

UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA



**MATERIALES METALORGÁNICOS
POROSOS CON COMPORTAMIENTO DUAL
EN DETOXIFICACIÓN DE COMPUESTOS
ORGANOFOSFORADOS Y REACTIVACIÓN
DE ACETILCOLINESTERASA**

PROGRAMA DE

DOCTORADO EN QUÍMICA

Javier David Martín Romera

Granada, 2023

Directores de la Tesis Doctoral:

Prof. Jorge Andrés Rodríguez Navarro

Prof. Francisco Jesús Carmona Fernández

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Javier David Martín Romera
ISBN: 978-84-1195-208-8
URI: <https://hdl.handle.net/10481/89831>

A mi madre

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer al Catedrático Jorge Andrés Rodríguez Navarro y al Prof. Francisco Jesús Carmona Fernández por la dirección de esta Tesis Doctoral, por confiar en mí, por su dedicación y consejos que tanto me han ayudado a nivel científico a lo largo de estos años. También me gustaría agradecer especialmente a Purificación Sánchez, mi mentora, por confiar en mí desde el primer momento y ayudarme incondicionalmente. Por preocuparse por mí y por tantos buenos consejos.

También quisiera agradecer a mis compañeros de laboratorio/departamento y a toda la gente que me ha acompañado durante esta Tesis. A Pedro Loja, por su incansable motivación que tanto me ayudó al comienzo de esta Tesis. Por enseñarme a nunca dejar de soñar, y a luchar por mis sueños. A Rodri, por enseñarme a estresarme con la calma, algo de lo que poca gente es capaz. A Esther, por confiarme su Totoro y hacerme pensar siempre en mi Tesis. A Pablo el petao, por animarme siempre en mis proyectos deportivos y enseñarme que con confianza y determinación uno es capaz hasta de mover la rueda de un tractor. A Juanra, por creer en mí y acompañarme en tantas carreras. A Aritz por tantas lasañas, mila esker lagun. A Andrea, mi amigo italiano, por tantas horas de *biliardo* y mojitos, grazie mille. A Rebecca, por transmitirme siempre su positividad. A Marta Salvachuli por su simpatía y tantos ratos de conversación. A Laura, por su ayuda y consejos desde el Grado, y a Manu por las excursiones. A Antonio, por todas las risas, bailes al ritmo de la ciencia, viajes al rocódromo y aventuras con sabor a pasta a la albondiguera. A Lydia, por ser la GGfa del laboratorio y reina de los fresquitos, por ayudarme tanto y por animarnos siempre a todos (¡venga chicos!). Al Ahe, por apuntarse a un bombardeo. A Pedro el largo, por compartir conmigo tantos succulentos menús en los comedores. A Emilio, por tantos mantecados y buenos momentos, viva el Betis. A Carmen, por sus consejos de viaje. A Pilar, Álex, y al resto del club del desayuno por tantas mañanas en el Menorca. A Miguel de Geología, por estar ahí y entenderme. A Sara y a Álvaro, por compartir mis penas. A Yating, por su compañía. A Chiqui, por todos sus saludos. A Pablo Garrido, quien a pesar de haber compartido poco tiempo conmigo ha sabido transmitirme cercanía y valiosos consejos. A Víctor, por acogermme con simpatía y aportarme su tranquilidad natural durante la escritura de esta Tesis. A Migue, Jose María, Elisa, Carmen, Natalia, Manuel, Antoñillo, Jose M., Nati, Juanma, Miguel... y el

resto de profesores. Mención especial se merecen Mari Carmen y Antonio de la Torre, a quienes se echará mucho de menos y sin los cuales el Departamento nunca será igual.

También quisiera agradecer la ayuda y colaboración de los técnicos del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, en especial a Fátima, Geli, Alicia, María José, Ali e Irene.

Furthermore, I would like to thank Prof. Paolo Falcaro and Dr. Francesco Carraro for welcoming me in Austria and for their guidance. To all my lab partners: Michi, Carlos, Simon, Tiziana, Lea, Verena, Mercedes, Miriam, Cathy, Teodora... for the moments (and sausages) we shared. Danke für alles.

A mi achoamigo Jaime, por todas las risas y noches de gambiteo a lo largo de estos años, eres como un hermano. A Chema, mi amigo motrileño que en tantas aventuras y desventuras me ha acompañado. Por todas las tardes de dardos y fútbolín, paseos al Alcampo y dibujos de Garfield.

A mi madre, a quien va dirigida esta Tesis, por quererme y apoyarme siempre de manera incondicional.

A Cristina, mi compañera de vida, gracias por iluminar mis días y sacarme siempre una sonrisa. Por estar siempre a mi lado, te quiero.

Por último, me gustaría expresar mi gratitud a las entidades responsables de la financiación de los proyectos sin los cuales esta Tesis no habría sido posible. Gracias a la Universidad de Granada, a la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (P20_00672, B-FQM-364-UGR18 y B-FQM-006-UGR18), al Ministerio de Ciencia e Innovación (TED2021-129886B-C41), al Ministerio de Economía, Comercio y Empresa (PID2020-113608RB-I00) y al Fondo Europeo de Desarrollo Regional de la Unión Europea (B-FQM-364-UGR18 y B-FQM-006-UGR18).

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	5
CAPÍTULO I: Introducción	9
1 Compuestos organofosforados	11
1.1 Estructura química y clasificación	11
1.2 Toxicidad y mecanismo de acción	14
1.3 Tratamiento actual del envenenamiento por compuestos organofosforados	17
2 Materiales para la detoxificación de compuestos organofosforados y el transporte y liberación controlada de fármacos.....	21
2.1 Liposomas	23
2.2 Nanopartículas.....	24
2.3 Materiales porosos	24
2.4 Carbón activado	25
2.5 Sílices mesoporosas	26
2.6 Zeolitas.....	26
2.7 Polímeros de coordinación porosos.....	26
2.8 Poliedros metal-orgánicos	33
3 Referencias bibliográficas	35
OBJETIVOS	41
CAPÍTULO II: Redes metal-orgánicas de circonio con propiedades duales de captura y detoxificación de compuestos organofosforados	47
1 Redes metal-orgánicas para el transporte y liberación de antidotos de compuestos organofosforados.....	49

2 Síntesis y caracterización del MOF de circonio(IV) y encapsulación de una oxima neutra	52
2.1 Liberación controlada de la oxima RS69N	56
2.2 Reactivación de la enzima acetilcolinesterasa mediante la oxima RS69N	58
2.3 Descontaminación de compuestos organofosforados modelo tipo G	60
3 Conclusiones	64
4 Referencias bibliográficas	67
 CAPÍTULO III: Poliedros metal-orgánicos de circonio como vehículos de agentes reactivadores de acetilcolinesterasa	
69	
1 Poliedros metal-orgánicos de circonio(IV)	71
2 Síntesis y caracterización de poliedros metal-orgánicos	73
3 Encapsulación y liberación controlada de la oxima pralidoxima	77
3.1 Encapsulación de la oxima pralidoxima	77
3.2 Liberación controlada de la oxima pralidoxima	80
4 Detoxificación de agentes nerviosos tipo G	81
5 Ensayos biofísicos de inhibición y reactivación enzimática	83
6 Incorporación en liposomas de fosfatidilcolina	85
7 Ensayos in vitro de neurotoxicidad	86
8 Conclusiones	87
9 Referencias bibliográficas	89
 CAPÍTULO IV: Detoxificación de compuestos organofosforados inducida por la degradación estructural de redes metal-orgánicas zeomiméticas	
91	
1 Redes metal-orgánicas zeomiméticas	93

2	Síntesis y caracterización de las redes metal-orgánicas zeomiméticas	96
3	Reactividad frente a modelos de agentes nerviosos tipo G	98
3.1	Impacto de la basicidad del ligando y la topología de los ZIFs.....	98
3.2	Impacto del tamaño de partícula	102
3.3	Reactivación de la enzima acetilcolinesterasa inducida por la degradación epitaxial de ZIFs.....	107
4	Materiales híbridos esterasa@ZIF	111
5	Conclusiones	113
6	Referencias bibliográficas	114
	CONCLUSIONES.....	117
	CONCLUSIONS.....	119
	ANEXO I: Detalles experimentales.....	121
1	Materiales y métodos	123
1.1	Materiales y reactivos.....	123
1.2	Métodos físicos y químicos de caracterización	123
2	Redes metal-orgánicas de circonio con propiedades duales de captura y detoxificación de compuestos organofosforados.....	128
2.1	Síntesis y caracterización	128
2.2	Encapsulación de la oxima RS69N en el MOF-808.....	129
2.3	Liberación de la oxima RS69N	131
2.4	Ensayos de actividad enzimática	134
3	Poliedros metal-orgánicos de circonio como vehículos de agentes reactivadores de acetilcolinesterasa.....	140
3.1	Síntesis de poliedros metal-orgánicos	140

3.2	Caracterización física y química	145
3.3	Estudios de adsorción de DIFP	174
3.4	Ensayos UV-Vis.....	177
3.5	Modelado computacional (localizador de adsorbatos)	178
3.6	Ensayos de viabilidad celular	180
4	Detoxificación de compuestos organofosforados inducida por la degradación estructural de redes metal-orgánicas zeomiméticas	181
4.1	Síntesis de redes metal-orgánicas zeomiméticas (ZIFs).....	181
4.2	Caracterización física y química	184
4.3	Estudios de degradación de DIFP y DICP	190
4.4	Ensayos enzimáticos	217
4.5	Cultivos celulares y ensayos de viabilidad	221
4.6	Síntesis y caracterización de materiales híbridos esterasa@ZIF	221
5	Referencias bibliográficas	225
	ANEXO II: Listado de publicaciones	227

RESUMEN

La erradicación del hambre es uno de los principales retos del siglo XXI, algo que requiere incrementar enormemente la producción de los cultivos actuales y con ello el uso de pesticidas. Entre los principales tipos de pesticidas se encuentran los compuestos organofosforados (OPs, del inglés *Organophosphorus compounds*) que, si bien se encuentran regulados por la Unión Europea, se utilizan ampliamente y suponen un gran riesgo para la salud humana y el medio ambiente. Desgraciadamente, también se ha incrementado el uso de otra clase de compuestos organofosforados, los agentes de guerra química (CWAs, del inglés *Chemical Warfare Agents*) de tipo nervioso.

Los OPs resultan especialmente tóxicos dado que, una vez se introducen en el organismo, su carácter lipofílico les permite atravesar diversos tejidos, entre ellos la barrera hematoencefálica (BBB, del inglés *Blood-Brain Barrier*), pudiendo llegar al cerebro donde inhiben a la enzima acetilcolinesterasa (AChE) al unirse a su centro activo. Esta enzima posee un papel imprescindible en la transmisión del impulso nervioso, ya que se encarga de regular la concentración del neurotransmisor acetilcolina (ACh) en la sinapsis nerviosa. Si la AChE no es capaz de llevar a cabo su función, se produce una acumulación de la ACh que provoca la saturación de los receptores neuronales asociados. De esta forma, tiene lugar una transmisión continua del impulso nervioso que, en última instancia, produce la muerte.

Actualmente, el tratamiento principal para la intoxicación por OPs incluye la administración de agentes reactivadores de la AChE como las oximas, capaces de romper el enlace fosfoéster entre el OP y la enzima AChE y con ello reactivar dicha enzima. Sin embargo, este tratamiento presenta distintas limitaciones, entre ellas un bajo rendimiento terapéutico consecuencia de que la administración de oxima no se produce de forma controlada y continua. A este respecto, la utilización de tratamientos alternativos como la administración de esterasas, capaces de reemplazar la actividad de la AChE inhibida y/o actuar a modo de sumideros de OPs, podrían ser una alternativa válida. De esta forma, resulta de especial importancia desarrollar materiales que sirvan para el transporte y liberación de manera controlada de esta clase de antídotos frente a la intoxicación por OPs (p.ej., oximas y biomoléculas). Con respecto a esto, el uso de redes metal-orgánicas

(MOFs), que son materiales poros cristalinos constituidos por núcleos metálicos unidos por ligandos orgánicos, o de los poliedros metal-orgánicos (MOPs), sus análogos moleculares, podría ser una opción viable en el tratamiento de la intoxicación por OPs. Estos materiales pueden presentar una elevada porosidad hacia la captura de compuestos tóxicos (p.ej., OPs), así como hacia el almacenaje y liberación de agentes terapéuticos. A su vez, algunos de estos materiales, en particular los formados por Zr(IV), presentan una actividad catalítica elevada frente a la degradación hidrolítica de OPs.

En este contexto, en esta Tesis Doctoral se plantea el uso de MOFs y MOPs como sistemas duales en la captura y/o degradación de OPs y el transporte y liberación de fármacos (oximas) y/o biomoléculas (enzimas tipo esterasa) para el tratamiento de la intoxicación por OPs.

Concretamente, en el Capítulo II se ha llevado a cabo la síntesis y caracterización de un material híbrido nuevo basado en la red metal-orgánica de Zr(IV) MOF-808 $[\text{Zr}_6\text{O}_4(\text{OH})_4(\text{BTC})_2(\text{HCOO})_6]$, BTC = ácido benceno-1,3,5-tricarboxílico) y la oxima neutra RS69N (2-(hidroxiimino)-*N*-2-(piperidin-1-il)etilacetamida). Asimismo, se ha evaluado de este material híbrido, denominado RS69N@MOF-808, para actuar como un sistema dual en el tratamiento de la intoxicación por OPs. Para ello, se ha analizado su capacidad para detoxificar DIFP en fluido biológico simulado. Asimismo, se ha determinado su capacidad para liberar de forma controlada y continua la oxima RS69N, así como la capacidad de la oxima liberada para reactivar AChE previamente inhibida por DIFP.

En el Capítulo III se ha evaluado la posibilidad de emplear poliedros metal-orgánicos de Zr(IV) como agentes duales para la detoxificación de OPs y el transporte y liberación de fármacos reactivadores de AChE. Para ello, inicialmente se han sintetizado y caracterizado cajas tetraédricas moleculares catiónicas $[(n\text{-butilCpZr})_3(\text{OH})_3\text{O}]_4\text{L}_6\text{Cl}_6$ (Zr-MOP-1; L = ácido tereftálico, *n*-butilCp = *n*-butilciclopentadienilo y Zr-MOP-10; L = ácido bifenil-4,4'-dicarboxílico). Tras esto, se ha determinado la capacidad de estos sistemas para capturar el simulador de agente nervioso DIFP. Asimismo, se ha evaluado su capacidad para almacenar y liberar de forma controlada el fármaco pralidoxima (2-PAM o 2-[(hidroxiimino)metil]-1-metilpiridin-1-ium), así como la de este fármaco para

reactivar AChE previamente inhibida por DIFP. Finalmente, se ha incorporado un sistema 2-PAM@Zr-MOP en liposomas biocompatibles de fosfatidilcolina y se ha estudiado su citotoxicidad sobre la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

En el Capítulo IV, se han sintetizado, a partir de ligandos imidazólicos de nucleofilicidad creciente (purina, benzimidazol, imidazol y 2-metilimidazol), distintas redes metal-orgánicas zeomiméticas (ZIFs) basadas en cinc: $\text{Zn}(\text{pIm})_2$ (ZIF-20), $\text{Zn}(\text{bIm})_2$ (ZIF-11), $\text{Zn}(\text{Im})_2$, $\text{Zn}(\text{mIm})_2$ (ZIF-L), $\text{Zn}(\text{mIm})_2$ (sod ZIF-8) y $\text{Zn}_3(\text{mIm})_5(\text{OH})$ (ZIF-EC-1). A este respecto, se sintetizaron partículas del material sod ZIF-8 con distinto tamaño (18 nm, 240 nm, 1.2 μm y 2 μm). Por otra parte, se ha estudiado el efecto que presenta la nucleofilicidad de los ligandos imidazólicos, la topología de las redes y los tamaños de partícula sobre la detoxificación de los compuestos simuladores de agentes nerviosos tipo G diisopropilfluorofosfato (DIFP) y diisopropilclorofosfato (DICP). También, se ha evaluado la degradación estructural asociada a esta detoxificación que experimentan los ZIFs y que tiene como consecuencia la liberación de los respectivos ligandos imidazólicos. Además, se ha determinado la capacidad de dichos ligandos imidazólicos para reactivar la enzima AChE previamente inhibida por DIFP. Por otro lado, se ha ensayado la neurotoxicidad de los sistemas sintetizados sobre una línea celular de neuroblastoma humano (SH-SY5Y). Finalmente, se ha sintetizado y caracterizado un material híbrido compuesto por la red metal-orgánica zeomimética ZIF-8 en fase sodalita (sod ZIF-8) y una enzima esterasa a modo de prueba de concepto sobre la utilización de ZIFs como sistemas para la administración de biomoléculas.

En resumen, en esta Tesis Doctoral se ha sintetizado un material híbrido novedoso formado por una oxima y un MOF de Zr(IV) capaz de actuar como agente dual en el tratamiento de la intoxicación por compuestos organofosforados. De manera similar, se han sintetizado distintas cajas moleculares catiónicas de Zr(IV) (Zr-MOPs) así como un material híbrido constituido por una oxima y un Zr-MOP, capaz también de servir como sistema dual en la intoxicación por organofosforados. Es más, se ha incrementado la biocompatibilidad de dicho material híbrido mediante la realización de liposomas de fosfatidilcolina no neurotóxicos. Por otra parte, se han sintetizado diversos ZIFs mediante ligandos imidazólicos de nucleofilicidad creciente y se ha llevado a cabo un estudio comparativo, en función de sus diferentes características fisicoquímicas, respecto a su

RESUMEN

capacidad para detoxificar agentes nerviosos tipo G y reactivar la enzima AChE. Finalmente, a modo de prueba de concepto, se ha desarrollado un material híbrido formado por una esterasa y un ZIF.

ABSTRACT

The eradication of hunger is one of the main challenges of the 21st century, something that requires an enormous increase in the production of current crops involving the use of pesticides. One of the most common types of pesticides are organophosphorus compounds (OPs) which, although regulated by the European Union, are widely used and pose a great risk to human health and the environment. Unfortunately, there has also been an increase in the use of another class of organophosphorus compounds, the nerve-type chemical warfare agents (CWAs).

OPs are particularly toxic because, once they are introduced into the body, their lipophilic nature allows them to cross various tissues, including the blood-brain barrier (BBB), ultimately reaching the brain where they inhibit the enzyme acetylcholinesterase (AChE) by binding to its active center. This enzyme plays an essential role in nerve impulse transmission, as it is responsible for regulating the concentration of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) at the nerve synapse. If AChE is not able to carry out its function, an accumulation of ACh occurs, causing saturation of the associated neuronal receptors. Thus, a continuous transmission of the nerve impulse takes place, which ultimately leads to death.

Currently, the main treatment for OPs poisoning involves the administration of AChE reactivating agents such as oximes, which can break the phosphoester bond between the OP and the AChE, reactivating the enzyme. However, this treatment has several limitations, including a low therapeutic yield because oxime administration does not occur in a controlled and continuous manner. For this reason, the use of alternative treatments such as the administration of esterases, capable of replacing the inhibited AChE activity and/or acting as OPs sinks, could be a valid alternative. Thus, it is of particular importance to develop materials that are able to transport and release in a controlled manner this class of antidotes (e.g., oximes and biomolecules) against OPs poisoning. In this regard, the use of metal-organic frameworks (MOFs), which are crystalline porous materials consisting of metal clusters bound by organic ligands, or metal-organic polyhedra (MOPs), their molecular analogs, could be a viable option in the treatment of OP poisoning. These materials can exhibit high porosity, which improves

the capture of toxic compounds (e.g., OPs) and the storage/release of therapeutic agents. In turn, some of these materials, in particular those with Zr(IV), present a high catalytic activity in the degradation of OPs.

In this context, this Doctoral Thesis proposes the use of MOFs and MOPs as dual systems for the capture and/or degradation of OPs and the transport/release of drugs (oximes) and/or biomolecules (esterase enzymes) for the treatment of OP poisoning.

Specifically, in Chapter II, the synthesis and characterization of a novel hybrid material based on the Zr(IV) metal-organic framework MOF-808 ($[\text{Zr}_6\text{O}_4(\text{OH})_4(\text{BTC})_2(\text{HCOO})_6]$, BTC = benzene-1,3,5-tricarboxylic acid) and the neutral oxime RS69N 2-(hydroxyimino)-N-2-(piperidin-1-yl)ethylacetamide has been carried out. Likewise, this hybrid material, named RS69N@MOF-808, has been evaluated to act as a dual system in the treatment of OPs poisoning. For this purpose, its capacity to detoxify DIFP in simulated biological fluid has been analysed. Additionally, its capacity to release in a controlled and continuous way oxime RS69N has been determined, as well as the capacity of the released oxime to reactivate AChE previously inhibited by DIFP.

In Chapter III, the possibility of employing Zr(IV) metal-organic polyhedra as dual agents for the detoxification of OPs and the transport/release of AChE reactivating drugs has been evaluated. For this reason, cationic molecular tetrahedral cages $[(\text{n-butylCpZr})_3(\text{OH})_3\text{O})_4\text{L}_6]\text{Cl}_6$ (Zr-MOP-1; L = terephthalic acid, n-butylCp = n-butylcyclopentadienyl and Zr-MOP-10; L = biphenyl-4,4'-dicarboxylic acid) have been initially synthesized and characterized. Next, the ability of these systems to capture the nerve agent simulant DIFP has been determined. Their ability to store and release in a controlled manner the drug pralidoxime (2-PAM or 2-[(hydroxyimino)methyl]-1-methylpyridin-1-ium), as well as the ability of this drug to reactivate AChE previously inhibited by DIFP, has also been evaluated. Finally, a 2-PAM@Zr-MOP system has been incorporated into biocompatible phosphatidylcholine liposomes and its cytotoxicity on the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y has been studied.

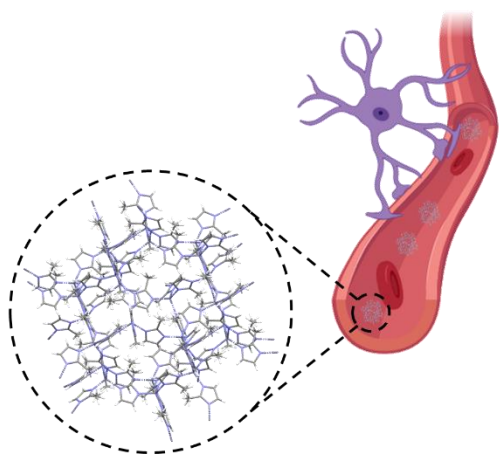
In Chapter IV, different imidazole ligands of increasing nucleophilicity (purine, benzimidazole, imidazole and 2-methylimidazole) have been used to synthesize zinc-based zeomimetic metal-organic frameworks (ZIFs): $\text{Zn}(\text{pIm})_2$ (ZIF-20), $\text{Zn}(\text{bIm})_2$ (ZIF-

11), $\text{Zn}(\text{Im})_2$, $\text{Zn}(\text{mIm})_2$ (ZIF-L), $\text{Zn}(\text{mIm})_2$ (sod ZIF-8) and $\text{Zn}_3(\text{mIm})_5(\text{OH})$ (ZIF-EC-1). In this regard, particles of the sod ZIF-8 material with different size (18 nm, 240 nm, 1.2 μm and 2 μm) were synthesized. Afterwards, the effect of the nucleophilicity of imidazole ligands, network topology and particle sizes on the detoxification of G-type nerve agent simulant compounds diisopropylfluorophosphate (DIFP) and diisopropylchlorophosphate (DICP) was studied. Also, the structural degradation of ZIFs, associated with this detoxification and that result in the release of the respective imidazole ligands, has been evaluated. In addition, the ability of these imidazole ligands to reactivate AChE, previously inhibited by DIFP, has been determined. Besides, the neurotoxicity of the synthesized systems has been tested on a human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y). Finally, a hybrid material composed of the zeomimetic metal-organic frameworks ZIF-8 in sodalite phase (sod ZIF-8) and an esterase enzyme has been synthesized and characterized as a proof of concept on the use of ZIFs as biomolecule delivery systems.

In summary, in this Doctoral Thesis a novel hybrid material consisting of an oxime and a Zr(IV) MOF, capable of acting as a dual agent in the treatment of organophosphorus poisoning, has been synthesized. Similarly, different cationic Zr(IV) molecular cages (Zr-MOPs), as well as a hybrid material based on an oxime and a Zr-MOP, capable of serving as a dual system in OPs have been synthesized. Moreover, the biocompatibility of such hybrid material has been increased by its incorporation into non-neurotoxic phosphatidylcholine liposomes. Moreover, several ZIFs have been synthesized using imidazole ligands of increasing nucleophilicity. Also, a comparative study has been carried out, based on their different physicochemical characteristics according to their ability to detoxify G-type nerve agents and reactivate AChE. Finally, as a proof of concept, a hybrid material consisting of an esterase enzyme and a ZIF has been developed.

CAPÍTULO I

Introducción



1 Compuestos organofosforados

Los compuestos organofosforados (OPs, del inglés *Organophosphorus compounds*) se comenzaron a emplear como insecticidas en agricultura a comienzos del siglo XX. Sin embargo, el hecho de que se pudiesen sintetizar y modificar con relativa facilidad hizo que, desgraciadamente, pronto se empezasen a utilizar como agentes de guerra química (CWAs del inglés, *Chemical Warfare Agents*). [1] Desde entonces, se han utilizado continuamente en numerosos conflictos armados (p.ej., gas sarín en la guerra civil siria) [2], ataques terroristas (p.ej., gas sarín en el atentado del metro de Tokio de 1995) [3] y asesinatos (p.ej., VX en el asesinato de Kim Jong-Nam) [4]. En cualquier caso, de forma paralela, también se han desarrollado numerosos compuestos organofosforados para ser utilizados como pesticidas en agricultura y jardinería, existiendo actualmente más de 100 OPs estructuralmente diferentes comercializados para dichos fines. [5], [6]

1.1 Estructura química y clasificación

La estructura química básica de todos los compuestos organofosforados se encuentra descrita por la fórmula de Schrader (Figura 1.1). De esta forma, la diversidad estructural de los compuestos organofosforados depende de los diferentes sustituyentes del átomo de fósforo. Los sustituyentes en R1 y R2 pueden ser grupos amino, alcoxi o alquilo mientras que el sustituyente en X se trata de un grupo acilo lábil (haluro, ciano, fenol o tiol) conocido como grupo saliente. [7]

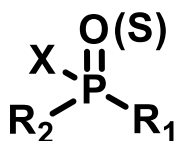


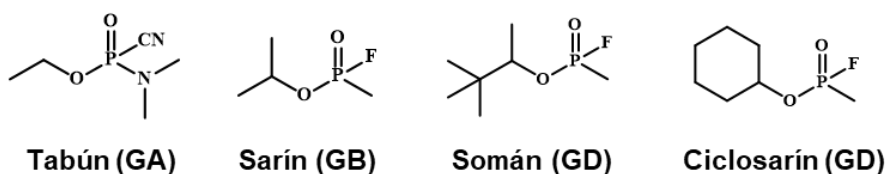
Figura 1.1. Fórmula de Schrader que representa la estructura química básica de los compuestos organofosforados.

La reactividad de los compuestos organofosforados depende de su estructura química. Así, la electrofilicidad del átomo de fósforo resulta crucial para las acciones biológicas este tipo de compuestos. Aquellos organofosforados que presentan dobles enlaces entre átomos de oxígeno y fósforo resultan altamente electrofílicos y, gracias a esto, altamente reactivos. Los grupos que incrementan la reactividad del átomo de fósforo son los grupos

halógeno, nitro, ciano, halógeno, cetona y éster carboxílico. Por el contrario, entre aquellos grupos que desactivan el átomo de fósforo se encuentran los grupos ácido carboxílico e hidroxilo. [7]

Los compuestos organofosforados empleados como agentes de guerra química se engloban dentro de la categoría de agentes nerviosos. [1] Dichos agentes se caracterizan por su elevada toxicidad, ya que actúan sobre el sistema nervioso central (SNC). [8] Es posible clasificar los agentes nerviosos en dos tipos: serie G (del inglés *German agents*), y serie V (del inglés, *venomous agents*). [9] Los primeros en aparecer (desarrollados poco antes y durante la Segunda Guerra Mundial) fueron los de la serie G, entre los que se incluyen el tabún (GA o dimetilfosforamidocianidato de O-etilo), el sarín (GB o 2-[fluoro(metil)fosforil]oxipropano), el somán (GD, metilfosfonofluoridato de O-pinacólilo) y el ciclosarín (GF o metilfosfonofluoridato de ciclohexilo) (Figura 1.2a). [9], [10]. Entre los agentes de la serie V, desarrollados tras la Segunda Guerra Mundial, es posible encontrar el VX (S-[2-(diisopropilamino)etil]metilfosfonotioato de O-etilo, desarrollado por Gran Bretaña) y sus isómeros RVX (desarrollado por Rusia) y CVX (desarrollado por China), entre otros (Figura 1.2b). Todos los agentes nerviosos se caracterizan por ser líquidos a temperatura ambiente y presentar cierta volatilidad, si bien los agentes de la serie V presentan una menor volatilidad que los de la serie G y por lo tanto una mayor toxicidad y persistencia en el medio ambiente. [11], [12].

a)



b)

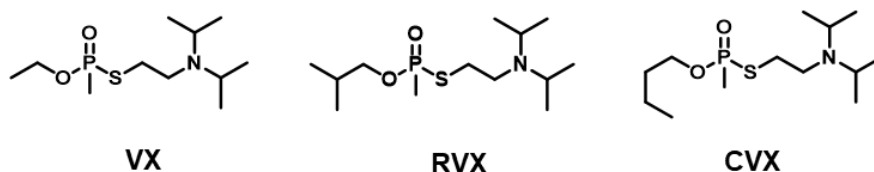


Figura 1.2. Estructura química de los principales agentes nerviosos organofosforados.

Sin embargo, debido a la elevada letalidad de los agentes nerviosos, su uso se encuentra altamente regulado por la Organización para la Prohibición de las Armas Químicas (OPCW del inglés, *Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons*) [13]. De esta forma, para actividades de investigación, es necesario utilizar simuladores de agentes nerviosos, es decir, compuestos con una estructura química y un comportamiento fisicoquímico similar al de los agentes nerviosos pero que presentan una toxicidad menor (Figura 1.3). [1]

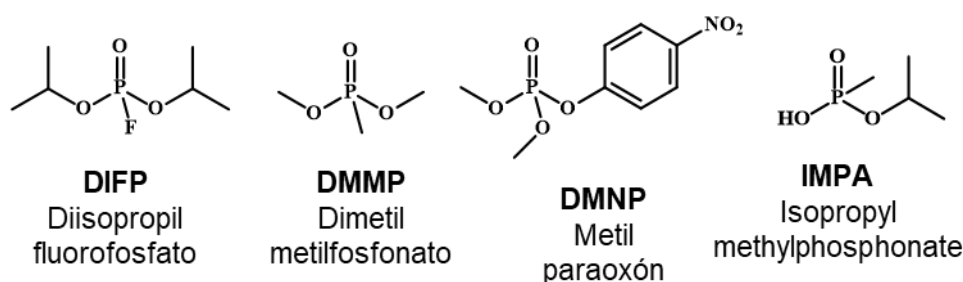


Figura 1.3. Estructuras químicas de simuladores de agentes nerviosos.

Por otra parte, es posible clasificar los pesticidas organofosforados en cuatro subgrupos principales en función de los sustituyentes del átomo de fósforo de la fórmula de Schrader (Figura 1.4): (i) fosfatos (p.ej., glifosato), (ii) fosforotioatos (p.ej., clorpirifós y paratión), (iii) fosforoditioatos (p.ej., etoprofós y malatión) y (iv) amidofosfato (p.ej., fenamifós). [14]

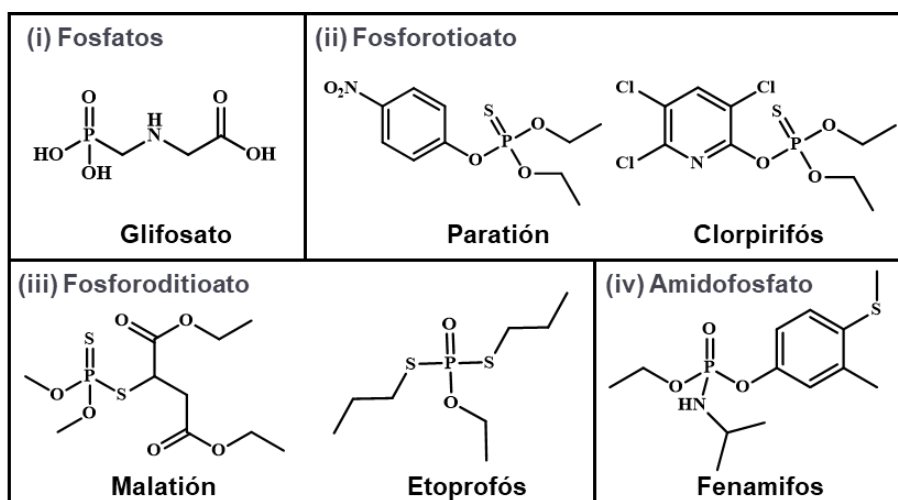


Figura 1.4. Estructuras químicas de distintos tipos de pesticidas organofosforados.

1.2 Toxicidad y mecanismo de acción

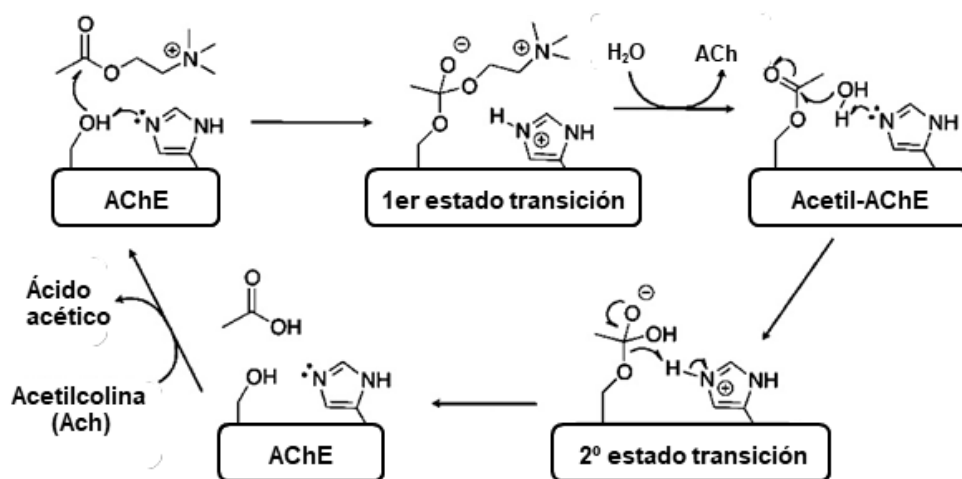
Las principales rutas de exposición a los compuestos organofosforados, entre ellos determinados agentes de guerra química y pesticidas, son la inhalación y el contacto dérmico, si bien otras vías como ingestión e inyección también son posibles. Una vez los compuestos organofosforados pasan al torrente sanguíneo se distribuyen a distintas partes del cuerpo, incluyendo el sistema nervioso central ya que son capaces de atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica (BBB, del inglés *Blood Brain Barrier*). [15]

Principalmente, dichos compuestos ejercen su acción inhibiendo de forma irreversible la enzima acetilcolinesterasa (AChE), si bien también son capaces de actuar sobre otras colinesterasas como la enzima butirilcolinesterasa (BChE). La butirilcolinesterasa se trata de una esterasa presente en el plasma sanguíneo capaz de hidrolizar ésteres de colina, como el neurotransmisor acetilcolina (ACh) e incluso sustratos más voluminosos (p.ej., butirilcolina). [16] Su papel fisiológico real se desconoce actualmente, si bien se sabe que participa en la detoxificación y el metabolismo de compuestos tóxicos tipo éster (p.ej., aspirina o cocaína). [17], [18]

Por otro lado, la enzima acetilcolinesterasa es una hidrolasa de serina encargada de hidrolizar el neurotransmisor acetilcolina, presente en las sinapsis neuronales y neuromusculares, cuya función es transmitir el impulso nervioso. [19] De forma general, la acetilcolina estimula la secreción de fluidos corporales y la contracción de los músculos esqueléticos y afecta a una gran cantidad de circuitos neuronales en el sistema nervioso central. En condiciones normales, las acciones de la acetilcolina sobre sus receptores (denominados colinérgicos y que pueden ser de dos tipos, muscarínicos o nicotínicos) finalizan cuando es hidrolizada por la AChE, lo que evita que se produzca una continua sobreestimulación de dichos receptores. De esta forma, la inhibición de la AChE impide la degradación de la acetilcolina, por lo que dicho neurotransmisor se acumula y se produce una sobreestimulación de los receptores asociados en los tejidos diana. Entre los efectos de la inhibición de la AChE se incluyen contracciones musculares involuntarias y aumento en la secreción de fluidos (p.ej., lágrimas, saliva), debido a la acumulación de acetilcolina en el sistema nervioso periférico, y convulsiones, como resultado de la acumulación de acetilcolina en el sistema nervioso central. En última

instancia, puede causar la muerte por disfunción respiratoria como resultado de la parálisis de los músculos respiratorios, broncoconstricción, aumento de las secreciones pulmonares y depresión del centro respiratorio del cerebro. [15]

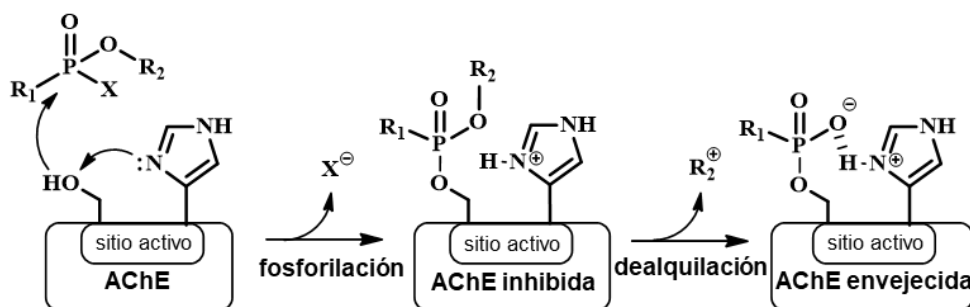
En cuanto al mecanismo de acción, en condiciones fisiológicas, la hidrólisis de la ACh se produce gracias a una tríada formada por residuos de serina-histidina-glutamato presente en el centro activo de la enzima AChE. El mecanismo catalítico se desarrolla en dos etapas: (i) en la primera etapa, la serina realiza un ataque nucleofílico sobre la acetilcolina, formándose un primer estado de transición tetraédrico que finalmente da lugar al complejo acetil-enzima, con la subsecuente liberación de colina; (ii) en la segunda etapa, una molécula de agua, activada por una histidina cercana, ataca a la acetilserina, dando lugar a la formación de un segundo estado de transición tetraédrico que finalmente da lugar, de nuevo, a la enzima libre, liberándose por tanto ácido acético (Esquema 1.1).



Esquema 1.1. Mecanismo de acción de la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina (ACh) llevada a cabo por la enzima acetilcolinesterasa (AChE). Adaptado de [9]

El mecanismo de inhibición de la enzima AChE por parte de los compuestos organofosforados es similar al primer paso de la hidrólisis previamente mencionada. En este caso, una vez el compuesto organofosforado alcanza el centro activo del enzima, un residuo de serina allí presente ataca nucleofílicamente al átomo de fósforo de dicho compuesto. Esto da lugar a la formación de un estado de transición bipiramidal, que precede a la salida del grupo saliente en el compuesto organofosforado, y a la subsecuente

fosforilación de la serina como consecuencia de la formación de un enlace fósforo-oxígeno (aducto enzima-organofosforado). Este aducto fosforilado se asemeja al primer estado de transición que se produce en la hidrólisis de la ACh en condiciones fisiológicas. Sin embargo, en este caso la histidina del centro activo no es capaz de llevar a cabo su función activando una molécula de agua dado que, o bien se encuentra en una conformación no favorable (como por ejemplo ocurre en la intoxicación por los compuestos VX [20] y tabún [21]) o apantallada del agua (como ocurre en la intoxicación por derivados del somán [22]). Por lo tanto, la hidrólisis espontánea del aducto enzima@organofosforado resulta extremadamente lenta, tardando desde horas hasta días en función del compuesto organofosforado. Además, la hidrólisis espontánea de dicho aducto compite con una reacción intramolecular dependiente del tiempo que se conoce como “envejecimiento”. [23] Esta reacción consiste, por lo general, en una desalquilación del grupo alcoxi presente en el átomo de fósforo, que tiene como resultado la formación de un aducto fosfonato. Entonces, el oxoanión fosfónico resultante forma un puente salino con la histidina de la tríada protonada que estabiliza enormemente el conjugado [21], [24] (Esquema 1.2). Además, el oxoanión fosfónico previene que cualquier nucleófilo cargado negativamente se aproxime al átomo de fósforo. De esta forma, una vez el conjugado enzima@organofosforado se encuentra envejecido, no es posible su hidrólisis y por lo tanto no resulta posible la reactivación del enzima. El tiempo de vida media de la reacción de envejecimiento varía en función del compuesto organofosforado, siendo de entre 2 y 4 min para el somán, 5 h para el sarín, 46 h para el tabún y 48 h para el VX. [25]



Esquema 1.2. Mecanismo de inhibición de la enzima AChE por compuestos organofosforados y reacción de “envejecimiento”. Adaptado de [9].

1.3 Tratamiento actual del envenenamiento por compuestos organofosforados

Debido a la amplia utilización de los compuestos organofosforados, desde su aplicación como pesticidas en agricultura hasta su uso como agentes de guerra nerviosos, estos compuestos suponen un gran riesgo para la salud. [26] Se estima que unos tres millones de personas se encuentran expuestas a los compuestos organofosforados anualmente, de entre las cuales se producen unas 300 000 muertes a nivel mundial. [27] Por ello, es de un gran interés social desarrollar nuevos métodos que permitan la detoxificación de los compuestos organofosforados, así como el tratamiento de la intoxicación por dichos compuestos.

Entre los principales mecanismos para la detoxificación de compuestos organofosforados se encuentran la adsorción, mediante el uso de adsorbentes que capturan los compuestos tóxicos desde una disolución acuosa; y la hidrólisis, ya sea en medio básico o mediante la acción de un catalizador, que transforma los compuestos organofosforados tóxicos en productos de degradación inocuos, o de un menor grado de toxicidad. [28]

Respecto al tratamiento convencional de la intoxicación por compuestos organofosforados, actualmente se utilizan tres tipos de compuestos: (i) fármacos anticolinérgicos (p.ej., atropina), (ii) fármacos reactivadores de la enzima AChE (p.ej., oximas) y (iii) fármacos anticonvulsivos (p.ej., benzodiazepinas). [7] Asimismo, un posible tratamiento alternativo puede ser la introducción intravenosa o intramuscular de biomoléculas que actúen como sumideros de compuestos organofosforados (p.ej., esterasas). [29]

En relación con los tratamientos alternativos, los sumideros de OPs (como la enzima butirilcolinesterasa e incluso la propia acetilcolinesterasa) actúan siendo objetivo de los OPs y, de esta forma, se reduce la concentración de los compuestos organofosforados en el organismo. [30] De hecho, se ha propuesto administrar a humanos suero humano enriquecido en BuChE como medida profiláctica ante la exposición de OPs ya que, entre otras cosas, esta enzima reacciona rápidamente con todos los tipos de OPs ofreciendo un

amplio abanico de protección. [31] Sin embargo, la principal desventaja es que resulta complejo desde un punto de vista económico y logístico obtener BuChE humana en grandes cantidades. [32] De esta forma, el uso de esterasas alternativas más económicas (p.ej., esterasa porcina) podría suponer una solución viable a este problema.

Con respecto a los tratamientos tradicionales, las benzodiazepinas (de las cuales la más utilizada es el diazepam) actúan, entre otros, inhibiendo la liberación de la acetilcolina en las sinapsis neuronales y neuromusculares. Por otra parte, la atropina actúa compitiendo con la acetilcolina por la unión a los receptores colinérgicos, pero únicamente es capaz de actuar sobre aquellos de tipo muscarínico. A su vez, únicamente resulta eficaz por un período limitado de tiempo. [7] Por el contrario, los fármacos como las oximas, que actúan reactivando a la enzima acetilcolinesterasa inhibida por compuestos organofosforados, pueden llegar a revertir por completo el efecto tóxico de dichos compuestos si se administran a tiempo. [33] De esta forma, la investigación de fármacos reactivadores de AChE como las oximas resulta de especial importancia a la hora de encontrar un tratamiento eficaz en el envenenamiento por compuestos organofosforados.

1.3.1 Fármacos reactivadores de la enzima acetilcolinesterasa

El primer fármaco reactivador de la AChE empleado con éxito para el tratamiento de la intoxicación por OPs fue la hidroxilamina, en 1957. [34] A partir de entonces, se comenzó a investigar de forma más extensa sobre esta clase de antidotos, lo que llevó al desarrollo de las oximas ($RCH = NOH$). [7] Dichas oximas resultan mucho más eficaces que la hidroxilamina, siendo capaces de reactivar la enzima AChE hasta un millón de veces más rápido. [35] La primera oxima eficaz desarrollada, y también la más utilizada en el tratamiento de la intoxicación por OPs, es la pralidoxima (abreviada como 2-PAM), aunque entre otras oximas relevantes se incluyen la obidoxima, metoxima, HI-6 y HLö-7 (Figura 1.5). [36]

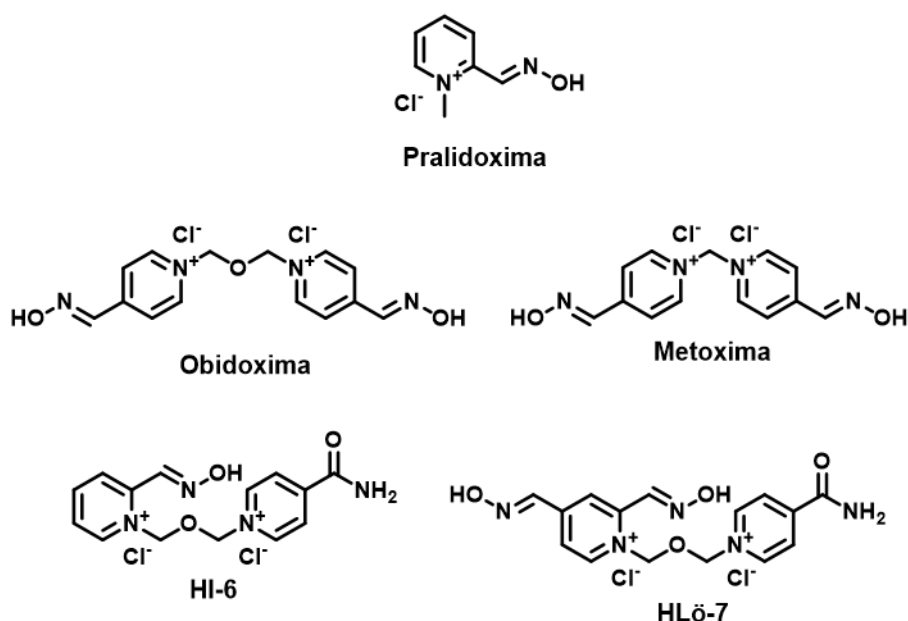


Figura 1.5. Estructura química de distintas oximas.

En cualquier caso, ninguna de las oximas desarrolladas actualmente supone un antídoto universal frente a la intoxicación causada por los distintos tipos de compuestos organofosforados existentes. [37] Por otra parte, muchas de las oximas, entre ellas las previamente mencionadas, son incapaces de atravesar la barrera hematoencefálica y por lo tanto de llegar al cerebro debido a que se encuentran cargadas positivamente. [38] De esta forma, desde el descubrimiento de las oximas se han empleado diferentes estrategias para intentar obtener una oxima capaz de atravesar la BBB y que resulte eficaz frente al mayor número posible de compuestos organofosforados. [39]

A este respecto, una de las primeras estrategias empleadas fue el uso de profármacos, es decir, derivados de fármacos que una vez administrados se metabolizan para convertirse en el fármaco que presenta el principio activo y que por lo tanto es capaz de llevar a cabo su función. [40] Concretamente, se empleó la pro-PAM, un profármaco de la pralidoxima capaz de atravesar la BBB y que se esperaba una vez en el cerebro fuese oxidado a pralidoxima. [41] Sin embargo, en ensayos *in vivo* se comprobó que menos del 10 % de la pro-PAM era capaz de alcanzar el cerebro y por lo tanto la eficacia no era lo suficientemente alta. [42] Otra estrategia utilizada ha sido el desarrollo de oximas con carga neta neutra, la primera de las cuales fue la monoisonitrosoacetona (abreviada como

MINA). Dicha oxima demostró ser eficaz en la reactivación de la AChE cerebral en conejillos de indias tras ser intoxicados con tres agentes nerviosos diferentes (VX, sarín y ciclosarín). [43] Sin embargo, no resultó tan eficaz como otros reactivadores ensayados frente a un mayor número de compuestos organofosforados. [44] Otra estrategia empleada ha sido el desarrollo de oximas conocidas como zwitteriónicas, estructuralmente aldoximas de imidazol u oximas con grupos acetamidas por lo general, que gracias al equilibrio existente entre su forma cargada y sin carga son capaces de atravesar la BBB. [45] De entre estas, oximas con estructuras muy similares como la RS194B y la RS69N (Figura 1.6) han demostrado resultar eficaces en la reactivación de AChE humana en ensayos *in vitro*. [45], [46]. Asimismo, ensayos *in vivo* han demostrado que la administración de RS194B a ratones intoxicados con VX incrementaba su supervivencia, si bien no presentó tan buenos resultados en un estudio similar con conejillos de indias y diferentes compuestos organofosforados. [47] A su vez, dicha oxima fue capaz de reducir los síntomas del envenenamiento por OPs en macacos envenenados con sarín. Algunos de estos animales recibieron un pretratamiento con butirilcolinesterasa humana recombinante en forma de aerosol antes de la intoxicación, lo que también favoreció la atenuación de la sintomatología. [48] Dichos estudios también se llevaron a cabo con el insecticida organofosforado paraoxón, obteniéndose resultados similares. [49]

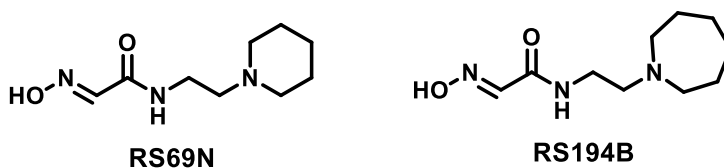
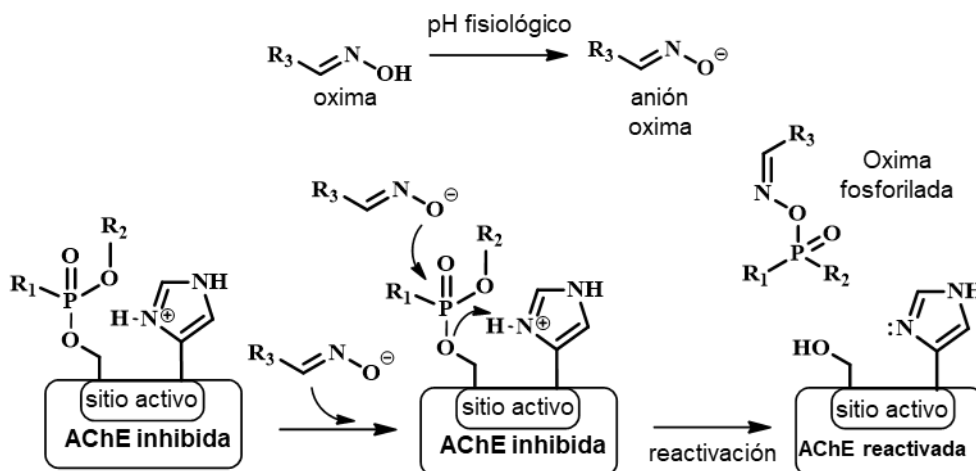


Figura 1.6. Estructura química de las oximas RS69N y RS194B.

Por otra parte, el mecanismo de reactivación de la AChE previamente inhibida por OPs se desarrolla en dos etapas (Esquema 1.3). Inicialmente, la oxima en su forma desprotonada (anión oximato), [50] se aproxima y realiza un ataque nucleófilo sobre el enlace covalente P-O entre el compuesto organofosforado y el residuo de serina del centro activo del enzima. Como consecuencia, se forma de manera reversible un conjugado entre la oxima y la enzima fosforilada que, finalmente, se rompe liberando la enzima libre (reactivada) y la oxima fosforilada. No obstante, se ha demostrado que esta

oxima fosforilada, si se encuentra a una concentración lo suficientemente elevada, es capaz de volver a inhibir a la AChE. [7], [16] Por otro lado, si la concentración de oxima es demasiado baja, la reactivación no se produce de forma significativa, lo que lleva a una reactivación inficiente. Por ello, la administración de la oxima de forma controlada resulta de especial importancia para el tratamiento de la intoxicación por compuestos organofosforados.



Esquema 1.3. Reactivación de AChE previamente inhibida por OPs llevada a cabo por una oxima.

2 Materiales para la detoxificación de compuestos organofosforados y el transporte y liberación controlada de fármacos

Muchos de los fármacos empleados en la actualidad presentan desventajas como baja biodisponibilidad, o una farmacocinética inadecuada que hace que sean rápidamente eliminados por el organismo. De esta forma, para que el tratamiento sea eficaz es necesario administrar altas dosis del fármaco, lo que conlleva efectos secundarios nocivos para la salud de los pacientes. Para evitar estos problemas, se requieren métodos de administración capaces de obtener una liberación en medio fisiológico de manera específica, prolongada y controlada. Para conseguirlo, una de las estrategias propuestas en las últimas décadas es la utilización de sistemas de liberación controlada de fármacos (DDS, del inglés *Drug Delivery System*). Un DDS se puede definir como una formulación o dispositivo capaz de almacenar y transportar un fármaco y liberarlo de forma controlada una vez ha alcanzado su objetivo. [51] De esta forma, mientras que en las terapias

tradicionales se obtiene una curva de concentración de fármaco en el organismo con numerosas variaciones, los DDS consiguen mantener los niveles de fármaco en el rango terapéutico, aumentando con ello su actividad y disminuyendo su toxicidad (Figura 1.7).

[52]

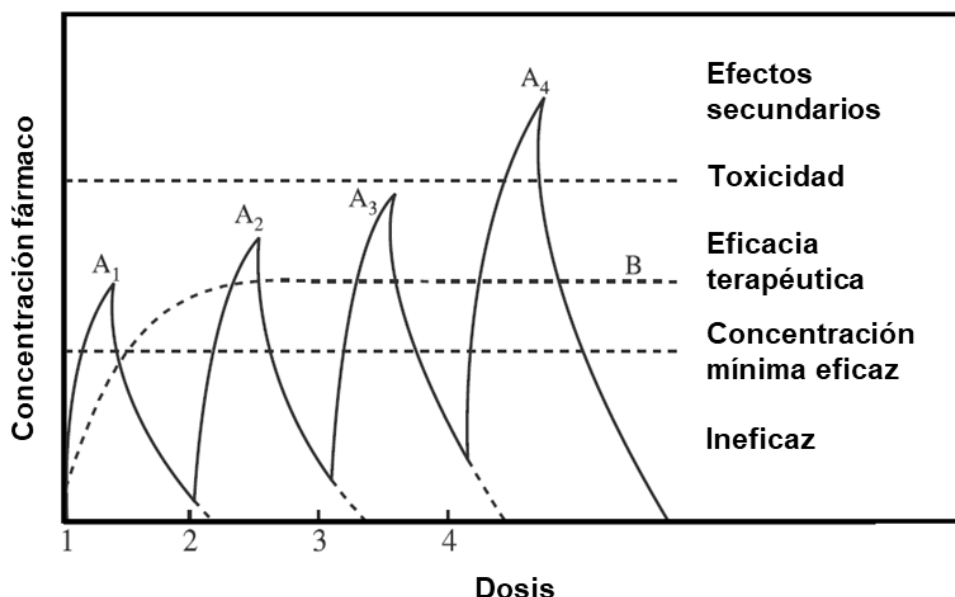


Figura 1.7. Comparación entre el perfil de liberación de un fármaco en el organismo tras la administración secuencial de dosis (línea sólida A_n) y empleando un DDS (línea discontinua B).

Imagen adaptada de [53].

Existen diferentes estrategias para incorporar el fármaco al DDS (p.ej., anclaje en superficie), de entre las cuales destaca se la encapsulación. De manera general, el uso de DDS presenta numerosas ventajas [54], [55]:

- Protege al fármaco de condiciones adversas, evitando su deterioro en el proceso de transporte.
- Reduce efectos secundarios adversos en caso de que los agentes de transporte sean biocompatibles y/o biodegradables.
- Aumenta la eficacia del tratamiento ya que favorece la internalización como consecuencia del uso de un vehículo de transporte adecuado.

- Mejora la especificidad del tratamiento, ya que se alcanzan las células objetivo de manera preferencial con baja internalización en las células sanas, reduciendo los efectos secundarios de forma notable.

Por esto, en los últimos años se ha estudiado el uso de diversos materiales como DDS, entre ellos liposomas, nanopartículas, carbones activos, zeolitas, sílices mesoporosas y polímeros de coordinación porosos. [56]

2.1 Liposomas

Los liposomas son vesículas lipídicas esféricas (generalmente de entre 50 y 500 nm de diámetro) compuestas por una o más bicapas lipídicas como consecuencia de la emulsión de lípidos en medio acuoso (Figura 1.8).

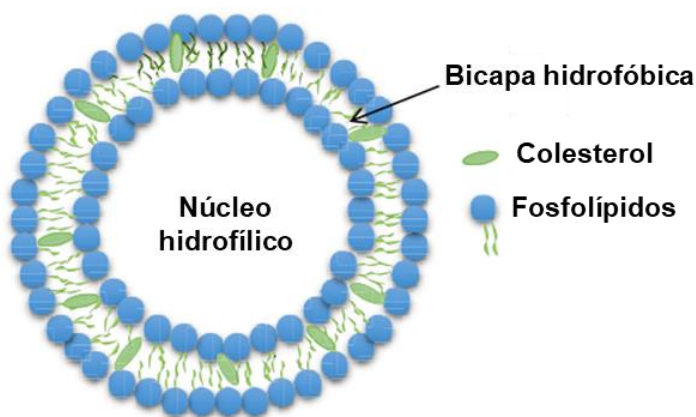


Figura 1.8. Representación esquemática de los liposomas. Adaptada de [57].

Su forma esférica, pequeño tamaño y naturaleza química (núcleo hidrofílico rodeado de una bicapa hidrofóbica) han hecho que se utilicen ampliamente como DDS. En función de su tamaño y el número de bicapas que presenten se clasifican en: vesículas unilamelares pequeñas, grandes o gigantes, vesículas multilaminares y vesículas multivesiculares. Respecto a su síntesis, el método más utilizado es el de hidratación de capa fina o método de Bangham. En él, inicialmente todos los lípidos y un fármaco hidrofóbico se disuelven en un disolvente orgánico adecuado, que posteriormente se evapora bajo presión reducida para generar una fina película. [58], [59] Dicha película es posteriormente rehidratada con una disolución acuosa tamponada (que a su vez puede

contener fármacos hidrofílicos para su incorporación en el núcleo del liposoma). Cuanto menor sea la ratio de hidratación, mayor será la eficiencia de encapsulación del fármaco. [58], [60] Cabe destacar que existen ejemplos reales en los que se usan liposomas como sistemas transportadores de fármacos, entre los que se puede destacar un sistema transportador del fármaco anticancerígeno doxorubicina funcionalizado con polietilenglicol (Doxil ®) para el tratamiento del sarcoma de Kaposi, [61] o el empleo de liposomas en las formulaciones de las vacunas de ARN mensajero frente a la COVID-19 (Pfizer/BioNTech y Moderna). En este último caso, los liposomas actuaban como agentes protectores para incrementar la estabilidad de los ingredientes activos tanto *in vivo* como *in vitro*. [62]

2.2 Nanopartículas

Las nanopartículas (NPs) son materiales con un tamaño de entre 1 y 100 nm en al menos una dimensión. [63] Entre ellos se encuentran las nanopartículas metálicas, comúnmente obtenidas de Au, Ag o Pt. De entre estos, las NPs de oro se han utilizado ampliamente como DDS por su elevada relación área superficial/volumen, biocompatibilidad y que son fáciles de sintetizar y funcionalizar. [64], [65] Como ejemplo de esto, Murawala y colaboradores [66] demostraron la capacidad de NPs de oro funcionalizadas con albúmina sérica bovina para transportar y liberar el fármaco anticancerígeno metrotexato, mejorando además el efecto inhibitorio de dicho fármaco de manera individual sobre la proliferación de células de cáncer de mama la línea MCF-7.

2.3 Materiales porosos

Los materiales porosos son un tipo de material que presentan en su interior un sistema formado por poros y canales. Dichas cavidades pueden presentar distinto tamaño (desde pocos angstroms hasta decenas de nanómetros), lo que les permite albergar desde moléculas de hidrógeno hasta grandes macromoléculas como enzimas. Los materiales porosos pueden ser cristalinos, en caso de que presenten un orden estructural de átomos que da lugar a cavidades de un tamaño y jerarquía definidas, o amorfos, sin ningún orden estructural y por tanto con una alta complejidad en la forma y tamaño de los poros. Esta

clase de materiales tienen en común una elevada área superficial, si bien suelen diferir en otras propiedades como la hidrofobicidad/hidrofiliidad, estabilidad química y térmica, densidad, etc. [67] Ejemplos de materiales porosos son polímeros de coordinación porosos, el carbón activo, las sílices mesoporosas y las zeolitas, entre otros (Figura 1.9). Gracias a sus características estos materiales han encontrado diversidad de aplicaciones que incluyen adsorción, catálisis, así como transporte y liberación de fármacos. Asimismo, muchos de estos materiales porosos podrían ser utilizados para la detoxificación de agentes contaminantes (p.ej., agentes de guerra química). [68]

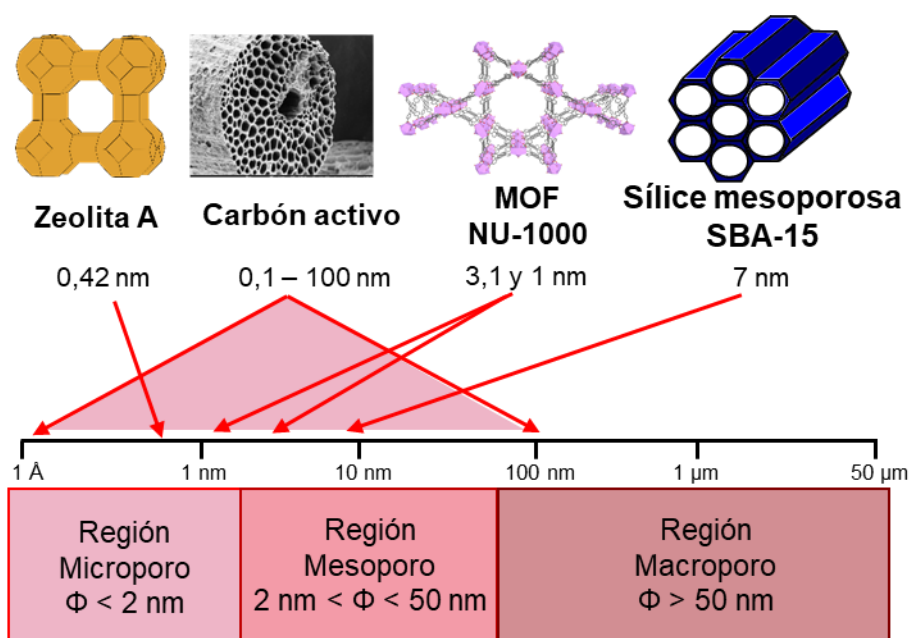


Figura 1.9. Distintos ejemplos de materiales porosos en relación con su distribución de tamaño de poro (Φ).

2.4 Carbón activado

El carbón activado o carbón activo (AC, del inglés *Activated Carbon*) es un material basado en carbono, con pequeñas cantidades de heteroátomos (p.ej., hidrógeno, oxígeno o nitrógeno) enlazados químicamente, así como ciertos componentes inorgánicos que varían en función de la materia prima que se utilice. Su estructura interna es compleja y amorfa, presentando canales y poros con diferente tamaño y morfología (desde 0.1 hasta 100 nm) [69]. Gracias a esto cuentan con una elevada superficie específica, por lo que se

han utilizado ampliamente en aplicaciones de adsorción. [70] Por ejemplo, se han empleado como protección frente a agentes de guerra químicos en filtros para máscaras y trajes de protección personal. [71], [72]

2.5 Sílices mesoporosas

Las sílices mesoporosas son materiales formados por una estructura ordenada con poros y canales de tamaño definido (2 – 50 nm) que se encuentran separados por paredes de sílice amorfa (SiO_2). Presentan una gran superficie específica (entre 50 y 1500 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) y un volumen de poro en torno a 1 $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$. Gracias a estas características, han encontrado aplicación en campos como catálisis, sensores o separación. [73] También se ha descrito su aplicación como DDS, aunque su baja capacidad de carga (debida a su baja capacidad de adsorción) y la rápida liberación del fármaco que producen (consecuencia de su débil interacción con la superficie de la matriz porosa) limita su uso. [74]

2.6 Zeolitas

Las zeolitas son aluminosilicatos, de metales alcalinos o alcalinotérreos, compuestos por tetraedros TO_4 ($\text{T} = \text{Si}$ o Al) conectados por átomos de oxígeno formando una estructura tridimensional extendida con canales y cavidades. Gracias a estas características estructurales, presentan propiedades como una elevada área superficial y porosidad permanente. Además, su grado de hidrofobicidad se puede regular ajustando la relación Si/Al . Todo esto hace que se hayan estudiado como DDS, siendo algunos ejemplos la aplicación de la zeolita beta para la administración de salbutamol y teofilina o el uso de clinoptilolita para la administración de sulfametoxazol y metronidazol. [75], [76]

2.7 Polímeros de coordinación porosos

Los polímeros de coordinación porosos (PCPs), más conocidos como redes metal-orgánicas porosas (MOFs del inglés, *Metal-Organic Frameworks*), son un tipo de materiales cristalinos porosos. Su formación se debe al autoensamblaje mediante enlaces de coordinación entre iones o clústeres metálicos, conocidos como unidades de construcción secundarias (SBUs, del inglés *Secondary Building Units*), y ligandos

orgánicos que actúan como espaciadores. De esta manera, el resultado son redes cristalinas con sistemas de poros y canales definidos en su interior (Figura 1.10).

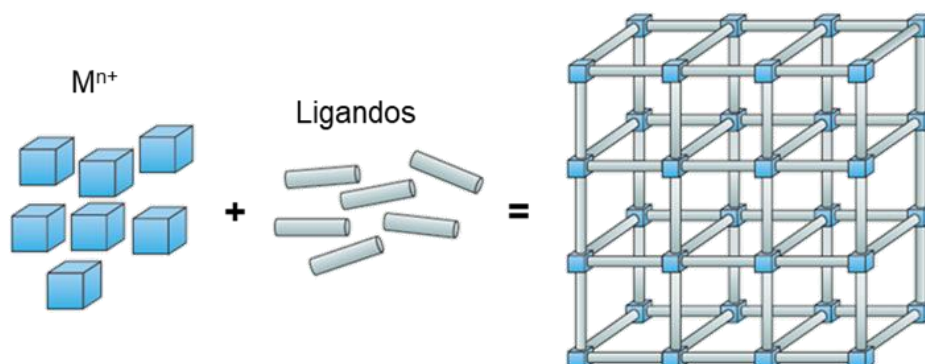


Figura 1.10. Proceso de síntesis de las redes metal-orgánicas porosas a partir de sus constituyentes.
Adaptada de [77].

Existen diferentes estrategias para la síntesis de MOFs (p.ej., mecanoquímica o mediante microemulsiones), aunque la más empleada es la síntesis solvotermal, que emplea condiciones de presión y temperatura entre moderadas y altas. [78] Asimismo, la síntesis asistida por microondas también puede ser utilizada para la preparación de MOFs. Esta última estrategia resulta útil para la obtención de partículas con una distribución de tamaño homogénea, ya que se favorece un proceso de nucleación rápido y uniforme. [79]

Los MOFs presentan diversas ventajas frente a los materiales inorgánicos porosos clásicos (p.ej., carbón activado o zeolitas):

- Alta porosidad (pudiendo alcanzar hasta un 90 % del volumen libre) y áreas superficiales internas (llegando hasta los 10.000 m²/g). [80]
- Elevada riqueza química y estructural, consecuencia de la gran variedad de iones metálicos y ligandos orgánicos que pueden utilizarse para su síntesis. [81]
- Flexibilidad estructural, pudiendo en determinados casos adaptar de manera reversible sus cavidades porosas al tamaño de moléculas huésped. [73], [82]
- Carácter funcionalizable, lo que permite realizar modificaciones para obtener propiedades deseadas (p.ej., tamaño de poro. [83], [84])

- Presencia de iones metálicos con propiedades diversas (catalíticas, luminiscentes, etc.). [85]

Estas propiedades hacen de los MOFs unos materiales prometedores en una amplia variedad de aplicaciones, entre las que se incluyen: catálisis, sensores, almacenamiento, separación y purificación de gases, encapsulación de moléculas bioactivas o aplicaciones biomédicas. [83]

Incluso, gracias a la posibilidad de diseñar de forma racional la estructura de los MOFs mediante la elección de unos determinados precursores, se ha llegado incluso a imitar la estructura de las zeolitas. Para ello, se han empleado nodos tetraédricos y ligandos angulares, similares a aquellos enlaces Si-O-Si y Si-O-Al presentes en las zeolitas. Esto ha dado lugar a la serie conocida como ZIF (del inglés, *Zeolite Imidazolate Frameworks*), constituidos a partir de Zn^{2+} y ligandos imidazolato. [86]

Asimismo, hasta la fecha se han dedicado grandes esfuerzos para la obtención de MOFs con alta estabilidad térmica y química. Con respecto a esto, el desarrollo de los MOFs de Zr(IV) UiO-66, UiO-67 y UiO-68 ha supuesto un gran avance puesto que dichos materiales presentan temperaturas de descomposición que pueden llegar a ser superiores a los 500 °C. [87] Todos presentan la fórmula general $[\text{Zr}_6(\mu_3\text{-O}_4)(\mu_3\text{-OH}_4)(\text{L})_6]$ (L = BDC, ácido 1,4-benzenodicarboxílico, para UiO-66; BPDC = ácido 4,4'-bifenil-dicarboxílico, para UiO-67; y TPDC = ácido terfenil-4,4'-dicarboxílico, para UiO-68). Esta extraordinaria estabilidad se debe a la fortaleza del enlace entre los iones Zr(IV) y los ligandos de tipo carboxiliato, así como a la elevada conectividad del MOF, que se encuentra coordinado con 12 ligandos carboxilato (siendo la coordinación más alta descrita hasta la fecha). [87] El mismo clúster metálico $[\text{Zr}_6(\mu_3\text{-O}_4)(\mu_3\text{-OH}_4)]^{12+}$ se ha combinado con diversos ligandos orgánicos, lo que ha dado lugar a gran variedad de MOFs de Zr(IV) con distintas topologías (Figura 1.11). [88]

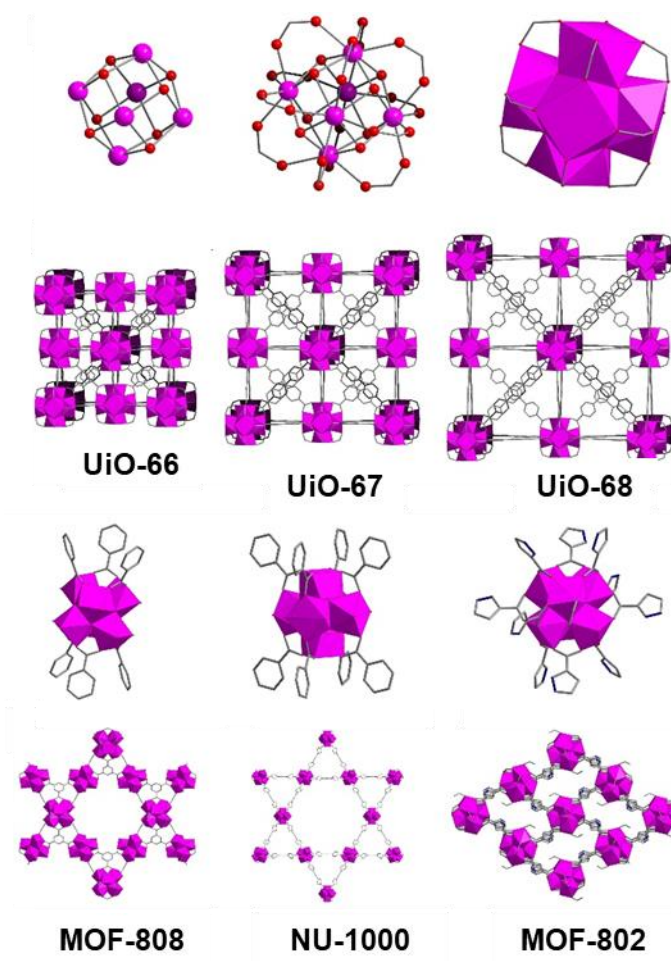


Figura 1.11. Unidades de construcción secundarias y estructuras cristalinas de algunos MOFs de Zr(IV). Adaptado de [89]

Nuestro grupo de investigación ha analizado la capacidad para degradar compuestos organofosforados (simuladores de agentes nerviosos) de diversos MOFs basados en Zr(IV) ($[\text{Zr}_6(\mu_3\text{-O})_4(\mu_3\text{-OH})_4]^{12+}$). Por ejemplo, se introdujo *tert*-butóxido de litio (LiO^tBu) en el MOF UiO-66 y se determinó que su capacidad para hidrolizar enlaces P-F o P-O, comúnmente presentes en agentes de guerra nerviosos, aumentaba respecto al UiO-66 sin modificar. [90] Esto es así dado que la introducción de alcóxidos de litio aumenta la basicidad de la SBU del MOF, impidiendo además que se produzca el envenenamiento del catalizador. Concretamente, el material $\text{UiO-66@LiO}^t\text{Bu}$ consiguió hidrolizar por completo el compuesto organofosforado diisopropilfluorofosfato (DIFP) tras 30 min ($t_{1/2} = 5$ min). A su vez, este material demostró también un alto rendimiento

en la hidrólisis del simulador de agente vesicante 2-cloro etil etilsulfuro (CEES) y el compuesto organofosforado dimetil metilfosfato (DMMP) y ($t_{1/2} = 3$ min para CEEs y $t_{1/2} = 25$ min para DMMP). Con objeto de emplear este material como equipo de protección personal, se depositó el catalizador en fibroína de seda, generándose un compuesto híbrido (proporción MOF:fibroína de seda 1:1) que aún mantenía su capacidad catalítica.

Por otra parte, en nuestro grupo de investigación se han desarrollado materiales híbridos basados en AC y MOFs como protección frente a agentes de guerra química de tipo nervioso. Uno de los principales problemas de los sistemas de protección basados en AC actuales es que los compuestos tóxicos, una vez adsorbidos, puede sufrir un proceso de desorción y con ello contaminar al usuario. Por este motivo, se decidió combinar MOFs de Zr(IV), capaces de degradar los enlaces P-X ($X = F, Cl, N, S$) característicos de los compuestos organofosforados, con materiales de AC de elevada capacidad de adsorción. Concretamente, se hicieron crecer capa a capa dos MOFs de Zr(IV) [$Zr_6O_4(OH)_4(BDC-X)_6$] ($X = H, UiO-66$; $X = NH_2, UiO-66-NH_2$) sobre la superficie de tejidos de AC. [91] Los materiales híbridos obtenidos ($UiO-66@AC$ y $UiO-66-NH_2@AC$) fueron capaces de adsorber de manera rápida y estable el compuesto organofosforado DIFP, gracias al carácter hidrofóbico del AC, para posteriormente hidrolizarlo como consecuencia de la actividad catalítica del MOF. En concreto, se obtuvieron unos valores de detoxificación del 80 % para el $UiO-66@AC$ y del 40 % para el $UiO-66-NH_2@AC$ pasadas 24 h. Gracias a esto se pudo demostrar que la combinación de ambos materiales supone una mejora respecto a los sistemas de protección basados en AC tradicionales.

Por otra parte, de entre las diversas aplicaciones de los MOFs, su uso como DDS resulta especialmente prometedor debido a que presentan determinadas características:

- Elevada porosidad y gran superficie específica para albergar moléculas bioactivas en el interior de sus cavidades. [92]
- Capacidad para proteger a los fármacos encapsulados de condiciones adversas (p.ej., luz, humedad o degradación enzimática). [55]

- Versatilidad de funcionalización, de forma que modificando determinadas propiedades (p.ej., interacción anfitrión-huésped) se puede controlar la cinética de liberación del fármaco. [93]
- Estabilidad adecuada en medio biológico para liberar el fármaco de manera controlada y finalmente degradarse evitando la bioacumulación. [94]

Existen diversas estrategias para la encapsulación de compuestos bioactivos en el interior de materiales porosos como los MOFs. La más común es la encapsulación del compuesto activo en el interior de sus cavidades formándose un sistema híbrido fármaco@material. Dicha incorporación se suele llevar a cabo mediante la impregnación del MOF en una disolución concentrada del fármaco (impregnación sólido-líquido). [95] Sin embargo, otra estrategia comúnmente utilizada es la encapsulación durante la preparación del material poroso (síntesis *one pot*). [96] Dentro de esto, en determinados casos como para la encapsulación de ciertas biomoléculas voluminosas (p.ej., proteínas), se emplea la estrategia conocida como mineralización biomimética. Dicha estrategia se basa en la evidencia de que algunas biomoléculas son capaces de favorecer el crecimiento del MOF al encontrarse ambos en medio acuoso, de forma que la biomolécula queda finalmente recubierta por la estructura del MOF. [97]

Por lo general, la cantidad de fármaco incorporado depende de diversos factores como la concentración de fármaco utilizada, el disolvente empleado o el pH. [51] Por otra parte, la posterior liberación del fármaco encapsulado estará determinada por su difusión a través de la matriz porosa, que a su vez está condicionada por diversos parámetros: (i) espaciales, como el tamaño y/o forma de las cavidades del MOF frente al tamaño de la molécula bioactiva, (ii) interacciones entre la molécula bioactiva y el MOF y (iii) tamaño de partícula. Asimismo, la estabilidad del material poroso en medio fisiológico también jugará un papel en dicha liberación. [98]

En cuanto a ejemplos prácticos, los MOFs como sistemas de liberación controlada de fármacos podrían ser útiles para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. [99] En la enfermedad de Alzheimer se produce una degradación progresiva de las neuronas encargadas de producir los neurotransmisores colinérgicos, cuya concentración se reduce drásticamente causando una pérdida del correcto

funcionamiento cognitivo del paciente. Una de las principales aproximaciones hoy en día para el tratamiento del Alzheimer de fase leve a moderada consiste en la utilización de fármacos inhibidores de la acetilcolinesterasa (p.ej., donepezilo, rivastigmina o galantamina, Figura 1.12) aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) de EE. UU. [100] Estos fármacos son compuestos nucleófilos que se unen de manera reversible a la AChE, disminuyendo su actividad y reestableciendo con ello unos niveles normales de ACh. Su principal problema es que presentan baja estabilidad en medio biológico, baja selectividad en su unión a la AChE presente en sinapsis colinérgicas y que resulta difícil controlar la dosis de fármaco en el paciente.

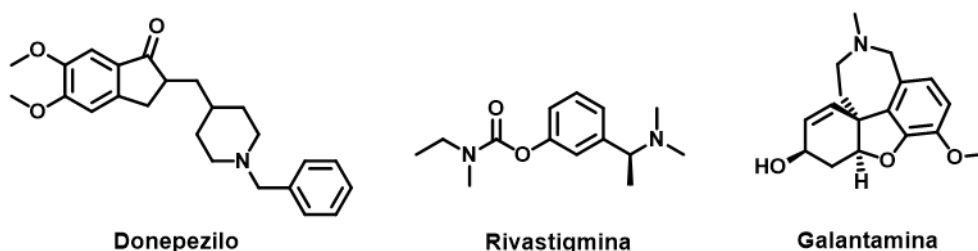


Figura 1.12. Estructura química de algunos fármacos inhibidores de la AChE aprobados por la FDA.

A pesar del creciente uso de los MOFs en aplicaciones biomédicas, aún existe una falta de estudios que exploren de forma específica el uso de MOFs para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. La mayoría de los estudios que utilizan este tipo de materiales están enfocados en su uso como sensores para un diagnóstico temprano, detectando la actividad de la enzima AChE y la presencia de biomarcadores. Los principales biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer son las fibras β -amiloides ($A\beta$), proteínas que se aglomeran formando placas en el fluido cerebroespinal y se encuentran relacionadas con la progresión de la enfermedad. [101] En cualquier caso, existen estudios como el de Wang y colaboradores [102] que utilizan MOFs de Zr para inhibir fotocatalíticamente el autoensamblaje de estas proteínas, frenando con ello el avance de la enfermedad.

De esta forma, el desarrollo de redes metal-orgánicas para el transporte y liberación de fármacos o ligandos nucleófilos, capaces de unirse de manera reversible a la AChE reduciendo su actividad, podría suponer un enfoque novedoso para el tratamiento temprano de enfermedades neurodegenerativas. Asimismo, existen estudios que indican

interacciones complejas entre neuronas reguladas por acetilcolina (colinérgicas) y aquellas reguladas por dopamina (dopamínicas) en el tegmento ventral del cerebro medio. [103] Esto permite una mayor comprensión de trastornos neuropsiquiátricos como el Alzheimer o el Parkinson (causado por la degeneración de neuronas dopamínicas), y aporta un nuevo enfoque que podría mejorar el tratamiento actual. Con respecto a esto, los MOFs podrían utilizarse como vehículos para el transporte y liberación controlada de fármacos, como inhibidores de AChE o incluso moléculas bioactivas (p.ej., L-DOPA, transformada en dopamina en el cerebro), para el tratamiento de estas enfermedades.

2.8 Poliedros metal-orgánicos

Los poliedros metal-orgánicos (MOPs, del inglés *Metal-Organic Polyhedra*), también conocidos como cajas moleculares metal-orgánicas, son otro tipo de materiales porosos cristalinos. [104] Al igual que los MOFs, están formados por iones o clústeres metálicos y ligandos orgánicos. Sin embargo, mientras que los MOFs presentan una estructura extendida, los MOPs son entidades moleculares. En función de los componentes empleados para la síntesis, es posible obtener MOPs con diferentes topologías (p.ej., tetraédricas, cuboctaédricas, cúbica). [105]

Su naturaleza modular ha hecho que los MOPs presenten diversas aplicaciones en catálisis,[106] adsorción de gases [107] o administración de fármacos, [108] entre otros.

Con relación a la aplicación de las cajas moleculares en biomedicina, cabe resaltar el empleo de estos compuestos en la creación de canales iónicos sintéticos. En relación con esto, Kim y colaboradores [109] consiguieron emplear como canal iónico sintético el conocido como MOP-18, sintetizado inicialmente por Yaghi y colaboradores. [110] Este material se trata de un cubooctaedro metal-orgánico estable, formado por la interacción entre iones Cu(II) y grupos carboxilato en un anillo bencénico, con un tamaño de aproximadamente 5 nm.

El principal problema de estos materiales es su baja estabilidad, ya que su estructura tiende a colapsar cuando se eliminan las moléculas de disolvente retenidas en sus poros. Para evitar esto, una posible solución es la utilización de clústeres de Zr(IV) como SBUs e iones carboxilato como ligandos, ya que los iones Zr(IV) presentan una gran afinidad

por los átomos de oxígeno de los ligandos carboxilato. [111] Con respecto a esto, Yuan y colaboradores sintetizaron MOPs tetraédricos formados por grupos de circonio trinucleares y ensamblados por $[\text{ZrCp}_2\text{Cl}_2]$ y diversos ligandos carboxílicos. De esta forma, los grupos ciclopentadienilo bloquean los sitios de coordinación de los átomos de circonio, impidiendo la formación de estructuras extendidas y estabilizando con ello la estructura discreta. [112] Por este motivo, en el Capítulo III de esta Tesis Doctoral se planteó la síntesis de MOPs con grupos ciclopentadienilo funcionalizados con cadenas alquílicas, con objeto de aumentar su biocompatibilidad. Asimismo, se estudió el efecto de MOPs sintetizados con ligandos orgánicos de distinto tamaño y grupos funcionales a modo de conectores en la encapsulación de moléculas reactivadoras de acetilcolinesterasa y la catálisis de compuestos organofosforados.

Por todo lo expuesto anteriormente, en esta Tesis Doctoral se explorará el uso tanto de MOFs como de MOPs como agentes duales para el transporte y liberación controlada de fármacos y la detoxificación de compuestos organofosforados.

3 Referencias bibliográficas

- [1] K. O. Kirlikovali, Z. Chen, T. Islamoglu, J. T. Hupp, and O. K. Farha, "Zirconium-Based Metal-Organic Frameworks for the Catalytic Hydrolysis of Organophosphorus Nerve Agents," *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 12, no. 13, pp. 14702–14720, Apr. 2020, doi: 10.1021/acsami.9b20154.
- [2] H. John *et al.*, "Fatal sarin poisoning in Syria 2013: forensic verification within an international laboratory network," *Forensic Toxicol*, vol. 36, no. 1, pp. 61–71, Jan. 2018, doi: 10.1007/s11419-017-0376-7.
- [3] T. Okumura *et al.*, "Report on 640 Victims of the Tokyo Subway Sarin Attack," *Ann Emerg Med*, vol. 28, no. 2, pp. 129–135, Aug. 1996, doi: 10.1016/S0196-0644(96)70052-5.
- [4] P. R. Chai, E. W. Boyer, H. Al-Nahhas, and T. B. Erickson, "Toxic chemical weapons of assassination and warfare: nerve agents VX and sarin," *Toxicol Commun*, vol. 1, no. 1, pp. 21–23, Jan. 2017, doi: 10.1080/24734306.2017.1373503.
- [5] T. C. Kwong, "Organophosphate Pesticides: Biochemistry and Clinical Toxicology," *Ther Drug Monit*, vol. 24, no. 1, pp. 144–149, Feb. 2002, doi: 10.1097/00007691-200202000-00022.
- [6] L. Karalliedde, M. Eddleston, and V. Murray, "The Global Picture of Organophosphate Insecticide Poisoning," in *Organophosphates and Health*, 2001, pp. 431–471. doi: 10.1142/9781848161443_0017.
- [7] B. Antonijevic and M. P. Stojiljkovic, "Unequal efficacy of pyridinium oximes in acute organophosphate poisoning," *Clinical Medicine and Research*, vol. 5, no. 1, pp. 71–82, Mar. 2007. doi: 10.3121/cmr.2007.701.
- [8] P. Eyer, "The Role of Oximes in the Management of Organophosphorus Pesticide Poisoning," *Toxicol Rev*, vol. 22, no. 3, pp. 165–190, 2003, doi: 10.2165/00139709-200322030-00004.
- [9] G. Mercey *et al.*, "Reactivators of acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus nerve agents," *Acc Chem Res*, vol. 45, no. 5, pp. 756–766, May 2012, doi: 10.1021/ar2002864.
- [10] K. Kim, O. G. Tsay, D. A. Atwood, and D. G. Churchill, "Destruction and detection of chemical warfare agents," *Chemical Reviews*, vol. 111, no. 9, pp. 5345–5403, Sep. 14, 2011. doi: 10.1021/cr100193y.
- [11] S. Mukherjee and R. D. Gupta, "Organophosphorus Nerve Agents: Types, Toxicity, and Treatments," *Journal of Toxicology*, vol. 2020. Hindawi Limited, 2020. doi: 10.1155/2020/3007984.
- [12] S. Chauhan *et al.*, "Chemical warfare agents," *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 26, no. 2, pp. 113–122, Sep. 2008. doi: 10.1016/j.etap.2008.03.003.
- [13] L. Szinicz, "History of chemical and biological warfare agents," *Toxicology*, vol. 214, no. 3, pp. 167–181, Oct. 2005, doi: 10.1016/j.tox.2005.06.011.
- [14] R. C. Gupta, "Classification and Uses of Organophosphates and Carbamates," in *Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds*, Elsevier, 2006, pp. 5–24. doi: 10.1016/B978-012088523-7/50003-X.
- [15] R. A. Moyer, F. R. Sidell, and H. Salem, "Nerve Agents," in *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*, Elsevier, 2014, pp. 483–488. doi: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00635-7.
- [16] L. Gorecki *et al.*, "SAR study to find optimal cholinesterase reactivator against organophosphorous nerve agents and pesticides," *Arch Toxicol*, vol. 90, no. 12, pp. 2831–2859, Dec. 2016, doi: 10.1007/s00204-016-1827-3.
- [17] O. Lockridge, "Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses," *Pharmacol Ther*, vol. 148, pp. 34–46, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.011.
- [18] T. Maurice, M. Strehaiano, N. Siméon, C. Bertrand, and A. Chatonnet, "Learning performances and vulnerability to amyloid toxicity in the butyrylcholinesterase knockout mouse," *Behavioural Brain Research*, vol. 296, pp. 351–360, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.bbr.2015.08.026.
- [19] D. M. Maxwell, K. M. Brecht, I. Koplovitz, and R. E. Sweeney, "Acetylcholinesterase inhibition: Does it explain the toxicity of organophosphorus compounds?," *Arch Toxicol*, vol. 80, no. 11, pp. 756–760, Nov. 2006, doi: 10.1007/s00204-006-0120-2.
- [20] C. B. Millard, G. Koellner, A. Ordentlich, A. Shafferman, I. Silman, and J. L. Sussman, "Reaction Products of Acetylcholinesterase and VX Reveal a Mobile Histidine in the Catalytic Triad," *J Am Chem Soc*, vol. 121, no. 42, pp. 9883–9884, Oct. 1999, doi: 10.1021/ja992704i.
- [21] E. Carletti, J.-P. Colletier, F. Dupeux, M. Trovaslet, P. Masson, and F. Nachon, "Structural Evidence That Human Acetylcholinesterase Inhibited by Tabun Ages through O-Dealkylation," *J Med Chem*, vol. 53, no. 10, pp. 4002–4008, May 2010, doi: 10.1021/jm901853b.
- [22] B. Sanson *et al.*, "Crystallographic Snapshots of Nonaged and Aged Conjugates of Soman with Acetylcholinesterase, and of a Ternary Complex of the Aged Conjugate with Pralidoxime," *J Med Chem*, vol. 52, no. 23, pp. 7593–7603, Dec. 2009, doi: 10.1021/jm900433t.

- [23] P. Masson, F. Nachon, and O. Lockridge, "Structural approach to the aging of phosphylated cholinesterases," *Chem Biol Interact*, vol. 187, no. 1–3, pp. 157–162, Sep. 2010, doi: 10.1016/j.cbi.2010.03.027.
- [24] Y. Segall *et al.*, "Direct observation and elucidation of the structures of aged and nonaged phosphorylated cholinesterases by phosphorus-31 NMR spectroscopy," *Biochemistry*, vol. 32, no. 49, pp. 13441–13450, Dec. 1993, doi: 10.1021/bi00212a009.
- [25] F. Worek, H. Thiermann, L. Szinicz, and P. Eyer, "Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes," *Biochem Pharmacol*, vol. 68, no. 11, pp. 2237–2248, Dec. 2004, doi: 10.1016/j.bcp.2004.07.038.
- [26] S. Costanzi, J. H. Machado, and M. Mitchell, "Nerve Agents: What They Are, How They Work, How to Counter Them," *ACS Chem Neurosci*, vol. 9, no. 5, pp. 873–885, May 2018, doi: 10.1021/acscchemneuro.8b00148.
- [27] M. Alozi and M. Rawas-Qalaji, "Treating organophosphates poisoning: management challenges and potential solutions," *Critical Reviews in Toxicology*, vol. 50, no. 9. Taylor and Francis Ltd., pp. 764–779, 2020. doi: 10.1080/10408444.2020.1837069.
- [28] T. Islamoglu *et al.*, "Metal-Organic Frameworks against Toxic Chemicals," *Chemical Reviews*, vol. 120, no. 16. American Chemical Society, pp. 8130–8160, Aug. 26, 2020. doi: 10.1021/acs.chemrev.9b00828.
- [29] B. P. Doctor and A. Saxena, "Bioscavengers for the protection of humans against organophosphate toxicity," in *Chemico-Biological Interactions*, Dec. 2005, pp. 167–171. doi: 10.1016/j.cbi.2005.10.024.
- [30] I. Primožic, R. Odžak, S. Tomic, V. Simeon-Rudolf, and E. Reiner, "Pyridinium, imidazolium, and quinuclidinium oximes: Synthesis, interaction with native and phosphylated cholinesterases, and antidotes against organophosphorus compounds," *J Med Chem Def*, vol. 2, pp. 1–30, Jan. 2004.
- [31] Y. Ashani, "Prospective of human butyrylcholinesterase as a detoxifying antidote and potential regulator of controlled-release drugs," *Drug Dev Res*, vol. 50, no. 3–4, pp. 298–308, Jul. 2000, doi: 10.1002/1098-2299(200007/08)50:3/4<298::AID-DDR13>3.0.CO;2-X.
- [32] N. Chilukuri *et al.*, "Polyethylene glycosylation prolongs the circulatory stability of recombinant human butyrylcholinesterase," *Chem Biol Interact*, vol. 157–158, pp. 115–121, Dec. 2005, doi: 10.1016/j.cbi.2005.10.013.
- [33] F. Worek, H. Thiermann, and T. Wille, "Organophosphorus compounds and oximes: a critical review," *Archives of Toxicology*, vol. 94, no. 7. Springer, pp. 2275–2292, Jul. 01, 2020. doi: 10.1007/s00204-020-02797-0.
- [34] A. G. Karczmar, "History of the research with anticholinesterase agents," *Anticholinesterase agents*, vol. 1, pp. 1–44, 1970.
- [35] C. Bismuth, R. H. Inns, and T. C. Marrs, "Efficacy, toxicity and clinical use of oximes in anticholinesterase poisoning," *Butterworth-Heinemann, Stoneham, MA(USA)*. 1992., 1992.
- [36] J. Kassa, "Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents," *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology*, vol. 40, no. 6. pp. 803–816, 2002. doi: 10.1081/CLT-120015840.
- [37] F. Worek, H. Thiermann, and T. Wille, "Oximes in organophosphate poisoning: 60 years of hope and despair," *Chem Biol Interact*, vol. 259, pp. 93–98, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.cbi.2016.04.032.
- [38] P. Ballabh, A. Braun, and M. Nedergaard, "The blood–brain barrier: an overview," *Neurobiol Dis*, vol. 16, no. 1, pp. 1–13, Jun. 2004, doi: 10.1016/j.nbd.2003.12.016.
- [39] J. E. Chambers, M. B. Dail, and E. C. Meek, "Oxime-mediated reactivation of organophosphate-inhibited acetylcholinesterase with emphasis on centrally-active oximes," *Neuropharmacology*, vol. 175. Elsevier Ltd, Sep. 15, 2020. doi: 10.1016/j.neuropharm.2020.108201.
- [40] J. Rautio *et al.*, "Prodrugs: design and clinical applications," *Nat Rev Drug Discov*, vol. 7, no. 3, pp. 255–270, Mar. 2008, doi: 10.1038/nrd2468.
- [41] F. A. Khan *et al.*, "Oxidative mechanisms for the biotransformation of 1-methyl-1,6-dihydropyridine-2-carbaldoxime to pralidoxime chloride," *Life Sci*, vol. 89, no. 25–26, pp. 911–917, Dec. 2011, doi: 10.1016/j.lfs.2011.09.019.
- [42] T.-M. Shih, J. A. Guarisco, T. M. Myers, R. K. Kan, and J. H. McDonough, "The oxime pro-2-PAM provides minimal protection against the CNS effects of the nerve agents sarin, cyclosarin, and VX in guinea pigs," *Toxicol Mech Methods*, vol. 21, no. 1, pp. 53–62, Jan. 2011, doi: 10.3109/15376516.2010.529190.
- [43] J. W. Skovira, J. C. O'Donnell, I. Koplovitz, R. K. Kan, J. H. McDonough, and T.-M. Shih, "Reactivation of brain acetylcholinesterase by monoisonitrosoacetone increases the therapeutic efficacy against nerve agents in guinea pigs," *Chem Biol Interact*, vol. 187, no. 1–3, pp. 318–324, Sep. 2010, doi: 10.1016/j.cbi.2010.03.010.

- [44] C. M. Wilhelm, T. H. Snider, M. C. Babin, D. A. Jett, G. E. Platoff, and D. T. Yeung, "A comprehensive evaluation of the efficacy of leading oxime therapies in guinea pigs exposed to organophosphorus chemical warfare agents or pesticides," *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 281, no. 3, pp. 254–265, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.taap.2014.10.009.
- [45] Z. Radić *et al.*, "Refinement of Structural Leads for Centrally Acting Oxime Reactivators of Phosphylated Cholinesterases," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 15, pp. 11798–11809, Apr. 2012, doi: 10.1074/jbc.M111.333732.
- [46] R. K. Sit *et al.*, "New Structural Scaffolds for Centrally Acting Oxime Reactivators of Phosphylated Cholinesterases," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 22, pp. 19422–19430, Jun. 2011, doi: 10.1074/jbc.M111.230656.
- [47] C. M. Wilhelm, T. H. Snider, M. C. Babin, D. A. Jett, G. E. Platoff, and D. T. Yeung, "A comprehensive evaluation of the efficacy of leading oxime therapies in guinea pigs exposed to organophosphorus chemical warfare agents or pesticides," *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 281, no. 3, pp. 254–265, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.taap.2014.10.009.
- [48] Y. J. Rosenberg *et al.*, "Post-exposure treatment with the oxime RS194B rapidly reactivates and reverses advanced symptoms of lethal inhaled paraoxon in macaques," *Toxicol Lett*, vol. 293, pp. 229–234, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.toxlet.2017.10.025.
- [49] Y. J. Rosenberg *et al.*, "Post-exposure treatment with the oxime RS194B rapidly reverses early and advanced symptoms in macaques exposed to sarin vapor," *Chem Biol Interact*, vol. 274, pp. 50–57, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.cbi.2017.07.003.
- [50] L. Gaohua, X. Miao, and L. Dou, "Crosstalk of physiological pH and chemical pKa under the umbrella of physiologically based pharmacokinetic modeling of drug absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity," *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, vol. 17, no. 9, pp. 1103–1124, Sep. 2021, doi: 10.1080/17425255.2021.1951223.
- [51] K. K. Jain, "Drug Delivery Systems - An Overview," 2008, pp. 1–50. doi: 10.1007/978-1-59745-210-6_1.
- [52] M. Vallet-Regi, F. Balas, and D. Arcos, "Mesoporous Materials for Drug Delivery," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 46, no. 40, pp. 7548–7558, Oct. 2007, doi: 10.1002/anie.200604488.
- [53] J. Swarbrick, *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. CRC Press, 2013. doi: 10.1201/b19309.
- [54] W. X. Mai and H. Meng, "Mesoporous silica nanoparticles: A multifunctional nano therapeutic system," *Integrative Biology*, vol. 5, no. 1, pp. 19–28, Jan. 2013, doi: 10.1039/c2ib20137b.
- [55] T. C. Yih and M. Al-Fandi, "Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems," *J Cell Biochem*, vol. 97, no. 6, pp. 1184–1190, Apr. 2006, doi: 10.1002/jcb.20796.
- [56] R. Liang, M. Wei, D. G. Evans, and X. Duan, "Inorganic nanomaterials for bioimaging, targeted drug delivery and therapeutics," *Chem. Commun.*, vol. 50, no. 91, pp. 14071–14081, Jun. 2014, doi: 10.1039/C4CC03118K.
- [57] H. Nsairat, D. Khater, U. Sayed, F. Odeh, A. Al Bawab, and W. Alshaer, "Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications," *Heliyon*, vol. 8, no. 5, p. e09394, May 2022, doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e09394.
- [58] D. E. Large, R. G. Abdelmessih, E. A. Fink, and D. T. Augustine, "Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application," *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 176, p. 113851, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.addr.2021.113851.
- [59] A. Akbarzadeh *et al.*, "Liposome: classification, preparation, and applications," *Nanoscale Res Lett*, vol. 8, no. 1, p. 102, Dec. 2013, doi: 10.1186/1556-276X-8-102.
- [60] B. Pradhan, N. Kumar, S. Saha, and A. Roy, "Liposome: Method of preparation, advantages, evaluation and its application," *Journal of Applied Pharmaceutical Research*, vol. 3, no. 3, pp. 1–8, 2015.
- [61] A. Cabanes, S. Even-Chen, J. Zimmeroff, Y. Barenholz, E. Kedar, and A. Gabizon, "Enhancement of Antitumor Activity of Polyethylene Glycol-coated Liposomal Doxorubicin with Soluble and Liposomal Interleukin 21," *Clinical Cancer Research*, vol. 5, no. 3, pp. 687–693, Mar. 1999.
- [62] G. Gregoriadis, "Liposomes and mRNA: Two technologies together create a COVID-19 vaccine," *Med Drug Discov*, vol. 12, p. 100104, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.medidd.2021.100104.
- [63] K. Kalimuthu, B. S. Cha, S. Kim, and K. S. Park, "Eco-friendly synthesis and biomedical applications of gold nanoparticles: A review," *Microchemical Journal*, vol. 152, p. 104296, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.microc.2019.104296.
- [64] P. Bergese, K. Hamad-Schifferli, and J. M. Walker, *Nanomaterial Interfaces in Biology*, vol. 1025. Totowa, NJ: Humana Press, 2013. doi: 10.1007/978-1-62703-462-3.

- [65] J. Manson, D. Kumar, B. J. Meenan, and D. Dixon, "Polyethylene glycol functionalized gold nanoparticles: the influence of capping density on stability in various media," *Gold Bull*, vol. 44, no. 2, pp. 99–105, Jun. 2011, doi: 10.1007/s13404-011-0015-8.
- [66] P. Murawala, A. Tirmale, A. Shiras, and B. L. V. Prasad, "In situ synthesized BSA capped gold nanoparticles: Effective carrier of anticancer drug Methotrexate to MCF-7 breast cancer cells," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 34, pp. 158–167, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.msec.2013.09.004.
- [67] X. Wang, X. Bu, and P. Feng, "Porous Inorganic Materials," in *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, Wiley, 2005. doi: 10.1002/0470862106.ia282.
- [68] P. S. Liu and G. F. Chen, "Application of Porous Metals," in *Porous Materials*, Elsevier, 2014, pp. 113–188. doi: 10.1016/B978-0-12-407788-1.00003-4.
- [69] P. Sinha, S. Banerjee, and K. K. Kar, "Characteristics of Activated Carbon," 2020, pp. 125–154. doi: 10.1007/978-3-030-43009-2_4.
- [70] M. O. Usman, G. Aturagaba, M. Ntale, and G. W. Nyakairu, "A review of adsorption techniques for removal of phosphates from wastewater," *Water Science and Technology*, vol. 86, no. 12, pp. 3113–3132, Dec. 2022, doi: 10.2166/wst.2022.382.
- [71] R. Osovsky, D. Kaplan, I. Nir, H. Rotter, S. Elisha, and I. Columbus, "Decontamination of Adsorbed Chemical Warfare Agents on Activated Carbon Using Hydrogen Peroxide Solutions," *Environ Sci Technol*, vol. 48, no. 18, pp. 10912–10918, Sep. 2014, doi: 10.1021/es502981y.
- [72] Z. Chen, T. Islamoglu, and O. K. Farha, "Toward Base Heterogenization: A Zirconium Metal–Organic Framework/Dendrimer or Polymer Mixture for Rapid Hydrolysis of a Nerve-Agent Simulant," *ACS Appl Nano Mater*, vol. 2, no. 2, pp. 1005–1008, Feb. 2019, doi: 10.1021/acsanm.8b02292.
- [73] I. I. Slowing, J. L. Vivero-Escoto, B. G. Trewyn, and V. S.-Y. Lin, "Mesoporous silica nanoparticles: structural design and applications," *J Mater Chem*, vol. 20, no. 37, p. 7924, 2010, doi: 10.1039/c0jm00554a.
- [74] M. Vallet-Regí, "Ordered Mesoporous Materials in the Context of Drug Delivery Systems and Bone Tissue Engineering," *Chemistry – A European Journal*, vol. 12, no. 23, pp. 5934–5943, Aug. 2006, doi: 10.1002/chem.200600226.
- [75] A. Rivera and T. Farias, "Clinoptilolite–surfactant composites as drug support: A new potential application," *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 80, no. 1–3, pp. 337–346, May 2005, doi: 10.1016/j.micromeso.2005.01.011.
- [76] D. G. Fatouros *et al.*, "In vitro and in silico investigations of drug delivery via zeolite BEA," *J Mater Chem*, vol. 21, no. 21, p. 7789, 2011, doi: 10.1039/c1jm10204d.
- [77] A. J. Howarth *et al.*, "Chemical, thermal and mechanical stabilities of metal–organic frameworks," *Nat Rev Mater*, vol. 1, no. 3, p. 15018, Feb. 2016, doi: 10.1038/natrevmats.2015.18.
- [78] Y. Sun and H.-C. Zhou, "Recent progress in the synthesis of metal–organic frameworks," *Sci Technol Adv Mater*, vol. 16, no. 5, p. 054202, Oct. 2015, doi: 10.1088/1468-6996/16/5/054202.
- [79] Y.-J. Zhu and F. Chen, "Microwave-Assisted Preparation of Inorganic Nanostructures in Liquid Phase," *Chem Rev*, vol. 114, no. 12, pp. 6462–6555, Jun. 2014, doi: 10.1021/cr400366s.
- [80] J. Rouquerol, F. Rouquerol, P. Llewellyn, G. Maurin, and K. Sing, *Adsorption by Powders and Porous Solids*. Elsevier, 2014. doi: 10.1016/C2010-0-66232-8.
- [81] P. Horcajada *et al.*, "Metal–Organic Frameworks in Biomedicine," *Chem Rev*, vol. 112, no. 2, pp. 1232–1268, Feb. 2012, doi: 10.1021/cr200256v.
- [82] C. T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli, and J. S. Beck, "Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism," *Nature*, vol. 359, no. 6397, pp. 710–712, Oct. 1992, doi: 10.1038/359710a0.
- [83] G. Férey and C. Serre, "Large breathing effects in three-dimensional porous hybrid matter: facts, analyses, rules and consequences," *Chem Soc Rev*, vol. 38, no. 5, p. 1380, 2009, doi: 10.1039/b804302g.
- [84] S. Kitagawa, R. Kitaura, and S. Noro, "Functional Porous Coordination Polymers," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 43, no. 18, pp. 2334–2375, Apr. 2004, doi: 10.1002/anie.200300610.
- [85] V. V Butova, M. A. Soldatov, A. A. Guda, K. A. Lomachenko, and C. Lamberti, "Metal-organic frameworks: structure, properties, methods of synthesis and characterization," *Russian Chemical Reviews*, vol. 85, no. 3, pp. 280–307, Mar. 2016, doi: 10.1070/RCR4554.
- [86] K. S. Park *et al.*, "Exceptional chemical and thermal stability of zeolitic imidazolate frameworks," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, no. 27, pp. 10186–10191, Jul. 2006, doi: 10.1073/pnas.0602439103.
- [87] J. H. Cavka *et al.*, "A New Zirconium Inorganic Building Brick Forming Metal Organic Frameworks with Exceptional Stability," *J Am Chem Soc*, vol. 130, no. 42, pp. 13850–13851, Oct. 2008, doi: 10.1021/ja8057953.

- [88] M. Taddei, “When defects turn into virtues: The curious case of zirconium-based metal-organic frameworks,” *Coord Chem Rev*, vol. 343, pp. 1–24, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.ccr.2017.04.010.
- [89] J. H. Cavka *et al.*, “A New Zirconium Inorganic Building Brick Forming Metal Organic Frameworks with Exceptional Stability,” *J Am Chem Soc*, vol. 130, no. 42, pp. 13850–13851, Oct. 2008, doi: 10.1021/ja8057953.
- [90] E. López-Maya *et al.*, “Textile/Metal–Organic-Framework Composites as Self-Detoxifying Filters for Chemical-Warfare Agents,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 54, no. 23, pp. 6790–6794, Jun. 2015, doi: 10.1002/anie.201502094.
- [91] R. Gil-San-Millan, P. Delgado, E. Lopez-Maya, J. D. Martin-Romera, E. Barea, and J. A. R. Navarro, “Layer-by-Layer Integration of Zirconium Metal–Organic Frameworks onto Activated Carbon Spheres and Fabrics with Model Nerve Agent Detoxification Properties,” *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 13, no. 42, pp. 50491–50496, Oct. 2021, doi: 10.1021/acsami.1c12095.
- [92] K. S. Pawar, R. R. Bhoite, C. P. Pillay, S. C. Chavan, D. S. Malshikare, and S. G. Garad, “Continuous pralidoxime infusion versus repeated bolus injection to treat organophosphorus pesticide poisoning: a randomised controlled trial,” *The Lancet*, vol. 368, no. 9553, pp. 2136–2141, Dec. 2006, doi: 10.1016/S0140-6736(06)69862-0.
- [93] A. C. McKinlay *et al.*, “BioMOFs: Metal–Organic Frameworks for Biological and Medical Applications,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 49, no. 36, pp. 6260–6266, Aug. 2010, doi: 10.1002/anie.201000048.
- [94] N. J. Hinks, A. C. McKinlay, B. Xiao, P. S. Wheatley, and R. E. Morris, “Metal organic frameworks as NO delivery materials for biological applications,” *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 129, no. 3, pp. 330–334, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.micromeso.2009.04.031.
- [95] J. R. A. Sietsma, A. Jos van Dillen, P. E. de Jongh, and K. P. de Jong, “Application of ordered mesoporous materials as model supports to study catalyst preparation by impregnation and drying,” 2006, pp. 95–102, doi: 10.1016/S0167-2991(06)80895-5.
- [96] H. Zheng *et al.*, “One-pot Synthesis of Metal–Organic Frameworks with Encapsulated Target Molecules and Their Applications for Controlled Drug Delivery,” *J Am Chem Soc*, vol. 138, no. 3, pp. 962–968, Jan. 2016, doi: 10.1021/jacs.5b11720.
- [97] K. Liang *et al.*, “Biomimetic mineralization of metal-organic frameworks as protective coatings for biomacromolecules,” *Nat Commun*, vol. 6, no. 1, p. 7240, Jun. 2015, doi: 10.1038/ncomms8240.
- [98] B. Maranescu and A. Visa, “Applications of Metal–Organic Frameworks as Drug Delivery Systems,” *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 8, p. 4458, Apr. 2022, doi: 10.3390/ijms23084458.
- [99] R. M. Lane, M. Kivipelto, and N. H. Greig, “Acetylcholinesterase and Its Inhibition in Alzheimer Disease,” *Clin Neuropsychopharmacol*, vol. 27, no. 3, pp. 141–149, May 2004, doi: 10.1097/00002826-200405000-00011.
- [100] J. M. Long and D. M. Holtzman, “Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies,” *Cell*, vol. 179, no. 2, pp. 312–339, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.cell.2019.09.001.
- [101] S. Tajahmadi *et al.*, “Metal-organic frameworks: A promising option for the diagnosis and treatment of Alzheimer’s disease,” *Journal of Controlled Release*, vol. 353, pp. 1–29, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.jconrel.2022.11.002.
- [102] J. Wang *et al.*, “Porphyrinic Metal–Organic Framework PCN-224 Nanoparticles for Near-Infrared-Induced Attenuation of Aggregation and Neurotoxicity of Alzheimer’s Amyloid- β Peptide,” *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 10, no. 43, pp. 36615–36621, Oct. 2018, doi: 10.1021/acsami.8b15452.
- [103] D. Dautan *et al.*, “Segregated cholinergic transmission modulates dopamine neurons integrated in distinct functional circuits,” *Nat Neurosci*, vol. 19, no. 8, pp. 1025–1033, Aug. 2016, doi: 10.1038/nn.4335.
- [104] A. W. Augustyniak, M. Fandzloch, M. Domingo, I. Łakomska, and J. A. R. Navarro, “A vanadium(IV) pyrazolate metal–organic polyhedron with permanent porosity and adsorption selectivity,” *Chemical Communications*, vol. 51, no. 79, pp. 14724–14727, 2015, doi: 10.1039/C5CC05913E.
- [105] S. Lee, H. Jeong, D. Nam, M. S. Lah, and W. Choe, “The rise of metal–organic polyhedra,” *Chem Soc Rev*, vol. 50, no. 1, pp. 528–555, 2021, doi: 10.1039/D0CS00443J.
- [106] W. Lu, D. Yuan, A. Yakovenko, and H.-C. Zhou, “Surface functionalization of metal–organic polyhedron for homogeneous cyclopropanation catalysis,” *Chemical Communications*, vol. 47, no. 17, p. 4968, 2011, doi: 10.1039/c1cc00030f.
- [107] M. B. Duriska *et al.*, “Systematic Metal Variation and Solvent and Hydrogen-Gas Storage in Supramolecular Nanoballs,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 48, no. 47, pp. 8919–8922, Nov. 2009, doi: 10.1002/anie.200903863.
- [108] N. Ahmad, H. A. Younus, A. H. Chughtai, and F. Verpoort, “Metal–organic molecular cages: applications of biochemical implications,” *Chem Soc Rev*, vol. 44, no. 1, pp. 9–25, 2015, doi: 10.1039/C4CS00222A.

- [109] M. Jung, H. Kim, K. Baek, and K. Kim, "Synthetic Ion Channel Based on Metal–Organic Polyhedra," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 47, no. 31, pp. 5755–5757, Jul. 2008, doi: 10.1002/anie.200802240.
- [110] H. Furukawa, J. Kim, K. E. Plass, and O. M. Yaghi, "Crystal Structure, Dissolution, and Deposition of a 5 nm Functionalized Metal–Organic Great Rhombicuboctahedron," *J Am Chem Soc*, vol. 128, no. 26, pp. 8398–8399, Jul. 2006, doi: 10.1021/ja062491e.
- [111] M. Kim and S. M. Cohen, "Discovery, development, and functionalization of Zr(iv)-based metal–organic frameworks," *CrystEngComm*, vol. 14, no. 12, pp. 4096–4104, 2012, doi: 10.1039/C2CE06491J.
- [112] G. Liu, Z. Ju, D. Yuan, and M. Hong, "In Situ Construction of a Coordination Zirconocene Tetrahedron," *Inorg Chem*, vol. 52, no. 24, pp. 13815–13817, Dec. 2013, doi: 10.1021/ic402428m.

OBJETIVOS

Uno de los grandes retos a nivel global del siglo XXI es incrementar la producción de los cultivos para satisfacer la elevada demanda de alimento consecuencia del continuo incremento de la población mundial. Con este fin, se ha incrementado el uso de pesticidas, gran parte de los cuales son compuestos organofosforados (OPs) que presentan un elevado riesgo para la salud humana y el medio ambiente. Por otra parte, desafortunadamente también ha aumentado el uso de OPs como agentes nerviosos de guerra química. Los OPs resultan extremadamente tóxicos como consecuencia del daño que generan sobre el sistema nervioso central debido a la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE).

En este sentido, el tratamiento principal para la intoxicación por OPs se basa en la utilización de agentes reactivadores de la AChE como las oximas. Sin embargo, el tratamiento actual con oximas presenta diversas limitaciones, destacándose que si las oximas no se administran de forma controlada y mantenida en el tiempo, se alcanzan bajos rendimientos terapéuticos. Respecto a esto, el uso de tratamientos alternativos, como la administración de esterasas capaces de reemplazar la actividad de la AChE perdida y/o actuar como sumideros de OPs podría suponer una alternativa válida. Por lo tanto, el desarrollo de materiales para el transporte y liberación controlada de esta clase de antidotos frente a la intoxicación por OPs (oximas, biomoléculas, etc.) resulta de especial importancia. En este sentido, el uso de materiales metal-orgánicos porosos como las redes metal-orgánicas (MOFs) y de sus análogos moleculares, llamados poliedros metal-orgánicos (MOPs) podría ser una solución viable. Dichos materiales presentan una elevada porosidad tanto hacia la captura de compuestos tóxicos (entre ellos los OPs) como hacia el almacenaje y la liberación de agentes terapéuticos. Por otra parte, algunos de estos sistemas (especialmente aquellos que están formados por Zr(IV)) poseen una elevada actividad catalítica frente a la degradación hidrolítica de OPs.

De esta forma, el principal objetivo de esta Tesis Doctoral es emplear redes metal-orgánicas porosas y poliedros metal-orgánicos porosos como materiales duales en: (i) captura y/o degradación de compuestos organofosforados y (ii) transporte y liberación de fármacos y/o biomoléculas capaces de actuar como antidotos en la intoxicación por compuestos organofosforados. Dicho objetivo principal puede subdividirse en distintos objetivos específicos:

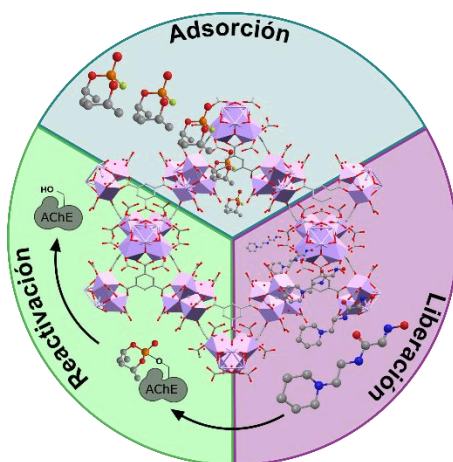
1. Sintetizar y caracterizar materiales híbridos basados en la red metal-orgánica de circonio MOF-808 ($[\text{Zr}_6\text{O}_4(\text{OH})_4(\text{BTC})_2(\text{HCOO})_6]$, BTC = ácido benceno-1,3,5-tricarboxílico) y la oxima neutra 2-(hidroxiimino)-*N*-2-(piperidin-1-il)etilacetamida (RS69N). Estudiar la capacidad del material híbrido RS69N@MOF-808 en fluido biológico simulado para: (i) detoxificar el compuesto organofosforado modelo diisopropilfluorofosfato (DIFP), (ii) liberar de forma controlada la oxima RS69N y (iii) reactivar la enzima acetilcolinesterasa (AChE) previamente inhibida por DIFP.
2. Sintetizar y caracterizar cajas tetraédricas moleculares catiónicas $[(n\text{-butilCpZr})_3(\text{OH})_3\text{O})_4\text{L}_6]\text{Cl}_6$ (Zr-MOP-1; L = ácido tereftálico, *n*-butilCp = *n*-butilciclopentadienilo y Zr-MOP-10; L = ácido bifeníl-4,4'-dicarboxílico). Evaluar la capacidad de estos sistemas, bajo condiciones biológicas simuladas, para: (i) capturar el compuesto organofosforado modelo DIFP, (ii) almacenar y liberar de manera controlada la oxima pralidoxima (2-PAM, 2-[(hidroxiimino)metil]-1-metilpiridin-1-ium) y (iii) reactivar la enzima AChE previamente inhibida por DIFP. Incrementar la biocompatibilidad de los sistemas híbridos 2-PAM@Zr-MOP mediante su incorporación en liposomas de fosfatidilcolina. Ensayar la neurotoxicidad de los sistemas sintetizados sobre la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y.
3. Sintetizar, mediante el uso de ligandos imidazólicos de nucleofilicidad creciente (purina, benzimidazol, imidazol y 2-metilimidazol), y caracterizar distintas redes metal-orgánicas zeomiméticas (ZIFs) basadas en cinc: $\text{Zn}(\text{pIm})_2$ (ZIF-20), $\text{Zn}(\text{bIm})_2$ (ZIF-11), $\text{Zn}(\text{Im})_2$, $\text{Zn}(\text{mIm})_2$ (ZIF-L), $\text{Zn}(\text{mIm})_2$ (sod ZIF-8) y $\text{Zn}_3(\text{mIm})_5(\text{OH})$ (ZIF-EC-1). Estudiar el efecto de la nucleofilicidad de los ligandos imidazólicos, la topologías de las redes y los tamaños de partícula sobre: (i) la detoxificación de los simuladores de agentes nerviosos de tipo G diisopropilfluorofosfato y diisopropilclorofosfato (DICP), (ii) la degradación estructural de los ZIFs asociada a esta detoxificación con la subsecuente liberación de los respectivos ligandos imidazólicos y (iii) la capacidad de dichos ligandos imidazólicos para reactivar AChE previamente inhibida por DIFP.

Ensayar la neurotoxicidad de los sistemas sintetizados sobre la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

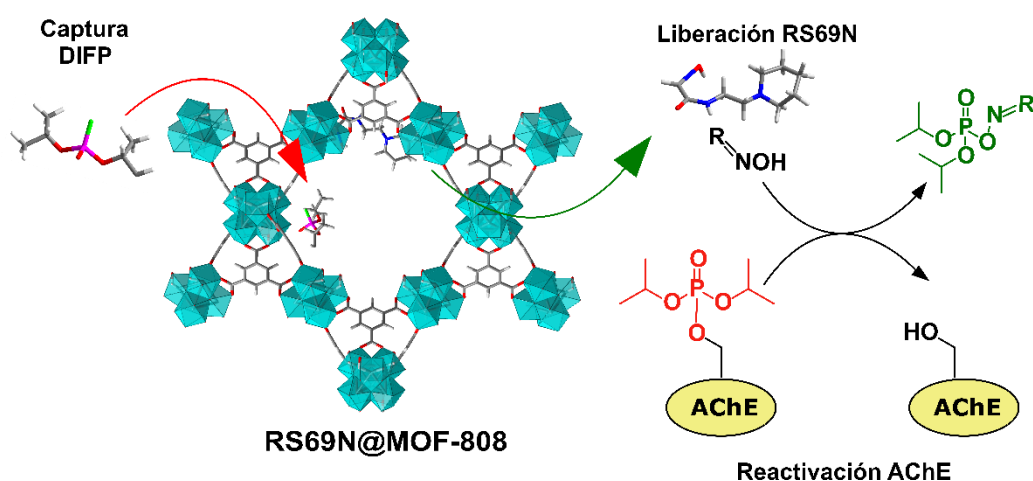
4. Sintetizar y caracterizar un material híbrido entre la red metal-orgánica zeomimética ZIF-8 en fase sodalita (sod ZIF-8) y una enzima esterasa.

CAPÍTULO II

Redes metal-orgánicas de circonio con propiedades duales de
captura y detoxificación de compuestos organofosforados



En este capítulo, se presenta la síntesis y caracterización de un nuevo material híbrido basado en la red metal-orgánica de circonio MOF-808 ($[\text{Zr}_6\text{O}_4(\text{OH})_4(\text{BTC})_2(\text{HCOO})_6]$, BTC = ácido benceno-1,3,5-tricarboxílico) y la oxima neutra 2-(hidroxiimino)-*N*-2-(piperidin-1-il)etilacetamida (RS69N) y la capacidad de este material híbrido, llamado RS69N@MOF-808, para actuar como un agente dual en el tratamiento de la intoxicación por compuestos organofosforados. Con este fin, se ha estudiado su capacidad para detoxificar el compuesto organofosforado modelo diisopropilfluorofosfato (DIFP) en fluido biológico simulado. De forma paralela, se ha evaluado su capacidad para liberar de manera controlada la oxima RS69N y reactivar la enzima acetilcolinesterasa (AChE) previamente inhibida por DIFP (Esquema 2.1).



Esquema 2.1. Representación esquemática del comportamiento dual del material híbrido RS69N@MOF-808 para la captura del organofosfato modelo DIFP y la liberación de la oxima RS69N. El fármaco RS69N liberado es capaz de reactivar la enzima AChE previamente inhibida por DIFP.

1 Redes metal-orgánicas para el transporte y liberación de antidotos de compuestos organofosforados

Como se mencionó anteriormente en la Introducción de esta Tesis Doctoral, los compuestos organofosforados (OPs), entre los cuales se incluyen algunos pesticidas ampliamente utilizados en agricultura, así como agentes de guerra química nerviosos, resultan altamente perjudiciales para la salud humana y los ecosistemas, debido a su

capacidad para inhibir la enzima acetilcolinesterasa (AChE). [1] Dicha enzima juega un papel muy importante en la transmisión del impulso nervioso, ya que es la encargada de regular la concentración del neurotransmisor acetilcolina (ACh) en la sinapsis neuronal. [2] Los compuestos organofosforados son capaces de inhibir la enzima AChE gracias a la similitud estructural de estos compuestos tóxicos con la acetilcolina, que es el sustrato natural de esta enzima. De hecho, estos tóxicos se unen de forma covalente a un residuo de serina del centro activo de la enzima AChE mediante un enlace éster fósforo-oxígeno, formando con ello un aducto estable enzima-organofosforado que impide que la AChE realice su función. De esta forma, la inhibición de la AChE da lugar a una acumulación del neurotransmisor en la sinapsis nerviosa, con la subsecuente saturación de los receptores neuronales de ACh. Todo esto provoca una serie de efectos perjudiciales para la salud entre los que se incluyen convulsiones, trastornos respiratorios y, en última instancia, la muerte. [3]

Actualmente, el tratamiento más común para la intoxicación por compuestos organofosforados consiste en la administración del fármaco atropina (para estimular el corazón) junto con fármacos reactivadores de la AChE, generalmente oximas. [4] Las oximas actúan como agentes nucleófilos al atacar al átomo de fósforo del aducto enzima-organofosforado, rompiendo el enlace P-O(serina) reactivando con ello la actividad hidrolasa. [5] Sin embargo, mientras que la administración de bajas concentraciones de oxima conducen a bajas tasas de reactivación de la enzima, el uso de altas dosis del fármaco pueden tener un efecto perjudicial debido a que estas especies una vez fosforiladas son capaces de inhibir la AChE. [5], [6] Por ello, resulta crucial controlar la concentración óptima de la oxima en el organismo para lograr un tratamiento eficaz contra la intoxicación por compuestos organofosforados. Con el objetivo de solventar estos problemas, el tratamiento actual con oximas se basa en la administración intravenosa de pequeñas cantidades de estos fármacos múltiples veces. A pesar de ello tienen lugar fluctuaciones considerables en la concentración de oxima en sangre que se traducen en una baja eficacia terapéutica. [6] Por lo tanto, resulta de especial interés el desarrollo de nuevos sistemas capaces de asegurar una concentración de oxima controlada y constante en el organismo. [7]

Las redes metal-orgánicas porosas (MOFs), gracias a su gran área superficial y elevada porosidad, son candidatos ideales para albergar moléculas bioactivas (p.ej., oximas) y liberarlas de forma controlada o gradual, actuando como sistemas de administración controlada de fármacos. [8] Sin embargo, hasta la fecha, se han llevado a cabo pocas investigaciones en las que se utilicen MOFs para el transporte y liberación de oximas en el tratamiento de la intoxicación por compuestos organofosforados.

En una de dichas investigaciones, se demostró la capacidad de un MOF de titanio, conocido como MIL-125-NH₂ ([Ti₈O₈(OH)₄(NH₂-BDC)₆] (BDC = ácido 1,4-benzenodicarboxílico), para adsorber de forma eficaz y reversible el compuesto pralidoxima (cloruro de 2-(N-hidroxiiminometil)-1-metilpiridinio, abreviado como 2-PAM), que se usa como antídoto en los tratamientos convencionales de intoxicación por compuestos organofosforados. Los resultados de este estudio indicaban que suspensiones del material en medio fisiológico simulado liberaban a la disolución un 82 % de su contenido en pralidoxima tras 5 minutos de incubación, alcanzándose la liberación total tras 90 minutos en suspensión. [9] En otro estudio reciente, se utilizó el MOF de hierro MIL-88B ([Fe₃OX(BDC)₃, X = Cl, OH) para albergar la misma oxima, y liberarla de forma gradual durante períodos de tiempo más largos. Además, se realizaron ensayos *in vivo* para evaluar la capacidad del nuevo material para mitigar el envenenamiento de ratones por gas sarín, un agente nervioso organofosforado con una alta toxicidad. Los resultados mostraban que, tras la administración del material a los ratones, la oxima se liberaba de forma gradual en su organismo lo que conducía a una reactivación de la actividad enzimática de la AChE que se mantenía durante 72 h [6].

Los resultados anteriores ponen de manifiesto la potencialidad de los MOFs para mejorar la eficacia de los tratamientos contra el envenenamiento por compuestos organofosforados. Sin embargo, en dichos estudios, la capacidad de adsorción tan excepcional de los MOFs aún no se ha explotado en su totalidad. En este sentido, los MOFs de Zr(IV) han demostrado poseer una elevada capacidad de adsorción de compuestos organofosforados y fosfatos, debido a la naturaleza ácido-dura de Pearson de los sitios activos de Zr(IV) [10], [11].

Por tanto, en este capítulo se parte de la hipótesis de que los MOFs no solo podrían almacenar oximas en sus cavidades y liberarlas de forma controlada en medio fisiológico, sino que, de forma simultánea, también podrían capturar los compuestos organofosforados tóxicos atrapándolos en el interior de sus matrices porosas y, por tanto, eliminarlos de los fluidos corporales.

2 Síntesis y caracterización del MOF de circonio(IV) y encapsulación de una oxima neutra

En este capítulo, se ha decidido emplear la red metal-orgánica de circonio(IV) MOF-808 ($[\text{Zr}_6\text{O}_4(\text{OH})_4(\text{BTC})_2(\text{HCOO})_6]$, BTC = ácido benceno-1,3,5-tricarboxílico) como matriz porosa para la adsorción y liberación de agentes reactivadores de la AChE (oximas) debido a su elevada área superficial y mesoporosidad (que cuenta con numerosos sitios para la adsorción de moléculas voluminosas), naturaleza ácida de Pearson y baja toxicidad del circonio (IV). [12], [13] Gracias a estas características, el MOF-808 resulta ideal como sistema para la administración de fármacos, ya que podría ser capaz de albergar y transportar moléculas bioactivas en el interior de su matriz porosa (p.ej., oximas) así como liberar dichas moléculas de forma controlada/gradual.[8] Asimismo, estas características también convierten al MOF-808 en el material idóneo para la detoxificación de compuestos organofosforados, ya que podría capturar las moléculas tóxicas y alojarlas en sus cavidades, facilitando su expulsión del organismo.

Como agente reactivador de la enzima AChE se ha seleccionado la oxima neutra RS69N (Figura 2.1). Dicha selección se fundamenta en que se ha observado que las oximas catiónicas (p.ej., pralidoxima, obidoxima) no son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (BBB, del inglés *Blood-Brain Barrier*), lo que limita que éstas alcancen las células diana y, por tanto, reduce su eficacia terapéutica. Ante esta problemática, se han propuesto dos posibles soluciones: aumentar la lipofilicidad del reactivador mediante la adición de grupos funcionales adecuados, o utilizar una oxima neutra, o ambas. [14] De hecho, los compuestos organofosforados lipofílicos y de carga neutra son capaces de inhibir tanto a la enzima AChE presente en el sistema nervioso central (SNC), como a aquella periférica en poco tiempo debido a que son capaces de difundir rápidamente a

través de la BBB. [15], [16]. Asimismo, cabe destacar que la oxima modelo seleccionada RS69N presenta una estructura anfifílica similar a las oximas RS194B y RS41A, capaces de reactivar la enzima AChE inhibida por el agente de guerra química tabún (Figura 2.1). [16]

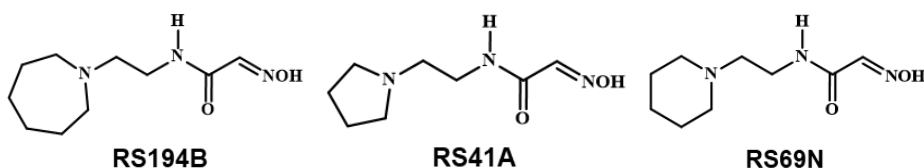


Figura 2.1. Estructuras químicas de la oximas RS194B, RS41A y RS69N.

Tras la selección del MOF y de la oxima a utilizar, se evaluó en primer lugar, y de forma teórica, la capacidad del MOF-808 para albergar la oxima RS69N mediante el modelado computacional Monte Carlo Metropolis, realizado usando el módulo *Adsorption Locator* del programa de Biovia *Materials Studio*. [17] El modelado confirmó que los mesoporos del MOF-808 presentaban una alta capacidad de carga de la oxima, pudiéndose llegar a acomodar hasta 52 moléculas de RS69N por celda unidad equivalente a 3.25 moléculas de RS69N por formula unidad del MOF (Figura 2.2a). Resulta importante destacar que la estructura del MOF cargado con oxima aún presenta un 7.36 % de volumen accesible para una molécula de 1.4 Å de radio, por lo que sería capaz de acomodar hasta 5 moléculas de DIFP (Figura 2.2b).

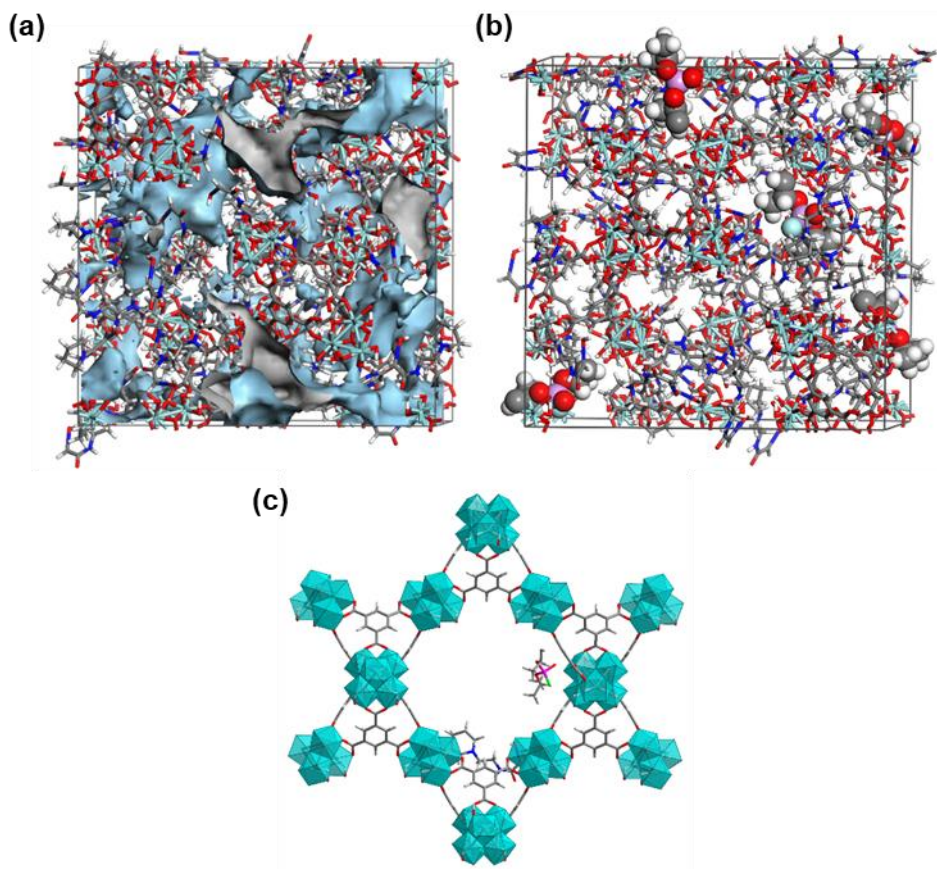


Figura 2.2. Modelado computacional de (a) la carga de 52 moléculas de la oxima RS69N por celda unidad destacando el 7.36 % de volumen accesible (b) la carga de 52 moléculas de RS69N y 5 moléculas de DIFP por celda unidad y (c) la co-adsorción preferencial de una molécula de la oxima RS69N y una molécula del tóxico DIFP en la matriz porosa del MOF-808.

A continuación, se prepararon tanto el MOF-808 como la oxima RS69N siguiendo métodos previamente publicados en bibliografía. [15], [18] Cabe destacar que el MOF-808 se preparó en forma de nanopartículas siguiendo un protocolo respetuoso con el medio ambiente desarrollado previamente por nuestro grupo. [18] Tras la síntesis, la cristalinidad y pureza del MOF-808 se evaluó mediante difracción de rayos X en polvo (PXRD) mientras que su porosidad se analizó por adsorción de N_2 a 77 K. Por otra parte, se confirmó la pureza de la oxima utilizando espectroscopía de resonancia magnética nuclear de 1H (1H NMR).

Tras la caracterización completa de los materiales (véase Anexo I), se llevó a cabo la encapsulación de la oxima RS69N en las cavidades de la matriz porosa siguiendo una estrategia de impregnación sólido-líquido en la que se empleó una suspensión de 20 mg de MOF-808 en una disolución metanólica de RS69N (1 mL). La mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente hasta la evaporación completa del disolvente con el objetivo de forzar la incorporación de la oxima en los poros del MOF-808 (véase Anexo I). El producto resultante, denominado RS69N@MOF-808, se lavó repetidas veces con agua, se secó mediante liofilización y se almacenó a 4 °C.

La encapsulación de la oxima RS69N en la matriz porosa del MOF-808 se confirmó mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) gracias a que las vibraciones características de la oxima (región $\sim 1300\text{-}800\text{ cm}^{-1}$) presentes en el espectro del material híbrido no se solapan con las bandas características del MOF (Figura 2.3a). A su vez, el análisis por difracción de rayos X en polvo muestra que el material híbrido RS69N@MOF-808 mantiene la integridad estructural del MOF puro tras el proceso de encapsulación (Figura 2.3b). Asimismo, la ausencia de reflexiones correspondientes a la oxima RS69N libre en el difractograma del material híbrido RS69N@MOF-808 descarta la co-precipitación de la oxima y la matriz porosa como fases cristalinas segregadas, confirmando que toda la oxima se encuentra adsorbida en la matriz porosa. Por otra parte, las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) mostraron que el material híbrido está constituido por partículas con una distribución de tamaño homogéneo (diámetro de partícula = $485 \pm 35\text{ nm}$, Figura 2.3c). Debido a que el tamaño de las partículas es superior a 200 nm, se espera que dichas partículas sean excretadas por el hígado y el bazo y, por lo tanto, resulten menos dañinas que otras partículas más pequeñas (15 – 200 nm). [19]

Tras confirmarse la formación del material híbrido RS69N@MOF-808, se procedió a cuantificar la cantidad de oxima RS69N incorporada en las cavidades del MOF-808 mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^1H (^1H NMR). Con este fin, se digirió el material híbrido (20 mg) en una disolución de NaOD (10 M) y el sobrenadante obtenido se analizó mediante ^1H NMR (véase Anexo I). Gracias a esto, se estimó una relación molar de 5.2 ± 0.9 moles de oxima por cada mol de MOF-808 (Figura AI.3). La mayor relación oxima:MOF encontrada experimentalmente con respecto al

cálculo computacional (véase arriba) podría estar relacionado con la presencia de defectos en la estructura, así como que parte de las moléculas de RS69N se acomoden en la superficie externa de las partículas de MOF-808.

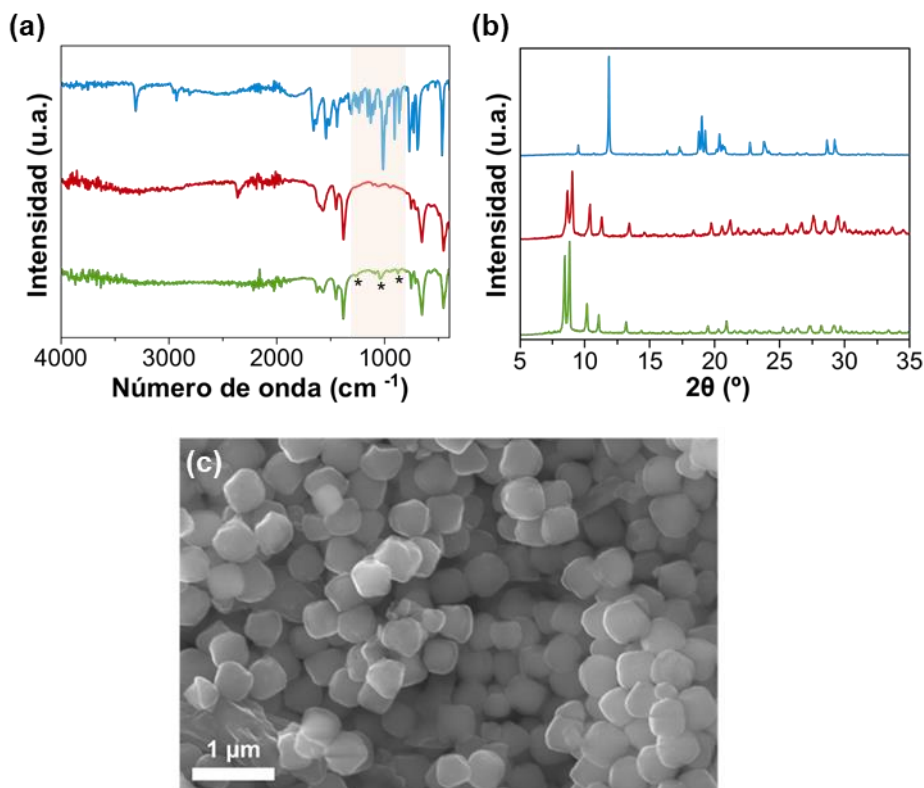


Figura 2.3. (a) Espectros infrarrojos y (b) difractogramas de rayos X en polvo de la oxima RS69N (azul), el MOF-808 (rojo), y el material híbrido RS69N@MOF-808 (verde). La zona en la que se encuentran las bandas características de la oxima RS69N en el espectro infrarrojo están señaladas con asteriscos y la región en la que aparecen se encuentra delimitada por una franja anaranjada. (c) Imagen de SEM del material híbrido RS69N@MOF-808. Barra de escala: 1 μm.

2.1 Liberación controlada de la oxima RS69N

Tras cuantificar la cantidad de oxima incorporada en la matriz porosa MOF-808, se procedió a evaluar la capacidad del material híbrido RS69N@MOF-808 para liberar de forma controlada dicha oxima bajo condiciones biológicas simuladas. Con este fin, se suspendieron 20 mg del material híbrido RS69N@MOF-808 junto con 20 μL de dimetilacetamida (DMA), utilizada como patrón interno, en 480 μL de PBS deuterado

(100 mM, pH = 7.4). La mezcla se incubó durante 24 h y la concentración de la oxima RS69N liberada a distintos tiempos se determinó mediante ^1H NMR (véase Anexo I).

Como se puede observar en el perfil de liberación de la oxima representado en la Figura 2.4, durante los primeros minutos se produce una liberación acelerada de la oxima (5.8 % de liberación acumulada transcurridos 10 min), probablemente debida a la desorción de las moléculas de oximas débilmente adsorbida en la superficie de las nanopartículas. A partir de los diez minutos, se observa una liberación gradual del agente reactivador que se mantiene durante al menos 24 horas (9.9 % y 37.5 % de liberación acumulada transcurridos 180 min y 24 h, respectivamente). Este segundo tramo de la liberación se asigna a la desorción de las moléculas de oxima alojados en el interior de las cavidades de la matriz porosa. Por tanto, estos resultados demuestran que la encapsulación de la oxima en las cavidades del MOF da lugar a un material que presenta una liberación gradual de la oxima en medio fisiológico simulado. Como resultado, esto permitiría obtener una concentración de oxima continua en el tiempo en el organismo tras su administración. Como se había indicado anteriormente, el control sobre la concentración del fármaco es beneficioso de cara a conseguir un tratamiento eficaz de desintoxicación. [20]

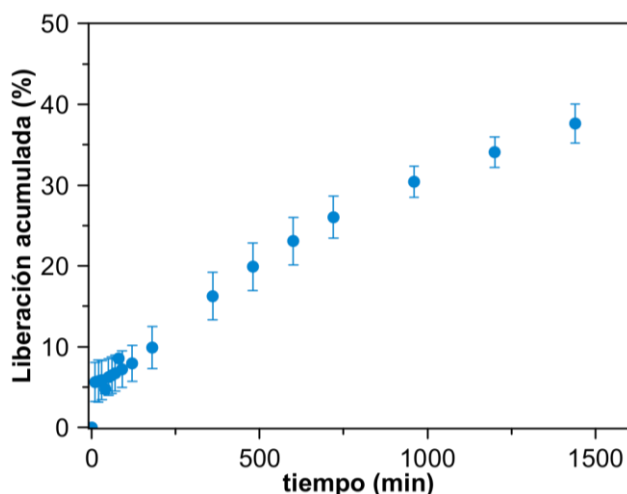
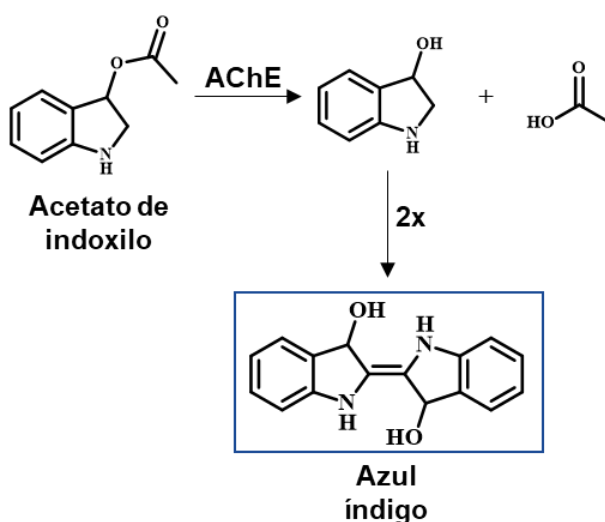


Figura 2.4. Perfil de liberación acumulada de la oxima RS69N obtenido a partir de una suspensión de RS69N@MOF-808 en fluido corporal simulado. Condiciones experimentales: RS69N@MOF-808 (20 mg), DMA (20 μL , patrón interno) y PBS deuterado (480 μL , 100 mM, pH = 7.4), temperatura ambiente.

2.2 Reactivación de la enzima acetilcolinesterasa mediante la oxima RS69N

Una vez evaluada la capacidad del material híbrido RS69N@MOF-808 para liberar de forma gradual la oxima RS69N, se estudió la capacidad de la oxima liberada para reactivar la enzima AChE previamente inhibida con un compuesto organofosforado modelo (DIFP). Para ello, se realizaron diferentes ensayos enzimáticos con el objetivo de cuantificar la actividad enzimática de la AChE bajo diferentes condiciones (p.ej. en presencia y ausencia del compuesto tóxico, actividad de inhibición y control, respectivamente; y tras la adición del reactivador sobre la AChE previamente inhibida es decir, actividad de la enzima tras su reactivación). Con esta finalidad se empleó el método colorimétrico del *acetato de indoxilo* [21] . Este protocolo se basa en la habilidad de enzima AChE para hidrolizar el compuesto acetato de indoxilo (incoloro) y formar indoxilo (sustrato incoloro) que se oxida rápidamente generando azul índigo (producto coloreado) (Esquema 2.2). Por tanto, determinando espectrofotométricamente la concentración de azul índigo generada es posible calcular la actividad enzimática de la AChE.



Esquema 2.2. Reacción de hidrólisis de acetato de indoxilo catalizada por la enzima AChE y posterior oxidación a azul índigo en la que se basa el método de actividad enzimática colorimétrico empleado. Imagen adaptada de la bibliografía. [21]

En primer lugar, se evaluó la capacidad de la oxima RS69N para recuperar la actividad enzimática de la AChE que se ha inhibido previamente con el compuesto tóxico DIFP. Para ello, se prepararon varias disoluciones en PBS (100 mM, pH = 7.4) conteniendo el compuesto tóxico DIFP ($[DIFP]_{\text{final}} = 5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) y la enzima AChE y se incubaron durante 30 minutos para que tuviera lugar la inhibición parcial de la enzima. Transcurrido este tiempo, se añadieron distintas cantidades de la oxima RS69N sobre las disoluciones de enzima inhibida ($[RS69N] = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$ y $5 \times 10^{-3} \text{ M}$) y se incubaron durante 30 minutos más para llevar a cabo la reactivación enzimática. Finalmente, la actividad enzimática de la AChE en cada una de las disoluciones se determinó mediante el método colorimétrico del *acetato de indoxilo*. Además, se realizaron dos ensayos enzimáticos adicionales como controles: i) un ensayo enzimático control para determinar la actividad enzimática de la AChE en ausencia del compuesto tóxico DIFP (actividad control de la enzima) y ii) un ensayo enzimático control para determinar la actividad enzimática de la AChE en presencia del DIFP y en ausencia de reactivador (actividad enzimática de inhibición) (Ver Anexo para más información sobre los detalles experimentales).

Por una parte, como se puede apreciar en la Tabla 2.1, el compuesto DIFP es capaz de inhibir a la AChE, reduciendo su actividad enzimática en un 62 % en las condiciones ensayadas. Asimismo, los resultados de los ensayos enzimáticos indican que el compuesto RS69N se comporta como un agente reactivador de la enzima AChE, logrando un porcentaje de reactivación del $25 \pm 5 \%$ y $97 \pm 3 \%$ para las concentraciones de oxima RS69N libre de $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ y $5 \times 10^{-3} \text{ M}$, respectivamente.

Tabla 2.1. Experimentos control de actividad de la enzima libre, inhibición por DIFP y reactivación por RS69N.

Muestra	Actividad enzimática (mU)
Control _{enzima}	1.07 ± 0.03
Control _{inhibición} ($[DIFP] = 5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$)	0.41 ± 0.04
RS69N ($5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$)	0.56 ± 0.03
RS69N ($5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$)	1.04 ± 0.01

Una vez confirmada la capacidad del compuesto RS69N para restaurar la actividad de la enzima AChE, se evaluó si la oxima liberada al medio desde la matriz del material RS69N@MOF-808 tras su incubación en medio fisiológico simulado era capaz de

reactivar a la enzima AChE previamente inhibida con DIFP. Para ello, se preparó una suspensión de RS69N@MOF-808 en PBS (100 mM, pH = 7.4) y se incubó durante 24 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo, el sólido se separó del líquido por centrifugación. A continuación, una alícuota del sobrenadante conteniendo la oxima RS69N se adicionó sobre una disolución de AChE que había sido inhibida con DIFP durante 30 min ([DIFP] final = $5 \cdot 10^{-6}$ M, [RS69N] final = 3.2×10^{-3} M) y se incubó durante 30 minutos adicionales para que tuviera lugar la reacción de reactivación. Finalmente, se evaluó la actividad enzimática de la AChE mediante el método colorimétrico del *acetato de indoxilo*. Como en el caso anterior, se realizaron dos experimentos control adicionales para determinar la actividad control de la enzima y la actividad enzimática de inhibición.

Como se observa en la Tabla 2.2, la oxima liberada es capaz de restaurar por completo la actividad de la enzima previamente inhibida con DIFP (inhibición enzimática del 70 %). Estos resultados confirman que la presencia del MOF-808 en medio fisiológico no afecta negativamente a la capacidad de la oxima liberada de reactivar la enzima AChE.

Tabla 2.2. Reactivación de AChE con el sobrenadante de RS69N@MOF-808.

Muestra	Actividad enzimática (mU)
Control _{enzima}	1.68 ± 0.04
Control _{inhibición}	0.50 ± 0.02
RS69N _{liberada} ($3.2 \cdot 10^{-3}$ M)	1.69 ± 0.01

2.3 Descontaminación de compuestos organofosforados modelo tipo G

Los Zr-MOFs (entre los que cabe destacar el MOF-808) han demostrado ser altamente eficaces en la captura y eliminación de compuestos organofosforados presentes en medio acuoso [24], sin embargo, existen pocos estudios sobre su comportamiento en medios biológicos. Por ello, se decidió evaluar la capacidad del material híbrido RS69N@MOF-808 para descontaminar disoluciones del compuesto organofosforado modelo DIFP en fluido biológico simulado (PBS 100 mM, pH = 7.4).

Con esta finalidad, se empleó una suspensión (volumen total 500 μ L) compuesta por el material híbrido RS69N@MOF-808 (20 mg), DIFP (2.9×10^{-2} M) y DMA (2.9×10^{-2} M), este último utilizado como patrón interno. Esta suspensión se mantuvo en agitación y a temperatura ambiente durante 24 h. Durante el experimento, la concentración del

compuesto organofosforado modelo DIFP en la disolución se cuantificó a diferentes tiempos mediante cromatografía de gases. A su vez, con el objetivo de identificar el efecto que las moléculas huésped de oxima encapsuladas tenían sobre la capacidad del MOF-808 para capturar/degradar las moléculas de DIFP en PBS, se realizó un experimento similar salvo que, en este segundo caso, la suspensión estaba formada por el MOF-808 (20 mg), DIFP (2.9×10^{-2} M) y DMA (2.9×10^{-2} M) a modo de control.

Los resultados, representados en la Figura 2.5 y Figura AI.6, muestran que el material híbrido RS69N@MOF-808 es capaz de capturar el compuesto organofosforado modelo DIFP, alcanzándose una tasa de eliminación del 30 % tras 90 min y un 95 % transcurridas 24 h mediante un proceso de adsorción sólido-líquido. La cinética de este proceso se ajustó a un modelo de adsorción de pseudo-segundo orden, estimándose un tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de 183 min para la captura de DIFP. Por su parte, la matriz porosa MOF-808 sin moléculas de RS69N en su interior (Figura 2.5 y Figura AI.7), presenta una cinética de adsorción más rápida que la observada para RS69N@MOF-808, con un tiempo de vida media de 99 min.

Estos resultados indican que, como era de esperar, la presencia de moléculas huésped en las cavidades de la matriz porosa (RS69N) compite con la capacidad del material para eliminar el compuesto organofosforado DIFP de la disolución. No obstante, cabe destacar que el material RS69N@MOF-808 es aun capaz de capturar casi en su totalidad las moléculas de DIFP tras 24 horas de incubación, aunque la cinética de adsorción se vea disminuida a la mitad. A su vez, como se ha mencionado anteriormente, se espera que las partículas relativamente grandes (> 200 nm) de RS69N@MOF-808, sean potencialmente excretables a través del hígado y el bazo. De esta forma, el uso del sistema híbrido RS69N@MOF-808 podría permitir la eliminación del DIFP del organismo, impidiendo que las moléculas tóxicas atravesasen la barrera hematoencefálica y por tanto, evitando su efecto perjudicial sobre la salud. [19]

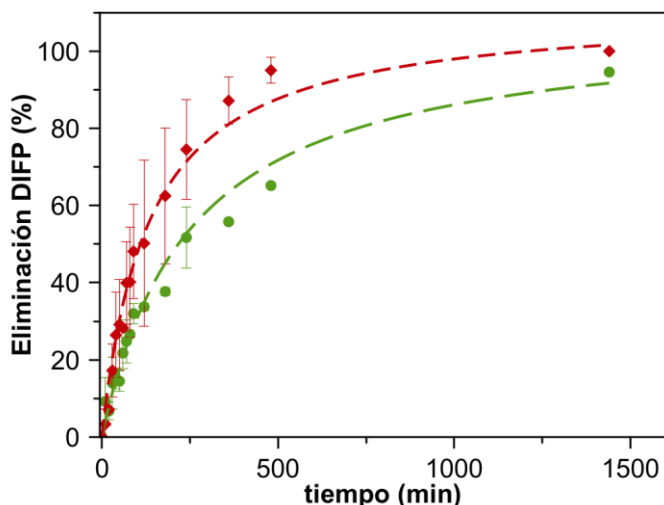


Figura 2.5. Eliminación acumulada de DIFP en fluido corporal simulado por parte del MOF-808 (curva roja) y del material híbrido RS69N@MOF-808 (curva verde). Condiciones experimentales: material poroso (20 mg), DIFP (2.9×10^{-2} M), DMA (2.9×10^{-2} M, patrón interno) y PBS (0.5 mL, 100 mM, pH = 7.4), temperatura ambiente.

A continuación, con el objetivo de elucidar la naturaleza del proceso de eliminación del compuesto organofosforado modelo DIFP de la disolución, es decir, adsorción o degradación del compuesto tóxico, se llevaron a cabo estudios adicionales de ^1H y ^{31}P NMR. Para ello, el material RS69N@MOF-808 (20 mg) se suspendió en una mezcla equimolar de DIFP y DMA (2.9×10^{-2} M), a modo de patrón interno, en fluido corporal simulado (PBS deuterado 100 mM, pH = 7.4). La suspensión resultante se mantuvo en agitación durante 24 h y, transcurrido este tiempo, el sobrenadante y el sólido se separaron mediante centrifugación.

El análisis por NMR de ^{31}P del sobrenadante demostró la presencia de dos especies de fósforo en disolución: DIFP y su producto de degradación, el hidrogenofosfato de diisopropilo (Figura 2.6a). Ambos productos se cuantificaron mediante ^1H NMR y los resultados obtenidos demostraron que, transcurridas 24 h, el 8.7 % del DIFP contenido inicialmente en la mezcla había sufrido un proceso de hidrólisis mientras que el 17.2 % aún permanecía de forma libre en la disolución (Figura 2.6b).

Por otra parte, el sólido se trató con $\text{DMSO-}d_6$ para extraer aquellas especies que pudieran encontrarse adsorbidas en la matriz porosa. El análisis por NMR de la disolución

extraída demostró que únicamente el DIFP (y no su producto de degradación) se encontraba adsorbido en la matriz porosa del MOF-808.

De esta forma, los análisis por NMR junto con los estudios de cromatografía, muestran que el sistema híbrido RS69N@MOF-808 es capaz de adsorber en su matriz porosa la mayor parte del tóxico DIFP (74.2 %) y degradar un 8.7 % de dicho tóxico, permaneciendo únicamente un 17.2 % del mismo en disolución transcurridas 24 h.

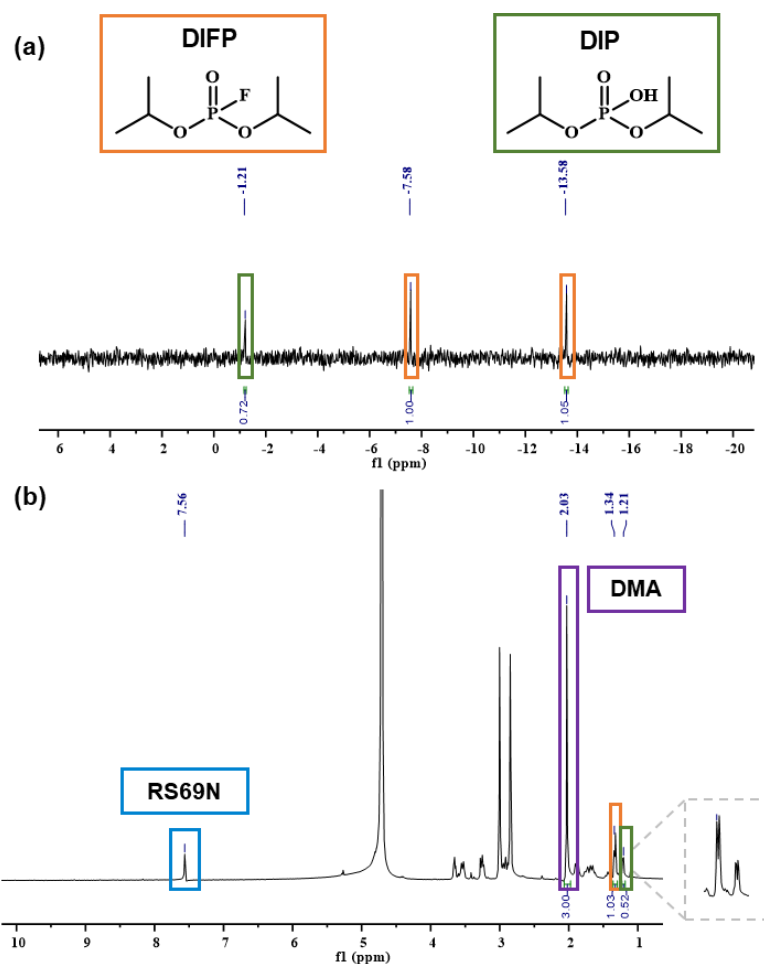


Figura 2.6. (a) Espectros de NMR de ^{31}P y (b) de ^1H del sobrenadante obtenido tras incubar el material híbrido RS69N@MOF-808 con el compuesto organofosforado DIFP durante 24 h. Condiciones experimentales: RS69N@MOF-808 (20 mg), DIFP (2.9×10^{-2} M), DMA (2.9×10^{-2} M, patrón interno) y PBS deuterado (0.5 mL, 100 mM, pH = 7,4), temperatura ambiente.

Finalmente, y con el objetivo de evaluar la capacidad detoxificadora dual del material RS69N@MOF-808 (captura del compuesto tóxico DIFP y reactivación enzimática

mediante la RS69N liberada) se llevaron a cabo ensayos de actividad enzimática adicionales. Con este objetivo se dispersaron 20 mg del material híbrido RS69N@MOF-808 en una disolución de DIFP (2.9×10^{-2} M, 0.5 mL) en PBS (100 mM, pH = 7.4), y la mezcla incubó a 37 °C durante 24 h. A su vez, una disolución de DIFP (2.9×10^{-2} M, 0.5 mL) en PBS (100 mM, pH = 7.4) se preparó como control negativo y se incubó en las mismas condiciones. Transcurrido este tiempo, se adicionó una alícuota de cada muestra ([DIFP] final en ensayo de inhibición = [DIFP] final = $5 \cdot 10^{-6}$ M,) sobre una disolución en PBS conteniendo a la enzima AChE y las mezclas se incubaron durante 1 hora para que la reacción de inhibición enzimática debido al DIFP tuviera lugar (*Véase Anexo I para más detalles experimentales*). En un último paso, se evaluó la actividad enzimática de la AChE en cada una de las disoluciones. Como en los ensayos enzimáticos anteriores, se realizó un ensayo enzimático adicional para evaluar la actividad enzimática de la AChE en ausencia del compuesto tóxico DIFP.

Como se observa en la Tabla 2.3, la disolución de DIFP inhibía la actividad de la enzima AChE un 63.5 ± 1.3 %. Por otra parte, el sobrenadante obtenido de la mezcla de RS69N@MOF-808 y DIFP dio lugar a una inhibición de solo 13.7 ± 1.5 %.

Tabla 2.3. Ensayo de inhibición de AChE con DIFP en ausencia o presencia de RS69N@MOF-808.

Muestra	Actividad enzimática (mU)
Control _{enzima}	1.07 ± 0.03
Control _{inhibición} [DIFP] = $5 \cdot 10^{-6}$ M	0.42 ± 0.03
RS69N@MOF-808 + [DIFP] = $5 \cdot 10^{-6}$ M	0.93 ± 0.09

De esta forma, se confirma que el material híbrido RS69N@MOF-808 es capaz de reducir significativamente el efecto inhibitorio del compuesto organofosforado modelo DIFP tiene sobre la actividad enzimática de AChE (tasa de detoxificación del 78.4 %) gracias a su actividad dual: *i*) captura del compuesto tóxico y *ii*) reactivación de la actividad enzimática de AChE mediante la liberación del agente reactivador RS69N.

3 Conclusiones

En este capítulo se ha aprovechado la porosidad excepcional y la elevada densidad de posibles sitios de adsorción para compuestos organofosforados que presenta la red metal-

orgánica porosa de circonio(IV) $[\text{Zr}_6\text{O}_4(\text{OH})_4(\text{BTC})_2(\text{HCOO})_6]$ (MOF-808, H_3BTC = ácido benceno-1,3,5-tricarboxílico), para incorporar en las cavidades de su matriz porosa la oxima neutra 2-(hidroxiimino)-*N*-2-(piperidin-1-il)etilacetamida (RS69N). Con este fin, se ha empleado una estrategia de impregnación sólido-líquido que ha dado lugar a una eficiencia de encapsulación de 5.2 ± 0.9 moles de oxima por cada mol de MOF-808. Dicha capacidad de adsorción excede la calculada computacionalmente (3.25 moles) lo que apunta al alojamiento de las moléculas huésped en exceso en defectos y/o en la superficie externa de las partículas.

El nuevo material híbrido, denominado RS69N@MOF-808, es capaz de liberar de forma continua y controlada la oxima RS69N, presentando una liberación de oxima acumulada del 37.5 % y una concentración de oxima liberada de 3.2×10^{-3} M tras una incubación de 24 h en condiciones biológicas simuladas. Como se ha demostrado mediante ensayos de actividad enzimática, esta concentración de oxima es capaz de reactivar por completo la enzima acetilcolinesterasa (AChE) previamente inhibida por el compuesto organofosforado modelo diisopropilfluorofosfato (DIFP).

También, se ha podido comprobar que el material híbrido RS69N@MOF-808 es capaz de capturar eficazmente el agente nervioso modelo DIFP en fluido corporal simulado (PBS 100 mM, pH = 7.4). Concretamente, el sistema híbrido es capaz de capturar un 95 % de DIFP tras 24, principalmente mediante un proceso de adsorción ($t_{1/2}$ = 183 min). Si bien el MOF-808 de forma individual presenta una eliminación de DIFP ligeramente mayor, del 100 % transcurridas 24 h, y una cinética de adsorción más rápida ($t_{1/2}$ = 99 min). Por consiguiente, se puede concluir que la incorporación de la oxima en la matriz porosa del MOF-808 no afecta de forma significativa a la cantidad máxima de DIFP que este puede capturar. Por otra parte, gracias a los análisis por NMR de ^1H y ^{31}P se confirmó que el material híbrido es capaz de degradar parcialmente el DIFP (8.7 %) y de adsorber la mayor parte del tóxico en su matriz porosa (74.2 %). Finalmente, ensayos adicionales de actividad enzimática demostraron que el material híbrido RS69N@MOF-808 es capaz de reducir tras 24 h de incubación en un 78.4 %, el efecto inhibitorio que el compuesto organofosforado modelo DIFP presenta sobre la enzima AChE.

Por todo lo descrito anteriormente, se confirma que el nuevo material híbrido RS69N@MOF-808 es capaz de liberar de forma gradual y controlada la oxima RS69N, consiguiendo con ello reactivar completamente la enzima acetilcolinesterasa previamente inhibida por el tóxico DIFP. A su vez, este material híbrido también es capaz de detoxificar disoluciones conteniendo el compuesto DIFP, lo que reduce de forma significativa la capacidad de este tóxico para inhibir la enzima AChE. De esta forma, se concluye que el nuevo material híbrido RS69N@MOF-808 presenta un comportamiento dual en el tratamiento de la intoxicación por compuestos organofosforados.

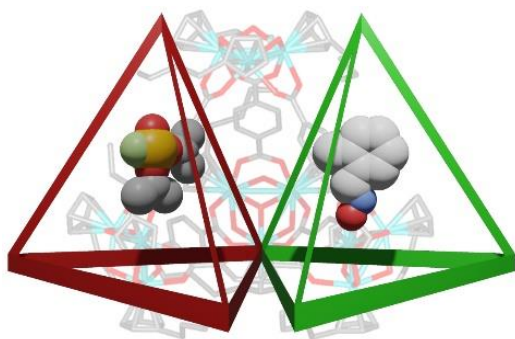
4 Referencias bibliográficas

- [1] H. Soreq and S. Seidman, "Acetylcholinesterase — new roles for an old actor," *Nat Rev Neurosci*, vol. 2, no. 4, pp. 294–302, Apr. 2001, doi: 10.1038/35067589.
- [2] F. Worek, H. Thiermann, L. Szinicz, and P. Eyer, "Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes," *Biochem Pharmacol*, vol. 68, no. 11, pp. 2237–2248, Dec. 2004, doi: 10.1016/j.bcp.2004.07.038.
- [3] L. Gorecki *et al.*, "SAR study to find optimal cholinesterase reactivator against organophosphorous nerve agents and pesticides," *Archives of Toxicology*, vol. 90, no. 12. Springer Verlag, pp. 2831–2859, Dec. 01, 2016, doi: 10.1007/s00204-016-1827-3.
- [4] M. Eddleston, N. A. Buckley, P. Eyer, and A. H. Dawson, "Management of acute organophosphorus pesticide poisoning," *The Lancet*, vol. 371, no. 9612, pp. 597–607, Feb. 2008, doi: 10.1016/S0140-6736(07)61202-1.
- [5] B. Antonijevec and M. P. Stojiljkovic, "Unequal efficacy of pyridinium oximes in acute organophosphate poisoning," *Clinical Medicine and Research*, vol. 5, no. 1, pp. 71–82, Mar. 2007, doi: 10.3121/cmr.2007.701.
- [6] D. Zhao *et al.*, "Loading and Sustained Release of Pralidoxime Chloride from Swellable MIL-88B(Fe) and Its Therapeutic Performance on Mice Poisoned by Neurotoxic Agents," *Inorg Chem*, vol. 61, no. 3, pp. 1512–1520, Jan. 2022, doi: 10.1021/acs.inorgchem.1c03227.
- [7] K. S. Pawar, R. R. Bhoite, C. P. Pillay, S. C. Chavan, D. S. Malshikare, and S. G. Garad, "Continuous pralidoxime infusion versus repeated bolus injection to treat organophosphorus pesticide poisoning: a randomised controlled trial," *The Lancet*, vol. 368, no. 9553, pp. 2136–2141, Dec. 2006, doi: 10.1016/S0140-6736(06)69862-0.
- [8] H. D. Lawson, S. P. Walton, and C. Chan, "Metal-Organic Frameworks for Drug Delivery: A Design Perspective," *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 13, no. 6, pp. 7004–7020, Feb. 2021, doi: 10.1021/acsami.1c01089.
- [9] S. M. F. Vilela *et al.*, "Nanometric MIL-125-NH₂ metal-organic framework as a potential nerve agent antidote carrier," *Nanomaterials*, vol. 7, no. 10, Oct. 2017, doi: 10.3390/nano7100321.
- [10] R. J. Drout, L. Robison, Z. Chen, T. Islamoglu, and O. K. Farha, "Zirconium Metal–Organic Frameworks for Organic Pollutant Adsorption," *Trends in Chemistry*, vol. 1, no. 3, Cell Press, pp. 304–317, Jun. 01, 2019, doi: 10.1016/j.trechm.2019.03.010.
- [11] L. González, F. J. Carmona, N. M. Padial, J. A. R. Navarro, E. Barea, and C. R. Maldonado, "Dual removal and selective recovery of phosphate and an organophosphorus pesticide from water by a Zr-based metal-organic framework," *Mater Today Chem*, vol. 22, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.mtchem.2021.100596.
- [12] J. Jiang, F. Gándara, Y. B. Zhang, K. Na, O. M. Yaghi, and W. G. Klemperer, "Superacidity in sulfated metal-organic framework-808," *J Am Chem Soc*, vol. 136, no. 37, pp. 12844–12847, Aug. 2014, doi: 10.1021/ja507119n.
- [13] H. Yuan *et al.*, "Particulate toxicity of metal-organic framework UiO-66 to white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*," *Ecotoxicol Environ Saf*, vol. 247, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.114275.
- [14] S. Ghosh, K. Jana, and B. Ganguly, "Influence of gauche effect on uncharged oxime reactivators for the reactivation of tabun-inhibited AChE: quantum chemical and steered molecular dynamics studies," *J Comput Aided Mol Des*, vol. 32, no. 7, pp. 793–807, Jul. 2018, doi: 10.1007/s10822-018-0130-1.
- [15] Z. Radić *et al.*, "Refinement of structural leads for centrally acting oxime reactivators of phosphorylated cholinesterases," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 15, pp. 11798–11809, Apr. 2012, doi: 10.1074/jbc.M111.333732.
- [16] Z. Kovarik *et al.*, "Centrally acting oximes in reactivation of tabun-phosphoramidated AChE," in *Chemico-Biological Interactions*, Mar. 2013, pp. 77–80, doi: 10.1016/j.cbi.2012.08.019.
- [17] D. S. Biovia, *Materials Studio* R2. San Diego, CA: Dassault Systèmes BIOVIA, 2018.
- [18] L. González, R. Gil-San-Millán, J. A. R. Navarro, C. R. Maldonado, E. Barea, and F. J. Carmona, "Green synthesis of zirconium MOF-808 for simultaneous phosphate recovery and organophosphorus pesticide detoxification in wastewater," *J Mater Chem A Mater*, vol. 10, no. 37, pp. 19606–19611, Apr. 2022, doi: 10.1039/d2ta02074b.
- [19] R. Ettlinger *et al.*, "Toxicity of metal-organic framework nanoparticles: From essential analyses to potential applications," *Chemical Society Reviews*, vol. 51, no. 2, Royal Society of Chemistry, pp. 464–484, Jan. 21, 2022, doi: 10.1039/d1cs00918d.
- [20] K. S. Pawar, R. R. Bhoite, C. P. Pillay, S. C. Chavan, D. S. Malshikare, and S. G. Garad, "Continuous pralidoxime infusion versus repeated bolus injection to treat organophosphorus pesticide poisoning: a

- randomised controlled trial,” *The Lancet*, vol. 368, no. 9553, pp. 2136–2141, Dec. 2006, doi: 10.1016/S0140-6736(06)69862-0.
- [21] M. Pohanka, M. Hrabínová, K. Kuca, and J. P. Simonato, “Assessment of acetylcholinesterase activity using indoxylacetate and comparison with the standard Ellman’s method,” *Int J Mol Sci*, vol. 12, no. 4, pp. 2631–2640, 2011, doi: 10.3390/ijms12042631.
- [22] J. Seixas De Melo, A. P. Moura, and M. J. Melo, “Photophysical and spectroscopic studies of indigo derivatives in their keto and leuco forms,” *Journal of Physical Chemistry A*, vol. 108, no. 34, pp. 6975–6981, Aug. 2004, doi: 10.1021/jp049076y.
- [23] E. Geravand, F. Farzaneh, R. Gil-San-Millan, F. J. Carmona, and J. A. R. Navarro, “Mixed-Metal Cerium/Zirconium MOFs with Improved Nerve Agent Detoxification Properties,” *Inorg Chem*, vol. 59, no. 22, pp. 16160–16167, Nov. 2020, doi: 10.1021/acs.inorgchem.0c01434.

CAPÍTULO III

**Poliedros metal-orgánicos de circonio como vehículos de agentes
reactivadores de acetilcolinesterasa**



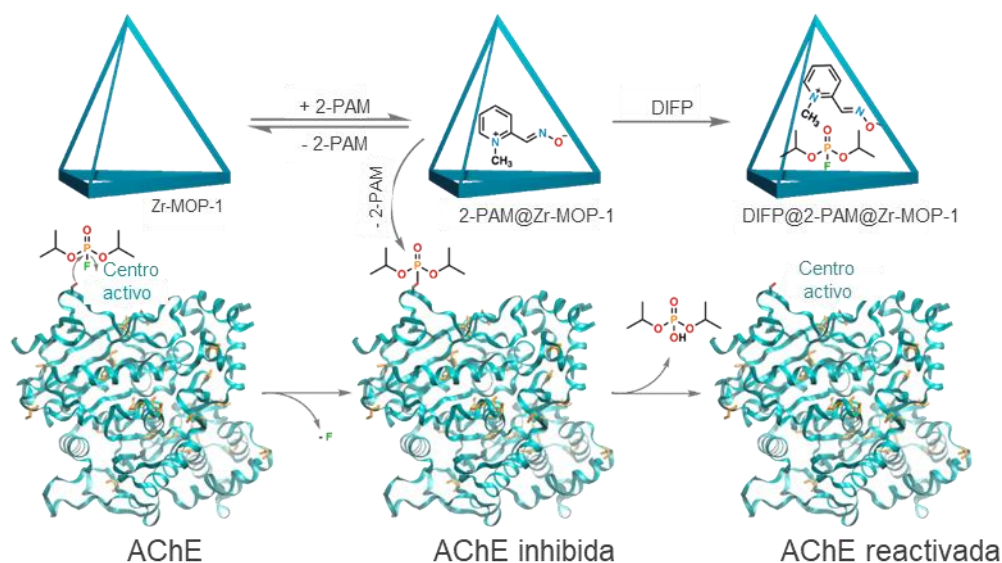
En este capítulo se aborda el concepto de la posible utilidad de poliedros metal orgánicos de circonio(IV) como vehículos de transporte de fármacos reactivadores de la enzima acetilcolinesterasa capaces de revertir el envenenamiento por compuestos organofosforados. Con esta finalidad se han sintetizado y caracterizado estructuralmente las cajas tetraédricas moleculares catiónicas $[(n\text{-butilCpZr})_3(\text{OH})_3\text{O})_4\text{L}_6]\text{Cl}_6$ (Zr-MOP-1; L = ácido tereftálico, $n\text{-butilCp}$ = $n\text{-butilciclopentadienilo}$ y Zr-MOP-10; L = ácido bifeníl-4,4'-dicarboxílico) decoradas con residuos lipofílicos alquílicos que presentan cavidades accesibles de ~ 9.8 y ~ 10.7 Å de diámetro interno, respectivamente. Por otra parte, se ha evaluado la capacidad de estos sistemas para capturar el compuesto organofosforado modelo diisopropilfluorofosfato (DIFP) así como de almacenar y liberar el fármaco pralidoxima. La liberación controlada de este fármaco da lugar a la reactivación de la enzima acetilcolinesterasa, bajo condiciones biológicas simuladas. Asimismo, se ha llevado a cabo la incorporación de un sistema 2-PAM@Zr-MOP en liposomas de fosfatidilcolina biocompatibles y se ha estudiado su neurotoxicidad mediante ensayos de viabilidad celular con la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

1 Poliedros metal-orgánicos de circonio(IV)

Como se mencionó previamente en la introducción de esta Tesis Doctoral, las redes metal-orgánicas de circonio (Zr-MOFs) basadas en unidades de construcción secundarias del tipo $[\text{Zr}_6\text{O}_4(\text{OH})_4]$ están siendo ampliamente estudiadas para la captura y degradación hidrolítica de compuestos organofosforados debido a que presentan una elevada robustez, una alta accesibilidad a su estructura porosa, y núcleos metálicos de circonio con una elevada acidez de Lewis.[1]–[4] Asimismo, como se demostró en el Capítulo II de esta Tesis Doctoral, las redes metal-orgánicas de circonio(IV) pueden actuar como sistemas duales para la adsorción de compuestos organofosforados y la encapsulación/liberación controlada de oximas, a la vez que sirven como reactivadores de la enzima acetilcolinesterasa. Sin embargo, su naturaleza polimérica, salvo cuando se encuentran en forma nanométrica, restringe las rutas en las que los Zr-MOFs pueden ser administrados a los pacientes (p.ej. la vía intravenosa requiere de materiales de tamaño nanométrico) lo que, por tanto, limita su uso clínico en el tratamiento de la intoxicación

por compuestos organofosforados. Por el contrario, los poliedros metal-orgánicos (MOPs),[5]–[7] son entidades moleculares solubles que pueden considerarse unidades reducidas de los MOFs, y que se caracterizan por presentar una química variada tanto en estado sólido como en disolución. En concreto, la solubilidad de los MOPs en disolventes adecuados facilita en gran medida su procesabilidad frente a los MOFs, ya que permite el uso de estrategias de funcionalización en disolución para, por ejemplo, incrementar su biocompatibilidad y, de esta forma, allanar el camino para su uso como vehículos de moléculas bioactivas. Por ejemplo, Liu y colaboradores han demostrado recientemente la posibilidad de procesar MOPs de circonio en fase homogénea y preparar constructos circonio-MOPs@liposoma quirales que permiten el transporte selectivo de aminoácidos a través de membranas. [8]

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, en este capítulo se parte de la hipótesis de que los MOPs de circonio, con una funcionalización adecuada, podrían ser capaces de transportar/liberar moléculas de fármacos mediante internalización celular y/o difusión a través de la barrera hematoencefálica, lo que podría permitir el desarrollo de nuevos antídotos para el tratamiento de la intoxicación por compuestos organofosforados (Esquema 3.1).



Esquema 3.1. Resumen del comportamiento dual de los ensamblajes Zr-MOP para la captura del agente nervioso modelo diisopropil fluorofosfato (DIFP), la liberación controlada del fármaco

pralidoxima (2-PAM) y la reactivación de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). Estructura cristalina de la acetilcolinesterasa humana obtenida de la base de datos de proteínas Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RSCB). [9]

2 Síntesis y caracterización de poliedros metal-orgánicos

La hidrólisis parcial de $(n\text{-butilCp})_2\text{ZrCl}_2$ en N,N' -dimetilformamida (DMF) húmeda y la posterior coordinación de los ligandos orgánicos de tipo carboxilato a 70 °C da lugar a la formación de Zr-MOPs tetraédricos robustos decorados con cadenas de n -butilo y con fórmula $[((n\text{-butilCpZr})_3(\text{OH})_3\text{O})_4\text{L}_6]\text{Cl}_6$ (Zr-MOP-1; L = ácido tereftálico, $n\text{-butilCp}$ = n -butilciclopentadienilo y Zr-MOP-10; L = ácido bifenil-4,4'-dicarboxílico), como se demostró mediante resonancia magnética nuclear de ^1H (^1H NMR), espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI-MS), microscopía electrónica de barrido (SEM) asociada a espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDX), así como difracción de rayos X en polvo (PXRD) y de monocristal (SCXRD) (Figura 3.1, Figura 3.4, Figura AI.8 - Figura AI.10, Figura AI.14 - Figura AI.19, Figura AI.21 y Figura AI.26 - Figura AI.29).

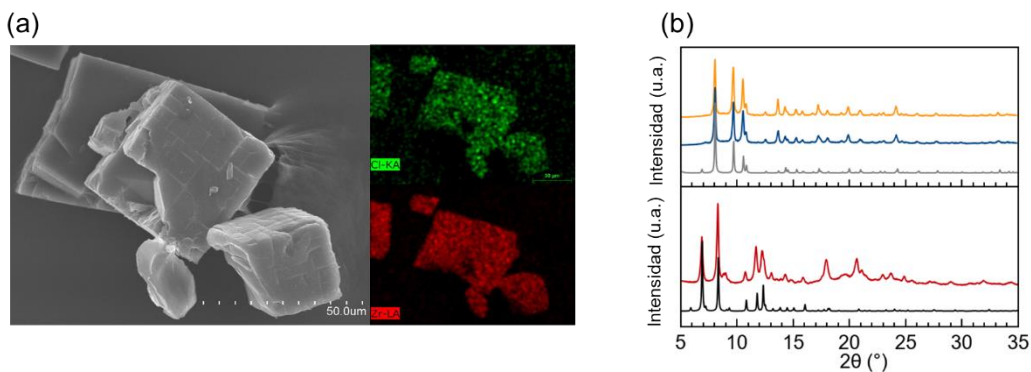


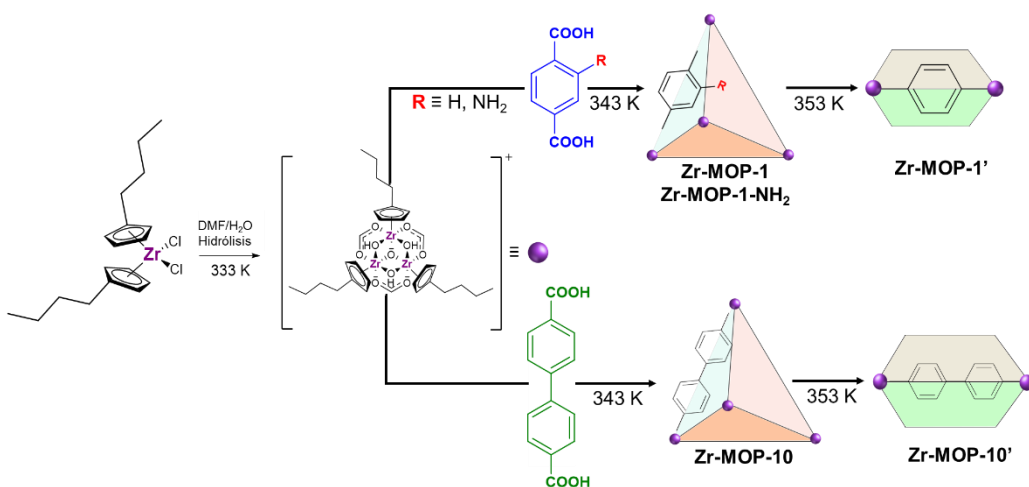
Figura 3.1. (a) Imágenes SEM-EDX de Zr-MOP-1; código de colores: Cl, verde y Zr, rojo. (b) Arriba: comparación de los patrones de PXRD obtenidos para el Zr-MOP-1 (línea azul) y Zr-MOP-1-NH₂ (línea amarilla) con el patrón PXRD simulado para el Zr-MOP-1-NH₂ (línea gris). Abajo: patrón PXRD del Zr-MOP-10 experimental (línea roja) y simulado (línea negra).

En cambio, si se calienta la mezcla de reacción a 80 °C se obtienen entidades moleculares diméricas no porosas con forma de “cigarro” y fórmula química $[((n\text{-butilCpZr})_3(\text{OH})_3\text{O})_2\text{L}_3]\text{Cl}_2$, que se han denominado Zr-MOP-1' y Zr-MOP-10' (Figura 3.2c y Figura AI.14, Figura AI.20 y Figura AI.21). Estos resultados concuerdan con la

teoría de que los ensamblajes tetraédricos y diméricos son los productos de reacción cinéticos y termodinámicos, respectivamente.

También se preparó un poliedro metal-orgánico de circonio (Zr-MOP-1-NH₂) siguiendo el mismo protocolo que en el caso de Zr-MOP-1, pero usando el ácido 2-aminotereftálico como espaciador orgánico en lugar del ácido tereftálico. En este caso, únicamente se aislaron cajas tetraédricas, probablemente debido a la presencia de los sustituyentes -NH₂ en los anillos del ligando orgánico, que favorece la formación de la fase tetramérica por impedimento estérico. Es importante resaltar que estos resultados están en línea con lo observado previamente bibliografía, donde se ha demostrado que tanto la longitud como los sustituyentes del espaciador orgánico determinan la obtención de una u otra fase[10].

En el Esquema 3.2 se recogen, de manera general, las rutas empleadas para obtener los distintos poliedros metal-orgánicos de circonio(IV).



Esquema 3.2. Representación esquemática de la síntesis de poliedros metal-orgánicos tetraédricos funcionalizados con *n*-butilo Zr-MOP-1(0)-X y sus isómeros diméricos Zr-MOP-1(0)'. X = H, NH₂

La estructura molecular y cristalina del Zr-MOP-1-NH₂ y el Zr-MOP-10 tetraméricos, así como del Zr-MOP-1' dimérico se han resuelto de manera inequívoca mediante difracción de rayos X de monocristal (Figura 3.2 y Figura AI.14 - Figura AI.16). Por el contrario, no fue posible aislar monocristales de los Zr-MOP-1 y Zr-MOP-10' de suficiente calidad para la resolución de su estructura mediante SCXRD. No obstante, la

comparación del patrón de difracción de rayos X en polvo del Zr-MOP-1 con el de su análogo funcionalizado con grupos -NH_2 confirmó que ambos materiales eran isoestructurales (Figura 3.1b).

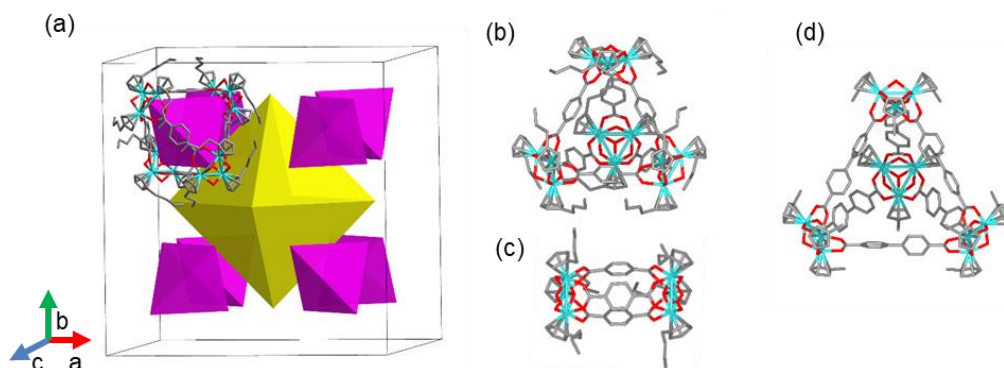


Figura 3.2. (a) Estructura cristalina simplificada del Zr-MOP-1-NH₂: el tetraedro fucsia representa las cajas tetraméricas y el octaedro amarillo la cavidad central. (b) Caja tetraédrica del Zr-MOP-1-NH₂. (c) Isómero dimérico Zr-MOP-1'. (d) Caja tetraédrica del Zr-MOP-10, isorreticular al Zr-MOP-1-NH₂. Código de colores: circonio, azul claro; carbono, gris; y oxígeno, rojo. Los hidrógenos y los residuos NH₂ desordenados no se han representado para mayor claridad.

Con respecto a la estructura cristalina de los Zr-MOP-1, Zr-MOP-1-NH₂ y Zr-MOP-10, todos ellos son isorreticulares y cristalizan en el espacio cúbico $Fm\bar{3}m$. En los tres casos, la celdilla unidad [Zr-MOP-1: $a = 37.131(2) \text{ \AA}$ y $V = 51191(8) \text{ \AA}^3$, Zr-MOP-1-NH₂: $a = 36.777(3) \text{ \AA}$ y $V = 49743(12) \text{ \AA}^3$, y Zr-MOP-10: $a = 42.3762(5) \text{ \AA}$ y $V = 76097(2) \text{ \AA}^3$] se compone de ocho cajas tetraédricas construidas alrededor de una cavidad central octaédrica (Figura 3.2a). Cada caja se compone de cuatro clústeres de Zr [(*n*-butilCpZr)₃(OH)₃O] conectados por seis espaciadores orgánicos ditópicos, formando una caja con forma tetraédrica con un volumen interno disponible de ~ 490 y $\sim 640 \text{ \AA}^3$ para el Zr-MOP-1/Zr-MOP-1-NH₂ y el Zr-MOP-10, respectivamente. Las ventanas de las cavidades, con forma triangular, presentan unas aperturas de ~ 4.9 y $\sim 5.8 \text{ \AA}$ (para el Zr-MOP-1-NH₂ y Zr-MOP-10, respectivamente), lo que permite la encapsulación del fármaco 2-PAM (volumen $117.8 \text{ \AA}^3$) [11] y la captura del simulador de agente nervioso DIFP (volumen: $148.9 \text{ \AA}^3$) (véase más adelante). Es importante destacar que los 12 residuos *n*-butilo que sobresalen de la superficie externa de la entidad tetraédrica generan una superficie hidrofóbica que aporta una mayor solubilidad a estos Zr-MOPs en

disolventes orgánicos y/o tejidos biológicos. Por otra parte, el isómero dimérico Zr-MOP-1' cristaliza en el grupo espacial monoclinico C2/c. Cada celdilla unidad [$a = 33.980(2) \text{ \AA}$, $b = 23.009(2) \text{ \AA}$, $c = 11.2581(8) \text{ \AA}$, $\beta = 97.560(3)$, y $V = 8725.6(12) \text{ \AA}^3$] contiene cuatro dímeros con una forma que se asemeja a *cigarros* y sin cavidades accesibles, dando lugar a una estructura densa (Figura 3.2c y Figura AI.14).

Asimismo, la pureza de los materiales obtenidos como polvo microcristalino (*bulk material*) se evaluó mediante ^1H NMR y ESI-MS, usando metanol como disolvente. Los resultados indican que tanto los Zr-MOP-1-X ($X = \text{H}$ y NH_2) tetraédricos y como la caja Zr-MOP-10 se obtienen como una única fase pura (Figura 3.4 y Figura AI.17 - Figura AI.18Figura AI.19AI). En el caso de los materiales densos Zr-MOP-1' y Zr-MOP-10', únicamente este último se obtenía como un sistema puro (Figura AI.20 y Figura AI.21), mientras que el primero presentaba pequeñas cantidades de Zr-MOP-1 como impureza.

Con relación a la estabilidad térmica de los materiales porosos, el análisis termogravimétrico confirmó que los Zr-MOP-1, Zr-MOP-1-NH₂ y Zr-MOP-10 son estables, bajo atmósfera de N₂, hasta aproximadamente 185, 180 y 165 °C, respectivamente (Figura AI.31 - Figura AI.36). Además, su estabilidad térmica se evaluó también mediante difracción de rayos X en polvo a temperatura variable *in situ* (VT-PXRD) (Figura AI.11 - Figura AI.13), observándose que la pérdida de disolvente tras la evacuación de los cavidades no viene acompañada por una pérdida de la cristalinidad o de una transición de fase. Estos resultados confirman que la integridad estructural de las cajas tetraédricas se mantiene tras la activación térmica, lo que se corresponde con el comportamiento de otros materiales porosos no covalentes robustos.[12]

Por último, se realizaron estudios de adsorción de N₂ a 77 K para evaluar si las cajas tetraédricas presentaban porosidad permanente tras su activación térmica. Los resultados indican que todas las cajas moleculares sin funcionalizar (Zr-MOP-1 y el Zr-MOP-10) isothermas de tipo I, típicos de sistemas microporosos, y unos valores de área superficial Brunauer-Emmett-Teller (BET) de 435 y 1140 m² g⁻¹ para el Zr-MOP-1 y el Zr-MOP-10 respectivamente (Figura 3.3a). Estos valores son aproximadamente la mitad de aquellos que presentan sus respectivos materiales en forma extendida, UiO-66 y UiO-67, lo que concuerda con la pérdida de la contribución de los poros octaédricos a la porosidad de

estos materiales.[13] Por el contrario, el compuesto Zr-MOP-1-NH₂ presenta una porosidad extremadamente baja. Este hecho puede atribuirse a la presencia de residuos amino en el ligando orgánico ácido 2-aminotereftálico que bloquea la difusión de las moléculas de N₂ en las cavidades de caja. De hecho, el CO₂ a 195 K, que presenta una energía cinética de adsorción más elevada que el N₂, es capaz de difundir en la cavidad interior de las cajas, dando lugar a un área superficial BET de 177 m² g⁻¹ (Figura 3.3b) y, por tanto, confirmando la porosidad permanente del compuesto Zr-MOP-1-NH₂.

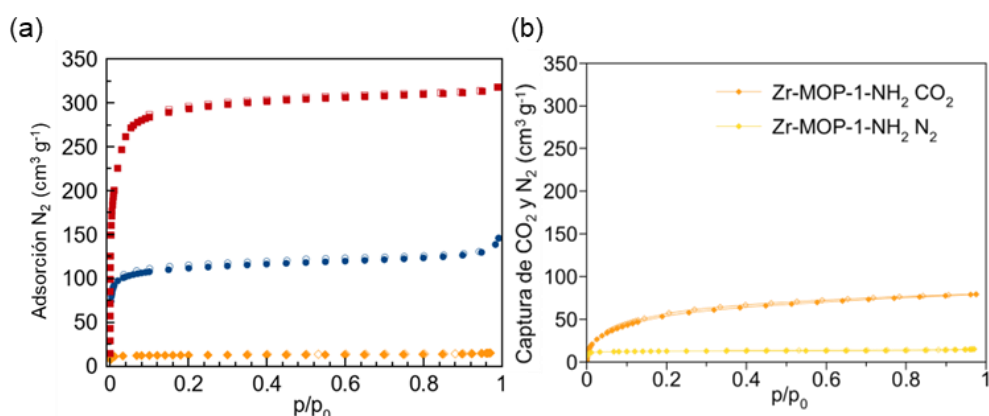


Figura 3.3. (a) Isothermas de adsorción de N₂ a 77 K para el Zr-MOP-1-X (X = H y NH₂, círculos azules y diamantes amarillos, respectivamente) y Zr-MOP-10 (cuadrados rojos). Los símbolos abiertos simbolizan desorción. Los valores de volumen se encuentran expresados en condiciones estándar de presión y temperatura (STP). (b) Isotherma de adsorción de nitrógeno del Zr-MOP-1-NH₂ (amarillo) a 77 K e isoterma de adsorción de CO₂ del Zr-MOP-1-NH₂ (naranja) a 195 K. Área superficial BET para la adsorción de N₂: prácticamente 0. Área superficial BET para la adsorción de CO₂ (195 K): 177 m²/g.

3 Encapsulación y liberación controlada de la oxima pralidoxima

3.1 Encapsulación de la oxima pralidoxima

Una vez demostrada la estabilidad y porosidad permanente de los Zr-MOPs previamente sintetizados, se exploró su capacidad para encapsular el fármaco pralidoxima (2-PAM), que como se ha indicado anteriormente es un reactivador de la enzima acetilcolinesterasa ampliamente utilizado en el tratamiento del envenenamiento por compuestos organofosforados. Para ello, cristales de Zr-MOP-1 y Zr-MOP-10 recién

preparados se sumergieron en una disolución de DMF con una concentración de 2-PAM 70 mM (proporción molar Zr-MOP:PAM de 1:7) y se incubaron durante una semana a temperatura ambiente. Tras este periodo, los cristales se recuperaron por centrifugación y lavaron con DMF, para eliminar las moléculas de 2-PAM no incorporadas en el interior de las cavidades, dando lugar a los materiales 2-PAM@Zr-MOP-1 y 2-PAM@Zr-MOP-10. Los resultados de ^1H NMR, usando CD_3OD como disolvente, confirman la formación de asociaciones con proporción molar 1:1 tanto en el compuesto 2-PAM@Zr-MOP-1 como en el compuesto 2-PAM@Zr-MOP-10. Asimismo, se observa que las señales correspondientes a la 2-PAM en los espectros de los dos compuestos 2-PAM@Zr-MOP-1/10 se encuentra desplazada hacia un campo más alto (0.02 ppm) respecto al espectro ^1H NMR de una disolución metanólica de 2-PAM libre, sugiriendo que el fármaco ha quedado retenido en las cavidades del MOP (Figura 3.4b y Figura AI.22 - Figura AI.25). Asimismo, cabe destacar que el espectro ESI-MS del compuesto 2-PAM@Zr-MOP-1 muestra un pico a 3934.36 m/z , que se corresponde con el ensamblaje $\text{Zr-MOP-1-4Cl-6H}+2\text{-PAM}^+$ (Figura 3.4c y Figura AI.30), confirmando la incorporación del fármaco en la estructura porosa. Por otra parte, estudios de modelado computacional apoyan la afinidad de la 2-PAM por los compuestos Zr-MOP-1y Zr-MOP-10, mostrando la adsorción preferencial de una única molécula del fármaco en la cavidad interior de las cavidades de las cajas moleculares Zr-MOP-1 y Zr-MOP-10 (Figura 3.4a y Figura AI.46).

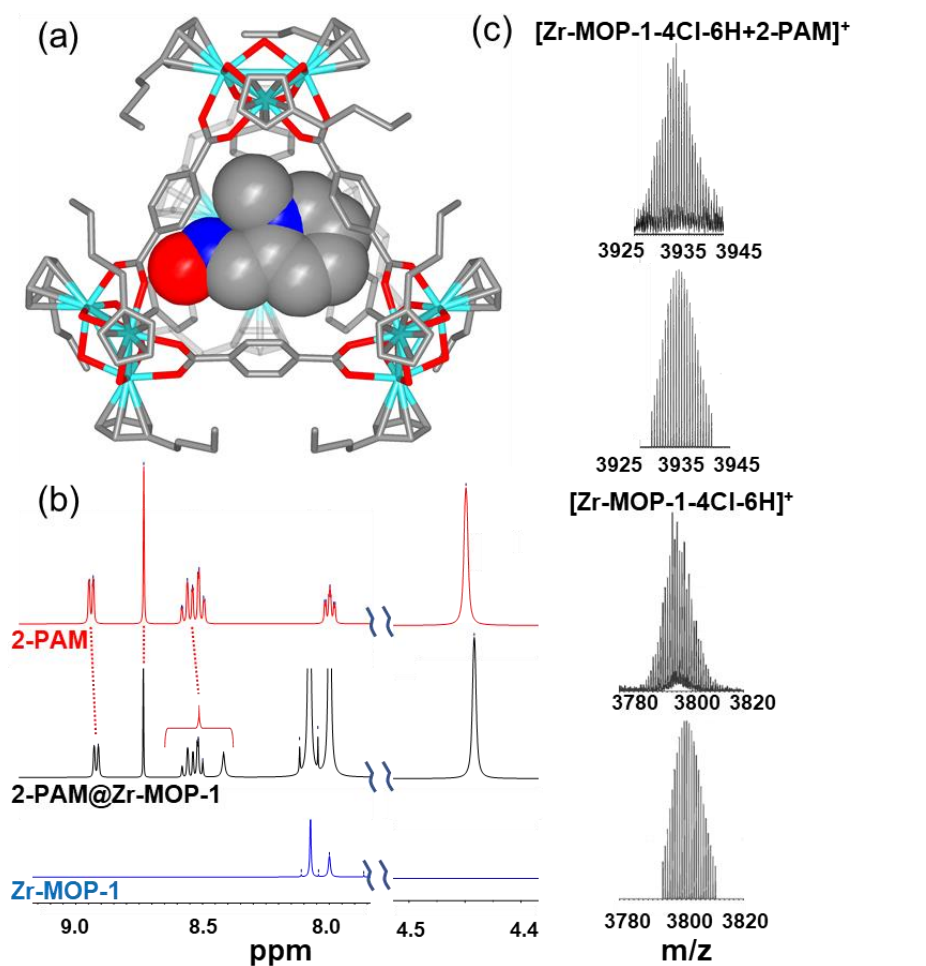


Figura 3.4. (a) Modelado computacional de la 2-PAM encapsulada en las cajas de Zr-MOP-1; (b) Espectro de ^1H NMR del Zr-MOP-1 libre, 2-PAM y asociación anfitrión-huésped 2-PAM@Zr-MOP-1; (c) Espectro ESI-MS del Zr-MOP-1 y 2-PAM@Zr-MOP-1.

Por otra parte, estudios realizados mediante PXRD confirmaron que la estructura cristalina de las cajas tetraédricas se mantiene también durante el proceso de encapsulación (Figura 3.5).

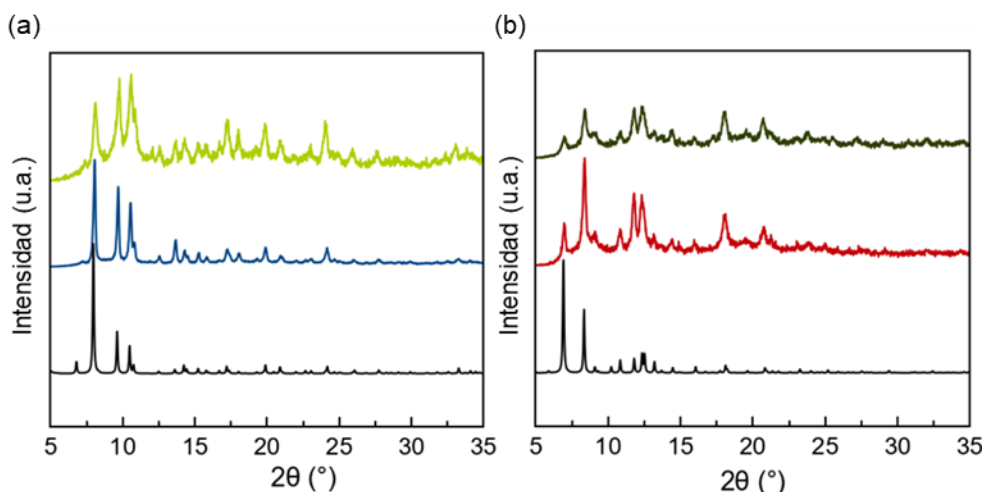


Figura 3.5. (a) Comparación de los patrones experimentales de PXRD de (izquierda) el Zr-MOP-1@2-PAM (arriba) y el Zr-MOP-1 (medio) con el patrón simulado para el Zr-MOP-1 (abajo). (b) Comparación de los patrones experimentales de PXRD del Zr-MOP-10@2-PAM (arriba) y el Zr-MOP-10 (medio) con el patrón simulado para el Zr-MOP-10 (abajo).

3.2 Liberación controlada de la oxima pralidoxima

Como se ha mencionado anteriormente, se necesita una concentración prolongada de 2-PAM en el organismo para conseguir un tratamiento eficaz contra la intoxicación por compuestos organofosforados. Con este fin, se ha estudiado la capacidad de las asociaciones 2-PAM@Zr-MOP-1 y 2-PAM@Zr-MOP-10 para liberar de forma controlada el compuesto 2-PAM en condiciones biológicas simuladas. Para ello, se prepararon suspensiones de los dos materiales en una disolución tampón de Tris-HCl (pH 7.4) y se monitorizó la concentración de 2-PAM en la disolución a diferentes tiempos de incubación, mediante espectrofotometría UV-Visible. Los perfiles de liberación de 2-PAM@Zr-MOP-1 y 2-PAM@Zr-MOP-10 pueden ajustarse a modelos cinéticos de *pseudo*-primer orden (Figura 3.6). Los resultados muestran una liberación gradual de 2-PAM, con un $t_{1/2}$ de 312 min para el sistema 2-PAM@Zr-MOP-1, alcanzando aproximadamente un 60% de liberación acumulada transcurridas 24 h. En el caso del 2-PAM@Zr-MOP-10, se produce una liberación acelerada del fármaco (aproximadamente el 70% de la 2-PAM encapsulada) en los primeros minutos seguida de una liberación más lenta, alcanzándose un 80% de liberación tras 53 min y un 100% de liberación tras 7 h.

A la vista de estos resultados se puede concluir que el sistema 2-PAM@Zr-MOP-1 se comporta como un material adecuado para la liberación controlada de fármacos.

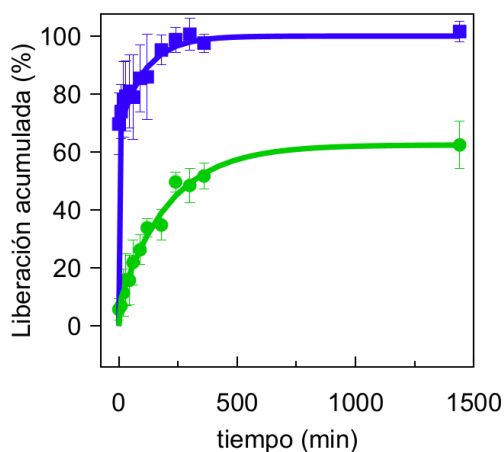


Figura 3.6. Liberación de 2-PAM del 2-PAM@Zr-MOP-1 (círculos verdes) y 2-PAM@Zr-MOP-10 (cuadrados azules).

4 Detoxificación de agentes nerviosos tipo G

Una vez demostrada la capacidad de los Zr-MOPs sintetizados para incorporar y liberar el fármaco 2-PAM, se exploró su capacidad para actuar como materiales duales en el tratamiento de la intoxicación por compuestos organofosforados (Esquema 3.1). Con este fin, se evaluó la capacidad de estos sistemas para detoxificar disoluciones acuosas del compuesto organofosforado modelo DIFP. Los resultados muestran que estos sistemas son capaces de capturar de forma rápida y eficaz del organofosforado modelo DIFP en disoluciones acuosas (14.4 mM) con unos tiempos de vida media $t_{1/2}$ de 4.2 y 16.5 min para el Zr-MOP-1 y el Zr-MOP-10, respectivamente (Figura 3.7). Cabe destacar que la incorporación de 2-PAM en el Zr-MOP-1 no parece tener un impacto importante en la captura rápida y eficiente de DIFP. En este sentido, los resultados muestran que el $t_{1/2}$ de captura de DIFP aumenta de 4.2 a 15.8 min al pasar de la caja vacía Zr-MOP-1 a la asociación 2-PAM@Zr-MOP-1 (Figura 3.7).

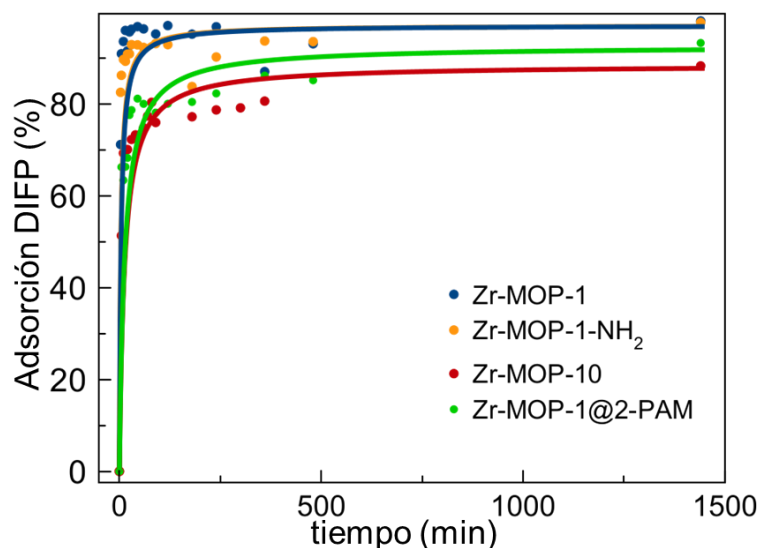


Figura 3.7. Perfiles de captura de DIFP de Zr-MOP-1, Zr-MOP-1-NH₂, Zr-MOP-10 y Zr-MOP-1@2-PAM en suspensión acuosa no tamponada con una proporción 1:2 MOP:DIFP. Las gráficas responden a un modelo cinético de adsorción de *pseudo*-segundo orden.

La incorporación de DIFP en la cavidad de las cajas moleculares se confirmó utilizando ³¹P NMR y modelado computacional. La falta de degradación hidrolítica del DIFP en el interior de las mismas es indicativo de que se favorece un proceso de fisorción (Figura AI.43 - Figura AI.45). Este comportamiento difiere del observado en la estructura de los sistemas extendidos UiO-6X, capaces de hidrolizar enlaces P-X (X = F, O y S) de agentes nerviosos/pesticidas.[14] La falta de actividad hidrolítica puede atribuirse a la menor acidez de Lewis de los centros metálicos y/o al impedimento estérico de los residuos *n*-butilCpZr en estos Zr-MOPs.

Teniendo en cuenta el comportamiento dual del 2-PAM@Zr-MOP-1 para la captura de DIFP y liberación controlada del fármaco, y sus mejores prestaciones frente al compuesto 2-PAM@Zr-MOP-10, se seleccionó la primera plataforma para evaluar su capacidad para restaurar la actividad de la AChE tras su inhibición con el compuesto organofosforado modelo DIFP.

5 Ensayos biofísicos de inhibición y reactivación enzimática

A continuación, se exploró la capacidad de las asociaciones 2-PAM@Zr-MOP-1 para reactivar AChE previamente inhibida por DIFP, a modo de prueba de concepto de su validez en el tratamiento de la intoxicación por organofosforados. Con este fin, primero se evaluó la actividad de la AChE utilizando acetato de indoxilo como sustrato enzimático en medio acuoso tamponado con Tris-HCl (pH 7.4). La adición de DIFP produce la inhibición de la AChE, alcanzándose un 50% de actividad para una concentración de 5×10^{-6} M de simulador de agente nervioso (Figura 3.8).

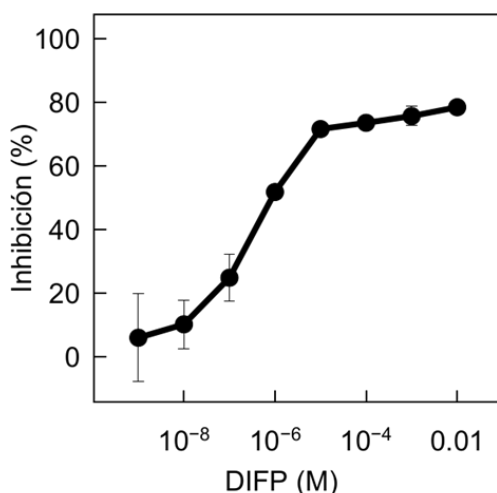


Figura 3.8. Perfil de inhibición por DIFP de la AChE en tampón Tris-HCl (pH = 7.4)

Tras esto, se evaluó la capacidad de el ensamblaje 2-PAM@Zr-MOP-1 para reactivar la AChE. Para ello, disoluciones de AChE inhibida al 50% se mezclaron con disoluciones de 2-PAM liberadas por el compuesto 2-PAM@Zr-MOP-1 tras su incubación en medio fisiológico simulado (Tris-HCl, pH=7,4) durante 1 h ($[2\text{-PAM}] = 6.06 \times 10^{-6}$ M) y 24 h ($[2\text{-PAM}] = 1.65 \times 10^{-5}$ M) en tampón Tris-HCl. Los resultados muestran un $9 \pm 1\%$ y $40 \pm 7\%$ de reactivación de AChE, respectivamente (inserto en Figura 3.9).

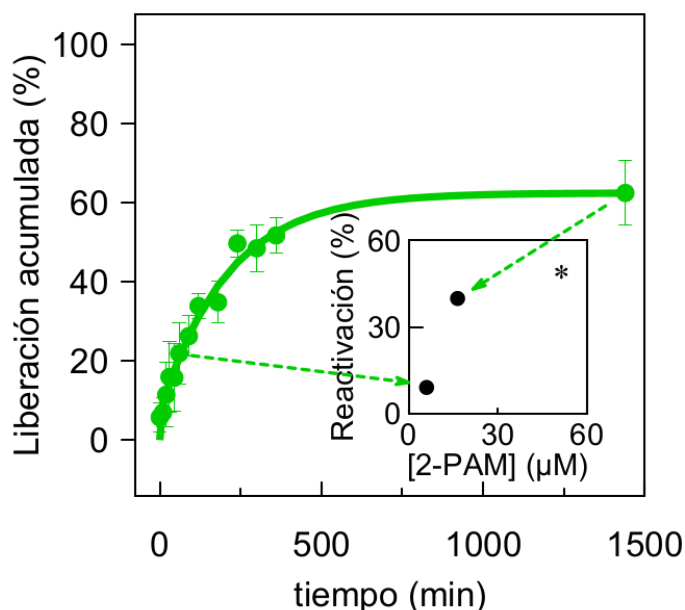


Figura 3.9. Liberación de 2-PAM de 2-PAM@Zr-MOP-1 (círculos verdes); el inserto se corresponde con la reactivación de AChE por parte de los sobrenadantes de 2-PAM liberados por 2-PAM@Zr-MOP-1, con el asterisco significando la reactivación de AChE por parte de 50 μM de 2-PAM libre;

Cabe destacar que en un ensayo de reactivación control, utilizando únicamente una disolución acuosa de 5×10^{-5} M de 2-PAM, y por tanto el mismo rango de concentraciones de la disolución de 2-PAM liberada por 2-PAM@Zr-MOP-1 tras 24 h de incubación, se obtiene un 48 ± 6 % de reactivación. Por tanto, estos resultados sugieren que la presencia del compuesto Zr-MOP-1 en medio fisiológico no afecta negativamente a la capacidad de la oxima liberada de reactivar AChE.

De esta forma, en base a los resultados obtenidos, se puede afirmar que el ensamblaje 2-PAM@Zr-MOP-1 no solo es capaz de liberar de forma gradual la oxima 2-PAM en medio fisiológico simulado, llevando a la recuperación de la actividad enzimática de AChE previamente inhibida, sino que también es capaz de capturar las moléculas tóxicas de DIFP en disolución acuosa. Estos resultados confirman que estos sistemas presentan propiedades duales para el tratamiento de la intoxicación por compuestos organofosforados, tanto antes como después de que la molécula tóxica DIFP alcance su diana biológica, es decir, la enzima AChE.

6 Incorporación en liposomas de fosfatidilcolina

En base a las buenas prestaciones mostradas por el compuesto 2-PAM@Zr-MOP-1 hacia la detoxificación de disoluciones con compuestos organofosforados en condiciones fisiológicas simuladas, se decidió dar un paso más y, como prueba de concepto, se exploró la posibilidad de incorporar el compuesto 2-PAM@Zr-MOP-1 en liposomas y, de esta forma, incrementar la biocompatibilidad de los materiales. Para ello, se tomó ventaja de la solubilidad del compuesto 2-PAM@Zr-MOP-1 en disolventes orgánicos adecuados, como metanol, y, de esta forma, realizar su procesamiento en disolución. En concreto, se prepararon disoluciones del compuesto de 2-PAM@Zr-MOP-1 en dos disolventes orgánicos, metanol y cloroformo, y se trataron con el surfactante fosfatidilcolina dando lugar a dispersiones coloidales acuosas de liposomas biocompatibles. Los materiales resultantes se analizaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Figura 3.11a) y dispersión dinámica de luz (DLS) (Figura 3.11b y Figura 3.11c), confirmando la formación de las asociaciones 2-PAM@Zr-MOP-1@liposoma con un tamaño medio de 200 nm (para aquellas procesadas en cloroformo) y 100 nm (para aquellas procesadas en metanol). Además, el análisis por TEM-EDX sugiere que las cajas de Zr-MOP-1 se encuentran principalmente asociadas con la bicapa lipídica del liposoma (Figura 3.10, Figura AI.41Figura AI.42). Cabe destacar que las asociaciones híbridas 2-PAM@Zr-MOP-1@liposoma ($[2\text{-PAM}] = 5 \times 10^{-6} \text{ M}$) son capaces de dar lugar a un aumento del 10 % en la reactivación de AChE inhibida por DIFP. Estos resultados sientan las bases del uso de Zr-MOPs como plataformas para el transporte de fármacos y el tratamiento de la intoxicación por compuestos organofosforados.

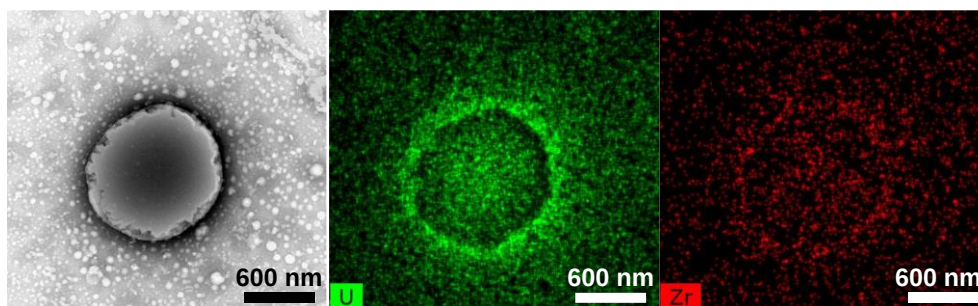


Figura 3.10. Análisis TEM-EDX de los ensamblajes liposoma@Zr-MOP-1@2-PAM preparados a partir de disoluciones del Zr-MOP-1@2-PAM en metanol. (uranio: verde, circonio: rojo). El uranio se encuentra presente debido al tratamiento de los ensamblajes con acetato de uranilo.

7 Ensayos *in vitro* de neurotoxicidad

Finalmente, se evaluó la neurotoxicidad de las asociaciones 2-PAM@Zr-MOP-1, tanto el compuesto original como el incorporado en liposomas, mediante la realización de ensayos de viabilidad celular *in vitro* frente a cultivos de la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y.^[15] Los resultados indicaron que la viabilidad celular de las células de neuroblastoma no se ve afectada por las asociaciones de 2-PAM@Zr-MOP-1, tanto antes como después de su incorporación en liposomas de fosfatidilcolina (Figura 3.11d). Estos experimentos prueban que las plataformas ensayadas para la reactivación de AChE no resultan neurotóxicas y podrían ser útiles para revertir el daño al sistema nervioso causado por la intoxicación por compuestos organofosforados.

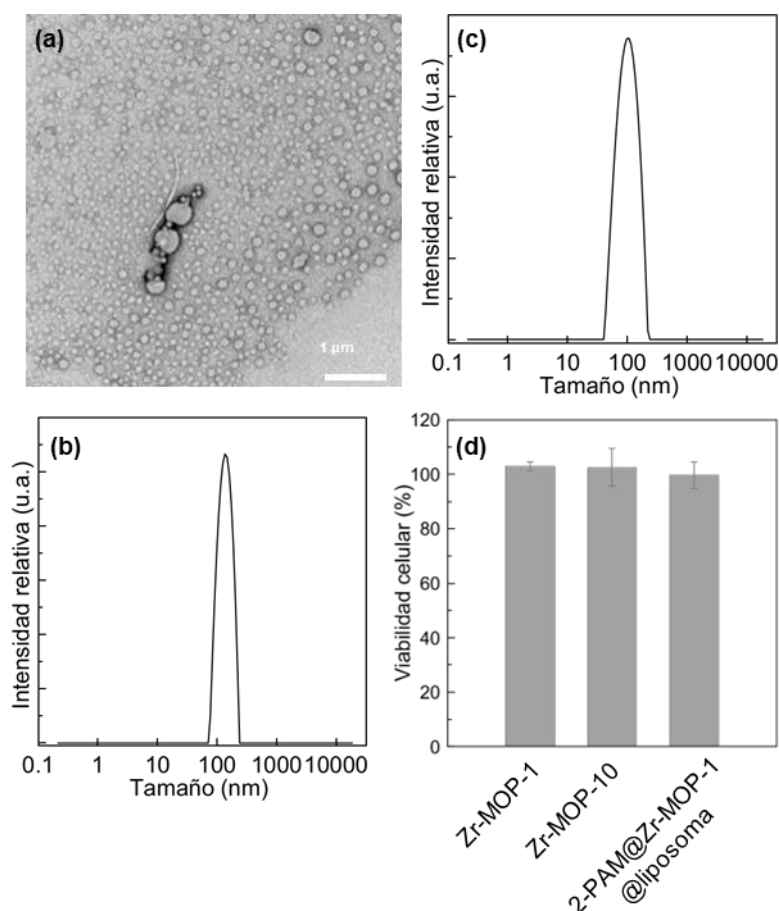


Figura 3.11. Imágenes de TEM (a) y distribución de tamaños DLS (b) de 2-PAM@Zr-MOP-1@liposoma preparados a partir de una disolución de 2-PAM@Zr-MOP-1 en CHCl_3 . (c) Distribución de tamaños DLS de 2-PAM@Zr-MOP-1@liposoma preparados a partir de una disolución de 2-PAM@Zr-MOP-1 en MeOH. (d) Viabilidad celular de células SH-SY5Y de neuroblastoma humano tras 24 h de incubación con Zr-MOP-1 (10 μM), Zr-MOP-10 (10 μM), y 2-PAM@Zr-MOP-1@liposoma (5 μM de Zr-MOP-1).

8 Conclusiones

En este capítulo, se ha demostrado que la decoración de los ligandos Cp terminales con residuos alquilo en las cajas moleculares Zr-MOPs da lugar a materiales solubles y biocompatibles. Cabe destacar que los sistemas desarrollados son capaces de capturar el compuesto organofosforado modelo DIFP e incorporar y liberar, de forma controlada el fármaco 2-PAM, lo que da lugar a una reactivación de AChE previamente inhibida por el compuesto organofosforado. Además, gracias que se pueden procesar en disolución,

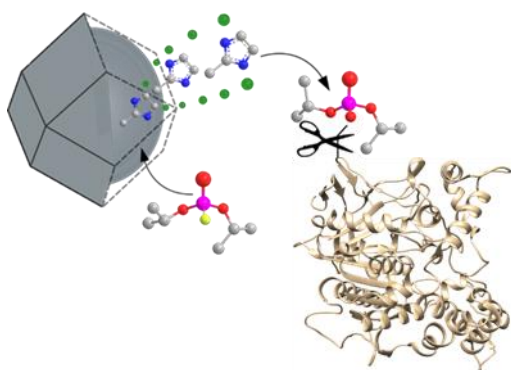
estos sistemas pueden incorporarse en liposomas no neurotóxicos biocompatibles, lo que posibilita su uso como vehículos transportadores de fármacos para el tratamiento de la intoxicación por compuestos organofosforados. En conjunto, estos resultados pueden considerarse como una prueba de concepto de la posible utilidad de Zr-MOPs como sistemas duales para el tratamiento de la intoxicación por organofosforados (más allá de agentes nerviosos/pesticidas), ya que son capaces de capturar una toxina y reactivar su diana biológica.

9 Referencias bibliográficas

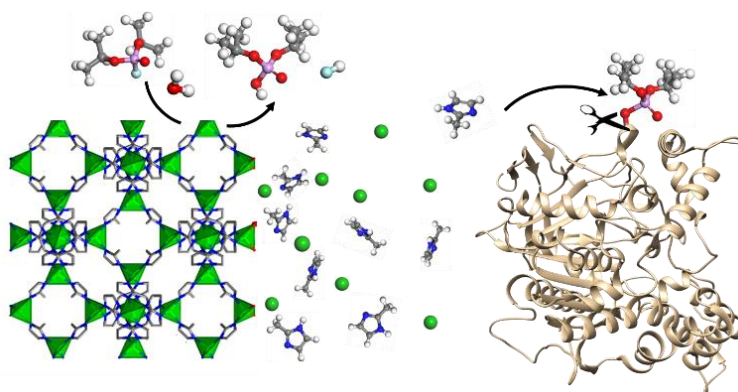
- [1] T. Islamoglu *et al.*, «Metal-Organic Frameworks against Toxic Chemicals», *Chemical Reviews*, vol. 120, n.º 16. American Chemical Society, pp. 8130-8160, 26 de agosto de 2020. doi: 10.1021/acs.chemrev.9b00828.
- [2] J. E. Mondloch *et al.*, «Destruction of chemical warfare agents using metal-organic frameworks», *Nat Mater*, vol. 14, n.º 5, pp. 512-516, may 2015, doi: 10.1038/nmat4238.
- [3] R. Gil-San-Millan, P. Delgado, E. Lopez-Maya, J. D. Martin-Romera, E. Barea, y J. A. R. Navarro, «Layer-by-Layer Integration of Zirconium Metal-Organic Frameworks onto Activated Carbon Spheres and Fabrics with Model Nerve Agent Detoxification Properties», *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 13, n.º 42, pp. 50491-50496, oct. 2021, doi: 10.1021/acsami.1c12095.
- [4] D. A. Giannakoudakis y T. Bandoz, *Detoxification of Chemical Warfare Agents. From WWI to Multifunctional Nanocomposite Approaches*. 2018. doi: 10.1007/978-3-319-70760-0.
- [5] J. Jiao, C. Tan, Z. Li, Y. Liu, X. Han, y Y. Cui, «Design and Assembly of Chiral Coordination Cages for Asymmetric Sequential Reactions», *J Am Chem Soc*, vol. 140, n.º 6, pp. 2251-2259, feb. 2018, doi: 10.1021/jacs.7b11679.
- [6] G. Liu *et al.*, «Process-Tracing Study on the Postassembly Modification of Highly Stable Zirconium Metal-Organic Cages», *J Am Chem Soc*, vol. 140, n.º 20, pp. 6231-6234, may 2018, doi: 10.1021/jacs.8b03517.
- [7] J. Albalad, L. Hernández-López, A. Carné-Sánchez, y D. Maspoch, «Surface chemistry of metal-organic polyhedra», *Chemical Communications*, vol. 58, n.º 15, pp. 2443-2454, feb. 2022, doi: 10.1039/d1cc07034g.
- [8] Y. Li *et al.*, «Artificial Biomolecular Channels: Enantioselective Transmembrane Transport of Amino Acids Mediated by Homochiral Zirconium Metal-Organic Cages», *J Am Chem Soc*, vol. 143, n.º 49, pp. 20939-20951, dic. 2021, doi: 10.1021/jacs.1c09992.
- [9] «<https://www.rcsb.org/structure/4pqe>».
- [10] E. J. Gosselin *et al.*, «Ligand-Based Phase Control in Porous Zirconium Coordination Cages», *Chemistry of Materials*, vol. 32, n.º 13, pp. 5872-5878, jul. 2020, doi: 10.1021/acs.chemmater.0c01965.
- [11] O. V. Dolomanov, L. J. Bourhis, R. J. Gildea, J. A. K. Howard, y H. Puschmann, «OLEX2: A complete structure solution, refinement and analysis program», *J Appl Crystallogr*, vol. 42, n.º 2, pp. 339-341, 2009, doi: 10.1107/S0021889808042726.
- [12] W. Bury, A. M. Walczak, M. K. Leszczyński, y J. A. R. Navarro, «Rational Design of Noncovalent Diamondoid Microporous Materials for Low-Energy Separation of C6-Hydrocarbons», *J Am Chem Soc*, vol. 140, n.º 44, pp. 15031-15037, nov. 2018, doi: 10.1021/jacs.8b09522.
- [13] J. H. Cavka *et al.*, «A new zirconium inorganic building brick forming metal organic frameworks with exceptional stability», *J Am Chem Soc*, vol. 130, n.º 42, pp. 13850-13851, oct. 2008, doi: 10.1021/ja8057953.
- [14] E. López-Maya *et al.*, «Textile/Metal-Organic-Framework Composites as Self-Detoxifying Filters for Chemical-Warfare Agents», *Angewandte Chemie*, vol. 127, n.º 23, pp. 6894-6898, jun. 2015, doi: 10.1002/ange.201502094.
- [15] R. A. Ross, B. A. Spengler, y J. L. Biedler, «Coordinate Morphological and Biochemical Interconversion of Human Neuroblastoma Cells», *J Natl Cancer Inst*, vol. 71, pp. 741-747, 1983, doi: <https://doi.org/10.1093/jnci/71.4.741>.

CAPÍTULO IV

Detoxificación de compuestos organofosforados inducida por la degradación estructural de redes metal-orgánicas zeomiméticas



En este capítulo, se presenta la síntesis y caracterización de distintas redes metal-orgánicas zeomiméticas (ZIFs) basadas en cinc y ligandos puente imidazolato. La superficie de los cristales de ZIFs reaccionan con compuestos organofosforados induciendo la degradación de la red cristalina, así como de los compuestos organofosforados. Se han investigado las diferentes características fisicoquímicas que influyen en la degradación estructural provocada por los compuestos organofosforados y la subsecuente liberación de ligandos puente imidazolato capaces de reactivar los aductos de enzima acetilcolinesterasa fosforilada (Esquema 4.1). Más concretamente, se ha estudiado el efecto que presentan las siguientes características fisicoquímicas de los ZIFs en su capacidad para actuar como antídotos en la intoxicación por compuestos organofosforados: i) nucleofilicidad del ligando imidazolato, ii) topología de la red cristalina y iii) tamaño de partícula.



Esquema 4.1. La degradación estructural de los ZIFs da lugar a la degradación hidrolítica del simulador de agente nervioso diisopropilfluorofosfato (DIFP) en diisopropilfosfato (DIP) y a la reactivación de la enzima acetilcolinesterasa (AChE).

1 Redes metal-orgánicas zeomiméticas

Como se ha mencionado anteriormente en la Introducción de esta Tesis Doctoral, los compuestos organofosforados (OPs), incluyendo determinados pesticidas y agentes de guerra química nerviosos, son extremadamente tóxicos debido a su capacidad para inhibir la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) que se encuentra involucrada en la transmisión de impulsos nerviosos. [1], [2] A este respecto, se ha dedicado mucho esfuerzo para desarrollar materiales de protección contra la exposición a compuestos

organofosforados, en particular filtros y catalizadores para su detoxificación. [3]–[7] Sin embargo, los estudios sobre antídotos para el tratamiento de la intoxicación por compuestos organofosforados son mucho más limitados. [8], [9] Con respecto a esto, el tratamiento actual para la intoxicación por OPs se basa en el ataque nucleofílico de oximas al aducto AChE fosforilada (OP@AChE). Dicho ataque conduce a la recuperación de la función de la enzima y, con ello, a restaurar el proceso de neurotransmisión a su estado fisiológico. Sin embargo, mientras que las concentraciones bajas de oxima en el organismo no son capaces de alcanzar una reactivación enzimática adecuada, concentraciones demasiado altas pueden inhibirla y provocar problemas de toxicidad severa. [10], [11] A su vez, la baja permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica de algunas oximas limita la eficacia del tratamiento. [12]

Por lo tanto, resulta necesario explorar nuevos compuestos que puedan actuar como antídotos eficaces frente al envenenamiento por compuestos organofosforados y, de esta forma, mitigar el efecto nocivo que los OPs presentan en el organismo. En este capítulo, se propone que las redes metal-orgánicas zeomiméticas (ZIFs), una subclase de las redes metal-orgánicas (MOFs) que presentan una gran diversidad estructural, facilidad para controlar el tamaño de partícula [13]–[16] y biocompatibilidad [17]–[19], podrían actuar como antídotos eficaces contra la intoxicación por compuestos organofosforados. Para ello, se parte de las siguientes hipótesis:

i) Los ligandos imidazólicos que componen comúnmente los ZIFs, como por ejemplo los ligandos purina (pIm), benzimidazol (bIm), imidazol (Im) y 2-metilimidazol (mIm), son compuestos nucleófilos de baja toxicidad (dosis letal media (LD50) por vía intraperitoneal en ratones de 800 mg kg^{-1} , 445 mg kg^{-1} , 300 mg kg^{-1} y 480 mg kg^{-1} , para pIm, bIm, Im y mIm, respectivamente)[20]. Teniendo en cuenta su baja toxicidad y naturaleza básica de Lewis se postuló que estos derivados serían capaces de atacar nucleofílicamente al aducto AChE fosforilada (OP@AChE). Por consiguiente, los ligandos imidazolato podrían comportarse como potenciales agentes reactivadores de la enzima acetilcolinesterasa inhibida por compuestos organofosforados (Esquema 4.1).

ii) El enlace de coordinación cinc-imidazolato presente en las estructuras de los ZIFs ha demostrado ser altamente sensible a medios biológicos que contienen iones de tipo

fosfato (H_2PO_4^- y HPO_4^{2-}), produciéndose la degradación estructural gradual de las redes metal-orgánicas zeomiméticas, y la consiguiente liberación de sus constituyentes (iones cinc y ligandos imidazólicos), así como de las moléculas bioactivas que puedan estar alojadas en sus cavidades (como por ejemplo moléculas bioactivas o biomoléculas). [21] Esta degradación estructural resultaría ventajosa de cara a su administración a pacientes intoxicados por compuestos organofosforados, ya que previene la acumulación de nanopartículas en el organismo. [22] De hecho, estudios *in vivo* han demostrado recientemente la bioseguridad de las nanopartículas de ZIF-8 ($[\text{Zn}(\text{mIm})_2]$) así como de sus productos de degradación. [23]

iii) Los MOFs que presentan enlaces de tipo cinc-azolato (incluyendo algunos ejemplos de ZIFs) presentan actividad catalítica frente a la degradación de compuestos organofosforados, mimetizando al centro activo de la enzima fosfohidrolasa, gracias al adecuado balance entre la acidez de Lewis de los iones cinc(II) y la basicidad de los ligandos de tipo azolato. [24]–[27] Sin embargo, todos los estudios catalíticos publicados hasta la fecha se han llevado a cabo usando un medio tamponado muy básico (pH 9-11), muy lejos de las condiciones fisiológicas (pH 7.4) requeridas para su empleo como antídotos frente a la intoxicación por compuestos organofosforados.

En base a lo expuesto anteriormente, en este capítulo se han empleado condiciones biológicas simuladas (Tris-HCl, 0.1 M, pH 7.4) para estudiar la capacidad que presentan distintas redes metal-orgánicas zeomiméticas (ZIFs), basadas en diferentes ligandos imidazólicos (purina, benzimidazol, imidazol y 2-metilimidazol), para romper el enlace P-X ($\text{X} = \text{F}, \text{Cl}$) de compuestos organofosforados modelo. Específicamente, se ha trabajado con simulantes de agentes nerviosos de tipo G, en concreto el diisopropilfluorofosfato (DIFP) y el diisopropilclorofosfato (DICP), que cuando se hidrolizan dan lugar al producto de degradación no tóxico diisopropilfosfato (DIP). Uno de los resultados más llamativos de este estudio es que la hidrólisis del enlace P-X viene acompañada de la degradación estructural de las redes metal-orgánicas zeomiméticas, con la subsecuente liberación de los ligandos imidazólicos y los iones cinc(II) al medio fisiológico simulado. Los ligandos orgánicos liberados tras la degradación de la matriz porosa son capaces de llevar a cabo un ataque nucleofílico sobre el aducto OP@AChE, recuperando con ello la función enzimática de la AChE. Cabe destacar que la ruptura del

enlace P-X y la reactivación de la enzima AChE se encuentran influenciadas por factores como la basicidad/nucleofilicidad de los ligandos imidazolato, la topología de la red cristalina y el tamaño de partícula de los ZIFs.

Finalmente, y a modo de prueba de concepto, se ha explorado la capacidad de los ZIFs para actuar como sistemas transportadores de biomoléculas, en concreto de una enzima esterasa. Durante la realización de este estudio, se ha partido de la hipótesis de que la incorporación de una enzima en la estructura de los ZIFs (p.ej., acetilcolinesterasa o butirilcolinesterasa) dando lugar a un material híbrido esterasa@ZIF, podría incrementar la estabilidad de la enzima frente a diferentes tipos de estrés (cambios de temperatura, pH, etc.). Asimismo, el compuesto esterasa@ZIF podría ser utilizado como un antídoto más eficaz frente a la intoxicación con compuestos organofosforados. De esta forma, la interacción del compuesto esterasa@ZIF con los OPs llevaría a la degradación estructural de los ZIFs y, por consiguiente, a la liberación de la enzima al medio. Como consecuencia, la enzima liberada sería capaz de reemplazar la actividad de la enzima inhibida. y/o de actuar como un sumidero de compuestos organofosforados. [28], [29] El método escogido para la preparación del material híbrido esterasa@ZIF ha sido la mineralización biomimética ya que, como se ha mencionado en la Introducción de esta Tesis Doctoral, resulta un método rápido, sencillo y eficaz para incorporar biomoléculas en redes metal-orgánicas porosas como los ZIFs. [30]

2 Síntesis y caracterización de las redes metal-orgánicas zeomiméticas

En este capítulo, se han seleccionado distintos ligandos imidazólicos de basicidad creciente (nucleofilicidad), concretamente purina (pIm), benzimidazol (bIm), imidazol (Im) y 2-metilimidazol (mIm) (Figura 4.1a) para preparar seis redes metal-orgánicas zeomiméticas (ZIFs) basadas en iones cinc(II): $\text{Zn}(\text{pIm})_2$ (ZIF-20, zeolita porosa A) [31], $\text{Zn}(\text{bIm})_2$ (ZIF-11, zeolita porosa RHO), [13], $\text{Zn}(\text{Im})_2$ (3D no porosa), [32] $\text{Zn}(\text{mIm})_2$ (ZIF-L, laminar, no porosa para el N_2), [33], [34] $\text{Zn}(\text{mIm})_2$ (sod ZIF-8, 3D, sodalita porosa) [13] y $\text{Zn}_3(\text{mIm})_5(\text{OH})$ (ZIF-EC-1, 3D, no porosa para el N_2) [35], [36] (Figura 4.1b). Todos los ZIFs seleccionados presentan la misma fórmula ($\text{Zn}(\text{imidazolato})_2$) pero diferente topología. El sistema ZIF-EC-1 es una excepción que puede considerarse como una estructura ZIF defectuosa en la que 1/6 de los ligandos imidazólicos han sido

reemplazados por un ion hidróxido que actúa como ligando puente. Todas las redes zeomiméticas se prepararon en forma de partículas micrométricas siguiendo protocolos previamente descritos en literatura. Las propiedades químicas, estructurales y morfológicas de estos sistemas se confirmaron mediante las siguientes técnicas de caracterización: difracción de rayos X en polvo (PXRD), isothermas de adsorción de N₂, análisis termogravimétrico (TGA), análisis elemental (EA), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y microscopía electrónica de barrido (SEM) (Figura AI.47Figura AI.51, Tabla AI.6).

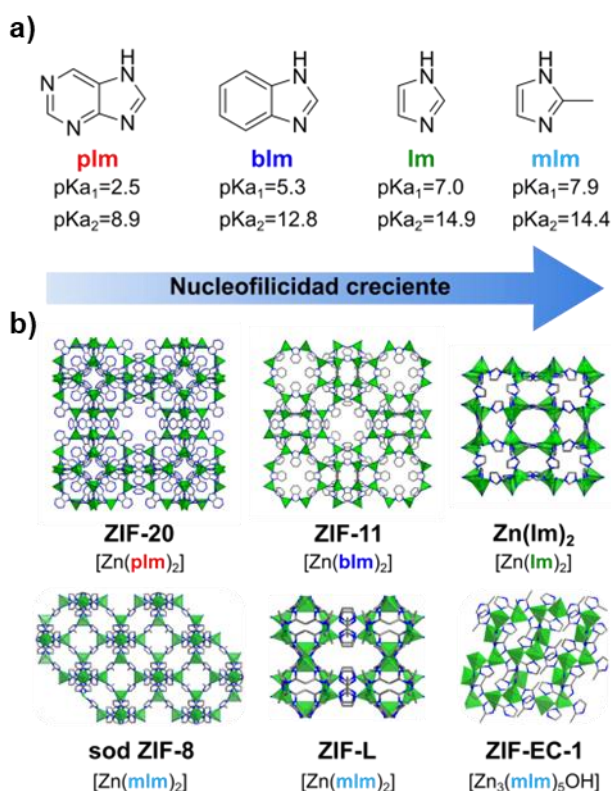


Figura 4.1. (a) Ligandos imidazólicos seleccionados en orden creciente de basicidad/nucleofilicidad. (b) Estructura de las redes metal-orgánicas zeomiméticas sintetizadas: Zn(pIm)₂ (ZIF-20, zeolita porosa A), Zn(blIm)₂ (ZIF-11, zeolita porosa RHO), Zn(Im)₂ (3D no porosa), ZIF-L (en capas), sod ZIF-8 (3D, sodalita) y ZIF-EC-1 (3D, no porosa)

3 Reactividad frente a modelos de agentes nerviosos tipo G

3.1 Impacto de la basicidad del ligando y la topología de los ZIFs

Una vez comprobada la pureza de todos los ZIFs preparados, se exploró el impacto de la basicidad del ligando y la topología de la estructura cristalina de las distintas redes metal-orgánicas zeomiméticas preparadas sobre la degradación hidrolítica de compuestos organofosforados modelo de agentes nerviosos tipo G (DIFP y DICP).

Inicialmente, se estudió la reactividad de los ZIFs (0.084 mmol, tamaño de partícula micrométrico) frente al simulador de agente nervioso diisopropilfluorofosfato (DIFP) (0.029 M), bajo condiciones biológicas simuladas (Tris-HCl, 0.1 M, pH 7.4). Para ello, se monitorizó la desaparición del compuesto DIFP en la disolución a lo largo del tiempo mediante cromatografía de gases. Los resultados indican que únicamente los materiales ZnIm₂, ZIF-EC-1 y ZIF-L que se encuentran constituidos por los dos ligandos imidazolato más básicos (imidazol y 2-metilimidazol) son capaces de producir una hidrólisis significativa del enlace P-F del DIFP, generando el producto de degradación no tóxico diisopropilfosfato (DIP) (Figura 4.2, Figura 4.3, Figura AI.52a, Figura AI.53Figura AI.55 - Figura AI.59).

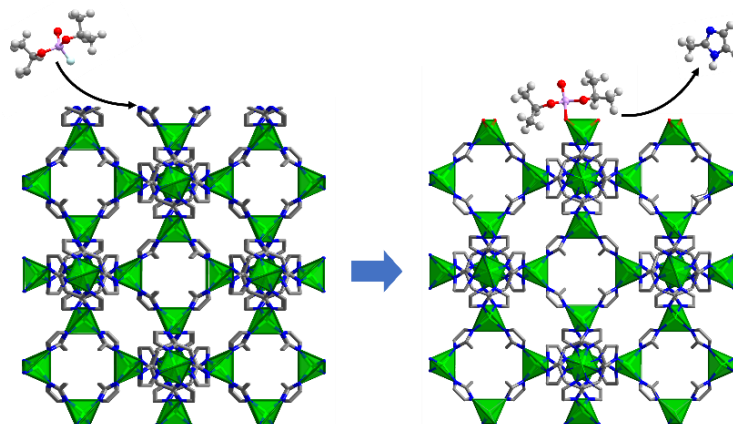


Figura 4.2. Reacción de degradación estructural del ZIF provocada por la interacción del DIFP con la cara cristalina 1 0 0 del sod ZIF-8.

Los tiempos de vida media $t_{1/2}$ para la degradación del DIFP siguen la tendencia 75 min (ZIF-L) < 124 min (ZIF-EC-1) < 238 min (sod ZIF-8) < 333 min (Zn(Im)₂) (Figura

4.3, Figura AI.52a y Figura AI.53). Por el contrario, los sistemas ZIF-20 y ZIF-11 basados en los ligandos pIm y bIm, que presentan una menor basicidad, exhiben una actividad hidrolítica mucho menor, alcanzando una degradación de DIFP de tan solo el 25 % transcurridas 24 h.

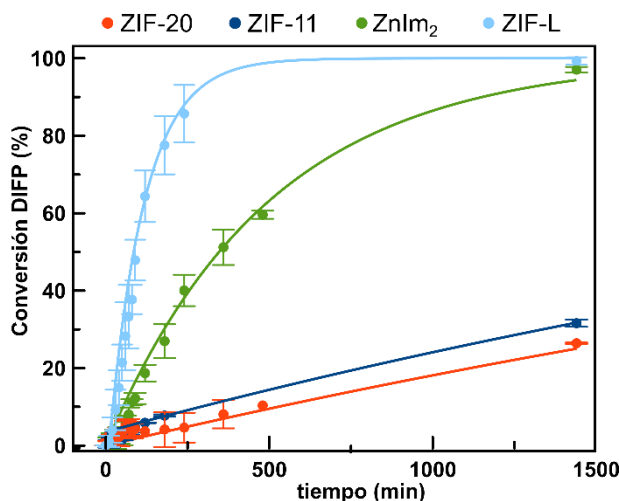


Figura 4.3. Perfiles de degradación hidrolítica de DIFP (0.029 M, 0.5 mL) bajo condiciones biológicas simuladas (Tris-HCl, 0.1 M, pH 7.4) que muestran el aumento de la actividad catalítica de los ZIFs (0.084 mmol) a medida que incrementa la basicidad del ligando imidazólico. Código de colores Zn(pIm)₂, ZIF-20 (rojo); Zn(bIm)₂, ZIF-11 (azul); Zn(Im)₂ (verde) y Zn(mIm)₂, ZIF-L (cian).

Asimismo, se realizaron experimentos adicionales a modo de control para evaluar la actividad catalítica de los componentes de los distintos ZIFs por separado (iones Zn^{2+} y ligandos imidazólicos). Los resultados muestran que tanto la sal $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ como todos los ligandos imidazólicos presentan una baja degradación hidrolítica del DIFP (Figura AI.62). Por tanto, estos resultados apuntan a que existe una combinación sinérgica entre la acidez de Lewis de los iones Zn^{2+} y la basicidad de los residuos imidazolato y/o hidroxilo en la estructura cristalina de los ZIFs que facilita la degradación hidrolítica del DIFP. En este sentido, es importante resaltar que las unidades $\text{Zn}_2(\mu\text{-imidazolato})$ en las estructuras de los ZIFs son semejantes al centro catalítico $\text{Zn}_2(\mu\text{-OH})(\text{imidazol})_4$ presente en la enzima fosfotriesterasa, la cual es capaz de hidrolizar compuestos organofosforados (Figura 4.4). [38]

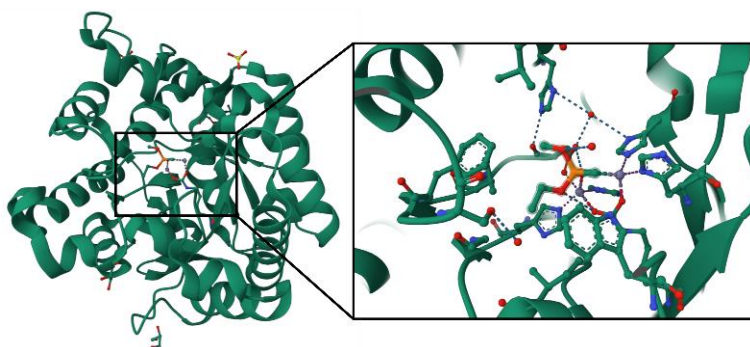


Figura 4.4. Estructura del aducto organofosforado@fosfotriesterasa, resaltándose los detalles estructurales del centro catalítico. [39]

Como se ha expuesto anteriormente, los resultados derivados de los ensayos catalíticos confirman que existe una correlación entre la nucleofilicidad (basicidad) de los ligandos presentes en la red metal-orgánica, y su actividad catalítica en la degradación del compuesto organofosforado DIFP. Sin embargo, los compuestos ZIF-L, ZIF-EC-1 y sod ZIF-8 presentan el mismo ligando (2-metilimidazol) en sus estructuras, pero muestran una actividad catalítica diferente hacia la degradación del compuesto tóxico DIFP. Estas diferencias deberían estar relacionadas con la topología de cada una de las redes cristalinas, así como con el tamaño de los cristales que componen cada uno de los materiales (Figura 4.1 y Figura AI.51).

Por otra parte, también se estudió la estabilidad química de las diferentes redes metal-orgánicas zeomiméticas durante los ensayos catalíticos. Para ello se cuantificó la lixiviación a la disolución tanto de los ligandos imidazolato, mediante $^1\text{H-NMR}$, como de los iones Zn^{2+} , mediante ICP-OES; tras la reacción de los distintos ZIFs con el compuesto organofosforado DIFP durante 24 horas. Como ensayo control, también se evaluó la lixiviación desde los ZIFs tras su incubación en el tampón Tris-HCl durante 24 horas en ausencia del compuesto tóxico DIFP. Los resultados muestran que, en todos los casos, la reacción del DIFP con las redes metal-orgánicas zeomiméticas lleva consigo la degradación estructural parcial de estas últimas (Figura AI.55 - Figura AI.61 y Tabla AI.7). Asimismo, se observa que la lixiviación de iones imidazolato de aquellos ZIFs compuestos por pIm, bIm o Im es un orden de magnitud menor que la de aquellos ZIFs basados en mIm, lo que apunta a una clara correlación entre la degradación estructural y

la ruptura hidrolítica del DIFP. Por el contrario, la suspensión de los ZIFs en ausencia del agente nervioso modelo dan lugar a una degradación estructural mucho menor (Tabla S2, S4).

Finalmente, se analizaron los efectos derivados de la reacción del compuesto organofosforado con las redes metal-orgánicas más reactivas, ZIF-8, ZIF-L y ZIF-EC-1; sobre la morfología de los cristales. Para ello, se prepararon suspensiones de los ZIFs (en una disolución de DIFP (0.18 M) en Tris-HCl (0.1 M, pH 7.4) y se incubaron durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se recuperaron las partículas, se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y se compararon con las imágenes de las partículas originales. También se realizó un experimento control en ausencia de DIFP para evaluar la influencia de la disolución tampón sobre la morfología de las partículas. Las imágenes de SEM indican, por una parte, que la suspensión de los ZIFs en la disolución tampón no llevan a una modificación apreciable de la morfología de los cristales (Figura AI.68 - Figura AI.70). Por el contrario, como se observa en las Figura 4.5 y Figura AI.68 - Figura AI.70, la interacción de las moléculas de DIFP con las redes metal-orgánicas lleva a la degradación superficial de los cristales de ZIF-L, ZIF-8 y ZIF-EC-1, lo que supone una pérdida de volumen de partícula de entre el 30 – 35 % (Figura AI.68 - Figura AI.70) [37].

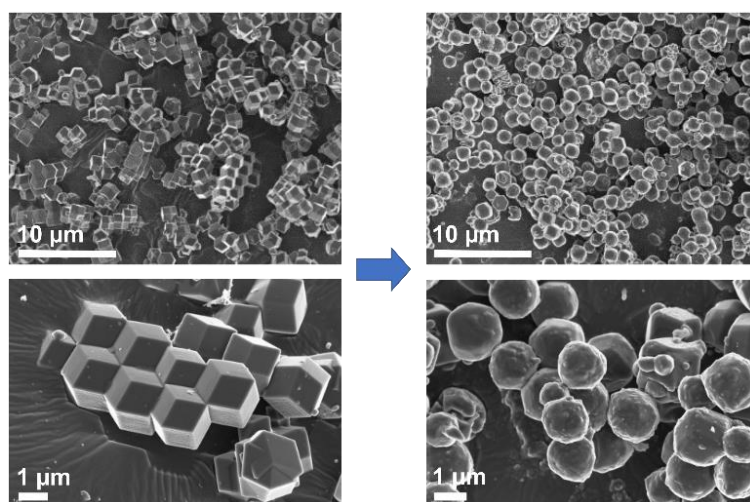


Figura 4.5. Imágenes de SEM de las partículas de sod ZIF-8 antes y tras 24 h de exposición a DIFP (0.17 M, 0.5 mL) en Tris-HCl (0.1 M, pH 7.4).

Como se ha expuesto anteriormente, la red ZIF-EC-1 presenta una estructura densa mientras que la red ZIF-L presenta una estructura laminar. En el caso del ZIF-8, esta red presenta una estructura porosa tridimensional. Sin embargo, las ventanas que dan acceso a su estructura porosa son demasiado pequeñas para permitir la accesibilidad y difusión de las moléculas de DIFP al interior de la red porosa. En consecuencia, las moléculas de DIFP interactúan únicamente con la superficie externa de las partículas, explicando la degradación superficial de los cristales observada mediante microscopía electrónica de barrido.

3.2 Impacto del tamaño de partícula

Tras demostrar el importante papel de la basicidad del ligando de la red metal-orgánica zeomimética sobre la ruptura del enlace P-X en compuestos organofosforados, se pasó a evaluar el impacto del tamaño de partícula de los ZIFs sobre la degradación de los modelos de agente nervioso tipo G diisopropilfluorofosfato (DIFP) y diisopropilclorofosfato (DICP) [40], [41] Para ello, se seleccionó el compuesto ZIF-8 de entre las redes metal-orgánicas más prometedoras identificadas en el apartado anterior debido a la mayor estabilidad de la fase cristalina ZIF-8 frente a su poliformofo metaestable ZIF-L [34], así como a la disponibilidad de protocolos en bibliografía que permiten, de forma sencilla, producir cristales de ZIF-8 con tamaño de partícula controlado. En este último material la variación de la proporción de sal de cinc y ligando y/o mediante la adición de *n*-butilamina como agente modulador permiten controlar el tamaño de partícula. [42] De esta forma, y siguiendo estos protocolos se prepararon cuatro materiales de ZIF-8 diferentes con un tamaño de partícula de entre 18 nm y 2 μ m (Figura 4.6).

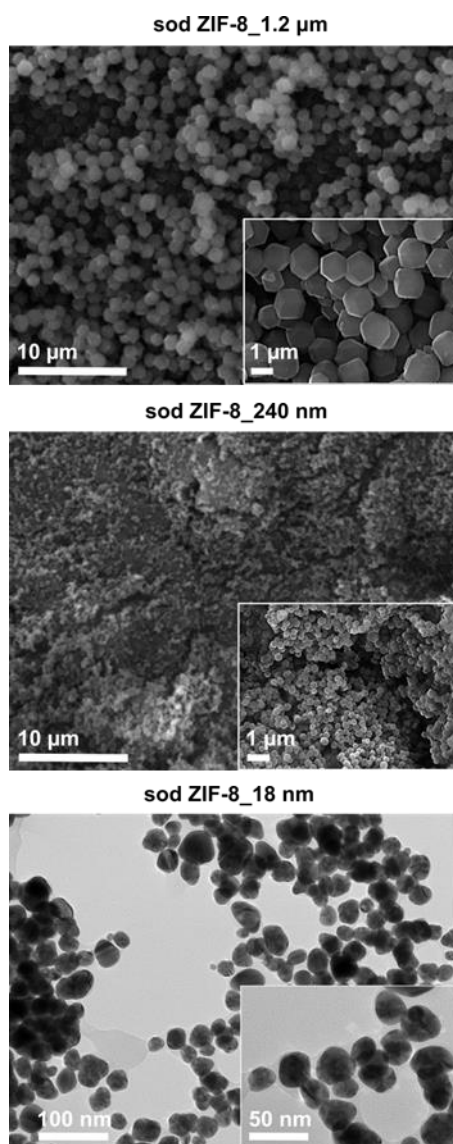


Figura 4.6. Imágenes de SEM y TEM de los sod ZIF-8 en orden decreciente de tamaño de partícula

Una vez preparados los ZIF-8 con distinto tamaño de partícula se caracterizaron mediante diferentes técnicas incluyendo microscopía electrónica, PXRD, TGA, FTIR y adsorción de N_2 (Figura 4.6, Figura 4.7 y Figura AI.48 - Figura AI.51), confirmando la pureza y porosidad de todos los materiales preparados. Cabe resaltar que los difractogramas de Rayos-X en polvo recogidos en la Figura 4.7 indican que, en todos los casos, los materiales están formados por una única fase cristalina pura, cúbica de tipo sodalita (sod ZIF-8). Asimismo, se puede observar un apreciable ensanchamiento

progresivo de los picos en los difractogramas de los distintos materiales lo que es indicativo de una disminución del tamaño de los cristales. Por otra parte, las imágenes de microscopía electrónica (SEM y TEM) confirman que todos los materiales obtenidos presentan una distribución de tamaño homogéneo y un diámetro de partícula medio de 18 nm, 240 nm, 1.2 μm y 2 μm (Figura AI.71Figura AI.74).

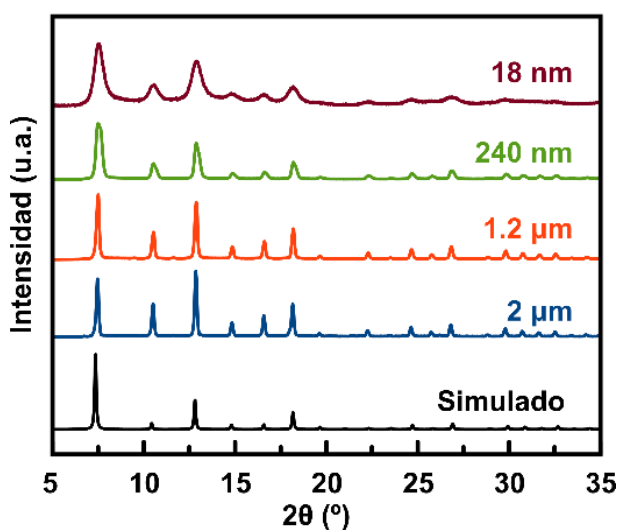


Figura 4.7. Patrones de PXRD de las partículas de sod ZIF-8 en orden decreciente de tamaño de partícula

Tras su caracterización, las partículas de sod ZIF-8 de distinto tamaño (0.084 mmol) se expusieron a los modelos de agente nervioso DIFP (0.029 M, 0.5 mL) y DICP (0.029 M, 0.5 mL) en fluido biológico simulado (Tris-HCl, 0.1 M, pH 7.4) y se monitorizó la desaparición del compuesto tóxico (DIFP o DICP) de la disolución en función del tiempo mediante cromatografía de gases. Como se puede observar en la Figura 4.8, la cinética de degradación de DIFP depende de forma significativa del tamaño partícula de los materiales, observándose la siguiente tendencia para los tiempos de vida media de hidrólisis: 2.6 min (18 nm) < 43 min (240 nm) < 249 min (1.2 μm) < 578 min (2 μm) (Figura AI.54). Para el compuesto tóxico DICP también se observó una tendencia similar en la cinética de degradación. Cabe resaltar que, en este último caso, las nanopartículas de 18 nm eran capaces de degradar cuantitativamente el DICP en DIP en menos de 1 min.

Además, dado que los fluidos fisiológicos pueden contener cantidades relevantes de iones fosfato y que estos podrían actuar como interferentes durante la degradación de los compuestos organofosforados por parte de las redes metal-orgánicas zeomiméticas, se realizó un estudio catalítico adicional exponiendo las nanopartículas de sod ZIF-8 de 18 nm a una disolución de DIFP (0.029 M, 0.5 mL) preparada en una disolución de tampón fosfato salino 0.01M (pH 7.4). Los resultados muestran que la actividad catalítica de las partículas de sod ZIF-8 de 18 nm no se ve afectada de forma significativa, incrementándose el tiempo de vida media de degradación desde 2.6 min, en ausencia de iones fosfato, hasta los 3.3 min en presencia de estos iones (Figura AI.52b y Figura AI.54).

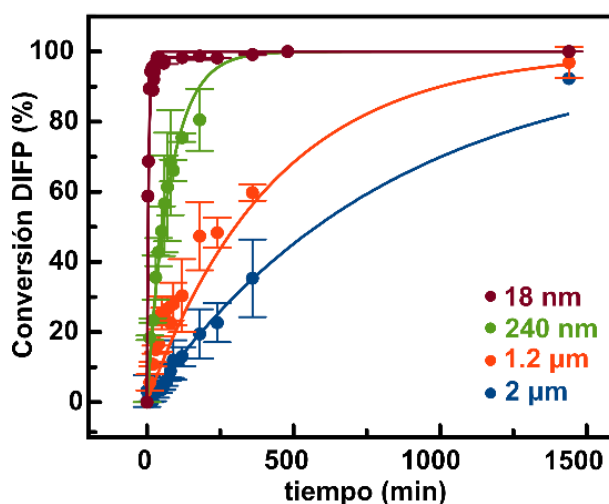


Figura 4.8. Degradación hidrolítica de DIFP (0.029 M, 0.5 mL) dependiente del tamaño de partícula del sod ZIF-8, bajo condiciones biológicas simuladas (Tris-HCl, 0.1 M, pH 7.4).

Finalmente, dado que los compuestos tóxicos pueden interaccionar únicamente con la superficie de los cristales, se analizó si existía una correlación entre el área superficial externa de cada uno de los materiales y su actividad catalítica en la degradación del compuesto tóxico DIFP. Para ello, en primer lugar, se estimó la superficie externa de las de los cristales de cada material asumiendo que presentaban una geometría esférica. A continuación, se representó la constante cinética de degradación de DIFP para cada uno de los materiales en función del área superficial externa calculada.

Como se puede apreciar en la , existe una clara correlación lineal entre la superficie externa de las partículas y la cinética de hidrólisis del enlace P-F. Este resultado es indicativo de que se está produciendo la degradación del simulador de agente nervioso en la superficie externa de las partículas de sod ZIF-8.

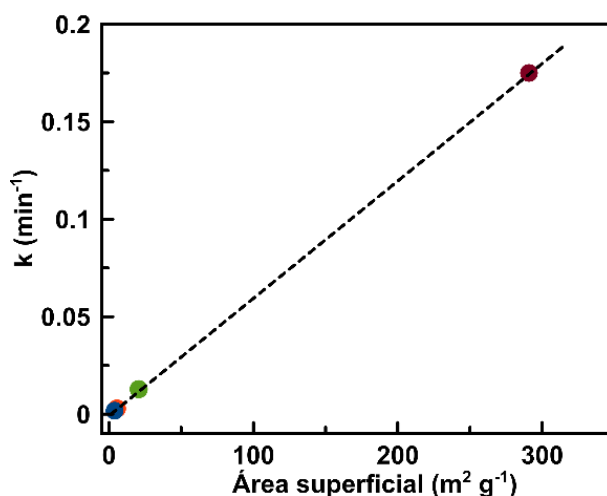


Figura 4.9. Correlación entre la superficie geométrica externa de las partículas de sod ZIF-8 y los valores de constante cinética para la degradación de DIFP.

De hecho, las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido (SEM) de las NPs de sod ZIF-8 expuestas a DIFP ([DIFP] = 0.18 M, pH 7.4) indican un decaído superficial significativo, que se incrementa a medida que se reduce el tamaño de las partículas (pérdida de volumen del 31 % para las partículas de 2 μm , del 47 % para las partículas de 240 nm y del 94 % para las partículas de 18 nm) (Figura S25 – S28). El alto grado de degradación estructural tras la exposición a DIFP de las nanopartículas de 18 nm, formándose partículas de 7 nm de diámetro medio, es beneficioso de cara a su administración en pacientes ya que evitaría la bioacumulación de las nanopartículas en el organismo y facilitaría su excreción. [23] Cabe destacar que también se ha observado una dependencia entre el tamaño de partícula y la degradación estructural de los materiales tras su exposición al compuesto tóxico DIFP, alcanzándose concentraciones de mIm liberado de 0.05 M para los materiales de tamaño nanométrico frente al observado para el sod ZIF-8 formado por partículas con diámetro medio de 2 μm (Tabla AI.7).

3.3 Reactivación de la enzima acetilcolinesterasa inducida por la degradación epitaxial de ZIFs

Como se expuso anteriormente, los ligandos imidazolato son bases de Lewis de baja toxicidad que podrían comportarse como potenciales agentes reactivadores de la enzima acetilcolinesterasa inhibida por compuestos organofosforados. Con el objetivo de confirmar esta hipótesis, se llevaron a cabo ensayos de reactivación enzimática de la AChE, siguiendo el método colorimétrico del acetato de indoxilo, para evaluar la capacidad reactivadora de los distintos ligandos imidazólicos usados en las secciones anteriores: purina (pIm), benzimidazol (bIm), imidazol (Im) y 2-metilimidazol (mIm). Para ello, se inhibió la actividad de la enzima AChE en un 50 % mediante su exposición a una disolución de DIFP. A continuación, la enzima se trató disoluciones acuosas a diferentes concentraciones de los ligandos imidazólicos durante 30 minutos, se evaluó su actividad enzimática tras el tratamiento y se comparó con la actividad enzimática de la enzima en ausencia del compuesto tóxico (actividad control). Los resultados muestran que el ligando mIm, el de mayor basicidad, se comporta como un reactivador de AChE a concentraciones superiores a 1×10^{-4} M bajo condiciones biológicas simuladas (Tris-HCl, 0.1 M, pH 7.4) (Figura 4.10). Por el contrario, el resto de ligandos imidazólicos presentan una reactivación moderada, de solo un 25 %, a la mayor concentración (0.1 M) lo que podría relacionarse con su menor basicidad (Figura AI.75). Por tanto, se seleccionaron los ZIFs basados en el ligando mIm como los materiales más prometedores para actuar como reactivadores de la enzima AChE.

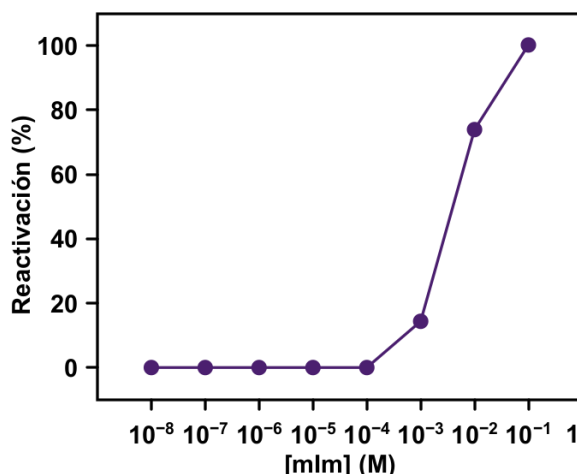


Figura 4.10. Perfil de reactivación de AChE inhibida por DIFP (50 % de actividad en comparación con la AChE libre) gracias al mIm (Tris-HCl, 0.1 M, pH 7.4).

En un paso sucesivo, se analizó si el mIm liberado tras la degradación estructural de las redes metal-orgánicas ZIF-L, sod ZIF-8, ZIF-EC-1 y nanopartículas de sod ZIF-8 (18 nm) como consecuencia de su incubación en medio fisiológico simulado era capaz de reactivar la actividad de la AChE previamente inhibida con el compuesto DIFP. Para ello, los materiales se incubaron en una disolución de Tris-HCl, 0.1 M, pH 7.4 durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, los sobrenadantes, con una concentración en mIm de $0.6 - 2.0 \times 10^{-3}$ M, se recuperaron y se evaluó su capacidad para restaurar la actividad de la AChE previamente inhibida con DIFP mediante el método colorimétrico del acetato de indoxilo. Los resultados muestran que estos sobrenadantes son capaces de recuperar entre un 10 y un 54 % la actividad enzimática de la AChE (Tabla AI.10). Como se esperaba, el sobrenadante con mayor actividad es aquel procedente de la incubación de las nanopartículas de sod ZIF-8 de 18 nm, que es capaz de recuperar hasta un 54 % de actividad enzimática perdida.

A continuación, se evaluó el doble beneficio derivado de: i) la degradación del compuesto tóxico DIFP en la superficie de los cristales de las redes metal-orgánicas zeomiméticas y ii) la reactivación de la AChE inducida por los iones imidazolato liberados como consecuencia de la degradación estructural de los materiales porosos tras su reacción con el compuesto DIFP. Para ello, los materiales micrométrico ZIF-L, sod

ZIF-8, ZIF-EC-1 (0.084 mmol) y las nanopartículas de sod ZIF-8 de 18 nm (0.084 mmol) se dispersaron en una disolución de DIFP (0.029 M, 0.5 mL) bajo condiciones biológicas simuladas (Tris-HCl, 0.1 M, pH 7.4) y la mezcla se mantuvo en incubación a 37 °C durante 1, 3 y 24 h (véase Anexo I). Transcurrido cada tiempo, se recuperaron los sobrenadantes y se analizó su efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática de la AChE en comparación con una disolución de DIFP (0.029 M). Este proceso se definió como detoxificación (Tabla AI.10). Como se puede observar en la Figura 4.11, los perfiles de detoxificación de los distintos ZIFs siguen una tendencia similar a la observada durante los ensayos de degradación hidrolítica del DIFP (Figura 4.3, Figura 4.8 y Figura AI.52a). De hecho, las nanopartículas de sod ZIF-8 de 18 nm, aquellas que presentan una mayor actividad catalítica, son capaces de recuperar el 100 % de la actividad de AChE en tan solo 1 h de incubación (Figura 4.11). Por el contrario, las micropartículas de ZIF-L, ZIF-EC-1 y sod ZIF-8 exhiben una menor capacidad de detoxificación tras 1 h, y alcanzan un 83 %, 72 % y 17 % de recuperación de la actividad enzimática tras 3 h, respectivamente. Asimismo, cabe destacar que todos los materiales son capaces de suprimir el efecto inhibitorio del DIFP en la función de la AChE tras 24 h de incubación (Figura 4.11). Estos resultados confirman que los materiales presentan una actividad de detoxificación dual ya que la exposición de las partículas de ZIF a disoluciones con DIFP no solo llevan a la degradación del compuesto tóxico, sino también a la degradación estructural de las redes metal-orgánicas con la consiguiente liberación de iones mM que actúan como agentes reactivadores de la enzima AChE.

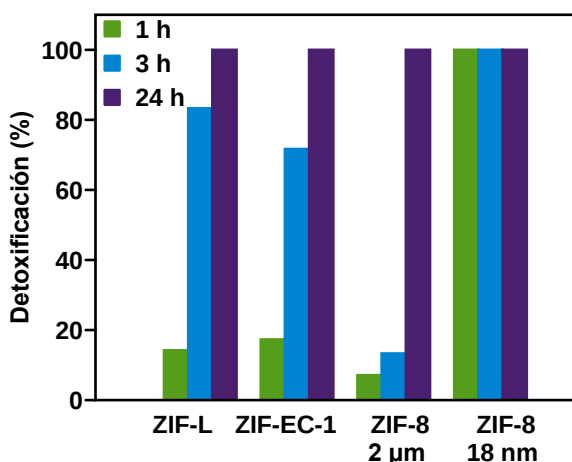


Figura 4.11. Efecto detoxificador sobre la actividad de la AChE de las micropartículas de ZIF-L, ZIF-EC-1, sod ZIF-8 (1-2 μm) y las nanopartículas de sod ZIF-8 (18 nm) tras 1 h, 3 h y 24 h de exposición a DIFP, evaluado bajo condiciones biológicas simuladas (Tris-HCl, 0.1 M, pH 7.4).

Finalmente, se evaluó la neurotoxicidad *in vitro* de las NPs de ZIF-8 de 18 nm y 240 nm de tamaño frente a un cultivo de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. [43] Los resultados, mostrados en la Figura 4.12, indican que la viabilidad celular apenas se ve afectada por las NPs de sod ZIF-8 de 18 nm, ya que presentan una neurotoxicidad *in vitro* despreciable, mientras que las NPs de ZIF-8 de 240 nm muestran un pequeño grado de toxicidad (70 % de viabilidad celular) en la mayor concentración ensayada ($0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$).

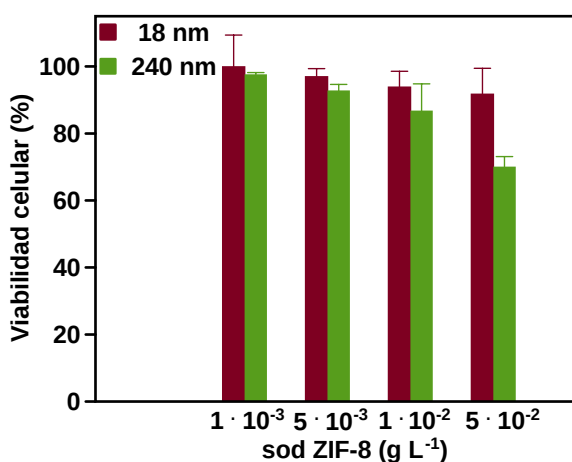


Figura 4.12. Evaluación de la citotoxicidad *in vitro* sobre células de neuroblastoma humano, a modo de modelo neuronal, de las nanopartículas de sod ZIF-8 de 18 y 240 nm.

4 Materiales híbridos esterasa@ZIF

Por otra parte, se decidió explorar la viabilidad de los ZIFs para actuar como sistemas transportadores de biomoléculas, en concreto de una enzima esterasa, a modo de prueba de concepto. Para ello, se sintetizó un material híbrido de sod ZIF-8 y esterasa comercial obtenida de hígado porcino (esterasa@sodZIF-8). El método empleado para ello fue la mineralización biomimética (véase Anexo I para más detalles). De forma general, se mezcló una disolución acuosa de $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ (7 mM) con una disolución acuosa de 2-metilimidazol (299 mM) junto con esterasa porcina (3.24 mg/mL) y la mezcla se incubó durante 24 h a temperatura ambiente. Una vez sintetizada, se evaluó la cristalinidad de la muestra mediante PXRD (Figura 4.13), estimándose una pureza del 100 % de la fase sodalita del ZIF-8 mediante la aplicación informática desarrollada por Hafner y colaboradores. [44]

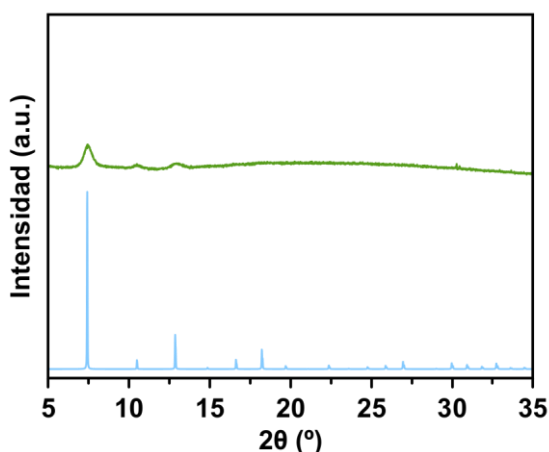


Figura 4.13. Difractograma de rayos X en polvo experimental del material híbrido esterasa@ZIF-8 (verde) y simulado del sod ZIF-8 (azul claro).

Por otra parte, el proceso de encapsulación se confirmó mediante FTIR, gracias a las vibraciones características de la esterasa (región $\sim 1700 - 1500 \text{ cm}^{-1}$) (Figura 4.14), que se encuentran presentes en el espectro de la esterasa libre y el material híbrido pero no coinciden con las bandas características del sod ZIF-8.

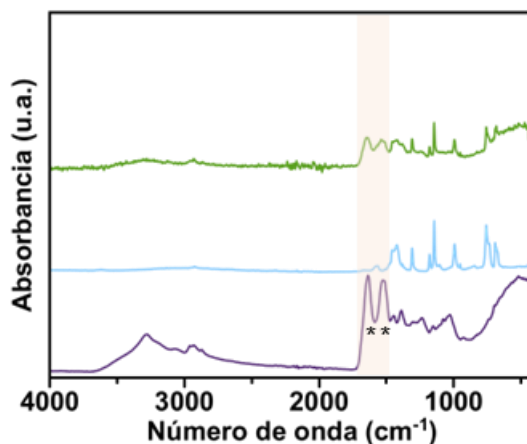


Figura 4.14. Espectros infrarrojos del material híbrido *esterasa@sodZIF-8* (verde), el *sod ZIF-8* (azul claro) y la *esterasa* libre (morado). Las bandas características de la *esterasa* se encuentran marcadas con asteriscos y la región en la que aparecen está delimitada por una franja anaranjada.

La capacidad de carga, así como la eficiencia de encapsulación, se determinaron mediante un ensayo Bradford (véase Anexo I). Dicho ensayo se trata de un método colorimétrico basado en la unión formada entre proteínas y el colorante azul brillante Coomassie G-250 en su forma aniónica ($\lambda = 595$ nm), cuantificable mediante espectrometría UV-Vis. De esta forma, se obtuvo una capacidad de carga de 0.25 ± 0.01 mg de proteína por mg de material y una eficiencia de encapsulación del 48 ± 1.3 %.

Finalmente, se analizó la actividad específica del enzima tras el proceso de encapsulación y se comparó con aquella del enzima libre para calcular el porcentaje de actividad retenida tras la encapsulación (véase Anexo I para más detalles). Para ello, se utilizó el método colorimétrico del *p*-nitrofenilacetato, basado en la hidrólisis llevada a cabo por una enzima *esterasa* del *p*-nitrofenilacetato (sustrato incoloro) a *p*-nitrofenol (producto coloreado), que puede seguirse mediante espectrometría UV-Vis ($\lambda = 405$ nm). [45] Respecto al procedimiento experimental, inicialmente se resuspendieron las muestras en tampón citrato (100 mM, pH 5.5) y se incubaron durante 3 h a temperatura ambiente con objeto de digerir la red metal-orgánica. Tras esto, se añadió una disolución en DMSO de *p*-nitrofenil acetato (200 mM) y se recogieron los datos de absorbancia a $\lambda = 405$ nm durante 30 min mediante espectrometría UV-Vis. La concentración de producto ($\epsilon = 9360 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), junto con la concentración de enzima en disolución (calculada

mediante un ensayo de Bradford), se utilizó para calcular la actividad enzimática específica. De esta forma, se obtuvo un valor de $3.88 \times 10^{-1} \pm 1.12 \times 10^{-2} \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (U/mg) para el material híbrido. La actividad del enzima libre se analizó siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, obteniéndose un valor de $8.44 \times 10^{-1} \pm 5.87 \times 10^{-2} \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Así, de acuerdo con estos datos, se calculó un porcentaje de actividad enzimática remanente tras el proceso de encapsulación era del $48.6 \pm 1.3 \%$ por lo que se puede concluir que se mantiene una actividad importante de la enzima tras el proceso de biomineralización.

5 Conclusiones

En este capítulo se ha demostrado que la sensibilidad del enlace de coordinación Zn-imidazolato frente a un compuesto simulador de agente nervioso tipo G da lugar a la hidrólisis del enlace P-X, obteniéndose el producto de degradación no tóxico diisopropilfosfato, y produce la degradación estructural en la superficie cristalina del ZIF, acompañada de la liberación del ligando imidazólico correspondiente. La hidrólisis del enlace P-X y la degradación superficial de los cristales de las redes metal-orgánicas zomiméticas se encuentran altamente interconectados, y dependen de la basicidad del ligando, la topología de la red y el tamaño del cristal. Con respecto a esto, entre los distintos materiales preparados, las nanopartículas de sod ZIF-8 de 18 nm han demostrado presentar una alta eficiencia tanto en la ruptura del enlace P-X, como en la liberación de iones imidazolato (mIm, como consecuencia de su degradación estructural) los cuales son capaces de llevar a cabo un ataque nucleofílico sobre el aducto organofosforado-acetilcolinesterasa y, por tanto, recuperar la actividad enzimática de la AChE. Además, este material presenta una baja neurotoxicidad *in vitro*. La reacción en cascada presentada en este capítulo es ventajosa ya que se trata de un único material que presenta una función de detoxificación dual. Por último, se ha sintetizado un material híbrido esterasa@ZIF a modo de prueba de concepto de la viabilidad de los ZIFs como sistemas transportadores de biomoléculas con actividad esterasa.

6 Referencias bibliográficas

- [1] H. Soreq and S. Seidman, "Acetylcholinesterase — new roles for an old actor," *Nat Rev Neurosci*, vol. 2, no. 4, pp. 294–302, Apr. 2001, doi: 10.1038/35067589.
- [2] F. Worek, H. Thiermann, L. Szinicz, and P. Eyer, "Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes," *Biochem Pharmacol*, vol. 68, no. 11, pp. 2237–2248, Dec. 2004, doi: 10.1016/j.bcp.2004.07.038.
- [3] D. A. Giannakoudakis and T. Bandosz, *Detoxification of Chemical Warfare Agents. From WWI to Multifunctional Nanocomposite Approaches*. 2018. doi: 10.1007/978-3-319-70760-0.
- [4] L. González, R. Gil-San-Millán, J. A. R. Navarro, C. R. Maldonado, E. Barea, and F. J. Carmona, "Green synthesis of zirconium MOF-808 for simultaneous phosphate recovery and organophosphorus pesticide detoxification in wastewater," *J Mater Chem A Mater*, vol. 10, no. 37, pp. 19606–19611, Apr. 2022, doi: 10.1039/d2ta02074b.
- [5] C. L. Hobday *et al.*, "Understanding the adsorption process in ZIF-8 using high pressure crystallography and computational modelling," *Nat Commun*, vol. 9, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-03878-6.
- [6] H. Bin Luo, A. J. Castro, M. C. Wasson, W. Flores, O. K. Farha, and Y. Liu, "Rapid, Biomimetic Degradation of a Nerve Agent Simulant by Incorporating Imidazole Bases into a Metal-Organic Framework," *ACS Catal*, vol. 11, no. 3, pp. 1424–1429, Feb. 2021, doi: 10.1021/acscatal.0c04565.
- [7] T. Islamoglu *et al.*, "Metal-Organic Frameworks against Toxic Chemicals," *Chemical Reviews*, vol. 120, no. 16. American Chemical Society, pp. 8130–8160, Aug. 26, 2020. doi: 10.1021/acs.chemrev.9b00828.
- [8] L. González *et al.*, "Oxime@Zirconium-Metal-Organic Framework Hybrid Material as a Potential Antidote for Organophosphate Poisoning," *Inorg Chem*, vol. 62, no. 13, pp. 5049–5053, Apr. 2023, doi: 10.1021/acs.inorgchem.3c00121.
- [9] P. Delgado *et al.*, "Zirconium Metal-Organic Polyhedra with Dual Behavior for Organophosphate Poisoning Treatment," *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 14, no. 23, pp. 26501–26506, Jun. 2022, doi: 10.1021/acscami.2c06025.
- [10] K. S. Pawar, R. R. Bhoite, C. P. Pillay, S. C. Chavan, D. S. Malshikare, and S. G. Garad, "Continuous pralidoxime infusion versus repeated bolus injection to treat organophosphorus pesticide poisoning: a randomised controlled trial," *The Lancet*, vol. 368, no. 9553, pp. 2136–2141, Dec. 2006, doi: 10.1016/S0140-6736(06)69862-0.
- [11] F. Worek, H. Thiermann, and T. Wille, "Organophosphorus compounds and oximes: a critical review," *Archives of Toxicology*, vol. 94, no. 7. Springer, pp. 2275–2292, Jul. 01, 2020. doi: 10.1007/s00204-020-02797-0.
- [12] M. A. Malfatti *et al.*, "The biodistribution and pharmacokinetics of the oxime acetylcholinesterase reactivator RS194B in guinea pigs," *Chem Biol Interact*, vol. 277, pp. 159–167, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.cbi.2017.09.016.
- [13] K. S. Park *et al.*, "Exceptional chemical and thermal stability of zeolitic imidazolate frameworks," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, no. 27, pp. 10186–10191, Jul. 2006, doi: 10.1073/pnas.0602439103.
- [14] S. N. Eustis *et al.*, "Electron-driven acid-base chemistry: Proton transfer from hydrogen chloride to ammonia," *Science (1979)*, vol. 319, no. 5865, pp. 936–939, Feb. 2008, doi: 10.1126/science.1151614.
- [15] M. Eddaoudi, D. F. Sava, J. F. Eubank, K. Adil, and V. Guillermin, "Zeolite-like metal-organic frameworks (ZMOFs): Design, synthesis, and properties," *Chemical Society Reviews*, vol. 44, no. 1. Royal Society of Chemistry, pp. 228–249, Jan. 07, 2015. doi: 10.1039/c4cs00230j.
- [16] P. Falcato *et al.*, "Phase dependent encapsulation and release profile of ZIF-based biocomposites," *Chem Sci*, vol. 11, no. 13, pp. 3397–3404, Apr. 2020, doi: 10.1039/c9sc05433b.
- [17] M. Giménez-Marqués, T. Hidalgo, C. Serre, and P. Horcajada, "Nanostructured metal-organic frameworks and their bio-related applications," *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 307. Elsevier B.V., pp. 342–360, Jan. 15, 2016. doi: 10.1016/j.ccr.2015.08.008.
- [18] N. Singh, S. Qutub, and N. M. Khashab, "Biocompatibility and biodegradability of metal organic frameworks for biomedical applications," *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 9, no. 30. Royal Society of Chemistry, pp. 5925–5934, Aug. 14, 2021. doi: 10.1039/d1tb01044a.
- [19] J. Troyano, A. Carné-Sánchez, C. Avci, I. Imaz, and D. Maspoch, "Colloidal metal-organic framework particles: The pioneering case of ZIF-8," *Chemical Society Reviews*, vol. 48, no. 23. Royal Society of Chemistry, pp. 5534–5546, Dec. 07, 2019. doi: 10.1039/c9cs00472f.

- [20] N. I. of H (USA gov), "Imidazole," <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/795#section=Acute-Effects>.
- [21] M. de J. Velásquez-Hernández *et al.*, "Towards applications of bioentities@MOFs in biomedicine," *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 429, Elsevier B.V., Feb. 15, 2021, doi: 10.1016/j.ccr.2020.213651.
- [22] J. I. Deneff, K. S. Butler, P. G. Kotula, B. E. Rue, and D. F. Sava Gallis, "Expanding the ZIFs Repertoire for Biological Applications with the Targeted Synthesis of ZIF-20 Nanoparticles," *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 13, no. 23, pp. 27295–27304, Jun. 2021, doi: 10.1021/acsami.1c05657.
- [23] S. Kumari *et al.*, "In vivo biocompatibility of ZIF-8 for slow release via intranasal administration," *Chem Sci*, vol. 14, no. 21, pp. 5774–5782, May 2023, doi: 10.1039/d3sc00500c.
- [24] M. R. Mian *et al.*, "Insights into Catalytic Hydrolysis of Organophosphonates at M-OH Sites of Azolate-Based Metal Organic Frameworks," *J Am Chem Soc*, vol. 143, no. 26, pp. 9893–9900, Jul. 2021, doi: 10.1021/jacs.1c03901.
- [25] A. Ebrahimi, E. Nassireslami, R. Zibaseresht, and M. Mohammadsalehi, "Ultra-fast catalytic detoxification of organophosphates by nano-zeolitic imidazolate frameworks," *Molecular Catalysis*, vol. 490, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.mcat.2020.110965.
- [26] T. Fu *et al.*, "Zeolitic Imidazolate Framework-90 Nanoparticles as Nanozymes to Mimic Organophosphorus Hydrolase," *ACS Appl Nano Mater*, vol. 4, no. 4, pp. 3345–3350, Apr. 2021, doi: 10.1021/acsanm.1c00540.
- [27] A. M. Ebrahim *et al.*, "Capture and Decomposition of the Nerve Agent Simulant, DMCP, Using the Zeolitic Imidazolate Framework (ZIF-8)," *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 12, no. 52, pp. 58326–58338, Dec. 2020, doi: 10.1021/acsami.0c12985.
- [28] M. B. Colovic, D. Z. Krstic, T. D. Lazarevic-Pasti, A. M. Bondzic, and V. M. Vasic, "Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology," *Curr Neuropsychopharmacol*, vol. 11, no. 3, pp. 315–335, Apr. 2013, doi: 10.2174/1570159X11311030006.
- [29] P. Masson and O. Lockridge, "Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: Catalytic complexities and hysteretic behavior," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 494, no. 2, pp. 107–120, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.abb.2009.12.005.
- [30] K. Liang *et al.*, "Biomimetic mineralization of metal-organic frameworks as protective coatings for biomacromolecules," *Nat Commun*, vol. 6, Jun. 2015, doi: 10.1038/ncomms8240.
- [31] H. Hayashi, A. P. Côté, H. Furukawa, M. O'Keeffe, and O. M. Yaghi, "Zeolite A imidazolate frameworks," *Nat Mater*, vol. 6, no. 7, pp. 501–506, Jul. 2007, doi: 10.1038/nmat1927.
- [32] N. Masciocchi *et al.*, "Synthesis and ab-initio XRPD structure of group 12 imidazolato polymers," *Chemical Communications*, vol. 3, no. 16, pp. 2018–2019, 2003, doi: 10.1039/b302840b.
- [33] R. Chen *et al.*, "A two-dimensional zeolitic imidazolate framework with a cushion-shaped cavity for CO₂ adsorption," *Chemical Communications*, vol. 49, no. 82, pp. 9500–9502, Sep. 2013, doi: 10.1039/c3cc44342f.
- [34] A. Deacon *et al.*, "Understanding the ZIF-L to ZIF-8 transformation from fundamentals to fully costed kilogram-scale production," *Commun Chem*, vol. 5, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1038/s42004-021-00613-z.
- [35] M. Ge *et al.*, "High-Throughput Electron Diffraction Reveals a Hidden Novel Metal–Organic Framework for Electrocatalysis," *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 60, no. 20, pp. 11391–11397, May 2021, doi: 10.1002/anie.202016882.
- [36] W. Liang *et al.*, "Control of Structure Topology and Spatial Distribution of Biomacromolecules in Protein@ZIF-8 Biocomposites," *Chemistry of Materials*, vol. 30, no. 3, pp. 1069–1077, Feb. 2018, doi: 10.1021/acs.chemmater.7b04977.
- [37] K. Jeong, J. Shim, W. Y. Chung, Y. S. Kye, and D. Kim, "Diisopropyl fluorophosphate (DFP) degradation activity using transition metal–dipicolylamine complexes," *Appl Organomet Chem*, vol. 32, no. 7, Jul. 2018, doi: 10.1002/aoc.4383.
- [38] J. L. Vanhooke, M. M. Benning, F. M. Raushel, and H. M. Holden, "Three-Dimensional Structure of the Zinc-Containing Phosphotriesterase with the Bound Substrate Analog Diethyl 4-Methylbenzylphosphonate †, ‡," *Biochemistry*, vol. 35, pp. 6020–6025, 1996, [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- [39] O. Dym *et al.*, "The impact of molecular variants, crystallization conditions and the space group on ligand–protein complexes: a case study on bacterial phosphotriesterase," *Acta Crystallogr D Struct Biol*, vol. 79, no. 11, Nov. 2023, doi: 10.1107/S2059798323007672.
- [40] D. A. Giannakoudakis, Y. Hu, M. Florent, and T. J. Bandosz, "Smart textiles of MOF/g-C₃N₄ nanospheres for the rapid detection/detoxification of chemical warfare agents," *Nanoscale Horiz*, vol. 2, no. 6, pp. 356–364, Nov. 2017, doi: 10.1039/c7nh00081b.

- [41] L. Chen, D. Wu, and J. Yoon, “Recent Advances in the Development of Chromophore-Based Chemosensors for Nerve Agents and Phosgene,” *ACS Sens*, vol. 3, no. 1, pp. 27–43, Jan. 2018, doi: 10.1021/acssensors.7b00816.
- [42] J. Cravillon, R. Nayuk, S. Springer, A. Feldhoff, K. Huber, and M. Wiebcke, “Controlling zeolitic imidazolate framework nano- and microcrystal formation: Insight into crystal growth by time-resolved in situ static light scattering,” *Chemistry of Materials*, vol. 23, no. 8, pp. 2130–2141, Apr. 2011, doi: 10.1021/cm103571y.
- [43] R. A. Ross, B. A. Spengler, and J. L. Biedler, “Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells,” *J Natl Cancer Inst*, vol. 71, no. 4, pp. 741–747, 1983, doi: 10.1093/jnci/71.4.741.
- [44] M. R. Hafner, L. Villanova, and F. Carraro, “App-based quantification of crystal phases and amorphous content in ZIF biocomposites,” *CrystEngComm*, vol. 24, no. 41, pp. 7266–7271, 2022, doi: 10.1039/D2CE00073C.
- [45] N. Valkova, F. Lépine, L. Labrie, M. Dupont, and R. Beaudet, “Purification and Characterization of PrbA, a New Esterase from *Enterobacter cloacae* Hydrolyzing the Esters of 4-Hydroxybenzoic Acid (Parabens),” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 15, pp. 12779–12785, Apr. 2003, doi: 10.1074/jbc.M213281200.

CONCLUSIONES

De forma general, en esta Tesis Doctoral se ha demostrado la capacidad para actuar como sistemas duales en el tratamiento de la intoxicación por compuestos organofosforados de: (i) un material híbrido basado en un MOF de Zr(IV) y una oxima neutra, (ii) un material híbrido basado en una caja tetraédrica molecular catiónica y una oxima cargada y (iii) diversas redes metal-orgánicas zeomiméticas sintetizadas con ligandos de distinta nucleofilicidad.

En el Capítulo II, se ha sintetizado un material híbrido novedoso formado por un MOF de Zr(IV), el MOF-808, y una oxima neutra, la oxima RS69N. Se ha demostrado que dicho material, llamado RS69N@MOF-808, es capaz de actuar como un agente dual en el tratamiento de la intoxicación por compuestos organofosforados. Esto es así dado que, por una parte, el material híbrido RS69N@MOF-808 puede capturar el simulador de agente nervioso diisopropilfluorofosfato (DIFP) sin que la oxima encapsulada presente un efecto significativamente negativo sobre dicha adsorción. A su vez, dicho material híbrido es capaz de liberar gradualmente y de forma controlada la oxima RS69N, que a su vez tiene la capacidad de reactivar por completo a la enzima acetilcolinesterasa previamente inhibida por DIFP. Que se sepa, el material híbrido RS69N@MOF-808 se trata del primer ejemplo reportado en literatura en el que un material híbrido constituido por una red metal-orgánica y una oxima presenta un comportamiento dual en el tratamiento de la intoxicación por compuestos organofosforados. De esta forma, por todo lo expuesto anteriormente, es posible concluir que el material híbrido RS69N@MOF-808 supone un material bastante prometedor para el tratamiento de la intoxicación por compuestos organofosforados.

En el Capítulo III, se han preparado distintas cajas tetraédricas moleculares catiónicas $[(n\text{-butilCpZr})_3(\text{OH})_3\text{O})_4\text{L}_6]\text{Cl}_6$ (Zr-MOP-1; L = ácido tereftálico, *n*-butilCp = *n*-butilciclopentadienilo y Zr-MOP-10; L = ácido bifeníl-4,4'-dicarboxílico) y se ha comprobado que la presencia de ligandos Cp terminales con residuos alquilo incrementa la solubilidad y biocompatibilidad de dichos materiales. Por otra parte, se ha demostrado que estos materiales son capaces de capturar de manera eficaz el simulador de agente nervioso de tipo G diisopropilfluorofosfato. Asimismo, presentan la capacidad de

incorporar y liberar la oxima pralidoxima (2-PAM) de manera controlada, que a su vez es capaz de reactivar la enzima AChE previamente inhibida por DIFP. Es más, gracias a su procesabilidad en disolución, ha sido posible incorporar dichos sistemas en liposomas biocompatibles que no resultan neurotóxicos. Por todo esto, se puede concluir que los Zr-MOPs podrían utilizarse como agentes duales en el tratamiento de la intoxicación por OPs.

En el Capítulo IV, a partir de ligandos imidazólicos con diferente nucleofilicidad (purina, benzimidazol, imidazol y 2-metilimidazol) se han llevado a cabo distintas redes metal-orgánicas zeomiméticas (ZIFs) basadas en cinc: ZIF-20, ZIF-11, $\text{Zn}(\text{Im})_2$, ZIF-L, sod ZIF-8 (con tamaños de partícula de 18 nm, 240 nm, 1.2 μm y 2 μm) y ZIF-EC-1. Se ha demostrado que dichos materiales son capaces de degradar los simuladores de agente nervioso de tipo G diisopropilfluorofosfato y diisopropilclorofosfato hasta diisopropilfosfato, un producto de degradación que no presenta toxicidad. Asimismo, se ha comprobado que esta interacción produce la degradación estructural de los ZIFs, liberándose los ligandos imidazólicos correspondientes y que dichos ligandos son capaces de reactivar la enzima AChE previamente inhibida por DIFP. Tanto la hidrólisis de los compuestos organofosforados como la degradación estructural que experimentan los ZIFs dependen de la basicidad del ligando imidazólico, la topología que presente la red y el tamaño del cristal. Respecto a esto, se concluye que el sistema más prometedor es el sod ZIF-8 (18 nm) ya que son las que mayor eficacia presentan en la degradación de OPs y reactivación de AChE y además no resultan neurotóxicas. Finalmente, se ha demostrado que es posible emplear ZIFs como transportadores de una enzima esterasa, a modo de prueba de concepto de su utilidad en el tratamiento de la intoxicación por OPs.

CONCLUSIONS

In general terms, in this Doctoral Thesis it has been demonstrated the ability to act as dual systems in the treatment of organophosphorus (OPs) poisoning of: (i) a hybrid material based on a Zr(IV) MOF and a neutral oxime, (ii) a hybrid material based on a cationic molecular tetrahedral cage and a charged oxime and (iii) several zeomimetic metal-organic frameworks synthesized with ligands of different nucleophilicity.

In Chapter II, a novel hybrid material consisting of a Zr(IV) MOF, MOF-808, and a neutral oxime, RS69N oxime, has been synthesized. It has been demonstrated that such material, named RS69N@MOF-808, is able to act as a dual agent in the treatment of organophosphorus poisoning. On the one hand, the hybrid material RS69N@MOF-808 can capture the nerve agent simulant diisopropylfluorophosphate (DIFP) without the encapsulated oxime presenting a significantly negative effect on such adsorption. On the other hand, such hybrid material is able to gradually release oxime RS69N in a controlled manner, which in turn has the ability to fully reactivate the acetylcholinesterase enzyme previously inhibited by DIFP. To our knowledge, the hybrid material RS69N@MOF-808 is the first example reported in literature in which a hybrid material consisting of a metal-organic framework and an oxime presents a dual behaviour in the treatment of organophosphorus poisoning. Thus, it is possible to conclude that the hybrid material RS69N@MOF-808 is a very promising material for the treatment of OPs poisoning.

In Chapter III, different cationic molecular tetrahedral cages $[(n\text{-butylCpZr})_3(\text{OH})_3\text{O})_4\text{L}_6]\text{Cl}_6$ (Zr-MOP-1; L = terephthalic acid, *n*-butylCp = *n*-butylcyclopentadienyl and Zr-MOP-10; L = biphenyl-4,4'-dicarboxylic acid) and it has been shown that the presence of terminal Cp ligands with alkyl residues increases the solubility and biocompatibility of these materials. Moreover, it has been demonstrated that these materials are capable of efficiently capturing the G-type nerve agent simulant diisopropylfluorophosphate. They also have the ability to incorporate pralidoxime (2-PAM) and release it in a controlled manner, which in turn is able to reactivate the AChE previously inhibited by DIFP. Furthermore, thanks to their processability in solution, it has been possible to incorporate these systems into non-neurotoxic biocompatible

liposomes. Therefore, it can be concluded that Zr-MOPs could be used as dual agents in the treatment of OPs poisoning.

In Chapter IV, imidazole ligands with different nucleophilicity (purine, benzimidazole, imidazole and 2-methylimidazole) have been used to synthesize several zinc-based zeomimetic metal-organic frameworks (ZIFs): ZIF-20, ZIF-11, $\text{Zn}(\text{Im})_2$, ZIF-L, sod ZIF-8 (particle sizes of 18 nm, 240 nm, 1.2 μm and 2 μm) and ZIF-EC-1. It has been proved that these materials are able to degrade G-type nerve agent simulants diisopropylfluorophosphate and diisopropylchlorophosphate to diisopropylphosphate, a degradation product that does not exhibit toxicity. It has also been shown that this interaction leads to structural degradation of the ZIFs, releasing the corresponding imidazole ligands, and that these ligands are able to reactivate AChE previously inhibited by DIFP. Both the hydrolysis of the organophosphorus compounds and the structural degradation experienced by the ZIFs depend on the basicity of the imidazole ligand, the topology of the network and the size of the crystal. Therefore, it is concluded that the most promising system is ZIF-8 sod (18 nm) since it is the most efficient in the degradation of OPs, the reactivation of AChE and it is not neurotoxic. Finally, it has been demonstrated that it is possible to use ZIFs as carriers of an esterase enzyme, as a proof of concept of their usefulness in the treatment of OPs poisoning.

ANEXO I

DETALLES EXPERIMENTALES

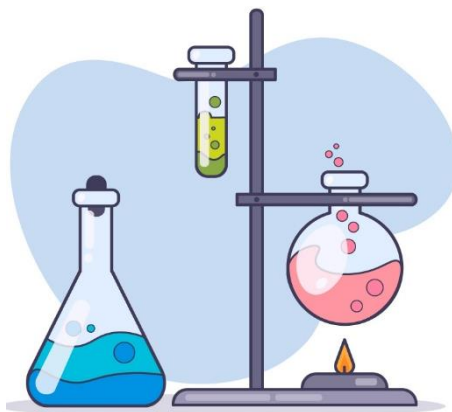


Imagen obtenida de Vectorportal.com

1 Materiales y métodos

1.1 Materiales y reactivos

Todos los reactivos y disolventes empleados en esta Tesis Doctoral se encuentran disponibles de manera comercial y no precisaron ningún tratamiento y/o purificación antes de usarse.

1.2 Métodos físicos y químicos de caracterización

Análisis elemental CHN. El contenido de carbono, hidrógeno y nitrógeno de los materiales sintetizados se determinó empleando un analizador elemental THERMO SCIENTIFIC modelo Flash 2000 con una microbalanza de precisión METTLER M-3. Dicho aparato se encuentra disponible en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Análisis termogravimétrico (TGA). El análisis termogravimétrico de los materiales sintetizados se realizó en atmósfera de aire y con una rampa de calentamiento de $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (desde temperatura ambiente hasta $950\text{ }^{\circ}\text{C}$). Para ello, se utilizó un analizador termogravimétrico METTLER-TOLEDO modelo TGA/DSC1. Dicho aparato se encuentra disponible en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Cromatografía de gases (GC). Los estudios de captura/degradación de los agentes nerviosos modelo diisopropilfluorofosfato (DIFP) y diisopropilclorofosfato (DICP) en disolución acuosa se llevaron a cabo empleando un cromatógrafo de gases AGILENT 8860 GC. Este cromatógrafo se encuentra equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna HP-5 de 50 m de longitud, 0.32 mm de diámetro y $1.05\text{ }\mu\text{m}$ de espesor. Dicho aparato se encuentra localizado en el Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Granada.

Difracción de rayos X de monocristal (SCXRD). Los compuestos obtenidos como monocristales en esta Tesis Doctoral, en concreto los compuestos Zr-MOP-1', Zr-MOP-1-NH₂ y Zr-MOP-10 (*véase apartado 2.1*) se analizaron mediante difracción de rayos-X de monocristal (SCXRD) con el objetivo de determinar su estructura cristalina. En el caso

de los compuestos Zr-MOP-1' y Zr-MOP-1-NH₂, los cristales se midieron a 130 K, usando un difractómetro BRUKER D8 VENTURE PHOTON III-14 con radiación de grafito monocromatizado Mo-K α (λ = 0.71073 Å) disponible en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. En el caso del compuesto Zr-MOP-10, los datos de difracción se obtuvieron usando el mismo difractómetro, pero usando un generador de Rayos-X de CuK α (λ = 1.54178 Å), realizándose las medidas a la temperatura de 100 K. En todos los casos, se aplicaron correcciones de absorción multianálisis utilizando la rutina SADABS. [1] Asimismo, todas las estructuras se resolvieron empleando métodos directos con SHELXT-2014 [2] y se refinaron con SHELXL-2018 [2] utilizando el programa OLEX 2-1.3.[3] Todos los átomos distintos del hidrógeno se refinaron mediante técnicas de ajuste de mínimos cuadrados de matriz completa. Debido a la existencia de desorden posicional, en el caso del Zr-MOP-1' y el Zr-MOP-1-NH₂ algunos de los átomos de las cadenas *n*-butilo se modelaron separándolos en dos posiciones. Lo mismo se realizó para uno de los anillos de ciclopentadienilo en la estructura del compuesto Zr-MOP-1'. En el caso del compuesto Zr-MOP-10 no fue posible modelar por completo la cadena *n*-butilo debido a la existencia de desorden posicional severo. En este sentido, se emplearon restricciones DFIX y SADI para describir las cadenas *n*-butilo con el fin de obtener parámetros geométricos razonables, debido al desorden observado y a la baja calidad de los datos. Asimismo, a algunos de los átomos de carbono de las cadenas de *n*-butilo y algunos de los anillos de ciclopentadienilo no se le asignaron parámetros de desplazamiento anisotrópico. En el caso del Zr-MOP-1-NH₂ y el Zr-MOP-10, las moléculas de disolvente se encontraban altamente desordenadas y ninguno de los intentos de describir la densidad electrónica difusa tuvo éxito. Las contribuciones a la difracción de todas estas moléculas altamente desordenadas, así como de las cadenas de *n*-butilo no modeladas se eliminaron empleando la rutina SQUEEZE de PLATON;[4] las estructuras cristalinas se volvieron a refinar entonces empleando los datos *hkl* generados. Cuando fue posible, los átomos de hidrógeno se asociaron a sus átomos parentales en posiciones geométricamente idealizadas.

Los parámetros de ajuste tras la resolución estructural fueron $R_1 = 0.1062$, $wR_2 = 0.2193$, $GOOF = 1.188$, $R_1 = 0.0741$, $wR_2 = 0.2058$, $GOOF = 1.075$, $R_1 = 0.0965$, $wR_2 =$

0.2814, $GOOF = 1.147$, para el Zr-MOP-1', Zr-MOP-1-NH₂ y Zr-MOP-10, respectivamente.

Difracción de rayos X en polvo (PXRD). Los difractogramas de rayos X en polvo se registraron en un difractómetro BRUKER D2-PHASES empleando una radiación CuK α ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) y un detector LYNXEYE. Los datos se registraron a un intervalo de valores de 2θ de 5 a 35° cada 0.02° con duraciones de 0.5 s o 1 s por scan. Dicho aparato se encuentra localizado en el Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Granada.

Difracción de rayos X en polvo a temperatura variable *in situ* (VT-PXRD). El análisis térmico por difracción de rayos X a temperatura variable *in situ* se realizó en un difractómetro BRUKER AXS D8 ADVANCE (CuK α $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$). Para ello, 20 mg de los materiales sintetizados se calentaron en atmósfera de aire desde 25 °C hasta su descomposición ($T_{\text{dec}} = 170\text{-}200 \text{ °C}$) con un intervalo de temperatura de 10 °C utilizando un calentador para muestras hecho a medida, que se encuentra disponible en la Universidad de la Insubria (Como, Italia).

Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS). Las medidas de cuantificación de iones Zn en disolución realizadas en el Capítulo IV se llevaron a cabo usando un espectrómetro de masas PERKINELMER NEXION 3000D, disponible en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). Los espectros de absorción infrarroja de los materiales sintetizados se obtuvieron en un espectrofotómetro de transformada de Fourier BRUKER TENSOR 27, con un accesorio de Reflectancia Total Atenuada GladiATR, operando en el intervalo de números de onda de 4000 a 400 cm⁻¹. Dicho aparato se encuentra localizado en el Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Granada.

Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis). Los espectros UV-Vis se obtuvieron empleando un espectrofotómetro SHIMADZU UV-1800. Dicho aparato se encuentra localizado en el Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Granada.

Los ensayos de actividad enzimática mediante el método del *acetato de indoxilo* se llevaron a cabo utilizando un lector de placas TECAN INFINITE 200 PRO NANOQUANT. Dicho aparato se encuentra disponible en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Los ensayos de Bradford y las medidas de actividad enzimática mediante el método del *p-nitrofenil acetato* se llevaron a cabo en un espectrofotómetro THERMO SCIENTIFIC NANODROP, disponible en el Institute of Physical and Theoretical Chemistry de la Graz University of Technology (Graz, Austria).

Isotermas de adsorción de nitrógeno y dióxido de carbono. Las isotermas de adsorción de N₂ a 77 K y de adsorción de CO₂ a 195 K de los materiales sintetizados se obtuvieron utilizando un analizador MICROMERITICS 3FLEX capaz de realizar medidas de precisión de microporo. Dicho aparato se encuentra disponible en el Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Granada. El área superficial específica de los materiales se determinó utilizando el método de Brunauer-Emmett-Teller (BET) mientras que el tamaño y la distribución de poro se calcularon empleando la Teoría Funcional de la Densidad (DFT). Antes de realizar las medidas de adsorción de nitrógeno, los materiales se sometieron a calor y vacío de forma simultánea (activación) empleando para ello un equipo MICROMERITICS SMART VACPREP, que se encuentra disponible en el Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Granada.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Las imágenes SEM de los materiales sintetizados se obtuvieron usando un microscopio electrónico de barrido de presión variable de alta resolución ZEISS SUPRA40VP, que se encuentra disponible en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Antes de realizar las medidas por SEM, las muestras se metalizaron con carbono en el Laboratorio de Preparación de Muestras Biológicas del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). Las imágenes TEM de los materiales sintetizados se obtuvieron gracias a un microscopio electrónico de transmisión CARL ZEISS SMT LIBRA 120 PLUS, que se encuentra disponible en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. En el caso de las muestras de

liposomas preparadas en el Capítulo III, antes de realizar las medidas por TEM, se llevó a cabo una tinción con acetato de uranilo por parte del Laboratorio de Preparación de Muestras Biológicas del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Resonancia magnética nuclear de protón (^1H NMR) y de fósforo (^{31}P NMR). Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{31}P se obtuvieron usando un espectrómetro de NMR de 400 MHz (2 canales) BRUKER NANOBAV AVANCE III HD. Los espectros correspondientes a los experimentos de liberación de oxima se obtuvieron con un espectrómetro de NMR de 500 MHz (2 canales) de alta definición BRUKER AVANCE NEO. Ambos aparatos están disponibles en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

2 Redes metal-orgánicas de circonio con propiedades duales de captura y detoxificación de compuestos organofosforados

2.1 Síntesis y caracterización

2.1.1 Síntesis del MOF-808

El MOF-808 ($[\text{Zr}_6\text{O}_4(\text{OH})_4(\text{BTC})_2(\text{HCOO})_6]$, H_3BTC =ácido benceno-1,3,5-tricarboxílico) se preparó mediante síntesis asistida por microondas, siguiendo un método previamente publicado. [5] Se añadieron $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (1.288 g, 4.00 mmol) y ácido trimésico (0.280 g, 1.33 mmol) a una mezcla de ácido fórmico/agua (10 mL/10 mL) en un vial de reacción de 30 mL, que posteriormente se sonicó durante 5 min. Tras esto, la suspensión se calentó hasta los 95 °C (empleando una rampa de calentamiento de 60 min) y se mantuvo a dicha temperatura durante 1 h para, finalmente, enfriarse hasta temperatura ambiente en un período de 2 min. El polvo de color blanco obtenido se centrifugó (2486 g/5 min) y se lavó tres veces con agua y una con acetona. Para eliminar los restos de disolvente que pudieran haber quedado atrapados en los poros del material, éste se activó a vacío dinámico durante 8 h. El estudio por TGA (Figura AI.2) dio como resultado un residuo (calc./exp.) de 54.21/54.61 %. El rendimiento fue de un 71.8 %.

2.1.2 Síntesis de la oxima RS69N

La oxima 2-(hidroxiimino)-N-(2-(piperidin-1-il)etil)acetamida, conocida como RS69N, se sintetizó de acuerdo con un procedimiento previamente descrito en bibliografía. [6] Inicialmente, se añadieron clorhidrato de hidroxilamina (0.69 g, 10 mmol), glioxilato de etilo al 50 % en tolueno (1.98 mL, 10 mmol), acetonitrilo (7.30 mL) y agua (0.80 mL) en un matraz de fondo redondo de 25 mL y la mezcla resultante se agitó durante 5 min a temperatura ambiente. Tras esto, se añadió trietilamina (1.40 mL, 10 mmol) gota a gota y la mezcla se agitó durante 1 h. Entonces, la disolución se concentró con la ayuda de un rotavapor hasta obtenerse un sólido de color blanco. Dicho sólido se disolvió en una mezcla de agua/dietiléter (15 mL/15 mL), la fase orgánica se separó y la fase acuosa restante se extrajo dos veces con dietiléter (20 mL). Las fases orgánicas resultantes se combinaron y se lavaron con salmuera para posteriormente secarse con

sulfato de magnesio anhidro y concentrarse utilizando un rotavapor. El resultado fue un aceite, que se mezcló con dihidrocloruro de *N*-(2-aminoetil)piperidina (1.47 g, 11.6 mmol), 2-ciano-2-(hidroxiimino)acetato de etilo (1.16 g, 10 mmol) y 10 mL de etanol y se incubó en agitación a 50 °C durante toda la noche. Tras esto, se dejó enfriar a temperatura ambiente y el precipitado resultante se filtró a vacío, se lavó tres veces con 10 mL de etanol frío y se secó utilizando un rotavapor hasta obtenerse un sólido de color blanco. El rendimiento obtenido fue del 63 %. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.92 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 3.24 (q, $J = 8\text{Hz}$, 2H), 2.37-2.32 (m, 6H), 1.51-1.45 (m, 4H), 1.40-1.35 (app d. $J = 4$, 2H) (Figura AI.1).

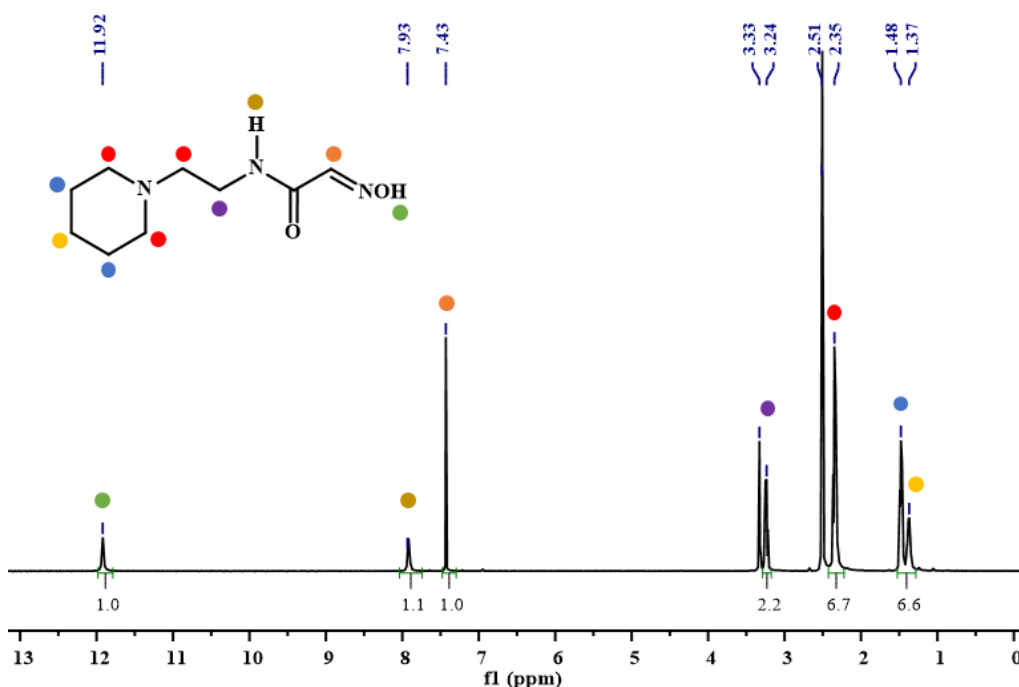


Figura AI.1. Espectro de NMR de ^1H de la oxima RS69N en $\text{DMSO-}d_6$.

2.2 Encapsulación de la oxima RS69N en el MOF-808

2.2.1 Modelado computacional

El modelado computacional de la interacción entre la oxima RS69N, así como del compuesto organofosforado modelo DIFP, con la matriz porosa del MOF-808 se llevó a cabo utilizando el programa de Biovia *Materials Studio* 2018. [7] Concretamente, se

utilizó el módulo *Adsorption Locator* para realizar búsquedas Monte Carlo del espacio configuracional del sistema sustrato-adsorbato con el fin de identificar las configuraciones de adsorción más favorables para los sustratos, en este caso RS69N y DIFP, en el interior de la matriz porosa del MOF-808. Respecto a la oxima RS69N, se exploraron cargas de oxima de 1 a 52 moléculas por celda cristalina (entre 0.0625 y 3.25 moléculas de oxima por unidad de MOF-808). Respecto al compuesto organofosforado modelo DIFP, se exploraron cargas de 0.0625 a 0.313 moléculas por unidad de MOF-808.

2.2.2 Encapsulación de la oxima RS69N en la matriz porosa MOF-808

La estrategia empleada para la encapsulación de la oxima neutra RS69N en la matriz porosa del MOF-808 fue la impregnación sólido-líquido. Para llevarla a cabo, inicialmente se disolvieron 200 mg de RS69N (1 mmol) en 0.4 mL de HCl al 37 % en un vial de vidrio de 5 mL. La mezcla resultante se sonicó hasta disolverse por completo y se evaporó hasta transformarse en un aceite utilizando un rotavapor. Tras esto, se añadieron 20 mg de MOF-808 (0.01 mmol) junto con 1 mL de metanol y la mezcla se mantuvo en agitación durante 24 h para evaporar el disolvente. El resultado fue un sólido de color blanco, que se lavó con agua (2 x 1 mL) y se recuperó mediante centrifugación (9168 g/5 min). Tras esto, el sólido se liofilizó con el objetivo de eliminar completamente cualquier resto de disolvente. Los estudios por TGA indicaron un residuo (calc./exp.) de 30.8/35.8 % (Figura AI.2).

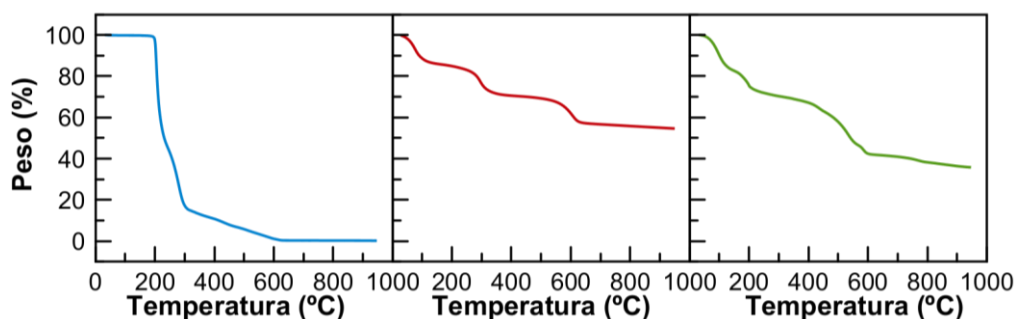


Figura AI.2. Análisis termogravimétrico de la oxima RS69N (azul), el MOF-808 (rojo) y el material híbrido RS69N@MOF-808 (verde).

2.2.3 Cuantificación de la cantidad de oxima encapsulada

Con objeto de cuantificar la cantidad de oxima RS69N encapsulada en el MOF-808, el material se digirió en medio básico y se cuantificó la cantidad de oxima mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^1H . En concreto, material híbrido RS69N@MOF-808 (20 mg) se mezcló con 600 μL de NaOD 10 M y la mezcla se mantuvo en agitación durante 24 h a 25 $^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante se aisló mediante centrifugación (9168 $g/5$ min) y se analizó por NMR ^1H (Figura AI.3).

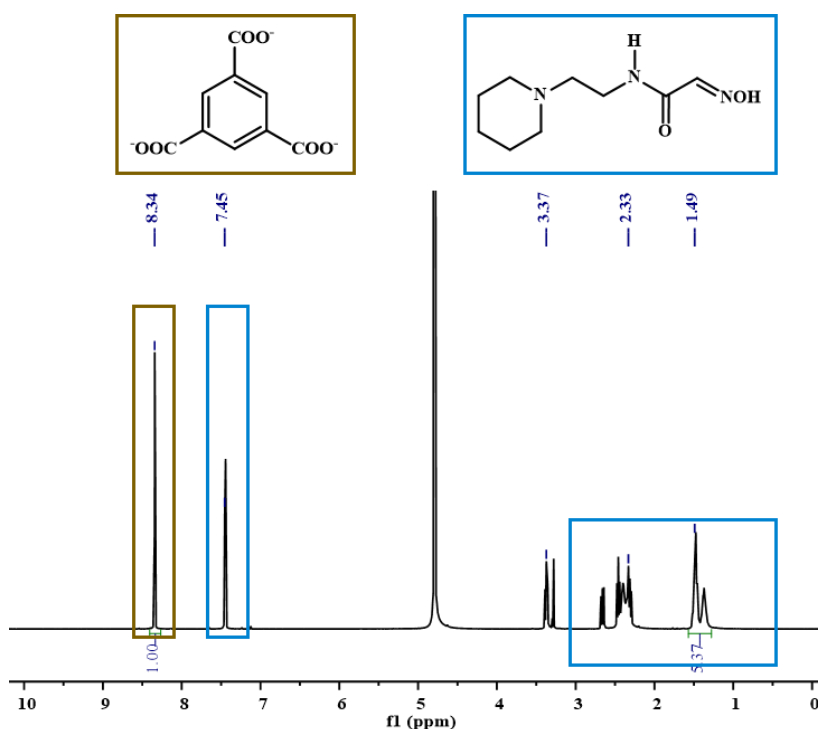


Figura AI.3. Espectro NMR de ^1H de la digestión con una disolución de NaOD del material híbrido RS69N@MOF-808. Condiciones experimentales: RS69N@MOF-808 (20 mg), NaOD (0.6 mL, 10 M), tiempo de incubación de 24 h.

2.3 Liberación de la oxima RS69N

Para cuantificar la cantidad de oxima RS69N liberada por el material híbrido RS69N@MOF-808 en medio fisiológico simulado, se suspendieron 20 mg de RS69N@MOF-808 en una disolución conteniendo 20 μL de dimetilacetamida (0.02 mmol), utilizada como patrón interno, y 480 μL de tampón fosfato salino deuterado (PBS,

100 mM) en el interior de un tubo de NMR. Tras esto, la mezcla se incubó a temperatura ambiente y, a distintos tiempos, se recogió el espectro ^1H NMR de la disolución para cuantificar la cantidad de oxima liberada. Asimismo, transcurridas 24 h de incubación, se separó el sobrenadante del precipitado por centrifugación (9168 g /15 min), se mezcló con 1 mL de NaOD 1 M y se volvió a analizar por ^1H -NMR para cuantificar la cantidad total de oxima en el material híbrido. Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado (Figura AI.4 y Figura AI.5, Tabla AI.1).

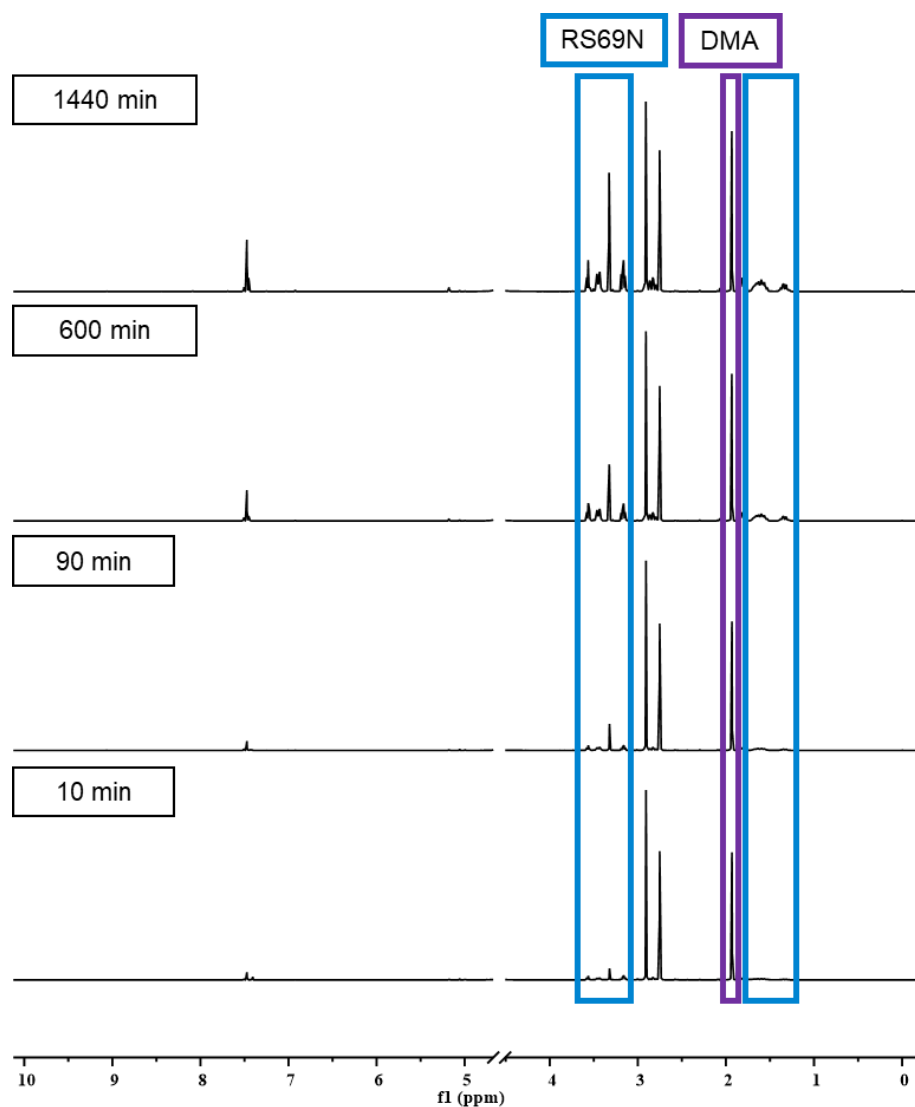


Figura AI.4. Espectros NMR de ^1H a distintos tiempos (10, 90, 600 y 1440 min) correspondientes a la liberación de la oxima RS69N del material híbrido RS69N@MOF-808.

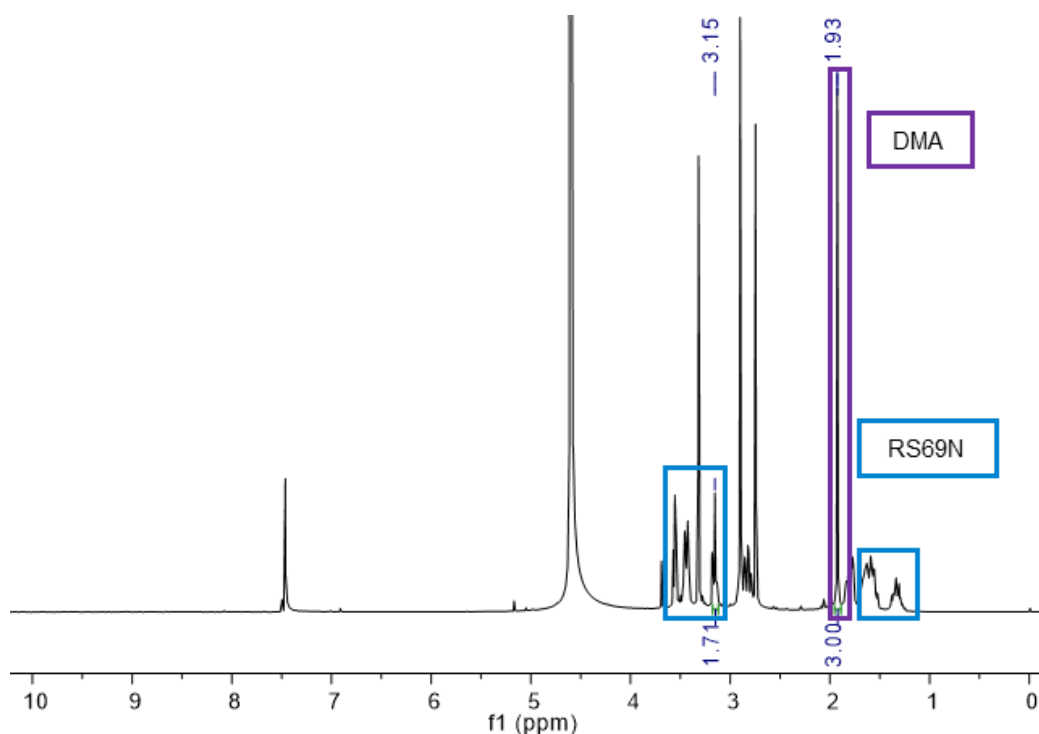


Figura AI.5. Espectro NMR de ^1H de la liberación de la oxima RS69N del material híbrido RS69N@MOF-808 tras 24 h de incubación y la adición de NaOD (1 M) para desprotonar por completo la oxima.

Tabla AI.1. Área bajo la curva de los picos del espectro ^1H NMR correspondientes a la oxima RS69N y al patrón interno (DMA) durante la liberación de oxima por parte del material híbrido RS69N@MOF-808 a diferentes tiempos (10 min, 90 min, 600 min y 1440 min).

Tiempo (min)	Integral DMA ($\delta 1.93$ ppm)	Integral RS69N ($\delta 3.16$ ppm)
10 min	3.00	0.30
90 min	3.00	0.36
600 min	3.00	1.03
1440 min	3.00	1.61

2.4 Ensayos de actividad enzimática

2.4.1 Ensayos de reactivación enzimática

Con objeto de determinar la capacidad de la oxima RS69N liberada del material híbrido RS69N@MOF-808 para reactivar la enzima acetilcolinesterasa, previamente inhibida por DIFP, se llevaron a cabo distintos ensayos de actividad enzimática. La actividad enzimática se determinó mediante un método colorimétrico basado en la transformación del acetato de indoxilo en azul índigo. [8] Se seleccionó este método para evaluar la actividad AChE, en lugar del clásico método de Ellman, debido a la sensibilidad de la acetiltiocolina a los compuestos nucleófilos (p.ej., oximas), lo que da lugar a falsos positivos. [19] Cabe resaltar que todos los ensayos enzimáticos se realizaron por triplicado.

En primer lugar, se evaluó la capacidad de la oxima RS69N para restaurar la actividad de la AChE inhibida con el agente nervioso modelo DIFP. Para ello, en una placa de 24 pocillos, se prepararon diferentes disoluciones mezclando 725 μL de PBS (100 mM, pH = 7.4), 25 μL de una disolución acuosa de AChE (75 U/mL) y 100 μL de una disolución acuosa de DIFP (concentración en el pocillo de 5×10^{-6} M) y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C para que tuviera lugar la inhibición parcial de la enzima. Transcurrido este tiempo, se añadieron 100 μL de una disolución acuosa de la oxima RS69N sobre las disoluciones anteriores para alcanzar una concentración de oxima en los pocillos de 5×10^{-4} M y 5×10^{-3} M; y las mezclas se incubaron durante 30 minutos adicionales a 37°C para que la reactivación enzimática tuviera lugar. A continuación, se añadieron 50 μL de una disolución 3.0 mM de acetato de indoxilo en isopropanol y la mezcla se incubó durante 30 min a 37 °C. Finalmente, cada muestra se mezcló con 3.3 mL con objeto de solubilizar el producto enzimático (azul índigo). La actividad enzimática se determinó cuantificando la concentración del producto mediante espectroscopía UV-Vis ($\lambda = 620$ nm, $\epsilon = 22140 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). [9]

Además, se realizaron dos ensayos enzimáticos adicionales como controles:

i) Un ensayo enzimático control para determinar la actividad enzimática de la AChE en ausencia del compuesto tóxico DIFP (actividad control de la enzima): En este

caso, se preparó una disolución conteniendo 725 μL de PBS (100 mM, pH = 7.4), 25 μL de una disolución acuosa de AChE (75 U/mL) y 200 μL de agua y se incubó durante 60 minutos a 37 °C. A continuación, se añadieron 50 μL de una disolución 3.0 mM de acetato de indoxilo en isopropanol y la mezcla se incubó durante 30 min a 37 °C. Finalmente, cada muestra se mezcló con 3.3 mL y la actividad enzimática se estimó mediante la cuantificación espectrofotométrica de la cantidad de azul índigo producida.

ii) Un ensayo enzimático control para determinar la actividad enzimática de la AChE en presencia del DIFP y en ausencia de reactivador (actividad enzimática de inhibición).

Este ensayo se realizó siguiendo el mismo protocolo que para los ensayos de reactivación enzimática detallados anteriormente, excepto que se añadieron 100 μL de agua en vez de 100 μL de disolución acuosa conteniendo la oxima RS69N a la disolución de PBS conteniendo a la enzima y al agente nervioso modelo DIFP. Como en los casos anteriores, la actividad enzimática se determinó espectrofotométricamente mediante el método del azul índigo.

Una vez confirmada la capacidad del compuesto RS69N para restaurar la actividad de la enzima AChE, se evaluó si la oxima liberada al medio desde la matriz del material RS69N@MOF-808 tras su incubación en medio fisiológico simulado era capaz de reactivar a la enzima AChE previamente inhibida con DIFP. Para ello, se suspendió RS69N@MOF-808 en PBS (100 mM, pH = 7.4) y se incubó durante 24 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo, el sólido se separó del líquido por centrifugación y se recuperó el sobrenadante. Por otra parte, en una placa de 24 pocillos, se mezclaron 725 μL de PBS (100 mM, pH = 7.4), 25 μL de una disolución acuosa de AChE (75 U/mL) y 100 μL de una disolución acuosa de DIFP (concentración en el pocillo de 5×10^{-6}) y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C para que tuviera lugar la inhibición parcial de la enzima. Transcurrido este tiempo, se añadieron 100 μL del sobrenadante conteniendo la oxima RS69N liberada del compuesto RS69N@MOF-808 (concentración de en el pocillo de 3.2×10^{-3} M) y la mezcla se incubó durante 30 minutos adicionales a 37 °C para que la reactivación de la enzima tuviera lugar. A continuación, se determinó la actividad enzimática de la AChE mediante el método colorimétrico del azul índigo detallado anteriormente. Asimismo, se realizaron dos experimentos controles adicionales para

determinar la actividad control de la enzima y actividad enzimática de la AChE inhibida, siguiendo el mismo protocolo detallado en los párrafos anteriores.

2.4.2 Ensayos de inhibición enzimática

Con el objetivo de evaluar la capacidad detoxificadora dual del material RS69N@MOF-808 (captura del compuesto tóxico DIFP y reactivación enzimática mediante la RS69N liberada) se llevaron a cabo ensayos de actividad enzimática adicionales.

Para ello, se prepararon una suspensión del material híbrido RS69N@MOF-808 (20 mg) en 500 μL de una disolución control de DIFP (2.9×10^{-2} M) en PBS (100 mM, pH = 7.4), y 500 μL de una disolución de DIFP (2.9×10^{-2} M) en PBS (100 mM, pH = 7.4); y ambas mezclas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se separó sólido del líquido en la suspensión mediante centrifugación y se recuperó el sobrenadante. A continuación, tanto la disolución de DIFP como el sobrenadante recuperado se diluyeron 560 veces (concentración de DIFP en la disolución control diluida de 5×10^{-5} M).

Por otra parte, en una placa de 24 pocillos, se mezclaron 825 μL de PBS (100 mM, pH = 7.4), 25 μL de una disolución acuosa de AChE (75 U/mL) y 100 μL de las disoluciones diluidas anteriores; y las mezclas se incubaron durante 1 hora para que la reacción de inhibición enzimática debido al DIFP tuviera lugar. A continuación, se determinó espectrofotométricamente la actividad enzimática en las disoluciones mediante el método azul índigo siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Además, se realizó un ensayo enzimático control para determinar la actividad enzimática de la AChE en ausencia del compuesto tóxico DIFP, siguiendo el procedimiento descrito en la sección anterior. Cabe resaltar que todos los ensayos se determinaron por triplicado.

2.5 Descontaminación de compuestos organofosforados modelo tipo G

2.5.1 Estudios por cromatografía de gases

La capacidad del material híbrido RS69N@MOF-808, así como la del MOF-808, para descontaminar disoluciones del compuesto organofosforado modelo DIFP se

estudió, entre otras técnicas, por cromatografía de gases. Para ello, se añadieron 20 mg de MOF-808 o RS69N@MOF-808 (0.015 mmol) sobre una disolución que contenía 2.5 μL de dimetilacetamida (DMA, a modo de patrón interno), 2.5 μL de DIFP (0.015 mmol) y 500 μL de PBS (100 mM, pH = 7.4) y la mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante un total de 24 h. La evaluación de la concentración de DIFP se monitoreó a distintos tiempos mediante un cromatógrafo de gases con un detector de ionización de llama (FID), inyectando 0.5 μL de sobrenadante en la columna a cada tiempo.

Los datos experimentales se ajustaron a un modelo cinético de pseudo-segundo orden según la Ecuación AI.1 (Figura AI.6 y Figura AI.7):

$$q_t = \frac{q_e^2 \cdot k_t \cdot t}{1 + k_t \cdot t \cdot q_e}$$

t = tiempo de adsorción (min)

q_t = capacidad de adsorción (mol/mol) a tiempo t

q_e = capacidad de adsorción en equilibrio (mol/mol)

k_t = constante de adsorción (mol/mol·min)

Ecuación AI.1. Ajuste a un modelo cinético de pseudo-segundo orden.

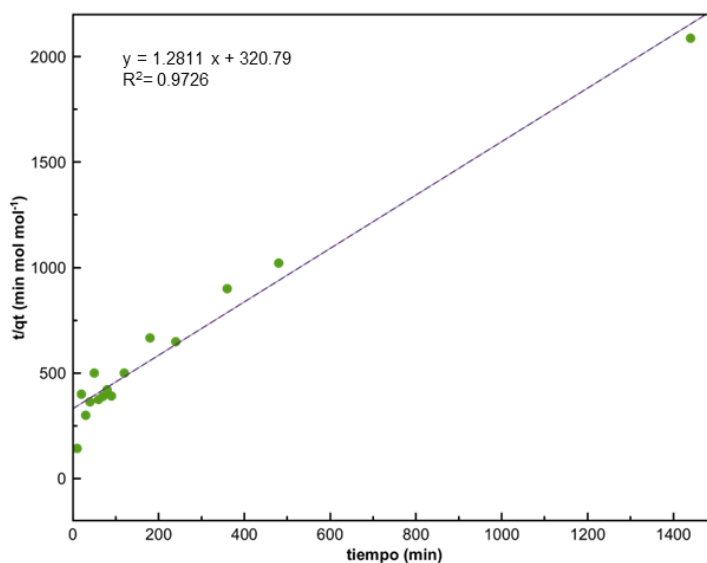


Figura AI.6. Gráfica de ajuste a un modelo cinético de pseudo-segundo orden para la eliminación de DIFP por parte del material híbrido RS69N@MOF-808.

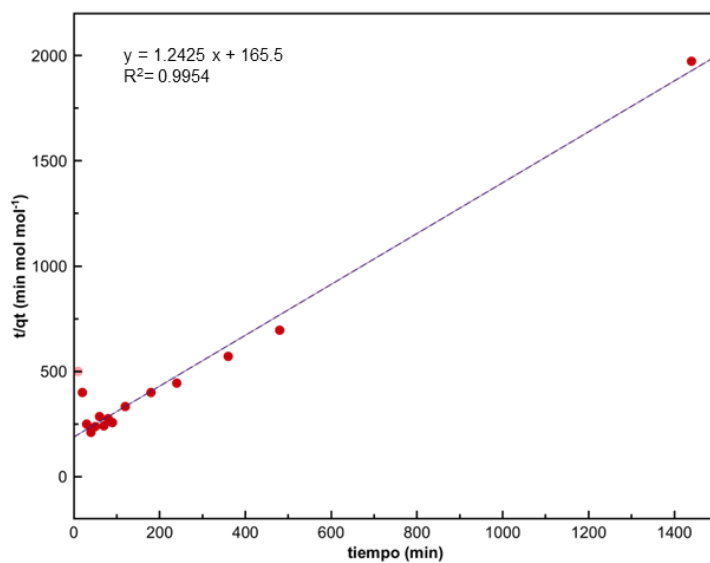


Figura AI.7. Gráfica de ajuste a un modelo cinético de pseudo-segundo orden para la eliminación de DIFP por parte del MOF-808.

2.5.2 Estudios por resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{31}P

La capacidad del material híbrido RS69N@MOF-808, así como la del MOF-808 de, para descontaminar disoluciones del compuesto organofosforado modelo DIFP se estudió, a su vez, por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{31}P . Para ello, inicialmente se suspendieron 20 mg del material híbrido RS69N@MOF-808 (0.015 mmol) o del MOF-808 (0.015 mmol) junto con 2.5 μL de DIFP (2.9×10^{-2} M) y 2.5 μL de DMA (2.9×10^{-2} M, patrón interno) en 500 μL de PBS deuterado (100 mM, pH = 7.4). La mezcla se incubó durante 24 h y, a continuación, se separó el sólido del líquido mediante centrifugación (2486 g/5 min) y se recuperó la fracción líquida. Por su parte, el sólido separado se suspendió en DMSO- d_6 para extraer aquellos compuestos que pudieran haber quedado retenidos dentro las cavidades de las matrices porosas. Finalmente, ambas fracciones (disolución extraída y sobrenadante) se analizaron por NMR de ^1H y ^{31}P .

3 Poliedros metal-orgánicos de circonio como vehículos de agentes reactivadores de acetilcolinesterasa

3.1 Síntesis de poliedros metal-orgánicos

3.1.1 Zr-MOP-1 $[(Zr_3(\mu_2-OH)_3(\mu_3-O)(n-butylCp)_3)_x(C_8H_4O_4)_n]Cl_x$ (monocristales) $x = 6$, $n = 6$ para la fase cúbica y $x = 2$, $n = 3$ para la fase monoclinica.

En un reactor de teflón de 4 mL, se disolvieron 4.43 mg de ácido tereftálico (0.027 mmol) y 21.4 mg de dicloruro de 1,1'-dibutircirconoceno ($[Zr(n-butylCp)_2Cl_2]$ (0.053 mmol)) en 2 mL de N,N-dimetilformamida (DMF) y 0.5 mL de agua. La mezcla se calentó durante 8 h a 70 °C con una rampa de calentamiento de 2 °C min⁻¹ y una rampa de enfriamiento de 0.1 °C min⁻¹. Se obtuvieron cristales cúbicos y prismáticos de dos fases diferentes, Zr-MOP-1 y Zr-MOP-1' respectivamente, que se recuperaron y analizaron por difracción de rayos X de monocristal.

3.1.2 Zr-MOP-1 $[(Zr_3(\mu_2-OH)_3(\mu_3-O)(n-butylCp)_3)_4(C_8H_4O_4)_6]Cl_6$ (granel).

En un vial de vidrio de 10 mL, se disolvieron 27 mg de ácido tereftálico (0.169 mmol) y 132 mg de dicloruro de 1,1'-dibutircirconoceno (0.326 mmol) en 2 mL de DMF y 1.5 mL de agua. La disolución se calentó durante 8 h a 65 °C. El sólido resultante se lavó con DMF (3 × 3.5 mL) y *n*-hexano (1 × 3.5 mL) y se recuperó por centrifugación (4000 rpm, 10 min). Finalmente, el sólido se sumergió en *n*-hexano durante 24 h y se activó a vacío (60 °C, 8 h) para eliminar los restos de disolvente en los poros del material. Rendimiento: 90.6 mg, 83.3 %. ¹H NMR (400.1 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 8.07 (s, 24 H, Ph), 8.00 (s, CHO, DMF), 6.56 (t, $J = 4$ Hz, 24 H, Cp), 6.40 (t, $J = 4$ Hz, 24 H, Cp), 3.01 (s, CH₃, DMF), 2.88 (s, CH₃, DMF), 2.84 (t, $J = 8$ Hz, 26 H, CH₂, *n*-butil), 1.71 (q, $J = 8$ Hz, 26 H, CH₂, *n*-butil), 1.46-1.37 (m, 25 H, CH₂, *n*-butil), 0.98 (t, $J = 8$ Hz, 39 H, CH₃, *n*-butil).

3.1.3 Zr-MOP-1' $[(Zr_3(\mu_2-OH)_3(\mu_3-O)(n-butylCp)_3)_x(C_8H_4O_4)_n]Cl_x$ (granel) $x = 6$, $n = 6$ para la fase cúbica y $x = 2$, $n = 3$ para la fase monoclinica.

En un vial de vidrio de 5 mL, se disolvieron 4.43 mg de ácido bifenil-4,4'-dicarboxílico (0.0267 mmol) y 21.4 mg de dicloruro de 1,1'-dibutylcirconoceno (0.053 mmol) en 2 mL de DMF y 0.25 mL de agua. La disolución se calentó durante 8 h a 80 °C. El sólido resultante se lavó con DMF (3 × 3.5 mL) y acetona (1 × 3.5 mL) y se recuperó por centrifugación (4000 rpm, 10 min) para posteriormente secarse al aire. Rendimiento: 9.1 mg, 33.3 % (fase monoclinica), 19.5 % (fase tetraédrica), determinado por NMR. ¹H NMR (400.1 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 8.07 (s, 9 H, Ph, fase cúbica), 8.00 (s, CHO, DMF), 7.74 (s, 15 H, Ph, fase monoclinica), 6.56 (t, J = 4 Hz, 24 H, Cp), 6.40 (t, J = 4 Hz, 24 H, Cp), 3.01 (s, CH₃, DMF), 2.88 (s, CH₃, DMF), 2.84 (t, J = 8 Hz, 26 H, CH₂, *n*-butil), 1.71 (q, J = 8 Hz, 26 H, CH₂, *n*-butil), 1.48-1.38 (m, 27 H, CH₂, *n*-butil), 0.98 (t, J = 8 Hz, 38 H, CH₃, *n*-butil).

3.1.4 Zr-MOP-1-NH₂

[(Zr₃(μ₃-OH)₃(μ₂-O)(*n*-butilCp)₃)₄(C₈H₅O₄N)₆]Cl₆ (monocristales).

En un reactor de teflón de 4 mL, se disolvieron 4.91 mg de ácido 2-aminotereftálico (0.027 mmol) y 21.4 mg de dicloruro de 1,1'-dibutylcirconoceno (0.053 mmol) en 2 mL de DMF y 0.25 mL de agua. La mezcla se calentó durante 8 h a 70 °C con una rampa de calentamiento de 2 °C min⁻¹ y una rampa de enfriamiento de 0.1 °C min⁻¹. Se obtuvieron cristales cúbicos correspondientes a la fase cristalina cúbica, que se recolectaron y analizaron por difracción de rayos X de monocristal. No se observó fase monoclinica.

3.1.5 Zr-MOP-1-NH₂

[(Zr₃(μ₃-OH)₃(μ₂-O)(*n*-butilCp)₃)₄(C₈H₅O₄N)₆]Cl₆ (granel).

En un vial de vidrio de 10 mL, se disolvieron 57.7 mg de ácido 2-aminotereftálico (0.318 mmol) y 250 mg de dicloruro de 1,1'-dibutylcirconoceno (0.618 mmol) en 5.7 mL de DMF y 2.85 mL de agua. La disolución se calentó durante 8 h a 70 °C. El sólido resultante se lavó con DMF (3 × 10 mL) y acetona (1 × 10 mL) y se recuperó por centrifugación (4000 rpm, 10 min). Finalmente, el sólido se sumergió en *n*-hexano durante 24 h y se activó a vacío (60 °C, 8 h) para eliminar el disolvente remanente en los poros del material. Rendimiento: 202.4 mg, 96.4 %. ¹H NMR (400.1 MHz, CD₃OD): δ (ppm): 8.00 (s, CHO, DMF), 7.84-7.82 (m, Ph), 7.35-7.32 (m, Ph), 7.16 (s ancha, Ph),

6.54-6.50 (m, Cp), 6.42 (s ancha, Cp), 3.01 (s, CH₃, DMF), 2.88 (s, CH₃, DMF), 2.75-2.65 (m, CH₂, *n*-butil), 1.63 (m, CH₂, *n*-butil), 1.35 (CH₂, *n*-butil), 0.93 (m, CH₃, *n*-butil).

3.1.6 Zr-MOP-10 $[(Zr_3(\mu_2-OH)_3(\mu_3-O)(n\text{-butilCp})_3)_x(C_{14}H_8O_4)_n]Cl_x$
(monocristales). $x = 6$, $n = 6$ para la fase cúbica y $x = 2$, $n = 3$ para la fase monoclinica.

En un reactor de teflón de 4 mL, se disolvieron 4.43 mg de ácido bifenil-4,4'-dicarboxílico (0.041 mmol) y 21.4 mg de dicloruro de 1,1'-dibutylcirconoceno (0.053 mmol) en 2 mL de DMF y 0.25 mL de agua. La mezcla se calentó durante 12 h a 70 °C con una rampa de calentamiento de 2 °C min⁻¹ y una rampa de enfriamiento de 0.1 °C min⁻¹. Se obtuvieron cristales cúbicos y prismáticos correspondientes dos fases diferentes, Zr-MOP-10 y Zr-MOP-10' respectivamente. Los cristales se recolectaron y analizaron por difracción de rayos X de monocristal.

3.1.7 Zr-MOP-10 $[(Zr_3(\mu_2-OH)_3(\mu_3-O)(n\text{-butilCp})_3)_4(C_{14}H_8O_4)_6]Cl_6$
(granel).

En un vial de vidrio de 5 mL, se disolvieron 20 mg de ácido bifenil-4,4'-dicarboxílico (0.185 mmol) y 55.5 mg de dicloruro de 1,1'-dibutylcirconoceno (0.137 mmol) en 0.45 mL de DMF, 0.22 mL de tetracloruro de carbono y 0.4 mL de agua. La mezcla se calentó durante 12 h a 60 °C. La suspensión resultante se lavó con DMF (3 × 3 mL) y *n*-hexano (1 × 3 mL) y se recuperó por centrifugación (4000 rpm, 10 min). Finalmente, el sólido se sumergió en *n*-hexano durante 24 h y se activó a vacío (60 °C, 8 h) para eliminar el disolvente remanente en los poros del material. Rendimiento: 45.7 mg, 92.3 %. ¹H NMR (400.1 MHz, CD₃OD): δ (ppm): 8.04 (d, $J = 8$ Hz, 24 H, Ph), 8.00 (s, CHO, DMF), 7.81 (d, $J = 8$ Hz, 24 H, Ph), 6.56 (t, $J = 4$ Hz 24 H, Cp), 6.40 (t, $J = 4$ Hz 24 H, Cp), 3.01 (s, CH₃, DMF), 2.87 (s, CH₃, DMF), 2.85 (t, $J = 8$ Hz, 27 H, CH₂, *n*-butil), 1.70 (q, $J = 8$ Hz, 30 H, CH₂, *n*-butil), 1.45-1.36 (m, 31 H, CH₂, *n*-butil), 0.96 (t, $J = 8$ Hz, 42 H, CH₃, *n*-butil).

3.1.8 Zr-MOP-10' $[(Zr_3(\mu_2-OH)_3(\mu_3-O)(n\text{-butilCp})_3)_2(C_{14}H_8O_4)_3]Cl_2$ (granel).

En un vial de vidrio de 5 mL, se disolvieron 20 mg de ácido bifenil-4,4'-dicarboxílico (0.185 mmol) y 55.5 mg de dicloruro de 1,1'-dibutylcirconoceno (0.137 mmol) en 0.45 mL de DMF, 2 mL de tetracloruro de carbono y 0.5 mL de agua. La disolución se calentó durante 12 h a 80 °C. Entonces, el polvo se obtuvo mediante difusión de vapor con éter dietílico. Se lavó con DMF (3 × 3 mL) y acetona (1 × 3 mL) y se dejó secar al aire. Rendimiento: 34.1 mg, 67.7 %. 1H NMR (400.1 MHz, CD_3OD): δ (ppm): 8.00 (s, CHO, DMF), 7.70 (d, $J = 8$ Hz, 24 H, Ph), 7.39 (d, $J = 8$ Hz, 24 H, Ph), 6.56 (t, $J = 4$ Hz 24 H, Cp), 6.40 (t, $J = 4$ Hz, 24 H, Cp), 3.01 (s, CH_3 , DMF), 2.88-2.86 (m, CH_3 , DMF and CH_2 , n -butil), 1.71 (q, $J = 8$ Hz, 26 H, CH_2 , n -butil), 1.48-1.39 (m, 27 H, CH_2 , n -butil), 0.98 (t, $J = 8$ Hz, 37 H, CH_3 , n -butil).

3.1.9 Encapsulación de 2-PAM en el Zr-MOP-1 (Zr-MOP-1@2-PAM)

Zr-MOP-1 fresco con 23.39 mg de pralidoxima (0.136 mmol) y 5.44 mg de hidróxido de sodio (0.136 mmol) en 2.5 mL de DMF. La mezcla se incubó durante una semana a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, el sólido se lavó con agua (2 × 3.5 mL) y acetona (1 × 3.5 mL) y se recuperó por centrifugación. El material resultante se secó a 60 °C durante 2 h. 1H NMR (400.1 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 8.86 (d, py, pralidoxima), 8.69 (s, $CH_2=NOH$, pralidoxima), 8.54-8.49 (m, py, pralidoxima), 8.07 (s, Ph, Zr-MOP-1), 8.00 (s, CHO, DMF), 6.57 (t, Cp), 6.40 (t, Cp), 4.44 (s, Me, pralidoxima), 3.01 (s, CH_3 , DMF) 2.84 (t, CH_2 , n -butil, Zr-MOP-1), 2.72 (s, CH_3 , DMF) 1.71 (q, CH_2 , n -butil, Zr-MOP-1), 1.46-1.37 (m, CH_2 , n -butil, Zr-MOP-1), 0.98 (t, CH_3 , n -butil, Zr-MOP-1).

3.1.10 Encapsulación de 2-PAM en el Zr-MOP-10 (Zr-MOP-10@2-PAM)

El procedimiento para la encapsulación de 2-PAM en el interior de las cavidades del Zr-MOP-10 es similar a aquel utilizado para el Zr-MOP-1, con la excepción de que únicamente se mezclaron 9.85 mg de pralidoxima (0.057 mmol) con Zr-MOP-10 fresco en 2.5 mL de DMF. 1H NMR (400.1 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 8.86 (d, py, pralidoxima), 8.69 (s, $CH_2=NOH$, pralidoxima), 8.54-8.49 (m, py, pralidoxima), 8.04 (d, Ph, Zr-MOP-10), 8.00 (s, CHO, DMF), 7.81 (d, Ph, Zr-MOP-10), 6.56 (t, Cp, Zr-MOP-10), 6.40 (t,

Cp, Zr-MOP-10), 4.43 (s, CH₃, pralidoxima), 3.01 (s, CH₃, DMF), 2.88 (s, CH₃, DMF), 2.84 (t, CH₂, *n*-butil, Zr-MOP-10), 1.70 (q, CH₂, *n*-butil, Zr-MOP-10), 1.43-1.36 (m, CH₂, *n*-butil, Zr-MOP-10), 0.96 (t, CH₃, *n*-butil, Zr-MOP-10).

3.1.11 Preparación de liposomas

Se prepararon vesículas unilamelares gigantes (GUV) de acuerdo con el protocolo publicado en bibliografía.[10] En concreto, se disolvieron 10 mg de fosfatidilcolina de yema de huevo y 1 mg de Zr-MOP-1@2-PAM en 10 mL de cloroformo o metanol. A continuación, el disolvente se eliminó bajo presión reducida durante 15 min y la película resultante se dejó secar durante la noche bajo vacío dinámico y a temperatura ambiente. Tras esto, la película se rehidrató a 37 °C durante 12 h con 5 mL una disolución acuosa de sacarosa (0.2 M).

3.2 Caracterización física y química

3.2.1 Difracción de rayos X en polvo (PXRD)

Los difractogramas de rayos-X en polvo para los distintos materiales, tanto recién preparados como después de diferentes tratamientos, en concreto tras su intercambio con n-hexano así como tras su activación térmica bajo vacío dinámico se muestran en las siguientes figuras (Figura AI.8 Figura AI.10). También se recogen los patrones de difracción de rayos-X en polvo simulados a partir de sus estructuras cristalinas resueltas mediante difracción de rayos-X de monocristal.

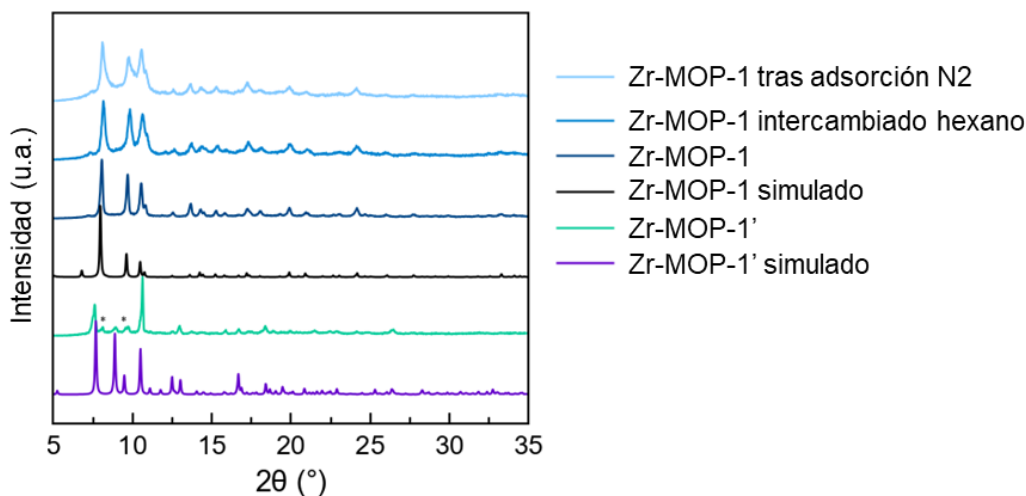


Figura AI.8. Comparación de los patrones experimentales de PXRD del Zr-MOP-1' y Zr-MOP-10 tal y como se sintetizaron, tras ser intercambiados con hexano y tras la adsorción de N₂ con los patrones simulados del Zr-MOP-1 y Zr-MOP-1'. Los asteriscos indican una impureza en el lote de la fase cúbica.

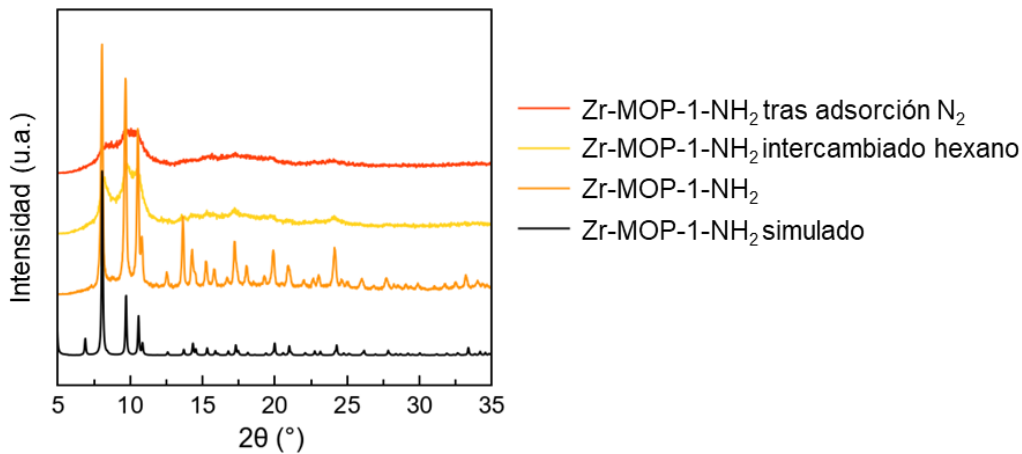


Figura AI.9. Comparación de los patrones experimentales de PXRD del Zr-MOP-1-NH₂ tal y como se sintetizó, intercambiado con hexano y tras la adsorción de N₂ con el patron simulado para el Zr-MOP-1-NH₂

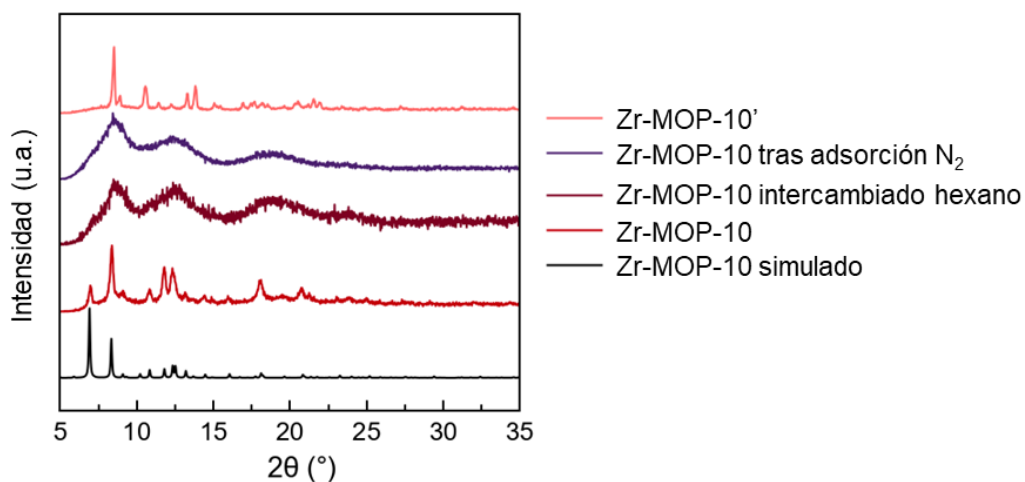


Figura AI.10. Comparación de los patrones experimentales de PXRD del Zr-MOP-10 tal y como se sintetizó, intercambiado con hexano y tras la adsorción de N_2 con el patron simulado para el Zr-MOP-10

3.2.2 Difracción de rayos X en polvo de temperatura variable (VT-PXRD)

A continuación, se muestran los resultados del análisis térmico por difracción de rayos-X a temperatura variable realizado sobre los compuestos Zr-MOP-1, Zr-MOP-1-NH₂ y Zr-MOP-10. Como se indicó anteriormente, los materiales se calentaron en una atmósfera de aire desde 25 °C hasta su descomposición, registrándose los difractogramas cada 10 °C (Figura AI.11a - Figura AI.13a). Asimismo, se determinaron los parámetros de celda y el volumen de celda a cada temperatura mediante un refinamiento Le Bail, y se determinó el porcentaje de variación de dichos parámetros con la temperatura para cada compuesto (Figura AI.11b - Figura AI.13b).

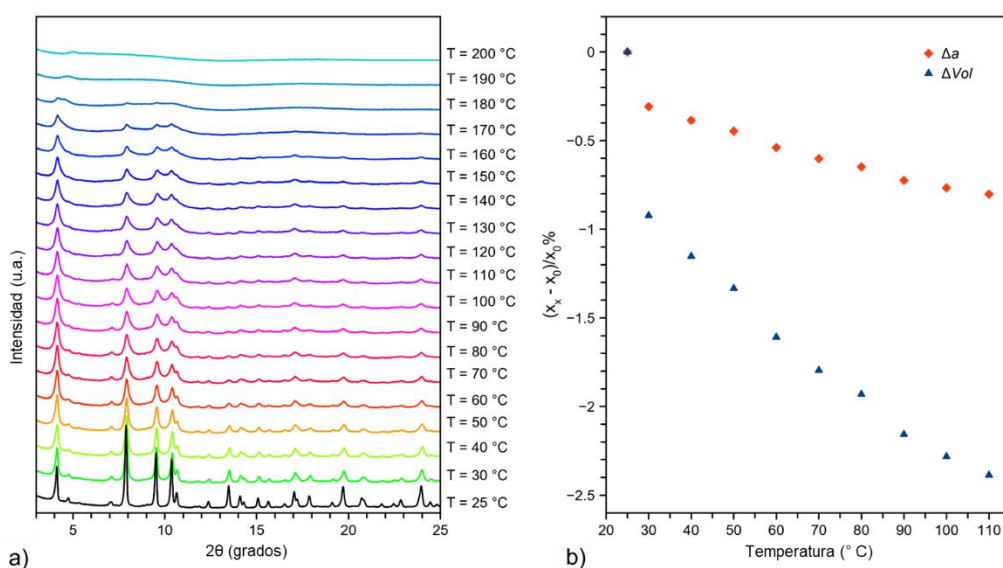


Figura AI.11. a) Patrones de difracción de rayos X en polvo (Cu K α , $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) obtenidos para el Zr-MOP-1 tal y como se sintetizó, como función de la temperatura de calentamiento en aire, con intervalos de 10 °C, en un intervalo de temperaturas de 25 a 200 °C. (b) Porcentaje de variación de los parámetros de la celdilla unidad del Zr-MOP-1 durante el experimento de VT-PXRD respecto a aquellos en los que $T = 25 \text{ °C}$, como resultado del refinamiento paramétrico de todo el patrón de difracción de acuerdo con el método Le Bail. [11]

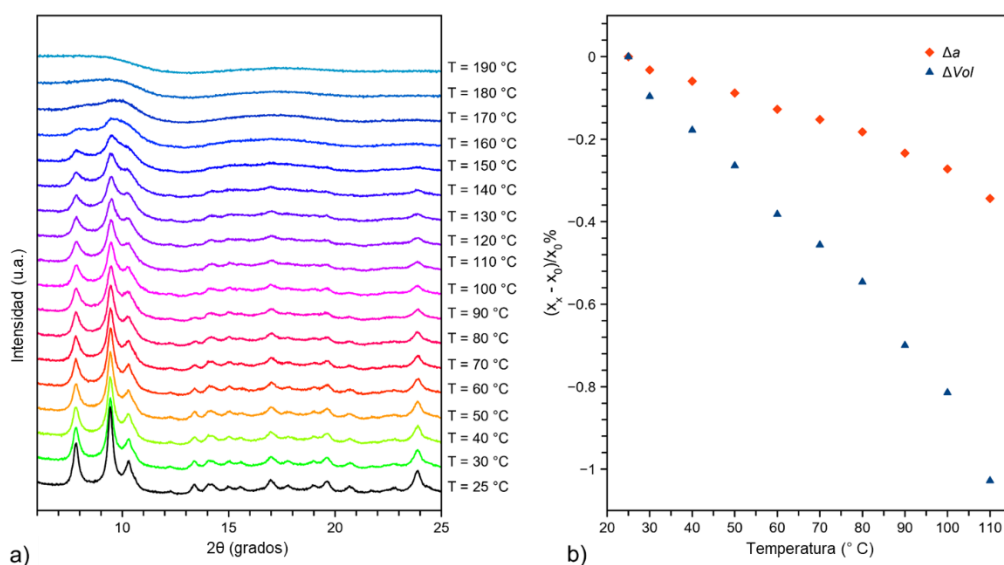


Figura AI.12. a) Patrones de difracción de rayos X en polvo (Cu K α , $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) obtenidos para el Zr-MOP-1-NH₂ tal y como se sintetizó, como función de la temperatura de calentamiento en aire, con intervalos de 10 °C, en un intervalo de temperaturas de 25 a 190 °C. (b) Porcentaje de variación de los parámetros de la celdilla unidad del Zr-MOP-1 durante el experimento de VT-PXRD respecto a aquellos en los que $T = 25 \text{ °C}$, como resultado del refinamiento paramétrico de todo el patrón de difracción de acuerdo con el método Le Bail. [11]

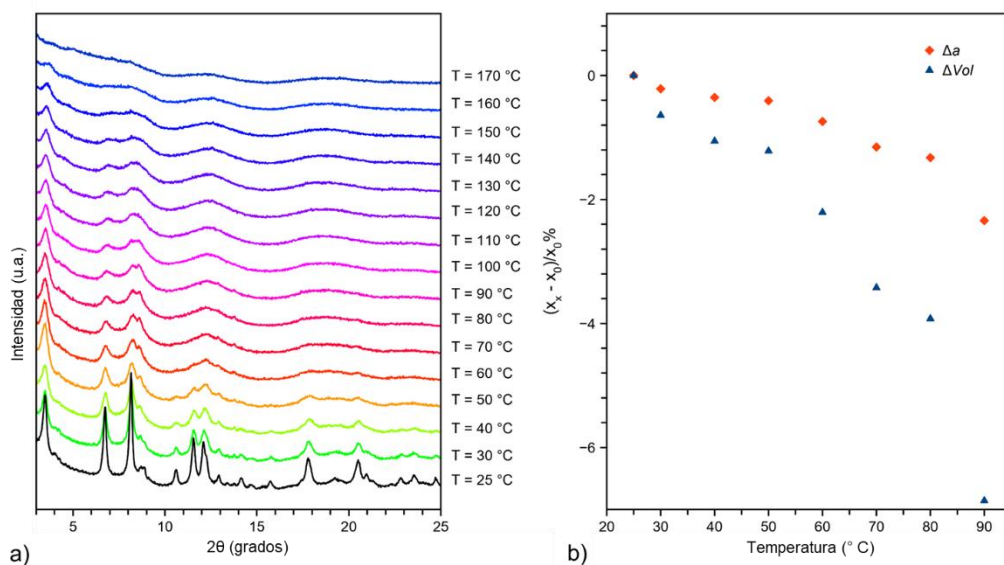


Figura AI.13. a) Patrones de difracción de rayos X en polvo (Cu K α , $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) obtenidos para el Zr-MOP-10 tal y como se sintetizó, como función de la temperatura de calentamiento en aire, con

intervalos de 10 °C, en un intervalo de temperaturas de 25 a 170 °C. (b) Porcentaje de variación de los parámetros de la celdilla unidad del Zr-MOP-10 durante el experimento de VT-PXRD respecto a aquellos en los que $T = 25\text{ °C}$, como resultado del refinamiento paramétrico de todo el patrón de difracción de acuerdo con el método Le Bail. [11]

3.2.3 Difracción de rayos X de monocristal (SCXRD)

Los datos cristallográficos y los resultados de la resolución estructural mediante SCXRD se muestran en la Tabla AI.2, mientras que las distancias y ángulos de enlace se encuentran recogidas en las Tabla AI.3, 4 y 5. Los archivos CIF han sido depositados en el *Cambridge Crystallographic Data Centre* (CDCC) bajo el número de deposición 2153759 (Zr-MOP-1'), 2153760 (Zr-MOP-1-NH₂) y 2153911 (Zr-MOP-10).

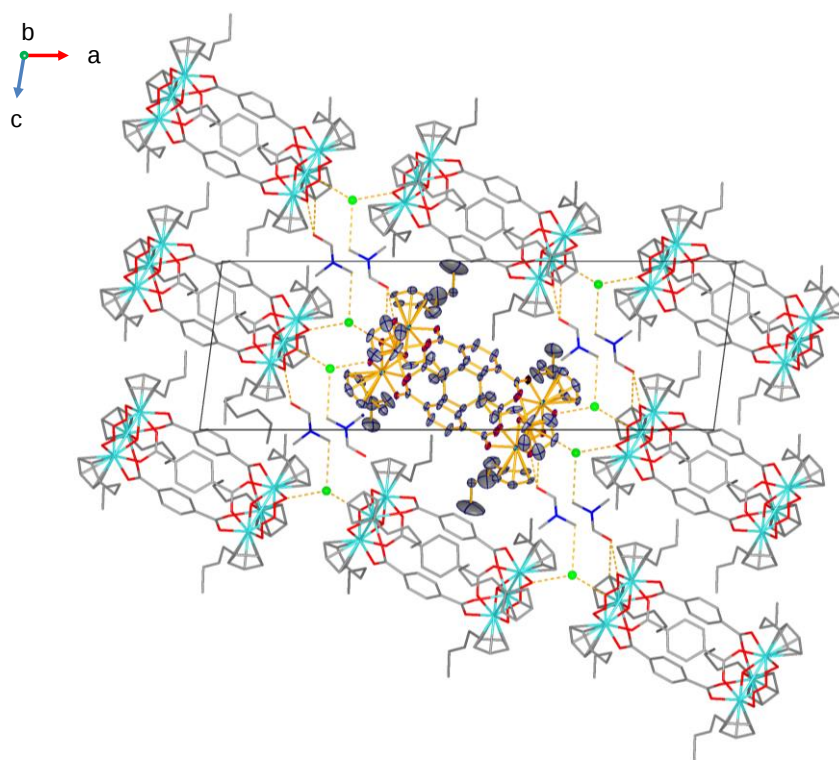


Figura AI.14. Porción del empaquetamiento cristalino del Zr-MOP-1' visto a través de la dirección cristalográfica [010]. Eje horizontal, a ; eje vertical, c . Elipsoides representadas con un 50 % de nivel de probabilidad. Los átomos de hidrógeno se han omitido para una mayor claridad. Las interacciones no enlazantes $O-H\cdots Cl\cdots H-O$, $C-H\cdots Cl$ y $O\cdots H-O$ que implican clústeres adyacentes y DMF se encuentran señalados con líneas naranjas intermitentes. Código de color de átomos: carbono, gris; cloro, verde; nitrógeno, azul; oxígeno, rojo; circonio, azul claro.

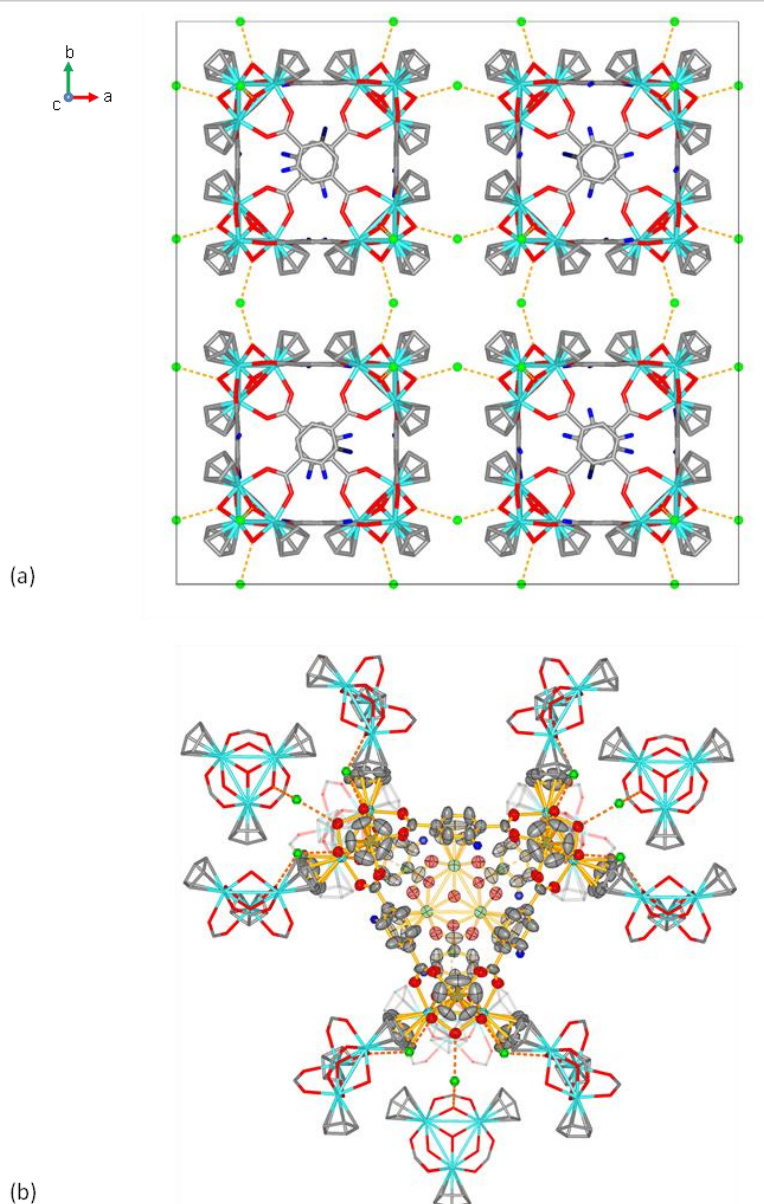


Figura AI.15. (a) Porción del empaquetamiento cristalino del Zr-MOP-1-NH₂ vista a través de la dirección cristalográfica [001]. Eje horizontal, *a*; eje vertical, *b*. Elipsoides representadas con un 50 % de nivel de probabilidad. Los átomos de hidrógeno y las cadenas *n*-butilo se han omitido, mientras que los grupos -NH₂ se han ordenado para mayor claridad. (b) Un tetraedro. Las interacciones no enlazantes O—H···Cl···H—O que implican clústeres adyacentes se encuentran señaladas con líneas naranjas intermitentes. Código de color de átomos: carbono, gris; cloro, verde; nitrógeno, azul; oxígeno, rojo; circonio, azul claro.

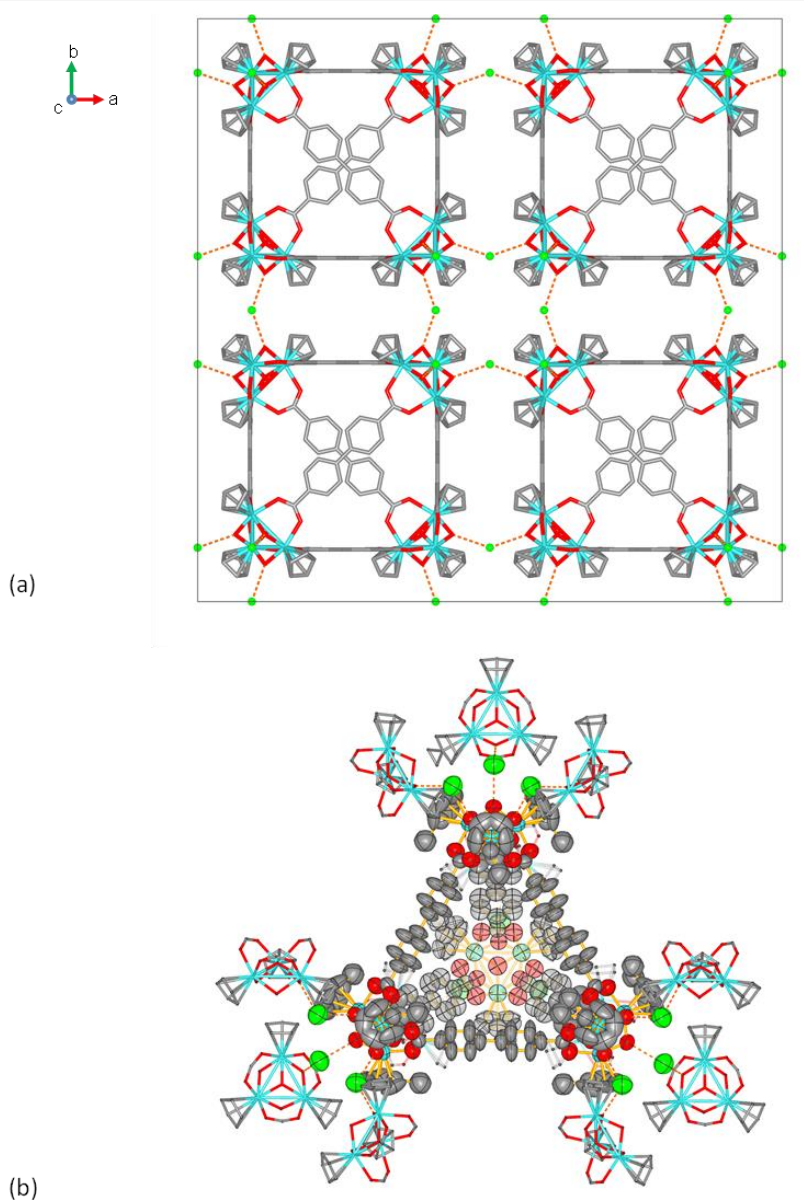


Figura AI.16. Porción del empaquetamiento cristalino del Zr-MOP-10 vista a través de la dirección cristalográfica [001]. Eje horizontal, *a*; eje vertical, *b*. Elipsoides representadas con un 50 % de nivel de probabilidad. Los átomos de hidrógeno y las cadenas *n*-butilo se han omitido, mientras que los anillos fenilo y los ligando carboxílicos se han ordenado para mayor claridad. (b) Un tetraedro. Las interacciones no enlazantes O–H···Cl···H–O que implican clústeres adyacentes se encuentran señaladas con líneas naranjas intermitentes. Código de color de átomos: carbono, gris; cloro, verde; nitrógeno, azul; oxígeno, rojo; circonio, azul claro.

Tabla AI.2. Datos cristalográficos y refinamiento estructural del Zr-MOP-1', Zr-MOP-1-NH₂ y Zr-MOP-10.

	Zr-MOP-1'	Zr-MOP-1-NH ₂	Zr-MOP-10
Fórmula empírica	C ₈₄ H ₇₀ Cl ₂ N ₂ O ₂₂ Zr ₆	C ₁₃₈ H ₄₈ Cl ₆ N ₆ O ₄₀ Zr ₁₂	C ₁₅₆ H ₉₆ Cl ₆ O ₄₀ Zr ₁₂
Fórmula mol./Da.	2077.64	3737.16	3917.66
T/K	130.0	130.0	100.0
Sistema cristalino	monoclínico	cúbico	cúbico
Grupo espacial	<i>C2/c</i>	<i>Fm-3m</i>	<i>Fm-3m</i>
<i>a</i> /Å	33.980(2)	36.777(3)	42.3762(5)
<i>b</i> /Å	23.009(2)	36.777(3)	42.3762(5)
<i>c</i> /Å	11.2581(8)	36.777(3)	42.3762(5)
α /°	90	90	90
β /°	97.560(3)	90	90
γ /°	90	90	90
<i>V</i> /Å ³	8725.6(12)	49743(12)	76097(2)
<i>Z</i>	4	8	8
ρ_{calc} g/cm ³	1.582	0.998	0.684
μ /mm ⁻¹	0.822	0.591	3.230
<i>F</i> (000)	4152.0	14560.0	15472.0
Radiación	MoK α (λ = 0.71073)	MoK α (λ = 0.71073)	CuK α (λ = 1.54178)
Intervalo 2 θ datos/°	4.288 a 57.58	4.828 a 41.688	3.612 a 72.638
Índices de Miller	-45 ≤ <i>h</i> ≤ 45 -31 ≤ <i>k</i> ≤ 31 -11 ≤ <i>l</i> ≤ 15	-20 ≤ <i>h</i> ≤ 36 -33 ≤ <i>k</i> ≤ 28 -36 ≤ <i>l</i> ≤ 16	-32 ≤ <i>h</i> ≤ 32 -32 ≤ <i>k</i> ≤ 32 -32 ≤ <i>l</i> ≤ 32
Reflexiones recogidas	101148	12096	55930
Reflexiones independientes	11316 <i>R</i> _{int} = 0.0425, <i>R</i> _{σ} = 0.0287	1351 <i>R</i> _{int} = 0.0542 <i>R</i> _{σ} = 0.0301	966 <i>R</i> _{int} = 0.2512 <i>R</i> _{σ} = 0.0251
Datos/impedimentos /parámetros	11316/13/543	1351/6/77	966/39/91
Bondad de ajuste <i>F</i> ²	1.177	1.075	1.147
Reflexiones <i>R</i> finales [<i>I</i> ≥ 2 σ (<i>I</i>)]	<i>R</i> ₁ = 0.1077, <i>wR</i> ₂ = 0.2217	<i>R</i> ₁ = 0.0741 <i>wR</i> ₂ = 0.2058	<i>R</i> ₁ = 0.0965 <i>wR</i> ₂ = 0.2814
Reflexiones <i>R</i> finales [todos los datos]	<i>R</i> ₁ = 0.1292, <i>wR</i> ₂ = 0.2343	<i>R</i> ₁ = 0.0913 <i>wR</i> ₂ = 0.2222	<i>R</i> ₁ = 0.1344 <i>wR</i> ₂ = 0.3484
CCDC	2153759	2153760	2153911

Tabla AI.3. Distancias y ángulos seleccionados para el Zr-MOP-1'.

DETALLES EXPERIMENTALES

Átomos	Longitud (Å) /Ángulo (°)	Átomos	Longitud (Å) /Ángulo (°)
Zr ⁽¹⁾ - O ⁽²⁾	2.132(5)	O ⁽²⁾ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽³²⁾	121.0(4)
Zr ⁽¹⁾ - O ⁽³⁾¹	2.103(6)	O ⁽²⁾ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽³³⁾	87.7(3)
Zr ⁽¹⁾ - O ⁽⁴⁾	2.083(5)	O ⁽²⁾ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽³⁴⁾	78.7(3)
Zr ⁽¹⁾ - O ⁽⁵⁾	2.220(6)	O ⁽²⁾ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽³⁵⁾	101.9(3)
Zr ⁽¹⁾ - C ⁽³¹⁾	2.574(9)	O ⁽⁴⁾ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽³¹⁾	153.9(3)
Zr ⁽¹⁾ - C ⁽³²⁾	2.519(10)	O ⁽⁴⁾ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽³²⁾	153.3(3)
Zr ⁽¹⁾ - C ⁽³³⁾	2.500(8)	O ⁽⁴⁾ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽³³⁾	151.2(3)
Zr ⁽¹⁾ - C ⁽³⁴⁾	2.532(11)	O ⁽⁴⁾ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽³⁴⁾	150.7(3)
Zr ⁽¹⁾ - C ⁽³⁵⁾	2.573(11)	O ⁽⁴⁾ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽³⁵⁾	152.2(3)
Zr ⁽²⁾ - Zr ⁽³⁾¹	3.3450(14)	O ⁽⁵⁾ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽³¹⁾	76.8(3)
O ⁽¹⁾¹ - Zr ⁽³⁾ - O ⁽⁸⁾	152.1(2)	O ⁽⁵⁾ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽³²⁾	88.1(4)
O ⁽¹⁾¹ - Zr ⁽³⁾ - O ⁽⁹⁾¹	86.4(2)	O ⁽⁵⁾ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽³³⁾	121.5(3)
O ⁽²⁾ - Zr ⁽³⁾ - O ⁽⁸⁾	85.6(2)	O ⁽⁵⁾ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽³⁴⁾	127.8(3)
O ⁽⁴⁾ - Zr ⁽³⁾ - O ⁽²⁾	73.8(2)	O ⁽⁵⁾ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽³⁵⁾	100.0(3)
O ⁽⁴⁾ - Zr ⁽³⁾ - O ⁽⁸⁾	79.2(2)	C ⁽²⁴⁾ - Zr ⁽²⁾ - C ⁽²²⁾	53.5(4)
O ⁽²⁾ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽³¹⁾	130.1(3)	C ⁽²⁴⁾ - Zr ⁽²⁾ - C ⁽²³⁾	32.1(5)
Transformaciones simétricas para generar átomos equivalentes: ¹ -x, +y, 1/2-z			

Tabla AI. 4. Distancias y ángulos seleccionados para el Zr-MOP-NH₂.

Átomos	Longitud (Å) /Ángulo (°)	Átomos	Longitud (Å) /Ángulo (°)
Zr ⁽¹⁾ - O ⁽¹⁾¹	2.131(5)	O ⁽¹⁾ - Zr ⁽¹⁾ - O ⁽³⁾	152.9(2)
Zr ⁽¹⁾ - O ⁽²⁾	2.059(4)	O ⁽¹⁾ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽⁴⁾	79.4(3)
Zr ⁽¹⁾ - O ⁽³⁾²	2.169(6)	O ⁽¹⁾¹ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽⁴⁾	102.5(3)
Zr ⁽¹⁾ - Zr ⁽¹⁾¹	3.335(2)	O ⁽¹⁾¹ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽⁵⁾	121.6(3)
Zr ⁽¹⁾ - C ⁽⁴⁾³	2.520(11)	O ⁽¹⁾ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽⁶⁾²	130.5(3)
Zr ⁽¹⁾ - C ⁽⁵⁾	2.577(17)	O ⁽¹⁾¹ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽⁶⁾²	92.0(3)
Zr ⁽¹⁾ - C ⁽⁶⁾²	2.558(13)	C ⁽⁴⁾ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽⁴⁾²	32.1(4)
O ⁽³⁾ - C ⁽¹⁾	1.256(8)	C ⁽⁴⁾ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽⁵⁾	50.0(4)
O ⁽¹⁾ - Zr ⁽¹⁾ - O ⁽¹⁾¹	92.6(4)	C ⁽⁴⁾² - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽⁶⁾²	31.0(3)
O ⁽¹⁾ - Zr ⁽¹⁾ - O ⁽³⁾²	85.3(3)	C ⁽⁴⁾ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽⁶⁾²	51.5(3)
Transformaciones simétricas para generar átomos equivalentes: ¹ -x, +y, 1/2-z, ² +x, +z, +y			

Tabla AI. 5. Distancias y ángulos seleccionados para el Zr-MOP-10.

Átomos	Longitud (Å) /Ángulo (°)	Átomos	Longitud (Å) /Ángulo (°)
Zr ⁽¹⁾ - O ⁽¹⁾²	2.125(11)	O ⁽¹⁾ - Zr ⁽¹⁾ - O ⁽³⁾	85.7(7)
Zr ⁽¹⁾ - O ⁽²⁾	2.048(12)	O ⁽¹⁾ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽⁶⁾	79.1(8)
Zr ⁽¹⁾ - O ⁽³⁾³	2.205(19)	O ⁽¹⁾ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽⁶⁾³	102.0(9)
Zr ⁽¹⁾ - Zr ⁽¹⁾¹	3.344(6)	O ⁽¹⁾ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽⁸⁾	121.3(7)
Zr ⁽¹⁾ - C ⁽⁶⁾³	2.45(3)	O ⁽¹⁾ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽⁷⁾³	129.9(9)
Zr ⁽¹⁾ - C ⁽⁷⁾³	2.58(3)	O ⁽¹⁾ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽⁷⁾	90.5(9)
Zr ⁽¹⁾ - C ⁽⁸⁾	2.50(4)	C ⁽⁶⁾³ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽⁶⁾	31.8(16)
O ⁽³⁾ - C ⁽¹⁾	1.24(2)	C ⁽⁶⁾³ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽⁷⁾	51.5(9)
O ⁽¹⁾ - Zr ⁽¹⁾ - O ⁽¹⁾²	92.3(10)	C ⁽⁶⁾³ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽⁷⁾³	30.3(9)
O ⁽¹⁾ - Zr ⁽¹⁾ - O ⁽³⁾³	153.9(6)	C ⁽⁶⁾ - Zr ⁽¹⁾ - C ⁽⁸⁾	49.7(13)
Transformaciones simétricas para generar átomos equivalentes: ¹ 1/2 -z, +x, 1/2-y; ² +y, 1/2-z, 1/2-x; ³ 1/2-z, +y, 1/2-x; ⁴ +x, 1/2-z, 1/2-y; ⁵ +x, 1/2-y, 1/2-z			

3.2.4 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^1H (^1H NMR)

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H de los compuestos Zr-MOP-1, Zr-MOP-1', Zr-MOP-1-NH₂, Zr-MOP-10 y Zr-MOP-10' se muestran en las figuras Figura AI.17 - Figura AI.19. Cabe resaltar que no fue posible obtener el compuesto Zr-MOP-1' como fase pura, ya que contenía una fracción de Zr-MOP-1, como se puede observar en la Figura AI.20.

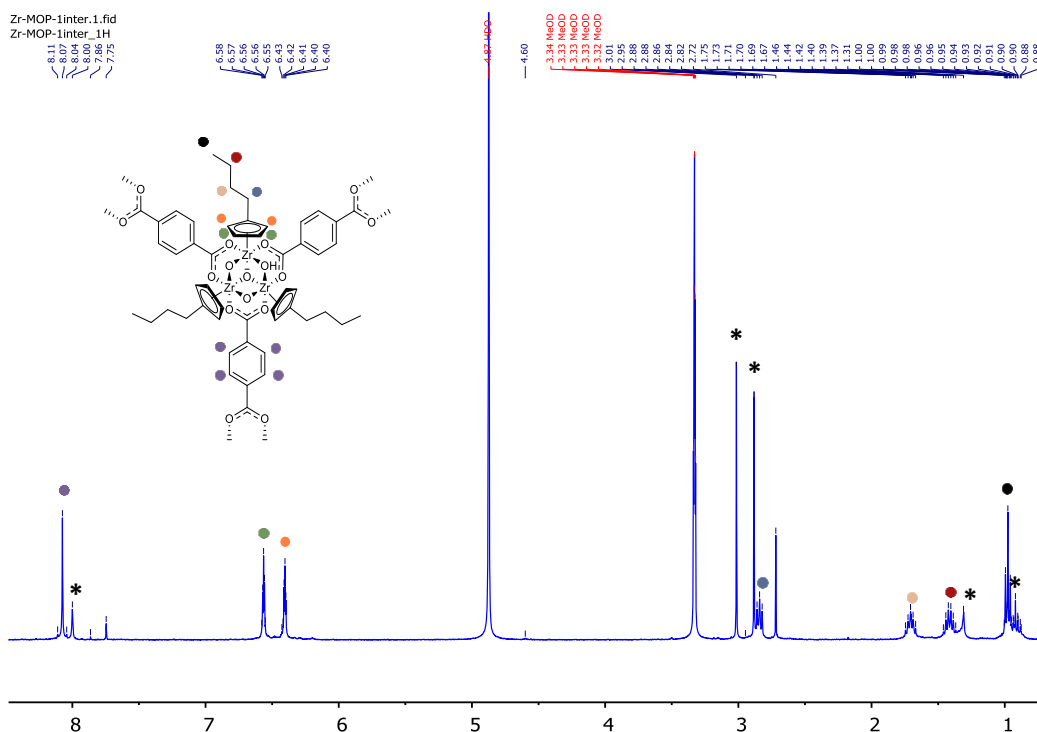


Figura AI.17. Espectro de NMR ^1H de una disolución de Zr-MOP-1 en CD_3OD . Las señales marcadas con un asterisco se corresponden con los disolventes N,N -dimetilformamida y n -hexano adsorbidos en la estructura porosa del material.

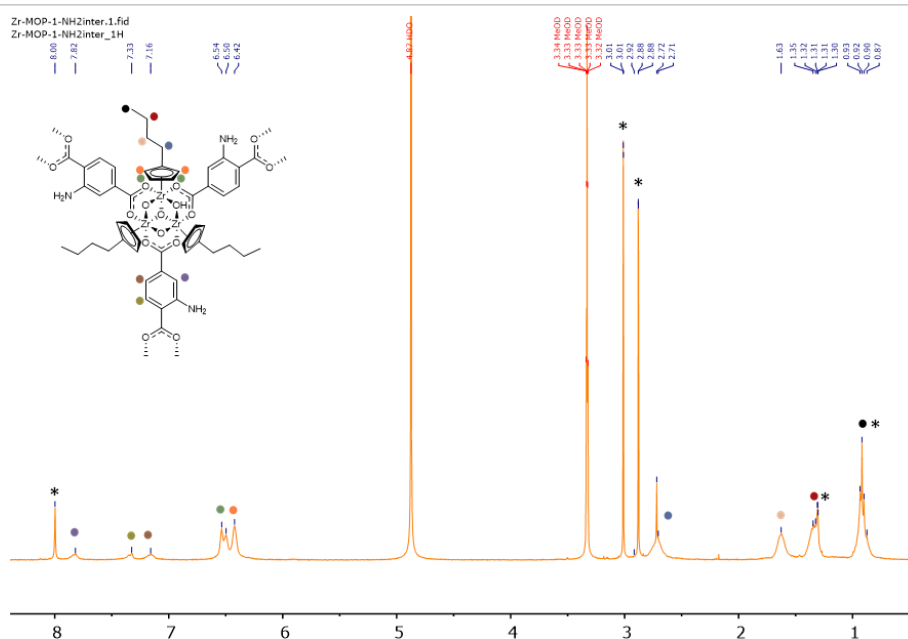


Figura AI.18. Espectro de NMR ^1H de una disolución de Zr-MOP-1-NH $_2$ en CD_3OD . Las señales marcadas con un asterisco se corresponden con los disolventes N,N -dimetilformamida y n -hexano adsorbidos en la estructura porosa del material.

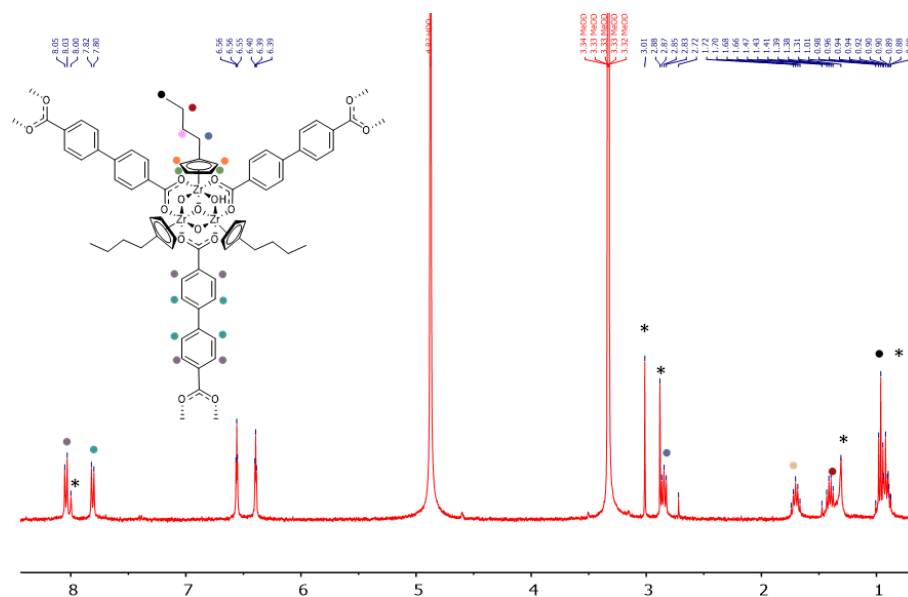


Figura AI.19. Espectro de NMR ^1H de una disolución de Zr-MOP-10 en CD_3OD . Las señales marcadas con un asterisco se corresponden con los disolventes N,N -dimetilformamida y n -hexano adsorbidos en la estructura porosa del material.

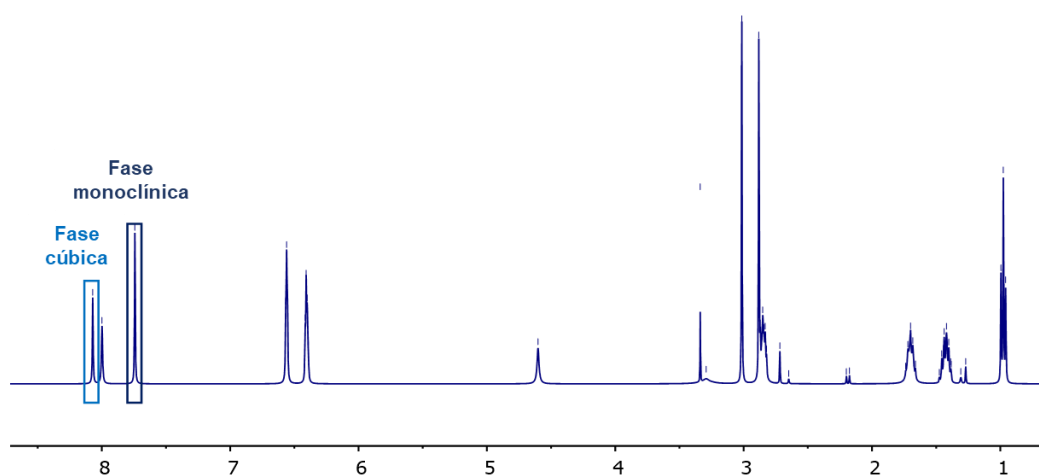


Figura A1.20. Espectro de NMR ^1H de una disolución de Zr-MOP-1' en CD_3OD .

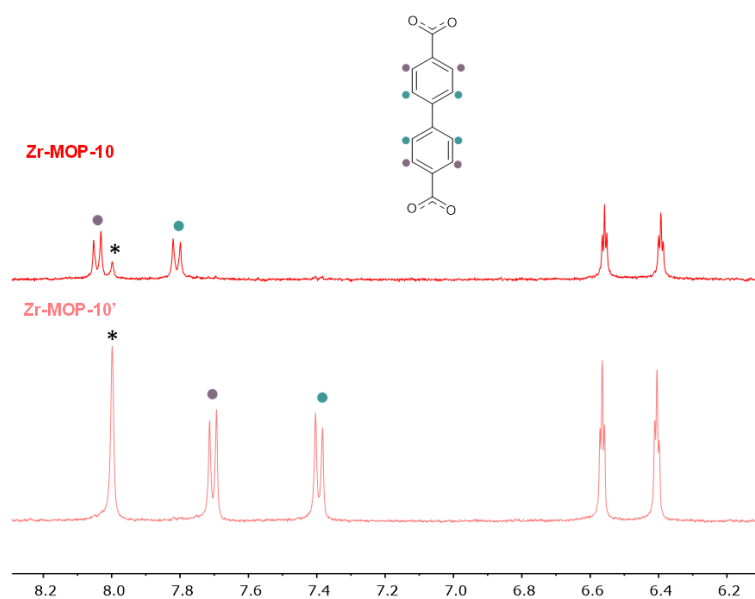


Figura A1.21. Comparación de la zona aromática del espectro de NMR ^1H de una disolución de Zr-MOP-10 y Zr-MOP-10' en CD_3OD . Las señales marcadas con un asterisco se corresponden con los disolventes *N,N*-dimetilformamida y *n*-hexano adsorbidos en la estructura porosa del material.

A continuación, se muestran los espectros de ^1H NMR de los compuestos Zr-MOP-1@2-PAM y Zr-MOP-10@2-PAM (Figura AI.22 y Figura AI.23) y su comparación con el espectro ^1H NMR de la 2-pralidoxima libre (Figura AI.24 y Figura AI.25)

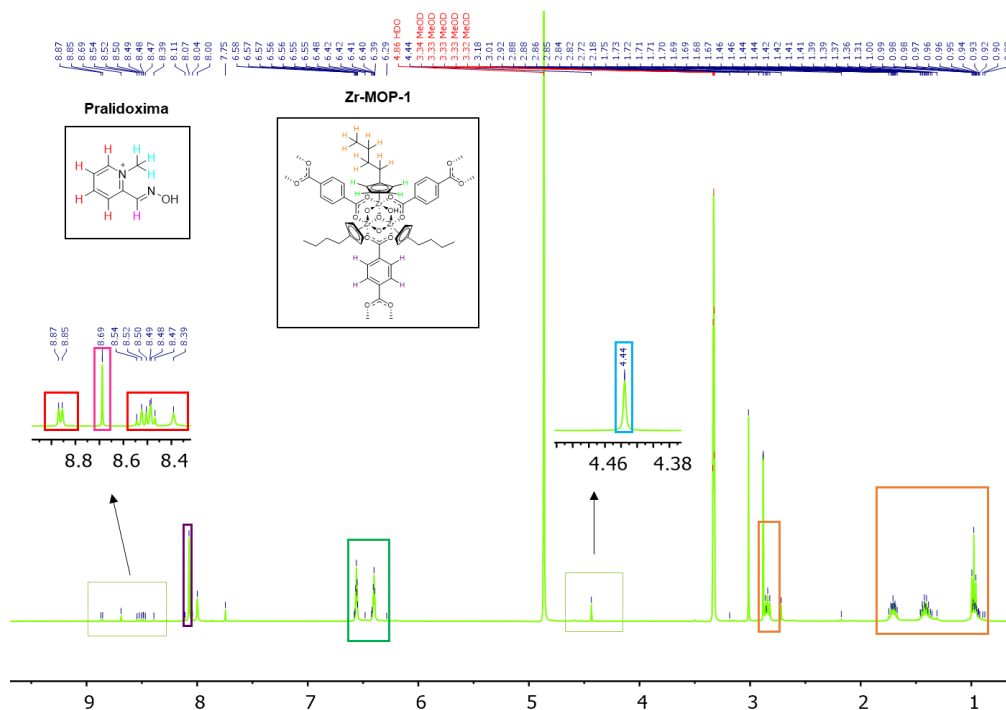


Figura AI.22. Espectro de NMR ^1H de una disolución de Zr-MOP-1@2-PAM en CD_3OD .

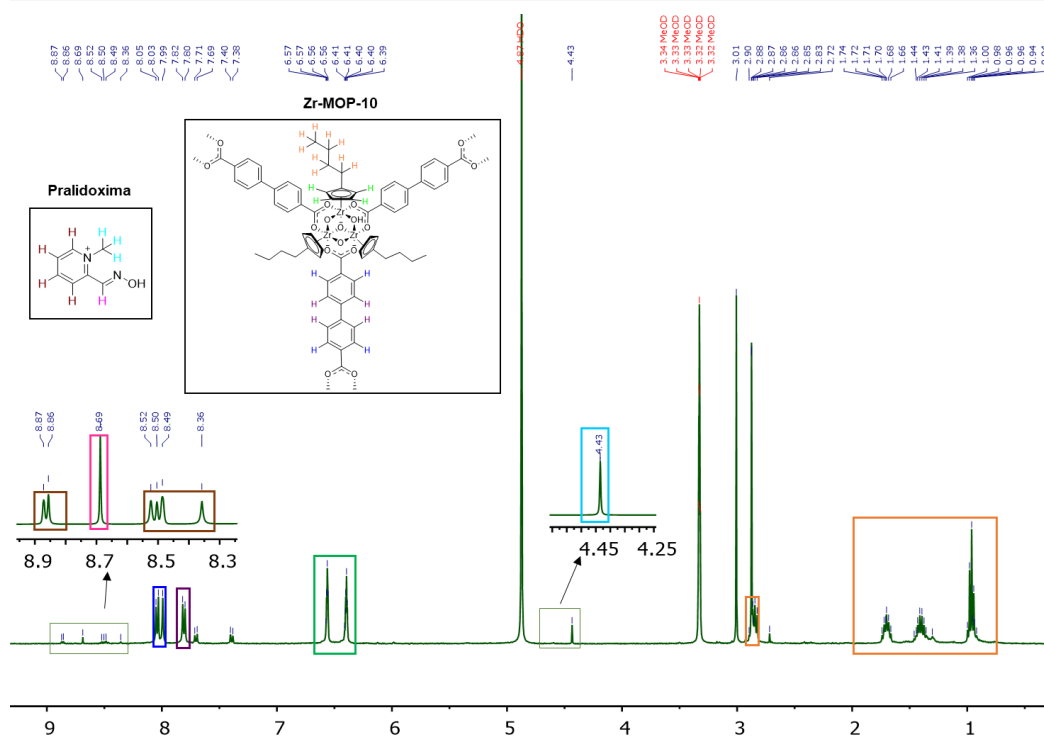


Figura AI.23. Espectro de NMR ^1H de una disolución de Zr-MOP-10@2-PAM en CD_3OD .

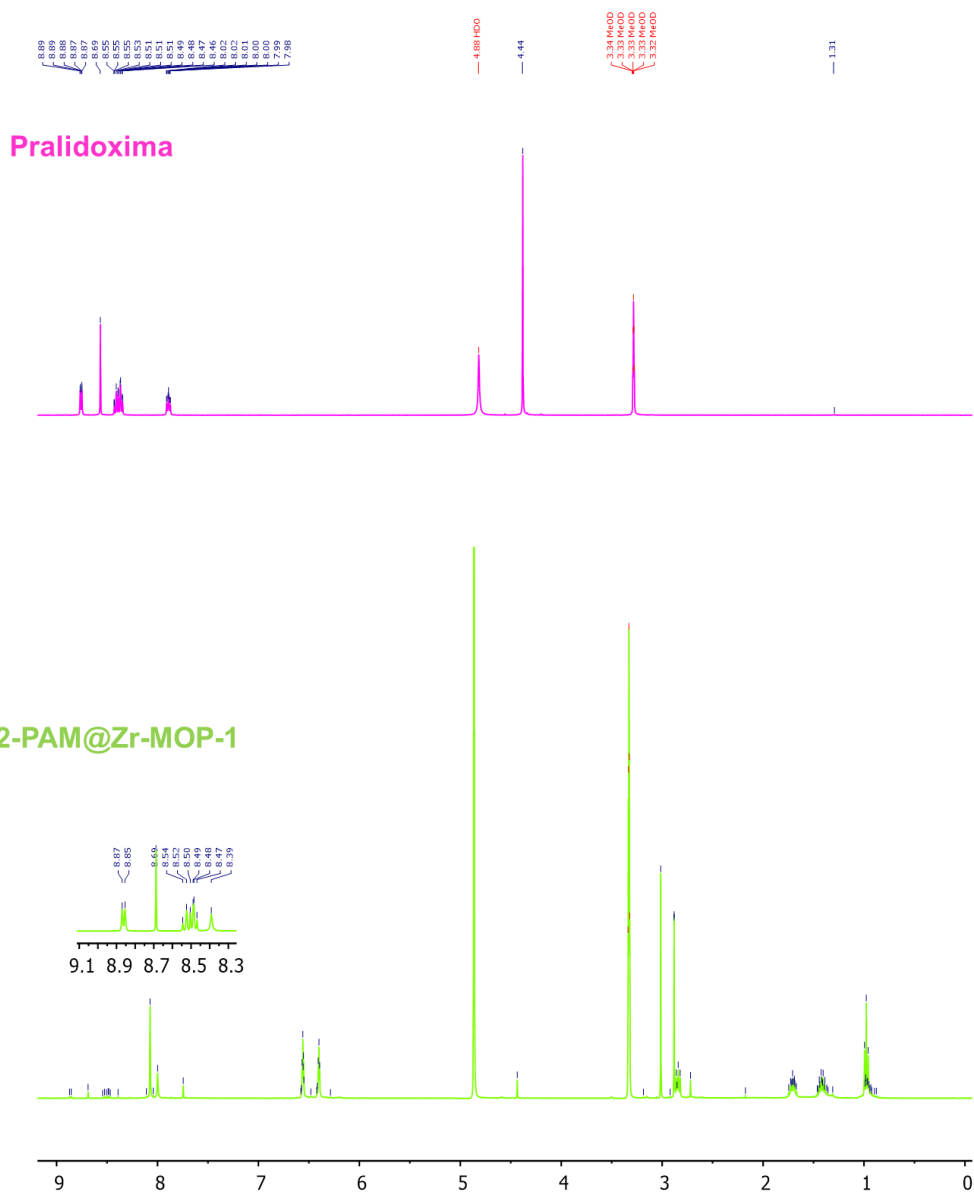


Figura AI.24. Comparación del espectro de NMR ^1H de la pralidoxima (arriba) y del Zr-MOP-1@2-PAM (abajo) en CD_3OD .

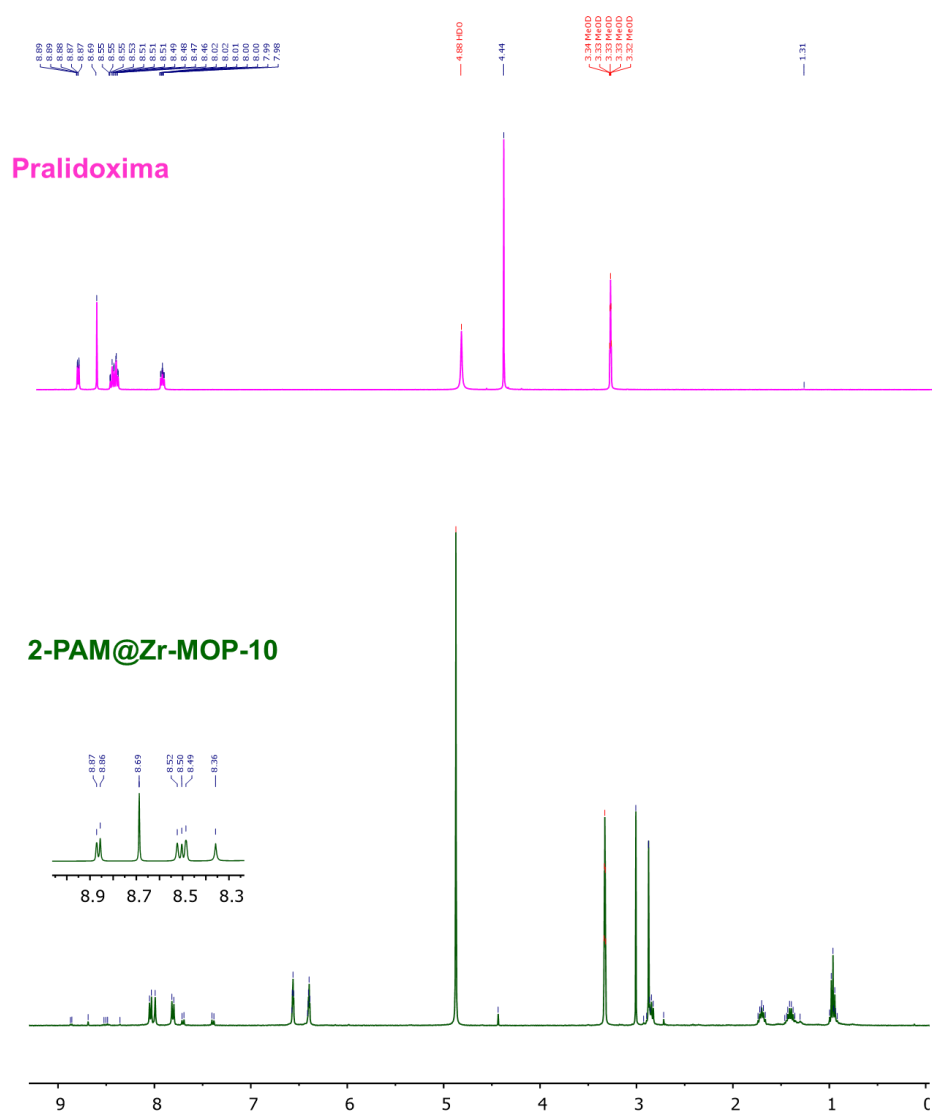


Figura AI.25. Comparación del espectro de NMR ^1H de la pralidoxima (arriba) y del Zr-MOP-10@2-PAM (abajo) en CD_3OD .

3.2.5 Espectrometría de masas de alta resolución (ESI-MS)

La comparación de los espectros de masas de alta resolución experimentales y calculados para los compuestos Zr-MOP-1, Zr-MOP-1-NH₂ y Zr-MOP-10 confirmando la identidad de los compuestos en disolución se muestran en las Figura AI.26 - Figura AI.29.

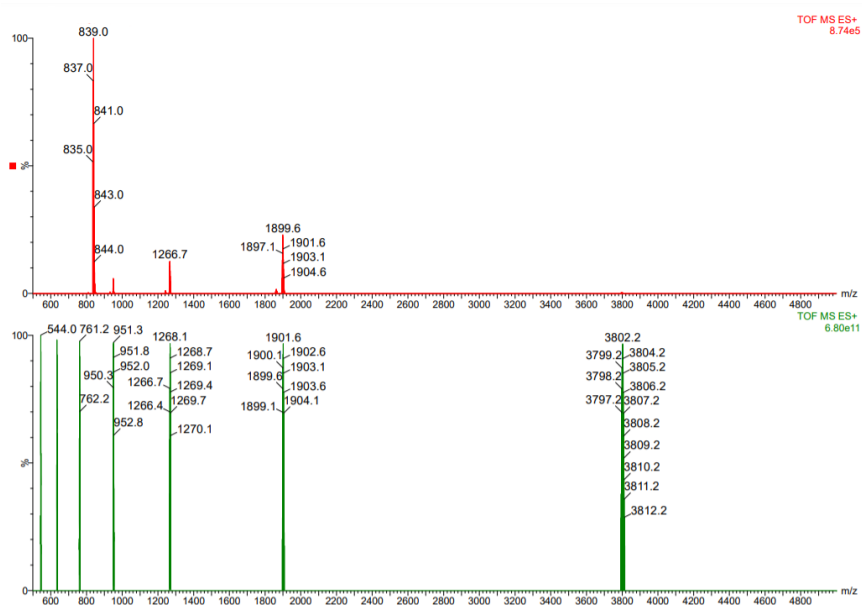


Figura AI.26. Espectro de alta resolución ESI-MS del Zr-MOP-1. Espectro ESI-MS experimental (arriba) y calculado (abajo).

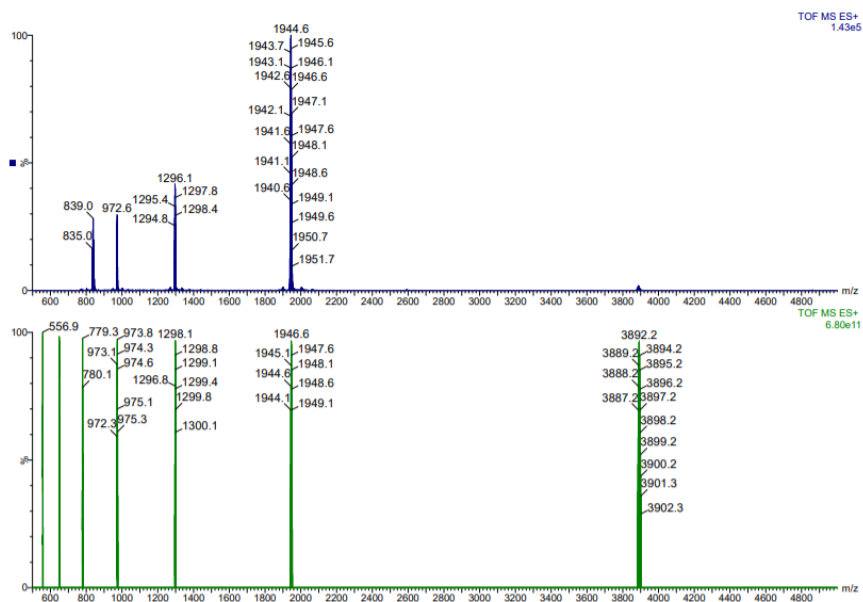


Figura A1.27. Espectro de alta resolución ESI-MS del Zr-MOP-1-NH₂. Espectro ESI-MS experimental (arriba) y calculado (abajo).

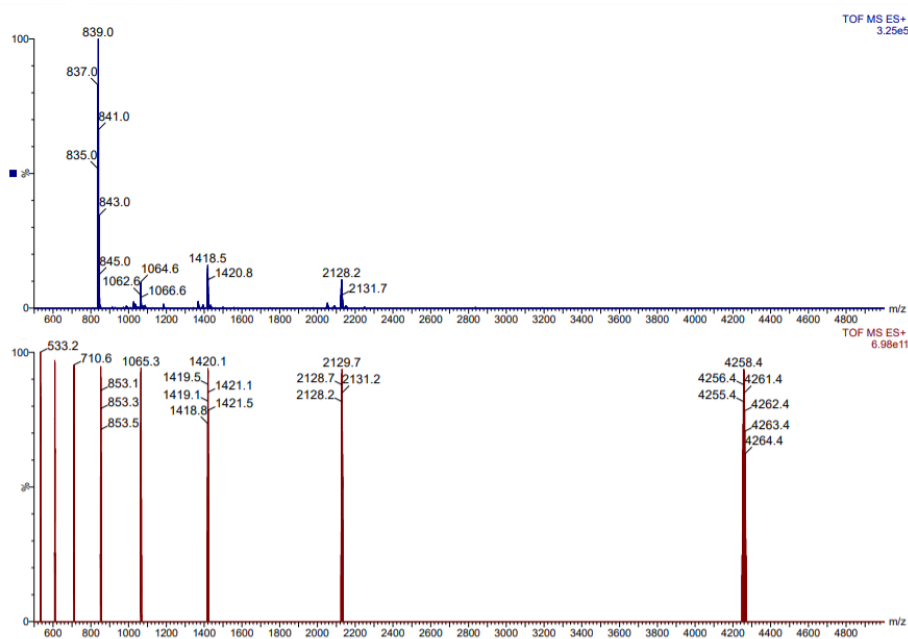


Figura A1.28. Espectro de alta resolución ESI-MS del Zr-MOP-10. Espectro ESI-MS experimental (arriba) y calculado (abajo).

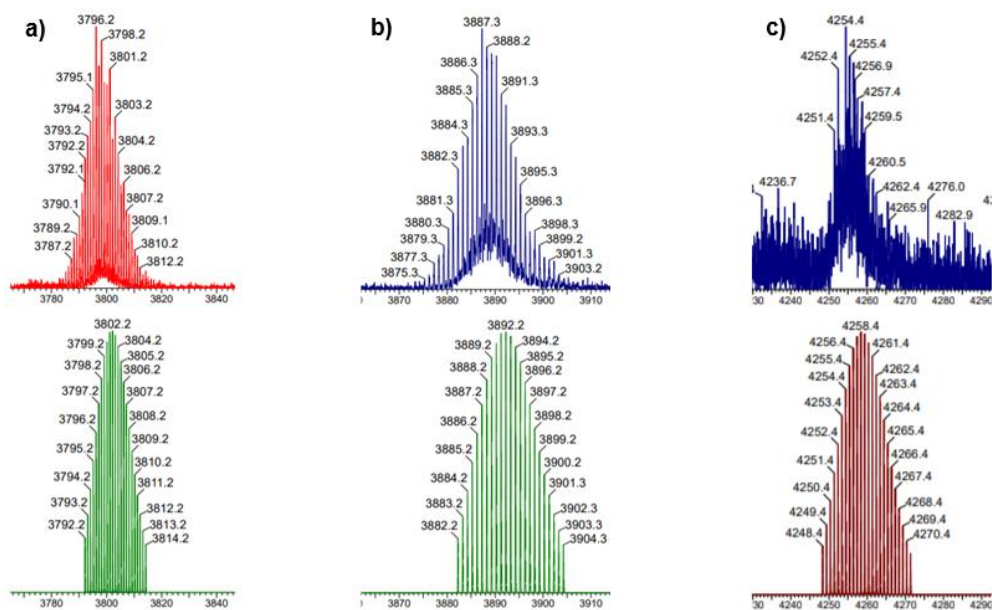


Figura A1.29. Magnificación del espectro ESI-MS de alta resolución: picos del $[\text{Zr-MOP-1-2Cl-6H}]^+$ (a), $[\text{Zr-MOP-1-NH}_2\text{-2Cl-6H}]^+$ (b), $[\text{Zr-MOP-10-2Cl-6H}]^+$ (c). Espectro ESI-MS experimental (arriba) y calculado (abajo).

Como se observa en la Figura AI.30, la formación del compuesto 2-PAM@Zr-MOP-1 se confirmó mediante espectroscopía de masas de alta resolución.

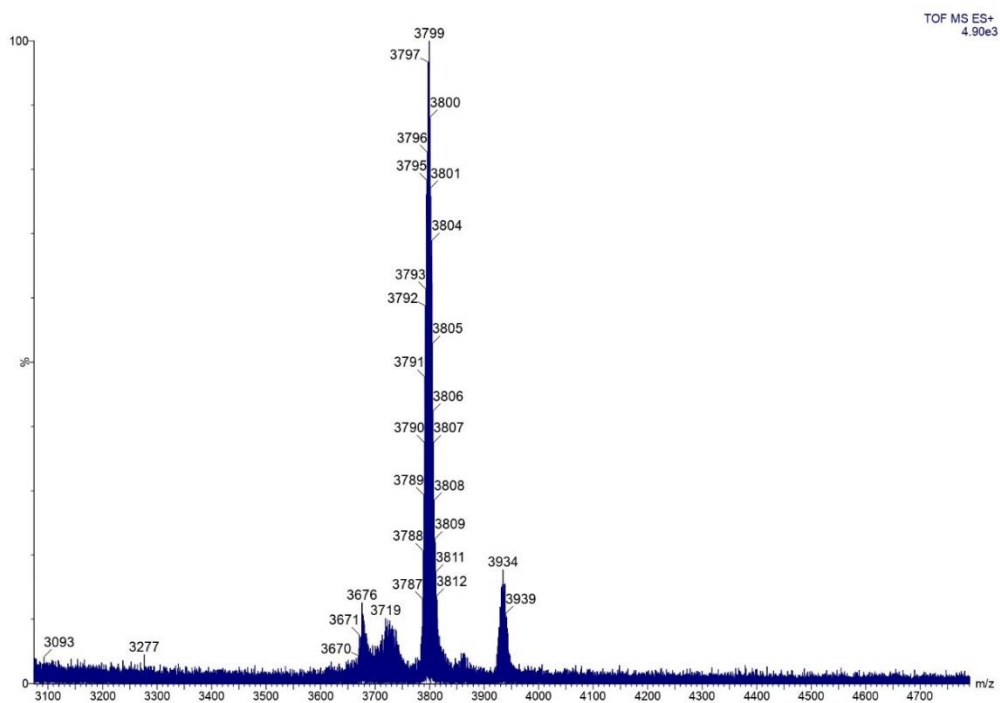


Figura AI.30. Espectro de alta resolución ESI-MS del 2-PAM@Zr-MOP-1. El pico de más intensidad se corresponde con $[\text{Zr-MOP-1-2Cl-6H}]^+$ (3799 m/z) y el siguiente pico de más intensidad con el $[\text{Zr-MOP-1-2Cl-6H+2-PAM}]^+$ (3934 m/z).

3.2.6 Análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los análisis termogravimétricos junto con las curvas de calorimetría diferencial de barrido para los compuestos Zr-MOP-1, Zr-MOP-1-NH₂ y Zr-MOP-10 se muestran en las Figura AI.31 - Figura AI.36.

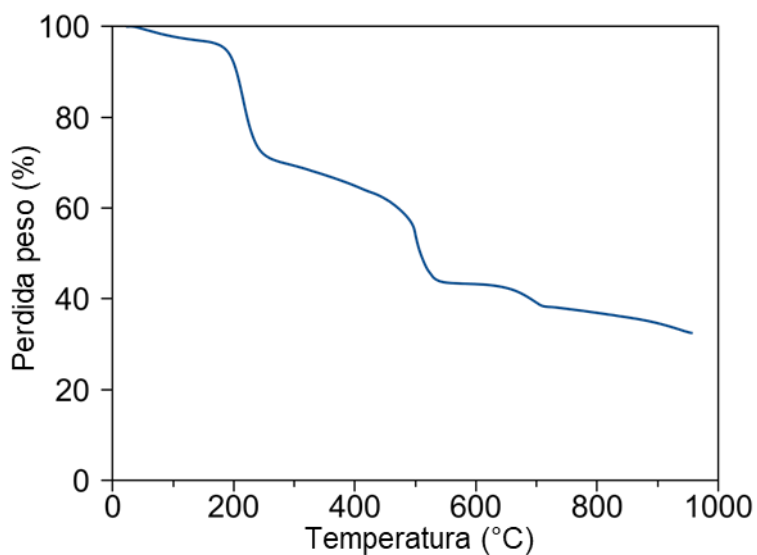


Figura AI.31. Análisis termogravimétrico del Zr-MOP-1.

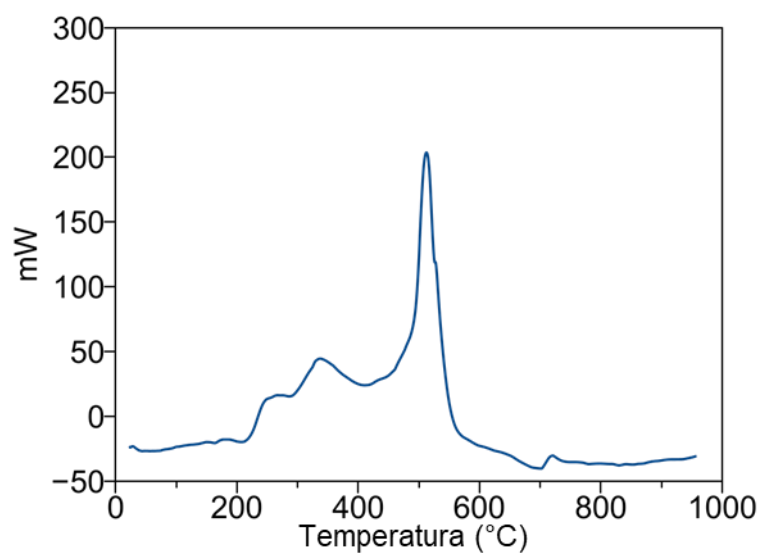


Figura AI.32. Calorimetría diferencial de barrido del Zr-MOP-1.

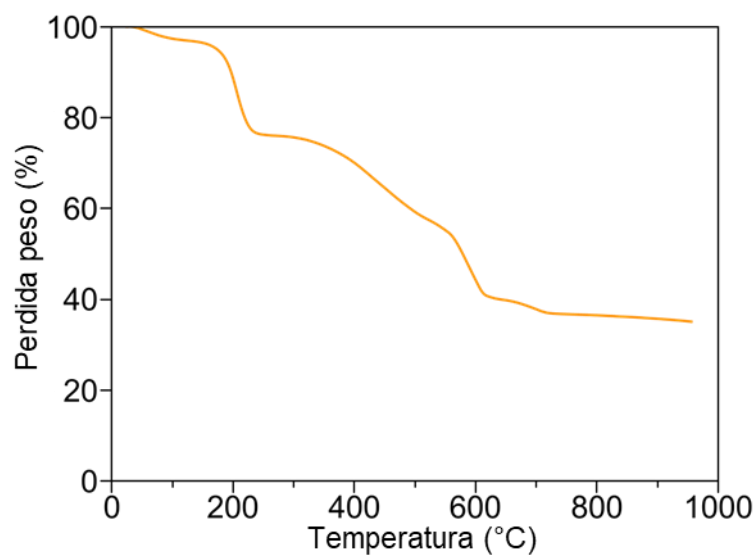


Figura AI.33. Análisis termogravimétrico del Zr-MOP-1-NH₂.

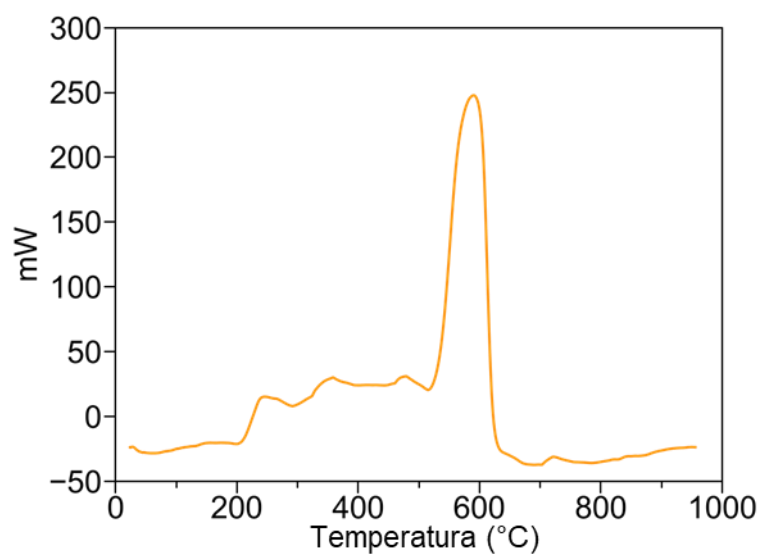


Figura AI.34. Calorimetría diferencial de barrido del Zr-MOP-1-NH₂.

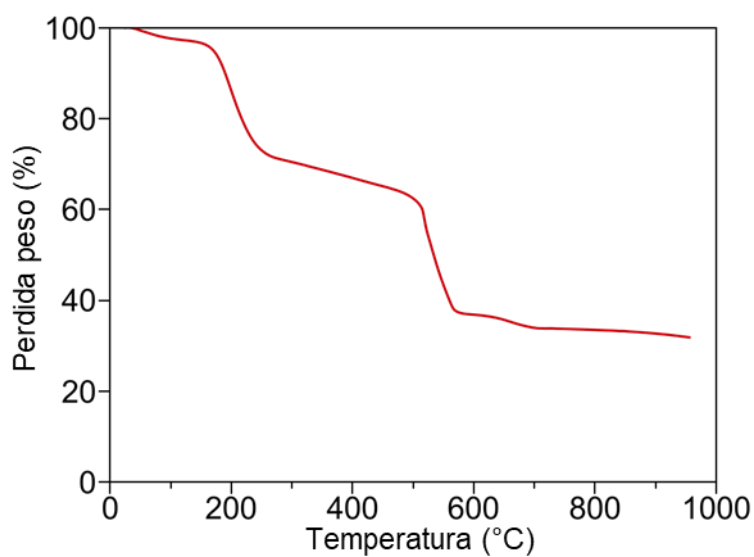


Figura AI.35. Análisis termogravimétrico del Zr-MOP-10.

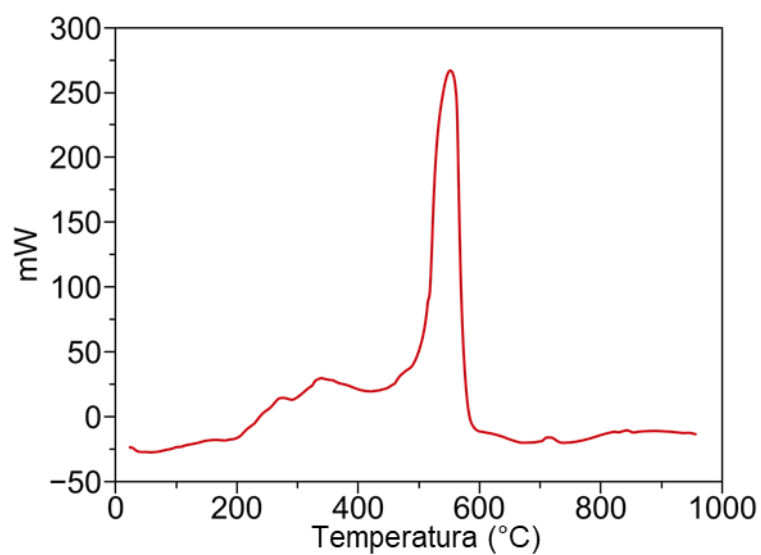


Figura AI.36. Calorimetría diferencial de barrido del Zr-MOP-10.

3.2.7 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

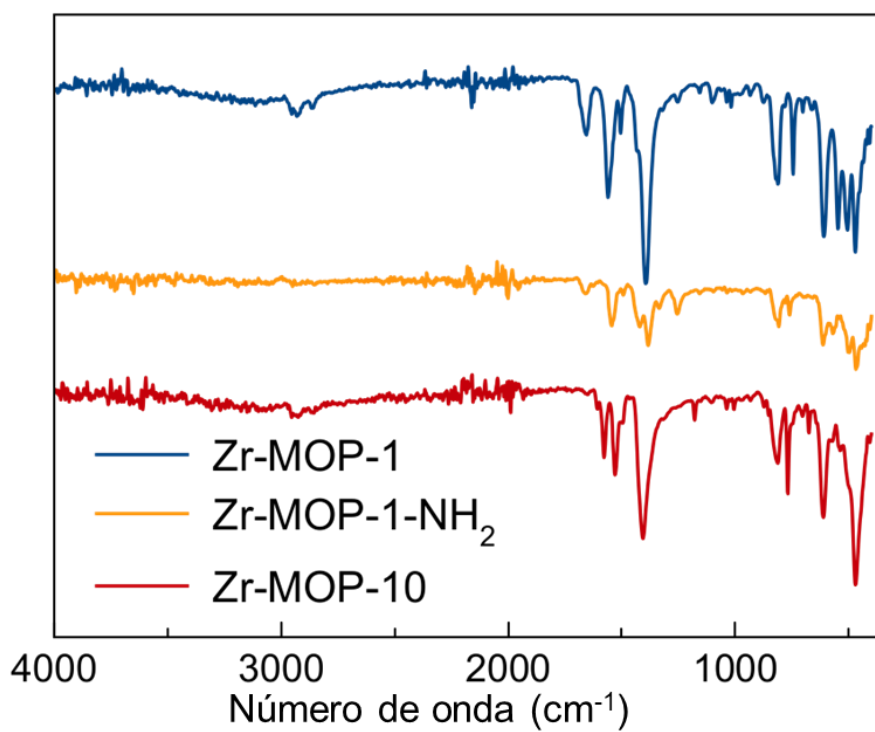


Figura AI.37. FTIR del Zr-MOP-1 (azul), Zr-MOP-1-NH₂ (amarillo) y Zr-MOP-10 (rojo).

3.2.8 Microscopía electrónica de barrido asociada a espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (SEM-EDX)

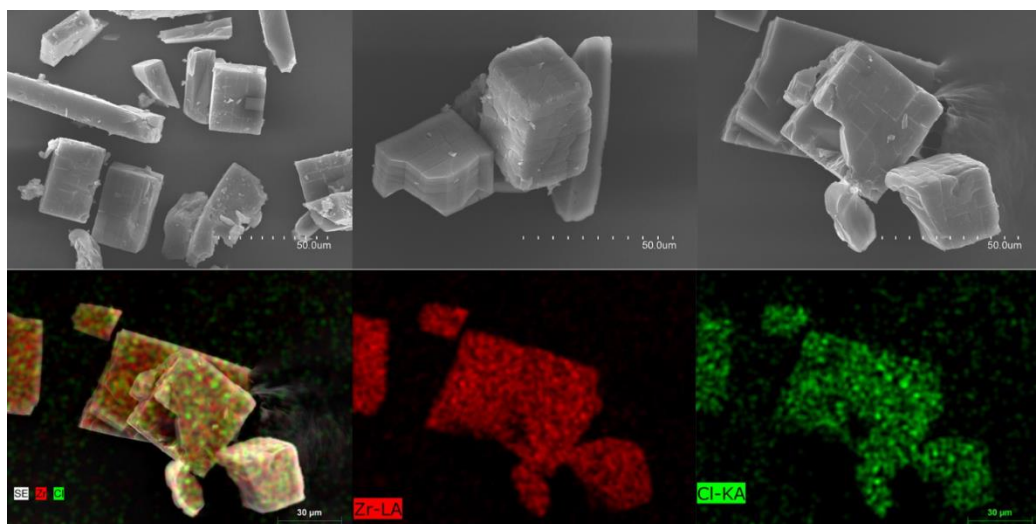


Figura AI.38. Imágenes de SEM-EDX del Zr-MOP-1.

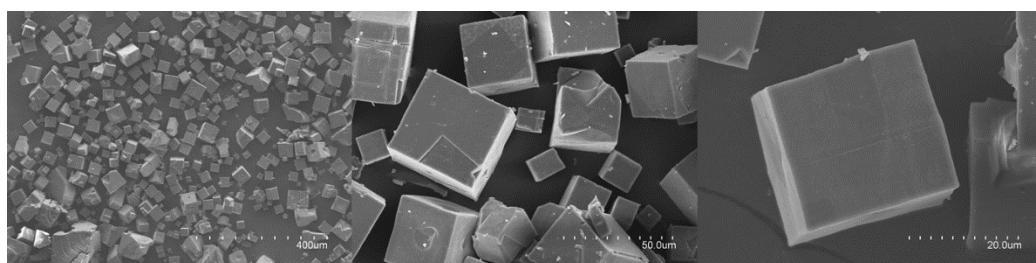


Figura AI.39. Imágenes de SEM-EDX del Zr-MOP-1-NH₂.

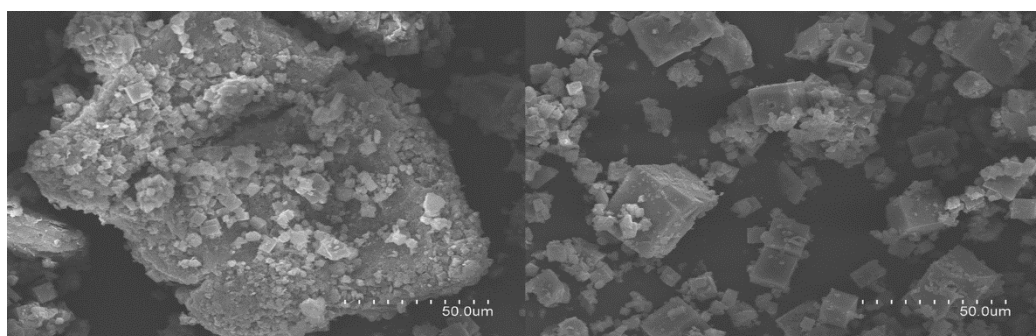


Figura AI.40. Imágenes de SEM del Zr-MOP-10.

3.2.9 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

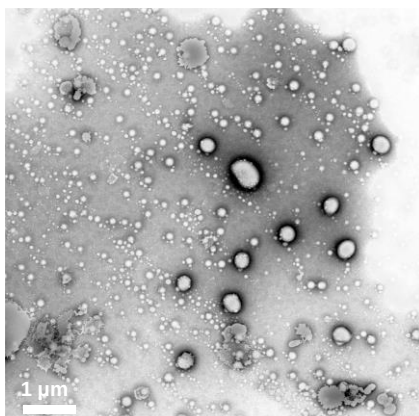


Figura AI.41. Imágenes de TEM de los ensamblajes liposoma@Zr-MOP-1@2-PAM preparados a partir de disoluciones del Zr-MOP-1@2-PAM en metanol.

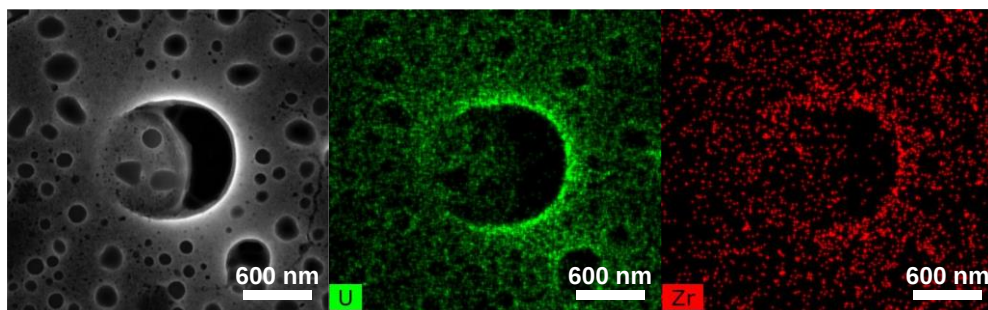


Figura AI.42. Análisis TEM-EDX de los ensamblajes liposoma@Zr-MOP-1@2-PAM preparados a partir de disoluciones del Zr-MOP-1@2-PAM en CHCl_3 . (uranio: verde, circonio: rojo). El uranio se encuentra presente debido al tratamiento de los ensamblajes con acetato de uranilo.

3.3 Estudios de adsorción de DIFP

3.3.1 Estudios por cromatografía de gases

La captura del compuesto diisopropilfluorofosfato (DIFP) por parte de los poliedros metal-orgánicos porosos de circonio(IV) Zr-MOP-1, Zr-MOP-1-NH₂ o Zr-MOP-10 se estudió mediante cromatografía de gases con detector FID. Para ello, se suspendieron 10 mg de Zr-MOP-1, Zr-MOP-1-NH₂ o Zr-MOP-10 en una disolución conteniendo 500 µL de H₂O, 1.25 µL de dimetilacetamida (DMA), como patrón interno; y 1.25 µL de DIFP. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 24 h y, a ciertos intervalos de tiempo, se cuantificó la concentración de DIFP en la disolución mediante cromatografía de gases.

3.3.2 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ³¹P (³¹P NMR)

Los estudios de adsorción de DIFP por parte de los diferentes MOPs (Zr-MOP-1, Zr-MOP-1-NH₂ y Zr-MOP-10) también se llevaron a cabo por NMR de ³¹P. Para ello, se mezclaron 6 mg de cada material con 0.5 mL de D₂O y 0.6 µL de DIFP. Tras 15 min o 24 h, los sobrenadantes se separaron del sólido por centrifugación. A continuación, el sólido se suspendió en CD₃OD para extraer los compuestos atrapados en el interior de las cavidades del MOP. Finalmente, ambas fracciones líquidas se analizaron por espectroscopía NMR de ³¹P con el objetivo de identificar la naturaleza de los compuestos fosforados (DIFP o su producto de hidrólisis DIP) tanto en el sobrenadante, como en el interior de las cavidades de los sólidos porosos. Como se observa en las Figura AI.43 - Figura AI.45, en todos los casos se observó que el DIFP era el único compuesto fosforado, indicando que la desaparición del compuesto tóxico de la disolución se producía únicamente mediante un proceso de adsorción.

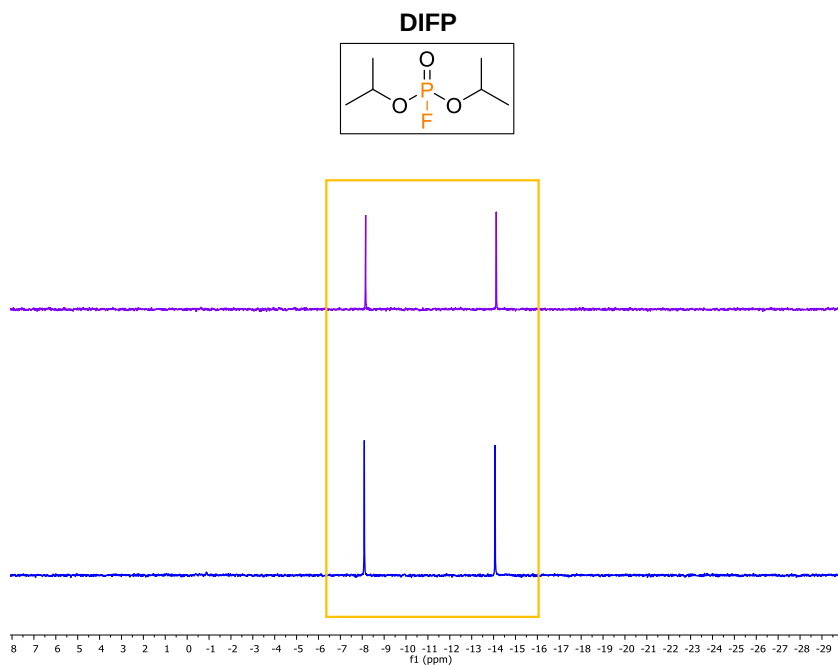


Figura AI.43. Espectro de NMR de ^{31}P del estudio de adsorción de diisopropilfluorofosfato (DIFP) en el Zr-MOP-1 tras 15 min (arriba) y 24 h (abajo).

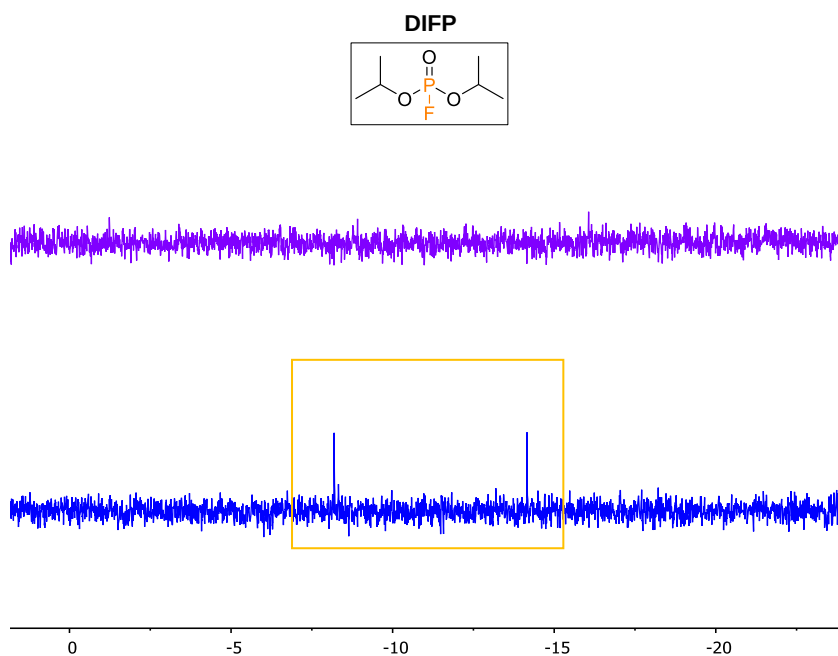


Figura AI.44. Espectro de NMR de ^{31}P del estudio de adsorción de diisopropilfluorofosfato (DIFP) en el Zr-MOP-1-NH₂ tras 15 min (arriba) y 24 h (abajo).

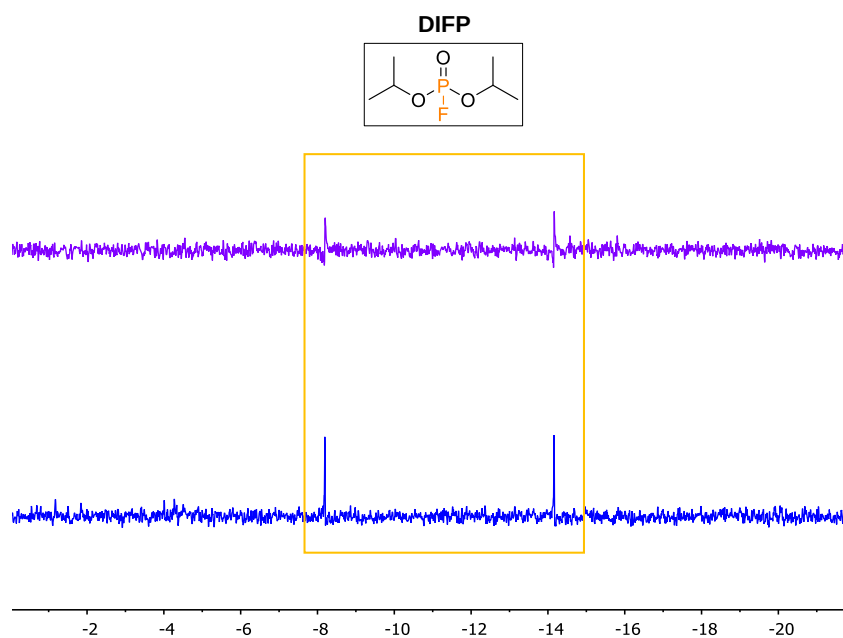


Figura AI.45. Espectro de NMR de ^{31}P del estudio de adsorción de diisopropilfluorofosfato (DIFP) en el Zr-MOP-10 tras 15 min (arriba) y 24 h (abajo).

3.4 Ensayos UV-Vis

3.4.1 Liberación de 2-PAM de Zr-MOP-1@2-PAM y Zr-MOP-10@2-PAM

Con el objetivo de estudiar la capacidad de los compuestos Zr-MOP-1@2-PAM y Zr-MOP-10@2-PAM para liberar de forma controlada las moléculas bioactivas 2-PAM en condiciones biológicas simuladas, se suspendieron 20 mg de Zr-MOP-1@2-PAM o Zr-MOP-10@2-PAM en 14.5 mL de Tris-HCl, 4.5 mL de H₂O y 1 mL de isopropanol, para replicar el medio utilizado en los ensayos de actividad enzimática. La mezcla se incubó a 37 °C bajo agitación orbital. A diferentes tiempos, se tomaron alícuotas de 100 µL que se centrifugaron para separar el sólido del sobrenadante. La concentración de 2-PAM en el sobrenadante se determinó mediante espectroscopía UV-Vis a $\lambda = 293$ nm.

3.4.2 Ensayos de reactivación de AChE

Con el objetivo de evaluar la actividad inhibidora del compuesto organofosforado modelo DIFP sobre la actividad enzimática de la AChE, así como la capacidad del compuesto 2-PAM para reactivar la actividad de la AChE, se llevaron a cabo ensayos de actividad enzimática de la AChE usando el método de acetato de indoxilo publicado previamente en bibliografía, aunque con ligeras modificaciones. Dicho método se basa en la habilidad de la enzima AChE para hidrolizar el acetato de indoxilo en azul índigo. Así, la concentración del producto de hidrólisis se determina mediante espectrofotometría UV-Visible lo que, por tanto, permite determinar la actividad de la enzima. [8]

Por una parte, se realizaron ensayos de inhibición enzimática con el objetivo de determinar la capacidad del compuesto organofosforado DIFP para inhibir a la enzima AChE. Para ello, se mezclaron 725 µL de Tris-HCl 0.01 M, pH 7.5 y 25 µL de una suspensión acuosa de AChE (50 U/mL) con 200 µL de agua o 200 µL de una disolución de DIFP (concentración final 5×10^{-6} M) para los ensayos control y de inhibición, respectivamente; y se incubaron a 37 °C durante 1 h. Transcurrido este tiempo, se añadieron 50 µL de una disolución de acetato de indoxilo en isopropanol y la mezcla se incubó durante otros 30 min. Entonces, cada muestra se mezcló con 3.3 mL de DMSO para solubilizar el producto de hidrólisis (azul índigo) y su concentración se determinó

mediante espectroscopía UV-Vis a $\lambda = 620 \text{ nm}$ ($\epsilon = 22140 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) lo que, finalmente, permitió determinar la actividad enzimática en cada ensayo.[9]

Por otra parte, también se realizaron ensayos de actividad enzimática de la AChE para evaluar la capacidad de las moléculas de 2-PAM liberadas para reactivar la actividad de la AChE previamente inhibida con el compuesto DIFP. Para ello, 725 μL de Tris-HCl 0.1 M, pH 7.5, 25 μL de una disolución acuosa de AChE (50 U/mL) y 100 μL de una disolución acuosa de DIFP (concentración final $5 \times 10^{-6} \text{ M}$) se incubaron durante 30 min a 37 °C. Pasado este tiempo, se añadieron 100 μL de una disolución de 2-PAM (concentración final 50 μM) o del sobrenadante liberado por el Zr-MOP-1@2-PAM tras 1 o 24 h de incubación y la mezcla se incubó durante otros 30 min. A continuación, se añadieron 50 μL de una disolución de acetato de indoxilo en isopropanol (sustrato) y la mezcla se incubó durante otros 30 min. Pasado este tiempo, muestra se mezcló con 3.3 mL de DMSO para solubilizar el producto de hidrólisis (azul índigo) y su concentración se determinó mediante espectroscopía UV-Vis a $\lambda = 620 \text{ nm}$ ($\epsilon = 22140 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) lo que, finalmente, permitió determinar la actividad enzimática en cada ensayo.

3.5 Modelado computacional (localizador de adsorbatos)

Se llevó a cabo el modelado computacional de la interacción del fármaco pralidoxima (2-PAM) y las moléculas del tóxico diisopropilfluorofosfato (DIFP) con las redes Zr-MOP-1 y el Zr-MOP-10. Con el fin de identificar las posibles configuraciones de adsorción de los sustratos estudiados para las cajas MOP, se utilizó el programa BIOVIA Materials Studio 2018 y mediante el módulo Adsorption Locator [12] y se llevaron a cabo búsquedas Monte Carlo del espacio configuracional del sistema sustrato-adsorbato.

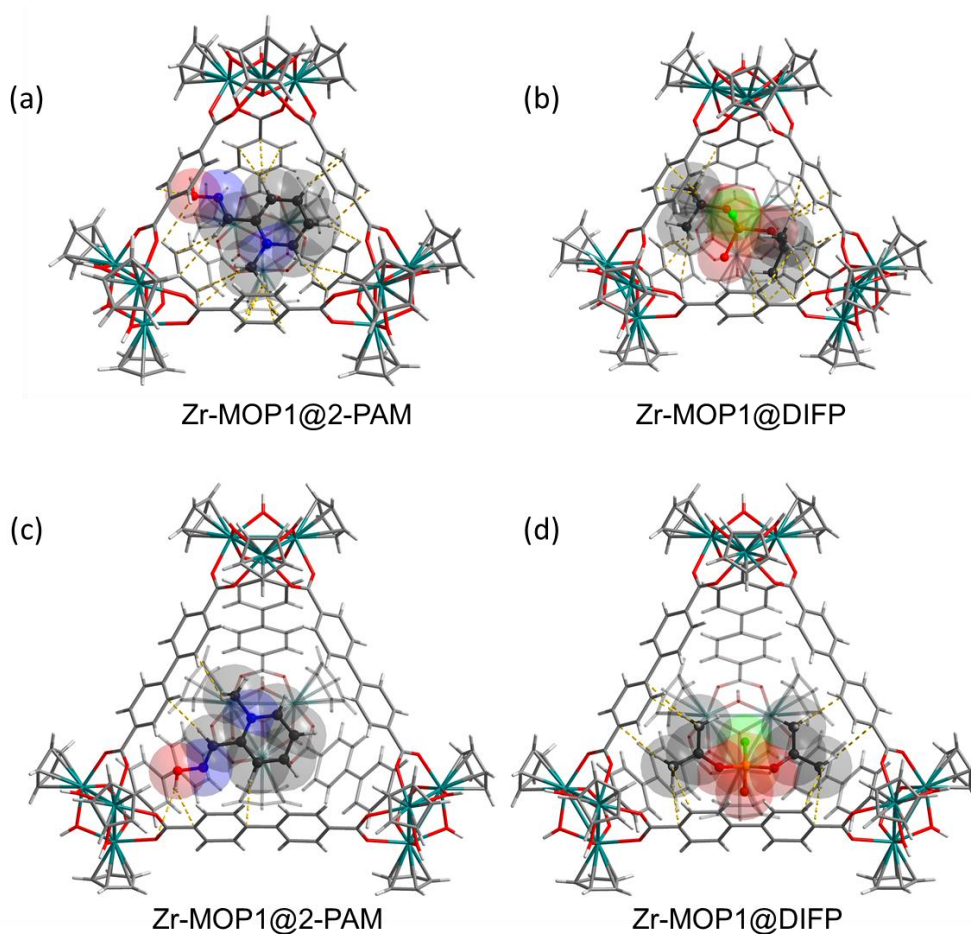


Figura AI.46. Modelado computacional de la acomodación del fármaco pralidoxima (2-PAM) y las moléculas del tóxico diisopropilfluorofosfato (DIFP) en las cajas internas de los sistemas Zr-MOP-1 (a, b) y Zr-MOP-10 (b, c).

3.6 Ensayos de viabilidad celular

Con el objetivo de evaluar la neurotoxicidad de las asociaciones 2-PAM@Zr-MOP-1, tanto el compuesto original como el incorporado en liposomas, se llevaron ensayos de viabilidad celular *in vitro* frente a cultivos de la línea la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Para ello, las células se cultivaron en forma de suspensión en medio RPMI-1640 (Sigma Aldrich R5886), suplementado con FBS al 20 % (Sigma Aldrich F4135), L-glutamina 4 mM (Sigma Aldrich G7513), piruvato de sodio 1 mM (Sigma Aldrich S8636) y glucosa 4.5 mg/mL a 37 °C en atmósfera humidificada con CO₂ al 5 % y se mantuvieron empleando técnicas de cultivos celulares estándar. La toxicidad de las muestras se determinó mediante el ensayo colorimétrico MTS. Los ensayos de viabilidad celular fueron llevados a cabo en su totalidad por el servicio de Cultivos de Tejidos y Banco Celular perteneciente al Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, que también proporcionó la línea celular.

4 Detoxificación de compuestos organofosforados inducida por la degradación estructural de redes metal-orgánicas zeomiméticas

4.1 Síntesis de redes metal-orgánicas zeomiméticas (ZIFs)

Todos los ZIFs se sintetizaron siguiendo métodos previamente publicados en bibliografía.

4.1.1 ZIF-20 [Zn(pIm)₂]

Se disolvieron 0.029 g de nitrato de cinc hexahidratado (0.10 mmol) en 0.40 mL de DMF y 0.06 g de purina (pIm, 0.50 mmol) se disolvieron en 0.80 mL de DMF. Ambas disoluciones se mezclaron. Tras esto, se añadieron 0.80 mL de una disolución de trietilamina (TEA) en DMF (1.25 mmol de TEA) a la mezcla, que se calentó en un reactor de microondas a 150 °C durante 15 min. El precipitado resultante se lavó con DMF (3 x 2 mL) y EtOH (3 x 2 mL) y se recuperó mediante centrifugación (4000 rpm x 10 min). [13]

4.1.2 ZIF-11 [Zn(bIm)₂]

Se disolvieron 0.12 g de benzimidazol (bIm, 1 mmol) en 8.62 mL de EtOH, tras lo cual se añadieron 5.31 mL de tolueno con 1 mmol de amoníaco. Tras esto, se añadieron 0.11 g de acetato de cinc dihidratado (0.5 mmol) y la disolución se agitó durante 3 h. El producto se lavó con EtOH (3 x 10 mL) y se recuperó mediante centrifugación (4000 rpm x 10 min). [14]

4.1.3 Zn(Im)₂

Se disolvieron 0.30 g de perclorato de cinc hexahidratado (0.81 mmol) en 5 mL de agua y 0.11 g de imidazol (Im, 1.61 mmol) se disolvieron en 5 mL de agua. Las dos disoluciones se mezclaron bajo agitación. Tras esto, se añadió una disolución acuosa de amoníaco gota a gota hasta la obtención de un precipitado blanco (pH = 10). El sólido resultante se lavó con H₂O (3 x 10 mL) y EtOH (1 x 10 mL) y se recuperó por filtración. [15]

4.1.4 Sod ZIF-8_2 μm [$\text{Zn}(\text{mIm})_2$]

Se disolvieron 0.32 g de acetato de cinc dihidratado (1.5 mmol) en 10 mL de agua y 1.23 g de 2-metilimidazol (mIm, 15 mmol) se disolvieron en 20 mL de agua. Las dos disoluciones se mezclaron y mantuvieron a temperatura ambiente hasta el día siguiente. El sólido resultante se lavó con H_2O (2 x 10 mL) y EtOH (1 x 10 mL) y se recuperó por centrifugación (3500 rpm x 5 min). [16]

4.1.5 Sod ZIF-8_1.2 μm [$\text{Zn}(\text{mIm})_2$]

Se disolvieron 0.32 g de acetato de cinc dihidratado (1.5 mmol) en 10 mL de agua y 2.46 g de 2-metilimidazol (mIm, 30 mmol) se disolvieron en 20 mL de agua. Las dos disoluciones se mezclaron y mantuvieron a temperatura ambiente hasta el día siguiente. El sólido resultante se lavó con H_2O (2 x 10 mL) y EtOH (1 x 10 mL) y se recuperó por centrifugación (3500 rpm x 5 min). [16]

4.1.6 Sod ZIF-8_240 nm [$\text{Zn}(\text{mIm})_2$]

Se disolvieron 0.32 g de acetato de cinc dihidratado (1.5 mmol) en 10 mL de agua y 4.92 g de 2-metilimidazol (mIm, 60 mmol) se disolvieron en 20 mL de agua. Las dos disoluciones se mezclaron y mantuvieron a temperatura ambiente hasta el día siguiente. El sólido resultante se lavó con H_2O (2 x 10 mL) y EtOH (1 x 10 mL) y se recuperó por centrifugación (3500 rpm x 5 min). [16]

4.1.7 Sod ZIF-8_18 nm [$\text{Zn}(\text{mIm})_2$]

Se disolvieron 0.73 g de nitrato de cinc hexahidratado (2.5 mmol) en 50 mL de metanol y 0.81 g de 2-metilimidazol (mIm, 9.9 mmol) junto con 0.975 mL de n-butilamina (9.9 mmol) se disolvieron en 50 mL de metanol. Esta última disolución se añadió a la primera disolución bajo agitación y la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 h. El sólido resultante se lavó con MeOH (3 x 25 mL) y se recuperó por centrifugación (15000 rpm x 5 min). [16]

4.1.8 ZIF-L [Zn(mIm)₂]

Se disolvieron 0.59 g de nitrato de cinc hexahidratado (2 mmol) en 40 mL de agua y 1.24 g de 2-metilimidazol (mIm, 15 mmol) se disolvieron en 40 mL de agua. Ambas disoluciones se mezclaron y se incubaron en agitación durante 24 h a temperatura ambiente. El sólido resultante se lavó con agua (3 x 20 mL) y se recuperó por centrifugación (4000 rpm x 10 min). [17]

4.1.9 ZIF-EC-1 [Zn₃(mIm)₅(OH)]

Se disolvieron 0.05 g de acetato de cinc dihidratado (0.29 mmol) en 1 mL de agua y 0.04 g de 2-metilimidazol (mIm, 0.48 mmol) se disolvieron en 0.125 mL de agua. Ambas disoluciones se mezclaron y agitaron a temperatura ambiente durante 4 h. El polvo de color blanco resultante se lavó con agua (6 x 1 mL) y se recuperó por centrifugación (12000 rpm x 2 min). [18]

4.2 Caracterización física y química

4.2.1 Análisis elemental

En la Tabla AI.6 se muestra el contenido en nitrógeno, carbono e hidrógeno, expresado como porcentaje en peso, de las redes metal-orgánicas zeomiméticas preparadas determinado experimentalmente mediante análisis elemental. También se muestra el contenido en nitrógeno, carbono e hidrógeno, expresado en porcentaje en peso, que deberían presentar teóricamente las redes metal-orgánicas zeomiméticas de acuerdo a su fórmula molecular.

Tabla AI.6. Análisis elemental de sod ZIF-20, ZIF-11, Zn(Im)₂, ZIF-L, ZIF-EC-1 y sod ZIFs-8 (2 μm , 1 μm , 240 nm y 18 nm).

	Teórico			Experimental		
	N (%)	C (%)	H (%)	N (%)	C (%)	H (%)
ZIF-20	30.20	32.38	2.17	30.19	33.49	3.89
ZIF-11	18.57	55.74	4.01	16.14	59.75	5.18
Zn(Im) ₂	27.80	35.76	4.00	27.78	35.50	3.77
ZIF-L	24.62	42.21	4.43	24.75	39.87	6.72
ZIF-EC-1	22.46	38.51	5.00	20.76	37.25	5.84
Sod ZIF-8_2 μm	24.62	42.21	4.43	24.51	42.14	6.34
Sod ZIF-8_1.2 μm	24.62	42.21	4.43	25.74	43.74	6.36
Sod ZIF-8_240 nm	24.62	42.21	4.43	25.19	42.89	6.02
Sod ZIF-8_18 nm	24.62	42.21	4.43	23.88	41.13	5.76

4.2.2 Difracción de rayos X en polvo (PXRD)

En la Figura AI.47, se comparan los difractogramas de Rayos-X en polvo experimentales de las redes metal-orgánicas preparadas, incluyendo ZIF-20, ZIF-11, ZnIm₂, ZIF-L, ZIF-EC-1 y sod ZIF-8 con distinto tamaño de partícula; con los difractogramas de Rayos-X en polvo simulados a partir de la estructura cristalina de la correspondiente red metal-orgánica.

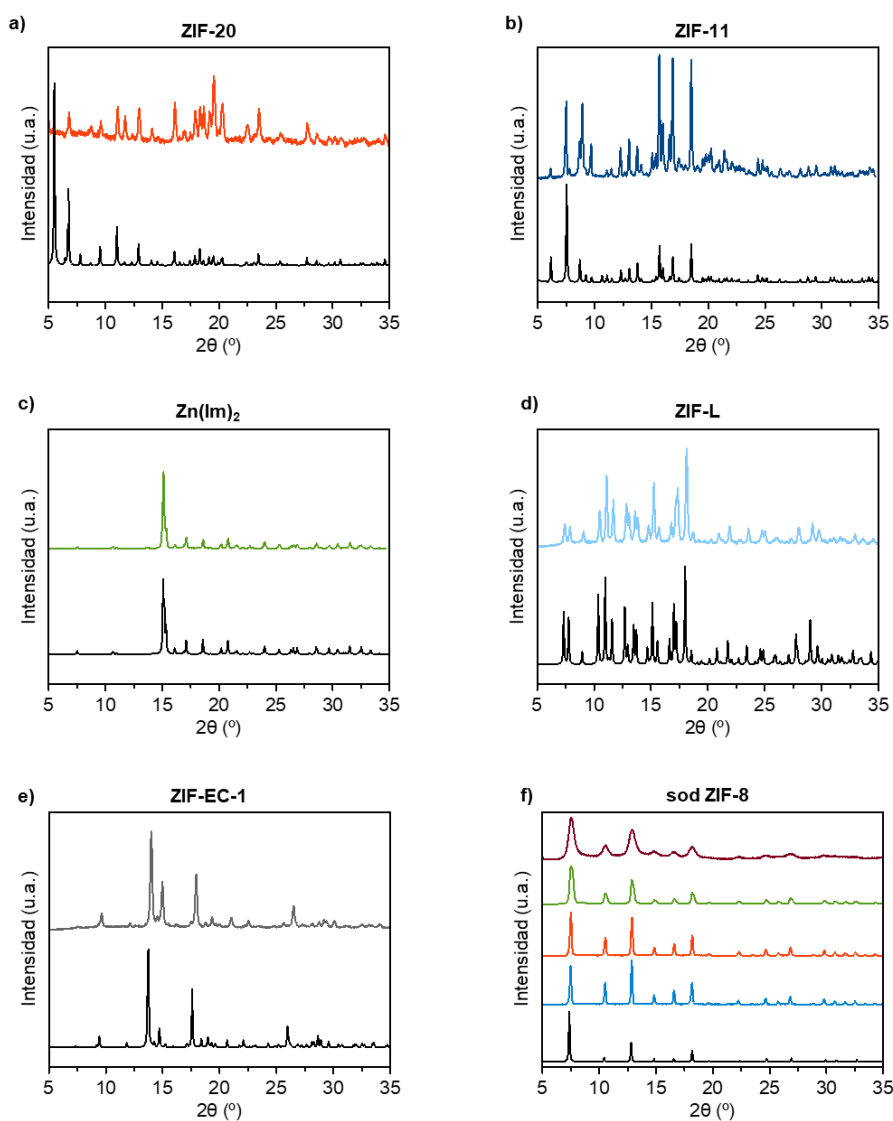


Figura A1.47. PXRD de (a) ZIF-20, (b) ZIF-11, (c) Zn(Im)₂, (d) ZIF-L, (e) ZIF-EC-1 y (f) sod ZIFs-8 (2 μm, línea azul; 1 μm, línea roja; 240 nm, línea verde; y 18 nm, línea marrón). Los patrones simulados se encuentran representados de color negro.

4.2.3 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros de absorción infrarroja de los compuestos ZIF-20, ZIF-11, ZnIm₂, ZIF-L, ZIF-EC-1 y sod ZIF-8 con distinto tamaño de partícula; se muestran en la Figura AI.48.

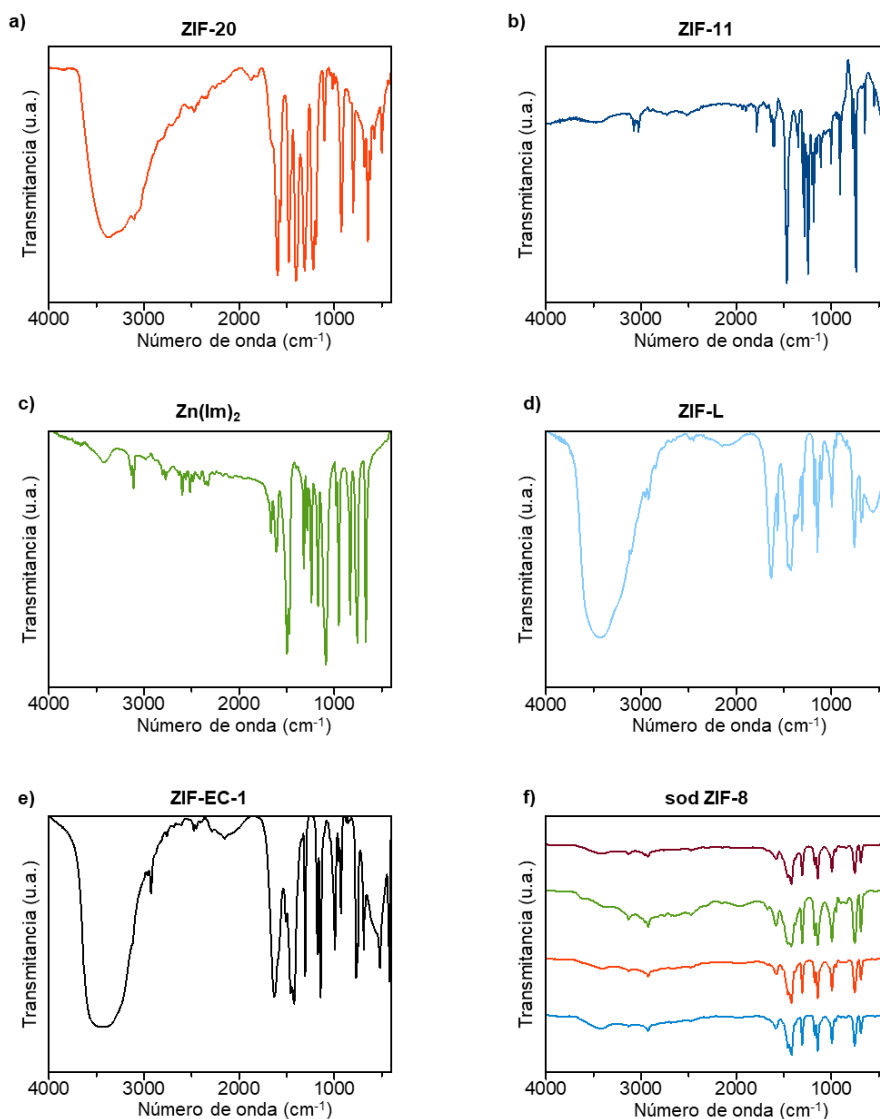


Figura AI.48. Espectro infrarrojo de (a) ZIF-20, (b) ZIF-11, (c) Zn(Im)₂, (d) ZIF-L, (e) ZIF-EC-1 y (f) sod ZIFs-8 (2 μm , línea azul; 1 μm , línea roja; 240 nm, línea verde; y 18 nm, línea marrón).

4.2.4 Análisis termogravimétrico (TGA)

Los análisis termogravimétricos de los compuestos ZIF-20, ZIF-11, ZnIm2, ZIF-L, ZIF-EC-1 y sod ZIF-8 con distinto tamaño de partícula; se muestran en la Figura AI.49:

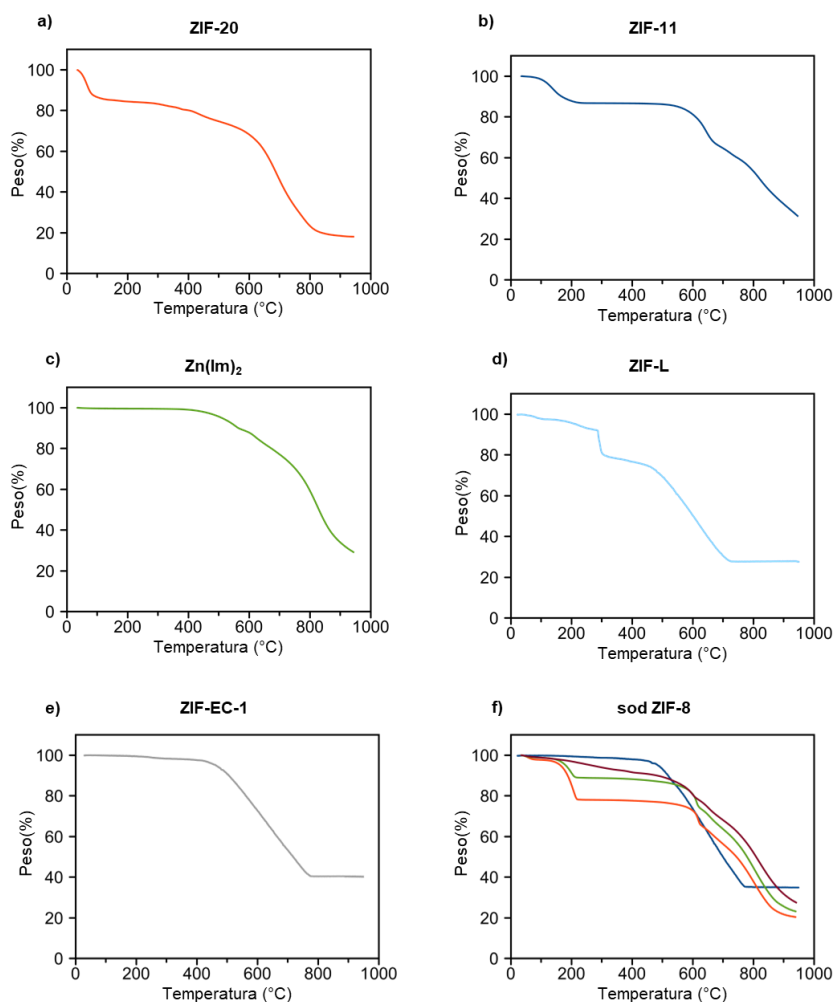


Figura AI.49. Análisis termogravimétrico de los ZIFs estudiados bajo atmósfera de aire ($20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) y rampa de calentamiento de $10 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ para el (a) ZIF-20, (b) ZIF-11, (c) Zn(Im)₂, (d) ZIF-L, (e) ZIF-EC-1, (f) partículas de sod ZIF-8 de 2 μm (línea roja), 1.2 μm (línea verde), 240 nm (línea marrón) y 18 nm (línea azul).

4.2.5 Isotermas de adsorción de gases

Las isotermas de adsorción de nitrógeno medidas a 77 K de las redes metal-orgánicas sod ZIF-8 con distinto tamaño de partícula se muestran a continuación (Figura AI.50). Antes de llevar a cabo las medidas de adsorción de nitrógeno, los distintos sod ZIFs-8 se sumergieron en metanol durante 24 h para eliminar los posibles restos de reactivo sin reaccionar que hayan podido quedar atrapados en los poros. Este proceso se llevó a cabo por triplicado. Tras esto, los materiales se activaron a 100 °C durante 12 h bajo vacío dinámico para eliminar el disolvente de las cavidades.

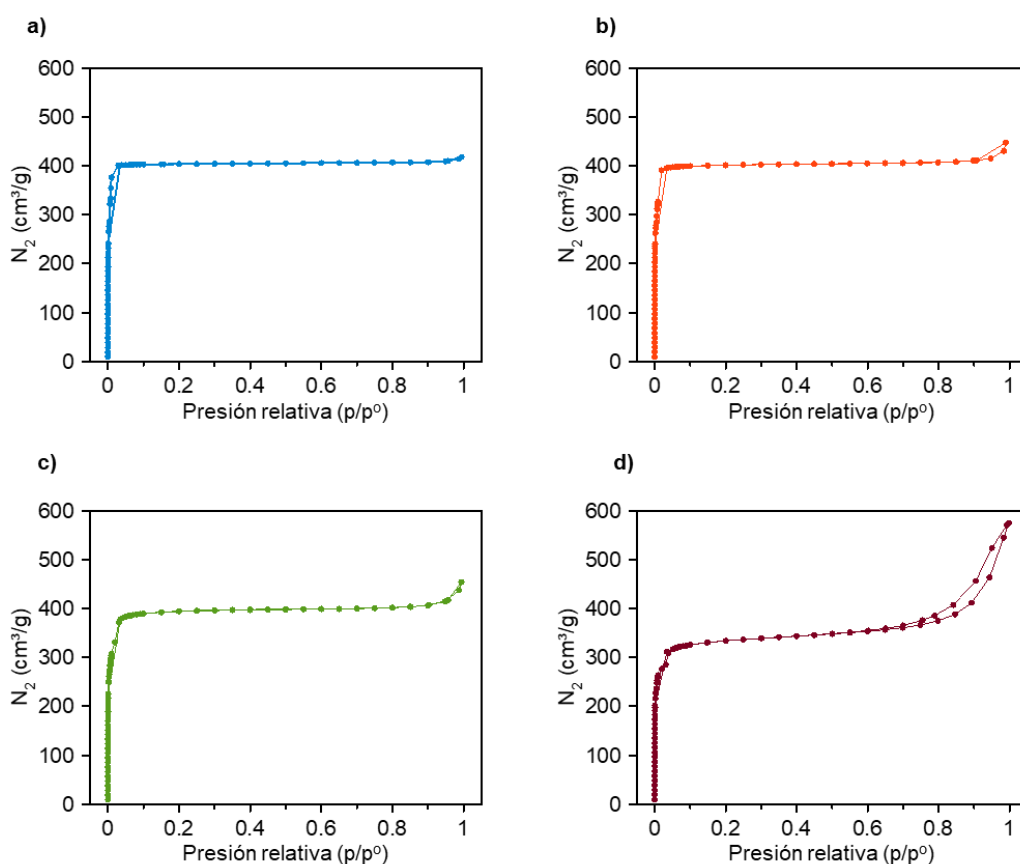


Figura AI.50. Isotermas de adsorción de nitrógeno de (a) sod ZIF-8_2 μm ($\text{BET} = 1624 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), (b) sod ZIF-8_1.2 μm ($\text{BET} = 1622 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), (c) sod ZIF-8_240 nm ($\text{BET} = 1620 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) y (d) sod ZIF-8_18 nm ($\text{BET} = 1540 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$).

4.2.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM)

Las imágenes de microscopía de transmisión electrónica de barrido para las redes metal-orgánicas zeomiméticas preparadas (ZIF-20, ZIF-11, $\text{Zn}(\text{Im})_2$, ZIF-EC-1, ZIF-L y sod ZIF-8 con tamaños de partícula de 2 μm , 1.2 μm y 240 nm se muestran en la Figura AI.51. En el caso de las partículas de sod ZIF-8 de 18 nm, debido a su tamaño nanométrico, las imágenes se tomaron mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM).

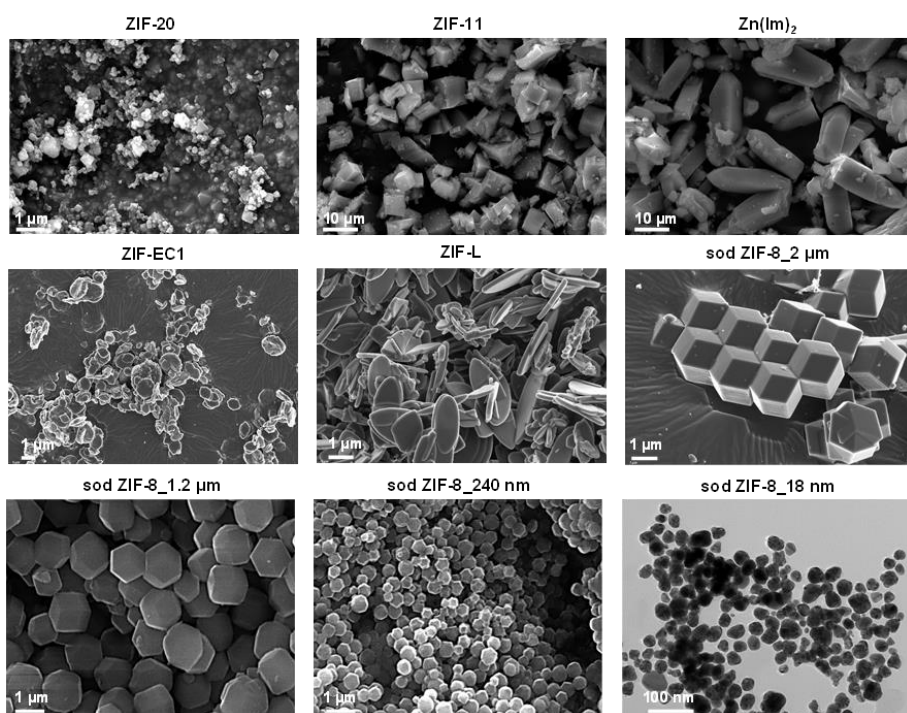


Figura AI.51. Imágenes de SEM y TEM de ZIF-20, ZIF-11, $\text{Zn}(\text{Im})_2$, ZIF-EC-1, ZIF-L, sod ZIF-8_2 μm , sod ZIF-8 1.2 μm , sod ZIF-8_240 nm y sod ZIF-8_18 nm.

4.3 Estudios de degradación de DIFP y DICP

4.3.1 Estudios por cromatografía de gases (GC)

La degradación hidrolítica del DIFP llevada a cabo por los diferentes ZIFs preparados se cuantificó mediante cromatografía de gases. Para ello, se adicionó cada uno de los ZIFs (ZIF-20 (0.084 mmol), ZIF-11 (0.084 mmol), $\text{Zn}(\text{Im})_2$ (0.084 mmol), sod ZIF-8_2 μm (0.084 mmol), sod ZIF-8 1.2 μm (0.084 mmol), sod ZIF-8_240 nm (0.084 mmol),

sod ZIF-8_18 nm (0.084 mmol), ZIF-L (0.084 mmol) o ZIF-EC-1 (0.029 mmol)) a 0.5 mL de una disolución Tris-HCl (0.1 M, pH 7.4) conteniendo DIFP (2.5 μ L, 0.015 mmol) y dimetilformamida (DMF, 1.08 μ L, 0.015 mmol, usado como patrón interno). Cada una de las mezclas anteriores se mantuvieron en agitación y a temperatura ambiente. A ciertos intervalos de tiempo, se cuantificó la concentración de DIFP en la disolución mediante cromatografía de gases para monitorizar la degradación hidrolítica del DIFP por parte de las redes metal-orgánicas zeomiméticas.

Asimismo, con el objetivo de evaluar si la presencia de los iones fosfato en medio fisiológico podían actuar como competidores durante la degradación hidrolítica del DIFP, se estudió la degradación hidrolítica del DIFP por parte de la red metal-orgánica sod ZIF-8 de 18 nm, empleado como ZIF modelo, mediante cromatografía de gases, usando como medio un tampón fosfato salino. El procedimiento experimental utilizado fue el mismo que en el párrafo anterior, excepto que la disolución de DIFP y del patrón interno se preparó en medio tampón fosfato salino (0.01 M, pH 7.4) en vez de en medio Tris-HCl.

Por otra parte, también se estudió la degradación hidrolítica del diisopropilclorofosfato (DICP) por parte de las redes sod ZIFs-8 con distinto tamaño de partícula (18 nm – 2 μ m). En este caso, el procedimiento experimental utilizado fue el mismo que en el caso de la degradación hidrolítica del DIFP, con la diferencia de que se empleó una disolución de Tris deuterado (Tris-DCl) en vez de una disolución de Tris-HCl.

Los perfiles de degradación hidrolítica del compuesto DIFP en medio Tris-HCl por parte todas las redes metal-orgánicas zeomiméticas se muestran en la memoria excepto en el caso del ZIF-EC-1, que se muestra en la Figura AI.52a. Por otra parte, la degradación hidrolítica del DIFP en medio tampón fosfato por parte del sod ZIF-8 de 18 nm se muestra en la Figura AI.52b mientras que la degradación hidrolítica del DICP en medio Tris-HCl por parte de los distintos sod ZIF-8 de distinto de tamaño de partícula preparados se muestran en la Figura AI.52c.

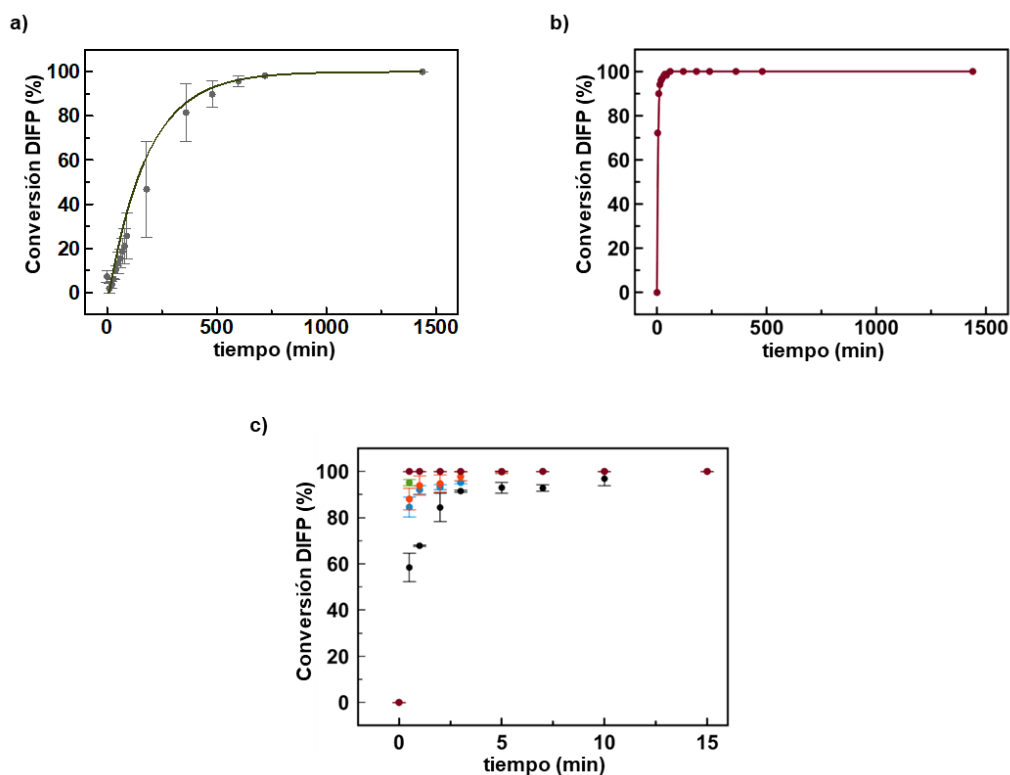


Figura AI.52. (a) Perfil de la degradación hidrolítica de DIFP (0.029 M, 0.5 mL) llevada a cabo por el ZIF-EC-1 (0.029 mmol) bajo condiciones biológicas simuladas (Tris-HCl, 0.1 M, pH 7.4); (b) Perfil de la degradación hidrolítica de DIFP (0.029 M, 0.5 mL) llevada a cabo por sod ZIF-8 18 nm (0.084 mmol) en tampón fosfato salino (0.01 M, pH 7.4) para evaluar la posible interferencia del fosfato; (c) Perfil de la degradación hidrolítica del DICP (0.029 M, 0.5 mL) llevada a cabo por los sod ZIF-8 de diferente tamaño de partícula: 2 μm (cian), 1.2 μm (rojo), 240 nm (verde), 18 nm (marrón), control (negro) bajo condiciones biológicas simuladas (Tris-DCl, 0.1 M, pD 7.8).

Todos los perfiles de degradación se ajustaron a un modelo cinético de primer orden para determinar la constante cinética de hidrólisis, así como el tiempo de vida media. Los ajustes para los distintos ensayos de degradación hidrolítica se muestran en la Figura AI.53.

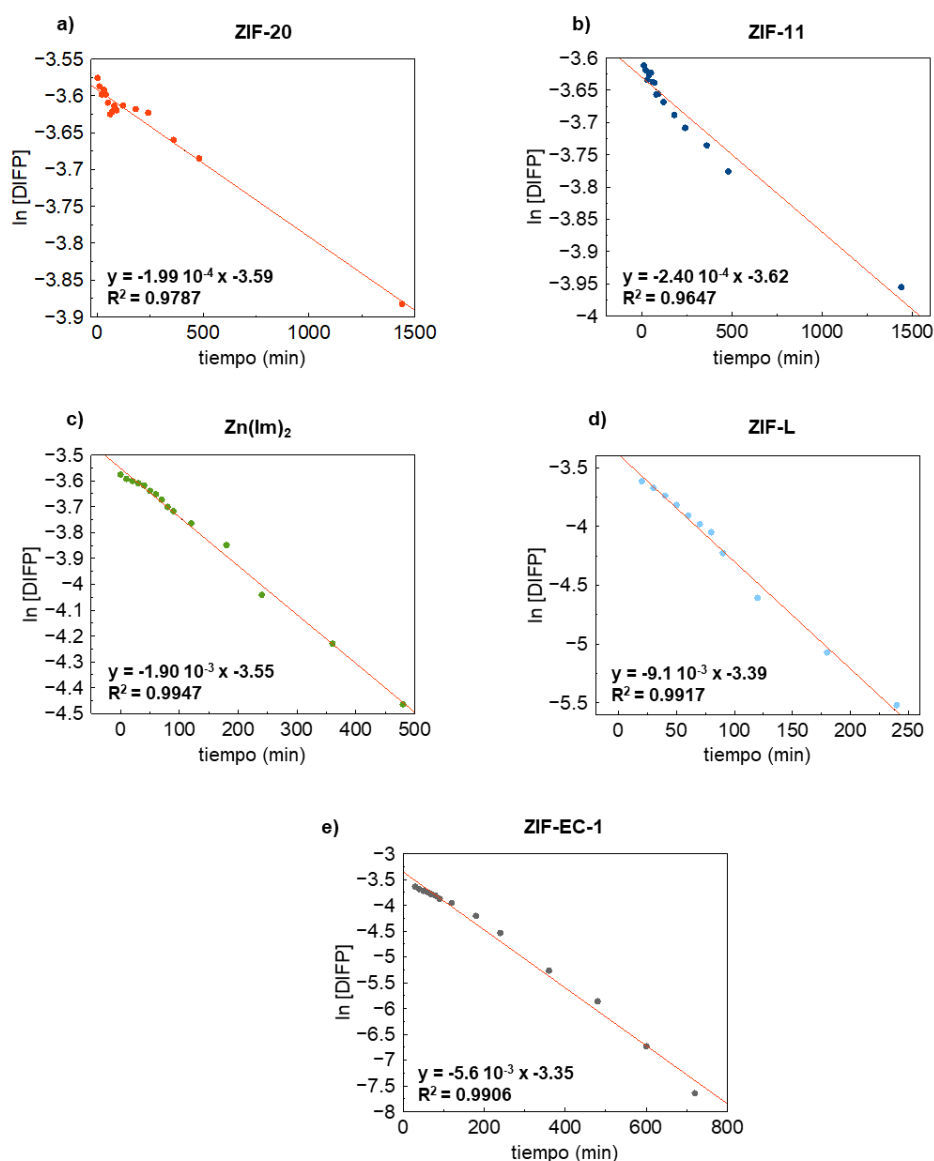


Figura AI.53. Ajuste a un modelo cinético de primer orden de las gráficas de degradación hidrolítica del DIFP (0.029 M, 0.5 mL) bajo condiciones biológicas simuladas llevadas a cabo por: (a) ZIF-20 (0.084 mmol), (b) ZIF-11 (0.084 mmol), (c) Zn(Im)₂ (0.084 mmol), (d) ZIF-L (0.084 mmol) y (e) ZIF-EC-1 (0.029 mmol).

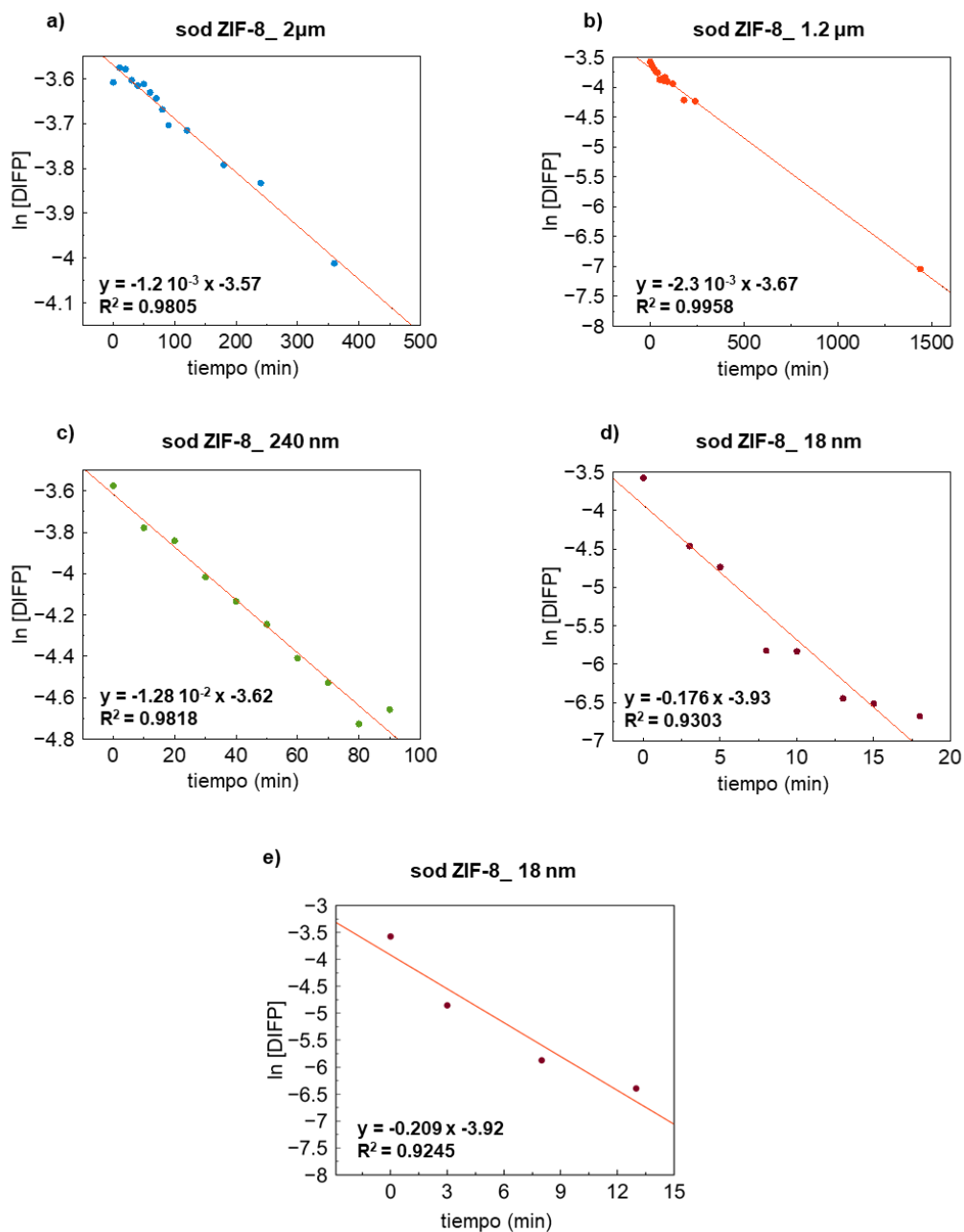


Figura AI.54. Ajuste a un modelo cinético de primer orden de las gráficas de degradación hidrolítica del DIFP (0.029 M, 0.5 mL) bajo condiciones biológicas simuladas llevadas a cabo por: a) sod ZIF-8_2 μm (0.084 mmol), (b) sod ZIF-8_1.2 μm (0.084 mmol), (c) sod ZIF-8_240 nm (0.084 mmol) y (d) sod ZIF-8_18 nm (0.084 mmol) en Tris-HCl (0.1 M, pH 7.4) y (e) sod ZIF-8_18 nm (0.084 mmol) en tampón fosfato salino (0.01 M, pH 7.4).

4.3.2 Estudios de degradación mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{31}P (^1H - y ^{31}P -NMR)

La degradación hidrolítica del DIFP llevada a cabo por los diferentes ZIFs también se estudió mediante NMR de ^1H y ^{31}P . Para ello, se adicionó cada una de las redes metal-orgánicas zeomiméticas, $\text{Zn}(\text{Im})_2$ (0.084 mmol), sod ZIF-8_2 μm (0.084 mmol), sod ZIF-8 1.2 μm (0.084 mmol), sod ZIF-8_240 nm (0.084 mmol), sod ZIF-8_18 nm (0.084 mmol), ZIF-L (0.084 mmol) o ZIF-EC-1 (0.029 mmol) a 0.5 mL de una disolución de Tris-DCl (0.1 M, pH 7.4) que contenía DIFP (0.029 mmol) y dimetilfosfato (0.029 M), éste último utilizado como patrón interno. Las mezclas se mantuvieron a temperatura ambiente y, a distintos tiempos, se analizó el sobrenadante mediante NMR de ^1H y ^{31}P para cuantificar la concentración de DIFP y de ligandos imidazólicos (mIm o Im) liberados tras la degradación de las redes metal-orgánicas.

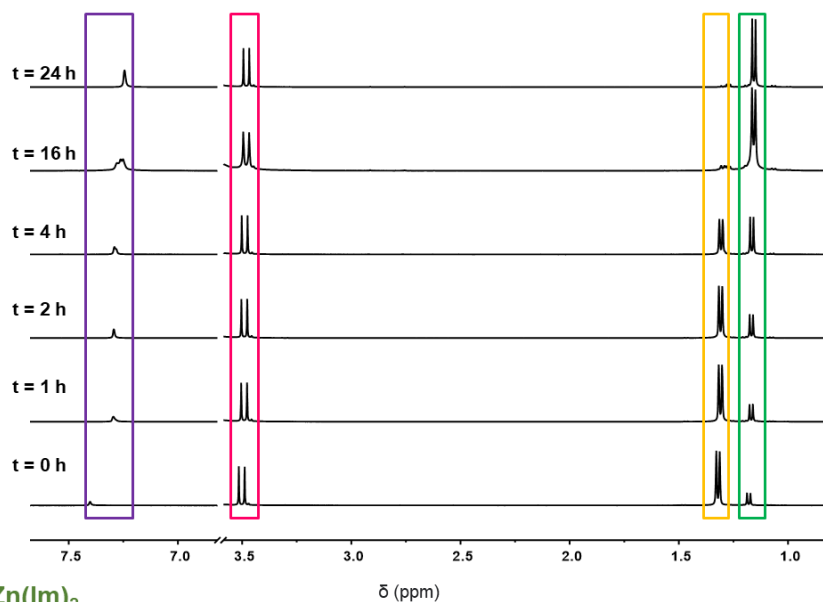
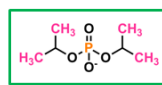
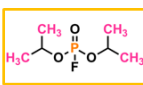
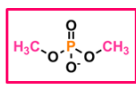
La degradación hidrolítica del DICP llevada a cabo por los sod ZIFs-8 con distinto tamaño de partícula (18 nm – 2 μm) también se analizó mediante resonancia magnética nuclear siguiendo el mismo procedimiento experimental anterior, pero usando una disolución conteniendo DICP (0.029 M) en vez de DIFP.

Por otra parte, y con el objetivo de evaluar si los iones zinc(II) o los ligandos mIm presentaban actividad catalítica, se estudió mediante ^1H NMR la capacidad de los iones Zn^{2+} ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 0.100 mmol) y mIm (0.020 mmol) para hidrolizar DIFP en Tris-DCl (0.1 M, pH 7.4, 0.5 mL) y dimetilfosfato (0.029 M, patrón interno) al cabo de 24 h. El procedimiento experimental utilizado fue el mismo al de los casos anteriores.

En las siguientes Figura AI.55 - Figura AI.66 se muestran los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (^1H) y fósforo (^{31}P), para los distintos estudios hidrolíticos realizados.

Asimismo, las Tabla AI.7 y Tabla AI.8 tablas muestran la cantidad de ligando imidazólico liberados durante los ensayos hidrolíticos, de acuerdo a la cuantificación realizada mediante resonancia magnética nuclear.

Zn(Im)₂
(¹H)



Zn(Im)₂
(³¹P)

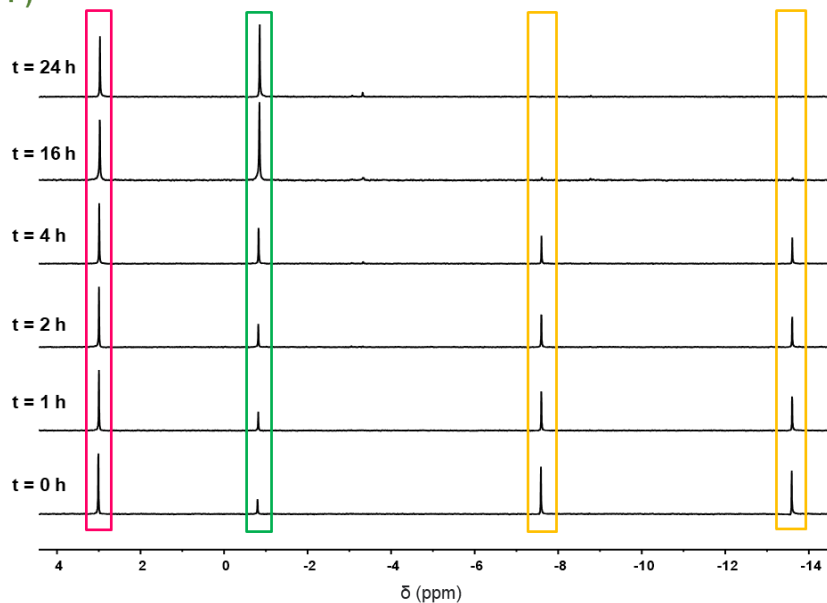


Figura AI.55 S9. Espectro de NMR de ¹H (arriba) y ³¹P (abajo) de la degradación hidrolítica del DIPF llevada a cabo por Zn(Im)₂. Condiciones experimentales: DIPF (0.029 M), Zn(Im)₂ (0.084 mmol), dimetilfosfato (0.029 M, patrón interno), Tris-DCI (0.1 M, pD 7.8, 0.5 mL), temperatura ambiente.

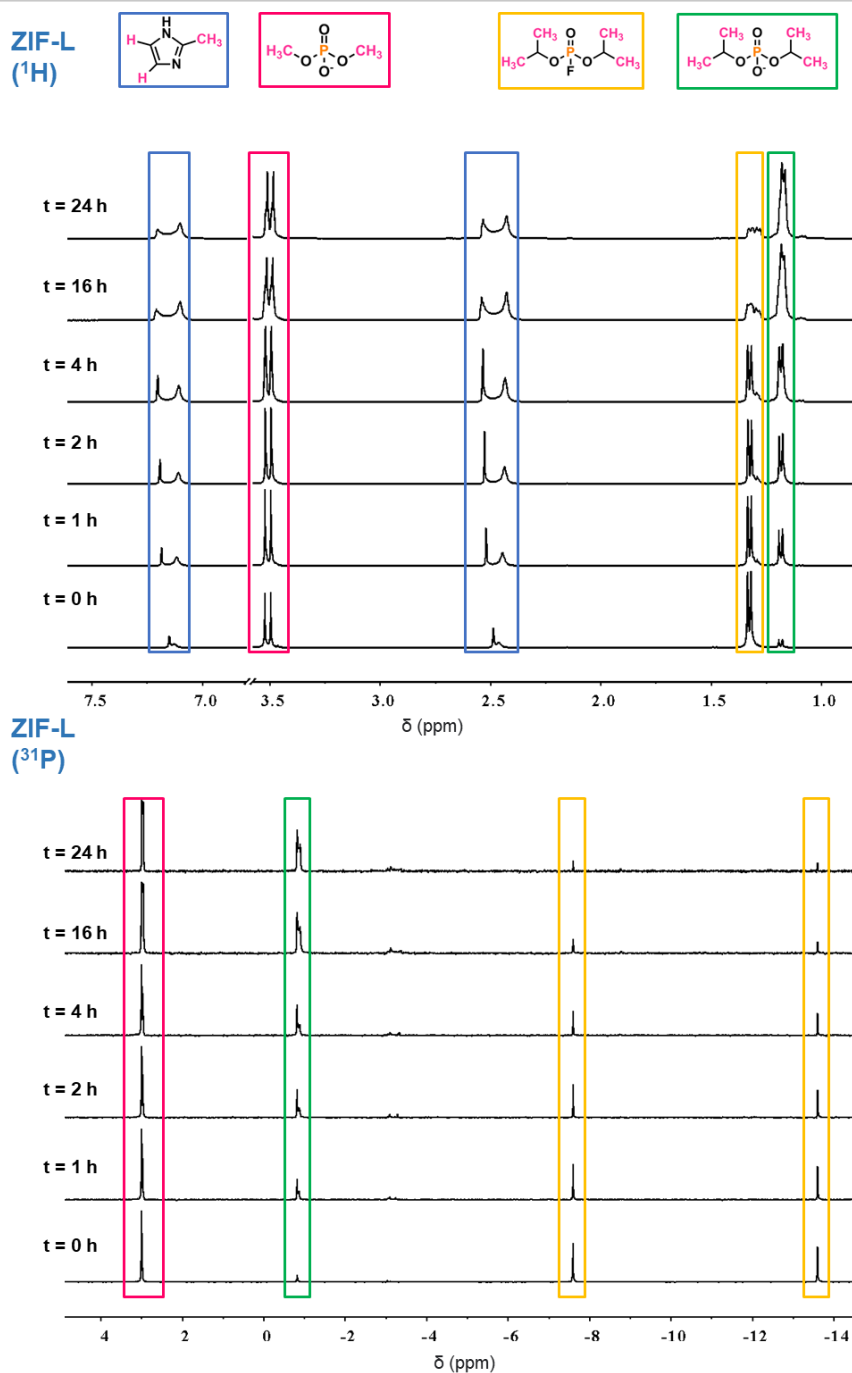


Figura AI.56. Espectro de NMR de ^1H (arriba) y ^{31}P (abajo) de la degradación hidrolítica del DIFP llevada a cabo por ZIF-L. Condiciones experimentales: DIFP (0.029 M), ZIF-L (0.084 mmol), dimetilfosfato (0.029 M, patrón interno), Tris-DCI (0.1 M, pH 7.8, 0.5 mL), temperatura ambiente.

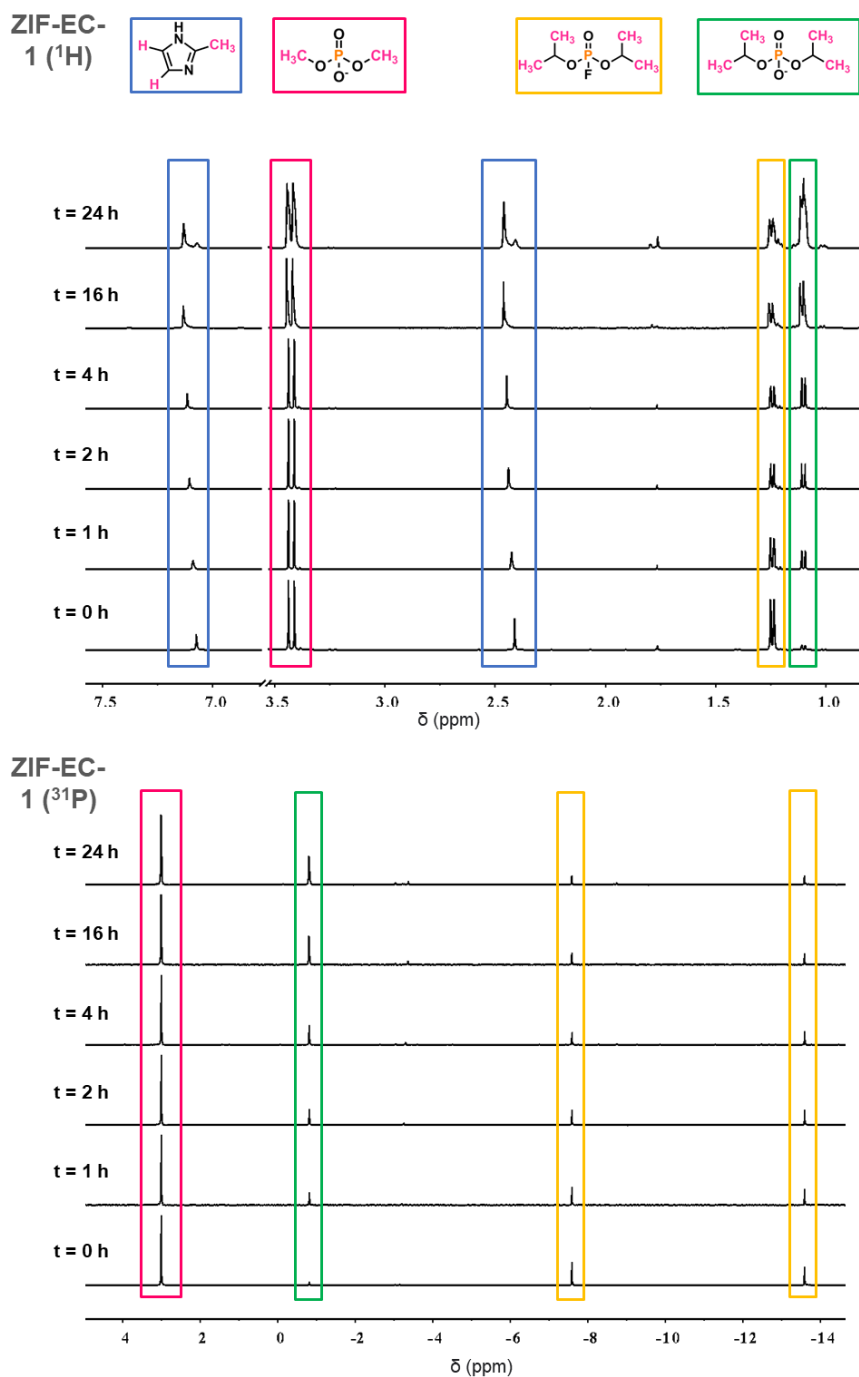


Figura A1.57. Espectro de NMR de ^1H (arriba) y NMR de ^{31}P (abajo) de la degradación hidrolítica del DIFP llevada a cabo por ZIF-EC-1. Condiciones experimentales: DIFP (0.029 M), ZIF-EC-1 (0.029 mmol), dimetilfosfato (0.029 M, patrón interno), Tris-DCI (0.1 M, pH 7.8, 0.5 mL), temperatura ambiente.

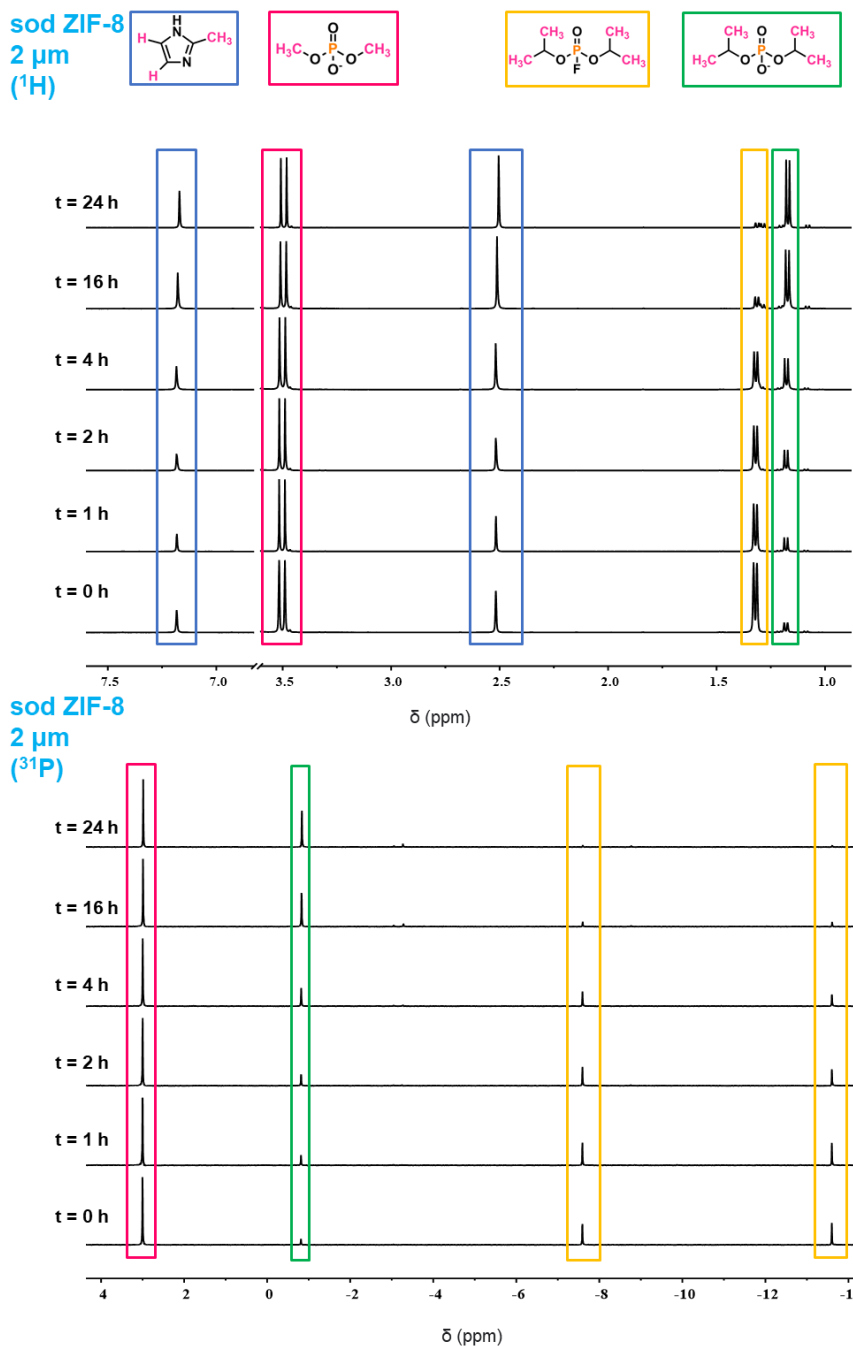


Figura AI.58. Espectro de NMR de ^1H (arriba) y NMR de ^{31}P (abajo) de la degradación hidrolítica del DIFP llevada a cabo por sod ZIF-8_2 μm . Condiciones experimentales: DIFP (0.029 M), sod ZIF-8_2 μm (0.084 mmol), dimetilfosfato (0.029 M, patrón interno), Tris-DCl (0.1 M, pD 7.8, 0.5 mL), temperatura ambiente.

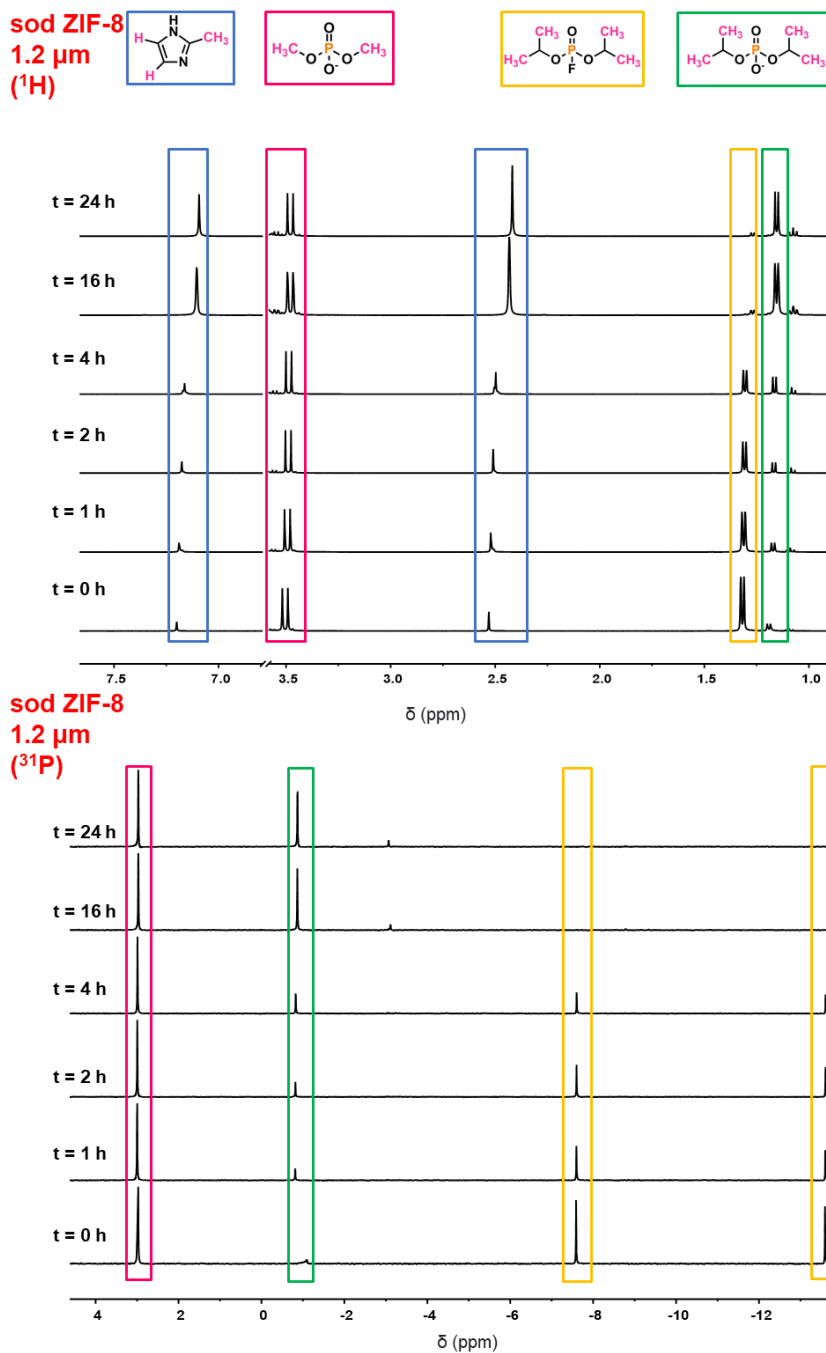


Figura AI.59. Espectro de NMR de ^1H (arriba) y NMR de ^{31}P (abajo) de la degradación hidrolítica del DIFP llevada a cabo por sod ZIF-8_1.2 μm . Condiciones experimentales: DIFP (0.029 M), sod ZIF-8_1.2 μm (0.084 mmol), dimetilfosfato (0.029 M, patrón interno), Tris-DCI (0.1 M, pD 7.8, 0.5 mL), temperatura ambiente.

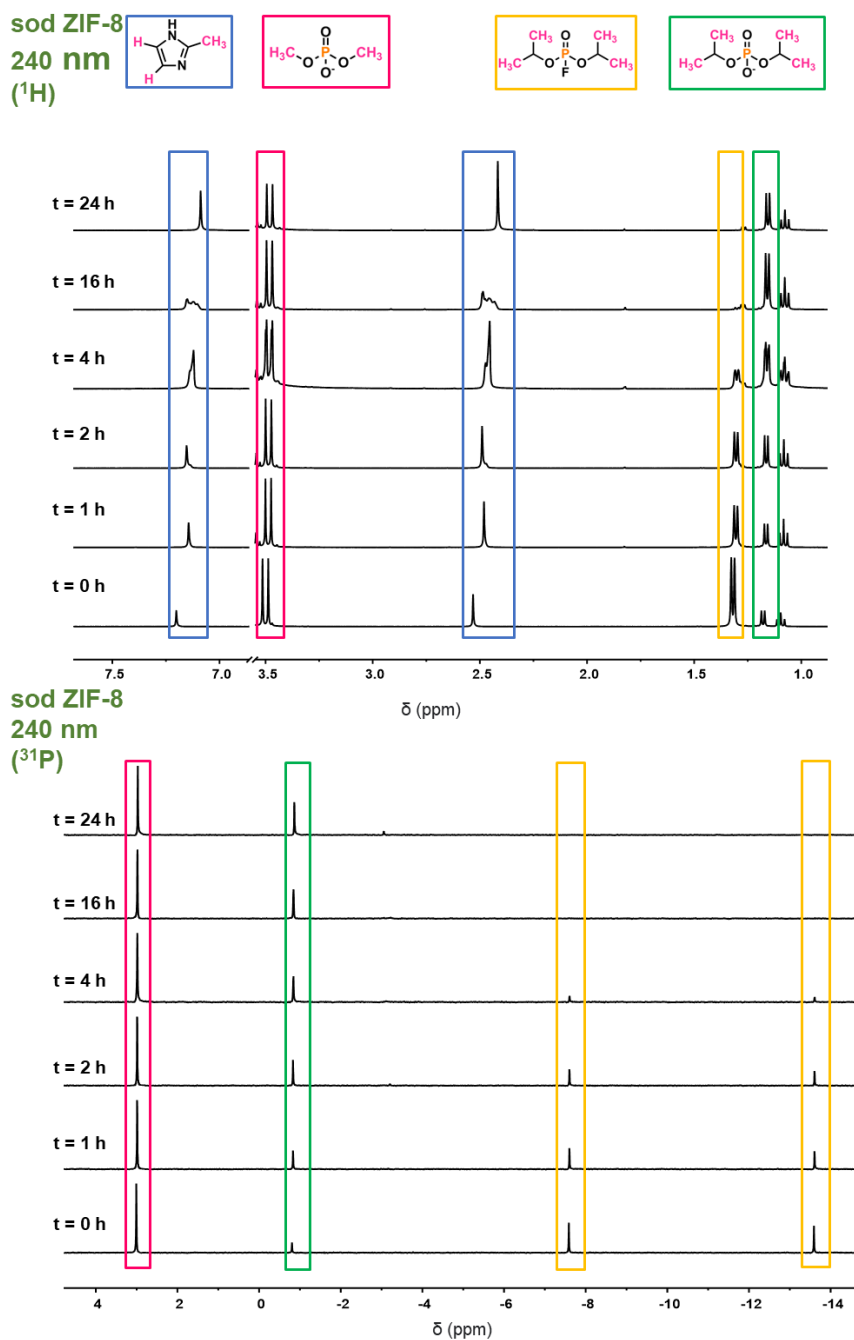


Figura AI.60. Espectro de NMR de ¹H (arriba) y NMR de ³¹P (abajo) de la degradación hidrolítica del DIFP llevada a cabo por sod ZIF-8_240 nm. Condiciones experimentales: DIFP (0.029 M), sod ZIF-8_240 nm (0.084 mmol), dimetilfosfato (0.029 M, patrón interno), Tris-DCl (0.1 M, pD 7.8, 0.5 mL), temperatura ambiente.

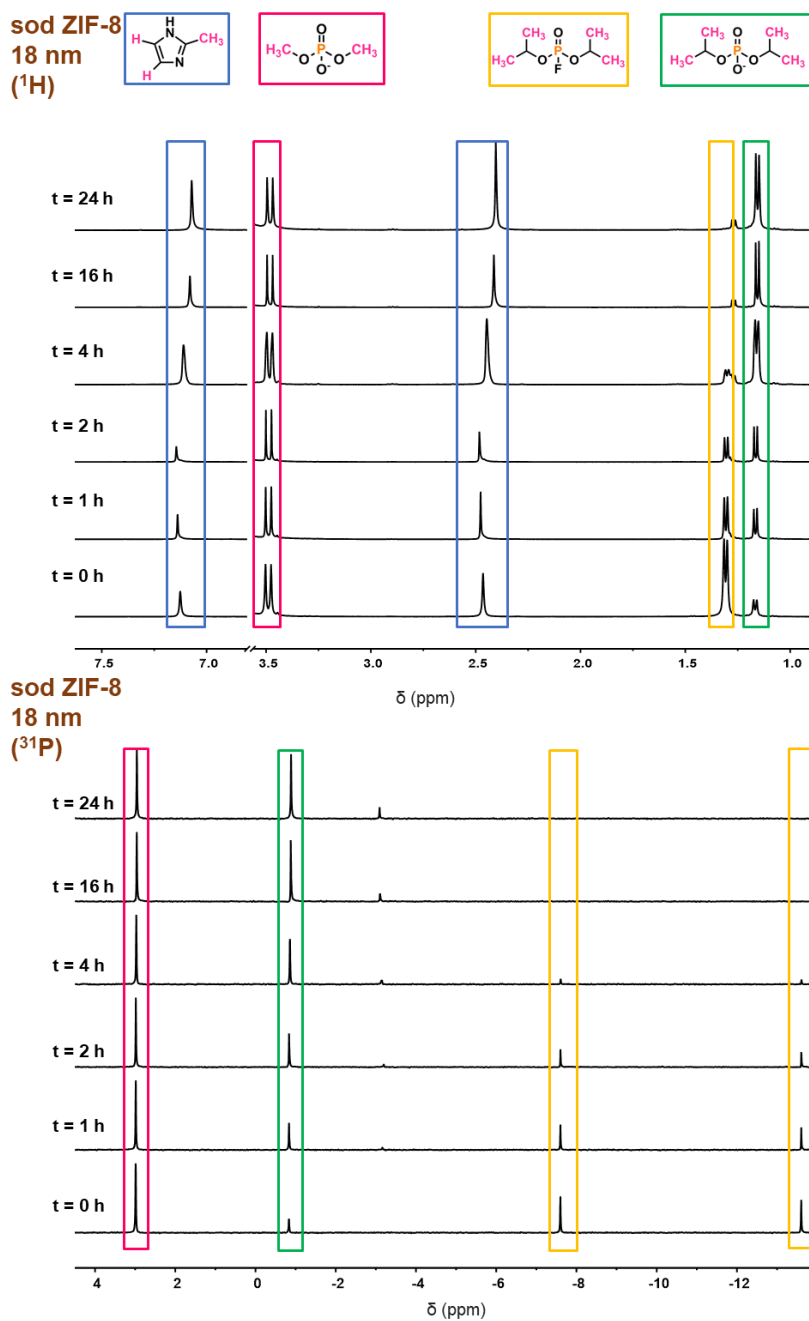


Figura AI.61. Espectro de NMR de ¹H (arriba) y NMR de ³¹P (abajo) de la degradación hidrolítica del DIFP llevada a cabo por sod ZIF-8_18 nm. Condiciones experimentales: DIFP (0.029 M), sod ZIF-8_18 nm (0.084 mmol), dimetilfosfato (0.029 M, patrón interno), Tris-DCI (0.1 M, pD 7.8, 0.5 mL), temperatura ambiente.

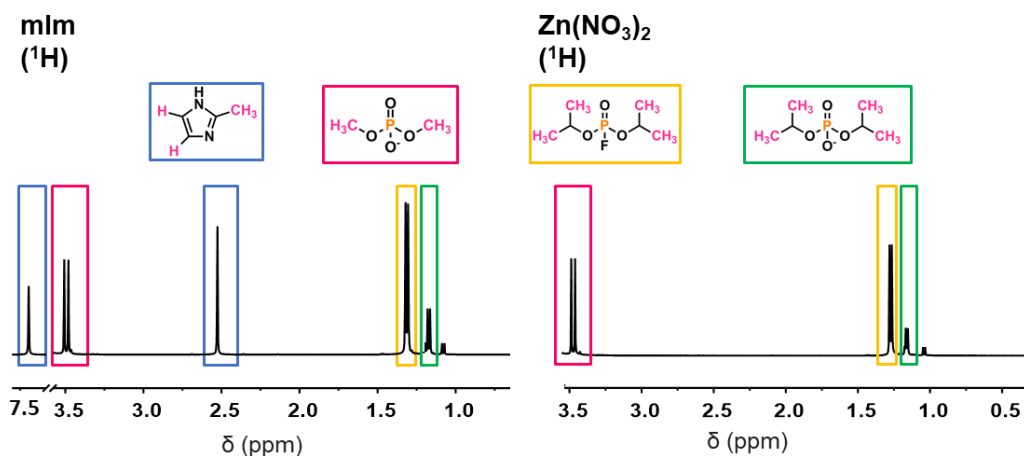


Figura A1.62. Espectro de NMR de ^1H (arriba) y NMR de ^{31}P (abajo) de la degradación hidrolítica del DIFP llevada a cabo por 2-metilimidazol (mIm) y $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ (derecha). Condiciones experimentales: DIFP (0.029 M), $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ (0.10 mmol), 2-metilimidazol (0.02 mmol), dimetilfosfato (0.029 M, patrón interno), Tris-DCI (0.1 M, pD 7.8, 0.5 mL), temperatura ambiente.

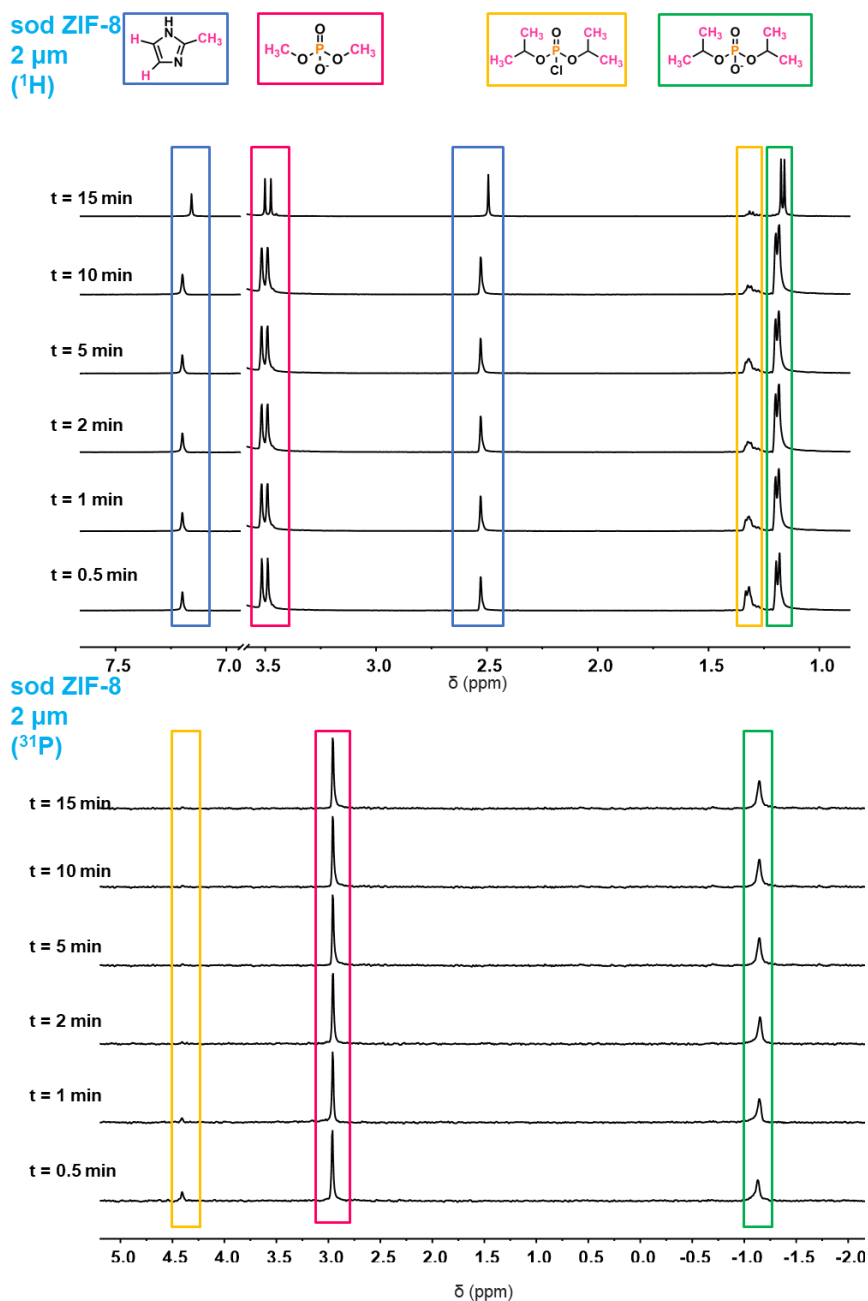


Figura AI.63. Espectro de NMR de ^1H (arriba) y NMR de ^{31}P (abajo) de la degradación hidrolítica del DICP llevada a cabo por sod ZIF-8_2 μm . Condiciones experimentales: DICP (0.029 M), sod ZIF-8_2 μm (0.084 mmol), dimetilfosfato (0.029 M, patrón interno), Tris-DCl (0.1 M, pD 7.8, 0.5 mL), temperatura ambiente.

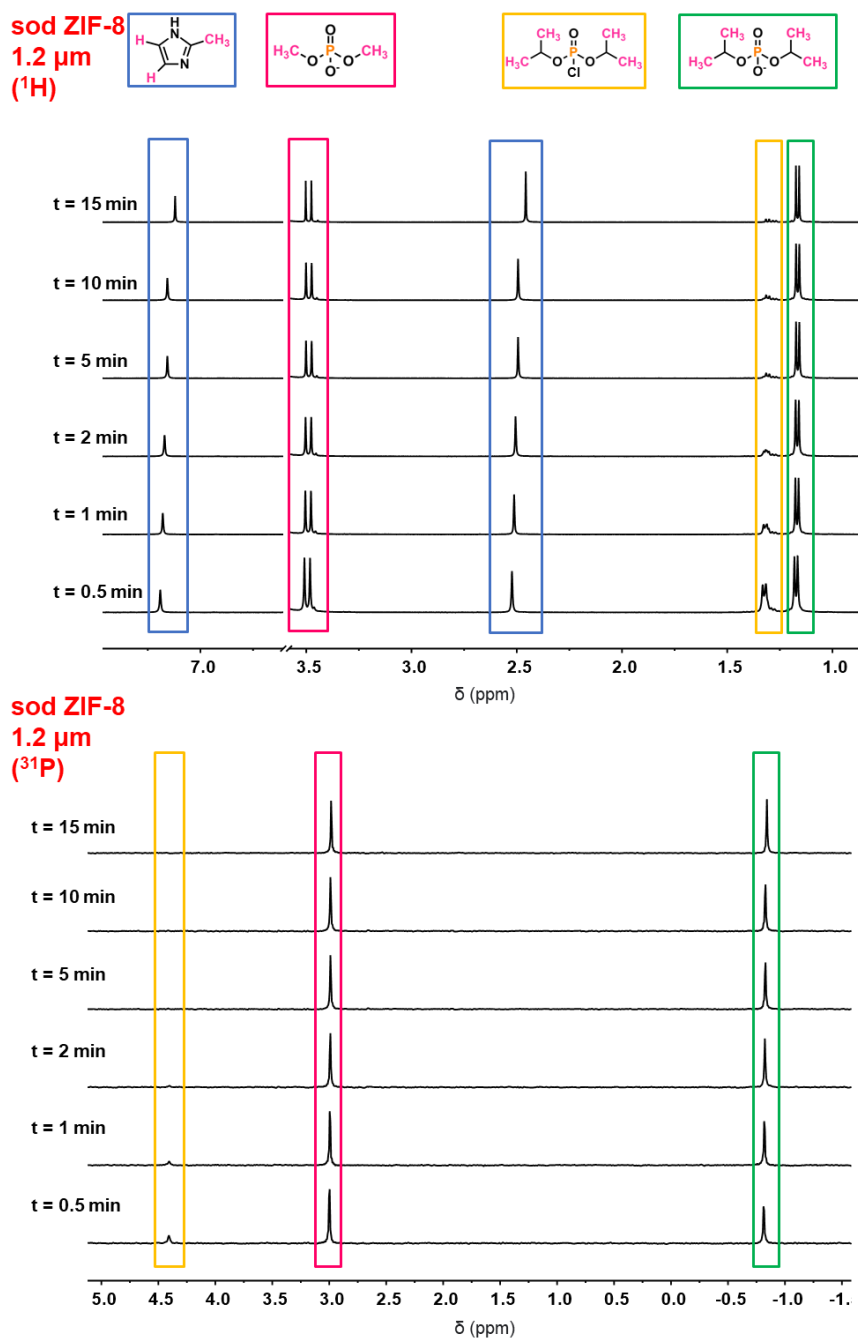


Figura AI.64. Espectro de NMR de ^1H (arriba) y NMR de ^{31}P (abajo) de la degradación hidrolítica del DICP llevada a cabo por sod ZIF-8_1.2 μm . Condiciones experimentales: DICP (0.029 M), sod ZIF-8_1.2 μm (0.084 mmol), dimetilfosfato (0.029 M, patrón interno), Tris-DCl (0.1 M, pH 7.8, 0.5 mL), temperatura ambiente.

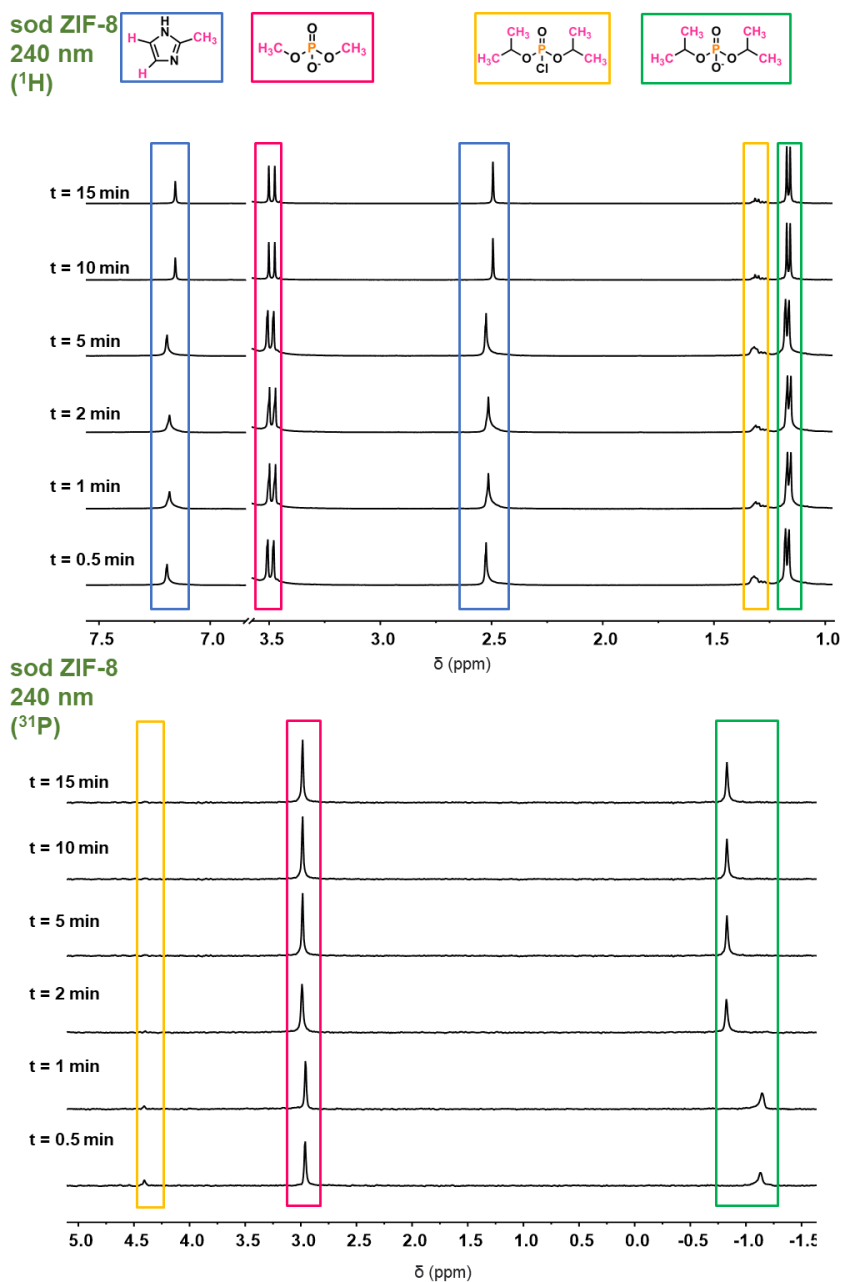


Figura AI.65. Espectro de NMR de ¹H (arriba) y NMR de ³¹P (abajo) de la degradación hidrolítica del DICP llevada a cabo por sod ZIF-8_240 nm. Condiciones experimentales: DICP (0.029 M), sod ZIF-8_240 nm (0.084 mmol), dimetilfosfato (0.029 M, patrón interno), Tris-DCl (0.1 M, pD 7.8, 0.5 mL), temperatura ambiente.

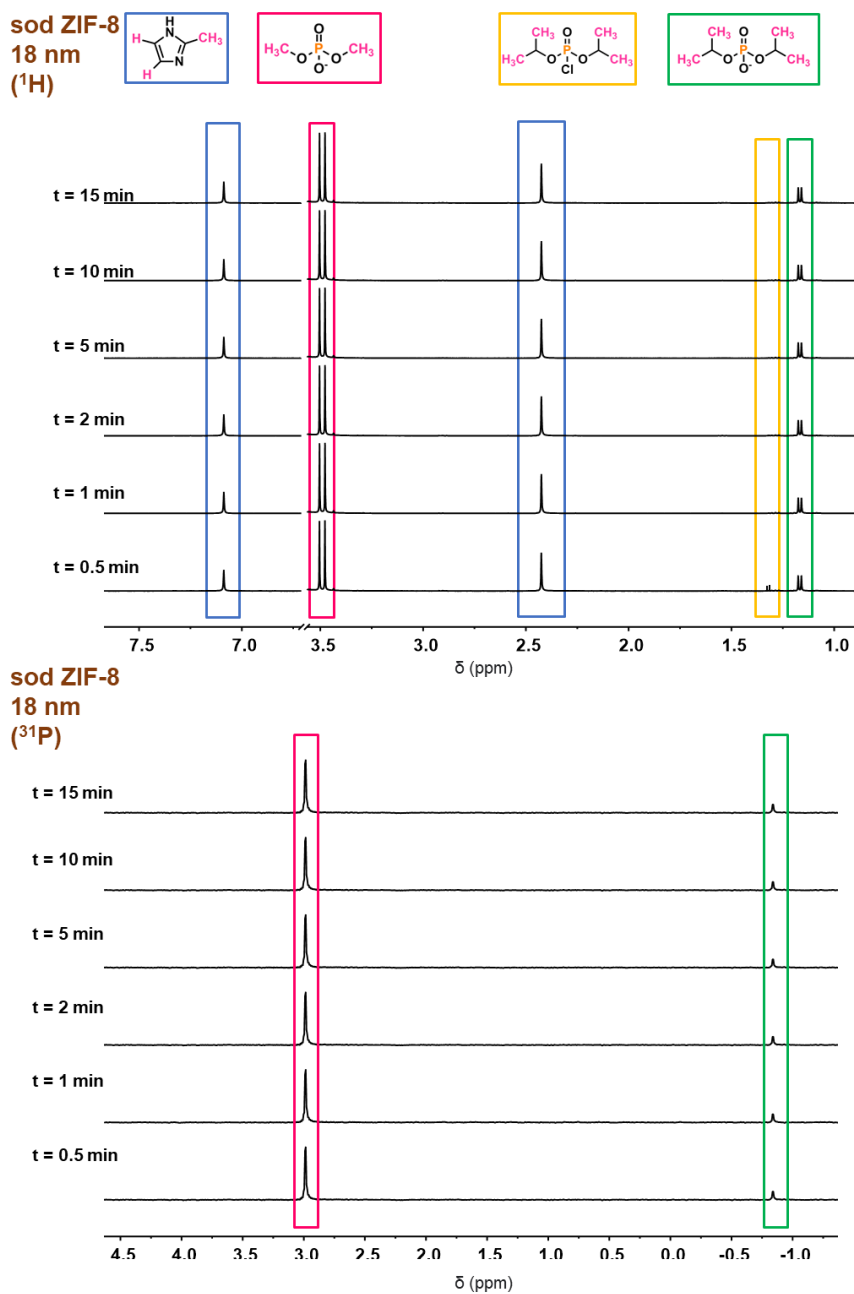


Figura AI.66. Espectro de NMR de ¹H (arriba) y NMR de ³¹P (abajo) de la degradación hidrolítica del DICP llevada a cabo por sod ZIF-8_18 nm. Condiciones experimentales: DICP (0.029 M), sod ZIF-8_18 nm (0.084 mmol), dimetilfosfato (0.029 M, patrón interno), Tris-DCl (0.1 M, pH 7.8, 0.5 mL), temperatura ambiente.

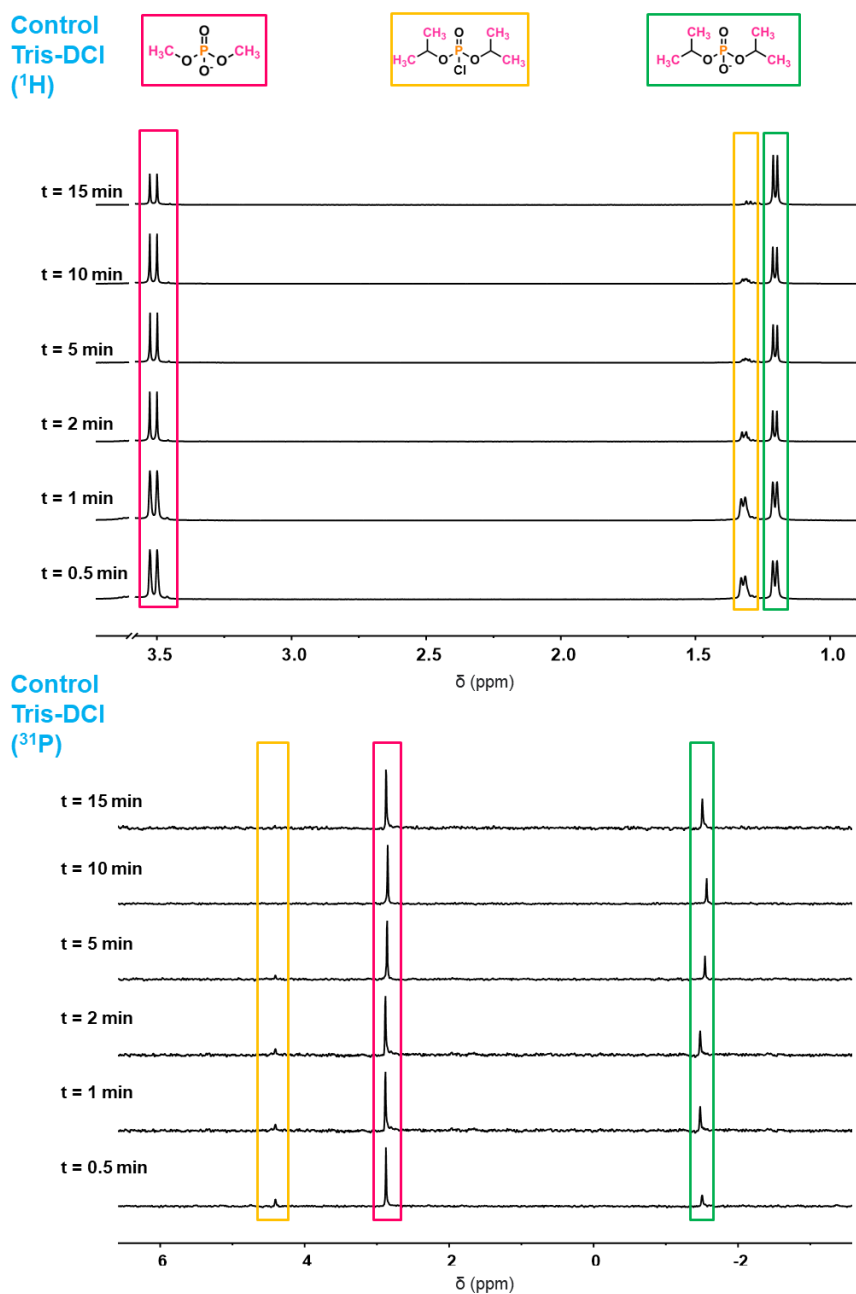


Figura AI.67. Espectro control de la estabilidad del DICP bajo condiciones biológicas simuladas analizado mediante NMR de ¹H (arriba) y NMR de ³¹P (abajo). Condiciones experimentales: DICP (0.029 M), dimetilfosfato (0.029 M, patrón interno), Tris-DCl (0.1 M, pH 7.8, 0.5 mL), temperatura ambiente.

Tabla AI.7. Liberación del ligando imidazolato tras la degradación del ZIF debida a la exposición a una disolución de Tris-HCl (0.1 M, pH 7.4) o de DIFP (0.029 M) en Tris-HCl (0.1 M, pH 7.4).

Condiciones experimentales: DIFP (0.029 M), ZIF-20 (0.084 mmol), ZIF-11 (0.084 mmol), Zn(Im)₂ (0.084 mmol), ZIF-L (0.084 mmol), ZIF-EC-1 (0.029 mmol), sod ZIF-8_2 µm (0.084 mmol), sod ZIF-8_1.2 µm (0.084 mmol), sod ZIF-8_240 nm (0.084 mmol), sod ZIF-8_18 nm (0.084 mmol), Tris-HCl (0.1 M, pH 7.4, 0.5 mL), temperatura ambiente.

Muestra	Liberación ligando imidazolato tras tratamiento DIFP (M)	Liberación ligando imidazolato tras tratamiento Tris-HCl (M)
ZIF-20	5.0×10^{-3}	3.4×10^{-3}
ZIF-11	1.7×10^{-3}	0
Zn(Im) ₂	2.4×10^{-3}	0
ZIF-L	5.7×10^{-2}	8.7×10^{-3}
ZIF-EC-1	2.2×10^{-2}	6.0×10^{-3}
Sod ZIF-8_2 µm	4.2×10^{-2}	2×10^{-2}
Sod ZIF-8_1.2 µm	5.1×10^{-2}	3.3×10^{-2}
Sod ZIF-8_240 nm	3.5×10^{-2}	2.5×10^{-2}
Sod ZIF-8_18 nm	4.5×10^{-2}	1.2×10^{-2}

Tabla AI.8. Liberación de ligandos imidazolato tras la degradación de sod ZIF-8 debida a la exposición a una disolución de DICP (0.029 M) en Tris-DCl (0.1 M, pH 7.8, 0.5 mL). Condiciones experimentales: DICP (0.029 M), sod ZIF-8_2 µm (0.084 mmol), sod ZIF-8_1.2 µm (0.084 mmol), sod ZIF-8_240 nm (0.084 mmol), sod ZIF-8_18 nm (0.084 mmol), temperatura ambiente.

Muestra	Liberación ligando 2-mIm tratamiento DICP (M)
Sod ZIF-8_2 µm	2.52×10^{-2}
Sod ZIF-8_1.2 µm	4.95×10^{-2}
Sod ZIF-8_240 nm	3.91×10^{-2}
Sod ZIF-8_18 nm	2.47×10^{-2}

4.3.3 Estudios por microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM)

En las Figura AI.68 - Figura AI.74 se muestran las imágenes de SEM de las redes metal-orgánicas micrométricas sod ZIF-8, ZIF-L y ZIF-EC-1 tras su preparación, tras su incubación en Tris-HCl a temperatura ambiente durante 24 h, y tras su incubación en una disolución de DIFP en Tris-HCl a temperatura ambiente durante 24 horas.

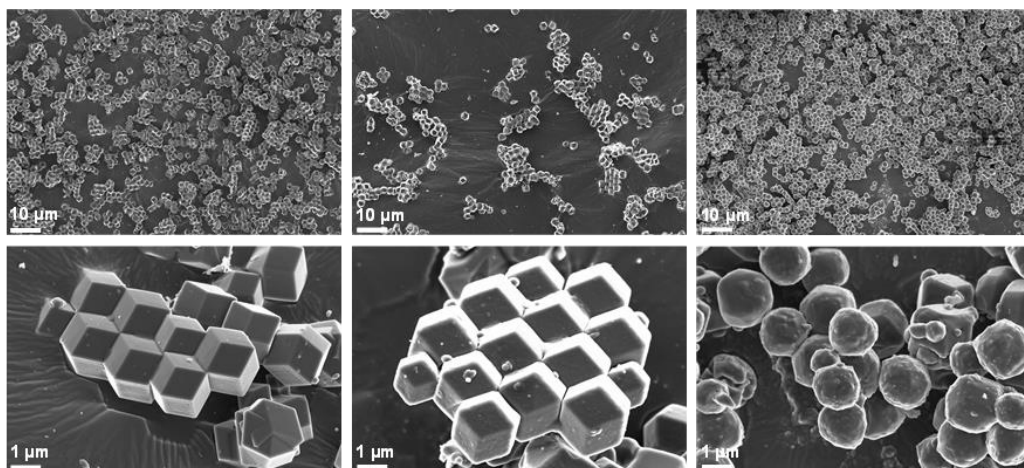


Figura AI.68. Imagen de SEM (izquierda) de partículas de sod ZIF-8 puras, (centro) de partículas de sod ZIF-8 incubadas en Tris-HCl durante 24 h y (derecha) partículas de sod ZIF-8 incubadas con Tris-HCl y DIFP durante 24 h. Condiciones experimentales: sod ZIF-8 (0.015 mmol), Tris-HCl (0.1 M, pH 7.4, 0.5 mL) y DIFP (0.18 M), temperatura ambiente.

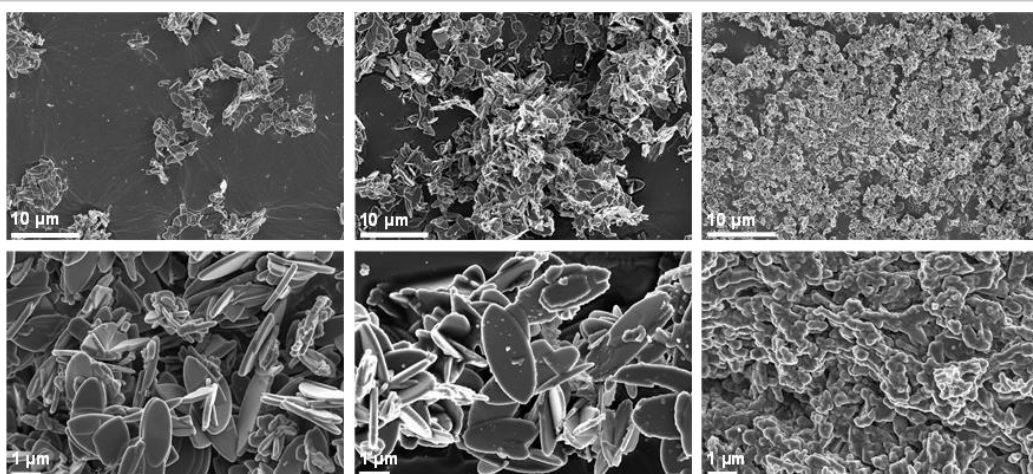


Figura AI.69. Imagen de SEM (izquierda) de partículas de ZIF-L puras, (centro) de partículas de ZIF-L incubadas en Tris-HCl durante 24 h y (derecha) partículas de ZIF-L incubadas con Tris-HCl y DIFP durante 24 h. Condiciones experimentales: ZIF-L (0.015 mmol), Tris-HCl (0.1 M, pH 7.4, 0.5 mL) y DIFP (0.18 M), temperatura ambiente.

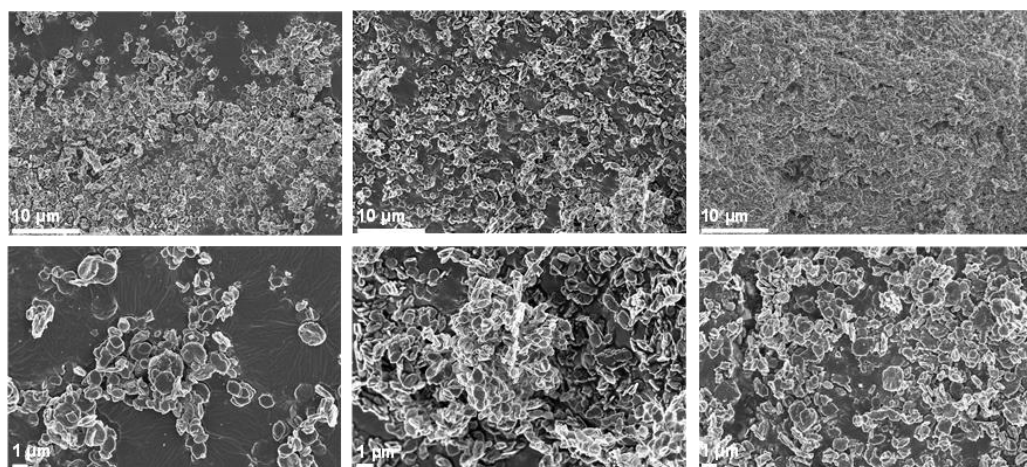


Figura AI.70. Imagen de SEM (izquierda) de partículas de ZIF-EC-1 puras, (centro) de partículas de ZIF-EC-1 incubadas en Tris-HCl durante 24 h y (derecha) partículas de ZIF-EC-1 incubadas con Tris-HCl y DIFP durante 24 h. Condiciones experimentales: ZIF-EC-1 (0.005 mmol), Tris-HCl (0.1 M, pH 7.4, 0.5 mL) y DIFP (0.18 M), temperatura ambiente.

A continuación, se muestran las imágenes de SEM de las redes metal-orgánicas sod ZIF-8 de distinto tamaño de partícula tras su preparación, y tras su incubación en una disolución de DIFP en Tris-HCl a temperatura ambiente durante 24 horas. Asimismo, con el objetivo de evaluar la disminución del tamaño de partícula de los materiales tras la degradación de su superficie como consecuencia de su reactividad con el compuesto organofosforado DIFP, se muestran la distribución de tamaño de partícula de las redes metal-orgánicas tras su preparación, y tras su incubación en la disolución de DIFP en Tris-HCl. En todos los casos, la distribución de tamaño de partícula se determinó a partir de las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica contabilizando, al menos, el tamaño de 100 partículas. Cabe resaltar que las imágenes del material sod ZIF-8 18 nm debido a su pequeño tamaño de partícula, se obtuvieron mediante microscopía electrónica de transmisión.

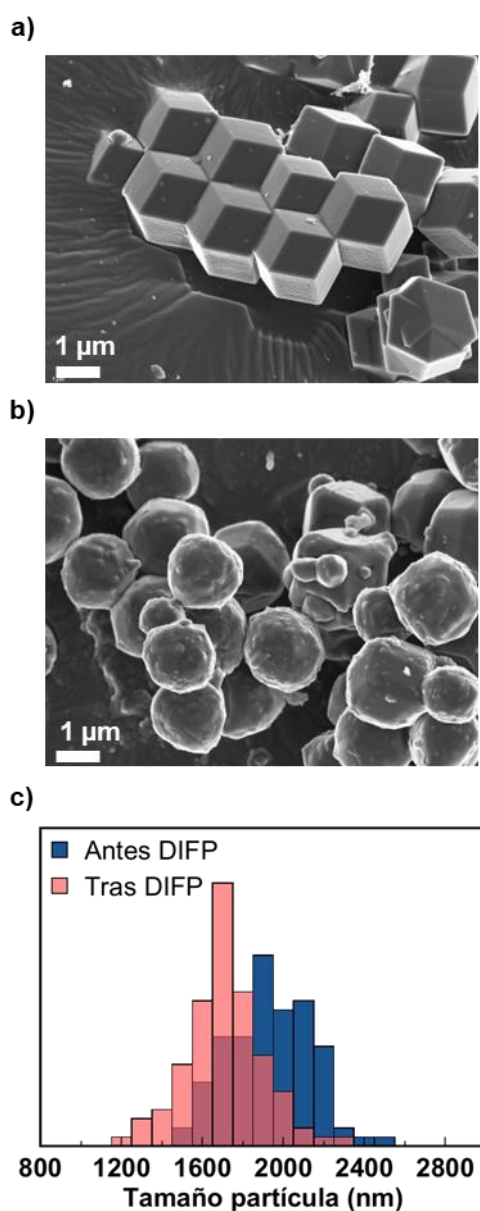


Figura AI.71. Imagen de SEM (a) de partículas de sod ZIF-8_2 μm puras y (b) de partículas de sod ZIF-8_2 μm incubadas en Tris-HCl y DIFP durante 24 h. Condiciones experimentales: sod ZIF-8_2 μm (0.015 mmol), Tris-HCl (0.1 M, pH 7.4, 0.5 mL) y DIFP (0.18 M), temperatura ambiente. (c) Distribución del tamaño de partícula de sod ZIF-8_2 μm antes (barras rojas) y después (barras azules) del tratamiento con DIFP.

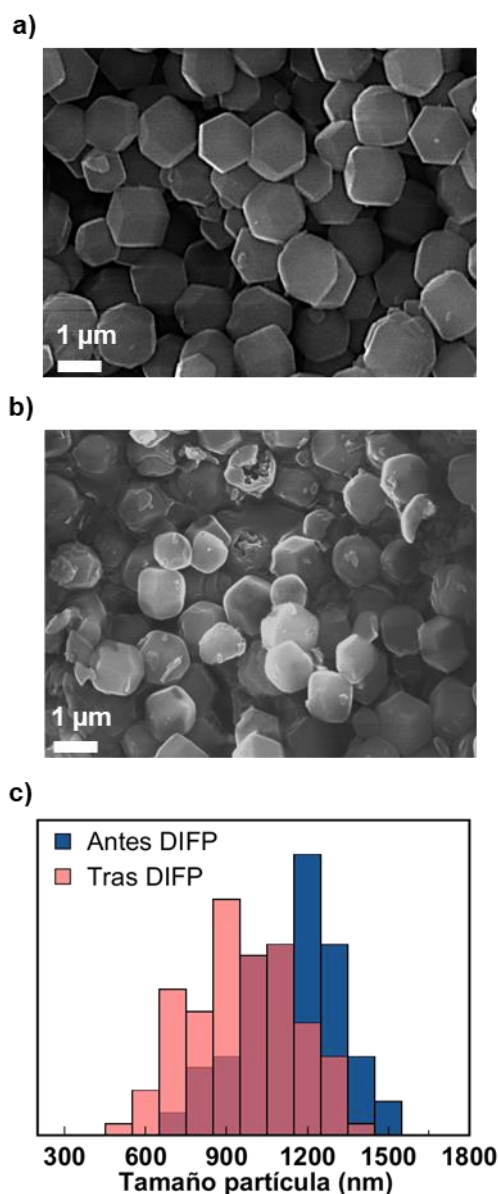


Figura AI.72. Imagen de SEM (a) de partículas de sod ZIF-8_1.2 μm puras y (b) de partículas de sod ZIF-8_1.2 μm incubadas en Tris-HCl y DIFP durante 24 h. Condiciones experimentales: sod ZIF-8_1.2 μm (0.015 mmol), Tris-HCl (0.1 M, pH 7.4, 0.5 mL) y DIFP (0.18 M), temperatura ambiente. (c) Distribución del tamaño de partícula de sod ZIF-8_1.2 μm antes (barras rojas) y después (barras azules) del tratamiento con DIFP.

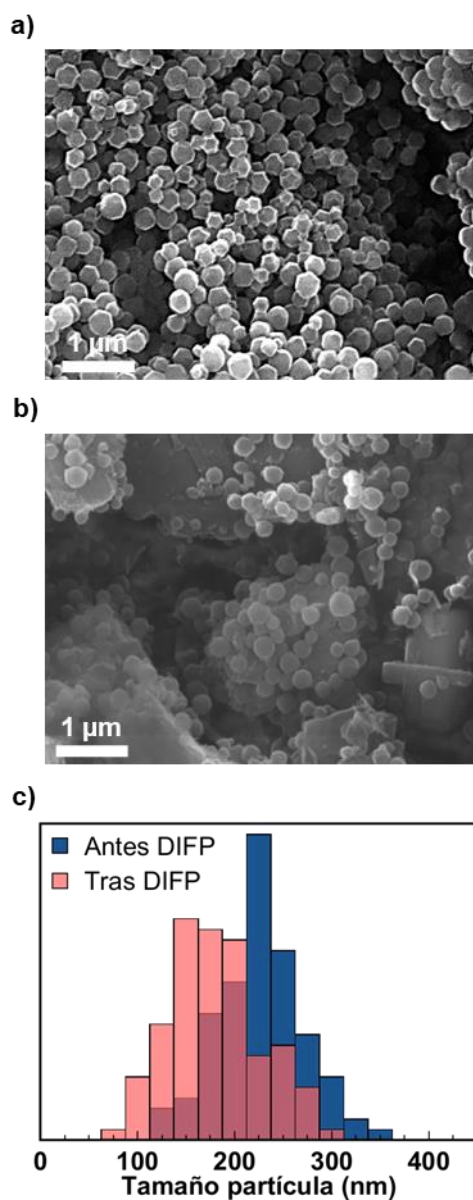


Figura AI.73. Imagen de SEM (a) de partículas de sod ZIF-8_240 nm puras y (b) de partículas de sod ZIF-8_240 nm incubadas en Tris-HCl y DIFP durante 24 h. Condiciones experimentales: sod ZIF-8_240 nm (0.015 mmol), Tris-HCl (0.1 M, pH 7.4, 0.5 mL) y DIFP (0.18 M), temperatura ambiente. (c) Distribución del tamaño de partícula de sod ZIF-8_240 nm antes (barras rojas) y después (barras azules) del tratamiento con DIFP.

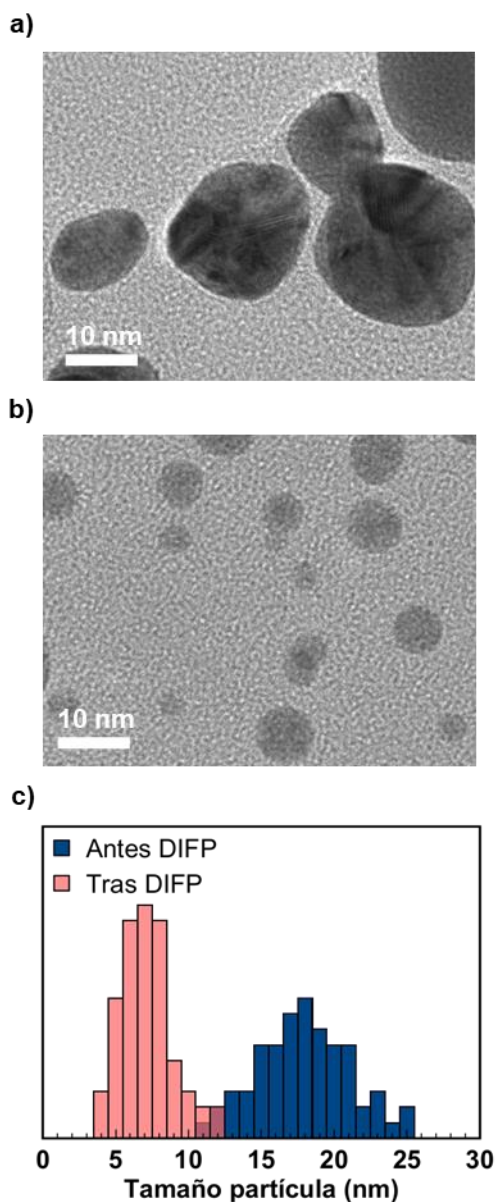


Figura AI.74. Imagen de SEM (a) de partículas de sod ZIF-8_18 nm puras y (b) de partículas de sod ZIF-8_18 nm incubadas en Tris-HCl y DIFP durante 24 h. Condiciones experimentales: sod ZIF-8_18 nm (0.015 mmol), Tris-HCl (0.1 M, pH 7.4, 0.5 mL) y DIFP (0.18 M), temperatura ambiente. (c) Distribución del tamaño de partícula de sod ZIF-8_18 nm antes (barras rojas) y después (barras azules) del tratamiento con DIFP.

4.3.4 Espectroscopía de masas por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)

Con el objetivo de estimar la lixiviación de iones Zn^{2+} que tiene lugar como consecuencia de la degradación de las redes metal-orgánicas zeomiméticas tras su incubación en medio fisiológico simulado, los materiales sod ZIF-8_2 μm (0.084 mmol), ZIF-L (0.084 mmol) y ZIF-EC-1 (0.029 mmol) se añadieron a 0.5 mL de una disolución de Tris-HCl (0.1 M, pH 7.4) y se mantuvieron en agitación durante 24 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, el sólido se separó del líquido mediante centrifugación. El sobrenadante se recuperó, se acidificó con ácido nítrico (concentración final del 2 %) y se cuantificó la concentración de iones Zn^{2+} en la disolución mediante espectroscopía ICP-MS. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla AI.9:

Tabla AI.9. Iones Zn^{2+} liberados por sod ZIF-8, ZIF-L y ZIF-EC-1 tras incubarse en Tris-HCl (0.1 M, pH 7.4, 0.5 mL) a temperatura ambiente durante 24 h, expresados como porcentaje de contenido total de Zn y concentración de iones Zn^{2+} .

	Zn^{2+} liberado de ZIF (%)	$[\text{Zn}^{2+}]$ sobrenadante (mM)
Sod ZIF-8	2.93	4.93
ZIF-L	3.33	5.73
ZIF-EC-1	5.27	8.72

4.4 Ensayos enzimáticos

Todos los ensayos para determinar la actividad enzimática del AChE se realizaron mediante el método colorimétrico del azul índigo [8], [9], siguiendo el procedimiento detallado en la sección 2.4 de este Anexo.

4.4.1 Ensayos de reactivación de AChE

Inicialmente, se estudió la capacidad de distintos ligandos imidazólicos (HpIm, HIm y HmIm) para restaurar la actividad enzimática de la AChE inhibida en un 50 % mediante el compuesto DIFP. Cabe resaltar que no fue posible realizar estos ensayos con el ligando imidazólico HbIm debido a su baja solubilidad en disolución acuosa.

Para la realización de los experimentos de reactivación enzimática, se prepararon diferentes disoluciones en una placa de 24 pocillos mezclando 725 μL de PBS (100 mM,

pH = 7.4), 25 μL de una disolución acuosa de AChE (75 U/mL) y 100 μL de una disolución acuosa de DIFP (concentración en el pocillo de 5×10^{-6} M) y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C para que tuviera lugar la inhibición parcial de la enzima. Transcurrido este tiempo, se añadieron 100 μL de una disolución acuosa de cada ligando imidazolato a distinta concentración (concentración final: de 10^{-4} M a 0.1 M); y las mezclas se incubaron durante 30 minutos adicionales a 37°C para que la reactivación enzimática tuviera lugar. A continuación, se determinó la actividad enzimática de la AChE en cada pocillo mediante el método colorimétrico del azul índigo.

Además, se realizaron dos ensayos enzimáticos adicionales como controles:

i) Un ensayo enzimático control para determinar la actividad enzimática de la AChE en ausencia del compuesto tóxico DIFP (actividad control de la enzima). En este caso, se preparó una disolución conteniendo 725 μL de PBS (100 mM, pH = 7.4), 25 μL de una disolución acuosa de AChE (75 U/mL) y 200 μL de agua y se incubó durante 60 minutos a 37 °C. A continuación, se determinó la actividad enzimática el método colorimétrico del azul índigo.

ii) Un ensayo enzimático control para determinar la actividad enzimática de la AChE en presencia del DIFP y en ausencia de reactivador (actividad enzimática de inhibición). Este ensayo se realizó siguiendo el mismo protocolo que para los ensayos de reactivación enzimática detallados anteriormente, excepto que se añadieron 100 μL de agua en vez de 100 μL de disolución acuosa conteniendo los iones imidazólicos a la disolución de PBS conteniendo a la enzima y al agente nervioso modelo DIFP. Como en los casos anteriores, la actividad enzimática se determinó espectrofotométricamente mediante el método del azul índigo.

Posteriormente, se determinó la capacidad de reactivación de la AChE de aquellos ligandos imidazolato liberados tras la degradación del ZIF en fluido biológico simulado.

Para la realización de estos experimentos, se suspendieron las redes metal-orgánicas zeomiméticas $\text{Zn}(\text{Im})_2$ (0.588 mmol), sod ZIF-8_2 μm (0.588 mmol), sod ZIF-8_18 nm (0.588 mmol), ZIF-L (0.588 mmol) o ZIF-EC-1 (0.203 mmol) en 3.5 mL de Tris-HCl (0.1 M, pH 7.4) y se mantuvieron en agitación, y a temperatura ambiente, durante 24 h.

Tras esto, el sobrenadante se separó del sólido mediante centrifugación (15000 rpm x 5 min).

A continuación, se prepararon diferentes disoluciones en una placa de 24 pocillos mezclando 825 μL de los sobrenadantes anteriores con 25 μL de una disolución acuosa de AChE (75 U/mL) y 100 μL de una disolución de DIFP (concentración final 5×10^{-6} M). Las mezclas se incubaron durante 1 h a 37 °C. Tras este tiempo, se determinó la actividad enzimática de la AChE en cada pocillo mediante el método colorimétrico de azul índigo. Asimismo, se realizaron dos experimentos controles adicionales para determinar la actividad control de la enzima y actividad enzimática de la AChE inhibida, siguiendo el mismo protocolo detallado en los párrafos anteriores.

Los perfiles de reactivación enzimática en función de la concentración del ligando para los compuestos imidazólicos HpIm y HIm se muestran en la Figura AI.75. El perfil de reactivación del ligando HmIm se encuentra en la memoria.

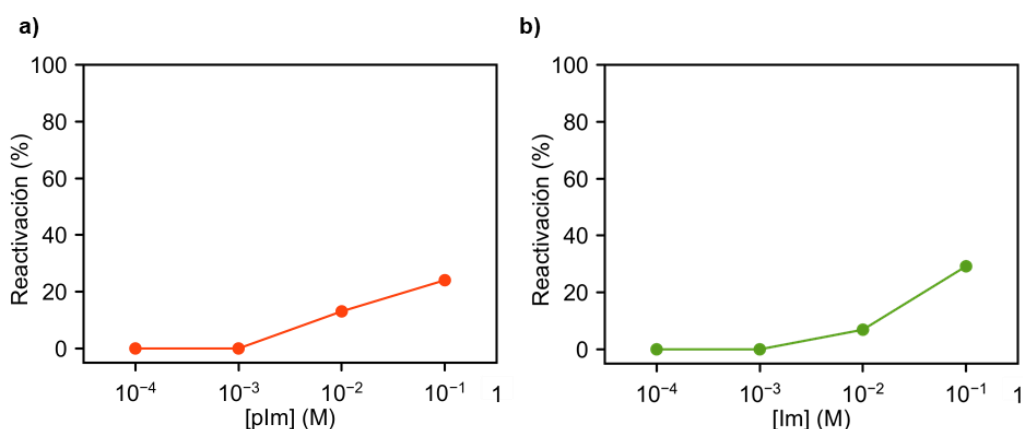


Figura AI.75. (a) Perfil de reactivación de AChE inhibida por DIFP gracias a (a) pIm libre (gráfica roja) y (b) Im libre (gráfica verde).

4.4.2 Estudios de detoxificación

Se llevaron a cabo ensayos enzimáticos adicionales, llamados ensayos de detoxificación, para determinar si los ZIFs son capaces de mitigar el efecto inhibitorio del DIFP sobre la actividad de la AChE a diferentes tiempos de incubación (1 h, 3 h y 24 h).

Para ello, se adicionaron las redes metal-orgánicas sod ZIF-8_2 μm (0.084 mmol), sod ZIF-8_18 nm (0.084 mmol), ZIF-L (0.084 mmol) o ZIF-EC-1 (0.029 mmol) a 0.5 mL de una disolución DIFP (0.029 M) en Tris-HCl (0.1 M, pH 7.4) y las mezclas se agitaron a temperatura ambiente. Tras diferentes intervalos de tiempo (1 h, 3 h y 24 h), se separó el sobrenadante del sólido de cada una de las suspensiones anteriores mediante centrifugación (15000 rpm x 5 min), se recuperó el sobrenadante y se diluyó 580 veces (concentración de DIFP en la disolución control diluida de 5×10^{-5} M).

Por otra parte, en una placa de 24 pocillos, se mezclaron 825 μL de Tris-HCl (0.1 M, pH 7.4), 25 μL de una disolución acuosa de AChE (75 U/mL) y 100 μL de las disoluciones diluidas anteriores; y las mezclas se incubaron durante 1 hora para que la reacción de inhibición enzimática debido al DIFP tuviera lugar. A continuación, se determinó espectrofotométricamente la actividad enzimática en las disoluciones mediante el método azul índigo siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Además, se realizó un ensayo enzimático control para determinar la actividad enzimática de la AChE en ausencia del compuesto tóxico DIFP, siguiendo el procedimiento descrito en la sección anterior. Cabe resaltar que todos los ensayos se determinaron por triplicado.

El porcentaje de detoxificación se determinó según la siguiente expresión:

$$\text{Detoxificación (\%)} = \left(1 - \frac{I_{ZIF}}{I_{INH}}\right) \times 100$$

I_{ZIF} = Porcentaje de inhibición de AChE para los experimentos con ZIFs

I_{INH} = Porcentaje de inhibición de AChE para los experimentos control de inhibición

En la Tabla AI.10 se muestran los porcentajes de reactivación y detoxificación estimados a partir de los resultados de los ensayos enzimáticos realizados.

Tabla AI.10. Reactivación de AChE inhibida por DIFP gracias a los ligandos imidazolato liberados tras la degradación de los ZIFs producida durante 24 h de incubación en Tris-HCl (0.1 M, pH 7.4).

Actividad detoxificadora de los ZIFs tras la exposición a DIFP durante 1 h, 3 h y 24 h

	Reactivación	Detoxificación		
	24 h (%)	1 h (%)	3 h (%)	24 h (%)
ZIF-L	12.8 ± 3.7	14.2	83.3	100
ZIF-EC-1	9.0 ± 0.4	17.3	71.7	100
Sod ZIF-8_2 µm	37.1 ± 3.8	7.1	13.3	100
Sod ZIF-8_18 nm	53.5 ± 8.7	91.3	100	100

4.5 Cultivos celulares y ensayos de viabilidad

Con el objetivo de evaluar la neurotoxicidad de los compuestos sod ZIF-8_240 nm y sod ZIF-8_18 nm, se llevaron ensayos de viabilidad celular in vitro frente a cultivos de la línea la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Para ello, las células se cultivaron en forma de suspensión en medio RPMI-1640 (Sigma Aldrich R5886), suplementado con FBS al 20 % (Sigma Aldrich F4135), L-glutamina 4 mM (Sigma Aldrich G7513), piruvato de sodio 1 mM (Sigma Aldrich S8636) y glucosa 4.5 mg/mL a 37 °C en atmósfera humidificada con CO₂ al 5 % y se mantuvieron empleando técnicas de cultivos celulares estándar. La toxicidad de las muestras se determinó mediante el ensayo colorimétrico MTS. Los ensayos de viabilidad celular fueron llevados a cabo en su totalidad por el servicio de Cultivos de Tejidos y Banco Celular perteneciente al Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, que también proporcionó la línea celular.

4.6 Síntesis y caracterización de materiales híbridos esterasa@ZIF

Se llevó a cabo la síntesis de materiales híbridos esterasa@ZIF con objeto de evaluar la capacidad de los ZIFs para actuar como sistemas transportadores de biomoléculas. El método empleado para ello fue la mineralización biomimética, llevándose a cabo cuatro réplicas del experimento. Respecto al procedimiento experimental, en cada caso se

añadió inicialmente 1 mL de una disolución acuosa de $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ (7 mM) a 1 mL de disolución acuosa de 2-metilimidazol (299 mM) junto con esterasa porcina comercial (3.24 mg/mL, 20 KU, Sigma Aldrich E3019), de forma lenta pero constante y en viales de centrifuga de fondo redondo de 2 mL, y la mezcla resultante se agitó tres veces por inversión. Tras esto, la muestra se incubó durante 24 h a temperatura ambiente y se separó el sobrenadante del sólido mediante centrifugación (15000 rpm x 5 min). Dicho sobrenadante sería utilizado posteriormente para determinar la concentración de proteína, y con ello la eficiencia de encapsulación, mediante un ensayo tipo Bradford (véase apartado 4.6.1). Las distintas muestras se lavaron entonces con agua (3 x 1 mL), mezclándose tras cada lavado primero con ayuda de una espátula y luego con ayuda de un agitador tipo vórtex durante 10 s. Tras el último lavado, se tomaron 30 μL de cada muestra y se depositaron en una placa de sílice para llevar a cabo la caracterización por PXRD. A continuación, una de las réplicas se dejó secar al aire y a temperatura ambiente durante 24 h, para posteriormente ser pesada y analizada por FTIR. Con las tres réplicas restantes, se llevó a cabo un ensayo de actividad enzimática para determinar la actividad remanente tras el proceso de encapsulación (véase apartado 4.6.2).

4.6.1 Ensayo de Bradford

El método de Bradford se trata de una técnica colorimétrica utilizada para la cuantificación de proteínas. Está basado en la variación de absorbancia que se produce como consecuencia del cambio de color que experimenta el colorante azul brillante Coomassie G-250, habitualmente denominado “reactivo de Bradford”. La forma aniónica de este colorante (presente a $\lambda = 595 \text{ nm}$ y de color azul) interacciona uniéndose con determinados residuos proteicos, por lo que su cantidad es proporcional a la cantidad de proteínas en disolución. [20] Para llevar a cabo dicho ensayo, inicialmente se prepararon disoluciones de albúmina sérica bovina (BSA, del inglés *bovine serum albumin*) con diferentes concentraciones (0, 0.1, 0.25, 0.5, 1 y 1.4 mg/mL), con objeto de llevar a cabo una curva de calibrado posteriormente. En cada caso (tanto muestras de la curva de calibrado como muestras de concentración proteica desconocida) se añadieron 33.3 μL de muestra junto con 1 mL de reactivo de Bradford comercial (Sigma Aldrich B6916) a una cubeta de plástico (1.6 mL volumen, 1 cm diámetro). Tras esto, se agitó cada cubeta

levemente para homogeneizar la mezcla y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se determinó la absorbancia a $\lambda = 590$ nm de las muestras mediante espectroscopía UV-Vis. Finalmente, se determinó la concentración de proteína de aquellas muestras de concentración desconocida haciendo uso de la Ley de Lambert-Beer (Ecuación AI.2) y la curva de calibrado construida.

$$\text{Absorbancia} = \epsilon \cdot l \cdot c$$

ϵ = coeficiente de extinción molar

l = longitud atravesada por la luz en el medio

c = concentración del absorbente en el medio

Ecuación AI.2. Ley de Lambert Beer. Adaptada de la referencia [21].

4.6.2 Ensayos de actividad enzimática

Los ensayos de actividad enzimática se hicieron siguiendo el método colorimétrico del *p*-nitrofenil acetato. Dicho método se basa en la hidrólisis, por parte de una enzima esterasa, del *p*-nitrofenil acetato (sustrato incoloro) a *p*-nitrofenol (producto coloreado), que puede seguirse mediante espectrometría UV-Vis a $\lambda = 405$ nm. [22] Para llevar a cabo estos ensayos, inicialmente se resuspendió cada muestra en 1 mL de tampón citrato (100 mM, pH 5.5) y la mezcla se incubó durante 3 h a temperatura ambiente en un agitador rotatorio. Pasado este tiempo, se tomaron 33.3 μ L de cada muestra para llevar a cabo un ensayo Bradford (con objeto de determinar la concentración de proteína y posteriormente calcular la actividad enzimática específica). Por otra parte, se añadieron 30 μ L de cada muestra a una cubeta de plástico (volumen 4 mL y diámetro 1 cm) junto con 970 μ L de tampón citrato (100 mM, pH 5.5). Para iniciar el ensayo enzimático, se añadieron a cada muestra 10 μ L de una disolución en DMSO de *p*-nitrofenil acetato (200 mM). Entonces, se monitoreó la absorbancia a $\lambda = 405$ nm durante 30 min mediante espectroscopía UV-Vis. La actividad enzimática específica (en $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) se determinó aplicando la Ley de Lambert-Beer (Ecuación AI.2) de acuerdo con la Ecuación AI.3 ($\epsilon = 9360 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$):

$$\frac{V \cdot \Delta A}{\epsilon \cdot t \cdot \text{enzima}}$$

V = volumen final de reacción (μL)

ΔA = absorbancia a la longitud de onda del ensayo dividida por la longitud de la trayectoria de la luz (cm)

ϵ = coeficiente de extinción molar ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

t = tiempo de reacción (min)

enzima = cantidad de enzima presente en la reacción (mg)

Ecuación A1.3. Ecuación utilizada para calcular la actividad enzimática en U mg^{-1} ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$).
[23].

Asimismo, se realizaron ensayos por triplicado con esterasa libre (concentración final 0.36 mg/mL) de la misma forma a modo de control, con objeto de determinar el porcentaje de actividad remanente en el enzima tras el proceso de encapsulación.

5 Referencias bibliográficas

- [1] R. H. Blessing, «An Empirical Correction for Absorption Anisotropy», 1995.
- [2] G. M. Sheldrick, «SHELXT - Integrated space-group and crystal-structure determination», *Acta Crystallogr A*, vol. 71, n.º 1, pp. 3-8, ene. 2015, doi: 10.1107/S2053273314026370.
- [3] O. V. Dolomanov, L. J. Bourhis, R. J. Gildea, J. A. K. Howard, y H. Puschmann, «OLEX2: A complete structure solution, refinement and analysis program», *J Appl Crystallogr*, vol. 42, n.º 2, pp. 339-341, 2009, doi: 10.1107/S0021889808042726.
- [4] A. L. Spek, «PLATON SQUEEZE: A tool for the calculation of the disordered solvent contribution to the calculated structure factors», *Acta Crystallogr C Struct Chem*, vol. 71, pp. 9-18, ene. 2015, doi: 10.1107/S2053229614024929.
- [5] L. González, R. Gil-San-Millán, J. A. R. Navarro, C. R. Maldonado, E. Barea, y F. J. Carmona, «Green synthesis of zirconium MOF-808 for simultaneous phosphate recovery and organophosphorus pesticide detoxification in wastewater», *J Mater Chem A Mater*, vol. 10, n.º 37, pp. 19606-19611, abr. 2022, doi: 10.1039/d2ta02074b.
- [6] Z. Radić *et al.*, «Refinement of structural leads for centrally acting oxime reactivators of phosphylated cholinesterases», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, n.º 15, pp. 11798-11809, abr. 2012, doi: 10.1074/jbc.M111.333732.
- [7] D. S. Biovia, *Materials Studio* R2. San Diego, CA: Dassault Systèmes BIOVIA, 2018.
- [8] M. Pohanka, M. Hrabínová, K. Kuca, y J. P. Simonato, «Assessment of acetylcholinesterase activity using indoxylacetate and comparison with the standard Ellman's method», *Int J Mol Sci*, vol. 12, n.º 4, pp. 2631-2640, 2011, doi: 10.3390/ijms12042631.
- [9] J. Seixas De Melo, A. P. Moura, y M. J. Melo, «Photophysical and spectroscopic studies of indigo derivatives in their keto and leuco forms», *Journal of Physical Chemistry A*, vol. 108, n.º 34, pp. 6975-6981, ago. 2004, doi: 10.1021/jp049076y.
- [10] C. Lang *et al.*, «Biomimetic Transmembrane Channels with High Stability and Transporting Efficiency from Helically Folded Macromolecules», *Angewandte Chemie*, vol. 128, n.º 33, pp. 9875-9879, ago. 2016, doi: 10.1002/ange.201604071.
- [11] A. Le Bail, H. Duroy, y J. L. Fourquet, «Ab-initio structure determination of LiSbW08 by X-ray powder diffraction», *Mater Res Bull*, vol. 23, pp. 447-452, 1988.
- [12] «<https://www.3ds.com/products-services/biovia/products/molecular-modeling-simulation/biovia-materials-studio/>».
- [13] J. I. Deneff, K. S. Butler, P. G. Kotula, B. E. Rue, y D. F. Sava Gallis, «Expanding the ZIFs Repertoire for Biological Applications with the Targeted Synthesis of ZIF-20 Nanoparticles», *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 13, n.º 23, pp. 27295-27304, jun. 2021, doi: 10.1021/acsami.1c05657.
- [14] M. He, J. Yao, Q. Liu, Z. Zhong, y H. Wang, «Toluene-assisted synthesis of RHO-type zeolitic imidazolate frameworks: Synthesis and formation mechanism of ZIF-11 and ZIF-12», *Dalton Transactions*, vol. 42, n.º 47, pp. 16608-16613, dic. 2013, doi: 10.1039/c3dt52103f.
- [15] N. Masciocchi *et al.*, «Synthesis and ab-initio XRPD structure of group 12 imidazolato polymers», *Chemical Communications*, vol. 3, n.º 16, pp. 2018-2019, 2003, doi: 10.1039/b302840b.
- [16] J. Cravillon, R. Nayuk, S. Springer, A. Feldhoff, K. Huber, y M. Wiebcke, «Controlling zeolitic imidazolate framework nano- and microcrystal formation: Insight into crystal growth by time-resolved in situ static light scattering», *Chemistry of Materials*, vol. 23, n.º 8, pp. 2130-2141, abr. 2011, doi: 10.1021/cm103571y.
- [17] R. Chen *et al.*, «A two-dimensional zeolitic imidazolate framework with a cushion-shaped cavity for CO2 adsorption», *Chemical Communications*, vol. 49, n.º 82, pp. 9500-9502, sep. 2013, doi: 10.1039/c3cc44342f.
- [18] M. Ge *et al.*, «High-Throughput Electron Diffraction Reveals a Hidden Novel Metal–Organic Framework for Electrocatalysis», *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 60, n.º 20, pp. 11391-11397, may 2021, doi: 10.1002/anie.202016882.
- [19] G. Šinko, M. Čalić, A. Bosak, y Z. Kovarik, «Limitation of the Ellman method: Cholinesterase activity measurement in the presence of oximes», *Anal Biochem*, vol. 370, n.º 2, pp. 223-227, nov. 2007, doi: 10.1016/j.ab.2007.07.023.
- [20] M. Bradford, «A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding», *Anal Biochem*, vol. 72, n.º 1-2, pp. 248-254, may 1976, doi: 10.1006/abio.1976.9999.
- [21] D. F. Swinehart, «The Beer-Lambert Law», *J Chem Educ*, vol. 39, n.º 7, p. 333, jul. 1962, doi: 10.1021/ed039p333.

- [22] N. Valkova, F. Lépine, L. Labrie, M. Dupont, y R. Beaudet, «Purification and Characterization of PrbA, a New Esterase from *Enterobacter cloacae* Hydrolyzing the Esters of 4-Hydroxybenzoic Acid (Parabens)», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, n.º 15, pp. 12779-12785, abr. 2003, doi: 10.1074/jbc.M213281200.
- [23] H. Bisswanger, «Enzyme assays», *Perspect Sci (Neth)*, vol. 1, n.º 1-6, pp. 41-55, may 2014, doi: 10.1016/j.pisc.2014.02.005.

ANEXO II

LISTADO DE PUBLICACIONES

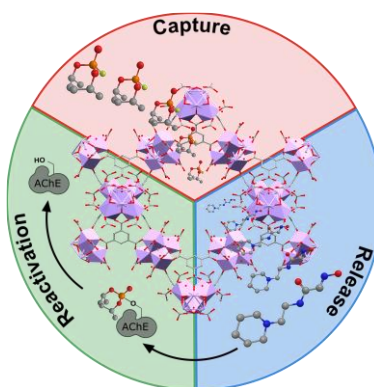


Imagen obtenida de Vectorportal.com

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS DOCTORAL

1. Oxime@Zirconium-Metal-Organic Framework Hybrid Material as a Potential Antidote for Organophosphate Poisoning.

González, L.,[#] Martín-Romera, J. D.,[#] Sánchez-Sánchez, P., Navarro, J. A. R., Barea, E., Maldonado, C. R., & Carmona, F. J. *Inorganic Chemistry*, **2023**, 62, 5049–5053. [#] = igual contribución.



2. Zirconium Metal-Organic Polyhedra with Dual Behavior for Organophosphate Poisoning Treatment.

Delgado, P.,[#] Martin-Romera, J. D.,[#] Perona, C., Vismara, R., Galli, S., Maldonado, C. R., Carmona, F. J., Padial, N. M., & Navarro, J. A. R. *ACS Applied Materials and Interfaces*, **2022** 14, 26501–26506. [#] = igual contribución.

