

UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA



**MATERIALES INORGÁNICOS POROSOS
PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE
MONÓXIDO DE CARBONO CON FINES
TERAPÉUTICOS**

PROGRAMA OFICIAL DE
DOCTORADO EN QUÍMICA

FRANCISCO J. CARMONA FERNÁNDEZ

GRANADA, 2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Francisco Jesús Carmona Fernández
ISBN: 978-84-9163-142-2
URI: <http://hdl.handle.net/10481/45373>

El doctorando Francisco Jesús Carmona Fernández y las directoras de la Tesis Elisa María Barea Martínez y Carmen Rodríguez Maldonado, garantizamos, al firmar esta Tesis Doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de las directoras de la Tesis y, hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores al ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 20 de diciembre de 2016

El doctorando



Fdo.: Francisco Jesús Carmona Fernández

Las Directoras de la Tesis



Fdo.: Elisa María Barea Martínez

Profesora Titular de Química Inorgánica de la Universidad de Granada



Fdo.: Carmen Rodríguez Maldonado

Investigadora “Juan de la Cierva” de la Universidad de Granada

Las doctoras Elisa María Barea Martínez y Carmen Rodríguez Maldonado,

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada “MATERIALES INORGÁNICOS POROSOS PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE MONÓXIDO DE CARBONO CON FINES TERAPÉUTICOS” ha sido realizada en el Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Granada, bajo su dirección, por el licenciado Francisco Jesús Carmona Fernández y autorizan su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral con mención de Doctorado Internacional.

Granada, 20 de diciembre de 2016

Las Directoras de la Tesis

A handwritten signature in blue ink that reads "Elisa Barea". The signature is enclosed in a blue oval, and there is a wavy line underneath it.

Fdo.: Elisa María Barea Martínez

Profesora Titular de Química Inorgánica de la Universidad de Granada

A handwritten signature in blue ink that reads "Carmen". Below the name, there are the initials "RM" and a stylized flourish.

Fdo.: Carmen Rodríguez Maldonado

Investigadora “Juan de la Cierva” de la Universidad de Granada

A mi familia

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	11
CAPÍTULO I.....	21
INTRODUCCIÓN.....	21
1. Materiales inorgánicos porosos para aplicaciones biomédicas	23
1.1. Polímeros de coordinación porosos.....	26
1.2. Sílices mesoporosas.....	36
2. Monóxido de carbono como agente terapéutico.....	43
2.1. Monóxido de carbono gas	43
2.2. Moléculas liberadoras de monóxido de carbono	52
2.3. Materiales liberadores de monóxido de carbono.....	63
OBJETIVOS	75
CAPÍTULO II.....	79
Control del tamaño de partícula de la matriz porosa para la preparación de CORMAs.....	79
1. Método de modulación de la coordinación	81
2. Control del tamaño y de la morfología de partícula en el polímero de coordinación poroso $[Al(OH)(SDC)]_n$ (CYCU-3)	84

2.1.	Influencia de la concentración de los reactivos en el tamaño, la cristalinidad y morfología de las partículas de CYCU-3.....	87
2.2.	Influencia de la proporción de modulador-ligando sobre el tamaño y la morfología de las partículas de CYCU-3.	91
3.	Materiales liberadores de CO basados en el CORM ALF794 y materiales CYCU-3 con diferente tamaño y morfología de partícula	101
3.1.	Preparación y caracterización.....	101
3.2.	Estudio de la liberación de CO	110
3.3.	Estudio de la lixiviación de fragmentos metálicos	113
4.	Conclusiones	115
CAPÍTULO III.....		119
Preparación de CORMAs mediante la encapsulación de CORMs en.....		119
MOFs de estructura jerarquizada.....		119
1.	Redes metalorgánicas mesoporosas de estructura jerarquizada	121
2.	Material liberador de CO basado en el CORM fotoactivo ALF794 y el MOF de estructura jerarquizada ZnCPO	126
2.1.	Preparación y caracterización.....	126
2.2.	Estudio de la liberación de CO para el material híbrido ALF794@ZnCPO_0.2	133
2.3.	Estudios de la lixiviación de fragmentos metálicos para el material híbrido ALF794@ZnCPO_0.2	136

3. Conclusiones	137
CAPÍTULO IV	139
Intercambio iónico como estrategia para la preparación de CORMAs.....	139
1. CORMs catiónicos fotoactivables basados en manganeso(I).....	141
2. Material liberador de CO basado en el CORM fotoactivo ALF472 y la red metalorgánica porosa bio-MOF-1	143
2.1. Preparación y caracterización.....	143
2.2. Estudio de la liberación de CO.....	147
2.3. Estudio de la lixiviación de fragmentos metálicos	150
3. Materiales liberadores de CO basados en el CORM fotoactivo ALF472 y en sílices mesoporosas funcionalizadas con grupos sulfónicos.	151
3.1. Preparación y caracterización.....	151
3.2. Estudio de la liberación de CO.....	158
3.3. Estudio de la lixiviación de fragmentos metálicos	159
4. Material liberador de CO basado en el CORM fotoactivo ALF472 y en la sílice mesoporosa Al-MCM-41.	160
4.1. Preparación y caracterización.....	160
4.2. Estudio de la liberación de CO.....	166
4.3. Estudio de la lixiviación de fragmentos metálicos metales.....	168

4.4. Incorporación dual de ALF472 y Cisplatino en la sílice mesoporosa nanométrica Al-MCM-41	170
5. Conclusiones	179
CONCLUSIONES	183
CONCLUSIONS	187
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	191
ANEXO I.....	203
DETALLES EXPERIMENTALES	203
1. Materiales y métodos.....	205
2. Control del tamaño de partícula de la matriz porosa para la preparación de CORMAs.....	209
2.1. Control del tamaño y de la morfología de partícula en el polímero de coordinación poroso CYCU-3.....	209
2.2. Materiales liberadores de CO basados en el CORM ALF794 y materiales CYCU-3 con diferente tamaño y morfología de partícula	211
3. Preparación de CORMAs mediante la encapsulación de CORMs en MOFs de estructura jerarquizada.	219
3.1. Preparación y caracterización.....	219
3.2. Estudio de la liberación de CO para el material híbrido ALF794@ZnCPO_0.2	221

3.3. Estudios de la lixiviación de fragmentos metálicos para el material híbrido ALF794@ZnCPO_0.2	222
4. Intercambio iónico como estrategia para la preparación de CORMAs	224
4.1. Preparación y caracterización.....	224
4.2. Estudio de la liberación de CO	232
4.3. Estudios de la lixiviación de fragmentos metálicos.....	234
ANEXO II.....	239
LISTA DE PUBLICACIONES	239

RESUMEN

Uno de los mayores retos científicos del siglo XXI es el diseño de materiales avanzados que puedan actuar como sistemas multifuncionales. Por ejemplo, en el ámbito de la biomedicina, se persigue el desarrollo de materiales inteligentes que sean capaces de actuar, al mismo tiempo, como vehículos para el transporte de fármacos de índole diversa y como sistemas de liberación controlada de los mismos. Estos híbridos fármaco@material presentarían, además, numerosas ventajas respecto a la simple administración del fármaco original; entre otras, i) un aumento en la eficacia terapéutica del principio activo, ii) un incremento en la estabilidad del fármaco en medio fisiológico, iii) una mayor especificidad del tratamiento y iv) una disminución de los efectos secundarios adversos.

Aunque ya se ha explorado la potencialidad de una amplia variedad de materiales (liposomas, micelas orgánicas, nanopartículas inorgánicas o materiales inorgánicos porosos), como sistemas para el transporte y liberación de fármacos (DDS, del inglés drug delivery system), aún queda mucho por hacer. En este contexto, esta Tesis Doctoral quiere aportar nuevos estudios acerca del uso de algunos materiales inorgánicos porosos, en concreto, los polímeros de coordinación porosos o redes metalorgánicas (PCPs o MOFs, del inglés Metal-Organic Frameworks) y las sílices mesoporosas (SMPs), como DDS.

Los MOFs son compuestos híbridos metal-orgánicos cristalinos, que presentan un tamaño de poro homogéneo (en el orden de los microporos o de los mesoporos), mientras que las SMPs son sólidos constituidos por SiO_2 que se ordenan generando cavidades de tamaño homogéneo en el orden de los mesoporos. Ambos materiales poseen interesantes características que los hace candidatos idóneos para el desarrollo de nuevos DDS, entre otras: i) elevada área superficial, ii) gran volumen de poro y iii) fácil funcionalización.

Por otra parte, el monóxido de carbono es un gas incoloro e inodoro que se produce como consecuencia de la oxidación parcial de compuestos de carbono. Su elevada toxicidad en animales y humanos, debida a su mayor afinidad por la hemoglobina frente al oxígeno, le ha otorgado el apelativo de “asesino silencioso”, ya que su inhalación en

altas concentraciones puede causar importantes lesiones, incluida la muerte. Sin embargo, este gas también se produce de forma endógena, en el organismo de mamíferos, a través de la acción de la enzima hemoxigenasa, cuya expresión es estimulada como respuesta ante diferentes situaciones de estrés. En este contexto, numerosos estudios han puesto ya de manifiesto la potencialidad de este gas como agente terapéutico, al demostrar su efectividad frente a diversos modelos de enfermedad. En concreto, la primera vía de administración de CO exógeno que se ha propuesto es la inhalación directa de mezclas aire-CO con la proporción adecuada de la molécula bioactiva. A pesar de la sencillez aparente de este protocolo/dispositivo, esta vía de administración presenta una seria limitación: la falta de especificidad. Así, la biodistribución del CO depende del coeficiente de partición entre los diferentes tejidos y fluidos corporales. En concreto, el CO inhalado accede al organismo mediante los pulmones por lo que, si son otros los órganos diana, serían necesarias mayores dosis para lograr efectos terapéuticos. Además, su liberación se produce como consecuencia de su unión reversible a la hemoglobina, por lo que su acción en órganos y tejidos lejanos al sistema vascular es muy limitada.

Por este motivo, en el año 2001, el grupo del Prof. Motterlini planteó por primera vez el empleo de moléculas liberadores de CO (CORMs, del inglés CO-Releasing Molecules), como una estrategia alternativa para una administración más específica de este gas terapéutico. Estos compuestos, que generalmente son carbonilos metálicos y pueden considerarse profármacos de CO, permiten la liberación controlada de la molécula bioactiva (CO) como respuesta a un estímulo externo (luz, temperatura, campo magnético) o a un efecto fisiológico (cambio de pH, interacción con enzimas). Sin embargo, la implementación clínica de los CORMs se ve limitada debido a su baja estabilidad en medios fisiológicos, a la toxicidad asociada a las fracciones metálicas de decarbonilación (iCORMs), así como a los rápidos perfiles de liberación de CO que presentan.

Con el objetivo de superar estas limitaciones, han surgido recientemente un nuevo tipo de materiales multitarea e inteligentes conocidos como CORMAs (materiales liberadores de CO, del inglés CO-Releasing Materials). Estos sistemas son plataformas de almacenamiento de monóxido de carbono (obtenidos mediante la unión de un

CORM a un sistema macromolecular) capaces de liberar el CO de forma activa como respuesta ante un estímulo específico (sistemas inteligentes ON/OFF). Además, también son capaces de evitar/minimizar la lixiviación indeseada de los fragmentos metálicos (CORMs e iCORMs) en el organismo, con el consiguiente beneficio para el paciente.

Bajo este telón de fondo, en esta Tesis Doctoral, se han preparado y caracterizado nuevos materiales liberadores de monóxido de carbono mediante la combinación de dos CORMs fotoactivos y diferentes materiales inorgánicos porosos (MOFs y SMPs). Algunos de los nuevos materiales híbridos desarrollados i) mantienen las propiedades fotoactivables del CORM original, ii) ofrecen perfiles cinéticos de liberación más favorables, es decir, más controlados en el tiempo y iii) son capaces de retener, en el interior de sus cavidades, la mayor parte de los fragmentos metálicos, limitando, de esta forma, su potencial toxicidad.

En concreto, en el Capítulo II de esta Tesis Doctoral, se describe la preparación de dos nuevos CORMAs basados en la encapsulación del tricarbonilo de molibdeno biológicamente activo $[\text{Mo}(\text{CNCMe}_2\text{CO}_2\text{H})_3(\text{CO})_3]$ ($\text{CNCMe}_2\text{CO}_2\text{H} = 2\text{-isociano-2-metilpropanoico}$), conocido como ALF794, dentro de las cavidades de diferentes materiales mesoporosos del tipo $[\text{Al}(\text{OH})(\text{SDC})]$ (H_2SDC : ácido 1,2-difeniletlenil-4,4'-dicarboxílico), conocido como CYCU-3. Para ello, en primer lugar, se ha estudiado la influencia que tiene la concentración de los reactivos, así como la proporción de modulador (ácido acético)/ligando empleada, sobre las características finales (tamaño, morfología y cristalinidad) de los materiales CYCU-3 preparados. En relación a los reactivos, se ha observado que el empleo de concentraciones diluidas, en ausencia de modulador (CYCU-3 20_0, concentración de reactivos 20 mM, proporción ligando/modulador 1/0), conduce a la formación de nanopartículas pseudoesféricas (~100 nm) con baja cristalinidad; mientras que el empleo de mezclas más concentradas (30-60 mM) permite la obtención de materiales más cristalinos pero con partículas alargadas en el rango de las micras. Por otra parte, en lo que respecta a la proporción ligando-modulador, se ha demostrado que un incremento en la concentración de ácido acético en el medio de reacción (proporción molar ligando-modulador usadas: 1/5 a 1/50), provoca un aumento en la longitud de las partículas resultantes. Además, para el

caso de los materiales preparados con una proporción molar ligando/modulador 1/50, y en concreto para el material CYCU-3 50_50 (concentración de reactivos 50 mM, proporción molar ligando/modulador 1/50), se ha observado la formación de una nueva fase cristalina, para la que se ha propuesto un modelo estructural basado en una estructura distorsionada del material CYCU-3 original.

Con el objetivo de estudiar la potencialidad de estas matrices como vehículos para el transporte y liberación del CORM fotoactivo ALF794, se han seleccionado tres de los materiales preparados. Las matrices seleccionadas (CYCU-3 20_0, CYCU-3 50_5 y CYCU-3 50_50) presentan tamaños de partícula y morfología muy diferentes entre sí. Antes de llevar a cabo la encapsulación del CORM ALF794, se ha analizado la estabilidad térmica y la porosidad de dichas matrices. En concreto, los materiales CYCU-3 20_0 y CYCU-3 50_5 muestran una elevada porosidad, con superficies de BET de $2225 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ y $2575 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$, respectivamente. En lo relativo a su estabilidad térmica, el material CYCU-3 20_0 es menos estable que el CYCU-3 50_5 (temperatura de descomposición de $350 \text{ }^\circ\text{C}$ y $408 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente) probablemente debido a su menor cristalinidad y tamaño de partícula. Por otro lado, el material CYCU-3 50_50 presenta una menor capacidad de adsorción que los materiales anteriores (BET de $865 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$), pero una mayor estabilidad térmica (temperatura de descomposición: $473 \text{ }^\circ\text{C}$). Para explicar este comportamiento tan diferente, se ha propuesto que $2/3$ de sus cavidades están ocupadas por cadenas monodimensionales del tipo $[\text{Al}(\text{OH})(\text{CH}_3\text{COO})_2]_n$. Esta ocupación parcial de los poros explica la importante disminución en la capacidad de adsorción para este material, así como su mayor estabilidad térmica y mecánica, al tratarse de un material más compacto que los anteriores.

A continuación, se ha llevado a cabo la incorporación del tricarbonilo metálico ALF794 en los materiales descritos anteriormente mediante un proceso de impregnación sólido-líquido asistido por la eliminación progresiva del disolvente. Los resultados demuestran que la matriz CYCU-3 50_50 es capaz de incorporar 0.71 mmol de CORM por gramo de material, mientras que la matriz CYCU-3 50_5 tan solo incorpora 0.44 mmol de CORM por gramo de material. Los resultados indican que la presencia de un mayor número de defectos cristalinos en la red deformada del CYCU-3

50_50 facilita la difusión del CORM ALF794 hacia el interior de los canales monodimensionales, haciendo más efectiva su encapsulación. Además, el mayor volumen de poro ocupado en este sistema (52.4 %) en comparación con el material ALF794@CYCU-3 50_5 (11.5 %), está de acuerdo con la presencia de asociaciones de moléculas de ALF794 que interaccionan por enlaces de hidrógeno lo que favorece su retención dentro de la matriz porosa. Por otro lado, se ha comprobado que la matriz CYCU-3 20_0 se degrada parcialmente en las condiciones de encapsulación, descartándose como potencial CORMA.

En referencia a los estudios de liberación de monóxido de carbono, los resultados confirman, en primer lugar, que el ALF794 es un compuesto fotoactivo bajo irradiación con luz visible, liberando 0.7 mmoles de CO por mmol de ALF794 a las 24 horas. En relación a los sistemas híbridos (ALF794@CYCU-3 50_5 y ALF794@CYCU-3 50_50), se ha demostrado que estos sistemas liberan CO de forma más controlada que el CORM libre. En concreto, se ha observado que, tras 24 horas, ALF794@CYCU-3 50_5 libera el doble de CO (0.46 mmol de CO por mmol de ALF794) que ALF794@CYCU-3 50_50 (0.24 mmol de CO por mmol de ALF794). Sin embargo, el material CYCU-3 50_5 tiene poca capacidad para retener en su matriz los fragmentos metálicos (6 % de Mo retenido tras 6 horas de irradiación con luz visible), probablemente como consecuencia de su baja estabilidad en PBS, lo que parece indicar que la liberación de CO observada (0.46 mmol de CO por mmol de ALF794) se debe principalmente a la fotoactivación de las moléculas de ALF794 lixiviadas al medio. Por el contrario, la matriz CYCU-3 50_50 muestra una mayor capacidad para retener los fragmentos metálicos (75 % de Mo retenido tras 72 horas de incubación en PBS), lo que sugiere que, en este caso, la liberación de CO observada se debe principalmente a la fotoactivación de las moléculas de ALF794 que permanecen adsorbidas dentro de la matriz porosa. De hecho, esta mayor estabilidad en PBS, y la consiguiente capacidad para retener los fragmentos metálicos dentro de la matriz, parece estar relacionada con la menor exposición de los centros metálicos del MOF al medio, debido a la presencia de las cadenas de $[Al(OH)(CH_3COO)_2]_n$, y con el mayor grado de ocupación de los poros, que favorecería la retención de las moléculas del CORM al establecerse interacciones por enlaces de hidrógeno.

Por otra parte, en el Capítulo III de esta Tesis Doctoral, se estudia la preparación de nuevos materiales liberadores de monóxido de carbono basados en la combinación del mismo fotoCORM utilizado en el Capítulo II (ALF794), con el polímero de coordinación poroso de estructura jerarquizada $[Zn_2(dhtp)(H_2O)_2]$ (H_4dhtp : ácido 2,5-dihidroxitereftálico), conocido como Zn-MOF-74 o ZnCPO. Aunque el material poroso seleccionado es biocompatible, desafortunadamente no presenta mesoporosidad intrínseca, lo que dificultaría enormemente la difusión de las moléculas de CORM hacia el interior de sus cavidades y, por tanto, su encapsulación. Por este motivo, y con el objetivo de conseguir un material que también sea mesoporoso, se ha empleado la metodología conocida como “nanofusión por pertubación”. Esta estrategia de síntesis permite la creación de mesoporos, en un material inicialmente microporoso, al favorecer la condensación/agregación controlada de nanopartículas cristalinas del MOF frente al proceso de cristalización. Mediante un control adecuado de las condiciones experimentales, estos agregados de nanopartículas pueden crear entre sí intersticios ordenados a lo largo del espacio, con un tamaño en el rango de los mesoporos y accesibles a moléculas huésped de mayor tamaño.

Una vez sintetizada la matriz mediante esta novedosa estrategia y con el objetivo de examinar su potencial uso en aplicaciones biomédicas, se ha analizado su estabilidad química en dos tampones fisiológicos diferentes: HEPES (10 mM, pH 7.4) y PBS (10 mM, pH 7.4). Los resultados han demostrado que la matriz porosa de estructura jerarquizada ZnCPO presenta una baja estabilidad en PBS, probablemente debido a la formación de fosfatos de zinc, mientras que es relativamente estable en HEPES (tanto los difractogramas de rayos X en polvo como los espectros infrarrojos de los sólidos recogidos, tras 6 horas de incubación en HEPES a 37 °C, muestran los picos/bandas características para la matriz ZnCPO). Además, y con el objetivo de minimizar el tiempo de preparación del CORMA, la incorporación del ALF794 se ha llevado a cabo durante la propia síntesis del material poroso, siendo el primer ejemplo de CORMA, basado en materiales inorgánicos porosos, que se prepara en una única etapa. Esta estrategia de síntesis-encapsulación en un solo paso supone una ventaja significativa frente a la metodología convencional de incorporación de moléculas huésped en sólidos porosos desarrollada por ejemplo en el Capítulo II, ya que disminuye el número de

etapas necesarias, los requerimientos energéticos del proceso, el tiempo de operación/manipulación, así como el riesgo de degradación o fotoactivación involuntaria del CORM. Para optimizar la cantidad de ALF794 empleada durante el proceso de síntesis-encapsulación, se han utilizado diferentes proporciones molares ALF794/Zn(AcO)₂·2H₂O. Los resultados demuestran que el uso de menores proporciones de CORM proporciona encapsulaciones más eficientes (el porcentaje de CORM encapsulado respecto al CORM empleado es mayor) y materiales más cristalinos y puros (ausencia de óxidos de molibdeno como subproductos). A la vista de estos resultados, el sistema híbrido más prometedor es el material ALF794@ZnCPO_0.2 (proporción molar ALF794/Zn(AcO)₂·2H₂O = 0.2), con una encapsulación de 0.28 mmol de CORM por gramo de material.

En relación a los estudios de liberación de CO, el sistema híbrido ALF794@ZnCPO_0.2 exhibe, tras su fotoactivación con luz visible, una tasa de liberación de CO muy limitada (0.05 mmol de CO por mmol de complejo para una concentración de ALF794 cinco veces mayor a la ensayada para el resto de sistemas). En contraposición, bajo una radiación más energética (luz ultravioleta, $\lambda = 365$ nm), el material cargado es capaz de liberar satisfactoriamente CO, con un perfil de liberación más controlado (0.33 mmol de CO liberados por mmol de CORM encapsulado tras 180 minutos de irradiación) que el del CORM original (0.95 mmol de CO liberados por mmol de CORM encapsulado tras 150 minutos de irradiación). Por último, los estudios de ICP-OES corroboran, tanto en oscuridad como bajo irradiación con luz ultravioleta, la elevada estabilidad de la matriz porosa en HEPES (lixiviando tan solo un 9 % de zinc tras 6 horas de incubación) y su capacidad para minimizar los fragmentos metálicos (CORMs e iCORMs) liberados al medio (aprox. 17 % de Mo, tras 6 horas de incubación).

Por último, el Capítulo IV de esta Tesis Doctoral se centra en la preparación y caracterización de diferentes materiales liberadores de monóxido de carbono basados en materiales inorgánicos porosos (sílices mesoporosas y redes metalorgánicas) y el tricarbonilo de manganeso [Mn(tacn)(CO)₃]Br (tacn = 1,4,7-triazaciclonano), conocido como ALF472. En este caso, y a diferencia de los capítulos anteriores donde la preparación de los sistemas híbridos CORM@MOFs se basaba en fenómenos de

fisorción, los potenciales CORMAs de este capítulo se han preparado mediante una estrategia de intercambio iónico. Por tanto, se espera que las interacciones anfitrión-huésped sean más fuertes (gracias a las interacciones electrostáticas), lo que puede influir en la cantidad de fármaco incorporado, en el perfil cinético de liberación del CO y en la retención de los fragmentos metálicos encapsulados en las cavidades.

El primer material con el que hemos trabajado es el polímero de coordinación poroso $(\text{NH}_2(\text{CH}_3)_2)_2[\text{Zn}_8(\text{adeninato})_4(\text{BPDC})_6]$ (BPDC: ácido bifenil-4,4'-dicarboxílico), conocido como bio-MOF-1. Este MOF presenta un esqueleto de naturaleza aniónica, lo que permite la encapsulación del compuesto catiónico ALF472+ en su matriz porosa, con una eficiencia de intercambio del 35 % (0.25 mmol de ALF472 por gramo de material). Los estudios de liberación de CO para el complejo ALF472 demuestran que este CORM es fotoactivo, ya que solo libera CO en presencia de luz visible (0.80 mmol de CO por mmol de ALF472 tras 24 horas de incubación), permaneciendo inactivo en oscuridad. Por su parte, el sistema híbrido ALF472@bio-MOF-1 muestra una capacidad total de liberación de CO similar a la del CORM original (0.82 mmol de CO por mmol de ALF472 tras 24 horas de incubación), pero lo hace a una mayor velocidad, como se pone de manifiesto en la pendiente más abrupta del perfil cinético. Este hecho experimental anómalo puede ser explicado en base a la baja estabilidad del polímero de coordinación poroso en medio fisiológico, que se degrada casi por completo en el transcurso de 6 horas. La lixiviación de sus componentes al medio fisiológico, y en concreto de la adenina, como consecuencia de la degradación de la matriz, parece favorecer la disociación del enlace Mn-CO, acelerando la liberación de la molécula bioactiva.

Debido a la baja estabilidad del material híbrido preparado anteriormente, se ha llevado a cabo la preparación de dos nuevos CORMAs basados en el mismo CORM catiónico (ALF472+) y las sílices mesoporosas MCM-41 y SBA-15, que muestran una mayor estabilidad en medio fisiológico. En este caso, se llevó a cabo la funcionalización post-sintética de estas matrices con grupos alquilsulfónicos para conferir carácter aniónico a sus cavidades. Una vez aisladas las sílices funcionalizadas, al igual que en los casos anteriores, se procedió a incorporar el ALF472 mediante intercambio iónico. Así pues, las eficiencias de intercambio han sido del 100 % para la

sílice funcionalizada MCM-41-SO₃H (con 0.22 mmol ALF472 por gramo de material) y del 50 % para la SBA-15-SO₃H (con 0.53 mmol ALF472 por gramo de material), mientras que no se ha observado intercambio alguno para los materiales originales sin funcionalizar. En lo relativo a los estudios de retención de los fragmentos metálicos en PBS, los resultados han demostrado que, aunque ambas matrices poseen una elevada estabilidad en dicho medio fisiológico, los dos sistemas híbridos intercambian la mayor parte de las moléculas de ALF472+ encapsuladas por cationes presentes en el tampón PBS (85 % de lixiviación de Mn para ALF472@MCM-41-SO₃ tras 1 hora de incubación y 75 % para ALF472@SBA-15-SO₃ tras 24 horas de incubación en oscuridad). Por último, los estudios de liberación de CO han puesto de manifiesto que los materiales híbridos presentan perfiles cinéticos similares al CORM original, lo que sugiere, una vez más, que la liberación de CO observada se debe, fundamentalmente, a las moléculas de CORM lixiviadas al medio.

Debido a la baja capacidad que estas sílices funcionalizadas tienen para almacenar el CORM en presencia de altas concentraciones de sales (como es el caso de los medios fisiológicos), hemos explorado el uso de la sílice mesoporosa funcionalizada Al-MCM-41 como un sistema anfitrión alternativo. El dopaje con grupos aluminato de la sílice mesoporosa MCM-41 tiene como objetivo conseguir interacciones electroestáticas huésped-anfitrión más fuertes que las presentes en los casos anteriores, que impliquen una menor lixiviación de los fragmentos metálicos, potencialmente tóxicos, en el medio fisiológico. De esta forma, se ha preparado el material ALF472@Al-MCM-41 con una gran eficiencia de encapsulación (0.48 mmol ALF472 por gramo de material). Este material presenta además una elevada estabilidad en medio fisiológico así como una mayor capacidad de retención de los fragmentos metálicos (capacidad de retención del 86 % de ALF472 tras 6 días de incubación en PBS, a 37 °C, en oscuridad) que las sílices con grupos alquilsulfónicos. Además, el material ALF472@Al-MCM-41 presenta un perfil de la cinética de liberación de CO completamente diferente al CORM libre, mostrando una liberación de CO más controlada en el tiempo y una cantidad total de CO liberado de 0.28 mmol de CO por mmol de CORM encapsulado. Por tanto, en este caso, la liberación de CO se produce, principalmente, a partir de las moléculas de ALF472 adsorbidas en la matriz. Por último, es importante destacar, que a diferencia de

los CORMAs mencionados anteriormente, el sistema ALF472@Al-MCM-41 está constituido por partículas de tamaño nanométrico, cuyas suspensiones son estables en PBS y que, por tanto, son adecuadas para una potencial administración intravenosa.

Finalmente, como prueba de concepto, se ha llevado a cabo satisfactoriamente la incorporación simultánea y eficiente de dos metalodrogas de referencia (ALF472 y cisplatino) en la matriz porosa Al-MCM-41 (ALF472: 0.45 mmol g^{-1} , cisplatino: 0.12 mmol g^{-1}). El nuevo sistema dual presenta una retención de los CORMs e iCORMs similar a la observada para el sistema híbrido ALF472@Al-MCM-41. Sin embargo, cabe mencionar que su capacidad para liberar CO bajo activación con luz visible (0.11 mmol de CO por mmol de ALF472 encapsulado) disminuye con respecto al material que sólo encapsula el CORM (ALF472@Al-MCM-41). Con el objetivo de lograr una liberación de CO más eficiente, el material dual se ha irradiado también con luz ultravioleta, consiguiendo liberar 0.59 mmol de CO por mmol de CORM encapsulado tras 2 horas de incubación. Aunque la irradiación con luz ultravioleta mejora la cantidad total de CO liberado, el sistema presenta una tasa de liberación de cisplatino baja (8.8% tras 48 horas de incubación) lo que probablemente conlleve una baja actividad antitumoral de este sistema dual.

En definitiva, durante la realización de esta Tesis Doctoral se ha demostrado que es posible la preparación de nuevos materiales liberadores de monóxido de carbono (CORMAs) basados en polímeros de coordinación porosos o sílices mesoporosas y moléculas liberadoras de monóxido de carbono. Algunos de los CORMAs preparados presentan propiedades mejoradas respecto a los CORMs originales, puesto que ralentizan la liberación de CO y minimizan la lixiviación de fragmentos metálicos (CORMs e iCORMs), potencialmente tóxicos, al medio fisiológico. Por último, se ha llevado a cabo la encapsulación dual del agente antitumoral cisplatino y del fotoCORM ALF472 en una de las sílices mesoporosas, lo que representa una prueba de concepto de la posibilidad de desarrollar CORMAs avanzados con actividad terapéutica dual.

ABSTRACT

One of the major scientific challenges of the 21st century is the design of advanced materials that could act as multifunctional systems. For example, in the field of biomedicine, the main goal is to develop new drug carriers able to release the bioactive compounds in a controlled manner. Moreover, these hybrids systems drug@materials would present numerous advantages over the simple administration of the pristine drug; among others, *i*) an increase in the therapeutic efficacy of the active pharmaceutical ingredient, *ii*) a higher stability of the drug in physiological media, *iii*) a more specific treatment and *iv*) a decrease of the adverse side effects.

Although a wide variety of compounds (liposomes, organic micelles, inorganic nanoparticles or inorganic porous materials) have been studied for the preparation of drug delivery systems (DDS), there is still a need to develop new materials with improved properties, which can be used in real clinical applications. In this context, this PhD dissertation is focused on the use of some porous inorganic materials, namely porous coordination polymers or metal-organic frameworks (PCPs or MOFs) and mesoporous silicas (SMPs), to prepare novel and more effective drug delivery systems.

MOFs are crystalline metal-organic compounds with a homogeneous pore distribution (pore size from micropores to mesopores), while SMPs are solids made of SiO₂ that are assembled to generate cavities with homogeneous size in the mesopores range. Both materials have interesting features that make them suitable candidates for the development of new DDS, among others: *i*) high surface area, *ii*) high pore volume and *iii*) easy functionalization.

On the other hand, carbon monoxide (CO) is a colourless and odourless gas produced during the partial oxidation of carbon compounds. This gas, known as *silent killer*, is highly toxic as a consequence of its higher affinity for haemoglobin against oxygen. Indeed, its inhalation at high concentrations can cause important injuries, including death. However, carbon monoxide is also produced endogenously through the catabolism of haem by the haemoxygenase enzyme, expressed in response to different stressful conditions. In this regard, carbon monoxide is currently considered as a

potential therapeutic agent as several studies have already demonstrated its effectiveness against various disease models.

The simplest way to achieve CO administration into the body is the inhalation of a gas mixture containing CO. However, this route of administration shows an important drawback: the lack of specificity. When CO is taken up via the respiratory system, its further distribution is determined by the partition ratio between the different body fluids and tissues. Since this is a fixed value, it is very difficult to target diseased tissues which are not part of the vascular system.

Taking into account this disadvantage, Prof. Motterlini proposed for the first time in 2001 the use of CO-Releasing Molecules (CORMs) as an alternative strategy for CO administration. These compounds, which are generally metal carbonyl complexes, allow a more controlled release of CO in response to an external stimulus (light, temperature, magnetic field) or to a physiological effect (pH change, interaction with enzymes). However, the clinical application of CORMs is also hampered because of *i*) their low stability in physiological media, *ii*) the potential toxicity of their metal decarbonylation fragments (known as inactivated CORMs, iCORMs) and *iii*) the rapid CO delivery profiles showed by these compounds.

In order to overcome the shortcomings of CORMs, a new type of CO-releasing materials (CORMAs) have recently emerged. These materials are solid-storage forms of CO, obtained by combining a CORM and a macromolecular carrier, which can release CO in response to a specific stimulus. In addition, CORMAs are also able to avoid/reduce the undesired leaching of coligand-metal fragments (CORMs and iCORMs), what would ultimately be beneficial for patients.

In this context, we have prepared and characterized several novel CO-releasing materials (CORMAs) by combination of two photoactive CORMs with different porous inorganic materials (MOFs and SMPs). Most of the prepared hybrid materials display photoactive properties, although showing a more controlled CO release than the pristine CORM. In addition, they are able to keep trapped most of the decarbonylation metal fragments within their cavities, limiting their potential toxicity.

Taking into account the above considerations, in Chapter II, we have described the preparation of two new CORMAS based on the encapsulation of the biologically active molybdenum tricarbonyl complex ($[\text{Mo}(\text{CNCMe}_2\text{CO}_2\text{H})_3(\text{CO})_3]$ ($\text{CNCMe}_2\text{CO}_2\text{H} = 2$ -isocyano-2-methylpropanoic acid), known as ALF794, into the cavities of different mesoporous materials of $[\text{Al}(\text{OH})(\text{SDC})]$ (H_2SDC : 4,4'-stilbenedicarboxylic acid), known as CYCU-3.

Firstly, we have studied the influence of both reagent concentration and modulator-ligand (acetic acid-SDC) ratio on the final characteristics of CYCU-3 (particle size, morphology, and crystallinity). Regarding the concentration of reagents, we have observed that the use of dilute concentrations without modulator (CYCU-3 20_0, reagent concentration of 20 mM, ligand-modulator ratio 1-0) results in pseudo-spherical nanoparticles (~100 nm) of CYCU-3 with low crystallinity. On the other hand, when more concentrated mixtures of reagents are used (30-60 mM), more crystalline elongated particles (from 1 to 3 μm) are obtained. On the other hand, when the ligand-modulator ratio is increased (from 1-5 to 1-50), materials with longer particles are produced. In addition, in the case of those materials prepared with a 1-50 modulator-ligand ratio, in particular CYCU-3 50_50 (reagent concentration of 50 mM, modulator-ligand molar ratio 1-50), we have observed that a new crystalline phase is formed. In this sense, we have proposed a structural model for this compound based on a distorted structure of the original CYCU-3.

Once we have evaluated the influence of the synthetic conditions on the characteristics of CYCU-3, we have selected three materials with different particle size and morphology (namely, CYCU-3 20_0, CYCU-3 50_5 and CYCU-3 50_50) in order to study their potential as carriers of the photoactive compound ALF794. Firstly, we have analysed the thermal stability and porosity of these matrices. The results show that CYCU-3 20_0 and CYCU-3 50_5 are highly porous showing BET surface areas of $2225 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ and $2575 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, respectively. Regarding their thermal stability, CYCU-3 20_0 is less stable than CYCU-3 50_5 (decomposition temperature $350 \text{ }^\circ\text{C}$ vs. $408 \text{ }^\circ\text{C}$, respectively) probably due to the lower crystallinity and smaller particle size of the former material. On the other hand, CYCU-3 50_50 has lower adsorption capacity than the other materials (with a BET surface area of $865 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) while it shows the highest

thermal stability (decomposition temperature: 473 °C). In order to explain this behaviour, we have proposed that 2/3 of CYCU-3 50_50 cavities are occupied by $[\text{Al}(\text{OH})(\text{CH}_3\text{COO})_2]_n$ 1D chains. In fact, the partial occupancy of its pores and the presence of 1D chains into the cavities, which results in a more dense material, could explain its lower adsorption capacity as well as its higher thermal stability.

Once the properties of the selected matrices have been evaluated, we have carried out the encapsulation of ALF794 in these CYCU-3 materials by solid-liquid impregnation. The results show that CYCU-3 50_50 can load 0.71 mmol of CORM per gram of material, while CYCU-3 50_5 incorporates only 0.44 mmol of CORM per gram of material. In the case of CYCU-3 50_50, the greatest number of crystalline defects in its distorted structure favours the diffusion of ALF794 into the cavities, yielding a more efficient encapsulation. In addition, the higher pore volume occupancy found in ALF794@CYCU-3 50_50 (52.4 %) in comparison to ALF794@CYCU-3 50_5 (11.5 %), enhances the interaction of encapsulated ALF794 molecules through hydrogen bonds, resulting in an improved retention of the CORM. On the other hand, CYCU-3 20_0 matrix is partially degraded under the encapsulation conditions, being discarded as potential CORMA in later studies.

Regarding the CO delivery studies, the results confirm that ALF794 is a photoactive compound under visible light irradiation, releasing 0.7 mmol of CO per mmol of ALF794 at 24 hours. On the other hand, both ALF794@CYCU-3 50_5 and ALF794@CYCU-3 50_50 systems slow the CO delivery rate in comparison to the free CORM. After 24 h, 0.46 and 0.24 mmol of CO per mmol of encapsulated complex is delivered for ALF794@CYCU-3 50_5 and ALF794@CYCU-3 50_50, respectively. Nevertheless, in the case of ALF794@CYCU-3 50_5, we have observed that a large amount of the loaded metal fragments are leached after 1 hour of irradiation (94 %), probably because of the low stability of CYCU-3 50_5 in PBS. These results suggest that the released CO from this material is due to the photoactivation of the leached ALF794 molecules. In contrast, ALF794@CYCU-3 50_50 shows a higher chemical stability and keeps trapped the 75 % of the metal fragments after 72 hours of irradiation. Therefore, it seems that in this case the released CO from ALF794@CYCU-

3 50_50 is mainly due to the photoactivation of the adsorbed ALF794 molecules in the matrix. In this sense, the higher stability of ALF794@CYCU-3 50_50 could be related to the lower exposure of the MOF metal centers to the medium as a consequence of the 1D $[\text{Al}(\text{OH})(\text{CH}_3\text{COO})_2]_n$ chains located inside the channels. In addition, as mentioned above, the higher degree of occupancy in ALF794@CYCU-3 50_50 favours the interaction between the loaded ALF794 molecules and, therefore, enhances their retention in the cavities.

On the other hand, in Chapter III, we have prepared a new CO-releasing material based on the combination of the same photoCORM used in Chapter II (ALF794), with the hierarchical porous coordination polymer $[\text{Zn}_2(\text{dhtp})(\text{H}_2\text{O})_2]$ (H_4dhtp : 2,5-Dihydroxyterephthalic acid), known as Zn-MOF-74 or ZnCPO. Although this inorganic porous material is highly biocompatible, the pore size (in the range of the micropores) hampers the diffusion of ALF794 molecules into the cavities and, therefore, prevents their encapsulation. In order to obtain a mesoporous material based on ZnCPO, we have used the novel methodology known as *Perturbation-Assisted Nanofusion Synthesis*. This synthetic strategy allows the generation of mesopores in an original microporous MOF by inducing condensation of crystalline MOF nanoparticles against individual MOF particle crystallization. Thus, by an appropriate control of experimental conditions, the nanoparticle aggregates can generate randomly ordered mesopores, which are accessible to larger host molecules.

Once the hierarchical MOF has been successfully synthesized, we have evaluated its chemical stability in two different physiological buffers: HEPES (10 mM, pH 7.4) and PBS (10 mM, pH 7.4). The results show that the hierarchical ZnCPO has a low stability in PBS, probably due to the formation of zinc phosphates, while is quite stable in HEPES (both powder X-ray patterns and infrared spectra of the collected solids show the characteristic peaks/bands of pristine ZnCPO). In addition, we have carried out the encapsulation of ALF794 during the synthesis of hierarchical ZnCPO. This one-pot synthesis-encapsulation strategy is advantageous compared to the conventional methodology since it decreases the number of required steps, the energy requirements, the operation/manipulation time and the risk of CORM degradation. It is important to highlight that, to the best of our knowledge, is the first example of CORMA (based on

an inorganic porous material) prepared by a one-pot strategy. In order to optimize the amount of ALF794 used during this synthesis-encapsulation process, we have employed different ALF794/Zn(AcO)₂·2H₂O molar ratios. The results show that more crystalline and pure (absence of molybdenum oxides as by-products) materials are obtained when lower CORM ratios are used. In addition, the encapsulation efficiency is also increased. Taking into account these results, the hybrid material ALF794@ZnCPO_0.2 (ALF794/Zn(AcO)₂·2H₂O molar ratio = 0.2) shows the best performance towards the encapsulation of ALF794, achieving a loading of 0.28 mmol of CORM per gram of material.

Regarding the CO releasing, the hybrid system ALF794@ZnCPO_0.2 exhibits a very limited CO delivery rate under visible light irradiation (0.05 mmol of CO per mmol of complex with an ALF794 concentration five times higher than the concentration tested for the other systems). However, the loaded material is capable of successfully releasing CO under a more energetic radiation (ultraviolet light, $\lambda = 365$ nm), slowing the CO delivery rate (0.33 mmol of CO released per mmol of loaded CORM after 180 minutes of irradiation) in comparison to the pristine CORM (0.95 mmol of CO per mmol of CORM after 150 minutes of irradiation). Finally, we have studied the stability and metal fragment leaching of ALF794@ZnCPO_0.2 under ultraviolet irradiation as well as in darkness. The results confirm the high stability of the porous matrix in HEPES (only 9% of leached Zn after 6 hours of incubation) and its capacity to retain the metal fragments into the cavities (17% of leached Mo after 6 hours of incubation).

At last, Chapter IV focuses on the preparation and characterization of different CO-releasing materials based on porous inorganic materials (MOFs and SMPs) and the manganese tricarbonyl complex [Mn(tacn)(CO)₃]Br (tacn = 1,4,7-triazacyclonano), known as ALF472. It is worth noting that in all the aforementioned materials, the loaded CORMs are physisorbed into the pore walls of the matrices. However, in Chapter IV, the potential CORMAs have been prepared by means of an ion exchange strategy. For this reason, host-guest interactions, which are expected to be stronger (due

to the electrostatic interactions), may have influence on drug loading, CO delivery kinetics and retention of the loaded metal fragments into the cavities.

First of all, we have explored the use of the porous coordination polymer $(\text{NH}_2(\text{CH}_3)_2)_2[\text{Zn}_8(\text{adeninate})_4(\text{BPDC})_6]$ (BPDC: biphenyl-4,4'-dicarboxylic acid), known as bio-MOF-1, as CORMA. This anionic MOF allows the incorporation of 0.25 mmol of ALF472^+ per gram of material (cationic exchange efficiency of 35 %). Regarding CO release properties, the results show that ALF472 is a photoactive compound because it only releases CO under visible light (0.80 mmol of CO per mmol of loaded ALF472 after 24 hours of incubation). Furthermore, the hybrid system ALF472@bio-MOF-1 releases a similar amount of CO under the same conditions (0.82 mmol of CO per mmol of loaded ALF472) with an enhanced kinetics in comparison with the pristine CORM. This anomalous behaviour could be related to the low stability of the porous coordination polymer in physiological conditions, which decomposes almost completely within 6 hours. In fact, the presence of leached components into the medium, in particular adenine, seems to favour the dissociation of the Mn-CO bond, accelerating the CO release.

In order to prepare new CORMAs based on the photoCORM ALF472 with better stability properties in physiological conditions, we have decided to use the more robust mesoporous silica materials, namely MCM-41 and SBA-15. With this aim, and in order to obtain suitable materials with anionic pores, we have firstly achieved the functionalization of these mesoporous silicas with alkylsulfonic groups. Then, ALF472 has been successfully incorporated in both functionalized mesoporous silicas by ion exchange with an exchange efficiency of 100% for MCM-41-SO₃H (0.22 mmol of loaded ALF472 per gram of material) and 50% for SBA-15-SO₃H (0.53 mmol of loaded ALF472 per gram of material). It should be highlighted that any attempt to incorporate ALF472 into the neutral silica frameworks (pristine SBA-15 and MCM-41) has been not successful, demonstrating that the encapsulation only takes place by a cation exchange process due to the presence of the alkylsulfonic groups. Regarding the leaching studies, the results show that both hybrid systems exchange most of the loaded ALF472^+ with cations from PBS solution (Mn leaching of 85% for $\text{ALF472@MCM-41-SO}_3$ after 1 hour of incubation in darkness and 75% for $\text{ALF472@SBA-15-SO}_3$ after 24

hours of incubation in darkness). Finally, the CO releasing studies have shown that both hybrid materials exhibit a CO-kinetic profile similar to that of the original CORM. Thus, it seems that the released CO is mainly due to the photoactivation of free ALF472 molecules leached to the medium.

Then, taking into account the previous results, we decided to use another functionalized mesoporous silica, Al-MCM-41, as an alternative host system. In this case, the aluminate groups located in the pores may give stronger host-guest interactions than in the case of alkylsulfonic functionalized mesoporous silicas. Therefore, it is expected that Al-MCM-41 may leach a lower amount of metal fragments than the sulfonic hybrids when suspended in physiological media. In this regard, we have successfully prepared the ALF472@Al-MCM-41 material with a high loading (0.48 mmol of ALF472 per gram of material). This material exhibits a high stability in physiological environment as well as a great retention capacity of the metal fragments (86% of loaded ALF472 keep trapped into the cavities after 6 days of incubation in PBS, 37 °C in dark). It is important to highlight that ALF472@Al-MCM-41 shows a completely different and more time-controlled release of CO in comparison to the pristine CORM, delivering 0.28 mmol CO per mmol of loaded CORM after 24 hours. In this case, it seems that the CO release occurs mainly from the ALF472 molecules adsorbed inside the matrix. Besides, unlike the previously described CORMAs, ALF472@Al-MCM-41 can be isolated as nanoparticles (48.8 ± 11.0 nm) that do not suffer from aggregation in PBS. Consequently, this material may be suitable for a potential intravenous administration.

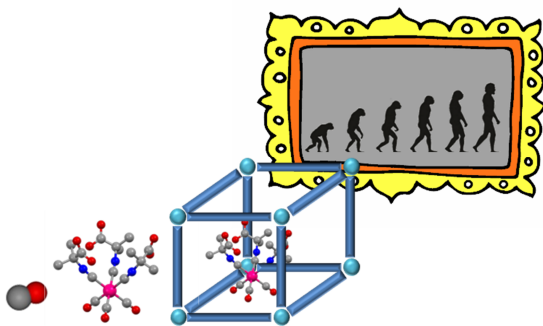
Finally, we have used the porous matrix Al-MCM-41 as a platform for the simultaneous incorporation of two different metallodrugs (ALF472 and cisplatin; ALF472 loading: 0.45 mmol g^{-1} , cisplatin loading: 0.12 mmol g^{-1}). This new dual system is able to keep trapped a similar amount of metal fragments than ALF472@Al-MCM-41 when incubated in PBS. However, the amount of CO released under visible light activation ($0.11 \text{ mmol CO per mmol of encapsulated ALF472}$) is decreased with respect to ALF472@Al-MCM-41. In order to achieve a more efficient CO release, the dual material has also been irradiated with ultraviolet light, releasing 0.59 mmol of CO

per mmol of loaded CORM after 2 hours of incubation. Although ultraviolet light radiation improves the total amount of CO released, the system has a low rate of cisplatin delivery (8.8% after 48 hours of incubation), which is likely to lead to a low antitumor activity.

Summarizing, in this PhD Thesis, it has been demonstrated that new CO-releasing materials (CORMAs) can be prepared by encapsulating CO-releasing molecules into porous coordination polymers or mesoporous silicas. Some of the isolated CORMAs improve the properties of the original CORMs, showing more controlled release of CO and reducing the leaching of metal fragments (CORMs and iCORMs) into the physiological media. Finally, we have performed the simultaneous encapsulation of the antitumoral agent cisplatin and the photoCORM ALF472 into Al-MCM-41 mesoporous silica. This result should be considered as a proof of concept of the feasibility of developing new advanced CORMAs with dual therapeutic action.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN



1. Materiales inorgánicos porosos para aplicaciones biomédicas

Desde sus orígenes, el ser humano ha tratado de hacer frente a las dolencias y enfermedades que le afectaban empleando los recursos naturales que encontraba a su alrededor, especialmente mediante el uso de plantas. No es hasta finales del siglo XIX, cuando se desarrollan los primeros fármacos sintéticos. Uno de estos primeros ejemplos es el ácido acetilsalicílico, popularmente conocido como aspirina, que fue sintetizado por primera vez en 1897 por el farmacéutico alemán Felix Hoffman en una forma químicamente pura y estable.[1] Desde entonces, el uso de la síntesis química para el desarrollo de nuevos fármacos, ha permitido la cura de un gran número de enfermedades, algunas de cuales eran mortales. Por ejemplo, el científico alemán Paul Ehrlich popularizó, a principios del siglo XX, el concepto de “bala mágica”, como un compuesto químico capaz de curar una determinada dolencia sin ocasionar efectos secundarios dañinos para el paciente. En 1901, Ehrlich sintetizó el llamado “compuesto número 606” (por ser fruto de 606 experimentos) o arsfenamina (Figura 1); un compuesto de arsénico efectivo frente a la sífilis, que fue posteriormente comercializado con el nombre de Salvarsán.[2]

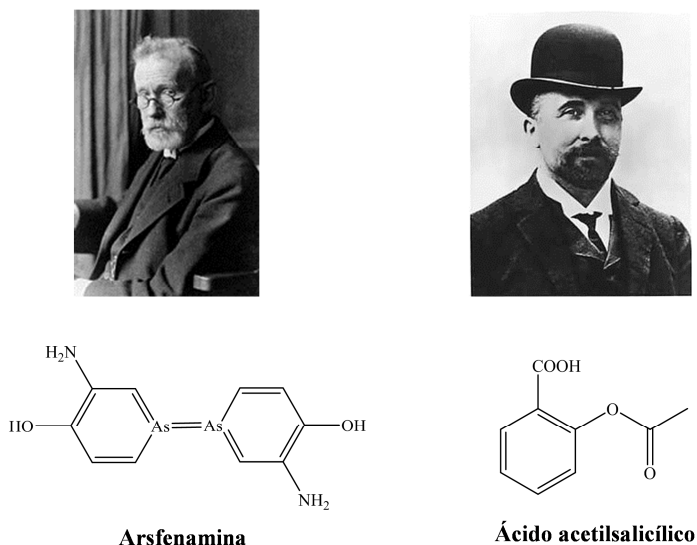


FIGURA 1: EJEMPLOS DE LOS PRIMEROS FÁRMACOS SINTÉTICOS. A LA IZQUIERDA, PAUL EHRLICH Y SU FÓRMULA PROPUESTA PARA EL SALVARSAÁN. A LA DERECHA, FELIX HOFFMAN, QUIÉN SINTETIZÓ POR PRIMERA VEZ EL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO EN SU FORMA PURA.

Aunque el uso de compuestos sintéticos supusieron una revolución en el campo de la medicina a principios del siglo XX, aspectos como su baja biocompatibilidad o biodisponibilidad, así como su falta de especificidad hacia los tejidos y órganos diana, conllevaban la administración de altas dosis del fármaco para lograr la efectividad necesaria frente a la dolencia a tratar, lo que generaba efectos secundarios nocivos en los pacientes. Una de las estrategias que se ha propuesto en las últimas décadas, para solventar estos inconvenientes, es el uso de sistemas de liberación controlada de fármacos (DDS, del inglés *Drug Delivery System*). Un DDS se define como una formulación o dispositivo que permite la administración de un agente terapéutico mediante un control tanto en la velocidad/tiempo de liberación del mismo como en su localización dentro del organismo (Figura 2), mejorando de esta forma su eficacia y haciéndolo más seguro para el paciente. Este sistema o dispositivo, por lo tanto, debe ser capaz no sólo de almacenar y transportar de manera segura el principio activo hasta la diana terapéutica, sino también de establecer un mecanismo (activo o pasivo) para la liberación del fármaco una vez que éste haya alcanzado su objetivo.[3]

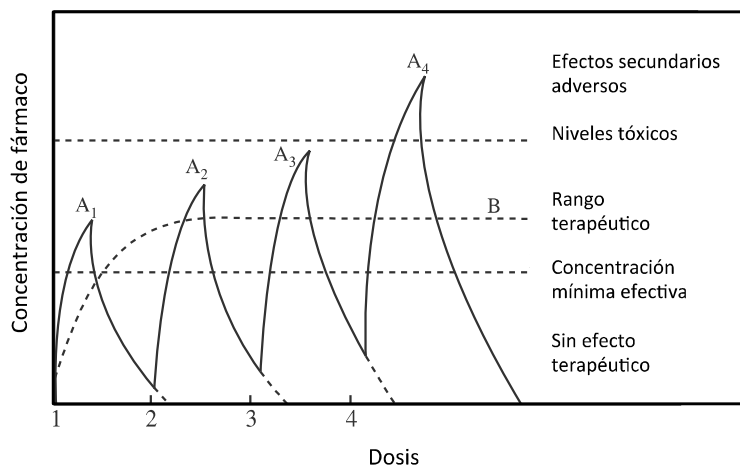


FIGURA 2: COMPARACIÓN DEL PERFIL DE LIBERACIÓN DE UN FÁRMACO EN EL ORGANISMO MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN REPETITIVA DE DOSIS (LÍNEA SÓLIDA A_n) Y A TRAVÉS UN SISTEMA DE LIBERACIÓN CONTROLADA (LÍNEA PUNTEADA B).[4]

Por este motivo, el diseño de vehículos que puedan actuar como DDS, ha experimentado un gran auge en los últimos años, empleándose micelas orgánicas, nanopartículas de oro u óxido de hierro y matrices porosas inorgánicas (polímeros de

coordinación porosos y sílices mesoporosas), entre otros (Figura 3). En general, la incorporación del fármaco al sistema de transporte se realiza mediante la encapsulación del principio activo, o bien mediante el anclaje de éste a la superficie del vehículo. El seguir una estrategia u otra determinará, en última instancia, la cantidad de fármaco incorporada, así como el comportamiento farmacocinético de la molécula activa *in vivo*. [5,6]

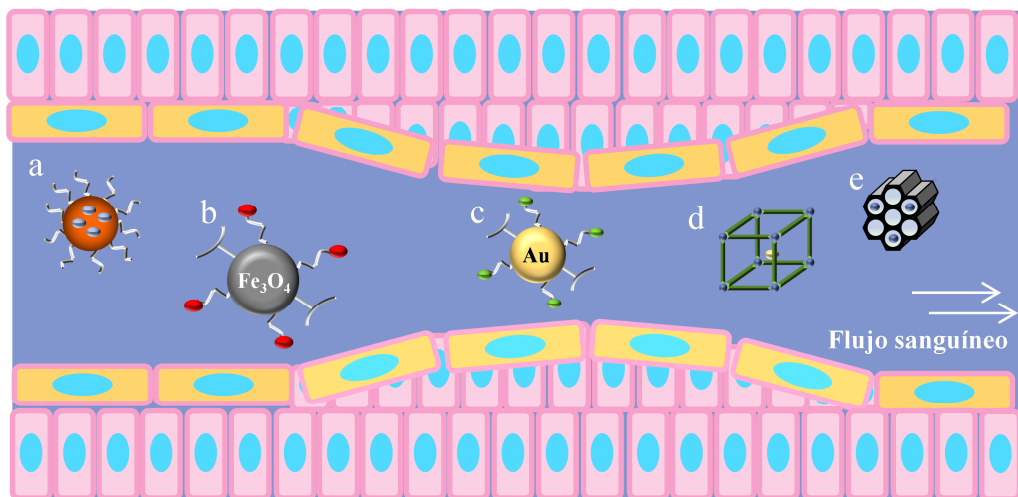


FIGURA 3: ESQUEMA DEL USO DE DIFERENTES VEHÍCULOS PARA EL TRANSPORTE Y LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS: A) MICELAS POLIMÉRICAS; B) NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE HIERRO; C) NANOPARTÍCULAS DE ORO; D) POLÍMEROS DE COORDINACIÓN POROSOS; E) SÍLICES MESOPOROSAS.

ADAPTADO .[7]

Respecto al fármaco original, el sistema híbrido fármaco@vehículo podría presentar numerosas ventajas:[8,9]

1. Aumentar la eficacia del tratamiento terapéutico, al producirse una mayor internalización, gracias al uso de un vehículo de transporte adecuado.
2. Proteger al compuesto bioactivo frente a las condiciones fisiológicas, evitando la pérdida de éste durante el transporte hacia el órgano o tejido diana.
3. Mejorar la especificidad del tratamiento; alcanzando las células objetivo con baja internalización en las células sanas y, por tanto, sin efectos secundarios notables.

4. Reducir los efectos secundarios adversos gracias a la biodegradabilidad y/o biocompatibilidad de los agentes de transporte.

Hasta la fecha, los liposomas, las micelas y los polímeros orgánicos han sido los materiales que más se han estudiado para su uso como vehículos de fármacos. De hecho, algunos de ellos ya han recibido la aprobación de la FDA (Administración de alimentación y fármacos de los Estados Unidos, del inglés *Food and Drug Administration*), para poder ser utilizados en ensayos clínicos. Sin embargo, estos sistemas de transporte convencionales suelen presentar poco control sobre la liberación del principio activo *in vivo*, así como lixiviaciones del fármaco, en ciertas condiciones fisiológicas, previas a su acumulación.[10,11] Por estos motivos, en los últimos años, se está explorando también el uso de compuestos inorgánicos porosos, como materiales alternativos para la preparación de nuevos DDSs. En este tipo de sistemas, tanto el tamaño como la forma de las partículas, así como sus propiedades superficiales, pueden controlarse fácilmente, lo que permitiría un diseño a la carta en función de la aplicación final a la que se vaya a destinar el material. Y es precisamente esa flexibilidad y versatilidad de los materiales inorgánicos porosos, la que ha despertado gran interés en la comunidad científica en los últimos años, que los ve como potenciales DDSs que se puedan utilizar tanto con fines terapéuticos como con fines de diagnóstico.[12,13]

En esta Tesis Doctoral se explorará el uso de polímeros de coordinación porosos (PCPs), también denominados *metal-organic frameworks* (MOFs), y sílices mesoporosas (SMPs) como sistemas para el transporte y liberación controlada de moléculas bioactivas, en concreto de monóxido de carbono. A continuación pasaremos a describir las características y propiedades fundamentales de ambos tipos de materiales.

1.1. Polímeros de coordinación porosos

Los polímeros de coordinación porosos (PCPs) o MOFs (del inglés, *Metal-Organic Frameworks*), son un tipo de compuestos híbridos metal-orgánicos cristalinos, que presenta un tamaño de poro homogéneo. Su preparación se basa en la combinación de iones metálicos con espaciadores orgánicos, que se autoensamblan para generar una red porosa accesible a moléculas huésped (Figura 4). Frente a otros sólidos porosos, como

son los carbonos, sílices o zeolitas, los MOFs ofrecen una amplia diversidad de estructuras debido a la gran variedad de iones metálicos y ligandos orgánicos que pueden elegirse en su diseño; permitiendo, en definitiva, la preparación de un amplio abanico de materiales con diferentes tamaños y/o tipos de poro (canales, cavidades, etc.).[14] Además, algunos de ellos tienen lo que se conoce como porosidad flexible, pudiendo adaptar sus cavidades al tamaño de la molécula huésped.[15,16] Por último, los espaciadores orgánicos también se pueden funcionalizar, lo que permitiría modular/modificar las interacciones anfitrión-huésped y, en definitiva, tener un mayor control sobre el material híbrido huésped@MOF preparado.[17]



FIGURA 4: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE UN POLÍMERO DE COORDINACIÓN POROSO Y SUS CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES.

En 1989 Robson y Hoskins sintetizaron el primer polímero de coordinación poroso,[18] desde entonces, se han preparado un gran número de PCPs que han demostrado su utilidad en diferentes campos de aplicación como son la catálisis,[19] la separación y purificación de gases[20] o la biomedicina.[21]

En lo relativo al uso de MOFs como DDSs, el primer aspecto a tener en cuenta es la toxicidad de los elementos que lo componen; en concreto del ión/es metálico/s y de los espaciadores orgánicos. En relación a los iones metálicos, es deseable seleccionar aquellos que presenten un bajo perfil de toxicidad, como por ejemplo son el calcio, magnesio, zinc, hierro, titanio o aluminio, entre otros.[14] Respecto al espaciador orgánico, lo más habitual es utilizar ligandos sintéticos exógenos; es decir, que no están presentes en los procesos metabólicos de los seres vivos. Ejemplos de este tipo de ligandos son el ácido tereftálico o el ácido 2,5-dihidroxitereftálico (Figura 5). Sin

embargo, existe también la posibilidad de utilizar los llamados ligandos endógenos o biomoléculas presentes de forma natural en los seres vivos, disminuyendo significativamente los riesgos de toxicidad. Ejemplos de este segundo tipo de ligandos serían los MOFs basados en ácido cítrico[22], ácido fórmico[23] o ácido aspártico[24] (Figura 5). Desafortunadamente, la mayoría de los MOFs que se han preparado utilizando ligandos endógenos, no presentan la porosidad o estabilidad necesarias para su uso en aplicaciones biomédicas, por lo que su estudio ha quedado relegado a un segundo plano.

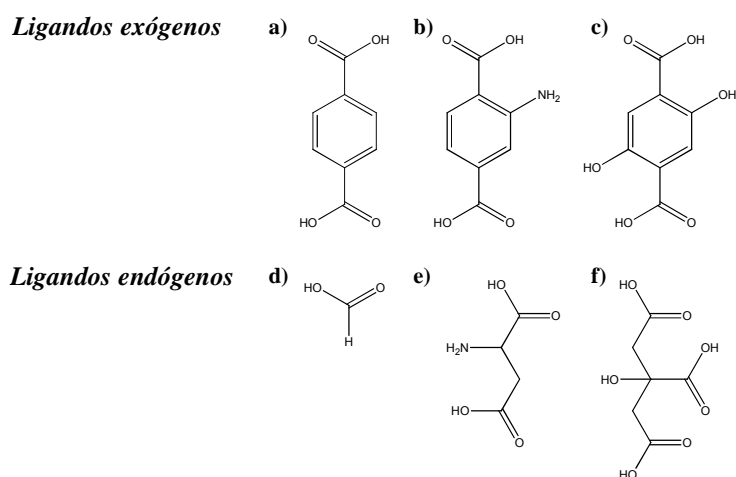


FIGURA 5: LIGANDOS UTILIZADOS PARA LA PREPARACIÓN DE MOFs. LIGANDOS EXÓGENOS: A) ÁCIDO TEREFTÁLICO; B) ÁCIDO 2-AMINOTEREFTÁLICO; C) ÁCIDO 2,5-DIHIIDROXITEREFTÁLICO. LIGANDOS ENDÓGENOS: D) ÁCIDO FÓRMICO; E) ÁCIDO ASPÁRTICO; Y F) ÁCIDO CÍTRICO.

Por otra parte, cuando nos referimos a sistemas que van a ser usados en este tipo de aplicaciones, el tamaño y la morfología de las partículas del MOF son dos parámetros claves, ya que determinan, entre otros, la potencial vía de administración del DDS en el organismo. Por ejemplo, la administración de fármacos vía parenteral requiere suspensiones de nanopartículas con tamaño inferior a 200 nm, de forma que puedan circular por los vasos sanguíneos del sistema circulatorio sin riesgo de producir una obstrucción. En este sentido, durante los últimos años se ha hecho un enorme esfuerzo en aras de desarrollar diferentes estrategias sintéticas que permitan controlar el tamaño y/o morfología de las partículas sintetizadas sin afectar a su porosidad (Figura 6).[21]

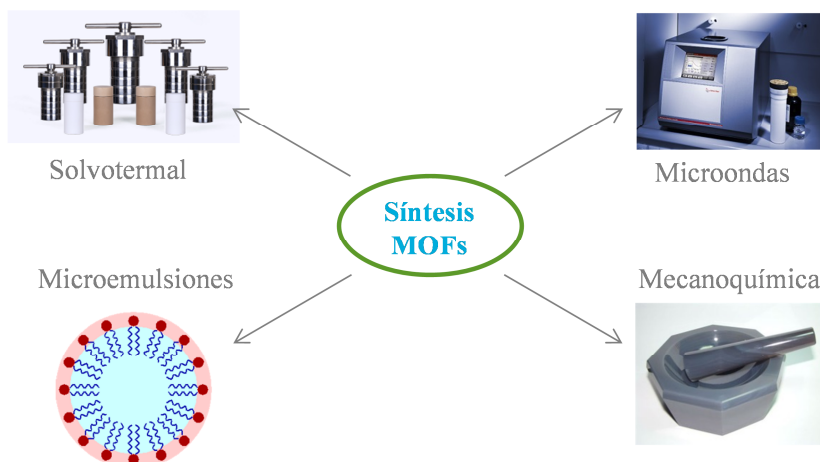


FIGURA 6: DIFERENTES RUTAS SINTÉTICAS PARA LA OBTENCIÓN DE MOFs CON TAMAÑO DE PARTÍCULA CONTROLADO.

A continuación pasaremos a describir brevemente las diferentes estrategias sintéticas desarrolladas para la preparación de MOFs con tamaño de partícula controlado; analizando las ventajas e inconvenientes de cada una de ellas.

- a) **Síntesis solvotermal:** La síntesis solvotermal es la estrategia más usada para la obtención de MOFs. Esta ruta sintética requiere condiciones de presión y temperatura de moderadas a altas. Para controlar el tamaño de las partículas resultantes es necesario modular los procesos de nucleación y cristalización. Los factores que influyen en dichos procesos son la temperatura, el tiempo de reacción, el pH de la disolución y la estequiometría de los reactivos, así como la adición de agentes modulantes.[25,26] Estos moduladores pueden ser *i*) compuestos que interaccionen con el ión metálico compitiendo, por lo tanto, con los espaciadores orgánicos (ej. ácidos carboxílicos) o *ii*) polímeros y/o tensioactivos que controlen el crecimiento o la forma de las partículas y, por tanto, su tamaño. En este sentido, Ranft *et al.* obtuvieron el MOF $[\text{Cu}_3(\text{BTC})_2]_n$ (BTC: ácido 1,3,5-benzenotricarboxílico) en rango nanométrico mediante la incorporación en la síntesis del ácido poliacrílico.[27] También, Mirkin y colaboradores obtuvieron un MOF funcionalizado con grupos azida del tipo UiO-66 $[\text{Zr}_6\text{O}_4(\text{OH})_4(\text{BDC})_6]_n$ (BDC: ácido 1,2-benzenodicarboxílico o ácido tereftálico) (UiO, *Universiteitet i Oslo*), con tres tamaños de partícula diferentes

(14, 19 y 540 nm), usando cantidades variables de ácido acético como modulador.^[28] A pesar de que esta estrategia ha demostrado su utilidad en la obtención de MOFs con tamaño de partícula controlado, precisa de largos procesos de optimización, así como de condiciones severas de reacción, lo que limita su fácil escalado.

- b) Síntesis asistida por microondas o ultrasonidos:** Frente a la síntesis solvotermal convencional, el calentamiento producido por microondas favorece un proceso de nucleación rápido y uniforme debido a la generación de sobrecalentamientos locales, generando partículas con distribución de tamaño homogéneo.[29] Un ejemplo de MOF sintetizado mediante esta estrategia es el tereftalato de cromo (III) MIL-101(Cr) (MIL: Material del Instituto Lavoisier). En este caso, el proceso solvotermal requería la presencia de ácido fluorhídrico y tiempos largos (16 horas) para obtener cristales en el rango micrométrico. Sin embargo, mediante la síntesis asistida por microondas, se obtuvieron partículas de 20 nm en 5 minutos, evitando además el uso del ácido fluorhídrico.[30,31] En lo referente a la síntesis asistida por ultrasonidos, Qui *et al.* publicaron por primera vez en el año 2008, la síntesis de diferentes nanoMOFs de zinc siguiendo esta estrategia sintética.[32] Por ejemplo, obtuvieron nanocristales de 50-100 nm del MOF $[Zn_3(BTC)_2]_n$ en condiciones muy suaves (temperatura ambiente) y tiempos muy cortos (5 minutos); mientras que en la síntesis solvotermal, que requería condiciones más severas (140 °C, 24 horas), se obtenían partículas en el rango micrométrico.[33]
- c) Síntesis basada en procesos mecanoquímicos:** Esta estrategia ha sido recientemente empleada para la obtención de MOFs con un tamaño de partícula controlado. Puede ser usada como tratamiento post-sintético, mediante la molturación de cristales ya formados, o como ruta sintética, mediante la molturación de los reactivos en ausencia de disolvente. Esta última metodología ha sido aplicada, por ejemplo, para la obtención de $[Cu_3(BTC)_2]_n$. [34,35] A pesar de no precisar disolventes, lo cual sería *a priori* una ventaja, es una estrategia sintética que solo puede ser empleada en la síntesis de MOFs que

requieran condiciones suaves para su preparación; excluyendo, por ejemplo, a sistemas basados en metales como el hierro, aluminio, cromo, zirconio o titanio.

- d) Síntesis mediante microemulsiones:** La preparación de microemulsiones también ha sido empleada en la obtención de nanoMOFs. En este caso, las micelas formadas pueden ser vistas como reactores a escala nanométrica, donde se forman las partículas de MOF. En el campo de las redes metal-orgánicas porosas, Lin *et al.* han usado esta estrategia para la formación MOFs basados en lantánidos o manganeso, con tamaño de partícula controlado.[36–39] En general, esta metodología ofrece pobres rendimientos y, a menudo, presenta problemas de reproducibilidad debido a la gran variedad de parámetros que determinan el proceso. Además, los tensioactivos necesarios para la generación de las micelas pueden difundir a través de los poros de las matrices sintetizadas, disminuyendo por lo tanto su capacidad de adsorción.

Una vez que el MOF y la ruta sintética han sido seleccionadas (atendiendo a la toxicidad de sus componentes y al tamaño y morfología de las partículas), el siguiente paso es la incorporación del fármaco o compuesto bioactivo dentro del material. En este sentido, existen fundamentalmente tres posibles estrategias: *i*) la preparación de MOFs intrínsecamente bioactivos, *ii*) la encapsulación del principio activo mediante la impregnación del sólido poroso con una disolución concentrada del fármaco o *iii*) la encapsulación mediante molturación del fármaco y el PCP en estado sólido, que resulta especialmente útil cuando la solubilidad del fármaco es limitada.[40]

En los denominados MOFs intrínsecamente bioactivos, el compuesto bioactivo o fármaco forma parte de la estructura de la matriz porosa; siendo o bien el ión metálico, o bien el espaciador orgánico. Por lo tanto, su liberación se produce como consecuencia de la degradación progresiva del MOF en el medio fisiológico. Dicha degradación está condicionada por parámetros tales como la naturaleza del ión metálico y de los espaciadores orgánicos, las funcionalizaciones introducidas/existentes en el poro, las propiedades superficiales de las partículas, etc.[41–43] Un ejemplo de este tipo de MOFs fue el desarrollado por Serre y colaboradores en el año 2010. El biomaterial poroso, al que denominaron con el acrónimo bio-MIL-1, estaba basado en un MOF de

hierro con ácido nicotínico (vitamina B3) como ligando orgánico (Figura 7).[44] La degradación del material, en condiciones fisiológicas (PBS, 37 °C), tenía lugar en el transcurso de 1 hora, provocando la liberación de las molécula bioactivas (ácido nicotínico) junto con iones Fe^{3+} que precipitaban posteriormente en forma de fosfatos.

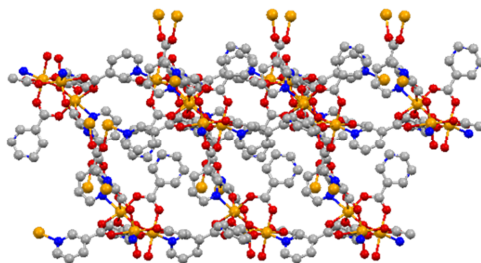


FIGURA 7: ESTRUCTURA DEL POLÍMERO DE COORDINACIÓN BIO-MIL-1. LOS ELEMENTOS Fe , C , N Y O ESTÁN EN NARANJA, GRIS, AZUL Y ROJO.[44]

Sin embargo, teniendo en cuenta la alta porosidad de los MOFs, la principal estrategia para incorporar el fármaco en la matriz es la encapsulación del compuesto activo en el interior de sus cavidades, dando lugar a un sistema híbrido fármaco@MOF. Esta incorporación se lleva a cabo generalmente mediante la impregnación del sólido poroso en una disolución concentrada del fármaco, seguida de un proceso de limpieza para eliminar aquellas moléculas que hayan quedado simplemente fisisorbidas en la superficie de las partículas del PCP (Figura 8).

Tanto el tamaño del poro como la naturaleza química del mismo (hidrofílica ó hidrofóbica), así como la presencia de espaciadores funcionalizados que modulen las interacciones anfitrión-huésped, son factores clave que determinarán, entre otros, la cantidad de fármaco incorporado.[44]

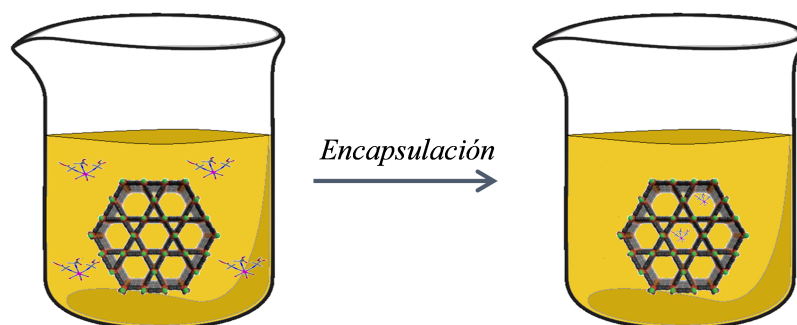


FIGURA 8: ESQUEMA DEL PROCESO DE ENCAPSULACIÓN POR IMPREGNACIÓN DE UNA MOLÉCULA BIOACTIVA EN LAS CAVIDADES DE UN MOF.

Además, la velocidad de liberación del compuesto bioactivo vendrá determinada por la posterior difusión del fármaco hacia la disolución a través de la matriz porosa. Este proceso podrá estar condicionado, a su vez, por diferentes parámetros, tales como: *i*) factores espaciales (tamaño de la molécula bioactiva respecto al tamaño y/o forma de las cavidades), *ii*) interacciones fármaco-MOF que, como se ha comentado previamente, pueden ser moduladas mediante la inserción de grupos funcionales en el espaciador orgánico o *iii*) tamaño de las partículas. Asimismo, la difusión del propio disolvente o de ciertas moléculas disueltas en él, hacia el interior de la matriz porosa, podría también repercutir en el proceso de liberación del fármaco; dando lugar a un proceso competitivo, en el que dichas moléculas interaccionasen de manera preferencial con las cavidades del PCP, favoreciendo, en definitiva, la liberación del compuesto activo. Por último, en función de la estabilidad del material poroso en cuestión, y como ocurría con los MOFs intrínsecamente bioactivos, la degradación parcial del material cargado en el medio fisiológico también puede tener lugar, repercutiendo asimismo en una mayor liberación del fármaco.

Esta segunda estrategia, la de encapsulación mediante impregnación, ha sido ampliamente utilizada en los últimos años para la incorporación de moléculas bioactivas de diversa índole (antitumorales,^[21] ácidos nucleicos,^[28] antivirales,^[45] bactericidas^[46] o gases terapéuticos^[47-49]). En el campo de los fármacos antitumorales, nuestro grupo de investigación ha diseñado y preparado ya varios sistemas híbridos fármaco@MOF, con el objetivo de lograr una liberación controlada de los compuestos bioactivos encapsulados (Figura 9). Por ejemplo, en el año 2011 preparamos un nuevo

MOF de níquel $[\text{Ni}_8(\text{OH})_4(4,4'\text{-buta-1,3-diin-1,4-diil})\text{bispirazolato}]_n$ que presentaba una alta estabilidad en fluido corporal simulado (SBF, del inglés *Simulated Body Fluid*). Dicha estabilidad era debida a las interacciones metal-pirazolato, mucho más robustas que los típicos enlaces metal-carboxilato empleados habitualmente en la preparación de MOFs. Como prueba de concepto, incorporamos el agente antitumoral RAPTA-C $[\text{Ru}(\text{Cl})_2(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{pta})]$ (pta: 1,3,5-triaza-7-fosfoadamantano) en el interior de la matriz y estudiamos la liberación de dicho fármaco en SBF. Los resultados pusieron de manifiesto que el proceso de incorporación-liberación era reversible.^[50] En el año 2016, encapsulamos este mismo agente antitumoral en un MOF más biocompatible (el MIL-100(Fe): $[\text{Fe}_3\text{OF}(\text{BTC})_3]$), y con tamaño de partícula en el rango nanométrico (135 ± 70 nm). En este caso, observamos que la liberación del compuesto bioactivo se producía en dos etapas diferenciadas (con tiempos de vida media de 1.9 y 30 horas, respectivamente) y que la velocidad de liberación del fármaco de rutenio aumentaba en presencia de albúmina de suero bovino.^[51] Otros ejemplos son las encapsulaciones del complejo RAPTA-C y del compuesto orgánico antitumoral mitoxantrona (un derivado de la antraquinona que presenta actividad antitumoral mediante la interacción con el ADN de forma no covalente) que llevamos a cabo utilizando como material poroso la serie ZnBDP_X (H_2BDP : 1,4-bis(1*H*-pirazol-4-il)-2-X-benceno; X = H, NO_2 , NH_2 , OH), sintetizada previamente por nuestro grupo de investigación.^[52] En este caso, un control en el tiempo de reacción, durante la síntesis del material, permitió obtener partículas nanométricas sin necesidad de adicionar ningún agente modulador. La cantidad encapsulada de ambos compuestos (RAPTA-C y mitoxantrona) variaba en función del grupo funcional presente en el espaciador orgánico utilizado, lo que demostró la influencia de la interacción huésped-anfitrión en la cantidad de fármaco incorporado. Además, observamos que los perfiles de liberación del complejo RAPTA-C en medio fisiológico, a partir de los distintos sistemas RAPTA-C@ZnBDP_X, también eran diferentes en función del ligando orgánico presente en la matriz porosa, confirmando la influencia de las interacciones huésped-matriz sobre el proceso de desorción. Por último, la estabilidad de la matriz porosa fue evaluada en medio fisiológico, demostrando que, en este caso, la funcionalización del espaciador con grupos OH labilizaba significativamente el material. Asimismo, en 2014 sintetizamos la

nueva metalodroga $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})_2\text{Ru}_2\text{mitoxantronato}]\text{Cl}_2$ mediante la reacción de $[\text{Ru}(\text{Cl})_2(p\text{-cimeno})]_2$ con el fármaco antitumoral mitoxantrona. En este caso, la incorporación de esta metalodroga dentro de las cavidades del MIL-100(Fe) se llevó a cabo mediante la estrategia de “el barco en la botella”. Puesto que las ventanas de las cavidades del MIL-100(Fe) no permitían la incorporación directa del fármaco $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})_2\text{Ru}_2\text{mitoxantronato}]\text{Cl}_2$, fue necesario prepararlo *in situ* mediante el uso de esta inusual estrategia.^[53] Para ello, en primer lugar, se llevó a cabo la incorporación del precursor de rutenio $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3\text{Cl}_3]$ dentro de las cavidades del MOF, a continuación se formó el complejo $[\text{Ru}(\text{Cl})_2(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})]_2$ y finalmente éste se hizo reaccionar con mitoxantrona para dar lugar a la metalodroga $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})_2\text{Ru}_2\text{mitoxantronato}]\text{Cl}_2$ dentro de la matriz porosa.

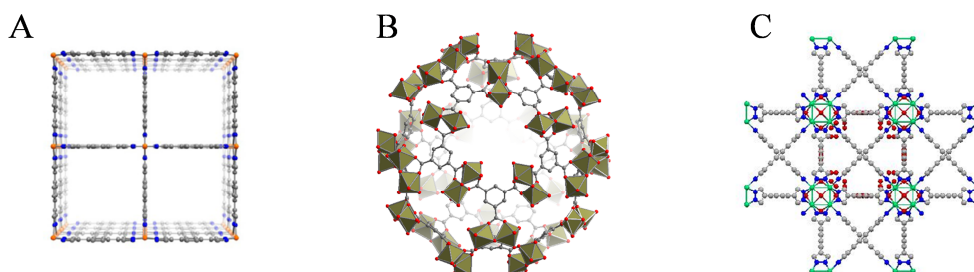


FIGURA 9: MOFs UTILIZADOS EN NUESTRO GRUPO DE INVESTIGACIÓN PARA EL TRANSPORTE Y LIBERACIÓN DE FÁRMACOS: A) ZnBDP_X; B) MIL-100 (Fe); C) $[\text{Ni}_8(\text{OH})_4(4,4'\text{-BUTA-1,3-DIIN-1,4-DIIL})\text{BISPIRAZOLATO}]_n$.

Por otra parte, recientemente se ha demostrado la actividad terapéutica de ciertos gases como son el monóxido de nitrógeno (NO), el sulfuro de hidrógeno (H_2S) y el monóxido de carbono (CO). En concreto, en el caso del monóxido de nitrógeno, su elevada reactividad precisa de sistemas o vehículos que le confieran estabilidad para poder alcanzar intacto los órganos o tejidos diana. Además, la liberación de este gas en combinación con fármacos antitumorales ha demostrado tener un efecto sinérgico, aumentando su citotoxicidad frente a diversas líneas celulares tumorales.^[54] En este contexto, nuestro grupo de investigación, en colaboración con el grupo del Prof. Russell Morris de la Universidad de St Andrews (Reino Unido), llevó a cabo la encapsulación combinada del gas terapéutico NO y del complejo antitumoral RAPTA-C, usando como vehículo de transporte el MOF $[\text{Ni}_2(\text{C}_8\text{H}_2\text{O}_6)(\text{H}_2\text{O})_2]$ (CPO-27-Ni).^[55] Este MOF, que

presenta posiciones de coordinación insaturadas en los centros metálicos, admitía, al mismo tiempo, la coordinación de moléculas de NO y la incorporación de RAPTA-C en sus cavidades. Ambos procesos eran además reversibles, lo que permitió la liberación simultánea de las dos moléculas bioactivas en medio fisiológico.

Además de los ejemplos aquí mencionados, existen otros muchos trabajos de investigación donde se explora el uso de los MOFs como vehículos para la incorporación/liberación de diferentes compuestos bioactivos. En la Tabla 1 se recogen algunos de los más representativos hasta la fecha.[21]

MOF	FÁRMACO
SiO ₂ -MIL-101-NH ₂	ETOXISUCCINATO-CISPLATINO ^[56]
MIL-100 (Fe)	BISULFÁN ^[45]
ZIF-8	CAMPTOTECINA[39]
UiO-66	ALENDRONATO ^[57]
UiO-66, UiO-66-NH ₂	CISPLATIN, NITRIC OXIDE ^[58]

TABLA 1: ALGUNOS DE LOS MOFS MÁS REPRESENTATIVOS UTILIZADOS PARA LA ENCAPSULACIÓN DE FÁRMACOS.[21]

1.2. Sílices mesoporosas

Las sílices mesoporosas (SMPs) constituyen otro tipo de sólidos inorgánicos porosos formados por SiO₂, que se ordenan generando cavidades de tamaño homogéneo en el orden de los mesoporos (2-50 nm). Su síntesis está basada en el conocido método sol-gel^[59] y consta de dos etapas bien diferenciadas: *i*) la etapa de condensación y *ii*) la posterior eliminación del tensioactivo. Para su preparación se utilizan tensioactivos que actúan como plantilla durante la condensación de los precursores inorgánicos. Durante este proceso, el tensioactivo alcanza un valor de concentración conocido como “concentración micelar crítica”, formando agregados moleculares denominados micelas, que a su vez forman estructuras supramoleculares. Los oligómeros basados en silicio condensan alrededor de las micelas formando un sólido que contiene al tensioactivo. Este tensioactivo es posteriormente eliminado mediante un proceso de calcinación o de extracción con disolventes (Figura 10). Las estructuras resultantes, que pueden presentar diversas geometrías (hexagonal, cúbica o laminar), están formadas por

cavidades o canales separados por paredes de sílice amorfa.^[60] La naturaleza y concentración de los tensioactivos utilizados, así como las condiciones de síntesis (temperatura, pH, agitación, concentración salina), determinan las propiedades finales del material poroso obtenido.

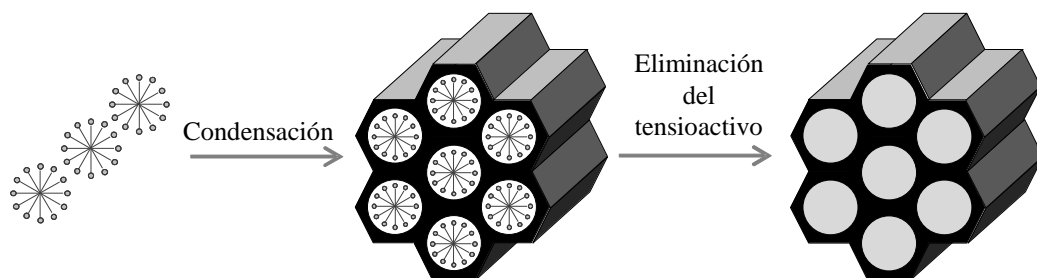


FIGURA 10: ESQUEMA DE LA FORMACIÓN DE UNA SÍLICE MESOPOROSA Y SU POSTERIOR CALCINACIÓN O EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES PARA LA ELIMINACIÓN DEL TENSIOLACTIVO.

Como en el caso de los PCPs, estos materiales de sílice presentan una red porosa ordenada de tamaño homogéneo, con alta área superficial así como un elevado volumen de poro. En este caso, la funcionalización es posible gracias a la presencia de grupos silanol superficiales.^[61] A diferencia de los MOFs, estos materiales suelen presentar una mayor estabilidad química/térmica pero una menor versatilidad en la composición de sus estructuras.

Las sílices mesoporosas surgieron en la década de los noventa, ante la necesidad de obtener materiales con mayor tamaño de poro que las zeolitas existentes. En concreto, en el año 1992, un grupo de científicos de la *Mobil Oil Company* sintetizaron una nueva familia de compuestos llamada M41S dando lugar a las primeras sílices mesoporosas.^[60] Desde entonces, estos materiales han encontrado aplicación en distintos campos como son la catálisis,^[62] la fabricación de sensores^[63], la separación de mezclas^[64] o la liberación de fármacos.^[65] En 2001, se utilizó por primera vez una sílice mesoporosa (el material MCM-41, del inglés *Mobil Composition of Matter 41*) para la preparación de un DDS, incorporando el fármaco ibuprofeno en el interior de sus cavidades.^[66] Desde entonces, se han desarrollado una gran variedad de sistemas híbridos fármaco@SMP, demostrando la habilidad de estos materiales para la preparación de DDSs.^[60]

En relación a su toxicidad, las sílices mesoporosas han demostrado una alta biocompatibilidad *in vivo*, con una buena tolerancia (de hasta 200 mg kg⁻¹)^[67] y hemocompatibilidad.^[68] Además, muestran una alta estabilidad química y térmica, por lo que son bastante estables en medio fisiológico. De hecho, el estudio de materiales basados en sílice para el diagnóstico de distintos tipos de cáncer ha sido aprobado recientemente por la FDA para su uso en fase clínica.^[69,70]

También en este caso, como se mencionó en el apartado anterior, la morfología y tamaño de las partículas determinarán la vía de administración del DDS. En este sentido, dichas características pueden ser moduladas durante la preparación de estos materiales porosos mediante la modificación de las condiciones de síntesis; por ejemplo variando la fuente de silicio, la naturaleza de los tensioactivos, la adición de disolventes, etc. De esta forma, se pueden obtener partículas con distinta morfología (esferas, barras) y tamaños, que van desde los 50 nm a las micras.^[65]

Al igual que con los PCPs, debido a la alta porosidad de las sílices mesoporosas, la incorporación del fármaco se realiza mediante un proceso de encapsulación. En este sentido, el tamaño de poro y la superficie específica del material son parámetros clave a la hora de determinar la cantidad de fármaco incorporado. Además, la posibilidad de poder funcionalizar las paredes del material también puede influir en dicho proceso, así como en la posterior liberación del compuesto terapéutico al medio fisiológico.

Por otra parte, el tamaño de las cavidades determina el tamaño de la molécula huésped que puede ser incorporada. Este tamaño a su vez puede ser controlado, por ejemplo, variando la longitud de las cadenas del tensioactivo utilizado, empleando agentes poliméricos o mediante aditivos. Además, dicho tamaño puede afectar también al proceso de liberación del fármaco, como demostraron Vallet-Regí *et al.* en el año 2004.^[71] En este estudio, se prepararon materiales del tipo MCM-41 con diferente tamaño de poro mediante el empleo de tensioactivos del tipo bromuro de alquiltrimetilamonio (C_nTAB) que presentaban cadenas hidrofóbicas con diferente número de átomos de carbono (n = 8-16). Tras la encapsulación de ibuprofeno en los diferentes materiales, comprobaron que la velocidad de liberación del fármaco estaba condicionada por el diámetro del poro (Figura 11).

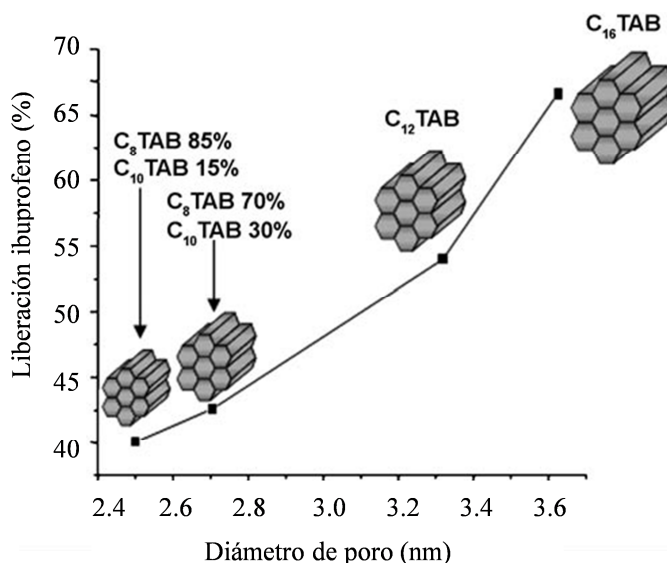


FIGURA 11 : PERFIL DE LIBERACIÓN DE IBUPROFENO ENCAPSULADO EN MCM-41 EN FUNCIÓN DEL TAMAÑO DE PORO DE LA MATRIZ.^[61]

Debido a que, en este tipo de materiales, el proceso de incorporación está gobernado por fenómenos de adsorción, el área superficial es otro parámetro importante que influye sobre la cantidad de fármaco encapsulado, ya que representa la superficie disponible para que se produzca la adsorción del mismo a las paredes de las cavidades. En este sentido, Vallet-Regí *et al.* realizaron un estudio comparativo sobre la cantidad del fármaco alendronato incorporado en dos sílices mesoporosas (MCM-41 y SBA-15) con distintos valores de área superficial (S_{BET} de 1160 y 720 m² g⁻¹, respectivamente). Las cantidades de alendronato encapsulado fueron de 139 mg g⁻¹ para la MCM-41 y de 93 mg g⁻¹ para la SBA-15. Este estudio permitió demostrar la importancia de la superficie accesible en la sílice en lo relativo a la incorporación del fármaco.^[72] Sin embargo, además de las interacciones fármaco-mesoporo, que tienen lugar durante el proceso de encapsulación, también se producen interacciones débiles fármaco-fármaco. Y es por este motivo que, además de la superficie accesible en la sílice, el volumen de poro de la misma también puede influir, en cierta medida, sobre la cantidad final de fármaco incorporado en el material híbrido.

Por otra parte, como ya se ha mencionado previamente, los poros de estos materiales también pueden ser funcionalizados con distintos grupos químicos que puedan

favorecer la incorporación de ciertas moléculas huésped y, como ocurría en el caso de los MOFs, puedan influir en la posterior liberación del fármaco. En este sentido, los grupos funcionales pueden ser introducidos mediante la reacción química de los grupos silanol superficiales con alcoxisilanos funcionalizados (Figura 12). Además, la superficie externa de las partículas también puede ser funcionalizada, lo que permitiría la incorporación de grupos químicos específicos en la superficie del material que favorecieran la bioacumulación de las partículas en los órganos o tejidos deseados.

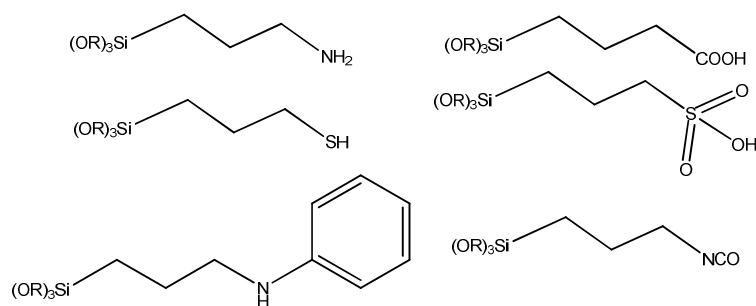


FIGURA 12: EJEMPLOS DE ALCOXISILANOS UTILIZADOS PARA LA FUNCIONALIZACIÓN DE SÍLCES MESOPOROSAS.

Para llevar a cabo esta funcionalización existen fundamentalmente dos metodologías:

- a) **Funcionalización post-sintética:** En este caso, la modificación puede ser realizada sobre las paredes de los poros o sobre la superficie externa de las partículas. Esta metodología permite además funcionalizar exclusivamente la superficie externa de las partículas, si se realiza antes de llevar a cabo la eliminación del tensioactivo. Sin embargo, en este último caso, los grupos funcionales deben ser estables bajo las condiciones experimentales necesarias para llevar a cabo la posterior eliminación del tensioactivo (altas temperaturas o presencia de disolventes) (Figura 13).

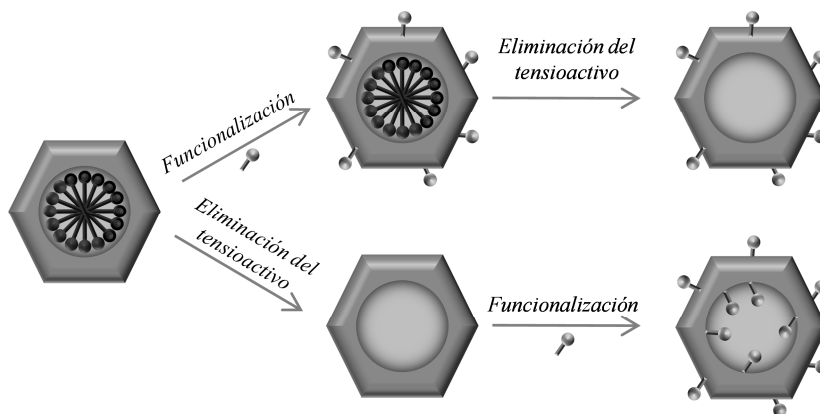


FIGURA 13: ESQUEMA DEL PROCESO DE FUNCIONALIZACIÓN POST-SINTÉTICA DE UNA SÍLICE MESOPOROSA.

- b) **Funcionalización sol-gel:** Este método consiste en la co-condensación de los alcoxisilanos hidrolizados procedentes de la fuente de silicio y de los organoalcoxisilanos que introducen la funcionalización. De esta forma, los grupos funcionales se incorporan a las paredes de la estructura durante su ensamblaje (Figura 14). Este proceso permite funcionalizaciones más homogéneas que en el caso anterior. Sin embargo, también es cierto que la estructura de los materiales resultantes puede verse alterada, afectando por ejemplo a su porosidad final.

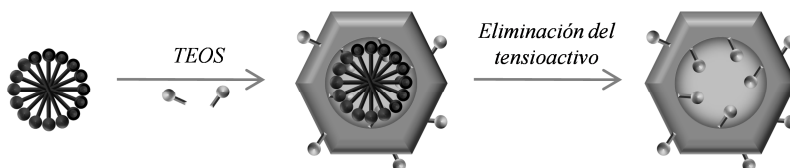


FIGURA 14: ESQUEMA DE LA FUNCIONALIZACIÓN DE SÍLICES MESOPOROSAS MEDIANTE CO-CONDENSACIÓN UTILIZANDO TETRAORTOSILICATO (TEOS) COMO FUENTE DE SILICIO.

Un ejemplo de la influencia que la funcionalización de sílices mesoporosas tiene en la incorporación y posterior liberación de fármacos fue el trabajo realizado por Delgado y colaboradores en 2013. En este estudio, se prepararon materiales MCM-41 en el rango de las micras y, mediante un tratamiento post-sintético, se incorporaron grupos funcionales amino y carboxílicos terminales en las cavidades.^[73] La encapsulación del agente tumoral *cisplatino* en cada uno de los materiales post-funcionalizados (MCM-41-NH₂ y MCM-41-COOH), así como en el material original (MCM-41), dió lugar a

tres valores diferentes de fármaco incorporado (61,4, 14,7 y 8,7 mg g⁻¹, respectivamente), como consecuencia de las diferentes interacciones fármaco-mesoporo que tenían lugar. Además, el estudio de liberación de cada material híbrido mostró un perfil cinético de liberación diferente, lo que puso de manifiesto la influencia de los grupos funcionales en la difusión del fármaco hacia el medio fisiológico (Figura 15).

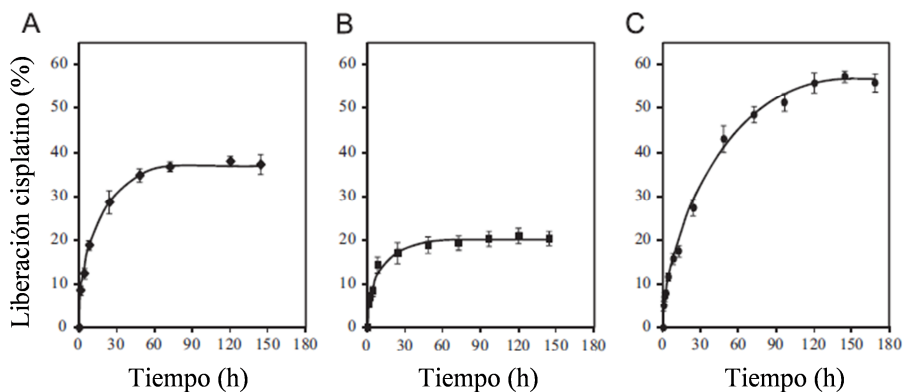


FIGURA 15: LIBERACIÓN DE CISPLATINO EN MEDIO FISIOLÓGICO DESDE LAS MATRICES A) MCM-41, B) MCM-41-NH₂ C) MCM-41-COOH.^[73]

Desde el primer DDS, basado en sílices mesoporosas en el año 2001, se ha desarrollado un amplio abanico de materiales híbridos fármaco@SMP. Hasta el momento, las matrices más estudiadas han sido la MCM-41 y la SBA-15 (76 % de las sílices mesoporosas empleadas).^[60] Algunos de los ejemplos más significativos, entre los que se incluyen fármacos antitumorales, hormonas, antibióticos o gases terapéuticos, vienen recogidos en la Tabla 2.

MATRIZ	FÁRMACO
SBA-15	AMOXICILINA ^[74]
MCM-41	CISPLATINO ^[75]
SBA-15	DOXORRUBICINA ^[76]
SBA-15	PROGESTERONA ^[77]
MCM-41, Al-MCM-41	NO ^[78]

TABLA 2: EJEMPLOS DE SÍLICES MESOPOROSAS UTILIZADAS PARA LA ENCAPSULACIÓN DE DIFERENTES FÁRMACOS.

2. Monóxido de carbono como agente terapéutico

El principal objetivo de esta Tesis Doctoral es el desarrollo de sistemas de almacenamiento, transporte y liberación controlada de monóxido de carbono con fines terapéuticos. En este apartado, se recogen las principales propiedades biológicas y terapéuticas de este gas, así como las estrategias sintéticas desarrolladas hasta la fecha para su liberación controlada en el organismo.

2.1. Monóxido de carbono gas

El monóxido de carbono (CO) es un gas incoloro e inodoro conocido como asesino silencioso (del inglés *silent killer*), debido a su elevada toxicidad en animales y humanos. Fue el genista y biólogo británico John Haldane quien, a comienzos del siglo XX, describió por primera vez los efectos fisiológicos de este gas sobre el cuerpo humano, en relación a su interacción con la hemoglobina (Hb).^[79] La hemoglobina presenta una afinidad por el monóxido de carbono 200 veces superior a la afinidad que presenta por el oxígeno, dando lugar a la formación de carboxihemoglobina, que impide el transporte de oxígeno hasta las células y tejidos del organismo. Así pues, la intoxicación con dicho gas, en función de su concentración así como del tiempo de exposición, puede producir la pérdida de conocimiento, estado de coma o incluso la muerte por hipoxia (falta de oxígeno). Su peligrosidad queda de manifiesto atendiendo al estudio realizado por la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) en 2015, que atribuye una media de 125 muertes anuales en España a la intoxicación con dicho gas, generalmente debida a la combustión incompleta en sistemas de calefacción.

Sin embargo, a pesar de lo mencionado anteriormente, Tenhunen *et al.*^[80] demostraron en 1968 que el monóxido de carbono es producido de forma endógena por el organismo de los mamíferos, principalmente mediante la oxidación del grupo hemo a través de la enzima hemoxigenasa (HO). Este proceso lleva consigo la liberación de monóxido de carbono, de Fe^{2+} (que es secuestrado por la ferritina) y de biliverdina (que a continuación es reducida a bilirrubina)^[80]. Este proceso puede ser observado fácilmente al producirse un hematoma (Figura 16). Tras la rotura vascular, y a partir de

la hemoglobina presente en la sangre, se produce la liberación del grupo hemo formando una mancha rojiza. Transcurrido un tiempo, puede apreciarse la aparición de una coloración verdosa (como consecuencia de la formación de biliverdina), que finalmente se convierte en bilirrubina por acción de la enzima biliverdina reductasa, dando a la lesión un tono amarillento. Antes de su recuperación, la zona mantiene regiones amarillentas junto con zonas de color rojo intenso, esto último como consecuencia de la formación de carboxihemoglobina.

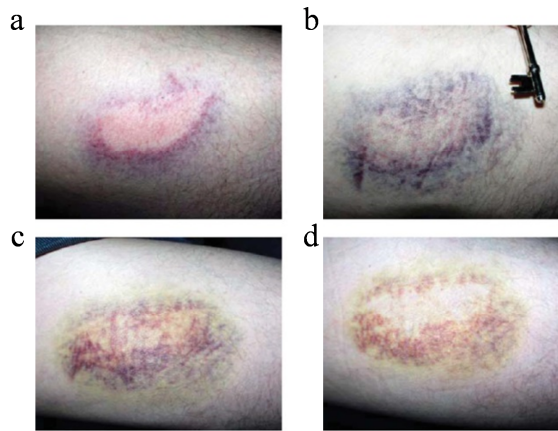


FIGURA 16: EVOLUCIÓN DE UN HEMATOMA CON EL TIEMPO. a) 12 HORAS; b) 2 DÍAS; c) 5 DÍAS; d) 10 DÍAS.^[81]

La mayor parte del CO producido de forma endógena en el organismo proviene del proceso enzimático descrito anteriormente (aprox. un 86%), mientras que el 14% restante es debido a procesos bacterianos, de fotoxidación, peroxidación de lípidos, etc.^[82] Existen tres isoenzimas de la hemoxygenasa (HO): *i*) la forma inducible HO-1, cuya expresión es estimulada en respuesta a amenazas contra la homeostasis celular y supervivencia,^[83,84] *ii*) la forma expresada de manera constitutiva HO-2, que se encuentra en órganos como el cerebro, hígado o endotelio y cuya función está relacionado con la neurotransmisión así como con la regulación del tono vascular^[83,85] y *iii*) una isoenzima con baja actividad catalítica, la HO-3.^[81]

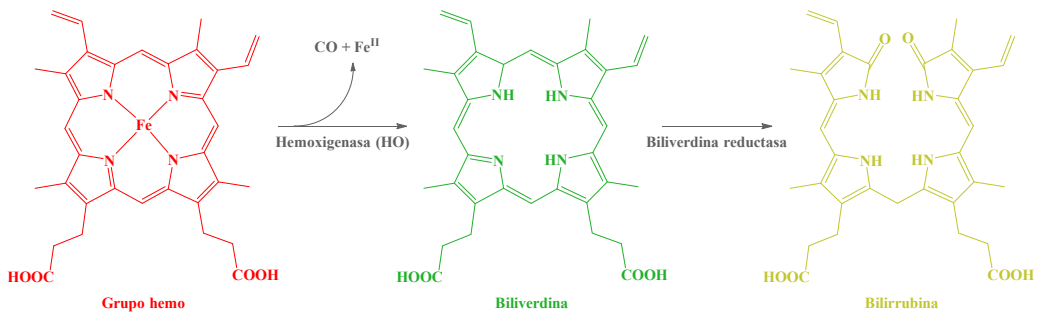


FIGURA 17: DEGRADACIÓN DEL GRUPO HEMO A TRAVÉS DE LA ENZIMA HEMOXIGENASA PRODUCIENDO MONÓXIDO DE CARBONO, HIERRO Y BILIVERDINA. ESTA ÚLTIMA ES REDUCIDA A BILIRRUBINA POR LA ACCIÓN DE LA ENZIMA BILIVERDINA REDUCTASA.

La importancia de la expresión de la enzima HO-1, frente a diversas situaciones de estrés, ha sido demostrada en diferentes modelos animales. Por ejemplo, la inducción de su producción en ensayos preclínicos de síndromes inflamatorios (como la colitis) presenta efectos citoprotectores y homeostáticos.^[86] También se ha observado que aquellos individuos que presentan genéticamente mayores niveles de expresión de la HO-1 son menos propensos a desarrollar ciertas patologías como son la diabetes, la arterioesclerosis, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o la artritis.^[87-90] Por otra parte, la inhibición genética de la producción de dicha enzima en ratones *knockout* es letal para los embriones, con una mortalidad superior al 95%, mientras que los supervivientes presentaban diferentes anomalías así como una dramática sensibilidad ante cualquier tipo de estrés.^[91] Además, cabe destacar que existe un caso clínico de muerte prematura de un ser humano con deficiencia en la expresión de la HO-1.^[92]

Teniendo en cuenta todo lo anterior, inducir la producción de dicha enzima, o administrar uno o más de sus productos, tendría como resultado un efecto homeostático y/o citoprotector, que en última instancia sería beneficioso para el organismo. De hecho, se ha planteado el uso de hierro, ferritina o pigmentos biliares (biliverdina o bilirrubina) como posibles agentes terapéuticos. Sin embargo, todos ellos presentan diferentes inconvenientes relacionados con su formulación química y/o biodisponibilidad.^[93-95] En cambio, la administración exógena de monóxido de carbono podría presentar ciertas ventajas frente a las anteriores sustancias, ya que posee una baja reactividad.

En este contexto, los científicos norteamericanos Robert Furchgott, Louis J. Ignarro y Ferid Murad recibieron el premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1998 por sus descubrimientos acerca de las propiedades del óxido nítrico como molécula señal en mamíferos.^[96,97] A raíz de estos estudios, la comunidad científica mostró un creciente interés sobre el posible efecto terapéutico que el NO y otros gases endógenos (p. ej. el monóxido de carbono o el sulfuro de hidrógeno) podían tener sobre el organismo. Estos gases pueden difundir y atravesar las membranas celulares sin la mediación de receptores o sistemas de transporte, lo que les permite acceder fácilmente al interior celular. Sin embargo, mientras que el NO y el H₂S interaccionan indiscriminadamente con diversos objetivos celulares, dada su alta reactividad, el monóxido de carbono reacciona casi exclusivamente con metales de transición, lo que le confiere una mayor especificidad. En este sentido, las principales biomoléculas diana para el CO son aquellas proteínas que presentan un grupo hemo, como por ejemplo la guanil ciclasa soluble (sGC), los canales de potasio que presentan grupos hemo, la NO sintetasa (NOS) o la NADPH oxidasa, en la superficie celular;^[98] así como la mitocondria o ciertos factores de transcripción, en el interior de la célula.^[99] La unión del monóxido de carbono al grupo hemo de estas proteínas altera su conformación y, por tanto, regula su función. Algunos ejemplos de su acción son la activación tanto de la sGC como de la NOS, lo que se traduce en un incremento del guanosin monofosfato cíclico (GMP) y el NO, respectivamente, que a su vez son reguladores del tono vasomotor así como la neurotransmisión.^[98] Por otra parte, el efecto que tiene el CO sobre la inhibición de otras enzimas, como son la NADPH oxidasa, modula la producción de superóxidos; mientras que sobre la citocromo C oxidasa incrementa la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).^[100-103]

Como consecuencia de la interacción del monóxido de carbono con éstas y otras moléculas diana, se desencadena una serie específica de procesos celulares que tienen efectos concretos sobre el organismo; haciendo de este gas un agente terapéutico con un enorme potencial (Figura 18). En concreto, hasta la fecha se han descrito para el CO: *i*) efectos antiinflamatorios,^[104] al disminuir la producción de mediadores inflamatorios y atenuar los niveles de NO, *ii*) efectos sobre la apoptosis^[105-108] y la proliferación celular,^[109-112] *iii*) control redox mediante la inducción de la producción de especies

reactivas de oxígeno (ROS) en la mitoncodria,^[100-103] y *iv*) efectos sobre el tono vascular mediante la activación de enzimas como son la sGC y la NOS.^[98]

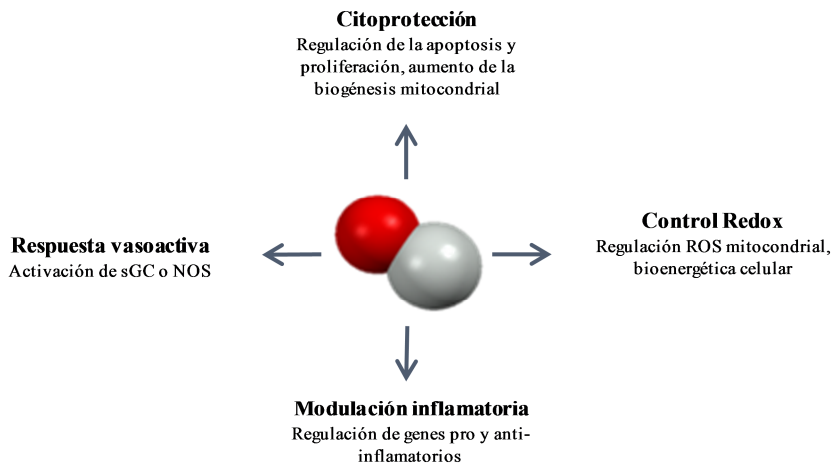


FIGURA 18: EFECTOS BIOLÓGICOS DERIVADOS DE LA ACCIÓN DE MONÓXIDO DE CARBONO. ADAPTADO.^[113]

Teniendo en cuenta estas potenciales propiedades terapéuticas, Motterlini y Otterbein señalan tres áreas sobre las que el monóxido de carbono, con vistas a su uso clínico, ha despertado un mayor interés.^[113] A continuación se exponen, para cada una de estas áreas, algunos ejemplos de ensayos preclínicos en los que el monóxido de carbono ha demostrado tener efectos beneficiosos (Tabla 3):

- a) **Enfermedades de índole inflamatoria:** Como se expuso anteriormente, el monóxido de carbono presenta propiedades antiinflamatorias, que ya han sido evaluadas en ensayos preclínicos con diferentes modelos de enfermedad. Un ejemplo sería el efecto positivo que el CO muestra frente a malaria cerebral inducida en ratones. En este modelo de enfermedad, que presenta una gran similitud sintomática con la infección en humanos, la principal causa de mortalidad es la inflamación cerebral. En este estudio, se observó que la administración de monóxido de carbono, inhalado 3 días después de la infección, impedía la formación de edema cerebral, con una tasa de supervivencia del 100% en los individuos infectados y del 0% en aquellos individuos infectados que fueron tratados con aire (grupo control).^[114] Otro caso, donde el monóxido de carbono ha demostrado su efectividad, es frente al

fleo post-operatorio, una alteración transitoria en la movilidad del intestino que suele darse tras una cirugía abdominal. La inhalación de monóxido de carbono^[115] o su administración intraperitoneal mediante soluciones saturadas de CO^[116] prevenían dicho trastorno en roedores.

- b) **Enfermedades cardiovasculares:** El principal modo de liberación del monóxido de carbono inhalado es mediante su disociación de la hemoglobina, lo que ocurre principalmente en el músculo liso y en el endotelio. Debido a esto, uno de los principales campos de acción del CO con fines terapéuticos es en las enfermedades vasculares. Un ejemplo del efecto del monóxido de carbono sobre este tipo de dolencias fue el ensayo que Nagai *et al.* llevaron a cabo en ratas con daño miocárdico por isquemia-reperfusión (efecto adverso producido al restablecerse la circulación y propiciar la llegada de sangre y nutrientes a las células tras un proceso isquémico) inducido por oclusión coronaria. En este caso, el tratamiento con 250-1000 ppm de CO disminuía la masa celular afectada.^[117] Por otra parte, la capacidad antiproliferativa del monóxido también puede ser usada en el tratamiento de afecciones vasculares, como es el caso de la hiperplasia intimal (engrosamiento de la túnica íntima o capa más interna de una vena o arteria), donde el tratamiento con monóxido de carbono bloqueaba a las células hiperproliferativas del músculo liso en roedores, cerdos y primates.^[111,118,119] Cabe también destacar la evaluación del uso de monóxido de carbono sobre la hipertensión arterial pulmonar, para la cual no existe cura actualmente. En modelos de esta enfermedad para roedores, la inhalación de CO restauraba la presión y tamaño, tanto de las arterias pulmonares como del ventrículo derecho, a valores cercanos a los normales.^[112]
- c) **Trasplantes y preservación de órganos:** Es el campo donde se han realizado más progresos en lo relativo a la evaluación de los efectos beneficiosos que el monóxido de carbono pueda tener sobre el donante y receptor, así como sobre el órgano trasplantado. Un ejemplo es en el trasplante de corazón en ratas, donde la inhalación de bajas cantidades de monóxido de carbono (20 ppm), por parte de los individuos receptores, prolongaba el tiempo de supervivencia del órgano trasplantado en comparación con los individuos no tratados

(control).^[120] En lo referente a la preservación de los órganos para trasplantes, la conservación en frío limita, pero no evita completamente, los daños isquémicos o la disfunción de dichos órganos una vez trasplantados. En este sentido, soluciones saturadas de CO podrían servir como coadyuvantes para la preservación. Así, un estudio en ratas demostró que la inhalación de monóxido de carbono por parte de los receptores, antes y después del trasplante intestinal, disminuía el daño por isquemia-reperfusión.^[121] Teniendo en cuenta estos resultados, Nakao *et al.* estudiaron posteriormente cómo afectaba la conservación del órgano en soluciones saturadas de CO, observando con éxito que de esta forma también se reducía el daño por isquemia-reperfusión.^[122]

MODELO DE ENFERMEDAD	EFFECTO DE CO
MALARIA CEREBRAL EN RATONES	250 PPM 3 DÍAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN EVITAN DAÑO CEREBRAL ^[114]
ÍLEO POST-OPERATORIO EN ROEDORES	250 PPM EVITAN EL ÍLEO ^[115] ; SOLUCIONES SATURADAS DE CO EVITAN EL ÍLEO POST-OPERATORIO ^[116]
DAÑO MIOCÁRDICO POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN INDUCIDO EN RATAS	250-1000 PPM DISMINUYEN LA MASA CELULAR AFECTADA ^[117]
HIPERTENSIÓN PULMONAR EN ROEDORES	250 PPM TRAS EL DAÑO PERMITEN RECUPERAR EL TAMAÑO DEL VENTRÍCULO DERECHO Y LA PRESIÓN ARTERIAL PULMONAR ^[112]
TRASPLANTE DE CORAZÓN EN RATAS	20 PPM PROLONGAN LA VIABILIDAD DEL ÓRGANO TRASPLANTADO ^[120]
TRASPLANTE INTESTINAL Y DAÑO POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN	ALMACENAMIENTO EN SOLUCIÓN SATURADA DE CO REDUCE EL DAÑO POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN TRAS EL TRASPLANTE ^[122]

TABLA 3: EFICACIA PRECLÍNICA DEL MONÓXIDO DE CARBONO SOBRE DISTINTOS MODELOS DE ENFERMEDAD.

Tras quedar demostrada la efectividad terapéutica del monóxido de carbono en ensayos preclínicos frente a diversos modelos de enfermedad, el siguiente paso es su evaluación en ensayos clínicos con humanos. Hasta la fecha, se han puesto en marcha un total de 5 pruebas clínicas que tratan de determinar la eficacia y toxicidad del CO en humanos ante diversas enfermedades (para más detalles consultar la Tabla 4).^[123-127]

TÍTULO	FECHA DE INICIO	FASE CLÍNICA	ESTADO
EFFECTO PREVENTIVO DEL CO EN LA INFLAMACIÓN PULMONAR	2004	1	COMPLETADO
ESTUDIO DE SEGURIDAD Y TOLERANCIA DEL CO INHALADO EN PACIENTES DE TRASPLANTE DE RIÑÓN	2007	2	RETIRADO
EFFECTO DEL CO INHALADO EN EL TRATAMIENTO DE FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA	2011	2	EN MARCHA
CO PARA EL TRATAMIENTO DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL PULMONAR SEVERA	2012	1 Y 2	EN MARCHA
ESTUDIO DE SEGURIDAD DE CO INHALADO PARA EL TRATAMIENTO DEL SÍNDROME DE DIFICULTAD RESPIRATORIA AGUDA	2015	1	EN MARCHA

TABLA 4: ENSAYOS CLÍNICOS DESARROLLADOS CON OBJETO DE ANALIZAR LA SEGURIDAD Y EFICACIA DE CO INHALADO FRENTE A DIVERSAS ENFERMEDADES.^[128]

La vía de administración del CO gas, en casi la totalidad de los ensayos expuestos anteriormente, tanto preclínicos como clínicos, se realiza mediante la inhalación de una mezcla gaseosa que contiene una proporción definida de monóxido de carbono. A pesar de que esta es la forma más sencilla de administración del CO de manera exógena, presenta una serie de limitaciones.

En primer lugar, debido a la alta toxicidad del CO y su fuerte afinidad por la hemoglobina, es necesario controlar la dosis de CO administrada, así como monitorear su concentración en el organismo (Figura 19). El principal marcador para determinar el nivel de exposición al monóxido de carbono es la proporción de hemoglobina unida al CO (Hb-CO_r). Los valores normales de Hb-CO_r en seres humanos sanos se encuentran entre el 1 y el 6%, aunque estos valores pueden alcanzar hasta el 14% en fumadores.^[129] Por otra parte, se considera que valores de Hb-CO_r > 50% son letales.^[130] Asimismo, se estima que valores entorno al 10% de Hb-CO_r, originados por la inhalación de CO, podrían presentar efectos terapéuticos beneficiosos. En concreto, la FDA ha fijado entre un 10% y un 12% de Hb-CO_r como valores límite para ensayos clínicos con humanos.^[131]

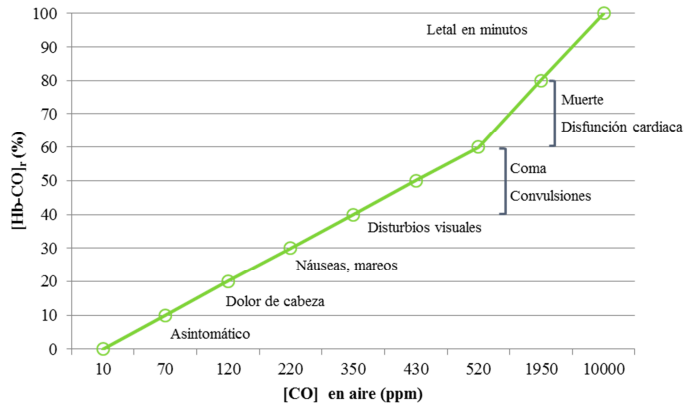


FIGURA 19: PORCENTAJE DE Hb-CO_R TRAS INHALACIÓN DE AIRE CON DISTINTAS PROPORCIONES DE MONÓXIDO DE CARBONO Y SÍNTOMAS CAUSADOS EN HUMANOS.^[132]

Debido a esta limitación, en los valores óptimos de Hb-CO_r, se ha desarrollado un dispositivo para la dosificación de monóxido de carbono inhalado con fines terapéuticos: el Covox DS.^[113] Este dispositivo dosifica la cantidad de CO especificada mediante pulsos que comienzan en cada período inspiratorio, controlando diversos parámetros, tales como el ritmo de respiración o la cantidad de aire inhalada, lo que permite la administración exacta de la cantidad de CO deseada. Además, presenta un sistema de seguridad que corta el suministro de gas ante situaciones/valores anómalos o de peligro (Figura 20).

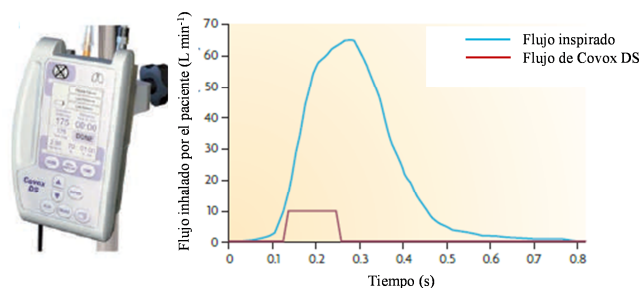


FIGURA 20: DISPOSITIVO COVOX DS. REGISTRA Y CONTROLA EL FLUJO DE INHALACIÓN DEL PACIENTE, EN CADA CICLO DE INSPIRACIÓN, PARA DOSIFICAR LA CANTIDAD DE MONÓXIDO DE CARBONO DESEADA.^[113]

Sin embargo, la principal desventaja que presenta la administración de CO por inhalación es su falta de especificidad, ya que su distribución depende del coeficiente de partición entre los diferentes tejidos y fluidos corporales. En concreto, el CO

inhalado accede al organismo mediante los pulmones por lo que, si son otros los órganos diana, serían necesarias mayores dosis para lograr efectos terapéuticos. Además, su liberación se produce como consecuencia de su unión reversible a la hemoglobina, por lo que su acción en órganos y tejidos lejanos al sistema vascular es muy limitada.

Por todo lo anterior, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias de liberación de CO más específicas que, a su vez, permitan vías de administración más versátiles (oral, intravenosa, intraperitoneal, etc.) que además puedan ser usadas fuera de las instalaciones hospitalarias.

2.2. Moléculas liberadoras de monóxido de carbono

En el año 2002, Motterlini *et al.* demostraron la capacidad de dos carbonilos metálicos, un dímero de tricarbonildiclororutenio(II) y un deca carbonilo de dimanganeso, para liberar monóxido de carbono en medio fisiológico e inducir efectos farmacológicos *in vivo*, introduciendo por primera vez el concepto de molécula liberadora de monóxido de carbono (CORM, del inglés *CO-releasing molecule*) (Figura 21).^[133] Aunque algunos compuestos orgánicos habían sido previamente estudiados como potenciales CORMs (haloalcanos, aldehídos, oxalatos o borocarbonatos entre otros), tanto sus perfiles cinéticos como toxicológicos no eran favorables. Por este motivo, desde los trabajos iniciales del Prof. Motterlini con carbonilos metálicos, las investigaciones se han centrado, casi en su totalidad, en el estudio y desarrollo de este tipo de moléculas como potenciales CORMs.^[132]

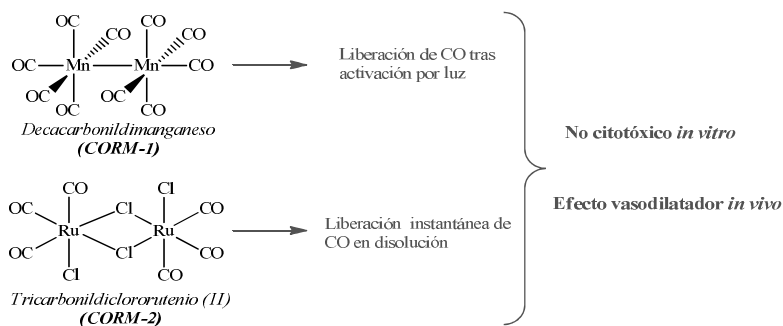


FIGURA 21: PRIMEROS CARBONILOS METÁLICOS ESTUDIADOS COMO CORMS QUE LIBERABAN CO EN MEDIO FISIOLÓGICO Y PRESENTABAN EFECTOS TERAPÉUTICOS *IN VIVO*.

Los CORMs son, por lo tanto, pro-fármacos liberadores de monóxido de carbono que surgen como una alternativa a la administración de CO gas mediante inhalación, con el objetivo de solventar las limitaciones que esta vía de administración presenta (Figura 22). Para que un CORM pueda ser considerado un candidato terapéutico ideal debe cumplir una serie de características: *i*) mostrar un perfil de toxicidad bajo y, en cualquier caso, adecuado para la aplicación clínica a la que esté destinado, *ii*) ser estable en el torrente sanguíneo, con un coeficiente de partición (entre los diferentes tejidos y fluidos corporales) específico para la dolencia a tratar; de forma que el CORM presente una distribución y permeabilidad preferencial hacia el tejido u órgano diana y *iii*) la disociación del CO debe producirse de una forma controlada, ya sea debida a un cambio fisiológico (variación de pH, activación por enzimas, etc.) o a un estímulo externo (irradiación con luz, cambio de temperatura, etc.).

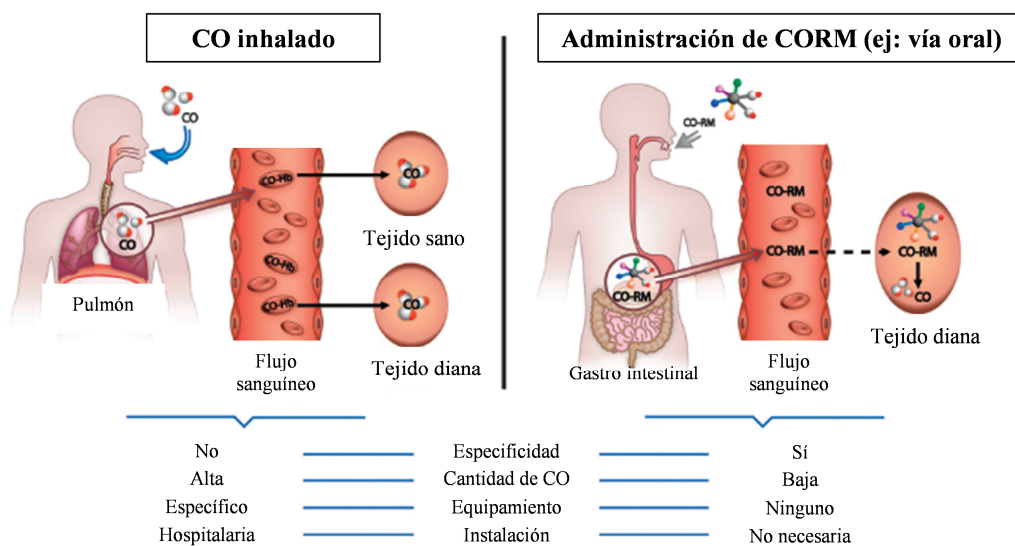


FIGURA 22: CARACTERÍSTICAS Y DIFERENCIAS ENTRE LA ADMINISTRACIÓN DE CO VÍA INHALACIÓN Y MEDIANTE EL USO DE CORMs (EN ESTE EJEMPLO VÍA ORAL).^[132]

La flexibilidad que posee el diseño molecular de los carbonilos metálicos permite una gran diversidad de estructuras. Por tanto, mediante una selección adecuada de parámetros tales como el centro metálico y los ligandos unidos a él, podrían obtenerse compuestos con las propiedades específicas deseadas.

En relación al diseño, el grupo del Prof. Carlos Romão ha propuesto un modelo conceptual de CORM en el que diferencia dos partes en la molécula: la *esfera de coordinación o esfera del CORM* y la *esfera del medicamento* (Figura 23).^[132]

La *esfera de coordinación* hace referencia a aspectos como la naturaleza y número de los iones metálicos y ligandos auxiliares que componen la molécula, así como el número de grupos carbonilo enlazados al metal. En definitiva, esta esfera determina la estabilidad del CORM en medio fisiológico, su respuesta ante estímulos concretos, así como el perfil cinético de disociación del CO.

Por otra parte, la *esfera del medicamento* engloba aquellos ligandos auxiliares que, por su naturaleza o posición de coordinación, tienen influencia en el transporte y biodistribución del compuesto, confiriéndole especificidad al sistema.

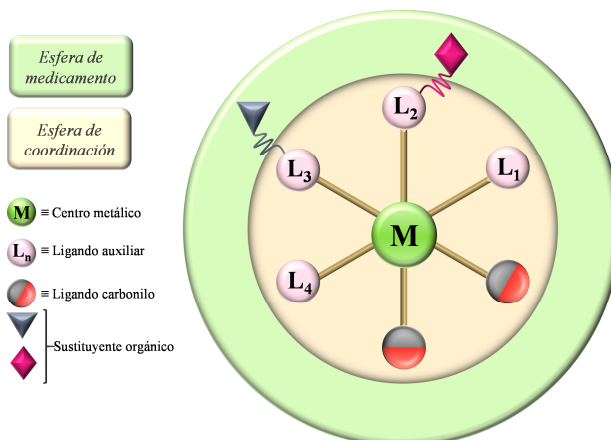


FIGURA 23: DISEÑO CONCEPTUAL DE UN CORM. ADAPTADO.^[132]

Respecto a la *esfera de coordinación*, un aspecto importante a tener en cuenta es la naturaleza y/o fortaleza del enlace metal-monóxido de carbono (M-CO), que determinará la capacidad de disociación del CO, y por tanto, su liberación al medio. El monóxido de carbono, como ligando, reacciona con muy pocos iones metálicos en condiciones acuosas y aeróbicas. Sin embargo, se une fácilmente a iones metálicos en bajo estado de oxidación bajo atmósfera inerte y condiciones reductoras. Este comportamiento puede explicarse mediante el diagrama de orbitales moleculares mostrado en la Figura 24, donde el orbital molecular de mayor energía ocupado

(HOMO) y el orbital de menor energía desocupado (LUMO) de la molécula de CO interaccionan con los orbitales adecuados del metal para formar el enlace M-CO.

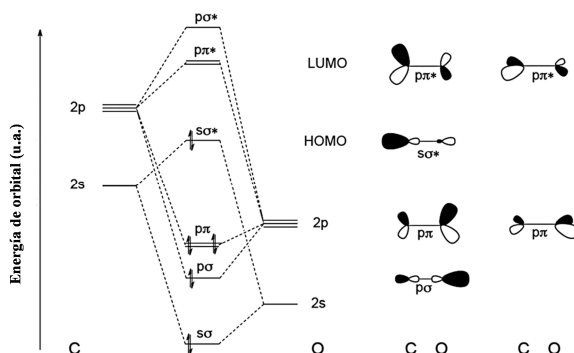


FIGURA 24: DIAGRAMA DE ORBITALES MOLECULARES DEL CO SIMPLIFICADO.^[132]

El HOMO del monóxido de carbono dona su par electrónico a los orbitales vacíos del metal, formando un enlace tipo σ . A su vez, los orbitales p del LUMO presentan la simetría adecuada para solaparse con los orbitales d ocupados del metal, comportándose de esta forma el CO, además de como σ -dador, como un π -aceptor. Estas dos interacciones presentan un efecto sinérgico; de forma que una fuerte donación de electrones en el enlace σ incrementa la densidad electrónica en el metal, favoreciendo la retrodonación electrónica de tipo π . Este tipo de enlace se ve favorecido, por lo tanto, para electrones d de alta energía, lo que explica la reactividad del CO frente a metales en bajo estado de oxidación.

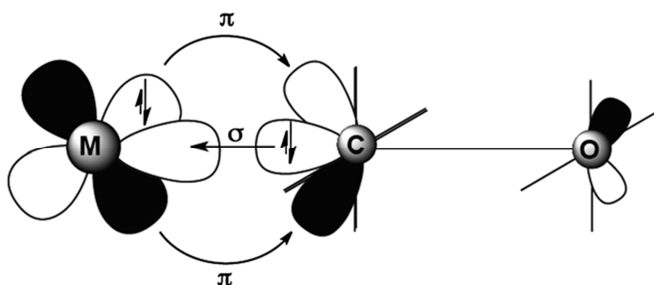


FIGURA 25: REPRESENTACIÓN DEL ENLACE M-CO.^[132]

Por lo tanto, atendiendo a la naturaleza del enlace M-CO, tanto el tipo de metal como la interacción de los ligandos auxiliares con éste tendrán influencia sobre la densidad electrónica del centro metálico y, por tanto, sobre la labilidad del enlace M-

CO. En última instancia, estos factores determinarán la estabilidad del CORM así como el tipo de estímulo necesario para la activación de dicho proceso

En referencia al metal, los elementos utilizados para la preparación de CORMs hasta la fecha, han sido fundamentalmente elementos de los grupos 6-8. Los metales de los grupos 3, 4 y 5 no han sido utilizados en la preparación de CORMs por cuestiones de estabilidad, ya que la formación del enlace M-CO en estos casos requiere condiciones muy reductoras, generando compuestos altamente sensibles a la oxidación. Por otra parte, los complejos de los grupos 9 y 10 tienden a ser electrónicamente insaturados (16 electrones), produciendo generalmente carbonilos metálicos muy lábiles. En contraste, los elementos de los grupos 6, 7 y 8 suelen formar complejos termodinámicamente estables con 18 electrones; siendo el cromo, rutenio, manganeso, molibdeno, hierro y renio los elementos principalmente utilizados.^[132,134] Algunos ejemplos, con estos metales, son el CORM-2, uno de los primeros CORMs publicados y ampliamente usado en modelos animales,^[133] o complejos de Mn(I), estables a la oxidación y que liberan CO tras su fotoactivación.^[135,136] Por otra parte, la serie de complejos de Mo(0), publicada por Marques *et al.*, demuestra la habilidad de este metal para formar CORMs con bajo perfil de toxicidad y propiedades terapéuticas *in vivo*.^[137]

En lo relativo a los ligandos usados en la preparación de CORMs, la variedad es enorme y abarca desde aquellos utilizados normalmente en la química organometálica (alquilos, arilos, aminos o fosfinas, entre otros) hasta biomoléculas o incluso fármacos. Dichos ligandos, como se mencionó anteriormente, interaccionan con el centro metálico modificando su densidad electrónica y afectando, por lo tanto, a la labilidad del enlace M-CO.

Una de las principales ventajas de los CORMs, frente al monóxido de carbono gas, es su capacidad para liberar CO de forma controlada tras su activación, ya sea por un cambio fisiológico o debido a un estímulo externo. Como ya hemos comentado previamente, dicha activación vendrá determinada en gran medida por los ligandos auxiliares presentes en la *esfera de coordinación*.

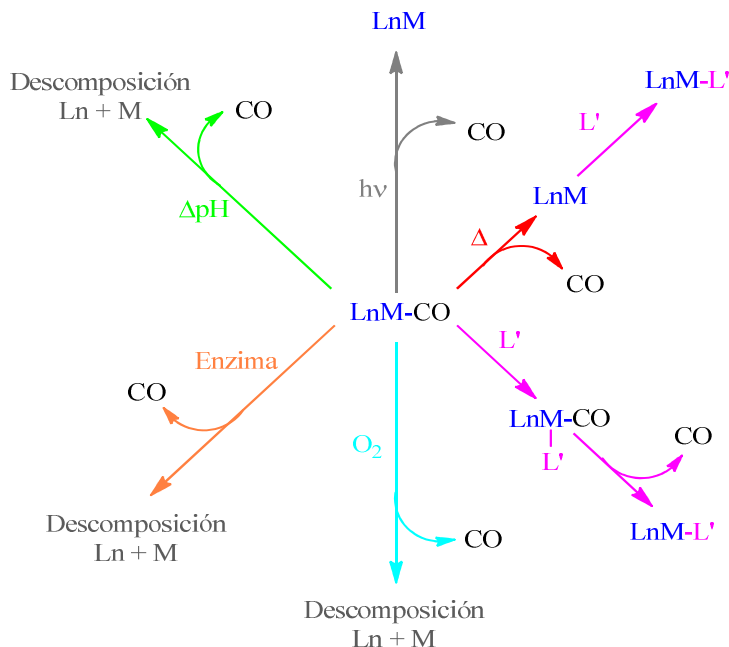


FIGURA 26: MÉTODOS DE ACTIVACIÓN PARA LA LIBERACIÓN DE MONÓXIDO DE CARBONO EN CORMs.

A continuación pasaremos a describir brevemente los diferentes métodos de activación que existen para la liberación de monóxido de carbono en CORMs (Figura 26).

- Fotoactivación:** Muchos carbonilos metálicos son capaces de liberar CO tras ser irradiados con luz. La naturaleza del complejo, así como la fortaleza del enlace M-CO, determinará la longitud de onda necesaria para activar la disociación. Este tipo de compuestos son conocidos como fotoCORMs y pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades relativas a la piel o, de forma más generalizada, en aquellos tratamientos que requieran una administración transdérmica con la posterior activación mediante una terapia fotodinámica adecuada. Un ejemplo de fotoCORM sería el carbonilo de manganeso $\text{Mn}_2\text{CO}_{10}$ (CORM-1), uno de los primeros CORMs publicados.^[133]
- Activación térmica:** En la mayoría de los carbonilos metálicos, un incremento de la temperatura permite la disociación del enlace M-CO y, por tanto, la liberación del monóxido de carbono. Sin embargo, en aplicaciones biológicas, el límite térmico estaría situado en torno a 37 °C, por lo que tan solo aquellos

CORMs con baja estabilidad en condiciones ambientales cumplirían este requisito, lo que por otra parte dificultaría su almacenamiento y manejo.

- c) Intercambio de ligandos: La capacidad de los carbonilos metálicos para intercambiar el monóxido de carbono por otro ligando ha sido ampliamente descrita en la bibliografía.^[138] De este modo, la presencia de biomoléculas en el organismo capaces de coordinarse al centro metálico del CORM y desplazar al CO, sería otro método específico para la liberación controlada del mismo. Por ejemplo, el complejo metálico $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{C}_2\text{H}_4\text{NO}_2)]$ (CORM-3) presenta un tiempo de vida media para la liberación del CO de 96 horas en disolución acuosa, mientras que este valor es 3 órdenes de magnitud inferior (3.6 minutos), si el complejo está disuelto en plasma. En este caso, la presencia de glutatión y cisteína en el plasma sanguíneo favorecen y aceleran la disociación del enlace Ru-CO a través de sus grupos tiol.^[139]

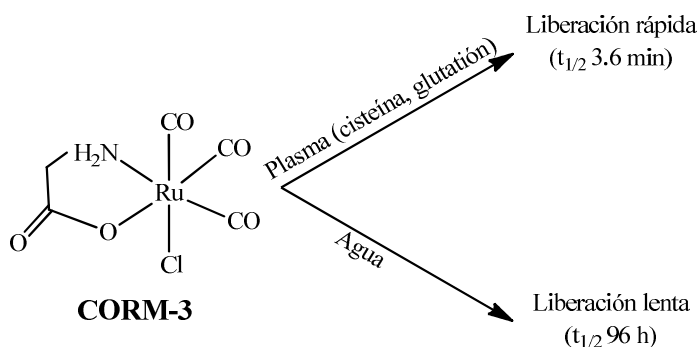


FIGURA 27: ACTIVACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE CO EN EL CORM-3 POR SUSTITUCIÓN DE LIGANDO. LA PRESENCIA DE BIOMOLÉCULAS COORDINANTES EN EL PLASMA SANGUÍNEO FAVORECE LA DISOCIACIÓN DEL ENLACE Ru-CO.

- d) Activación por pH: El uso de ligandos π -dadores fuertes labiliza el enlace M-CO de los carbonilos situados en posiciones adyacentes. Ejemplos de este tipo de ligandos serían OH^- , OR^- , NHR^- o NR_2^- que se pueden formar a partir de la desprotonación de los ligandos H_2O , HOR , NH_2R o NHR_2 .^[138] El uso de este tipo de moléculas en la preparación de CORMs permite una liberación de monóxido de carbono que depende del pH. Por ejemplo, el complejo $\text{Na}[\text{Mo}(\text{CO})_3(\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_2)]$ (ALF186), presenta una cinética de liberación más

lenta en condiciones ácidas, lo que podría permitir, por ejemplo, una liberación preferencial en el medio básico del intestino tras su administración oral.^[140] (Figura 28).

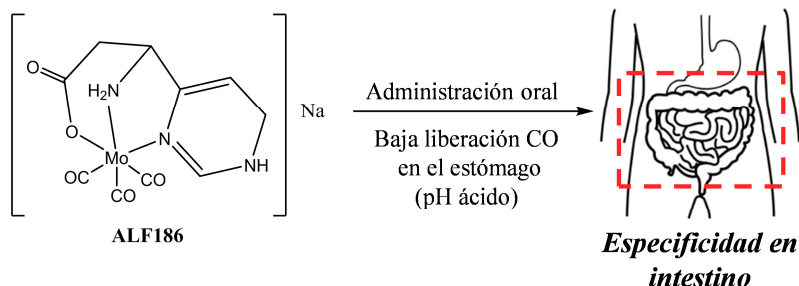


FIGURA 28: ESQUEMA DE LA LIBERACIÓN PREFERENCIAL DE CO EN CONDICIONES BÁSICAS (COMO LAS DEL INTESTINO) PARA EL CORM ALF186.

- e) Liberación por oxidación: Como se mencionó anteriormente, la fortaleza del enlace M-CO es mayor para aquellos metales en bajo estado de oxidación. Existe diversos agentes oxidantes en los fluidos biológicos, desde el propio oxígeno molecular disuelto o las ROS, que si entraran en contacto con el metal lo oxidarían, labilizandando el enlace M-CO y provocando su disociación. Teniendo en cuenta esto, un ligando auxiliar inicialmente estable al aire puede ser desplazado por las condiciones específicas del órgano o tejido diana; por ejemplo, en condiciones ácidas, la protonación de piridinas labilizaría el enlace piridina-metal. La pérdida de esas piridinas permitiría que la especie oxidante interaccionase entonces con el metal, a través de la posición de coordinación vacante, induciendo la liberación de CO. Este mecanismo de activación es el más común para la mayoría de complejos metálicos liberadores de CO. Sin embargo, algunos de ellos, como el CORM-2 o el CORM-3, han demostrado ser estables en condiciones oxidantes.
- f) Activación enzimática: La descomposición de los complejos metálicos por acción de enzimas es otra vía que permite la liberación de CO *in vivo*. De hecho, el uso de sustratos habituales para ciertas enzimas, como ligandos auxiliares, es una alternativa para llevar a cabo una administración específica del CO. Los carbonilos metálicos que liberan monóxido de carbono por este

mecanismo son conocidos como ET-CORM (del inglés *enzyme-triggered CORM*). Un ejemplo es la serie de tricarbonilos de hierro coordinados a ligandos de tipo aciloxiciclohexadieno propuesto por Romanski *et al.*^[141] Mediante la acción de esterases, el ligando se transforma en hidroxiciclohexadieno, más sensible a la oxidación, lo cual provoca la descomposición del complejo y posterior liberación del CO (Figura 29).

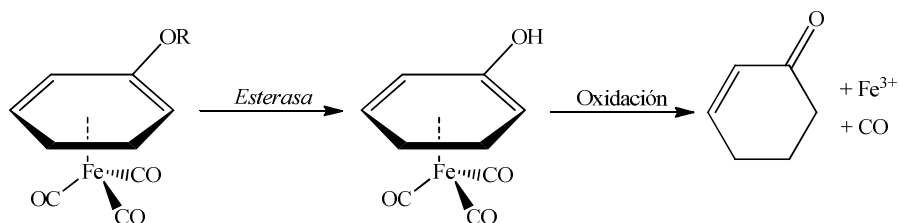


FIGURA 29: ESQUEMA DE LA ACCIÓN DE ESTERASAS SOBRE TRICARBONILOS DE HIERRO CON LIGANDOS DE TIPO ACILOXICICLOHEXADIENO.

Respecto a la *esfera de medicamento*, como ya hemos mencionado anteriormente, el uso de ciertos ligandos orgánicos puede dotar de especificidad al sistema o aumentar su biocompatibilidad (Figura 30). Por ejemplo, la presencia de hidratos de carbono en el complejo metálico puede mejorar su solubilidad en agua o, incluso, su distribución específica a ciertos tejidos. En concreto, Romão *et al.* desarrollaron el complejo [RuCl₂-tiogalactopiranosil(CO)₃] (ALF492),^[142] donde la presencia de un ligando derivado de la galactosa aumentaba la solubilidad en agua del compuesto y permitía una distribución específica en el hígado. Este CORM ha demostrado además ser efectivo frente a fallo hepático agudo en ratones, sin alterar el transporte de oxígeno de la hemoglobina.^[142] Otro ejemplo, es la serie de carbonilos de Mo(0) desarrollada posteriormente por el mismo grupo de investigación.^[137] En concreto, la incorporación de grupos metilo en el CORM [Mo(CNMe₂CO₂H)₃(CO)₃] (ALF794) incrementaba significativamente la liberación de CO en el hígado (órgano diana), en comparación al complejo equivalente sin sustituyentes metilo [Mo(CNCH₂CO₂H)₃(CO)₃] (ALF795).

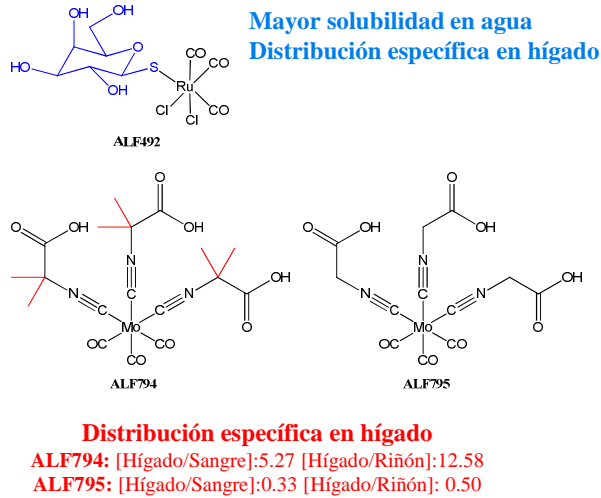


FIGURA 30: EJEMPLOS DEL USO DE LIGANDOS AUXILIARES EN LA ESFERA DE MEDICAMENTO CON OBJETO DE MEJORAR LA BIODISTRIBUCIÓN DEL CORM.

En resumen, se han desarrollado un nutrido grupo de carbonilos metálicos, con capacidad para generar *in situ* monóxido de carbono, que muestran diferentes perfiles cinéticos de liberación en respuesta a distintos estímulos. Sin embargo, la mayoría de los estudios terapéuticos llevados a cabo hasta fecha se han centrado en los carbonilos metálicos comerciales CORM-2 y CORM-3 (Figura 21), que exhiben efectos beneficiosos similares a los obtenidos al inhalar CO gas (Tabla 5).^[113]

MODELO DE ENFERMEDAD	EFECTO DE CO
ÍLEO POSTOPERATORIO EN ROEDORES	CORM-3 INCORPORADO VÍA INTRAPERITONEAL REDUCE LA INFLAMACIÓN MUSCULAR EN EL INTESTINO ANTES DEL ÍLEO ^[143]
DAÑO MIOCÁRDICO POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN INDUCIDO EN RATAS	CORM-3 REDUCE EL DAÑO DERIVADO DE UN INFARTO DE MIOCARDIO ^[144]
TRASPLANTE DE CORAZÓN EN RATAS	CORM-3 PROLONGA LA VIABILIDAD DEL ÓRGANO ^[105] TRASPLANTADO
FOTOCARCINOGENÉISIS EN RATONES SIN PELO	CORM-2 VÍA TÓPICA REDUCE LA INFLAMACIÓN CRÓNICA Y LA MULTIPLICIDAD TUMORAL ^[145]
DAÑO HEPÁTICO AGUDO	ALF794 PRESENTA DISTRIBUCIÓN Y LIBERACIÓN DE CO ESPECÍFICA EN EL HÍGADO CON EFICACIA TERAPÉUTICA EN RATONES ^[137]

TABLA 5: EJEMPLOS DE EFICACIA TERAPÉUTICA DE MOLÉCULAS LIBERADORAS DE CO (CORMS) EN ENSAYOS PRECLÍNICOS.

A pesar del potencial que presentan los CORMs, la realidad es que ninguno de ellos se está ensayando clínicamente en humanos, ya que por el momento presentan ciertas limitaciones (Figura 31).^[146]

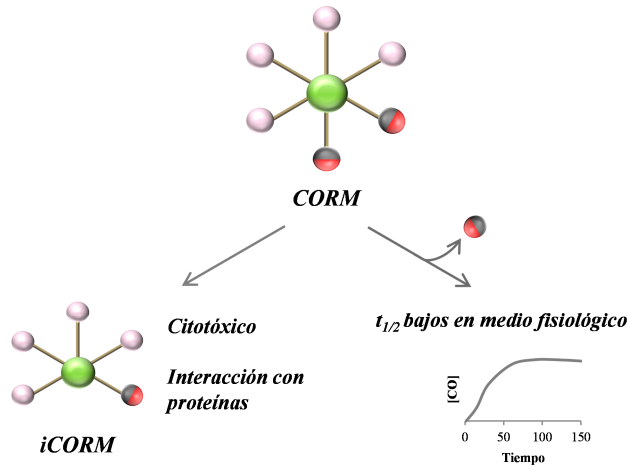


FIGURA 31: ESQUEMA DE LAS PRINCIPALES LIMITACIONES DE LOS CORMs PARA SU USO COMO MEDICAMENTO.

En primer lugar, la estabilidad de muchos CORMs, en contacto con los fluidos fisiológicos, es baja, debido principalmente a su interacción con algunas de las biomoléculas presentes en el medio o a su descomposición mediante procesos de oxidación. Dicha inestabilidad conlleva tiempos de vida media para la liberación de CO pequeños ($t_{1/2}$), lo que dificulta que el CORM llegue intacto al órgano o tejido diana. En este sentido, como ya hemos comentado en varias ocasiones, la cinética de liberación del monóxido de carbono es un parámetro clave en la especificidad del sistema, siendo deseables liberaciones controladas en el tiempo, así como específicas en el órgano o tejido a tratar.

Además, esta liberación lleva consigo la formación de fragmentos metálicos de decarbonilación conocidos como iCORMs (CORMs inactivos, del inglés *inactivated CORMs*). Estos productos de reacción pueden bioacumularse o presentar citotoxicidad frente a ciertos tejidos, lo que podría derivar en efectos secundarios indeseados. En relación a este último aspecto, Winburn *et al.* evaluaron la citotoxicidad del CO gas, el CORM-2 y el correspondiente iCORM-2, frente a dos líneas celulares (células de riñón de embrión humano HEK-293 y células de riñón de canino MDCK). A diferencia del

monóxido de carbono gaseoso, ambos complejos disminuían la viabilidad celular por encima de ciertas concentraciones, demostrando que el fragmento metálico, producido tras la liberación de CO, exhibía cierta citotoxicidad.^[147]

Por último, otro aspecto importante a tener en cuenta, para el uso clínico de los CORMs, es su potencial interacción con diferentes biomoléculas; especialmente con las proteínas presentes en el plasma sanguíneo, ya que determinan su perfil farmacocinético así como su absorción, distribución, metabolismo y excreción en el organismo. En este sentido, un estudio especialmente interesante es el llevado a cabo por Romão y colaboradores, en 2011, con el CORM-3 y otros complejos de rutenio similares. En este trabajo de investigación, se puso de manifiesto que los compuestos del tipo *fac*-[RuL₃(CO)₃] reaccionaban rápidamente con las proteínas del plasma sanguíneo, perdiendo un equivalente de CO (en forma de CO₂) al formar aductos proteína-[RuL₃(CO)₂]. Se considera que estos aductos proteína-complejo facilitan la biodistribución y liberación del CO, lo que explicaría en parte los numerosos efectos terapéuticos asociados al CORM-3.^[148]

Teniendo en cuenta que, para que el CO pueda ser usado como agente terapéutico, es imprescindible que su administración sea segura, eficaz, específica y controlada en el tiempo y espacio, la comunidad científica necesita, una vez más, desarrollar nuevas estrategias de liberación controlada del CO que sean más sofisticadas y puedan superar las limitaciones asociadas tanto al CO gas como a las moléculas liberadoras de monóxido de carbono (CORMs).

2.3. Materiales liberadores de monóxido de carbono

En general, la industria farmacéutica es reacia a desarrollar medicamentos que contengan metales en su formulación química, debido a la toxicidad asociada a los mismos. A pesar de que en algunos casos dicha toxicidad realmente impide su uso, en otros muchos se trata tan solo de una idea preconcebida.^[128] De hecho, algunos complejos metálicos se utilizan en la actualidad como agentes terapéuticos.^[149] Por ejemplo, el *cis*-diaminodicloroplatino(II), conocido como *cisplatin*, es un medicamento usado actualmente en quimioterapia para el tratamiento de varios tipos de cáncer.^[150] Otro ejemplo sería el trióxido de arsénico (As₂O₃) que ha sido aprobado por

la FDA y la EMA (del inglés, *European Medicines Agency*), bajo el nombre de Trisenox, para el tratamiento de ciertas formas de leucemia.^[151] Estos ejemplos, y otros muchos, ponen de manifiesto que el hecho de que un compuesto esté formado por metales no es razón suficiente para descartar automáticamente su desarrollo en clínica. Sin embargo, sí que es cierto que el uso de metales de transición añade una mayor complejidad a su desarrollo farmacéutico frente a otras formulaciones (moléculas orgánicas, fármacos basados en proteínas o péptidos). En el organismo, la concentración de los diferentes metales está controlada en rangos muy estrechos, ya que pequeñas variaciones pueden desembocar en situaciones graves para la salud, incluida la muerte. Debido a esto, hasta la fecha, el uso de complejos metálicos como agentes terapéuticos se ha limitado a *i*) tratamientos de corta duración, ya que en tratamientos de larga duración o crónicos existiría una alta probabilidad de que los metales se acumularan en el organismo asumiendo un riesgo innecesario, o *ii*) dolencias/enfermedades especialmente graves, como es el caso del cáncer.

Con objeto de superar las limitaciones asociadas a la unidad metálica en los complejos liberadores de CO, Shiller *et al.* introducen en 2014 el concepto de material liberador de monóxido de carbono (CORMA, del inglés *CO-releasing material*).^[152] Un CORMA se define como un sistema sólido de almacenamiento de monóxido de carbono capaz de liberarlo como respuesta ante un estímulo, ya sea interno o externo. Estos materiales se obtienen mediante la unión de un CORM a un sistema de transporte macromolecular, ya sea mediante enlaces covalentes u otro tipo de interacción (Figura 32).

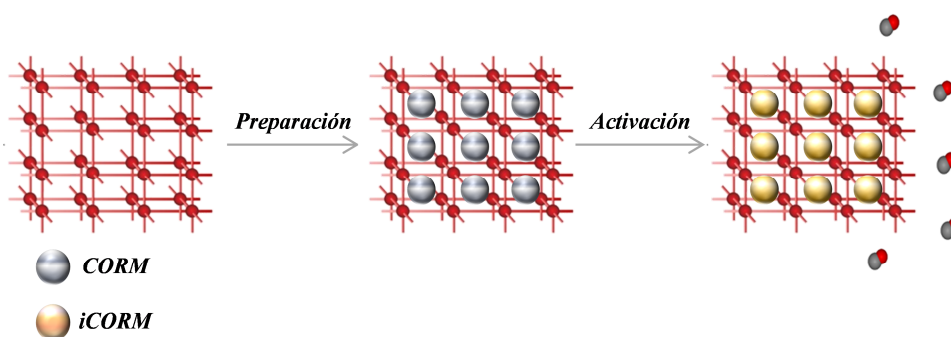


FIGURA 32: ESQUEMA CONCEPTUAL DE LA PREPARACIÓN DE UN CORMA. TRAS LA LIBERACIÓN DE CO ACTIVADA MEDIANTE UN ESTÍMULO, LOS FRAGMENTOS METÁLICOS QUEDAN RETENIDOS EN LA MATRIZ.

El uso de estos materiales, además de evitar la lixiviación de los metales derivados tanto del complejo metálico como de los iCORMs generados tras la liberación de CO, podría solventar o mejorar otras de las limitaciones asociadas al uso de las moléculas liberadoras de CO. Salvo algunas excepciones expuestas en el apartado anterior (ALF794, ALF492), la mayoría de los CORMs presentan una distribución inespecífica en el organismo. Al tratarse de compuestos moleculares, tras su administración, difunden rápidamente por el organismo y liberan CO sin acumularse de manera específica en ningún tejido u órgano diana, lo que podría generar efectos secundarios nocivos para los pacientes. En este sentido, el uso de materiales que actúen como vehículos podría aumentar la especificidad del sistema mediante una distribución y/o acumulación controlada. Por ejemplo, sistemas híbridos basados en nanopartículas poliméricas o de óxido de hierro han demostrado su utilidad como vehículos de fármacos antitumorales, permitiendo la acumulación pasiva en tejidos tumorales mediante el efecto de permeabilidad y retención mejorada (efecto EPR, del inglés *enhanced permeability and retention effect*).^[153–155] Por otra parte, estos nuevos sistemas híbridos podrían estabilizar a los CORMs en condiciones fisiológicas, ya que como se expuso en el apartado anterior, muchos de ellos son altamente sensibles a procesos de oxidación o de intercambio de ligandos con biomoléculas presentes en el organismo. Además, los CORMAs desarrollados podrían ofrecer diferentes perfiles de liberación de CO respecto al CORM original, afectando a parámetros tales como la cantidad de CO liberada o su perfil cinético.^[156]

Los distintos sistemas transportadores que hasta el momento han sido usados para la preparación de CORMAs vienen recogidos en la Figura 33.

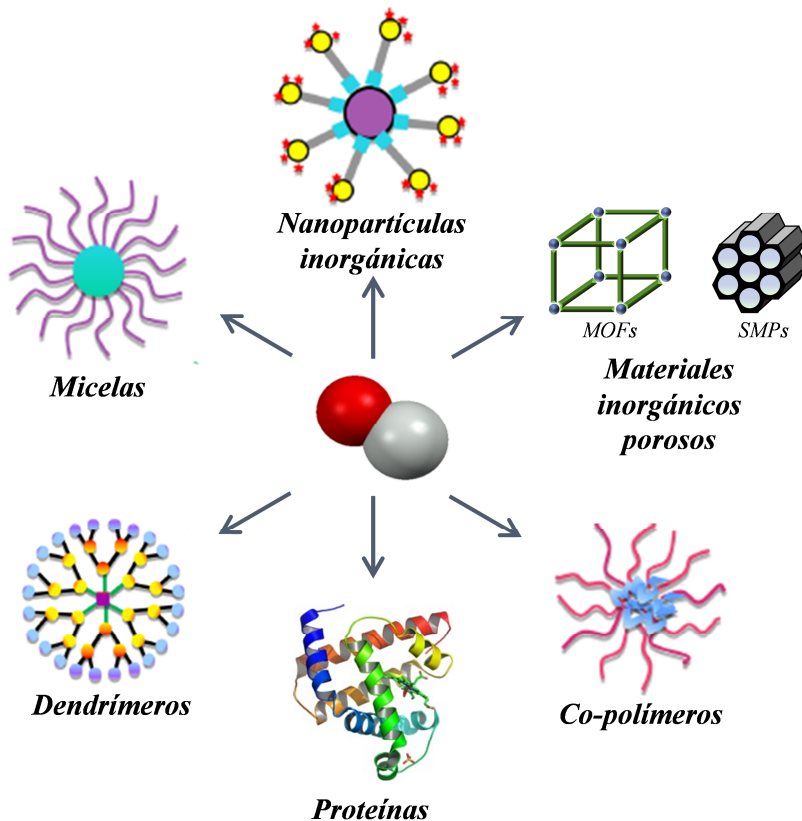


FIGURA 33: MATERIALES USADOS PARA LA PREPARACIÓN DE CORMAS.^[157]

Boyer *et al.* clasifican los CORMs atendiendo a la naturaleza del material que actúa como vehículo para el CORM.^[157] A continuación, se resumen los materiales liberadores de CO utilizados hasta la fecha, atendiendo a ese criterio de clasificación, y se discuten los ejemplos más relevantes para cada tipo de material o plataforma.

Plataformas basadas en polímeros orgánicos

Este tipo de vehículos ha sido ampliamente estudiado para el almacenamiento y distribución de fármacos en el organismo. Los polímeros orgánicos pueden ser usados para aumentar la solubilidad o estabilidad de los fármacos que albergan, así como para mejorar su efectividad terapéutica mediante el control temporal de la liberación o de su biodistribución.^[158] Entre ellos se destacan:

- a) *Co-polímeros*: En 2007, Kunz *et al.* desarrollaron la primera encapsulación de un CORM en una estructura polimérica orgánica.^[159] Fragmentos metálicos de

$\text{Re}(\text{CO})_3$ fueron incorporados a una estructura polimérica basada en *N*-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HPMA). A pesar de que no se realizaron estudios de liberación de CO a partir de este material, este trabajo abrió la puerta a nuevas estrategias para el desarrollo de sistemas liberadores de CO. De hecho en 2011, Brückman *et al.* anclaron fragmentos de $\text{Mn}(\text{CO})_3$ tanto a polímeros de HPMA como a derivados funcionalizados con cadenas biodegradables (Figura 34). En estos sistemas, la liberación de CO se producía mediante fotoactivación, sin cambios en el perfil cinético respecto al CORM original. También se estudió su internalización en células, demostrando que el tamaño y peso molecular de los polímeros determinaba su capacidad de acumulación intracelular.^[160]

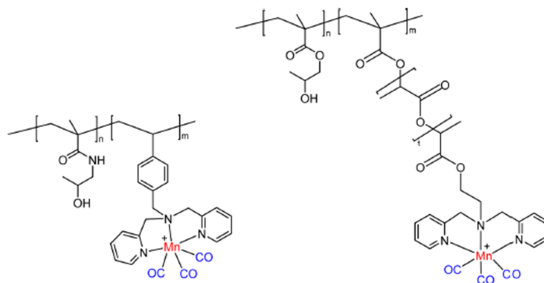


FIGURA 34: INCORPORACIÓN DE TRICARBONILOS DE MANGANESO A POLÍMEROS BASADOS EN HPMA.^[160]

- b) *Micelas*: Hasegawa *et al.* utilizaron por primera vez micelas poliméricas capaces de liberar CO en 2010.^[161] De tamaño nanométrico, estos sistemas presentaban la capacidad de acumularse preferencialmente en células tumorales. Albergaban en su interior complejos del tipo $\text{RuCl}(\text{CO})_3\text{L}$ (L: ornitinato, $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_2$) y solo liberaban CO en presencia de moléculas tales como cisteína o glutatión, a una velocidad mucho menor respecto al equivalente CORM-3.

Plataformas basadas en proteínas

Como se expuso anteriormente, una de las limitaciones que presentan los CORMs, con vistas a su uso como fármacos, es la facilidad con la que interaccionan con diferentes proteínas. De hecho, tal y como hemos mencionado previamente, se ha propuesto que la biodistribución del CORM-3 en el organismo se produce mediante la

formación de aductos del complejo metálico con distintas proteínas presentes en la sangre ($\text{RuCl}(\text{CO})_2$ -proteína) y es a partir de estos aductos complejo-proteína que se libera el monóxido de carbono.^[148] En el año 2007, Razavet *et al.* desarrollaron la primera proteína funcionalizada con un CORM, combinando lisozima de huevo con el tricarbonilo de manganeso $[\text{Mn}(\text{CO})_3(\text{acetona})_3](\text{CF}_3\text{SO}_3)$ para dar lugar al sistema $[(\text{lisozima})\text{Mn}(\text{CO})_3(\text{OH}_2)_2]_2$.^[162] Desde entonces, se han llevado a cabo diversos trabajos de investigación con el objetivo de estudiar la interacción de diferentes carbonilos metálicos con proteínas presentes en el organismo.^[140,163–165] En este contexto, Kitagawa y colaboradores combinaron el CORM-2 con lisozima de huevo para la preparación de un nuevo CORMA en el año 2015.^[166] Este sistema presentaba un tiempo de vida media para la liberación del CO diez veces mayor que para CORM original, ofreciendo una liberación más controlada en el tiempo. Además, dada la naturaleza biológica de las proteínas, estos sistemas podrían ser usados como transportadores de CO con menor riesgo de toxicidad.

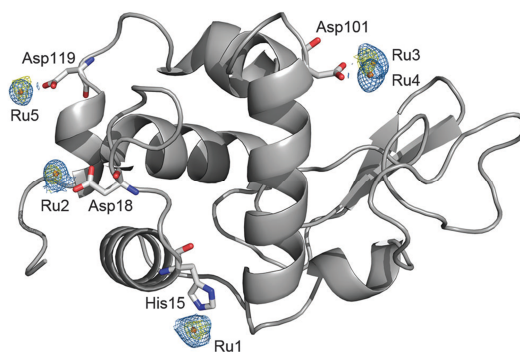


FIGURA 35: ESTRUCTURA DE LISOZIMA DE HUEVO UNIDA A TRICARBONILOS METÁLICOS DE RUTENIO (II) A TRAVÉS DE RESIDUOS DE HISTIDINA Y ÁCIDO ASPÁRTICO.^[163]

Plataformas basadas en dendrímeros

Los dendrímeros son macromoléculas tridimensionales ramificadas. Dado que presentan estructuras bien definidas con capacidad de atravesar membranas celulares, son sistemas de transporte con bastante potencial en aplicaciones biomédicas.^[167] Govender *et al.* han sido los primeros y únicos, hasta la fecha, en utilizar un sistema de este tipo para la preparación de un CORMA.^[168] En concreto, funcionalizaron un

dendrímico, basado en piridinas con fragmentos metálicos del tipo $\text{Mn}(\text{CO})_3$, que liberaba CO bajo fotoactivación.

Plataformas basadas en nanopartículas inorgánicas

Entre las nanopartículas inorgánicas utilizadas para la preparación de CORMAs se encuentran:

- a) *Nanopartículas de sílice*: Han experimentado un gran desarrollo en los últimos años debido a su estabilidad, biodegradabilidad y ausencia de toxicidad.^[169–172] Además, estas nanopartículas se preparan utilizando rutas sintéticas sencillas. En relación a la preparación de CORMAs, el primer estudio llevado a cabo con este tipo de nanopartículas fue desarrollado por Dördelmann *et al.* en el año 2011.^[173] La superficie de las nanopartículas fue modificada, dotándola de grupos azida terminales a los que pudiera anclarse un complejo modificado del fotoCORM $[\text{Mn}(\text{tmp})(\text{CO})_3]^+$ (tmp: tris(pirazolil)metano), mediante una cicloadición 1,3-dipolar catalizada por cobre. El CORMA resultante presentaba perfiles cinéticos similares al CORM original bajo activación con luz ultravioleta.

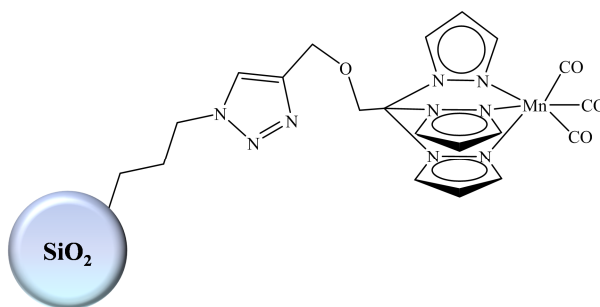


FIGURA 36: UNIÓN COVALENTE DEL FOTOCORM $[\text{Mn}(\text{TMP})(\text{CO})_3]^+$ A LA SUPERFICIE FUNCIONALIZADA DE NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE.

- b) *Nanodiamantes de carbono*: Debido a su baja toxicidad, fácil funcionalización con biomoléculas y alto grado de internalización celular, los nanodiamantes son otro tipo de compuestos inorgánicos que se han propuesto para el transporte y liberación de fármacos.^[174] Dördelmann y colaboradores utilizaron este tipo de materiales para la preparación de un CORMA, siguiendo la misma estrategia que para las nanopartículas de sílice mencionadas anteriormente (Figura 36).

Los materiales híbridos resultantes $\text{Mn}(\text{CO})_5$ @nanodiamante presentaban un tamaño de partícula nanométrico (10 nm) y la liberación de CO se producía mediante activación con luz ultravioleta.^[175]

- c) *Nanopartículas de óxido de hierro*: La baja toxicidad, elevada área superficial y bajo coste de estos materiales ha incentivado su estudio como liberadores de fármacos.^[176] Haciendo uso de estos materiales, Kunz *et al.* introdujeron por primera vez el concepto de liberación de CO mediante activación magnética.^[177] A través de la funcionalización de la superficie de las nanopartículas, consiguieron anclar el CORM-2. Posteriormente, la presencia de un campo magnético de alta frecuencia aumentaba la temperatura de las nanopartículas de óxido de hierro, induciendo la liberación de CO por activación térmica. La ventaja de estos sistemas, en comparación con los CORMAs fotoactivables, es que no presentan limitaciones en relación a la capacidad de penetración en los tejidos. Sin embargo, tienen el inconveniente de ofrecer un menor control espacial.
- d) *Nanopartículas de conversión ascendente*: Las nanopartículas de conversión ascendente (del inglés, *up-converting nanoparticles*) son nanocristales dopados con lantánidos que promueven la emisión de fotones de alta energía (en el visible y ultravioleta) después de la absorción secuencial de dos o más fotones en el infrarrojo cercano. Dada la baja permeabilidad de la piel hacia radiaciones de alta energía, el empleo de este tipo de nanopartículas en combinación con compuestos fotoactivables bajo luz ultravioleta-visible (como la mayoría de fotoCORMs) permite el desarrollo de nuevos sistemas fotoactivos bajo irradiaciones con mayor capacidad de penetración. De esta forma, estos materiales híbridos posibilitan el tratamiento de lesiones en profundidad. En este sentido, en el año 2015, Pierri *et al.* emplearon una matriz orgánica para crear un sistema híbrido en el que quedaban embebidos el fotoCORM $[\text{Mn}(\text{bpy})(\text{CO})_2(\text{PPh}_3)_2]^+$ (bpy: bipyridina, PPh_3 : trifenilfosfina) y nanopartículas de conversión ascendente (Figura 37).^[178] Estos sistemas demostraron ser estables en medio fisiológico y oscuridad. Sin embargo, bajo irradiación en el infrarrojo cercano, las nanopartículas se excitaban provocando la activación del

fotoCORM y, en definitiva, la disociación del enlace Mn-CO. Esta estrategia tiene la ventaja, frente a las anteriores, de permitir un control localizado y temporal en la liberación del CO. Además, como se ha comentado anteriormente, la radiación infrarroja presenta una mayor penetración en tejidos biológicos y biocompatibilidad.

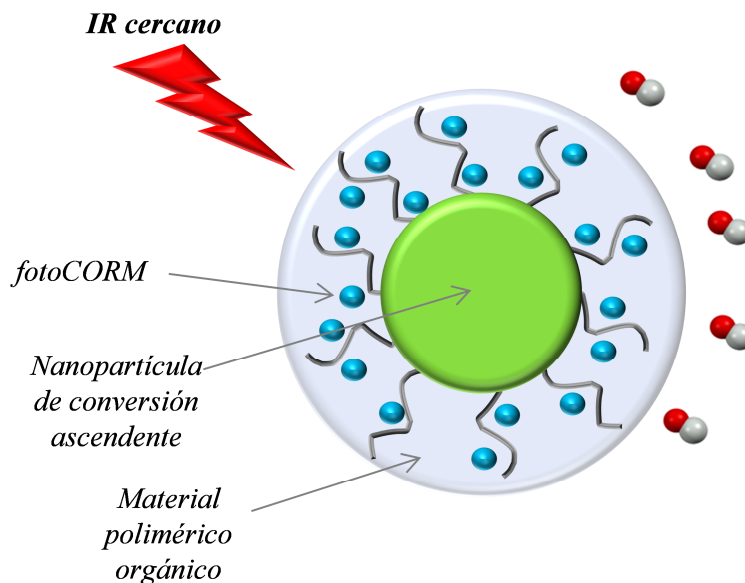


FIGURA 37: LIBERACIÓN DE CO TRAS ACTIVACIÓN CON LUZ INFRARROJA DE UN CORMA BASADO EN NANOPARTÍCULAS DE CONVERSIÓN ASCENDENTE. ADAPTADO.^[178]

Plataformas basadas en materiales inorgánicos porosos

Como ya hemos comentado en la primera sección de este capítulo, los materiales inorgánicos porosos son capaces de albergar compuestos bioactivos en sus matrices debido a su porosidad y área superficial. Su uso como vehículos de transporte permite, entre otros, aumentar la estabilidad en el medio fisiológico de los fármacos y/o modificar su cinética de liberación. En relación al empleo de sólidos inorgánicos porosos para la preparación de materiales liberadores de monóxido de carbono (CORMAs), fundamentalmente se han empleado los polímeros de coordinación porosos (MOFs) y las sílices mesoporosas (SMPs).

- a) *Polímeros de coordinación porosos (MOFs)*: Hasta la fecha, sólo se ha descrito en la literatura científica un ejemplo de CORMA basado en MOFs.^[49] En

concreto, los polímeros de coordinación porosos MIL-88B-Fe [$\text{Fe}_3\text{O}(\text{BDC})\text{Cl}$] (BDC: ácido tereftálico) y $\text{NH}_2\text{-MIL-88B-Fe}$ ($[\text{Fe}_3\text{O}(\text{NH}_2\text{-BDC})\text{Cl}]$) ($\text{NH}_2\text{-BDC}$: ácido 2-aminotereftálico) presentan posiciones insaturadas en los centros metálicos de hierro, que Schatzschneider *et al.* utilizaron para adsorber directamente moléculas de CO gas. La posterior descomposición del MOF de hierro, en contacto con el medio fisiológico, provocó la liberación del CO adsorbido en las cavidades del material poroso. Puesto que en el caso descrito el CO gas se incorporó directamente al material, hasta nuestro conocimiento, no existe aún en bibliografía ningún ejemplo que describa el uso de MOFs como vehículos para la encapsulación de pro-fármacos de CO (CORMs).

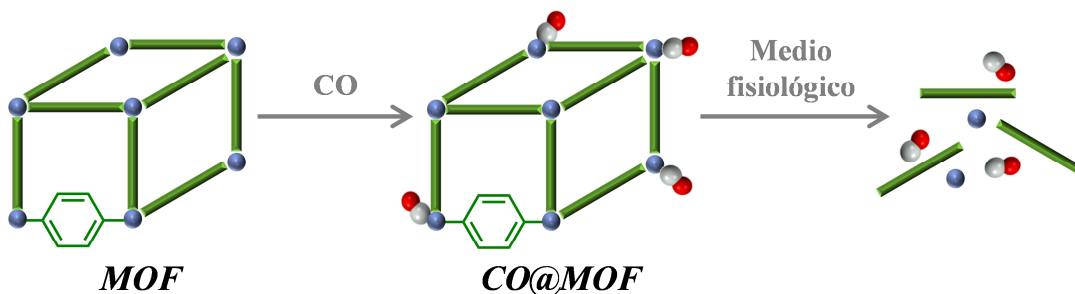


FIGURA 38: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA INCORPORACIÓN DE CO GAS AL MOF MIL-88B-Fe Y POSTERIOR LIBERACIÓN MEDIANTE LA DESCOMPOSICIÓN DE LA MATRIZ EN MEDIO FISIOLÓGICO.

- b) *Sílices mesoporosas (SMPs)*: Sílices mesoporosas (SMPs): El primer ejemplo de CORMA basado en una sílice mesoporosa fue publicado en 2014.^[179] En este trabajo, Gonzales y colaboradores utilizaron como vehículo la MCM-41 dopada con aluminio (Al-MCM-41). La presencia de grupos aluminato en la matriz porosa dotaba de carácter iónico al poro, lo que permitió la incorporación del fotoCORM catiónico *fac*- $[\text{Mn}(\text{pqa})(\text{CO})_3](\text{ClO}_4)$ ($\text{pqa}=(2\text{-piridilmetil})(2\text{-quinolilmetil})\text{-amina}$) en su interior mediante un proceso de intercambio iónico. En este caso, la liberación de CO desde el CORMA se produjo mediante activación con luz visible. Posteriormente, en 2015, esta misma matriz fue usada por Mascharak y colaboradores para la encapsulación del fotoCORM $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pbt})(\text{PPh}_3)](\text{CF}_3\text{SO}_3)$ ($\text{pbt}: 2\text{-}(2\text{-piridil})\text{-benzotiazol}$).^[180] Este CORM de renio, además de ser fotoactivable, presentaba luminiscencia en el rojo ($\lambda_{\text{em}} =$

605 nm), lo que permitió confirmar la internalización del sistema híbrido Re-CO@Al-MCM-41 en células humanas de cáncer de mama (MDA-MB-231). Además, bajo irradiación con luz ultravioleta, el sistema liberaba CO induciendo la muerte de las células cancerígenas y provocando, al mismo tiempo, la pérdida de luminiscencia. Este sistema ON/OFF permitió monitorizar, mediante microscopía confocal, no solo el proceso de internalización del material híbrido sino también el proceso de disociación del enlace Re-CO.

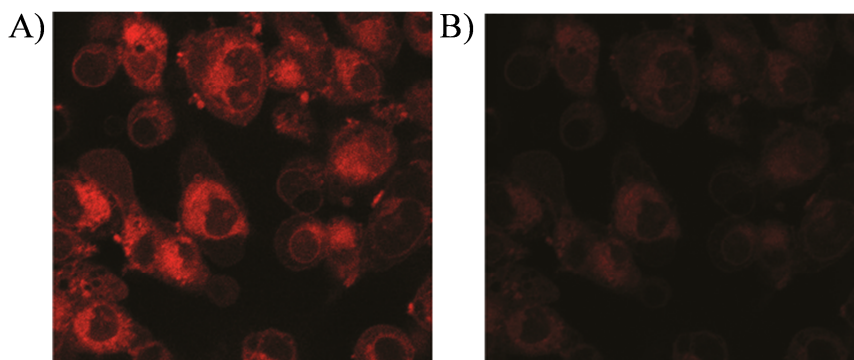


FIGURA 39: SEGUIMIENTO DE LA LIBERACIÓN DE CO PARA EL SISTEMA HÍBRIDO RE-CO@AL-MCM-41 EN CÉLULAS MDA-MB-231 MEDIANTE MICROSCOPÍA CONFOCAL. A) EN OSCURIDAD B) TRAS 15 MINUTOS DE IRRADIACIÓN CON LUZ ULTRAVIOLETA.^[180]

A la vista de los ejemplos aquí descritos y de la gran variedad de materiales que pueden ser utilizados como vehículos para el transporte y liberación de monóxido de carbono, queda patente que los CORMAs poseen un gran potencial como dispositivos para la administración controlada de CO. Además, este tipo de sistemas avanzados podrían superar algunas de las limitaciones que presenta la inhalación de CO gas (baja especificidad) o las moléculas liberadoras de CO (toxicidad asociada a los fragmentos de decarbonilación, baja estabilidad en los fluidos biológicos o interacción con diferentes biomoléculas presentes en el medio) (Figura 40). Sin embargo, tras el primer CORMA sintetizado por Kunz y colaboradores en 2007, el número de materiales liberadores de CO preparados ha sido escaso, con solo unos pocos ejemplos para cada tipo de material/plataforma. Por lo tanto, aún queda mucho por explorar en este campo, siendo necesario preparar nuevos sistemas híbridos CORM@vehículo con propiedades

mejoradas, que permitan una liberación específica, segura y controlada en el tiempo y el espacio. En concreto, en esta Tesis Doctoral se explorará el uso de dos tipos de materiales inorgánicos porosos (los polímeros de coordinación porosos y las sílices mesoporosas), de los que solo existen unos pocos ejemplos en bibliografía,^[157,180] como vehículos para el transporte y liberación controlada de diferentes CORMs fotoactivables.

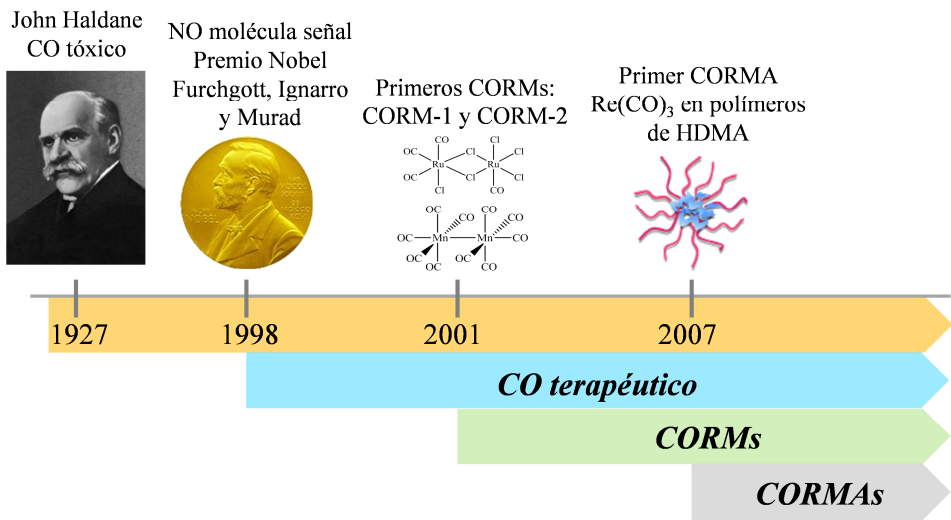


FIGURA 40: EVOLUCIÓN CRONOLÓGICA DEL USO DEL MONÓXIDO DE CARBONO COMO AGENTE TERAPÉUTICO, ASÍ COMO DE LOS DISTINTOS SISTEMAS DE LIBERACIÓN (CORMs Y CORMAs) DISEÑADOS HASTA LA FECHA.

OBJETIVOS

A pesar de la toxicidad del monóxido de carbono en altas concentraciones, su efectividad terapéutica, frente a diversos modelos de enfermedad, ha sido demostrada. De hecho, en la actualidad se han puesto en marcha un total de 5 pruebas clínicas que tratan de determinar la eficacia y toxicidad del CO en humanos. Sin embargo, al tratarse de un gas, es capaz de difundir fácilmente a través las membranas presentes en el organismo lo que, en su papel como agente terapéutico, le otorga una baja especificidad hacia los órganos y tejidos diana. En este sentido, el desarrollo de moléculas liberadoras de CO (CORMs) ha ofrecido nuevas posibilidades; permitiendo controlar la liberación del CO mediante la activación de estas moléculas, ya sea a través de un estímulo externo o de cambios fisiológicos producidos en el propio organismo. Sin embargo, la mayoría de los CORMs descritos hasta la fecha no presentan una biodistribución específica. Además, la lixiviación al medio fisiológico del propio CORM y/o los fragmentos metálicos producidos tras la decarbonilación del mismo (iCORMs), puede provocar un desequilibrio en la concentración de metales en el organismo, lo que podría tener consecuencias fatales. Debido a esto, recientemente la comunidad científica ha planteado el uso de materiales sólidos que puedan servir de vehículos para estas moléculas liberadoras de CO y ser capaces, al mismo tiempo, de liberarlo tras una activación específica. Asimismo, estos sistemas evitarían la difusión al medio fisiológico de las fracciones metálicas potencialmente tóxicas. Además, estos materiales conocidos como CORMAs, podrían ofrecer nuevos perfiles de biodistribución más específicos hacia los órganos o tejidos diana.

Esta Tesis Doctoral tiene como objetivo el desarrollo de diferentes estrategias para la preparación de CORMAs basados en la combinación de fotoCORMs con materiales inorgánicos porosos (en concreto, polímeros de coordinación porosos y sílices mesoporosas). Este objetivo general se formula en los siguientes objetivos específicos:

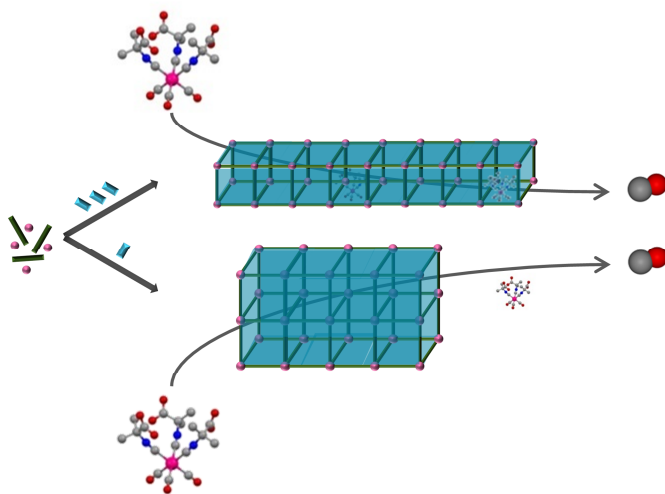
1. Preparación de materiales liberadores de monóxido de carbono basados en la encapsulación del fotoCORM neutro $[\text{Mo}(\text{CNCMe}_2\text{CO}_2\text{H})_3(\text{CO})_3]$, a partir de ahora denominado como ALF794, dentro de las cavidades del polímero de coordinación poroso $[\text{Al}(\text{OH})(\text{SDC})]_n$ (SDC: Ácido 1,2-difeniletlenil-4,4'-dicarboxílico), a partir de ahora denominado como CYCU-3. En este caso, el

tamaño y morfología de las partículas de la matriz porosa se controlará mediante el conocido método de modulación de la coordinación (CMM, del inglés *coordination modulation method*). Se estudiará la capacidad de incorporación del ALF794 en matrices de distinta morfología y tamaño, así como el perfil cinético de liberación de CO y estabilidad en medio fisiológico del sistema híbrido ALF794@CYCU-3.

2. Incorporación del ALF794 en la matriz jerarquizada $[\text{Ni}_2(\text{C}_8\text{H}_2\text{O}_6)(\text{H}_2\text{O})_2]_n$, a partir de ahora denominada como CPO-27-Zn, durante la síntesis de la matriz porosa a temperatura ambiente. Se estudiarán las propiedades del CORMA resultante así como su estabilidad en diferentes medios fisiológicos.
3. Preparación de materiales de liberación de CO mediante la estrategia de intercambio iónico combinando el fotoCORM catiónico $[\text{Mn}(\text{tacn})(\text{CO})_3]\text{Br}$ (tacn: 1,3,5-triazaciclono-nano), a partir de ahora denominado como ALF472, con diferentes matrices inorgánicas porosas aniónicas: *i*) el polímero de coordinación poroso $(\text{NH}_2(\text{CH}_3)_2)_2 [\text{Zn}(\text{adeninato})(\text{BPDC})]$ (BPDC: ácido ácido bifeníl-4,4'-dicarboxílico), a partir de ahora denominado como bio-MOF-1, *ii*) las sílices mesoporosas funcionalizadas con grupos alquilsulfónicos MCM-41-SO₃H y SBA-15-SO₃H y *iii*) la matriz aniónica dopada con grupos aluminato Al-MCM-41. El comportamiento de estos sistemas híbridos (en oscuridad y tras ser expuesto a luz visible), así como su estabilidad en medio fisiológico serán evaluadas.
4. Co-encapsulación del ALF472 y el agente tumoral *cisplatino* en la matriz porosa Al-MCM-41. La cantidad de fármaco incorporado para el sistema dual, así como para aquellos materiales que alberguen un único compuesto bioactivo será evaluada. Además, se analizará la co-liberación en medio fisiológico de ambos agentes terapéuticos.

CAPÍTULO II

Control del tamaño de partícula de la matriz porosa para la
preparación de CORMAs



En este capítulo, se estudia la influencia de diferentes parámetros de síntesis (concentración de reactivos y presencia de modulador) sobre la composición, cristalinidad, el tamaño y la morfología de partícula en polímeros de coordinación porosos, en concreto, sobre la red metalorgánica $[Al(OH)(SDC)]_n$ (H_2SDC : ácido 1,2-difeniletlenil-4,4'-dicarboxílico), conocida como CYCU-3. A continuación, se describe la preparación y caracterización de nuevos sistemas liberadores de monóxido de carbono basados en materiales de CYCU-3 constituidos por partículas de diferente tamaño y morfología y el CORM $[Mo(CNCMe_2CO_2H)_3(CO)_3]$ (ALF794). Finalmente, se evalúa el efecto del tamaño y la morfología de partícula de la matriz anfitriona sobre la carga del CORM, la estabilidad del material híbrido resultante y sobre la cinética de liberación de CO.

1. Método de modulación de la coordinación

Como se mencionó en la introducción de esta Tesis Doctoral, un sistema liberador de fármacos (DDS, del inglés *Drug Delivery System*) se define como una formulación o dispositivo que permite la administración de un agente terapéutico controlando tanto la velocidad/tiempo de liberación del mismo, así como la diana que alcanza dentro del organismo, mejorando de esta forma su eficacia y haciéndolo más seguro para los pacientes. En aquellos DDSs basados en materiales transportadores sólidos, como son los polímeros de coordinación porosos, una de sus características más importantes es el tamaño de partícula. Este parámetro no solo limita la ruta de administración del DDS en el organismo sino que puede influir sobre su comportamiento *in vivo*, lo que determina su actividad. Por ejemplo, la internalización celular de las partículas menores de 500 nm se produce mediante un proceso de endocitosis, mientras que aquellas de mayor tamaño lo hacen por fagocitosis.^[181,182] Además, su excreción del organismo también está condicionada por este parámetro, favoreciéndose la eliminación renal para las partículas inferiores a 10 nm, mientras que las de mayor tamaño se filtran, principalmente, a través del bazo.^[183]

Por otra parte, el tamaño de partícula también influye en el proceso de incorporación/liberación de compuestos bioactivos en sólidos porosos. Dado que la mayoría de las encapsulaciones de moléculas huésped en matrices porosas se llevan a

cabo mediante procesos de impregnación sólido-líquido, tanto el área superficial externa de las partículas, es decir, la superficie de contacto de las partículas con la disolución, como la longitud de difusión en la matriz porosa son parámetros clave que determinan aspectos como la cantidad de droga incorporada o su perfil cinético de liberación.^[184] Además, con vistas a dotar de especificidad a estos materiales y/o mejorar su estabilidad coloidal, el área superficial externa de las partículas es también importante, ya que condiciona los procesos de funcionalización externa de estos sistemas.[21]

Por tanto, teniendo en cuenta lo anterior, es necesario controlar el tamaño de partícula de los polímeros de coordinación porosos (MOFs) con vistas a su empleo como sistemas albergadores, transportadores y liberadores de fármacos. Para conseguir esto, como se mencionó en el Capítulo I de esta Tesis Doctoral, se han desarrollado diferentes estrategias sintéticas de MOFs como son *i*) la síntesis asistida por microondas o ultrasonidos, *ii*) la síntesis mecanoquímica, *iii*) la síntesis mediante el empleo de microemulsiones y *vi*) la síntesis solvotermal. De las estrategias anteriores, tanto la síntesis mecanoquímica como la preparación de MOFs asistida por ultrasonidos están restringidas a aquellos materiales que requieran condiciones suaves de reacción mientras que el uso de microemulsiones para la preparación de PCPs es una metodología que ofrece pobres rendimientos y baja reproducibilidad. Por el contrario, la síntesis clásica solvotermal, acompañada del empleo de moduladores, resulta ventajosa frente a las anteriores puesto que permite el control del tamaño y morfología de partícula en MOFs para un elevado número de estructuras.

Esta última estrategia ha sido desarrollada por Kitagawa *et al.*, quienes, inspirados en el trabajo realizado por Fischer y colaboradores,[26] introdujeron, en el año 2009, el método de modulación de la coordinación (CMM, del inglés *Coordination Modulation Method*) como un procedimiento sencillo para el control del tamaño y morfología de partícula en MOFs.^[184] Dicho método se basa en que, mediante la modulación del proceso de autoensamblaje en MOFs, regido por interacciones de coordinación, es posible controlar las características de las partículas de los materiales resultantes (tamaño, morfología o cristalinidad). De esta forma, proponen que la adición a la mezcla de reacción de compuestos que presenten el mismo grupo funcional que el

espaciador orgánico (moduladores), genera una situación de competencia entre ambos (agente modulante y espaciador orgánico), que influye sobre los procesos de nucleación y crecimiento cristalino de las partículas de MOF. En este sentido, como se muestra en la Figura 41, la interacción de los moduladores con los iones metálicos limita el crecimiento del cristal en ciertas direcciones del espacio, lo que determina el tamaño y morfología de partícula de los materiales resultantes.

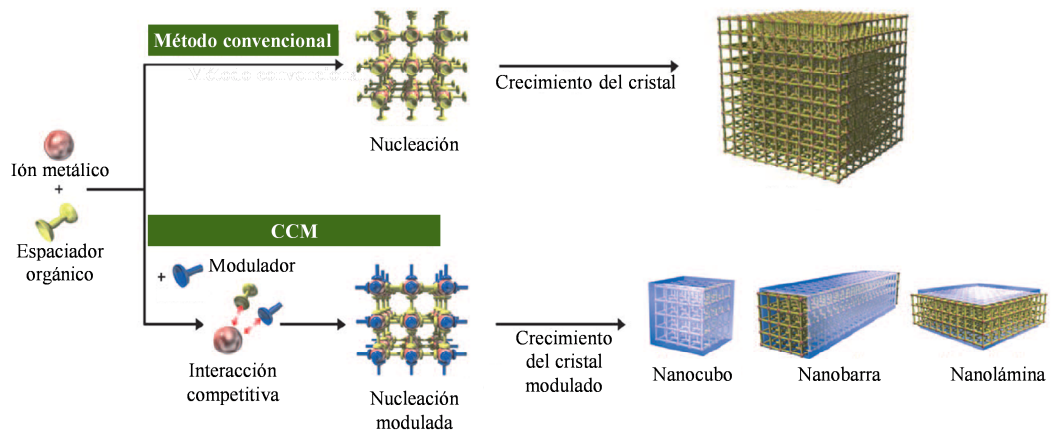


FIGURA 41: ESQUEMA DEL CRECIMIENTO DE CRISTALES DE MOFs MEDIANTE EL MÉTODO CONVENCIONAL Y EL MÉTODO DE MODULACIÓN DE LA COORDINACIÓN. EN ÉSTE ÚLTIMO, EL MODULADOR (CON EL MISMO GRUPO FUNCIONAL QUE EL ESPACIADOR ORGÁNICO) IMPIDE EL CRECIMIENTO DEL CRISTAL EN CIERTAS DIRECCIONES (REPRESENTADO EN AZUL) MODIFICANDO LA MORFOLOGÍA DE LAS PARTÍCULAS RESULTANTES. IMAGEN ADAPTADA.^[3]

Para demostrar la utilidad del CCM, el grupo del profesor Kitagawa seleccionó el PCP $[\text{Cu}_2(\text{ndc})_2(\text{dabco})]_n$ (ndc: ácido naftaleno-1,4-dicarboxílico, del inglés *1,4-naphthalene dicarboxylic acid*, dabco: 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano, del inglés *1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane*)^[185] debido a que presenta dos modos de coordinación diferentes: ndc-cobre y dabco-cobre. Como se observa en la Figura 42b, la interacción de los ligandos carboxílicos con los clústeres metálicos de cobre da lugar a un enrejado cuadrado bidimensional. A su vez, estos enrejados se unen entre sí a lo largo del eje *c*, mediante los enlaces Cu-dabco, formando la red tridimensional (Figura 42b).

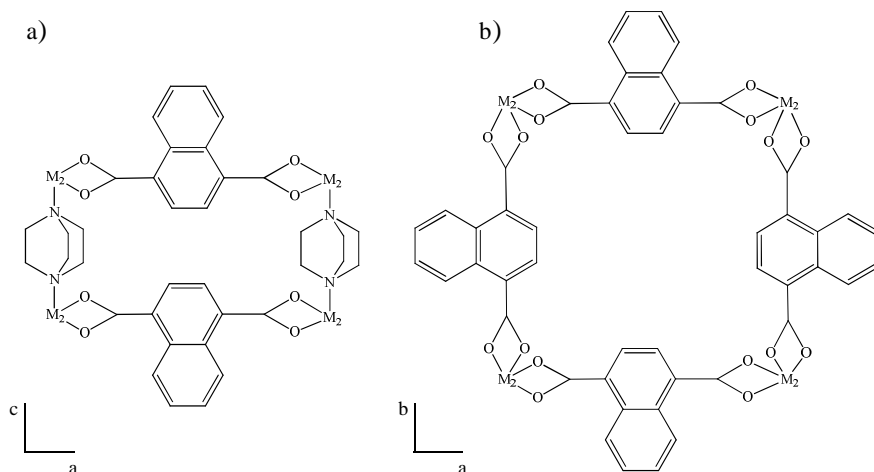


FIGURA 42: MODOS DE COORDINACIÓN EN EL MOF $[\text{Cu}_2(\text{ndc})_2(\text{dabco})]_n$.

En este sentido, la anisotropía del PCP elegido les permitió modular un único modo de coordinación, es decir, influir sobre el crecimiento cristalino en una dirección determinada. Para ello, adicionaron ácido acético al medio de reacción como modulador ya que, al presentar el mismo grupo funcional al espaciador orgánico ndc, competía con éste por la interacción con el clúster metálico de cobre. De esta forma, observaron que el incremento de concentración de modulador en la mezcla de reacción limitaba el desarrollo del cristal a través de las interacciones ndc-cobre, dando lugar a partículas de morfología de barra (rods) cuya proporción longitud/anchura se veía incrementada de forma proporcional a la cantidad de agente modulante añadida. Por tanto, se demostró que modulando el crecimiento del cristal en una dirección dada, se conseguía controlar la morfología y tamaño de partícula, confirmando la utilidad del método desarrollado.

2. Control del tamaño y de la morfología de partícula en el polímero de coordinación poroso $[\text{Al}(\text{OH})(\text{SDC})]_n$ (CYCU-3)

En este capítulo, se ha seleccionado la red metal-orgánica porosa $[\text{Al}(\text{OH})(\text{SDC})]_n$ (H_2SDC : ácido 1,2-difeniletilenil-4,4'-dicarboxílico), sintetizada por Lin *et al.* en el año 2013,^[186] para llevar a cabo la modulación del tamaño, morfología y cristalinidad de sus partículas empleando el método de modulación de la coordinación. A continuación, los diferentes materiales obtenidos se han utilizado para preparar nuevos CORMAs

encapsulando en ellos el CORM fotoactivo ALF794. Las razones que motivaron la elección de este MOF se detallan a continuación:

En relación a su estructura, el polímero de coordinación poroso CYCU-3 se basa en iones Al(III) unidos a espaciadores orgánicos SDC (1,2-difeniletilenil-4,4'-dicarboxilato). De esta forma, cada ión aluminio se enlaza a cuatro átomos de oxígeno de los grupos carboxilato de cuatro moléculas de SDC diferentes, y a dos átomos de oxígeno procedentes de grupos hidroxilo, formando octaedros del tipo AlO_6 . Estos octaedros se unen entre sí a través de puentes hidroxilo formando cadenas inorgánicas monodimensionales que actúan como unidades de construcción secundarias (SBUs, del inglés *Secondary Building Units*) y que se extienden a lo largo del eje *c*, como se muestra en la Figura 43a. Por su parte, las distintas SBUs formadas se enlazan entre sí a través de los espaciadores orgánicos SDC dando lugar a dos tipos de cavidades: mesoporos hexagonales y microporos triangulares, como se observa en la Figura 43, b. En este sentido, tanto el tamaño de las cavidades mesoporosas (3 nm) como su disposición en el espacio formando canales monodimensionales favorecen la incorporación y difusión de moléculas huésped en la red porosa, haciendo del polímero de coordinación poroso CYCU-3 un material adecuado para la encapsulación y liberación de moléculas bioactivas.

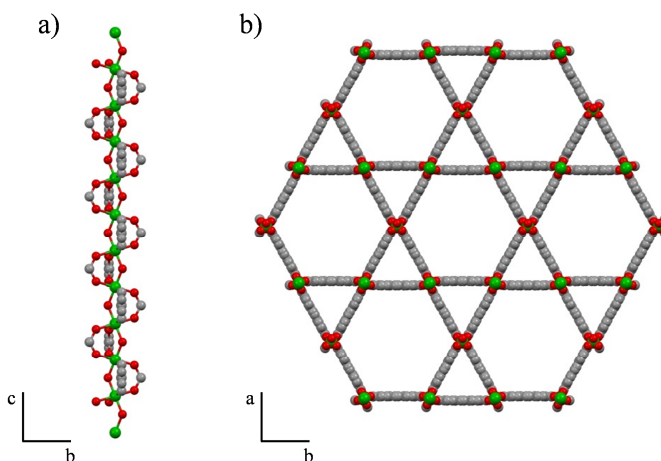


FIGURA 43: a) CANALES MONODIMENSIONALES QUE FORMAN LAS SBUs EN LA ESTRUCTURA DEL MOF CYCU-3, b) CANALES HEXAGONALES MESOPOROSOS Y TRIANGULARES MICROPOROSOS QUE SE EXTIENDEN A LO LARGO DEL EJE *c*.

Por otra parte, en relación a su composición, la fracción metálica del MOF está formada por aluminio. Este elemento, tercero en abundancia en la corteza terrestre, es ampliamente usado en la preparación de envases de comida y bebidas. De hecho, la principal fuente de exposición de los humanos frente a este elemento químico es su lixiviación a partir de estos envases. Además, este elemento está presente en la formulación de algunos medicamentos o cosméticos de uso actual. Por ejemplo, mientras los sulfatos de aluminio se emplean como coadyuvantes en vacunas para conseguir respuestas inmunológicas más efectivas, el hidróxido de aluminio es muy utilizado en formulaciones antiácidas. Otro ejemplo son los productos antitranspirantes que, en su gran mayoría, están basados en cloruro de aluminio. En este sentido, el amplio uso de compuestos de aluminio por parte de las industrias farmacéutica y alimentaria es un reflejo de su biocompatibilidad, por lo que, teniendo en cuenta todo lo anterior, se justifica el empleo de la matriz porosa CYCU-3 para la preparación de materiales liberadores de monóxido de carbono (CORMAs) con vistas a su potencial uso como sistemas de liberación de fármacos (DDSs).

Una vez elegida la matriz porosa que se va a emplear en la preparación de CORMAs, se seleccionó el método de modulación de la coordinación (CMM) como estrategia sintética para la preparación de materiales de CYCU-3 con diferentes características de partícula (morfología, tamaño, cristalinidad). Las razones para utilizar esta estrategia sintética son:

- La preparación del material CYCU-3 requiere condiciones moderadas-fuertes de reacción (190 °C mediante síntesis solvotermal), lo que impide utilizar otras rutas sintéticas como la preparación mecanoquímica o la síntesis asistida por ultrasonidos.
- La estructura del compuesto CYCU-3 presenta dos modos de interacción metal-ligando diferentes (Al-OH, Al-SDC). Por tanto, es posible modular el proceso de cristalización de un modo anisotrópico, lo que permite la formación de partículas con distinta morfología y tamaño.

Tras seleccionar el método de modulación de la coordinación (CMM) como procedimiento para controlar las propiedades de las partículas del MOF, se decidió

emplear ácido acético como agente modulante. La elección de este compuesto se basa en que: *i*) es miscible con el disolvente utilizado en la preparación del PCP (*N,N'*-dimetilformamida (DMF)), *ii*) es estable en las condiciones de reacción y *iii*) presenta el mismo grupo funcional que el espaciador orgánico H₂SDC (ácido carboxílico) por lo que se favorece el proceso competitivo entre ambos ácidos por su interacción con los iones metálicos del MOF (Al(III)).

Una vez seleccionados los reactivos y la metodología para controlar las propiedades de las partículas del PCP CYCU-3, se procedió a analizar la influencia de distintos parámetros sintéticos sobre estas propiedades.

2.1. Influencia de la concentración de los reactivos en el tamaño, la cristalinidad y morfología de las partículas de CYCU-3

En primer lugar, en ausencia de modulador, se evaluó la influencia de la concentración de los reactivos utilizados en la síntesis del MOF (Al(NO₃)₃·9H₂O y H₂SDC) sobre las propiedades de las partículas de los materiales resultantes. En todas las síntesis llevadas a cabo, se emplearon cantidades equimolares de Al(NO₃)₃·9H₂O y H₂SDC y se prepararon las correspondientes suspensiones en DMF con concentraciones de ambos reactivos que variaban desde 20 hasta 60 mM. A continuación, las mezclas se calentaron a 190 °C durante 3 días (los intentos de reducir el tiempo de reacción a 24 horas conducía a materiales con menor cristalinidad). Tras el tiempo de reacción, en todos los casos, se obtuvo un precipitado blanco que se lavó con DMF y se dejó secar a 90 °C a vacío (véase Anexo I). A continuación, se evaluó la cristalinidad de los distintos materiales obtenidos registrando sus difractogramas de rayos-X en polvo (XRPD, del inglés *X-ray Powder Diffraction*), mientras que el tamaño y la morfología de partícula se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, del inglés *Scanning Electron Microscopy*).

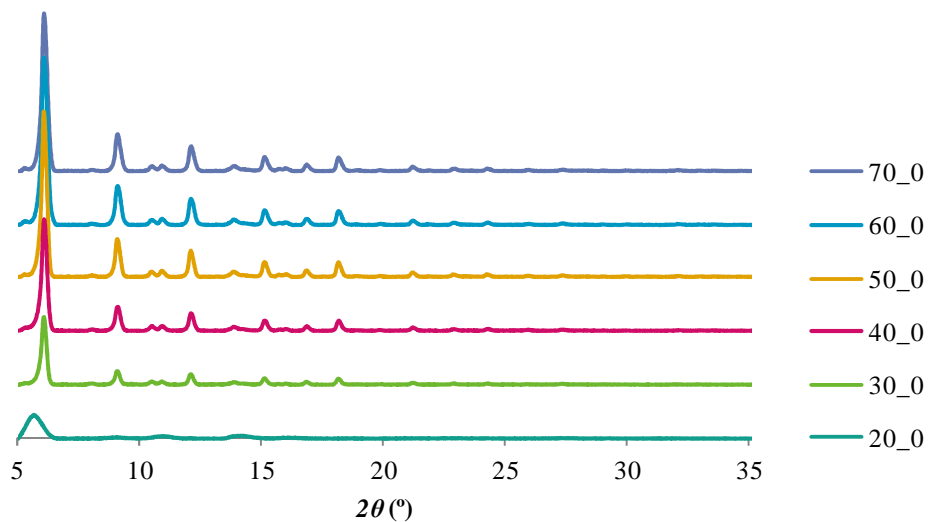


FIGURA 44: PATRONES DE DIFRACCIÓN DE RAYOS-X EN POLVO DE LOS MATERIALES PREPARADOS EN AUSENCIA DE MODULADOR (A_B; A: CONCENTRACIÓN DE LOS REACTIVOS (mM), B: RATIO MODULADOR-LIGANDO, EN ESTE CASO, LAS REACCIONES SE LLEVARON A CABO EN AUSENCIA DE MODULADOR).

Como se observa en la Figura 44, en ausencia de modulator, las matrices preparadas a partir de concentraciones de reactivos comprendidas entre 30-60 mM presentan una alta cristalinidad. Sin embargo, el patrón de difracción del material obtenido de reacción más diluida, 20 mM (material 20-0, concentración de reactivos 20 mM y ausencia de modulator), muestra una única reflexión a bajo ángulo, de mayor anchura y menor intensidad en comparación a las reflexiones observadas en los difractogramas del resto de materiales.

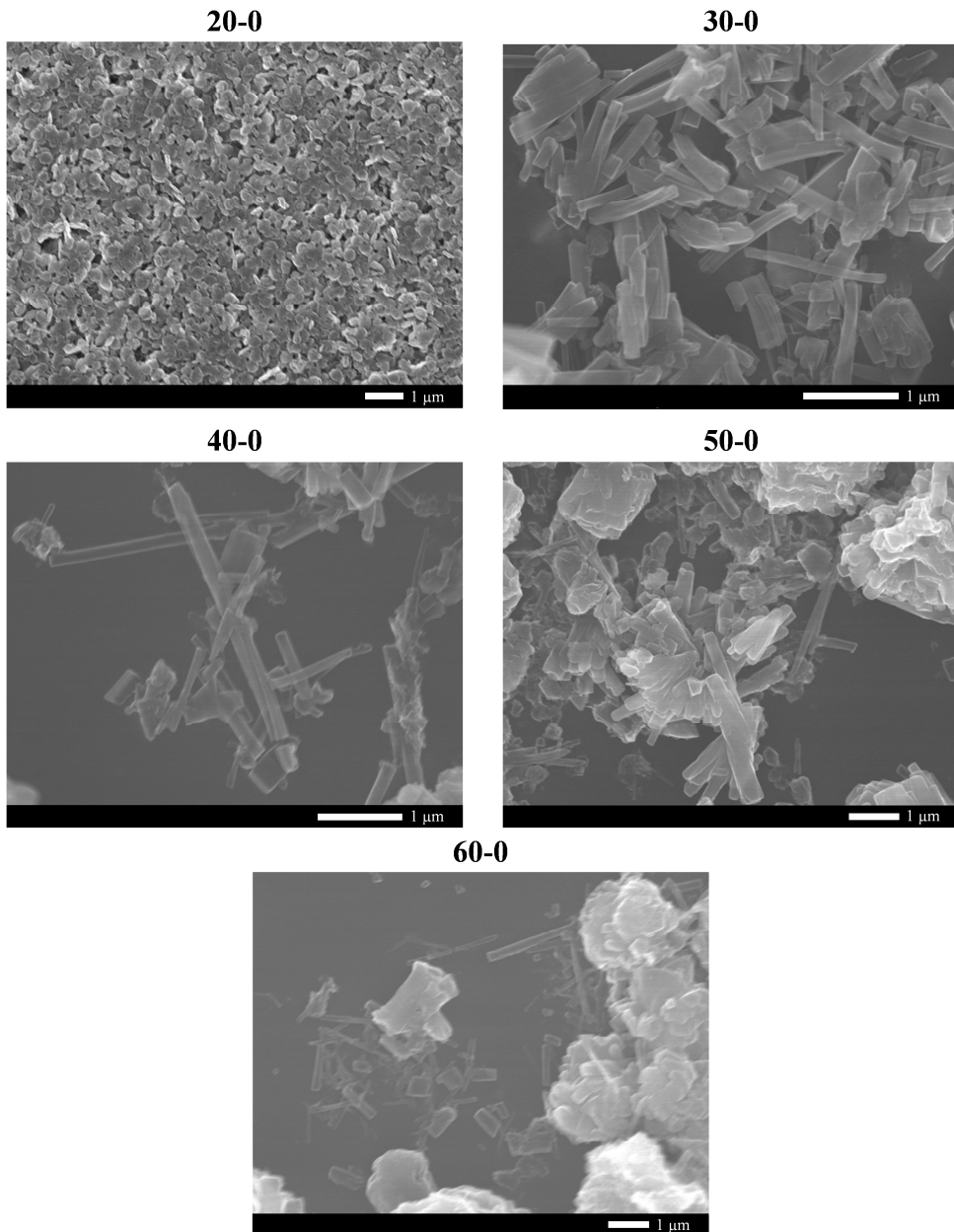


FIGURA 45: IMÁGENES OBTENIDAS MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM) DE LOS MATERIALES OBTENIDOS EN AUSENCIA DE MODULADOR (CONCENTRACIONES DE REACTIVOS: 20-60 mM).

Por su parte, las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de los materiales CYCU-3 sintetizados en ausencia de modulator (Figura 45), muestran que el empleo de concentraciones de reactivos comprendidas entre 30-60 mM conduce a la formación de partículas con morfología tipo barra de alrededor de 1 μm de

longitud. Debe destacarse que, a medida que aumenta la concentración de los reactivos, se obtienen materiales más heterogéneos que combinan partículas alargadas y aglomerados. Sin embargo, el uso de mezclas de reactivos más diluidas (20 mM) da lugar a partículas de morfología poco definida en el rango nanométrico (< 100 nm). Estas imágenes corroboran los resultados obtenidos mediante difracción de rayos-X en polvo donde el patrón de difracción del material 20_0 presenta picos más anchos y de menor intensidad en comparación con los difractogramas del resto de materiales. Esta mayor anchura observada puede deberse al pequeño tamaño de las partículas, mientras que la menor intensidad de las reflexiones está relacionada con la baja cristalinidad del material obtenido. Por otra parte, los MOFs preparados a partir de mezclas más concentradas muestran difractogramas con reflexiones estrechas e intensas debido al mayor tamaño de partícula de estos materiales así como a su elevada cristalinidad.

Por otra parte, también se ha demostrado que la concentración del espaciador orgánico H₂SDC en la mezcla de reacción es un parámetro importante que influye sobre el proceso de cristalización. En este sentido, es importante destacar que, dado que el ligando es insoluble en DMF a temperatura ambiente, la síntesis del material se llevó a cabo a partir de suspensiones de dicho ligando en disoluciones de la sal Al(NO₃)₃·9H₂O en DMF. A continuación, en las condiciones de reacción empleadas (calentamiento en bomba solvotermal a 190 °C), el disolvente utilizado, DMF, se degrada liberando iones [NH₂(CH₃)₂]⁺ que confieren basicidad al medio de reacción y favorecen la desprotonación de los grupos carboxílicos del ligando, favoreciendo su disolución y generando los grupos carboxilato, que se coordinarán a los centros metálicos Al(III) para dar lugar a la red porosa CYCU-3. En este sentido, con objeto de evaluar si la desprotonación previa del ácido dicarboxílico modificaba el proceso de cristalización del CYCU-3, se preparó una disolución de H₂SDC en DMF calentando 15 minutos a 175 °C en un reactor asistido por microondas. A continuación, la disolución resultante se mezcló con una disolución de nitrato de aluminio (proporción equimolar metal-ligando y concentración 40 mM de cada reactivo) para llevar a cabo la síntesis del compuesto CYCU-3 (reacción solvotermal, 190 °C, 3 días) (véase Anexo I). Como se observa en la Figura 46, el tratamiento térmico previo del ligando conduce a la formación de un material con baja cristalinidad (40_0_sol) en comparación con el

material equivalente (40_0), preparado según el procedimiento general. De esta forma, se demuestra que la desprotonación del espaciador orgánico H₂SDC previa a la síntesis favorece la rápida coordinación de los grupos carboxilato a los iones de aluminio presentes en el medio de reacción. Esto conduce a un crecimiento cristalino menos controlado, es decir, a mayor velocidad y con menor orden y, por tanto, a la formación de partículas de menor cristalinidad.

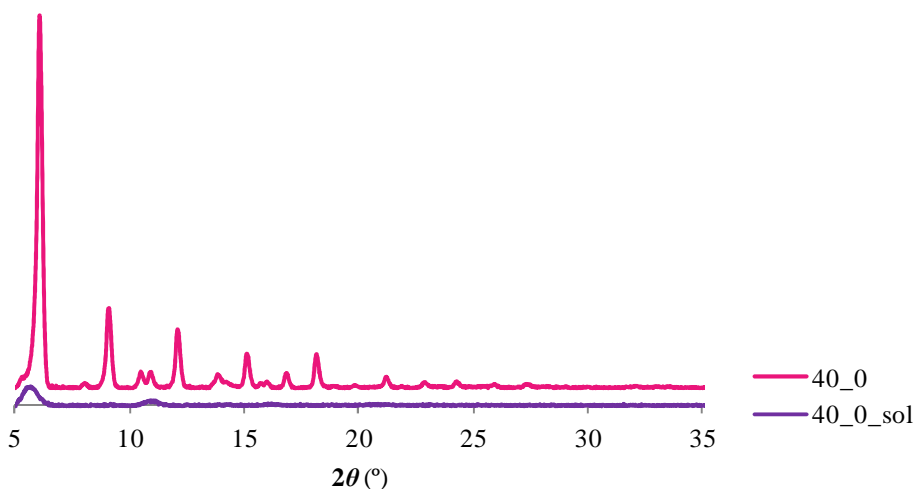


FIGURA 46: DIFRACTOGRAMAS DE RAYOS-X EN POLVO DE LOS MATERIALES OBTENIDOS A PARTIR DE MEZCLAS EQUIMOLARES DE REACTIVOS (CONCENTRACIÓN 40 mM) Y AUSENCIA DE MODULADOR. 40_0_sol: REACCIÓN CON EL LIGANDO DESPROTONADO Y DISUELTO PREVIAMENTE (MORADA), 40_0: REACCIÓN A PARTIR DE UNA SUSPENSIÓN DEL LIGANDO EN UNA DISOLUCIÓN DE NITRATO DE ALUMINIO(III) (ROSA).

2.2. Influencia de la proporción de modulador-ligando sobre el tamaño y la morfología de las partículas de CYCU-3.

Una vez analizada la influencia de la concentración de los reactivos en la mezcla de reacción sobre las características de las partículas del material poroso CYCU-3, se prepararon materiales CYCU-3 usando el método de modulación de la coordinación (CMM). Para ello, se llevó a cabo la reacción en presencia de distintas concentraciones de ácido acético (agente modulador) con objeto de controlar el tamaño y la morfología

de las partículas del sólido poroso resultante. En particular, se emplearon proporciones molares ácido acético-ligando 0-1, 5-1, 20-1 y 50-1.

Como se observa en la Figura 47, la evolución de la cristalinidad de los materiales aislados en función de la proporción de modulador empleada muestra una tendencia similar para todo el rango de concentraciones de reactivos (30-60 mM) en el que se llevó a cabo la reacción. Como se puede observar, la adición de proporciones moderadas de agente modulante (proporción agente modulante-ligando: 5-1 y 20-1) no afecta a la estructura ni a la cristalinidad de las partículas de CYCU-3 resultantes, en el rango de concentraciones de 30-60 mM, en comparación con el material CYCU-3 original (que se corresponde con el material CYCU-3 40_5). Sin embargo, en los casos en los que se empleó una proporción de modulador 50 veces superior a la del ligando, se aislaron materiales con una baja cristalinidad. Además, en estos materiales, hay algunos cambios en sus patrones de difracción en comparación con el material CYCU-3 original. En concreto, se puede observar un ligero desplazamiento a menor ángulo de la reflexión más intensa (desde $2\theta = 6.02^\circ$ a 5.62°) que podría ser indicativo de la obtención de una nueva fase.

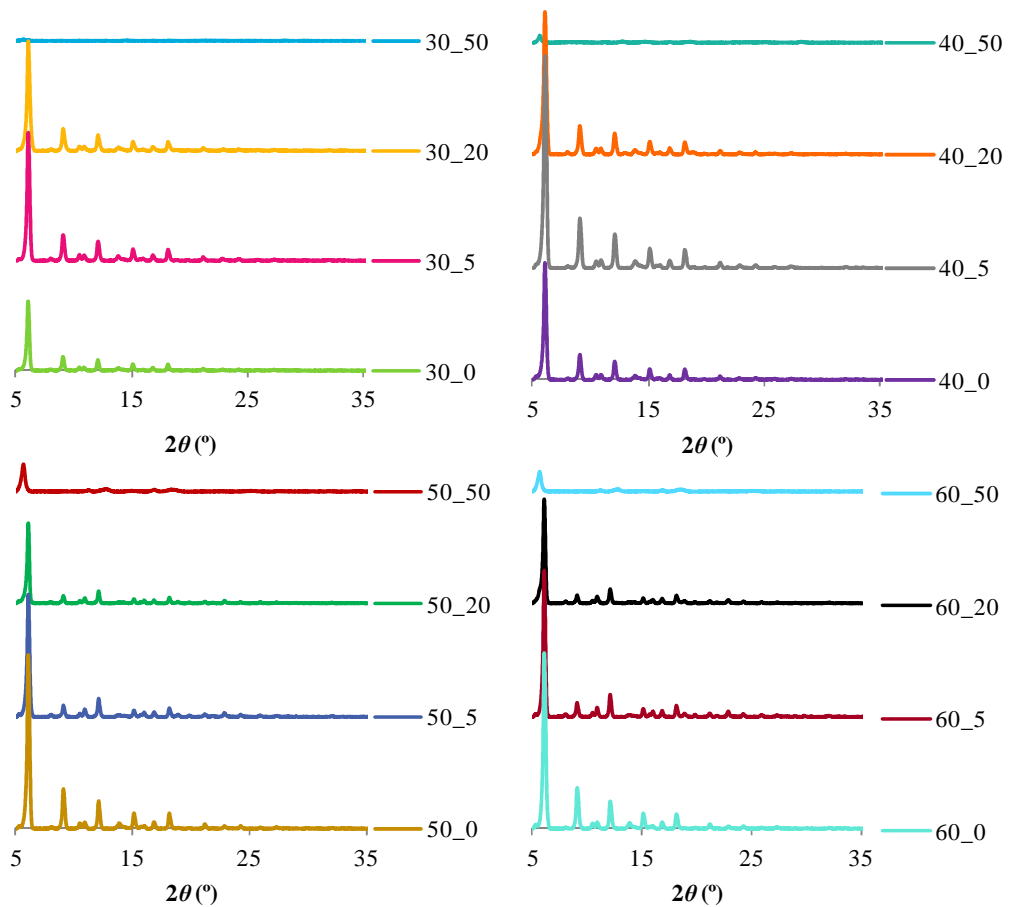


FIGURA 47: PATRONES DE DIFRACCIÓN DE RAYOS-X EN POLVO DE LOS MATERIALES SINTETIZADOS CON DISTINTAS PROPORCIONES DE MODULADOR-LIGANDO PARA EL RANGO DE CONCENTRACIONES DE REACTIVOS 30-60 mM. (A_B: A = CONCENTRACIÓN DE H_2SDC Y $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (mM), B = PROPORCIÓN MOLAR MODULADOR/LIGANDO).

Por tanto, con el objetivo de analizar con más detalle la estructura de CYCU-3 50_50, se llevó a cabo un estudio estructural de dicho compuesto mediante difracción de electrones con rotación continua (CRED, del inglés *Continuous rotation electron diffraction*) en colaboración con el grupo de investigación de la Profesora X. Zou de la Universidad de Estocolmo (Suecia). Para este estudio, se obtuvieron imágenes del material mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y se registraron los datos difracción de electrones de un área seleccionada (ED).

Por una parte, las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) muestran que los cristales tienen una morfología de barra (Figura 48), lo que está de acuerdo con las imágenes de SEM de este material (véase más adelante, Figura 54). A continuación, se empleó la técnica CRED para el análisis estructural del material objeto de estudio (véanse los detalles experimentales en el Anexo I). La red recíproca 3D reconstruida a partir de los datos de CRED (Figura 49) se utilizó para determinar los parámetros de la celdilla unidad del material CYCU-3 50_50 ($a = 32.6 \text{ \AA}$, $b = 67.5 \text{ \AA}$, $c = 6.8 \text{ \AA}$, $\alpha = 89.0^\circ$, $\beta = 90.3^\circ$, and $\gamma = 96.3^\circ$). Estos valores son muy similares a los del material CYCU-3 original publicado ($a = 34.067 \text{ \AA}$, $b = 60.07 \text{ \AA}$, $c = 6.312 \text{ \AA}$, $\alpha = 90.0^\circ$, $\beta = 90.0^\circ$, and $\gamma = 90.0^\circ$).^[186] En este sentido, las diferencias más importantes se observan el parámetro b (7.4 \AA) y en el ángulo γ (6.3°). Por otra parte, en la red recíproca 3D reconstruida que se muestra en la Figura 49, pueden observarse importantes manchas de difracción a lo largo del eje b^* , lo que indica que la estructura de CYCU-3 50_50 está desordenada a lo largo de dicho eje. En este sentido, debido al desorden observado, así como al comportamiento flexible del cristal (Figura 49a-c), la calidad de los datos obtenidos mediante CRED no permitieron una resolución directa de la estructura del CYCU-3 50_50. No obstante, la comparación de los parámetros de la celdilla unidad de ambos materiales parece indicar que el material CYCU-3 50_50 es una nueva estructura distorsionada del material CYCU-3 original.

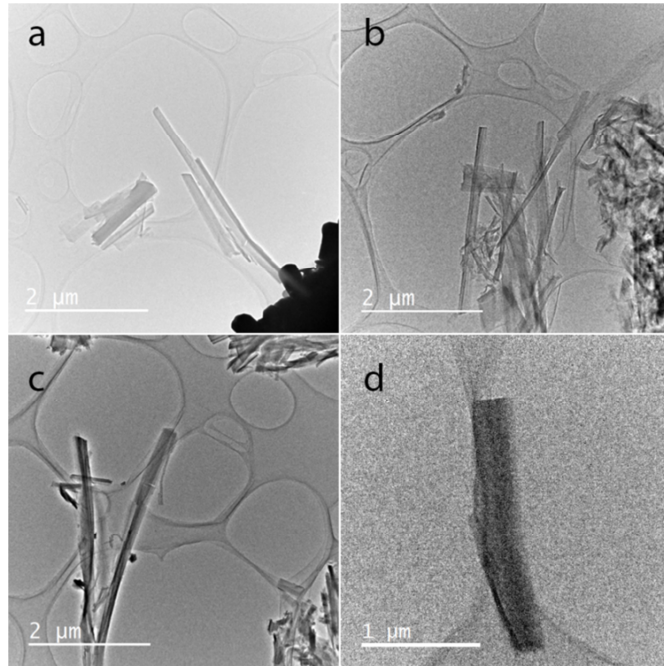


FIGURA 48: IMÁGENES DEL MATERIAL CYCU-3 50_50 OBTENIDAS MEDIANTE MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.

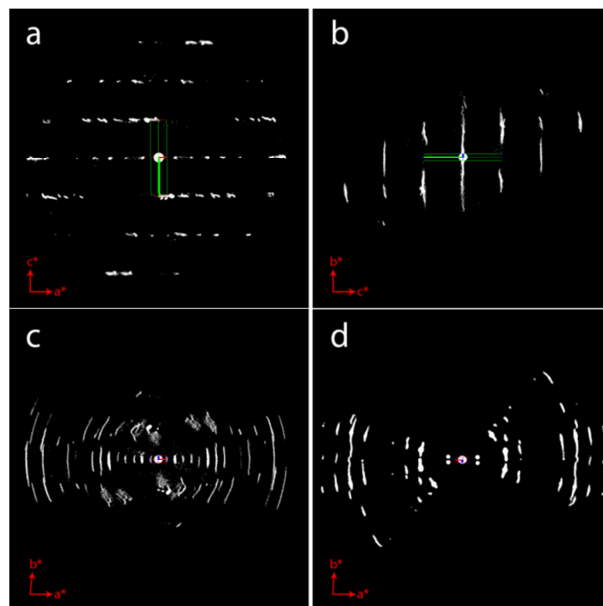


FIGURA 49: RED RECÍPROCA 3D DEL CYCU-3 50_50 RECONSTRUIDA MOSTRANDO LA PROYECCIÓN A LO LARGO DEL A) EJE B*, B) EJE A*, C) EJE C*) Y D) IMAGEN 2D CORTADA A PARTIR DEL PLANO HK0 DE OTRO CRISTAL.

Teniendo en cuenta que los parámetros de la celdilla unidad obtenidos mediante RED no eran muy exactos, se realizó un ajuste Pawley de los datos de difracción de rayos-X en polvo para confirmar y refinar estos parámetros (véase el Anexo 1). Los parámetros de celdilla unidad refinados son: $a = 32.513 \text{ \AA}$, $b = 68.471 \text{ \AA}$, $c = 6.821 \text{ \AA}$, $\alpha = 90.0^\circ$, $\beta = 90.0^\circ$, and $\gamma = 95.436^\circ$, lo que confirma que CYCU-3 50_50 posee una simetría monoclinica frente a la simetría ortorrómbica del material CYCU-3 original.

Por tanto, en base a la relación entre los parámetros de celdilla unidad de ambos materiales, se ha propuesto un modelo estructural promedio para el material CYCU-3 50_50, como se muestra en la Figura 50. Como se puede observar, la celdilla unidad ortorrómbica del material CYCU-3 original se distorsiona para dar lugar a la celdilla monoclinica del compuesto CYCU-3 50_50. Además, es importante destacar que, debido al incremento del parámetro b y del ángulo γ , la distancia Al-Al a lo largo de $[-1 \ 1 \ 0]$ es demasiado grande para permitir la coordinación de los ligandos orgánicos a los centros metálicos de aluminio desde ambos lados. Por tanto, los espaciadores a lo largo de $[-1 \ 1 \ 0]$ podrían, o bien estar coordinados sólo por un lado (Figura 51, indicado por un círculo), o bien ausentes. Sin embargo, los extremos de ambos espaciadores a lo largo de $[-1 \ 1 \ 0]$ sí estarían coordinados a los centros metálicos de aluminio. De esta forma, el compuesto presenta una estructura abierta, pero con desorden.

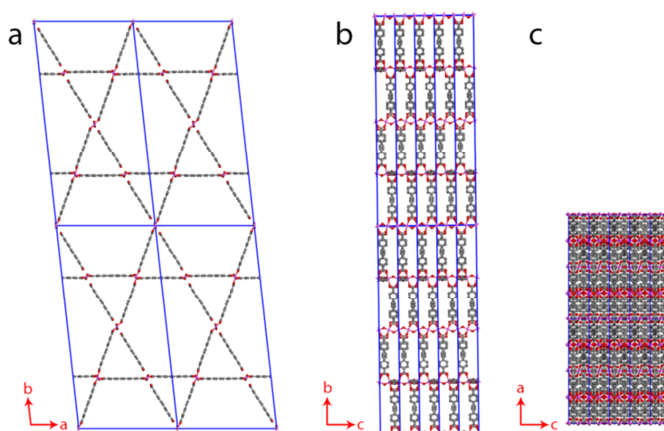


FIGURA 50: MODELO ESTRUCTURAL PROMEDIO PROPUESTO EN BASE A LOS PARÁMETROS DE CELDILLA UNIDAD OBTENIDOS MEDIANTE CRED.

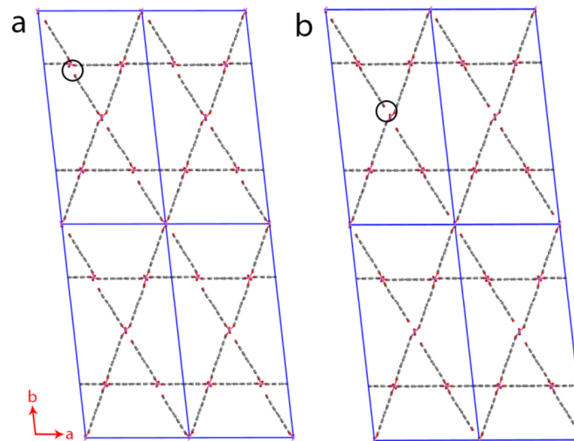


FIGURA 51: MODELOS ESTRUCTURALES POSIBLES QUE MUESTRAN DESORDEN A LO LARGO DEL EJE b .

Por último, se simularon los patrones de difracción de electrones del modelo estructural promedio propuesto para el compuesto CYCU-3 50-50 y del compuesto CYCU-3 original y se compararon con el patrón de difracción de electrones obtenido experimentalmente para el material CYCU-3 50_50 (Figura 52). Por una parte, se observa que el patrón obtenido experimentalmente para CYCU-3 50_50 es similar al simulado para el material CYCU-3 original (Figura 52a y b). En este sentido, las diferencias observadas entre ambos se deben a la distorsión de la de celdilla unidad de la estructura del CYCU-3 50_50. Por otra parte, el patrón de difracción de electrones experimental del material CYCU-3 50_50 (Figura 52c) está de acuerdo con el patrón de difracción simulado para la estructura propuesta (Figura 52a), lo que indica el modelo estructural promedio propuesto para el compuesto CYCU-3 50_50 es probablemente correcto. Además, el patrón de difracción de rayos-X en polvo simulado para la estructura de CYCU-3 50_50 propuesta (Figura 52b) es también similar al encontrado experimentalmente (Figura 52a). En este caso, la anchura de los picos observada en el patrón de difracción experimental puede deberse al desorden de la estructura así como a la orientación preferencial de los cristales. Debido a estos factores, además del problema de solapamiento de las reflexiones, es difícil indexar el patrón de difracción completo.

En definitiva, estos estudios han demostrado que el uso de una proporción modulador-ligando muy elevada, de 50-1, conlleva la obtención de una nueva fase del material CYCU-3 distorsionada.

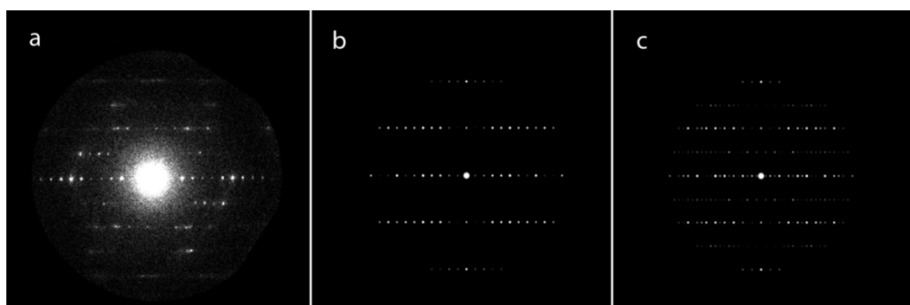


FIGURA 52: a) PATRÓN DE DIFRACCIÓN DE ELECTRONES EXPERIMENTAL DE CYCU-3 50_50, b) PATRÓN DE DIFRACCIÓN DE ELECTRONES SIMULADO PARA CYCU-3 ORIGINAL, c) PATRÓN DE DIFRACCIÓN DE ELECTRONES SIMULADO PARA CYCU-3 50_50. ES IMPORTANTE DESTACAR QUE APARECEN BANDAS DE DIFRACCIÓN EXTRAS EN a) y b), LO QUE INDICA QUE CYCU-3 ORIGINAL Y CYCU-3 50_50 NO PRESENTAN LA MISMA SIMETRÍA.

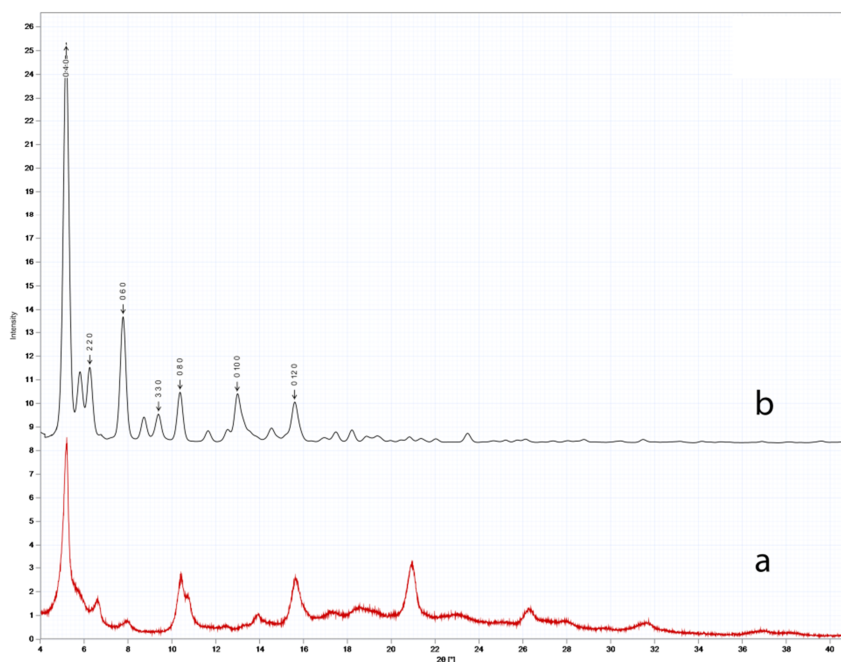


FIGURA 53: PATRONES DE DIFRACCIÓN DE RAYOS-X EN POLVO DE CYCU-3 50_50: a) EXPERIMENTAL, b) SIMULADO.

Finalmente, las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de los distintos materiales CYCU-3 obtenidos con distintas proporciones modulador-ligando (Figura 54), muestran que el efecto del ratio de modulador empleado sobre el tamaño y la morfología de las partículas sintetizadas presenta una tendencia similar para todas las concentraciones de reactivos ensayadas (30-60 mM). En este sentido, el aumento en la proporción de modulador conlleva un incremento en la longitud de las partículas, algo especialmente apreciable para los materiales preparados con una concentración de modulador cincuenta veces superior a la del espaciador orgánico.

Este hecho puede explicarse teniendo en cuenta la estructura del CYCU-3. Dicho MOF está constituido por cadenas monodimensionales formadas por iones Al(III) conectados entre sí por puentes OH que se extienden a lo largo del eje *c* formando las unidades de construcción secundarias (SBUs). Dichas SBUs se unen entre sí a través del espaciador orgánico SDC, dando lugar a los canales monodimensionales de la matriz porosa. En este sentido, la adición del modulador ácido acético, que presenta un ácido carboxílico como grupo funcional, no tiene influencia sobre las interacciones de tipo Al-OH, es decir, no limita el crecimiento cristalino en la dirección del eje *c*. Sin embargo, las moléculas de ácido acético pueden competir con el espaciador orgánico H₂SDC por su interacción con los iones de aluminio que forman los clústeres metálicos, lo que modula el equilibrio de coordinación y limita el crecimiento cristalino de las partículas a través de dichas interacciones. Por tanto, el incremento de la concentración de ácido acético usada en la preparación del MOF CYCU-3 genera partículas de menor grosor (limitación de crecimiento en las interacciones Al-SDC) mientras que su longitud no se ve afectada (crecimiento de los cristales a través de las cadenas Al-OH).

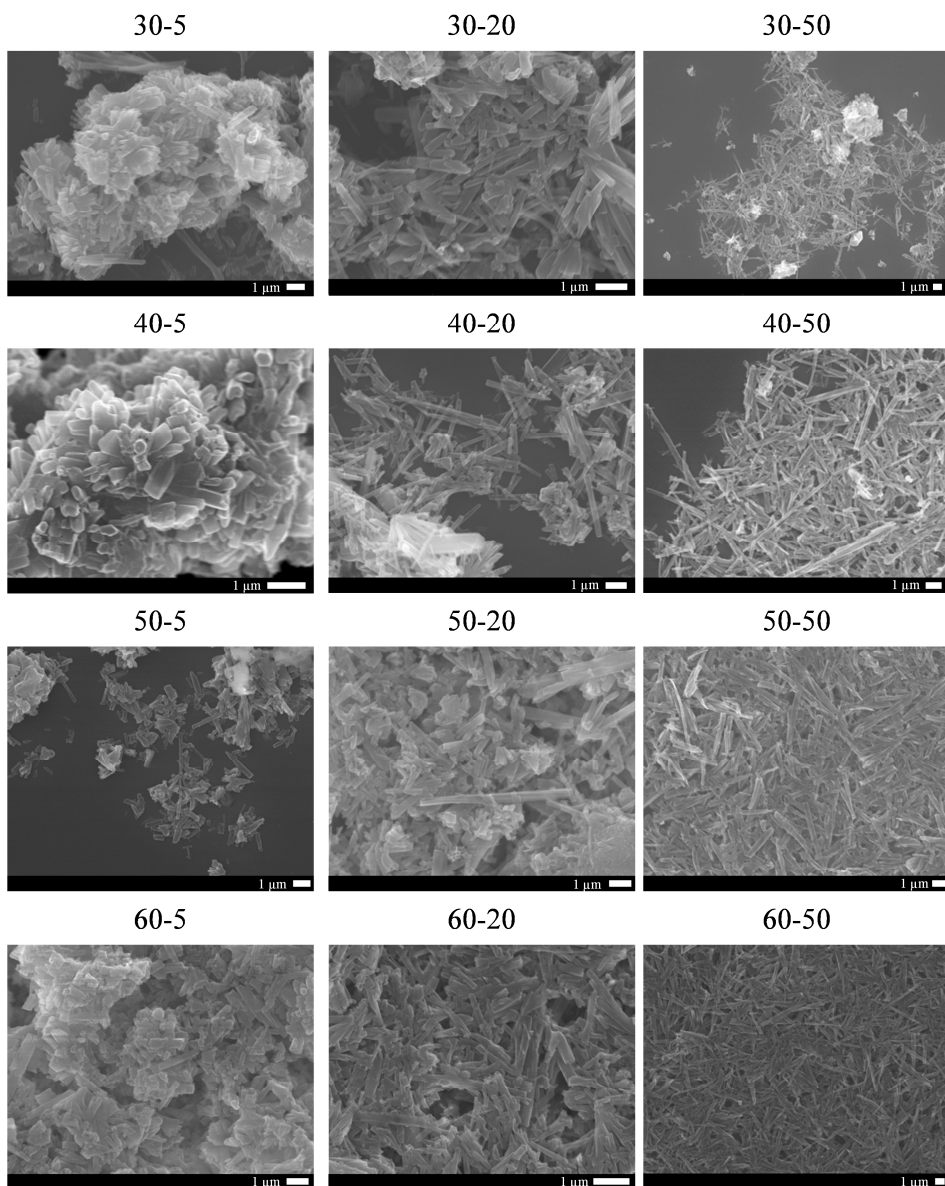


FIGURA 54: IMÁGENES DE LOS MATERIALES CYCU-3 OBTENIDAS MEDIANTE MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM). CONCENTRACIÓN DE REACTIVOS (30-60 mM); RATIO MODULADOR-LIGANDO (DESDE 0-1 A 50-1).

3. Materiales liberadores de CO basados en el CORM ALF794 y materiales CYCU-3 con diferente tamaño y morfología de partícula

3.1. Preparación y caracterización

Teniendo en cuenta lo expuesto en el apartado anterior, se decidió utilizar las matrices porosas de CYCU-3 con diferentes características de partícula para la preparación de nuevos CORMAs mediante la incorporación de moléculas liberadoras de CO a sus cavidades. En concreto, se seleccionó el CORM [Mo(CNCMe₂CO₂H)₃(CO)₃] (ALF794), un tricarbonilo de molibdeno que presenta tres moléculas de ácido 2-isociano-2-metilpropanoico como ligando auxiliar (Figura 55). Este compuesto, proporcionado por ALFAMA Ltd., es capaz de liberar monóxido de carbono de forma específica en el hígado. Además, estudios *in vivo* han puesto de manifiesto que ALF794 es efectivo frente al fallo hepático agudo inducido en ratones mostrando, al mismo tiempo, una baja toxicidad (LD₅₀ por encima de 300 mg/kg).^[137]

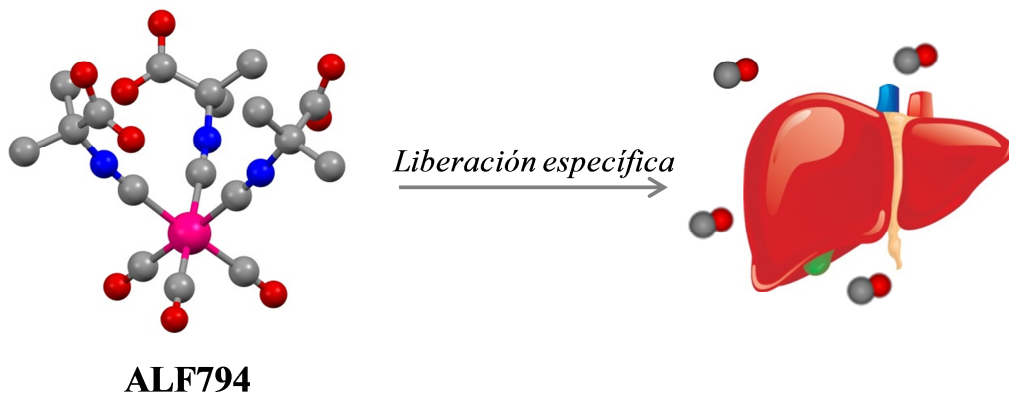


FIGURA 55: ESTRUCTURA DEL CORM ALF794 Y ESQUEMA DE LA LIBERACIÓN ESPECÍFICA DE MONÓXIDO DE CARBONO EN EL HÍGADO.

Por otra parte, como sistema transportador poroso para la preparación de nuevos materiales liberadores de monóxido de carbono se eligió el CYCU-3. En concreto, se seleccionaron tres materiales CYCU-3 entre los preparados en el apartado anterior. Cada uno de estos materiales presenta diferentes características en términos de tamaño/morfología de partícula así como de cristalinidad. En este sentido, se eligieron tres materiales CYCU-3 con diferente tamaño y morfología de partícula para comparar

la influencia de estas características en el comportamiento de esta matriz porosa como CORMAs. Por tanto, los materiales seleccionados, se detallan a continuación:

- **CYCU-3 20_0.** Este material, obtenido en ausencia de modulador a partir de mezclas diluidas de los reactivos (concentración de nitrato de aluminio(III) y de ligando de 20 mM), muestra una baja cristalinidad y partículas de morfología poco definida. Sin embargo, su tamaño de partícula en el rango nanométrico (~ 100 nm) ofrece una mayor versatilidad con vistas a su potencial aplicación biomédica como DDS (ej. posibilidad de administración intravenosa).
- **CYCU-3 50_5.** Este compuesto presenta una alta cristalinidad y está formado por partículas con morfología de tipo barra con un tamaño heterogéneo en el rango de 100-300 nm.
- **CYCU-3 50_50.** Como se mencionó anteriormente, al aumentar la proporción de modulador hasta 50 veces con respecto a la concentración de H₂SDC, todas las mezclas de reactivos ensayadas llevaban a la formación de partículas de varias micras de longitud. Además, el análisis estructural de este compuesto ha demostrado que presenta una estructura distorsionada respecto al material CYCU-3 original en la que es probable la presencia de defectos.

A continuación, se sintetizaron estos materiales a mayor escala de acuerdo con el procedimiento general (reacción solvotermal, 190 °C, 3 días) empleando la concentración de reactivos y modulador correspondiente a cada uno de ellos (véase Anexo I). Una vez obtenidos los correspondientes sólidos, estos se sometieron a un proceso de lavado con el objetivo de eliminar las moléculas de ligando que hubieran quedado sin reaccionar y estuvieran atrapadas en las cavidades de las matrices porosas. De esta forma, se pretende obtener poros accesibles con vistas a la incorporación del compuesto bioactivo ALF794. Por tanto, con este objetivo, las muestras se lavaron tres veces suspendiéndolas en DMF y calentándolas en un reactor asistido por microondas a 50 °C durante 15 minutos. Tras este proceso de lavado, las matrices se activaron a 150 °C bajo vacío durante 24 horas para eliminar el disolvente que ocupaba las cavidades (véase Anexo I). Los análisis termogravimétricos de cada una de las matrices desolvatadas se muestran en la

Figura 56. En ninguno de los casos se aprecia pérdida de masa antes de los 350 °C, lo que significa que las cavidades de los distintos materiales de CYCU-3 no contienen moléculas de ligando libres ni moléculas de disolvente (DMF; T_{eb} : 153 °C). Este resultado confirma el éxito del tratamiento realizado. Por otro lado, las curvas de velocidad de pérdida de masa (dm/dt) reflejan la diferente estabilidad térmica que muestra cada una de las matrices preparadas. Mientras las nanopartículas del compuesto CYCU-3 20_0 comienzan su descomposición en torno a 350 °C, el material 50_5 permanece estable hasta los 408 °C, probablemente, debido a su mayor tamaño de partícula y cristalinidad. Sin embargo, el compuesto CYCU-3 50_50, constituido por partículas de aún mayor tamaño (varias micras), presenta una estabilidad térmica superior con respecto a los materiales anteriores (temperatura de descomposición 473 °C) a pesar de su baja cristalinidad.

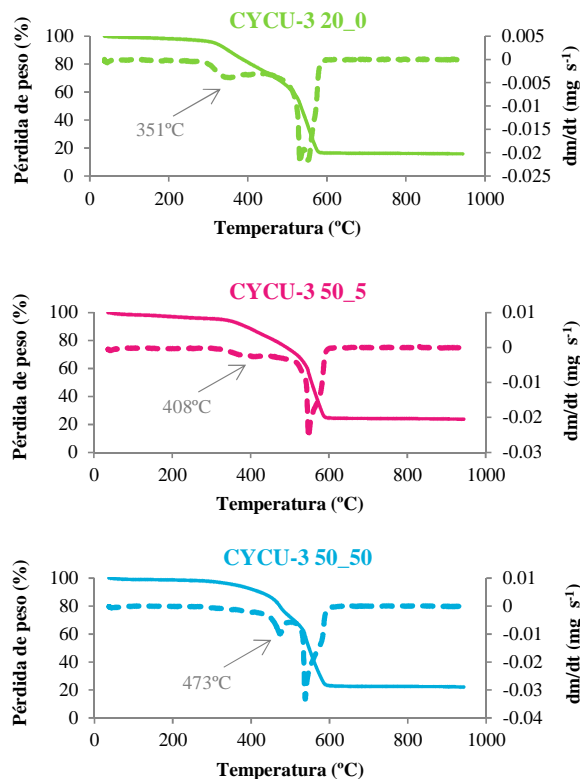


FIGURA 56: ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICOS DE LAS MATRICES POROSAS CYCU-3 ACTIVADAS. (LÍNEA SÓLIDA: TERMOGRAMA, LÍNEA PUNTEADA: VELOCIDAD DE PÉRDIDA DE MASA).

Por otra parte, se evaluó también la porosidad de estos materiales, tras su activación térmica, mediante adsorción de nitrógeno a 77 K (véase Anexo I). Como se observa en la Figura 57 a, todos los materiales son porosos y sus isothermas reflejan la presencia de microporos (elevada capacidad de adsorción a bajas presiones parciales de N_2) y de mesoporos (cambio de tendencia en la curva de adsorción a presiones parciales mayores). Sin embargo, mientras la capacidad de adsorción de los materiales CYCU-3 20_0 y CYCU-3 50_5 es similar entre sí y a la del material CYCU-3 publicado en bibliografía^[186] (CYCU-3 20_0: S_{BET} de $2225 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$; CYCU-3 50_5: $2575 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, CYCU-3 publicado: $2760 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$),¹ el material CYCU-3 50_50 presenta una menor capacidad de adsorción de N_2 a 77 K que se ve reflejada en una S_{BET} de $865 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. En este sentido, como muestra la Figura 57 b, se observa que cuando la isoterma del material CYCU-3 50_50 se multiplica por un factor de 3, ésta se superpone a la curva de adsorción del material CYCU-3 50_5. Este hecho parece indicar que tan solo un tercio de los poros presentes en la matriz CYCU-3 50_50 son accesibles a las moléculas del gas sonda, mientras que los dos tercios restantes están bloqueados.

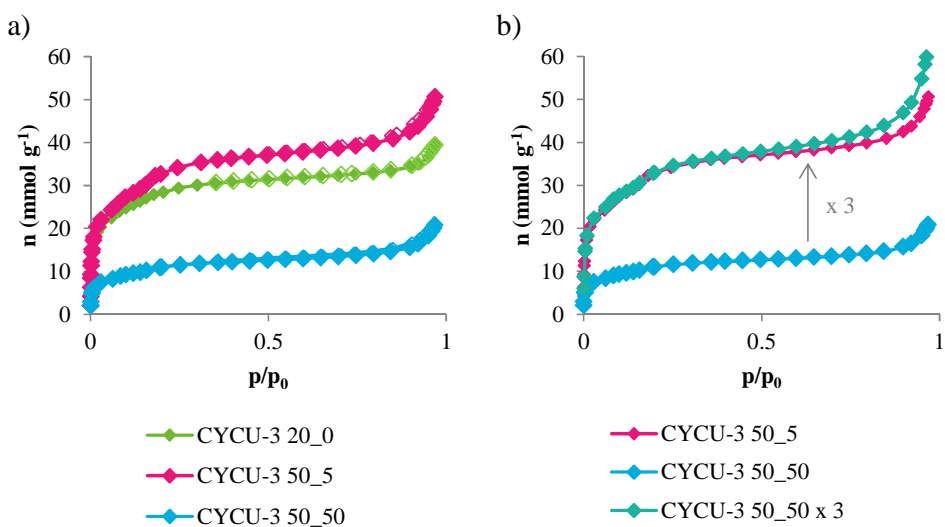


FIGURA 57: a) ISOTERMAS DE ADSORCIÓN DE N_2 A 77 K DE LOS MATERIALES CYCU-3 20_0, CYCU-3 50_5 Y CYCU-3 50_50 (ROMBOS RELLENOS: ADSORCIÓN, ROMBOS HUECOS: DESORCIÓN). b) ISOTERMA DE ADSORCIÓN DEL MATERIAL CYCU-3 50_50 MULTIPLICADA POR UN FACTOR DE 3 (CURVA TURQUESA) EN COMPARACIÓN CON EL MATERIAL CYCU-3 50_5.

¹ S_{BET} : Superficie específica calculada mediante el método desarrollado por Brunauer, Emmett, Teller

Teniendo en cuenta lo anterior, se propone como hipótesis para explicar los resultados observados en el material CYCU-3 50_50 que, al aumentar la concentración de ácido acético en la mezcla de reacción (50 veces respecto a la concentración de H₂SDC) se favorece la formación de cadenas monodimensionales infinitas del tipo $[\text{Al}(\text{OH})(\text{CH}_3\text{COO})_2]_n$, que quedarían encapsuladas en 2/3 de los canales monodimensionales del material CYCU-3 50_50. Esta hipótesis, ha sido también confirmada con los resultados de análisis elemental y termogravimetría (véase Anexo I. Además, dichas cadenas, al extenderse a lo largo del eje *c*, podrían actuar como plantilla para la formación del esqueleto estructural, lo que explicaría el mayor crecimiento longitudinal observado en las partículas de este material respecto al resto. Por otra parte, la presencia de dichas cadenas, al conformar un material más compacto, justificaría la mayor estabilidad térmica observada anteriormente (Figura 56).

Tras la caracterización de las distintas matrices CYCU-3 preparadas, se llevó a cabo la encapsulación del CORM ALF794 en las cavidades de cada una de ellas mediante un proceso de impregnación sólido-líquido. Para ello, se suspendieron los materiales en una disolución del CORM en metanol y, con el objetivo de forzar la incorporación del tricarbonilo metálico en los canales de la matriz porosa, las mezclas se agitaron hasta la evaporación completa del disolvente (aproximadamente, 10 horas). A continuación, cada uno de los materiales se lavó con MeOH y se dejó secar a temperatura ambiente. Todas las manipulaciones anteriores se llevaron a cabo en oscuridad dada la posible fotoactividad del CORM (véase Anexo I).

A continuación, se evaluó la incorporación del compuesto ALF794 en las cavidades de las distintas matrices porosas seleccionadas (CYCU-3 20_0, CYCU-3 50_5 y CYCU-3 50_50). Para ello, en primer lugar, se registraron los espectros de absorción infrarroja de los sistemas híbridos obtenidos. Debido a que, en general, los carbonilos metálicos presentan bandas de absorción infrarroja muy intensas como consecuencia de la vibración de *stretching* de los enlaces CO terminales en el rango de 2200-1850 cm⁻¹, esta técnica permite confirmar, de forma rápida y sencilla, si la encapsulación del CORM ha tenido lugar con éxito evaluando la presencia o ausencia de dichas bandas en el espectro de los sistemas híbridos. En concreto, para el caso del CORM ALF794, estas bandas se encuentran a valores de número de onda ν_{CO} : 2165, 2105, 1924 y 1859

cm^{-1} . Por su parte, como se observa en la Figura 58, los espectros de los materiales híbridos también presentan estos picos de absorción, lo que confirma la presencia del CORM en ellos. Sin embargo, estas señales se encuentran ligeramente desplazadas respecto a las del CORM original (ν_{CO} : 2152, 2102, 1940 y 1978 cm^{-1}). Dicho desplazamiento ya ha sido observado previamente por Mascharak *et al.* cuando incorporaron el tricarbonilo de manganeso $[\text{Mn}(\text{pqa})(\text{CO})_3](\text{ClO}_4)$ en las cavidades de la sílice mesoporosa Al-MCM-41.^[78,179] Sin embargo, cuando Schatzschneider *et al.* llevaron a cabo el anclaje de fragmentos metálicos similares del tipo $\text{Mn}(\text{CO})_3$ a la superficie de nanopartículas de sílice no porosas, no observaron ningún cambio entre el espectro de absorción infrarroja del sistema híbrido y el del CORM original. Por tanto, estas variaciones en las bandas de absorción infrarroja se producen como consecuencia de las interacciones que tienen lugar entre los grupos CO presentes en los carbonilos metálicos con las paredes de las matrices porosas. En este sentido, dado que para que dichas interacciones tengan lugar es necesario que el CORM en cuestión se encuentre confinado en las cavidades de la matriz porosa, el desplazamiento observado permite confirmar, de forma indirecta, el éxito de la encapsulación.

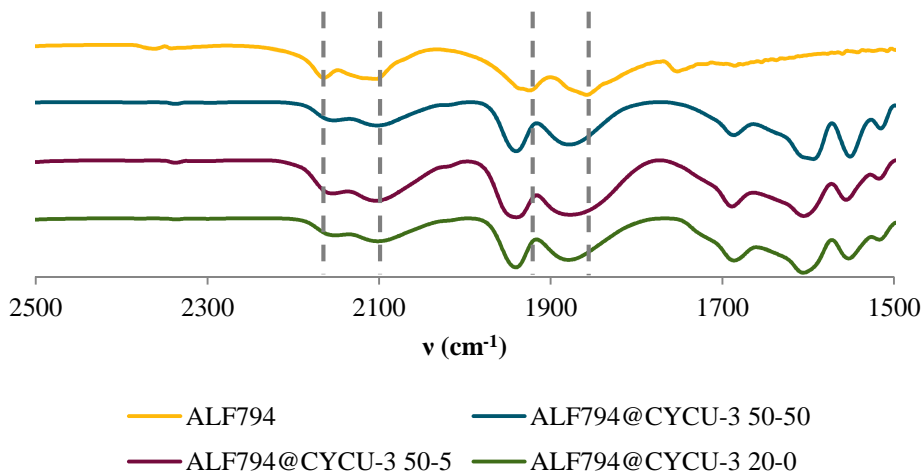


FIGURA 58: ESPECTROS INFRARROJOS DEL CORM ALF794 LIBRE Y LOS SISTEMAS HÍBRIDOS ALF794@CYCU-3 20_0, ALF794@CYCU-3 50_5 Y ALF794@CYCU-3 50_50. LAS LÍNEAS PUNTEADAS SEÑALAN LAS BANDAS CORRESPONDIENTES A LOS ENLACES CO DEL CORM ORIGINAL.

Una vez confirmada la encapsulación en cada uno de los sistemas ensayados, se tomaron imágenes de los distintos materiales híbridos mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y se registró un mapa de distribución elemental de estos mediante EDX (Figura 59). Por un lado, la presencia de molibdeno en todos los materiales corrobora los resultados obtenidos mediante espectroscopía infrarroja, confirmando la presencia del CORM en los sistemas híbridos al mismo tiempo que muestra una distribución homogénea de éste en todas las matrices porosas. Por su parte, la presencia de aluminio en las partículas confirma la composición de la matriz porosa.

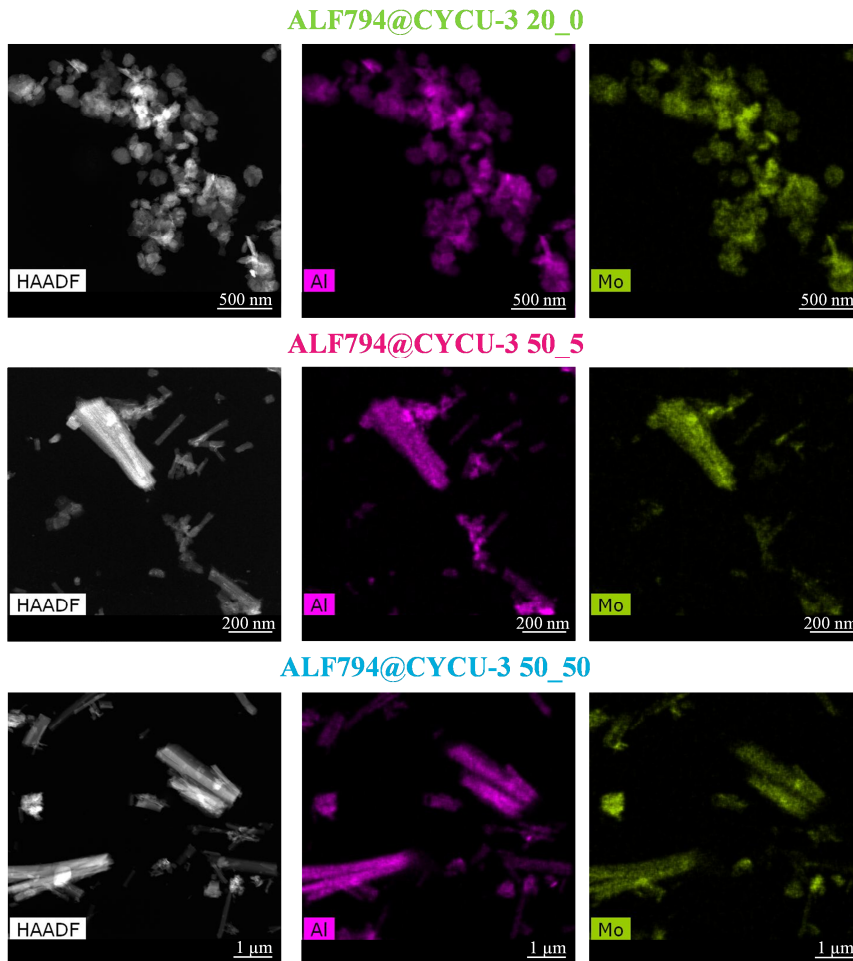


FIGURA 59: IMÁGENES DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM) Y MAPAS DE DISTRIBUCIÓN ELEMENTAL OBTENIDOS MEDIANTE EDX DE LOS MATERIALES HÍBRIDOS ALF794@CYCU-3 20_0, ALF794@CYCU-3 50_5 Y ALF794@CYCU-3 50_50 (MORADO: ALUMINIO, VERDE: MOLIBDENO).

En relación a la morfología y tamaño de partícula de los materiales híbridos, las imágenes no muestran cambios significativos en comparación con las matrices originales vacías. De esta forma, el sistema híbrido ALF794@CYCU-3 20_0 está formado por nanopartículas (93 ± 24 nm) de morfología poco definida mientras que los materiales ALF794@CYCU-3 50_5 y ALF794@CYCU-3 presentan partículas con forma de barra con longitudes comprendidas entre 100-300 nm y 1-2.5 μ m, respectivamente.

Por otro lado, se evaluó la cristalinidad de los nuevos sistemas híbridos mediante difracción de rayos-X en polvo y se comparó con la de los materiales iniciales, con el objetivo de evaluar la estabilidad de las matrices porosas durante el proceso de encapsulación. Como se observa en la Figura 60, los materiales ALF794@CYCU-3 50_5 y ALF794@CYCU-3 50_50 no muestran cambios significativos en el patrón de difracción respecto al de las matrices originales, lo que confirma la estabilidad de estos sistemas porosos durante el proceso de encapsulación. Para corroborar este resultado, se trataron las matrices en las condiciones de encapsulación pero en ausencia del CORM para verificar su estabilidad en MeOH. Para ello, se suspendieron 100 mg de CYCU-3 50_5 y CYCU-3 50_50 en 20 mL de MeOH hasta la evaporación completa del disolvente (aproximadamente, 10 horas). A continuación, se pudo comprobar que los patrones de difracción de CYCU-3 50_5 y CYCU-3 50_50 permanecían invariables después de este tratamiento (véase Anexo I).

Por el contrario, ALF794@CYCU-3 20_0 parece no ser tan estable en las condiciones de encapsulación. De hecho, su difractograma muestra dos nuevas reflexiones que no estaban presentes en el DRXP de la matriz original CYCU-3 20_0 y que, además, se corresponden con el patrón de difracción del ligando orgánico H₂SDC libre. Por tanto, este resultado demuestra que las nanopartículas de CYCU-3 20_0 se degradan parcialmente durante el proceso de impregnación en metanol, lixiviando moléculas del ligando orgánico al medio. Del mismo modo que en el caso anterior, los estudios de estabilidad en ausencia de CORM llevados a cabo con el material CYCU-3 20_0 corroboran los resultados obtenidos en presencia del tricarbonilo de molibdeno (véase Anexo I).

La inestabilidad de dicho material en MeOH se debe, probablemente, a su baja cristalinidad, así como a su pequeño tamaño de partícula (~ 100 nm), que hace estas tengan una elevada superficie externa en contacto con el disolvente lo que favorece el proceso de degradación. Como consecuencia de este resultado, los estudios posteriores se llevaron a cabo únicamente con los sistemas ALF794@CYCU-3 50_ 5 y ALF794@CYCU-3 50_50.

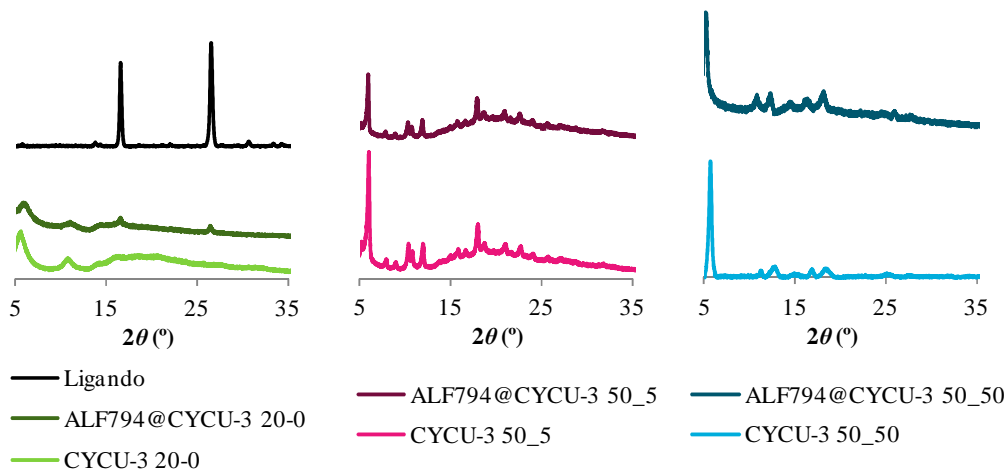


FIGURA 60: DIFRACTOGRAMAS DE DIFRACCIÓN DE RAYOS-X EN POLVO DE LAS MATRICES POROSAS ANTES Y DESPUÉS DEL PROCESO DE ENCAPSULACIÓN.

Por otra parte, el contenido en ALF794 incorporado en cada una de las matrices (mmol de CORM por gramo de material ensayado) se determinó mediante técnicas de caracterización de sólidos, tales como análisis elemental y termogravimetría (véase Anexo I). El material CYCU-3 50_50 permite el mayor grado de incorporación en comparación con el resto de matrices ensayadas (0.71 mmol de CORM por gramo de material). Por su parte, las partículas del material cristalino CYCU-3 50_5 pueden encapsular 0.44 mmol g⁻¹. El hecho de que el material CYCU-3 50_50 muestre la mayor capacidad de adsorción de CORM, a pesar de que posee la menor superficie de BET debido a la ocupación de 2/3 de sus canales con el polímero monodimensional [Al(OH)(CH₃COO)₂]_n, puede justificarse atendiendo a una mayor presencia de defectos en dicho material que favorecerían la difusión del CORM en los canales monodimensionales. Este resultado estaría de acuerdo con el estudio estructural que

proponía que los espaciadores a lo largo de la dirección [-1 1 0] podrían, o bien estar coordinados sólo por un lado o bien ausentes (véase el apartado 2.2). Además, la interacción CORM-CORM en el interior de las cavidades del MOF (formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos carboxílicos presentes en ALF794), parece jugar un papel importante en el proceso de encapsulación. En este sentido, se ha determinado que el porcentaje de volumen de poro ocupado para el material ALF794@CYCU-3 50_50 es del 52.4 %, ² casi cinco veces superior al del material ALF794@CYCU-3 50_5 (11.5 %). De esta forma, la mayor ocupación observada en la matriz CYCU-3 50_50 favorecería la interacción entre las moléculas de ALF794 incorporadas y, por tanto, su retención en la matriz porosa. Este hecho también justificaría el mayor grado de encapsulación de la prodroga en ALF794@CYCU-3 50_50 respecto a ALF794@CYCU-3 50_5.

Por otra parte, es importante destacar que, en todas las encapsulaciones anteriores, se observó la formación de óxidos de molibdeno, probablemente, como consecuencia de la degradación parcial del CORM en las condiciones de encapsulación (0.35 mol de MoO₂ por mol de MOF y 0.25 mol MoO₂ por mol de MOF para CYCU-3 50_5 y CYCU-3 50_50, respectivamente) (véase Anexo I).

3.2. Estudio de la liberación de CO

Una vez cuantificada la cantidad de compuesto bioactivo incorporada en cada una de las matrices seleccionadas, se evaluó la capacidad de liberación de monóxido de carbono de los distintos materiales híbridos preparados, así como la del compuesto ALF794, mediante el ensayo de la mioglobina, ^[133,187] que permite determinar de forma indirecta la cantidad de CO liberada desde cualquier material/o compuesto. Este método se basa en el empleo de la mioglobina, una hemoproteína que presenta un grupo prostético con un centro metálico de hierro. Cuando este ión se reduce a Fe²⁺, se forma lo que se conoce como mioglobina reducida (Mb(Fe(II))), que presenta un máximo característico de absorción en el ultravioleta-visible a 435 nm en disolución acuosa. Por su parte, en estado reducido, el centro metálico de hierro muestra una alta afinidad por el monóxido de carbono de forma que, en presencia de éste, se coordina a él para

² Volumen de poro calculado a partir de las isoterma de adsorción de N₂ a 77 K.

formar la carbomonoximioglobina (Mb-CO), que presenta un máximo de absorción a 423 nm (Figura 61). Por tanto, mediante la incubación del material/compuesto liberador de CO en cuestión, en condiciones reductoras, en una disolución de mioglobina reducida Mb(Fe(II)) es posible determinar la cantidad de carbomonoximioglobina (Mb-CO) formada, o lo que es lo mismo, la cantidad de monóxido de carbono liberada, registrando el espectro de absorción ultra-violeta visible de la disolución (para más detalles véase Anexo I)

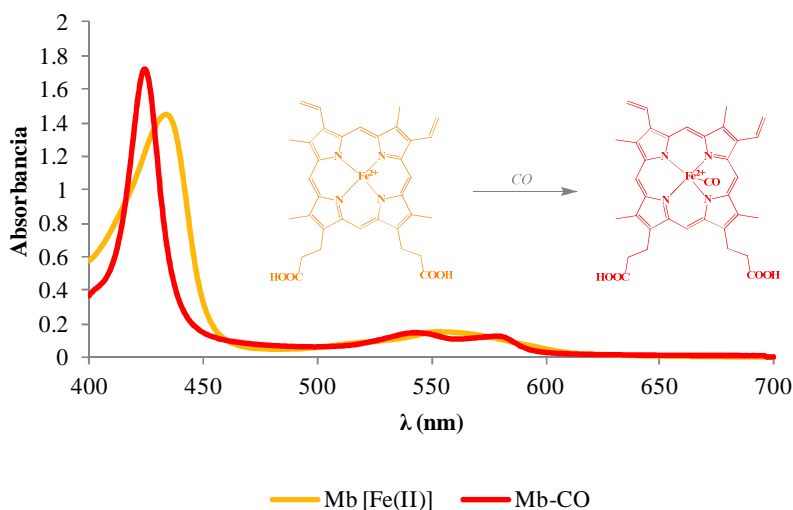


FIGURA 61: ESPECTROS DE ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA-VISIBLE DE LA MIOGLOBINA REDUCIDA (Mb [Fe(II)]) EN NARANJA Y CARBOMONOXIMIOGLOBINA (Mb-CO) EN ROJO.

En este capítulo, los estudios de liberación de monóxido de carbono se realizaron bajo la irradiación con luz visible de las muestras (flujo luminoso: 600 lm, temperatura de color 4000 K) dado que la fotoactivación de algunos CORMs basados en molibdeno acelera significativamente la velocidad de disociación del enlace Mo-CO.^[136] En este sentido, también se evaluó la capacidad del compuesto ALF794 para liberar CO en oscuridad, con el objetivo de confirmar su fotoactividad.

Como se puede observar en la Figura 62b, el compuesto ALF794 libera 0.7 equivalentes de CO cuando se disuelve en PBS (10 mM, pH 7.4) y se mantiene bajo irradiación con luz visible durante 24 horas a 37 °C, lo que refleja la labilidad de uno de sus grupos carbonilos. Sin embargo, tras su incubación en oscuridad durante el mismo periodo de tiempo, tan solo es capaz de liberar 0.12 mmol de CO por mmol de

complejo. Estos resultados confirman que el CORM ALF794 es un compuesto fotoactivo. En relación al mecanismo de liberación de CO, probablemente, como se ha descrito para otros CORMs,^[134,136] la liberación de CO de la esfera de coordinación del metal está acompañada por una reacción de intercambio de ligandos con el medio, como se esquematiza en la Figura 62 a.

Por otra parte, los resultados obtenidos para los sistemas híbridos muestran cómo, en general, los materiales preparados disminuyen la velocidad de liberación de monóxido de carbono con respecto al CORM libre, mostrando perfiles de liberación con pendientes mucho más suaves. Entre los materiales híbridos, ALF794@CYCU-3 50_5 es el que muestra una mayor velocidad de liberación de CO. Por otra parte, respecto a la cantidad de CO liberada al medio, después de 24 horas de irradiación, el sistema ALF794@CYCU-3 50_5 libera el doble de CO (0.46 mmol de CO por mmol de CORM encapsulado) que ALF794@CYCU-3 50_50 (0.24 mmol de CO por mmol de CORM encapsulado). Este resultado puede explicarse teniendo en cuenta la distinta capacidad de retención del CORM en las cavidades de las matrices ALF794@CYCU-3 50_5 y ALF794@CYCU-3 50_50 (véase la sección 3.3). En ALF794@CYCU-3 50_5, la capacidad de retención del CORM es muy baja (tasa de lixiviación de fragmentos metálicos de 94 % tras 6 horas de incubación en PBS bajo irradiación con luz visible). Sin embargo, ALF794@CYCU-3 50_50 muestra una capacidad de retención de los fragmentos metálicos muy superior, pues sólo se observa la lixiviación del 25 % del CORM tras 6 horas de incubación en PBS bajo irradiación con luz visible, sin que se observe una mayor lixiviación en las 66 horas siguientes (véase la sección 3.3). Por tanto, en ALF794@CYCU-3 50_5, la liberación de CO se debe a la fotoactivación de las moléculas de ALF794 lixiviadas al medio fisiológico, tal y como ocurre en el CORM libre. Sin embargo, en el caso de ALF794@CYCU-3 50_50, la liberación de CO observada se debe, principalmente, a la fotoactivación de las moléculas de ALF794 adsorbidas en la matriz.

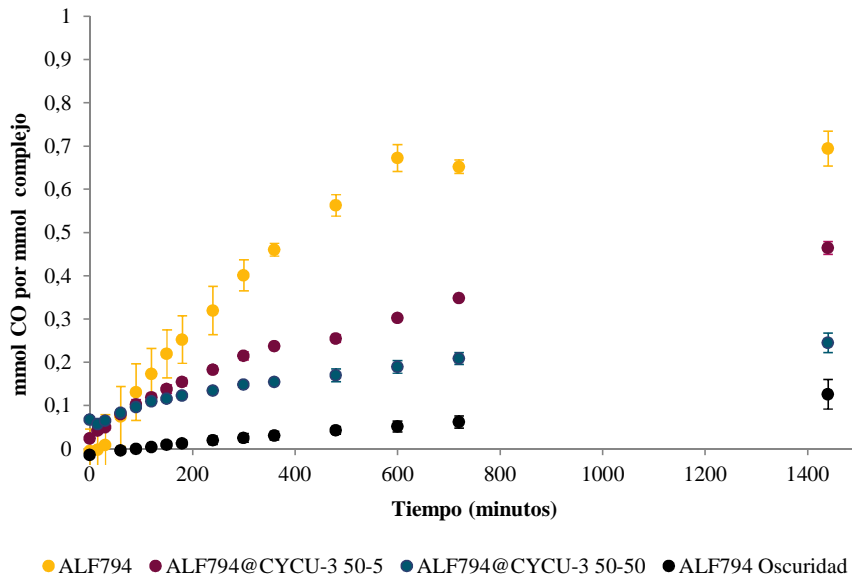


FIGURA 62: a) ESQUEMA DE LIBERACIÓN DE CO DEL COMPUESTO ALF794; b) PERFILES DE LIBERACIÓN DE MONÓXIDO DE CARBONO BAJO ACTIVACIÓN CON LUZ VISIBLE PARA LOS SISTEMAS HÍBRIDOS ALF794@CYCU-3 50_5 Y ALF794@CYCU-3 50_50 ASÍ COMO PARA EL CORM ALF794, ESTE ÚLTIMO TAMBIÉN EN OSCURIDAD. CONDICIONES EXPERIMENTALES: ATMÓSFERA DE ARGÓN, 37 °C, CONCENTRACIÓN ALF794 10 μ M.

3.3. Estudio de la lixiviación de fragmentos metálicos

Finalmente, se evaluó la estabilidad de los sistemas preparados en medio acuoso así como su capacidad para retener en el interior de sus cavidades los fragmentos metálicos (CORMs e iCORMs, coligandos resultantes del proceso de decarbonilación). Para ello, los materiales híbridos se suspendieron en agua y se incubaron a 37 °C durante 6, 24 y 72 horas bajo irradiación con luz visible. A continuación, las muestras incubadas se centrifugaron y se cuantificó la concentración de metales (Al y Mo) en el sobrenadante mediante ICP-OES (véase Anexo I).

En este sentido, los resultados referentes a la estabilidad de las matrices porosas en agua siguen una tendencia similar a la observada en los estudios anteriores. El compuesto CYCU-3 50_50 es el material más robusto, degradándose tan solo un 9 % de la matriz tras 72 horas de incubación. En este caso, la presencia de las cadenas $[\text{Al}(\text{OH})(\text{CH}_3\text{COO})_2]_n$ en las cavidades da lugar a una red porosa más compacta que

dificulta la interacción de los clústeres metálicos con el disolvente, confiriéndole una mayor estabilidad. Por su parte, un 19 % del material CYCU-3 50_5 se descompone tras su incubación en agua durante 3 días, lo que demuestra su menor estabilidad respecto al material CYCU-3 50_50.

Asimismo, también se estudió la capacidad de los materiales CYCU-3 para retener los fragmentos metálicos, tanto CORM como iCORMs (fragmentos de decarbonilación generados tras la fotoactivación con luz visible) cuando son incubados en agua a 37 °C. Las matrices CYCU-3 50_50 y ALF794@CYCU-3 50_5 retienen el 70 % y el 25 % de fragmentos metálicos de Mo después de 72 horas, respectivamente. Este resultado, además de estar relacionado con la estabilidad de dichas matrices en agua discutida anteriormente, se ve claramente afectado por fenómenos de difusión de las moléculas del CORM e iCORMs. En este sentido, las interacciones por enlaces de hidrógeno entre los grupos carboxílicos de los fragmentos metálicos encapsulados se ven favorecidas en el sistema ALF794@CYCU-3 50_50 debido al mayor porcentaje de volumen de poro ocupado que presenta (52.4 %) con respecto a ALF794@CYCU-3 50_5 (11.5 %) (véase sección 3.1). Como consecuencia, la retención de los fragmentos metálicos se ve favorecida en la matriz CYCU-3 50_50 que presenta una menor tasa de lixiviación frente al sistema ALF794@CYCU-3 50-5.

Por último, se evaluó la capacidad de retención de los fragmentos metálicos (CORMs e iCORMs) para los distintos sistemas híbridos en medio fisiológico simulado (PBS, 10 mM, pH. 7.4). Para ello, los materiales híbridos se suspendieron en PBS y se incubaron a 37 °C durante 6, 24 y 72 horas bajo irradiación con luz visible. A continuación, las muestras incubadas se centrifugaron y se cuantificó la concentración de molibdeno en el sobrenadante mediante ICP-OES (véase Anexo I). En este sentido, es importante destacar que la concentración de aluminio no pudo ser evaluada mediante esta técnica ya que, en el caso de que se lixiviaran iones Al(III) a la disolución, estos reaccionarían con los fosfatos presentes en el medio, dando lugar a la precipitación de fosfato de aluminio que serían retirados de la disolución durante la centrifugación.

En este caso, todos los materiales presentan una tendencia similar a la observada en los ensayos de incubación en agua. En este sentido, la matriz CYCU-3 50_50 es capaz

de retener el 75 % de los fragmentos de molibdeno después de seis horas de incubación sin que se observe una mayor lixiviación en las 66 horas siguientes. Sin embargo, para el caso del sistema CYCU-3 50_5, la tasa de lixiviación de metales, tras 6 horas de incubación en PBS, es del 94 %, es decir, muy superior a la observada en agua (53 %). Además, tras 72 horas de incubación, casi la totalidad de las fracciones metálicas se han liberado al medio fisiológico (99 %). Este resultado sugiere que la matriz CYCU-3 50_5 es bastante inestable en PBS, por lo que se descompone casi por completo y libera los fragmentos metálicos potencialmente tóxicos al medio. Dicha inestabilidad puede deberse a la rápida degradación de los *clusters* metálicos con la consecuente formación de fosfatos de aluminio(III) insolubles. Sin embargo, la mayor estabilidad química de la matriz CYCU-3 50_50 en este medio, puede atribuirse a la presencia de las cadenas monodimensionales $[\text{Al}(\text{OH})(\text{CH}_3\text{COO})_2]_n$ ocupando 2/3 de las cavidades, lo que da lugar a un material más compacto y en el que los *clusters* metálicos se encuentran menos expuestos al medio y, por tanto, más protegidos frente a la degradación. Además, como ya ocurría en los ensayos de lixiviación en agua, la mayor tasa de ocupación de volumen de poro en el sistema ALF794@CYCU-3 50_50 favorece las interacciones entre los fragmentos metálicos encapsulados y, por tanto, su retención en el interior de la matriz porosa.

4. Conclusiones

En este capítulo, se ha demostrado cómo la variación de la concentración de los reactivos (nitrato de aluminio(III) y ácido 1,2-difeniletlenil-4,4'-dicarboxílico (H_2SDC)), así como la proporción de modulador-ligando (ácido acético- H_2SDC) empleada durante la síntesis del CYCU-3 $[\text{Al}(\text{OH})(\text{SDC})]_n$ permite la obtención de materiales con tamaño y morfología de partícula muy diferentes e incluso con una estructura distorsionada respecto al CYCU-3 original. Estas características, a su vez, determinan las propiedades del material poroso resultante en términos de porosidad, estabilidad, capacidad de incorporación del CORM ALF794, cinética de liberación de CO y capacidad de retención de fragmentos metálicos tóxicos en sus cavidades.

Por tanto, el empleo de concentraciones diluidas de los reactivos (20 mM) en ausencia de modulador (CYCU-3 20_0) conduce a la formación de nanopartículas de

baja cristalinidad (~100 nm). Sin embargo, el uso de mezclas de reactivos más concentradas (30-60 mM) conduce a materiales más cristalinos formados por partículas alargadas en el rango de las micras. Por otra parte, se ha demostrado que el aumento en la proporción modulador-ligando utilizada en la síntesis (proporciones 0-1 hasta 50-1) conlleva un incremento en la longitud de las partículas para todas las concentraciones de reactivos ensayadas (30-60 mM). Además, el material CYCU-3 50_50 (concentración de reactivos = 50 mM; proporción modulador-ligando 50-1) presenta una estructura distorsionada con defectos (simetría monoclinica) con respecto a la estructura del CYCU-3 original (simetría ortorrómbica).

A continuación, entre todos los materiales aislados, se seleccionaron tres como candidatos para el estudio de su comportamiento como CORMAs: CYCU 20_0 (nanopartículas pseudoesféricas de ~ 100 nm), CYCU 50_5 (nanopartículas alargadas de 100-300 nm) y CYCU 50_50 (estructura distorsionada y partículas alargadas de varias micras). Todos estos materiales demostraron tener una buena estabilidad térmica (temperatura de descomposición superior a 350 °C) y porosidad permanente. Sin embargo, debe destacarse que CYCU 50_50 presenta una menor superficie de BET ($865 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) que la esperada ($2757 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), lo que se atribuye a la ocupación de 2/3 de sus cavidades por cadenas monodimensionales del tipo $[\text{Al}(\text{OH})(\text{CH}_3\text{COO})_2]_n$, cuya formación se ve favorecida por el incremento de la proporción de modulador en el medio de reacción. Por otra parte, respecto a la estabilidad química de estos materiales en las condiciones de encapsulación del ALF794 (MeOH), debe destacarse que mientras CYCU 50_5 y CYCU 50_50 son perfectamente estables en metanol, las partículas CYCU-3 20_0 se degradan produciéndose la coprecipitación del espaciador orgánico. Por este motivo, a partir de este momento, el resto de los estudios se hicieron sólo con las matrices obtenidas usando modulador.

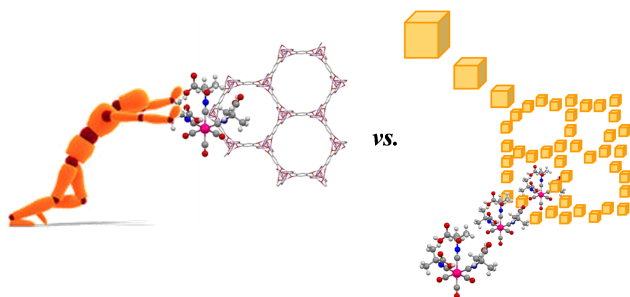
El estudio del comportamiento de CYCU-3 50_5 y CYCU-3 50_50 como sistemas transportadores del compuesto bioactivo ALF794, ha puesto de manifiesto que CYCU-3 50_50, tiene una mayor capacidad de encapsulación (0.71 mmol de CORM por gramo de material) que la matriz CYCU-3 50_5 (0.44 mmol de CORM por gramo de material), a pesar de que, en la primera matriz, 2/3 de los canales monodimensionales se encuentran ocupados. Este resultado puede explicarse teniendo en cuenta la mayor

presencia de defectos cristalinos en la red CYCU-3 50_50, lo que facilitaría la difusión de la prodroga al interior de los canales 1D. Además, el mayor volumen de poro ocupado que presenta el sistema ALF794@CYCU-3 50_50 (52.4 %) en comparación a ALF794@CYCU-3 50_5 (11.5 %) favorecería las interacciones por enlaces de hidrógeno entre las moléculas de ALF794 incorporadas, y por tanto, su retención.

Finalmente, los estudios de liberación de CO demuestran que los híbridos ALF794@CYCU-3 50_5 y ALF794@CYCU-3 50_50 liberan esta molécula bioactiva de forma más controlada que el CORM libre cuando se incuban con luz visible en PBS a 37 °C durante 24 horas. Además, después de 24 horas, ALF794@CYCU-3 50_5 libera el doble de CO (0.46 mmol de CO por mmol de ALF794) que ALF794@CYCU-3 50_50 (0.24 mmol de CO por mmol de ALF794). Este resultado puede explicarse teniendo en cuenta la baja capacidad de ALF794@CYCU-3 50_5 para retener los fragmentos metálicos (94 % de tasa de liberación de Mo en PBS después de 6 horas), lo que significa que el CO que libera se debe, principalmente, a la fotoactivación de las moléculas de ALF794 desorbidas, tal y como ocurre en el propio CORM libre. Sin embargo, el híbrido ALF794@CYCU-3 50_50 es capaz de retener hasta el 75 % de los fragmentos metálicos, incluso después de 72 horas de incubación, por lo que este material se comporta como un verdadero CORMA, ralentizando la liberación de CO en comparación con el CORM libre, gracias a la fotoactivación de las moléculas de CORM encapsuladas en las cavidades de dicha matriz porosa.

CAPÍTULO III

Preparación de CORMAs mediante la encapsulación de CORMs en
MOFs de estructura jerarquizada



En este capítulo se detalla la preparación de un nuevo material liberador de monóxido de carbono (CORMA) mediante la combinación del CORM fotoactivo [Mo(CNCMe₂CO₂H)₃(CO)₃] (ALF794) con el polímero de coordinación poroso de estructura jerarquizada [Zn₂(dhtp)(H₂O)₂]·8H₂O (H₄dhtp: ácido 2,5-dihidroxitereftálico), conocido como Zn-MOF-74 o ZnCPO.

A diferencia del capítulo anterior, donde la obtención del sistema híbrido requería tres etapas (síntesis del MOF, activación del material e incorporación del CORM a la matriz porosa mediante un proceso de impregnación sólido-líquido), en este caso, la formación del material CORM@MOF se consigue a través de un único paso, ya que la encapsulación del carbonilo metálico tiene lugar durante la síntesis del material poroso.

1. Redes metalorgánicas mesoporosas de estructura jerarquizada

Como se mencionó en el Capítulo I de esta Tesis Doctoral, los polímeros de coordinación porosos (PCPs o MOFs) son un tipo de compuestos híbridos metal-orgánicos cristalinos, que presentan un tamaño de poro homogéneo. Su preparación se basa en la combinación de iones metálicos con espaciadores orgánicos que se autoensamblan para generar una red porosa accesible a moléculas huésped. Como en todos los materiales porosos (sílices mesoporosas, zeolitas, carbones, etc.), el tamaño de poro es una de sus características más importantes, ya que determina el tipo de moléculas que pueden difundir hacia el interior de la red porosa y, en definitiva, su funcionalidad. En este sentido, la mayoría de los MOFs preparados hasta la fecha presentan estructuras microporosas (diámetro de poro inferior a 2 nm), lo que impide su uso en aplicaciones en las que las moléculas huésped tienen un mayor tamaño (ej. biomoléculas).^[188] Para poder, por tanto, ampliar el campo de aplicación de estos materiales porosos es necesario el desarrollo de MOFs que contengan mesoporos en sus estructuras (2-50 nm).

A pesar de que algunos polímeros de coordinación porosos presentan mesoporosidad intrínseca, como es el caso del MOF CYCU-3 [Al(OH)(SDC)] (H₂SDC: ácido 1,2-difeniletlenil-4,4'-dicarboxílico)^[186] empleado en el Capítulo II, en general se necesita un control más específico del tamaño de poro. En este sentido, se han

desarrollado hasta la fecha diferentes estrategias para conseguirlo, entre las que destacamos:

Preparación de MOFs mesoporosos mediante el empleo de ligandos extendidos.

Esta estrategia se basa en el diseño de series isoreticulares de MOFs, conocidos como IRMOFs (del inglés *isorecticular series of metal-organic frameworks*). En el año 2002, Yaghi *et al.*^[17] demostraron por primera vez que, a través de una modificación en la longitud o en los sustituyentes de los espaciadores orgánicos empleados, se pueden obtener distintas redes metalorgánicas que presenten la misma topología pero diferente tamaño de poro o funcionalidad, siempre y cuando dichas variaciones no influyan sobre las características de la unidad de construcción secundaria (SBU, del inglés *secondary building unit*). En concreto, un incremento en la longitud del ligando orgánico empleado en la preparación de un MOF dado, permitiría introducir mesoporosidad en su estructura. Por ejemplo, en la serie isoreticular IRMOF-74-I-XI, desarrollada por el grupo de investigación del Prof. Omar Yaghi en el año 2012,^[188] se llevó a cabo una extensión de la estructura del MOF-74 $M_2(\text{dhtp})$ (donde M es Zn^{2+} o Mg^{2+} y H_4dhtp : ácido 2,5-dihidroxitereftálico), incrementando la longitud del espaciador orgánico original (H_4dhtp) mediante la incorporación de grupos bencénicos intermedios (Figura 63A). Como resultado, se obtuvieron estructuras isoreticulares al MOF-74 con cavidades cuyos tamaños estaban comprendidos entre 1.4 y 9.8 nm (Figura 63B). Cabe destacar que todas las estructuras sintetizadas mostraron porosidad permanente tras su desolvatación.

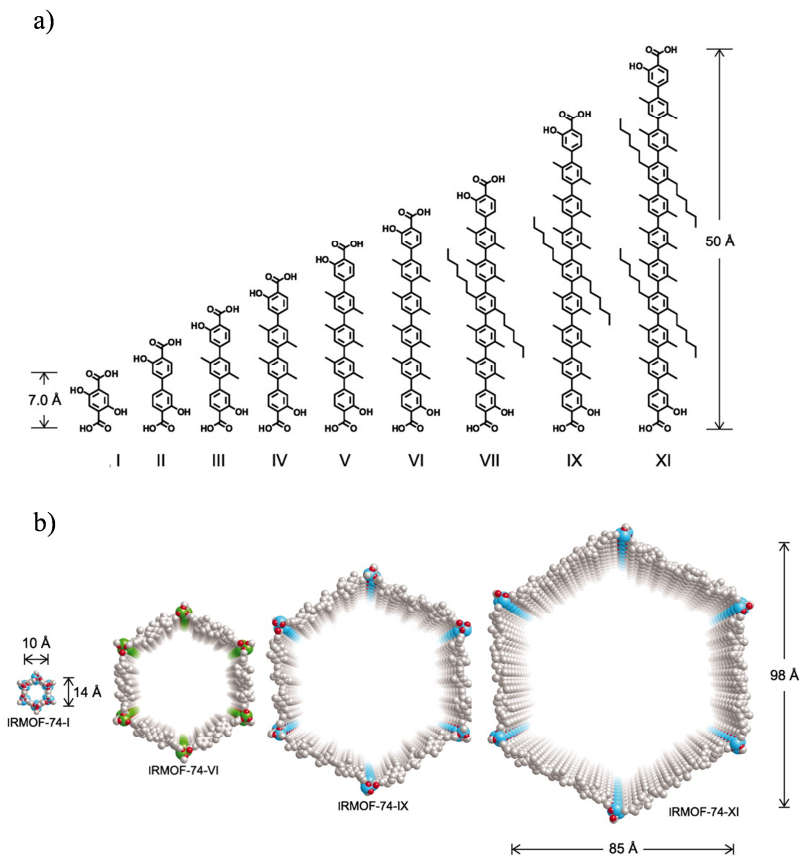


FIGURA 63: A) ESPACIADORES ORGÁNICOS EMPLEADOS EN LA SERIE ISORETICULAR IRMOF-74 B) CANALES MONODIMENSIONALES DE ALGUNAS ESTRUCTURAS DE LA SERIE ISORETICULAR IRMOF-74.^[189]

En general, esta es la estrategia más empleada para la obtención de estructuras con mayor diámetro de poro. Sin embargo, a pesar del éxito obtenido en el ejemplo anterior, en ocasiones un aumento en la longitud de los ligandos orgánicos no se traduce en la aparición de mesoporosidad, sino en la formación de redes interpenetradas en las que una o más redes se encuentran ocupando el espacio generado por la red original, lo que disminuye el tamaño efectivo de las cavidades. Además, muchas de las redes metalorgánicas obtenidas mediante el empleo de ligandos extendidos, presentan estructuras frágiles que colapsan tras la eliminación de las moléculas de disolvente.

Preparación de estructuras jerarquizadas mesoporosas mediante el empleo de plantillas. Otra de las estrategias desarrolladas para introducir mesoporosidad en polímeros de coordinación porosos (MOFs) es el empleo de compuestos que actúen

como “plantillas”. Sobre estas plantillas se forman posteriormente redes metalorgánicas microporosas, dando lugar a estructuras que presentan al mismo tiempo micro y mesoporosidad. Como ya mencionamos en el Capítulo I, a principios de los años noventa, investigadores de la *Mobil Oil Company* desarrollaron las primeras sílices mesoporosas, ante la necesidad de obtener sólidos que tuvieran un tamaño de poro mayor al de las zeolitas microporosas ya existentes. La preparación de estas sílices mesoporosas se basa en la formación de agregados supramoleculares, a partir de tensioactivos o polímeros orgánicos, sobre los que se produce posteriormente la condensación de los precursores inorgánicos (SiO_2), dando lugar a estructuras de tamaño de poro ordenado.^[60] La extensión de esta estrategia a la preparación de MOFs permite la obtención de materiales micro-mesoporosos a través de tres etapas bien diferenciadas. En una primera etapa, los tensioactivos y/o polímeros orgánicos empleados se autoensamblan formando una estructura supramolecular ordenada. A continuación, los iones metálicos y espaciadores orgánicos, necesarios para la formación del MOF, se co-ensamblan con la estructura supramolecular previamente formada, dando lugar a una red metalorgánica microporosa extendida que presenta mesoporos. Finalmente, se eliminan los tensioactivos y/o polímeros orgánicos que ocupan los mesoporos, haciéndolos accesibles a potenciales moléculas huésped de gran tamaño.

A pesar de que esta metodología ha demostrado su utilidad en la preparación de MOFs con estructuras mesoporosas jerarquizadas,^[190] presenta como principal desventaja la etapa de eliminación del tensioactivo. En la preparación de sílices mesoporosas, este último paso se suele llevar a cabo mediante un proceso de calcinación, alcanzando temperaturas en torno a 500 °C. Desafortunadamente, la estabilidad térmica de la mayoría de los PCPs se sitúa por debajo de esta temperatura, por lo que la eliminación de las moléculas plantilla tiene que realizarse mediante múltiples extracciones sólido-líquido, haciendo difícil que el proceso pueda ser escalable. Además, al igual que ocurría con la estrategia anterior, la eliminación de las moléculas alojadas en las cavidades mesoporosas puede conducir al colapso de la estructura.

Preparación de estructuras jerarquizadas mesoporosas en ausencia de plantillas. Teniendo en cuenta las desventajas asociadas al uso de plantillas que hemos comentado previamente, Dai *et al.* sintetizaron en el año 2013 una estructura microporosa jerarquizada del compuesto Zn-MOF-74 sin necesidad de emplear tensioactivos o polímeros orgánicos.^[191] Para ello emplearon una nueva metodología que denominaron síntesis basada en “nanofusión mediante perturbación” (del inglés *perturbation-assisted nanofusion synthesis*).^[192] Esta estrategia se basa en la formación de agregados de nanopartículas de MOFs que originan intersticios de tamaño variable (mesoporos). En esta estrategia, las condiciones sintéticas empleadas (temperatura, velocidad de agitación, concentración de reactivos, disolvente, etc.) son factores clave, ya que favorecen la formación de agregados de partículas cristalinas pequeñas (condensación) frente al crecimiento de dichas nanopartículas (cristalización). El resultado es la formación de nanopartículas microporosas cristalinas que quedan embebidas en una fase amorfa del MOF. De hecho, se ha observado que cuando el material se mantiene en suspensión durante períodos de tiempo largos (hasta de diez días), se produce la disolución parcial de las nanopartículas cristalinas y, como consecuencia, aumenta el tamaño de los mesoporos (Figura 64). Por el contrario, si el material se somete a condiciones solvotermales, se favorece termodinámicamente la formación de cristales microporosos de mayor tamaño o, lo que es lo mismo, el crecimiento de la fase cristalina, produciéndose el colapso de los mesoporos.

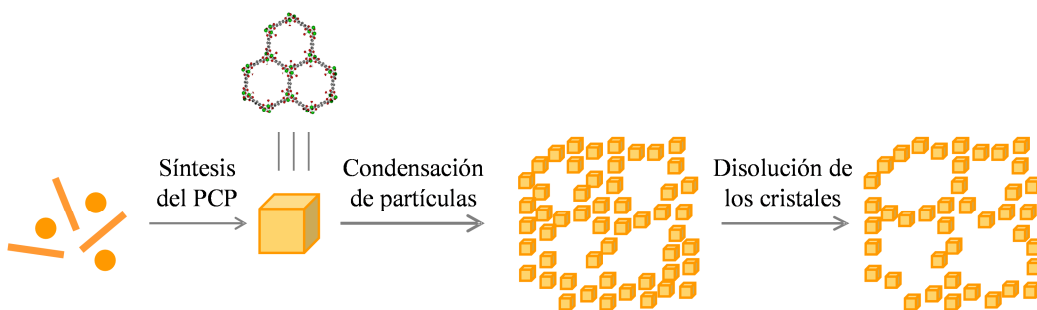


FIGURA 64: ESQUEMA DE INDUCCIÓN DE MESOPOROSIDAD EN MOFs USANDO LA ESTRATEGIA DE NANOFUSIÓN MEDIANTE PERTURBACIÓN.^[191]

2. Material liberador de CO basado en el CORM fotoactivo ALF794 y el MOF de estructura jerarquizada ZnCPO

A la luz de los resultados obtenidos en el capítulo anterior, decidimos preparar, mediante una estrategia sintética diferente, un nuevo CORMA basado en el carbonilo metálico $[\text{Mo}(\text{CNCMe}_2\text{CO}_2\text{H})_3(\text{CO})_3]$ (ALF794) y el polímero de coordinación poroso $[\text{Zn}_2(\text{dhtp})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (H_4dhtp : ácido 2,5-dihidroxitereftálico), conocido como Zn-MOF-74 o ZnCPO.

Como comentamos previamente, el complejo de molibdeno ALF794 es un CORM fotoactivo muy prometedor desde el punto de vista terapéutico; de hecho, estudios recientes *in vivo* demuestran su efectividad frente a fallo hepático agudo inducido en ratones.^[137] Por otra parte, el polímero de coordinación poroso ZnCPO es un candidato idóneo para aplicaciones biomédicas al tratarse de un material biocompatible (los cationes Zn^{2+} se caracterizan por una baja toxicidad: $\text{LD}_{50} = 0.5 \text{ g kg}^{-1}$).^[14] En relación a su estructura, la matriz está formada por clústeres de zinc que interactúan con los espaciadores orgánicos dhtp dando lugar a canales monodimensionales hexagonales que se extienden a lo largo del eje *c* (Figura 63B).

Sin embargo, a diferencia de la red metalorgánica CYCU-3, empleada en el capítulo anterior, el polímero de coordinación ZnCPO solo presenta cavidades microporosas; lo que, en principio, dificultaría la difusión e incorporación de las moléculas ALF794 dentro de la matriz porosa. Por este motivo, se decidió aplicar la metodología denominada “nanofusión mediante perturbación” (ver sección 1), para obtener un material jerarquizado de ZnCPO con micro y mesoporos en los que incorporar satisfactoriamente el CORM ALF794.

2.1. Preparación y caracterización

Siguiendo esta novedosa estrategia sintética se obtuvo un material con características similares al previamente publicado por Dai *et al.*^[191] (véase Anexo I). Además, y con el objetivo de evaluar el potencial de esta matriz como vehículo para el desarrollo de nuevos CORMAs, se estudió su estabilidad química en diferentes tampones fisiológicos (PBS: del inglés *phosphate buffer saline* y HEPES: del inglés 2-

[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid). Para ello, se prepararon varias suspensiones del material en PBS (pH = 7.4, 10 mM) o HEPES (pH = 7.4, 10 mM) que se incubaron, en oscuridad y a 37 °C, durante diferentes tiempos. A cada uno de estos tiempos, el sólido se recuperó por centrifugación y se analizó mediante difracción de rayos-X en polvo y espectroscopía infrarroja (véase Anexo I). Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que el polímero de coordinación poroso de estructura jerarquizada ZnCPO presentaba una baja estabilidad química en el medio fisiológico PBS. Como se observa en la Figura 65a, tras 30 minutos de incubación en PBS, la cristalinidad del material disminuía significativamente, siendo su degradación casi total en el transcurso de 1 hora. Estos resultados son acordes a lo observado en los espectros infrarrojos (Figura 65b), donde tras 30 minutos de incubación se aprecia una importante disminución en las bandas de absorción relativas al material poroso, llegando a ser inapreciables al cabo de 1 hora. Además, se observa la aparición de nuevas bandas intensas en la región de 1000 a 1300 cm^{-1} , características de los grupos fosfato,^[193] que podrían estar relacionadas con la formación de fosfatos de zinc y con la consiguiente degradación del MOF.

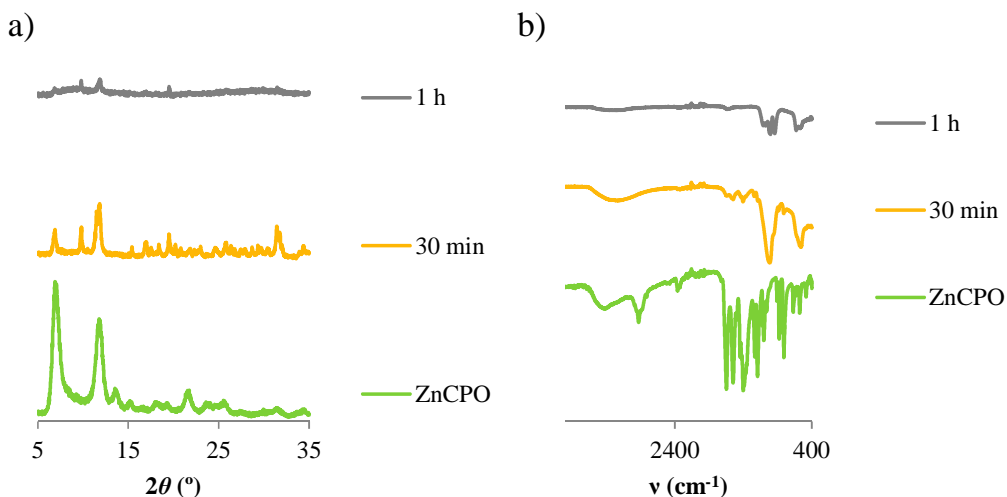


FIGURA 65: a) DIFRACTOGRAMAS DE RAYOS-X EN POLVO DEL MOF ZnCPO ORIGINAL (VERDE), TRAS 30 MINUTOS DE INCUBACIÓN (NARANJA) Y TRAS 1 HORA DE INCUBACIÓN (GRIS). b) ESPECTROS DE ABSORCIÓN INFRARROJA DEL MOF ZnCPO ORIGINAL (VERDE), TRAS 30 MINUTOS DE INCUBACIÓN (NARANJA) Y TRAS 1 HORA DE INCUBACIÓN (GRIS). CONDICIONES EXPERIMENTALES: 10 mM PBS, 37 °C, OSCURIDAD.

Por el contrario, este polímero de coordinación poroso sí demostró una alta estabilidad química en el tampón fisiológico HEPES. En este caso, tal y como se observa en la Figura 66a, el material mantenía una elevada cristalinidad incluso tras 6 horas de incubación en este medio. Además, en los espectros infrarrojos mostrados en Figura 66b, se aprecia como, para todos los materiales recuperados, se mantienen las bandas características de la red metalorgánica ZnCPO, lo que corrobora la estabilidad de este material en HEPES.

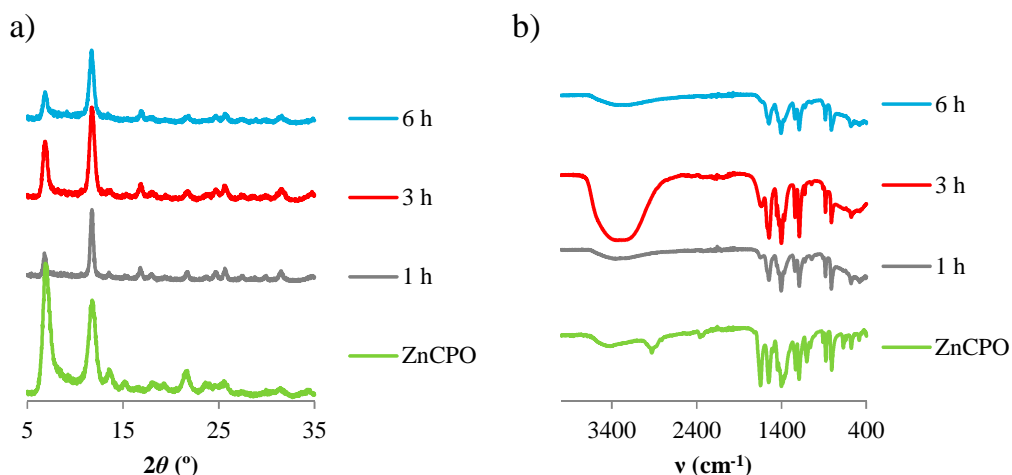


FIGURA 66: a) DIFRACTOGRAMAS DE RAYOS-X EN POLVO DEL MOF ZnCPO ORIGINAL (VERDE), TRAS 1 HORA DE INCUBACIÓN (GRIS), TRAS 3 HORAS DE INCUBACIÓN (NARANJA), TRAS 6 HORAS DE INCUBACIÓN (ROJO). b) ESPECTROS DE ABSORCIÓN INFRARROJA DEL MOF ZnCPO ORIGINAL (VERDE), TRAS 1 HORA DE INCUBACIÓN (GRIS), TRAS 3 HORAS DE INCUBACIÓN (NARANJA), TRAS 6 HORAS DE INCUBACIÓN (ROJO).

CONDICIONES EXPERIMENTALES: 10 mM HEPES, 37 °C, OSCURIDAD.

Una vez confirmada la estabilidad de la matriz micro-mesoporosa jerarquizada ZnCPO en el tampón fisiológico HEPES, se llevó a cabo la incorporación del complejo de molibdeno ALF794 a la misma. En este caso, y con el objetivo de minimizar el tiempo de preparación y número de etapas, decidimos incubar directamente el ALF794 durante la síntesis de la matriz. Cabe destacar que esta estrategia de síntesis-encapsulación en una sola etapa, aunque implica ciertas ventajas, tan solo puede ser empleada cuando las condiciones de reacción son suaves ya que los CORMs generalmente presentan una estabilidad térmica moderada.

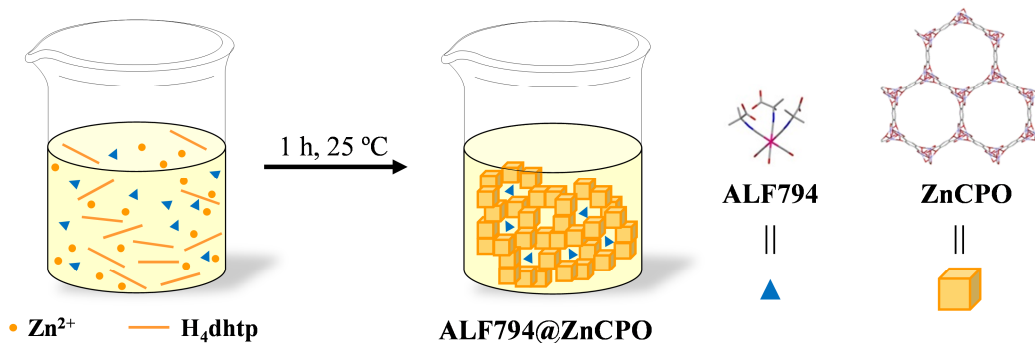


FIGURA 67: ESQUEMA DE LA INCORPORACIÓN DEL CORM ALF794 DURANTE LA SÍNTESIS DE LA MATRIZ MICRO-MESOPOROSA JERARQUIZADA ZnCPO.

Siguiendo el esquema representado en la Figura 67, y con el objetivo de evaluar la capacidad de la matriz porosa jerarquizada ZnCPO para incorporar el CORM ALF794 mediante esta estrategia en una sola etapa, se prepararon diferentes sistemas híbridos del tipo ALF794@ZnCPO_x, variando la cantidad de CORM adicionada al medio de reacción ($x = \text{ratio molar ALF794/Zn}(\text{AcO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $x = 0.2, 0.4, 0.6, 0.8$ y 1). Para ello, diferentes mezclas de $\text{Zn}(\text{AcO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, dhtp y ALF794, en las proporciones adecuadas, se disolvieron en *N,N'*-dimetilformamida (DMF) y se mantuvieron en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras sucesivos lavados con DMF y metanol, se recuperó el sólido por centrifugación. Es importante destacar que todo el proceso se llevó a cabo en oscuridad para evitar la fotoactivación accidental del tricarbonilo de molibdeno (véase Anexo I).

Una vez preparados los sistemas híbridos ALF794@ZnCPO_x (con $x: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8$ y 1), se evaluó su cristalinidad mediante difracción de rayos-X en polvo (XRPD). Como se aprecia en la Figura 68, la matriz jerarquizada ZnCPO presenta reflexiones con picos ensanchados, que confirman el tamaño nanométrico de las partículas cristalinas del MOF.^[191] Por otra parte, los sistemas híbridos presentan patrones de difracción similares a los de la matriz vacía, con una clara amorfización del material al aumentar la cantidad de CORM empleada durante la síntesis. Estos resultados parecen indicar que la presencia del tricarbonilo de molibdeno en el medio de reacción dificulta el proceso de cristalización. Finalmente, se confirmó que ninguno de los difractogramas, para los materiales híbridos, presentaba reflexiones coincidentes con el

patrón de difracción del CORM original, lo que descarta la presencia de ALF794 libre fuera de las cavidades del material.

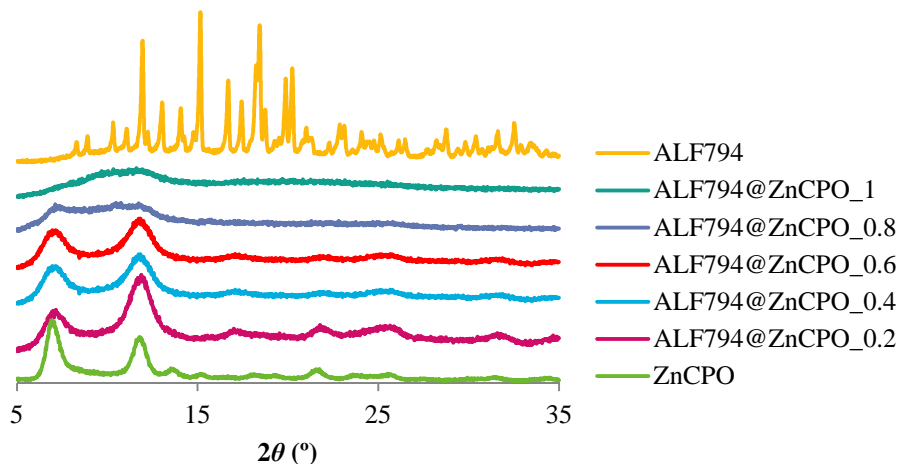


FIGURA 68: DIFRACTOGRAMAS DE RAYOS-X EN POLVO DE LA MATRIZ ORIGINAL ZNCPO, ASÍ COMO DE LOS SISTEMAS HÍBRIDOS ALF794@ZNCPO_x (CON x = 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1).

A continuación, se confirmó la presencia del CORM ALF794 en los materiales híbridos mediante espectroscopía infrarroja. Como ya se mencionó en el capítulo anterior, los carbonilos metálicos presentan bandas muy intensas en los espectros de absorción infrarroja debidas a la vibración de los enlaces CO terminales en el rango ν : 2200-1850 cm^{-1} . En el caso del CORM ALF794, estas bandas se encuentran a valores de número de onda ν_{CO} : 2165, 2105, 1924 y 1859 cm^{-1} . Tal y como se observa en la Figura 69 los espectros infrarrojos de los distintos sistemas híbridos preparados también presentan estas bandas de absorción, confirmando la presencia del CORM en todos ellos. Sin embargo, cabe destacar que estas bandas se encuentran ligeramente desplazadas respecto a las del CORM original (ej. para ALF794@ZnCPO_0.2 ν_{CO} : 2155, 2117, 1936 y 1868 cm^{-1}) debido, probablemente, al confinamiento del CORM dentro de la matriz porosa.^[78,179]

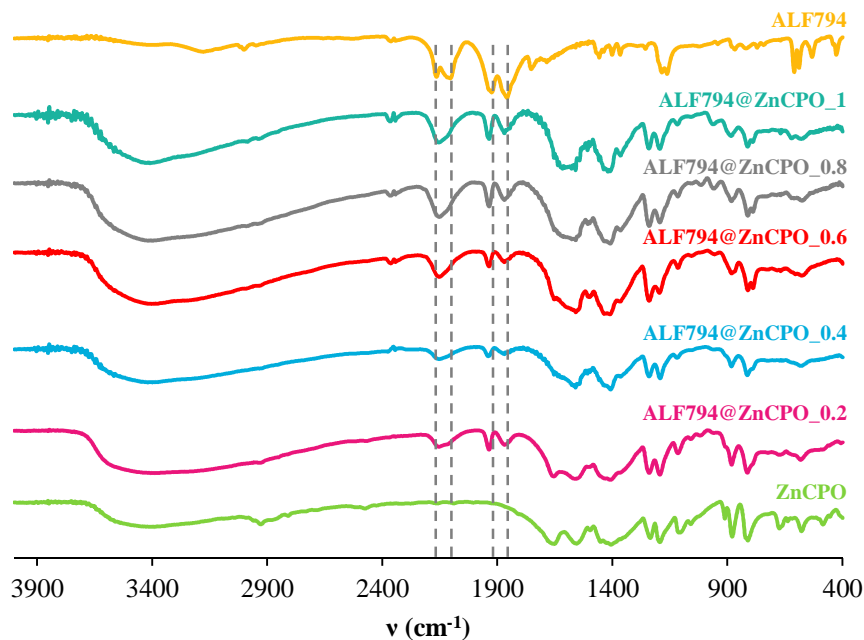


FIGURA 69: ESPECTROS DE ABSORCIÓN INFRARROJA DEL CORM ALF794 Y LOS SISTEMAS HÍBRIDOS ALF794@ZnCPO_x (CON X: RATIO MOLAR ALF794/Zn(AcO)₂·2H₂O EMPLEADO EN LA SÍNTESIS).

Una vez confirmada la presencia del complejo de molibdeno en la matriz porosa, se llevó a cabo la cuantificación del ALF794 incorporado mediante análisis elemental, termogravimetría y espectroscopía de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) (véase Anexo I). Los resultados recogidos en la Tabla 6 muestran como, a pesar de añadir cantidades crecientes de ALF794 durante la preparación del material, no se produce un aumento significativo en la cantidad de CORM incorporada a la matriz porosa. Este incremento, además de resultar en encapsulaciones menos eficientes (CORM empleado *vs.* CORM encapsulado), favorece la formación indeseada de óxidos de molibdeno, probablemente como consecuencia de la degradación parcial del CORM. De hecho, la formación de estos óxidos se ha observado para aquellos materiales ALF794@ZnCPO_x con mayor proporción de CORM ($x = 0.8$ y 1), (véase Anexo I). En este sentido, es importante destacar que a diferencia de los sistemas híbridos preparados en el Capítulo II, donde para todos los materiales del tipo ALF794@CYCU-3 obtenidos se observaba la formación de óxidos de molibdeno como subproductos, en este capítulo, se han conseguido preparar materiales híbridos

ALF794@MOF más puros o, lo que es lo mismo, sistemas que no presentan subproductos de degradación.

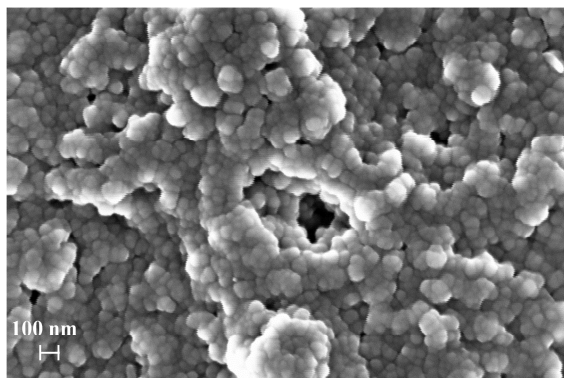
MUESTRA	CANTIDAD INCORPORADA (mmol g ⁻¹)
ALF794@ZnCPO_0.2	0.28
ALF794@ZnCPO_0.4	0.30
ALF794@ZnCPO_0.6	0.34
ALF794@ZnCPO_0.8	0.26
ALF794@ZnCPO_1	0.40

TABLA 6: CANTIDAD DE ALF794 INCORPORADA EN LOS SISTEMAS HÍBRIDOS ALF794@ZnCPO_x.

A la vista de estos resultados y teniendo en cuenta que este incremento en la cantidad de ALF794 empleada durante la preparación del material híbrido no solo conduce a materiales con menor cristalinidad (Figura 68) sino que origina procesos de encapsulación menos eficientes (Tabla 6) y favorece además la formación de óxidos de molibdeno como subproductos (véase Anexo I) se seleccionó el material híbrido ALF794@ZnCPO_0.2 como sistema más prometedor. A continuación, se procedió a caracterizarlo en detalle y a evaluar sus propiedades como material liberador de CO.

En primer lugar, el material híbrido seleccionado ALF794@ZnCPO_0.2 fue caracterizado mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). En concreto, las imágenes de SEM, donde se observan aglomerados de partículas con pequeños intersticios (mesoporos) ordenados de manera aleatoria, confirmaron la naturaleza mesoporosa del material híbrido (Figura 70a). Por otra parte, la distribución elemental de las partículas de ALF794@ZnCPO_0.2, obtenida mediante espectroscopía dispersiva de rayos-X, ratificó la presencia de zinc (procedente de la matriz porosa) y, en menor medida, de molibdeno (procedente del CORM encapsulado) (Figura 70b). Además, la distribución puntual del elemento molibdeno en la muestra parece indicar que, como cabría esperar, el compuesto ALF794 está alojado en las cavidades mesoporosas del material.

a)



b)

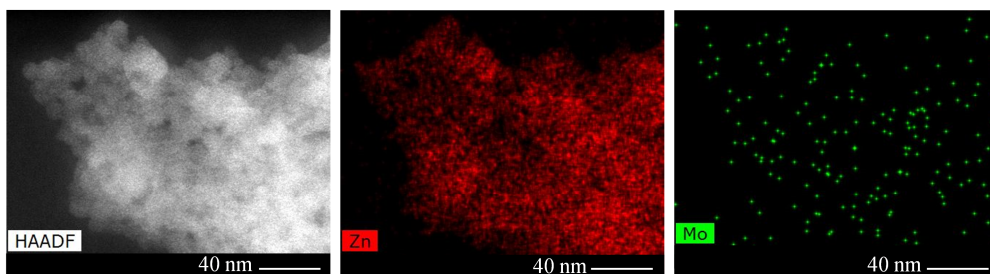


FIGURA 70: a) IMAGEN DEL MATERIAL ALF794@ZnCPO_0.2 OBTENIDA MEDIANTE MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM), b) DISTRIBUCIÓN ELEMENTAL DEL MATERIAL ALF794@ZnCPO_0.2 OBTENIDA MEDIANTE ESPECTROSCOPÍA DISPERSIVA DE RAYOS-X EDX (Zn: ROJO, Mo: VERDE).

2.2. Estudio de la liberación de CO para el material híbrido ALF794@ZnCPO_0.2

Una vez caracterizado el material híbrido ALF794@ZnCPO_0.2, se evaluaron sus propiedades como material liberador de monóxido de carbono (CORMA) mediante el ensayo de la mioglobina. Como se expuso el capítulo anterior, este método permite la cuantificación indirecta de la liberación de CO desde cualquier compuesto o material mediante su incubación en una disolución de mioglobina en condiciones reductoras. De esta forma, la deoximioglobina (Mb[Fe(II)]) presente en el medio reacciona con el monóxido de carbono liberado dando lugar a la formación de carbmonoximioglobina (Mb-CO). En este sentido, dado que ambos compuestos (Mb[Fe(II)] y Mb-CO) presentan espectros de absorción ultra-violeta visible diferentes, es posible determinar la cantidad Mb-CO formada, o lo que es lo mismo, la cantidad de CO liberada mediante

la evaluación de los cambios producidos en la región de la banda Soret del espectro (entre 423 y 435 nm).

Dada la baja estabilidad de la matriz porosa ZnCPO en PBS (véase sección 2.1), los ensayos de liberación de monóxido de carbono, realizados en este capítulo, se llevaron a cabo empleando una disolución de mioglobina reducida en tampón HEPES desoxigenado (10 mM, pH = 7.4). En concreto, se evaluaron los perfiles cinéticos de liberación de monóxido de carbono, tanto para el compuesto libre ALF794 como para el material híbrido ALF794@ZnCPO_0.2, bajo fotoactivación con luz visible (lámpara fluorescente: flujo luminoso 600 lm, temperatura de color 4000 K) (véase Anexo I). Como ya mencionamos en el capítulo anterior, el compuesto ALF794 es capaz de liberar hasta 0.7 mmol de CO por mmol de ALF794 tras ser irradiado 24 horas con luz visible. Sin embargo, cuando el sistema híbrido ALF794@ZnCPO_0.2 fue sometido a las mismas condiciones experimentales (fotoactivación con luz visible, 10 μ M ALF794; monitorización durante 24 horas), no se observó liberación aparente de CO; de hecho, incluso tras aumentar la concentración del ALF794 encapsulado hasta 50 μ M, el material híbrido tan solo era capaz de liberar 0.05 mmol de CO por mmol de complejo.

A la vista de estos resultados, y con el objetivo de aumentar la eficacia de este CORMA como material liberador de monóxido de carbono, se decidió estudiar la cinética de liberación de CO bajo una radiación más energética (luz ultravioleta, $\lambda = 365$ nm). En este sentido, el empleo de un estímulo más eficaz podría ser beneficioso para ciertas aplicaciones en las que se requiera una liberación de CO rápida en el tiempo pero al mismo tiempo controlada en el espacio.

Tanto el compuesto ALF794 como el material híbrido ALF794@ZnCPO_0.2 (concentración final de ALF794: 10 μ M) se incubaron a 37 °C en una disolución de mioglobina reducida en medio fisiológico (tampón HEPES, pH = 7.4). A continuación, se determinaron los perfiles cinéticos de liberación de monóxido de carbono bajo luz ultravioleta (lámpara ultravioleta, $\lambda = 365$ nm, distancia lámpara-muestra: 5 cm) para ambos sistemas (véase Anexo I). En este caso, la fotoactivación del compuesto ALF794 con luz ultravioleta produce la liberación de 0.95 equivalentes de monóxido de carbono tras 150 minutos de incubación (Figura 71), lo que confirma de nuevo la mayor

labilidad de uno de los tres carbonilos presentes en el complejo de molibdeno. Además, estos resultados también ponen de manifiesto que el uso de una radiación electromagnética más energética (luz ultravioleta vs. visible) aumenta significativamente la velocidad de liberación de la molécula activa (alcanzando su máximo de liberación tras 2.5 horas vs. 10 horas) así como la cantidad total de CO liberado al medio (0.95 equivalentes vs. 0.70 equivalentes).

En lo que se refiere al material híbrido, la incorporación del CORM a las cavidades de la matriz micro-mesoporosa jerarquizada ZnCPO conlleva una disminución en la velocidad de liberación de CO, como refleja la pendiente de la curva de liberación respecto a la del CORM original (Figura 71), lo que permitiría en una futura aplicación una liberación más controlada del CO una vez se fotoactive el CORM. Sin embargo, también es cierto que el confinamiento del CORM dentro de las cavidades del material poroso limita la capacidad del pro-fármaco para liberar CO, alcanzando el máximo de liberación (0.33 equivalentes de CO) tras 180 minutos de irradiación.

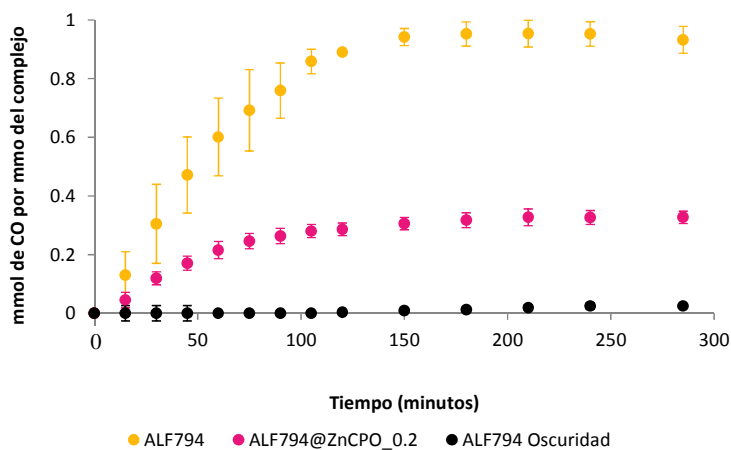


FIGURA 71: CINÉTICAS DE LIBERACIÓN DE MONÓXIDO DE CARBONO OBTENIDOS AL IRRADIAR CON LUZ ULTRAVIOLETA ($\lambda = 365 \text{ nm}$) LOS COMPUESTOS ALF794 (NARANJA) Y ALF794@ZnCPO_0.2 (ROSA).

LOS CÍRCULOS NEGROS CORRESPONDEN A LA LIBERACIÓN DE CO EN OSCURIDAD PARA EL ALF794. CONDICIONES EXPERIMENTALES: ATMÓSFERA DE ARGÓN, HEPES 10 mM, 37 °C, 10 μM ALF794, 10 μM MIOGLOBINA.

2.3. Estudios de la lixiviación de fragmentos metálicos para el material híbrido ALF794@ZnCPO_0.2

Finalmente, con el objetivo de evaluar la capacidad de la matriz micro-mesoporosa para retener los fragmentos metálicos de molibdeno dentro de sus cavidades, se prepararon varias suspensiones del material ALF794@ZnCPO_0.2 en medio fisiológico (HEPES, 10 mM, pH = 7.4) y se incubaron a 37 °C durante 1, 3 ó 6 horas, tanto en oscuridad como bajo irradiación con luz ultravioleta ($\lambda = 365$ nm). A cada tiempo, el sólido se separó mediante centrifugación y el sobrenadante se recogió para determinar tanto su contenido en zinc como molibdeno mediante espectroscopía de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) (véase Anexo I). La cuantificación de zinc nos permitió evaluar la degradación de la matriz porosa, mientras que la cuantificación de molibdeno nos permitió determinar la cantidad de CORMs o iCORMs lixiviados. Los resultados pusieron de manifiesto que la matriz porosa presenta una alta estabilidad química ya que, tras 6 horas de incubación (tanto bajo irradiación con luz ultravioleta como en oscuridad), tan solo un 9% de su contenido en zinc fue lixiviado (Tabla 7). Estos resultados coinciden con los observados para los ensayos de difracción de rayos-X en polvo, donde la fase cristalina del material poroso se mantenía inalterada tras 6 horas de incubación en HEPES (ver sección 2.1). En relación a los fragmentos de molibdeno presentes en la disolución, tampoco se aprecian diferencias significativas entre los resultados obtenidos para el material híbrido incubado en oscuridad y bajo irradiación UV. En este caso, la matriz es capaz de retener en la fase sólida cerca del 83 % de los fragmentos metálicos (CORMs y/o iCORMs).

LIXIVIACIÓN DE METALES (%)				
TIEMPO	IRRADIACIÓN		OSCURIDAD	
	Zn	Mo	Zn	Mo
1 h	7.9	11.2	8.3	12.5
3 h	8.9	14.2	8.1	14.9
6 h	8.9	16.9	9.0	17.5

TABLA 7: PORCENTAJE DE ZINC Y MOLIBDENO LIXIVIADO AL MEDIO DESDE EL MATERIAL ALF794@ZnCPO TRAS SU INCUBACIÓN BAJO IRRADIACIÓN CON LUZ ULTRAVIOLETA ($\lambda = 365$ nm) Y EN OSCURIDAD. CONDICIONES EXPERIMENTALES: TAMPÓN HEPES (pH: 7.4, 10 mM), 37 °C.

3. Conclusiones

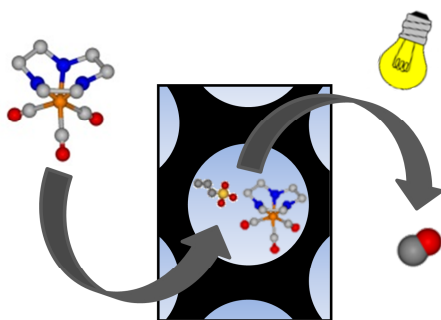
En este capítulo se han presentado los resultados relativos a la preparación y caracterización de un nuevo material liberador de monóxido de carbono basado en la molécula liberadora de monóxido de carbono fotoactiva ALF794 y el polímero de coordinación poroso de estructura jerarquizada ZnCPO. El empleo de la metodología denominada “nanofusión mediante perturbación”, para la preparación del MOF ZnCPO, permitió generar cavidades mesoporosas donde alojar las moléculas del tricarbonilo de molibdeno ALF794, que de otra forma no hubieran podido ser encapsuladas en la matriz microporosa convencional, debido a las limitaciones de difusión impuestas por el tamaño de poro micrométrico (alrededor de 1.2 nm). Además, la incorporación del CORM ALF794 se llevó a cabo durante la síntesis del propio material poroso, siendo el primer ejemplo, de CORMA basado en materiales inorgánicos porosos que se prepara en una única etapa. Esta estrategia de síntesis-encapsulación en un solo paso supone una ventaja significativa frente a la metodología convencional de incorporación de moléculas huésped en sólidos porosos, ya que disminuye el número de etapas necesarias, los requerimientos energéticos del proceso, el tiempo de operación/manipulación así como el riesgo de degradación o fotoactivación involuntaria del CORM.

Por otro lado, el estudio llevado a cabo para optimizar de la cantidad de ALF794 empleada durante el proceso de síntesis-encapsulación, confirma que el uso de menores proporciones de CORM proporciona materiales más cristalinos y puros (ausencia de subproductos tales como óxidos de molibdeno) y encapsulaciones más eficientes (CORM empleado *vs.* CORM incorporado). Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionó como material más prometedor el sistema híbrido ALF794@ZnCPO_0.2, con un contenido de 0.28 mmol de ALF794 por gramo de material. Los estudios de liberación de CO mediante el ensayo de la mioglobina demostraron que este nuevo CORMA, al igual que el compuesto ALF794, es fotoactivo (siendo más eficiente bajo luz UV que visible). Además, la incorporación del CORM dentro de la matriz porosa implica una liberación más lenta del CO respecto al ALF794 libre, lo que permitiría ejercer cierto control sobre cuándo y cómo se lleva a cabo la administración de la

molécula bioactiva. Por último, se evaluó la estabilidad química del nuevo sistema híbrido preparado en medio fisiológico simulado (HEPES). Tanto los resultados de difracción de rayos-X, como los obtenidos mediante ICP-OES, confirman la elevada estabilidad de la matriz porosa (tan solo el 9 % del zinc total es lixiviado tras 6 horas de incubación), así como su capacidad para retener, durante el mismo periodo de incubación, hasta el 83 % de los fragmentos metálicos de molibdeno en sus cavidades. El nuevo material ALF794@ZnCPO_0.2 es, por lo tanto, capaz de conservar, en oscuridad, la mayor parte del CORM encapsulado, así como de retener los iCORMs generados tras la fotoactivación del mismo, lo que se traduce en una disminución significativa del potencial riesgo asociado a la toxicidad de los fragmentos metálicos. Ambos resultados son alentadores de cara al uso de este material como vehículo capaz de transportar CORMs u otras moléculas bioactivas de forma segura.

CAPÍTULO IV

Intercambio iónico como estrategia para la preparación de CORMAs



En este capítulo, se detalla la preparación de diferentes materiales liberadores de monóxido de carbono basados en materiales inorgánicos porosos (sílices mesoporosas y redes metalorgánicas) y moléculas liberadoras de CO (CORMs), mediante una estrategia de intercambio iónico. En concreto, se ha seleccionado el MOF bioMOF-1 ($(\text{NH}_2(\text{CH}_3)_2)_2[\text{Zn}_8(\text{adeninato})_4(\text{BPDC})_6]$ (BPDC: ácido bifenil-4,4'-dicarboxílico) y una serie de sílices mesoporosas funcionalizadas (MCM-41-SO₃H y SBA-15-SO₃H, Al-MCM-41), que se caracterizan por poseer esqueletos porosos aniónicos con tamaños de poro adecuado para incorporar CORMs catiónicos, tales como el ALF472 ($[\text{Mn}(\text{tacn})(\text{CO})_3]\text{Br}$ (tacn: 1,4,7-triazaciclonano). A diferencia de los capítulos anteriores (véanse los Capítulos II y III), donde la preparación de los sistemas híbridos CORM@MOFs se basaba en fenómenos de fisisorción, en este caso, las interacciones anfitrión-huésped serán más fuertes (gracias a las interacciones electrostáticas) lo que se espera que influya en la cantidad de fármaco incorporada en cada material, así como en el perfil cinético de liberación de CO y en la lixiviación de los fragmentos de decarbonilación (iCORMs) producidos tras la disociación del enlace M-CO. Además, se ha llevado a cabo la co-encapsulación del agente antitumoral *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] junto al CORM ALF472 en la matriz porosa Al-MCM-41. La preparación de este material híbrido se presenta como prueba de concepto de la posibilidad de desarrollar sistemas transportadores de cócteles de fármacos (agente tumoral y molécula liberadora de CO), que puedan dar lugar a tratamientos más efectivos y/o con menos efectos secundarios contra diferentes enfermedades, como por ejemplo, el cáncer.

1. CORMs catiónicos fotoactivables basados en manganeso(I)

Como se mencionó en la introducción de esta Tesis Doctoral, los carbonilos metálicos basados en manganeso(I) suelen ser bastante estables a la oxidación. Además, muchos de estos compuestos son fotoactivos, es decir, son capaces de liberar monóxido de carbono cuando son irradiados a una determinada longitud de onda.^[136] Un ejemplo de este tipo de CORMs es el fotoCORM desarrollado por Schatzschneider *et al.* $[\text{Mn}(\text{tpm})(\text{CO})_3]\text{PF}_6$, que libera CO tras su activación con luz ultravioleta (λ : 365 nm). Este compuesto demostró ser citotóxico bajo fotoactivación frente a la línea celular HT-29 (cáncer de colon), no mostrando ningún efecto terapéutico en oscuridad.^[194] Otro

ejemplo es la serie de tricarbonilos de manganeso(I) fotoactivos basados en ligandos de tipo polipiridina desarrollados por Mascharak *et al.*^[195] En este trabajo, evaluaron la influencia de la conjugación de los ligandos auxiliares sobre la transferencia de carga metal-ligando (TCML) y, por tanto, sobre la labilidad del enlace Mn-CO. Comprobaron que los complejos sintetizados: $[\text{Mn}(\text{tpa})(\text{CO})_3](\text{ClO}_4)$, $[\text{Mn}(\text{dpa})(\text{CO})_3](\text{ClO}_4)$, y $[\text{Mn}(\text{pqa})(\text{CO})_3](\text{ClO}_4)$, (tpa: tris(piridil)amina, dpa: *N,N'*-bis(2-piridilmetil)amina y pqa: (2-piridilmetil(2-quinolilmetil)amina podían ser fotoactivados a diferentes longitudes de onda (λ : 330, 350 y 360 nm, respectivamente), y observaron que un aumento en la conjugación del ligando auxiliar requería irradiaciones menos energéticas para la activación de la liberación de CO (Figura 72).

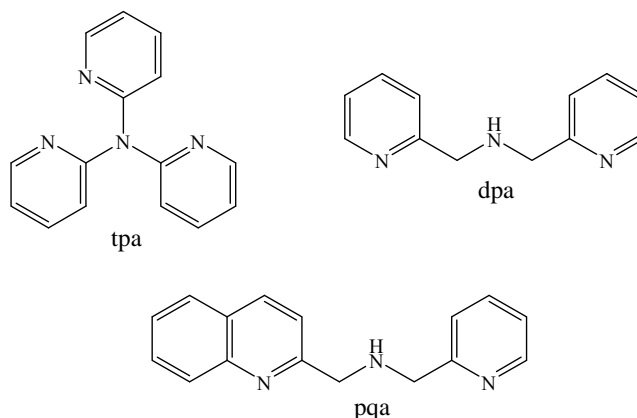
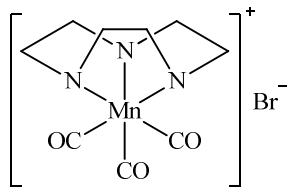


FIGURA 72: LIGANDOS UTILIZADOS POR MASCHARAK *ET AL.* PARA LA SÍNTESIS DE FOTOCORMS BASADOS EN MANGANESO(I).^[195]

Por tanto, con el objetivo de preparar CORMAs que presenten una liberación de monóxido de carbono controlada y, teniendo en cuenta que diversos tricarbonilos metálicos de manganeso(I) pueden actuar como fotoCORMs, seleccionamos el complejo catiónico $[\text{Mn}(\text{tacn})(\text{CO})_3]\text{Br}$ (Figura 2), conocido como ALF472, para llevar a cabo la preparación de los materiales liberadores de CO mediante intercambio iónico desarrollados en este capítulo.

Dicho CORM fue proporcionado por ALFAMA Ltd. y se caracteriza porque es soluble en agua y estable en oscuridad, tanto al aire como en disolución acuosa. Además, ha demostrado no ser tóxico frente a macrófagos RAW246.7, en concentraciones de hasta 100 μM .



ALF472

fotoCORM
 Estable al aire
 Soluble en agua
 Estable en disolución acuosa (oscuridad)
 No tóxico frente a macrófagos RAW246.7

FIGURA 73: ESTRUCTURA DEL CARBONILO METÁLICO DE MANGANESO(I) ALF472 UTILIZADO PARA LA PREPARACIÓN DE CO.

Teniendo en cuenta la naturaleza catiónica del carbonilo metálico elegido, se seleccionaron diferentes matrices inorgánicas aniónicas porosas para llevar a cabo su encapsulación. A continuación, se describen los distintos materiales híbridos ALF472@matriz porosa preparados así como los resultados obtenidos con cada uno de ellos en relación a sus perfiles de liberación de CO y a su estabilidad.

2. Material liberador de CO basado en el CORM fotoactivo ALF472 y la red metalorgánica porosa bio-MOF-1

2.1. Preparación y caracterización

En este caso, se eligió el MOF $(\text{NH}_2(\text{CH}_3)_2)_2[\text{Zn}_8(\text{adeninato})_4(\text{BPDC})_6]$ (BPDC: ácido bifenil-4,4'-dicarboxílico (bio-MOF-1), desarrollado por Rosi *et al.* en 2009,^[196] como matriz porosa para la preparación del CORMA ALF472@bio-MOF-1. Las razones que motivaron la selección de esta matriz porosa como anfitrión fueron las siguientes. Por una parte, se trata de un MOF biocompatible basado en ligandos adeninato (una de las cinco bases nitrogenadas que forman los ácidos nucleicos) y cationes Zn^{2+} , que se caracterizan por su baja toxicidad (LC_{50} 0.5 g kg^{-1}). [14] Por otra parte, en relación a su estructura, debe destacarse que el bio-MOF-1 posee un esqueleto estructural aniónico basado en columnas infinitas paralelas de adeninato de zinc que actúan como unidades de construcción secundarias (SBU, del inglés *secondary building units*). Dichas SBUs están interconectadas entre sí mediante espaciadores orgánicos BPDC, dando lugar a canales cuadrangulares monodimensionales de 0.52 nm de diámetro que se extienden a lo largo del eje cristalográfico *c* y que alojan cationes

$[\text{NH}_2(\text{CH}_3)_2]^+$ que compensan la carga (Figura 74). Estos cationes son susceptibles de ser intercambiados por otros huéspedes catiónicos como, por ejemplo, el CORM ALF472. Además, el diámetro de los poros es adecuado para la incorporación de dicho CORM.

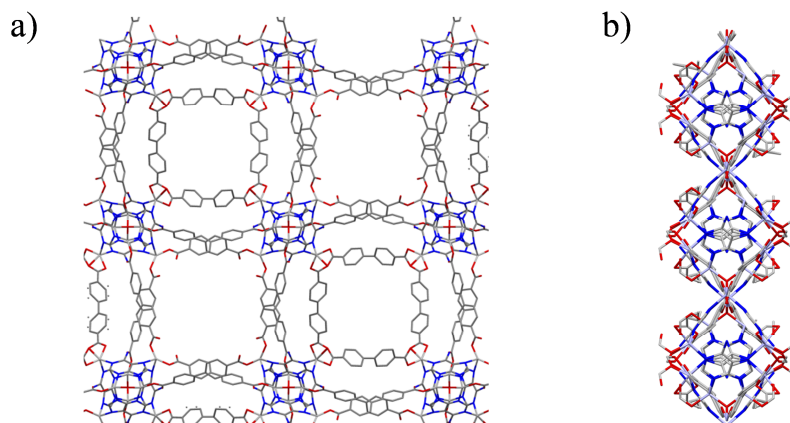


FIGURA 74: ESTRUCTURA DE bio-MOF-1. a) A LO LARGO DEL EJE C, MOSTRANDO LOS CANALES MONODIMENSIONALES; b) UNIDAD DE CONSTRUCCIÓN SECUNDARIA (SBU).

El polímero de coordinación poroso bio-MOF-1 fue sintetizado siguiendo el procedimiento ya publicado.^[196] Mediante una reacción solvotermal, usando DMF como disolvente y ácido nítrico como agente modulante, se obtuvo un sólido de color blanco (véase Anexo I). El patrón de difracción de rayos-X en polvo confirmaba la cristalinidad y pureza del material obtenido.

A continuación, se llevó a cabo la encapsulación del complejo ALF472 en los canales de la matriz porosa bio-MOF-1 mediante una estrategia de intercambio iónico. Para ello, se impregnó el bio-MOF-1 en una disolución en DMF de ALF472, con un exceso estequiométrico doble respecto a los cationes $[\text{NH}_2(\text{CH}_3)_2]^+$ intercambiables en la estructura de la matriz porosa. La suspensión resultante se mantuvo en agitación y a temperatura ambiente durante cuatro días, con objeto de alcanzar el equilibrio de intercambio. Una vez transcurrido ese tiempo, el material híbrido se lavó con DMF y MeOH y se dejó secar a temperatura ambiente. Todas las manipulaciones realizadas, así como su almacenamiento, se llevaron a cabo en ausencia de luz para evitar la fotoactivación del CORM (véase Anexo I).

La incorporación del CORM en la matriz porosa se confirmó, en primer lugar, mediante espectroscopía infrarroja. Como se observa en la Figura 75, el espectro del material híbrido muestra las bandas de *stretching* de los grupos carbonílicos del CORM ligeramente desplazadas a mayores longitudes de onda en comparación con las del ALF472 libre (ν_{CO} (ALF472): 2017 y 1895 cm^{-1} , ν_{CO} (ALF472@bio-MOF-1): 2030 y 1925 cm^{-1}). Este pequeño desplazamiento se debe al efecto del confinamiento del CORM en la matriz porosa, confirmando su encapsulación. Como se mencionó en los capítulos anteriores (véase Capítulos II y II), este mismo efecto ha sido observado con anterioridad en otros casos de la bibliografía.^[179]

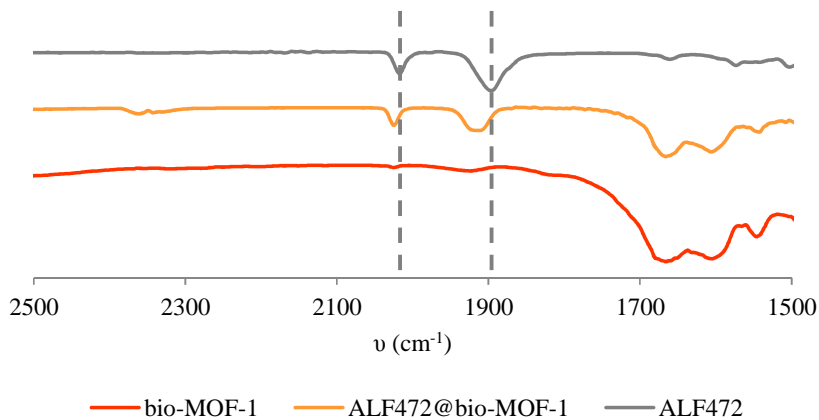


FIGURA 75: ESPECTRO INFRARROJO DE LOS COMPUESTOS bio-MOF-1 (LÍNEA ROJA), ALF472@bio-MOF-1 (LÍNEA NARANJA) Y ALF472 (LÍNEA GRIS).

Asimismo, el patrón de difracción de rayos-X en polvo del material híbrido confirma que la matriz porosa no ha sufrido cambios durante el proceso de encapsulación (Figura 76). De hecho los estudios de estabilidad por difracción de rayos-X en polvo del bio-MOF-1 en las condiciones de encapsulación (suspensión en DMF durante 4 días a temperatura ambiente) demostraron que la matriz porosa se recupera inalterada después de este tratamiento. Además, debe destacarse que la ausencia de reflexiones debidas a la presencia de ALF472 libre en el difractograma del sistema ALF472@bio-MOF-1 descarta la co-precipitación del CORM junto a las partículas del PCP. Por otra parte, las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM)

ponen de manifiesto que el material híbrido se aísla como partículas con forma de barra de tamaño micrométrico (1.5-3 μm) (véase Anexo I).

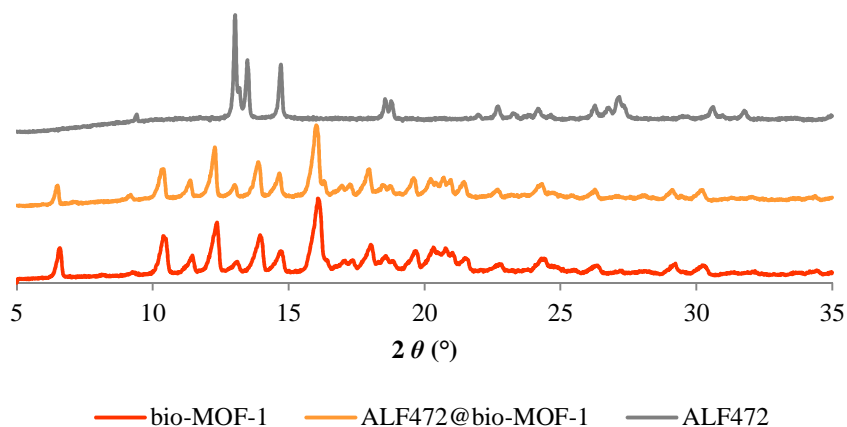


FIGURA 76: DIFRACTOGRAMAS DE RAYOS-X EN POLVO DE LOS COMPUESTOS: bio-MOF-1 (LÍNEA ROJA), ALF472@ bio-MOF-1 (LÍNEA NARANJA) Y ALF472 (LÍNEA GRIS).

Una vez confirmada la presencia del complejo de manganeso en la matriz porosa, se llevó a cabo la cuantificación del ALF472 incorporado mediante diferentes técnicas de caracterización de sólidos, tales como análisis elemental, termogravimetría y espectroscopía de energía dispersiva de rayos-X (EDX) (véase Anexo I). El espectro del material ALF472@bio-MOF-1 obtenido mediante EDX confirma la presencia de los metales Zn y Mn en las partículas del material híbrido (ratio Zn_8/Mn : 0.88), a la vez que descarta la presencia de aniones bromuro (contraiones del CORM original) (Figura 77). Este resultado de nuevo corrobora que la incorporación del CORM se produce mediante el intercambio iónico de los cationes $[\text{NH}_2(\text{CH}_3)_2]^+$ y, por tanto, no hay pares iónicos $[\text{Mn}(\text{tacn})(\text{CO})_3]^+\text{Br}^-$ fisisorbidos en las cavidades del MOF. Estos resultados también se confirmaron mediante análisis elemental y termogravimetría (véase Anexo I). De hecho, la cantidad de ALF472^+ encapsulada es de 0.25 mmol por gramo de material, lo que supone una eficiencia de intercambio del 35%.

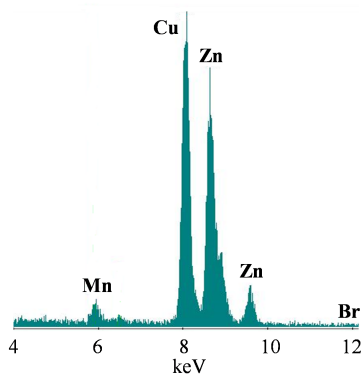


FIGURA 77: ESPECTRO DE EDX DEL MATERIAL ALF472@bio-MOF-1 MOSTRANDO LA PRESENCIA DE LOS METALES Zn y Mn ASÍ COMO LA AUSENCIA DE BROMO. LA PRESENCIA DE Cu ES DEBIDA A LAS REJILLAS UTILIZADAS PARA LA DEPOSICIÓN DE LAS MUESTRAS.

2.2. Estudio de la liberación de CO

Una vez caracterizado el compuesto híbrido ALF472@bio-MOF-1, se procedió a evaluar su potencial aplicación práctica como material liberador de CO en comparación con el CORM libre ALF472. Para realizar este estudio, se ensayó la liberación de dicha molécula bioactiva, mediante el ensayo de la mioglobina, durante 24 h en condiciones biológicas simuladas (PBS, 37°C) tras la fotoactivación de los compuestos objeto de estudio con luz visible. Asimismo, se evaluó el comportamiento del CORM libre y del material híbrido en ausencia de luz (Figura 78 b). Como se explicó anteriormente, el ensayo de la mioglobina permite cuantificar de forma indirecta la cantidad de monóxido de carbono liberada a partir de un compuesto/material liberador de CO. Para ello, este se adiciona a una disolución de mioglobina (Mb(Fe(II))) en condiciones reductoras y se determina la cantidad de carbomonoximioglobina (Mb-CO) formada, o lo que es lo mismo, la cantidad de monóxido de carbono liberada, mediante espectrofotometría ultravioleta-visible (véase Anexo I).

De acuerdo con los resultados obtenidos, la incubación de una disolución de ALF472 y la proteína Mb(Fe(II)) en oscuridad durante 24 horas no genera cambios en el espectro UV-vis de esta última, lo que significa que en esas condiciones no se produce liberación de CO. Sin embargo, cuando ALF472 se irradia con luz visible usando una lámpara fluorescente (flujo luminoso 600 lm, temperatura de color 4000 K),

se observan cambios en la banda Soret del espectro UV-vis de Mb(Fe(II)) debidos a la coordinación de las moléculas de CO liberadas al centro de hierro presente en la mioglobina. Por tanto, el aumento y la disminución relativa de las bandas de absorción situadas a 423 y 435 nm, respectivamente, demuestra que este compuesto es un CORM fotoactivo que libera CO cuando es irradiado con luz visible (Figura 78 b). Además, se ha comprobado que ALF472 libera 0.80 mmol de CO por mmol de complejo transcurridas 24 horas, lo que demuestra que uno de los ligandos CO es más lábil que los otros dos. En relación al mecanismo de liberación de CO, probablemente, como se ha descrito para otros CORMs,^[134,136] la liberación de CO de la esfera de coordinación del metal está acompañada por una reacción de intercambio de ligandos con el medio, como se esquematiza en la Figura 78 a.

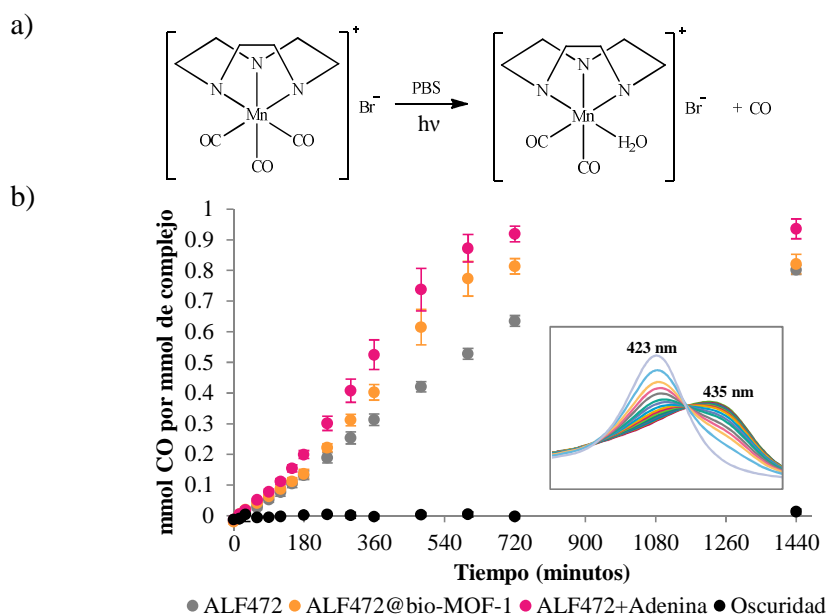


FIGURA 78: a) ESQUEMA DE LIBERACIÓN DE CO DEL COMPUESTO ALF472; b) CINÉTICAS DE LIBERACIÓN DE MONÓXIDO DE CARBONO OBTENIDOS AL IRRADIAR CON LUZ VISIBLE LOS COMPUESTOS ALF472 (GRIS), ALF472@bio-MOF-1 (NARANJA), MEZCLA FÍSICA ADENINA+ALF472 (ROSA). LOS CÍRCULOS NEGROS CORRESPONDEN A LA LIBERACIÓN DE CO EN OSCURIDAD PARA EL ALF472. LA GRÁFICA INSERTADA MUESTRA LA EVOLUCIÓN DEL ESPECTRO UV-VISIBLE DE LA MIOGLOBINA DEBIDO A LA COORDINACIÓN DEL CO ($\lambda_{\text{abs Mb}}$ 435 nm, $\lambda_{\text{abs Mb-CO}}$ 423 nm). CONDICIONES EXPERIMENTALES: ATMÓSFERA DE ARGÓN, PBS, 37°C, 10 μM DE ALF 472, 10 μM DE MIOGLOBINA .

Por otra parte, debe destacarse que el CORM encapsulado en el material híbrido ALF472@bio-MOF-1, libera una cantidad similar de CO que el CORM libre después de 24 h (0.82 mmol de CO por mmol de complejo), lo que significa que la incorporación del ALF472 en las cavidades del PCP mediante intercambio iónico no afecta a sus propiedades liberadoras de CO. Además, como se aprecia en la Figura 78 b, el perfil de la cinética de liberación de CO del ALF472@bio-MOF-1 es similar a la del ALF472 sólo hasta los 180 minutos. Sin embargo, después de 180 minutos, se aprecia una aceleración en la liberación de CO en comparación con el perfil cinético del CORM original, lo que puede atribuirse a la degradación de la matriz del MOF y a la lixiviación de adenina a la disolución. Con el objetivo de confirmar esta hipótesis, estudiamos cómo afecta la presencia de adenina libre al perfil de liberación de CO del ALF472@bio-MOF-1. Para ello, evaluamos el CO liberado de una mezcla que contenía ALF472 libre y adenina (la concentración de adenina utilizada era equivalente a la obtenida tras la degradación completa del bio-MOF-1, (véase Anexo I). Los resultados muestran que la adición de adenina a la disolución de ALF472, efectivamente, aumenta la cinética de liberación de CO, lo que puede deberse al reemplazamiento del ligando CO lábil por una molécula de adenina que se coordina al centro metálico (Figura 79).

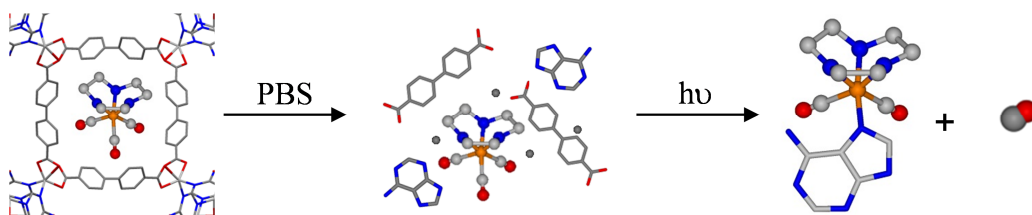


FIGURA 79: ESQUEMA PROPUESTO PARA LA LIBERACIÓN DE MONÓXIDO DE CARBONO POR EL MATERIAL ALF472@bio-MOF-1 TRAS LA LIBERACIÓN DE ADENINA COMO CONSECUENCIA DE LA DEGRADACIÓN PROGRESIVA DE LA MATRIZ POROSA EN PBS.

Asimismo, esta hipótesis se confirmó mediante espectroscopía de RMN ^1H . Para ello, se registraron los espectros RMN ^1H de los compuestos ALF472, adenina y de su mezcla en disolución, permaneciendo esta última durante 24 horas tanto en oscuridad como bajo irradiación con luz visible (véase Anexo I). Como se observa en la Figura 80, el espectro de la mezcla física en oscuridad es una combinación de los espectros de cada molécula por separado (Figura 80 c), indicando que la fotoactivación es

imprescindible para que la reacción entre la adenina y el CORM tenga lugar. Sin embargo, en el espectro de la mezcla irradiada (Figura 80, d) se observa un ensanchamiento y ligero desplazamiento de las señales de los protones H2 y H6 de la molécula de adenina, confirmando que existe una interacción de ésta con el complejo de manganeso tras su fotoactivación.

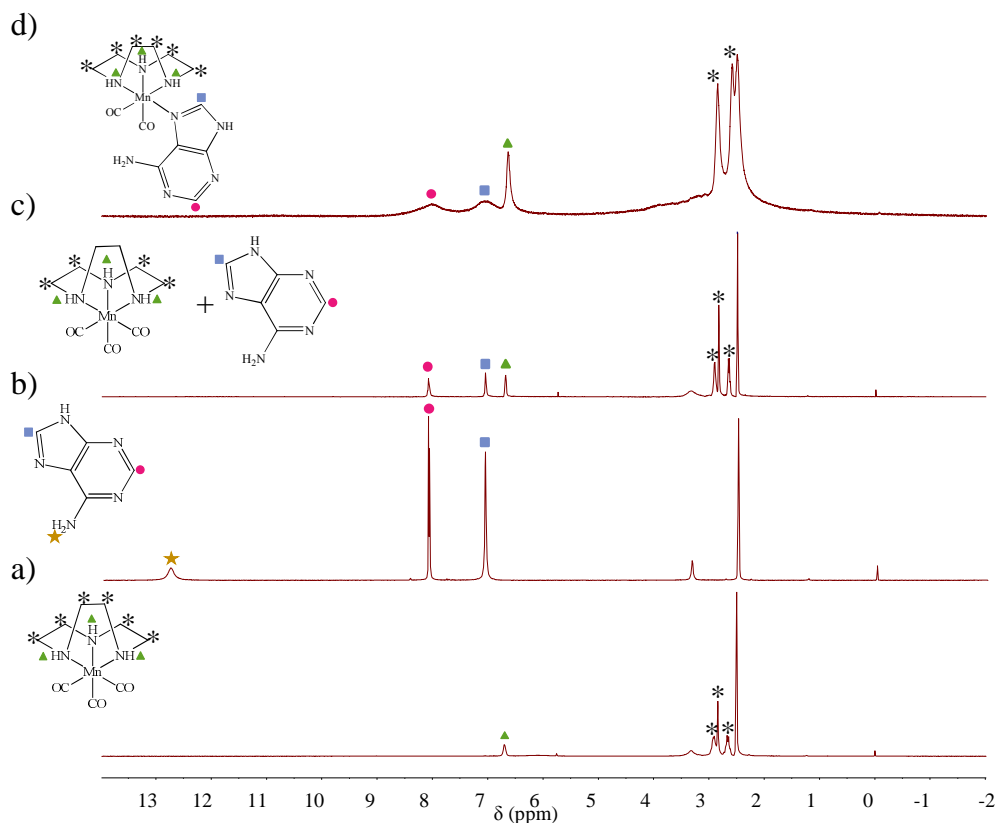


FIGURA 80: ESPECTROS DE RMN ^1H EN D_2O DE A) ALF472, B) ADENINA, C) ALF472 + ADENINA EN OSCURIDAD, 24 h, D) ADENINA + ALF472 IRRADIADO CON LUZ VISIBLE, 24 h.

2.3. Estudio de la lixiviación de fragmentos metálicos

Finalmente, con el objetivo de evaluar la estabilidad química del sistema híbrido en condiciones fisiológicas, éste se suspendió en agua durante períodos de 6 y 24 horas bajo irradiación con luz visible a 37 °C y se cuantificó el contenido de cinc y manganeso en la disolución sobrenadante mediante espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES, del inglés *inductively coupled*

plasma-optical emission spectrometry) (véase Anexo I). Tras 6 horas de incubación, ALF472@bio-MOF-1 muestra casi una degradación total, puesto que el 83.1 % del cinc y el 74.7% del manganeso presentes en dicho material son detectados en la disolución sobrenadante. Además, a las 24 horas de incubación, el material híbrido se degrada por completo (100% de cinc lixiviado y 95.3% de manganeso). Este resultado concuerda con los estudios de liberación de CO y confirma la baja estabilidad química de la matriz porosa bio-MOF-1 en disolución acuosa.

3. Materiales liberadores de CO basados en el CORM fotoactivo ALF472 y en sílices mesoporosas funcionalizadas con grupos sulfónicos.

3.1. Preparación y caracterización

Teniendo en cuenta el éxito de la estrategia de intercambio iónico para la preparación del CORMA ALF472@bio-MOF-1, decidimos extender el empleo de este procedimiento para la encapsulación del fotoCORM ALF472 en materiales con una mayor estabilidad química en medio fisiológico. Para ello, seleccionamos como sistemas anfitriones derivados funcionalizados de las sílices mesoporosas MCM-41 y SBA-15 (SMPs). Como se indicó en la introducción, estos materiales son las SMPs más utilizadas en la preparación de sistemas para la liberación de fármacos (DDS, del inglés drug delivery system) debido a su gran biocompatibilidad, elevado volumen de poro y área superficial, así como su capacidad para ser funcionalizadas. Además, estas sílices han demostrado tener una elevada estabilidad en medio fisiológico simulado. De hecho, la sílice MCM-41 muestra una degradación inferior al 1 % tras su incubación a 37 °C en PBS durante 24 horas^[197] y la SBA-15 muestra una degradación inferior al 12 % después de 1000 horas de incubación en SBF (fluido corporal simulado).^[198] Teniendo en cuenta lo anterior, las propiedades de estos materiales los hacen adecuados para la preparación de nuevos CORMAs que puedan presentar una mayor estabilidad en medio fisiológico en comparación con el sistema basado en la red metalorgánica bio-MOF-1.

Por otra parte, en relación a sus estructuras, ambos materiales son compuestos de sílice que presentan una red porosa ordenada como consecuencia de la condensación de

los monómeros SiO₂ en torno al tensioactivo y/o polímero utilizado como molécula plantilla durante su síntesis. Como se observa en la Figura 81, la sílice MCM-41 presenta canales hexagonales que se encuentran en el rango de los mesoporos (2-50 nm). Por su parte, el material SBA-15, al igual que la sílice MCM-41, está formada por cavidades mesoporosas ordenadas en el espacio que, en este caso, se conectan entre sí a través de microporos.

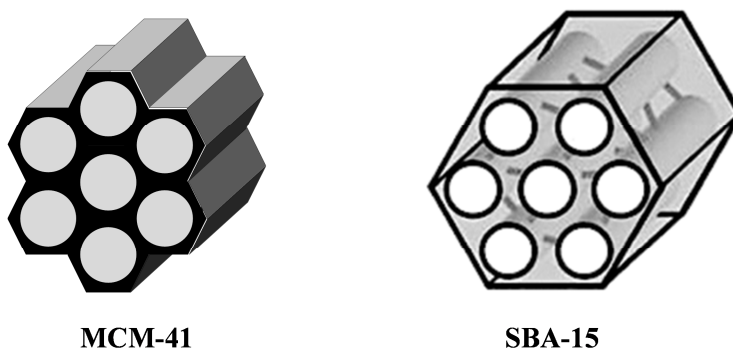
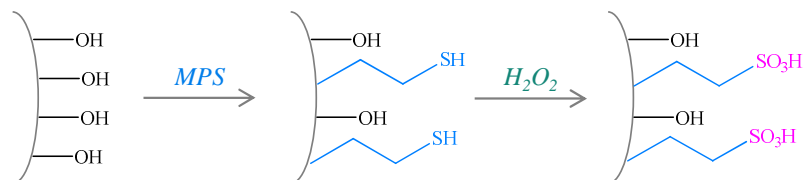


FIGURA 81: ESTRUCTURAS DE LAS SÍLICES MESOPOROSAS EMPLEADAS: MCM-41 (IZQUIERDA) Y SBA-15 (DERECHA).^[60]

En esta Tesis Doctoral, las sílices mesoporosas MCM-41 y SBA-15 se sintetizaron mediante el método sol-gel,^[199,200] utilizando como tensioactivos CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) y Pluronic 123 (poli(etilenglicol))-poli(propilenglicol)-poli(etilenglicol) (EO)20(PO)70(EO)20, EO: Óxido de etileno, PO: Óxido de propileno), respectivamente. La fuente de silicio empleada fue metasilicato de sodio en el caso de MCM-41 y tetraetoxisilicato (TEOS) para la SBA-15. En ambos casos, la eliminación del tensioactivo alojado en los poros se llevó a cabo mediante la calcinación del material a 550-600 °C (véase anexo I). Posteriormente, se llevó a cabo la funcionalización de ambas sílices mesoporosas con grupos alquilsulfónicos (R-SO₃H) con el objetivo de conferir carácter aniónico al esqueleto estructural de la sílice y, así, llevar a cabo la incorporación en sus cavidades del fotoCORM ALF472 mediante intercambio iónico. Para el caso del MCM-41, la funcionalización se llevó a cabo mediante un tratamiento post-sintético con 3-(mercaptopropil)trimetoxisilano (MPS, del inglés *3-(mercaptopropyl)trimethoxysilane*).^[201] La oxidación del grupo tiol con agua oxigenada y su protonación con ácido sulfúrico conducía a la formación del grupo

sulfónico terminal. En el caso de la sílice SBA-15, el proceso se llevó a cabo mediante la co-condensación de TEOS y MPS para, posteriormente, formar el grupo sulfónico con agua oxigenada.^[202] En este último caso, la eliminación del tensioactivo se llevó a cabo mediante extracción con etanol (véase Anexo I). Ambos procesos se esquematizan en la Figura 82.

MCM-41-SO₃H: Funcionalización post-sintética



SBA-15-SO₃H: Funcionalización por co-condensación

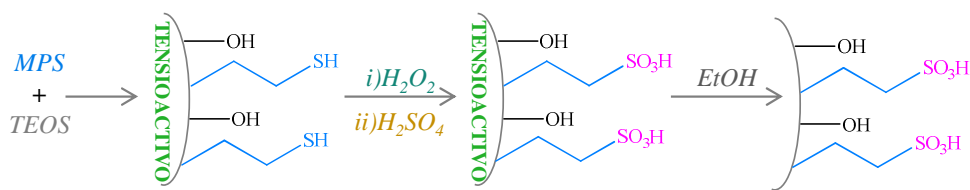


FIGURA 82: ESQUEMA DE FUNCIONALIZACIÓN CON GRUPOS ALQUILSULFÓNICOS DE LA SÍLICE MCM-41 (TRATAMIENTO POST-SINTÉTICO) Y SBA-15 (FUNCIONALIZACIÓN POR CO-CONDENSACIÓN).

El grado de funcionalización de las sílices se determinó mediante una valoración ácido-base y, posteriormente, se confirmó mediante otras técnicas de caracterización de sólidos, como análisis elemental y termogravimetría (véase Anexo I). El tratamiento de post-funcionalización en el material MCM-41 condujo a la incorporación de 0.023 mol de R-SO₃H por mol de sílice, mientras que el proceso de co-condensación en la sílice SBA-15 condujo a un mayor grado de funcionalización alcanzándose 0.14 mol de R-SO₃H por mol de sílice.

A continuación, con el fin de comprobar si la incorporación de grupos funcionales a las matrices limitaba tanto la accesibilidad como la difusividad de las moléculas huésped a través de los canales de la matriz, se evaluó la porosidad de todos los materiales, originales y funcionalizados, mediante adsorción de nitrógeno a 77 K (véase Anexo I). Como se observa en la Figura 83, todos los compuestos presentan una

isoterma de adsorción de tipo IV, confirmando su mesoporosidad. En el caso de las matrices funcionalizadas, como era de esperar, la presencia de los grupos $-\text{SO}_3\text{H}$ en los poros provoca una ligera disminución de su porosidad respecto a los materiales originales (disminución de la S_{BET} de 885 a 825 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ en MCM-41 y su derivado alquilsulfónico, respectivamente; disminución de la S_{BET} de 700 a 675 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ en SBA-15 y su derivado alquilsulfónico, respectivamente). No obstante, tras la incorporación de los grupos alquilsulfónicos, ambos materiales mantienen una alta área superficial así como un elevado volumen de poro (d_{poro} de 3.91 y 5.83 nm para MCM-41- SO_3H y SBA-15- SO_3H , respectivamente).³ Por tanto, el tamaño de poro así como la elevada superficie específica disponible en los materiales funcionalizados deben permitir el acceso y difusión de las moléculas huésped a las cavidades y su interacción con las paredes aniónicas de las mismas.

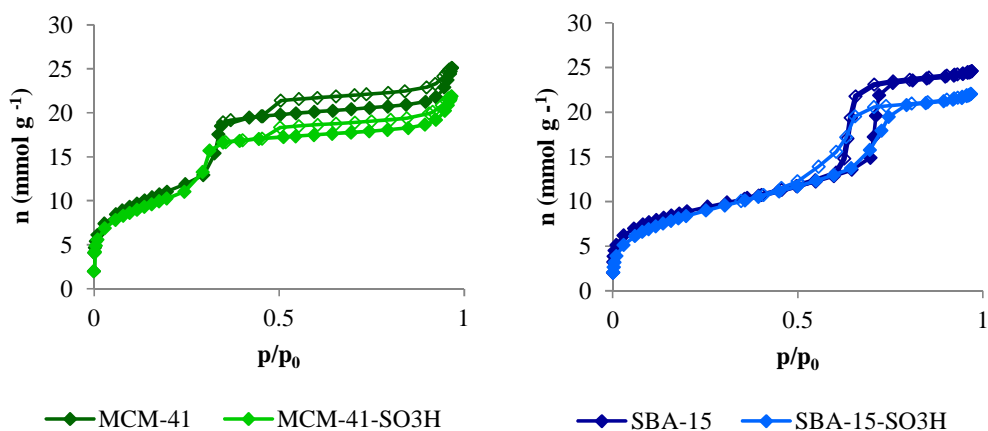


FIGURA 83: ISOTERMAS DE ADSORCIÓN DE NITRÓGENO A 77 K DE LAS SÍLICES MESOPOROSAS MCM-41, SBA-15 Y SUS DERIVADOS ALQUILSULFÓNICOS (MCM-41- SO_3H Y SBA-15- SO_3H) (ROMBOS RELLENOS: ADSORCIÓN, ROMBOS HUECOS: DESORCIÓN).

Una vez caracterizados los materiales porosos, se procedió a la encapsulación del CORM ALF472 en el interior de las sílices mesoporosas funcionalizadas. Al igual que en el caso del bio-MOF-1, el proceso de intercambio iónico se llevó a cabo mediante una estrategia de impregnación del sólido en una disolución acuosa que contenía un exceso doble estequiométrico del CORM respecto a los cationes intercambiables (los

³ Diámetros de poro calculados mediante el método BJH (Barrett-Joyner-Halenda)

protones del grupo alquilsulfónico) durante cuatro días, con objeto de alcanzar el equilibrio de intercambio (véase Anexo I).

Posteriormente, la incorporación del complejo catiónico en las cavidades se evaluó, en primer lugar, mediante espectroscopía infrarroja. La Figura 84 muestra que ambas matrices funcionalizadas son capaces de incorporar el CORM catiónico ALF472. En este caso, al igual que en el bio-MOF-1, también se observa un ligero desplazamiento de las señales de *stretching* de los enlaces C-O en los materiales híbridos en comparación con el CORM original ($\nu_{\text{CO (ALF472)}}$: 2017 y 1895 cm^{-1} , $\nu_{\text{CO (ALF472@SMPs-SO}_3)}$: 2030 y 1925 cm^{-1}) como consecuencia del confinamiento del compuesto carbonílico en los canales de la matriz porosa.

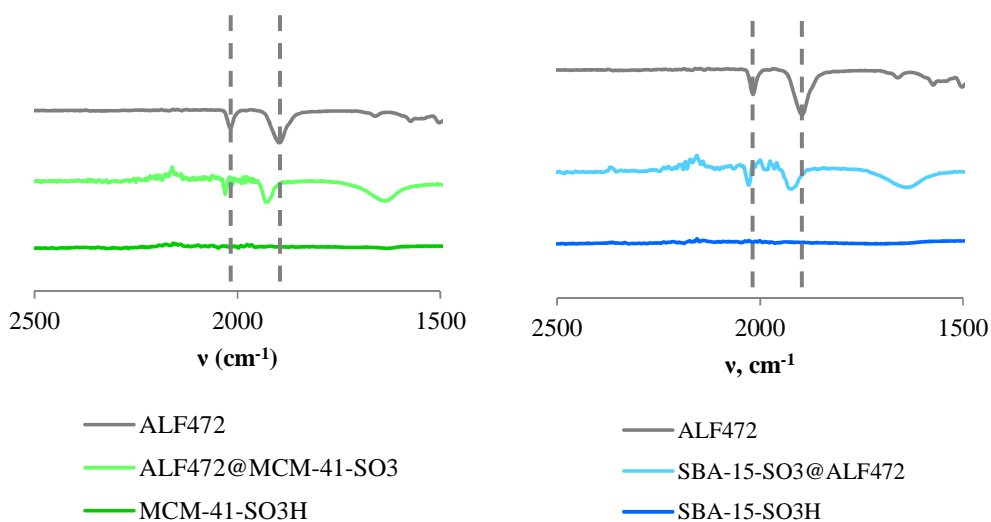


FIGURA 84: ESPECTROS INFRARROJOS DE LOS COMPUESTOS MCM-41-SO₃H (LÍNEA VERDE OSCURO), ALF472@MCM-41-SO₃ (LÍNEA VERDE CLARO), ALF472 (LÍNEA GRIS), SBA-15-SO₃H (LÍNEA AZUL OSCURO), ALF472@SBA-15-SO₃ (LÍNEA AZUL CLARO).

A continuación, la cuantificación del CORM encapsulado en las sílices mesoporosas funcionalizadas se llevó a cabo mediante espectroscopía de energía dispersiva de rayos-X (Figura 85). La proporción Si/Mn hallada para ambos materiales fue de 1/0.015 para ALF472@MCM-41-SO₃ y de 1/0.044 para ALF472@SBA-15-SO₃. Además, los estudios de EDX también confirmaron la ausencia de iones bromuro en los materiales híbridos lo que demuestra que la incorporación del ALF472 tiene lugar mediante un

proceso de intercambio catiónico. Todos estos resultados se confirmaron posteriormente mediante análisis elemental y termogravimetría (véase Anexo I).

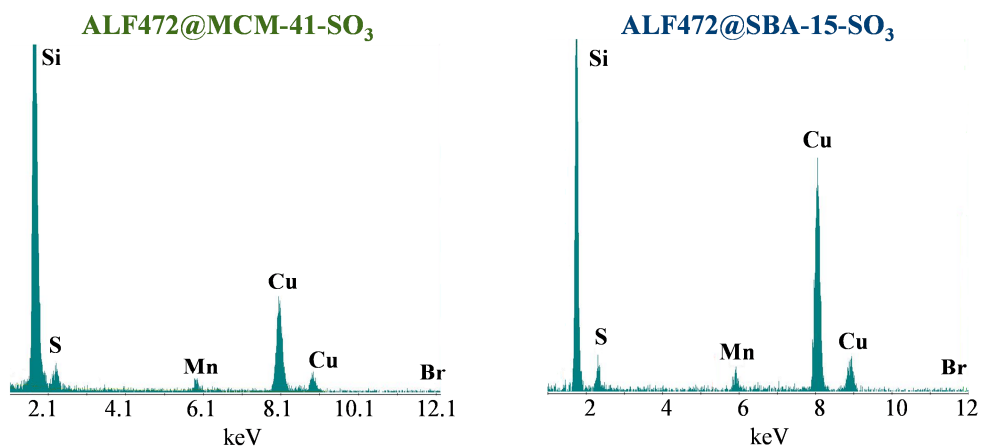


FIGURA 85: ESPECTRO DE EDX DEL MATERIAL ALF472@MCM-41-SO₃ (IZQUIERDA) Y ALF472@SBA-15-SO₃ (DERECHA) CONFIRMANDO LA PRESENCIA DE LOS ELEMENTOS Si Y S (PRESENTES EN LOS MATERIALES POROSOS FUNCIONALIZADOS) Y Mn DERIVADO DEL COMPLEJO ENCAPSULADO.

Los resultados de la cuantificación del CORM almacenado en las sílices mesoporosas funcionalizadas muestran que el material SBA-15-SO₃H es capaz de incorporar una mayor cantidad de ALF472 (0.53 mmol de ALF472⁺ por gramo de material seco) que MCM-41-SO₃H (0.22 mmol g⁻¹), a pesar de que el empleo de este último conduce a un intercambio iónico con una eficiencia del 100%, es decir, es capaz de intercambiar la totalidad de los protones de los grupos R-SO₃H por cationes ALF472⁺ presentes en disolución. Como consecuencia, el mayor grado de funcionalización de la matriz SBA-15-SO₃H permite obtener cargas de ALF472 mayores aunque el proceso de intercambio es menos eficiente (intercambio de ~50% de los sitios R-SO₃H disponibles en su matriz porosa), como se muestra en la Figura 86.

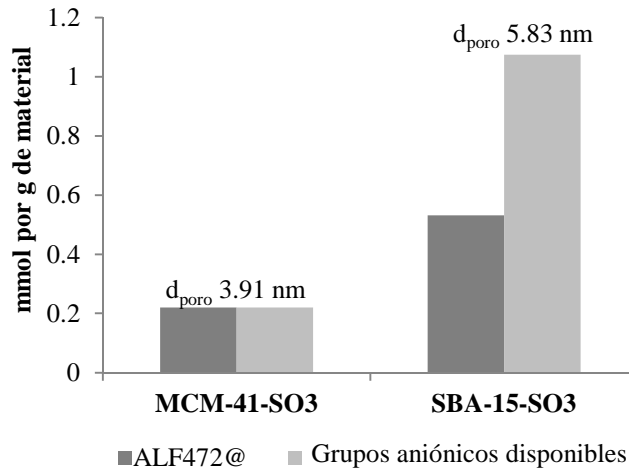


FIGURA 86: SITIOS DE INTERCAMBIO IÓNICO DISPONIBLES (GRIS CLARO) Y CANTIDAD DE ALF472 INCORPORADA (GRIS OSCURO) EN LOS SISTEMAS HÍBRIDOS ALF472@MCM-41-SO₃ Y ALF472@SBA-15-SO₃.

Asimismo, es importante destacar que tras varios intentos, no se consiguió encapsular el ALF472 en las sílices porosas neutras sin funcionalizar (MCM-41, SBA-15). Este resultado de nuevo pone de manifiesto que la incorporación del CORM catiónico en las sílices SBA-15-SO₃H y MCM-41-SO₃H tiene lugar mediante un proceso de intercambio catiónico gracias a la presencia de los grupos alquilsulfónicos. Además, este resultado confirma la encapsulación del CORM dentro de las cavidades de las matrices en lugar de su mera fisiorción en la superficie externa de las partículas.

Por otra parte, con el objetivo de analizar la estabilidad de las matrices funcionalizadas en las condiciones de encapsulación, estas se suspendieron en agua, en oscuridad, durante cuatro días a temperatura ambiente y en ausencia del CORM. Posteriormente, se cuantificaron los grupos sulfónicos antes y después de este tratamiento (mediante una valoración ácido-base) y se comprobó que se perdían, aproximadamente, la tercera parte de estos. Además, la pérdida de estos grupos funcionales también se observó cuando se llevó a cabo la encapsulación del ALF472 en las mismas condiciones. En este caso, se perdieron el 35 y 36 % de los grupos sulfónicos para ALF472@MCM-41-SO₃ y ALF472@SBA-15-SO₃, respectivamente.

3.2. Estudio de la liberación de CO

Una vez caracterizados los materiales híbridos ALF472@MCM-41-SO₃ y ALF472@SBA-15-SO₃, se evaluó su potencial aplicación como materiales liberadores de CO (CORMAs). Para ello, se estudió su capacidad para liberar CO en condiciones biológicas simuladas (PBS, 37 °C), mediante UV-vis (ensayo de la mioglobina), cuando son irradiados con luz visible (véase Anexo I). Como se observa en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, ambos materiales son fotoactivos puesto que liberan CO tras su irradiación con luz visible (lámpara fluorescente, flujo luminoso 600 lm, temperatura de color 4000 K). Sin embargo, al contrario que en el sistema híbrido ALF472@bio-MOF-1, la incorporación del CORM en ambas sílices mesoporosas conlleva una disminución en la velocidad de liberación de CO en comparación con el CORM libre, que se pone de manifiesto en la pendiente menos pronunciada de la curva de liberación. Según este resultado, la encapsulación de ALF472 en las sílices mesoporosas funcionalizadas conduciría a un CORMA que permitiría una liberación de CO más controlada que el CORM sin encapsular, lo que sería ventajoso en aplicaciones terapéuticas. Por otra parte, debe señalarse que después de 24 horas, los nuevos sistemas híbridos ALF472@MCM-41-SO₃ y ALF472@SBA-15-SO₃ liberan una menor cantidad de CO que el CORM libre (0.65 y 0.48 mmol de CO por mmol de complejo encapsulado, respectivamente, frente a 0.80 mmol de CO por mmol de CO en el caso del CORM libre).

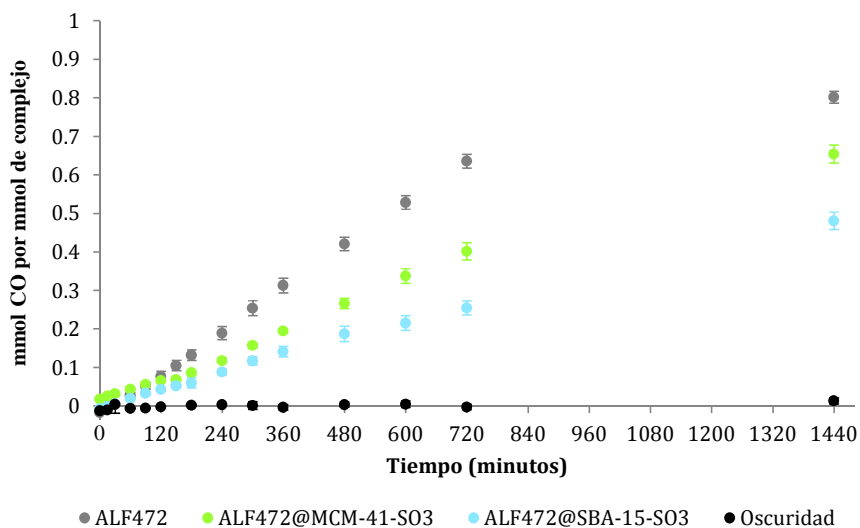


FIGURA 87: CINÉTICAS DE LIBERACIÓN DE MONÓXIDO DE CARBONO OBTENIDAS AL IRRADIAR CON LUZ VISIBLE LOS COMPUESTOS ALF472 (GRIS), ALF472@MCM-41-SO₃ (VERDE) Y ALF472@SBA-15-SO₃ (AZUL). LOS CÍRCULOS NEGROS CORRESPONDEN A LA LIBERACIÓN DE CO EN OSCURIDAD PARA EL ALF472. CONDICIONES EXPERIMENTALES: ATMÓSFERA DE ARGÓN, PBS, 37°C, 10 μ M DE ALF 472, 10 μ M DE MIOGLOBINA.

3.3. Estudio de la lixiviación de fragmentos metálicos

Por último, se evaluó la estabilidad de los nuevos CORMAs preparados en condiciones fisiológicas simuladas (PBS) y oscuridad para evitar la fotoactivación del ALF472. Con estos ensayos se pretende determinar si existiría lixiviación del CORM como consecuencia de procesos de intercambio iónico que pudieran tener lugar debido a la presencia de una elevada concentración de iones en el PBS. Para realizar estos estudios, se suspendió el material híbrido en PBS, en oscuridad, durante 1, 6 y 24 horas y se cuantificó la concentración de ALF472 en el sobrenadante mediante espectroscopía ultravioleta-visible (véase Anexo I). Después de una hora de incubación, se comprobó que el material ALF472@MCM-41-SO₃ liberaba el 85 % del CORM mientras que el material ALF472@SBA-15-SO₃ sólo liberaba el 57 %, alcanzado el máximo de liberación tras 24 horas (75 %). Estos resultados hacen pensar que el bajo tiempo de residencia del CORM en las matrices de sílice se deba a fenómenos de intercambio iónico del mismo con los cationes presentes en el tampón fosfato salino. En este

sentido, la presencia de grupos alquilsulfónicos libres en los canales de la matriz SBA-15-SO₃H parece favorecer la retención del CORM catiónico en sus cavidades, disminuyendo la velocidad de intercambio catiónico del ALF472, en comparación con la matriz MCM-41-SO₃, que carece de grupos alquilsulfónicos libres tras el proceso de encapsulación del CORM.

Por tanto, el bajo tiempo de residencia de una gran parte del CORM cargado en el interior de las matrices ALF472@MCM-41-SO₃ y ALF472@SBA-15-SO₃ puede justificar los resultados de liberación de CO discutidos en el apartado anterior, donde no se observaba una diferencia importante al comparar los perfiles de liberación del gas de los materiales híbridos y del CORM libre. La prematura lixiviación del CORM al medio fisiológico hace que estos sistemas híbridos tengan un comportamiento similar al CORM libre y no proporcionen las ventajas esperables del confinamiento del CORM en sus matrices (ej. ralentización significativa de la cinética de liberación de CO y retención de los fragmentos metálicos potencialmente tóxicos).

Teniendo en cuenta estos resultados se han buscado materiales alternativos que mejoren la encapsulación de los CORMs con objeto de que el material resultante se comporte como CORMAs reales (véase apartado 4).

4. Material liberador de CO basado en el CORM fotoactivo ALF472 y en la sílice mesoporosa Al-MCM-41.

4.1. Preparación y caracterización

Como se ha explicado anteriormente, las sílices mesoporosas utilizadas en este capítulo (MCM-41 y SBA-15) presentan una estabilidad en medio fisiológico adecuada para su uso en la preparación de CORMAs. Sin embargo, se ha demostrado que la encapsulación del CORM catiónico ALF472 en dichas matrices solamente se puede llevar a cabo mediante un proceso de intercambio iónico, por lo que es necesario funcionalizar las cavidades de estas sílices con grupos aniónicos. Para conseguir esto, en el apartado anterior, se ha descrito la funcionalización de los poros de MCM-41 y SBA-15 con grupos alquilsulfónicos. Sin embargo, se ha puesto de manifiesto que los

materiales híbridos resultantes ALF472@MCM-41-SO₃ y ALF472@SBA-15-SO₃ poseen una baja retención del CORM encapsulado en medio fisiológico simulado (PBS), donde la concentración de iones es muy alta y provoca el intercambio de los cationes ALF472⁺. Con el objetivo de mejorar la estabilidad del sistema CORM@sílice mesoporosa en PBS, se decidió utilizar otra estrategia para funcionalizar la sílice mesoporosa MCM-41. Para ello, se preparó dicha sílice en presencia de una fuente de aluminio (aluminato de sodio, sulfato de aluminio, isopropóxido de aluminio, etc.). Al igual que ocurre en las zeolitas, la sustitución de iones Si⁴⁺ por iones Al³⁺ en el esqueleto estructural otorga carácter aniónico al mismo, siendo necesaria la compensación de esta carga mediante la presencia de cationes en las cavidades.^[203] Así, dichos cationes podrían ser intercambiados por el compuesto ALF472⁺ con el objetivo de incorporarlo a las cavidades mediante un proceso de intercambio iónico.

Por tanto, se sintetizó la sílice mesoporosa Al-MCM-41 mediante la co-condensación de aluminato de sodio (NaAlO₂) y TEOS (tetraetoxisilicato), utilizando CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) como tensioactivo, que actuará como plantilla.^[179] Tras la síntesis, este último se eliminó calcinando el material (véase Anexo I). Como se observa en la Figura 88, esta ruta sintética lleva a la formación de una estructura basada en monómeros de SiO₂ y AlO₂⁻ con carga neta negativa, que se compensa por cationes Na⁺ procedentes de la fuente de aluminio (NaAlO₂), y que se distribuyen a través de las cavidades.

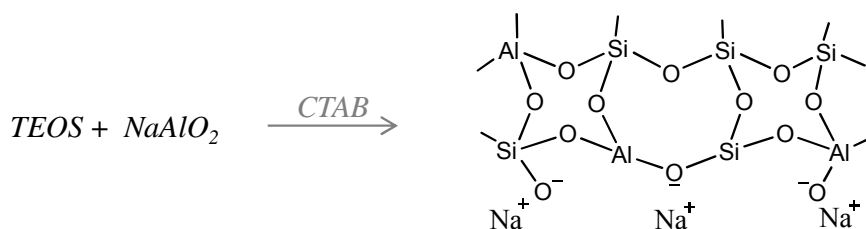


FIGURA 88: ESQUEMA DE FORMACIÓN DE LA SÍLICE MESOPOROSA Al-MCM-41 USANDO TEOS Y ALUMINATO DE SODIO COMO FUENTES DE SILICIO Y ALUMINIO, RESPECTIVAMENTE. EL TENSIOACTIVO UTILIZADO EN EL EJEMPLO ES CTAB.

Una vez sintetizada la sílice mesoporosa Al-MCM-41, se caracterizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y EDX. Como se observa en la Figura 89, las partículas del material Al-MCM-41 presentan una morfología esférica y una

distribución de tamaño homogénea (diámetro medio: 64.0 ± 13.6 nm) similar al material descrito en bibliografía.^[179] Es importante destacar que, en comparación con los materiales porosos presentados anteriormente en este capítulo, el tamaño de partícula de la sílice mesoporosa Al-MCM-41 se encuentra en el rango nanométrico. Esto permite una mayor variedad de rutas de administración del potencial material liberador de CO con vistas a su aplicación biomédica. Por ejemplo, la administración de fármacos por vía intravenosa exige el uso de materiales con tamaños inferiores a los 300 nm para evitar el riesgo de embolia.^[204] Por otra parte, los análisis de EDX de Al-MCM-41 permitieron determinar la cantidad de aluminio incorporada a la estructura. Según los resultados la proporción Si/Al es de 1/0.106.

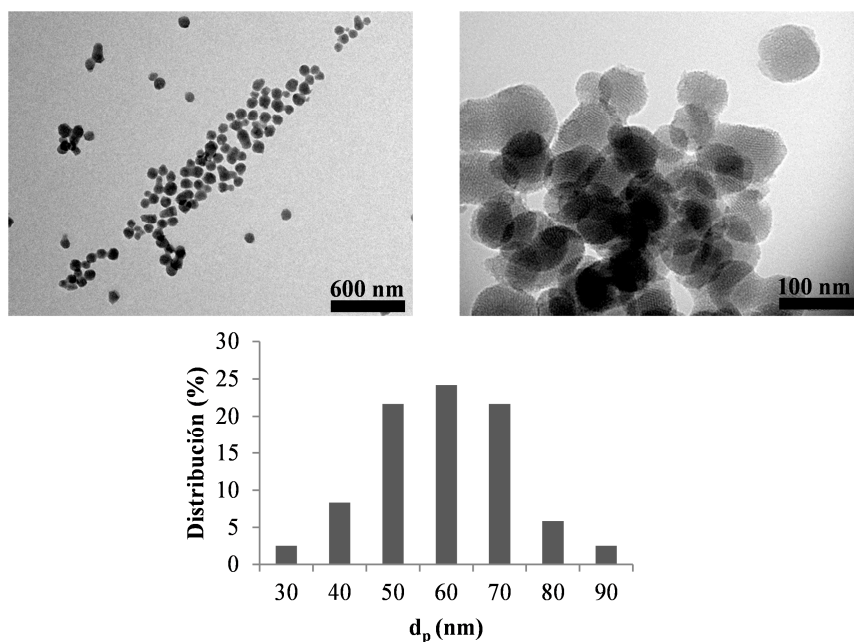


FIGURA 89: IMÁGENES DEL MATERIAL Al-MCM-41 OBTENIDAS MEDIANTE MICROSCOPÍA DE ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA.

A continuación, con el objetivo de analizar si la presencia de grupos aluminato en la estructura de Al-MCM-41 influye en su porosidad, se midieron sus isotermas de adsorción de nitrógeno a 77 K. Como se observa en la Figura 90, la sílice funcionalizada Al-MCM-41 presenta una isoterma de adsorción tipo IV, típica de un sólido mesoporoso. Además, tiene una alta superficie específica de BET ($955 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) y un elevado volumen de poro (d_{poro} (Al-MCM-41): 2.97 nm vs d_{poro} (MCM-41): 3.91

nm).⁴ Estos resultados demuestran que, a pesar de la funcionalización, la sílice Al-MCM-41 obtenida sigue presentando una estructura abierta accesible a las moléculas huésped.

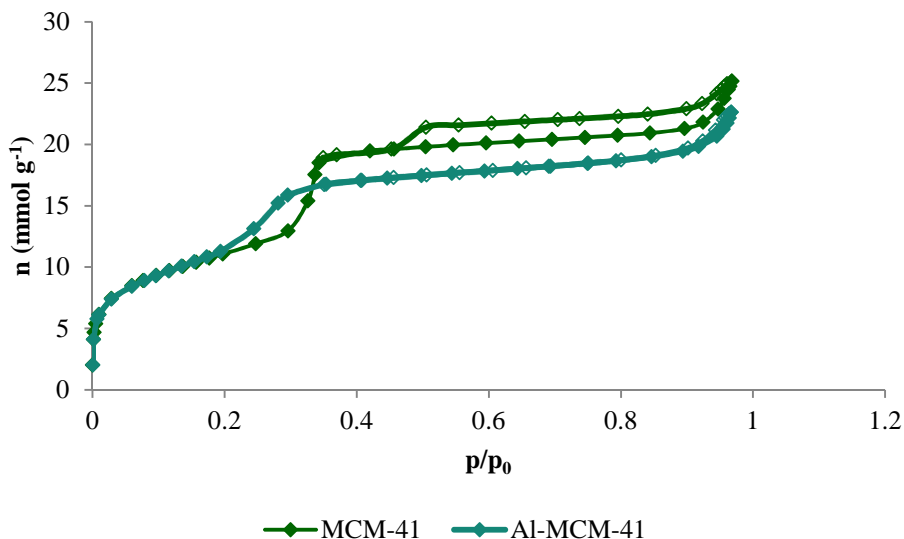


FIGURA 90: ISOTERMAS DE ADSORCIÓN DE NITRÓGENO A 77 K DE LA SÍLICE MESOPOROSA MCM-41 (LÍNEA VERDE) Y DE LA SÍLICE MESOPOROSA FUNCIONALIZADA Al-MCM-41 (LÍNEA TURQUESA) (ROMBOS RELLENOS: ADSORCIÓN, ROMBOS HUECOS: DESORCIÓN).

Las características que presenta el material Al-MCM-41 sintetizado (canales aniónicos, alta área superficial, elevado volumen de poro) lo hacen idóneo para la incorporación del carbonilo catiónico de manganeso ALF472 en sus cavidades. Por tanto, se llevó a cabo la encapsulación del CORM en la matriz Al-MCM-41 mediante un proceso de impregnación sólido-líquido, en agua, a temperatura ambiente y en oscuridad, con objeto de evitar la fotoactivación del CORM. Como en las encapsulaciones descritas anteriormente en este capítulo, se utilizó un doble exceso estequiométrico del complejo de manganeso respecto a los cationes intercambiables presentes en la matriz (cationes Na⁺), siendo necesario, en este caso, tan solo un día de impregnación para alcanzar el equilibrio de intercambio (véase Anexo I).

Un primer análisis mediante espectroscopía infrarroja confirmó la incorporación del CORM. El espectro del material híbrido preparado (ALF472@Al-MCM-41) muestra

⁴ Diámetro de poro calculado mediante el método BJH (Barrett-Joyner-Halenda)

las bandas de *stretching* de los grupos carbonílicos del ALF472, confirmando su incorporación (ν_{CO} (ALF472@Al-MCM-41): 2029 y 1927 cm^{-1}). Además, como ya ocurría en los casos anteriores, se produce un ligero desplazamiento de estas señales respecto a las señales equivalentes del CORM libre (ν_{CO} (ALF472): 2017 y 1895), como consecuencia de las interacciones del ALF472^+ con las paredes de los canales de la matriz porosa (Figura 91).

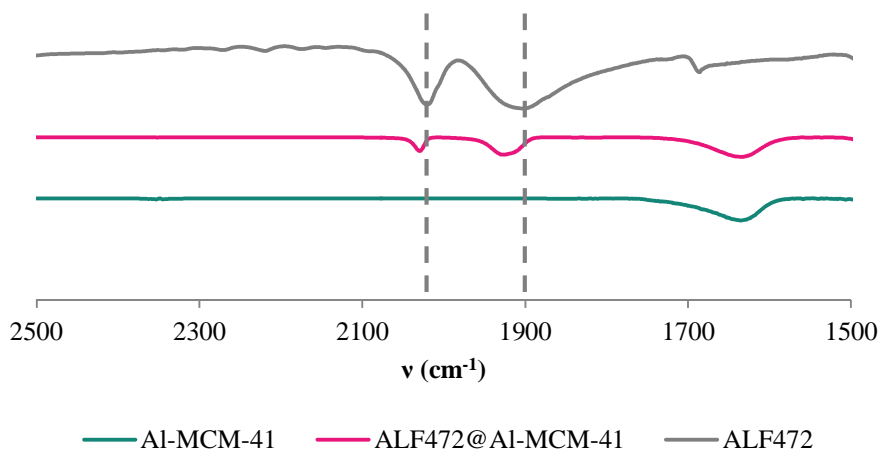


FIGURA 91: ESPECTRO INFRARROJO DE LOS COMPUESTOS Al-MCM-41 (LÍNEA TURQUESA), B) ALF472@Al-MCM-41 (LÍNEA ROSA) Y ALF472 (LÍNEA GRIS).

Una vez confirmada la incorporación del carbonilo metálico en los canales de la sílice mesoporosa Al-MCM-41, se cuantificó la cantidad de CORM encapsulado mediante EDX (ratio Mn/Si: 0.030), análisis elemental y termogravimetría (véase Anexo I). En este caso, la cantidad de CORM incorporada era de 0.48 mmol $[\text{ALF472}]^+$ por gramo de material, lo que supone una eficiencia de intercambio del 38.5 % (sitios catiónicos intercambiables: 1.22 mmol g^{-1} material). De acuerdo con estos resultados, la sílice mesoporosa Al-MCM-41 incorpora el doble de ALF472 en sus cavidades por gramo de material que el sistema híbrido análogo ALF472@MCM-41-SO₃ (0.22 mmol $[\text{ALF472}]^+$ g^{-1} material). Este hecho se debe a la mayor proporción de sitios catiónicos intercambiables presentes en Al-MCM-41 en comparación con ALF472@MCM-41-SO₃ (1.22 mmol g^{-1} vs a 0.22 mmol g^{-1} , respectivamente).

A continuación, el material híbrido resultante se caracterizó mediante microscopía electrónica. Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (Figura 92) muestran que las partículas de ALF472@Al-MCM-41 tienen una morfología y tamaño (diámetro medio: 48.8 ± 11.0 nm) similar al de la matriz original (diámetro medio: 64.0 ± 13.6 nm), lo que confirma la estabilidad de dicha matriz durante el proceso de encapsulación. Además, el mapa de distribución elemental obtenido mediante EDX (Figura 93) confirmó la presencia en las partículas de los elementos silicio y aluminio (que componen la estructura de la matriz porosa), así como de manganeso debido al CORM incorporado. Estos análisis descartaron la presencia de iones bromuro, confirmando que la totalidad del CORM catiónico encapsulado en la matriz se ha incorporado mediante intercambio iónico. Por otra parte, la distribución homogénea de manganeso sobre las partículas del material poroso indica que no existe co-precipitación de CORM no encapsulado y confirma que todo el carbonilo metálico se encuentra encapsulado formando parte del material híbrido ALF472@Al-MCM-41.

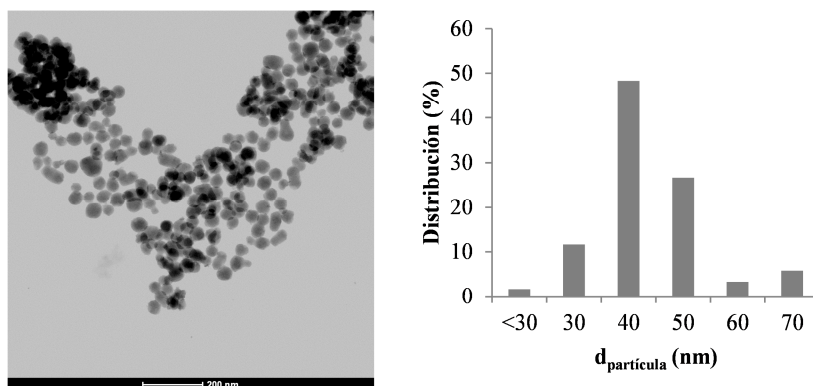


FIGURA 92: IMÁGENES DEL MATERIAL ALF472@Al-MCM-41 OBTENIDAS MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN Y DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA.

Asimismo, se estudió el comportamiento hidrodinámico de ALF472@Al-MCM-41 en PBS con el objetivo de evaluar la estabilidad de las nanopartículas en suspensión para una potencial aplicación biológica. Para ello, se llevaron a cabo estudios de dispersión dinámica de la luz (DLS, del inglés *Dynamic Light Scattering*) en suspensiones de 5 mg de ALF472@Al-MCM-41 en 10 ml de PBS (véase Anexo I). Los resultados ponen de manifiesto que se producía una ligera agregación de las partículas puesto que estas alcanzaron un tamaño de 112 ± 33 nm en comparación con el tamaño

calculado a partir de los datos de TEM (48.8 ± 11.0 nm). Este mismo comportamiento se observó para la matriz porosa sin cargar (93 ± 28 nm). Además, el potencial z tanto de la sílice cargada como del material original es de -23 ± 1 mV y -28 ± 1 mV, respectivamente. Estos parámetros aseguran que las nanopartículas de ALF472@Al-MCM-41 no formarían clusters ni se agregarían en el medio biológico. Debe destacarse que las partículas con diámetros inferiores a 50 nm tienden a agregarse durante su incorporación a las células. Además, se ha demostrado que las nanopartículas de sílices mesoporosas con tamaños entre 50-300 nm permiten una fácil endocitosis en las células vivas sin que se produzca una toxicidad significativa, consiguiéndose una incorporación óptima con tamaños de partícula de unos 200 nm.^[204]

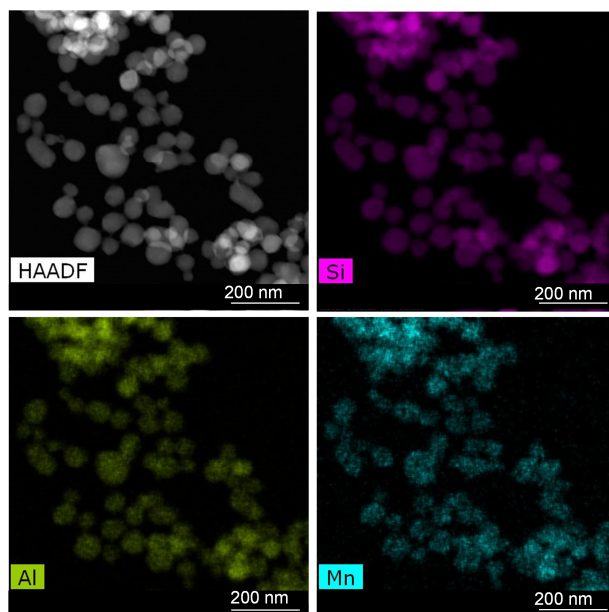


FIGURA 93: MAPA DE DISTRIBUCIÓN ELEMENTAL DEL MATERIAL ALF472@Al-MCM-41 OBTENIDO MEDIANTE EDX PARA LOS ELEMENTOS: SILICIO (ROSA), ALUMINIO (VERDE) Y MANGANESO (AZUL).

4.2. Estudio de la liberación de CO

Una vez demostrada la incorporación del compuesto ALF472 en la matriz Al-MCM-41, se procedió a estudiar el comportamiento como CORMA del material híbrido preparado, bajo irradiación con luz visible (lámpara fluorescente, flujo luminoso 600 lm, temperatura de color 4000 K). Para ello, como en los casos anteriores, se estudió la cinética de liberación de CO utilizando el ensayo de la mioglobina (véase Anexo I). En

la Figura 94, se muestran las cinéticas de liberación de monóxido de carbono de los sistemas híbridos ALF472@Al-MCM-41 y ALF472@MCM-41-SO₃, así como del CORM original ALF472. Como se puede observar, ALF472@Al-MCM-41 presenta un perfil cinético bastante diferente a ALF472@MCM-41-SO₃ y al propio CORM libre. En particular, la incorporación del CORM en las cavidades de Al-MCM-41 conlleva una disminución en la velocidad de liberación de monóxido de carbono tras su fotoactivación (obsérvese la pendiente menos pronunciada del perfil cinético, especialmente, a partir de los 200 minutos). Además, se alcanza un plateau, aproximadamente, a los 600 minutos que se mantiene hasta las 24 horas. Por otro lado, ALF472@Al-MCM-41 libera una menor cantidad de CO por mmol de CORM encapsulado (0.28 mmol de CO por mmol de compuesto incorporado) que ALF472@MCM-41-SO₃ (0.65 mmol de CO por mmol de compuesto incorporado). En este sentido, debe destacarse que, para una potencial aplicación biomédica, dada la capacidad de Al-MCM-41 para incorporar una mayor cantidad del CORM ALF472 mediante intercambio iónico, la tasa de liberación de monóxido de carbono por gramo de material para ambas matrices es muy similar después de 24 horas (0.12 y 0.14 mmol por gramo de material para ALF472@Al-MCM-41 y ALF472@MCM-41-SO₃, respectivamente).

Cabe también resaltar que la diferente cinética de liberación de CO observada para los híbridos ALF472@Al-MCM-41 y ALF472@MCM-41-SO₃, puede explicarse teniendo en cuenta la distinta capacidad de retención del CORM en las cavidades de las matrices MCM-41-SO₃H y Al-MCM-41. Como se discutió en el apartado 3.3, la retención del CORM en el material híbrido MCM-41-SO₃H es baja, como consecuencia del proceso de intercambio iónico ocurrido entre el ALF472⁺ encapsulado con los diferentes cationes presentes en el tampón fisiológico PBS (tasa de intercambio para ALF472⁺ del 85 % tras una hora de incubación en oscuridad). Sin embargo, la matriz funcionalizada Al-MCM-41 muestra una capacidad de retención de los fragmentos metálicos muy superior, pues sólo se observa la lixiviación del 14.3 % del CORM tras 144 horas de incubación en PBS y en oscuridad y del 20.2 % después de incubarlo 72 horas en PBS y bajo irradiación con luz visible (véase la sección 4.3). Por tanto, estos resultados justifican la similitud entre el perfil cinético de liberación de CO del sistema

ALF472@MCM-41-SO₃ con el del CORM libre, puesto que en ALF472@MCM-41-SO₃ la liberación de CO se sigue debiendo, en gran medida, a la fotoactivación de las moléculas de ALF472 lixiviadas al medio fisiológico. Sin embargo, en el caso de ALF472@Al-MCM-41, la liberación de CO observada se debe, principalmente, a la fotoactivación de las moléculas de ALF472 adsorbidas en la matriz. En este sentido, debe indicarse que el confinamiento de las fracciones metálicas en la matriz Al-MCM-41 podría limitar la interacción entre CORMs e iCORMs restringiendo los procesos de sustitución de ligandos mediante la formación de enlaces Mn-Mn, acompañados de la disociación de los enlaces Mn-CO, y, por tanto, favoreciendo una cinética de liberación más lenta.

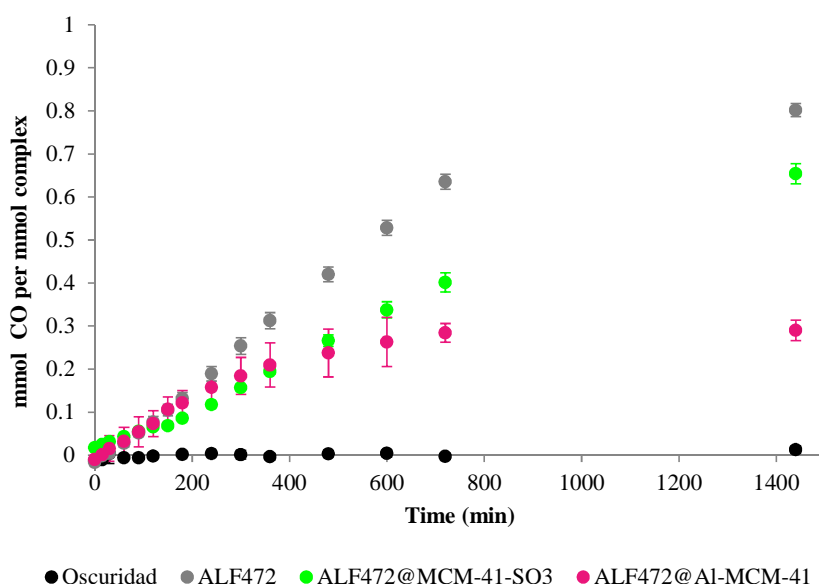


FIGURA 94: CINÉTICAS DE LIBERACIÓN DE MONÓXIDO DE CARBONO BAJO IRRADIACIÓN CON LUZ VISIBLE MEDIANTE EL ENSAYO DE LA MIOGLOBINA EN PBS A 37 °C PARA: ALF472 (GRIS), ALF472@MCM-41-SO₃ (VERDE), ALF472@Al-MCM-41 (ROSA). CONDICIONES EXPERIMENTALES: ATMÓSFERA DE ARGÓN, PBS, 37 °C, 10 μM DE ALF472, 10 μM DE MIOGLOBINA.

4.3. Estudio de la lixiviación de fragmentos metálicos metales

A continuación, se evaluó la estabilidad química del sistema híbrido ALF472@Al-MCM-41, así como su capacidad de retener tanto el CORM como los fragmentos de decarbonilación producidos tras su fotoactivación (iCORMs). Para realizar estos

estudios, se suspendió el material híbrido en PBS y se mantuvo en agitación tanto en oscuridad como bajo irradiación con luz visible durante 6, 24 y 72 horas a 37 °C. A cada tiempo, el sólido se centrifugó y el sobrenadante fue recogido para determinar la concentración de metales disueltos (aluminio y manganeso) mediante espectroscopía de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS, del inglés *inductively coupled plasma-optical mass spectrometry*) (véase Anexo I). Cuando la incubación se llevó a cabo en oscuridad, se comprobó que ALF472@Al-MCM-41 podía retener hasta el 85.7 % del CORM encapsulado tras 72 horas de incubación. Este resultado mejora en gran medida al obtenido para la sílice funcionalizada con grupos sulfónicos. De hecho, ALF472@MCM-41-SO₃, después de una hora de incubación en PBS, había lixiviado el 85% del CORM incorporado debido a un proceso de intercambio iónico con los cationes presentes en el tampón fosfato salino. Por tanto, parece que la interacción del ALF472 con el anfitrión funcionalizado con grupos aluminato es más fuerte que con la matriz con grupos alquilsulfónicos en sus cavidades. Asimismo, con objeto de analizar la estabilidad del sistema híbrido ALF472@Al-MCM-41 durante períodos de tiempo más prolongados en oscuridad, se retiró el sobrenadante y, de nuevo, se incubó este material otras 72 horas más en PBS fresco (para forzar el intercambio de una mayor cantidad de CORM) (véase Anexo I). El análisis del sobrenadante mostró cantidades despreciables de manganeso confirmando la fortaleza de la interacción entre los grupos aluminato de las cavidades y el CORM catiónico encapsulado.

Por otra parte, también se estudió la capacidad de la matriz porosa Al-MCM-41 para retener los fragmentos de decarbonilación, potencialmente tóxicos, generados después de la liberación de CO. Los resultados ponen de manifiesto que este material sólo lixivía un 20.2 % de las fragmentos metálicos de manganeso después de ser irradiado con luz blanca 6 horas en PBS, sin que se observe una mayor lixiviación en las 66 horas siguientes. De acuerdo con este resultado, la mayor parte de los fragmentos metálicos de manganeso quedarían retenidos en la matriz porosa después de la liberación de CO.

4.4. Incorporación dual de ALF472 y Cisplatino en la sílice mesoporosa nanométrica Al-MCM-41

Como se mencionó en la introducción de esta Tesis Doctoral, el monóxido de carbono, ya sea administrado como gas o liberado a partir de moléculas/materiales liberadores de CO, presenta efectos terapéuticos frente a diferentes dolencias o enfermedades. En concreto, en relación a los tratamientos contra el cáncer, el compuesto liberador de monóxido de carbono $[\text{Mn}(\text{tpm})(\text{CO})_3]\text{PF}_6$ ha demostrado tener actividad antitumoral frente a la línea celular HT-29 (cáncer de colón) tras su fotoactivación con luz ultravioleta (λ : 365 nm)^[194] mientras que el CORM *fac*- $[\text{MnBr}(\text{azpy})(\text{CO})_3]$ (azpy: 2-fenilazopiridina) ha mostrado una alta citotoxicidad frente a las líneas celulares tumorales MDA-MB-231 (cáncer de mama) y HeLa (cáncer de útero), como consecuencia de su fotoactivación con luz visible.^[205] Asimismo, se ha demostrado que lociones del CORM-2 ($[\text{Ru}_2\text{Cl}_4(\text{CO})_6]$) son capaces de disminuir el crecimiento de un fotocarcinoma inducido en ratones sin pelo, así como la inflamación aguda crónica que éste provoca.^[145]

Por otra parte, el monóxido de carbono puede actuar como agente citoprotector sobre células sanas.^[113] Debe destacarse que esta acción citoprotectora del CO sería muy útil para el tratamiento de los efectos secundarios derivados de los tratamientos quimioterapéuticos (cardiotoxicidad, nefrotoxicidad, etc.). En este sentido, se han publicado diversos trabajos de investigación sobre el efecto de la administración de CO junto al fármaco antitumoral doxorrubicina, que induce cardiotoxicidad como efecto secundario. Estos estudios han demostrado que la aplicación del monóxido de carbono no sólo incrementa la viabilidad de las células sanas (cardiomiocitos), sino que sensibilizaba a las células tumorales frente a la doxorrubicina, mejorando hasta 100 veces su efectividad.^[206–208] Otro ejemplo de acción dual agente antitumoral-CO es el caso del cisplatino (*cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$). Este fármaco es uno de los más empleados en los tratamientos quimioterapéuticos en la actualidad. Sin embargo, su administración a los pacientes genera diversos efectos secundarios, como nefrotoxicidad. En este sentido, Motterlini *et al.* demostraron que la aplicación dual de cisplatino junto al CORM-3 disminuía la citotoxicidad del complejo frente a células de riñón sanas (LLC-PK1).^[209]

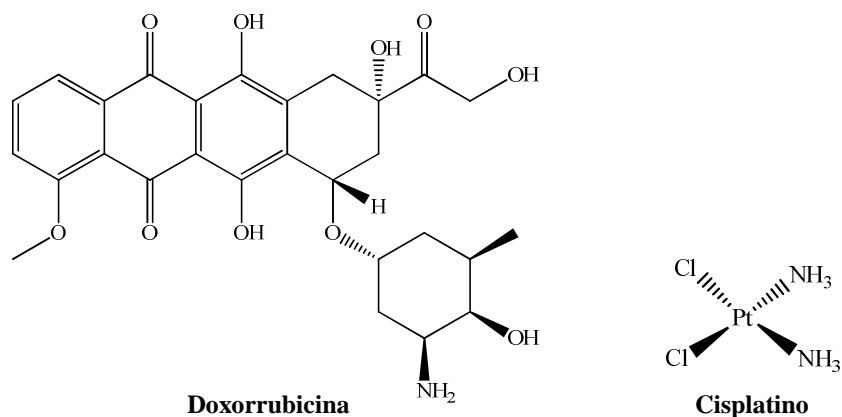


FIGURA 95: FÁRMACOS ANTITUMORALES ESTUDIADOS EN COMBINACIÓN CON MONÓXIDO DE CARBONO O CORMs.

De acuerdo con estos antecedentes, como prueba de concepto, decidimos llevar a cabo la incorporación dual del agente antitumoral cisplatino junto al fotoCORM ALF472 en la matriz porosa Al-MCM-41. Debe destacarse que seleccionamos dicha matriz, puesto que el material híbrido ALF472@Al-MCM-41 presenta las características más prometedoras para su uso como material liberador de CO:

- i) En primer lugar, la fotoactivación de este material híbrido con luz visible induce la liberación de monóxido de carbono a una velocidad menor respecto al CORM libre, lo que permitiría un mayor control en la administración de CO.
- ii) Por otra parte, ALF472@Al-MCM-41 es capaz de retener una gran proporción de los fragmentos metálicos (CORMs e iCORMs) en presencia de PBS tanto en oscuridad como bajo irradiación con luz visible, evitando así los riesgos de toxicidad asociados a la lixiviación de dichos fragmentos metálicos al medio fisiológico.
- iii) ALF472@Al-MCM-41 se obtiene como nanopartículas de tamaño homogéneo, lo que permitiría su administración por ruta intravenosa e intraparenteral para una potencial aplicación biomédica. En este sentido, debe destacarse que se ha demostrado que la encapsulación de cisplatino en la matriz análoga MCM-41 favorece la internalización de dicho complejo en

células tumorales de leucemia.^[75] Como consecuencia, el nuevo sistema híbrido podría mejorar el transporte del complejo de platino hacia las células diana. Además, dado que la disociación del enlace Mn-CO puede ser activada bajo irradiación con luz, sería posible controlar la liberación del monóxido de carbono de forma localizada para potenciar su actividad terapéutica en las células diana.

4.4.1. Preparación y caracterización del material híbrido dual

Dado que ambos complejos metálicos (ALF472 y cisplatino) son solubles en agua, decidimos llevar a cabo la encapsulación dual de ambas drogas en un solo paso. Para ello, a una suspensión del material Al-MCM-41 se le adicionó una disolución acuosa de ALF472 (doble exceso estequiométrico respecto a los cationes intercambiables en la matriz) y cisplatino (en proporción molar 1:3 respecto a la cantidad de ALF472), y se mantuvo en agitación durante un día a temperatura ambiente y en oscuridad, para evitar la fotoactivación del CORM (véase Anexo I). El espectro infrarrojo del material híbrido resultante confirma la incorporación del CORM puesto que muestra las señales de *stretching* características de los grupos carbonílicos (ν_{CO} : 2031 y 1925 cm^{-1}). Como en el caso del material ALF472@Al-MCM-41, se produce un ligero desplazamiento de estas señales con respecto al CORM libre (ν_{CO} (ALF472): 2017 y 1895 cm^{-1}), debido al efecto del confinamiento del complejo en las cavidades de la matriz porosa (Figura 96).

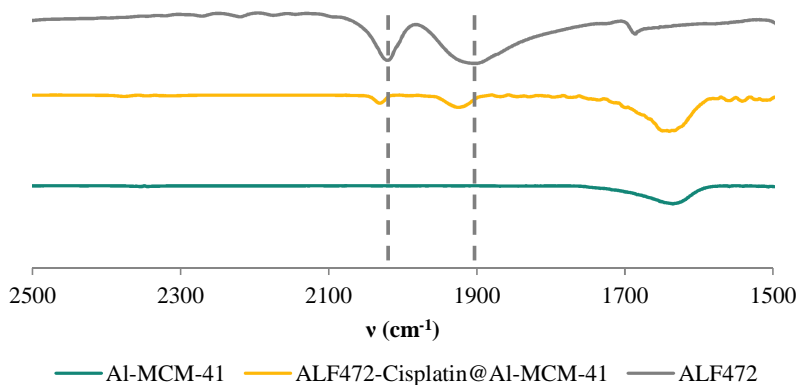


FIGURA 96: ESPECTRO INFRARROJO DE LOS COMPUESTOS Al-MCM-41(LÍNEA TURQUESA), ALF472-CISPLATINO@AL-MCM-41 (LÍNEA AMARILLA) Y ALF472 (LÍNEA GRIS).

Por otro lado, con objeto de confirmar la incorporación del cisplatino en las cavidades de la matriz porosa, se registró un mapa de distribución elemental de las partículas mediante EDX al mismo tiempo que se tomaron imágenes del material mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). La Figura 97 confirma que el proceso de encapsulación no afecta al tamaño ni a la morfología de las partículas, puesto que estas presentan un diámetro medio (47.8 ± 14.1 nm) del mismo orden que el observado en las partículas de la matriz sin cargar (diámetro medio: 64.0 ± 13.6 nm).

Además, como en el caso del material ALF742@Al-MCM-41, se estudió el comportamiento hidrodinámico de ALF472-Cisplatino@Al-MCM-41 en PBS con el objetivo de evaluar la estabilidad de las nanopartículas en suspensión para una potencial aplicación biológica. Para ello, se llevaron a cabo estudios de dispersión dinámica de la luz (DLS) en suspensiones de 5 mg de ALF472-Cisplatino@Al-MCM-41 en 10 ml de PBS (véase Anexo I). En este caso, los resultados ponen de manifiesto que el material híbrido ALF472-Cisplatino@Al-MCM-41 muestra una mayor agregación de las partículas en medio fisiológico (335.5 ± 49.9 nm) que el sistema ALF472@Al-MCM-41 (112 ± 33 nm). Sin embargo, los valores de potencial z observados son similares de (-21 ± 1 mV y -23 ± 1 mV, respectivamente). Como se discutió en la sección 4.1, el tamaño de las partículas de ALF472-Cisplatino@Al-MCM-41 en PBS es de un orden de magnitud adecuado para una potencial aplicación biológica puesto que se ha demostrado que las nanopartículas de sílices mesoporosas con tamaños entre 50-300 nm permiten una fácil endocitosis en las células vivas sin que se produzca una toxicidad significativa.^[204]

Por su parte, la Figura 98 muestra una distribución homogénea de los elementos esperados (Si, Al, Mn y Pt), confirmando el éxito en la incorporación dual de ambas drogas.

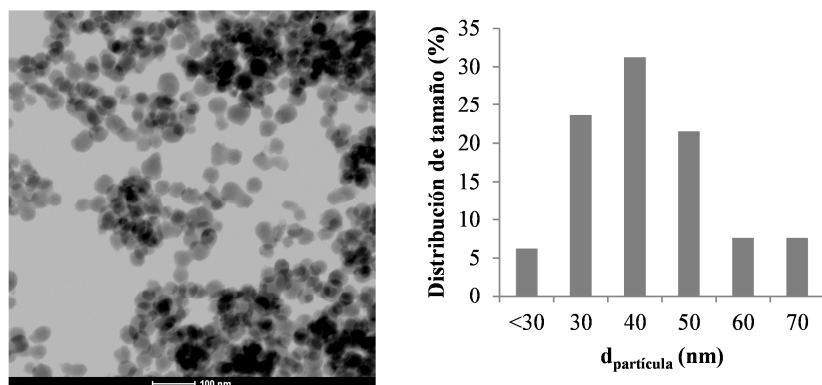


FIGURA 97: IMÁGENES DEL MATERIAL ALF472-CISPLATINO@Al-MCM-41 OBTENIDAS MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA.

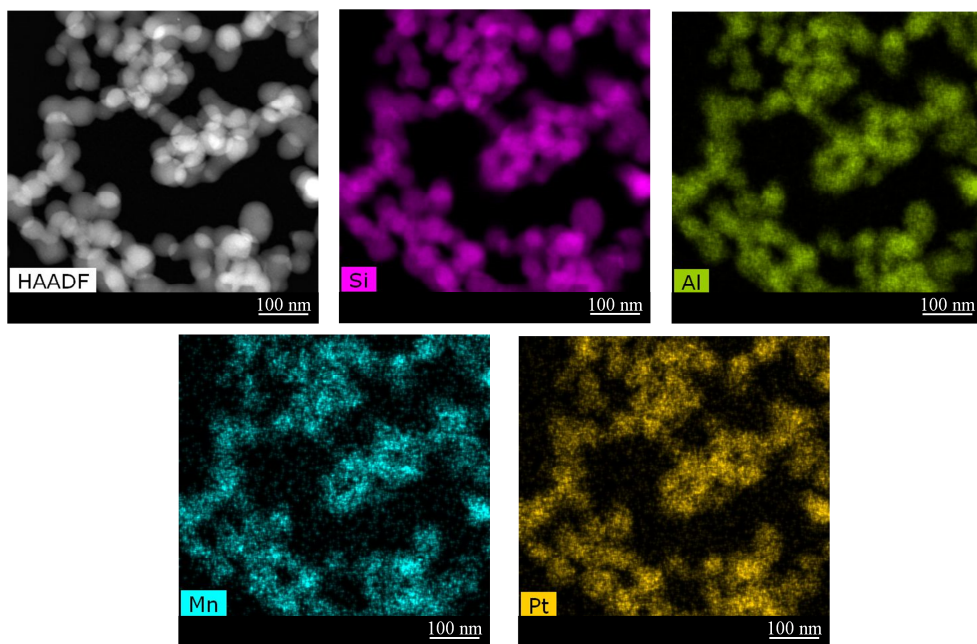


FIGURA 98: MAPA DE DISTRIBUCIÓN ELEMENTAL DEL MATERIAL ALF472-CISPLATINO@Al-MCM-41 OBTENIDO MEDIANTE EDX PARA LOS ELEMENTOS: SILICIO (ROSA), ALUMINIO (VERDE) Y MANGANESO (AZUL) Y PLATINO (AMARILLO).

Los espectros de EDX junto con los resultados obtenidos mediante análisis elemental y termogravimetría permitieron cuantificar la cantidad incorporada de ambos complejos (ALF472: 0.45 mmol g^{-1} , cisplatino: 0.12 mmol g^{-1}) (véase Anexo I). En relación al CORM, la carga obtenida es muy similar a la del material ALF472@Al-MCM-41 (0.48 mmol g^{-1}), demostrando que la co-encapsulación de cisplatino no

influye en el proceso de intercambio iónico. Por el contrario, cuando la encapsulación del complejo de platino se lleva a cabo en ausencia del CORM, la cantidad de dicha droga incorporada en la matriz porosa disminuye de forma sustancial ($0.038 \text{ mmol g}^{-1}$). Este resultado indica que la presencia de ALF472 favorece la incorporación del cisplatino en Al-MCM-41. Para explicar este fenómeno deben tenerse en cuenta los estudios publicados por Delgado *et al.* sobre la encapsulación de cisplatino en la sílice mesoporosa MCM-41, así como en la matriz porosa funcionalizada con grupos amino MCM-41-NH₂.^[73] Según estas investigaciones, la matriz MCM-41 es capaz de incorporar 0.029 mmol de cisplatino por gramo de material. Dicha carga es del mismo orden de magnitud que la que nuestro grupo de investigación ha conseguido incorporar en el material análogo Al-MCM-41 ($0.038 \text{ mmol g}^{-1}$). Por tanto, este resultado confirma que la presencia de grupos aluminato en el esqueleto de la sílice no modifica las interacciones cisplatino-matriz y, por tanto, no afecta al proceso de encapsulación de la droga. Sin embargo, la funcionalización de la sílice MCM-41 con grupos amino favorece la incorporación del agente antitumoral ($0.204 \text{ mmol g}^{-1}$ de MCM-41-NH₂), probablemente debido a la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos amino del esqueleto estructural y los ligandos amino y cloruro del complejo de platino. Por tanto, de todo lo anterior se deduce que, cuando tiene lugar la encapsulación dual de cisplatino y ALF472 en Al-MCM-41, los grupos amino del ligando triazaciclononano del CORM podrían dar lugar a interacciones por enlaces de hidrógeno con los grupos cloruro del cisplatino, favoreciendo la encapsulación de éste en los canales de la matriz porosa.

4.4.2. Estudio de la liberación de CO

Una vez caracterizado el compuesto ALF472-cisplatino@Al-MCM-41, se procedió a estudiar su comportamiento como material liberador de monóxido de carbono mediante el ensayo de la mioglobina. En primer lugar, al igual que en los casos descritos anteriormente, se incubó el material híbrido en PBS a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y se estudió la cinética de liberación de CO en un periodo de tiempo de 24 horas bajo irradiación con luz visible blanca (lámpara fluorescente, flujo luminoso 600 lm , temperatura de color 4000 K , véase Anexo I). Los resultados recogidos en la Figura 99 muestran que

ALF472-cisplatino@Al-MCM-41 libera una menor cantidad de CO (0.11 mmol de CO por mmol de CORM incorporado) que el sistema híbrido ALF472@Al-MCM-41 (0.28 mmol de CO por mmol de CORM incorporado). Además, el primero tiene una cinética de liberación ligeramente más rápida puesto que alcanza el máximo de liberación antes que ALF472@Al-MCM-41 (480 min vs 600 min). La menor capacidad de liberación de monóxido de carbono observada para el sistema híbrido ALF472-cisplatino@Al-MCM-41 podría deberse a reacciones secundarias de tipo redox en las que estuviera involucrado el CO producido. En este sentido, parte del monóxido de carbono liberado podría actuar como agente reductor frente a los iones Pt(II) del cisplatino, oxidándose y evitando ser cuantificado.

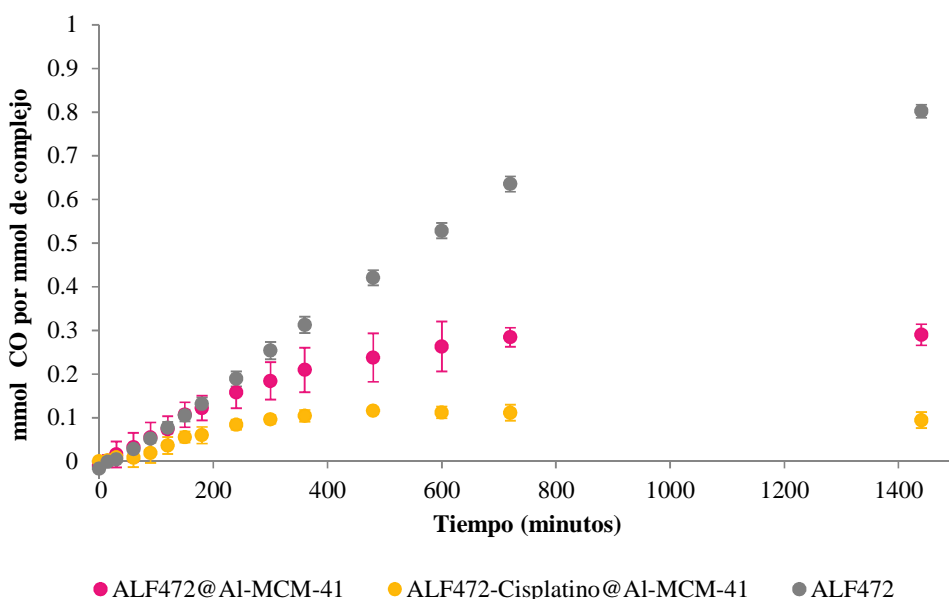


FIGURA 99: CINÉTICAS DE LIBERACIÓN DE MONÓXIDO DE CARBONO OBTENIDOS AL IRRADIAR CON LUZ VISIBLE LOS COMPUESTOS ALF472 (GRIS), ALF472@Al-MCM-41(ROSA) Y ALF472-CISPLATINO@Al-MCM-41 (AMARILLO). CONDICIONES EXPERIMENTALES: ATMÓSFERA DE ARGÓN, PBS, 37 °C, 10 μ M DE ALF472, 10 μ M DE MIOGLOBINA

Como consecuencia de este resultado, se decidió estudiar la cinética de liberación de CO del material dual irradiándolo con luz ultravioleta con el objetivo de comprobar si aumentaba la cantidad de CO liberado. Además, debe destacarse que el empleo de un estímulo más específico, tal como la luz ultravioleta, para activar la liberación de CO

puede ser beneficioso para ciertas aplicaciones en las que se requiera una liberación de CO controlada en cierta diana. Por tanto, teniendo en cuenta que ALF472 presenta un máximo de absorción a 345 nm, se suspendió el material dual híbrido en PBS a 37 °C y se irradió a 365 nm para estudiar la liberación de CO (véase Anexo I). Como se muestra en la Figura 100, la cinética de este proceso es mucho más rápida que para los materiales irradiados con luz visible, confirmando una fotoactivación más eficiente del enlace M-CO con luz ultravioleta. Como se puede observar, el material dual libera una mayor cantidad de CO (0.59 mmol de CO por mmol de [ALF472]⁺) y, además, alcanza el máximo de liberación tan solo después de 120 minutos (frente a los 480 minutos bajo irradiación con luz visible). Sin embargo, debe destacarse que dicha cinética de liberación de CO sigue siendo más lenta que la del CORM libre irradiado con la misma luz ultravioleta (Figura 100), tal y como ocurría bajo irradiación con luz visible.

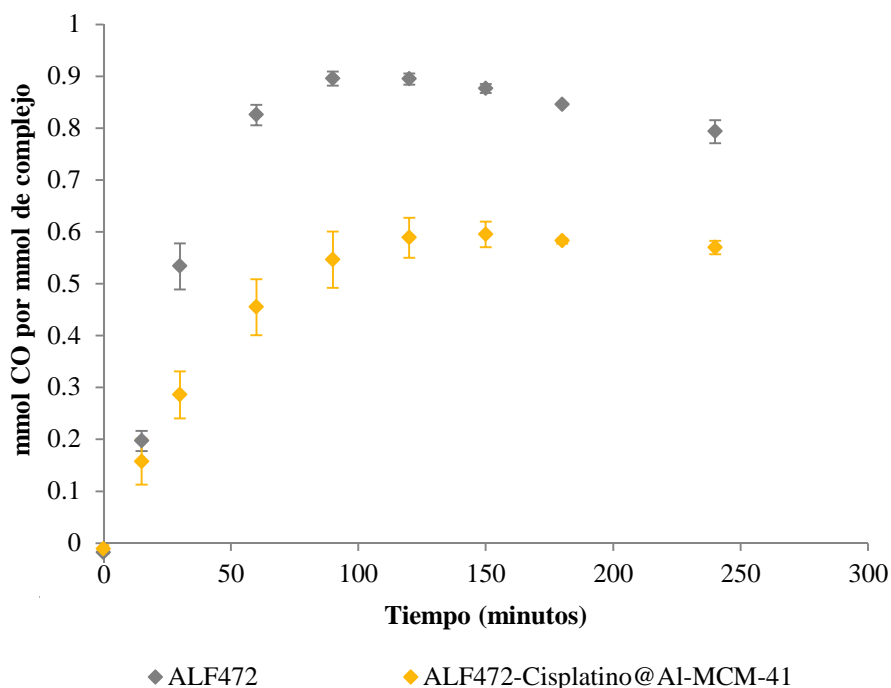


FIGURA 100: CINÉTICAS DE LIBERACIÓN DE MONÓXIDO DE CARBONO OBTENIDOS AL IRRADIAR CON LUZ ULTRAVIOLETA (λ : 365 nm) LOS COMPUESTOS, ALF472 (GRIS) Y ALF472-CISPLATINO@Al-MCM-41 (AMARILLO). CONDICIONES EXPERIMENTALES: ATMÓSFERA DE ARGÓN, PBS, 37 °C, 10 μ M DE ALF472, 10 μ M DE MIOGLOBINA.

4.4.3. Estudio de la lixiviación de fragmentos metálicos

Por otra parte, con el objetivo de estudiar la potencial lixiviación de fragmentos metálicos potencialmente tóxicos (CORM o iCORM) por parte del material ALF472-cisplatino@Al-MCM-41 en medio fisiológico simulado, se suspendió dicho material en PBS a 37 °C y se irradió con luz visible durante 24 y 72 horas o con luz ultravioleta durante 30 minutos para inducir la liberación de CO. A continuación, se recogió el sobrenadante y se determinó la concentración de metales (Pt y Mn), a distintos tiempos, mediante ICP-MS (véase Anexo I).

Los resultados obtenidos tanto al irradiar con luz visible como ultravioleta son similares. Se observa que sólo se lixivian un 10.9 o un 12.4 % de manganeso desde la matriz tras 24 horas de incubación bajo radiación visible o 30 minutos bajo luz ultravioleta, respectivamente. Además, desde ese momento, en ambos casos, no se aprecia un aumento significativo en la difusión de las moléculas de CORM o iCORM al medio en las siguientes 48 horas. Por tanto, después de 48 horas de incubación, se siguen reteniendo el 88.8 % y el 86.4 % de los fragmentos metálicos encapsulados para el sistema fotoactivado mediante luz visible y luz ultravioleta, respectivamente. Estos valores son ligeramente superiores al obtenido para el sistema híbrido ALF472@Al-MCM-41 (79.2 %). En este sentido, como se mencionó anteriormente, parece que la interacción por enlaces de hidrógeno de las moléculas de cisplatino co-encapsuladas con el compuesto ALF472 podrían favorecer la retención de las fracciones metálicas (CORMs e iCORMs) en la matriz porosa.

4.4.4. Estudio de liberación de la metalodroga cisplatino

En relación a la liberación de cisplatino desde el sistema ALF472-cisplatino@Al-MCM-41, tanto al irradiar con luz visible como a 365 nm, se observa la rápida desorción de una pequeña fracción de este compuesto después de 6 horas de incubación en PBS (5.3 % y 7.0 %, respectivamente). Además, sólo se llega a liberar un 8.8 % del mismo incluso después de 48 horas de incubación bajo irradiación con luz ultravioleta. Por su parte, cuando ALF472-cisplatino@Al-MCM-41 se incuba con luz blanca durante 72 horas se alcanza una desorción similar de cisplatino (7.4 %) que en el caso anterior (véase anexo I). Esta baja tasa de liberación puede deberse a que el cisplatino

esté fuertemente retenido en las cavidades de la matriz porosa debido a la formación de enlaces de hidrógeno con el complejo ALF472. En este sentido, el material cisplatino@MCM-41-NH₂ desarrollado por Delgado *et al.* muestra una tendencia similar, con una tasa de desorción de cisplatino inferior a la del sistema no funcionalizado, cisplatino@MCM-41 (20 y 57 %, respectivamente tras 150 horas de incubación).^[73] Debe destacarse, que la baja tasa de liberación de cisplatino por parte de ALF472-cisplatino@Al-MCM-41, puede conllevar una baja potencial actividad antitumoral de este sistema híbrido. Por tanto, este material debe considerarse una prueba de concepto de la posibilidad de desarrollar CORMAs avanzados constituidos por un cóctel de fármacos con actividad terapéutica dual.

5. Conclusiones

En este capítulo, se ha demostrado la utilidad de la estrategia de intercambio iónico en la preparación de nuevos materiales liberadores de monóxido de carbono basados en la combinación del fotoCORM catiónico ALF472 con diferentes matrices inorgánicas porosas aniónicas.

Por una parte, se ha conseguido la incorporación del compuesto ALF472 en las cavidades de la red metalorgánica aniónica bio-MOF-1 (0.25 mmol de ALF472 incorporado por gramo de material). Sin embargo, la baja estabilidad de este MOF en medio acuoso conlleva su degradación total en pocas horas, lo que provoca la rápida lixiviación de los fragmentos metálicos encapsulados (CORMs) así como una aceleración en la liberación de la molécula bioactiva (CO), como consecuencia de la interacción del CORM con las moléculas de adenina, resultantes de la degradación del esqueleto del MOF. Por tanto, este sistema no presenta ninguna mejora significativa con respecto a la utilización del CORM original.

En la búsqueda de materiales liberadores de CO con una mayor estabilidad en medio fisiológico, se han preparado dos nuevos CORMAs mediante la incorporación de ALF472 en las cavidades de las sílices mesoporosas funcionalizadas MCM-41-SO₃H y SBA-15-SO₃H (cantidad de ALF472 incorporada: 0.53 mmol g⁻¹ y 0.22 mmol g⁻¹, respectivamente). Debe destacarse que es bien conocida la biocompatibilidad, así como

la elevada estabilidad de las sílices mesoporosas en medio fisiológico. En este caso, los dos nuevos CORMAs preparados presentan un perfil cinético similar al CORM libre aunque muestran una liberación de CO un poco más lenta. Este resultado puede explicarse teniendo en cuenta la rápida lixiviación de un gran porcentaje del CORM al medio fisiológico como consecuencia de los procesos de intercambio iónico que tienen lugar entre el ALF472⁺ encapsulado y los iones presentes en el PBS (tasa de intercambio iónico del 85 % tras una hora de incubación en oscuridad para ALF472@MCM-41-SO₃H y del 75 % para ALF472@SBA-15-SO₃ tras 24 horas de incubación en las mismas condiciones). Por tanto, el CO liberado se debe, principalmente, a la fotoactivación de las moléculas de ALF472 desorbidas.

A continuación, se empleó como sistema anfitrión la sílice mesoporosa funcionalizada Al-MCM-41 con el objetivo de conseguir interacciones electroestáticas huésped-anfitrión más fuertes que en los casos anteriores y, por tanto, conseguir una menor lixiviación de los fragmentos metálicos, potencialmente tóxicos, en el medio fisiológico. De esta forma, el nuevo CORMA ALF472@Al-MCM-41 ha demostrado presentar una gran eficiencia de encapsulación (0.48 mmol ALF472 por gramo de material), una elevada estabilidad en medio fisiológico, una liberación de CO más controlada que en el CORM libre, así como una mayor capacidad de retención de los fragmentos metálicos (CORMs e iCORMs) que los híbridos funcionalizados con grupos alquilsulfónicos (tasa de lixiviación de fragmentos metálicos del 14.3 % tras 6 días de incubación en PBS y oscuridad respecto al 85 % observado para el material ALF472@MCM-SO₃ tras una hora de incubación en las mismas condiciones). Además, es importante destacar, que a diferencia de los CORMAs comentados anteriormente, el sistema ALF472@Al-MCM-41 está constituido por partículas de tamaño nanométrico, cuyas suspensiones son estables en PBS y que, por tanto, son adecuadas para una potencial administración intravenosa. Todas estas características, ponen de manifiesto las ventajas del uso de CORMAs para la liberación de CO con fines terapéuticos en comparación con los CORMs: ralentización significativa de la liberación de CO y retención de fragmentos metálicos potencialmente tóxicos.

Por último, dado que la matriz Al-MCM-41 es el sistema transportador más prometedor entre los materiales porosos preparados en este capítulo, se ha empleado

como sistema anfitrión para demostrar que es posible la incorporación simultánea y eficiente de dos drogas (ALF472 y cisplatino) en sus cavidades (cantidad de droga encapsulada: ALF472 = 0.45 mmol g⁻¹, cisplatino = 0.12 mmol g⁻¹). El nuevo sistema dual presenta una retención de los CORMs e iCORMs similar a ALF472@Al-MCM-41. Sin embargo, su capacidad para liberar CO bajo activación con luz visible disminuye con respecto a ALF472@Al-MCM-41. Además, este sistema presenta una tasa de liberación de cisplatino baja, lo que puede conllevar una baja actividad antitumoral (tasa de liberación de cisplatino del 8.8 % tras 48 horas de incubación en PBS). Por tanto, este material híbrido dual se puede considerar una prueba de concepto de la posibilidad de desarrollar CORMAs avanzados con actividad terapéutica dual.

CONCLUSIONES

En esta Tesis Doctoral, se ha demostrado que es posible preparar nuevos materiales liberadores de CO (CORMAs) basados en la combinación de materiales inorgánicos porosos, en concreto polímeros de coordinación porosos (MOFs) y sílices mesoporosas (SMPs), con moléculas liberadoras de monóxido de carbono (CORMs).

En el Capítulo II, se ha investigado el efecto que el tamaño y la morfología de partícula de la red metalorgánica tienen sobre las propiedades finales que exhibe el CORMA preparado. En concreto, se han preparado CORMAs basados en el MOF biocompatible CYCU-3 ($[Al(OH)(SDC)]_n$, ácido 1,2-difeniletlenil-4,4'-dicarboxílico) y el CORM ALF794 ($[Mo(CNCMe_2CO_2H)_3(CO)_3]$, $(CNCMe_2CO_2 = 2\text{-isociano-2-metilpropanoico})$). Además, se ha demostrado que modificando las condiciones de síntesis del CYCU-3 (concentración de reactivos y proporción modulador/ligando) se pueden obtener materiales con tamaño y morfología de partícula muy diferentes (desde nanopartículas de ~100 nm pseudoesféricas a partículas alargadas de varias micras) e incluso con una estructura distorsionada respecto al CYCU-3 original. Este resultado es de gran importancia puesto que nos ha permitido comprobar que la estructura, el tamaño y la morfología de la matriz porosa influyen decisivamente en las propiedades como CORMAs de los materiales resultantes, afectando a su estabilidad, capacidad para incorporar la prodroga, cinética de liberación de CO y retención de los fragmentos metálicos. De hecho, se ha confirmado que sólo uno de los materiales híbridos sintetizados (ALF794@CYCU-3 50_50) se comporta como un verdadero CORMA puesto que: *i*) incorpora una elevada cantidad de ALF794 gracias al efecto del confinamiento de estas moléculas en sus cavidades; *ii*) ralentiza la liberación de CO en medio fisiológico simulado en comparación con el CORM libre; y, *iii*) retiene la mayor parte de los fragmentos metálicos, CORMs e iCORMs (coligandos resultantes del proceso de decarbonilación), en sus cavidades, evitando los potenciales efectos tóxicos derivados de su lixiviación. Por tanto, este material podría considerarse prometedor para una potencial aplicación terapéutica aunque debe tenerse en cuenta que el tamaño de sus partículas, de varias micras, no lo hacen apto para algunas vías de administración (ej. administración intravenosa).

Por otra parte, en el Capítulo III se ha preparado por primera vez un CORMA, basado en un material inorgánico poroso, en una sola etapa. Esta estrategia de síntesis-encapsulación en un único paso presenta numerosas ventajas con respecto a la metodología tradicional (preparación, activación y encapsulación), minimizando el número de pasos necesarios y el tiempo de manipulación y evitando, en definitiva, la degradación parcial del carbonilo metálico y/o su fotoactivación accidental. En concreto, se ha llevado a cabo la encapsulación *in situ* del CORM ALF794 ($[\text{Mo}(\text{CNMe}_2\text{CO}_2\text{H})_3(\text{CO})_3]$, ($\text{CNMe}_2\text{CO}_2 = 2\text{-isociano-2-metilpropanoico}$) durante la preparación del polímero de coordinación poroso biocompatible ZnCPO $[\text{Zn}_2(\text{dhtp})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (H_4dhtp : ácido 2,5-dihidroxitereftálico). Además y con objeto de conseguir un material basado en el MOF ZnCPO que exhiba también mesoporos, en los que albergar satisfactoriamente el CORM ALF794, se ha seguido la metodología denominada “nanofusión mediante perturbación”. La optimización de la estrategia de síntesis-encapsulación propuesta ha puesto de manifiesto que las incorporaciones del ALF794 a la matriz son más eficientes cuanto menores son las proporciones de CORM empleadas; además, estos materiales resultan ser más cristalinos y puros. A tenor de estos resultados, el híbrido ALF794@ZnCPO_0.2, con 0.28 mmol de ALF794 incorporado por gramo de material, ha sido seleccionado como el candidato más prometedor. Este nuevo CORMA exhibe una gran estabilidad en medio fisiológico simulado HEPES, al mismo tiempo que es capaz de retener la mayor parte de los fragmentos metálicos (CORMs e iCORMs) encapsulados, minimizando la potencial toxicidad asociada a este tipo de compuestos. Sin embargo, para conseguir que actúe como verdadero material liberador de CO, es necesario utilizar un estímulo más energético (luz ultravioleta) que el usado para la activación de los materiales preparados en el capítulo anterior, por lo que su aplicación práctica real sería más limitada.

Por último, en el Capítulo IV, se ha demostrado que es posible utilizar una estrategia de intercambio iónico para la preparación de nuevos CORMAs basados en el fotoCORM catiónico ALF472 ($[\text{Mn}(\text{tacn})(\text{CO})_3]\text{Br}$, ($\text{tacn} = 1,4,7\text{-triazaciclonano}$) y en diferentes matrices inorgánicas porosas biocompatibles aniónicas, en concreto, el PCP bio-MOF-1 ($(\text{NH}_2(\text{CH}_3)_2)_2[\text{Zn}_8(\text{adeninato})_4(\text{BPDC})_6]$ (BPDC: ácido bifenil-4,4'-dicarboxílico) y las sílices mesoporosas funcionalizadas SBA-15-SO₃H, MCM-41-

SO₃H y Al-MCM-41. Respecto al material híbrido basado en el bio-MOF-1, debe destacarse que su elevada inestabilidad en el medio fisiológico simulado, conduce a la rápida lixiviación del CORM al medio y, por tanto, descarta este material como un potencial CORMA. Por otra parte, se ha comprobado que, aunque las sílices funcionalizadas con grupos alquilsulfónicos son muy estables químicamente, los materiales híbridos derivados de ellas tienen una baja capacidad para retener el CORM liberándolo prematuramente debido a un proceso de intercambio iónico con los iones presentes en el medio fisiológico. Como consecuencia, estos materiales no se comportan como verdaderos CORMAs puesto que no proporcionan las ventajas esperables del confinamiento del CORM en una matriz porosa. Este resultado pone de manifiesto que la estrategia de intercambio iónico para preparar CORMAs puede no resultar ventajosa si las interacciones anfitrión-huésped no son lo suficientemente fuertes como para evitar el posterior intercambio del CORM catiónico con los iones del medio fisiológico. Finalmente, el material híbrido ALF472@Al-MCM-41 se puede considerar el sistema más prometedor de los preparados en este capítulo. ALF472@Al-MCM-41 presenta una gran eficiencia de encapsulación, una elevada estabilidad en medio fisiológico, una liberación de CO más controlada que el CORM libre, así como una mayor capacidad de retención de los fragmentos metálicos (CORMs e iCORMs) que los híbridos funcionalizados con grupos alquilsulfónicos. Además, es importante destacar, que el sistema ALF472@Al-MCM-41 está constituido por partículas de tamaño nanométrico que dan lugar a suspensiones estables en PBS y que, por tanto, serían adecuadas para una potencial administración intravenosa. Asimismo, se ha probado que es posible incorporar de forma eficiente dos drogas, ALF472 y cisplatino, en la matriz Al-MCM-41. Aunque este material dual presenta una serie de limitaciones debido a su baja capacidad de liberación de ambas moléculas bioactivas, puede considerarse una prueba de concepto de la posibilidad de desarrollar CORMAs con actividad terapéutica múltiple.

Las conclusiones que se desprenden de esta Tesis Doctoral son una muestra de la potencialidad de los sólidos inorgánicos porosos en el desarrollo de sistemas para el transporte y la administración de moléculas bioactivas. Además, teniendo en cuenta que los materiales híbridos CORM@red metalorgánica preparados en esta Tesis Doctoral

CONCLUSIONES

constituyen, hasta donde alcanza nuestro conocimiento, los primeros ejemplos del uso de MOFs como plataformas para el desarrollo de CORMAs, estos estudios serían el punto de partida de futuras investigaciones que proporcionarían nuevos dispositivos para la liberación controlada y segura del gas terapéutico CO.

CONCLUSIONS

In this PhD Thesis, we have shown that new CO-releasing materials (CORMAs) can be prepared by combining porous inorganic materials, namely metal-organic frameworks (MOFs) and mesoporous silicas (SMPs), with CO-releasing molecules (CORMs).

In Chapter II, the influence of MOF particle size and morphology over the properties of the resulting CORMA have been investigated. In particular, we have successfully prepared three new CORMAs based on the biocompatible MOF CYCU-3 [Al(OH)(SDC)] (H₂SDC: 4,4'-Stilbenedicarboxylic acid) and the CORM ALF794 ([Mo(CNCMe₂CO₂H)₃(CO)₃] (CNCMe₂CO₂H = 2-isocyano-2-methylpropanoic acid). In addition, it has been shown that modification of certain conditions during the synthesis of CYCU-3 (reagent concentration and modulator/ligand ratio) lead to materials with different particle size and morphology (from pseudo-spherical nanoparticles of ~100 nm to elongated particles of several micrometers) and, even with a distorted structure, if compared with the original CYCU-3. This result allowed us to demonstrate that the structure, size and morphology of the porous matrix decisively determine the properties of the resulting CORMAs in terms of chemical stability, CORM loading, CO-releasing kinetics and retention of the metal fragments. In fact, only one of the synthesized hybrid materials (ALF794@CYCU-3 50_50) behaves as a real CORMA since: *i*) it shows a high loading of ALF794 as a consequence of the confinement of the molecules in its cavities; *ii*) it slows the CO delivery rate in comparison to the pristine CORM; and *iii*) it keeps trapped most of the metal fragments, CORMs and iCORMs (coligand-metal fragments), reducing the toxicity risk derived from their leaching. Therefore, ALF794@CYCU-3 50_50 may be considered a promising material as a potential therapeutic agent. However, its particle size in the micrometer range prevents its administration through certain routes (e.j. intravenous administration).

On the other hand, in Chapter III, we have prepared for the first time a CORMA (based on a porous inorganic material) in a one-pot synthesis. This one-step synthesis-encapsulation strategy has numerous advantages over the traditional methodology

(MOF synthesis, MOF activation and encapsulation) because it decreases the number of steps and the operation time and, therefore, it minimizes the CORM degradation risk. In particular, we have carried out the encapsulation of the CORM ALF794 $[\text{Mo}(\text{CNCMe}_2\text{CO}_2\text{H})_3(\text{CO})_3]$ ($\text{CNCMe}_2\text{CO}_2\text{H} = 2\text{-isocyano-2-methylpropanoic acid}$) during the synthesis of the biocompatible metal-organic framework ZnCPO $[\text{Zn}_2(\text{dhtp})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (H_4dhtp : 2,5-dihydroxyterephthalic acid). In addition, we have used the “nanofusion by perturbation” methodology in order to obtain a ZnCPO material with suitable pore size (mesopores) where encapsulate the CORM. Regarding the optimization of the encapsulation-synthesis process, we have demonstrated that the lower CORM/MOF ratios are used, the most efficient encapsulations are achieved, resulting in more crystalline and pure materials. Taking into account these results, we have selected ALF794@ZnCPO_0.2 (ALF794 loading: 0.28 mmol of ALF794 per gram of material) as the most promising material among all prepared in this chapter. This new CORMA has a high stability in simulated physiological buffer HEPES and is able to keep trapped most loaded metal fragments (CORMs and iCORMs), reducing the toxicity risk. However, it only releases CO under ultraviolet irradiation. Therefore, its clinical application is limited because of the detrimental effects of UV light on biological targets.

Finally, in Chapter IV, it has been shown the preparation of new CORMAs based on the cationic photoCORM ALF472 $[\text{Mn}(\text{tacn})(\text{CO})_3]\text{Br}$, ($\text{tacn} = 1,4,7\text{-triazacyclonane}$) and different anionic biocompatible porous inorganic matrices, namely, bio-MOF-1 $(\text{NH}_2(\text{CH}_3)_2)_2[\text{Zn}_8(\text{adeninate})_4(\text{BPDC})_6]$ (BPDC: 4,4'-biphenyl-dicarboxylic acid) and the functionalized mesoporous silicas SBA-15-SO₃H, MCM-41-SO₃H and Al-MCM-41 by means of a simple ionic exchange strategy. Regarding the hybrid material based on bio-MOF-1, it should be noted that its high instability in simulated physiological conditions leads to the rapid leaching of the CORM. Therefore, we have discarded this material as a potential CORMA. On the other hand, we have found that hybrid materials based on alkylsulfonic functionalized silicas show a low capacity to retain the CORM within their cavities in spite of their high stability in physiological media. In this case, the CORM leaching is due to ion exchange processes among loaded ALF472⁺ and the ions present on physiological media. Consequently, these materials do not

behave like true CORMAs since they do not provide the expected advantages of the CORM confinement in a porous matrix. These results bring to light that the ion exchange strategy is only useful if the host-guest interactions are stronger enough to prevent the loaded CORM exchange with the ions of the physiological media. Finally, ALF472@Al-MCM-41 can be considered as the most promising system prepared in this chapter. Worthy of note this hybrid material is stable in physiological media and it has a high ALF472 loading. Moreover, ALF472@Al-MCM-41 shows a more controlled CO release than the pristine CORM while keeping trapped the major part of the metal fragments. In addition, it should be highlighted that ALF472@Al-MCM-41 can be isolated as nanoparticles leading to stable suspensions in PBS. Therefore, this material would be suitable for a potential intravenous administration. In addition, we have proved that it is possible to efficiently incorporate two different drugs, ALF472 and cisplatin, into Al-MCM-41 matrix. However, this hybrid material possesses certain limitations due to its low releasing capacity of both bioactive molecules. Therefore, ALF472@Al-MCM-41 must be considered a proof of concept of the feasibility of developing CORMAs with multiple therapeutic activities.

In summary, in this PhD Thesis, we have demonstrated that inorganic porous materials are good candidates for the transport and delivery of bioactive molecules. In addition, considering that the hybrid materials CORM@MOF prepared in this PhD Thesis are, to the best of our knowledge, the first examples of the use of MOFs as platforms for the development of CORMAs, these studies pave the way for further research that may lead to new devices for a controlled and safe release of therapeutic CO.

**REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

-
- [1] W. Sneader, *BMJ* **2000**, *321*, 1591-1594.
- [2] N. C. Lloyd, H. W. Morgan, B. K. Nicholson, R. S. Ronimus, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, *44*, 941.
- [3] K. K. Jain, *Methods Mol. Biol.* **2008**, *437*, 1.
- [4] Y. W. Chien, S. Lin, *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*; Swarbrick, J., Ed.; Third.; CRC Press, 2006.
- [5] Y.-L. Luo, Y.-S. Shiao, Y.-F. Huang, *ACS Nano* **2011**, *5*, 7796.
- [6] K. K. Coti, M. E. Belowich, M. Liong, M. W. Ambrogio, Y. A. Lau, H. A. Khatib, J. I. Zink, N. M. Khashab, J. F. Stoddart, *Nanoscale* **2009**, *1*, 16.
- [7] R. Liang, M. Wei, D. G. Evans, X. Duan, *Chem. Commun. (Camb)*. **2014**, *50*, 14071.
- [8] W. X. Mai, H. Meng, *Integr. Biol.* **2013**, *5*, 19.
- [9] T. C. Yih, M. Al-Fandi, *J. Cell. Biochem.* **2006**, *97*, 1184.
- [10] N. Maurer, D. B. Fenske, P. R. Cullis, *Expert Opin. Biol. Ther.* **2001**, *1*, 923.
- [11] Y. Barenholz, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2001**, *6*, 66.
- [12] D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, *Nat Nano* **2007**, *2*, 751.
- [13] N. Kamaly, Z. Xiao, P. M. Valencia, A. F. Radovic-Moreno, O. C. Farokhzad, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2971.
- [14] P. Horcajada, R. Gref, T. Baati, P. K. Allan, G. Maurin, P. Couvreur, G. Férey, R. E. Morris, C. Serre, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 1232.
- [15] S. Kitagawa, R. Kitaura, S. Noro, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2004**, *43*, 2334.
- [16] G. Férey, C. Serre, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1380.
- [17] M. Eddaoudi, J. Kim, N. Rosi, D. Vodak, J. Wachter, M. O'Keeffe, O. M. Yaghi, *Science* **2002**, *295*, 469.
- [18] B. F. Hoskins, R. Robson, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5962.
- [19] J. Liu, L. Chen, H. Cui, J. Zhang, L. Zhang, C.-Y. Su, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 6011.
- [20] E. Barea, F. Turra, J. A. Rodríguez Navarro, In *Metal-Organic Frameworks: Applications from Catalysis to Gas Storage*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011; pp. 69–97.
- [21] M. Giménez-Marqués, T. Hidalgo, C. Serre, P. Horcajada, *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *307*, 342.
- [22] W. Li, L. Jin, N. Zhu, X. Hou, F. Deng, H. Sun, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12408.
- [23] J. A. Rood, B. C. Noll, K. W. Henderson, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 5521.
- [24] M. J. Ingleson, J. P. Barrio, J. Bacsá, C. Dickinson, H. Park, M. J. Rosseinsky, *Chem. Commun.* **2008**, 1287.
- [25] S. Diring, S. Furukawa, Y. Takashima, T. Tsuruoka, S. Kitagawa, *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 4531.
- [26] S. Hermes, T. Witte, T. Hikov, D. Zacher, S. Bahnmüller, G. Langstein, K. Huber, R. A. Fischer, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5324.
- [27] A. Ranft, S. B. Betzler, F. Haase, B. V. Lotsch, *CrystEngComm* **2013**, *15*, 9296.
- [28] W. Morris, W. E. Briley, E. Auyeung, M. D. Cabezas, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 7261.
- [29] Y.-J. Zhu, F. Chen, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 6462.
- [30] A. Demessence, P. Horcajada, C. Serre, C. Boissiere, D. Grosso, C. Sanchez, G.

- Ferey, *Chem. Commun.* **2009**, 7149.
- [31] G. Férey, C. Mellot-Draznieks, C. Serre, F. Millange, J. Dutour, S. Surblé, I. Margiolaki, *Science* **2005**, *309*, 2040.
- [32] L.-G. Qiu, Z.-Q. Li, Y. Wu, W. Wang, T. Xu, X. Jiang, *Chem. Commun.* **2008**, 3642.
- [33] O. M. Yaghi, H. Li, T. L. Groy, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9096.
- [34] M. Klimakow, P. Klobes, A. F. Thünemann, K. Rademann, F. Emmerling, *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 5216.
- [35] W. Yuan, A. L. Garay, A. Pichon, R. Clowes, C. D. Wood, A. I. Cooper, S. L. James, *CrystEngComm* **2010**, *12*, 4063.
- [36] W. J. Rieter, K. M. L. Taylor, H. An, W. Lin, W. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9024.
- [37] W. J. Rieter, K. M. L. Taylor, W. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9852.
- [38] K. M. L. Taylor, W. J. Rieter, W. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14358.
- [39] W. J. Rieter, K. M. Pott, K. M. L. Taylor, W. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11584.
- [40] S. Rojas, F. J. Carmona, C. R. Maldonado, P. Horcajada, T. Hidalgo, C. Serre, J. A. R. Navarro, E. Barea, *Inorg. Chem.* **2016**, *55*, DOI: 10.1021/acs.inorgchem.6b00045.
- [41] J. J. Low, A. I. Benin, P. Jakubczak, J. F. Abrahamian, S. A. Faheem, R. R. Willis, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15834.
- [42] N. C. Burtch, H. Jasuja, K. S. Walton, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 10575.
- [43] N. U. Qadir, S. A. M. Said, H. M. Bahaidarah, *Microporous Mesoporous Mater.* **2015**, *201*, 61.
- [44] S. R. Miller, D. Heurtaux, T. Baati, P. Horcajada, J.-M. Greneche, C. Serre, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 4526.
- [45] V. Agostoni, T. Chalati, P. Horcajada, H. Willaime, R. Anand, N. Semiramoth, T. Baati, S. Hall, G. Maurin, H. Chacun, K. Bouchemal, C. Martineau, F. Taulelle, P. Couvreur, C. Rogez-Kreuz, P. Clayette, S. Monti, C. Serre, R. Gref, *Adv. Healthc. Mater.* **2013**, *2*, 1630.
- [46] W. Zhuang, D. Yuan, J.-R. Li, Z. Luo, H.-C. Zhou, S. Bashir, J. Liu, *Adv. Healthc. Mater.* **2012**, *1*, 225.
- [47] C. Kim, S. Diring, S. Furukawa, S. Kitagawa, *Dalt. Trans.* **2015**, *44*, 15324.
- [48] A. C. McKinlay, P. K. Allan, C. L. Renouf, M. J. Duncan, P. S. Wheatley, S. J. Warrender, D. Dawson, S. E. Ashbrook, B. Gil, B. Marszalek, T. Düren, J. J. Williams, C. Charrier, D. K. Mercer, S. J. Teat, R. E. Morris, *APL Mater.* **2014**, *2*.
- [49] M. Ma, H. Noei, B. Mienert, J. Niesel, E. Bill, M. Muhler, R. a. Fischer, Y. Wang, U. Schatzschneider, N. Metzler-Nolte, *Chem. - A Eur. J.* **2013**, *19*, 6785.
- [50] E. Quartapelle-Procopio, S. Rojas, N. M. Padial, S. Galli, N. Masciocchi, F. Linares, D. Miguel, J. E. Oltra, J. A. R. Navarro, E. Barea, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 11751.
- [51] S. Rojas, F. J. Carmona, C. R. Maldonado, E. Barea, J. A. R. Navarro, *New J. Chem.* **2016**, *40*, 5690.
- [52] V. Colombo, C. Montoro, A. Maspero, G. Palmisano, N. Masciocchi, S. Galli, E. Barea, J. A. R. Navarro, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12830.
- [53] S. Rojas, E. Quartapelle-Procopio, F. J. Carmona, M. a. Romero, J. a. R.

- Navarro, E. Barea, *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 2473.
- [54] D. Hirst, T. Robson, *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 411.
- [55] S. Rojas, P. S. Wheatley, E. Quartapelle-Procopio, B. Gil, B. Marszalek, R. E. Morris, E. Barea, *CrystEngComm* **2013**, *15*, 9364.
- [56] P. F. Gao, L. L. Zheng, L. J. Liang, X. X. Yang, Y. F. Li, C. Z. Huang, *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 3202.
- [57] X. Zhu, J. Gu, Y. Wang, B. Li, Y. Li, W. Zhao, J. Shi, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 8779.
- [58] K. A. Mocniak, I. Kubajewska, D. E. M. Spillane, G. R. Williams, R. E. Morris, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 83648.
- [59] W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26*, 62.
- [60] A. L. Doadrio, A. J. Salinas, J. M. Sánchez-montero, M. Vallet-Regí, *Curr. Pharm. Des.* **2015**, *21*, 6189.
- [61] M. Vallet-Regí, F. Balas, D. Arcos, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2007**, *46*, 7548.
- [62] N. R. Shiju, V. V. Gulians, *Appl. Catal. A Gen.* **2009**, *356*, 1.
- [63] T. Shimomura, T. Itoh, T. Sumiya, F. Mizukami, M. Ono, *Sensors Actuators, B Chem.* **2008**, *135*, 268.
- [64] L. Zhang, S. Qiao, Y. Jin, H. Yang, S. Budihartono, F. Stahr, Z. Yan, X. Wang, Z. Hao, G. Q. Lu, *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18*, 3203.
- [65] S. Giret, M. Wong Chi Man, C. Carcel, *Chem. – A Eur. J.* **2015**, *21*, 13850.
- [66] M. Vallet-Regí, A. Rámila, R. P. Del Real, J. Pérez-Pariente, *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 308.
- [67] T. Asefa, Z. Tao, *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 2265.
- [68] I. I. Slowing, C.-W. Wu, J. L. Vivero-Escoto, V. S.-Y. Lin, *Small* **2009**, *5*, 57.
- [69] M. Benezra, O. Penate-Medina, P. B. Zanzonico, D. Schaer, H. Ow, A. Burns, E. DeStanchina, V. Longo, E. Herz, S. Iyer, J. Wolchok, S. M. Larson, U. Wiesner, M. S. Bradbury, *J. Clin. Invest.* **2011**, *121*, 2768.
- [70] ClinicalTrials.gov, Study Targeted Silica Nanoparticles for Image-Guided Intraoperative Sentinel Lymph Node Mapping in Head and Neck Melanoma, Breast and Cervical/Uterine Cancer Patients. Identifier: NCT02106598 First received: April 2014 Last verified: September 2016.
- [71] P. Horcajada, A. Rámila, J. Pérez-Pariente, M. Vallet-Regí, *Microporous Mesoporous Mater.* **2004**, *68*, 105.
- [72] M. Vallet-Regí, F. Balas, M. Colilla, M. Manzano, *Drug Metab. Lett.* **2007**, *1*, 37.
- [73] C. O. Arean, M. J. Vesga, J. B. Parra, M. R. Delgado, *Ceram. Int.* **2013**, *39*, 7407.
- [74] M. Vallet-Regí, J. C. Doadrio, A. L. Doadrio, I. Izquierdo-Barba, J. Pérez-Pariente, In *Solid State Ionics*; 2004; Vol. 172, pp. 435–439.
- [75] Z. Tao, B. Toms, J. Goodisman, J. Asefa, *ACS Nano* **2010**, *4*, 789.
- [76] J. Pang, L. Zhao, L. Zhang, Z. Li, Y. Luan, *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, *395*, 31.
- [77] J. Gordon, H. Kazemian, S. Rohani, *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *47*, 172.
- [78] B. J. Heilman, J. St. John, S. R. J. Oliver, P. K. Mascharak, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11573.
- [79] J. B. S. Haldane, *Biochem. J.* **1927**, *21*, 1068.
- [80] R. Tenhunen, H. S. Marver, R. Schmid, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1968**, *61*,

- 748.
- [81] B. E. Mann, R. Motterlini, *Chem. Commun.* **2007**, 4197.
- [82] H. J. Vreman, R. J. Wong, D. K. Stevenson, *Carbon Monoxide and Cardiovascular Functions*; Wang, R., Ed.; CRC Press, 2002.
- [83] R. Foresti, R. Motterlini, *Free Radic. Res.* **1999**, *31*, 459.
- [84] L. E. Otterbein, A. M. Choi, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2000**, *279*, 1029.
- [85] M. D. Maines, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1997**, *37*, 517.
- [86] S. W. Ryter, J. Alam, A. M. K. Choi, *Physiol Rev* **2006**, *86*, 583.
- [87] N. Yamada, M. Yamaya, S. Okinaga, K. Nakayama, K. Sekizawa, S. Shibahara, H. Sasaki, *Am. J. Hum. Genet.* **2000**, *66*, 187.
- [88] F. A. Wagener, E. J. Toonen, L. Wigman, J. Franssen, M. C. W. Creemers, T. R. D. J. Radstake, M. J. H. Coenen, P. Barrera, P. L. C. M. van Riel, F. G. M. Russel, *Arthritis Rheum.* **2008**, *58*, 3388.
- [89] F. Song, X. Li, M. Zhang, P. Yao, N. Yang, X. Sun, F. B. Hu, L. Liu, *Am. J. Epidemiol.* **2009**, *170*, 747.
- [90] A. Brydun, Y. Watari, Y. Yamamoto, K. Okuhara, H. Teragawa, F. Kono, K. Chayama, T. Oshima, R. Ozono, *Hypertens. Res.* **2007**, *30*, 341.
- [91] K. D. Poss, S. Tonegawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 10925.
- [92] A. Yachie, Y. Niida, T. Wada, N. Igarashi, H. Kaneda, T. Toma, K. Ohta, Y. Kasahara, S. Koizumi, *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 129.
- [93] R. Stocker, *Antioxid. Redox Signal.* **2004**, *6*, 841.
- [94] R. Öllinger, K. Yamashita, M. Bilban, A. Erat, P. Kogler, M. Thomas, E. Cszimadia, A. Usheva, R. Margreiter, F. H. Bach, *Cell Cycle* **2007**, *6*, 39.
- [95] R. Öllinger, H. Wang, K. Yamashita, B. Wegiel, M. Thomas, R. Margreiter, F. H. Bach, *Antioxid. Redox Signal.* **2007**, *9*, 2175.
- [96] S. Moncada, *J. R. Soc. Med.* **1999**, *92*, 164.
- [97] L. J. Ignarro, G. Cirino, A. Casini, C. Napoli, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1999**, *34*, 879.
- [98] J. Boczkowski, J. J. Poderoso, R. Motterlini, *Trends Biochem. Sci.* **2006**, *31*, 614.
- [99] E. M. Dioum, J. Rutter, J. R. Tuckerman, G. Gonzalez, M.-A. Gilles-Gonzalez, S. L. McKnight, *Science.* **2002**, *298*, 2385.
- [100] A. I. Rodriguez, A. Gangopadhyay, E. E. Kelley, P. J. Pagano, B. S. Zuckerbraun, P. M. Bauer, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2010**, *30*, 98.
- [101] B. S. Zuckerbraun, B. Y. Chin, M. Bilban, J. de Costa d'Avila, J. Rao, T. R. Billiar, L. E. Otterbein, *FASEB J.* **2007**, *21*, 1099.
- [102] B. Y. Chin, G. Jiang, B. Wegiel, H. J. Wang, T. MacDonald, X. C. Zhang, D. Gallo, E. Cszimadia, F. H. Bach, P. J. Lee, L. E. Otterbein, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 5109.
- [103] M. Desmard, J. Boczkowski, J. Poderoso, R. Motterlini, *Antioxid. Redox Signal.* **2007**, *9*, 2139.
- [104] L. E. Otterbein, F. H. Bach, J. Alam, M. Soares, H. Tao Lu, M. Wysk, R. J. Davis, R. A. Flavell, A. M. Choi, *Nat. Med.* **2000**, *6*, 422.
- [105] J. E. Clark, P. Naughton, S. Shurey, C. J. Green, T. R. Johnson, B. E. Mann, R. Foresti, R. Motterlini, *Circ. Res.* **2003**, *93*, e2.
- [106] H. S. Kim, P. A. Loughran, J. Rao, T. R. Billiar, B. S. Zuckerbraun, *Am. J.*

- Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2008**, 295, G146.
- [107] J. McDaid, K. Yamashita, A. Chora, R. Ollinger, T. B. Strom, X. C. Li, F. H. Bach, M. P. Soares, *FASEB J.* **2005**, 19, 458.
- [108] R. Song, Z. Zhou, P. K. M. Kim, R. A. Shapiro, F. Liu, C. Ferran, A. M. K. Choi, L. E. Otterbein, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 44327.
- [109] S. S. Lee, W. Gao, S. Mazzola, M. N. Thomas, E. Csizmadia, L. E. Otterbein, F. H. Bach, H. Wang, *FASEB J.* **2007**, 21, 3450.
- [110] B. Wegiel, D. J. Gallo, K. G. Raman, J. M. Karlsson, B. Ozanich, B. Y. Chin, E. Tzeng, S. Ahmad, A. Ahmed, C. J. Baty, L. E. Otterbein, *Circulation* **2010**, 121, 537.
- [111] K. G. Raman, J. E. Barbato, E. Ifedigbo, B. A. Ozanich, M. S. Zenati, L. E. Otterbein, E. Tzeng, *J. Vasc. Surg.* **2006**, 44, 151.
- [112] B. S. Zuckerbraun, B. Y. Chin, B. Wegiel, T. R. Billiar, E. Czsimaia, J. Rao, L. Shimoda, E. Ifedigbo, S. Kanno, L. E. Otterbein, *J. Exp. Med.* **2006**, 203, 2109.
- [113] R. Motterlini, L. E. Otterbein, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, 9, 728.
- [114] A. Pamplona, A. Ferreira, J. Balla, V. Jeney, G. Balla, S. Epiphonio, A. Chora, C. D. Rodrigues, I. P. Gregoire, M. Cunha-Rodrigues, S. Portugal, M. P. Soares, M. M. Mota, *Nat. Med.* **2007**, 13, 703.
- [115] L. M. Napolitano, Carbon monoxide and ileus: inhaled gas to prevent retained gas? *Crit. Care Med.* **2005**, 33, 1445–1446.
- [116] A. Nakao, J. Schmidt, T. Harada, A. Tsung, B. Stoffels, R. J. J. Cruz, J. Kohmoto, X. Peng, K. Tomiyama, N. Murase, A. J. Bauer, M. P. Fink, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, 319, 1265.
- [117] H. Fujimoto, M. Ohno, S. Ayabe, H. Kobayashi, N. Ishizaka, H. Kimura, K. Yoshida, R. Nagai, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2004**, 24, 1848.
- [118] L. E. Otterbein, B. S. Zuckerbraun, M. Haga, F. Liu, R. Song, A. Usheva, C. Stachulak, N. Bodyak, R. N. Smith, E. Csizmadia, S. Tyagi, Y. Akamatsu, R. J. Flavell, T. R. Billiar, E. Tzeng, F. H. Bach, A. M. K. Choi, M. P. Soares, *Nat. Med.* **2003**, 9, 183.
- [119] B. Ramlawi, J. R. Scott, J. Feng, S. Mieno, K. G. Raman, D. Gallo, E. Csizmadia, B. Yoke Chin, F. H. Bach, L. E. Otterbein, F. W. Sellke, *J. Surg. Res.* **2007**, 138, 121.
- [120] A. Nakao, H. Toyokawa, M. Abe, T. Kiyomoto, K. Nakahira, A. M. K. Choi, M. A. Nalesnik, A. W. Thomson, N. Murase, *Transplantation* **2006**, 81, 220.
- [121] A. Nakao, K. Kimizuka, D. B. Stolz, J. S. Neto, T. Kaizu, A. M. K. Choi, T. Uchiyama, B. S. Zuckerbraun, M. A. Nalesnik, L. E. Otterbein, N. Murase, *Am. J. Pathol.* **2003**, 163, 1587.
- [122] A. Nakao, H. Toyokawa, A. Tsung, M. A. Nalesnik, D. B. Stolz, J. Kohmoto, A. Ikeda, K. Tomiyama, T. Harada, T. Takahashi, R. Yang, M. P. Fink, K. Morita, A. M. K. Choi, N. Murase, *Am. J. Transplant.* **2006**, 6, 2243.
- [123] ClinicalTrials.gov, Carbon monoxide to prevent lung inflammation. Identifier: NCT00094406 First received: October 2004; Last verified: August 2016.
- [124] ClinicalTrials.gov, Study of inhaled carbon monoxide to treat idiopathic pulmonary fibrosis. Identifier: NCT0121587 First received: May 2015; Last verified: August 2016.
- [125] ClinicalTrials.gov, Carbon monoxide therapy for sever pulmonary arterial hypertension. Identifier: NCT01523548 First received: January 2012; Last

- verified: August 2016.
- [126] ClinicalTrials.gov, Safety and tolerability study of inhaled carbon monoxide in kidney transplant patients. Identifier: NCT00531856 First received: September 2007; Last verified: August 2016.
- [127] ClinicalTrials.gov, .
- [128] X. Ji, K. Damera, Y. Zheng, B. Yu, L. E. Otterbein, B. Wang, *J. Pharm. Sci.* **2016**, *105*, 406.
- [129] C. M. Castleden, P. V Cole, *Br. J. Ind. Med.* **1975**, *32*, 115.
- [130] R. Von Burg, *J. Appl. Toxicol.* **1999**, *19*, 379.
- [131] B. Wegiel, D. W. Hanto, L. E. Otterbein, *Trends Mol. Med.* **2013**, *19*, 3.
- [132] C. C. Romão, W. A. Blättler, J. D. Seixas, G. J. L. Bernardes, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 3571.
- [133] R. Motterlini, J. E. Clark, R. Foresti, P. Sarathchandra, B. E. Mann, C. J. Green, *Circ. Res.* **2002**, *90*, e17.
- [134] U. Schatzschneider, Novel lead structures and activation mechanisms for CO-releasing molecules (CORMs). *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172*, 1638–1650.
- [135] U. Schatzschneider, *Inorganica Chim. Acta* **2011**, *374*, 19.
- [136] J. Marhenke, K. Trevino, C. Works, The chemistry, biology and design of photochemical CO releasing molecules and the efforts to detect CO for biological applications. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *306*, 533–543.
- [137] A. R. Marques, L. Kromer, D. J. Gallo, N. Penacho, S. S. Rodrigues, J. D. Seixas, G. J. L. Bernardes, P. M. Reis, S. L. Otterbein, R. A. Ruggieri, A. S. G. Gonçalves, A. M. L. Gonçalves, M. N. De Matos, I. Bento, L. E. Otterbein, W. A. Blättler, C. C. Romão, *Organometallics* **2012**, *31*, 5810.
- [138] D. J. Darensbourg, J. D. Draper, D. L. Larkins, B. J. Frost, J. H. Reibenspies, *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 2538.
- [139] T. R. Johnson, B. E. Mann, I. P. Teasdale, H. Adams, R. Foresti, C. J. Green, R. Motterlini, *Dalt. Trans.* **2007**, 1500.
- [140] J. D. Seixas, A. Mukhopadhyay, T. Santos-Silva, L. E. Otterbein, D. J. Gallo, S. S. Rodrigues, B. H. Guerreiro, A. M. L. Gonçalves, N. Penacho, A. R. Marques, A. C. Coelho, P. M. Reis, M. J. Romão, C. C. Romão, *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 5985.
- [141] S. Romanski, B. Kraus, U. Schatzschneider, J. Neudörfl, S. Amslinger, H. Schmalz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 2392.
- [142] A. C. Pena, N. Penacho, L. Mancio-Silva, R. Neres, J. D. Seixas, A. C. Fernandes, C. C. Romao, M. M. Mota, G. J. L. Bernardes, A. Pamplona, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 1281.
- [143] O. De Backer, E. Elinck, B. Blanckaert, L. Leybaert, R. Motterlini, R. A. Lefebvre, *Gut* **2009**, *58*, 347.
- [144] Y. Guo, A. B. Stein, W.-J. Wu, W. Tan, X. Zhu, Q.-H. Li, B. Dawn, R. Motterlini, R. Bolli, *Am. J. Physiol. Hear. Crclulatory Physiol.* **2004**, *286*, H1649.
- [145] M. Allanson, V. E. Reeve, *Cancer Immunol. Immunother.* **2007**, *56*, 1807.
- [146] S. García-Gallego, G. J. L. Bernardes, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53*, 9712.
- [147] I. C. Winburn, K. Gunatunga, R. D. McKernan, R. J. Walker, I. A. Sammut, J. C. Harrison, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2012**, *111*, 31.
- [148] T. Santos-Silva, A. Mukhopadhyay, J. D. Seixas, G. J. L. Bernardes, C. C.

- Romao, M. J. Romao, *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 3361.
- [149] D. Gaynor, D. M. Griffith, *Dalt. Trans.* **2012**, *41*, 13239.
- [150] M. G. Apps, E. H. Y. Choi, N. J. Wheate, *Endocr. Relat. Cancer* **2015**, *22*, R219.
- [151] E. Lengfelder, F. Lo-Coco, L. Ades, P. Montesinos, D. Grimwade, B. Kishore, S. M. Ramadan, M. Pagoni, M. Breccia, A. J. G. Huerta, A. M. Nloga, J. D. Gonzalez-Sanmiguel, A. Schmidt, J.-F. Lambert, S. Lehmann, E. Di Bona, B. Cassinat, W.-K. Hofmann, D. Gorlich, M.-C. Sauerland, P. Fenaux, M. Sanz, *Leukemia* **2015**, *29*, 1084.
- [152] S. H. Heinemann, T. Hoshi, M. Westerhausen, A. Schiller, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 3644.
- [153] Y. Matsumura, H. Maeda, *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6387.
- [154] H. Maeda, Y. Matsumura, EPR effect based drug design and clinical outlook for enhanced cancer chemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 129–130.
- [155] H. Maeda, *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 797.
- [156] H. Inaba, K. Fujita, T. Ueno, *Biomater. Sci.* **2015**, *3*, 1423.
- [157] D. Nguyen, C. Boyer, *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2015**, *1*, 895.
- [158] N. S. Santos-Magalhaes, V. C. F. Mosqueira, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 560.
- [159] P. C. Kunz, N. E. Brückmann, B. Spingler, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, *2007*, 394.
- [160] N. E. Brückmann, M. Wahl, G. J. Reiß, M. Kohns, W. Wätjen, P. C. Kunz, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2011**, *2011*, 4571.
- [161] U. Hasegawa, A. J. van der Vlies, E. Simeoni, C. Wandrey, J. A. Hubbell, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 18273.
- [162] M. Razavet, V. Artero, C. Cavazza, Y. Oudart, C. Lebrun, J. C. Fontecilla-Camps, M. Fontecave, *Chem. Commun. (Camb)* **2007**, *3*, 2805.
- [163] M. F. A. Santos, J. D. Seixas, A. C. Coelho, A. Mukhopadhyay, P. M. Reis, M. J. Romão, C. C. Romão, T. Santos-Silva, *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *117*, 285.
- [164] F. Zobi, B. Spingler, *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 1210.
- [165] T. Santos-Silva, A. Mukhopadhyay, J. D. Seixas, G. J. L. Bernardes, C. C. Romão, M. J. Romão, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1192.
- [166] H. Tabe, K. Fujita, S. Abe, M. Tsujimoto, T. Kuchimaru, S. Kizaka-Kondoh, M. Takano, S. Kitagawa, T. Ueno, *Inorg. Chem.* **2015**, *54*, 215.
- [167] P. Kesharwani, K. Jain, N. K. Jain, *Prog. Polym. Sci.* **2014**, *39*, 268.
- [168] P. Govender, S. Pai, U. Schatzschneider, G. S. Smith, *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 5470.
- [169] I. I. Slowing, J. L. Vivero-Escoto, C.-W. Wu, V. S.-Y. Lin, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1278.
- [170] J. M. Rosenholm, C. Sahlgren, M. Linden, *Nanoscale* **2010**, *2*, 1870.
- [171] V. Mamaeva, C. Sahlgren, M. Linden, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 689.
- [172] M. W. Ambrogio, C. R. Thomas, Y.-L. Zhao, J. I. Zink, J. F. Stoddart, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 903.
- [173] G. Dördelmann, H. Pfeiffer, A. Birkner, U. Schatzschneider, *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 4362.
- [174] V. N. Mochalin, A. Pentecost, X.-M. Li, I. Neitzel, M. Nelson, C. Wei, T. He, F. Guo, Y. Gogotsi, *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 3728.

- [175] G. Dördelmann, T. Meinhardt, T. Sowik, A. Krueger, U. Schatzschneider, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 11528.
- [176] V. Sundaresan, J. U. Menon, M. Rahimi, K. T. Nguyen, A. S. Wadajkar, *Int. J. Pharm.* **2014**, 466, 1.
- [177] P. C. Kunz, H. Meyer, J. Barthel, S. Sollazzo, A. M. Schmidt, C. Janiak, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 4896.
- [178] A. E. Pierri, P.-J. Huang, J. V. Garcia, J. G. Stanfill, M. Chui, G. Wu, N. Zheng, P. C. Ford, *Chem. Commun. Chem. Commun* **2015**, 51, 2072.
- [179] M. A. Gonzales, H. Han, A. Moyes, A. Radinos, A. J. Hobbs, N. Coombs, S. R. J. Oliver, P. K. Mascharak, *J. Mater. Chem. B* **2014**, 2, 2107.
- [180] I. Chakraborty, S. J. Carrington, J. Hauser, S. R. J. Oliver, P. K. Mascharak, *Chem. Mater.* **2015**, 27, 8387.
- [181] S. Muro, C. Garnacho, J. A. Champion, J. Leferovich, C. Gajewski, E. H. Schuchman, S. Mitragotri, V. R. Muzykantov, *Mol. Ther.* **2008**, 16, 1450.
- [182] S. E. A. Gratton, P. A. Ropp, P. D. Pohlhaus, J. C. Luft, V. J. Madden, M. E. Napier, J. M. DeSimone, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, 105, 11613.
- [183] H. Soo Choi, W. Liu, P. Misra, E. Tanaka, J. P. Zimmer, B. Itty Ipe, M. G. Bawendi, J. V. Frangioni, *Nat Biotech* **2007**, 25, 1165.
- [184] T. Tsuruoka, S. Furukawa, Y. Takashima, K. Yoshida, S. Isoda, S. Kitagawa, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, 48, 4739.
- [185] S. Furukawa, K. Hirai, K. Nakagawa, Y. Takashima, R. Matsuda, T. Tsuruoka, M. Kondo, R. Haruki, D. Tanaka, H. Sakamoto, S. Shimomura, O. Sakata, S. Kitagawa, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, 48, 1766.
- [186] S. H. Lo, C. H. Chien, Y. L. Lai, C. C. Yang, J. J. Lee, D. S. Raja, C. H. Lin, *J. Mater. Chem. A* **2013**, 1, 324.
- [187] D. E. Bikiel, E. González Solveyra, F. Di Salvo, H. M. S. Milagre, M. N. Eberlin, R. S. Corrêa, J. Ellena, D. a Estrin, F. Doctorovich, *Inorg. Chem.* **2011**, 50, 2334.
- [188] Z. X. Wu, D. Y. Zhao, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 3332.
- [189] Z. Deng, Hexiang Grunder, Sergio Cordova, Kyle E. Valente, Cory, Furukawa, Hiroyasu Hmadeh, Mogamad Gándara, Felipe whalley, Adam C. Liu, S. Asahina, H. Kazumori, M. O’Keeffe, O. Terasaki, J. F. Stoddart, O. M. Yaghi, *Science.* **2012**, 336, 1018.
- [190] D. Bradshaw, S. El-Hankari, L. Lupica-Spagnolo, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 5431.
- [191] Y. Yue, Z.-A. Qiao, P. F. Fulvio, A. J. Binder, C. Tian, J. Chen, K. M. Nelson, X. Zhu, S. Dai, Template-free synthesis of hierarchical porous metal-organic frameworks. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 9572–9575.
- [192] Y. Yue, P. F. Fulvio, S. Dai, *Acc. Chem. Res.* **2015**, 48, 3044.
- [193] F. M. Goñi, J. L. Arrondo, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **1986**, 81, 117.
- [194] J. Niesel, A. Pinto, H. W. Peindy N’Dongo, K. Merz, I. Ott, R. Gust, U. Schatzschneider, *Chem. Commun.* **2008**, 1798.
- [195] I. Chakraborty, S. J. Carrington, P. K. Mascharak, *Acc. Chem. Res.* **2014**, 47, 2603.
- [196] J. An, S. J. Geib, N. L. Rosi, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 8376.
- [197] Y. Lang, D. P. Finn, A. Pandit, P. J. Walsh, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2012**, 23, 73.

-
- [198] I. Izquierdo-Barba, M. Colilla, M. Manzano, M. Vallet-Regí, *Microporous Mesoporous Mater.* **2010**, *132*, 442.
- [199] J. Rathouský, M. Zúkalová, A. Zúkal, J. Had, *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1998**, *63*, 1893.
- [200] D. Zhao, J. Feng, Q. Huo, N. Melosh, G. Fredrickson, B. Chmelka, G. Stucky, *Science.* **1998**, *279*, 548.
- [201] R. Marschall, I. Bannat, J. Caro, M. Wark, *Microporous Mesoporous Mater.* **2007**, *99*, 190.
- [202] J. G. C. Shen, R. G. Herman, K. Klier, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 9975.
- [203] M. T. Janicke, C. C. Landry, S. C. Christiansen, D. Kumar, G. D. Stucky, B. F. Chmelka, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6940.
- [204] I. I. Slowing, B. G. Trewyn, S. Giri, V. S.-Y. Lin, *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*, 1225.
- [205] S. J. Carrington, I. Chakraborty, P. K. Mascharak, *Chem. Commun. (Camb).* **2013**, *49*, 11254.
- [206] D.-S. Kim, S.-W. Chae, H.-R. Kim, H.-J. Chae, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **2009**, *31*, 64.
- [207] H. B. Suliman, M. S. Carraway, A. S. Ali, C. M. Reynolds, K. E. Welty-Wolf, C. A. Piantadosi, *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 3730.
- [208] F. S. Carvalho, A. Burgeiro, R. Garcia, A. J. Moreno, R. A. Carvalho, P. J. Oliveira, *Med. Res. Rev.* **2014**, *34*, 106.
- [209] Y. Tayem, T. R. Johnson, B. E. Mann, C. J. Green, R. Motterlini, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2006**, *290*, F789.
- [210] S. C. Dhara, *Indian J. Chem.* **1970**, *8*, 193.
- [211] J. G. C. Shen, T. H. Kalantar, R. G. Herman, J. E. Roberts, K. Klier, *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 4479.

ANEXO I

DETALLES EXPERIMENTALES

1. Materiales y métodos

Todos los reactivos y los disolventes utilizados en esta Tesis Doctoral están disponibles comercialmente y no necesitaron ningún tratamiento y/o purificación antes de su uso.

Análisis elemental

La determinación del contenido en carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre de los diferentes compuestos preparados se realizaron: *i)* en un analizador elemental THERMO SCIENTIFIC Modelo Flash 2000, compuesto por una microbalanza de precisión METTLER M-3, disponible en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, o *ii)* en un analizador elemental modelo Flash EA1112 CHNS-O de Thermo Finnigan, dotado con una microbalanza electrónica Mettler Toledo MX5, disponible en el Centro de Instrumentación Científico-Técnica de la Universidad de Jaén.

Análisis termogravimétricos

Los análisis de termogravimetría se llevaron a cabo, en atmósfera de aire y con una rampa de calentamiento de $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, empleando un analizador termogravimétrico METTLER-TOLEDO modelo TGA/DSC1. Este equipo está disponible en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Difracción de electrones con rotación continua

Los datos de difracción de electrones con rotación continua (CRED) obtenidos para el material CYCU-3 50_50 se registraron en un microscopio de transmisión electrónica JEOL JEM2100 (200 kV), usando el detector de pixel Timepix QTPX-262k (512 x 512 pixels, tamaño de pixel $55\text{ }\mu\text{m}$, Amsterdam Sci. Ins.). Este equipo se encuentra disponible en el Departamento de Materiales y Química Ambiental de la Universidad de Estocolmo (Suecia).

Difracción de rayos-X en polvo

Los difractogramas de rayos-X en polvo se registraron en un difractómetro Bruker D2-PHASER disponible en el Departamento de Química Inorgánica de la Universidad

de Granada, usando radiación $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) y un detector Lyneye. Para los materiales CYCU-3 preparados a pequeña escala (véase Capítulo II), los difractogramas de rayos-X en polvo se realizaron, usando radiación $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), en un difractómetro SmartLab RIGAKU disponible en el Institute for Integrated Cell-Materials Sciences (ICeMs) de la Universidad de Kyoto (Japón).

Dispersión dinámica de la luz (DLS) y medida de potencial z

Los ensayos de dispersión dinámica de la luz (DLS) y de medición de potencial z se llevaron a cabo en un medidor de tamaño y potencial Zeta Sizer MALVERN ubicado en el departamento de Física Aplicada de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada

Espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES)

La cuantificación de los metales lixiviados, en los estudios de estabilidad química de los materiales híbridos preparados, se llevaron a cabo utilizando un espectrómetro de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) OPTIMA 7300DV disponible en los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Málaga.

Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)

La cuantificación de los metales lixiviados, en los estudios de estabilidad química de los materiales Al-MCM-41 y sus derivados (véase capítulo IV), se realizaron con espectrómetro de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) modelo 7500a de Agilent disponible en el Centro de Instrumentación Científico-Técnica de la Universidad de Jaén.

Espectrofotometría ultravioleta-visible

Los espectros UV-vis se registraron en un espectrómetro Shimadzu UV-1600 UV-VIS disponible en el Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Granada.

Espectroscopía infrarroja

Los espectros de absorción infrarroja se obtuvieron en un espectrofotómetro con transformada de Fourier TENSOR 27 (BRUKER), disponible en el Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Granada, empleando KBr como medio dispersante.

Isotermas de adsorción de nitrógeno

Las medidas de las isotermas de adsorción de N₂ a 77 K de los materiales porosos preparados se realizaron en un equipo Micromeritics Tristar 3000 de adsorción volumétrica ubicado en el Departamento de Petrología y Mineralogía de la Universidad de Granada. En todos los casos, el análisis de los datos obtenidos mediante el método de Brunauer-Emmet-Teller (BET) permitió determinar el área superficial específica de cada una de las muestras.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Las imágenes de SEM de los materiales preparados en el Capítulo II se obtuvieron utilizando un microscopio electrónico de barrido JEOL-JSM-7001F a 10 kV, disponible en el Institute for Integrated Cell-Materials Sciences (ICeMs) de la Universidad de Kyoto (Japón). El metalizado previo de las muestras se realizó utilizando Osmio.

Las imágenes del resto de materiales preparados a lo largo de esta Tesis Doctoral se obtuvieron utilizando un microscopio electrónico de barrido de presión variable de alta resolución Zeiss SUPRA40VP disponible en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. En este caso, el metalizado previo de las muestras se realizó utilizando carbono.

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Las imágenes de TEM de los materiales preparados en el Capítulo II así como del material Al-MCM-41 y sus derivados (véase Capítulo IV), se adquirieron en un microscopio electrónico de transmisión de ultra alta resolución HAADF FEI TITAN G2, dotado con un sistema FEI para la realización de microanálisis químico por dispersión de energía de rayos-X (EDX). Este equipo se encuentra en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Por otra parte, las imágenes de TEM recogidas en el Capítulo III se obtuvieron utilizando un microscopio electrónico de transmisión STEM PHILIPS CM200 dotado con un sistema EDAX de microanálisis químico por espectrometría de rayos-X (EDX). Este equipo se encuentra en los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Málaga.

Por último, las imágenes de TEM para los materiales bio-MOF-1, MCM-41, SBA-15 y sus derivados alquilsulfónicos (véase Capítulo IV) se obtuvieron utilizando un microscopio STEM PHILIPS CM20, dotado con un sistema EDAX de microanálisis químico por espectrometría de rayos-X (EDX), disponible en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (^1H RMN) se realizaron en espectrómetro de resonancia magnética nuclear de 300 MHz (2 canales) VARIAN INOVA UNITY que se encuentra ubicado en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Preparación de medios fisiológicos simulados.

Los medios fisiológicos simulados que se han empleado en esta Tesis Doctoral han sido los siguientes:

- Tampón PBS (10 mM, pH 7.4): Para su preparación, se disolvieron 8.00 g (0.14 mol) de NaCl, 0.20 g (2.68 mmol) de KCl, 0.22 g (1.6 mmol) de KH_2PO_4 y 1.44 g (0.01 mol) de Na_2HPO_4 en 800 mL de agua destilada (calidad miliQ). Tras su completa disolución se mide el pH y, en caso de ser necesario, se ajusta hasta pH 7.4 con una disolución de hidróxido de sodio (2M). Finalmente, la disolución se enrasa hasta un litro.
- Tampón HEPES (10 mM, pH 7.4): Para su preparación, se disuelven 2.38 g (0.01 mol) de ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico en 800 mL de agua destilada (calidad miliQ). A continuación, se ajusta el pH hasta 7.4 con una disolución de hidróxido de sodio (2M). Finalmente, la disolución se enrasa hasta un litro.

2. Control del tamaño de partícula de la matriz porosa para la preparación de CORMAs

2.1. Control del tamaño y de la morfología de partícula en el polímero de coordinación poroso CYCU-3

Síntesis de CYCU-3 a pequeña escala. Con objeto de evaluar la influencia de la concentración de reactivos y de la proporción modulador-ligando sobre las propiedades del polímero de coordinación poroso CYCU-3 $[Al(OH)(SDC)]_n$ (H_2SDC : ácido 1,2-difeniletlenil-4,4'-dicarboxílico) se llevaron a cabo diferentes síntesis del MOF a pequeña escala para hacer un primer estudio de los materiales obtenidos. En general, se prepararon mezclas de $Al(NO)_3 \cdot 9H_2O$ y ácido 1,2-difeniletlenil-4,4'-dicarboxílico (H_2SDC) en *N,N'*-Dimetilformamida (DMF) (concentraciones usadas: 20, 30, 40, 50 y 60 mM) con ácido acético (proporción molar ($CH_3COOH-H_2SDC$: 0-1, 5-1, 20-1 y 50-1) y se transfirieron a reactores solvotermales de 1 ml (volumen de reacción 750 μ L). Las mezclas se calentaron a 190 °C durante 24 y 72 horas, tras lo cual se enfriaron hasta la temperatura ambiente durante 6 horas. A continuación, los sólidos obtenidos se lavaron con DMF (3 x 1 mL), se recuperaron por centrifugación (10 min/3500 rpm) y se secaron a vacío a 90 °C durante la noche. Por otra parte, la síntesis del material CYCU-3 40_0_sol se llevó a cabo siguiendo un procedimiento diferente. Se preparó una disolución de H_2SDC en DMF calentando en un reactor asistido por microondas a 175 °C durante 15 minutos. A continuación, se mezcló con una disolución de $Al(NO)_3 \cdot 9H_2O$ (concentración final de ambos reactivos: 40 mM) y la mezcla se transfirió a un reactor solvotermal de 1 mL, manteniendo la mezcla a 190 °C durante 72 horas. Tras ese tiempo, el sólido obtenido se lavó con DMF (3 x 1 mL), se recuperó por centrifugación (10 min/3500 rpm) y se secó a vacío a 90 °C durante la noche.

Análisis estructural del material CYCU-3 50_50 mediante difracción de electrones con rotación continua (CRED) y difracción de rayos-X en polvo (XRPD). Con el objetivo de evaluar si el material CYCU-3 50_50 presentaba de una nueva fase, se realizó un análisis estructural de este material mediante difracción de electrones con rotación continua (CRED). Este trabajo se ha realizado en colaboración

con el grupo de investigación de la Profesora X. Zou de la Universidad de Estocolmo (Suecia).

Para ello, el material se suspendió en acetona y se depositó una gota sobre una rejilla de cobre recubierta por carbono. A continuación, se obtuvieron imágenes del material mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM) y se registraron los datos de difracción de electrones del área seleccionada (ED) (velocidad del goniómetro $0.074^\circ \text{ s}^{-1}$, tiempo de exposición 50 ms por patrón de difracción). En este sentido, se obtuvieron 924 patrones difracción de electrones en 1 minuto, cubriendo un rango de inclinación desde 50.6° a -16.4° . Posteriormente, la red recíproca (3D de CYCU-3_50_50 se reconstruyó a partir de los patrones de difracción de electrones obtenidos, usando el programa informático *RED-data processing* y se obtuvieron los parámetros de la celdilla unidad.

Por otro lado, con objeto de confirmar y refinar los parámetros de la celdilla unidad obtenidos mediante (CRED), se registró el patrón de difracción de rayos-X en polvo del material y se realizó un ajuste Pawley de estos datos (Figura 101). En este sentido, el refinamiento se llevó a cabo utilizando la función de perfil de pico tipo Pearson VII, seguido de un refinamiento de la celdilla unidad y del desplazamiento 0. De esta forma, los valores R convergieron a $R_p= 0.1064$, $R_{wp}= 0.07486$, $R_{exp}= 0.1988$, y $GOF= 0.377$. El alto valor de R_{exp} y el bajo valor de GOF se deben a la anchura de los picos, causada por el desorden observado y por la orientación preferencial de los cristales.

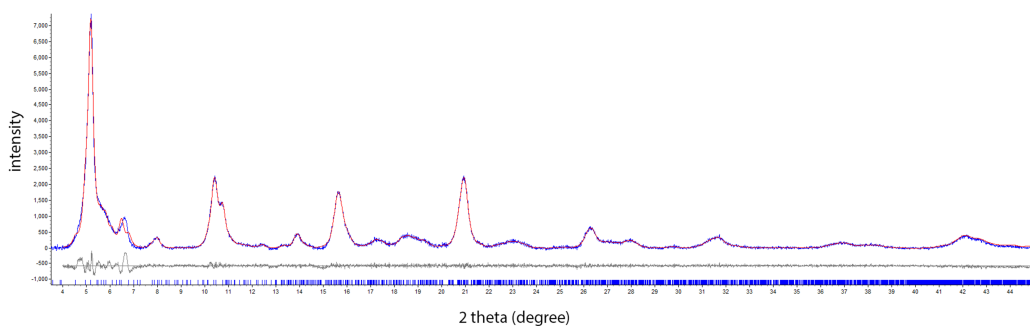


FIGURA 101: AJUSTE DE PAWLEY DEL PATRÓN DE DIFRACCIÓN DE RAYOS-X DEL MATERIAL CYCU-3_50_50. LÍNEA ROJA: PATRÓN SIMULADO; LÍNEA AZUL: PATRÓN OBSERVADO; LÍNEA GRIS: PERFIL DE LA DIFERENCIA ENTRE EL PATRÓN SIMULADO Y OBSERVADO. LAS LÍNEAS AZULES BAJO LA CURVA INDICAN LA POSICIÓN DE LOS PICOS.

2.2. Materiales liberadores de CO basados en el CORM ALF794 y materiales CYCU-3 con diferente tamaño y morfología de partícula

2.2.1. Preparación y caracterización

Síntesis a escala del material CYCU-3 20_0. Para la preparación de la matriz porosa CYCU-3 20_0, se suspendieron 75 mg (0.2 mmol) de $\text{Al}(\text{NO})_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ y 53.6 mg (0.2 mmol) de H_2SDC en 10 mL de DMF y se transfirieron a un reactor sovotermal de 23 mL. La mezcla se calentó a 190 °C durante 72 horas y, posteriormente, se enfrió hasta la temperatura ambiente en seis horas. El sólido obtenido se lavó con DMF (3 x 10 mL), se recuperó por centrifugación y se dejó secar al aire. Anál. calc. para $[\text{Al}(\text{OH})(\text{C}_{16}\text{O}_4\text{H}_{10})](\text{H}_2\text{O})_{1.1}(\text{C}_3\text{H}_7\text{NO})_{0.1}$ (CYCU-3 20_0): N, 0.41; C, 58.0; H, 4.15. Encontrado: N, 0.39; C, 60.81; H, 5.24. Residuo (%) (calc./exp.): 16.13/15.11

Síntesis del material CYCU-3 50_5. El compuesto CYCU-3 50_5 se preparó siguiendo el mismo procedimiento que para CYCU-3 20_0 salvo que, en este caso, se suspendieron 187.6 mg (0.5 mmol) de $\text{Al}(\text{NO})_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ y 134.1 mg (0.5 mmol) de H_2SDC en 9.86 mL de DMF con 0.14 mL (2.5 mmol) de ácido acético. Anál. calc. para $[\text{Al}(\text{OH})(\text{C}_{16}\text{O}_4\text{H}_{10})](\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_3\text{H}_7\text{NO})_{0.2}$ (CYCU-3 50_5): N, 0.77; C, 55.24; H, 4.58. Anál. exp.: N, 0.77; C, 51.31; H, 3.70. Residuo (%) (calc./exp.): 22.01/18.22

Síntesis del material CYCU-3 50_50. El compuesto CYCU-3 50_50 se preparó siguiendo el mismo procedimiento que para CYCU-3 20_0 salvo que, en este caso, se suspendieron 187.6 mg (0.5 mmol) de $\text{Al}(\text{NO})_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ y 134.1 mg (0.5 mmol) de H_2SDC en 8.6 mL de DMF con 1.4 mL (2.5 mmol) de ácido acético. Anál. calc. para $[\text{Al}(\text{OH})(\text{C}_{16}\text{O}_4\text{H}_{10})][(\text{Al}(\text{OH})(\text{CH}_3\text{COO})_2)]_{0.66}(\text{C}_3\text{H}_7\text{NO})_{0.1}$ (CYCU-3 50_50): N, 0.33; C, 53.59; H; 3.58. Anál. exp.: N, 0.29; C, 52.73; H, 3.58. Residuo (%) (calc./exp.): 24.01/22.10

Incorporación de ALF794 en CYCU-3 20_0. El proceso de encapsulación del compuesto ALF794 $[\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{MoN}_3\text{O}_9]$ se llevó a cabo mediante impregnación sólido-líquido. Una disolución de 100 mg (0.19 mmol) de ALF794 en 10 mL de metanol se adicionó sobre una suspensión de 100 mg de CYCU-3 20_0 (0.32 mmol), previamente activado (150 °C, 24 horas, bajo vacío), en 10 mL de metanol. La mezcla se mantuvo en

agitación hasta la completa evaporación del disolvente (10 horas). A continuación, el producto se lavó con metanol (3 x 10 mL), se recuperó por centrifugación y se dejó secar al aire. Todas las manipulaciones se realizaron en ausencia de luz para evitar la fotoactivación del CORM. Anál. calc. para $[\text{Al}(\text{OH})(\text{C}_{16}\text{O}_4\text{H}_{10})](\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{MoN}_3\text{O}_9)_{0.20}(\text{MoO}_2)_{1.7}(\text{H}_2\text{O})_{1.1}(\text{C}_{16}\text{O}_4\text{H}_{12})_{0.2}(\text{Al}(\text{OH})_3)_{0.2}$ (**ALF794@CYCU-3 20_0**): N, 1.17; C, 37.99; H, 2.85. Anál. exp.: N, 1.28; C, 35.93; H, 2.30. Residuo (%) (calc./exp.): 42.21/38.33

Incorporación de ALF794 en CYCU-3 50_5. La incorporación de ALF794 en la matriz porosa CYCU-3 50_5 se llevó a cabo de la misma forma que para CYCU-3 20_0. Anál. calc. para $[\text{Al}(\text{OH})(\text{C}_{16}\text{O}_4\text{H}_{10})(\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{MoN}_3\text{O}_9)_{0.20}](\text{H}_2\text{O})_{1.3}(\text{MoO}_2)_{0.35}$ (**ALF794@CYCU-3 50_5**) N, 1.74; C, 48.13; H, 3.41. Anál. exp.: N, 1.69; C, 48.13; H, 3.41. Residuo (%) (calc./exp.): 25.16/26.90

Incorporación de ALF794 en CYCU-3 50_50. La incorporación de ALF794 en la matriz porosa CYCU-3 50_50 se llevó a cabo de la misma forma que para CYCU-3 20_0. Anál. calc. para $[\text{Al}(\text{OH})(\text{C}_{16}\text{O}_4\text{H}_{10})][(\text{Al}(\text{OH})(\text{CH}_3\text{COO})_2)]_{0.66}(\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{MoN}_3\text{O}_9)_{0.5}(\text{H}_2\text{O})_{1.1}(\text{MoO}_2)_{0.25}$ (**ALF794@CYCU-3 50_50**): N, 2.88; C, 45.56; H; 3.92. Anál. exp.: N, 2.89; C, 43.05; H, 3.92. Residuo (%) (calc./exp.): 27.16/23.13

Los análisis termogravimétricos de los distintos materiales preparados en este capítulo se muestran en la Figura 102. Los residuos calculados y teóricos se muestran en el apartado de preparación de cada material.

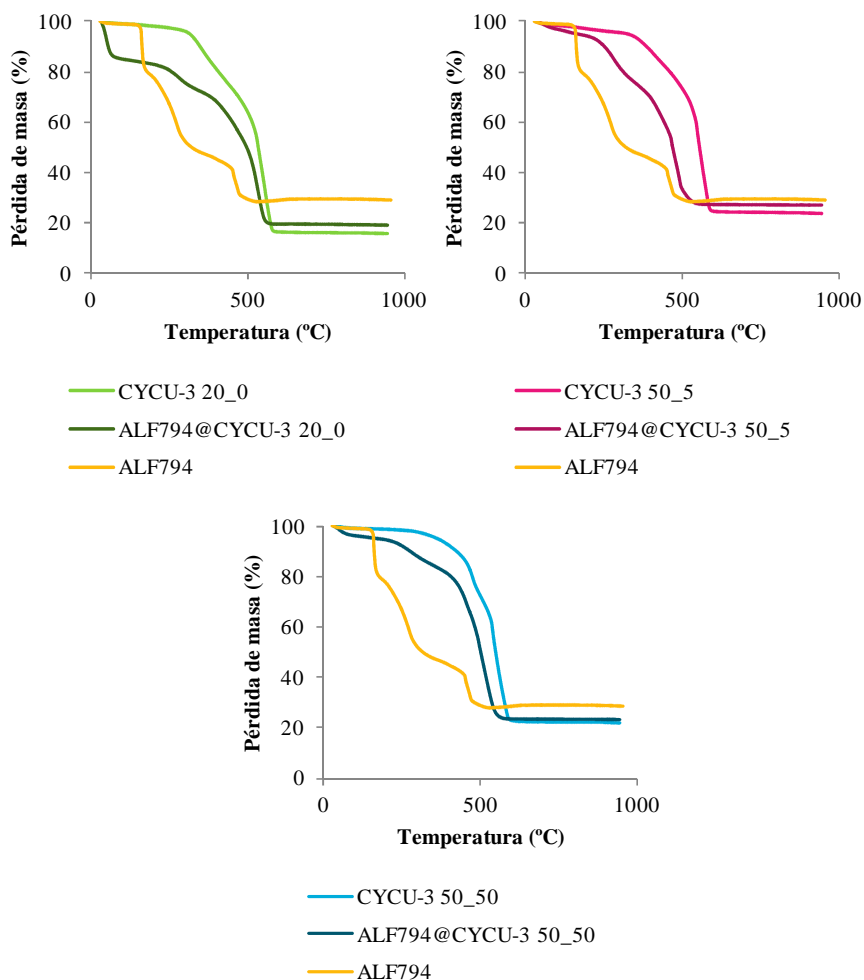


FIGURA 102: ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICOS DE LOS DISTINTOS MATERIALES PREPARADOS EN EL CAPÍTULO II.

Evaluación de la porosidad de las matrices CYCU-3 sintetizadas. En primer lugar, se llevó a cabo un estudio de solubilidad del ligando H₂SDC con objeto de eliminar las posibles moléculas de espaciador orgánico sin reaccionar que pudieran quedar retenidas en las cavidades de la matriz porosa CYCU-3 tras su síntesis. Para ello, se prepararon suspensiones de H₂SDC (10 mM) en metanol, etanol, diclorometano y DMF y se calentaron en un reactor asistido por microondas en un rango de temperatura de 50-100 °C durante 15-50 minutos. Tras estos estudios, se comprobó mediante termogravimetría que el calentamiento de los materiales aislados a 50 °C

durante 15 minutos en DMF conducía a la matriz porosa sin moléculas de ligando orgánico en sus cavidades.

Teniendo en cuenta lo anterior, las matrices CYCU-3 20_0, CYCU-3 50_5 y CYCU-3 50_50 preparadas se suspendieron en DMF (5 mg/mL) y se calentaron en un reactor de microondas a 50 °C durante 15 minutos. Después de esto, los sólidos se recuperaron por centrifugación. Este proceso se realizó por triplicado. A continuación, se eliminó el disolvente retenido en los poros de las distintas matrices mediante un tratamiento térmico a vacío. Para ello, los materiales se activaron a 150 °C a vacío (10^{-4} bar) durante 24 horas. Finalmente, se registraron las isotermas de adsorción de nitrógeno a 77 K que permitieron evaluar su porosidad. La superficie específica de cada uno de ellos se determinó mediante el método Brunauer-Emmet-Teller (BET).

2.2.2. Estudio de la liberación de CO

Los estudios cinéticos de liberación de monóxido de carbono se llevaron a cabo mediante el ensayo de la mioglobina, previamente publicado.^[133,187] Este método permite la cuantificación del monóxido de carbono liberado desde cualquier compuesto de forma indirecta, registrando la conversión de mioglobina ([Mb-Fe(II)]) en carbomonoximioglobina (Mb-CO) mediante espectrofotometría ultravioleta visible. La proteína ([Mb-Fe(II)]) en disolución presenta un máximo de absorción a valores de longitud de onda de 435 nm mientras que la segunda lo muestra a 423 nm. De esta forma, la cantidad de Mb-CO formada, o lo que es lo mismo, la cantidad de monóxido de carbono liberada, puede cuantificarse espectrofotométricamente registrando los cambios espectrales en la banda Soret (entre 423 y 435 nm) de una disolución de mioglobina previamente reducida, en presencia de la molécula/material liberador de CO en cuestión. Es importante destacar que el seguimiento de esta reacción también se puede llevar a cabo registrando los cambios espectrales ocurridos en la región de las bandas Q (entre 540 y 575 nm). En este caso, la mioglobina reducida presenta un máximo de absorción a λ de 550 nm y, cuando se forma la Mb-CO, aparecen dos máximos de absorción a longitudes de onda de 540 y 575 nm, que permiten determinar la concentración de Mb-CO y, por tanto, la cantidad de monóxido de carbono liberada (Figura 103).

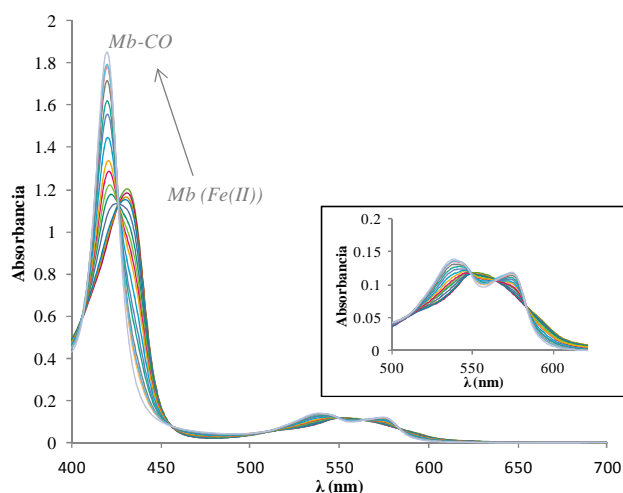


FIGURA 103: CAMBIOS ESPECTRALES DURANTE UN ESTUDIO DE LIBERACIÓN DE CO MEDIANTE EL ENSAYO DE LA MIOGLOBINA (EN DETALLE, LOS CAMBIOS OCURRIDOS EN LAS BANDAS Q).

Para el empleo de este método, antes de cada ensayo, se prepararon las disoluciones madre, en tampón PBS desoxigenado (10 mM, pH. 7.4) para la mioglobina de corazón de caballo (100 μM), el agente reductor (ditionito de sodio, 40 mg mL^{-1}) y los compuestos objeto de estudio (ALF794, ALF794@CYCU-3 20_0, ALF794@CYCU-3 50_5 y ALF794@CYCU-3 50_50). En este sentido, dada la baja solubilidad en medio acuoso del CORM libre, se preparó previamente una disolución de ALF794 (10 mM) en metanol desoxigenado (5.2 mg mL^{-1}), de la que se tomó una alícuota y se transfirió a una disolución tampón de PBS desoxigenado para alcanzar una concentración final de ALF794 1 mM. Por otra parte, para el caso de los sistemas híbridos, se prepararon directamente diferentes suspensiones con una concentración final de ALF794 1 mM (ALF794@CYCU-3 20_0: 3.6 mg mL^{-1} , ALF794@CYCU-3 50_5: 2.4 mg mL^{-1} y ALF794@CYCU-3 50_50: 1.5 mg mL^{-1}). A continuación, en una cubeta de cuarzo dotada con un septum ($l = 1 \text{ cm}$), se añadieron, bajo atmósfera inerte, 100 μL de la disolución de mioglobina, 100 μL de la disolución de ditionito, 10 μM de la disolución de ALF794 en PBS o de la suspensión de los sistemas híbridos y 790 μL de PBS desoxigenado (concentración final de ALF794 = 10 μM).

Ensayo en oscuridad. La cubeta de ALF794 se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$ en oscuridad y se registró su espectro de absorción a diferentes tiempos (0-1440 minutos).

Ensayos con luz visible. Las cubetas de ALF794, ALF794@CYCU-3 20_0, ALF794@CYCU-3 50_5 y ALF794@CYCU-3 50_50 se incubaron a 37 °C bajo la irradiación de una lámpara fluorescente (flujo luminoso: 600 lm, temperatura de color 4000 K, distancia lámpara-muestra: 5 cm), registrándose su espectro de absorción a diferentes tiempos (0-1440 minutos).

Al final de cada ensayo, las muestras se saturaron de monóxido de carbono mediante su burbujeo con un corriente de dicho gas. Tras esto, se determinó la cantidad de Mb-CO máxima formada según la expresión:

$$[Mb - CO]_{m\acute{a}x}(\mu M) = \frac{Abs(\lambda: 423\text{ nm})}{121\text{ mM}^{-1}} \times 1000$$

Dado que en cada medida se superponen dos espectros (el de [Mb-Fe(II)]) y el de Mb-CO), es necesario eliminar la parte proporcional del primero para determinar la cantidad de monóxido de carbono liberada. Para esto, se utiliza el valor de absorbancia a 510 nm, donde los espectros de los dos compuestos puros presentan un punto isobéptico. De esta forma, se puede determinar un nuevo coeficiente de extinción molar ε' :

$$\varepsilon'(mM^{-1}) = \frac{\Delta Abs(\lambda: 423\text{ nm}) - \Delta Abs(\lambda: 510\text{ nm})}{[Mb - CO]_{m\acute{a}x}(\mu M)} \times 1000$$

$\Delta Abs(\lambda: 423\text{ nm})$: Diferencia entre absorbancias a $\lambda: 423\text{ nm}$ de los compuestos Mb-CO (disolución saturada con monóxido de carbono) y [Mb-Fe(II)]

$\Delta Abs(\lambda: 510\text{ nm})$: Diferencia entre absorbancias a $\lambda: 510\text{ nm}$ de los compuestos Mb-CO (disolución saturada con monóxido de carbono) y [Mb-Fe(II)]

Finalmente, la concentración de monóxido de carbono liberado a cada tiempo $[Mb-CO]_t$ se determinó según la expresión:

$$[Mb - CO]_t(\mu M) = \frac{[\Delta Abs(\lambda: 423\text{ nm})]_t - [\Delta Abs(\lambda: 510\text{ nm})]_t}{\varepsilon'(mM^{-1})} \times 1000$$

$[\Delta Abs(\lambda: 423\text{ nm})]_t$: Diferencia entre absorbancias a $\lambda: 423\text{ nm}$ de los compuestos $[Mb-CO]_t$ y [Mb-Fe(II)]

$[\Delta Abs(\lambda: 510\text{ nm})]_t$: Diferencia entre absorbancias a $\lambda: 510\text{ nm}$ de los compuestos $[Mb-CO]_t$ y [Mb-Fe(II)]

2.2.3. Estudios de la lixiviación de metales

Estabilidad de las matrices porosas durante el proceso de encapsulación. La estabilidad de las matrices CYCU-3 20_0, CYCU-3 50_5 y CYCU-3 50_50, en las condiciones de encapsulación se evaluó mediante difracción de rayos-X en polvo. Para ello, tras el proceso de lavado asistido por microondas (DMF, 50 °C durante 15 minutos x 3) así como de la activación (150 °C bajo vacío durante 24 horas) se registraron sus difractogramas de rayos-X en polvo en el rango 2θ de 5-35° cada 0.02° a intervalos de tiempo de 0.5 segundos. A continuación, se suspendieron 100 mg de cada uno de los materiales en metanol (20 mL) hasta la completa evaporación del disolvente y, tras secarse a temperatura ambiente, se registraron de nuevo sus patrones difracción. Los resultados se muestran en la Figura 104:

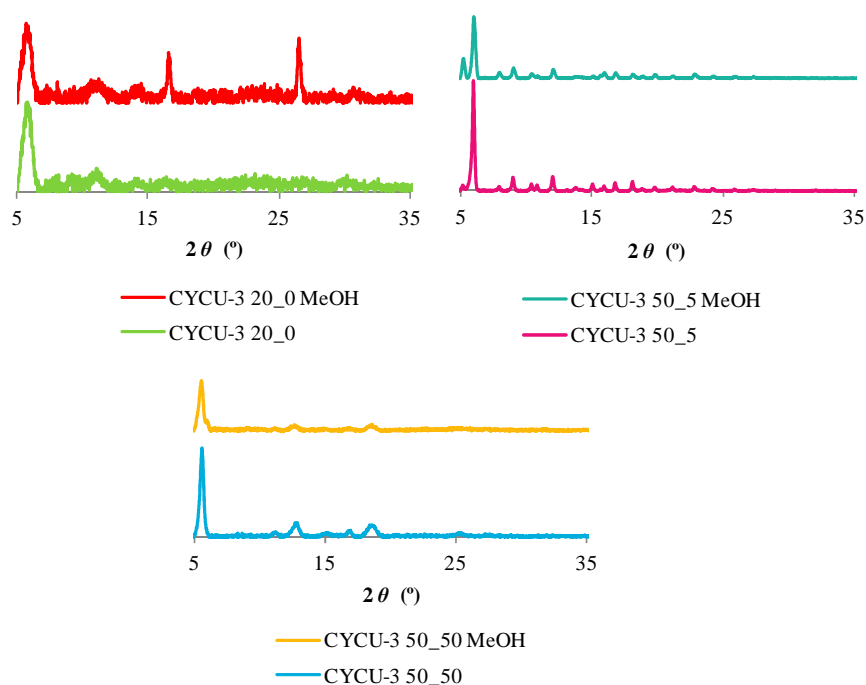


FIGURA 104: PATRONES DE DRXP DE LAS MATRICES CYCU-3 20_0, CYCU-3 50_5 Y CYCU-3 50_50 ANTES Y DESPUÉS DE SOMETERSE A LAS CONDICIONES DE ENCAPSULACIÓN.

Estudio de lixiviación para los materiales incubados en agua a 37 °C bajo irradiación con luz visible. Con el objetivo de evaluar la estabilidad de los sistemas híbridos así como su capacidad de retener los fragmentos metálicos encapsulados en

agua tras su fotoactivación, se prepararon diferentes suspensiones madres de los sistemas híbridos en agua para alcanzar una concentración de ALF794 1 mM (ALF794@CYCU-3 20_0: 3.6 mg mL⁻¹, ALF794@CYCU-3 50_5: 2.4 mg mL⁻¹ y ALF794@CYCU-3 50_50: 1.5 mg mL⁻¹). A continuación, se prepararon diferentes suspensiones de los sistemas híbridos diluyendo las suspensiones anteriores (1 mL de las suspensiones madre y 9 mL de agua) con el fin de alcanzar la misma concentración de ALF4794 empleada en los ensayos de liberación de CO (concentración final de ALF472 = 10 μM). Posteriormente, estas suspensiones se incubaron a 37 °C bajo irradiación con luz visible (lámpara fluorescente, flujo luminoso: 600 lm, temperatura de color 4000 K, distancia lámpara-muestra: 5 cm) durante 6, 24 y 72 horas. A cada tiempo, el sólido se separó del sobrenadante por centrifugación (3500 rpm/10 minutos), y este último se filtró (membrana de nylon, 0.2 μm). La concentración de los metales de interés (aluminio y molibdeno) en cada uno de los sobrenadantes recogidos se determinó mediante ICP-OES.

Estudio de lixiviación de Mo para los materiales incubados en PBS a 37 °C bajo irradiación con luz visible. Con el objetivo de evaluar la estabilidad de los sistemas híbridos, así como su capacidad de retener los fragmentos metálicos encapsulados después de incubarlos en PBS tras su fotoactivación, se prepararon diferentes suspensiones madres de los sistemas híbridos en PBS para alcanzar una concentración de ALF794 1 mM (ALF794@CYCU-3 20_0: 3.6 mg mL⁻¹, ALF794@CYCU-3 50_5: 2.4 mg mL⁻¹ y ALF794@CYCU-3 50_50: 1.5 mg mL⁻¹). A continuación, se prepararon diferentes suspensiones de los sistemas híbridos diluyendo las suspensiones anteriores (1 mL de las suspensiones madre y 9 mL de PBS) con el fin de alcanzar la misma concentración de ALF4794 empleada en los ensayos de liberación de CO (concentración final de ALF472 = 10 μM). Posteriormente, estas suspensiones se incubaron a 37 °C bajo irradiación con luz visible (lámpara fluorescente, flujo luminoso: 600 lm, temperatura de color 4000 K, distancia lámpara-muestra: 5 cm) durante 6, 24 y 72 horas. A cada tiempo, el sólido se separó del sobrenadante por centrifugación (3500 rpm/10 minutos) y este último se filtró (membrana de nylon, 0.2 μm). En cada uno de los sobrenadantes recogidos, se determinó la concentración de los metales de interés (molibdeno) mediante ICP-OES.

3. Preparación de CORMAs mediante la encapsulación de CORMs en MOFs de estructura jerarquizada.

3.1. Preparación y caracterización.

Síntesis de la matriz porosa ZnCPO de estructura jerarquizada. El material ZnCPO $[(Zn_2(dhtp)(H_2O)_2)_n]$ (H_4dhtp : ácido 2,5-dihidroxitereftálico; $C_8H_2O_6$) se sintetizó de acuerdo al procedimiento ya publicado.^[191] Para ello, se preparó una disolución de ácido 2,5-dihidroxitereftálico (49.5 mg, 0.25 mmol) en 10 mL de *N,N'*-dimetilformamida (DMF) y se añadió a otra disolución de $Zn(OAc)_2 \cdot 2H_2O$ (171.5 mg, 0.78 mmol) en 10 mL de DMF. La mezcla se agitó vigorosamente durante 1 hora, tras lo cual, el sólido se lavó con DMF (3 x 10 mL) y metanol (3 x 10 mL), se recuperó por centrifugación (3500 rpm/10 minutos) y se dejó secar al aire a temperatura ambiente. Anál. calc. para $[(Zn_2(C_8H_2O_6)(H_2O)_2)(C_3ONH_7)_{1.5}]$ (**ZnCPO**): N, 4.47; C, 31.91; H, 3.53. Anál. exp.: N, 4.40; C, 32.04; H, 3.55. Residuo (%) (calc./exp.): 34.59/31.15.

Estabilidad de la matriz porosa ZnCPO en condiciones fisiológicas simuladas. Para evaluar la estabilidad química de la matriz porosa de estructura jerarquizada ZnCPO ($[Zn_2(C_8H_2O_6)(H_2O)_2]_n$) en condiciones fisiológicas simuladas, se prepararon distintas suspensiones con 10.0 mg del material en 2 mL del tampón HEPES (10 mM, pH 7.4) o en 2 mL del tampón PBS (10 mM, pH 7.4). Estas suspensiones se incubaron en oscuridad a 37 °C durante diferentes tiempos (1, 3 y 6 horas para las suspensiones preparadas en HEPES; 30 minutos y 1 hora para las suspensiones preparadas en PBS). A cada tiempo, el sólido se recuperó por centrifugación (3500 rpm / 10 minutos) y se analizó mediante espectroscopía infrarroja y difracción de rayos-X en polvo.

Síntesis de los materiales ALF794@ZnCPO_x. Como procedimiento general, se preparó una disolución de $Zn(OAc)_2 \cdot 2H_2O$ (57.2 mg, 0.30 mmol) y diferentes proporciones molares de $[C_{18}H_{21}MoN_3O_9]$ (ALF794) (ej. $x = 0.2$ equivale a 31.2 mg, 0.06 mmol) en 3.33 mL de DMF. A esta disolución se le añadió otra disolución de H_4dhtp (16.5 mg, 0.08 mmol) en 3.33 mL de DMF. La mezcla se agitó vigorosamente durante 1 hora tras lo cual, el sólido se lavó con DMF (3 x 10 mL) y metanol (3 x 10 mL) y se recuperó por centrifugación, dejando secar al aire a temperatura ambiente. Las

distintas proporciones de ALF794/Zn(OAc)₂·2H₂O (x) empleadas fueron: x = 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1. Es importante destacar que todas las manipulaciones se realizaron en oscuridad para evitar la fotoactivación del complejo metálico.

Anál. calc. para $Zn_2(C_8H_2O_6)(H_2O)_{4.6}(C_{18}H_{21}O_9N_3Mo)_{0.14}(C_3ONH_7)_{0.23}$ (ALF794@ZnCPO_0.2): N, 1.85; C, 27.65; H, 3.00. Anál. exp.: N, 1.89; C, 26.86; H, 2.95; Residuo (%) (calc./exp.): 35.81/36.79. Ratio Zn/Mo determinado por ICP-OES: 2.0/0.14

Anál. calc. para $Zn_2(C_8H_2O_6)(H_2O)_{4.5}(C_{18}H_{21}O_9N_3Mo)_{0.15}(C_3ONH_7)_{0.1}$ (ALF794@ZnCPO_0.4): N, 1.61; C, 27.53; H, 2.91. Anál. exp.: N, 1.51; C, 26.86; H, 2.97; Residuo (calc./exp.) (%) 31.03/37.54. Ratio Zn/Mo determinado por ICP-OES: 2.0/0.15

Anál. calc. para $(Zn_2(C_8H_2O_6)(H_2O)_3(C_{18}H_{21}O_9N_3Mo)_{0.16}(C_3ONH_7)_{0.15}$ (ALF794@ZnCPO_0.6): N, 1.87; C, 28.77; H 2.64. Anál. exp.: N, 1.85; C, 28.49; H 2.41. Residuo (calc./exp.) (%): 35.34/39.28. Ratio Zn/Mo determinado por ICP-OES: 2.0/0.16.

Anál. calc. para $(Zn_2(C_8H_2O_6)(H_2O)_{3.3}(C_{18}H_{21}O_9N_3Mo)_{0.13}(MoO_3)_{0.19}(C_3ONH_7)_{0.33}$ (ALF794@ZnCPO_0.8): N, 2.00; C, 27.04; H, 2.73. Anál. exp.: N, 2.16; C, 26.87; H 2.40. Residuo (calc./exp.) (%): 41.49/38.4. Ratio Zn/Mo determinado por ICP-OES: 2.0/0.32.

Anál. calc. para $(Zn_2C_8H_2O_6)(H_2O)_{3.5}(C_{18}H_{21}O_9N_3Mo)_{0.23}(MoO_3)_{0.31}(C_3ONH_7)_{0.32}$ (ALF794@ZnCPO_1): N, 2.46; C, 27.35; H 2.82. Anál. exp.: N, 2.80; C, 27.04; H, 2.50. Residuo (calc./exp.) (%): 41.80%/40.18%. Ratio Zn/Mo determinado por ICP-OES: 2.0/0.53

Los análisis termogravimétricos de los distintos materiales híbridos preparados en este capítulo se muestran en la Figura 105. Los residuos calculados y teóricos se muestran junto a los resultados de análisis elemental e ICP-OES para cada material.

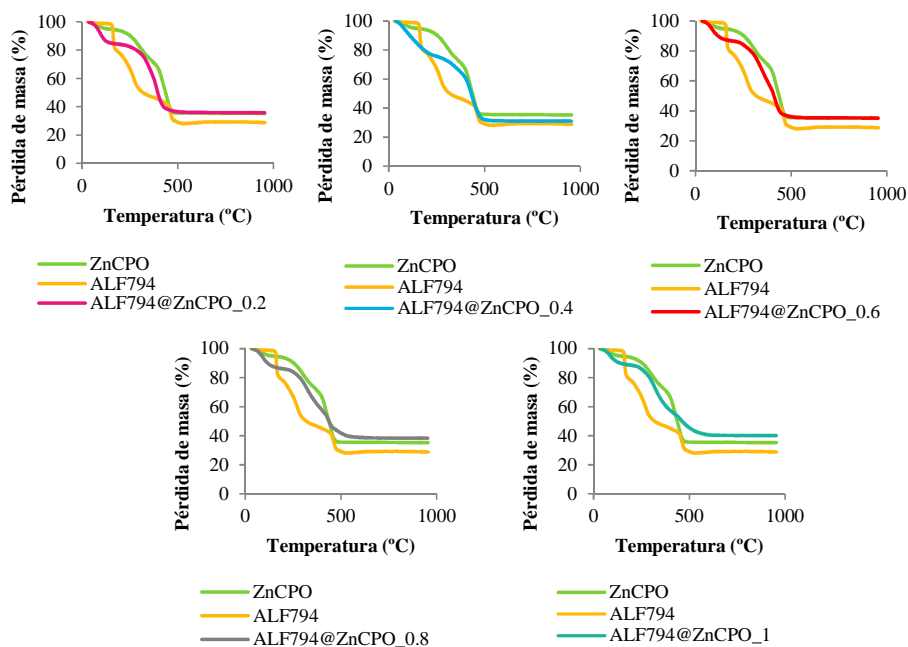


FIGURA 105: ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICOS DE LOS DISTINTOS MATERIALES PREPARADOS EN EL CAPÍTULO III.

3.2. Estudio de la liberación de CO para el material híbrido ALF794@ZnCPO_0.2

La cantidad de monóxido de carbono liberada se cuantificó mediante el ensayo de la mioglobina (véase sección 2.2.2 de este Anexo).^[133,187] La liberación de CO, desde el compuesto ALF794 así como desde el sistema híbrido ALF794@ZnCPO_0.2, se determinó registrando la conversión de una disolución de mioglobina reducida ([Mb-Fe(II)]) en carbomonoximioglobina (Mb-CO) mediante espectrofotometría ultravioleta-visible. La cantidad de Mb-CO formada se determinó registrando el espectro de absorción en el rango 400-700 nm y midiendo la absorbancia a 423 nm a diferentes tiempos. Antes de cada ensayo, se prepararon disoluciones madre, en tampón HEPES desoxigenado (10 mM, pH 7.4), para la mioglobina de corazón de caballo (100 μM), el agente reductor (ditionito sódico, 40 mg mL^{-1}) y los compuestos bajo estudio (ALF794 y ALF794@ZnCPO_0.2). En este sentido, dada la baja solubilidad en medio acuoso del CORM libre, se preparó previamente una disolución de ALF794 (10 mM) en metanol desoxigenado (5.2 mg mL^{-1}), de la cual se tomó una alícuota y se transfirió a una

disolución de tampón HEPES desoxigenado para alcanzar una concentración final de ALF794 1 mM. Por otra parte, para el caso del material híbrido ALF794@ZnCPO_0.2, se preparó directamente una suspensión con una concentración final de ALF794 1 mM (3.5 mg ALF794@ZnCPO_0.2/mL HEPES desoxigenado). A continuación, en una cubeta de cuarzo dotada con un septum ($l = 1$ cm), se añadieron, bajo atmósfera inerte, 100 μ L de la disolución madre de mioglobina, 100 μ L de la disolución de ditionito sódico, 10 μ L de la disolución de ALF794 o de la suspensión de ALF794@ZnCPO_0.2 y 790 μ L de tampón HEPES desoxigenado (concentración final de ALF794 = 10 μ M).

Ensayos con luz visible. Las cubetas se incubaron a 37 °C bajo la irradiación de una lámpara fluorescente (flujo luminoso: 600 lm, temperatura de color 4000 K, distancia lámpara-muestra: 5 cm), registrándose su espectro de absorción a diferentes tiempos (0-1440 minutos).

Ensayos con luz ultravioleta. Las cubetas se incubaron a 37 °C bajo la irradiación de una lámpara ultravioleta ($\lambda = 365$ nm, distancia lámpara-muestra: 5 cm), registrándose su espectro de absorción a diferentes tiempos (0-240 minutos).

3.3. Estudios de la lixiviación de fragmentos metálicos para el material híbrido ALF794@ZnCPO_0.2

Estudio de lixiviación en oscuridad

Con el objetivo de evaluar la capacidad del material ALF794@ZnCPO_0.2 para retener el compuesto ALF794 dentro de sus cavidades, se preparó una suspensión madre con 3.5 mg del material ALF794@ZnCPO_0.2 en 10 mL de HEPES (10 mM, pH 7.4). La concentración final de ALF794 en esta disolución madre era de 100 μ M. A continuación, se prepararon diferentes suspensiones de ALF794@ZnCPO_0.2 diluyendo la suspensión madre (1 mL de la suspensión anterior y 9 mL de HEPES), con el fin de alcanzar la misma concentración de ALF794 empleada en los ensayos de liberación de CO (concentración final de ALF794 = 10 μ M). Posteriormente, estas suspensiones se incubaron a 37 °C en oscuridad durante 1, 3 y 6 horas. A cada tiempo, el sólido se separó del sobrenadante por centrifugación (3500 rpm/10 minutos) se recogió y se filtró (membrana de nylon, 0.2 μ m). La concentración de los metales de

interés (Zn y Mo) en cada uno de los sobrenadantes recogidos se determinó mediante ICP-OES.

Estudio de lixiviación bajo irradiación con luz ultravioleta

Con el objetivo de evaluar la capacidad del material ALF794@ZnCPO_0.2 para retener los fragmentos metálicos dentro de sus cavidades, se preparó una suspensión madre con 3.5 mg del material ALF794@ZnCPO_0.2 en 10 mL de HEPES (10 mM, pH 7.4). La concentración final de ALF794 en esta disolución madre era de 100 μ M. A continuación, se prepararon diferentes suspensiones de ALF794@ZnCPO_0.2 diluyendo la suspensión madre (1 mL de la suspensión anterior y 9 mL de HEPES), con el fin de alcanzar la misma concentración de ALF794 empleada en los ensayos de liberación de CO (concentración final de ALF794 = 10 μ M). Posteriormente, estas suspensiones se incubaron a 37 °C y se irradiaron con una lámpara ultravioleta ($\lambda = 365$ nm, distancia muestra-lámpara: 5 cm) durante 1, 3 y 6 horas. A cada tiempo, el sólido se separó del sobrenadante por centrifugación (3500 rpm/10 minutos), se recogió y se filtró (membrana de nylon, 0.2 μ m). Finalmente, la concentración de los metales de interés (Zn y Mo) en cada uno de los sobrenadantes recogidos se determinó mediante ICP-OES.

4. Intercambio iónico como estrategia para la preparación de CORMAs

4.1. Preparación y caracterización

Síntesis de $(\text{NH}_2(\text{CH}_3)_2)_2[\text{Zn}_8(\text{adeninato})_4(\text{BPDC})_6$ (bio-MOF-1). El compuesto bio-MOF-1 se sintetizó siguiendo el procedimiento ya publicado.^[196] Se mezclaron 16.9 mg (0.13 mmol) de adenina, 60.6 mg (0.25 mmol) de ácido bifenil-4,4'-dicarboxílico, 82.3 mg (0.38 mmol) de acetato de zinc dihidratado, 42 μL de ácido nítrico (agente modulante), 13.5 mL de *N,N'*-dimetilformamida (DMF) y 1 mL de agua destilada en un vial de 20 mL. La mezcla se calentó a 130 °C durante 24 horas. Tras el tiempo de reacción precipitó un sólido blanco. La mezcla se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y el sólido se lavó con DMF (3 x 10 mL) y se separó por centrifugación (4000 rpm/10 minutos). El producto final se dejó secar al aire a temperatura ambiente.

Anál. calc. para $(\text{NH}_2(\text{CH}_3)_2)_2[\text{Zn}_8(\text{C}_5\text{N}_3\text{H}_4)_4(\text{C}_{14}\text{H}_8\text{O}_4)_6\text{O}(\text{CH}_3\text{OH})_{1.3}](\text{C}_3\text{H}_7\text{NO})_{18}(\text{H}_2\text{O})_8(\text{CH}_3\text{OH})_4$ (bio-MOF-1): N, 12.11; C, 47.07; H, 4.99. Anál. exp. N, 12.60; C, 47.14; H, 4.57. Residuo (%) (cal./exp.): 16.33/18.7

Síntesis de MCM-41. La síntesis de la sílice mesoporosa MCM-41 se llevó a cabo según el protocolo propuesto por Rathousky *et al.*^[199] Para ello, se disolvieron 2.61 g (7.16 mmol) de dodeciltrimetilamonio (CTAB) en 400 mL de agua a 30 °C. Tras su disolución, se añadieron 2.67 g (21.874 mmol) de metasilicato de sodio. Una vez conseguida una mezcla homogénea, se añadieron 4 mL de acetato de etilo bajo una agitación fuerte y tras 15 segundos, la mezcla se trasladó a una botella de polipropileno y se mantuvo en condiciones estáticas a temperatura ambiente durante 24 horas. Tras esto, se calentó a 100 °C durante 48 horas. El sólido blanco precipitado se filtró en caliente, se lavó con etanol y agua (3 x 10 mL) y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, la eliminación del tensioactivo se llevó a cabo por calcinación calentando a 600 °C durante 20 horas (rampa de calentamiento de 1 °C min^{-1}).

Síntesis de SBA-15. El material SBA-15 se sintetizó según el procedimiento propuesto por Zhao *et al.*^[200] En este caso, se disolvieron 2.0 gramos del polímero Pluronic 123 (poli(etilenglicol))-poli(propilenglicol)-poli(etilenglicol) (EO)20(PO)70(EO)20, EO: Óxido de etileno, PO: Óxido de propileno) en 104 mL de agua y 20 mL de HCl con el 37 % de riqueza a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 7.4 mL (20.3 mmol) de tetraetoxisilicato (TEOS) y la disolución se calentó a 40 °C durante 20 horas. Transcurrido ese tiempo, la mezcla se sometió a un proceso hidrotermal a 100 °C durante 24 horas. El sólido resultante se lavó con abundante agua y se filtró. Tras secarlo a temperatura ambiente, el tensioactivo se eliminó por calcinación a 550 °C durante 6 horas (rampa de calentamiento de 1 °C min⁻¹).

Síntesis de MCM-41-SO₃H. La funcionalización del material MCM-41 se llevó a cabo mediante un procedimiento post-sintético ya publicado.^[201] Para ello, se introdujeron 0.5 gramos de MCM-41 ya calcinado en un tubo Schlenk y se mantuvieron bajo vacío durante 5 horas. Tras ese tiempo y bajo atmósfera inerte, el sólido se suspendió en 20 mL de diclorometano a 0 °C y se añadieron 1.86 mL (10.01 mmol) de 3-(mercaptopropil)trimetoxisilano (MPS) manteniendo la mezcla en agitación durante 22 horas en atmósfera inerte. Tras el tiempo de reacción, la suspensión se filtró, lavando con diclorometano y etanol (3 x 10 mL) y el sólido se secó a 100 °C durante 5 horas. A continuación, 0.3 g del sólido resultante se suspendieron en 10 mL de H₂O₂ (30 wt %) y la mezcla se mantuvo en agitación durante 48 horas a temperatura ambiente. Después, el producto se filtró lavando con etanol y agua (3 x 10 mL), y se suspendió en 30 mL de H₂SO₄ (1 M) manteniéndolo en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, el sólido se recogió por filtración, se lavó con etanol y agua (3 x 10 mL) y se dejó secar a temperatura ambiente. Anál. calc. para SiO₂[(CH₂)₃SO₃H]_{0.023}(H₂O)_{0.18}(CH₃CH₂OH)_{0.05} (**MCM-41-SO₃H**): C, 3.04; H, 1.02; S, 0.98. Anál. exp.: C, 2.96; H, 1.21; S, 1.07. Residuo (%) (cal./exp.): 87.8/85.0. Grado de funcionalización encontrado (valoración ácido-base): 0.37 mmol R-SO₃H g⁻¹. Calculado: 0.34 mmol R-SO₃H g⁻¹

Síntesis de SBA-15-SO₃H. La funcionalización de la matriz SBA-15 con grupos alquilsulfónicos se llevó a cabo mediante un proceso de co-condensación de acuerdo

con el procedimiento publicado por Klier *et al.*^[202] En este caso, se disolvieron 4.0 gramos de Pluronic 123 en 125 gramos de una disolución de HCl 1.9 M a temperatura ambiente. A continuación, se adicionaron 7.4 mL (32.8 mmol) de TEOS y la mezcla se mantuvo en agitación durante 3 horas. Una vez transcurrido ese tiempo, se añadieron 1.52 mL (8.2 mmol) de MPS y 8.25 mL de H₂O₂ (30 wt %) y la mezcla calentó a 40 °C durante 20 horas. Posteriormente, la suspensión se transfirió a una botella de polipropileno y se calentó a 100 °C durante 24 horas más. Tras el tiempo de reacción, se formó un sólido que se recogió por filtración y se lavó con abundante agua. En este caso, la eliminación del polímero orgánico se llevó a cabo mediante extracción con etanol. Para ello, el sólido obtenido se suspendió en etanol (1.5 gramos de material por 400 mL de disolvente) y la suspensión se calentó a reflujo durante 24 horas. Finalmente, el sólido se recogió por filtración, se lavó con agua y etanol (3 x 10 mL) y se dejó secar a temperatura ambiente. Anál. calc. para SiO₂[(CH₂)₃SO₃H]_{0.14}(H₂O)_{0.15}(CH₃CH₂OH)_{0.07} (**SBA-15-SO₃H**): C, 8.18; H, 2.05; S, 5.34. Anál. exp.: C, 8.08; H, 2.06; S, 5.39. Residuo (%) (cal./exp.): 71.2/72.1. Grado de funcionalización encontrado (valoración ácido-base): 1.6 mmol R-SO₃H g⁻¹. Calculado: 1.7 mmol R-SO₃H g⁻¹

Síntesis de Al-MCM-41. El material Al-MCM-41 se preparó de acuerdo al protocolo publicado.^[179] Para ello, se disolvió 1 g of CTAB en 483.5 mL de una disolución acuosa de hidróxido de sodio (14 mM) a 80 °C durante 15 minutos. A continuación, se añadieron 98 mg de aluminato de sodio (1.19 mmol) y 4.52 mL de TEOS (23.0 mmol) manteniendo la mezcla en agitación durante 2 horas más a 80 °C. Tras este tiempo, precipitó un sólido blanco que se recuperó por filtración, se lavó con agua y se dejó secar a temperatura ambiente. La eliminación del tensioactivo se llevó a cabo mediante la calcinación del material a 550 °C durante 4 horas (rampa de calentamiento 1 °C min⁻¹. Ratio Al/Si (EDX): 0.106 para SiO₂[AlO₂Na]_{0.106}

Síntesis de [Pt(Cl)₂(NH₃)₂] (Cisplatino): El compuesto se sintetizó de acuerdo con la metodología desarrollada por Dhara.^[210] Todas las manipulaciones se llevaron a cabo en oscuridad. Se disolvieron 500 mg (1.20 mmol) de K₂PtCl₄ en 5 mL de agua. A continuación, se añadieron 828 mg (4.99 mmol) de KI y la disolución se mantuvo en

agitación durante 10 minutos. Entonces, se añadieron 0.40 mL de una mezcla de agua-amoniaco en proporción 1:1 (v/v) y la mezcla se mantuvo en agitación durante 30 minutos más, dando lugar a un precipitado $[\text{PtI}_2(\text{NH}_3)_2]$ que se lavó con agua (3 x 5 mL), se recogió por filtración y se dejó secar a temperatura ambiente. Entonces, se añadieron 530 mg de $[\text{PtI}_2(\text{NH}_3)_2]$ (1.10 mmol) sobre 10 mL de una disolución acuosa de AgNO_3 (2.21 mmol) y la suspensión se mantuvo a 70 °C durante 1.5 horas. El precipitado formado (AgI) se desechó. A continuación, se añadieron 196 mg de KCl (2.62 mmol) sobre la disolución filtrada y ésta se calentó a 70 °C durante una hora. Finalmente, precipitó un sólido de color amarillo $[\text{Pt}(\text{Cl})_2(\text{NH}_3)_2]$ (Cisplatino) que, tras lavarse con agua (3 x 10 mL) se recogió por filtración. Anál. calc. para: $[\text{Pt}(\text{Cl})_2(\text{NH}_3)_2]$; N, 9.34; C, 0.00; H, 2.06. Anál. exp.: N, 9.13; C, 0.06; H, 2.14.

Incorporación de ALF472 en el bio-MOF-1. La incorporación del compuesto $[\text{Mn}(\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_{15})(\text{CO})_3]\text{Br}$ (ALF472) en el MOF bio-MOF-1 ($(\text{NH}_2(\text{CH}_3)_2)_2[\text{Zn}_8(\text{adeninato})_4(\text{BPDC})_6]$) se llevó a cabo mediante impregnación sólido-líquido. Para ello, se preparó una disolución de ALF472 (29.2 mg, 0.08 mmol) en 2 mL de DMF y se añadieron sobre una suspensión de bio-MOF-1 (70 mg, 0.02 mmol, equivalente a 0.04 mmol de cationes $[\text{NH}_2(\text{CH}_3)_2]^+$ intercambiables) en 3 mL de DMF. La mezcla se mantuvo en agitación durante 4 días a temperatura ambiente. Tras este tiempo, el sólido se recogió por filtración y se lavó con DMF (2 x 10 mL) y MeOH (1 x 10 mL) dejándolo secar a temperatura ambiente. Todas las manipulaciones anteriores se llevaron a cabo en oscuridad a fin de evitar la fotoactivación del complejo de manganeso. Anál. calc. para $(\text{NH}_2(\text{CH}_3)_2)_{1.3}[\text{Mn}(\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_{15})(\text{CO})_3]_{0.7}[\text{Zn}_8(\text{C}_5\text{N}_5\text{H}_4)_4(\text{C}_{14}\text{H}_8\text{O}_4)_6\text{O}](\text{CH}_3\text{OH})_{1.3}(\text{C}_3\text{H}_7\text{NO})_{10}(\text{H}_2\text{O})_6$ (ALF472@bio-MOF-1): N, 12.83; C, 47.51; H, 4.76. Anál. exp.: N, 13.13; C, 46.97; H, 4.60. Residuo (%) (cal./exp.): 18.9/19.2. Ratio (EDX) Zn_8/Mn : 0.88.

Incorporación de ALF472 en MCM-41-SO₃H. La incorporación de ALF472 en el material MCM-41-SO₃H también se llevó a cabo mediante impregnación sólido-líquido. Para ello, 100 mg de MCM-41-SO₃H activado (1.6 mmol, equivalente a 0.03 mmol grupos alquilsulfónicos con protones intercambiables) se añadieron a 5 mL de una disolución de ALF472 (20.0 mg, 0.06 mmol). La mezcla se mantuvo en agitación

durante 4 días a temperatura ambiente. Tras este tiempo, el sólido se lavó con agua (3 x 6 mL) y se recuperó por centrifugación (3500 rpm/5 minutos), dejándose secar al aire a temperatura ambiente. Todas las manipulaciones anteriores se llevaron a cabo en oscuridad con el objetivo de evitar la fotoactivación del complejo de manganeso. Anál. calc. para $\text{SiO}_2[(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Mn}(\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_{15})(\text{CO})_3]_{0.015}(\text{H}_2\text{O})_{0.75}(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH})_{0.05}$ (**ALF472@MCM-41-SO₃**): N, 0.83; C, 4.23; H, 2.79; S, 0.56. Anál. exp.: N, 0.78; C, 4.14; H, 2.61; S, 0.59. Residuo (%) (cal./exp.): 89.5/85.5. Ratio Si/Mn (EDX): 0.015

Incorporación de ALF472 en SBA-15-SO₃H. La incorporación de ALF472 en el material SBA-15-SO₃H se llevó a cabo mediante impregnación sólido-líquido. Para ello, 100 mg de SBA-15-SO₃H previamente activado (1.30 mmol, equivalente a 0.18 mmol de grupos alquilsulfónicos con protones intercambiables) se añadieron a 5 mL de una disolución acuosa de ALF472 (124 mg, 0.36 mmol). La mezcla se mantuvo en agitación durante 4 días a temperatura ambiente. Tras este tiempo, el sólido se lavó con agua (3 x 6 mL) y se recuperó por centrifugación (3500 rpm/5 minutos), dejándose secar al aire a temperatura ambiente. Todas las manipulaciones anteriores se llevaron a cabo en oscuridad a fin de evitar la fotoactivación del complejo de manganeso. Anál. calc. para $\text{SiO}_2[(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{H}]_{0.045}[(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Mn}(\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_{15})(\text{CO})_3]_{0.044}(\text{H}_2\text{O})_{0.6}$ (**ALF472@SBA-15-SO₃**): N, 1.79; C, 8.33; H, 2.14; S, 3.20. Anál. exp.: N, 1.97; C, 8.56; H, 2.63; S, 3.05. Residuo (%) (cal./exp.): 70.5/70.0 Ratio Si/Mn (EDX): 0.044.

Incorporación de ALF472 en Al-MCM-41. La incorporación de ALF472 en el material AL-MCM-41 se llevó a cabo siguiendo la misma metodología que en los casos anteriores. Para ello, 100 mg del material Al-MCM-41 activado (1.45 mmol, equivalente a 0.15 mmol de cationes sodio intercambiables) se suspendieron en 4 mL de agua. A continuación, una disolución de 107.3 mg (0.30 mmol) de ALF472 en 6 mL de agua se añadió a la suspensión y se mantuvo en agitación durante 24 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras el tiempo de reacción, el sólido se lavó con agua (3 x 10 mL) y se recuperó por centrifugación (3500 rpm/5 minutos), dejándolo secar a temperatura ambiente. Todas las manipulaciones anteriores se llevaron a cabo en la oscuridad con el objetivo de evitar la fotoactivación del complejo de manganeso. Anál. calc. para $\text{SiO}_2(\text{AlO}_2\text{Na})_{0.059}(\text{AlO}_2\text{Mn}(\text{HNC}_2\text{H}_4)_3(\text{CO})_3)_{0.037}(\text{H}_2\text{O})_{0.65}$

(**ALF472@Al-MCM-41**): N, 1.75; C, 4.51; H, 2.11. Anál. exp.: N, 2.00; C, 4.14; H 1.82. Residuo (%) (cal./exp.): 76.2/74.0. Ratio Si/Mn (EDX): 0.03

Incorporación dual de ALF472 y cisplatino en Al-MCM-41. La incorporación dual de ALF472 y cisplatino en el material Al-MCM-41 se llevó a cabo mediante impregnación sólido-líquido. Para ello, se preparó una disolución acuosa con 15 mg (0.05 mmol) de cisplatino en 15 mL de agua. A continuación, se añadieron 53.5 mg (0.15 mmol) de ALF472 y 50 mg del material Al-MCM-41 activado (0.72 mmol, equivalente a 0.07 mmol de cationes sodio intercambiables). La mezcla se mantuvo en agitación y oscuridad a temperatura ambiente durante un día. A continuación, el sólido se lavó con agua (3 x 15 mL) y se recuperó por centrifugación (3500 rpm/5 minutos). Todas las manipulaciones anteriores se llevaron a cabo en la oscuridad con el objetivo de evitar la fotoactivación del complejo de manganeso. Anál. calc. para $\text{SiO}_2(\text{AlO}_2\text{Na})_{0.059}(\text{AlO}_2\text{Mn}(\text{HNC}_2\text{H}_4)_3(\text{CO})_3)_{0.036}(\text{Pt}(\text{Cl})_2(\text{NH}_3)_2)_{0.01}(\text{H}_2\text{O})_{1.85}$ (**ALF472-Cisplatino@Al-MCM-41**): N, 1.58; C, 3.44; H, 3.83. Anál. exp.: N, 1.53; C, 3.60; H, 3.34. Residuo (%) (cal./exp.): 60.2/55.0. Ratio Mn/Pt (EDX): 3.0

Incorporación de cisplatino en Al-MCM-41. La incorporación cisplatino en el material Al-MCM-41 se llevó a cabo mediante impregnación sólido-líquido. Para ello, se preparó una disolución acuosa con 15 mg (0.05 mmol) de cisplatino en 15 mL de agua. A continuación, se añadieron 50 mg del material Al-MCM-41 activado (0.72 mmol). La mezcla se mantuvo en agitación y oscuridad a temperatura ambiente durante un día. A continuación, el sólido se lavó con agua (3 x 15 mL) y se recuperó por centrifugación (3500 rpm/5 minutos). Anál. calc. para $\text{SiO}_2(\text{AlO}_2\text{Na})_{0.106}(\text{Pt}(\text{Cl})_2(\text{NH}_3)_2)_{0.003}(\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{NBr})_{0.028}(\text{H}_2\text{O})_{10.55}$ (**Cisplatino@Al-MCM-41**): N, 0.53; C, 7.12; H, 2.58. Encontrado: N, 0.33; 7.48; H, 2.60. Residuo (%) (cal./exp.): 78.6/77.8. Ratio Si/Pt (EDX): 0.006

Los análisis termogravimétricos de los distintos materiales preparados en este capítulo se muestran en la Figura 106. Los residuos calculados y teóricos se pueden consultar en el apartado de preparación de cada material.

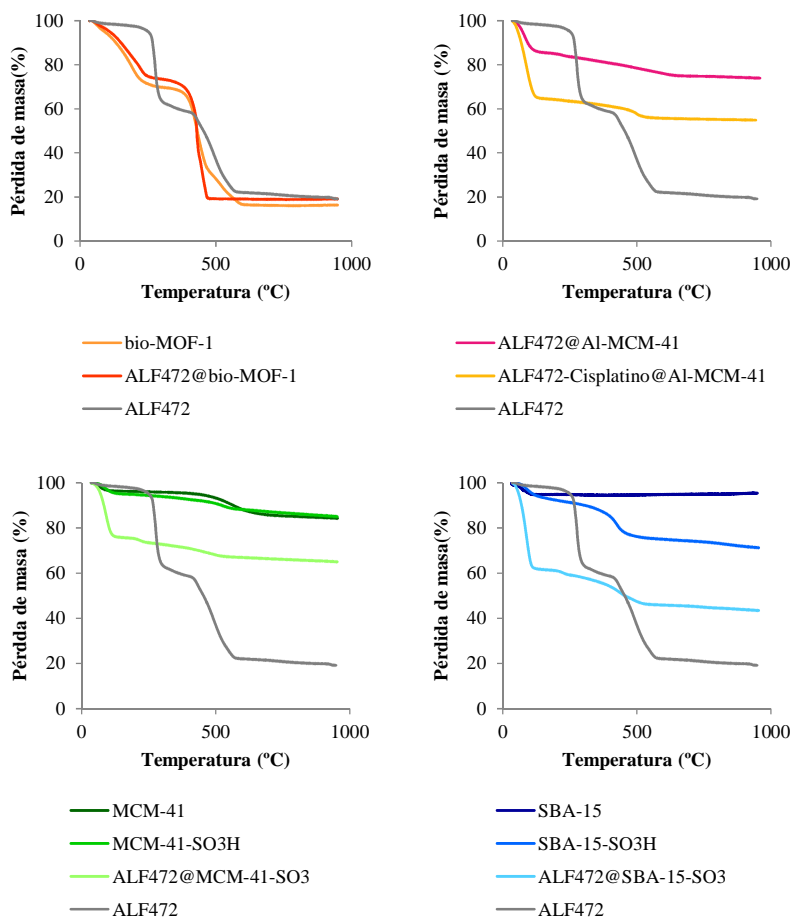


FIGURA 106: ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICOS DE LOS DISTINTOS MATERIALES PREPARADOS EN EL CAPÍTULO IV.

Evaluación de la porosidad. La porosidad los materiales MCM-41, MCM-41-SO₃H, SBA-15, SBA-15-SO₃H y Al-MCM-41 se evaluó registrando sus isothermas de adsorción de nitrógeno a 77 K. Antes de llevar a cabo las medidas de adsorción, el disolvente retenido en los poros de las distintas matrices fue eliminado mediante un tratamiento térmico a vacío. Para el caso de los materiales MCM-41, SBA-15, Al-MCM-41, los materiales se activaron a 150°C bajo vacío (10⁻⁴ bar) durante 24 horas. Por su parte, los materiales funcionalizados MCM-41-SO₃H y SBA-15-SO₃H se activaron a 60 °C bajo vacío (10⁻⁴ bar) durante 24 horas.

Finalmente, la superficie específica de cada uno de estos materiales se determinó mediante el método Brunauer-Emmet-Teller (BET). Además, para el caso de los

materiales MCM-41-SO₃H, SBA-15-SO₃H, los datos obtenidos permitieron determinar el diámetro de poro mediante el método BJH.

Imágenes obtenidas mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM).

Las imágenes de los sistemas híbridos ALF472@MCM-41-SO₃, ALF472@SBA-15-SO₃, ALF472@bio-MOF-1 obtenidas mediante TEM se muestran en la Figura 107:

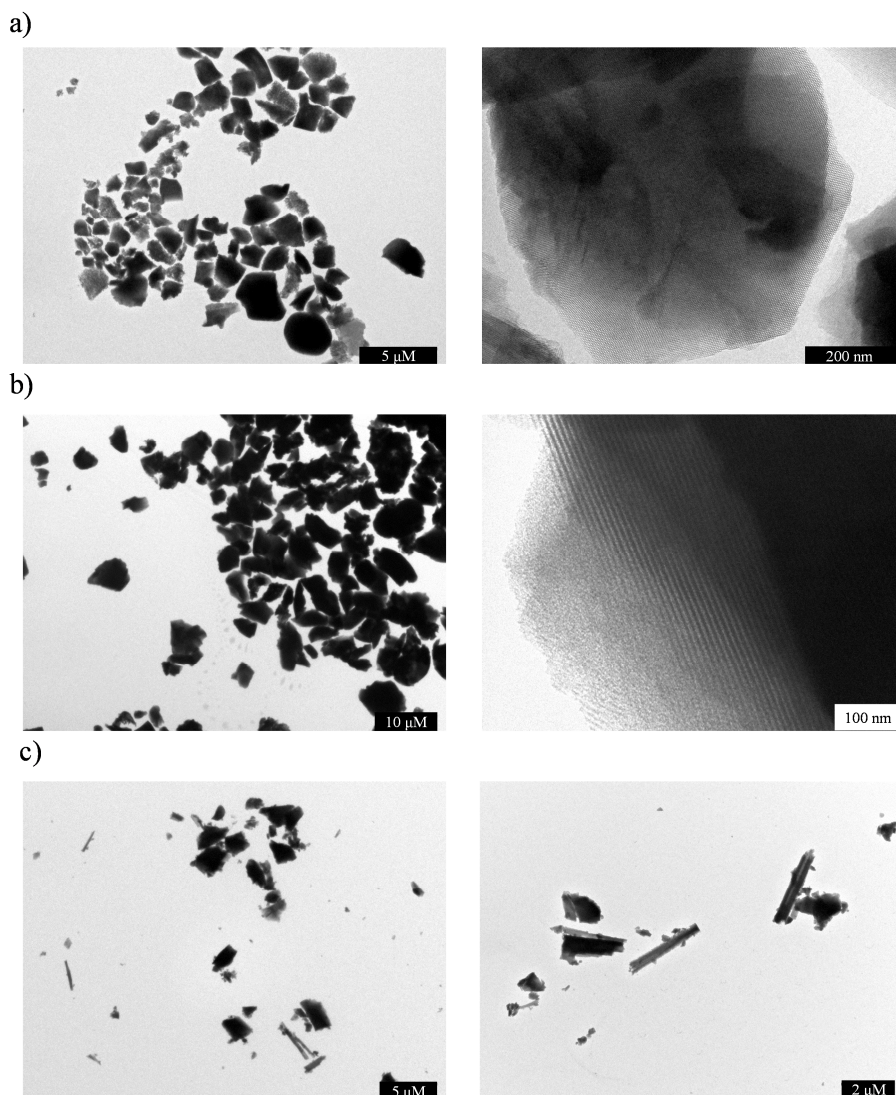


FIGURA 107: IMÁGENES OBTENIDAS MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM). a) ALF472@MCM-41-SO₃H, b) ALF472@SBA-15-SO₃H, c) ALF472@bio-MOF-1.

Estudios de Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN-¹H). Con el fin de confirmar la interacción de ALF472 con las moléculas de adenina, se registraron los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H) del complejo ALF472 y de la base nitrogenada adenina utilizando en ambos casos agua deuterada (D₂O) como disolvente. Por otro lado, se prepararon dos disoluciones acuosas que contenían una mezcla de ALF472 (10 μM) y adenina (57 μM). Una de ellas se incubó a 37 °C durante 24 horas bajo irradiación con luz visible (lámpara fluorescente con lujo luminoso: 600 lm, temperatura de color 4000 K, distancia lámpara-muestra: 5 cm) mientras que la otra se incubó durante el mismo tiempo y a la misma temperatura pero en oscuridad. Tras ese tiempo, el disolvente de ambas disoluciones se eliminó a vacío, los sólidos se redisolviaron en agua deuterada (D₂O) y se registraron sus espectros RMN-¹H

Estudios de comportamiento hidrodinámico. Con el objetivo de analizar el comportamiento hidrodinámico de las partículas de los materiales Al-MCM-41, ALF472@Al-MCM-41 y ALF472-Cisplatino@Al-MCM-41 en medio fisiológico, se prepararon suspensiones de estos en PBS (10 mM, pH 7.4) con concentraciones de 0.5 mg/mL y se sonicaron mediante ultrasonidos (pulsos de encendido/apagado de 15 segundos, amplitud 30 %, potencia 20 W, tiempo total 15 minutos). A continuación, se analizó su tamaño y potencial z mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS). Previamente, cada una de las suspensiones se sonicaron.

4.2. Estudio de la liberación de CO

La cantidad de monóxido de carbono liberada por los distintos CORMAs preparados y por el propio CORM ALF 472 libre se cuantificó mediante el ensayo de la mioglobina (véanse los detalles en la página 214).^[133,187] La liberación de CO desde el compuesto ALF472 así como desde los sistemas híbridos ALF472@bio-MOF-1, ALF472@MCM-41-SO₃, ALF472@SBA-15-SO₃, ALF472@Al-MCM-41, ALF472-Cisplatino@Al-MCM-41 y desde la mezcla ALF472 y adenina (57 μM, concentración correspondiente a la cantidad lixiviada tras la descomposición de la matriz bio-MOF-1) se determinó registrando la conversión de una disolución de mioglobina reducida ([Mb-Fe(II)]) en carbomonoximioglobina (Mb-CO) mediante espectrofotometría ultravioleta-visible. La cantidad de Mb-CO formada se determinó registrando el espectro de absorción en el

rango 400-700 nm y midiendo la absorbancia a 423 nm a diferentes tiempos. Previo a cada ensayo, se prepararon las disoluciones madre, en PBS desoxigenado, de mioglobina de corazón de caballo (100 μM), del agente reductor ditionito de sodio (40 mg mL^{-1}) y de los compuestos objeto de estudio: *i*) ALF472 libre para obtener una concentración 1 mM o *ii*) los diferentes materiales híbridos en una cantidad tal para obtener una suspensión que contuviera una concentración 1 mM de ALF472. En este sentido, para el caso del CORM libre, se preparó previamente una disolución de ALF472 (10 mM) en PBS desoxigenado (3.5 mg mL^{-1}), de la que se tomó una alícuota y se transfirió a una disolución de tampón PBS desoxigenado para alcanzar una concentración final de ALF472 1 mM. Por otra parte, para el caso de los materiales híbridos, se preparó directamente una suspensión, para cada uno de ellos, con una concentración final de ALF472 1 mM (ALF472@bio-MOF-1: 5.3 mg mL^{-1} , ALF472@MCM-41-SO₃: 5.4 mg mL^{-1} , ALF472@SBA-15-SO₃: 2.1 mg mL^{-1} , ALF472@Al-MCM-41: 2.4 mg mL^{-1} , ALF472-Cisplatino@Al-MCM-41: 3.1 mg mL^{-1}). A continuación, bajo atmósfera inerte, se añadieron a una cubeta de cuarzo dotada con un septum ($l = 1 \text{ cm}$): 100 μL de la disolución de mioglobina, 100 μL de la disolución de ditionito de sodio, 10 μL de la disolución de ALF472 o de la correspondiente suspensión del material híbrido y 790 μL de PBS desoxigenado (concentración final de ALF472 = 10 μM).

Ensayo en oscuridad. La cubeta con ALF472 se incubó a 37 °C en oscuridad y se registró su espectro de absorción a diferentes tiempos (0-1440 minutos).

Ensayos con luz visible. Las cubetas con ALF472, ALF472@bio-MOF-1, ALF472@MCM-41-SO₃, ALF472@SBA-15-SO₃ y ALF472@Al-MCM-41, ALF472-Cisplatino@Al-MCM-41 se incubaron a 37 °C bajo luz visible (lámpara fluorescente con flujo luminoso: 600 lm, temperatura de color 4000 K, distancia lámpara-muestra: 5 cm) y se registraron sus espectros de absorción a diferentes tiempos (0-1440 minutos).

Ensayos con luz ultravioleta. Las cubetas con ALF472 y ALF472-Cisplatino@Al-MCM-41 se incubaron a 37 °C bajo irradiación ultravioleta (λ : 365 nm, distancia lámpara-muestra: 5 cm) y se registraron sus espectros de absorción a diferentes tiempos (0-240 minutos).

4.3. Estudios de la lixiviación de fragmentos metálicos

Estabilidad de la matriz porosa bio-MOF-1 en las condiciones de encapsulación. La estabilidad de la matriz porosa bio-MOF-1 en las condiciones de encapsulación se determinó mediante difracción de rayos-X en polvo. Para ello, se suspendieron 70 mg de bio-MOF-1 en 5 mL de DMF durante 4 días a temperatura ambiente. Tras recoger el sólido por centrifugación (3500 rpm/5 minutos) y secarlo a temperatura ambiente, se adquirió su difractograma de rayos-X en polvo en el rango 2θ de 5-35°, cada 0.02° a intervalos de tiempo de 0.5 segundos, y se comparó con el patrón de difracción del material original (Figura 108).

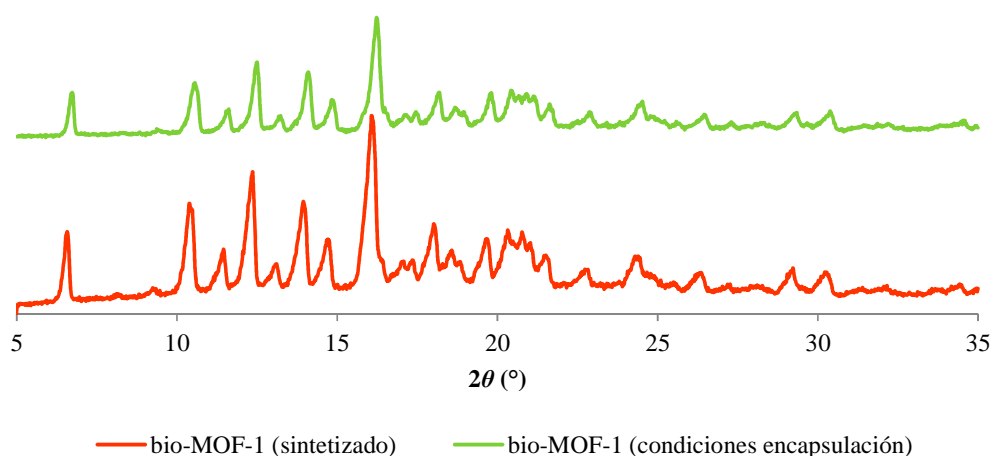


FIGURA 108: DIFRACTOGRAMAS DE RAYOS-X EN POLVO PARA EL MATERIAL BIO-MOF-1 TRAS SU SÍNTESIS (LÍNEA ROJA) Y TRAS SOMETERSE A LAS CONDICIONES DE ENCAPSULACIÓN (LÍNEA VERDE).

Estabilidad de las matrices funcionalizadas MCM-41-SO₃ y SBA-15-SO₃-H en las condiciones de encapsulación. La estabilidad de las sílices mesoporosas funcionalizadas en las condiciones de encapsulación se evaluó mediante una valoración ácido-base. Para ello, las matrices se activaron a 60 °C bajo vacío (10⁻⁴ bar) durante 5 horas. Tras esto, se reservaron 100 mg del material activado y otros 100 mg se suspendieron en 5 mL de agua y se mantuvieron en agitación durante 4 días a temperatura ambiente. Entonces, el sólido se recuperó por filtración, se secó al aire y se activó de nuevo (60 °C, 5 horas, vacío). A continuación, tanto el material suspendido

como aquel que se había reservado se sometieron a una valoración ácido-base con objeto de determinar el contenido de grupos sulfónicos antes y después de someter la matriz porosa a las condiciones de encapsulación.^[211] De esta forma, se añadieron 25 mg de cada material activado a una disolución acuosa de NaCl (2 M, 10 mL). La suspensión se mantuvo en agitación constante y se realizó una valoración ácido-base mediante la adición, gota a gota, de una disolución de NaOH 0.01 M que actuaba como agente valorante.

Estudio de lixiviación para el material ALF472@bio-MOF-1 incubado en agua a 37 ° C bajo irradiación con luz visible. Con el objetivo de evaluar la estabilidad del sistema híbrido ALF472@bio-MOF-1, así como su capacidad de retener los fragmentos de decarbonilación (iCORMs) generados tras su fotoactivación, se preparó una suspensión madre con 5.3 mg del material ALF472@bio-MOF-1 en 10 mL de agua (concentración 100 μ M de ALF472). A continuación, se prepararon diferentes suspensiones de ALF472@bio-MOF-1 diluyendo la suspensión madre (1 mL de la suspensión anterior y 9 mL de agua) con el fin de alcanzar la misma concentración de ALF472 empleada en los ensayos de liberación de CO (concentración final de ALF472 = 10 μ M). Posteriormente, estas suspensiones se incubaron a 37 °C bajo irradiación con luz visible (lámpara fluorescente, flujo luminoso: 600 lm, temperatura de color 4000 K, distancia lámpara-muestra: 5 cm) durante 6, 24 y 72 horas. A cada tiempo, el sólido se separó del sobrenadante por centrifugación (3500 rpm/10 minutos), se recogió, se filtró (membrana de nylon, 0.2 μ m). La concentración de los metales de interés (Zn y Mn) en cada uno de los sobrenadantes recogidos se determinó mediante ICP-OES.

Estudio de la lixiviación para los materiales ALF472@SBA-15-SO₃ y ALF472@MCM-41-SO₃ incubados en PBS a 37 °C y en oscuridad. Con el objetivo de evaluar la capacidad de las sílices SBA-15-SO₃ y MCM-41-SO₃ para retener el compuesto ALF472⁺, se suspendieron 5.0 mg de los materiales ALF472@MCM-41-SO₃ y ALF472@SBA-15-SO₃ en 1 mL de PBS (10 mM, pH: 7.4) y se incubaron a 37 °C en oscuridad durante 1, 6 y 24 horas. A cada tiempo, las suspensiones se centrifugaron (3500 rpm/10 minutos) y el sobrenadante se recogió haciéndolo pasar a través de un filtro de membrana de nylon (0.2 μ m). Finalmente, los sobrenadantes se

analizaron mediante espectrofotometría ultravioleta-visible para determinar la concentración de ALF472 presente en cada uno de ellos. La recta patrón utilizada para determinar la concentración de ALF472 en PBS (10 mM, pH: 7.4) se muestra en la Figura 109:

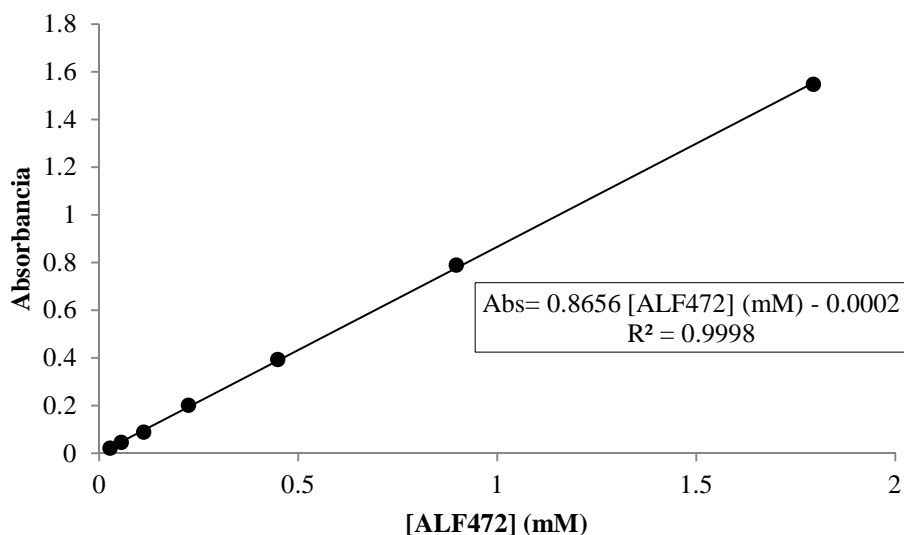


FIGURA 109: RECTA PATRÓN QUE RELACIONA LA ABSORBANCIA DEL COMPUESTO ALF472 Y SU CONCENTRACIÓN.

Estudio de la lixiviación en oscuridad para los materiales ALF472@Al-MCM-41 y ALF472-Cisplatino@Al-MCM-41 incubados en PBS. Con el objetivo de evaluar la capacidad de la sílice Al-MCM-41 para retener el CORM encapsulado, se suspendieron 5.0 mg de los materiales ALF472@Al-MCM-41 y ALF472-Cisplatino@Al-MCM-41 en 1 mL de PBS (10 mM, pH: 7.4) y se incubaron a 37 °C en oscuridad durante 6, 24 y 72 horas. A cada tiempo, el sobrenadante se recogió mediante centrifugación (3500 rpm/10 min, tubo vivaspin con membrana 30000 MWCO PES). La concentración de manganeso en cada uno de los sobrenadantes se determinó mediante ICP-MS.

Además, en el caso de ALF472@Al-MCM-41, después de la primera incubación en PBS durante 72 horas, se estudió si existía una ulterior lixiviación del CORM, suspendiendo de nuevo el sistema híbrido en PBS fresco (10 mM, pH: 7.4). Para ello, el compuesto híbrido ALF472@Al-MCM-41 filtrado, se incubó otra vez (5 mg mL⁻¹)

durante 72 horas en PBS a 37 °C y en oscuridad. Entonces, se separó el sólido del sobrenadante por centrifugación (3500 rpm/10 min, tubo vivaspin con membrana 30000 MWCO PES). La concentración de manganeso en el sobrenadante se determinó mediante ICP-MS.

Estudio de lixiviación de los materiales ALF472@Al-MCM-41 y ALF472-Cisplatino@Al-MCM-41 incubados en PBS a 37 °C bajo irradiación con luz visible. Con el objetivo de determinar la lixiviación de los fragmentos metálicos encapsulados en la matriz Al-MCM-41 (CORMs e iCORMs), se prepararon diferentes suspensiones en PBS (10 mM, pH: 7.4) de los sistemas híbridos ALF472@Al-MCM-41 y ALF472-Cisplatino@Al-MCM-41. Primero se preparó una suspensión madre de cada uno de los materiales con una concentración 100 μ M de ALF472. Para ello, se pesaron 2.4 mg y 3.1 mg de ALF472@Al-MCM-41 y ALF472-Cisplatino@ALF472, respectivamente, y cada uno de ellos se suspendió en 10 mL de PBS. A continuación, se prepararon diferentes suspensiones de ALF472@Al-MCM-41 y ALF472-Cisplatino@ALF472 diluyendo las suspensiones madre (añadiendo 1 mL de las suspensiones anteriores y 9 mL de PBS) con el fin de alcanzar la misma concentración de ALF472 empleada en los ensayos de liberación de CO (concentración final de ALF472 = 10 μ M). Posteriormente, las suspensiones se incubaron a 37 °C bajo luz visible (lámpara fluorescente con lujo luminoso: 600 lm, temperatura de color 4000 K, distancia lámpara-muestra: 5 cm) durante 6, 24 y 72 horas. A cada tiempo, el sobrenadante se recogió mediante centrifugación (3500 rpm/10 minutos, tubo vivaspin, membrana 30000 MWCO PES). La concentración de manganeso en cada uno de los sobrenadantes se determinó mediante ICP-MS.

Estudio de lixiviación del material ALF472-Cisplatino@Al-MCM-41 incubado en PBS a 37 °C bajo irradiación con luz ultravioleta. Con el objetivo de determinar la lixiviación de los fragmentos metálicos para el material ALF472-Cisplatino@Al-MCM-41, se preparó una suspensión madre de ALF472-Cisplatino@ALF472 con una concentración 100 μ M en ALF472. Para ello, se pesaron 3.1 mg de ALF472-Cisplatino@ALF472 y se suspendieron en 10 mL de PBS. A continuación, se prepararon diferentes suspensiones de ALF472-Cisplatino@ALF472 diluyendo la

suspensión madre (añadiendo 1 mL de la suspensión anterior y 10 mL de PBS) con el fin de alcanzar la misma concentración de ALF472 empleada en los ensayos de liberación de CO (concentración final de ALF472 = 10 μ M). Posteriormente, las suspensiones se irradiaron con luz ultravioleta durante 30 minutos (lámpara ultravioleta, λ : 365 nm, distancia lámpara-muestra: 5 cm) y se incubaron a 37 °C en oscuridad durante 0, 0.5, 2.5, 5.5, 23.5 y 47.5 horas. A cada tiempo, el sólido se separó mediante centrifugación (3500 rpm/10 minutos, tubo vivaspin, membrana 30000 MWCO PES). La concentración de manganeso en cada uno de los sobrenadantes se determinó mediante ICP-MS.

ANEXO II

LISTA DE PUBLICACIONES

PUBLICACIÓN DERIVADA DE ESTA TESIS DOCTORAL:**- Cation Exchange Strategy for the Encapsulation of a Photoactive CO Releasing Organometallic Molecule into Anionic Porous Frameworks**

F. J. Carmona, S. Rojas, P. Sánchez, H. Jeremias, A. R. Marques, C. C. Romão, D. Choquesillo-Lazarte, J. A. R. Navarro, C. R. Maldonado y E. Barea. *Inorg. Chem.* **2016**, *55*, 6525.

