



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE
TECNOLOGÍA
QUÍMICA



EXCELENCIA
SEVERO
OCHOA



**DESARROLLO DE NUEVOS MATERIALES
NANOESTRUCTURADOS BASADOS EN
REDES ORGANOMETÁLICAS CON
APLICACIONES BIOMÉDICAS**

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

INSTITUTO UNIVERSITARIO MIXTO DE TECNOLOGÍA
QUÍMICA

TESIS DOCTORAL

ALEJANDRO CABRERA GARCÍA

DIRECTOR

Dr. PABLO BOTELLA ASUNCIÓN

Valencia, febrero, 2019

Agradecimientos

Me gustaría dedicar unas palabras de agradecimiento a todas aquellas personas que han puesto su granito de arena en mi desarrollo personal y profesional a lo largo de estos años de tesis doctoral.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mi director de tesis, quien confió en mí para el desarrollo del proyecto que se plasma en estas páginas y a la fundación La Caixa, por el soporte económico que he recibido en esta etapa académica. También a mis compañeros de laboratorio, así como a todas las personas que conforman el Instituto de Tecnología Química, desde administración a caracterización, pasando por todos y cada uno de los laboratorios, los servicios externos que tanto frecuenté, como el Servicio de Microscopía Electrónica de la UPV y los otros sitios que visité en nuestras colaboraciones como el Instituto de Neurociencias de Alicante, el Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche y el Centro de Investigación Príncipe Felipe. De todos ustedes he aprendido, ¡muchas gracias compañeros!

Mis años en Valencia hubieran sido muy duros si no contase con el apoyo de mi maravillosa familia, amigos, mi pareja y todas aquellas personas que han estado junto a mí cuando les he necesitado. **¡Les quiero!**

Resumen

El desarrollo de nuevas metodologías para la detección y tratamiento del cáncer pasa por la necesidad de minimizar los efectos secundarios de las terapias actuales. En este campo, la nanotecnología permite diseñar y fabricar vehículos de agentes terapéuticos y/o de diagnóstico que pueden dirigirse selectivamente al tejido patológico y responder a estímulos específicos que permiten ejercer un control estricto sobre la actividad biológica de estos sistemas.

En este contexto, en la presente tesis doctoral se aborda el diseño, síntesis y validación biológica de sistemas basados en nanopartículas de redes organometálicas (nanoMOFs). El objetivo general es el estudio y evaluación del potencial de los nanoMOFs como componentes estructurales de vehículos destinados a aplicaciones biomédicas, concretamente a la difusión intracelular de fármacos y a la mejora de la resolución de imagen clínica. Dicho planteamiento da lugar a dos retos principales:

Desarrollar sistemas estables basados en nanoMOFs de Fe^{3+} para la difusión intracelular de fármacos antitumorales.

Desarrollar sistemas estables basados en nanoMOFs de Fe^{3+} y Gd^{3+} para la obtención de nuevos agentes de contraste para mejorar la imagen por resonancia magnética.

Para implementar el primero de estos retos, se han preparado materiales para liberación controlada de camptotecina (CPT) basados en nanoMOFs funcionalizados con grupos amino, MIL-100(Fe) y MIL-101(Fe) nanoMOF a los cuales se une CPT mediante enlace covalente sobre los grupos amino, ya sea por amidación o por química click. Los derivados del MIL-101(Fe)

cargados con CPT presentan una internalización celular mejorada debido a su potencial ζ positivo y una fuerte respuesta al pH ácido, aumentando la descarga del fármaco de 2 a 4 veces a pH 5, lo que estimula la liberación intracelular por actividad endosomolítica. En general, estos nanoMOFs constituyen un vehículo apropiado para la difusión segura de CPT, con gran potencial para su uso *in vivo*.

Respecto del segundo reto, se han desarrollado diversos agentes de contraste para imagen por resonancia magnética basados en un MOF análogo del azul de Prusia, $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, capaces de mejorar tanto la relajatividad longitudinal (T_1), como la transversal (T_2). Mediante reacción del $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ con silicato en medio alcalino se han obtenido nanopartículas monodispersas de óxido de Gd-Si conservando la morfología original, con valores de T_1 y T_2 *in vitro* superiores a las disoluciones comerciales de quelatos de Gd^{3+} y excelente estabilidad en fluidos fisiológicos. Asimismo, se ha obtenido un nuevo material híbrido por recubrimiento de las nanopartículas de $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ con una delgada capa de sílice, por hidrólisis y polimerización del silicato a pH neutro. Dicho material presenta valores de T_1 un orden de magnitud superior a los sistemas basados en quelatos de Gd^{3+} y un contraste positivo mucho más fuerte en imágenes de resonancia *in vitro* e *in vivo*, debido al efecto sinérgico entre los centros magnéticos de Gd^{3+} y Fe^{3+} estrechamente conectados a través de enlaces tipo ciano en una estructura cristalina muy compacta. Además, estas nanopartículas presentan una composición muy homogénea y una relación atómica de Gd:Fe constante, proporcionando excelente reproducibilidad en la señal.

Abstract

Developing new methodologies for cancer diagnosis and therapy involves the need to minimize current therapies secondary effects. In this field, nanotechnology brings out the opportunity to design and manufacture vehicles for therapeutic and/or diagnostic agents, which may be selectively targeted to the pathological tissue and respond under specific stimuli that allow to accurately control the systems biological activity.

In this context, this doctoral thesis tackles the design, synthesis and biological validation of metalorganic nanoparticle-based systems (nanoMOFs). The general aim is the study and evaluation of nanoMOFs potential as structural components of vehicles for biomedical use, mostly to drug intracellular diffusion and clinical imaging improvement. This rationale leads to two main challenges:

Developing stable systems based on Fe^{3+} nanoMOFs for intracellular diffusion of antitumor drugs.

Developing stable systems based on Fe^{3+} and Gd^{3+} nanoMOFs to obtain novel contrast agents that can enhance magnetic resonance imaging.

In order to address the first challenge, we have prepared camptothecin (CPT) controlled release materials based on amino group functionalized nanoMOFs, MIL-100(Fe) and MIL-101(Fe), where CPT is covalently bonded over amino groups by amidation or click chemistry. CPT-loaded MIL-101(Fe) derivatives have shown improved cell internalization due to their positive ζ potential and a strong response to acid pH, increasing drug discharge over 2-4 fold at pH 5, which promotes intracellular release by endosomolytic activity.

Overall, these nanoMOFs provide an appropriate vehicle for safe CPT diffusion, with good potential at *in vivo* use.

With regards to our second challenge, we have developed different contrast agents for magnetic resonance imaging based on a Prussian Blue analogue, $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, that is able to increase both longitudinal (T_1) and transversal relaxivity (T_2). By reaction of $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ with silicate in alkaline medium we have obtained Gd-Si oxide monodispersed nanoparticles keeping the pristine morphology, with T_1 y T_2 *in vitro* values higher than Gd^{3+} chelate commercial solutions. Moreover, we have obtained a novel hybrid material by $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ nanoparticle covering with a thin silica layer, by silicate hydrolysis and polymerization at neutral pH. Such material presented T_1 values one order higher than Gd^{3+} chelate based systems and a positive contrast much stronger in magnetic resonance images *in vitro* and *in vivo*, due to the synergetic effect between Fe^{3+} and Gd^{3+} magnetic centers closely connected through cyano-bridge bonds in an extremely dense structure. Furthermore, these nanoparticles present a very homogeneous composition and a constant Gd:Fe atomic ratio, providing excellent signal reproducibility.

Resum

El desenvolupament de noves metodologies per a la detecció i tractament del càncer passa per la necessitat de minimitzar els efectes secundaris de les teràpies actuals. En aquest camp, la nanotecnologia permet dissenyar i fabricar vehicles d'agents terapèutics i/o de diagnòstic que poden dirigir-se selectivament al teixit patològic i respondre a estímuls específics que permeten exercir un control estricte sobre l'activitat biològica d'aquests sistemes.

En aquest context, en la present tesi doctoral s'aborda el disseny, síntesi i validació biològica de sistemes basats en nanoparticules de xarxes organometàliques (nanoMOFs). L'objectiu general és l'estudi i avaluació del potencial dels nanoMOFs, com a components estructurals de vehicles destinats a aplicacions biomèdiques, concretament a la difusió intracel·lular de fàrmacs i a la millora de la resolució d'imatge clínica. Aquest plantejament dona lloc a dos reptes principals:

Desenvolupar sistemes estables basats en nanoMOFs de Fe^{3+} per a la difusió intracel·lular de fàrmacs antitumorals.

Desenvolupar sistemes estables basats en nanoMOFs de Fe^{3+} i Gd^{3+} per a l'obtenció de nous agents de contrast per a millorar la imatge per ressonància magnètica.

Per a implementar el primer d'aquests reptes, s'han preparat sistemes d'alliberament controlat de camptotecina (CPT) basats en nanoMOFs funcionalitzats amb grups amino, MIL-100(Fe) i MIL-101(Fe) nanoMOF als quals s'uneix CPT mitjançant enllaç covalent sobre els grups amino, ja siga per amidació o per química click. Els derivats del MIL-101(Fe) carregats amb CPT presenten una internalització cel·lular millorada a causa del

seu potencial ζ positiu i una forta resposta al pH àcid, augmentant la descàrrega del fàrmac de 2 a 4 vegades a pH 5, la qual cosa estimula l'alliberament intracel·lular per activitat endosomolítica. En general, aquests nanoMOFs constitueixen un vehicle apropiat per a la difusió segura de CPT, amb gran potencial per al seu ús *in vivo*.

Respecte del segon repte, s'han desenvolupat diversos agents de contrast per a ressonància magnètica basats en un MOF anàleg del blau de Prússia, $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, capaços de millorar tant la relaxativitat longitudinal (T_1), com la transversal (T_2). Mitjançant reacció del $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ amb silicat en pH alcalí s'ha obtingut nanopartícules monodisperses d'òxid de Gd-Si conservant la morfologia original, amb valors de T_1 i T_2 *in vitro* superiors a les dissolucions comercials de quelats de Gd^{3+} i excel·lent estabilitat en fluids fisiològics. Així mateix, s'ha obtingut un nou material híbrid per recobriment de nanopartícules de $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ amb una capa prima de sílice, per hidròlisi i polimerització del silicat a pH neutre. Aquest material presenta valors de T_1 un ordre de magnitud superior als sistemes basats en Gd^{3+} i un contrast positiu molt més fort en imatges de ressonància *in vitro* e *in vivo*, a causa d'aquest efecte sinèrgic existent entre els centres magnètics de Gd^{3+} i Fe^{3+} estretament connectats a través d'enllaços tipus ciano en una estructura cristal·lina molt compacta. A més, aquestes nanopartícules presenten una composició molt homogènia i una relació atòmica de Gd:Fe constant, proporcionant total reproductibilitat en el senyal.

Índice

1. Introducción.....	19
1.1 Redes organometálicas y polímeros de coordinación	19
1.2 Aplicaciones biomédicas de los MOFs	20
1.2.1 Nanomedicina: requerimientos de los MOFs.....	22
1.2.2 NanoMOFs.....	24
1.2.2.1 Rutas sintéticas	25
1.2.2.2 Modificación superficial.....	28
1.2.2.3 Limitaciones: degradación, estabilidad y toxicidad....	30
1.3 NanoMOFs para difusión de fármacos	32
1.3.1 Procedimientos de incorporación de fármacos	34
1.3.2 Mecanismos de liberación intracelular	38
1.3.3 Aplicaciones.....	40
1.3.3.1 Quimioterapia.....	41
1.3.3.3 Difusión de ácidos nucleicos	52
1.3.3.4. Difusión de otros fármacos.....	54
1.4 NanoMOFs para imagen clínica	59
1.4.1 Resonancia magnética para imagen (RMI)	60
1.4.2 Tomografía Computarizada	66
1.4.3 Imagen óptica	68
1.5 NanoMOFs como biosensores	69
1.5.1 Sensores de pH.....	70
1.5.2. Otros biosensores	72
1.6 Desafíos pendientes y consideraciones futuras	75
1.7 Referencias bibliográficas	79
2. Objetivos	91
3. Materiales y métodos	97

3.1 Reactivos y disolventes y abreviaturas	97
3.1.2 Líneas celulares	99
3.1.3 Animales de laboratorio	99
3.2 Técnicas instrumentales de caracterización	100
3.2.1 Adsorción de gases	100
3.2.2 Análisis elemental.....	100
3.2.3 Análisis termogravimétrico.....	102
3.2.4 Espectrometría de masas	102
3.2.5 Difracción de rayos X en polvo	103
3.2.6 Espectrometría infrarroja.....	104
3.2.7 Espectroscopía electrónica.....	105
3.2.8 Espectroscopía de resonancia de espín nuclear o resonancia magnética nuclear	106
3.2.9 Dispersión de la luz dinámica y potencial ζ	107
3.2.10 Microscopía electrónica de transmisión.....	108
3.2.11 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo	109
3.2.12 espectroscopía de emisión atómica con fuente de plasma de acoplamiento inductivo	111
3.3 Técnicas cromatográficas.....	113
3.3.1 Cromatografía en columna.....	113
3.3.2 Cromatografía en capa fina	113
3.4 Síntesis de los nanomateriales.....	114
3.4.1 Materiales sensibles al pH para la difusión intracelular de camptotecina.....	114
3.4.1.1 Síntesis del nano-MIL-101(Fe)-NH ₂ (M1-NH ₂).....	114
3.4.1.2 Síntesis del nano-MIL-100(Fe)-BTB-NH ₂ (M2-NH ₂)..	114
3.4.1.3 Síntesis de profármacos de camptotecina para su anclaje covalente	116

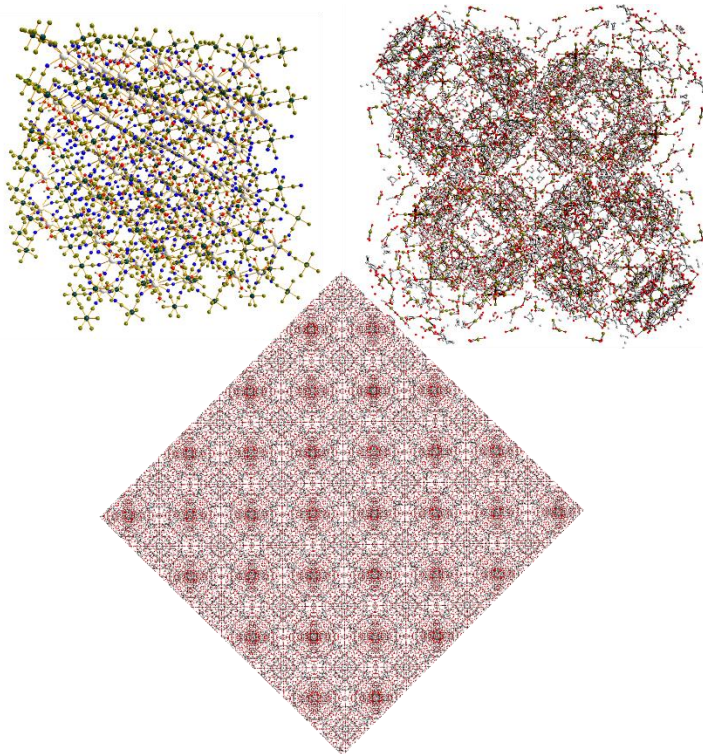
3.4.1.4 Preparación del nano-MIL-101(Fe)-NH-Suc-CPT (M1-S-CPT)	118
3.4.1.5 Preparación del nano-MIL-100(Fe)-BTB-NH-Suc-CPT (M2-S-CPT)	119
3.4.1.6 Preparación del nano-MIL-101(Fe)-Click-CPT (M1-C-CPT)	119
3.4.1.7 Preparación del nano-MIL-100(Fe)-Click-CPT (M2-C-CPT)	120
3.4.1.8 Síntesis del MIL-101(Fe) (M1) y MIL-100(Fe) (M2) ...	121
3.4.1.9 Preparación del Nano-MIL-101(Fe) + CPT (M1-A-CPT)	121
3.4.1.10 Preparación del nano-MIL-100(Fe)-BTB-NH ₂ + CPT (M2-A-CPT)	122
3.4.1.11 Preparación del nano-MIL-101(Fe)-NH-CO-RhB (M1-RhB)	122
3.4.1.12 Preparación del nano-MIL-100(Fe)-BTB-NH-CO-RhB (M2-RhB)	123
3.4.2 Materiales agentes de contraste en resonancia magnética de imagen	123
3.4.2.1 Síntesis del Gd(H ₂ O) ₄ [Fe(CN) ₆] (GdFe) de cristal grande	123
3.4.2.2 Síntesis del Gd(H ₂ O) ₄ [Fe(CN) ₆] (GdFe) de cristal pequeño.....	124
3.4.2.3 Síntesis del nanocomposite Gd-Si óxido/hidróxido (GdSi)	125
3.4.2.4 Síntesis del nanocomposite Gd-Si óxido/hidróxido pegilado (GdSi _{PEG})	125
3.4.2.5 Síntesis de nanopartículas mesoporosas de óxido de silicio y gadolinio (mGdSi)	126
3.4.2.6 Síntesis del Gd(H ₂ O) ₄ [Fe(CN) ₆]@SiO ₂ (GdFeSi)	127
3.4.2.7 Síntesis Gd(H ₂ O) ₄ [Fe(CN) ₆]@SiO ₂ @PEG ₃ (GdFeSi _{PEG})	127
3.5 Ensayo de estabilidad	128
3.6 Estudios <i>in vitro</i>	128

3.6.1 Biocompatibilidad celular	128
3.6.2 Microscopía confocal de barrido láser.....	130
3.6.3 Citometría de flujo	131
3.7 Estudios de resonancia magnética para imagen.....	133
3.7.1 Estudio de relajatividad ¹ H-RMN y resonancia magnética para imagen <i>in vitro</i>	133
3.7.2 Estudio de resonancia magnética para imagen <i>in vivo</i> ...	134
3.8 Referencias bibliográficas	137
4. Desarrollo de nanomateriales para transporte y liberación intracelular controlada de Camptotecina basados en redes organometálicas	143
4.1 Fundamento.....	143
4.2 Resultados	146
4.2.1 Síntesis y caracterización de dos MOF funcionalizados con grupos amino primarios libres.	146
4.2.2 Incorporación de camptotecina	151
4.2.3 Estudio de la estabilidad de los materiales y de la influencia del pH	154
4.2.4 Estudio de internalización celular	157
4.2.5 Estudio de citotoxicidad.....	160
4.3 Discusión	162
4.4 Conclusiones parciales	166
4.5 Referencias bibliográficas	167
5. Desarrollo de nanomateriales como agentes de contraste en resonancia magnética para imagen (RMI) basados en redes organometálicas	175
5.1 Fundamento.....	175
5.2 Desarrollo de un agente de contraste T_1 , estable en medio fisiológico	185
5.2.1 Preparación y caracterización de nanopartículas de un óxido mixto de Gd y Si.....	185
5.2.2 Medidas de relajatividad y RMI <i>in vitro</i>	198

5.2.3 Optimización de la síntesis de nanopartículas Gd-Si como agente de contraste T_1	206
5.2.4 Estudio de citotoxicidad.....	205
5.2.5 Estudio de imágenes de RMI <i>in vivo</i>	206
5.3 Desarrollo de un agente de contraste dual, T_1 - T_2 , estable en medio biológico.....	208
5.3.1 Síntesis y caracterización del agente de contraste $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]@SiO_2@PEG_3$ ($GdFeSi_{PEG}$).....	211
5.3.2 Medidas de relajatividad y medidas de RMI <i>in vitro</i>	219
5.4.3 Estudio de citotoxicidad.....	223
5.3.4 Estudio de imágenes de RMI <i>in vivo</i>	224
5.4 Conclusiones parciales	229
5.5 Referencias Bibliográficas	232
6. Conclusiones generales	239
ANEXO I. Espectros de resonancia magnética nuclear de los compuestos sintetizados	245
ANEXO II. Caracterización adicional de materiales para liberación controlada de fármacos	251
ANEXO III. Caracterización adicional de materiales para RMI	265
ANEXO IV. Curriculum en el periodo de tesis doctoral	287

Capítulo I.

Introducción



1. Introducción

1.1 Redes organometálicas y polímeros de coordinación

La primera referencia bibliográfica que se encuentra en la literatura científica referente a las redes organometálicas se la debemos a Richard Robson en el año 1989. En el trabajo citan un nuevo material molecular infinito obtenido a través de la extensión de compuestos de coordinación formados por el catión cobre (I) y el ligando 4,4',4'',4'''-tetraciano tetrafenilmetano.¹ Hoy día se conoce a este tipo de materiales comúnmente como MOFs, que se debe a sus siglas en inglés (metal-organic frameworks), nombre dado por Yaghi en 1995.² Estos materiales tienen una red cristalina compuesta de complejos metálicos conteniendo ligandos orgánicos que actúan de puente entre dichos complejos. Estos compuestos se encuentran en la interface entre la química de coordinación molecular y la ciencia de materiales.³ De manera general, se trata de complejos metálicos que polimerizan en el espacio a través de ligandos puente, por lo que también se les conoce como polímeros de coordinación (CPs), sin embargo, algunos autores reservan esta terminología para aquellos materiales que no presentan estructura cristalina definida, sino que la polimerización resulta en un material amorfo, que puede ser poroso o no.⁴ Se pueden construir MOFs a partir de un número ilimitado de ligandos puente e iones metálicos, lo que permite adaptar las propiedades del material a una aplicación particular. Por estas razones, los MOF han sido bien estudiados para aplicaciones tales como almacenamiento de gas, óptica no lineal, detección, catálisis, magnetismo, y

difusión controlada de fármacos.⁵ La facilidad con la que la geometría de los constituyentes, el tamaño y la funcionalidad puede variarse ha llevado a la síntesis de más de 20.000 MOFs diferentes en la última década. Los ligandos orgánicos son carboxilatos orgánicos ditópicos o politópicos (y otras moléculas similares cargadas negativamente) que, cuando se unen a cationes o clústeres metálicos, producen estructuras de MOF cristalinas arquitectónicamente robustas con una porosidad típica superior al 50% del volumen de cristal del MOF. Los valores de área superficial de tales MOFs oscilan típicamente entre 1000 y 10.000 m²/g, superando así las de los materiales porosos tradicionales tales como zeolitas y derivados de carbono. Hasta la fecha, existen más MOFs con porosidad permanente en variedad y multiplicidad que cualquier otra clase de materiales porosos. En la **Figura 1** se muestran algunos ejemplos de estructuras de redes organometálicas.⁶⁻⁹

1.2 Aplicaciones biomédicas de los MOFs

Los MOF poseen muchas características deseables para aplicaciones biológicas, incluyendo grandes cantidades de fármacos a través de varios métodos (incorporación directa en la red o modificación post-sintética), biodegradabilidad intrínseca de los enlaces lábiles metal-ligando, alta porosidad para la carga/liberación de agentes atrapados y versátiles metodologías de funcionalización. Más recientemente, estos materiales han reducido su tamaño hasta la nanoescala para formar nano-redes organometálicas (nanoMOFs) y nanopolímeros de coordinación (NCPs) que son potencialmente más

adecuados para aplicaciones biológicas a través de la administración sistémica.¹⁰

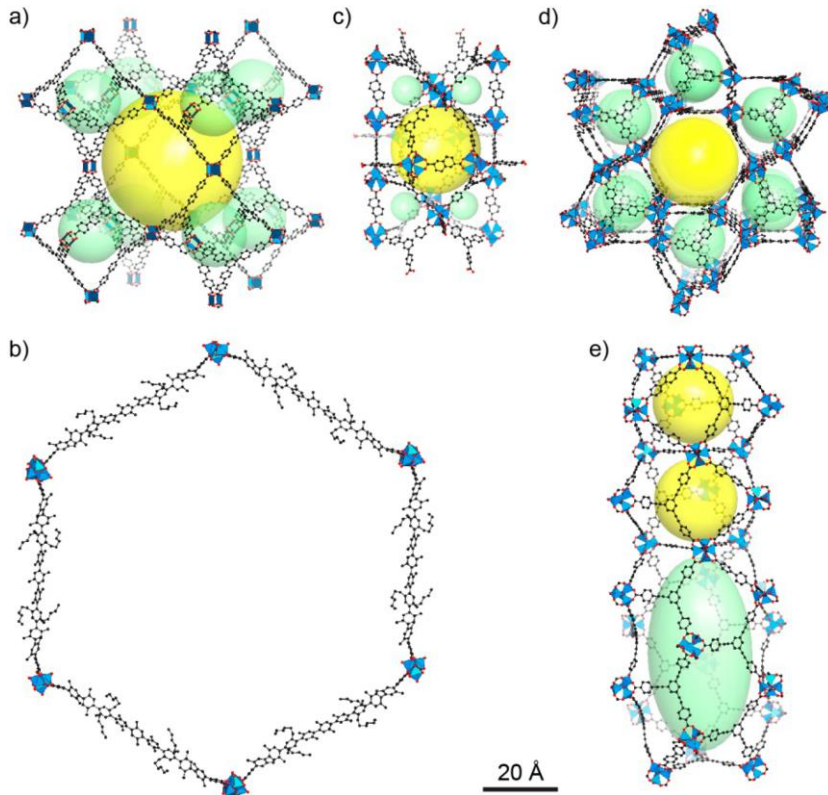


Figura 1. Muestra la estructura de algunos MOFs altamente porosos conocidos: (a) MOF-399, (b) IRMOF-74-XI, (c) DUT-6 (MOF-205), (d) UCMC-1 y (e) MOF-210. Como esferas amarillas y/o verdes se destaca el volumen de las cavidades interiores. Los colores de los átomos indican: M (poliedros azules, M = Zn, Cu, Mg), C (negro) y O (rojo). Los átomos de H se han omitido por claridad.⁹

Actualmente, los nanoMOFs presentan un gran potencial en diversos campos de la biomedicina, como la liberación controlada de fármacos,¹¹ terapia fotodinámica,¹² difusión de ácidos nucleicos y terapia combinada,¹³ imagen por resonancia

magnética,¹⁴ tomografía computarizada,¹⁵ imagen óptica¹⁶ y sensores.¹⁷

1.2.1 Nanomedicina: requerimientos de los MOFs

Hoy en día, existe una gran variedad de tratamientos para todo tipo de enfermedades. Sin embargo, muchos de ellos no son específicos contra la diana para la que fueron diseñados. Por esta razón, un nuevo campo ha surgido dentro de la nanotecnología para resolver esta situación. La nanomedicina se encarga de diseñar, crear y optimizar nuevos vectores farmacológicos que mejoren la especificidad y el radio de actuación de los tratamientos clínicos actuales, con el objetivo de evitar o reducir los efectos secundarios durante la terapia. La nanomedicina es un área de estudio muy amplia en la actualidad, centrada principalmente en el tratamiento de enfermedades complicadas, como los diferentes tipos de cáncer.¹⁸ Para ello, el uso de nanomateriales aprovecha el efecto de mayor permeabilidad y retención (EPR), que dirige la acumulación de nanomedicinas preferentemente hacia el tumor en lugar de permanecer en el plasma u otros órganos, aumentando así su semivida plasmática. Los tumores vasculares comprenden típicamente células endoteliales defectuosas mal alineadas con fenestraciones anchas (hasta 4 μm), carentes de capa muscular o innervaciones, con lumen relativamente ancho y función de receptor alterada para mediadores vasoactivos, especialmente angiotensina II; y carecen de linfáticos funcionales. Además, de la hiperproducción de mediadores vasculares, como el factor de crecimiento endotelial vascular, la bradiquinina, el peroxinitrito de óxido nítrico, las prostaglandinas y las metaloproteinasas de matriz, contribuyen en gran medida a esta hiperpermeabilidad

en tejidos tumorales. El efecto EPR implica dos componentes principales, alteración de la biodistribución, donde el nanofármaco muestra acumulación diferencial en los tejidos tumorales alcanzando mayor concentración que en el plasma u otros órganos, este efecto es dependiente del tiempo y puede ser reproducido en tumores de diferente tamaño. El efecto EPR es principalmente función de peso molecular con moléculas que van de 40-800 kD las cuales pueden mostrar orientación tumoral preferente.

El otro aspecto del efecto EPR es el aumento de la vida media plasmática de los fármacos de tamaño nanométrico, ya que su tamaño excede el límite del umbral de excreción renal, limitando su aclaramiento. Dado que el efecto farmacológico y la concentración plasmática son paralelos, este fenómeno da como resultado un efecto terapéutico prolongado además de la focalización sobre el tumor. La ganancia esperada del efecto EPR es de una magnitud de concentración tumoral de 7 a 10 veces mayor que la dosis equivalente del mismo fármaco en la forma de bajo peso molecular.¹⁹

La célula es el centro de la biología: es la unidad viva más pequeña. La célula es, en una visión reduccionista, un compartimento en el cual ocurren reacciones. Una célula de mamífero mide aproximadamente 10 μm en diámetro cuando está redonda, y quizás 50 μm en diámetro cuando está totalmente estirada en un cultivo tisular adherido; estas dimensiones no cambiarán (en la **Figura 2** se puede ver un gráfico comparativo de objetos de pequeño tamaño).²⁰ Por lo que el uso de contenedores sólidos de fármacos para fines biomédicos requiere un control preciso sobre sus dimensiones ya que, las partículas más pequeñas de 500 nm por lo general

entran en las células por endocitosis en lugar de por fagocitosis, que es más probable para partículas más grandes. El tamaño juega un papel decisivo en el aclaramiento esplénico y renal: las partículas mayores de 200 nm se eliminan más probablemente a través del sistema de filtración esplénica, mientras que aquellas menores a 10 nm son eliminadas a través del sistema de filtración del riñón. Por último, el tamaño afecta fuertemente el tiempo de circulación en el torrente sanguíneo, modificando la interacción con el endotelio y, por lo tanto, su biodistribución. Como ejemplo, las partículas menores que 250 nm presentan un mayor cruce a través del endotelio con fugas (es decir, extravasación), siendo útiles para la orientación hacia el tumor. Por esta razón, quizá el rango de tamaño más útil para aplicaciones biomédicas sea de 10 a 100 nm, lo que permitiría la entrada en la célula por endocitosis de las partículas y pequeños agregados y su eliminación a través del bazo. Para aplicaciones *in vivo* de nanopartículas (Nps), su superficie necesita ser modificada para protegerlas del agresivo medio biológico que las rodea y prolongar su tiempo de circulación sanguínea. La unión de polietilenglicol (PEG), también conocida como PEGilación superficial, protege a las NPs con un revestimiento hidrófilo que mejora estas propiedades y aumenta la dispersibilidad de las NPs al tiempo que evita su agregación.²¹

1.2.2 NanoMOFs

Como se ha comentado con anterioridad, los MOFs y los CPs, presentan muchas propiedades que los hace poder ser útiles en diversos campos. Controlando las condiciones de síntesis de los mismos, podemos definir la forma y tamaño de los cristales a obtener y de esta manera conseguir nano-redes

organometálicas (nanoMOFs) y nano-polímeros de coordinación (NCPs), los cuales son potencialmente más adecuados para aplicaciones biológicas a través de la administración sistémica.^{4,10}

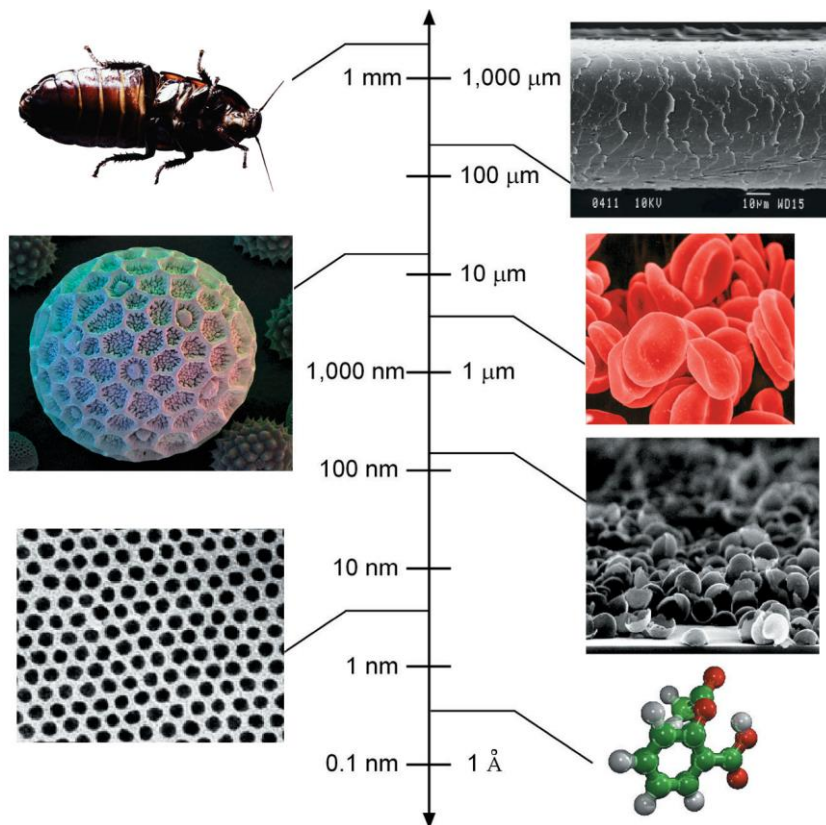


Figura 2. Tamaños de objetos 'pequeños' representativos. (a) Una cucaracha. (b) Un pelo humano. (c) Grano de polen *Polygonum*. (d) Glóbulos rojos. (e) Superretículo nanocrystalino de cobalto. (f) Un agregado de medias capas de paladio. (g) molécula de aspirina.²⁰

1.2.2.1 Rutas sintéticas

Antes de la síntesis de un MOF para una aplicación biológica determinada, es necesario considerar la toxicidad de todos los

reactivos y aditivos utilizados durante todo el procedimiento de síntesis, así como los posibles tratamientos de escalado y esterilización.²²

Los principales métodos utilizados para la síntesis de nanoMOFs y NCPs pueden clasificarse en cuatro rutas generales: precipitación a nanoescala, solvotermal, modulada por un surfactante y microemulsión reversa. El primer método generalmente produce materiales amorfos, mientras que los tres últimos métodos pueden producir tanto materiales amorfos como cristalinos. En el método de precipitación a nanoescala a temperatura ambiente, las nanopartículas se sintetizan aprovechando la insolubilidad de las partículas en un disolvente dado, en el cual los precursores individuales permanecen disueltos, este procedimiento se esquematiza en la **Figura 3.**⁴

Quizá la manera más popular de preparar nanoMOFs es utilizar la síntesis hidro/solvotermal. Esta metodología clásica implica precursores metálicos y disolventes polares bajo de moderadas a altas presiones y temperaturas. En este tipo de síntesis se ha hecho muy popular la síntesis asistida por radiación de microondas (MW), y ultrasonidos (US). Estas técnicas permiten en general la cristalización rápida de los MOFs. En particular, el calentamiento por MW favorece un proceso de nucleación rápido y uniforme debido a la formación de puntos locales supercalientes y la transferencia rápida de calor, lo que conduce a una distribución más homogénea del tamaño de partícula.²³

Las moléculas de tensioactivos pueden usarse como agentes de plantilla durante la síntesis solvotermal de nanoMOFs y NCPs.

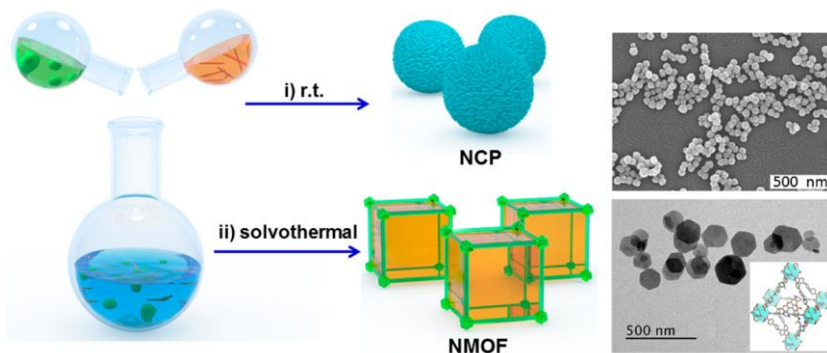


Figura 3. La síntesis a temperatura ambiente produce generalmente NCPs amorfos, mientras que la síntesis solvotermal a temperaturas elevadas puede generar tanto NCPs como nanoMOFs cristalinos.⁴

Aunque los agentes de plantilla no se incorporan dentro de los nanoMOFs o NCPs, juegan un papel importante en la definición de morfologías y tamaños de las partículas. En este método el calentamiento destruye las microemulsiones en el sistema, no apareciendo estas en el material final.

Un método típico para obtener nano redes organometálicas monodispersas es la técnica de microemulsión reversa. Esta metodología utiliza microemulsiones, que son dispersiones termodinámicamente estables de dos líquidos inmiscibles en presencia de un emulsionante o surfactante. Estas microemulsiones se comportan como reactores químicos nanoestructurados que confinan la síntesis de MOFs a la nanoescala, ofreciendo la posibilidad de ajustar su tamaño. El primer ejemplo de síntesis de materiales híbridos empleando esta técnica fue publicado por Stephen Mann en el año 2000, para la síntesis de nanopartículas monodispersas de azul de Prusia.²⁴ Aunque recientemente estas dos últimas metodologías sintéticas han sido ampliamente utilizadas por el grupo de

Wenbin Lin para la síntesis de nanoMOFs de lantónidos o manganeso, útiles como agentes de contraste en resonancia magnética de imagen.^{10,25-28} En la **Figura 4** se ilustran estos procedimientos.

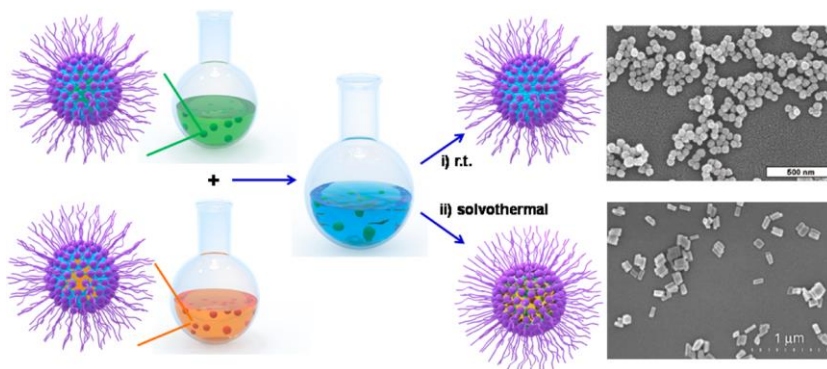


Figura 4. Síntesis moduladas por surfactante ya sea a temperatura ambiente o a temperatura elevada.⁴

1.2.2.2 Modificación superficial

La relación superficie/volumen de las nanopartículas controla el tipo de interacciones que tienen lugar entre la NP y el entorno, afectando así fuertemente a su estabilidad coloidal, biocompatibilidad, capacidades de reconocimiento y a su biodistribución. Esto es particularmente interesante en el caso de las aplicaciones biomédicas, donde el diseño racional de las características superficiales es crucial para mejorar la estabilidad química y coloidal en medio fisiológico y/o en formulaciones más complejas, introducir funcionalidades biológicas adicionales tales como contraste para imagen o sensores y controlar sus características directoras en aplicaciones *in vivo*.^{29,30}

Las modificaciones superficiales optimas deberían mejorar de manera significativa la estabilidad coloidal de las

nanopartículas, incrementar su estabilidad en condiciones fisiológicas, permitiendo alcanzar el efecto biológico objetivo, adicionar estas propiedades superficiales en condiciones no tóxicas y en el caso de los nanoMOFs porosos no penetrar dentro de los poros, manteniendo intacto su carácter poroso.²¹

Existen dos maneras de modificar la superficie de una nanopartícula: a través de un anclaje covalente (condensaciones, química click y reacciones de conjugación) o por anclaje no covalente (interacciones electrostáticas, fuerzas de dispersión y enlaces de hidrógeno). La elección del método depende de parámetros tales como la forma, tamaño y naturaleza de los grupos funcionales de la superficie externa de la NP, pero también de la naturaleza de la molécula a injertar (grupos funcionales, tamaño, polaridad, etc.).³¹

La modificación superficial más comúnmente encontrada es la protección de nanopartículas con paredes de sílice de diferentes grosores, el grupo liderado por Wenbin Lin fue el primero en aplicar estas modificaciones sobre polímeros de coordinación amorfos. Estas paredes de sílice son biocompatibles y confieren mayor estabilidad a la estructura que contienen, además gracias a sus características pueden ser fácilmente funcionalizables con el fin de añadir nuevas funcionalidades como moléculas directoras, agentes que aporten una función adicional o que incrementen la estabilidad fisiológica de las nanopartículas en condiciones biológicas, como la adhesión irreversible de polietilenglicol tal y como se comentó anteriormente.^{12,32-43} Otras modificaciones superficiales encontradas son la adhesión de lípidos y polímeros en superficie.⁴⁴ Estos procesos se esquematizan en la

Figura 5.

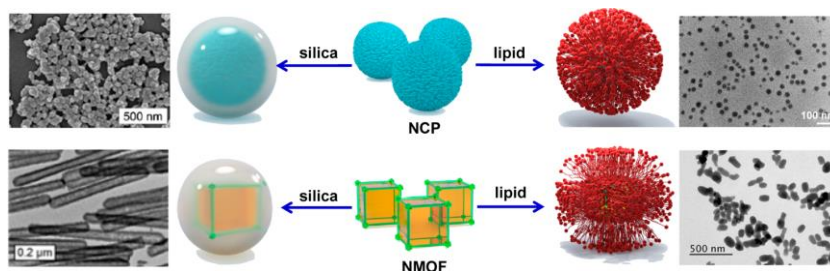


Figura 5. Esquema que muestra estrategias de recubrimiento superficial de partículas de nanoMOF y NCP con una capa delgada de sílice o una bicapa lipídica, acompañado de las imágenes de TEM de los materiales.⁴

1.2.2.3 Limitaciones: degradación, estabilidad y toxicidad.

La mayoría de los nanomateriales que se están explorando para el tratamiento o diagnóstico de enfermedades se componen de sustancias que son totalmente ajenas al sistema biológico y no son fácilmente degradadas en el cuerpo. Además de tener un agente activo unido o adsorbido tal como un fármaco o un ion paramagnético, las partículas se recubren a menudo con polietilenglicol o una sustancia similar, la cual, aunque biocompatible, generalmente disminuye la velocidad a la cual la partícula puede ser retirada del sistema circulatorio. Mientras que los tiempos largos de la circulación pueden ser beneficiosos, por ejemplo, para los agentes de contraste de imagen, también significan la exposición larga a las partículas y a cualquier efecto adverso que puedan tener. Puesto que las dimensiones de las partículas son más pequeñas que las células eucarióticas típicas y pueden entrar en la célula a través de endocitosis mediada por receptores, las partículas pueden tener un efecto dramático en el funcionamiento de la célula.⁴⁵⁻⁴⁸

La principal ventaja que nos ofrecen los nanoMOFs para su aplicación sistémica es su biodegradabilidad intrínseca debida a la labilidad de los enlaces de coordinación metal-ligando, lo cual facilita su descomposición y excreción de manera eficaz. Evidentemente para que este proceso no sea perjudicial, la composición del nanomaterial debe ser en sí misma no toxica.⁴⁹

Horcajada y colaboradores⁵⁰ examinaron la citotoxicidad de una serie de 14 nanoMOFs con diferentes estructuras y composiciones (cationes metálicos = Fe, Zn, Zr y varios ligandos tipo policarboxilato e imidazolato), las pruebas se hicieron en dos líneas celulares, una línea de células de macrófagos murinos (J774) y una línea celular de carcinoma epitelial de cuello uterino humano (HeLa). Este estudio concluyó principalmente que los nanoMOFs estudiados exhibieron una citotoxicidad baja, comparable a la de otros nanosistemas comerciales; la toxicidad de nanoMOF está fuertemente influenciada por la naturaleza del catión, siendo menos tóxicos los nanoMOF basados en Fe, en comparación con los nanoMOF de Zr o Zn, la menor relación hidrófilia/hidrofobicidad del ligando parece estar relacionada con toxicidades menores de los nanoMOF y las propiedades intrínsecas de las células también afectan a la toxicidad de los nanoMOF (por ejemplo, la citotoxicidad puede estar relacionada con una capacidad de internalización más alta/más rápida de una línea celular dada).⁵⁰

La toxicidad de estos sistemas también se ha probado en embriones de pez cebra. Se examinaron 9 nanoMOF con diferentes composiciones y estructuras, demostrando que tras la exposición del pez cebra a diferentes concentraciones (de 1 a 200 mM) de los nanoMOF, no se encontraron diferencias en la

tasa de supervivencia o fenotipo después de 120 horas de exposición, con la excepción de una disminución de la tasa de supervivencia asociada a tres de los sistemas ensayados y algunos defectos morfológicos menores tras el tratamiento con algunos de los nanoMOFs.⁵¹

Horcajada y colaboradores, demostraron en un estudio sobre la toxicidad y biodistribución *in vivo* de nanoMOFs de hierro que los materiales se degradan progresivamente dentro del cuerpo en sus componentes constitutivos, hierro y ligando orgánico, el exceso de hierro en el hígado y el bazo, es totalmente reversible como consecuencia de la eliminación del exceso de hierro a través de la orina y las heces y los ligandos exógenos se eliminan directamente por la orina y las heces sin ninguna otra metabolización (biotransformación).⁵²⁻⁵⁴ Sin embargo, los ligandos endógenos como el fumarato se reutilizan en el ciclo de Krebs. De esta manera, la cinética de eliminación depende tanto de la polaridad del ligando como de la velocidad de degradación del nanoMOF. En conjunto, estos resultados confirmaron claramente el interés de la utilización de nanoredes organometálicas biodegradables no tóxicas de hierro (III) y ligandos carboxilato para aplicaciones biomédicas, esta biodistribución se esquematiza en la **Figura 6**.⁵²⁻⁵⁴

1.3 NanoMOFs para difusión de fármacos

La difusión controlada de fármacos es el método o procedimiento de administración de compuestos farmacéuticos para conseguir un efecto terapéutico deseado en seres humanos o animales para el tratamiento de enfermedades humanas.⁵⁵

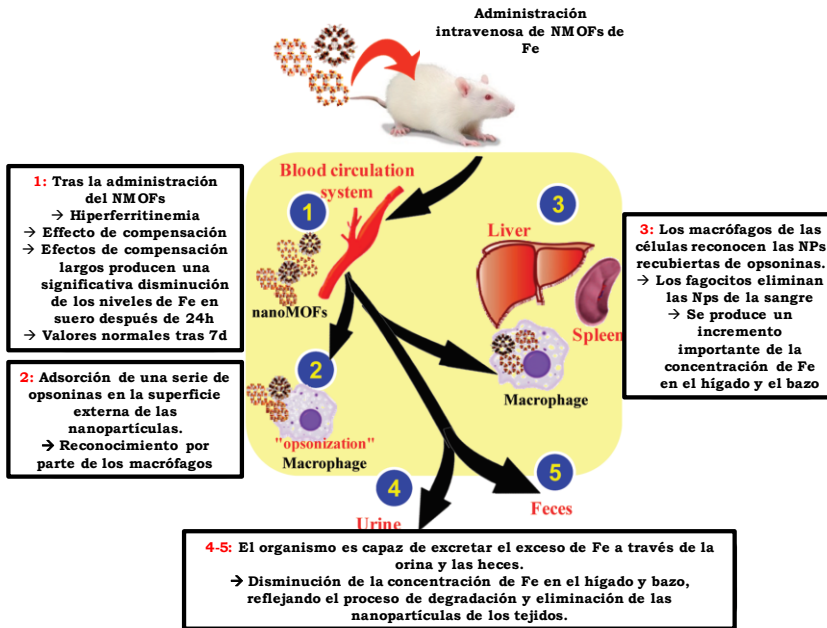


Figura 6. Biodistribución de los nanoMOFs de hierro, de acuerdo a la concentración de Fe.⁵³

En el diseño de nuevos sistemas de liberación de fármacos se deben tener en cuenta la encapsulación de fármacos y su biodegradabilidad, de esta manera, se ha considerado la introducción de los nanoMOFs así como otros nanomateriales en diferentes modalidades biomédicas en el tratamiento y detección de enfermedades. La carga del fármaco puede llevarse a cabo mediante métodos covalentes o no covalentes. El control de sus propiedades de liberación es posible debido a la estructura altamente porosa de estos materiales. Mientras que los compuestos terapéuticos requieren protección, los fármacos procedentes de la biodegradación del vector minimizan visiblemente su toxicidad y aumentan su eficacia y vida media en la sangre. El principal objetivo de la administración de fármacos es encapsular moléculas con

diferentes estructuras y tamaños y liberarlos lentamente durante varios días desde el portador hacia las dianas terapéuticas. La versatilidad de los nanomateriales nos permite modular la administración de fármacos ajustando las interacciones huésped-receptor mediante la introducción de varios grupos funcionales polares o apolares, o cambiando la estructura del sólido (interconectividad, tamaño de poro, flexibilidad) para controlar la difusión a través de la estructura porosa. En resumen, la administración de fármacos en nanomateriales está controlada por diferentes factores, tales como la degradación del vector en diferentes condiciones biológicas, el nivel de difusión de fármacos a través de los poros y las interacciones entre los fármacos y la matriz. La degradación del portador puede verse afectada por variables complejas: la solubilidad del portador, la calidad de su superficie y otras. Cuando el material es muy estable en el agua u otros ambientes biológicos, la difusión del fármaco depende principalmente de la porosidad de la N_p y el tamaño del fármaco.²¹

1.3.1 Procedimientos de incorporación de fármacos

De manera general, las especies activas, ya sean orgánicas o inorgánicas, pueden incorporarse al MOF de tres maneras diferentes: el fármaco se adsorbe y atrapa en los poros,⁵⁶ el agente activo puede ser parte constitutiva de la red, este proceso de incorporación consiste en la síntesis del MOF utilizando el agente activo como material de partida,⁵⁷ o por una combinación de los dos primeros métodos en el caso de que el MOF obtenido sea poroso.

En el caso de usar un agente bioactivo como parte del nanoMOF la biodegradación del material controlará su difusión, este tipo de materiales se esquematizan en la **Figura 7**, un ejemplo muy interesante de este tipo de sistemas se lo debemos al grupo de Wenbin Lin, quienes emplearon un profármaco del cisplatino, el complejo c,c,t-diaminodiclorodisuccinatoplatino (IV) como ligando, ellos disolvieron el complejo de platino en agua, ajustaron el pH a 5.5, lo que desprotona los dos grupos carboxilo libres del compuesto, y añadieron el catión Tb^{3+} para formar la red. Finalmente, los investigadores añadieron rápidamente etanol a la disolución con agitación constante, lo que redujo drásticamente la constante dieléctrica del medio, haciendo que un sólido precipite de la disolución. Este material, contenía terbio y el complejo de platino, en forma de nanopartículas no cristalinas de tamaño relativamente uniforme con un diámetro de $58,3 \pm 11,3$ nm.²⁶

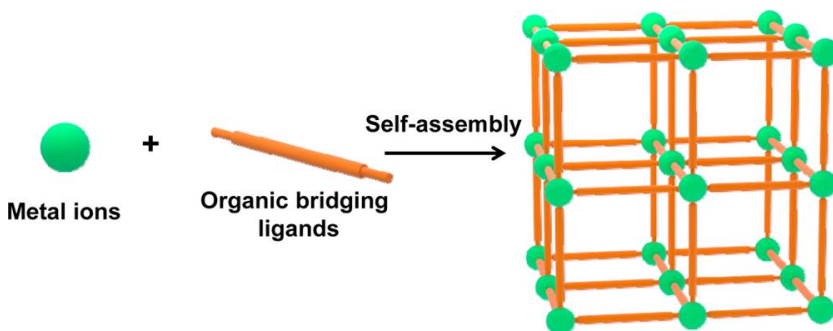


Figura 7. Esquema del autoensamblado directo de metales como puntos de conexión y ligandos puente biomédicamente relevantes.⁴

En cuanto a la adsorción y retención de fármacos dentro de su estructura porosa puede llevarse a cabo a través de métodos, no covalentes, es decir, la simple adsorción y retención de los fármacos a través de interacciones electrostáticas y no

covalentes o bien, generando enlaces covalentes entre la estructura del MOF y el fármaco en cuestión, los cuales pueden ser diseñados para una rotura y liberación bajo un ambiente determinado y, por tanto, actuando solamente sobre la diana. Estos métodos se conocen como modificaciones postsintéticas, es decir, tras la síntesis de la red organometálica se procederá con el dopaje con la molécula bioactiva.⁴ Estos procedimientos se esquematizan en la **Figura 8**. Horcajada y colaboradores⁵² probaron la capacidad de diferentes nanoMOFs tipo carboxilato de hierro porosos biocompatibles para encapsular enormes cantidades de diferentes fármacos antitumorales, antivirales y agentes cosméticos con diferentes polaridades, tamaños y grupos funcionales. Para ello, los materiales se sumergieron en disoluciones concentradas del producto a ser atrapado. Los autores describieron el comportamiento del material como "esponjas moleculares". Esos nanoMOFs mostraron una liberación molecular progresiva sin una importante liberación rápida al inicio del ensayo en una disolución tampón de fosfato a 37°C.

A pesar de que pueden unirse moléculas a las estructuras de los MOFs a través de la modificación de los ligandos previa a la síntesis del material, estos métodos no son muy adecuados para funcionalizaciones con moléculas grandes y sofisticadas como los fármacos, debido a la interferencia que estos fragmentos moleculares introducen en la síntesis del MOF.⁵⁸ Además, no es posible introducir funcionalidades térmicamente lábiles, coordinación metálica o grupos que disminuyan la solubilidad de los ligandos.⁵⁹ Por esta razón resulta más adecuado modificar el material tras su formación a través de

enlaces covalentes. En este sentido, el grupo de Wenbin Lin realizó la primera modificación postsintética de una red organometálica con el profármaco etoxisuccinato de cisplatino a través de la unión de este, por formación de un enlace amida entre los grupos amino libres del MOF MIL-101(Fe)-NH₂ y los grupos carboxilo del profármaco.⁴¹ Hints y Wuttke lograron anclar con éxito, a través de estos enlaces tipo amida, el analgésico ácido acetilsalicílico y el antitumoral clorambucilo directamente sobre la superficie del MIL-101(Al)-NH₂, que tiene ventanas pentagonales de 12 Å de diámetro y hexagonales de 16 Å con sus grupos amino libres.⁶⁰

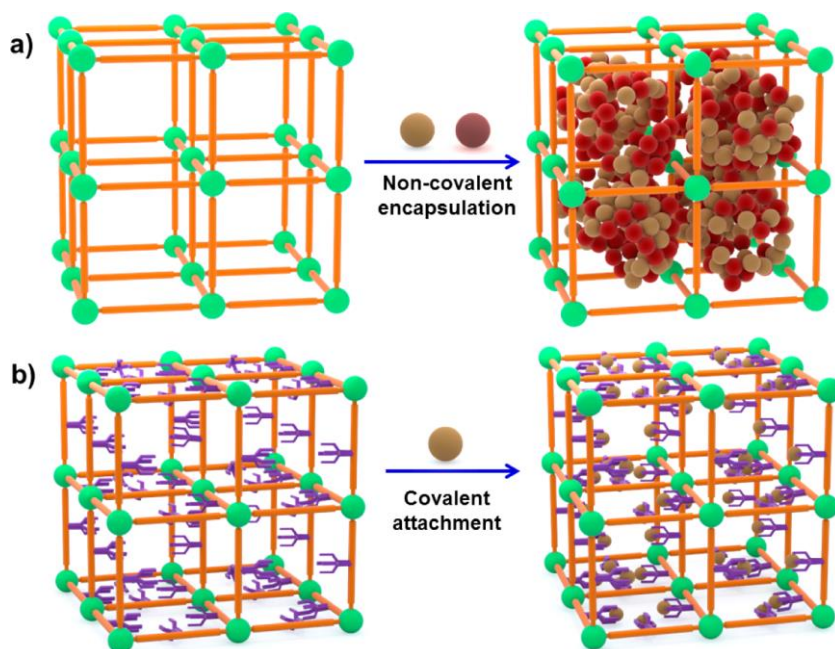


Figura 8. Esquemas que muestran la encapsulación postsintética de fármacos mediante encapsulación no covalente (a) y unión covalente (b).⁴

1.3.2 Mecanismos de liberación intracelular

Actualmente, muchos fármacos contra enfermedades como el cáncer pueden cargarse en MOFs gracias a su alta porosidad y las interacciones π - π , entre el material y la alta carga de fármaco. Como ejemplo de ello, el contenido de trifosfato de azidotimidina y cidofovir en el material MIL-101(Fe)-NH₂ fue de aproximadamente un 42,0% y un 41,9%, respectivamente.⁵² Sin embargo, no es suficiente para un buen portador de fármaco solo con tener una alta carga de fármaco, sino también se requiere que posea una buena capacidad de liberación de los fármacos de manera controlada.⁶¹

Las investigaciones recientes se han concentrado en el desarrollo de los métodos de un mejor control sobre la liberación de los fármacos por parte de los MOFs. Existen tres estrategias principales, la liberación del fármaco controlada por la interacción del fármaco con la matriz, la liberación del fármaco controlada por el recubrimiento del material y la liberación del fármaco activada por el catión. En el primer caso, la liberación de fármacos de MOF con porosidad alta y regular viene controlada por la interacción entre los MOF y los fármacos. En el retículo flexible MIL-53(Fe)⁶² cargado con ibuprofeno, gracias a que las características geométricas y energéticas del ibuprofeno eran coincidentes con las del MIL-53(Fe), su interacción se vio reforzada, lo que prolongó el tiempo de liberación del fármaco. El resultado mostró que el tiempo de liberación de ibuprofeno por parte del MIL-53(Fe) se prolongó hasta aproximadamente 20 días. Por su parte, Horcajada y colaboradores⁵² investigaron la liberación controlada de tres fármacos, la doxorrubicina, el cidofovir y el trifosfato de azidotimidina por parte de nanopartículas de MIL-

100(Fe).⁵² Se demostró que los tres fármacos se liberaron lentamente, sin un fuerte abandono inicial de la matriz por parte del fármaco, durante varios días debido al enlace de hidrógeno y las interacciones π - π entre los fármacos y los retículos del MIL-100(Fe) estos efectos prolongaban el tiempo de liberación del fármaco.

En el segundo caso, la liberación de fármacos a partir de MOFs está controlada por el espesor de un recubrimiento biocompatible aplicado sobre el MOF cargado de fármaco. Esta degradación se estudió por parte de Rieter y su grupo,²⁶ quienes prepararon un polímero de coordinación a nanoescala que incluía en su estructura el profármaco del cisplatino c,c,t-diaminodiclorodisuccinatoplatino (IV) y cationes Tb^{3+} el cual se funcionalizó con polivinilpirrolidona, lo cual sirvió para recubrir el material con una capa de sílice amorfa de un espesor de 2 a 7 nm. Los autores demostraron que, con el aumento del espesor de la cubierta de sílice, la velocidad de liberación del cisplatino desde el portador disminuía gradualmente. Este trabajo sugirió que había un mejor control sobre la velocidad de liberación del fármaco del soporte gracias al espesor del revestimiento. Lin y colaboradores. Demostraron más detalles sobre el efecto del espesor del recubrimiento sobre la liberación del fármaco por el MIL-101(Fe)-NH₂@SiO₂.⁴¹ En primer lugar, se sintetizó el nanomaterial MIL-101(Fe)-NH₂. A continuación, el profármaco etoxisuccinato de cisplatino se unió químicamente al material por el grupo amino terminal. Finalmente, este sistema se recubrió una capa delgada de sílice usando silicato sódico como fuente de sílice. De esta manera, con la existencia de una capa de sílice uniforme, el tiempo de liberación del fármaco se alargó a 14 horas, en comparación

con el material inicial cuyo tiempo de liberación era de 1,2 horas.

En el tercer caso, se usaron cationes para activar la liberación de fármacos catiónicos encerrados en MOFs aniónicos. Un estudio importante en este campo lo hizo An y su grupo⁶³ quienes prepararon el MOF aniónico $Zn_8(ad)_4(BPDC)_6O \cdot 2Me_2NH_2 \cdot 8DMF \cdot 11H_2O$, usando ácido bifenildicarboxílico (BPDC), adenina (ad) y acetato de zinc deshidratado. A continuación, se introdujo procainamida, un fármaco catiónico, en los MOF mediante intercambio catiónico entre el fármaco y los cationes dimetilamonio en los poros de los MOF. La cantidad cargada de fármaco fue $0,22 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ de material después de 15 días de incubación. El experimento de liberación del fármaco reveló que en tampón fosfato (pH = 7,4), la repulsión electrostática entre los iones metálicos (como, K^+ y Na^+) y el fármaco catiónico condujo a una liberación estable de procainamida. La cantidad de fármaco liberado fue de casi el 100% después de 72 horas, mientras que en el agua desionizada, la liberación de procainamida fue muy lenta debido a la ausencia de interacción iónica y sólo el 20% del fármaco se liberó del MOF en 72 horas.

1.3.3 Aplicaciones

Los sistemas de administración controlada de fármacos son una de las aplicaciones más prometedoras para la salud humana, estos sistemas representan un campo en constante evolución para la ciencia de los materiales biomédicos. En el área de la administración de fármacos, la búsqueda de vehículos no tóxicos y eficientes para la entrega de fármacos al cuerpo es un reto crucial. Hasta ahora se han estudiado

muchos sistemas diferentes para aplicaciones biológicas, tales como polímeros orgánicos y materiales porosos inorgánicos. Sin embargo, sus aplicaciones están limitadas por una menor capacidad de carga de fármaco o por un perfil de liberación no controlado. Para evitar estos problemas, se han propuesto los MOFs para aplicaciones biomédicas. Los MOFs ya han demostrado ser prometedores materiales en una serie amplia de aplicaciones, que incluye la catálisis, la óptica no lineal, la luminiscencia, la separación y almacenamiento de gases y otras muchas en el terreno biomédico que comentaremos a continuación.⁶⁴

1.3.3.1 Quimioterapia

La nanotecnología ha proporcionado nuevas herramientas para abordar situaciones clínicas no deseables, especialmente en el campo de la oncología. El desarrollo de nanoportadores inteligentes capaces de administrar agentes quimioterapéuticos específicamente a las células enfermas y liberarlos de manera controlada ha ofrecido una ventaja primordial sobre la terapia convencional.⁶⁵

La presencia del agente antitumoral cisplatino en los MOFs, como ya se citó anteriormente ha sido un área en constante desarrollo. El cis-diaminodicloroplatino (II), es un complejo de coordinación cuadrado plano de Pt (II), fue el primer complejo metálico en entrar en el uso clínico para el tratamiento del cáncer. Actualmente, el cisplatino se usa por sí mismo o en combinación con otros fármacos para tratar cáncer de pulmón, ovario, vejiga, testicular, de cabeza y cuello, esófago, colon, gástrico, mama, melanoma y próstata. A pesar de que las ventas de cisplatino están actualmente en declive, dado que los

análogos de segunda y tercera generación están siendo más ampliamente recetados, el cisplatino sigue siendo el "patrón de oro" al que se aspiran los fármacos anticancerosos basados o no en platino.⁶⁶

De esta manera, en la bibliografía actual se encuentran muchos ejemplos de la incorporación de cisplatino y sus profármacos de Pt (IV) a nanomateriales. En este sentido, en los MOF de zirconio UiO66 y UiO66-NH₂ se ha incorporado cisplatino siguiendo dos enfoques diferentes. En la primera ruta, el profármaco de cisplatino cisdiaminocisdiclorotransdisuccinatoplatino (IV) se incorporó al UiO66-NH₂ a través de una reacción de acoplamiento formando amidas con los grupos NH₂, mientras que, en la segunda ruta, el cisplatino se encapsuló en las cavidades grandes de ambos MOF. La citotoxicidad de ambas formulaciones se evaluó en la línea celular de cáncer de pulmón A549 mostrando que el MOF cargado con cisplatino resultó ser más eficiente debido a su mayor capacidad de carga. Los mismos autores también investigaron la multifuncionalidad de estos sistemas mediante la incorporación de NO antitrombótico en los MOFs cargados de fármaco; sorprendentemente, la cantidad de NO liberado de estas formulaciones es mucho mayor que la de los MOF puros.⁶⁷

El cisplatino también se ha incorporado formando parte de la estructura de los MOFs como ligandos tipo bisfosfonato de cisplatino, bisfosfonato de oxaliplatino⁶⁸ y cisdiaminocisdiclorotransdisuccinatoplatino (IV),^{26,39} de manera que la liberación del fármaco viene gobernada por la propia degradación del material. Así estos materiales admiten una gran cantidad de carga de fármaco y liberación prolongada del mismo en el

tumor, estos sistemas mostraron gran eficiencia en ensayos *in vitro* e *in vivo*, más incluso que los fármacos libres. También se ha anclado cisplatino como etoxisuccinato de cisplatino a través de enlaces amida sobre el MIL-101(Fe)-NH₂ mediante una modificación postsintética del material. Este sistema se protegió de la degradación prematura generando una capa de sílice protectora en su superficie, su eficacia se demostró en células HT-29 de adenocarcinoma de colon humano.⁴¹ En la **Figura 9** se muestran las estructuras de estos complejos de Platino.

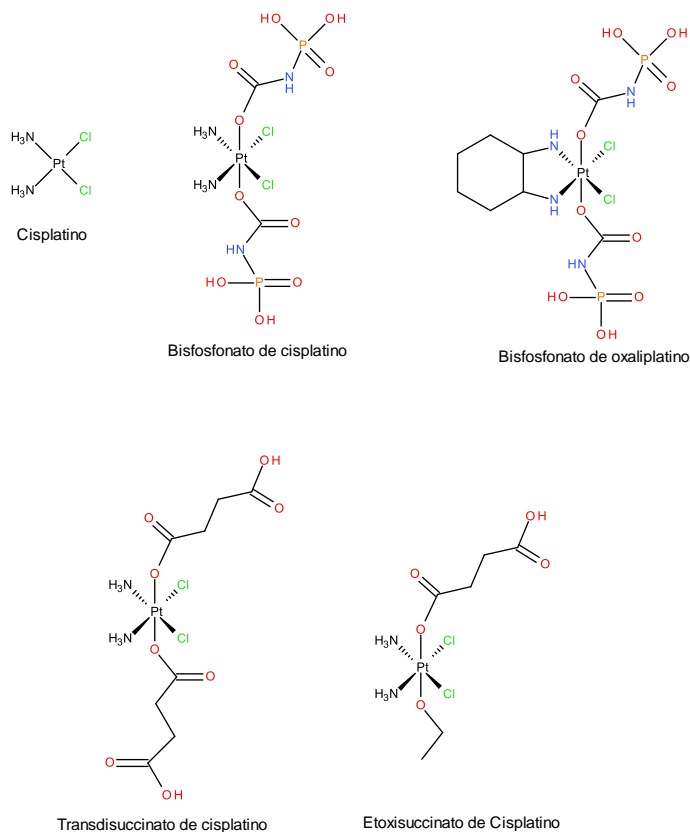


Figura 9. Cisplatino y algunos de sus profármacos incorporados en plataformas de difusión basadas en nanoMOFs.

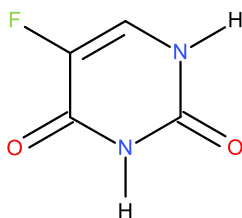
El 5-Fluorouracilo (5-FU) es sin duda uno de los fármacos antitumorales más investigado para su transporte dentro de los nanoMOFs, como lo confirman los numerosos ejemplos encontrados en la bibliografía. El 5-FU es un fármaco hidrófilo de bajo peso molecular. Es uno de los agentes quimioterapéuticos más comunes utilizados contra diversos tipos de tumores malignos, incluidos los cánceres colorrectal, de mama, cabeza y cuello. A pesar de sus beneficios clínicos, el 5-FU está asociado con frecuentes toxicidades gastrointestinales y hematológicas, lo que a menudo conduce a la interrupción del tratamiento. Además, tiene una semivida corta *in vivo* lo que significa que no se puede lograr un efecto terapéutico sostenido. El uso clínico del mismo también está limitado por su escasa estabilidad en medio biológico y penetración intracelular restringida, como consecuencia de su importante carácter hidrofílico,⁶⁴ su estructura química se muestra en la **Figura 10**. Como ejemplo, muy recientemente, el grupo de Yang ha descrito partículas microporosas de UiO-66-NH₂ en las que han cargado el fármaco y poseen [2]pseudorotaxanos como puertas moleculares de los nanoportadores unidos a través de la complejación receptor-huésped para regular la liberación controlada del fármaco.⁶⁹

Liu y colaboradores⁷⁰ diseñaron un interesante sistema basado en nanoesferas huecas del MOF altamente estable ZIF-8, que está compuesto de cationes Zn²⁺ y un ligando 2-metilimidazol. Este material se cargó con un 51% de 5-FU y finalmente se recubrió con capas del polímero desarrollado por ellos FA-CHI-5-FAM. Este polímero FA-CHI-5-FAM estaba compuesto de ácido fólico (FA) como una molécula de orientación, capaz de unirse a los receptores de folato sobreexpresados en muchas

superficies de células cancerosas, el ligando quitosano (CHI), que facilita la formación del polímero y su unión a la superficie de las nanopartículas y finalmente, el agente de imagen 5-carboxilfluoresceína (5-FAM) para monitorizar el proceso de liberación controlada del fármaco. La nanomedicina sintetizada ZIF-8/5-FU@FA-CHI-5-FAM tenía una distribución de tamaños de aproximadamente 400 nm. El material no cargado con 5-Fu demostró ser no tóxico en células MGC-803. Sin embargo, 200 µg/mL de ZIF-8/5-FU@FA-CHI-5-FAM produjeron la muerte del 55% de las células. Los autores también comprobaron su poderoso efecto de señalización siguiendo la fuerte fluorescencia verde del material incubado en células MGC-803. Finalmente, los autores mostraron la liberación sostenida de 5-FU del nanomaterial en condiciones fisiológicas (PBS, 37 °C) y en condiciones ácidas (pH=5), lo que favorece la disolución de CHI y ZIF-8. La liberación completa se llevó a cabo a lo largo de 45h y 21h respectivamente. Con lo que, ZIF-8/5-FU@FA-CHI-5-FAM se presentó como un vehículo de farmacológico con alta capacidad de carga muy útil para matar células cancerosas de manera controlada.

Teniendo en cuenta que las interacciones por enlace de hidrógeno podrían aumentar la eficiencia de carga del 5-FU, se sintetizó un MOF quiral y mesoporoso con más potencial para formar enlaces de hidrógeno, por parte del grupo de Wang. Para ello, emplearon nitrato de cinc y triisofalato de 5,5',5''-(1,3,5-triazin-2,4,6-triil)tris(azanodiilo) (TATAT), este MOF tenía dos tipos de poros: prismáticos hexagonales y cavidades prismáticas trigonales. Las dimensiones de ellos son 1,7 y 2,1 nm. Los tamaños de las ventanas son 6,3 x 10,5 y 14,3 x 11,5Å², respectivamente. Este material disponía de numerosos

puntos de unión por enlace de hidrógeno debidos a la cadena principal de imino triazina y grupos carboxílicos del ligando TATAT que podrían ofrecer interacciones entre el sólido poroso y las moléculas de 5-FU. La carga de 5-FU se realizó por adsorción, resultando una carga de 0,5 g de 5-FU/g como consecuencia de la formación de enlaces de hidrógeno entre el sólido y la molécula de fármaco 5-FU. En los experimentos de liberación del fármaco se observó una liberación progresiva sin una importante liberación inicial. En una semana se liberó el 86,5% del fármaco cargado. Los autores encontraron tres etapas relacionadas con este proceso: alrededor del 42% del fármaco cargado se liberó en la primera etapa (8 h) y el 43% se liberó en las dos etapas posteriores. Esta liberación escalonada se debe a los diferentes tamaños de poro de los sólidos porosos, a los enlaces de hidrógeno y a las interacciones π - π que se producen entre el 5-FU y la parte orgánica del MOF. Con lo cual, los autores concluyeron que las interacciones específicas entre moléculas de fármacos y la estructura de los MOFs no sólo podrían mejorar la capacidad de carga sino también prolongar el proceso de liberación.



5-Fluorouracilo

Figura 10. Estructura química del fármaco antitumoral 5-Fluorouracilo (5-FU).

La camptotecina (CPT) es un alcaloide pentacíclico natural insoluble, aislado del árbol oriental *Camptotheca accuminata* por Wall y colaboradores en 1966. La CPT es bien conocida por su actividad antitumoral contra una amplia gama de cánceres humanos. También se le han encontrado una gran variedad de actividades biológicas, entre las que se encuentran, su uso como plaguicida, antisoriasis, antiparasitario, antimicrobiano, antifúngico y antiviral. Muchos investigadores han publicado que la CPT inhibe una enzima celular de la ADN topoisomerasa I e induce la apoptosis en varias células cancerosas.⁷¹

Desafortunadamente, la CPT presenta algunas limitaciones importantes con respecto a la aplicación terapéutica, como su pobre solubilidad en agua y la hidrólisis rápida del anillo de lactona a pH fisiológico, lo que da lugar a la forma de carboxilato inactiva (**Figura 11**). Además, la CPT es extremadamente insoluble en compuestos orgánicos excepto en dimetilsulfóxido, en el que muestra una solubilidad moderada. Debido a la insolubilidad de la CPT en disolventes biocompatibles, es muy difícil aplicarla mediante las vías convencionales de administración de fármacos, incluyendo la administración oral, inyección intravenosa o intramuscular, para distribuir este compuesto en todo el cuerpo. Existen otros aspectos negativos que limitan el uso de CPT en ensayos clínicos: pérdida pronunciada de actividad debido a la hidrólisis del anillo de lactona, reversibilidad de la interacción fármaco-objetivo y toxicidad severa, incluyendo cistitis hemorrágica y mielotoxicidad.⁷¹

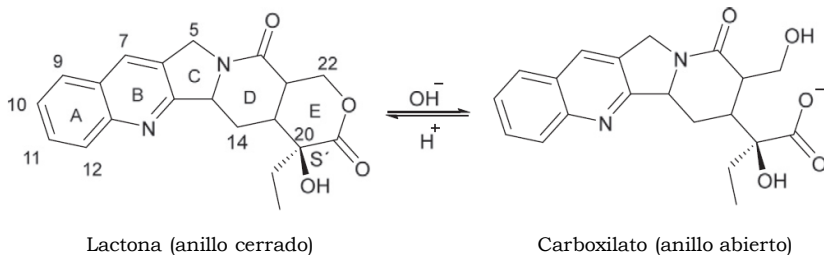


Figura 11. Equilibrio de la CPT entre la forma lactona (forma activa) y la forma carboxilato (forma inactiva).⁷¹

Hay muy pocos ejemplos de MOF para liberación de CPT, la mayoría de ellos están centrados en la estructura del ZIF-8. De esta forma, se encapsularon fluoresceína y CPT en el MOF zeolítico imidazólico (ZIF-8) monodisperso con partículas de tamaño uniforme de 70 nm (**Figura 12**). La evaluación de las nanoesferas del ZIF-8 con fluoresceína encapsulada en la línea celular de adenocarcinoma de mama humano MCF-7 demostró la internalización celular y citotoxicidad mínima del contenedor. El tamaño de partícula de 70 nm facilita la captación celular, mientras que la disociación fácil del MOF ZIF-8 da como resultado una liberación endosomal rápida de la carga de moléculas pequeñas. De esta manera se demostró que las partículas de ZIF-8 con CPT encapsulada muestran una mayor muerte celular, que implica la captación por parte de las células y la liberación intracelular del fármaco.⁷¹

Con este mismo fin también se han cargado derivados de la CPT dentro de los MOFs. Nunzio y sus colaboradores⁷² desarrollaron un nanoMOF para liberación de Topotecan (TPT) que sigue el modelo del "barco en la botella" (**Figura 13**). En este trabajo, los autores sintetizaron el MIL-100(Fe), mediante autoensamblaje de cationes Fe³⁺ y el ligando ácido trimésico.

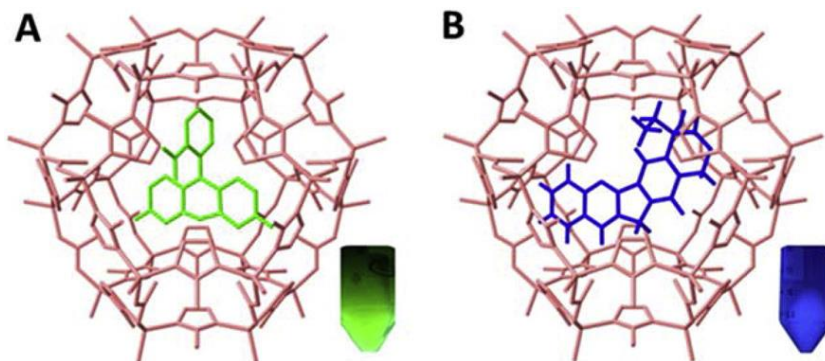


Figura 12. Imagen esquemática de la aplicación de MOFs para el suministro de moléculas pequeñas (fluoresceína en verde (A) y CPT en azul (B)) dentro del ZIF-8. La molécula de CPT encaja bien dentro de la red microporosa, que carga un máximo de 2% de fármaco.⁷¹

Posteriormente, el TPT se introdujo en los poros por medio de varias impregnaciones consecutivas del MIL-100 en disoluciones del agente anticancerígeno. El mecanismo de atrapamiento se basa en que los monómeros del fármaco pueden penetrar en las aperturas hexagonales (poros más grandes de la estructura) pero no en las ventanas pentagonales (poros más pequeños) y las moléculas se almacenan dentro de las grandes cavidades. Dentro del MOF, las moléculas del monómero se podrían agregar en las grandes cavidades a través de interacciones de apilamiento. Este nuevo sistema de liberación controlada de fármacos se basa en un mecanismo de absorción de uno y dos fotones para activar la liberación controlada de la carga. Este mecanismo permite usar la región del infrarrojo cercano en lugar de la luz UV/Vis, la cual posee una mejor penetración en los tejidos, ya que la irradiación UV/Vis puede dañar las células y dificultar la penetración de la luz en el tejido. Los ensayos de eficacia *in vitro* demostraron que los MOFs sin carga de TPT no afectaban a la actividad

biológica contra el adenocarcinoma alveolar A549 y las líneas de células pancreáticas humanas MiaPaCa2, mientras que el nanoMOF cargado con TPT indujo muerte celular con una concentración inhibitoria media máxima (IC₅₀) de 2,5 y 0,2 μM respectivamente, también se obtuvieron valores superiores a los observados para el fármaco desnudo contra la línea de células pancreáticas humanas PANC1 2,4 frente a >25 μM. Una hipótesis para explicar el efecto anterior podría apuntar hacia la interacción entre el nanoMOF y las células, lo que permitiría que el fármaco se transportara dentro de las células con el fin de ejercer la actividad antitumoral.

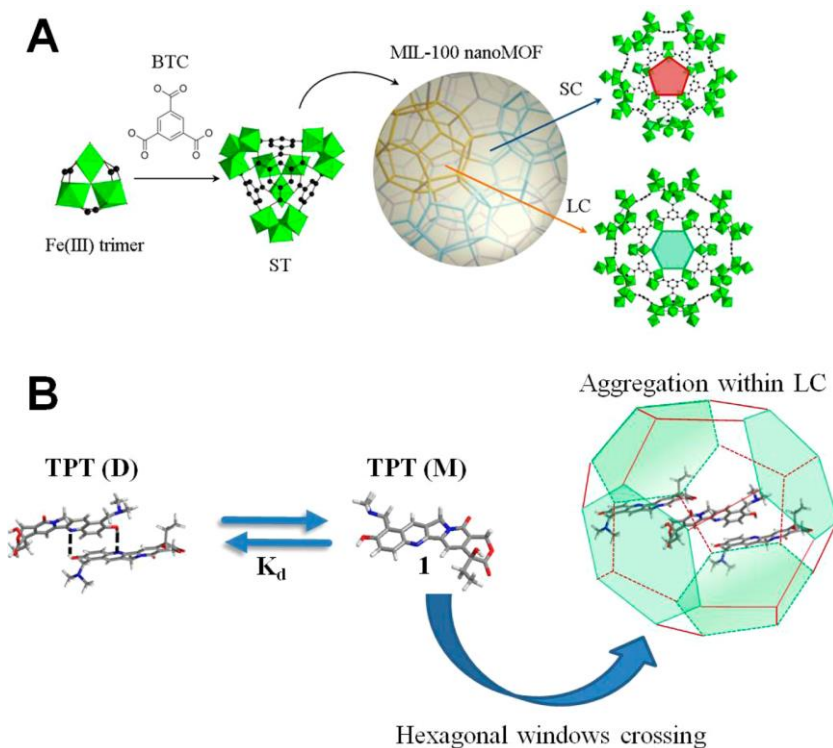


Figura 13. Ilustración esquemática de la síntesis y estructura del nanoMOF MIL-100. A) El nanoMOF posee cavidades pequeñas (SC) y cavidades grandes (LC). B) Representación esquemática del mecanismo hipotético de atrapamiento de TPT dentro de nanoMOF.⁷²

Existen muchos más ejemplos de fármacos antitumorales cargados dentro de diferentes MOFs, como por ejemplo doxorrubicina,⁷³ metotrexato,⁷⁴ compuestos de rutenio⁷⁵ y NO.⁷⁶

1.3.3.2 Terapia fotodinámica

Los MOF también pueden utilizarse como agentes sensibilizantes en la terapia fotodinámica (PDT). Este tratamiento utiliza especies químicas como las porfirinas, que pueden ser parte de la red, son capaces de excitarse por acción de la luz y transferir el exceso de energía a otras moléculas como el O₂, dando la especie extremadamente inestable oxígeno singlete: ¹O₂. Esta especie puede interactuar con las macromoléculas que juegan un papel clave en el ciclo de vida celular, matando la célula, o con agua, produciendo especies oxigenadas reactivas (EORs), tales como el superóxido, O₂^{•-}, el radical hidroxilo, OH[•], o el peróxido de hidrógeno, H₂O₂. Estos agentes muy reactivos también pueden dañar las células. Los tejidos donde el oxígeno singlete o las EORs se han formado por la acción de la luz sobre un fotosensibilizador serán destruidos en un área controlada. La limitación más importante de esta terapia es que su profundidad de penetración es muy corta por lo que no es muy útil para tumores profundos.¹⁸ Con esta aplicación en mente el grupo liderado por el profesor Wenbin Lin desarrolló el primer nanoMOF usando una clorina como ligando,⁷⁷ las clorinas son compuestos orgánicos macrocíclicos y heterocíclicos aromáticos, que consisten en un conjunto de cuatro anillos de pirrol, uno de los cuales está en forma reducida, unidos por cuatro enlaces metino (=CH-). Los autores prepararon el

ligando 5,15-di(pbenzoato)-clorina (H_2BDC) a partir de la correspondiente porfirina. El autoensamblado de dicha especie con el catión Hf^{4+} produjo una estructura que denominaron DBC-UiO. Este material es estable y posee los ligandos bien separados entre sí, lo cual evita el auto quencheado de la propia estructura además los pesados cationes Hf^{4+} coordinados con los grupos carboxilato de este ligando mejora el cruce entre sistemas lo que incrementa la generación de oxígeno singlete. Su estructura altamente porosa y la fina apariencia de sus cristales en forma de láminas facilita la difusión de las EORs hacia el exterior del cristal. Los autores demostraron *in vitro* la no toxicidad del material en la oscuridad y su fuerte acción citotóxica cuando se irradia con luz sobre dos líneas celulares de cáncer de colon la HT29 de adenocarcinoma de colon humano y la CT26 de carcinoma de colon de roedor. De la misma manera demostraron la fuerte inhibición de crecimiento de este tipo de tumores en ratones al recibir el tratamiento de PDT con este nuevo material, con lo que los MOFs con un diseño racional de su estructura, se destacan también para aplicaciones en terapia fotodinámica. En la **Figura 14** se esquematiza el funcionamiento de este nuevo material.

1.3.3.3 Difusión de ácidos nucleicos

Al contrario que la mayoría de los fármacos compuestos por moléculas pequeñas los cuales pueden entrar en las células a través de la difusión pasiva o por translocación por los transportadores de membrana, los ácidos nucleicos no pueden ser absorbidos por las células en sus formas moleculares libres debido a su hidrofiliidad y elevado peso molecular.

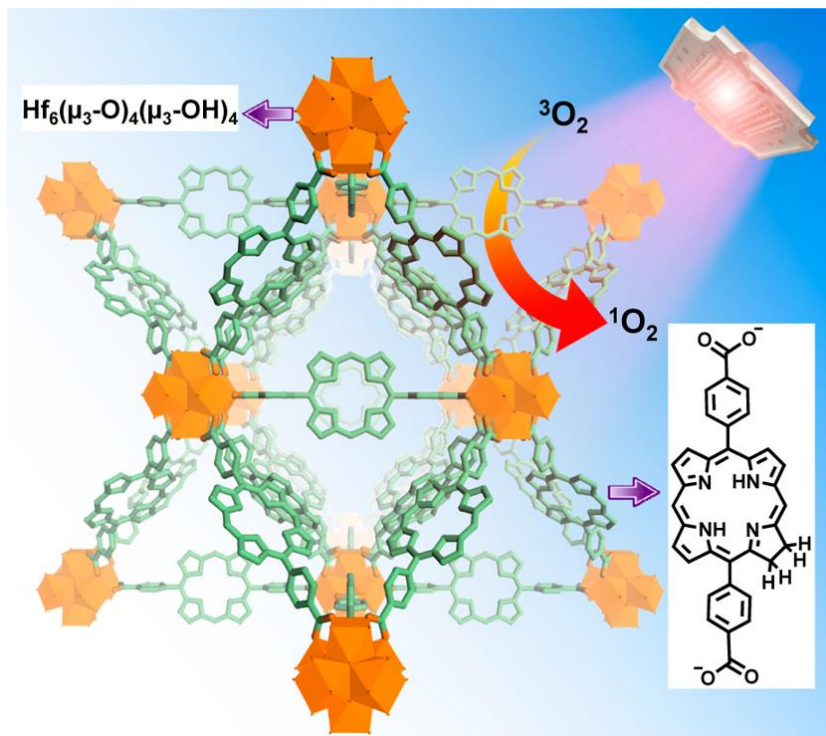


Figura 14. Descripción esquemática de la generación de oxígeno singlete por parte del efecto fotosensibilizador del DBC-UiO con luz LED.⁷⁷

De la misma manera se han usado MOFs para suministrar ácidos nucleicos con alta eficiencia.⁴ En un trabajo pionero, Lin y colaboradores prepararon el primer nanoMOF útil para liberación combinada de cisplatino y siRNA. Para esto, el cisplatino y un grupo de genes directores de siARN resistentes a múltiples fármacos se cargaron en cristales en forma de láminas hexagonales de $\sim 100\text{nm}$ de diámetro y $\sim 30\text{nm}$ de espesor del nanoMOF UiO formado por unidades de $\text{Zr}_6(\mu_3\text{-O})_4(\mu_3\text{-OH})_4$ y ácido aminotrifendicarboxílico como ligando, el cisplatino se retuvo dentro de los poros del material como el profármaco $\text{cis,cis,trans-[Pt(NH}_3)_2\text{Cl}_2(\text{OEt})(\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{COOH)]}$

en una cantidad de 12.3 ± 1.2 % en peso. El siRNA se retuvo sobre la superficie del material mediante la coordinación entre los grupos fosfato de los siRNAs y las posiciones vacantes de los Zr^{4+} . Curiosamente, estos sistemas liberaron eficientemente tanto el siRNA como el cisplatino a cuatro líneas celulares de cáncer de ovario humano resistentes al cisplatino (ES-2, OVCAR-3, SKOV-3 y A2780/CDDP) disminuyendo los valores de IC_{50} del cisplatino en un orden de magnitud en comparación con el cisplatino libre. Este aumento de eficacia se atribuyó a la activación del gen resistente a los fármacos de las células de cáncer de ovario para el cisplatino mediado por el nuevo sistema denominado siARN/UiO-Cis, demostrando así la eficiencia de este tipo de sistemas de terapia combinada.⁷⁸ En la **Figura 15** se explica este nuevo sistema de liberación combinada centrado en nanoMOFs.

1.3.3.4. Difusión de otros fármacos

En el campo de la difusión de fármacos usando las redes organometálicas como vectores, se considera al trabajo publicado por Vallet-Regí y colaboradores en el año 2006 la primera aportación. Los autores usaron ibuprofeno como molécula farmacológica y estudiaron el comportamiento de estos nuevos vehículos.¹¹ El ibuprofeno es un fármaco de venta libre bien conocido con potentes propiedades anti-inflamatorias y analgésicas. Dado que el ibuprofeno es especialmente útil para aliviar los síntomas de la artritis, el hallazgo de formulaciones del fármaco que permitiera que se liberara lentamente en el cuerpo durante un largo período de tiempo sería beneficioso para los pacientes que sufren de artritis.

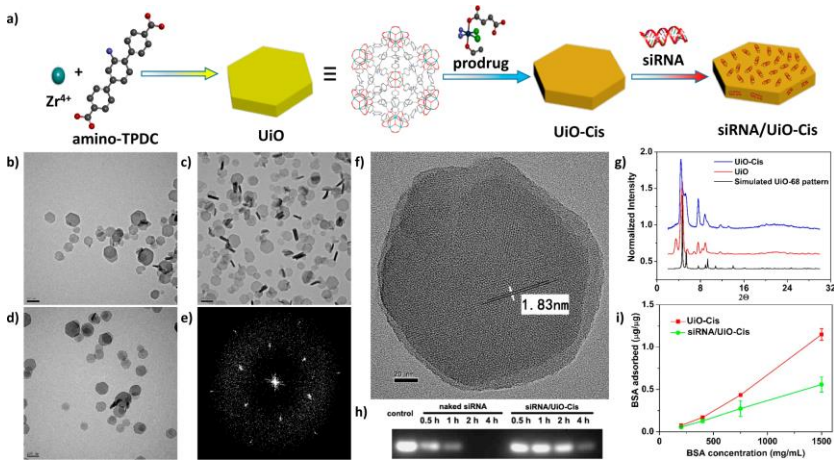


Figura 15. Preparación y caracterización del siARN/Uio-Cis. (a) Presentación esquemática de la síntesis del siARN/Uio-Cis y la carga del fármaco. Imágenes de TEM del Uio (b), Uio-Cis (c), y siARN/Uio-Cis (d). Barras: 200nm. (e) Patrón de difracción de electrones del Uio. (f) Imagen TEM de alta resolución del Uio. Barra: 20nm. (g) Patrones de PXRD de Uio-68 (negro), Uio (rojo) y Uio-Cis (azul). (h) Estabilidad en suero de los siARNs agrupados en el material siARN/Uio-Cis según electroforesis. (i) Unión de albúmina de suero bovino (BSA) a Uio-Cis con y sin carga de siARN. Los resultados se expresan como la cantidad de BSA (μg) adsorbida por μg de Uio-Cis.

El tamaño molecular del ibuprofeno es menor que los poros del MIL-100 o MIL-101. Con el fin de ver si el ibuprofeno podría ser adsorbido en cualquier MOF, los investigadores sumergieron los materiales MIL-100(Cr) y MIL-101(Cr) en disoluciones de ibuprofeno en hexano. Ellos descubrieron que ambos MOF adsorbían el fármaco, el MIL-101(Cr) es capaz de adsorber el 138% de su propio peso de ibuprofeno. Después de obtener los MOFs cargados de fármaco, los investigadores también estudiaron la liberación del fármaco en un medio acuoso que simula fluidos corporales. Se encontró que mientras que algo del fármaco se libera en cuestión de horas para ambos MOF, la eliminación completa del fármaco de las partículas requería

alrededor de 6 días, lo que sugiere que los MOF de este tipo podrían ser útiles para la liberación lenta de ibuprofeno en preparaciones farmacéuticas tales como un parche transdérmico. Aunque el Cr^{3+} es bastante tóxico para las células de los mamíferos, los investigadores señalaron que la red molecular no necesita ser construida alrededor de octaedros de Cr^{3+} y que el Fe^{3+} , el cual es mucho menos tóxico que el Cr^{3+} y forma fácilmente octaedros, sería una alternativa útil para construir MOFs para almacenamiento y liberación de fármacos bajo condiciones biológicas.

Así, como una alternativa biocompatible, Férey y colaboradores propusieron el uso de un MIL-53 de hierro menos tóxico como portador, el cual tiene estructura flexible.⁶² Ellos investigaron su capacidad de administración de fármacos utilizando ibuprofeno como modelo farmacológico, al igual que el caso anterior. Debido a su estructura flexible, el sólido fue capaz de adsorber alrededor del 21% en peso de ibuprofeno. Esta capacidad de carga es mucho menor que la de los primeros sólidos, probablemente debido a su menor tamaño de poro (8Å). Sin embargo, este modelo exhibió una sorprendente habilidad de liberar lentamente el fármaco encerrado en sus cavidades: La liberación total se logró después de 3 semanas en fluido corporal simulado a 37°C. La entrega tan lenta del ibuprofeno por parte del MIL-53 de hierro se beneficia de las interacciones de enlace de hidrógeno entre el grupo carboxílico del ibuprofeno y los grupos hidroxilo del MIL-53, así como del tamaño de poro más pequeño del material. Este resultado indicó que las terapias muy largas podrían realizarse mediante la optimización de las interacciones entre los fármacos y la

matriz de los materiales que los encierran, así como la modulación de los tamaños de poro de los nanoMOF.

Nuevamente, Férey y colaboradores emplearon una serie de nanopartículas de la familia de los MIL para encapsular enormes cantidades de diferentes medicamentos antitumorales, antivirales y agentes cosméticos con diferentes polaridades, tamaños y grupos funcionales, tales como busulfán (Bu), trifosfato de azidotimina (AZT-TP), cidofovir (CDV), doxorubicina (Doxo), ibuprofeno, cafeína, urea, benzofenona 4 y benzofenona 3.⁵² A pesar de las excelentes propiedades anticancerosas o antivirales de estos fármacos, la mayoría de ellos tienen inconvenientes terapéuticos, por ejemplo, poca solubilidad y/o estabilidad en fluidos biológicos, baja biodisponibilidad, semivida corta en sangre y limitado acceso a través de las barreras biológicas, por lo que su uso clínico está muy limitado. Para eludir estos inconvenientes, hasta ahora, se han desarrollado muchos materiales como nanonanoportadores de ellos, pero la mayoría de estos fármacos no podían ser atrapados usando nanomateriales existentes. Por lo que sorprendentemente, las nanopartículas de MIL-100(Fe) atraparon con éxito estos agentes con tasas de encapsulación de hasta el 21,2% para el AZT-TP, 16,1% para CDV, 25,5% para Bu y 9,1% para Doxo. Mientras que el MIL-101(Fe)-NH₂ exhibió mayor capacidad de carga para AZT-TP (42,0%) y CDV (41,9%). Sus altas eficacias se explican por una fuerte afinidad entre los fármacos y las nanopartículas que se originan a partir de los sitios disponibles del metal en el MIL-101(Fe)-NH₂ interactuando con los grupos fosfato de CDV y AZT-TP. Las nanopartículas de los nanoMOFs flexibles (MIL-89, MIL-88A y MIL-53) también demostraron su capacidad para

actuar como contenedores de estos fármacos, sin embargo, no se obtuvieron buenas capacidades de carga con ellos. Sólo 0,6% de AZT-TP se retuvo en el MIL-88A y sólo 0,24% en el MIL-53. Estas capacidades de carga insatisfactorias probablemente se deben a sus tamaños de poro más pequeños que limitan la entrada de las moléculas de fármaco grandes. La liberación de AZT-TP en MIL-88A se mostró muy rápida desde el principio debido a que estas moléculas de fármaco de tamaño grande no atravesaron los pequeños poros del material y solamente se hallaban retenidos sobre su superficie. En comparación con los MOF flexibles, se observó la liberación progresiva de las tres moléculas de fármaco, CDV, AZT-TP y Doxo por parte de las nanopartículas del MIL-100(Fe), sin una liberación acusada inicial. La mayoría de los fármacos se liberaron en el plazo de 5 días (**Figura 16**), los cuales fueron gobernados principalmente por el proceso de difusión, acompañado de una degradación del 10% del MIL-100(Fe). La actividad anti VIH de estas nanopartículas se evaluó en células mononucleares de sangre periférica infectadas con VIH-1-LAI. Se observó un resultado significativo sólo para las nanopartículas cargadas con el fármaco que se encuentra alrededor del 90% de inhibición de la replicación del VIH ($IC_{90} = 200$ nM de AZT-TP en MIL-100(Fe)). Además, como se introdujo anteriormente, también se ensayó la capacidad de los MOF como portadores de moléculas cosméticas de naturaleza hidrofílica o hidrófoba, como la cafeína, la urea, la benzofenona 3 y la benzofenona 4. La capacidad de carga de la urea fue muy alta, hasta el 69,2% y 63,5% utilizando las nanopartículas MIL-100(Fe) y MIL-53(Fe) respectivamente,

mientras que la capacidad carga para la la benzofenona 3 fue bastante baja, sólo el 1,5%.

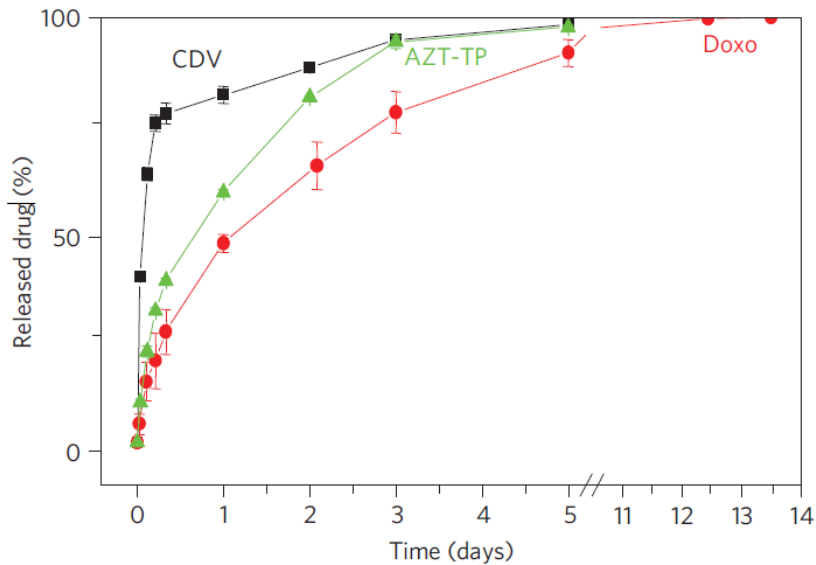


Figura 16. Perfiles de liberación de fármacos CDV (negro), Doxo (rojo) y AZT-TP (verde) en condiciones fisiológicas simuladas (PBS, 37°C) a partir de nanopartículas MIL-100(Fe).⁵²

1.4 NanoMOFs para imagen clínica

Una de las principales razones por las que el cáncer es un desafío médico importante del siglo XXI es que, en muchos casos, el éxito de la terapia se ve afectado principalmente por el diagnóstico oportuno y la prognosis. En este sentido, es crucial encontrar nuevos enfoques de técnicas diagnósticas capaces de detectar la malignidad en etapas tempranas.⁷⁹ La imagen biomédica es una herramienta muy importante en muchos diagnósticos. Debido a su adaptabilidad composicional, las redes organometálicas a nanoescala pueden ser útiles para funcionar como diferentes tipos de agentes de contraste (ACs)

para técnicas de diagnóstico por imagen clínica. Incluso, estos materiales son capaces de mejorar la señal de diferentes técnicas de formación de imágenes con el mismo material.

1.4.1 Resonancia magnética para imagen (RMI)

La resonancia magnética es una de las herramientas de diagnóstico clínico más potentes debido a su naturaleza no invasiva, alta resolución espacial, dependencia de agentes de contraste no radiactivos (ACs), infinita profundidad de penetración y resolución anatómica. Sin embargo, la sensibilidad intrínsecamente baja de la RM requiere el uso de agentes de contraste, que aceleren las velocidades de relajación de los protones del agua que los rodea generando una mejora de la sensibilidad de la señal obtenida. Por lo tanto, los ACs se administran a menudo en dosis altas. En base a sus mecanismos de relajación, los ACs pueden clasificarse como agentes T_1 -positivos que modifican la velocidad de relajación longitudinal, generando un aumento en el brillo o contraste positivo, cuando los datos captados son tratados a través de un software especializado, o como agentes T_2 -negativos que modifican la velocidad de relajación transversal, generando así un oscurecimiento de la imagen obtenida o contraste negativo. Con respecto a esta propiedad, se sabe que los nanomateriales paramagnéticos pueden trabajar a niveles de concentración muy bajos con una notable mejora de la señal de RMI. Los cationes Gd^{3+} y Fe^{3+} tienen la capacidad de incrementar las velocidades de relajación protónica longitudinal (r_1) y transversal (r_2) de las moléculas de agua en los tejidos humanos, mejorando así las imágenes clínicas de RM. Estos cationes, formando parte de un retículo estable, logran evitar la aparición de efectos secundarios indeseables de los quelatos

solubles actualmente usados en los ensayos clínicos y permiten elevadas cargas útiles de iones metálicos paramagnéticos. También prolongan la vida media del agente de contraste en plasma y proporcionan una buena señalización y acumulación en los tumores.⁷⁹ La magnitud del efecto sobre el tiempo de relajación longitudinal T_1 o el tiempo de relajación transversal T_2 se mide como la relajatividad r_1 o r_2 , respectivamente normalizada a 1 mM de concentración del agente de contraste bajo una intensidad de campo magnético aplicado. La relajatividad se utiliza para evaluar la eficacia de los ACs.²¹

La eficacia de los nanoMOFs de Gd^{3+} como agentes de contraste para resonancia magnética de imagen ponderada en T_1 fue demostrada por primera vez por Lin y sus colaboradores con nanobarras de aproximadamente 100 nm de longitud y 40 nm de grosor del MOF Gd-BDC. Estos nanoMOFs mostraban una relajatividad longitudinal $r_1=35,8 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ por catión de Gd^{3+} en una suspensión acuosa de goma de xantano, bajo un campo magnético de 3,0 Teslas. La relajatividad por Gd^{3+} resultó ser casi una orden de magnitud superior a la del agente de contraste Omniscan comercialmente disponible, el cual usaron como patrón. Además, el Gd-BDC también exhibió una relajatividad transversal $r_2=55,6 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ por Gd^{3+} .¹⁴

Hatakeyama y colaboradores⁸⁰ estudiaron la influencia del tamaño de partícula de dos MOF de gadolinio con ácido 1,4-benzenodicarboxílico (1,4-BDC) o ácido 1,2,4-bencenotricarboxílico (1,2,4-BTC) sobre la relajación de los protones del agua para RM. Los autores sintetizaron MOFs de gadolinio con diferentes formas y tamaños, que van desde 24 nm a más de 1 micra, usando micelas controladas. También se analizaron sus propiedades magnéticas bajo un campo

magnético de 4,7 T. Ellos encontraron que las partículas con una mayor área disponible para la interacción de los cationes Gd^{3+} con las moléculas de agua circundantes producían mayores velocidades de relajación que las partículas más grandes y más gruesas, que tenían menos superficie. De esta manera, la mayor relajación longitudinal de $83,9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ se encontró con el MOF de Gd^{3+} con el área superficial más alta de $4,51 \cdot 10^{19} \text{ nm}^2$, y el menor $r_1=17,8 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ se mostró con las partículas de mayor tamaño del MOF de Gd^{3+} , con un área superficial de $0,893 \cdot 10^{19} \text{ nm}^2$. Estos resultados mostraron que la mayor mejora de la relajatividad no dependía de la carga de Gd^{3+} dentro de las nanopartículas del MOF, pero si dependía de su disponibilidad para interactuar con las moléculas de agua circundantes (**Figura 17**).

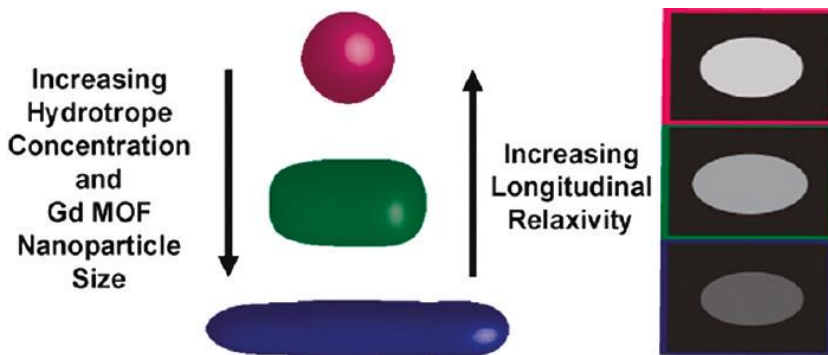


Figura 17. Representación esquemática de la variación de la relajatividad longitudinal con el tamaño de partícula.⁸⁰

Con la idea de buscar una composición más biocompatible y evitar la presencia de gadolinio en los nuevos agentes de contraste, el grupo de Lin sintetizó nanoMOFs basados en Mn^{2+} y evaluó sus aplicaciones como agentes de contraste para RMI.²⁷ Se ha demostrado que los iones Mn^{2+} funcionan como

potentes agentes de contraste en RMI con menor toxicidad que el Gd^{3+} libre. Se encontró que las nanobarras de $\text{Mn}(\text{BDC})(\text{H}_2\text{O})_2$ presentaban relajatividades de $r_1=5,5 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $r_2=50,0 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ con respecto al Mn^{2+} bajo un campo magnético de 3T, mientras que las nanobarras de $\text{Mn}_2(\text{BTC})_3(\text{H}_2\text{O})_6$ exhibieron relajatividades de $r_1=7,8 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $r_2=70,8 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ respecto a la $[\text{Mn}^{2+}]$. Los nanoMOF de Mn-BTC se recubrieron con una cubierta protectora de sílice y se funcionalizaron con un péptido director del cáncer el c(RGDfK) con el fin de estabilizar el nanoMOF en el medio biológico y añadirle a la capacidad de direccionamiento hacia el tumor. La acción de este nanoMOF se probó *in vivo* demostrando una mejora en las señales de RMI ponderadas en T_1 en el hígado, el bazo y la aorta 1 h después de la inyección intravenosa de una dosis de $10 \mu\text{mol/kg}$ de Mn, causada por los iones Mn^{2+} liberados de los nanoMOFs.

Estas características de los nanoMOFs abren una puerta en el campo de los materiales teranósticos. Este concepto incluye la terapia y diagnóstico del cáncer y ha sido tendencia en la investigación con este tipo de materiales desde su introducción por parte de John Funkhouser, director ejecutivo de PharmaNetics en 1998. Entre las diversas técnicas de diagnóstico basadas en imagen molecular, la tomografía computarizada de rayos X (TC), resonancia magnética de imagen (RMI), la tomografía de emisión positrónica (TEP) y la imagen óptica por fluorescencia están siendo ampliamente usadas para guiar la terapia clínica. La terapia guiada por imágenes no sólo nos permite localizar y medir intuitivamente el tejido lesionado, sino también puede optimizar la eficacia terapéutica, monitorizar las respuestas terapéuticas y

determinar el programa terapéutico para realizar terapias personalizadas. La resonancia magnética, se ha usado ampliamente en la ciencia médica como una técnica de diagnóstico no invasiva de gran alcance, la cual, gracias a la introducción de compuestos magnéticos y nanopartículas, nos permiten obtener imágenes de alta resolución con un excelente contraste de los tejidos blandos, pudiendo distinguir perfectamente los tejidos sanos de las lesiones de forma inocua para el paciente.⁸¹ De esta manera, Horcajada y colaboradores⁵² en un trabajo comentado en la sección anterior introdujeron por primera vez el uso de MOFs como materiales teranósticos aprovechando la capacidad del Fe^{3+} de disminuir el tiempo de relajación transversal de los protones del agua bajo un campo magnético, incrementando de esta manera el contraste negativo de los tejidos. Concretamente, el MIL-100 cargado con fármaco anti-VIH AZT-TP, presentó valores de r_2 superiores a $50 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ bajo un campo magnético de 9,4 T. También se probó el nanoMOF hierro-carboxilato MIL-88A PEGilado ($r_2 = 95 \text{ s}^{-1} \text{mM}^{-1}$) en un ensayo *in vivo* como agente de contraste T_2 para RM en ratas. El oscurecimiento en las imágenes de resonancia en los tejidos donde se produjo la acumulación del agente de contraste (hígado y bazo) generó buenas imágenes para el diagnóstico clínico (**Figura 18**).

Finalmente, Lin y colaboradores,⁸² fabricaron un nano polímero de coordinación teranóstctico producto del autoensamblado de iones Mn^{2+} y el fármaco zoledronato ($63 \pm 5\%$ en peso) gracias a su estructura de bifosfonato.⁸² El ácido zolendrónico es un medicamento para el tratamiento de la osteoporosis, así como uno de los bifosfonatos nitrogenados más eficaces, ha demostrado ser beneficioso para los pacientes con cáncer de

mama en varios estudios de la fase clínica III como fármaco auxiliar.

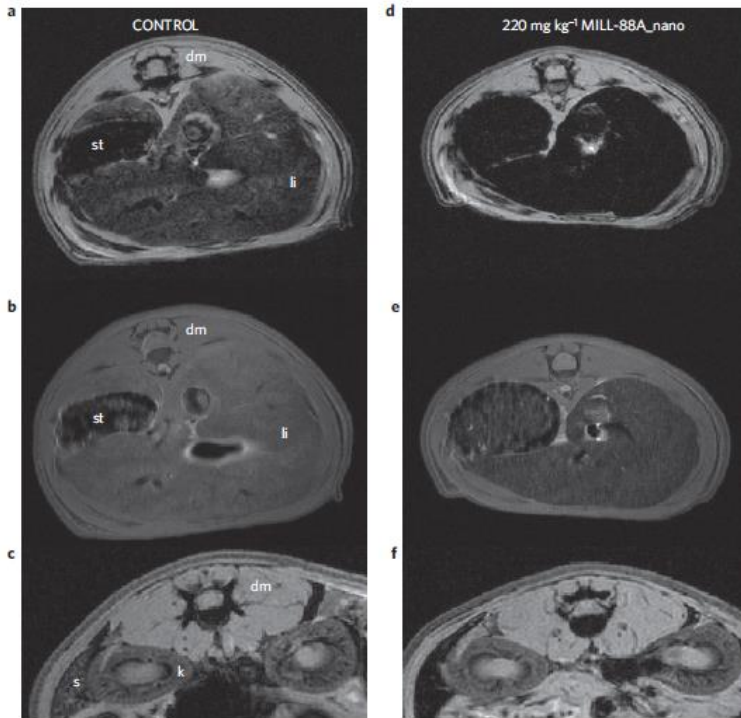


Figura 18. Imágenes de resonancia magnética. Imágenes a la izquierda (a-c) ratas control. Imágenes a la derecha (d-f) ratas inyectadas con 220 mg kg^{-1} de MIL-88A, en las regiones del hígado (a, b, d, e) y del bazo (c, f). 30 minutos después de la inyección, el efecto del producto se observa en el hígado y en el bazo. (dm, músculo dorsal; k, riñón; li, hígado; s, bazo; st, estómago).⁵²

Sin embargo, la aplicación clínica de bisfosfonatos como terapia anticancerosa está limitada por su farmacocinética desfavorable, pues al igual que la mayoría de los fármacos inyectados se unen a los huesos o se eliminan rápidamente mediante la excreción renal. El polímero de coordinación preparado se recubrió adicionalmente con un lípido y polietilenglicol para conseguir una liberación controlada del fármaco, mejorar su estabilidad y se funcionalizó

adicionalmente con anisamida como ligando director (**Figura 19**). Estos polímeros de coordinación de Mn conjugados con PEG y anisamida exhibieron un valor de r_1 de 7,6 y un valor de r_2 de $70,3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bajo un campo magnético de 3,0 Tesla. Además, se demostró que presentaban señales más intensas en imágenes ponderadas en T_1 después de la incubación con células MCF-7 de cáncer de mama humano en comparación con las partículas carentes de anisamida tras un tiempo de incubación de 24 h. Se estimó que el valor de r_1 de los NCP de Mn era de aproximadamente $8 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en células MCF-7, lo que sugiere la capacidad de este NCP para actuar como un agente de contraste, ponderado en T_1 eficaz para RM *in vitro*.

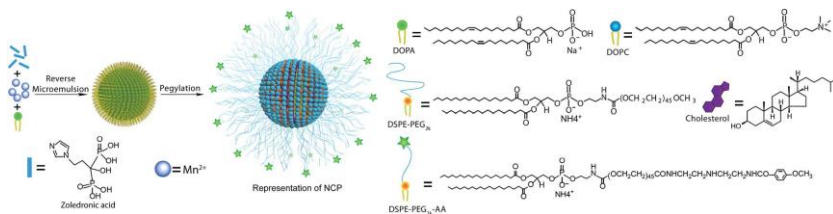


Figura 19. Esquema que muestra el procedimiento general del autoensamblaje de NPCs recubiertos de lípidos y PEG.⁸²

1.4.2 Tomografía Computarizada

La tomografía computarizada (TC) es una herramienta de diagnóstico clínico rápida y económica mediante la cual se hace pasar un haz de rayos X a través del cuerpo del paciente contra un detector móvil para la recogida de datos en diversas direcciones y ángulos. A partir de estos datos, se obtienen imágenes en diferentes direcciones del área objetivo, las cuales se pueden utilizar para construir un tomograma en un ordenador, que contiene información tridimensional de la parte implicada del cuerpo del paciente. Actuando como agentes de

contraste para la tomografía computarizada, los elementos más pesados producen una fuerte dispersión de los rayos X, por lo que la introducción de estos elementos disminuirá la recolección de datos por el detector en las áreas de acumulación de estos elementos pesados. Entonces, si los elementos pesados están bien localizados alrededor del tejido afectado, el contraste entre los tejidos normales y enfermos se realizará en el tomograma, contribuyendo así a concluir el estado de la enfermedad.¹⁸ Buscando mejores agentes de contraste para TC, Dekrafft y colaboradores⁸³ introdujeron átomos de yodo como componente pesado de un MOF capaz de atenuar los rayos X de la muestra irradiada, permitiendo la construcción de imágenes con alta resolución espacial. Se sintetizaron cinco redes organometálicas a nanoescala con el ligando puente ácido 2,3,5,6-tetraiodo-1,4-benceno dicarboxílico (I₄-BDC) y Cu²⁺ o Zn²⁺ actuando como cationes metálicos en la construcción de los nanoMOFs. Dichos nanoMOFs presentaron una fuerte atenuación de los rayos X mostrada en estudios fantasma (phantom) (en la **Figura 20** se muestran los estudios fantasma comparando el nuevo agente de contraste con iodixanol), lo que los convierte en potenciales agentes de contraste para tomografía computarizada de rayos X. Estos nuevos agentes de contraste a nanoescala presentaban una buena biodegradabilidad con un tiempo de semivida de una hora y media medido en condiciones biológicas simuladas (disolución de tampón de fosfatos de pH=7,4, 37 °C). En este período de tiempo antes de su completa disolución, los nuevos materiales se presentan como una herramienta de diagnóstico de gran alcance para TC.

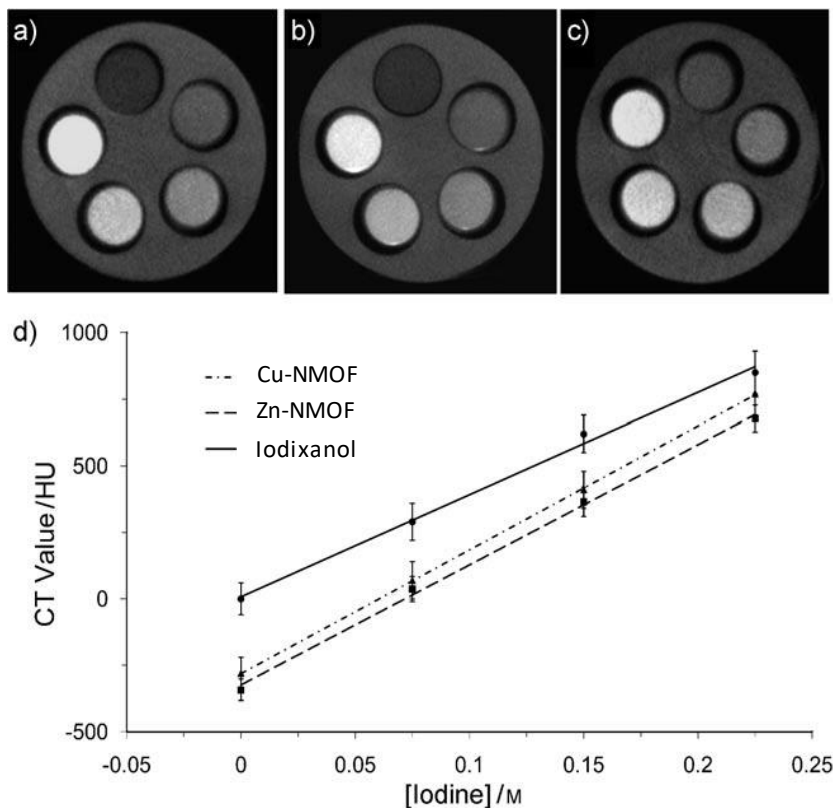


Figura 20. Las imágenes fantasma de TC de a) $[\text{Cu}(\text{I}_4\text{-BDC})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Cu-nanoMOF) y b) $[\text{Zn}(\text{I}_4\text{-BDC})(\text{EtOH})_2] \cdot 2\text{EtOH}$ (Zn-nanoMOF) los nanoMOFs estaban dispersos en etanol y c) Iodixanol en disolución acuosa. En la parte superior de la imagen, en sentido horario, los círculos tienen $[\text{I}] = 0, 0,075, 0,150, 0,225$ y $0,300$ M. d) Atenuación de rayos X en función de $[\text{I}]$ para Cu-nanoMOF a 40 kVp, Zn-nanoMOF a 50 kVp y Iodixanol a 40 kVp.⁸³

1.4.3 Imagen óptica

La imagen óptica ha surgido en los últimos años como una poderosa modalidad de imagen ampliamente utilizada en el campo de la biomedicina, principalmente en aplicaciones oncológicas, debido a su capacidad para diferenciar de manera no invasiva entre tejidos enfermos (como los tumores) y tejidos

sanos en base a la acumulación diferencial de colorantes en ellos.⁵³ Aprovechando las excelentes propiedades de los nanoMOFs Damirin y colaboradores diseñaron un nuevo sistema teranóstico que utiliza el MIL-53(Fe)-NH₂, que conjuga Fe³⁺ con ligandos 2-aminotereftalato en una estructura con intensas propiedades magnéticas, como contenedor para la carga del fármaco antitumoral 5-fluorouracilo en un 28% en peso.⁸⁴ Además, la gran cantidad de grupos amino libres en superficie permitió la unión covalente de 5-carboxifluoresceína, para dotar al sistema con un agente fluorescente que permitiera seguir el proceso de liberación de fármacos usando imagen óptica y ácido fólico, como agente director que siente afinidad por los grupos folato sobreexpresados en la superficie de las células tumorales. Gracias a las excelentes propiedades fluorescentes de este sistema, pudieron demostrar que la liberación del 5-FU se produce dirigida a las células que presentan el receptor específico de ácido fólico (células MGC-803) (**Figura 21**), también permitió estudiar la distribución del sistema *ex vivo*, según la intensidad de fluorescencia en los diferentes órganos, comprobando una circulación *in vivo* del sistema de liberación y una mayor acumulación en el hígado (**Figura 21**).

1.5 NanoMOFs como biosensores

Otra de las numerosas prestaciones de los MOFs, es su habilidad para actuar como sensores gracias a sus numerosas y adaptables propiedades, en este apartado vamos a citar algunos ejemplos de estas aplicaciones.⁸⁵⁻⁸⁷ Aquí comentaremos algunas de sus funciones como biosensores, es decir, un dispositivo integrado autosuficiente que es capaz de

proporcionar información analítica cuantitativa o semi-cuantitativa específica utilizando un elemento de reconocimiento biológico que se mantiene en contacto espacial directo con un elemento de transducción.⁸⁸

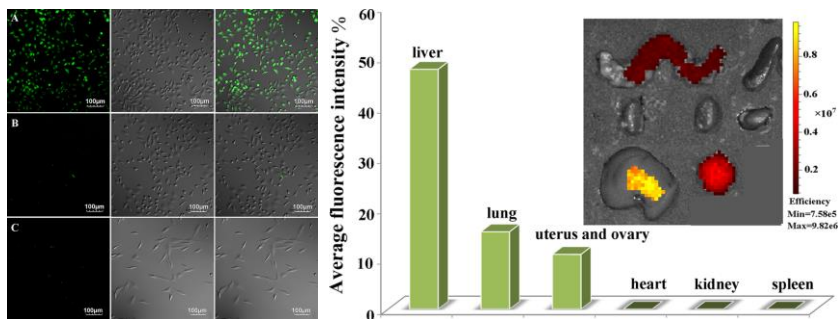


Figura 21. A la izquierda se presentan las imágenes de fluorescencia de células MGC-803 (con receptores de folato) vivas cultivadas con el sistema que incluye ácido fólico (A) y sin ácido fólico (B), para comprobar la capacidad directora de este sobre el material, células HASMC (sin receptores de folato) cultivadas con el sistema que lleva ácido fólico (C) durante 4 h. Los paneles izquierdo, medio y derecho son imágenes de campo oscuro, imágenes de campo claro y superposiciones, respectivamente. Barra de escala: 100 μm. A la derecha se muestra la acumulación de la nanomedicina en los órganos principales extirpados de ratones atímicos desnudos 24 h después de la inyección, e imágenes de fluorescencia *ex vivo* de diferentes órganos a las 24 horas post inyección.⁸⁴

1.5.1 Sensores de pH

Buscando una red organometálica que sirviera de sistema de monitorización de pH, el grupo de Avelino Corma desarrolló el MOF ITQMOF-3-Eu (**Figura 22**), el cual, fue producto del autoensamblado de cationes europio (III) con ácido 1,10-fenantrolina-2,9-dicarboxílico.⁸⁹ Este material resultó ser muy útil como componente de un sensor de pH en miniatura que funciona en el rango de pH de interés biológico (5-7,5).

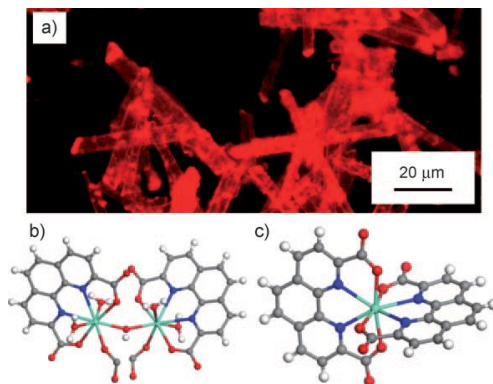


Figura 22. a) Imagen de microscopía óptica del ITQMOF-3-Eu. b) y c) Entornos de coordinación del europio en la estructura.

Conociendo que se puede introducir la propiedad de medir el pH en una red organometálica, el grupo del profesor Lin desarrolló el primer sensor de pH basado en nanoMOF para la medida del pH intracelular en células vivas con respuesta rápida y alta exactitud.⁹⁰ El pH intracelular (pHi) desempeña un papel vital en la regulación del proceso fisiológico/patológico. Es de gran importancia detectar y monitorizar los cambios de pHi a tiempo real dentro de células vivas para comprender mejor los procesos biológicos y contribuir al diseño racional de nanoMOFs para la entrega intracelular de fármacos. Para este menester, los autores usaron el isotiocianato de fluoresceína (FITC) anclado covalentemente a un nanoMOF tipo UiO construido a partir de Zr^{4+} y ácido aminotrifendicarboxílico (amino-TPDC). Este nanoMOF denominado F-UiO con cargas de FITC de hasta el 7% en peso, presentaba una fluorescencia eficiente y excelentes propiedades de monitorización radiométrica del pH. Los F-UiO nanoMOFs se internalizaron eficientemente por las células y se mantuvieron estructuralmente intactos dentro de

los endosomas, ofreciendo la posibilidad de detectar el pH endosómico/lisosomal. Los estudios de imagen sobre células vivas permitieron ver la endocitosis y la exocitosis de los F-UiO y la acidificación endosómica en tiempo real. Las ventajas de la utilización de estos sistemas para la detección del pH_i en células vivas quedaron demostradas claramente en este estudio. Los nanoMOF a los que se les ha acoplado un sustrato fluorescente representan así una clase de nanosensores para detectar el pH_i y para investigar las interacciones de las células con los nanoMOF.

1.5.2. Otros biosensores

Wang y colaboradores⁹¹ desarrollaron un sensor colorimétrico basado en el MOF Fe-MIL-88A, que se construyó con hierro y ácido fumárico. Este MOF fue capaz de catalizar la oxidación de la 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) produciendo un cambio de color en disolución acuosa. Gracias a la introducción de una biomolécula objetivo y su correspondiente aptámero, la unión entre el objetivo/aptámero y el MOF inhibió el efecto catalítico del Fe-MIL-88A sobre el TMB, lo cual se utilizó para el diseño del sensor (**Figura 23**). Se demostró su respuesta sensible y selectiva en muestras complejas tales como suero humano mediante la detección de trombina, que presentó un rango de detección lineal de 0,8 nM a 80 nM. La determinación se pudo realizar con los ojos desnudos y sin necesidad de hacer medidas de absorbancia a partir de 10 nM. Este sistema presenta una nueva y prometedora herramienta de detección de biomoléculas basada en MOFs para el cuidado de la salud.

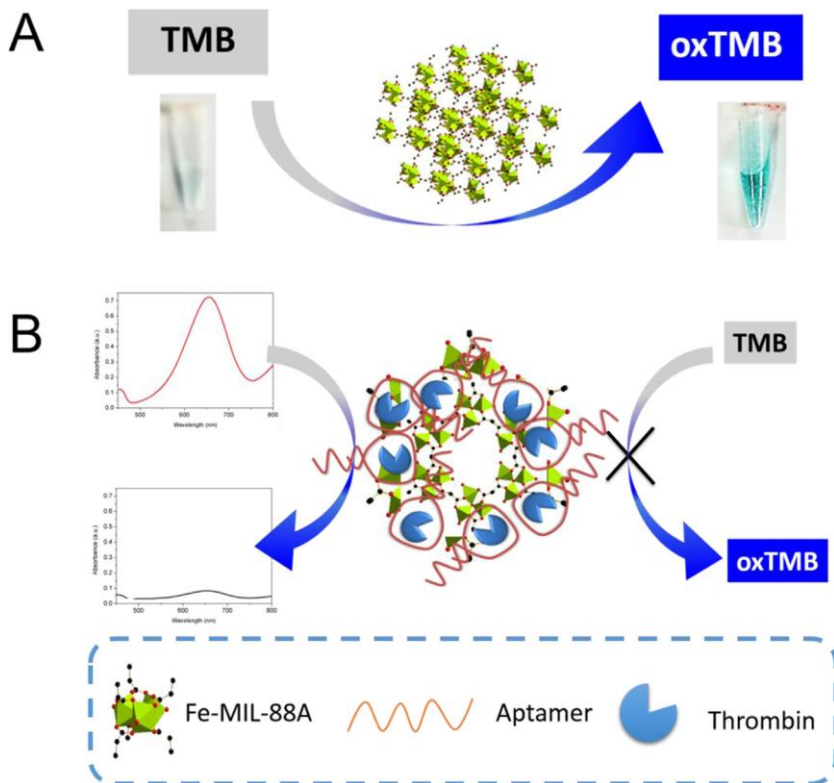


Figura 23. (A) Ilustración esquemática de la reacción colorimétrica catalítica que imita la peroxidasa del Fe-MIL-88A; (B) Representación esquemática del mecanismo de detección del MOF/aptámero para la detección colorimétrica de la trombina: después de la introducción de la mezcla de aptámeros y trombina que se envolvieron alrededor del Fe-MIL-88A, inhibiendo la oxidación y así desapareciendo el color azul.⁹¹

Con respecto al uso de redes organometálicas como biosensores destaca el azul de Prusia (PB) y sus análogos (PBAs). Se trata de una familia de compuestos tipo hexacianometalatos donde dos iones metálicos idénticos o diferentes están unidos por el ligando tipo ciano, lo que da a estos compuestos propiedades muy interesantes. Debido al hecho de que el PB y los PBA son estructuras sólidas formadas

por iones metálicos y ligandos orgánicos, pueden considerarse como los MOFs más antiguos. De hecho, el PB, cuya fórmula general incluye dos cationes de hierro de valencia diferentes en $\text{Fe}^{\text{III}}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, ha tenido un uso bien conocido en la industria de los pigmentos desde 1704.⁹² Estos compuestos son no tóxicos y han demostrado una gran cantidad de aplicaciones en el campo biomédico como agentes para terapia fototérmica,⁹³ agentes de contraste para RMI⁹⁴ y dispositivos de administración de fármacos,⁹⁵ entre otros. Además, la administración de fármacos y alimentos de los Estados Unidos (FDA) aprobó los tratamientos clínicos con nanopartículas de azul de Prusia comerciales llamadas Radiogardase™ de HEYL Chemisch-pharmazeutische Fabrik GmbH & Co. KG como tratamiento para la contaminación interna con cesio radiactivo y talio radiactivo o no radioactivo.⁹² Un ejemplo de una de sus aplicaciones en el campo de los biosensores la tenemos en la detección de glucosa, donde el azul de Prusia puede favorecer la acción de enzimas tales como la glucosa oxidasa que cataliza la oxidación de glucosa a peróxido de hidrógeno, permitiendo que estas trabajen a un menor potencial, esta propiedad electroquímica se puede emplear para el desarrollo de glucómetros como el presentado por Wang y colaboradores.⁹⁶ Ellos fabricaron un biosensor a base quitosano y azul de Prusia, la estrategia consistió en el depósito de una capa de azul de Prusia sobre el electrodo de trabajo y la introducción e inmovilización de las enzimas (glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glutamato oxidasa) a través de un film de quitosano, el cual posee una permeabilidad muy selectiva evitando la penetración de sustancias interferentes tales como ácido úrico y ácido ascórbico. Los resultados obtenidos a través del uso de

este biosensor se compararon con métodos espectrofotométricos encontrando que los resultados de ambas medidas estaban en un excelente acuerdo obteniendo un coeficiente de correlación mayor del 0,99 para las 100 muestras bajo estudio, los resultados también demostraron que este sistema podía detectar de manera eficiente glutamato y galactosa en muestras reales de suero humano. Estos resultados apoyan el uso de MOF para la detección de distintos tipos de analitos.

1.6 Desafíos pendientes y consideraciones futuras

Las redes organometálicas han demostrado ser un tipo de material muy útil en muchos campos de trabajo de la ciencia actual, tales como la catálisis, óptica, detección, aplicaciones energéticas y medioambientales. En cuanto al campo que nos ocupa, su posible implementación en la medicina futura, los MOFs, construidos con un diseño racional de su composición y características parecen funcionar bien a nivel de laboratorio casi para cualquier tipo de terapia conocida, así como para el diagnóstico de enfermedades, gracias a sus excelentes propiedades estructurales y composicionales. No obstante, al margen de la amplia gama de posibilidades sintéticas con las que contamos para el desarrollo de estas estructuras, su baja toxicidad, altos rendimientos, costes de producción económicos, posibilidad de escalado y su facilidad para adaptar a cualquier forma y tamaño, han hecho posible fabricarlos a gran escala, incluso algunos de estos MOFs ya se encuentran disponibles en algunas casas comerciales.⁹⁷ Lo cierto es que la exploración del terreno biomédico usando esta clase de materiales es muy reciente. A pesar de que algunos autores ya

han propuesto formulaciones farmacéuticas con ellos tales como parches transdérmicos⁹⁸ y de que incluso también se han publicado MOFs comestibles,⁹⁹ aún se debe hacer mucho trabajo para conseguir sistemas terapéuticos, agentes de diagnóstico, y sistemas combinados para terapia e imagen (teranósticos) eficientes con estas estructuras. Conseguir dispositivos que combinen las propiedades deseadas en el interior del material y su superficie y llevar a cabo estudios rigurosos y completos acerca de estabilidad de los MOFs en medio fisiológico, toxicología y grado de biocompatibilidad, así como el conocimiento completo de su comportamiento en las etapas de absorción, distribución, metabolismo y excreción, permitirá evaluar la viabilidad de los tratamientos con estas nuevas nanomedicinas.¹⁰⁰

En el capítulo 4, hemos desarrollado nuevos sistemas de liberación de fármacos basados en las estructuras de los nanoMOFs MIL-101(Fe) y MIL-100(Fe) modificados con grupos amino. Seleccionamos estos materiales debido a sus poros de grandes dimensiones, en el rango del mesoporo, haciendo factible la acomodación de la molécula de CPT dentro de las cavidades internas, hemos unido la CPT covalentemente a los materiales a través de ligandos específicos a los grupos amino. Los conjugados resultantes incorporaron lo que a nuestro conocimiento es la mayor cantidad de CPT publicada (casi el 20%) y mostraron una alta estabilidad a pH fisiológico. Además, debido a su carga positiva, los derivados del MIL-101(Fe) portadores de CPT presentaron una buena internalización celular en ensayos *in vitro*, y también un importante comportamiento de respuesta al pH ácido, el cual puede impulsar la liberación del fármaco tras la captación

celular en el estadio lisosomal, mejorando la seguridad de la liberación y liberación controlada de la CPT.¹⁰¹

En el capítulo 5, presentamos un enfoque novedoso para la síntesis de nanopartículas mesoporosas de óxido de Gd-Si con una alta densidad de átomos de Gd^{3+} con morfología controlada. Para este propósito, el análogo del azul de Prusia $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]$ se usó por primera vez como una plantilla de sacrificio en una reacción con silicato soluble. Al superponer la cinética de condensación de la sílice con la eliminación del $[Fe(CN)_6]^{3-}$, pudimos sintetizar partículas de un nanocompuesto tipo óxido/hidróxido con una forma y tamaño iguales que los cristales primigenios del MOF. Luego, la mesoporosidad se desarrolló mediante la incorporación de un agente tensioactivo bajo condiciones hidrotermales, dando un sólido poroso de doble morfología siendo estas nanocruces y nanobarras de gran área superficial.¹⁰² Luego empleamos este procedimiento de superposición de la cinética de condensación de la sílice con la eliminación del $[Fe(CN)_6]^{3-}$, para sintetizar partículas de un nanocompuesto de óxido de Gd y Si con la misma forma y tamaño que los cristalitos originales del $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]$. El material resultante presentó una morfología de nanobarras, con tamaño de partícula pequeño (75 nm de longitud promedio) mostrando buenos valores de relajatividad r_1 y r_2 dentro de un campo magnético de 3 teslas (T), mejorando el contraste positivo de imágenes de RMI *in vitro* e *in vivo*.⁷⁹

Finalmente, hemos llevado a cabo con éxito el recubrimiento de las nanopartículas de $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]$ mediante la polimerización del silicato a pH neutro. Para este fin, hemos optimizado una estrategia sintética biomimética desarrollada por nuestro grupo para activar la sílice a pH~7 mediante el uso

de análogos funcionales de la proteína silicateína α (la trietilamina, TEA) como catalizador. Mediante el control minucioso de la preparación del $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ y la hidrólisis y polimerización del silicato, hemos obtenido nanopartículas de un material híbrido $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]@\text{SiO}_2$, muy estable en fluidos biológicos, con tamaño y morfología controladas (de nanocruces y nanobarras). Mediante la combinación de centros magnéticos de Gd y Fe estrechamente empaquetados en la misma estructura cristalina, los átomos de Fe imponen un efecto magnético sinérgico sobre los átomos de Gd, lo que conduce a un fuerte aumento de la relajatividad longitudinal, manteniendo la alta relajatividad transversal correspondiente a los centros de Fe. Esto dio como resultado un agente de contraste con una relación atómica de Gd:Fe constante capaz de mejorar tanto el contraste positivo como el negativo en las imágenes de RM ponderadas en T_1 y T_2 , tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo*. Además, este material muestra baja citotoxicidad en estudios sobre cultivos celulares, no presenta anomalías estructurales o celulares en las secciones histológicas y el recubrimiento de sílice es fácil de funcionalizar con grupos orgánicos, mostrando un gran potencial para la RM clínica.¹⁰⁴

1.7 Referencias bibliográficas

1. Hoskins, B. & Robson, R. Infinite Polymeric Frameworks Consisting of Three Dimensionally Linked Rod-like Segments. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 5962–5964 (1989).
2. Yaghi, O. M. & Li, H. Hydrothermal Synthesis of a Metal-Organic Framework Containing Large Rectangular Channels. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 10401–10402 (1995).
3. James, S. L. Metal-organic frameworks. *Chem. Soc. Rev.* **32**, 276 (2003).
4. He, C., Liu, D. & Lin, W. Nanomedicine Applications of Hybrid Nanomaterials Built from Metal-Ligand Coordination Bonds: Nanoscale Metal-Organic Frameworks and Nanoscale Coordination Polymers. *Chem. Rev.* **115**, 11079–11108 (2015).
5. Janiak, C. Engineering coordination polymers towards applications. *Dalt. Trans.* 2781 (2003).
6. Furukawa, H., Cordova, K. E., O’Keeffe, M. & Yaghi, O. M. The Chemistry and Applications of Metal-Organic Frameworks. *Science (80)*. **341**, 1230444–1230444 (2013).
7. Robson, R. A net-based approach to coordination polymers. *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* 3735–3744 (2000).
8. Robson, R. Design and its limitations in the construction of bi- and poly-nuclear coordination complexes and coordination polymers (aka MOFs): a personal view. *Dalt. Trans.* 5113 (2008).
9. Jiang, J., Zhao, Y. & Yaghi, O. M. Covalent Chemistry beyond Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 3255–3265 (2016).
10. Della Rocca, J. & Lin, W. Nanoscale metal-organic frameworks: Magnetic resonance imaging contrast agents and beyond. *European Journal of Inorganic Chemistry* 3725–3734 (2010).
11. Horcajada, P., Serre, C., Vallet-Regí, M., Sebba, M., Taulelle, F., & Férey, G. Metal-organic frameworks as efficient materials for drug delivery. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **45**, 5974–5978 (2006).
12. Liu, J., Yang, Y., Zhu, W., Yi, X., Dong, Z., Xu, X., Chen, M., Yang, K., Lu, G., Jiang, L. & Liu, Z. Nanoscale metal-organic frameworks for combined photodynamic & radiation therapy in cancer treatment. *Biomaterials* **97**, 1–9 (2016).
13. He, C., Lu, J. & Lin, W. Hybrid nanoparticles for combination therapy of cancer. *J. Control. Release* **219**, 224–236 (2015).
14. Rieter, W. J., Taylor, K. M. L., An, H., Lin, W. & Lin, W.

- Nanoscale metal-organic frameworks as potential multimodal contrast enhancing agents. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 9024–9025 (2006).
15. Tian, C., Zhu, L., Lin, F. & Boyes, S. G. Poly(acrylic acid) Bridged Gadolinium Metal-Organic Framework-Gold Nanoparticle Composites as Contrast Agents for Computed Tomography and Magnetic Resonance Bimodal Imaging. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 17765–17775 (2015).
 16. Liu, D., Huxford, R. C. & Lin, W. Phosphorescent nanoscale coordination polymers as contrast agents for optical imaging. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **50**, 3696–3700 (2011).
 17. Liu, D., Lu, K., Poon, C. & Lin, W. Metal-organic frameworks as sensory materials and imaging agents. *Inorg. Chem.* **53**, 1916–1924 (2014).
 18. Dabrowiak, J. C. in *Metals in Medicine* 283–310 (John Wiley & Sons, Ltd., 2009).
 19. Greish, K. in *Methods in Molecular Biology, Cancer Nanotechnology* **624**, 163–175 (2010).
 20. Whitesides, G. M. The ‘right’ size in nanobiotechnology. *Nat. Biotechnol.* **21**, 1161–1165 (2003).
 21. Giménez-Marqués, M., Hidalgo, T., Serre, C. & Horcajada, P. Nanostructured metal-organic frameworks and their bio-related applications. *Coordination Chemistry Reviews* **307**, 342–360 (2015).
 22. Tamames-Tabar, C., García-Márquez, A., Blanco-Prieto, M. J., Serre, C. & Horcajada, P. in *Bio- and Bioinspired Nanomaterials* (eds. Ruiz-Molina, D., Novio, F. & Claudio, R.) 83–112 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., 2015).
 23. Zhu, Y. & Chen, F. Microwave-Assisted Preparation of Inorganic Nanostructures in Liquid Phase. *Chem. Rev.* **114**, 6462–6555 (2014).
 24. Vaucher, S., Li, M. & Mann, S. Synthesis of Prussian Blue Nanoparticles and Nanocrystals Superlattices in Reverse Microemulsions. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **39**, 1793–1796 (2000).
 25. Taylor, K. M. L., Jin, A. & Lin, W. Surfactant-Assisted Synthesis of Nanoscale Gadolinium Metal-Organic Frameworks for Potential Multimodal Imaging. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2**, 7722–7725 (2008).
 26. Rieter, W. J., Pott, K. M., Taylor, K. M. L. & Lin, W. Nanoscale Coordination Polymers for Platinum-Based Anticancer Drug

- Delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **3**, 11584–11585 (2008).
27. Taylor, K. M. L., Rieter, W. J. & Lin, W. Manganese-Based Nanoscale Metal-Organic Frameworks for Magnetic Resonance Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* 14358–14359 (2008).
 28. Rieter, W. J., Taylor, K. M. L. & Lin, W. Surface Modification and Functionalization of Nanoscale Metal-Organic Frameworks for Controlled Release and Luminescence Sensing. *J. Am. Chem. Soc.* **27599**, 9852–9853 (2007).
 29. Meyers, S. R. & Grinsta, M. W. Biocompatible and Bioactive Surface Modifications for Prolonged In Vivo Efficacy. *Chem. Rev.* 1615–1632 (2012).
 30. Nell, A. E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M. V., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V., & thompson, M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat. Publ. Gr.* **8**, 543–557 (2009).
 31. Sapsford, K. E., Algar, W. R., Berti, L., Gemmill, K. B., Casey, B. J., Oh, E., Stewart, M. H., & Medintz, I. L. Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries that Facilitate Nanotechnology. *Chem. Rev.* 1904–2074 (2013).
 32. Zou, H., Wu, S. & Shen, J. Polymer/Silica Nanocomposites: Preparation, Characterization, Properties, and. *Chem. Rev.* **108**, 3893–3957 (2008).
 33. Gref, R., Duchêne, D., Cnrs, U. M. R., Pharmacie, F. De & Paris-sud, U. Cyclodextrins as “ smart ” components of polymer nanoparticles. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **22**, 223–233 (2012).
 34. Bellido, E., Hidalgo, T., Lozano, M. V., Guillevic, M., Simón-Vázquez, R., Santander-Ortega, M. J., González-Fernández, Á., Serre, C., Alonso, M. J., & Horcajada, P. Heparin-Engineered Mesoporous Iron Metal-Organic Framework Nanoparticles: Toward Stealth Drug Nanocarriers. *Adv. Healthc. Mater.* **4**, 1246–1257 (2015).
 35. Rowe, M. D., Thamm, D. H., Kraft, S. L. & Boyes, S. G. Polymer-Modified Gadolinium Metal-Organic Framework Nanoparticles Used as Multifunctional Nanomedicines for the Targeted Imaging and Treatment of Cancer. *Biomacromolecules* **10**, 983–993 (2009).
 36. Gao, P. F., Zheng, L. L., Liang, L. J., Yang, X. X., Li, Y. F., & Huang, C. Z., A new type of pH-responsive coordination polymer sphere as a vehicle for targeted anticancer drug delivery and sustained release. *J. Mater. Chem. B* 3202–3208 (2013).
 37. Huxford, R. C., deKrafft, Kathryn, E., Boyle, W. S., Liu, D. &

- Lin, W. Lipid-coated nanoscale coordination polymers for targeted delivery of antifolates to cancer cells. *Chem. Sci.* 198–204 (2012).
38. Liu, D., Kramer, S. A., Huxford-Phillips, R. C., Wang, S., Della Rocca, J. & Lin, W. Coercing bisphosphonates to kill cancer cells with nanoscale coordination polymers. *Chem. Commun. (Camb)*. 2668–2670 (2012).
39. Huxford-phillips, R. C., Russell, S. R., Liu, D. & Lin, W. Lipid-coated nanoscale coordination polymers for targeted cisplatin delivery. *RSC Adv.* 14438–14443 (2013).
40. Novio, F., Lorenzo, J., Nador, F., Wnuk, K. & Ruiz-, D. Carboxyl Group (-CO₂H) Functionalized Coordination Polymer Nanoparticles as Efficient Platforms for Drug Delivery. *Chem. a Eur. J.* 15443–15450 (2014).
41. Taylor-Pashow, K. M. L., Rocca, J. Della, Xie, Z., Tran, S. & Lin, W. Postsynthetic Modifications of Iron-Carboxylate Nanoscale Metal-Organic Frameworks for Imaging and Drug Delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 14261–14263 (2009).
42. Agostoni, V., Horcajada, P., Noiray, M., Malanga, M., Aykaç, A., Jicsinszky, L., Vargas-Berenguel, A., Semiramoth, N., Daoud-Mahammed, S., Nicolas, V., Martineau, C., Taulelle, F., Vigneron, J., Etcheberry, A., Serre, C. & Gref, R. A “green” strategy to construct non-covalent, stable and bioactive coatings on porous MOF nanoparticles. *Sci. Rep.* 1–7 (2015).
43. Loftsson, T. & Duchêne, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.* **329**, 1–11 (2007).
44. Rowe, M. D., Chang, C.-C., Thamm, D. H., Kraft, S. L., Harmon, Jr., J. F., Vogt, A. P., Sumerlin, B. S., & Boyes, S. G. Tuning the Magnetic Resonance Imaging Properties of Positive Contrast Agent Nanoparticles by Surface Modification with RAFT Polymers. *Langmuir* **25**, 9487–9499 (2009).
45. Vega-Villa, K. R., Takemoto, J. K., Yáñez, J. A., Remsberg, C. M., Forrest, M. L., Davies, N. M. Clinical toxicities of nanocarrier systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 929–938 (2008).
46. Warheit, D. B. How Meaningful are the Results of Nanotoxicity Studies in the Absence of Adequate Material Characterization? *Toxicol. Sci.* **101**, 183–185 (2017).
47. Warheit, D. B., Sayes, C. M., Reed, K. L. & Swain, K. A. Health effects related to nanoparticle exposures: Environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks. *Pharmacol. Ther.* **120**, 35–42 (2008).
48. Lewinski, N., Colvin, V. & Drezek, R. Cytotoxicity of

- Nanoparticles. *Small* **4**, 26–49 (2008).
49. Rocca, J. Della, Liu, D. & Lin, W. Nanoscale Metal-Organic Frameworks for Biomedical Imaging and Drug Delivery. *Acc. Chem. Res.* **44**, 957–968 (2011).
 50. Tamames-Tabar, C., Cunha, D., Imbuluzqueta, E., Ragon, F., Serre, C., Blanco-Prieto, M. J., & Horcajada, P. frameworks. *J. Mater. Chem. B* 262–271 (2014).
 51. Ruyra, À., Yazdi, A., Espín, J., Carné-Sánchez, A., Roher, N., Lorenzo, J., Imaz, I. & MasPOCH, D. Synthesis, Culture Medium Stability, and In Vitro and In Vivo Zebrafish Embryo Toxicity of Metal–Organic Framework Nanoparticles. *Chem. a Eur. J.* **8**, 2508–2518 (2015).
 52. Horcajada, P., Chalati, T., Serre, C., Gillet, B., Sebrie, C., Baati, T., Eubank, J. F., Heurtaux, D., Clayette, P., Kreuz, C., Chang, J.-S., Hwang, Y. K., Marsaud, V., Bories, P.-N., Cynober, L., Gil, S., Férey, G., Couvreur, P. & Gref, R. Porous metal-organic-framework nanoscale carriers as a potential platform for drug delivery and imaging. *Nat. Mater.* **9**, 172–178 (2010).
 53. Horcajada, P., Gref, R., Baati, T., Allan, P. K., Maurin, G., Couvreur, P., Férey, G., Morris, R. E., & Christian Serre, C. Metal-Organic Frameworks in Biomedicine. *Chem. Rev.* **112**, 1232–1268 (2012).
 54. Baati, T., Njim, L., Neffati, F., Kerkeni, A., Bouttemi, M., Gref, R., Najjar, M. F., Zakhama, A., Couvreur, P., Serre, C. & Horcajada, P. In depth analysis of the in vivo toxicity of nanoparticles of porous iron(III) metal-organic frameworks. *Chem. Sci.* 1597–1607 (2013).
 55. Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhati, L., Pandey, S. Pandey, P., Bannerjee S. K., Drug delivery systems : An updated review. *Int. J. Pharm. Investig.* **2**, (2012).
 56. Huxford, R. C., Della Rocca, J. & Lin, W. Metal–organic frameworks as potential drug carriers. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14**, 262–268 (2010).
 57. Miller, S. R., Heurtaux, D., Baati, T., Horcajada, P., Grenècheb, J.-M. & Serre, C. Biodegradable therapeutic MOFs for the delivery of bioactive molecules. *Chem. Commun. (Camb)*. 4526–4528 (2010).
 58. Wang, Z. & Cohen, S. M. Postsynthetic modification of metal–organic frameworks. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 1315–1329 (2009).
 59. Cohen, S. M. Postsynthetic Methods for the Functionalization of Metal-Organic Frameworks. *Chem. Rev.* 970–1000 (2012).

60. Hintz, H. & Wuttke, S. Postsynthetic modification of an amino-tagged MOF using peptide coupling reagents: a comparative study. *Chem. Commun.* **50**, 11472–11475 (2014).
61. Liu, R., Yu, T., Shi, Z. & Wang, Z. The preparation of metal-organic frameworks and their biomedical application. *Int. J. Nanomedicine* 1187–1200 (2016).
62. Horcajada, P., Serre, C., Maurin, G., Ramsahye, N. A., Balas, F., Vallet-Regí, M., Sebban, M., Taulelle, F., & Férey G. Flexible Porous Metal-Organic Frameworks for a Controlled Drug Delivery. *J. Am. Chem. Soc.* 6774–6780 (2008).
63. An, J., Geib, S. J. & Rosi, N. L. Cation-Triggered Drug Release from a Porous Zinc-Adeninate Metal-Organic Framework. *J. Am. Chem. Soc.* 8376–8377 (2009).
64. Sun, C.-Y., Qin, C., Wang, X.-L. & Su, Z.-M. Metal-organic frameworks as potential drug delivery systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* **10**, 89–101 (2013).
65. Baeza, A., Ruiz-Molina, D. & Vallet-Regí, M. Recent advances in porous nanoparticles for drug delivery in antitumoral applications: inorganic nanoparticles and nanoscale metal-organic frameworks. *Expert Opin. Drug Deliv.* **5247**, 1–14 (2016).
66. Dabrowiak, J. C. in *Metals in Medicine* 73–107 (John Wiley & Sons, Ltd., 2009).
67. Mocniak, K. A., Kubajewska, I., Spillane, D. E. M., Williams, G. R. & Morris, R. E. Incorporation of cisplatin into the metal-organic frameworks UiO66-NH₂ and UiO66-encapsulation vs. conjugation. *RSC Adv.* **5**, 83648–83656 (2015).
68. Liu, D., Poon, C., Lu, K., He, C. & Lin, W. Self-assembled nanoscale coordination polymers with trigger release properties for effective anticancer therapy. *Nat. Commun.* **5**, 1–11 (2014).
69. Tan, L.-L., Li, H., Zhou, Y., Zhang, Y., Feng, X., Wang, B., & Yang, Y.-W. Zn²⁺-Triggered Drug Release from Biocompatible Zirconium MOFs Equipped with Supramolecular Gates. *Small* **11**, 3807–3813 (2015).
70. Gao, X., Hai, X., Baigude, H., Guan, W. & Liu, Z. Fabrication of functional hollow microspheres constructed from MOF shells: Promising drug delivery systems with high loading capacity and targeted transport. *Nat. Publ. Gr.* 1–10 (2016).
71. Botella, P. & Rivero-Buceta, E. Safe approaches for camptothecin delivery: Structural analogues and nanomedicines. *Journal of Controlled Release* **247**, 28–54 (2017).

-
72. Di Nunzio, M. R., Agostoni, V., Cohen, B., Gref, R. & Douhal, A. A “ Ship in a Bottle” Strategy To Load a Hydrophilic Anticancer Drug in Porous Metal Organic Framework Nanoparticles : Efficient Encapsulation , Matrix Stabilization , and Photodelivery. *J. Med. Chem.* 411–420 (2014).
73. Zheng, H., Zhang, Y., Liu, L., Wan, W., Guo, P., Nyström, A. M. & ZouZheng, X. One-pot Synthesis of Metal–Organic Frameworks with Encapsulated Target Molecules and Their Applications for Controlled Drug Delivery. *J. Am. Chem. Soc.* 962–968 (2016).
74. Lin, W., Hu, Q., Jiang, K., Yang, Y., Yang, Y., Cui, Y., Guodong & Qian, G. A porphyrin-based metal–organic framework as a pH-responsive drug carrier. *J. Solid State Chem.* **237**, 307–312 (2016).
75. Rojas, S., Carmona, F. J., Maldonado, C. R., Horcajada, P., Hidalgo, T., Serre, C., Navarro, J. A. R., & Barea E. Nanoscaled Zinc Pyrazolate Metal–Organic Frameworks as Drug-Delivery Systems. *Inorganic* 2650–2663 (2016).
76. McKinlay, A. C., Eubank, J. F., Wuttke, S., Xiao, B., Wheatley, P. S., Bazin, P., Lavalley, J.-C., Daturi, M., Vimont, A., De Weireld, G., Horcajada, P., Serre, C. & Morris, R. E. Nitric Oxide Adsorption and Delivery in Flexible MIL-88(Fe) Metal–Organic Frameworks. *Chem. Mater.* **88**, 1592–1599 (2013).
77. Lu, K., He, C. & Lin, W. A Chlorin-Based Nanoscale Metal–Organic Framework for Photodynamic Therapy of Colon Cancers. *J. Am. Chem. Soc.* 7600–7603 (2015).
78. He, C., Lu, K., Liu, D. & Lin, W. Nanoscale Metal–Organic Frameworks for the Co-delivery of Cisplatin and Pooled siRNAs to Enhance Therapeutic Efficacy in Drug-Resistant Ovarian Cancer Cells. *J. Am. Chem. Soc.* 5181–5184 (2014).
79. Cabrera-García, A., Vidal-Moya, A., Bernabeu, Á., Pacheco-Torres, J., Checa-Chavarria, E., Fernández, E. & Botella, P. Gd-Si Oxide Nanoparticles as Contrast Agents in Magnetic Resonance Imaging. *Nanomaterials* 1–15 (2016). doi:10.3390/nano6060109
80. Hatakeyama, W., Sanchez, T. J., Rowe, M. D., Serkova, N. J., Liberatore, M. W., & Boyes S. G. Synthesis of Gadolinium Nanoscale Metal–Organic Framework with Hydrotropes : Manipulation of Particle Size and Magnetic Resonance Imaging Capability. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 1502–1510 (2011).
81. Wang, D., Guo, Z., Zhou, J., Chen, J., Zhao, G., Chen, R., He, M., Liu, Z., Wang, H., & Chen Q. Novel Mn₃[Co(CN)₆]₂SiO₂@Ag Core–Shell Nanocube: Enhanced Two-Photon Fluorescence and Magnetic Resonance Dual-Modal Imaging-Guided Photothermal

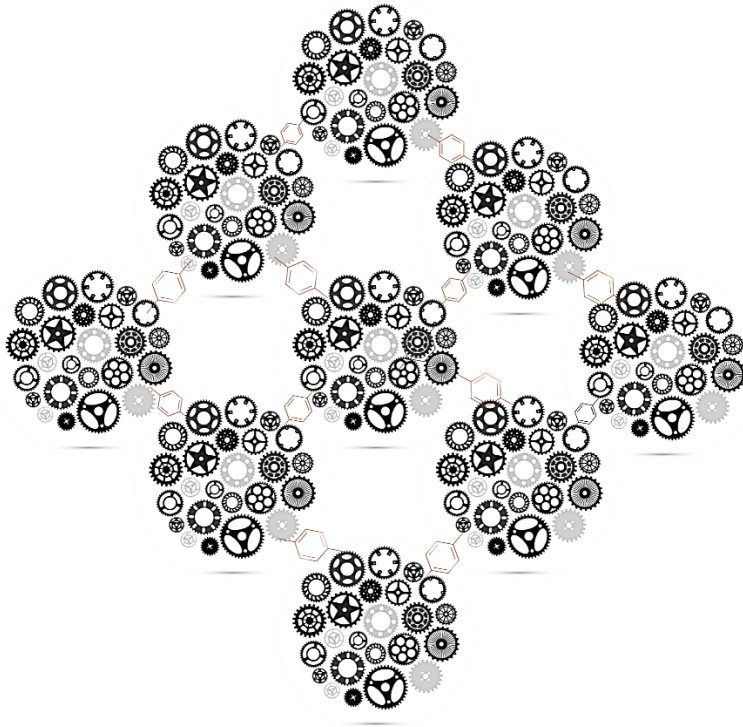
- and Chemo-therapy. *Small* **11**, 5956–5967 (2015).
82. Liu, D., He, C., Poon, C. & Lin, W. Theranostic nanoscale coordination polymers for magnetic resonance imaging and bisphosphonate delivery. *J. Mater. Chem. B* **2**, 8249–8255 (2014).
 83. Dekrafft, K. E., Xie, Z., Cao, G., Tran, S., Ma, L., Zhou, O. Z., & Lin, W. Iodinated nanoscale coordination polymers as potential contrast agents for computed tomography. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **48**, 9901–9904 (2009).
 84. Gao, X., Zhai, M., Guan, W., Liu, J., Liu, Z., & Damirin, A. Controllable synthesis of a smart multifunctional nanoscale metal-organic framework for magnetic resonance/optical imaging and targeted drug delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 3455–3462 (2017).
 85. Farha, O. K., Yazaydın, A., Ö., Eryazici, I., Malliakas, C. D., Hauser, B. G., Kanatzidis, M. G., Nguyen, S. T., Snurr, R. Q., & Hupp, J. T. De novo synthesis of a metal-organic framework material featuring ultrahigh surface area and gas storage capacities. *Nat. Chem.* **2**, 944–948 (2010).
 86. Park, J., Feng, D. & Zhou, H. C. Structure-assisted functional anchor implantation in robust metal-organic frameworks with ultralarge pores. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 1663–1672 (2015).
 87. Pettinari, C., Marchetti, F., Mosca, N., Tosi, G. & Drozdov, A. Application of metal-organic frameworks. *Polym. Int.* **66**, 731–744 (2017).
 88. Salazar, P., Martin, M., O’Neil, R. D., Lorenzo-Luis, P., Roche, R., & González-Mora, J. L. in *Advanced Biomaterials and Biodevices* (eds. Tiwari, A. & Nordin, A. N.) 423–450 (Scrivener Publishing LLC, Wiley, 2014).
 89. Harbuzaru, B. V. Corma, A., Rey, F., Jordá, J. L., Ananias, D., Carlos, L. D., & João Rocha, J. A miniaturized linear pH sensor based on a highly photoluminescent self-assembled Europium(III) metal-organic framework. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **48**, 6476–6479 (2009).
 90. He, C., Lu, K. & Lin, W. Nanoscale metal-organic frameworks for real-time intracellular pH sensing in live cells. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 12253–12256 (2014).
 91. Wang, Y. Zhu, Y., Binyam, A., Liu, M., Wu, Y., Li, F. Discovering the enzyme mimetic activity of metal-organic framework (MOF) for label-free and colorimetric sensing of biomolecules. *Biosens. Bioelectron.* **86**, 432–438 (2016).
 92. Huang, S. D., Basu, S., Khitrin, A. K., Shokouhimehr, M. &

- Soehnlén, E. S. Materials and methods for MRI contrast agents and drug delivery. (2011).
93. Fu, G., Liu, W., Feng, S. & Yue, X. Prussian blue nanoparticles operate as a new generation of photothermal ablation agents for cancer therapy. *Chem. Commun.* **48**, 11567 (2012).
 94. Guari, Y., Larionova, J., Corti, M., Lascialfari, A. Marinone, M., Poletti, G., Molvinger, K., f & Guérin C. Cyano-bridged coordination polymer nanoparticles with high nuclear relaxivity: toward new contrast agents for MRI. *Dalton Trans.* 3658–3660 (2008).
 95. Roy, X., Hui, J. K. H., Rabnawaz, M., Liu, G. & MacLachlan, M. J. Prussian blue nanocontainers: Selectively permeable hollow metal-organic capsules from block ionomer emulsion-induced assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 8420–8423 (2011).
 96. Wang, Y., Zhu, J., Zhu, R., Zhu, Z., Lai, Z. & Chen Z. Chitosan/Prussian blue-based biosensors. *Meas. Sci. Technol.* **14**, 831–836 (2003).
 97. Férey, G. Structural flexibility in crystallized matter: from history to applications. *Dalton Trans.* **45**, 4073–4089 (2016).
 98. Márquez, A. G., Hidalgo, T., Lana, H., Cunha, D., Blanco-Prieto, M. J., Álvarez-Lorenzo, C., Boissière, C., Sánchez, C., Serre, C. & Horcajada, P. Biocompatible polymer–metal–organic framework composite patches for cutaneous administration of cosmetic molecules. *J. Mater. Chem. B* **4**, 7031–7040 (2016).
 99. Smaldone, R. A., Forgan, R. S., Furukawa, H., Gassensmith, J. J., Slawin, A. M. Z., Yaghi, O. M., & Stoddart, J. F. Metalorganic frameworks from edible natural products. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **49**, 8630–8634 (2010).
 100. McKinlay, A. C., Morris, R. E., Horcajada, P., Férey, G., Gref, R., Couvreur, P. & Serre, C. BioMOFs: Metal-organic frameworks for biological and medical applications. *Angewandte Chemie-International Edition* **49**, 6260–6266 (2010).
 101. Cabrera-García, A., Checa-Chavarria, E., Rivero-Buceta, E., Moreno, V., Fernández, E. & Botella, P. Amino modified metal-organic frameworks MIL-100(Fe) and MIL-101(Fe) as pH-responsive nanoplatforms for safety delivery of camptothecin. *J. Colloid Sci. Interfaces* **Aceptado**, (2019).
 102. Cabrera-García, A. Vidal-Moya, A., Bernabeu, Á., Sánchez-González, J., Fernández, E. & Botella P. Gd–Si oxide mesoporous nanoparticles with pre-formed morphology prepared from a Prussian blue analogue template. *Dalton Trans.* **44**, 14034–41 (2015).

103. Cabrera-García, A. Checa-Chavarria, E., Pacheco-Torres, J., Bernabeu-Sanz, Á., Vidal-Moya, A., Rivero-Buceta, E., Sastre, G., Fernández, E. & Botella, P. Engineered Contrast Agents in a Single Structure for T_1 - T_2 Dual Magnetic Resonance Imaging. *Nanoscale* **10**, 6349-6360 (2018).

Capítulo II.

Objetivos



2. Objetivos

Como se ha comentado en la introducción, los nanomateriales ofrecen unas características muy particulares las cuales nos permiten su uso en diversas áreas de la biomedicina. Aquí, nosotros hemos querido aprovechar las características estructurales de las nano redes organometálicas para el diseño y preparación de nuevos agentes de contraste para resonancia magnética de imagen más eficientes que los que se utilizan actualmente en la práctica clínica evitando los efectos adversos que estos últimos presentan. Por otro lado, la lucha contra el cáncer es un objetivo primordial en la sociedad actual, por esta razón también pretendemos mejorar la actual quimioterapia utilizando estos contenedores sólidos como parte de un diseño racional de nuevos portadores de fármacos, los cuales se valgan del efecto EPR para el tratamiento selectivo y seguro de tumores sin la aparición de efectos secundarios.

En este sentido, el objetivo general de la presente tesis doctoral es el estudio y evaluación del potencial de las redes organometálicas como componente estructural de vehículos destinados a aplicaciones biomédicas, concretamente a la difusión intracelular de fármacos y a la mejora de la resolución de la imagen clínica.

A partir de este objetivo general se desglosan los siguientes objetivos específicos:

1. Desarrollo de nuevos materiales nanoestructurados basados en redes organometálicas de Fe^{3+} para la difusión intracelular de fármacos antitumorales.

2. Desarrollo de nuevos materiales nanoestructurados utilizando redes organometálicas como *plantillas* para la obtención de un nuevo agente de contraste de Gd^{3+} para mejorar la imagen por resonancia magnética en secuencia T_1 .

3. Desarrollo de nuevos materiales nanoestructurados basados en redes organometálicas de Fe^{3+} y Gd^{3+} para la obtención de un nuevo agente de contraste dual que mejore la imagen por resonancia magnética en secuencias T_1 y T_2 .

Para la obtención de los nanoMOFs se llevarán a cabo diversos procedimientos de síntesis. En ocasiones, para la obtención de un sistema biocompatible, será necesario proteger las partículas del nanoMOF con una cubierta inerte y funcionalizable, pudiendo tratarse de un recubrimiento de sílice amorfa o de una cubierta polimérica orgánica como un polietilenglicol.

Los nuevos materiales preparados requerirán un profundo estudio de sus propiedades y cómo éstas se verán modificadas. La caracterización de los nanoMOFs se llevará a cabo mediante técnicas espectroscópicas (PXRD, UV-Vis, FTIR, y RMI), análisis de la estabilidad y distribución hidrodinámica de las partículas (DLS), microscopía electrónica (TEM-STEM, FESEM, EDX), análisis químico (ICP, análisis elemental de C, H, N) y termogravimétrico (TGA, DTA, DTG), entre otras. Asimismo, se llevarán a cabo los ensayos para la determinación de los tiempos de relajación T_1 y T_2 .

Para la incorporación de agentes terapéuticos se seguirán dos tipos de estrategias: post-sintéticas (a) la molécula del fármaco se adsorbe dentro del material poroso estabilizándose dentro del material por interacciones electrostáticas o (b) la molécula

farmacológica, se modifica químicamente para favorecer la unión covalente a la estructura organometálica. La eficacia terapéutica de las nuevas nanomedicinas será determinada en ensayos preclínicos, evaluando el proceso de tránsito intracelular, determinando el grado de internalización celular alcanzado, y comparando la actividad citotóxica con la del fármaco libre.

En el caso de los nuevos agentes de contraste en la determinación de sus valores de relajatividad y su capacidad para aumentar el contraste positivo y/o negativo en imágenes de resonancia magnética. De la misma forma, se ha de evaluar la estabilidad de los vehículos preparados en medio de cultivo, para estimar la seguridad del tratamiento con estos nanomateriales. En estos ensayos de laboratorio, se harán ensayos *in vitro* con el fin de evaluar su viabilidad celular, es decir, se comprobará la ausencia de toxicidad de los agentes portadores de nuestros fármacos y agentes de contraste en células vivas.

En función de los resultados obtenidos en el apartado anterior, se seleccionarán los materiales nanoMOF más eficientes, para su estudio sobre animales de experimentación. Con los agentes de contraste estudiaremos la mejora producida sobre las imágenes de resonancia magnética al emplear nanoMOFs en su adquisición. Este estudio se llevará a cabo *in vivo* sobre los principales órganos del sistema retículoendotelial (SRE) y se analizará la resolución de las imágenes obtenidas, comparándolas con las producidas usando agentes de contraste comerciales (Magnevist®), con el fin de evaluar la mejora que podemos aportar al contraste usando estos nanomateriales.

Capítulo III.

Materiales y Métodos



3. Materiales y métodos

3.1 Reactivos y disolventes y abreviaturas

Todos los reactivos químicos usados en la parte experimental de esta tesis doctoral mostraban grado de pureza de síntesis o superior. La calidad de los disolventes era la misma o de HPLC, procedentes de la empresa Scharlab, salvo que se indique lo contrario. Todos ellos se listan en la Tabla 1 a continuación, indicando el proveedor comercial y el acrónimo correspondiente con el que nos referiremos a ellos con posterioridad.

Tabla 1. Reactivos químicos

Reactivo	Proveedor	Acrónimo
Ferricianuro potásico	Sigma-Aldrich	
Bromuro de tetraetilamonio	Sigma-Aldrich	
Nitrato de gadolinio hexahidratado	ABCR	
Ácido acético	Sigma-Aldrich	
3-Cianopropiltriclorosilano	Sigma-Aldrich	CPTCS
Silicato sódico	Sigma-Aldrich	
3-aminopropiltriethoxisilano	Sigma-Aldrich	APTES
Diisopropilamina	Sigma-Aldrich	DIPA
Diisopropil etilamina	Sigma-Aldrich	DIPEA
Éster succinimidílico del ácido 2,5,8,11-tetraoxatetradecan-14-oico	Iris Biotech	PEG ₃
Bromuro de hexadeciltrimetilamonio	Sigma-Aldrich	CTAB
Cianopropiltrimetoxisilano	Sigma-Aldrich	CPTMS
Tetrametil ortosilicato	Merk	TMOS
Trietilamina	Sigma-Aldrich	TEA
Ácido 2-aminotereftálico	Sigma-Aldrich	BDC-NH ₂
Ácido tereftálico	Sigma-Aldrich	BDC
Dimetilformamida	Acros Organics	DMF
Cloruro férrico hexahidratado	Sigma-Aldrich	
Acetato potásico	Fluorochem	

Tribromobenceno	Fluorochem	
Bis(pinacolato)diboro	Fluorochem	
Cloruro de 1,1'- Bis(difenilfosfino)ferrocenopaladio (II)	Fluorochem	(Pddppf)Cl ₂
4-bromo-2-aminobenzoato de metilo	Fluorochem	
1,4-Dioxano	Sigma-Aldrich	
Fluoruro de Cesio	Fluorochem	
Cloruro amónico	Sigma-Aldrich	
Sulfato sódico anhidro	Sigma-Aldrich	
Hidróxido sódico	Sigma-Aldrich	
Ácido clorhídrico	Sigma-Aldrich	
Ácido Fluorhídrico	Sigma-Aldrich	
Ácido 4-(terc-butoxi)-4-oxobutanoico	Fluorochem	
Dimetilaminopiridina	Sigma-Aldrich	DMAP
Diisopropilcarbodiimida	Sigma-Aldrich	DIC
Camptotecina	Carbosynth	CPT
Ácido trifluoroacético	Sigma-Aldrich	TFA
Ácido 5-hexinóico	Fluorochem	5HA
Clorhidrato de <i>N</i> -(3- dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida	Sigma-Aldrich	EDC
Nitrito de terc-butilo	Sigma-Aldrich	tBuONO
Azidotrimetilsilano	Sigma-Aldrich	TMSN ₃
Hexafluorofosfato de tetrakis(acetonitrilo)cobre (I)	Sigma-Aldrich	Cu(CH ₃ CN) ₄ PF ₆
Disolución salina de fosfato	Sigma-Aldrich	PBS, 1x
Glucosa	Sigma-Aldrich	
Ácido tricloroacético	Sigma-Aldrich	TCA
Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)- 2,5-difenil-2H-tetrazolio	Sigma-Aldrich	MTT
Medio de Cultivo DMEM	Lonza	
Medio de Cultivo MEM	Lonza	
Rodamina B	Sigma-Aldrich	RhB
DRAQ 5™	Invitrogen	
Lysotracker Green	Invitrogen	

Agua mQ (El agua se desionizó hasta $18.2 \text{ m}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ usando un sistema miliQ pack Academic equipado con un cartucho Quantum Ex de Millipore).

3.1.2 Líneas celulares

Las células HeLa y Neuroblastoma SH-SY5Y se obtuvieron de American Type Culture Collection (Rockville, MD), se mantuvieron en MEM (Earle's), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) and DMEM + F12 respectivamente, se suplementaron con un 10% de suero bovino fetal (FBS, de Lonza, Verviers, Bélgica) y Penicilina/estreptomicina (1%) a 37 °C bajo atmósfera humidificada de 95% aire y un 5–10% CO₂.

3.1.3 Animales de laboratorio

Para los ensayos de resonancia magnética de imagen *in vivo* se usaron ratas Sprague-Dawley macho (250-300 g) de Janvier Labs (Francia) y se mantuvieron bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h (se encendieron en el intervalo 07:00-19:00 h) a temperatura ambiente ($22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), con acceso libre a comida y agua. Las ratas se alojaron en grupo y se adaptaron a estas condiciones durante al menos 1 semana antes de la manipulación experimental. Todos los experimentos fueron aprobados por las autoridades locales (Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Miguel Hernández) y se realizaron de acuerdo con la legislación española (ley 32/2007) y europea (directiva de la UE 86/609, decreto de la UE 2001-486).

3.2 Técnicas instrumentales de caracterización

3.2.1 Adsorción de gases

La determinación del área superficial de un sólido es una manera habitual para la estimación de pequeñas moléculas que en él se pueden introducir bien por funcionalización directa de la superficie, o bien por retención en el interior de sus poros. Esta determinación se puede llevar a cabo interpretando las isotermas de adsorción mediante la teoría de Brunauer, Emmett y Teller,¹ conocida como teoría BET. Los procedimientos experimentales y cálculos se han llevado a cabo usando adsorción de nitrógeno a 77 K. De esta manera podremos determinar el área superficial de adsorción de nuestros sólidos, estimar el calor de adsorción y el diámetro y volumen de poro. También, se pueden relacionar el número de moles adsorbidos cuando el adsorbente está cubierto con una monocapa (n_m) con el área superficial específica (A) de acuerdo con la expresión

$$A = n_m N_0 \sigma^\circ$$

Donde σ° es el área por molécula en una monocapa llena y N_0 es el número de Avogadro $6.022 \cdot 10^{23}$.² En la **Figura 3.1** se muestra un esquema de estos sistemas de medida. En esta tesis hemos usado un Micromeritics Flowsorb, para estas determinaciones.

3.2.2 Análisis elemental

Distintas casas comerciales fabrican instrumentos automáticos para analizar algunos de los elementos más comunes en

compuestos orgánicos, tales como carbono, hidrógeno, oxígeno, azufre y nitrógeno.

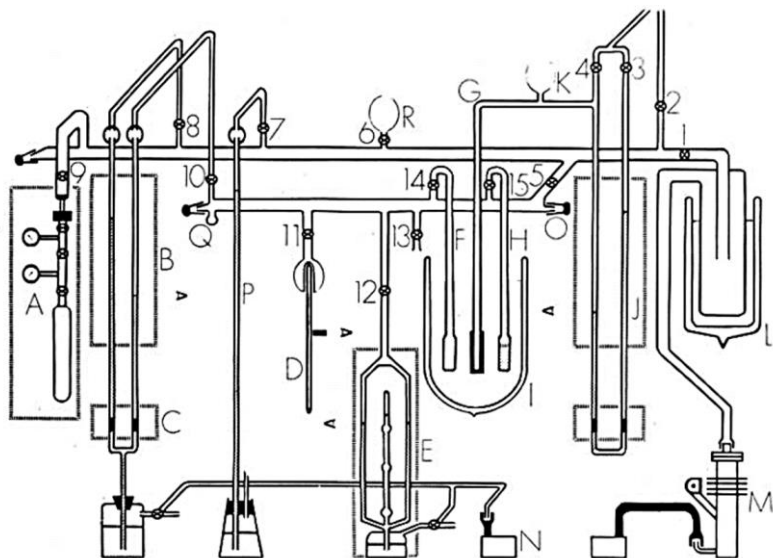


Figura 3.1. Esquema de un sistema de adsorción de alto vacío.²

El análisis elemental (AE) se basa en la oxidación a elevadas temperaturas de los compuestos orgánicos, que convierten a los elementos de interés en moléculas gaseosas. En algunos equipos los gases se separan en una columna cromatográfica; en otros, las separaciones se basan en absorbentes específicos. En la mayoría de los instrumentos, las determinaciones se completan mediante una detección por conductividad térmica. A menudo estos equipos poseen dispositivos que introducen de forma automática las muestras, ya pesadas, en el área de combustión.³ El equipo utilizado es un analizador de C, H, N y S, EA 1108 Series de la casa comercial FISIONS. Equipado con un Automuestreador automático, y una Microbalanza Mettler Toledo.

3.2.3 Análisis termogravimétrico

La Termogravimetría (TG), registra continuamente la masa de la muestra, colocada en una atmósfera controlada, en función de la temperatura o del tiempo al ir aumentando la temperatura de la muestra (normalmente de forma lineal con el tiempo). La representación de la masa o del porcentaje de masa en función del tiempo se denomina *termograma* o *curva de descomposición térmica*.^{4,5} En la **Figura 3.2** se muestra un diagrama de bloques de un sistema de análisis termogravimétrico acoplado con un bloque de determinaciones para Calorimetría diferencial de barrido (DTG) y análisis térmico diferencial (DTA), que son sistemas muy comunes en los laboratorios actuales. Para ello contamos con una Balanza termogravimétrica (TG) Mettler Toledo TGA/SDTA851e usando una rampa de calentamiento de 5°C/min en el intervalo desde 25 °C hasta 800 °C con aire como gas portador.

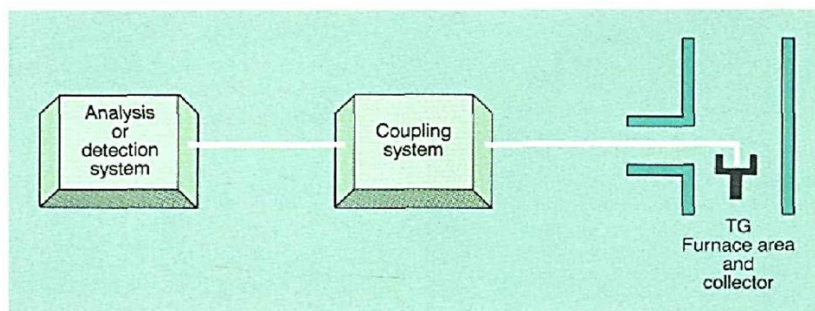


Figura 3.2. Sistema de medida TG, DTG y DTA.⁴

3.2.4 Espectrometría de masas

Esta técnica es capaz de proporcionar información acerca de: (1) la composición elemental de las muestras, (2) la estructura

de las moléculas inorgánicas, orgánicas y biológicas; (3) la composición de mezclas complejas; (4) la estructura y composición de superficies sólidas; y (5) las relaciones isotópicas de átomos en las muestras.^{3,5} Los espectros de masas, tanto de baja (EM) como de alta resolución (EMAR), se realizaron bien mediante la técnica de inyección indirecta previa separación en HPLC o UPLC empleando el espectrómetro Agilent 1100 Series LC/MSD, o mediante ionización por electroespray en un espectrómetro Waters ACQUITY™ XevoQToF spectrometer (Waters Corp.).

3.2.5 Difracción de rayos X en polvo

Al igual que con los otros tipos de radiación electromagnética, la interacción entre el vector eléctrico de la radiación X y los electrones de la materia que atraviesa da lugar a una dispersión. Cuando los rayos X son dispersados por el entorno ordenado de un cristal, tienen lugar interferencias (tanto constructivas como destructivas) entre los rayos dispersados, ya que las distancias entre los centros de dispersión son del mismo orden de magnitud que la longitud de onda de radiación, dando como resultado un diagrama de interferencias que se puede utilizar para determinar la distancia entre los átomos del cristal. Las direcciones de difracción de los rayos X están determinadas por la ley de Bragg y dependen del aspecto de la estructura cristalina y el tamaño de la celda unidad del cristal, esto se representa en la **Figura 3.3**. El conocimiento de las posiciones atómicas en el interior de un cristal (lo que denominamos la estructura cristalina), es consecuencia de la resolución de lo que se conoce con el nombre de la “función de densidad electrónica”, una magnitud periódica, como el contenido de los cristales, definida en cada punto del interior

de estos sólidos y cuyos máximos corresponden a los centros atómicos.⁶ Las medidas de difracción de rayos X en polvo (DRXP) se realizaron en un difractómetro Philips X'Pert equipado con un monocromador de grafito, operando a 40 kV y 45 mA usando la radiación K α del Cu filtrada por níquel ($\lambda = 0.1542$ nm).

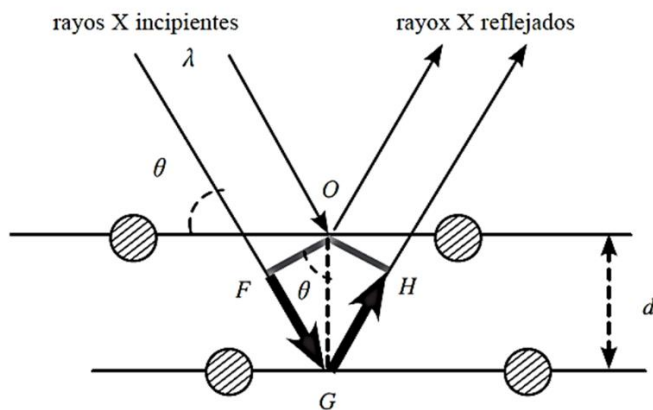


Figura 3.3. Ley de Bragg: $2 d \sin \theta = n \lambda$ donde n es un número entero.⁶

3.2.6 Espectrometría infrarroja

Las aplicaciones de la espectrometría en el infrarrojo (IR) se dividen en tres grandes categorías según las tres regiones espectrales. La región más utilizada es, con mucha diferencia, la región del infrarrojo medio que se extiende entre aproximadamente 670 y 4000 cm^{-1} ($2,5$ y $14,9$ μm). En esta región para los análisis cualitativos y cuantitativos, se emplean los espectros de absorción, reflexión y emisión. La región del infrarrojo cercano (4000 y 14000 cm^{-1}) y del IR lejano son menos utilizadas. La primera se usa para la determinación cuantitativa de rutina de ciertas especies, como el agua,

dióxido de carbono, azufre, nitrógeno amínico, hidrocarburos de bajo peso molecular, etc. La segunda se usa para la determinación de estructuras de especies inorgánicas y organometálicas.^{3,5} Los espectros se registraron en un espectrómetro Nicolet 205xB operando a temperatura ambiente en el rango 400-4000 cm^{-1} y resolución espectral de 1 cm^{-1} .

3.2.7 Espectroscopía electrónica

La energía electrónica de un sistema químico puede cambiar como consecuencia de la absorción o emisión de un fotón de frecuencia adecuada. Las transiciones entre los estados electrónicos de átomos y moléculas dan lugar a los espectros electrónicos. Aunque puede haber transiciones tanto de los electrones de valencia como de los electrones internos, en la práctica interesan las transiciones de los primeros entre el estado electrónico fundamental y los estados electrónicos excitados de más baja energía, en los que las energías puestas en juego son del orden de 10^5 cm^{-1} . En consecuencia, la zona espectral asociada a estas transiciones es la visible-ultravioleta (UV-Vis).

A diferencia de los espectros de vibración y rotación, los espectros electrónicos son propios tanto de sistemas atómicos como moleculares, ya que ambos poseen estados electrónicos, mientras que solo los sistemas moleculares tienen grados de libertad rotacionales y vibracionales.

La importancia específica de los espectros electrónicos radica en la información que proporcionan, no solo sobre la estructura electrónica de átomos y moléculas, sino también sobre la geometría y estructura vibracional y rotacional de moléculas en estados electrónicos excitados, que no puede

obtenerse por otras técnicas.⁷ El instrumento utilizado para realizar estas medidas fue un espectrofotómetro UV-vis CARY 5.

3.2.8 Espectroscopía de resonancia de espín nuclear o resonancia magnética nuclear

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) se basa en la medida de la absorción de la radiación electromagnética en la región de las radiofrecuencias aproximadamente de 4 a 900 MHz. En contraste con la absorción ultravioleta, visible e infrarroja, en el proceso de absorción están implicados los núcleos de los átomos en lugar de los electrones exteriores. Es necesario colocar el analito en un intenso campo magnético, ya que los núcleos en un campo magnético intenso absorben radiación electromagnética, como consecuencia del desdoblamiento de niveles de energía inducido por el campo magnético. En los cinco primeros años que siguieron al descubrimiento de la RMN, los químicos se dieron cuenta de que el entorno molecular influía en la absorción de la radiación de radiofrecuencias (RF) por un núcleo en un campo magnético, y que este efecto se podía correlacionar con la estructura molecular.

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear es una de las técnicas más potentes de las que dispone el químico y el bioquímico para la elucidación de estructuras de las especies químicas. La técnica es también útil para la determinación cuantitativa de las especies absorbentes.

Aunque existen dos tipos generales de espectrómetros de RMN, de onda continua (CW) y de impulsos, o de transformada de Fourier (FT/RMN), en la actualidad son los segundos los que

dominan en el mercado. El equipo de RMN utilizado en nuestro trabajo experimental han sido un espectrómetro de alta resolución en fase líquida Bruker Avance 300, (300 MHz para ^1H y 75 MHz para ^{13}C) el equipo está equipado con gradientes de campo magnético en el eje z. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ) calibrados desde la referencia interna TMS (Me_4Si) y el pico residual de protón del disolvente deuterado utilizado; las constantes de acoplamiento se miden en hertzios (Hz).³

3.2.9 Dispersión de la luz dinámica y potencial ζ

La dispersión de luz dinámica (DLS) es una de las técnicas experimentales más populares en la caracterización de suspensiones coloidales. El DLS proporciona una medida de la escala de tiempo para las fluctuaciones en el índice de refracción de un fluido complejo, y es prueba de las fluctuaciones en la escala de longitud de la inversa del vector de dispersión, q^{-1} . En el caso de la intensidad de las fluctuaciones de las partículas coloidales son predominantemente causados por el movimiento difusivo de las partículas. Basado de la correlación entre el coeficiente de difusión y tamaño de partícula. El DLS se utiliza como un método muy conveniente y no destructivo para determinar el tamaño de partículas. La técnica es adecuada para la caracterización de partículas coloidales en un amplio intervalo de tamaños, desde unos pocos nanómetros a varios micrómetros. Por otra parte, el DLS también nos permite seguir procesos tales como la agregación y gelificación.⁸

El potencial ζ , se define como la caída de potencial a través de la parte móvil de la doble capa, que es responsable de los

fenómenos electrocinéticos. ζ es positiva si el potencial aumenta desde el seno de la fase líquida hacia la interfase. En el cálculo del potencial electrocinético a menudo se asume que el líquido adherido a la pared sólida y el líquido móvil están separados por un plano estrecho y bien definido.⁹ Para determinar estos parámetros se usó un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK).

3.2.10 Microscopía electrónica de transmisión

En el desarrollo del trabajo experimental aquí redactado se ha usado la microscopía electrónica convencional (TEM) a 100 kV y la de alta resolución (HRTEM) a 200 kV o en el modo de barrido (STEM), para el estudio del tamaño y morfología de los materiales. En el trabajo llevado a cabo a 100 kV, donde la longitud de onda de los electrones es 0.037 Å y los factores de dispersión de los electrones son alrededor de mil veces mayor que para los rayos X presentan dos importantes ventajas. Los efectos de difracción son procedentes de muy pequeñas regiones de un cristal en muy corto periodo de tiempo. Se pueden tener exposiciones de los electrones de aproximadamente 10^4 celdas unidad en unos pocos segundos, mientras pueden ser necesarias varias horas de dispersión a partir de 10^{18} celdas unitarias empleando rayos X. Por otro lado, la difracción de electrones y análisis de imágenes es difícil debido a la dispersión múltiple de los electrones en espesores de unos pocos nanómetros.

En HRTEM toda la región del cristal a ser examinado está bañado por un haz fijo de electrones que son observados ya sea en la difracción de un área seleccionada o reflejado por medio de un sistema de lentes magnético adecuado. En STEM un haz

electrónico enfocado barre la región de interés por medio de un tipo de barrido con patrón horizontal de televisión. El haz de electrones transmitidos, electrones retrodispersados, o rayos X emitidos a continuación, pueden monitorizarse para dar información sobre la composición y estructura de regiones espaciales tan pequeñas como unos pocos Å³.

La resolución de punto a punto actualmente disponible es ya superior a aproximadamente 3 Å para 100 kV, 2.5 Å para 200 kV y 2 o mejor para equipos de 1 MV.¹⁰ En nuestro caso hemos usado, un microscopio HRTEM JEOL JEM 2100F trabajando a 200 kV, que nos permitió hacer análisis composicional mediante espectroscopía de dispersión de rayos X (EDS) usando el software INCA Energy TEM 250 de Oxford Instruments y un detector SDD X-MAX 80. Y un microscopio TEM para caracterización de rutina Philips CM-10 operando a 100 kV.

3.2.11 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es, como su nombre indica, un microscopio, y como tal se utiliza para ampliar los detalles de un objeto particular. El SEM ha sido ampliamente, pero no exclusivamente, utilizado para el estudio de las superficies de materiales sólidos. Los componentes básicos de un SEM son los mismos que en los microscopios de transmisión convencionales. Hay una fuente de electrones y lentes electromagnéticas utilizadas para condensar y enfocar el haz de electrones (**Figura 3.4**). En SEM, sin embargo, este rayo se desvía por las bobinas electromagnéticas y las exploraciones a través de la superficie de la muestra se realizan en un

movimiento de tipo lineal. Este haz actúa como una sonda de electrones de alta energía incidente o haz de electrones primario. Mientras que en microscopía óptica y en TEM la información obtenida está directamente relacionada con el efecto de la muestra sobre la radiación respectiva, en el SEM la fuente de información se encuentra en las señales producidas por la interacción del haz de electrones con el espécimen. Las señales tales como los electrones secundarios, fotones, y los rayos X, son producidos por un proceso de ionización por impacto. Los átomos de la muestra se ionizan por la energía transferida de los electrones incidentes de alta energía. Los electrones expulsados pueden tener energía suficiente para causar la liberación de otros electrones desde el huésped.

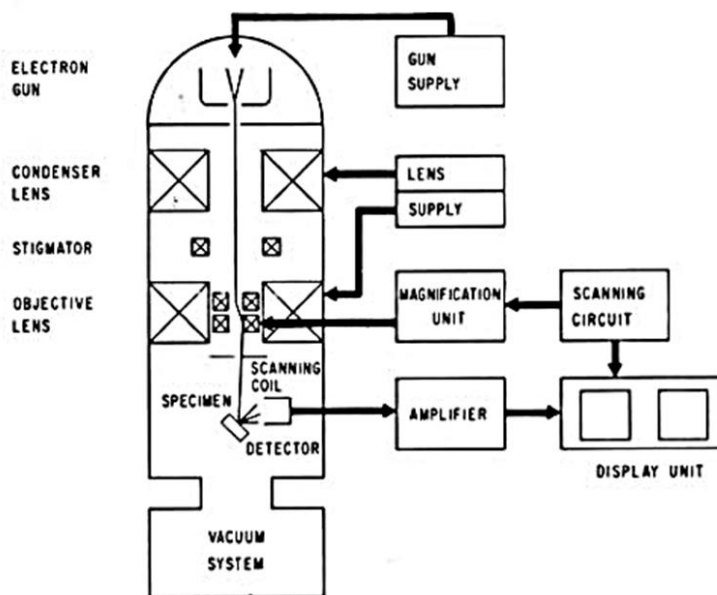


Figura 3.4. Diagrama de bloques de un microscopio electrónico de barrido común.¹¹

Algunos de los electrones de baja energía expulsados o "secundarios" se encontrarán ya sea cerca de la superficie, o difundirán a través de ella. Estos electrones serán emitidos por la muestra si su energía cinética es superior a la barrera de energía superficial que está en el rango de 2 a 6 eV. Unos detectores adecuados recogen las diferentes señales y producen corrientes de emisión. Estos se utilizan para modular la luminosidad de una pantalla de tubo de rayos catódicos (CRT), que se barre en sincronía con el haz primario.¹¹ En la actualidad, la alta resolución que ofrece la microscopía electrónica de barrido con emisión de campo (FESEM) ofrece imágenes con una resolución del orden de 2 nm para estructuras periódicas. En estas se conjuga el uso de una fuente de alto brillo, un haz con un diámetro pequeño y pequeñas aberraciones de un sistema de lentes objetivo in-lens (**Figura 3.5**).^{12,13} En nuestro trabajo hemos contado con un equipo ZEISS Ultra 55 microscope operando a 2 kV, con una corriente de haz de $2 \cdot 10^{-9}$ A y distancia de trabajo de 2.5 mm.

3.2.12 Espectroscopía de emisión atómica con fuente de plasma de acoplamiento inductivo

En la espectroscopía de plasma de acoplamiento inductivo (ICP) se emplea una fuente de plasma como fuente de atomización y excitación de los analitos presentes en la muestra. Un plasma es una mezcla gaseosa conductora de la electricidad que contiene una elevada concentración de cationes y electrones, manteniendo la carga neta en aproximadamente cero. En el plasma de argón, empleado frecuentemente en los análisis de emisión, los iones de argón y los electrones son las principales especies conductoras, a pesar de que los cationes de la muestra también se encuentran presentes en menor cantidad.

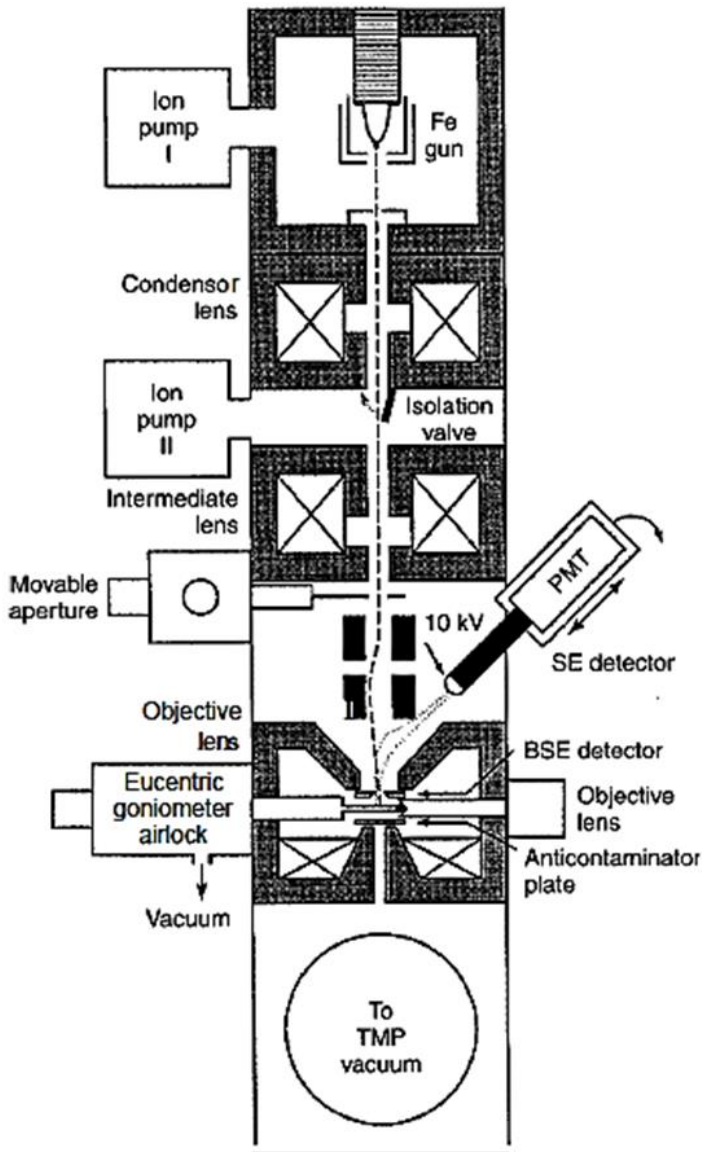


Figura 3.5. FESEM in-lens. Las características importantes de este instrumento son el acoplamiento del alto brillo de una fuente de emisión de campo a una lente de baja aberración equipada con una plataforma de inclinación eucentrica de alta estabilidad y entrada lateral. Tal diseño también protege el rayo del campo magnético disperso desde la fuente hasta la muestra. PMT = tubo fotomultiplicador, SE = electrón secundario, BSE = electrón retrodispersado, TMP = bomba turbo-molecular.

Una vez formados los iones de argón en un plasma, estos serán capaces de absorber la suficiente energía de una fuente externa como para mantener la temperatura a un nivel tal que la posterior ionización sustente el plasma indefinidamente; alcanzando temperaturas de hasta 10000 K.³ Para nuestras determinaciones empleamos un equipo ICP-OES Varian 715-ES.

3.3 Técnicas cromatográficas

3.3.1 Cromatografía en columna

Para la cromatografía en columna (CC), se utilizó gel de sílice de 0,04-0,06 mm de diámetro y 230-400 mallas, de la empresa Sharlau. Las columnas se hicieron en su formato estándar de elución o bien a presión (flash chromatography) aplicando la muestra disuelta en el eluyente (indicado en cada caso). La preparación de las columnas se realizó mediante los procedimientos habituales de compactación con el eluyente (indicado en cada caso).

3.3.2 Cromatografía en capa fina

Para la cromatografía en capa fina (CCF) se utilizaron placas (20x20 cm) de gel de sílice tipo 60, con marcador de fluorescencia a 254 nm, de la empresa Merk. La detección de los productos se realizó por fluorescencia utilizando una lámpara ultravioleta a una longitud de onda de 254 nm.

3.4 Síntesis de los nanomateriales

3.4.1 Materiales sensibles al pH para la difusión intracelular de camptotecina

3.4.1.1 Síntesis del nano-MIL-101(Fe)-NH₂ (M1-NH₂)

Este material se preparó usando un procedimiento solvotermal previamente descrito.¹⁴ Una disolución de 0,181 g (1 mmol) de ácido 2-aminotereftálico y 0,541 g (2 mmol) de FeCl₃.6H₂O en 12,14 mL de DMF 24 h, se calentó a 110 °C, en un autoclave. Después de enfriar a temperatura ambiente, la suspensión resultante se separó por filtración y se lavó tres veces con DMF (15 mL cada una) y otras tres veces con EtOH (15 mL cada una). Finalmente, el material se redispersó en 35 mL de etanol absoluto y se centrifugó lavando tres veces a 13336 G durante 20 minutos cada lavado, y se secó a vacío, proporcionando 0,242 g de M1-NH₂.¹⁵

3.4.1.2 Síntesis del nano-MIL-100(Fe)-BTB-NH₂ (M2-NH₂)

Para llevar a cabo la síntesis de este MOF, en primer lugar, se sintetizó el ligando H₃BTB-NH₂, siguiendo una receta de tres pasos de Yaghi y colaboradores.¹⁶ En el primer paso, el 1,3,5-tribromobenceno (1,021 g, 3,24 mmol) y el Bis(pinacolato)diboro (2,55 g, 9,57 mmol) se disolvieron en 10 mL de DMF anhidra previamente purgada con Ar. Después se añadieron rápidamente al matraz acetato de potasio y Pd(dppf)Cl₂ y la mezcla se calentó a 90 °C durante 24 h. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, se agitó con agua mQ (120 mL) y el precipitado negro se recogió por filtración, lavando con agua tres veces y finalmente se secó a vacío durante 12 h (rendimiento: 1,496 g, 3,22 mmol, 99 %).

En una segunda etapa, se disolvieron 1,013 g (2,18 mmoles) del sólido negro obtenido y 1,742 g (7,59 mmol) de 4-bromo-2-aminobenzoato de metilo en 62 mL de 1,4-dioxano/H₂O (1:1, v/v) previamente desoxigenada con Ar. Luego, se añadieron fluoruro de cesio (3,088 g, 20,20 mmol) y Pd(dppf)Cl₂ (0,123 g, 0,17 mmol) y se calentó hasta 90 °C con vigorosa agitación magnética durante 24 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, la suspensión resultante se agitó con 190 mL de una disolución de cloruro amónico al 20 %, y la mezcla se extrajo tres veces con 65 mL de AcOEt. La fase orgánica se secó con una disolución saturada de cloruro sódico y sulfato sódico anhidro. Finalmente, el producto se purificó por cromatografía en columna bajo presión usando DCM/AcOEt (15:1, v/v) como fase eluyente. Se obtuvo 0,448 g (0,85 mmoles, 39 %) del producto aislado MeO-BTB-NH₂. ¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 7,85 (s, 3H, Ar H), 7,83 (d, *J* = 8,8 Hz, H, Ar H), 7,24 (s, 3H, Ar H) 7,00 (d, *J* = 8,4 Hz, 3H, Ar H), 6,73 (s, 6H, NH₂), 3,82 (s, 9H, COOMe). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 167,59 (C=O), 151,59 (C), 144,83 (C), 140,83 (C), 135,35 (CH), 114,57 (CH), 113,76 (CH), 108,25 (C), 51,42 (Me). Vease espectros de RMN en el ANEXO I, **Figura I.1**.

Finalmente, se consiguió la desprotección de los ésteres metílicos disolviendo (0,448 g, 0,85 mmol) del MeO-BTB-NH₂ en 27 mL de tetrahidrofurano seguido de la adición de 27 mL de una disolución acuosa 0,5 M de NaOH. La suspensión se agitó vigorosamente a 50 °C durante 48 h. El THF se eliminó por evaporación y la fase acuosa se acidificó a pH inferior a 4 con ácido clorhídrico concentrado. El producto precipitado se filtró y se lavó tres veces con agua mQ y se secó por liofilización (-55 °C, 16 h). Se obtuvo 0,375 g (0,78 mmol, 91 %) de H₃BTB-

NH₂. ¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 8,62 (br s, 3H, COOH), 7,83 (s, 3H, Ar H), 7,82 (d, *J* = 8,0 Hz, H, Ar H), 7,20 (s, 3H, Ar H) 6,97 (d, *J* = 8,4 Hz, 3H, Ar H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 169,32 (C=O), 151,76 (C-NH₂), 144,64 (C), 140,95 (C), 131,97 (CH), 124,61 (CH), 114,38 (CH), 113,57 (CH), 109,13 (C). Vease espectros de RMN en el ANEXO I, **Figura I.2**.

Una vez obtenido este ligando, se utilizó para la síntesis de M2-NH₂. Para ello, utilizamos una estrategia de envejecimiento del Fe³⁺ con agua y ácido acético^{17,18} para obtener pequeños cristales, con área superficial baja, pero un gran número de grupos amino funcionalizables y diámetro de poro muy grande. Para ello se disolvió FeCl₃·6H₂O (0,161 g, 0,60 mmol) en 15,2 mL de DMF y luego se añadieron 122 μL de agua mQ y 498 μL de AcOEt. La disolución se dejó envejecer durante dos días a temperatura ambiente antes de la adición de 0,191 g (0,40 mmol) del ligando BTB-NH₂ disuelto en 5 mL de DMF. La mezcla resultante se introdujo en un autoclave y se calentó a 120 °C durante 24 horas. El sólido obtenido se recogió por filtración y se lavó tres veces con DMF, tres veces más con etanol absoluto, se redispersó en etanol y se lavó por centrifugación 3 veces a 27216 G durante 10 minutos cada uno. Finalmente, el sólido se secó a vacío, proporcionando 0,184 g.¹⁵

3.4.1.3 Síntesis de profármacos de camptotecina para su anclaje covalente

Este paso fue necesario para lograr un punto de anclaje eficiente entre la camptotecina y los grupos amino disponibles en la estructura de los materiales portadores.

3.4.1.3.1 Síntesis de 20-OH-hemisucinato de camptotecina

El producto 20-OH-hemisucinato de camptotecina (CPT-suc) se sintetizó usando una receta conocida.¹⁹ Se disolvieron 1,002 g (5,75 mmol) de ácido 4-(terc-butoxi)-4-oxobutanoico y 0,473 g (3,89 mmol) de DMAP en 200 mL de DCM seco, luego se agregaron 1,1 mL (7,10 mmol) de DIC y 1,022 g (2,93 mmol) de CPT y se dejó con agitación constante durante toda la noche. Luego, se agregaron 80 mL de DCM a la suspensión resultante, se lavó con HCl 0,1 N, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se llevó a sequedad en un rotavapor. El sólido precipitado se purificó por recristalización en MeOH. Una vez seco, el sólido se disolvió en 30 mL de DCM y se trató con 20 mL de TFA con agitación magnética durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del tiempo de reacción, el producto se evaporó hasta sequedad en un rotavapor. El residuo obtenido se purificó por recristalización en MeOH a 4 °C. Finalmente, el sólido obtenido se filtró, se lavó con MeOH frío y se secó a vacío, produciendo 0,966 g (2,16 mmol, 74 %). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 12,26 (br. s, 1H, COOH), 8,69 (s, 1H C-7H), 8,16 (m, 1H, Ar H) 7,87 (t, , *J* = 7,5, 1H, Ar H) 7,72 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H, Ar H), 7,13 (s, 1H, C-14H), 5,48 (s, 2H, CH₂O), 5,30 (s, 2H, CH₂N), 2,76 (m, 2H, CH₂COOH), 2,15 (q, *J*₁ = 7,5 Hz, *J*₂ = 14,8 Hz CH₂CH₃), 0,91 (t, *J* = 7,6 Hz, 3H, Me). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 172,92 (C=O), 171,23 (C=O), 167,12 (C=O), 156,50 (C), 152,36 (C), 147,87 (C), 145,89 (C), 145,22 (C), 131,51 (CH), 130,35 (CH), 129,75 (CH), 128,97 (CH), 128,49 (CH), 127,94 (CH), 127,67 (CH), 118,88 (C), 95,08 (CH), 75,82 (C), 66,26 (CH₂), 50,16 (CH₂), 30,36 (CH₂), 28,57 (CH₂), 28,41 (CH₂), 7,48 (CH₃).¹⁵ Vease espectros de RMN en el ANEXO I, **Figura I.3**.

3.4.1.3.2 Síntesis del 5-hexinoato de camptotecina

Para la síntesis del 5-hexinoato de camptotecina (CPT-5HA), hemos optimizado la ruta sintética publicada por Feng y colaboradores.²⁰ Se disolvió CPT (1,000 g, 2,79 mmol), ácido 5-hexinoico (652,8 μ L, 5,70 mmol) y DMAP (0,043 g, 0,35 mmol) en 51 mL de DCM, luego se añadió DIC (836 μ L, 5,34 mmol) a la disolución y se mantuvo con agitación magnética durante una noche. El sólido se precipitó con éter etílico, se filtró y se recrystalizó en MeOH:DCM (95:5) dando 1,009 g (2,28 mmol, 82 %) de CPT-5HA. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 8,70 (s, 1H C-7H), 8,16 (t, *J* = 9,7 Hz, 2H, Ar H) 7,87 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H, Ar H) 7,72 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H, Ar H), 7,06 (s, 1H, C-14H), 5,50 (s, 2H, C-17 CH₂), 5,30 (s, 2H, CH₂N), 2,84 (t, 1H, CH₂C=CH), 2,64 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H CH₂C=CH), 2,24 (m, 2H, COCH₂), 2,16 (dd, *J*₁=7,5 Hz, *J*₂= 15,1 Hz, 2H, C-19, CH₂) 1,74 (m, 2H, CH₂CH₂C=CH) 0,93 (t, *J* = 7,0, 3H, Me). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 171,56 (C=O), 167,22 (C=O), 156,53 (C=O), 152,31 (C), 147,85 (C), 146,01 (C), 131,56 (CH), 130,39 (CH), 129,81 (C), 128,92 (CH), 128,51 (CH), 127,98 (C), 127,69 (CH), 118,78 (C), 94,64 (CH), 83,46 (C), 75,80 (C), 71,84 (CH), 66,25 (CH₂), 50,22 (CH₂), 31,99 (CH₂), 30,19 (CH₂), 23,36 (CH₂), 16,87 (CH₂), 7,53 (CH₃).¹⁵ Vease espectros de RMN en el ANEXO I, **Figura I.4**.

3.4.1.4 Preparación del nano-MIL-101(Fe)-NH-Suc-CPT (M1-S-CPT)

Se secaron 0,242 g de M1-NH₂ a 100 °C bajo vacío (8 torr) durante 24 h en un matraz de fondo redondo de 50 mL de 2 bocas. En otro matraz de fondo redondo de 2 bocas de 50 mL se añadieron 0,042 g (0,093 mmol) de CPT-Suc, 0,023 g (0,12

mmol) de EDC, 0,025 g (0,18 mmol) de HOBT y 10 mL de DCM seco la mezcla se mantuvo con agitación constante bajo atmósfera de N₂ y a 0 °C durante 30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, la mezcla se añadió sobre el MIL-101(Fe)-NH₂ seco. A continuación, se añadieron 16.52 µL (0.095 mmol) de DIPEA, a la mezcla y se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de N₂. Finalmente, el sólido se recogió por filtración, se lavó con DCM 3 veces y con MeOH 3 veces, luego, el sólido se redispersó en MeOH y se lavó 5 veces a 13336 G durante 20 minutos cada lavado. Finalmente se secó a vacío durante una noche. Se generó 0,249 g de M1-S-CPT.¹⁵

3.4.1.5 Preparación del nano-MIL-100(Fe)-BTB-NH-Suc-CPT (M2-S-CPT)

Se siguió el mismo procedimiento que para la funcionalización del M1-NH₂, pero en este caso, las cantidades usadas fueron M2-NH₂ (0,050 g), CPT-Suc (0,012 g, 0.026 mmol), EDC (0,005 g, 0,026 mmol), HOBT (0,005 g, 0,037 mmol) y DIPEA (3,16 µL, 0,018 mmol). Produciendo 0,044 g de M2-S-CPT.¹⁵

3.4.1.6 Preparación del nano-MIL-101(Fe)-Click-CPT (M1-C-CPT)

Para llevar a cabo la síntesis de este material, hemos adaptado procedimientos sintéticos de transformación de grupos amino en azidas y su posterior ciclación [3 + 2] con un alquino a nuestros materiales.^{21,22} En un matraz de fondo redondo de 50 mL y 2 bocas se colocaron 0,050 g de M1-NH₂ seco, 3,0 mL de THF anhidro, 0,187 mL (1,309 mmol) de tBuONO y finalmente se añadieron 0,168 mL (1,122 mmol) de TMSN₃ siguiendo este orden. Esta mezcla se dejó reaccionar durante la noche a

temperatura ambiente bajo atmósfera de Ar para producir el derivado intermedio azida MIL-101(Fe)-N₃. El compuesto se separó por filtración y se lavó 3 veces con 8 mL de THF, 3 veces con 8 mL de DCM y otras 3 veces con 8 mL de tolueno. El sólido todavía húmedo se transfirió a un matraz de fondo redondo de 50 mL y 2 bocas bajo atmósfera de Ar y se suspendió en 1 mL de DMF seca y desgasificada. La suspensión se trató luego con 0,5 mL de una disolución de CPT-5HA (0,2244 mmol, 0,099 g) y se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 5 h. Se añadió Cu^I(CH₃CN)₄PF₆ (0,224 mmol, 0,041 g) a la mezcla disuelta en 0,3 mL de DMF seca y desgasificada. Finalmente, la mezcla de reacción se calentó a 85 °C durante 14 h con agitación magnética constante. Una vez enfriado, el sólido se recuperó por filtración y se lavó 3 veces con DMF, 3 veces con DCM y finalmente 3 veces con MeOH. Luego, el sólido se redispersó en MeOH y se lavó 5 veces a 13336 G durante 20 minutos cada lavado, y finalmente se secó a vacío durante una noche, produciendo 0,088 g de M1-C-CPT.¹⁵

3.4.1.7 Preparación del nano-MIL-100(Fe)-Click-CPT (M2-C-CPT)

Se siguió el mismo procedimiento que para la funcionalización del M1-NH₂, pero en este caso, las cantidades usadas fueron M2-NH₂ (0,085 g), THF 5,4 mL, t-BuONO (0,457 mL, 3,20 mmol), TMSN₃ (0,335 mL, 2,24 mmol), CPT-5HA (0,231 g, 0,52 mmol), DMF (2,6 mL), Cu^I(CH₃CN)₄PF₆ (0,098 g, 0,53 mmol) disueltos en 0,51 mL de DMF seca y desgasificada. Se obtuvieron 0,086 g de M2-C-CPT.¹⁵

3.4.1.8 Síntesis del MIL-101(Fe) (M1) y MIL-100(Fe) (M2)

Con el fin de comparar los materiales decorados con grupos amino en su superficie con aquellos materiales no funcionalizables, se preparó MIL-101(Fe) a través de una síntesis solvotermal con 0,273 g (1,00 mmol) de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,250 g (1,50 mmol) de ácido tereftálico, 15 mL de DMF y 20 mL (0,08 mmol) de una disolución de HF 4 M. La mezcla se calentó a 100 °C en condiciones estáticas durante 16 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, la suspensión resultante se separó por filtración y se lavó tres veces con DMF (15 mL cada vez) y otras tres veces con EtOH (25 mL cada vez). Finalmente, el material se redispersó en 35 mL de etanol absoluto y se lavó por centrifugación tres veces a 13336 G durante 20 minutos cada lavado, se secó a vacío, produciendo 0,133 g de M1.

El MIL-100(Fe)-BTB se sintetizó siguiendo el procedimiento descrito por Horcajada y colaboradores.¹⁷ Los datos de caracterización obtenidos se utilizaron para realizar el proceso de obtención de nanocristales más dispersos utilizando el método de envejecimiento de la sal metálica. De esta forma, los procedimientos de síntesis de M2 y M2-NH₂ fueron análogos. En este caso, utilizamos las siguientes cantidades: 0,158 g (0,58 mmol) de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 15 mL de DMF, 120 μL de agua de mQ, 490 μL de AcOH y 0,176 g (0,40 mmol) de BTB disueltos en 5 mL de DMF. Se obtuvieron 0,150 g de M2.¹⁵

3.4.1.9 Preparación del nano-MIL-101(Fe) + CPT (M1-A-CPT)

Con el fin de lograr una adsorción eficiente de CPT por parte del material, se mezclaron 0,100 g de M1-NH₂ y 0,201 g (0,58 mmol) de CPT en un matraz de fondo redondo de 50 mL de 2

bocas. Sobre esta mezcla se añadieron 3 mL de DMF seca y desgasificada y la mezcla se agitó a 85 °C bajo una atmósfera de Ar durante una noche. Una vez enfriado a temperatura ambiente, el sólido se recuperó por filtración y se lavó 3 veces con DMF, 3 veces con DCM y finalmente 3 veces con MeOH. Luego, el sólido se redispersó en MeOH y se lavó 5 veces a 13336 G durante 20 minutos cada lavado, y finalmente se secó a vacío durante la noche. Se obtuvo 0,099 g de M1-A-CPT.¹⁵

3.4.1.10 Preparación del nano-MIL-100(Fe)-BTB-NH₂ + CPT (M2-A-CPT)

Se siguió el mismo procedimiento que para la adsorción de CPT en el interior del M1-NH₂, pero en este caso, las cantidades utilizadas fueron M2-NH₂ (0,079 g), CPT (0,217 g, 0,62 mmol), DMF seca y desgasificada (3 mL). Produjo 0,077 g de M2-A-CPT.¹⁵

3.4.1.11 Preparación del nano-MIL-101(Fe)-NH-CO-RhB (M1-RhB)

Para tener Rodamina B unida covalentemente a las superficies de los nanomateriales para posteriores estudios de internalización celular, se secaron 0,155 g de M1-NH₂ a 100 °C bajo vacío (8 torr) durante 24 h en un matraz de fondo redondo de 50 mL y 2 bocas. Se añadieron 0,0024 g (0,005 mmol) de RhB, 0,0012 g (0,006 mmol) de EDC, 0,0013 g (0,009 mmol) de HOBT y 10 mL de DCM seco a otro matraz de fondo redondo de 50 mL y 2 bocas y la mezcla se mantuvo con agitación constante bajo una atmósfera de N₂ y a 0 °C durante 30 minutos. Después de este tiempo, la mezcla se añadió sobre el MIL-101(Fe)-NH₂ seco y luego se añadieron 0,8 µL (0,005 mmol) de DIPEA, la mezcla que se mantuvo con agitación

magnética durante 16 horas a temperatura ambiente en atmósfera de N₂. Finalmente, el sólido se recogió por filtración, se lavó con DCM 3 veces y con MeOH 3 veces, luego, el sólido se redispersó en MeOH y se lavó 5 veces a 13336 G durante 20 minutos, cada lavado, finalmente se secó a vacío durante la noche. Produjo 0,147 g de M1-RhB.¹⁵

3.4.1.12 Preparación del nano-MIL-100(Fe)-BTB-NH-CO-RhB (M2-RhB)

Se siguió el mismo procedimiento que para la funcionalización del M1-NH₂, pero en este caso, las cantidades usadas fueron M2-NH₂ (0,058 g), RhB (0,0009 g, 0,002 mmol), EDC (0,0005 g, 0,001 mmol), HOBT (0,0006 g, 0,004 mmol) y DIPEA (0,3 μL, 0,005 mmol). Dando 0,039 g de M2-RhB.¹⁵

3.4.2 Materiales agentes de contraste en resonancia magnética de imagen

3.4.2.1 Síntesis del Gd(H₂O)₄[Fe(CN)₆] (GdFe) de cristal grande

Para obtener este material, primero fue necesario preparar (Et₄N)₃[Fe(CN)₆] siguiendo un procedimiento publicado por Maschrack.²³ Para ello, en un balón de 500 mL se disolvieron 3,3 g (10 mmol) de K₃[Fe(CN)₆] y 6,3 g (30 mmol) de Et₄NBr en 200 mL de metanol bajo atmósfera de nitrógeno y se agitó durante 3 días a 30 °C. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró a vacío hasta aproximadamente 10 mL. La disolución resultante se agitó con 100 mL de éter etílico y el precipitado amarillo se colectó por filtración. Este sólido se disolvió en 150 mL de acetonitrilo a reflujo luego se dejó enfriar la disolución obteniendo (Et₄N)₃[Fe(CN)₆] puro. Para preparar el

análogo del azul de Prusia, se disolvieron 11,75 g (225 mmol) de ácido acético y 0,86 g (2,5 mmol) de $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 50 mL de $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ (2,5:1 v/v). Sobre esta disolución se añadió otra disolución de 1,5 g (2,5 mmol) de $(\text{Et}_4\text{N})_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ en 15 mL de metanol, esta mezcla se mantuvo a 25 °C sin agitación durante 24 h. El precipitado se filtró, se lavó con etanol y se secó a vacío obteniendo 118 mg de sólido naranja.²⁴

3.4.2.2 Síntesis del $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (GdFe) de cristal pequeño

Para obtener este material, primero fue necesario preparar $(\text{Et}_4\text{N})_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ siguiendo un procedimiento publicado por Maschrack.¹⁵ Para ello, en un balón de 500 mL se disolvieron 3,3 g (10 mmol) de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ y 6,3 g (30 mmol) de Et_4NBr en 200 mL de metanol bajo atmosfera de nitrógeno y se agitó durante 3 días a 30 °C. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró a vacío hasta aproximadamente 10 mL. La disolución resultante se agitó con 100 mL de éter etílico y el precipitado amarillo se colectó por filtración. Este sólido se disolvió en 150 mL de acetonitrilo a reflujo luego se dejó enfriar la disolución obteniendo $(\text{Et}_4\text{N})_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ puro. Para preparar el análogo del azul de Prusia, se disolvió 0,86 g (2,5 mmol) de $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 50 mL de $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ (2,5:1 v/v). Sobre esta disolución se añadió otra disolución de 1,5 g (2,5 mmol) de $(\text{Et}_4\text{N})_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ en 15 mL de metanol, esta mezcla se mantuvo a 25°C sin agitación durante 24 h. El precipitado se filtró, se lavó con etanol y se secó a vacío obteniendo 118 mg de sólido naranja.²⁵

3.4.2.3 Síntesis del nanocomposite Gd-Si óxido/hidróxido (GdSi)

Para la preparación de nanopartículas densas de $\text{Gd}(\text{OH})_3 \cdot \text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ se suspendieron 550 mg (1,25 mmol) del $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ previamente preparado, eligiendo el sólido según el tamaño y forma requerido, en 278 mL de EtOH:H₂O (2,5:1 v/v) con vigorosa agitación. Entonces, se añadieron 697 μL (4,50 mmol) de 3-cianopropiltriclorosilano y se dejó en agitación durante 30 minutos. A continuación, se añadieron 3,5 mL de amoníaco y 11 mL de una disolución recién preparada de silicato sódico (0,54 % en SiO₂, 2,69 mmol). Tras 48 h de reacción los iones silicato no reaccionantes se eliminaron mediante centrifugación (2 h, 484 g), el sólido blanco obtenido se lavó repetidamente con agua mQ (30 min, 1935 g) y a continuación se liofilizó para eliminar el agua (-55 °C, 16 h).^{24,25}

3.4.2.4 Síntesis del nanocomposite Gd-Si óxido/hidróxido pegilado (GdSi_{PEG})

Con el fin de poder aplicar estos materiales en administración *in vivo* es necesario recubrirlos con un polietilenglicol, preferiblemente de cadena corta y a través de enlace covalente. El proceso se denomina PEGilación, y para ello empleamos un procedimiento desarrollado por nuestro grupo.²⁶ Se tomaron 375 mg del $\text{Gd}(\text{OH})_3 \cdot \text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ previamente preparado y se secaron a 80 °C y vacío (8 torr) durante 24 h. A continuación, se añadieron 7,4 mL de tolueno anhidro y la mezcla se calentó a reflujo. Entonces se añadieron 728 μL (3,13 mmol) de 3-aminopropiltriétoxosilano y la mezcla se agitó durante 3 h, tras las cuales, el producto obtenido se filtró, se lavó con tolueno y

metanol y se liofilizó (-55 °C, 16 h). Luego, 156 mg de este material se suspendió en 15,6 mL de diclorometano anhidro bajo atmósfera de nitrógeno. Se inyectaron 195 µL de diisopropilamina y 234 mg del éster succinico del ácido 2,5,8,11-tetraoxatetradecan-14-oico (PEG₃). La reacción se dejó progresar durante toda la noche, luego se eliminó el disolvente en el rotavapor y el material se suspendió en 100 mL de etanol con agitación. La suspensión se filtró, y se lavó con etanol (300 mL) y finalmente el material se liofilizó (-55 °C, 16 h).²⁵

3.4.2.5 Síntesis de nanopartículas mesoporosas de óxido de silicio y gadolinio (mGdSi)

Se desarrolló una estructura mesoporosa en los materiales GdSi de 300 nm gracias a la incorporación de un surfactante catiónico, el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) en la matriz del nanocomposite, lo cual mejora sus propiedades texturales. Las nuevas partículas mesoporosas de Gd₂O₃·SiO₂ se prepararon empleando el Gd(OH)₃·SiO₂·xH₂O como única fuente de sílice en el siguiente gel composicional 1 SiO₂/0,30 CTAB/0,15 NaOH/622 H₂O/54 EtOH, el cual se mezcló a temperatura ambiente agitando la mezcla durante 15 minutos y se transfirió a un autoclave y se calentó a 100 °C en estático durante 4-48 h, el material se colectó por centrifugación (30 min, 1935 g) y se lavó repetidamente con agua mQ (30 min, 1935 g) y se liofilizó (-55 °C, 16 h). Finalmente, se eliminó el surfactante con un calentamiento en corriente de aire a 500 °C durante 6 h. Las muestras se llamaron mGdSi-*n*, donde *n* corresponde al tiempo del tratamiento hidrotermal (4-48 h).²⁴

3.4.2.6 Síntesis del $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]@\text{SiO}_2$ (GdFeSi)

Las muestras de GdFe recubiertas con sílice se prepararon añadiendo cianopropiltrimetoxisilano (CPTMS) (417 μL , 2,19 mmol) a una suspensión de GdFe (441 mg GF -1 mmol- en 221 mL de mezcla EtOH:H₂O, 2,5:1 v/v) con vigorosa agitación magnética para hacer vitreofílica la superficie del GdFe. Después de 30 minutos, se añadieron lentamente 1,1 mL de TMOS (7,29 mmol) y 44 μL (0,31 mmol) de TEA para ajustar el pH a 7. La dispersión resultante se dejó con agitación durante 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se llevó a cabo una segunda adición igual de TMOS y la mezcla se agitó durante otras 24 h. Finalmente, los iones silicato que no reaccionaron se eliminaron completamente mediante centrifugación (484 g, 2 h), y el sólido naranja obtenido se lavó cinco veces con una mezcla EtOH: H₂O (2,5:1 v/v) 55 °C, 16 h).²⁷

3.4.2.7 Síntesis $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]@\text{SiO}_2@\text{PEG}_3$ (GdFeSiPEG)

La PEGilación sobre el material GdFeSi se realizó, al igual que en el caso del GdSi_{PEG} utilizando un método previamente descrito por nuestro grupo.²⁶ Se secaron 331 mg de GdFeSi a 80 °C y se sometieron a vacío (8 torr) durante 24 h. A continuación, se añadieron 13,30 mL de tolueno anhidro y la mezcla se calentó a reflujo. Se añadieron 646 μL (2,78 mmol) de 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES) y la mezcla se agitó durante 3 h. El producto obtenido se separó por filtración, se lavó con tolueno y metanol y se liofilizó (-55 °C, 16 h). A continuación, se suspendieron 285 mg del material silanizado en 28,5 mL de diclorometano anhidro y se le añadieron 356 μL de diisopropil amina bajo atmósfera de nitrógeno. Después, se

añadieron 221 mg de PEG₃ y la mezcla se agitó durante una noche a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó a presión reducida en un rotavapor y las nanopartículas se suspendieron en 100 mL de etanol con agitación. Esta suspensión se separó por filtración y se lavó con etanol (300 mL). Finalmente, el material se liofilizó (-55 °C, 16 h).²⁷

3.5 Ensayo de estabilidad

Se ensayó la estabilidad de todos los materiales en disolución salina de fosfato (PBS, 1x), glucosa en agua (5,5 %, m %), medio de cultivo DMEM o agua. Para ello 5 mg del correspondiente material se dispersaron en 1 mL de estas disoluciones a 1500 rpm y 37 °C en un Termomixer® durante 24 h. Luego las muestras se centrifugaron (16100 g, 15 min) y se analizó la concentración de cationes metálicos en el sobrenadante mediante ICP.

3.6 Estudios *in vitro*

Los estudios en cultivos celulares se llevaron a cabo en las instalaciones del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche (IB-UMH) y del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia (CIPF). Los ensayos realizados se describen a continuación.

3.6.1 Biocompatibilidad celular

Se cultivaron diferentes líneas celulares en placas de 96 pocillos mostrando diferentes densidades de siembra en un volumen de medio final de 200 µL/pocillo: 10000 células HeLa/mL; fibroblastos 3T3 y neuroblastoma SH-SY5Y 100000 células/mL. Las células HeLa se cultivaron en medio de cultivo

MEM (Earle's), la línea celular 3T3 en DMEM y la línea celular SH-SY5Y se cultivó en un medio DMEM y Ham (F12) Mezcla Nut (1:1). Los medios celulares se complementaron con 10% de FBS y Penicilina-Streptomicina 1 % (*v/v*). Las placas se cultivaron durante 24 h a 37 °C y con una atmósfera del 5 % de CO₂. Después de 24 h las células se trataron con el material en cuestión en un intervalo de concentración de aproximadamente 0,25 a 100 µg/mL en medio RPMI. Las células con nanopartículas se incubaron a 37 °C durante 24 h y 5 % de CO₂. Todas las concentraciones se ensayaron por triplicado, así como los controles negativos, sin nanopartículas.

La viabilidad celular se midió utilizando el ensayo del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Para ello, se añadieron 200 µL/pocillo de MTT/PBS (1 mg/mL) y las placas se incubaron a 37 °C durante 3 h. Los cristales de formazán formados tras la reducción mitocondrial se disolvieron con 100 µL de DMSO y luego se midió la absorbancia a 595 nm con un lector de microplacas 1681130 iMark™. Los valores de absorbancia se normalizaron con respecto al control y se expresaron en porcentaje usando la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad celular relativa} = \frac{\text{Densidad óptica células tratadas}}{\text{Densidad óptica células control}} \cdot 100$$

Los datos de supervivencia por cálculo de la IC₅₀ (concentración inhibitoria máxima para reducir la población celular al 50 %) se evaluaron mediante ajuste de la curva sigmoidea no lineal (pendiente variable) de respuesta a la dosis usando el software Prism 6.0 (GraphPad, San Diego, CA).

3.6.2 Microscopía confocal de barrido láser

El microscopio confocal proporciona una resolución espacial particularmente buena. Se usan principalmente en medidas de Raman y fluorescencia. La idea básica de un microscopio confocal de barrido láser (LCSM) es que todas las estructuras que están desenfocadas se suprimen en el detector. Esto se logra mediante la iluminación puntual y una ranura (*pinhole*) en frente del detector. La disposición óptica de un microscopio confocal se diferencia de un microscopio convencional en que el objeto completo no se ilumina al mismo tiempo. La imagen será reconstruida por movimiento gradual de la muestra. Escanear tanto en el plano como a lo largo del eje óptico permite realizar investigaciones tridimensionales. El desenfoco no produce borrosidad, pero corta una parte de la imagen de muestra a medida que uno se aleja del plano focal, de modo que estas partes se oscurecen o incluso desaparecen. Esta característica también se conoce como sección óptica. La profundidad del foco está determinada por la apertura numérica del objetivo, el diámetro de la ranura y la longitud de onda.

La alta transparencia de los tejidos biológicos en la región del IR cercano y la baja energía de los fotones permiten que se utilicen intensidades altas sin riesgo de daño de las muestras. Además, con el uso de ópticas de gran enfoque, como las utilizadas en microscopía confocal, se pueden muestrear volúmenes muy pequeños en tejidos biológicos con fluorescencia de excitación multifotónica, logrando una resolución 3D sin precedentes. Por lo tanto, las muestras microscópicas pueden escanearse con barrido, manteniendo el punto focal dentro de un plano perpendicular al rayo láser (dirección *xy*) y recogiendo fluorescencia y fotones de fondo de

una región espacial estrechamente confinada en función de las posiciones x e y . Además, la muestra se puede ajustar en pasos micrométricos en la dirección z en diferentes planos dentro de la muestra, lo que permite emplear la microscopía confocal para controlar puntos seleccionados dentro de una célula.²⁸

La entrada de los NanoMOF en células HeLa se estudió mediante experimentos de colocalización en un microscopio confocal (Leica TCS-SP2-AOBS). Se sembraron 37500 células/pocillo (sistemas de vidrio borosilicato de cubreobjetos Lab-tek® de 2 cámaras #1.0) y se estabilizaron durante 24 h en medio DMEM + F12 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SBF) y 1 % de antibiótico (estreptomicina/penicilina) a 37 °C en un ambiente de 95 % de aire y 5 % de CO₂. Luego, se cambió el medio de cultivo y las células con medio nuevo se trataron con M1-RhB y M2-RhB, con dosis finales de 5 y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ambos materiales, durante 24 h. Después de la incubación, las células se lavaron repetidamente con PBS para eliminar por completo las nanopartículas no internalizadas. Antes de la adquisición de imágenes las células se incubaron a 37 °C durante 1 hora con LysoTracker Green 10 μM (Invitrogen), se fijaron con paraformaldehído al 4 % y se incubaron con DAPI durante 5 minutos.

3.6.3 Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrico basada en hacer pasar una suspensión células alineadas de una en una a través de un láser focalizado. Las señales obtenidas corresponden a diferentes parámetros de la célula que son recogidos por distintos detectores.

Las células pueden estar vivas o fijadas, pero obligatoriamente en suspensión celular y en forma de célula única. Se obliga a pasar a las células a través de un canal muy fino llamado fluidica, de manera alineada una a una frente a un haz láser con un flujo continuo. Cada célula, a la vez que dispersa la luz, emite luz fluorescente como consecuencia de la excitación láser a la que es sometida. Los parámetros que típicamente se miden de forma simultánea por cada célula son:

1. Dispersión frontal de la luz a 2° (forward scatter), valor proporcional al tamaño celular.
2. Dispersión de la luz ortogonal (side scatter), proporcional a la cantidad de estructuras granulares o complejidad de la célula.
3. Intensidades de fluorescencia a diferentes longitudes de onda.²⁹⁻³¹

Las determinaciones cuantitativas de internalización celular se llevaron a cabo mediante citometría de flujo. Para este propósito, se sembraron células HeLa en placas de 12 pocillos a una densidad de 75000 células/pocillo y se les permitió adherirse durante 24 h. Luego, los diferentes nanomateriales se agregaron a los pocillos (por triplicado) a una concentración final de 1, 5, 25 y 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y se mantuvieron así durante 24 horas. Después de lavar repetidamente con PBS, las células adheridas se tripsinizaron, se recogieron cuidadosamente y se trataron con 2 μL de DRAQ 5TM. Los análisis de citometría de flujo se realizaron en un citómetro de flujo FC500 MPL (Beckman-Coulter). Los datos se analizaron y trazaron para la rodamina B y DRAQ 5TM en una gráfica de puntos bidireccional (región recuadrada). Previamente, la calibración se llevó a cabo

para dos regiones cerradas diferentes: células sin nanopartículas con DRAQ 5TM, células con DRAQ 5TM y nanopartículas.

3.7 Estudios de resonancia magnética para imagen

3.7.1 Estudio de relajatividad ¹H-RMN y resonancia magnética para imagen *in vitro*

Los estudios de determinación de relajatividad y estudios de resonancia magnética de imagen se llevaron a cabo en el hospital internacional medimar (Alicante), utilizando una unidad de resonancia magnética clínica de 3 T (Philips Achieva 3 T de la X-Series, Philips Healthcare, Países Bajos) con una sonda de ocho canales. El blanco se escaneó en una sola rebanada en orientación coronal, también se obtuvo una visión transversal de todos los tubos llenos de concentración variable de agente de contraste. Los parámetros geométricos permanecieron equivalentes entre las secuencias de estimación de T_2 y T_1 (campo de visión de 220 x 220 mm², grosor de corte de 5 mm y 1,0 x 1,0 mm² en la resolución del plano) compartiendo la misma localización espacial. Se empleó una secuencia de eco de espín de eco múltiple para estimar valores de T_2 adquiriendo 32 ecos que van de 14 a 231 ms ($\Delta TE = 7$ ms) con una secuencia TR de 2000 ms. Los valores T_1 de cada tubo se estimaron utilizando una adquisición de recuperación de inversión look-looker con 107 tiempos de inversión que van desde 6,51-5306,51 ms, con un intervalo de tiempo de inversión de 50 ms. Se aplicaron nuevos impulsos de inversión cada 6 s para evitar la saturación de la señal debido a los extremadamente estrechos impulsos de inversión. Para reducir la influencia de los pulsos de excitación en la lectura en los

valores T_1 finales, se aplicó un ángulo de excitación de 5° durante la toma del TFE .³² Con respecto al análisis de imágenes, los mapas de T_2 se generaron por un ajuste no lineal de la señal adquirida en cada TE para un modelo monoexponencial. El mismo procedimiento se aplicó a cada píxel de la imagen produciendo los mapas de T_2 . Por otra parte, los mapas de T_1 se generaron por ajuste no lineal de la señal adquirida en cada tiempo de inversión para el modelo de señal descrita por Blüml.³³ Como en el caso de los mapas T_2 , el mismo procedimiento se aplicó a cada píxel de la imagen para generar el mapa T_1 final. Los valores cuantitativos se obtuvieron sobre suspensiones acuosas de nanopartículas en goma de xantano (0,1 %) por análisis manual de la zona de interés (ROI) sobre los mapas de T_2 y T_1 . La ROI circular de cada tubo se colocó, evitando el borde. En cada ROI, las medias y las desviaciones estándar se calcularon para su posterior comparación. Los valores de T_1 y T_2 resultantes se promedian y se representan como $1/T_i$ (s^{-1}) donde $i = 1, 2$ frente a $[Gd^{3+}]$ (mM), las pendientes de estas gráficas nos proporcionan las capacidades de relajación específicas r_1 y r_2 .

3.7.2 Estudio de resonancia magnética para imagen *in vivo*

Los experimentos se llevaron a cabo en el instituto de neurociencias de Alicante (IN). Las ratas se anestesiaron con un 3-4 % de isofluorano en aire médico ($0,8-1 \text{ L min}^{-1}$) en una cámara de inducción y se mantuvieron con 1-2 % de isofluorano (IsoFlo) durante el experimento de MRI. Los animales anestesiados se fijaron en un soporte hecho a medida para minimizar los artefactos de los movimientos relacionados con la respiración. La temperatura del animal se mantuvo a 37°C utilizando una manta de agua, monitorizada, a través de

una unidad de control de temperatura compatible con la resonancia magnética (multisens signal conditioner, OpSens, Quebec, Canadá). También se controló la velocidad de respiración utilizando un dispositivo diseñado a medida. Los experimentos se llevaron a cabo en un escáner horizontal de 7 T y de 30 cm de diámetro (Biospec 70/30 V, Bruker Medical, Ettlingen, Alemania). El sistema tenía una bobina de gradiente activamente apantallado de 675 mT m^{-1} (Bruker, BGA 12-S) de 11,4 cm de diámetro interior. Se empleó un resonador de cuerpo de rata para recibir y transmitir las señales de ^1H (Bruker BioSpin MRI GmbH, Alemania). Los datos fueron adquiridos con una consola Hewlett-Packard y el software Paravisión (Bruker Medical GmbH, Ettlingen, Alemania) que opera en una plataforma Linux.

Los estudios se llevaron a cabo mediante la inyección de 1 mL de la suspensión del agente de contraste (5 mg/mL) en la vena de la cola a través de un catéter como un único bolo (0,04 mmol Gd/kg de peso corporal), y la adquisición de imágenes se hizo 30 min después. La adquisición se llevó a cabo durante 1 h. Las imágenes anatómicas ponderadas en T_2 para posicionar el animal se recogieron en las tres orientaciones ortogonales utilizando una secuencia de rápida adquisición y relajación mejorada (RARE), aplicando los siguientes parámetros: campo de visión (FOV) 40 x 40 mm, 15 rebanadas, grosor del corte de 1 mm, matriz de 256 x 256, tiempo de eco efectivo (TE_{eff}) = 56 ms, tiempo de repetición (TR) = 2 s, 1 media y un tiempo total de adquisición de 64 s.^{34,35} Se utilizaron dos tipos de imágenes para evaluar el efecto del agente de contraste en la intensidad de señal de las imágenes ponderadas en T_1 y T_2 . En el primer caso, las fotografías FLASH fueron adquiridas con los

siguientes parámetros: 25 rebanadas, 1.5 mm de grosor de corte, $TR = 197$ ms; $TE = 2,7$ ms; $FOV = 6,0 \times 5,0$ cm; $Mtx = 128 \times 108$; promedios = 4; tiempo total de adquisición = 90 s. Se adquirieron tres imágenes antes de la administración del agente de contraste (línea base) y 20 después de ella. Para las imágenes ponderadas en T_2 , se utilizó RARE con la misma geometría que las imágenes ponderadas en T_1 y los siguientes parámetros: $TR = 2800$ ms; $TE = 48$ ms; $FOV = 6,0 \times 5,0$ cm; $Mtx = 256 \times 214$; promedios = 8; tiempo total de adquisición = 600 s. Una de estas imágenes se adquirió al comienzo (línea base) y otra al final del experimento. Los datos fueron analizados con la Image J (W. S. Rasband, EE.UU. National Institute of Health, Bethesda, MD, EE.UU.).

3.8 Referencias bibliográficas

1. Brunauer, S., Emmett, P. H. & Teller, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *J. Am. Chem. Soc.* **60**, 309–319 (1938).
2. Saban, G. H. & Moran, F. Gas-Solid Interactions. *J. Chem. Educ.* **50**, 219–223 (1973).
3. Skoog, D. A., Hooler, F. J. & Nieman, T. A. in *Principios de Análisis Instrumental* (eds. Skoog, D. A., Hooler, F. J. & Nieman, T. A.) (McGRAW-HILL/INTERAMERICANA DE ESPAÑA S. A. U., 2001).
4. Earnest, C. M. Modern Thermogravimetry. *Anal. Chem.* **56**, 1471–1486 (1984).
5. Musie, G., Farmer, P. J., Tuntulani, T., Reibenspies, J. H. & Darensbourg, M. Y. Influence of Sulfur Metalation on the Accessibility of the Ni(II/I) Couple in [N,N'-Bis(2-mercaptoethyl)-1,5-diazacyclooctanato]nickel(II): Insight into the Redox Properties of [NiFe]-Hydrogenase. *Inorg. Chem.* **35**, 2176–2183 (1996).
6. Rom, P. ¿Cómo aprendimos a “ver” átomos y moléculas después de von Laue? *An. Quím.* **108**, 225–235 (2012).
7. Tortajada, J. in *Química Física I* (eds. Bertrán Rusca, J. & Núñez Delgado, J.) 765–801 (Ariel Ciencia, 2002).
8. Urban, C. & Schurtenberger, P. Characterization of Turbid Colloidal Suspensions Using Light Scattering Techniques Combined with Cross-Correlation Methods. *J. Colloid Interface Sci.* **207**, 150–158 (1998).
9. McNaught, A. D. & Wilkinson, A. *IUPAC. Compendium of Chemical Terminology*. (Blackwell Scientific Publications, 1997).
10. Eyring, L. The application of high-resolution electron microscopy to problems in solid state chemistry: The exploits of a peeping TEM. *J. Chem. Educ.* **57**, 565 (1980).
11. Reimschuessel, A. C. Chemical Instrumentation. *J. Chem. Educ.* **49**, A413–A419 (1972).
12. de Souza, W., Campanati, L. & Attias, M. Strategies and results of field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) in the study of parasitic protozoa. *Micron* **39**, 77–87 (2008).
13. Pawley, J. The Development of Field-Emission Scanning Electron Microscopy for Imaging Biological Surfaces. *Scanning* **19**, 324–336 (1997).
14. Čendak, T. *et al.* Indomethacin embedded into MIL-101

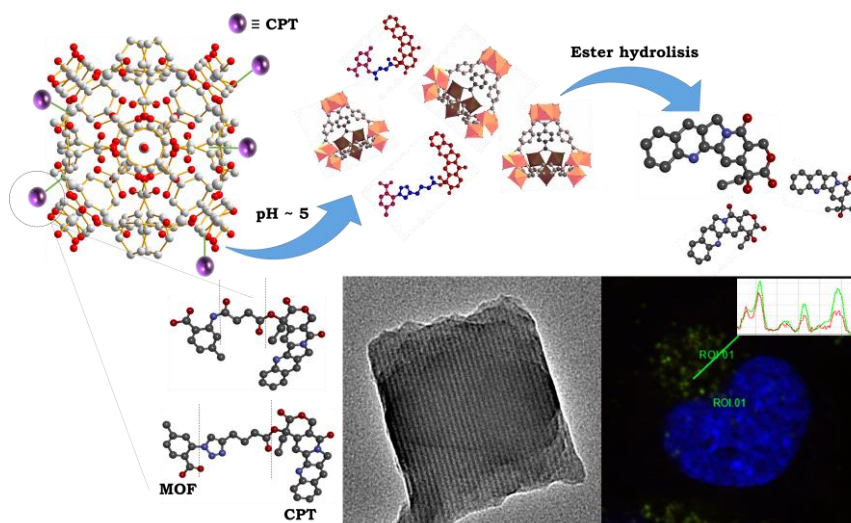
- frameworks: A solid-state NMR study. *J. Phys. Chem. C* **118**, 6140–6150 (2014).
15. Cabrera-García, A., Checa-Chavarria, E., Rivero-Buceta, E., Moreno, V., Fernández, E. & Botella, P. Amino modified metal-organic frameworks MIL-100(Fe) and MIL-101(Fe) as pH-responsive nanoplateforms for safety delivery of camptothecin. *J. Colloid Sci Interfaces* **Aceptado**, (2019).
 16. Zhang, Y. B. *et al.* Introduction of functionality, selection of topology, and enhancement of gas adsorption in multivariate metal-organic framework-177. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 2641–2650 (2015).
 17. Horcajada, P., Chevreau, H., Heurtaux, D., Benyettou, F., Salles, F., Devic, T., Garcia-Marquez, A., Yu, C., Lavrard, H., Dutson, C. L., Magnier, E., Maurin, G., Elkaïm & Serre, C. Extended and functionalized porous iron(III) tri- or dicarboxylates with MIL-100/101 topologies. *Chem. Commun. (Camb)*. **50**, 6872–4 (2014).
 18. Taddei, M., Dümbgen, K. C., van Bokhoven, J. A. & Ranocchiari, M. Aging of the reaction mixture as a tool to modulate the crystallite size of UiO-66 into the low nanometer range. *Chem. Commun.* **52**, 6411–6414 (2016).
 19. Norbedo, S., Dinon, F., Bergamin, M., Bosi, S., Aroulmoji, V., Khan, R. & Murano E. Synthesis of 6-amino-6-deoxyhyaluronan as an intermediate for conjugation with carboxylate-containing compounds: application to hyaluronan-camptothecin conjugates. *Carbohydr. Res.* **344**, 98–104 (2009).
 20. Feng, X., Pinaud, J., Chaikof, E. L., Taton, D. & Gnanou, Y. Sequential functionalization of janus-type dendrimer-like poly(ethylene oxide)s with camptothecin and folic acid. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **49**, 2839–2849 (2011).
 21. Tuci, G., Rossin, A., Xu, X., Ranocchiari, M., van Bokhoven, J. A., Luconi, L., Manet, I., Melucci, M., & Giambastiani, G. “Click” on MOFs: A Versatile Tool for the Multimodal Derivatization of N₃-Decorated Metal Organic Frameworks. *Chem. Mater.* **25**, 2297–2308 (2013).
 22. Savonnet, M. Bazer-Bachi, D., Bats, N., Perez-Pellitero, J., Jeanneau, E., Lecocq, V., Pinel, C., & Farrusseng, D. Generic Post-Functionalization Route from Amino-Derived Metal-Organic Frameworks. *J. Am. Chem. Soc.* **68**, 4518–4519 (2010).
 23. Mascharak, P. K. Convenient Synthesis of Tris(tetraethylammonium) Hexacyanoferrate(III) and Its Use as an Oxidant with Tunable Redox Potential. *Inorg. Chem.* **25**, 245–247 (1986).

24. Cabrera-García, A. Vidal-Moya, A., Bernabeu, Á., Sánchez-González, J., Fernández, E. & Botella P. Gd-Si oxide mesoporous nanoparticles with pre-formed morphology prepared from a Prussian blue analogue template. *Dalton Trans.* **44**, 14034–41 (2015).
25. Cabrera-García, A., Vidal-Moya, A., Bernabeu, Á., Pacheco-Torres, J., Checa-Chavarria, E., Fernández, E. & Botella, P. Gd-Si Oxide Nanoparticles as Contrast Agents in Magnetic Resonance Imaging. *Nanomaterials* 1–15 (2016). doi:10.3390/nano6060109
26. Clemmets, A. M., Muniesa, C., Landry, C. C. & Botella, P. Effect of surface properties in protein corona development on mesoporous silica nanoparticles. *RSC Adv.* **4**, 29134–29138 (2014).
27. Cabrera-García, A. Checa-Chavarria, E., Pacheco-Torres, J., Bernabeu-Sanz, Á., Vidal-Moya, A., Rivero-Buceta, E., Sastre, G., Fernández, E. & Botella, P. Engineered Contrast Agents in a Single Structure for T_1 - T_2 Dual Magnetic Resonance Imaging. *Nanoscale* **10**, 6349-6360 (2018).
28. *Handbook of Spectroscopy. Handbook of Spectroscopy* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., 2003).
29. CITOMETRIA DE FLUJO. Centro nacional de biotecnología. Universidad autónoma de Madrid. Disponible en: http://wwwuser.cnb.csic.es/~fotonica/Photonic_en/Review/citometria_de_flujo.htm
30. Resino, S. Citometría de Flujo. (2011). Available at: <http://epidemiologiamolecular.com/citometria-flujo/>.
31. Díaz Martínez, V. & Martos, M. C. Citometría de flujo: midiendo células. (2011). Disponible en: https://biotechspain.com/?iid=1104a_tecnica_citometria&itid=5&lan=es.
32. Na, H. B., Lee, J. H., An, K., Park, Y. I., Park, M., Lee, I. S., Nam, D.-H., Kim, S. T., Kim, S.-H., Kim, S.-W., Lim, K.-H., Kim, K.-S., Kim, S.-O., & Hyeon, T. *et al.* Development of a T_1 contrast agent for magnetic resonance imaging using MnO nanoparticles. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **46**, 5397–5401 (2007).
33. Blüml, S., Schad, L. R., Stepanow, B. & Lorenz, W. J. Spin-Lattice Relaxation Time Measurement by Means of a TurboFLASH Technique. *Magn. Reson. Med.* 289–295 (1993).
34. Henning, J., Nauerth, A. & Friedburg, H. RARE Imaging: A Fast Imaging Method for Clinical MR. *Magn. Reson. Med.* 823–833 (1986).
35. Henning, J. & Friedburg, H. Clinical Applications and

Methodological Developments of the RARE Technique. *Magn. Reson. Imaging* **6**, 391–395 (1988).

Capítulo IV.

Desarrollo de Nanomateriales para Transporte y Liberación Intracelular Controlada de Camptotecina Basados en Redes Organometálicas



4. Desarrollo de nanomateriales para transporte y liberación intracelular controlada de camptotecina basados en redes organometálicas

4.1 Fundamento

Como se adelantó en el capítulo 1, la mayoría de los medicamentos actualmente en uso no son muy específicos para las enfermedades que están destinados a tratar. Los fármacos de uso común tienen *ventanas terapéuticas* relativamente estrechas, lo que sugiere que sus eficacias se deben a diferencias relativamente pequeñas en su concentración entre el tejido sano y el enfermo en el cuerpo. En un esfuerzo por mejorar la especificidad de los medicamentos y minimizar sus efectos secundarios, la ciencia está examinando el potencial de las partículas diseñadas en el rango nanométrico para actuar como plataformas de entrega de fármacos.¹⁻⁵ Dado que los nanomateriales son muy variados en dimensiones, formas y propiedades, y pueden ser llevados a la célula por mecanismos endocitóticos. Cargar nanopartículas con un agente citotóxico o unir fármacos a su superficie puede ser una forma de llevar una alta 'carga útil' de un agente farmacológicamente activo a un sitio específico en el cuerpo. Si la partícula también está equipada con alguna característica de reconocimiento celular tal como un anticuerpo, el sistema resultante de este ensamblaje promete ser un sistema altamente específico para la administración de agentes quimioterapéuticos a ciertos tipos de tejido.⁶

En cuanto a la investigación actual en la búsqueda de nuevos tratamientos selectivos en el campo de la *nanomedicina* que

eliminen eficazmente las células tumorales evitando los indeseables efectos secundarios producidos por la quimioterapia.⁷ En este campo de aplicación, las redes organometálicas (MOF) han demostrado su aplicabilidad como vehículos farmacológicos eficientes desde 2006.^{8,9} Los MOF ofrecen propiedades muy atractivas, como alta porosidad, capacidad de diseño estructural y composicional y fácil funcionalización de su superficie, lo que hace que estos materiales sean adecuados para muchas aplicaciones diferentes,¹⁰ tales como adsorción de gases,¹¹ catálisis,¹² óptica no lineal¹³ o sensores.¹⁴ En nanomedicina, se ha aprovechado su carencia de toxicidad, su fácil reducción del tamaño de cristal a la nanoescala y la intrínseca labilidad relativa de los enlaces metal-ligando, lo que favorece su biodegradabilidad.¹⁵ También han demostrado ser muy eficientes como agentes de contraste en resonancia magnética de imagen, tomografía computerizada y en imagen óptica,¹⁶⁻¹⁸ como agentes sensibilizadores tanto en terapia fototérmica¹⁹ como fotodinámica²⁰ y como vectores para la liberación controlada de fármacos.¹⁸ En este contexto, los MOF pertenecientes a la familia de los MIL (Materiales del Instituto Lavoisier), formados por ligandos tipo carboxilato y hierro (III), elegido como catión no tóxico, han demostrado un enorme potencial en la carga y liberación segura de grandes cantidades de fármacos.²¹⁻²³

La 20-(S)-camptotecina (CPT) es un alcaloide natural con potente actividad antitumoral contra un amplio espectro de tipos de cáncer.^{24,25} Desde su descubrimiento por parte de Wall y colaboradores en 1966, se han hecho grandes esfuerzos en la implementación de este fármaco en los tratamientos contra el cáncer actuales.²⁶ Sin embargo, esta molécula por sí sola no

tiene aplicación oncológica, debido a su solubilidad extremadamente baja en agua y en la mayoría de los disolventes orgánicos, su baja estabilidad a pH ácido, en el cual se rompe su anillo de lactona disminuyendo drásticamente su actividad además de su fuerte toxicidad, capaz de producir cistitis hemorrágica y miotoxicidad.^{27,28} A pesar de las desventajas que presenta esta molécula, su poderosa acción antitumoral ha llevado a la comunidad científica a buscar nuevas formas de implementación de este medicamento en terapias contra el cáncer. A pesar de esto, hasta la fecha hay muy pocos trabajos en los que la molécula de CPT se haya retenido sobre la estructura de un MOF, siempre a través de atrapamiento *in situ* o adsorción postsintética,²⁹⁻³¹ dando sistemas de liberación de fármacos muy inestables, los cuales muestran una liberación significativa e inespecífica durante el transporte.

Con el fin lograr una administración eficiente y descarga de CPT intracelular, en este capítulo presentamos nuevos sistemas de liberación de fármacos basados en las estructuras de los nanoMOF MIL-100(Fe) y MIL-101(Fe) modificadas con grupos amino. Seleccionamos estos materiales debido a sus grandes dimensiones de poro, en el rango mesoporoso, lo que hace posible la acomodación de moléculas de CPT dentro de sus cavidades internas, y hemos unido covalentemente el fármaco a través de enlaces específicos a través de los grupos amino. Los conjugados resultantes incorporaron casi un 20% de CPT a su estructura, a nuestro conocimiento la mayor cantidad de CPT publicada hasta la fecha en un nanofármaco. Estos sistemas mostraron una alta estabilidad a pH fisiológico. Además, debido a la carga positiva de su superficie, los

derivados del MIL-101(Fe) que contienen CPT presentaron muy buena internalización celular en ensayos *in vitro* y también mostraron una importante sensibilidad al pH ácido, que puede estimular la liberación del fármaco después de la captación celular en la fase lisosómica. mejorando la liberación controlada y segura del fragmento antitumoral.

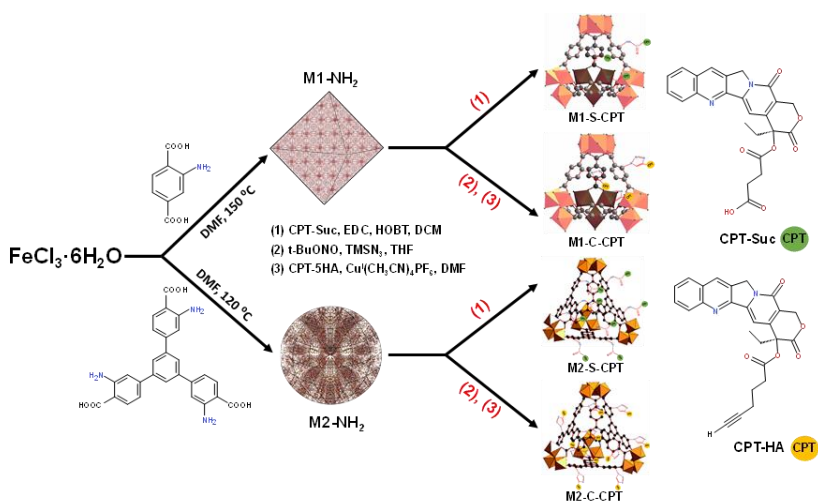
En el Esquema 1 se describe el procedimiento de obtención de estas nanomedicinas. Los MOF que contenían CPT se prepararon por modificación post-sintética de los grupos amino que contenían estos materiales MIL-100(Fe) y MIL-101(Fe). En un primer paso, los MOF se sintetizaron a escala nanométrica con ligandos tipo policarboxilato funcionalizados con grupos amino y hierro (III). Paralelamente, se prepararon profármacos de CPT con dos grupos de enlace diferentes. Luego, en una segunda etapa, se incorporaron estos profármacos de CPT sobre la estructura de los MOF por formación de enlaces amida o química click.

4.2 Resultados

4.2.1 Síntesis y caracterización de dos MOF funcionalizados con grupos amino primarios libres.

Se han utilizado dos estructuras organometálicas diferentes como materiales de base para la unión covalente y estable de la molécula antitumoral camptotecina. Los materiales tipo policarboxilato de hierro (III) MIL-101(Fe) (M1-NH₂) y MIL-100(Fe) (M2-NH₂) funcionalizados con grupos amino se sintetizaron a escala nanométrica mediante el uso de metodologías de síntesis solvotermal. En el caso del M1-NH₂, se obtuvieron nanopartículas monodispersas octaédricas con un

diámetro promedio de 193 ± 38 nm, en las que los planos (111) de su estructura podían apreciarse con una distancia interplanar de 5,1 nm (**Figura 1a**) así como el patrón típico de XRD en polvo de estos materiales (**Figura 2** y **Figura II.1** en el ANEXO II).



Esquema 1. Esquema de síntesis de los nanoMOFs de Fe(III) cargados con CPT.³²

Las isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno mostraron que el material M1-NH₂ tiene una gran superficie externa ($> 1800 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) y poros grandes de alrededor de 3,9 nm de diámetro (Tabla 1, **Figura II.2** en el ANEXO II), también publicado por otros autores,¹⁸ mientras que el análisis elemental reveló una concentración de grupos amino de $3,6 \text{ mmol g}^{-1}$, valor muy próximo al cálculo estequiométrico ($3,8 \text{ mmol g}^{-1}$).

En el caso del material M2-NH₂, introdujimos ácido acético en el proceso sintético para modular la velocidad de crecimiento del cristal, de la misma forma que se ha hecho con otras estructuras tipo MOFs,^{17,33} obteniendo nanopartículas monodispersas de aproximadamente 117 ± 33 nm de diámetro promedio, según lo determinado por medidas en TEM (**Figura 1b**). Sin embargo, con el uso del ligando BTB-NH₂ con tres grupos amino primarios por molécula en la síntesis del M2-NH₂, dio como resultado polímeros de coordinación con baja cristalinidad, como se muestra en el patrón de XRD (**Figura 2**).

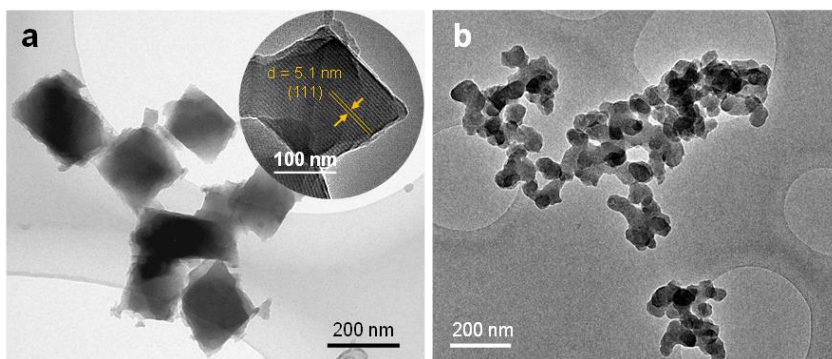


Figura 1. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de (a) M1-NH₂ y (b) M2-NH₂.³²

Desafortunadamente, el área BET y el volumen de poro de este material son muy reducidos (Tabla 1 y **Figura II.2** en el ANEXO II), a pesar de los grandes valores teóricos.³⁴ Este fenómeno se ha atribuido al alto grado de entrecruzamiento entre los ligandos BTB-NH₂ y a su gran diámetro de poro (7,2 nm), publicado anteriormente.^{34,35} También en consonancia con el ligando multifuncionalizado utilizado para la síntesis, este material presentó una concentración de grupos amino mayor de 5,2 mmol g⁻¹, respecto al cálculo estequiométrico que da 4,4

mmol g⁻¹. Asignamos tal discrepancia a los defectos estructurales y cierta adsorción del ligando BTB-NH₂.

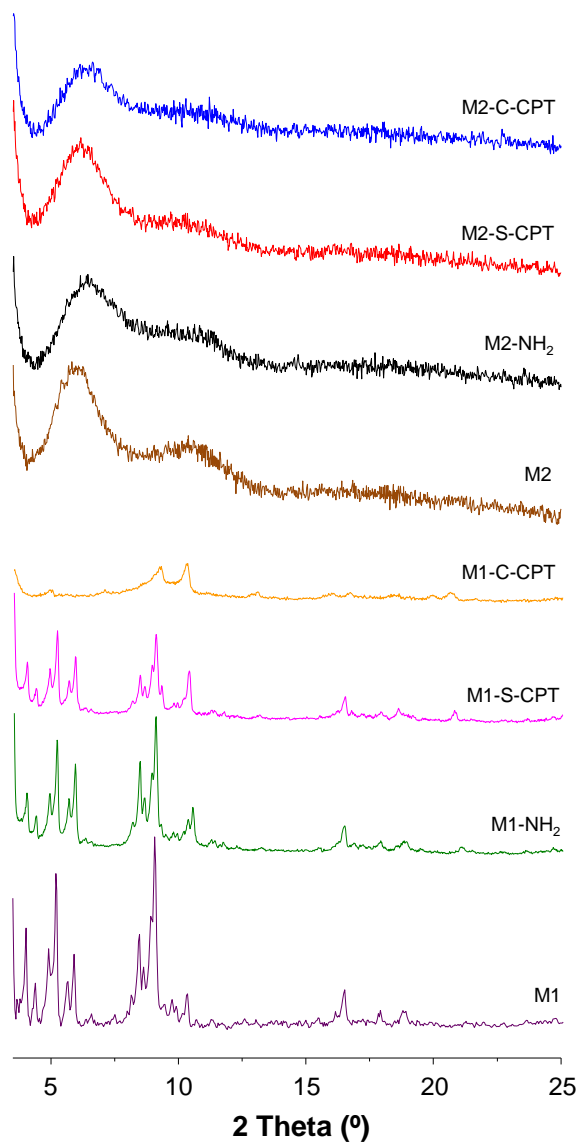


Figura 2. Patrones de difracción de rayos X en polvo de los materiales M1-NH₂ y sus derivados con CPT (a) así como M2-NH₂ y sus derivados con CPT (b).³²

Tabla 1. Propiedades composicionales y texturales de los materiales para liberación de fármacos.

Muestra	Composición	CPT ^a	Tamaño (nm) ^b	BET ^c			Potencial ζ (mV)
				Área (m ² ·g ⁻¹)	Vp (cm ³ ·g ⁻¹)	Dp (nm)	
M1-NH ₂	Nano-MIL-101(Fe)-NH ₂	-	193 ± 38	1824	0,38	3,9	+16,2
M1-S-CPT	Nano-MIL-101(Fe)-Suc-CPT	17,6	189 ± 61	1254	0,16	3,6	+6,4
M1-C-CPT	Nano-MIL-101(Fe)-Click-CPT	18,0	194 ± 81	143	0,03	3,4	+3,4
M1-A-CPT	Nano-MIL-101(Fe)-NH ₂ + CPT	6,2	189 ± 85	169	0,05	3,8	+7,8
M1-RhB	Nano-MIL-101(Fe)-RhB	-	185 ± 56	1325	0,14	3,8	+9,4
M2-NH ₂	Nano-MIL-100(Fe)-NH ₂	-	117 ± 33	88	0,09	7,2	-31,5
M2-S-CPT	Nano-MIL-100(Fe)-Suc-CPT	1,3	112 ± 37	71	0,07	3,5	-27,0
M2-C-CPT	Nano-MIL-100(Fe)-Click-CPT	9,2	132 ± 51	70	0,09	3,6	-45,8
M2-A-CPT	Nano-MIL-100(Fe)-NH ₂ + CPT	0,9	98 ± 28	71	0,08	3,1	-19,3
M2-RhB	Nano-MIL-100(Fe)-RhB	-	111 ± 38	79	0,08	3,9	-27,7

^a Porcentaje en peso. Determinado por HPLC con detección por fluorescencia. ^b Determinado por estudios en TEM de al menos 200 partículas. ^c Determinado de las isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno (método BET-BJH); área = área superficial; Vp = volumen de poro; Dp = diámetro de poro.

4.2.2 Incorporación de camptotecina

Como se comentó anteriormente, para la incorporación de CPT sobre MOF funcionalizados con grupos amino, el fármaco se esterificó previamente con un ligando conector. Posteriormente, estos profármacos de CPT se conjugaron con los grupos amino primarios de los nanoMOF a través de un enlace amida o química click. No se observaron cambios morfológicos tras estos tratamientos post-sintéticos (**Figura II.3** en el ANEXO II).

En el primer caso, el enlace amida se forma entre los grupos amino y el ácido carboxílico terminal del succinato de camptotecina (CPT-Suc). Esta metodología nos permitió incorporar casi un 18% en peso de CPT en el M1-NH₂, lo que es consistente con su alta área superficial y cristalinidad. La incorporación produjo una reducción significativa del área superficial y del diámetro de poro (Tabla 1), que está asociada con cierto bloqueo de los poros mediante la CPT conjugada, aunque no se observó cambio en la cristalinidad según el patrón de XRD (**Figura 2**, M1-S-CPT). Por el contrario, la muestra M2-NH₂ solo incorporó un 1% en peso de CPT a través del mismo procedimiento. Atribuimos esta reducida reactividad y pequeña capacidad de carga de fármaco a la accesibilidad obstaculizada a los grupos amino en la estructura del MOF con baja cristalinidad y área superficial, como ya han mostrado otros autores.³⁶⁻³⁸

La formación exitosa de los enlaces amida entre el CPT-Suc y el M1-NH₂ se comprobó mediante la aparición de dos bandas anchas de vibración de tensión N-H a 3460 cm⁻¹ y 3362 cm⁻¹ en el espectro FTIR.³⁹ Además, la banda de baja intensidad a 1745 cm⁻¹ corresponde a la vibración de tensión del grupo

carbonilo de la lactona de la CPT ($\nu_{C2O} = O22$) (**Figura 3**).⁴⁰ Esta banda no es evidente en el espectro FTIR del M2-S-CPT, debido a la baja cantidad de CPT incorporada.

Como segunda estrategia para formar enlaces covalentes con la CPT a nanoMOF funcionalizados con grupos amino, aprovechamos la química click,⁴¹ utilizando el profármaco 5-hexinoato de camptotecina (CPT-HA). En primer lugar, hicimos reaccionar las nanopartículas del MOF que contienen grupos amino con nitrito de terc-butilo (t-BuONO) y azidotrimetilsilano (TMSN₃) para convertir cuantitativamente los grupos -NH₂ en grupos azido (-N₃), y luego completamos el acoplamiento [3+2] con la adición del CPT-HA.

Mediante este protocolo, incorporamos un 18% en peso de CPT en el M1-C-CPT y un 9% en peso de CPT en el M2-C-CPT. La mayor eficiencia del proceso de postfuncionalización a través de química click se refleja en la alta carga de CPT obtenida sobre la muestra M2-NH₂, a pesar de la menor accesibilidad hacia los grupos amino, antes comentada. Desafortunadamente, el producto M1-N₃ sufrió una pérdida significativa de cristalinidad (**Figura II.4** en el ANEXO II) y, en consecuencia, una caída brusca del área superficial (Tabla 1). Este efecto no fue tan aparente para M2-N₃, debido a la menor cristalinidad y área superficial de la muestra M2-NH₂ primigenia (**Figura II.4** en el ANEXO II, Tabla 1).

La formación de grupos azida en los nanoMOFs se controló mediante la aparición de una banda de tensión asimétrica debido al grupo de azida a 2120 cm⁻¹ en el espectro FTIR.⁴² Esta banda fue intensa en las muestras M1-N₃ y M2-N₃ (**Figura II.5** en el ANEXO II), y se suprimió por completo después de

completar la adición del alquino. Además, la incorporación de la CPT se demostró por la aparición de la banda del grupo carbonilo a 1750 cm^{-1} (**Figura 3**).⁴⁰

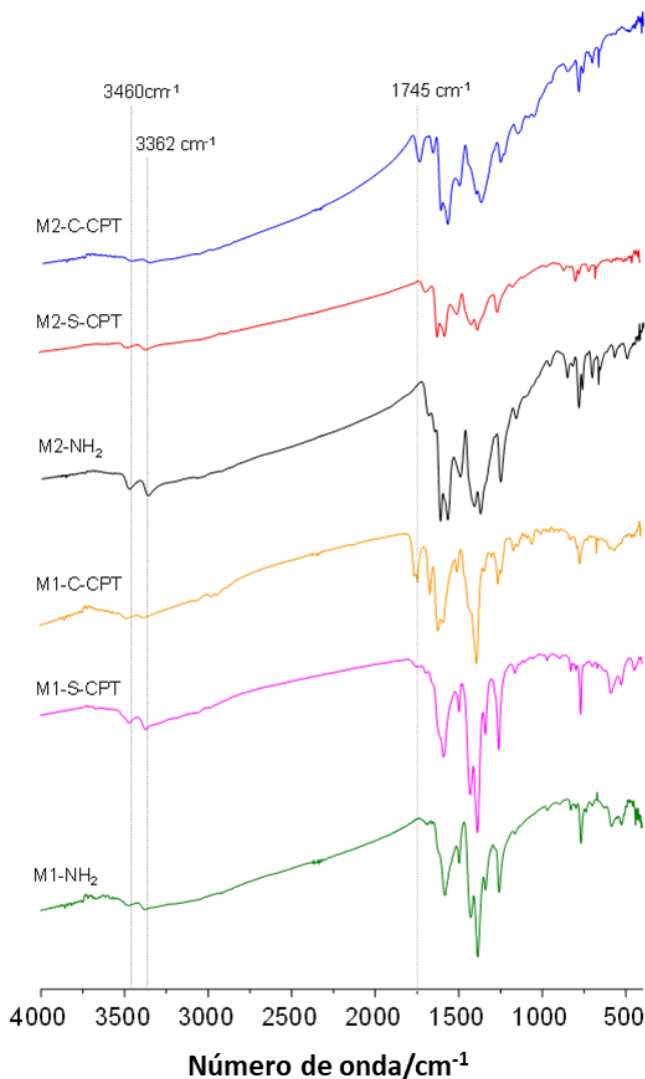


Figura 3. Espectros de FTIR de los materiales M1-NH₂ y sus derivados con CPT (a) y M2-NH₂ y sus derivados con CPT (b), mostrando sus principales bandas de vibración.³²

Con fines comparativos, también cargamos CPT por adsorción física en los nanoMOF funcionalizados con grupos amino. De esta forma, las muestras M1-A-CPT y M2-A-CPT, incorporaron, respectivamente, un 6 y un 1% en peso de CPT, lo que es consistente con las diferencias de área superficial observadas entre estas muestras. No se detectó ningún cambio visible en la cristalinidad (**Figura II.6** en el ANEXO II), pero el M1-NH₂ sufrió una importante reducción del área superficial, debido al bloqueo de los poros internos (Tabla 1, **Figura II.7** en el ANEXO II).

4.2.3 Estudio de la estabilidad de los materiales y de la influencia del pH

Los nanoMOF cargados con CPT pueden sufrir una liberación inespecífica en condiciones fisiológicas, principalmente por hidrólisis directa del enlace éster entre el fármaco y el vehículo, luego la liberación de CPT libre, o por desintegración de la estructura del material, que libera diferentes fragmentos tipo CPT+cadena lateral. En este contexto, la estabilidad de los conjugados nanoMOF-CPT se probó en DMEM (pH 7,4) complementado con un 10% de SFB y 1% de antibiótico a 37 °C con agitación (1500 rpm, Thermomixer®).

Las muestras M1-S-CPT y M1-C-CPT descargaron, respectivamente un 8 y un 12% de la CPT total en la primera hora, y no hubo liberación adicional en las 48 h de ensayo (**Figura 4a, b**). Este patrón de liberación correspondía principalmente a profármacos de CPT físicamente adsorbidos (CPT-Suc o CPT-HA, según lo detectado por HPLC-FL), debido a la gran área superficial y la porosidad altamente ordenada del material M1-NH₂. Además, también se detectó una cantidad

muy pequeña de CPT libre, probablemente causada por la hidrólisis del profármaco. Por el contrario, la CPT covalentemente unida permaneció estable en condiciones fisiológicas. Esta liberación de CPT inicial no se observó sobre la muestra M2-C-CPT, ya que su menor cristalinidad y el área BET evitan fuertemente la adsorción física de los derivados de CPT, con una liberación de CPT inespecífica limitada al 2 % (**Figura 4c**). M2-S-CPT no se consideró para este estudio debido a su menor contenido de CPT.

En este punto, las nanopartículas con CPT, preparadas por adsorción física revelaron ser muy inestables en el medio de cultivo celular y, por ejemplo, la muestra M1-A-CPT descargó casi el 50% de su carga terapéutica en las primeras 6 horas y completó el proceso en 24 h (**Figura II.8** en el ANEXO II). No se tomó ninguna medida de liberación de M2-A-CPT por la misma razón que para M2-S-CPT. Además, algunos MOF basados en carboxilatos de hierro (III) son sensibles al pH ácido moderado, como el de los lisosomas, que acelera su velocidad de degradación. Esto se debe a la protonación de los ligandos orgánicos y la pérdida de especies de $Fe^{3+/2+}$, lo que conduce al colapso de la estructura. En nuestro caso, después de la internalización celular de las nanopartículas del MOF y el tráfico endosomal-lisosómico, esto puede liberar diferentes derivados de CPT al medio citosólico, donde las enzimas específicas hidrolizan el enlace éster entre la CPT y la cadena orgánica lateral.^{19,43,44} En base a esto, sometimos las muestras que contenían CPT M1-S-CPT, M1-C-CPT y M2-C-CPT a experimentos de estabilidad en medio DMEM acidificado (pH 5.0 o pH 3.0) suplementado con un 10 % de FBS y 1 % de antibiótico a 37 °C con agitación (1500 rpm, Thermomixer®).

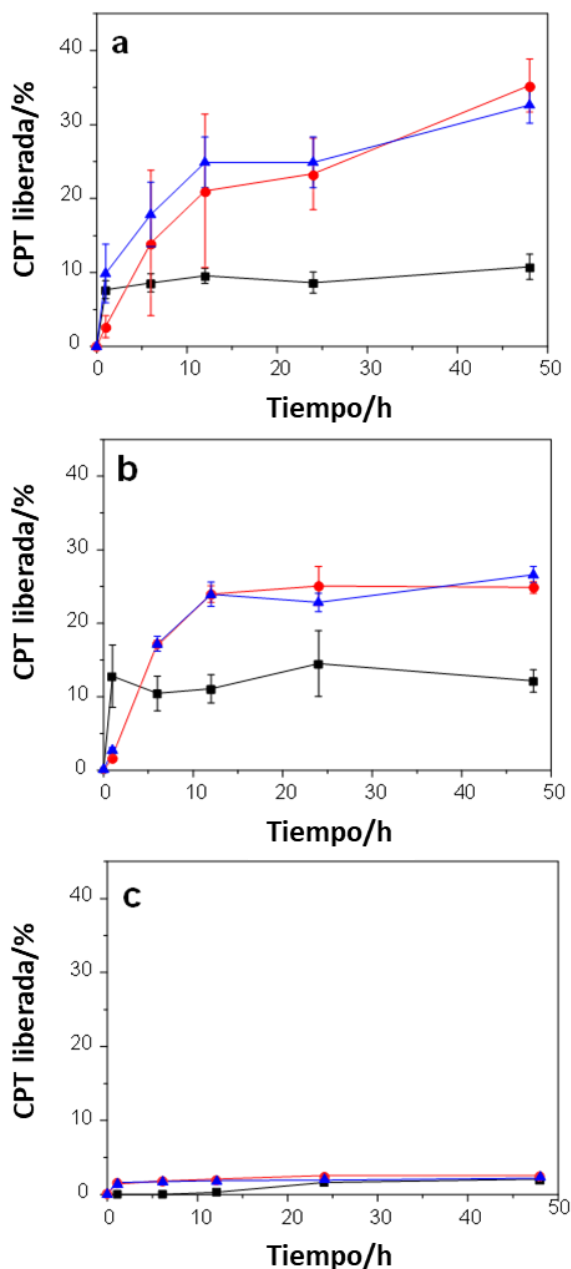


Figura 4. Perfiles de estabilidad y liberación de los materiales M1-S-CPT (a), M1-C-CPT (b) y M2-C-CPT (c) bajo condiciones fisiológicas y pH ácido. Leyenda: pH = 7.4 (■), pH = 5.00 (●), pH = 3.00 (▲).³²

Los resultados (**Figura 4**) mostraron un aumento importante en la liberación de CPT para los sistemas de liberación de fármacos basados en el MIL-101(Fe) a pH 5, estimado en más del 35 % para M1-S-CPT y el 23 % para M1-C-CPT a las 48 h, no observándose una descarga adicional de CPT a pH 3.

La mayoría de esta CPT se liberó como fragmentos de la degradación de la estructura del MOF. Dichos fragmentos se identificaron por UPLC-MS/MS con la fórmula general CPT-(ligando puente)-(ligando estructural) y se presentan en el ANEXO II (compuestos 1 y 1' en la **Figura II.9**) junto con sus correspondientes curvas de liberación (**Figura II.10**). Además, también se liberaron cantidades significativas de los profármacos de CPT físicamente adsorbidos (CPT-Suc o CPT-HA), y también se detectó una pequeña cantidad de CPT libre, que resulta de la hidrólisis del enlace éster promovido en medio ácido.

Por el contrario, M2-C-CPT se vio muy poco afectado por el pH ácido. Como se comentó anteriormente, la menor cristalinidad y el área de la superficie de los materiales basados en el MIL-100(Fe) imposibilita la difusión dentro de la red estructural, lo que minimiza el efecto de las condiciones del medio sobre los componentes de la estructura.

4.2.4 Estudio de internalización celular

Los estudios de captación celular sobre la línea celular HeLa se llevaron a cabo con derivados de los nanoMOF de hierro (III) que contenían rodamina B (RhB). Estos incorporaron aproximadamente un 1% del fluorocromo sin cambios significativos en la cristalinidad (datos no mostrados), y una

ligera reducción del área superficial atribuida a algún bloqueo de poros por la molécula orgánica (Tabla 1). El análisis de citometría de flujo mostró grandes diferencias en la internalización celular entre el M1-RhB y el M2-RhB a baja concentración de nanopartículas ($1-5 \mu\text{g mL}^{-1}$, **Figura 5** y Tabla 2). Por ejemplo, a $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ M1-RhB se asimiló en un $95.9 \pm 1.0 \%$, mientras que solo un $20.3 \pm 13.0 \%$ de M2-RhB se internalizó en la célula. Achacamos este efecto al alto potencial negativo del M2-NH₂ y sus derivados en medio fisiológico (Tabla 1), que limita la difusión intracelular debido a la repulsión electrostática con la membrana celular.⁴⁴ Por el contrario, los materiales derivados del M1-NH₂ mostraron un potencial ζ positivo (Tabla 1), favoreciendo el proceso de internalización celular.

Tabla 2. Resultados de citometría de flujo sobre células HeLa incubadas con diferentes concentraciones de partículas de las muestras funcionalizadas con RhB.

Muestra	$1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (%)	$5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (%)	$25 \mu\text{g mL}^{-1}$ (%)	$50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (%)
M1-RhB	81.7 ± 11.5	95.9 ± 1.0	98.4 ± 0.9	100 ± 0.004
M2-RhB	22.1 ± 28.9	20.3 ± 13.0	80.5 ± 3.8	100 ± 0.033

Los estudios adicionales de captación celular se realizaron por microscopía confocal de barrido láser. Las células HeLa se incubaron con las muestras M1-RhB o M2-RhB en el intervalo de $5-10 \mu\text{g mL}^{-1}$ durante 24 horas, y las nanopartículas internalizadas se visualizaron mediante experimentos de colocalización. En el caso de M1-RhB, se observó claramente la internalización satisfactoria del material por las células HeLa, con casi 100% de colocalización de nanopartículas y lisosomas (**Figura 5d-f**). Por el contrario, M2-RhB experimentó una menor

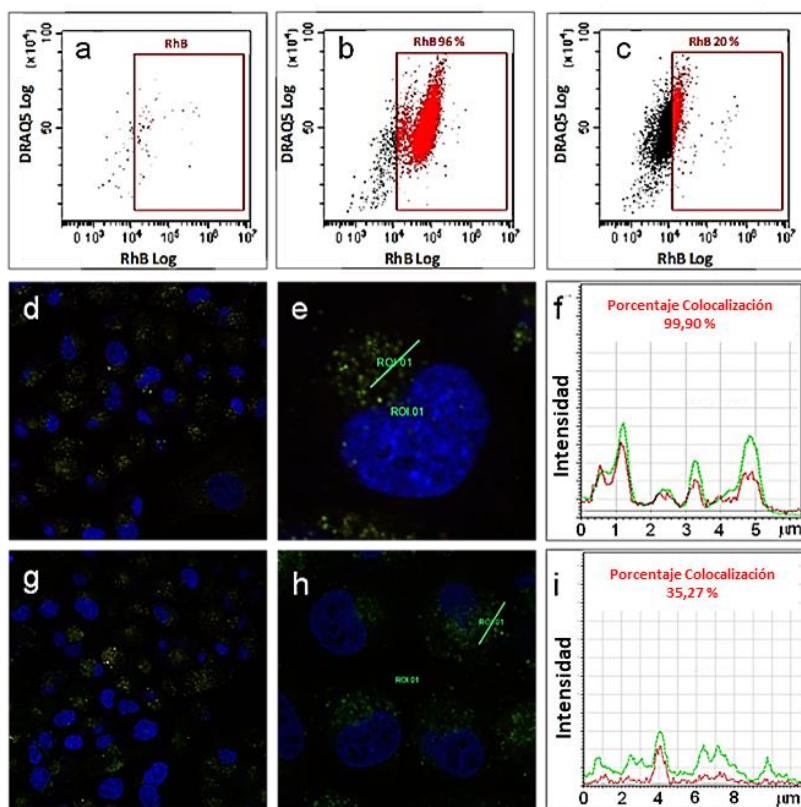


Figura 5. Gráficos representativos de los ensayos de citometría de flujo para células HeLa incubadas 24 h con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de los MOFs cargados con RhB, después de la tinción con DRAQ5TM. Se muestran los gráficos bidimensionales para (a) células HeLa. (b) M1-RhB. (c) M2-RhB. En las regiones marcadas se cuantificó: células sin nanopartículas (puntos negros) y células con nanopartículas (puntos rojos). Los experimentos se hicieron por triplicado. Se presentan los estudios de colocalización para M1-RhB (d-f) y M2-RhB (g-i) a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Las imágenes d y g muestran una visión general de las células después de ser incubados con los materiales, los cuales se han marcado en rojo (nanopartículas con RhB en el citosol), lysotracker® (verde, orgánulos ácidos) y DAPI (azul, núcleos celulares). Las imágenes e y h presentan detalles de estas imágenes mostrando colocalización de las nanopartículas de M1-RhB y M2-RhB con los orgánulos ácidos (puntos amarillos). Las líneas verdes indican las regiones de interés (ROI) seleccionadas para los gráficos de intensidad de señal (f, i).³²

internalización celular (estimada en más del 35%, **Figura 5g-i**), lo que es consistente con los resultados de la citometría de flujo.

4.2.5 Estudio de citotoxicidad

La actividad citotóxica se analizó mediante el ensayo MTT, únicamente con derivados del M1-NH₂ con CPT (M1-S-CPT y M1-C-CPT). No se realizaron más estudio *in vitro* sobre la muestra M2-C-CPT, debido a su menor contenido de CPT y difusión intracelular limitada. Además, las muestras con CPT adsorbida físicamente (como, M1-A-CPT) no son apropiadas para estudios *in vitro* o *in vivo*, ya que no pueden imponer ninguna liberación controlada sobre el fármaco.

En primer lugar, probamos la biocompatibilidad del material no cargado (M1-NH₂) sobre las líneas celulares HeLa y SH-SY5Y en el rango de concentraciones de nanopartículas correspondiente. Los resultados (**Figura 6**) indican que incluso a la mayor carga de partículas (100 µg mL⁻¹), la viabilidad celular relativa era superior al 80 %. A pesar de las limitaciones del ensayo MTT para una determinación precisa de la viabilidad celular, estos resultados corresponden a un perfil de biocompatibilidad aceptable.⁴⁵ Posteriormente, se usó un rango de dosis de 0,001-20 µg mL⁻¹ de CPT equivalente con las muestras M1-S-CPT y M1-C-CPT. Para fines comparativos, también se determinó la actividad citotóxica de la CPT (**Figura II.11** en el ANEXO II). Ambos materiales evaluados presentaron valores similares de concentración inhibitoria máxima al 50 % (IC₅₀), lo que es consistente con su carga de CPT similar. Sin embargo, la actividad citotóxica fue menor que la de la CPT libre (Tabla 3). En este sentido, se ha demostrado que la

esterificación de la CPT sobre nanopartículas puede limitar la división enzimática de ésteres en el citosol, impidiendo la liberación completa y limitando la actividad citotóxica.^{31,43}

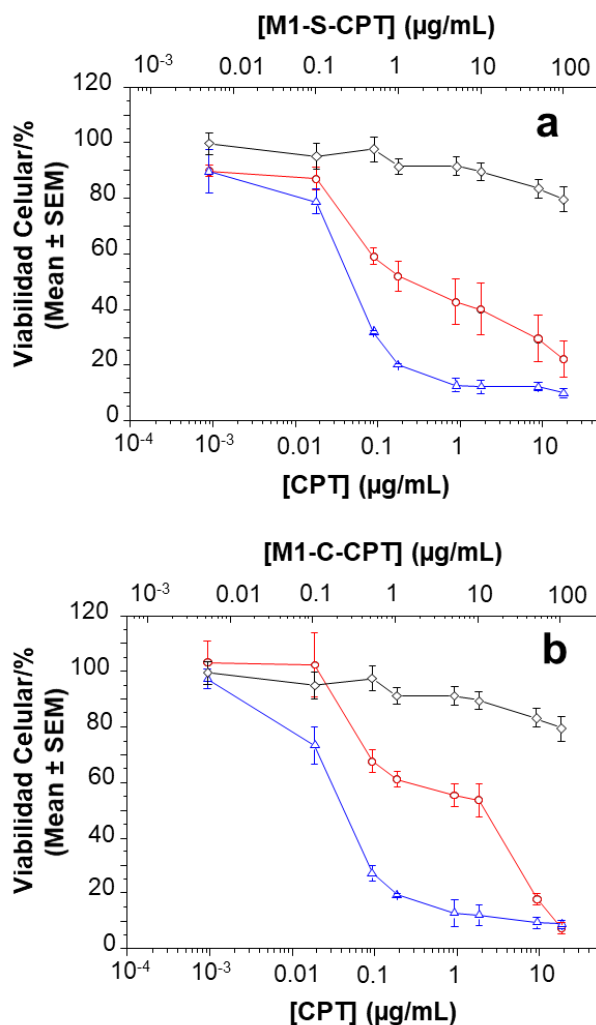


Figura 6. Ensayos de viabilidad celular MTT en las líneas celulares HeLa (○) y neuroblastoma SH-SY5Y (△). (a) M1-S-CPT. (b) M1-C-CPT. La concentración de muestra se refiere a equivalentes de CPT (escala inferior). El material no cargado (M1-NH₂) se probó sobre la línea celular HeLa (◇), y su concentración se muestra en la escala superior.³²

Tabla 3. Valores de IC₅₀ para los derivados del MIL-101 sobre las líneas celulares HeLa y neuroblastoma.

Línea celular	CPT ^a	M1-S-CPT ^a	M1-C-CPT ^a
HeLa	0,003 ± 0,001	0,078 ± 0.016	0,063 ± 0.015
Neuroblastoma (SH-SY5Y)	9,77·10 ⁻⁴ ± 3,7·10 ⁻⁵	0,040 ± 3.2·10 ⁻³	0,029 ± 2.5·10 ⁻³

^a Cada valor indica la media ± SEM (µg/mL). Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

4.3 Discusión

La CPT ha sido conjugada covalentemente sobre diferentes nanoplateformas, como las ciclodextrinas⁴⁶ o nanopartículas de sílice.⁴³ Sin embargo, ninguno de estos soportes puede incorporar cantidades del fármaco superiores al 10% en peso. La introducción de CPT en estructuras organometálicas mediante enlaces covalentes ha permitido lograr una carga de fármaco superior (hasta un 18%). Hemos encontrado que la cristalinidad del material y su área superficial determinan el acceso a los grupos amino y, en consecuencia, la carga de CPT y su liberación. Las dramáticas diferencias entre las estructuras del MIL-101(Fe) y el MIL-100(Fe) pueden deberse a la ocupación estructural selectiva de los retículos más grandes, en el caso del MIL-100(Fe), o completas en el MIL-101 (Fe).⁸

Para la incorporación covalente de la CPT en los MOFs funcionalizados con grupos amino, el fármaco se esterificó previamente con una cadena enlazante, que se puede unir sobre los grupos amino primarios mediante enlaces amida o química click. No se observan diferencias significativas para el M1-NH₂, que es consistente con un nivel de carga de fármaco cercano a la capacidad máxima del material. Sin embargo, la

superior eficiencia del proceso de química click consigue una mejora significativa en la incorporación de CPT en la muestra de área superficial más baja M2-NH₂.⁴¹

Estos materiales presentan una buena estabilidad en condiciones fisiológicas, no observándose descarga del fármaco conjugado covalentemente a pH 7,4, aunque hay alguna liberación inicial de especies adsorbidas físicamente, principalmente en los derivados del M1-NH₂, ya que su gran área superficial promueve esta acción. Por el contrario, las muestras obtenidas solamente por adsorción física de la CPT en los poros de las estructuras del M1-NH₂ o del M2-NH₂ son inaceptables como sistemas de liberación de fármacos, ya que no pueden imponer ningún mecanismo específico de descarga del fármaco, perdiendo más del 50% de su carga terapéutica en las primeras etapas del proceso por liberación no específica.

Por el contrario, el perfil de liberación de los conjugados covalentes de CPT con estructura del MIL-101(Fe) cambia drásticamente a pH ácido. Aquí, debe tenerse en cuenta que después de la captación celular, el tráfico endosomolítico (lúmenes lisosómicos pH 4,5-5)⁴⁷ promueve la descarga de medicamentos para los sistemas sensibles a los ácidos. En este contexto, hemos encontrado a pH 5 un aumento en la liberación de CPT para los sistemas de liberación de fármacos basados en el MIL-101(Fe) de 2 a 4 veces superior con respecto al pH fisiológico. En realidad, la mayoría de los estudios recientes sobre los MOF sensibles al pH para liberación controlada de fármacos se han llevado a cabo con materiales tipo ZIF (principalmente el ZIF-8), debido a la alta sensibilidad del anillo de imidazol en condiciones ácidas.^{48,49} Así como otras

estructuras funcionales de MOFs que contienen unidades de borato,⁵⁰ fosfato⁵¹ o ligandos policarboxílicos^{52,53} son propensos a la protonación y desensamblaje de la red en condiciones ácidas. En el caso de las muestras M1-S-CPT y M1-C-CPT, el pH ácido promueve la protonación de los grupos carboxilato, lo que lleva a la pérdida de especies de hierro y al colapso de la estructura. Como resultado, la CPT liberada en su mayoría se encuentra acoplada al correspondiente ligando estructural. Se espera que dicha digestión previa de la estructura del MIL-101(Fe) por la actividad lisosómica allane el camino para una liberación mejorada de la CPT a través de la hidrólisis del éster en el citosol por carboxilasas específicas. Por el contrario, es conocido que la degradación de la estructura del MIL-100(Fe) bajo pH ácido es muy gradual e incompleta,⁵² ya que su baja cristalinidad y área superficial dificultan la difusión interna y, en ese sentido, el material M2-C-CPT mostró poca liberación adicional de fármaco con respecto al pH fisiológico.

Hemos encontrado diferencias significativas en la internalización celular entre los materiales M1-NH₂ y M2-NH₂ cargados con CPT, tanto en citometría de flujo como en estudios por microscopía confocal de barrido láser. Por un lado, se debe tener en cuenta que la carga positiva de la estructura del MIL-101(Fe) favorece un fuerte proceso de opsonización con las proteínas séricas en el medio de cultivo celular, lo que resulta en la formación de una corona de proteínas y, como consecuencia, la endocitosis se ve altamente promovida.⁵⁴ Por otro lado, el potencial ζ muy negativo de los derivados del MIL-100(Fe) contribuye a la estabilidad coloidal en el medio fisiológico,^{54,55} pero limita la captación celular debido a la repulsión electrostática sobre la membrana

celular.⁵⁶ Dicha difusión intracelular limitada, además de su menor carga de CPT en la muestra M2-NH₂, nos llevó a excluir los sistemas de liberación de fármacos basados en el MIL-100(Fe) de otros estudios *in vitro*.

La actividad biológica de los nuevos conjugados de CPT con nanopartículas del MIL-101(Fe) funcionalizadas con grupos amino se probó sobre las líneas celulares HeLa y neuroblastoma, mostrando menos citotoxicidad que la CPT libre, con valores de IC₅₀ 1 orden de magnitud superiores al fármaco libre. Esto no es sorprendente, ya que el mecanismo esperado de liberación intracelular del fármaco (hidrólisis del enlace éster 20-O por las carboxilasas citosólicas después de la captación celular) se ve afectado por algunas restricciones estéricas que inhiben un proceso de liberación completo. De hecho, se conocen limitaciones comparables para la liberación intracelular completa de CPT y valores más bajos de IC₅₀ en otros sistemas de liberación de fármacos donde el fármaco se encuentra unido covalentemente al vehículo.^{43,46,57} Sin embargo, la estabilización de la CPT en los poros del MOF asegura que el fármaco no sea liberado en la circulación y que su activación solo es posible cuando las nanopartículas se internalizan en las células tumorales. En este sentido, la alta capacidad de carga de CPT por parte del material MIL-101(Fe) proporciona una alta actividad citotóxica incluso a dosis bajas y una descarga intracelular del fármaco sensible a estímulos, debido a la alta sensibilidad de estos sistemas de liberación controlada de fármacos a pH ácido, que son propiedades deseadas para la administración *in vivo* de fórmulas farmacéuticas.

4.4 Conclusiones parciales

Hemos desarrollado novedosos sistemas de liberación controlada de fármacos basados en nanoMOFs funcionalizados con grupos amino, MIL-100(Fe) y MIL-101(Fe). NanoMOF a los cuales se les ha unido covalentemente CPT. Para este fin, hemos esterificado la CPT con diferentes cadenas que portaban grupos funcionales orgánicos para la unión al material a través de la conjugación con los grupos amino de la estructura de los MOFs mediante amidación o química click. Los nanovehículos de CPT resultantes incorporaron casi el 20% de esta molécula y mostraron una alta estabilidad a pH fisiológico, sin liberación inespecífica del fármaco unido covalentemente.

Los derivados del MIL-101(Fe) cargados con CPT presentan una internalización celular mejorada debido a su potencial ζ positivo y una fuerte respuesta al pH ácido, aumentando la descarga del fármaco de 2 a 4 veces a pH 5, lo que estimula la liberación intracelular por actividad endosomolítica. En general, estos nanoMOFs constituyen un vehículo apropiado para la administración segura de la muy tóxica molécula de CPT a las células cancerosas con un potencial directo para la aplicación *in vivo*.

4.5 Referencias bibliográficas

1. Slowing, I., Viveroescoto, J., Wu, C. & Lin, V. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1278–1288 (2008).
2. Forrest, M. L. & Kwon, G. S. Clinical developments in drug delivery nanotechnology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 861–862 (2008).
3. Cohen, S. M. New approaches for medicinal applications of bioinorganic chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**, 115–120 (2007).
4. Moghimi, S. M. & Kissel, T. Particulate nanomedicines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 1451–1455 (2006).
5. Whitesides, G. M. The ‘right’ size in nanobiotechnology. *Nat. Biotechnol.* **21**, 1161–1165 (2003).
6. Dabrowiak, J. C. in *Metals in Medicine* 283–310 (John Wiley & Sons, Ltd., 2009).
7. Louage, B., De Wever, O., Hennink, W. E. & De Geest, B. G. Developments and future clinical outlook of taxane nanomedicines. *J. Control. Release* **253**, 137–152 (2017).
8. Horcajada, P., Serre, C., Vallet-Regí, M., Sebban, M., Taulelle, F., & Férey, G. Metal-organic frameworks as efficient materials for drug delivery. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **45**, 5974–5978 (2006).
9. Baeza, A., Ruiz-Molina, D. & Vallet-Regí, M. Recent advances in porous nanoparticles for drug delivery in antitumoral applications: inorganic nanoparticles and nanoscale metal-organic frameworks. *Expert Opin. Drug Deliv.* **5247**, 1–14 (2016).
10. Jiang, J., Zhao, Y. & Yaghi, O. M. Covalent Chemistry beyond Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 3255–3265 (2016).
11. Liu, Z., Lv, L., He, Y. & Feng, Y. An anionic metal-organic framework constructed from a triazole-functionalized diisophthalate featuring hierarchical cages for selective adsorptive C₂H₂/CH₄ and CO₂/CH₄ separation. *CrystEngComm* **19**, 2795–2801 (2017).
12. Rechac, V. L., Cirujano, F. G., Corma, A. & Lladrés i Xamena, F. X. Diastereoselective Synthesis of Pyranoquinolines on Zirconium-Containing UiO-66 Metal-Organic Frameworks. *Eur. J. Inorg. Chem.* 4512–4516 (2016).

13. Medishetty, R., Nalla, V., Nemeč, L., Henke, S., Mayer, D., Sun, H., Reuter, K. A New Class of Lasing Materials: Intrinsic Stimulated Emission from Nonlinear Optically Active Metal–Organic Frameworks. *Adv. Mater.* **29**, 1–7 (2017).
14. Qi, Z., Wang, L., You, Q. & Chen, Y. PA-Tb-Cu MOF as luminescent nanoenzyme for catalytic assay of hydrogen peroxide. *Biosens. Bioelectron.* **96**, 227–232 (2017).
15. Rocca, J. Della & Lin, W. Nanoscale metal-organic frameworks: Magnetic resonance imaging contrast agents and beyond. *European Journal of Inorganic Chemistry* 3725–3734 (2010).
16. Liu, D., Lu, K., Poon, C. & Lin, W. Metal-organic frameworks as sensory materials and imaging agents. *Inorganic Chemistry* **53**, 1916–1924 (2014).
17. Cabrera-García, A. Checa-Chavarría, E., Pacheco-Torres, J., Bernabeu-Sanz, Á., Vidal-Moya, A., Rivero-Buceta, E., Sastre, G., Fernández, E. & Botella, P. Engineered Contrast Agents in a Single Structure for T_1 - T_2 Dual Magnetic Resonance Imaging. *Nanoscale* **10**, 6349–6360 (2018).
18. Horcajada, P., Chalati, T., Serre, C., Gillet, B., Sebrie, C., Baati, T., Eubank, J. F., Heurtaux, D., Clayette, P., Kreuz, C., Chang, J.-S., Hwang, Y. K., Marsaud, V., Bories, P.-N., Cynober, L., Gil, S., Férey, G., Couvreur, P. & Gref, R. Porous metal-organic-framework nanoscale carriers as a potential platform for drug delivery and imaging. *Nat. Mater.* **9**, 172–178 (2010).
19. Wang, D. Zhou, J., Chen, R., Shi, R., Zhao, G., Xia, G., Li, R., Liu, Z., Tian, J., Wang, H., Guo, Z., Wang, H., & Chen, Q. *et al.* Controllable synthesis of dual-MOFs nanostructures for pH-responsive artemisinin delivery, magnetic resonance and optical dual-modal imaging-guided chemo/photothermal combinational cancer therapy. *Biomaterials* **100**, 27–40 (2016).
20. Lismont, M., Dreesen, L. & Wuttke, S. Metal-Organic Framework Nanoparticles in Photodynamic Therapy: Current Status and Perspectives. *Advanced Functional Materials* **27**, 1–16 (2017).
21. Sun, C., Qin, C., Wang, X. & Su, Z. Metal-organic frameworks as potential drug delivery systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* **10**, 89–101 (2013).
22. Horcajada, P., Gref, R., Baati, T., Allan, P. K., Maurin, G., Couvreur, P., Férey, G., Morris, R. E., & Christian Serre, C. Metal-Organic Frameworks in Biomedicine. *Chem. Rev.* **112**, 1232–1268 (2012).
23. Giménez-Marqués, M., Hidalgo, T., Serre, C. Horcajada, P.

- Nanostructured metal-organic frameworks & their bio-related applications. *Coordination Chemistry Reviews* **307**, 342–360 (2015).
24. Zhou, H. Bin, Liu, G. S. & Yao, Z. J. Highly efficient and mild cascade reactions triggered by bis(triphenyl)oxodiphosphoniumtrifluoromethanesulfonate and a concise total synthesis of camptothecin. *Org. Lett.* **9**, 2003–2005 (2007).
 25. Ezell, Edward L.; Smith, L. L. ¹H- and ¹³C-NMR spectra of camptothecin and derivatives. *J. Nat. Prod.* **54**, 1645–1650 (1991).
 26. Venditto, V. J. & Szoka, F. C. Cancer nanomedicines: So many papers and so few drugs! *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 80–88 (2013).
 27. Martinez, A., Palomo Ruiz, M. del V., Perez, D. I. & Gil, C. Drugs in clinical development for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin. Investig. Drugs* **26**, 403–414 (2017).
 28. Basili, S. & Moro, S. Novel camptothecin derivatives as topoisomerase I inhibitors. *Expert Opin. Ther. Pat.* **19**, 555–574 (2009).
 29. Liu, J., Zhang, L., Lei, J., Shen, H. & Ju, H. Multifunctional metal-organic framework nanoprobe for cathepsin B-activated cancer cell imaging and chemo-photodynamic therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 2150–2158 (2017).
 30. Zhuang, J., Kuo, C. H., Chou, L. Y., Liu, D. Y., Weerapana, E. & Tsung, C. K. Optimized metal-organic-framework nanospheres for drug delivery: Evaluation of small-molecule encapsulation. *ACS Nano* **8**, 2812–2819 (2014).
 31. Botella, P. & Rivero-Buceta, E. Safe approaches for camptothecin delivery: Structural analogues and nanomedicines. *Journal of Controlled Release* **247**, 28–54 (2017).
 32. Cabrera-García, A., Checa-Chavarria, E., Rivero-Buceta, E., Moreno, V., Fernández, E. & Botella, Amino modified metal-organic frameworks MIL-100(Fe) and MIL-101(Fe) as pH-responsive nanoplatforms for safety delivery of camptothecin. *J. Colloids Sci Interfaces* **Aceptado**, (2019).
 33. Taddei, M., Dürnberg, K. C., van Bokhoven, J. A. & Ranocchiari, M. Aging of the reaction mixture as a tool to modulate the crystallite size of UiO-66 into the low nanometer range. *Chem. Commun.* **52**, 6411–6414 (2016).
 34. Horcajada, P., Chevreau, H., Heurtaux, D., Benyettou, F.,

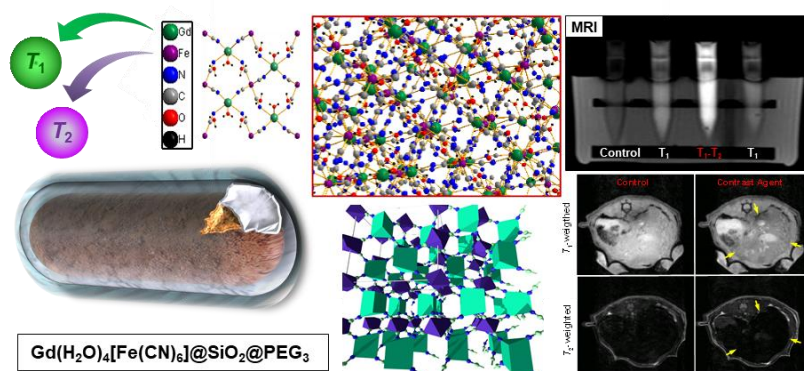
- Salles, F., Devic, T., Garcia-Marquez, A., Yu, C., Lavrard, H., Dutson, C. L., Magnier, E., Maurin, G., Elkaïm & Serre, C. Extended and functionalized porous iron(III) tri- or dicarboxylates with MIL-100/101 topologies. *Chem. Commun. (Camb)*. **50**, 6872–4 (2014).
35. Zhang, Y. B., Furukawa, H., Ko, N., Nie, W., Park, H. J., Okajima, S., Cordova, K. E., Deng, Kim, J., Yaghi, O. M. Introduction of functionality, selection of topology, and enhancement of gas adsorption in multivariate metal-organic framework-177. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 2641–2650 (2015).
36. Wang, Z. & Cohen, S. M. Postsynthetic modification of metal-organic frameworks. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 1315–1329 (2009).
37. Cohen, S. M. Postsynthetic Methods for the Functionalization of Metal-Organic Frameworks. *Chem. Rev.* 970–1000 (2012).
38. Wang, Z., Tanabe, K. K. & Cohen, S. M. Accessing postsynthetic modification in a series of metal-organic frameworks and the influence of framework topology on reactivity. *Inorg. Chem.* **48**, 296–306 (2009).
39. Li, X., Tjioptutro, A. K., Ding, J., Xue, J. M. & Zhu, Y. Pd-Ce nanoparticles supported on functional Fe-MIL-101-NH₂: An efficient catalyst for selective glycerol oxidation. *Catal. Today* **279**, 77–83 (2017).
40. Subramanian, N., Sundaraganesan, N., Sudha, S., Aroulmoji, V., Sockalingam, G. D., & Bergamin, M. Experimental and theoretical investigation of the molecular and electronic structure of anticancer drug camptothecin. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **78**, 1058–1067 (2011).
41. Hein, C. D., Liu, X. & Wang, D. Click Chemistry, A Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences. *Pharm. Res.* **25**, 2216–2230 (2008).
42. Savonnet, M., Kockrick, E., Camarata, A., Bazer-Bachi, D., Bats, N., Lecocq, V., Pinel, C., Farrusseng, D. Combinatorial synthesis of metal-organic frameworks libraries by click-chemistry. *New J. Chem.* **35**, 1892 (2011).
43. Botella, P. Abasolo, I., Fernández, Y., Muniesa, C., Miranda, S., Quesada, M., Ruiz, J., Schwartz, S., & Corma, A. Surface-modified silica nanoparticles for tumor-targeted delivery of camptothecin and its biological evaluation. *J. Control. Release* **156**, 246–257 (2011).
44. Bellido, E. Guillevic, M., Hidalgo, T., Santander-Ortega, M. J., Serre, C., & Horcajada, P. Understanding the colloidal stability of the mesoporous MIL-100(Fe) nanoparticles in physiological

- media. *Langmuir* **30**, 5911–5920 (2014).
45. Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. in *Assay Guidance Manual* (Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda, MD, 2012., 2012).
 46. Cheng, J., Khin, K. T., Jensen, G. S., Liu, A. & Davis, M. E. Synthesis of linear, B-cyclodextrin-based polymers and their camptothecin conjugates. *Bioconjug. Chem.* **14**, 1007–1017 (2003).
 47. Diciccio, J. E. & Steinberg, B. E. Lysosomal pH and analysis of the counter ion pathways that support acidification. *J. Gen. Physiol.* 385–390 (2011).
 48. Yan, L., Chen, X., Wang, Z., Zhang, X., Zhu, X., Zhou, M., Chen, W., Huang, L., Roy, V. A. L., Yu, P. K. N., Zhu, G., Zhang, W., Size Controllable and Surface Tunable Zeolitic Imidazolate Framework-8–Poly(acrylic acid sodium salt) Nanocomposites for pH Responsive Drug Release and Enhanced in Vivo Cancer Treatment. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 32990–33000 (2017).
 49. Wu, Q., Niu, M., Chen, X., Tan, L., Fu, C., Ren, X., J. Ren, J., Li, L., Xu, K., Zhong, H., Meng, X., Biocompatible and biodegradable zeolitic imidazolate framework/polydopamine nanocarriers for dual stimulus triggered tumor thermochemotherapy. *Biomaterials* **162**, 132–143 (2018).
 50. Liu, S., Ma, Y., Gao, L. & Pan, J. pH-responsive magnetic metal-organic framework nanocomposite: A smart porous adsorbent for highly specific enrichment of cis -diol containing luteolin. *Chem. Eng. J.* **341**, 198–207 (2018).
 51. Duan, F., Feng, X., Yang, X., Sun, W., Jin, Y., Liu, H., Ge, K., Li, Z., & Zhang, J. A simple and powerful co-delivery system based on pH-responsive metal-organic frameworks for enhanced cancer immunotherapy. *Biomaterials* **122**, 23–33 (2017).
 52. Zhu, Y. Chen, S., Zhao, H., Yang, Y., Chen, X., Sun, J., Fan, H., & Zhang, X. *et al.* PPy @ MIL-100 Nanoparticles as a pH- and Near-IR-Irradiation-Responsive Drug Carrier for Simultaneous Photothermal Therapy and Chemotherapy of Cancer Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 34209–34217 (2016).
 53. Lin, W., Hu, Q., Jiang, K., Cui, Y., Yang, Y., & Qian, G. A porous Zn-based metal-organic framework for pH and temperature dual-responsive controlled drug release. *Microporous Mesoporous Mater.* **249**, 55–60 (2017).
 54. Clemments, A. M., Muniesa, C., Landry, C. & Botella, P. RSC

- Advances Effect of surface properties in protein corona development on mesoporous silica nanoparticles. *RSC Adv.* **4**, 29134–29138 (2014).
55. Simon-yarza, T. Gim, Ø. Ø., Mrimi, R., Mielcarek, A., Gref, R., Horcajada, P., Serre, C., & Couvreur, P. A Smart Metal – Organic Framework Nanomaterial for Lung Targeting. *Angew. Chemie Int. Ed.* **56**, 15565–15569 (2017).
56. Ferrari, R. Lupi, M., Colombo, C., Morbidelli, M., Incalci, M. D., & Moscatelli, D. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Investigation of size , surface charge , PEGylation degree and concentration on the cellular uptake of polymer nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **123**, 639–647 (2014).
57. Min, K. H., Park, K., Kim, Y. S., Bae, S. M., Lee, S., Jo, H. G., Park, R. W., Kim, I. S., Jeong, S. Y., Kim, K. & Kwon, I. C. Hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles-encapsulated camptothecin enhance the drug stability and tumor targeting in cancer therapy. *J. Control. Release* **127**, 208–218 (2008).

Capítulo V.

Desarrollo de Nanomateriales como Agentes de Contraste en Resonancia Magnética para Imagen (RMI) Basados en Redes Organometálicas



5. Desarrollo de nanomateriales como agentes de contraste en resonancia magnética para imagen (RMI) basados en redes organometálicas

5.1 Fundamento

El descubrimiento de la *resonancia magnética nuclear*, RMN, como técnica capaz de detectar diferencias en las propiedades de las moléculas de agua en los tejidos normales y enfermos propulsó esta disciplina desde el dominio puramente químico hasta la medicina.¹⁻⁸ A través de un aumento del imán de RMN, el cual normalmente aceptaba un tubo de cristal de pequeño diámetro que contenía una muestra química, se crearon instrumentos de resonancia magnética para imagen (RMI) a un tamaño lo suficientemente grande para visualizar el cuerpo humano, y capaces de detectar sutiles diferencias entre las moléculas de agua localizadas en los fluidos y en los tejidos blandos del cuerpo. Además, se descubrió que, si al paciente se le administraba un complejo metálico paramagnético previo a la adquisición de imagen, la definición o contraste de la imagen resultante mejoraba considerablemente. Este efecto era causado por el complejo metálico paramagnético actuando como un pequeño imán, el cual inducía cambios en la RMN de las moléculas de agua que podían detectarse por RMI. Desde estos descubrimientos iniciales, muchos compuestos y nanomateriales que contienen gadolinio, manganeso y hierro han sido aprobados para su uso como agentes de contraste (ACs) en RMI, y muchos otros agentes de mejora de imagen están en diversos estados de desarrollo.³⁻⁸

Las bases para el diagnóstico por imagen con RMI está directamente conectado con la teoría de la resonancia magnética nuclear, RMN.^{9,10} Mientras que la espectrometría de RMN convencional ante todo usa el desplazamiento químico de los protones como un medio de caracterización de estructuras de moléculas en disolución, la RMI se centra en las propiedades de relajación de los protones de las moléculas de agua localizados en los tejidos blandos del cuerpo.

Los protones tienen un *número cuántico de espín nuclear* (a veces llamado simplemente espín nuclear), I , de $1/2$, indicando que hay un espín nuclear desapareado. Así para el protón que está girando en su eje, el espín desapareado genera un *momento magnético nuclear* perpendicular al giro. Cuando el protón se sitúa en el seno de un campo magnético, la mecánica cuántica requiere que solo se permita una orientación discreta del momento de espín, especificada por el *número cuántico de momento angular de espín nuclear*, m_I , relativo al campo magnético aplicado. Una orientación con $m_I = +1/2$ tiene el momento de espín alineado con el campo magnético aplicado y es menor en energía (más estable), mientras que la otra orientación con $m_I = -1/2$ tiene el momento de espín oponiéndose al campo magnético aplicado y es mayor en energía (menos estable) (**Figura 1**). Si no hay campo magnético aplicado, no hay orientación preferencial y no hay diferencia de energía entre los estados (sin división). En este caso, ambos estados m_I se dice que están degenerados en energía. Experimentalmente, la energía de separación entre los dos estados en Julios, J , ΔE , viene dada por:

$$\Delta E = \gamma \hbar H \quad (\text{eq. 5.1})$$

Donde γ es el radio giromagnético, una constante para un núcleo dado con unidades $2\pi\text{s}^{-1}\text{T}^{-1}$; \hbar es la constante de Planck, h , dividida por 2π ; y H es la fuerza del campo magnético aplicado en Teslas, T.

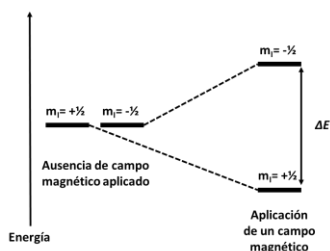


Figura 1. Un protón con un número cuántico de espín, $I = \frac{1}{2}$ indica la presencia de un espín nuclear desapareado. El protón girando genera un momento magnético el cual tiene dos orientaciones posibles en un campo magnético aplicado, las cuales vienen descritas por el número cuántico de momento angular de espín nuclear m_I . La división entre los estados $m_I = +\frac{1}{2}$ y $m_I = -\frac{1}{2}$ en presencia del campo magnético, ΔE , es proporcional a la fuerza del campo magnético aplicado, H_0 .

La fuerza del campo magnético usado en RMI es de aproximadamente 1 T, lo cual es alrededor de un orden de magnitud más débil que muchos campos magnéticos empleados en la espectrometría de RMN convencional. Para un protón situado en un campo magnético de esta intensidad, el valor de ΔE para la división entre los dos niveles es muy pequeña, correspondiente a la radiación electromagnética en el rango de la radiofrecuencia, en términos de número de onda, $\sim 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$. En comparación, la división entre los orbitales d para un complejo de un metal de transición, medido por el parámetro de desdoblamiento del campo cristalino, Δ , es $\sim 10^4 \text{ cm}^{-1}$, lo cual es siete órdenes de magnitud mayor que la energía de separación de los estados en la **Figura 1**. Si un gran número de moléculas de agua se sitúan en un campo

magnético, no todos sus protones tendrán su momento magnético nuclear alineado en la manera correspondiente al estado de menor energía, $m_I = +1/2$. Esto es porque a temperaturas a las cuales se llevan a cabo la mayoría de las medidas de RMN, así como las RMI, hay suficiente energía térmica disponible –alrededor de 200 cm^{-1} a temperatura ambiente- que ambos niveles están casi igualmente poblados, pero hay un ligero exceso de núcleos en el estado de menor energía, $m_I = +1/2$.

La expresión que considera el número de núcleos que se encuentran en cada estado es la *ecuación de distribución de Boltzmann*, la cual viene dada por

$$\frac{N(-1/2)}{N(+1/2)} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} \quad (\text{eq. 5.2})$$

En esta expresión, $N(-1/2)$ y $N(+1/2)$ son el número de núcleos en los estados $m_I = -1/2$ y $m_I = +1/2$, respectivamente; ΔE es la separación entre los dos niveles en cm^{-1} ; k es la constante de Boltzmann, $k = 0,695 \text{ cm}^{-1}\text{K}^{-1}$ y T es la temperatura en Kelvin, K. De esta ecuación es evidente que a temperatura ambiente ($20 \text{ }^\circ\text{C}$), la relación $N(-1/2)/N(+1/2)$ es 0,9999954, mostrando que para un conjunto de núcleos hay ligeramente mayor población en el estado de menor energía, más estable, que en el estado superior. La espectrometría de RMN aprovecha esta pequeña diferencia poblacional entre los dos estados irradiando la muestra mientras está en el campo magnético con radiación electromagnética que exactamente corresponde a ΔE , una condición llamada *resonancia*. Esto se hace alineando un campo de radiofrecuencia (RF) perpendicular al campo magnético principal, lo cual resulta en la promoción de núcleos

en el estado inferior hacia el estado superior. Si el campo de RF permanece encendido por un periodo de tiempo, la población en los dos estados se igualará y se dice que el sistema alcanza la *saturación*. Después de apagar el campo de RF, la población de núcleos comienza inmediatamente a *relajarse* a la distribución de equilibrio original, la velocidad de esto viene gobernada por algunas constantes de velocidad, k . De esta manera la transición desde el nivel $m_I = -1/2$ al estado $m_I = +1/2$ emite radiación, la velocidad de *relajación* puede seguirse directamente por un detector *-bobina receptora-* sensible a la radiación RF que está localizada a ángulos rectos (90°) de ambos campos el magnético y el de RF. Los datos acumulados por el detector como función del tiempo después de apagar el campo de RF pueden usarse para medir la velocidad y el tiempo de vida del proceso de relajación.

Uno de los parámetros de relajación medidos en RMN es el *tiempo de relajación longitudinal o espín red*, T_1 , que es el tiempo constante, $1/k$, donde k es la constante de velocidad observada, asociado con la relajación de espín de la población en saturación a su equilibrio térmico. Este parámetro está fundamentalmente afectado por las fluctuaciones de las moléculas vecinas y por sustancias paramagnéticas con grandes momentos magnéticos, las cuales generan fluctuaciones de los campos magnéticos en las posiciones de relajación de los núcleos. Los líquidos presentan valores típicos de T_1 en el rango 10^{-4} -10 segundos, y para los sólidos en el rango 10^{-2} - 10^3 segundos.

Un segundo parámetro de relajación medido en RMN es el *tiempo de relajación transversal o espín-espín*, T_2 . Este tiempo de relajación constante, el cual no puede describirse usando el

modelo mecanocuántico de la **Figura 1**, es una medida de la velocidad de pérdida de coherencia de fase entre los espines en el plano perpendicular al campo aplicado. En el modelo clásico del experimento de RMN, un conjunto de núcleos excitados tiene sus espines precesando al unísono (coherencia) en el campo aplicado, pero campos locales actuando sobre diferentes núcleos en el conjunto y/o interacciones entre los espines pueden destruir la coherencia de la población. Este efecto que implica cambios en la magnetización total en el plano perpendicular al campo aplicado viene descrito por la constante de tiempo de relajación transversal o espín-espín, T_2 , la cual, para líquidos, es similar en magnitud a T_1 . Un tercer parámetro de relajación, T_2^* , causado por los efectos de las inhomogeneidades en el campo aplicado sobre T_2 .

Hemos visto los paralelismos entre los experimentos de RMI y los de RMN excepto que las moléculas de agua están en el cuerpo y las constantes, T_1 , T_2 y otros parámetros, se determinan en tres dimensiones dentro de los tejidos del paciente.¹ El paciente se posiciona en una superficie móvil en el interior de la sonda de un gran electroimán, que produce el campo magnético principal. En un ángulo recto al campo magnético hay un campo de RF y en un ángulo recto a ambos, el campo magnético principal y el campo de RF está la bobina receptora que captura la radiación emitida desde la población de espín.

La resolución espacial de los parámetros de relajación se lleva a cabo usando tres *gradientes magnéticos* en ángulo recto uno respecto de los otros, que cuando se encienden, producen gradientes de campo lineales en direcciones específicas; esto

es, el campo magnético cambia a lo largo del gradiente. La activación de estos electroimanes crea los sonidos molestos que se crean durante una prueba de RMI. Mediante la producción de gradientes en el campo en diferentes direcciones, se pueden obtener las propiedades de relajación de las moléculas de agua a lo largo de los gradientes dentro del tejido del paciente. Cuando se analizan los datos con un ordenador, los parámetros de relajación dentro de muchos elementos de pequeño volumen, llamados vóxeles, se calculan y después de añadirles color (o una escala de grises) a un valor específico del parámetro de relajación, se crea una imagen basada en estos colores, mostrando las propiedades de relajación del agua dentro de los vóxeles. Dependiendo del tamaño del campo de visión (el tamaño de la región del cuerpo sobre la cual se colectan los datos de relajación) y otros parámetros, se puede obtener una resolución espacial del orden de unos pocos milímetros en una prueba típica de RMI.

De esta manera el contraste de la imagen, y así su utilidad para el diagnóstico, depende críticamente de las diferencias en los parámetros de relajación entre varias regiones en el tejido, se han desarrollado compuestos químicos llamados agentes de contraste, ACs son aquellos que afectan dramáticamente a las propiedades de relajación del agua. De esta manera estos compuestos no son tóxicos y se distribuyen en solamente ciertos tipos de fluidos y tejidos en el cuerpo, estos ACs pueden administrarse al paciente inmediatamente antes de una prueba de RMI. Si un AC tiene acceso a un tipo particular de tejido, este cambiará drásticamente las propiedades de relajación de las moléculas de agua localizadas en dicho tejido, llevando a

grandes diferencias en las propiedades de relajación (contraste) entre tejidos con y sin AC.

Muchos ACs actualmente en uso contienen el lantanoide gadolinio, que, en su estado de oxidación trivalente estable, Gd^{3+} , es altamente paramagnético con la configuración electrónica $[Xe]4f^7$ y $S = 7/2$. Los ACs que contienen Gd^{3+} principalmente afectan al tiempo de relajación de espín red (relajatividad longitudinal), T_1 , a través de dos mecanismos. El primero implica el intercambio directo de una molécula de agua que está unida al ion metálico por moléculas de agua que están libres en fluidos y tejido; el otro es el resultado de moléculas de agua pasando a través del campo magnético local producido por el ion Gd^{3+} ; esto es, sin que ocurra un enlace directo al ion metálico. Además de los compuestos y nanopartículas que contienen Gd^{3+} , se han desarrollado pequeñas partículas nanométricas que contienen hierro como ACs. Estos compuestos, que tienen el momento de espín de muchos centros de hierro alineados en la misma dirección, producen fuertes campos magnéticos locales que fundamentalmente reducen el tiempo de relajación transversal o espín-espín, T_2 , de las moléculas de agua que pasan a través del campo (relajatividad transversal).

La eficacia de un AC en la reducción de T_1 y T_2 de una masa de moléculas de agua depende de una propiedad del AC, llamada *relajatividad*, r_i la cual, junto con la concentración de AC, afecta a las propiedades de relajación del agua de acuerdo con

$$R_{i(obs)} = \frac{1}{T_{i(obs)}} = \frac{1}{T_{i(diam)}} + r_i C; \quad i = 1 \text{ o } 2 \quad (\text{eq. 5.3})$$

En esta expresión, $i = 1$ es el efecto del AC sobre T_1 (relajatividad longitudinal), e $i = 2$ es su efecto sobre T_2 (relajatividad transversal).¹ Las cantidades $R_{i(\text{obs})}$ y $1/T_{i(\text{obs})}$ son las constantes de velocidad de relajación globales de las moléculas de agua en el sistema (s^{-1}); $T_{i(\text{diam})}$ es el tiempo de relajación del agua antes de la adición del AC paramagnético (s); C es la concentración del ion paramagnético en el AC ($\text{mmol}^{-1} \text{ L}$); y r_i es la *relajatividad* ($\text{s}^{-1} \text{ mmol}^{-1} \text{ L}$). Experimentalmente, la relajatividad de un AC, la cual es también dependiente de la fuerza del campo magnético aplicado (generalmente expresado en unidades Tesla, T) y la temperatura de la disolución, se determina midiendo $R_{i(\text{obs})}$ a diferentes valores de C y, se extrae de la representación de $R_{i(\text{obs})}$ frente a C , calculando la pendiente, que es r_i .

El trabajo de Solomon, Bloembergen y Morgan señaló que ciertas propiedades del complejo metálico paramagnético afectan a la magnitud de r .¹ Una propiedad es el número de moléculas de agua intercambiables unidas al ion metálico, denotadas por q . Otra es la constante de tiempo para el intercambio de una molécula de agua unida con una en disolución, indicado por τ_M , donde $\tau_M = 1/k_{\text{ex}}$. Si q es grande y τ_M es pequeña (k_{ex} es grande), a muchas moléculas de agua en el disolvente se les permitirá tener contacto directo, 'visitando' al ion metálico paramagnético durante el experimento, el cual tendrá el efecto de disminuir el tiempo de relajación del agua observado en el experimento. La tasa de caída (rotacional) del AC en disolución, llamado tiempo de correlación rotacional, denotado por la constante de tiempo, τ_R , donde $\tau_R = 1/k_{\text{rot}}$, también afecta a la relajatividad, r , del AC. Si τ_R es grande (k_{rot} es pequeña), como podría ser el caso para un AC grande, que

rote lentamente, el ‘tiempo de contacto’ entre el campo magnético local producido por el AC y una molécula de agua en el disolvente es relativamente largo, lo que también incrementa la r del AC. Muchos de los esfuerzos actuales en el campo de RMI/AC están enfocados en maximizar la relajatividad longitudinal y transversal (respectivamente, r_1 y r_2) mediante cambios en la estructura del AC de varias maneras para afectar a uno o más de los parámetros comentados anteriormente.¹¹⁻¹³

En este sentido, el presente capítulo compila los diferentes estudios que hemos llevado a cabo para desarrollar nuevos agentes de contraste para RMI, capaces de incrementar los *valores de relajatividad r respecto de los productos actualmente* utilizados en la práctica clínica, a la vez que se mejora la biodisponibilidad de los elementos magnéticamente activos y se minimizan los posibles efectos tóxicos resultado de su acumulación en el organismo.

A tal fin, el capítulo se ha dividido en dos apartados. En el primero de ellos se estudia el desarrollo de un AC T_1 muy estable en medio fisiológico basado en nanopartículas de un óxido mixto de Gd y Si. Para ello, se ha implementado un protocolo de síntesis novedoso basado en la utilización de una red organometálica (MOF) como plantilla de sacrificio, obteniendo nanopartículas con idéntica morfología y tamaño que el MOF inicial, pudiendo también generar porosidad en las partículas cuando fuese necesario mediante un proceso de transformación pseudomórfica. Asimismo, se ha llevado a cabo una validación biológica de la actividad de este AC mediante experimentos de adquisición de imágenes de resonancia *in vitro* e *in vivo*.

En la segunda parte del capítulo se aborda la preparación, caracterización y validación biológica de un nuevo agente de contraste dual (T_1 - T_2), basado en nanopartículas de un material híbrido de estructura *core-shell*, donde el núcleo está constituido por el MOF $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]$, responsable de la actividad magnética, y la cubierta es de sílice amorfa, la cual proporciona elevada estabilidad coloidal en medio fisiológico y multifuncionalidad.

5.2 Desarrollo de un agente de contraste T_1 , estable en medio fisiológico

5.2.1 Preparación y caracterización de nanopartículas de un óxido mixto de Gd y Si

Como ya se comentó anteriormente, los agentes de contraste se pueden clasificar en base a sus procesos de relajación, como agentes de especies paramagnéticas T_1 -positivos y agentes de materiales superparamagnéticos T_2 -negativos. Debido a su alta sensibilidad y detectabilidad, los quelatos solubles de Gd^{3+} son los ACs T_1 más representativos y empleados en pruebas clínicas de RMI actuales.¹⁴ Sin embargo, su deficiente perfil farmacocinético, debido a la rápida filtración renal, limita la sensibilidad.¹⁵ Esto, en consecuencia, requiere la administración de dosis abundantes de AC, por ejemplo, en estudios de perfusión para la detección de tumores, que pueden provocar algunos efectos secundarios como dolor de cabeza, náuseas y mareos.¹⁶ Entre los efectos secundarios más importantes conocidos sobre la administración de compuestos Gd^{3+} , encontramos fibrosis nefrogénica sistémica en pacientes con función renal dañada, reacciones de hipersensibilidad y dermatopatía nefrogénica fibrosante, lo que hace conveniente

desarrollar alternativas a estas pequeñas moléculas solubles.¹⁷ Esto es lo que ha movido nuestro estudio hacia el desarrollo de nanopartículas magnéticas (NPM), las cuales presentan varias ventajas sobre los ACs de Gd^{3+} convencionales, tales como el transporte de grandes cargas de iones metálicos paramagnéticos, vidas medias de circulación en plasma más largas, acumulación pasiva en tejidos tumorales y mejores perfiles de seguridad.^{18,19} Por lo tanto, la incorporación de Gd^{3+} en un nanovehículo estable apunta al desarrollo de ACs seguros y eficientes para RMI.

De esta manera, primero presentamos un enfoque novedoso para la síntesis de nanopartículas de óxido de Gd-Si con una alta densidad de átomos de Gd^{3+} y morfología controlada. Para este propósito, usamos el análogo de azul de Prusia $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]$ por primera vez como plantilla en una reacción con silicato soluble. Al superponer la cinética de condensación de la sílice con la eliminación del $[Fe(CN)_6]^{3-}$, pudimos sintetizar partículas de un nanocomposite de tipo óxido/hidróxido con una forma y tamaño iguales que los cristales anteriores del MOF. Asimismo, con vistas a potenciar la multifuncionalidad de los materiales, como la posible incorporación de agentes terapéuticos para preparar un conjunto teranóstico, se sometió el sistema Gd-Si a un tratamiento hidrotermal en presencia de un agente director de estructura, con el fin de generar mesoporosidad en las partículas,^{20,21} obteniendo un sólido poroso con una doble morfología de nanocruces y nanovarillas, y elevada área superficial.

Las nanopartículas de óxido de Gd-Si se sintetizaron en un proceso en tres etapas (**Figura 2**). Inicialmente, las nanopartículas de $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (GdFe) con una morfología dual (nanocruces y nanobarras) se prepararon usando $(\text{Et}_4\text{N})_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($\text{Et}=\text{CH}_3\text{CH}_2-$) como precursor. En segundo lugar, se hizo reaccionar el GdFe con silicato sódico dando como resultado partículas densas de $\text{Gd}(\text{OH})_3 \cdot 3\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ amorfo (GdSi), de forma y tamaño idénticos a los del MOF primitivo. Finalmente, el GdSi se colocó con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) en un autoclave y se procesó bajo condiciones hidrotérmicas para desarrollar un retículo poroso en las partículas (mGdSi), de acuerdo con una transformación pseudomórfica bien conocida.²²

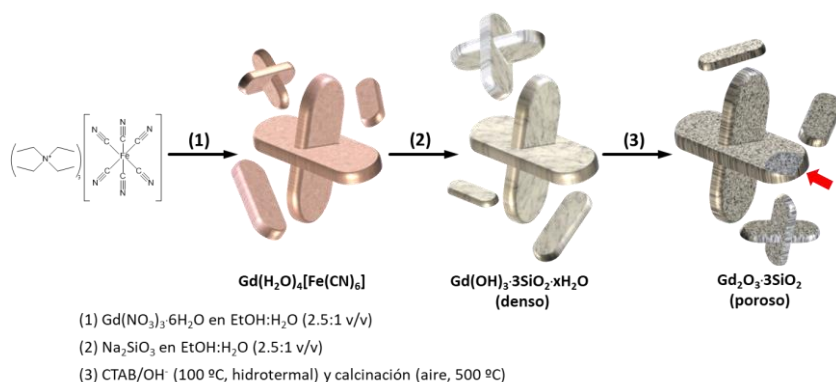


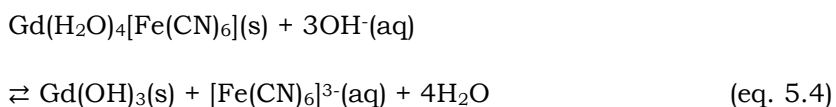
Figura 2. Esquema sintético de las nanopartículas mesoporosas de óxido de Gd-Si con una morfología preformada utilizando $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ como plantilla. La flecha roja señala una representación artística de una composición porosa homogénea del nanocomposite.

La estrategia para sintetizar nanopartículas mesoporosas de óxido de Gd-Si preformadas aparece representada en la **Figura 2**. En primer lugar, se confeccionó un método para la

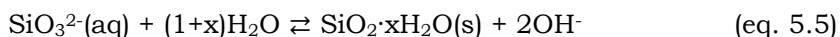
preparación de nanocristales de GdFe con morfología bien definida. Se obtuvieron partículas de alta pureza monodispersas con doble morfología (cruces y barras) de aproximadamente 260 nm de diámetro medio (Tabla 1). La estructura cristalina de la red de coordinación tridimensional del $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ es conocida.²³ El sólido cristaliza en el sistema ortorrómbico en el grupo espacial C_{mcm} los parámetros de celda son $a = 7.4016(3) \text{ \AA}$, $b = 12.78813(14) \text{ \AA}$, y $c = 13.5980(12) \text{ \AA}$. Es importante destacar que el patrón de DRX en polvo del MOF de tamaño nanométrico (**Figura III.1** en el ANEXO III) es perfectamente comparable al obtenido para el compuesto mediante DRX en monocristal.²³ Sin embargo, este material es extremadamente compacto y denso, por lo cual no se pudo obtener datos de isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno. A pesar de la especial morfología observada en forma de cruces en muchas nanopartículas, los estudios de microscopía electrónica indican que más del 60% de las partículas son nanovarillas, con una relación de cruces: varillas de aproximadamente 2:3 (Tabla 1 y **Figura 3**). Un mecanismo plausible para dicha formación de las nanocruces implicaría que el Et_4N^+ funcionaría como un surfactante catiónico, que coopera en la síntesis con el ácido acético para funcionar como una plantilla suave que obliga a los cristales de Fe-CN-Gd a ensamblarse en la morfología cruzada.²⁴ De hecho, en ausencia de ácido acético solo crecen pequeñas varillas. Por el contrario, la composición cristalina, según lo determinado por el análisis de espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS), es muy homogénea, con distribución uniforme de Fe y Gd dentro de las partículas, como se revela en los resultados del mapeo elemental (**Figura 3** y **Figura III.2** en el

ANEXO III), lo cual es muy consistente con la estequiometría del MOF.

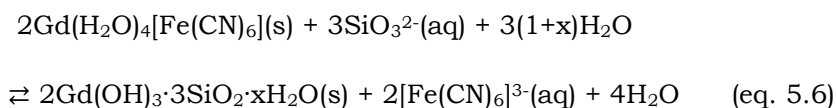
El compuesto GdFe es parcialmente soluble en agua, pero es insoluble en una mezcla EtOH:H₂O (2,5:1 v/v). En disolución alcalina, tiene lugar una reacción de intercambio iónico que da como resultado la disolución completa del MOF, como sigue:



El Gd³⁺ del GdFe se asocia con los iones hidroxilo para formar Gd(OH)₃ insoluble. Se puede conseguir una concentración moderada de iones OH⁻ por hidrólisis del silicato, como se describe a continuación:



En condiciones óptimas, es posible superponer el intercambio iónico del análogo del azul de Prusia con la hidrólisis de la base conjugada. Luego, tiene lugar una condensación estequiométrica simultánea del hidróxido de gadolinio y la sílice. Este proceso está definido por la ecuación:



Como resultado, se sintetizaron nanopartículas de GdSi densas y monodispersas, preservando la forma y el tamaño originales de los cristales del original GdFe. La reacción transcurre lentamente a temperatura ambiente en una disolución etanólica de silicato.

Tabla 1. Características composicionales, morfológicas y texturales de los materiales sintetizados.

Muestra	Fórmula molecular	Y _{SiO₂} (% m)	Y _{CTMA} ^b (% m)	CTMA/SiO ₂ (M)	Composición Atómica ^a (%)			Tamaño ^c (nm)	Morfología ^d Cruces : Varillas (%)	Área BET ^e (m ² g ⁻¹)	Poros ^e (Å)
					Gd	Fe	Si				
GdFe	Gd(H ₂ O) ₄ [Fe(CN) ₆]	-	-	-	59,0	49,1	0	262,1 ± 43,5	36 : 64	Nd ^f	Nd ^f
GdSi	Gd(OH) ₃ ·3SiO ₂ ·xH ₂ O	-	-	-	38,7	1,0	60,3	191,9 ± 52,5	38 : 62	11,7	Nd ^f
mGdSi-4	Gd ₂ O ₃ ·3SiO ₂	63,2	8,1	0,13	40,1	0,8	59,1	190,9 ± 33,5	34 : 66	94,0	37,4
mGdSi-12	Gd ₂ O ₃ ·3SiO ₂	68,9	15,0	0,22	42,2	0,8	57,0	Nd ^f	Nd ^f	114,2	37,0
mGdSi-24	Gd ₂ O ₃ ·3SiO ₂	83,5	15,8	0,19	39,2	0,6	60,2	Nd ^f	Nd ^f	130,2	36,1
mGdSi-48	Gd ₂ O ₃ ·3SiO ₂	66,9	13,0	0,19	39,4	0,9	59,7	210,2 ± 62,2	26 : 74	140,5	35,8

^aSe determinó mediante el estudio EDS. ^bCTMA: Hexadeciltrimetilamonio. Se calculó del análisis de carbono. ^cmedia ± SD. Determinado mediante medidas en TEM de al menos 100 partículas. ^dDeterminado mediante las isothermas de adsorción-desorción (método BET-BJH). ^eNo determinado.

De esta forma, las partículas del MOF se consumen gradualmente, liberando hexacianoferrato(III) en la medida que los iones OH^- difunden hacia el interior, y como resultado de esto, crece un composite de $\text{Gd}(\text{OH})_3$ y SiO_2 . El patrón de XRD en polvo muestra un material amorfo (**Figura III.3** en el ANEXO III), con un área superficial BET y porosidad muy bajas ($11,7 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) (Tabla 1 y **Figura III.4** en el ANEXO III).

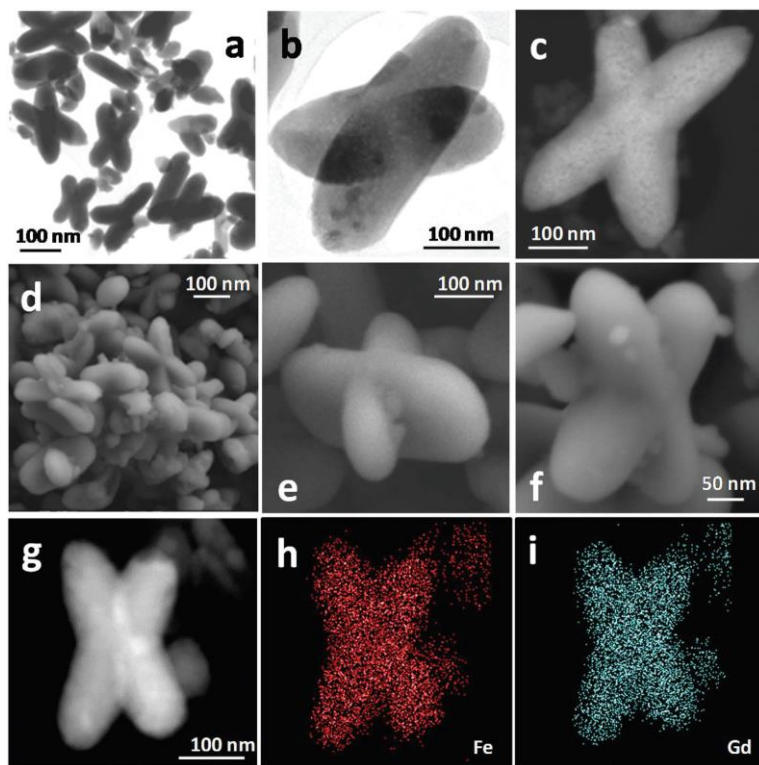


Figura 3. Estudio de microscopía electrónica de las nanocruces/nanovarillas del GdFe sintetizadas. (a, b) Imágenes de TEM que muestran el aspecto de las nanopartículas de GdFe. (c) La imagen STEM muestra la porosidad del MOF original. (d-f) Imágenes FESEM. (d) Muestra el aspecto de las partículas de GdFe, mientras que (e, f) muestran nanocruces individuales en detalle. (g-i) imagen STEM (g) e imágenes de mapeo elemental por EDS de una nanocruz de GdFe (h, i).

Mediante un estudio de TEM (**Figura 4**) confirmamos que la morfología no experimenta cambios significativos en el proceso de transformación del MOF GdFe al nanocomposite GdSi, aunque las cruces y varillas nanométricos presentan un diámetro promedio ligeramente más pequeño. Además, a pesar de las observaciones de Lou y colaboradores sobre microcajas de azul de Prusia,^{25,26} nuestras partículas transformadas son en su mayoría densas, y solo se encontraron unas pocas unidades huecas (**Figura 3c**). Atribuimos tal característica diferente del material a la nanoescala, ya que la difusión de los iones OH⁻ hacia el interior de las partículas es más rápida en partículas más pequeñas y el compuesto Gd(OH)₃·3SiO₂·xH₂O precipita rápidamente para rellenar el espacio vacío dejado por la liberación del [Fe(CN)₆]³⁻.

De lo contrario, las estructuras huecas restantes se vuelven inestables y colapsan (**Figura 4d y h**). El análisis por EDS es consistente con la estequiometría esperada (relación atómica de Gd: Si de aproximadamente 2: 3), y demuestra una eliminación de hierro casi completa (Tabla 1 y **Figura III.5** en el ANEXO III). Además, la distribución espacial del Gd(OH)₃ y SiO₂ en partículas aisladas puede verse claramente mediante un mapeo elemental (**Figura 4i-1**), que ilustra tanto la distribución homogénea de Gd y Si, como la extracción del hierro.

Por otro lado, debe tenerse en cuenta que los nanomateriales densos generalmente muestran algunas limitaciones para su aplicación en sistemas químicos y biológicos, ya que suelen presentar baja estabilidad en fase líquida, interacción limitada

entre centros activos y moléculas reactivas y fuertes restricciones superficiales para la unión de moléculas.

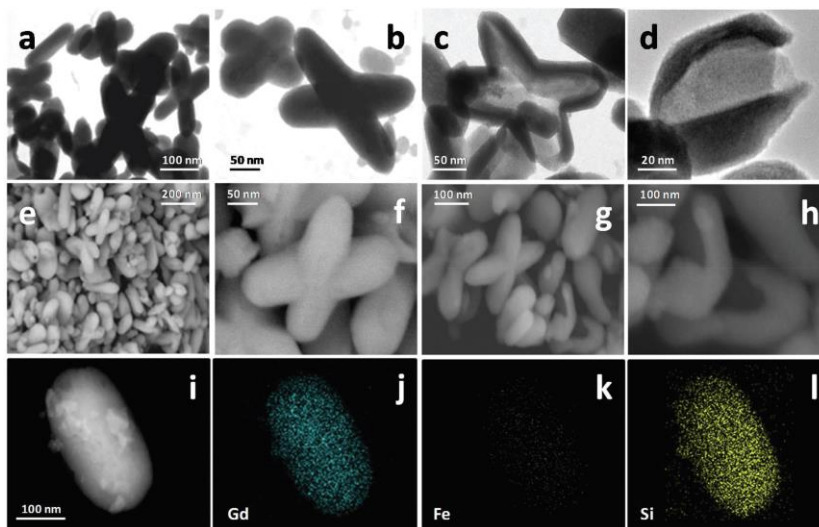


Figura 4. Estudio de microscopía electrónica de las nanocruces y nanovarillas del GdSi sintetizadas usando análogos del azul de Prusia como plantillas a temperatura ambiente. (a-d) Imágenes TEM. (a) y (b) muestran el aspecto de las nanopartículas de GdSi. Ocasionalmente, se pueden encontrar partículas vacías (c), aunque la mayoría de ellas se vuelven inestables y colapsan (d). (e-h) Imágenes FESEM. (e) y (g) Muestran la apariencia de las partículas de GdSi, mientras que (f) muestra una nanocruz en detalle y en (h) se presentan algunos fragmentos vacíos. (i-l) imagen de STEM (i) e imágenes de mapeo elemental por EDS de una nanovarilla de GdSi (j-l).

En este sentido, el desarrollo de un perfil mesoporoso en nanopartículas de GdSi podría proporcionar estabilidad coloidal, al tiempo que introduciría nuevas características superficiales y texturales.²⁷ De esta forma, es posible promover la porosidad en nanopartículas de sílice mediante un tratamiento hidrotermal en medio alcalino con un agente director de estructura, como el CTAB.^{20,21,28} Aquí, con un control preciso de las variables de síntesis, se produjo una

transformación del GdSi amorfo y denso sin cambios en su morfología y tamaño, lo que dio como resultado nanocruces y nanobarras mesoporosas, uniformes y monodispersas (mGdSi-*n*). La disolución de sílice amorfa tiene lugar desde la superficie exterior a la pared interna del GdSi, y el equilibrio entre la generación de especies de silicato y la incorporación simultánea del surfactante dentro de la matriz inorgánica debe mantenerse para el crecimiento de la plantilla micelar apropiada para la formación de la mesofase creciente. Suponemos que la sílice es el único componente del nanocomposite involucrado en el proceso, ya que el Gd(OH)₃ muestra una estabilidad muy alta en medio alcalino (producto de solubilidad, $K_{ps} = 1.8 \times 10^{-23}$). Sin embargo, se espera que la dispersión homogénea de los nanocristales de Gd(OH)₃ y SiO₂ en el compuesto favorezca al crecimiento de la pared mesoporosa por este mecanismo. Además, después de la calcinación a 500 °C, el patrón de DRX en polvo continúa correspondiendo a un sólido amorfo (**Figura III.3b** y **c** en el ANEXO III). Esto resultó sorprendente, ya que se esperaba que el tratamiento térmico a 500 °C diera lugar al crecimiento de pequeños cristales de Gd₂O₃.²⁹ Para mayor claridad, calcinamos la muestra mGdSi-4 a 700 °C en aire durante 6 h, y se obtuvo nuevamente un material completamente amorfo (**Figura III.3d** en el ANEXO III). Esto se debe al tamaño muy pequeño de las partículas altamente dispersas de Gd(OH)₃ y SiO₂ en el nanocomposite, y a la mutua inhibición del crecimiento cristalino de ambos compuestos.²⁶

Sin embargo, el perfil obtenido en las isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno indica que durante el tratamiento hidrotermal la incorporación de CTAB en la matriz densa del

GdSi conduce a una mesofase que, después de la calcinación, aumenta su área superficial un orden de magnitud ($94 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, Tabla 1 y **Figura III.6a** en el ANEXO III). Si el tratamiento hidrotermal se prolonga, el área BET sigue aumentando, pero la propagación de la porosidad es mucho más lenta ($140,6 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ tras 48 h, Tabla 1 y **Figura III.6b-d** en el ANEXO III). De hecho, cuando calculamos la fracción de surfactante incorporada en las muestras tratadas hidrotermalmente (Tabla 1), se observa que el proceso se completa en las primeras 12 h. Además, se ha encontrado pequeñas diferencias en el tamaño y la distribución de los poros en estos materiales, con un diámetro de poro promedio de aproximadamente 3.6-3.8 nm (Tabla 1 y **Figura III.7** en el ANEXO III).

Nuestro estudio de microscopía electrónica por TEM y FESEM (**Figura 5** y **Figura III.8** en el ANEXO III) no revela cambios significativos en la forma y el tamaño de las partículas después de la incorporación del surfactante en la matriz del GdSi. Las imágenes de TEM (**Figura 5a y b**) muestran nanopartículas monodispersas con mesoporosidad bien desarrollada. Aunque es posible encontrar algunas disposiciones hexagonales locales de $P6mm$ (**Figura 5b**), no se observa un orden de largo alcance en esta compleja estructura porosa, donde los mesocanales no se alinean sobre toda la partícula, sino que forman poros de tipo agujero de gusano, que se distribuyen aleatoriamente en todas las direcciones. Dicha mesofase desordenada se debe probablemente a la baja alcalinidad del gel de síntesis ($\text{OH}^-/\text{SiO}_2 = 0.15$), ya que la cinética de la transformación del GdSi inicial depende fuertemente de la concentración de álcali.²⁰ Por el contrario, bajo estas condiciones de síntesis, las partículas

adquieren un grado de agregación muy bajo, lo que conduce a partículas totalmente discretas.

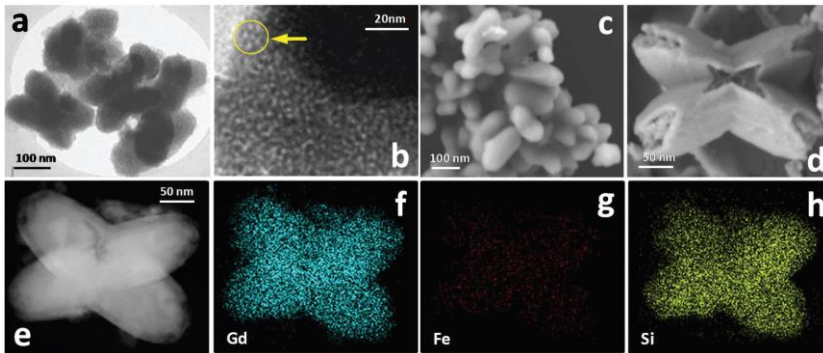


Figura 5. Estudio de microscopía electrónica de nanocruces y nanovarillas $mGdSi-n$ obtenidas a través de transformación hidrotérmica del $GdSi$ preformado a $100\text{ }^{\circ}C$. (a, b) Imágenes TEM de nanopartículas $mGdSi-4$ (a) y su mesofase porosa irregular, tipo agujero de gusano (b). Sin embargo, es posible encontrar alguna disposición local de microestructura en simetría hexagonal (círculo amarillo). (c, d) imágenes FESEM de partículas $mGdSi-4$ (c) y $mGdSi-48$ de una sola partícula que presenta un daño severo debido a un tratamiento hidrotérmico largo. (e-h) Imagen STEM (e) e imágenes EDS de mapeo elemental de una nanocruz de $mGdSi-4$ (f-h).

A pesar de las condiciones relativamente suaves utilizadas en el tratamiento hidrotérmico, no es recomendable mantener la mesofase final durante un periodo de tiempo prolongado ($t > 24$ h), ya que no se logra incorporación adicional de surfactante y, en cambio, si se produce disolución parcial de los nanocristales, estropeando el material híbrido (**Figura 5d**). Como consecuencia, la relación cruces: varillas disminuye a 1:3 (Tabla 1). Sin embargo, no se observan cambios composicionales en el nanocompuesto mesoporoso según el análisis por EDS (Tabla 1, **Figura 5e-h** y **Figura III.9** en el ANEXO III). Los resultados del mapeo elemental demuestran la distribución homogénea de Gd y Si dentro de las partículas,

que corresponden a los pequeños cristales de Gd_2O_3 y SiO_2 , así como a la presencia residual del hierro no extraído.

Finalmente, se espera que el desarrollo de mesoporosidad en un material denso de sílice aumente la fracción de silanoles aislados en su superficie.³⁰ Desde un punto de vista semicuantitativo, esto debería exhibir un incremento significativo de una banda de tensión de OH⁻, centrada alrededor de 3700 cm^{-1} . Esto se puede apreciar claramente al comparar los espectros de FTIR de las muestras GdSi y mGdSi-4 (**Figura 6**). Mientras que no se observa señal en el material denso y seco en el intervalo de $3300\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$, una banda a 3730 cm^{-1} ilustra la vibración de tensión de las especies Si-OH en la muestra mGdSi-4. Esta banda aumenta notablemente en el nanocompuesto mGdSi-48, probablemente como consecuencia de la destrucción parcial del material, lo que provoca un aumento adicional de las especies silanol.

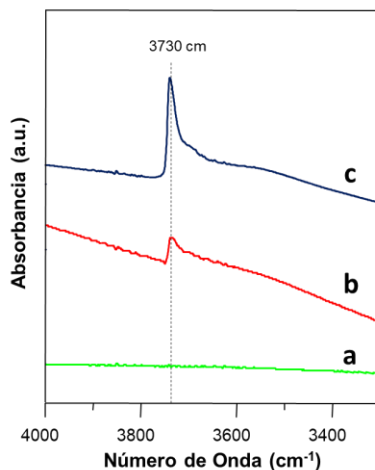


Figura 6. Espectros de IR representativos de los materiales secados a ($400\text{ }^{\circ}\text{C}$) que ilustran la vibración de tensión de las especies Si-OH en mGdSi-*n*: (a) GdSi; (b) mGdSi-4; y (c) mGdSi-48.

5.2.2 Medidas de relajatividad y RMI *in vitro*

La eficiencia de las muestras GdSi y mGdSi-4 como ACs ponderados en T_1 o T_2 para RM se evaluó midiendo las velocidades de relajación longitudinal (r_1) y transversal (r_2) de los protones del agua en suspensiones acuosas del material a temperatura ambiente en una unidad Philips Achieva X-Series de RMI de 3 T. Se prepararon coloides estables en disolución acuosa de goma de xantano (0,1%) con una concentración de Gd^{3+} en el intervalo de 0,05-1,00 mM.

Los valores de r_1 y r_2 se determinaron, respectivamente, a partir de las pendientes de la gráfica de $1/T_1$ (s^{-1}) y $1/T_2$ (s^{-1}) frente a la concentración de Gd^{3+} (mM, Tabla 2), siguiendo el modelo de la ecuación 5.3. Con fines comparativos, se llevaron a cabo las mismas medidas con la sal gadopentetato de dihidrógeno que es un AC comercial (Aldrich) equivalente al gadopentetato de dimeglumina utilizado en la práctica clínica (Magnevist®). Debe tenerse en cuenta que cuando el valor de r_2/r_1 es cercano a 1 se favorece la aplicación como AC positivo (brillante), mientras que si esta relación es mucho más alta que 1 el AC funciona mejor para contraste negativo (oscuro).³¹

Tabla 2. Relajatividades del mGdSi-4 y el Gd-DTPA (intensidad de campo magnético, $B_0=3$ T).

Muestra	$r_1/s^{-1}\cdot mM^{-1}$	$r_2/s^{-1}\cdot mM^{-1}$	r_2/r_1
GdSi	2,6	3,6	1,4
mGdSi-4	2,0	3,1	1,5
Gd-DTPA	3,8	3,0	0,8

Como se puede ver en la Tabla 2, ambas muestras basadas en el nanocomposite de Gd-Si presentan una capacidad de

relajación transversal similar a la del complejo soluble de Gd^{3+} , pero con un valor de r_1 ligeramente inferior. Esto resultó sorprendente, porque en el caso de las nanopartículas con un número creciente de centros paramagnéticos, con respecto al complejo mononuclear Gd^{3+} , se esperaba una mejora de la relajatividad longitudinal debido al efecto cooperativo y la accesibilidad a todos los sitios donde se encuentra el Gd^{3+} (superficie y seno del material), especialmente en el caso del material mesoporoso.²³ Atribuimos este hecho a algunas restricciones para la interacción de los protones de agua con los núcleos de Gd^{3+} debido al tamaño relativamente grande de estas partículas (alrededor de 200 nm de diámetro promedio). En este sentido, aunque la pared mesoporosa puede favorecer la difusión del agua dentro de las partículas del nanocomposite, el entorno hidrofóbico dentro de los canales y su carácter irregular (“agujeros de gusano”), limitan la accesibilidad a los iones Gd^{3+} , de manera que algunos centros paramagnéticos podrían estar fuera del alcance de los protones del agua.

No obstante, con un valor r_2/r_1 cercano a 1, se espera que estos materiales mejoren las imágenes de RMI tanto en contraste positivo como negativo. Desafortunadamente el gran tamaño de estas partículas no los hace útiles para su aplicación como agentes de contraste,³² lo cual nos motivó para buscar cómo desarrollar nuevos ACs más pequeños usando esta metodología como base. Para ello, y dado que el material GdSi mostró gran estabilidad en medio acuoso y buenos valores de relajatividad r_1 y r_2 , se decidió optimizar el proceso de síntesis, con vistas a obtener nanopartículas de menor

tamaño en las que aumenta la interacción de los protones del agua con los centros magnéticos.

5.2.3 Optimización de la síntesis de nanopartículas Gd-Si como agente de contraste T_1

Con la metodología desarrollada en el apartado anterior se ha obtenido un nuevo AC tal como se esquematiza en la **Figura 7** siguiendo la estrategia de síntesis de nanopartículas de óxido de Gd-Si preformadas. En primer lugar, se desarrolló un método mejorado para la preparación del análogo del azul de Prusia GdFe con un tamaño de partícula pequeño, solventando así el problema que se nos presentó con el material anterior.

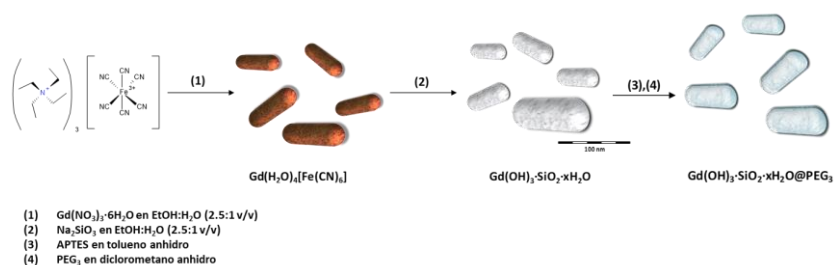


Figura 7. Esquema sintético de las nanopartículas de óxido de Gd-Si, usando $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ como plantilla.

Se obtuvieron partículas en forma de varillas, monodispersas, de alta pureza y con una longitud promedio de 94 nm (ver Tabla 3). La estructura cristalina de esta red de coordinación tridimensional, concuerda con el $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (**Figura III.10** en el ANEXO III).²³ El análisis elemental llevado a cabo por EDS revela una distribución muy homogénea y uniforme de Gd y Fe en las partículas (Mapeo elemental, **Figura 8**).

Tabla 3. Características composicionales y texturales de los materiales sintetizados.

Muestra	Fórmula Molecular	Composición Atómica (%) ^a			Tamaño (nm)		Área BET (m ² ·g ⁻¹) ^b
		Gd	Fe	Si	TEM ^c	DLS ^d	
GdFe	Gd(H ₂ O) ₄ [Fe(CN) ₆]	52,8	47,2	-	94,2 ± 35,5	nd ^e	nd ^e
GdSi	Gd(OH) ₃ ·3SiO ₂ ·xH ₂ O	18,6	1,3	80,1	75,2 ± 24,0	84 ± 44	19,0

^aSe determinó mediante el estudio EDS. ^bAnálisis de área superficial por el método de Brunauer-Emmet-Teller (BET). ^cmedia ± SD. Determinado mediante medidas en TEM de al menos 200 partículas. ^dDispersión de la luz difusa (DLS). ^eNo determinado.

El proceso sintético llevado a cabo con este material progresa de la misma manera que con los cristales más grandes. Se superponen las cinéticas de liberación de especies [Fe(CN)₆]³⁻ y difusión de OH⁻ en el material, produciendo a su vez SiO₂, siguiendo las ecuaciones químicas 5.4, 5.5 y 5.6 expresadas en la transformación del material de mayor tamaño (Apartado 5.2). El estudio de microscopía electrónica por TEM y FESEM (**Figura 9**) confirma que la morfología no experimenta cambios significativos, aunque las varillas nanométricas presentan un diámetro promedio ligeramente más pequeño (75 nm). Como ya se ha detectado con otras morfologías a nanoescala,²² nuestras partículas transformadas son totalmente densas.

El análisis de EDS es consistente con la estequiometría esperada (relación atómica de Gd: Si de aproximadamente 2: 3), y demuestra una eliminación del hierro casi completa (Tabla 3). Además, la distribución espacial de Gd(OH)₃ y SiO₂ en partículas aisladas puede verse claramente por mapeo elemental (**Figura 9c-h**), que ilustra tanto la distribución homogénea de Gd y Si, como la extracción del hierro. En este caso también se trató de desarrollar porosidad en la superficie de las partículas, mediante transformación pseudomórfica. Sin embargo, estas partículas tan pequeñas no resistían el

tratamiento hidrotérmal de incorporación del surfactante, sufriendo un proceso de redisolución y posterior maduración de Oswald²⁸ lo que hace inviable la síntesis.

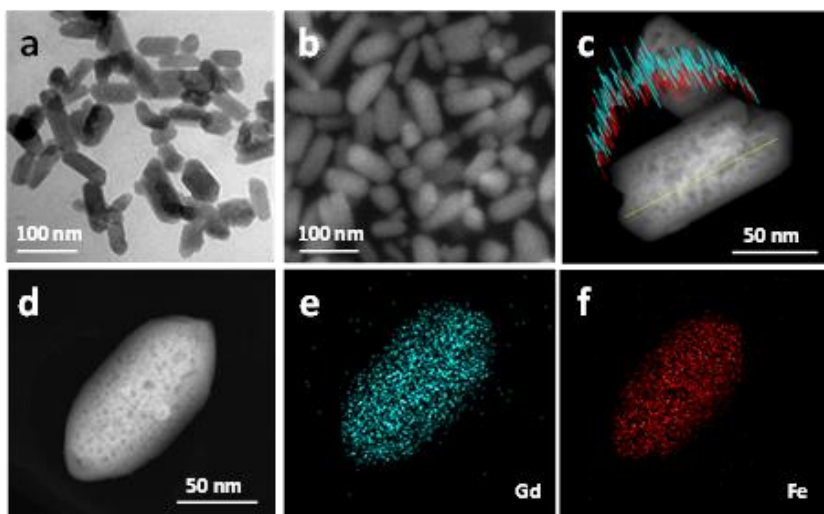


Figura 8. Estudio de microscopía electrónica de las nanovarillas de GdFe sintetizadas. (a-b): Imágenes TEM (a) y FESEM (b). (c) Imagen STEM con análisis EDS siguiendo una línea recta a través de una partícula individual. Leyenda: línea azul = Gd; línea roja = Fe (d-f): imagen STEM (d) e imágenes de mapeo elemental por EDS de una nanobarra de GdFe (e-f).

La muestra GdSi presenta un buen patrón de estabilidad para uso en medio biológico. En este contexto, el diámetro hidrodinámico, según lo determinado por DLS (**Figura III.11** en el ANEXO III), es $83,9 \pm 44,1$ nm, está muy cerca de lo determinado por TEM, y con una estrecha distribución de tamaño, lo que indica que la mayoría de las partículas están monodispersas.

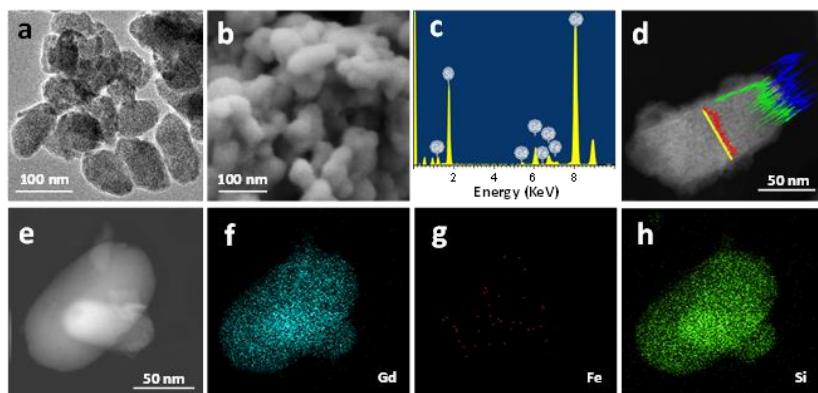


Figura 9. Estudio de microscopía electrónica de nanovarillas de GdSi obtenidas por transformación alcalina del GdFe precursor. (a, b): Imágenes TEM (a) y FESEM (b) de las nanopartículas de GdSi; (c) análisis elemental por EDS; (d) Imagen STEM con análisis EDS siguiendo una línea recta a través de una partícula individual. Leyenda: línea azul = Gd; línea roja = Fe; línea verde = Si; (e-h) Imagen de STEM (e) e imágenes de mapeo elemental por EDS de dos nanovarillas de GdSi (f-h).

Al igual que en el caso anterior, para determinar la eficacia del agente de contraste se calcularon sus valores de relajatividad longitudinal y transversal, extrayéndose de la pendiente de las curvas $1/T_n$ (s^{-1}) frente a la concentración de catión paramagnético (Gd^{3+} , mM), según el modelo de la ecuación 5.3.

Como puede verse en la **Figura 10**, la muestra de GdSi presenta valores de relajatividad longitudinal ($r_1=5,6 s^{-1} mM^{-1}$) y transversal ($r_2=8.2 s^{-1} mM^{-1}$), respectivamente, 1,5 y 2,7 veces mayores que los correspondientes al quelato soluble de Gd^{3+} . Esto concuerda con las observaciones de otros autores para diferentes nanopartículas de silicato de Gd.³³ En este punto, debe considerarse la alta concentración de Gd (320 mg/g) presente en este material. Con respecto al complejo mononuclear de Gd^{3+} , la gran densidad de centros

paramagnéticos en la nanopartícula acorta T_1 y T_2 , debido a un efecto cooperativo y la accesibilidad de las moléculas de agua a todos los centros de Gd^{3+} (superficie y seno).²³

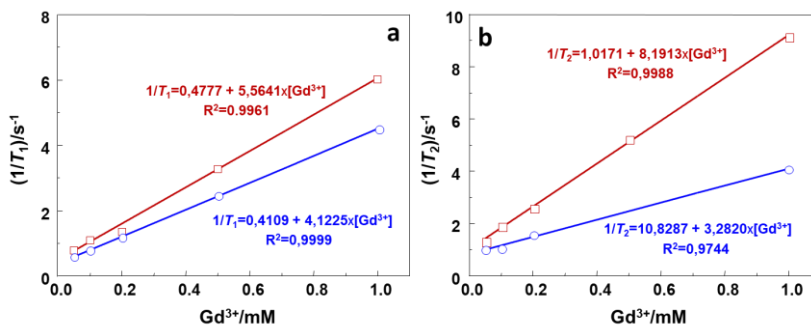


Figura 10. Medidas de la velocidad de relajación ponderadas en T_1 (a) y en T_2 (b) frente a la concentración de disoluciones acuosas de GdSi (0,1% de goma de xantano) en un campo magnético de 3 T. Leyenda: (Cuadrado rojo) GdSi; (Círculo azul) Gd-DTPA.

De hecho, la mejora del valor de r_1 y r_2 respecto a los presentados en la sección 5.2.2 puede atribuirse al aumento de la superficie específica de contacto con las moléculas de agua, dado su menor tamaño y buena dispersión. Por lo tanto, es evidente que no existen restricciones de difusión entre las moléculas de agua y los sitios de Gd^{3+} ubicados en la matriz de silicato. Además, debe tenerse en cuenta que la presencia de una pequeña cantidad de cationes Fe^{3+} en la muestra de GdSi sintetizada (Tabla 3) podría contribuir a reducir el valor de T_2 . En este sentido, con una relación r_2/r_1 de aproximadamente 1,5, se espera que este material mejore las imágenes de RMI sobre todo en contraste positivo. Para verificar aún más la capacidad del nanomaterial GdSi, recolectamos imágenes *in vitro* (*phantoms*) de RMI. Se tomaron secciones en orientación coronal con concentración variable de AC o de gadopentetato.

Los resultados muestran que las imágenes T_1 se vuelven progresivamente más brillantes a medida que aumenta el contenido de nanopartículas (**Figura 10**). También, las imágenes ponderadas en T_2 se vuelven más oscuras con el aumento de la concentración de Gd^{3+} , pero con un menor efecto que el contraste positivo. En todos los casos, la sensibilidad de este sistema es mayor que la del quelato comercial de Gd^{3+} . Esto nos animó a probar estas nanopartículas magnéticas en condiciones biológicas.

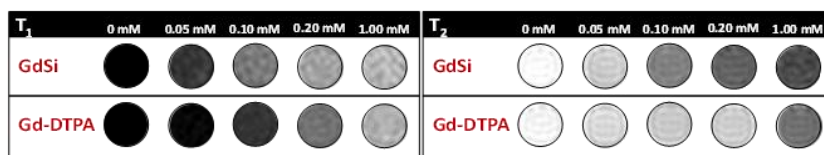


Figura 10. Secciones de RMI ponderadas en T_1 (izquierda) y T_2 (derecha) de disoluciones acuosas de GdSi (0,1% goma de xantano), con concentración de Gd^{3+} variable, campo magnético de 3 T y tiempo de eco de 2 ms (T_1) y 203 ms (T_2).

5.2.4 Estudio de citotoxicidad

Con el fin de validar la potencial capacidad de acción de las nanopartículas de Gd-Si en un entorno biológico, se evaluó su viabilidad celular 24 horas después de la incubación con la muestra de GdSi midiendo la conversión del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) en su forma de formazan siguiendo procedimientos estándar. Para estos experimentos, utilizamos fibroblastos sanos (línea celular 3T3) y varias líneas celulares cancerosas (células HeLa, células multiformes de glioblastoma 42-MG-BA y células de neuroblastoma SH-SY5Y) en el rango de concentraciones (0,25-100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Los resultados (**Figura 11**) indican que la

supervivencia celular fue siempre de alrededor del 70% o superior, incluso a la concentración máxima de partículas. A pesar de las limitaciones del ensayo MTT para una determinación de viabilidad celular precisa, estos resultados corresponden a un perfil de biocompatibilidad aceptable.

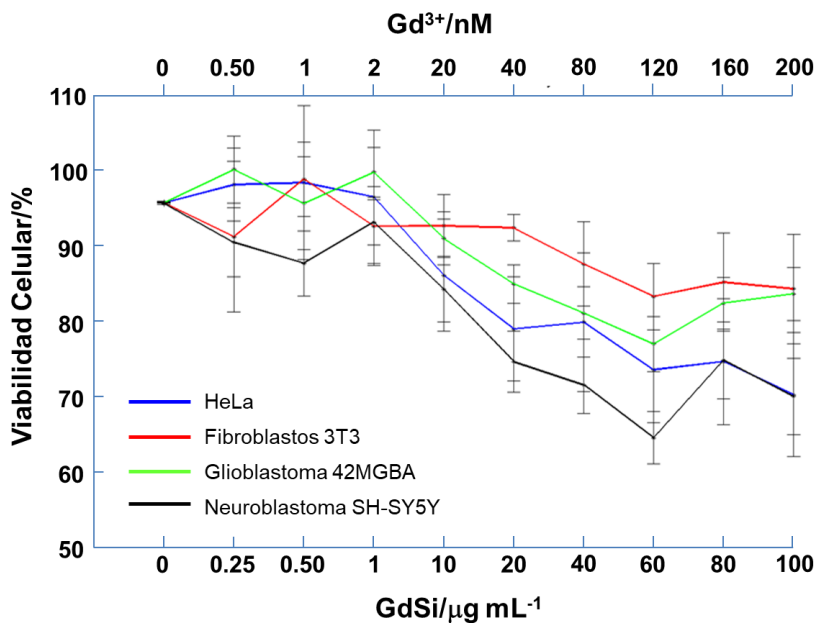


Figura 11. Ensayos de viabilidad celular *in vitro* MTT en diferentes líneas celulares incubadas con concentraciones variables de nanovarillas magnéticas de GdSi (media \pm SEM, $n = 4$). El eje X superior indica la concentración de Gd^{3+} equivalente a las concentraciones de GdSi mostradas en el eje X inferior.

5.2.5 Estudio de imágenes de RMI *in vivo*

Cuando se introducen nanopartículas no protegidas en sangre, éstas sufren una fuerte adsorción de proteínas (proceso de opsonización), lo que da como resultado la formación de la corona de proteínas, que promueve una mayor interacción con

los elementos celulares del sistema reticuloendotelial (RES).³⁴ Como consecuencia, las partículas se eliminan rápidamente de la sangre y se acumulan en los tejidos del RES, principalmente hígado, bazo y pulmones. En consecuencia, para el estudio *in vivo* del agente de contraste GdSi, primero modificamos la superficie de las nanovarillas con una cadena corta de polietilenglicol, conteniendo apenas 3 unidades etilenglicol (PEG₃). De esta forma, se espera que las nanopartículas prolonguen su circulación en el torrente sanguíneo, y finalmente se eliminen del cuerpo principalmente por vía renal (orina) y hepática (biliar).^{35,36} Entonces, se inyectó 1,0 mL de un coloide estable de 5 mg mL⁻¹ de GdSi_{PEG} en glucosa al 5,5% en la vena cateterizada de la cola de ratas macho Sprague-Dawley sanas (3 especímenes) como un bolo (0,04 mmol de Gd kg⁻¹). Posteriormente, se adquirieron las imágenes ponderadas en T_1 y T_2 antes (línea base) y después de la administración del AC mediante el uso de un escáner horizontal de 7 T.

La **Figura 12** muestra imágenes coronales ponderadas en T_1 de los riñones (**Figura 12a y b**, flechas rojas) e hígado (**Figura 12c y d**, flechas rojas), respectivamente, antes (**Figura 12a y c**) y después (**Figura 12b y d**) de la administración del AC. Estos órganos reciben la mayor parte de la corriente sanguínea por lo que se produce una gran acumulación de partículas en ellos, lo cual promueve una mejora notable del contraste de RMI T_1 . En los riñones se produjo un aumento del 7% en la intensidad de la señal (IS) de RMI después de la administración del AC. En el hígado se mostraron cambios no homogéneos, probablemente debido a la restringida biodistribución y farmacocinética de las nanopartículas, habiendo algunas áreas que representan grandes cambios hasta el 21% (**Figuras 12c y d**, punta de

flecha) mientras que otras áreas no mostraron cambios o incluso una disminución en la IS. La mejora del contraste en el hígado se mantuvo al menos una hora, tiempo que seguimos el agente de contraste por RMI. Podemos plantear la hipótesis de que el contraste se potenciará durante más tiempo, ya que cuando detuvimos la adquisición aun podíamos detectar mejora en la intensidad de la señal con respecto a la línea base.

Nuestro sistema GdSi muestra una gran estabilidad y un perfil de seguridad superior en fluidos biológicos en comparación con otras nanopartículas magnéticas estudiadas recientemente,^{37,38} ya que no se observó lixiviación de cationes en las pruebas de disolución llevadas a cabo durante 24 h. Además, aunque este no fue el objetivo de este trabajo, en el caso de su aplicación al estudio de desarrollo tumoral, la dirección de nanopartículas de Gd-Si a células cancerosas puede favorecerse mediante la incorporación superficial de motivos directores específicos hacia células que se dividen rápidamente.³⁹

Por el contrario, a pesar de los buenos resultados de RMI *in vitro* presentados anteriormente para T_1 , debemos decir que no se observó un cambio significativo en las imágenes ponderadas en T_2 después de la administración del AC.

5.3 Desarrollo de un agente de contraste dual, T_1 - T_2 , estable en medio biológico

Los buenos resultados obtenidos en cuanto a la síntesis controlada del análogo del azul de Prusia $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]$, pudiendo dirigir su síntesis hacia la obtención de nanocristales de determinada forma y tamaño y su uso como plantilla para el

diseño de agentes de contraste positivos biocompatibles nos animó a tratar de aprovechar la presencia cercana de los cationes Fe^{3+} y Gd^{3+} en su red cristalina con el fin de elaborar un agente de contraste dual capaz de disminuir eficazmente ambas velocidades de relajación de los protones del agua así como no lixiviar cationes al organismo garantizando una aplicación segura de este nuevo AC.

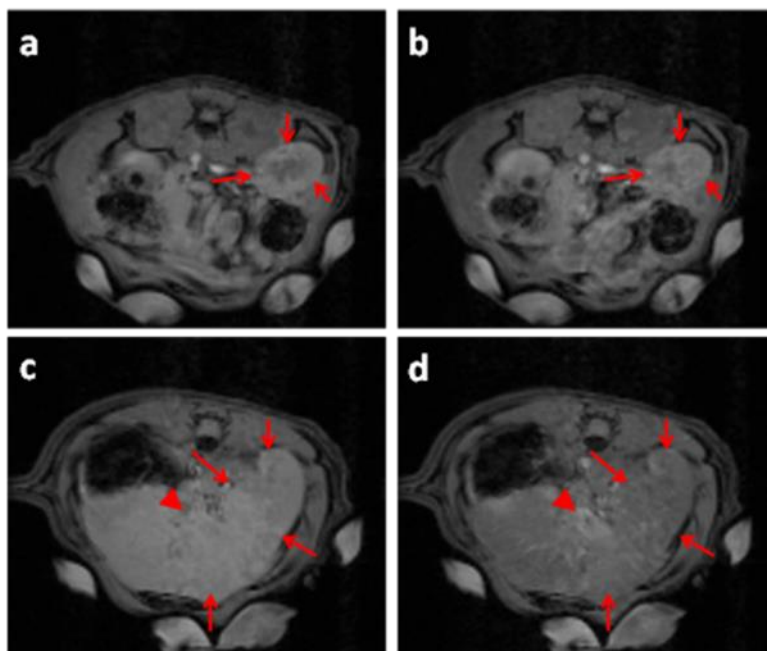


Figura 12. Imágenes coronales ponderadas en T_1 *in vivo* adquiridas de una rata macho Sprague-Dawley bajo un campo magnético de 7 T. (a, c) Control (línea base) sin administración de NPM. (b, d) Adquisición 30 minutos después de la inyección de nanopartículas de GdSi ($0,04 \text{ mmol de Gd}^{3+} \text{ kg}^{-1}$). Las líneas rojas muestran los riñones (a, b) y el hígado (c, d).

La estrategia de modalidad de contraste dual T_1 - T_2 puede proporcionar imágenes complementarias de T_1 y T_2 en RM, lo que permite aislar las señales de los artefactos de los agentes

de contraste en la región de interés.⁴⁰ Una adquisición dual ideal de T_1 - T_2 usando RMI sería la mejor opción para tejidos con moderados tiempos de relajación T_1 y T_2 , tales como hígado, riñones, músculo y materia cerebral.⁴¹

En una estructura como la del $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ el campo magnético local inducido por los centros superparamagnéticos de Fe promueve la alineación de los espines de los átomos de Gd en la misma dirección, lo que produce un aumento del efecto de contraste T_1 ^{42,43} que, junto con la fuerte actividad de contraste T_2 asociada a los átomos de Fe, puede promover una combinación centros magnéticos en la misma red para RMI dual. Desafortunadamente, a pesar de los buenos resultados de relajación obtenidos en estudios *in vitro*, el uso clínico de los derivados del azul de Prusia como ACs en RMI no resulta seguro debido a su solubilidad parcial en medio acuoso a pH fisiológico, liberando cantidades tóxicas de ambos cationes, Gd^{3+} y Fe^{3+} . Sin embargo, esta situación podría solventarse si las nanopartículas del análogo del azul de Prusia con Gd se protegen con un fino revestimiento de sílice estable y diamagnético. Como ya hemos demostrado, esto no es posible en medio alcalino, ya que el azul de Prusia y sus análogos reaccionan con silicato soluble, desencadenando un proceso de intercambio iónico que da como resultado una pérdida completa del hierro con condensación estequiométrica de hidróxido de gadolinio y sílice, para dar el material compuesto $\text{Gd}(\text{OH})_3 \cdot 3\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$.^{44,45} Para llevar a cabo con éxito el recubrimiento de las nanopartículas de $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ fue necesario activar la polimerización del silicato a pH neutro. Para este propósito, optamos por una estrategia sintética biomimética para activar la sílice a pH~7 mediante el uso de un

análogo funcional de la proteína silicateína α (la trietilamina, TEA)⁴⁶ como catalizador. Mediante el control preciso de la preparación del $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, además de la hidrólisis y polimerización de silano, hemos obtenido nanopartículas del material híbrido $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]@\text{SiO}_2$, muy estable en fluidos biológicos, con ajustado diseño de tamaño y morfología (de nanocruces a nanovarillas). La combinación de centros magnéticos de Gd y Fe estrechamente empaquetados en la misma estructura cristalina favorece un efecto magnético sinérgico, que produce una notable mejora de la relajatividad longitudinal con respecto a los quelatos solubles de Gd^{3+} , manteniendo la alta relajatividad transversal inherente a las nanopartículas de óxido de hierro.

5.3.1 Síntesis y caracterización del agente de contraste $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]@\text{SiO}_2@\text{PEG}_3$ ($\text{GdFeSi}_{\text{PEG}}$).

Las nanopartículas magnéticas estables de Gd-Fe se sintetizaron en dos pasos. Inicialmente, los centros paramagnéticos de Gd^{3+} y los superparamagnéticos Fe^{3+} se combinaron en la estructura del análogo del azul de Prusia $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (GdFe). A partir de este momento ejercemos control sobre la forma y el tamaño de los híbridos resultantes mediante la incorporación variable de ácido acético, obteniendo nanovarillas uniformes monodispersas de aproximadamente 100 nm de diámetro promedio (GdFe-1, sin ácido acético) o una mezcla de nanocruces y nanovarillas monodispersas de 260 nm de diámetro promedio (GdFe-2, con ácido acético). Posteriormente, los cristalitos de GdFe aislados se recubrieron con una capa fina de sílice mediante la polimerización del TMOS a pH neutro en presencia de análogos de silicateína α (TEA), obteniéndose partículas de $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]@\text{SiO}_2$ con

la misma forma y tamaño que el análogo de azul de Prusia primitivo (GdFeSi-1 y GdFeSi-2, respectivamente). La secuencia para obtener las diferentes muestras de GdFeSi se esquematiza en la **Figura 13**. Con fines comparativos, hemos incluido la ruta alternativa correspondiente a la polimerización de silicato sobre partículas de GdFe en medio alcalino, para dar nanopartículas del composite $\text{Gd}(\text{OH})_3 \cdot 3\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$.^{44,45}

Finalmente, para los estudios *in vivo*, las muestras de GdFeSi se silanizaron con APTES y se hicieron reaccionar con un precursor de PEG₃ para desarrollar un análogo del azul de Prusia con gadolinio recubierto de sílice con un polietilenglicol de cadena corta decorando su superficie (GdFeSi_{PEG}). En la **Figura 13** también se muestra una representación artística del material final GdFeSi_{PEG}.

En el esquema de síntesis (**Figura 13**) hay dos puntos cruciales a tener en cuenta: i) el papel del ácido acético en la distribución de formas y tamaños de los nanocristales; y ii) un control preciso del pH durante la polimerización del silicato. Se pueden obtener nanocristales de $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ con una morfología dual bien definida (cruces y varillas, con un diámetro promedio de más de 260 nm, y una relación de forma en torno a 1:2, determinada por TEM) o como simples nanovarillas (diámetro promedio de más de 95 nm) (Tabla III.12 en el ANEXO III).

El GdFe obtenido es parcialmente soluble en agua, pero es estable en una mezcla de EtOH: H₂O (2,5: 1 v/v). Sin embargo, si el proceso de revestimiento de sílice se lleva a cabo con silicato de sodio (pH > 8,5), tiene lugar una reacción de intercambio iónico, dando como resultado la disolución

completa del GdFe y la precipitación simultánea de $\text{Gd}(\text{OH})_3$ ecuaciones 5.4, 5.5 y 5.6.

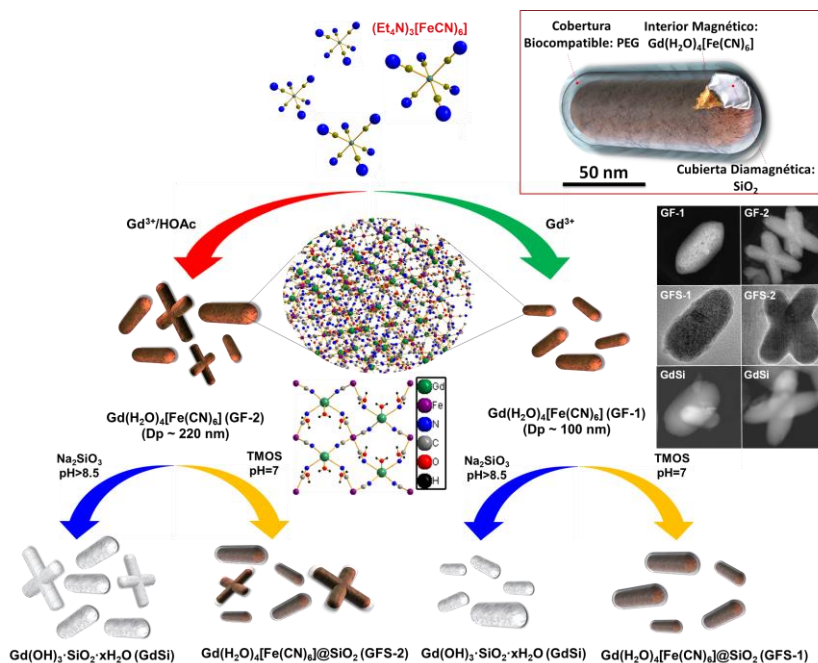


Figura 13. Esquema de la estrategia biomimética seguida para obtener los materiales GdFeSi y las rutas sintéticas alternativas. En el recuadro se muestra una representación artística de las nanopartículas GdFeSiPEG finales.

De esta manera, como ya se demostró anteriormente, se produce el nanocomposite $\text{Gd}(\text{OH})_3 \cdot 3\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (**Figura 1**).^{22,45} De otra manera, bajo pH neutro siguiendo una estrategia sintética biomimética usando análogos funcionales de la silicateína α como TEA, la pared de sílice crece homogéneamente sobre las nanopartículas de GdFe funcionalizadas con CPTMS, para dar el material GdFeSi. No se observó disolución significativa del compuesto de GdFe durante el proceso de recubrimiento (la lixiviación de hierro tiñe

rápidamente el medio de amarillo), dando como resultado nanopartículas de $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]@\text{SiO}_2$ con la misma morfología y distribución de tamaños que el análogo de azul de Prusia con Gd. En este punto, se observa un ligero aumento en el diámetro medio de las partículas en el caso de las varillas pequeñas de la muestra GdFeSi-1. Sin embargo, el material GdFeSi-2 sufre cierta reducción del tamaño de partícula después del recubrimiento de sílice, que puede atribuirse a la destrucción parcial de las nanocruces más grandes durante el tratamiento (como se confirma por la disminución en la relación cruces: varillas, ver Tabla III.12 en el ANEXO III).

Se espera que estas nanopartículas protegidas con sílice sean estables en medio acuoso, de acuerdo con un potencial Z inferior a -10 mV (Tabla III.12 en el ANEXO III). Sin embargo, el diámetro hidrodinámico por DLS de las muestras GdFeSi en agua (GdFeSi-1 = $124,7 \pm 81,9$, GFS-2 = $343,7 \pm 154,1$) es significativamente mayor que las medidas hechas por TEM (GFS-1 = $106,7 \pm 33,5$, GFS-2 = $230,3 \pm 35,5$) (**Figura III.13** en el ANEXO III), que se debe a una cierta agregación de las partículas en el agua, con un índice de polidispersión (Pdl) que varía de 0,2 a 0,4 (Tabla III.12 en el ANEXO III). Su estabilidad en PBS está claramente comprometida por la alta fuerza iónica de este medio, dando lugar a suspensiones muy inestables donde la agregación tiene lugar en gran medida (Pdl = 1, Tabla III.12 en el ANEXO III). Esto se supera notablemente mediante la PEGilación de las muestras (0,05-0,06 mmol de PEG₃/g, según lo determinado por TGA). Se obtuvieron los diámetros hidrodinámicos en DLS para las muestras GdFeSi@PEG (GdFeSi-1@PEG = $111,4 \pm 62,7$, GdFeSi-2@PEG = $228,9 \pm 79,3$) que son muy similares al tamaño real determinado por TEM

(**Figura III.13** en el ANEXO III), los valores de PdI son claramente inferiores que en las suspensiones de GdFeSi (Tabla III.12 en el ANEXO III). Además, la PEGilación reduce significativamente la agregación en PBS (aunque no la suprime por completo), lo que permite preparar suspensiones razonablemente estables de estas nanopartículas. En este sentido, la PEGilación contribuye a minimizar la reacción inmunogénica bajo administración intravenosa de dos formas: por un lado, por la estabilización del coloide. Por otro lado, limita o impide la interacción de los grupos funcionales en superficie de las nanopartículas con las proteínas plasmáticas.⁴⁷

Los diagramas de rayos X en polvo revelan que la estructura del GdFe se conserva completamente después del recubrimiento con sílice (**Figura III.14** en el ANEXO III). La PEGilación tampoco modifica significativamente el patrón de DRX.

El estudio de microscopía electrónica (**Figura 14**) confirma la formación de nanopartículas monodispersas con una fina capa de sílice (6-10 nm de ancho), continua y homogénea sobre cada núcleo de $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. El análisis de EDS es consistente con la estequiometría esperada para el análogo del azul de Prusia (relación atómica Gd: Fe = 1), aunque existen pequeñas desviaciones que atribuimos a la precisión de la técnica analítica sobre las nanopartículas individuales. Además, la distribución espacial de Si, Gd y Fe en partículas aisladas observada mediante mapeo elemental (**Figura 14i-1**), ilustra la distribución homogénea de Gd y Fe en el núcleo, así como la presencia de Si exclusivamente en la cubierta. Esto se indica claramente en la **Figura 14d**, que muestra análisis elementales

por EDS trazados en línea sobre una partícula, localizando Gd y Fe dentro de las nanopartículas y el Si en la parte exterior. Tampoco, se aprecian cambios en la estructura estrechamente empaquetada del análogo de azul de Prusia, así como la estimación de la distancia interplanar del plano [112] determinada por TEM que coincide bastante bien con el cálculo teórico según la ley de Bragg (**Figura 14g-h**).

Los resultados de FTIR mostraron dos picos a 2140 y 2150 cm^{-1} correspondientes a la vibración de tensión del enlace Fe-CN-Gd, y una vibración adicional a 2070 cm^{-1} (**Figura III.15** en el ANEXO III). La señal de baja energía pertenece al ferrocianuro $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, que es probablemente generado por la reducción del ferricianuro $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ por el alcohol durante la síntesis.²⁴ Los pequeños picos en el rango 1610-1630 cm^{-1} se asignan a la vibración $\delta(\text{H-O-H})$.⁴⁸ Además de una señal aguda $\nu(\text{H-O})$ presente a 3610 cm^{-1} y una banda ancha intensa $\nu(\text{H-O-H})$ en el rango de 3000-3550 cm^{-1} .^{48,49} Después de dotar a las partículas de GdFe con el recubrimiento de sílice, aparece una nueva señal amplia centrada en 1085 cm^{-1} , correspondiente a la vibración $\nu(\text{Si-O-Si})$. Además, las muestras PEGiladas muestran pequeños picos en el rango de 2850-2950 cm^{-1} , que se deben a las $\nu(\text{C-H})$ de los grupos metileno. El revestimiento de sílice resulta ser crucial para la estabilidad de estos híbridos en fluidos fisiológicos. El material GdFe es parcialmente soluble en agua y fluidos fisiológicos, lixiviando cantidades significativas de cationes metálicos en un período corto. Para estudiar esto, dispersamos GdFeSi-1_{PEG} a 37 °C en una disolución isotónica de glucosa al 5.5% en peso o en fluido corporal simulado SBF y monitorizamos la concentración de metal lixiviado por ICP/ICP-MS (**Figura III.16** en el ANEXO III).

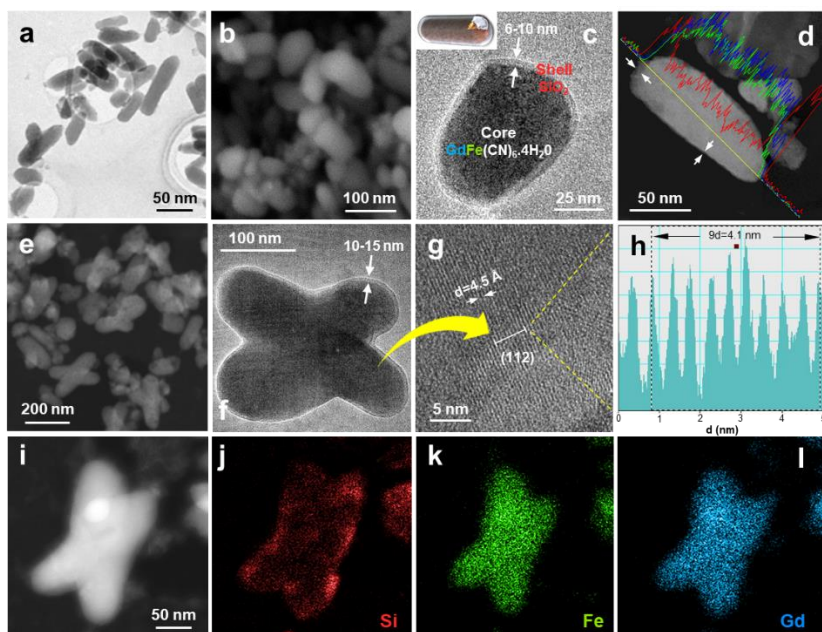


Figura 14. Estudio de microscopía electrónica de los materiales GdFeSi sintetizados. (a, b): imágenes generales de las muestras GdFeSi-1 por TEM (a) y FESEM (b). (c) Imagen TEM de alta resolución de una nanovarilla de GdFeSi-1 que muestra su naturaleza núcleo-cubierta. En el recuadro se muestra su representación artística. (d) Los análisis de líneas según EDS de una nanovarilla de GdFeSi-1 representan los cambios en la composición desde la superficie exterior de la partícula al núcleo interno. (e) Imagen general de la muestra GdFeSi-2 por STEM. (f) Imagen TEM de alta resolución de una nanocruz de GdFeSi-2 que muestra su naturaleza núcleo-cubierta. Un aumento de esta imagen en (g) permite observar la estructura estrechamente empaquetada del análogo del azul de Prusia y su plano [112]. El cálculo de la distancia interplanar por TEM sobre 10 láminas (h) coincide estrechamente con el cálculo teórico según la ley de Bragg. (i-l) Imágenes de mapeo elemental por EDS de una nanocruz de GdFeSi-2.

Desafortunadamente, en estas condiciones de prueba, la mayoría del Gd^{3+} liberado precipita rápidamente como $Gd(OH)_3 \cdot xH_2O$, permaneciendo en la bolsa de diálisis como un polvo blanco insoluble, por lo que la concentración de Gd^{3+} obtenida de las muestras de diálisis es muy baja y no puede

ser utilizada como patrón de lixiviación de metales (la cantidad total de Gd^{3+} medida en disolución por ICP-MS fue menor del 0.5%). En este contexto, en la **Figura III.16** en el ANEXO III muestra solamente la lixiviación producida por el Fe^{3+} en disolución de glucosa al 5.5% (según lo determinado por ICP) y en SBF (según lo determinado por ICP-MS). Observamos una lixiviación de metal insignificante en las primeras 4 h (<1 %) y aproximadamente 5-11 % tras 24 h, lo que hace que este material sea adecuado para la MRI *in vivo* (la adquisición de imágenes no dura más de 1-2 horas después de la administración *iv*). Además, incluso después de 7 días, la concentración de metal lixiviado fue inferior al 25 % en ambos medios. Esto también es importante, ya que implica una degradación de partículas muy lenta, lo que debería permitir la eliminación casi por completo de las partículas por vía renal y biliar antes de alcanzar la toxicidad.³⁵

Es notable que el proceso de recubrimiento es determinante no solo para evitar la disolución de análogo del azul de Prusia en medio acuoso, sino también para aumentar el área superficial del híbrido, ya que la estructura del $GdFe$ es altamente compacta y difícil de funcionalizar con ligandos orgánicos. En este sentido, el patrón de adsorción obtenido de las isothermas de nitrógeno sobre muestras cubiertas de sílice corresponde a materiales amorfos, no porosos, con un área superficial externa superior a $60 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ (Tabla II12 y **Figura III.17** en el ANEXO III). Esto es suficiente para la posterior incorporación de diferentes funcionalidades, como agentes terapéuticos, compuestos directores y/o moléculas de PEG.

5.3.2 Medidas de relajatividad y medidas de RMI *in vitro*

La eficacia del material GdFeSi como AC T_1 y T_2 se evaluó midiendo las velocidades de relajación nuclear longitudinales (r_1) y transversales (r_2) de los protones del agua en suspensiones acuosas a temperatura ambiente bajo campos magnéticos de 3 T y 9,4 T. Los coloides se prepararon en disolución acuosa de goma de xantano (0,1% en peso) con una concentración de M^{3+} en el intervalo de 0-1,00 mM (Gd^{3+} para T_1 , Fe^{3+} para T_2). Los valores de relajatividad se determinaron de la pendiente de la recta $1/T_i$ frente a la concentración de ión paramagético, siguiendo el modelo de la ecuación 5.3. Con el fin de comparar también se determinaron estos valores para la sal dihidrógeno gadopentetato (Gd-DTPA, Sigma-Aldrich) (Tabla 4 y **Figura III.18** en el ANEXO III).

Tabla 5. Relajatividades longitudinal y transversal de los materiales híbridos GdFeSi y Gd-DTPA a 9,4 y 3,0 T.

Muestra	r_1 ($s^{-1} mM^{-1}$)	r_2 ($s^{-1} mM^{-1}$)	r_2/r_1
$B_0 = 9,4$ (T)			
Gd-DTPA	4,4	4,6	1,0
GdFeSi-1	13,1	66,6	5,1
GdFeSi-2	11,7	58,6	5,0
GdFeSi-1 _{PEG}	20,8	69,9	3,4
GdFeSi-2 _{PEG}	16,7	59,6	3,6
$B_0 = 3,0$ (T)			
Gd-DTPA	3,8	3,0	0,8
GdFeSi-1 _{PEG}	27,0	35,1	1,3

Las muestras GdFeSi-1 y GdFeSi-2 muestran altos valores de r_1 y r_2 en un campo magnético alto (9,4 T), aproximadamente 1 orden de magnitud superior al Gd-DTPA (Tabla 5).

Se espera una dramática reducción de T_2 con respecto al quelato comercial a partir de la presencia de una gran población de centros de Fe^{3+} en las muestras de GdFeSi . El mayor valor de r_1 en comparación con las especies mononucleares de Gd^{3+} se debe principalmente al orden de los espines de Gd^{3+} que se disponen paralelos al campo magnético local inducido por los dominios de los centros superparamagnéticos de Fe^{3+} bajo un campo magnético externo.⁵⁰ Además, la contribución parcial en la reducción de T_1 por los sitios de Fe^{3+} puede mejorar el efecto de contraste T_1 . Este efecto sinérgico es gracias al empaquetamiento extremadamente denso de los iones Gd^{3+} y Fe^{3+} en la misma estructura cristalina, los cuales están conectados a través de enlaces tipo ciano.²³ En realidad, una vista en perspectiva de la topología de la red cristalina del GdFe en la **Figura 15** muestra dos distancias de enlace indirecto Gd-Fe, de 5,509 y 5,352 Å. Se observó un efecto sinérgico similar cuando se incorporaron pequeños cristales de óxido de Gd en nanopartículas de hierro.^{42,43}

Ahora, somos conscientes del hecho de que el recubrimiento externo de sílice podría ser un problema sobre las propiedades magnéticas de las muestras GdFeSi , principalmente sobre la relajación longitudinal. Según la teoría de Solomon-Bloembergen-Morgan, el acortamiento de T_1 se relaciona con interacciones de las moléculas de agua directamente unidas a los centros magnéticos, correspondiendo al mecanismo de relajación de esfera interna.^{12,13} Esta interacción se ve obstaculizada en nanopartículas completamente protegidas con una cubierta homogénea de sílice no porosa.

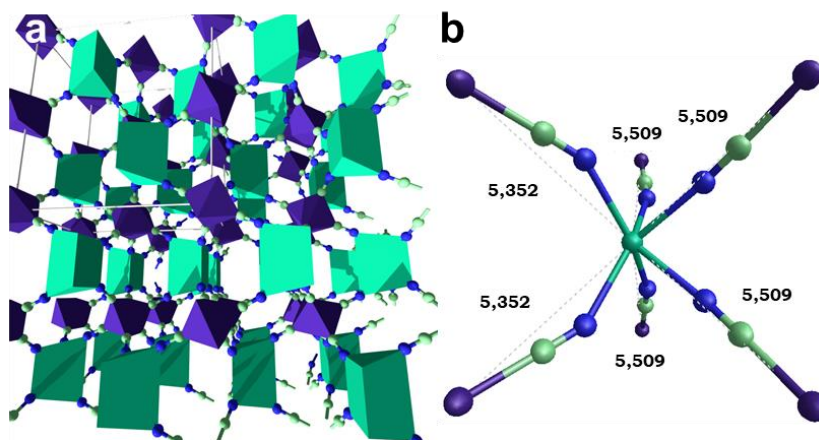


Figura 15. (a) Vista en perspectiva de la topología de red del $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]$, donde se han eliminado las moléculas de agua, por claridad. El Gd está en el centro de los prismas triangulares verdes; y Fe está en el centro de los octaedros azules. Cuando se considera el agua, dos moléculas de agua se coordinan a cada átomo de Gd generando una coordinación de antiprisma cuadrado en la esfera de coordinación de los átomos de Gd. (b) Vista en perspectiva de la estructura y coordinación de un átomo de Gd en la estructura del $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]$. Se han omitido dos moléculas de agua para mayor claridad. Las distancias no enlazantes de la unión Gd-Fe son 5,509 Å (4) y 5,352 Å (2).

Sin embargo, los agentes de contraste pueden mostrar relajación incluso cuando no hay agua en la esfera de coordinación interna, y en este caso la relajación proviene de la contribución de la esfera externa, donde las moléculas de agua enlazadas a la superficie de sílice se relajan mediante mecanismos dipolares.⁸

La ganancia en r_1 es claramente mayor en las muestras PEGiladas (alrededor del 60% para GdFeSi-1 y el 45% para GdFeSi-2, Tabla 5). Así como la disminución de T_1 está relacionada principalmente con el intercambio químico de moléculas de agua, y sus protones correspondientes, sobre los

centros M^{3+} en el régimen de la esfera del agua, lo cual significa que T_1 debería mejorar cuando aumenta el área de superficie externa de las partículas.^{5,8,12} En este contexto, la PEGilación estabiliza el coloide magnético reduciendo la agregación de partículas y el diámetro hidrodinámico (Tabla III.12 y **Figura III. 13** en el ANEXO III), que magnifica la superficie de interacción con las moléculas de agua. Aquí, otros autores han achacado el fuerte efecto de la PEGilación sobre el intercambio de agua y el acceso de la molécula de agua a los centros Gd^{3+} y su influencia sobre la relajatividad longitudinal.⁵¹ Por el contrario, la PEGilación muestra un efecto modesto sobre la relajatividad transversal (un aumento muy pequeño de 2-4% en un $B_0 = 9,4$ T, Tabla 5), ya que r_2 depende poco de la hidratación de los iones metálicos, el tiempo medio de residencia de la molécula de agua en la primera esfera de coordinación y la velocidad de caída de las especies.

En la misma línea, se asume que el modesto aumento de r_1 en los híbridos $GdFeSi-1$ y $GdFeSi-1_{PEG}$ con respecto a las muestras $GdFeSi-2$ y $GdFeSi-2_{PEG}$ es consecuencia del tamaño de partícula más pequeño.⁴⁹ Tal efecto es incluso más fuerte bajo el campo magnético de menor intensidad (3 T), con una relación r_2/r_1 cercana a 1 (muestra $GdFeSi-1_{PEG}$, Tabla 5). Esto, junto con el valor relativamente alto de r_2 , presenta un uso potencial del material $GdFeSi$ como un AC dual T_1-T_2 para MRI.

Para verificar esta capacidad, se registraron imágenes de RMI de las suspensiones preparadas en goma de xantano de muestras $GdFeSi-1_{PEG}$ (**Figura 16**). Con fines comparativos, también se ensayó con dos agentes T_1 conocidos, el quelato comercial $Gd-DPTA$ ($r_1 = 4,1 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $r_2 = 3,3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) y

nanopartículas de óxido de Gd-Si (GdSi, $r_1 = 5,6 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $r_2 = 8,2 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$),^{45,52}. Las imágenes se registraron como una oblea en orientación coronal. La **Figura 16a** muestra las imágenes ponderadas en T_1 de los diferentes materiales a concentración variable de AC en función del contenido de Gd^{3+} . Tanto el GdSi como el Gd-DTPA muestran una mejora de señal similar en función de su concentración. Sin embargo, GdFeSi-1_{PEG} muestra un efecto de contraste mucho más fuerte, debido al efecto sinérgico descrito anteriormente entre los centros magnéticos de Gd^{3+} y Fe^{3+} . Tales diferencias se destacan en una imagen ponderada en T_1 en orientación transversal obtenida a una concentración de 1 mM de Gd^{3+} en todos los casos (**Figura 16b**). La **Figura 16c** presenta las imágenes ponderadas en T_2 correspondientes a estas muestras con una concentración variable de M^{3+} (Gd^{3+} para GdSi y Gd-DTPA, Fe^{3+} para GdFeSi-1_{PEG}). Como se esperaba, el híbrido GdFeSi exhibe un rendimiento superior de contraste oscuro debido a la gran presencia de centros superparamagnéticos de Fe^{3+} en su estructura.

5.4.3 Estudio de citotoxicidad

Para valorar el uso potencial de las nanopartículas de GdFeSi en un entorno biológico, se evaluó su viabilidad celular 24 h después de la incubación con la muestra GdFeSi-1 mediante la determinación de la conversión del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) en su forma formazan, siguiendo procedimientos estándar. Para ello, utilizamos fibroblastos sanos (línea celular 3T3) y tres líneas celulares de cáncer diferentes (células HeLa, células de glioblastoma multiforme 42-MG-BA y células de neuroblastoma SH-SY5Y) en un rango de concentraciones (0,25-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Los resultados (**Figura III.19** en el ANEXO III) indican que incluso con la mayor carga de partículas, la viabilidad celular relativa era superior al 70%. En realidad, a pesar de las limitaciones inherentes a la prueba del MTT para una determinación precisa de la viabilidad celular, estos resultados corresponden a un perfil de biocompatibilidad aceptable.⁵³

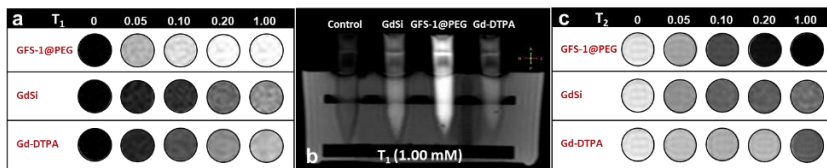


Figura 16. Imágenes RMI de la muestra GdFeSi-1 y dos agentes de contraste T_1 conocidos, Gd-DTPA comercial y nanopartículas de óxido de Gd-Si (GdSi).^{45,52} (a) Imágenes laminares en orientación coronal de RMI ponderadas en T_1 bajo un campo magnético de 3 T y tiempo de eco de 2 ms sobre muestras de distinta concentración de Gd^{3+} . (b) Corte transversal de RMI ponderado en T_1 en el campo magnético de 3 T y tiempo de eco de 2 ms sobre muestra de concentración $Gd^{3+} = 1$ mM. (c) Imágenes de cortes de RMI potenciados en T_2 en un campo magnético de 3 T y tiempo de eco de 203 ms con concentraciones variables de M^{3+} (Gd^{3+} para GdSi y Gd-DTPA, Fe^{3+} para GdFeSi-1).

5.3.4 Estudio de imágenes de RMI *in vivo*

La administración *iv* directa de las nanopartículas de GdFeSi-1 no se aplica debido a la inmediata y fuerte reacción con las proteínas séricas, lo que da como resultado la formación de la corona de proteínas. Esto promueve la interacción posterior con los elementos celulares del sistema reticuloendotelial la rápida eliminación de las partículas de la sangre, las cuales se acumulan principalmente en el hígado, el bazo y los pulmones.³⁴ Para minimizar este proceso inmunogénico no específico, las nanovarillas de GdFeSi-1 se modificaron con una cadena corta de PEG,⁴⁷ para dar GdFeSi-1_{PEG}. De esta forma,

se espera que las nanopartículas prolonguen su tiempo de circulación sanguínea, siendo finalmente eliminadas principalmente por vía renal (orina) y hepática (biliar).^{35,36} Posteriormente, 1 mL de un coloide estable e isotónico de 5 mg mL⁻¹ de GdFeSi-1_{PEG} en glucosa 5,5%, se inyectó en la vena cateterizada de la cola de ratas Sprague-Dawley macho sanas (3 especímenes) como un bolo (~0,05 mmol de Gd kg⁻¹ y 0,05 mmol de Fe kg⁻¹). Después de 30 min, se adquirieron imágenes ponderadas en T_1 y en T_2 durante 1 h mediante el uso de un escáner horizontal de 7 T. Previamente a las imágenes de administración del AC, se procesaron las imágenes iniciales.

La **Figura 17** muestra imágenes de RMI en orientación coronal ponderadas en T_1 y T_2 antes (línea base) y después de la administración del AC. Las diferentes regiones de interés (ROI) que presentan los cambios más significativos en la relación señal/ruido (SNR) se han etiquetado manualmente sobre las imágenes previas a la inyección. Estos cambios en la SNR se compilan en la Tabla 5. Las imágenes ponderadas en T_1 muestran una significativa mejora de la señal positiva en el hígado (Δ SNR = 17,3% en relación con la línea base, **Figura 17a y a')** y los riñones (Δ SNR = 6,4%, **Figura 17c y c')**. Esto no es sorprendente ya que estos órganos reciben la mayor parte del flujo sanguíneo, lo que favorece la acumulación de partículas en ellos. A pesar de su gran tamaño y forma lobular, el hígado presenta cambios generalmente uniformes en la intensidad de la señal, que corresponde a una biodistribución homogénea de nanopartículas en todo el órgano. De la misma manera, las imágenes ponderadas en T_2 presentan un fuerte contraste negativo para el hígado (Δ SNR = 27,8%, **Figura 17b y b')**, vesícula biliar (Δ SNR = 78,0%, **Figura 17b y b')** y riñones

(Δ SNR = 51,7 %, **Figura 17d y d'**). En todos los casos, la mejora del contraste permanece completamente estable durante todo el tiempo de adquisición (1 h), lo cual indica que una extensión significativa del periodo de adquisición sería, también factible.

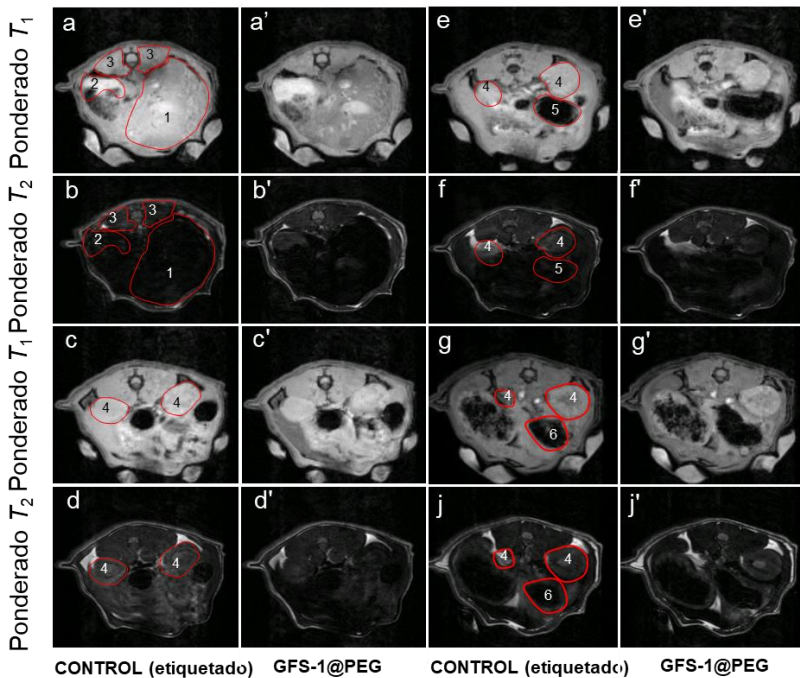


Figura 17. Imágenes coronales *in vivo* ponderadas en T_1 y T_2 adquiridas a partir de una rata macho Sprague-Dawley en un campo magnético de 7 T. (a-j) Control (línea base) sin administración de NPMs. Las siguientes ROIs se han etiquetado manualmente (líneas rojas): 1-hígado; 2-vesícula biliar; 3-Músculo paraespinal; 4-riñón; 5-estómago; 6-páncreas. (a'-j') Adquisición 30 min después de inyección de las nanovarillas de $GdFeSi-1_{PEG}$ ($0.05 \text{ mmol Gd}^{3+} \text{ kg}^{-1}$, $0.05 \text{ mmol Fe}^{3+} \text{ kg}^{-1}$).

Tabla 5. Magnitud de los cambios normalizados en la relación señal/ruido (SNR) de las imágenes ponderadas en T_1 y T_2 después de la administración *iv* de GdFeSi-1_{PEG} en una rata Sprague-Dawley (0.05 mmol Gd Kg⁻¹ y 0.05 mmol Fe Kg⁻¹). Los valores corresponden a la media Δ SNR promediada durante 15 minutos después de la inyección.

Región de Interés (ROI)	Δ SNR (%)
Imágenes ponderadas en T_1	
Hígado	17,3
Vesícula biliar	0,1
Músculo paraespinoso	3,0
Riñón	6,4
Imágenes ponderadas en T_2	
Hígado	27,8
Vesícula biliar	78,0
Músculo paraespinoso	6,3
Riñón	51,7

La histología hepática (**Figura 18a y b y Figura 18i y j**) no muestra hemorragias en las venas y las arterias hepáticas, tampoco muestran daño ni anomalías en las células o estructura de los lóbulos hepáticos. No se observaron anomalías en la histología del bazo (**Figura 18c y d y Figura 18k y l**) en la pulpa blanca y roja. La estructura de los ganglios linfáticos era normal y no se observaron signos de hemorragias ni alta actividad del sistema inmune.

La histología del miocardio del corazón no se vio afectada por la administración del AC (**Figura 18e y f y Figura 18m y n**). Con respecto al pericardio y el endocardio, ambas estructuras se mantuvieron intactas después de la administración del agente de contraste (imágenes no mostradas). Finalmente, la histología de las secciones del pulmón (**Figura 18g y h y Figura 18o y p**) no mostraron signos de insuficiencia

pulmonar manteniendo las estructuras alveolares y bronquiales intactas.

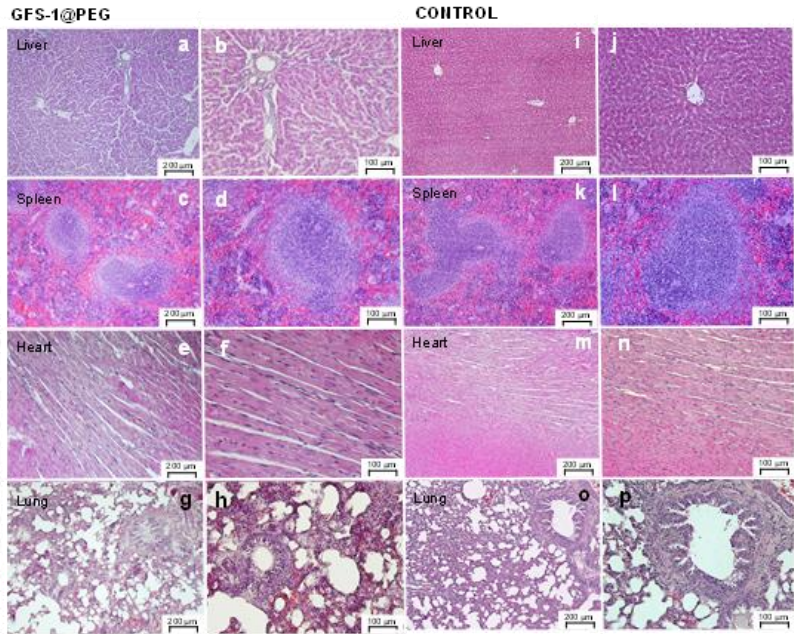


Figura 18. (a-h) Tinción con hematoxilina/eosina de los cortes histológicos después de la administración (bolo único) de $\text{GdFeSi-1}_{\text{PEG}}$ ($0,05 \text{ mmol de Gd}^{3+} \text{ kg}^{-1}$, $0,05 \text{ mmol de Fe}^{3+} \text{ kg}^{-1}$). (i-p) Los mismos cortes histológicos en una muestra control. Hígado (liver); bazo (spleen); corazón (heart); pulmón (lung).

En general, estos hallazgos indican que el nanomaterial GdFeSi PEGilado es un AC dual altamente biocompatible capaz de proporcionar una mejora, tanto del contraste positivo T_1 como del negativo T_2 en RM. Esto es consecuencia de las características mejoradas del GdFeSi como AC en RMI, el cual presenta buena estabilidad en fluidos biológicos y altos valores de relajatividad longitudinal y transversal debido al efecto sinérgico entre los centros de Gd^{3+} y Fe^{3+} en una estructura cristalina estrechamente empaquetada.

5.4 Conclusiones parciales

Se ha demostrado que el análogo del azul de Prusia $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ es una plantilla útil para la síntesis de óxidos metálicos estructurados con formas complejas y aplicaciones de alto valor añadido. Por reacción en un medio alcalino con silicato soluble, se obtienen nanopartículas monodispersas de óxido/hidróxido de Gd-Si conservando la morfología original (como son, cruces y varillas) y el tamaño de partícula del MOF primigenio. Además, hemos probado que la incorporación de un tensioactivo catiónico como agente director de estructura bajo condiciones hidrotermales conduce a un sistema mesoporoso con una gran área superficial que permite la posterior funcionalización de su superficie con múltiples ligandos.

Las nanopartículas de óxido de Gd-Si obtenidas mediante la transformación alcalina de un análogo del azul de Prusia nos han servido para el diseño de un nuevo agente de contraste para RMI con valores de relajatividad longitudinal y transversal *in vitro* mayor que las disoluciones comerciales de quelatos de Gd^{3+} , excelente estabilidad en fluidos fisiológicos, sin citotoxicidad significativa y fácil funcionalización de su superficie. Estas propiedades demuestran su potencial como una alternativa válida a los ACs actuales utilizados en la etapa clínica, principalmente en aquellos casos donde el perfil farmacocinético deficiente y la potencial toxicidad de las formas solubles de Gd^{3+} pueden convertirse en un problema (por ejemplo, pacientes con insuficiencia renal).

La incorporación de identidades activas en los procesos de relajación longitudinal (T_1) y transversal (T_2) en un AC dual

para RM proporciona información complementaria que puede ayudar a mejorar la seguridad del diagnóstico. En este sentido, hemos desarrollado un novedoso material híbrido de alto rendimiento como AC en RMI optimizando la síntesis de nanopartículas magnéticas de $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ de tamaño y morfología controlados, protegidas con una delgada capa diamagnética de sílice siguiendo una estrategia biomimética en cuanto a la hidrólisis y polimerización del silicato a pH neutro. De esta forma hemos otorgado al sistema una gran estabilidad a largo plazo en fluidos fisiológicos debido a la protección de la capa externa no porosa. Este material presenta valores de relajatividad longitudinal un orden de magnitud superior a los sistemas T_1 basados en Gd^{3+} y un contraste positivo mucho más fuerte en imágenes de RM *in vitro* e *in vivo*, debido al efecto sinérgico existente entre los centros magnéticos de Gd^{3+} y Fe^{3+} estrechamente conectados a través de enlaces tipo ciano en una estructura cristalina muy compacta. Nuestro híbrido GdFeSi exhibe datos de relajatividad transversal comparables a los de las nanopartículas de óxido de hierro, que proporcionan un fuerte contraste oscuro en la RMI *in vitro* e *in vivo*. La falta de citotoxicidad comprobada en diferentes líneas celulares y la ausencia de daño histológico observado en los principales órganos de los animales analizados indican un buen perfil de bioseguridad, lo que enfatiza el potencial de este AC en aplicaciones clínicas. Con respecto a otros ACs duales T_1 - T_2 propuestos, nuestras nanopartículas presentan una composición muy homogénea y una relación atómica de Gd: Fe constante, proporcionando total reproducibilidad en la señal de RMI.

5.5 Referencias bibliográficas

1. Krause, W. in *Top. Curr. Chem.* **221** (2002).
2. Drago, R. S. *Physical Methods for Chemists.* (1992).
3. Allen, M. J. & Meade, T. J. Magnetic Resonance Contrast Agents for Medical and Molecular Imaging. *Met. Ions Biol. Syst.* **42**, 1–38 (2004).
4. Aime, S., Barge, A., Cabella, C., Crich, S. G. & Gianolio, E. Targeting cells with MR imaging probes based on paramagnetic Gd(III) chelates. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **5**, 509–518 (2004).
5. Caravan, P. Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium based MRI contrast agents. *Chem. Soc. Rev.* **35**, 512 (2006).
6. Storr, T., Thompson, K. H. & Orvig, C. Design of targeting ligands in medicinal inorganic chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **35**, 534 (2006).
7. Hermann, P., Kotek, J., Kubíček, V. & Lukeš, I. Gadolinium(III) complexes as MRI contrast agents: ligand design and properties of the complexes. *Dalt. Trans.* **9226**, 3027 (2008).
8. Bottrill, M., Kwok, L. & Long, N. J. Lanthanides in magnetic resonance imaging. *Chem. Soc. Rev.* **35**, 557 (2006).
9. Haken, H. & Wolf, H. C. *Fundamental Constants of Atomic Physics in the International System of Units (SI)*. **397**, (2005).
10. Werner, E. J., Datta, A., Jocher, C. J. & Raymond, K. N. High-relaxivity MRI contrast agents: Where coordination chemistry meets medical imaging. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **47**, 8568–8580 (2008).
11. Dabrowiak, J. C. *Metal Complexes for Diagnosing Disease. Metals in Medicine* **11**, (2009).
12. Lauffer, R. B. Paramagnetic Metal Complexes as Water Proton Relaxation Agents for NMR Imaging: Theory and Design. *Chem. Rev.* **87**, 901–927 (1987).
13. Caravan, P., Ellison, J. J., McMurry, T. J. & Lauffer, R. B. Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: Structure, dynamics, and applications. *Chem. Rev.* **99**, 2293–2352 (1999).
14. Hu, F., Joshi, H. M., Dravid, V. P. & Meade, T. J. High-performance nanostructured MR contrast probes. *Nanoscale* **2**, 1884 (2010).
15. Davis, M. E., Chen, Z. (Georgia) & Shin, D. M. Nanoparticle

- therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 771–782 (2008).
16. Lee, N. & Hyeon, T. Designed synthesis of uniformly sized iron oxide nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging contrast agents. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 2575–2589 (2012).
 17. Hasebroock, K. M. & Serkova, N. J. Toxicity of MRI and CT contrast agents. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **5**, 403–416 (2009).
 18. Sun, C., Lee, J. S. H. & Zhang, M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1252–1265 (2008).
 19. Corot, C., Robert, P., Ballet, S., Gonzalez, W., Idee, J.-M., Raynal, I. & Port, M. in *Molecular Imaging Probes for Cancer Research* (ed. Chen, X.) 611–658 (World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2012).
 20. Botella, P., Corma, A., Navarro, M. T. & Quesada, M. Design of optically active nanoclusters of gold particles with mesostructured silica coating. *J. Mater. Chem.* **19**, 3168 (2009).
 21. Botella, P., Corma, A. & Navarro, M. T. Single gold nanoparticles encapsulated in monodispersed regular spheres of mesostructured silica produced by pseudomorphic transformation. *Chem. Mater.* **19**, 1979–1983 (2007).
 22. Cabrera-García, A. Vidal-Moya, A., Bernabeu, Á., Sánchez-González, J., Fernández, E. & Botella P. Gd-Si oxide mesoporous nanoparticles with pre-formed morphology prepared from a Prussian blue analogue template. *Dalton Trans.* **44**, 14034–41 (2015).
 23. Perrier, M., Kenouche, S., Long, J., Thangavel, K., Larionova, J., Goze-Bac, C., Lascialfari, A., Mariani, M., Baril, N., Guérin, C., Donnadiou, B., Trifonov, A., & Guari, Y. Investigation on NMR relaxivity of nano-sized cyano-bridged coordination polymers. *Inorg. Chem.* **52**, 13402–13414 (2013).
 24. Yamada, M. & Yonekura, S. Nanometric Metal-Organic Framework of $\text{LnFe}(\text{CN})_6$: Morphological Analysis and Thermal Conversion Dynamics by Direct TEM Observation. *J. Phys. Chem. C* **113**, 21531–21537 (2009).
 25. Zhang, L., Wu, H. Bin, Madhavi, S., Hng, H. H. & Lou, X. W. Formation of Fe_2O_3 microboxes with hierarchical shell structures from metal-organic frameworks and their lithium storage properties. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 17388–17391 (2012).
 26. Zhang, L., Wu, H. Bin & Lou, X. W. Metal-organic-frameworks-derived general formation of hollow structures with high

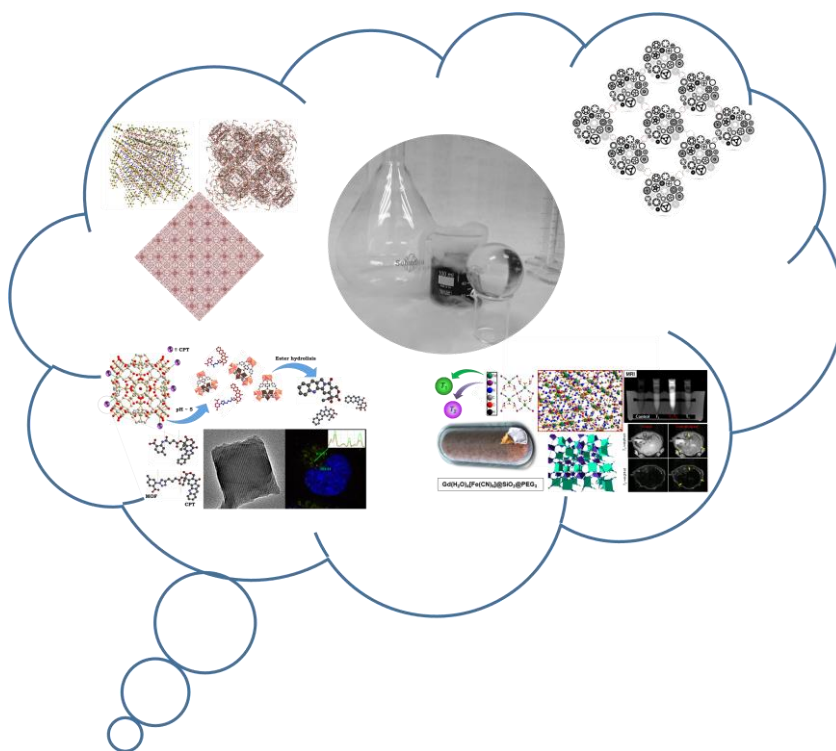
- complexity. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 10664–10672 (2013).
27. Gu, D. & Schüth, F. Synthesis of non-siliceous mesoporous oxides. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 313–344 (2014).
 28. Martin, T., Galarneau, A., Di Renzo, F., Fajula, F. & Plee, D. Morphological control of MCM-41 by pseudomorphic synthesis. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **41**, 2590–2592 (2002).
 29. Thongtem, T., Phuruangrat, A., Ham, D. J., Lee, J. S. & Thongtem, S. Controlled Gd₂O₃ nanorods and nanotubes by the annealing of Gd(OH)₃ nanorod and nanotube precursors and self-templates produced by a microwave-assisted hydrothermal process. *CrystEngComm* **12**, 2962 (2010).
 30. Gallas, J. P., Goupil, J.-M., Vimont, A., Lavalley, J.-C., Gil, B., Gilson, J.-P., & Miserque, O. Quantification of water and silanol species on various silicas by coupling IR spectroscopy and in-situ thermogravimetry. *Langmuir* **25**, 5825–5834 (2009).
 31. Osseni, S. A. Lechevallier, S., Verelst, M., Perriat, P., Dexpert-Ghys, J., Neumeyer, D., Garcia, R., Mayer, F., Djanashvili, K., Peters, J. O., Magdeleine, E., Gros-Dagnac, H., Celsisf, P. & Mauricot Gadolinium oxysulfide nanoparticles as multimodal imaging agents for T₂-weighted MR, X-ray tomography and photoluminescence. *Nanoscale* **6**, 555–564 (2014).
 32. Hatakeyama, W., Sanchez, T. J., Rowe, M. D., Serkova, N. J., Liberatore, M. W., & Boyes S. G. Synthesis of gadolinium nanoscale metal-organic framework with hydrotropes: Manipulation of particle size and magnetic resonance imaging capability. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **3**, 1502–1510 (2011).
 33. Yeh, C. S., Su, C.-H., Ho, W.-Y., Huang, C.-C., Chang, J.-C., Chien, Y.-H., Hung, S.-T., Liau, M.-C. & Ho, H.-Y. Tumor targeting and MR imaging with lipophilic cyanine-mediated near-infrared responsive porous Gd silicate nanoparticles. *Biomaterials* **34**, 5677–5688 (2013).
 34. Mahmoudi, M., Lynch, I., Ejtehadi, M.R., Monopoli, M.P., Bombelli, F.B. & Laurent, S. Protein-nanoparticle interactions: Opportunities and challenges. *Chem. Rev.* **111**, 5610–5637 (2011).
 35. Botella, P., Abasolo, I., Fernández, Y., Muniesa, C., Miranda, S., Quesada, M., Ruiz, J., Schwartz, S., Jr. & Corma, A. Surface-modified silica nanoparticles for tumor-targeted delivery of camptothecin and its biological evaluation. *J. Control. Release* **156**, 246–257 (2011).
 36. Lu, J., Liong, M., Li, Z., Zink, J. I. & Tamanoi, F. Biocompatibility, biodistribution, and drug-delivery efficiency of mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy in animals.

- Small* **6**, 1794–1805 (2010).
37. Na, H. B., Lee, J. H., An, K., Park, Y. I., Park, M., Lee, I. S., Nam, D-H., Kim, S. T., Kim, S.-H., Kim, S.-W., Lim, K.-H., Kim, K.-S., Kim, S.-O. & Hyeon, T. Development of a T_1 contrast agent for magnetic resonance imaging using MnO nanoparticles. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **46**, 5397–5401 (2007).
 38. Kim, T., Cho, E.-J., Chae, Y., Kim, M., Oh, A., Jin, J., Lee, E.-S., Baik, H., Haam, S., Suh, J.-S., Huh, Y.-M., & Lee, K. Urchin-Shaped Manganese Oxide Nanoparticles as pH-Responsive Activatable T_1 Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. *Angew. Chemie Int. Ed.* **50**, 10589–10593 (2011).
 39. Lim, E.-K., Kim, T., Paik, S., Haam, S., Huh, Y.-M. & Lee, K. Nanomaterials for Theranostics: Recent Advances and Future Challenges. *Chem. Rev.* **115**, 327–394 (2015).
 40. Shin, T.-H., Choi, Y., Kim, S. & Cheon, J. Recent advances in magnetic nanoparticle-based multi-modal imaging. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 4501–4516 (2015).
 41. Khawaja, A. Z., Cassidy, D. B., Al Shakarchi, J., McGrogan, D. G., Inston, N. G., & Jones R. G. Revisiting the risks of MRI with Gadolinium based contrast agents-review of literature and guidelines. *Insights Imaging* **6**, 553–558 (2015).
 42. Zhou, Z. Huang, D., Bao, J., Chen, Q., Liu, G., Chen, Z., Chen X. & Gao, J. A. A Synergistically Enhanced $T_1 - T_2$ Dual-Modal Contrast Agent. *Adv. Mater.* **24**, 6223–6228 (2012).
 43. Yang, L., Zhou, Z., Liu, H., Wu, C., Zhang, H., Huang, G., Aib, H. & Gao J. Europium-engineered iron oxide nanocubes with high T_1 and T_2 contrast abilities for MRI in living subjects. *Nanoscale* **7**, 6843–6850 (2015).
 44. Botella, P., Ortega, Í., Quesada, M., Madrigal, R. F., Muniesa, M., Fimia, A., Fernández, E. & Corma Multifunctional hybrid materials for combined photo and chemotherapy of cancer. *Dalt. Trans.* **41**, 9286 (2012).
 45. Cabrera-García, A., Vidal-Moya, A., Bernabeu, Á., Pacheco-Torres, J., Checa-Chavarria, E., Fernández, E. & Botella, P. Gd-Si Oxide Nanoparticles as Contrast Agents in Magnetic Resonance Imaging. *Nanomaterials* **6**, 109 (2016). doi:10.3390/nano6060109.
 46. Botella, P., Corma, A. & Quesada, M. Synthesis of ordered mesoporous silica templated with biocompatible surfactants and applications in controlled release of drugs. *J. Mater. Chem.* **22**, 6394 (2012).

47. Clemments, A. M., Muniesa, C., Landry, C. C. & Botella, P. Effect of surface properties in protein corona development on mesoporous silica nanoparticles. *RSC Adv.* **4**, 29134–29138 (2014).
48. Navarro, M. C., Pannunzio-Miner, E. V., Pagola, S., Gómez, M. I. & Carbonio, R. E. Structural refinement of Nd[Fe(CN)₆]·4H₂O and study of NdFeO₃ obtained by its oxidative thermal decomposition at very low temperatures. *J. Solid State Chem.* **178**, 847–854 (2005).
49. Ding, Y., Chu, X., Hong, X., Zou, P. & Liu, Y. The infrared fingerprint signals of silica nanoparticles and its application in immunoassay. *Appl. Phys. Lett.* **100**, 98–101 (2012).
50. Kim, Y., Kwon, S. J., Jang, H.-k., Jung, B. M., Lee, S. B. & Choi U. H. High Ion Conducting Nanohybrid Solid Polymer Electrolytes via Single-Ion Conducting Mesoporous Organosilica in Poly(ethylene oxide). *Chem. Mater.* **29**, 4401–4410 (2017).
51. Zhang, W., Martinelli, J., Peters, J. A., van Hengst, J. M. A., Bouwmeester, H., Kramer, E., Bonnet, C. S., Szeremeta, F., Tóth, É. & Djanashvili, K. Surface PEG Grafting Density Determines Magnetic Relaxation Properties of Gd-Loaded Porous Nanoparticles for MR Imaging Applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 23458–23465 (2017).
52. Cai, X., Gao, W., Ma, M., Wu, M., Zhang, L., Zheng, Y., Chen, H. & Shi, J. A. A Prussian Blue-Based Core-Shell Hollow-Structured Mesoporous Nanoparticle as a Smart Theranostic Agent with Ultrahigh pH-Responsive Longitudinal Relaxivity. *Adv. Mater.* **27**, 6382–6389 (2015).
53. Riss, T. L. Moravec, R. A., Niles, A. L, Duellman, S., Benink, H. A., Worzella T. J., & Minor, L. *Cell Viability Assays, in Assay Guidance Manual*, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda, MD, 2012.

Capítulo VI.

Conclusiones Generales



6. Conclusiones generales

En la presente tesis doctoral se han desarrollado nuevos sistemas basados en redes organometálicas a nanoescala (nanoMOFs), útiles para la difusión de fármacos antitumorales en tratamientos específicos, así como agentes de contraste en resonancia magnética de imagen (RMI) para diagnóstico clínico. De los resultados extraídos en nuestra investigación se destacan las siguientes conclusiones.

- Debido a su estructura mesoporosa, los nanoMOFs utilizados presentan elevada funcionalidad superficial, lo que les confiere una gran capacidad de carga de fármacos mediante unión covalente. Ello hace posible el desarrollo de preparados farmacológicos con elevada actividad específica, lo que permitirá reducir las dosis para alcanzar niveles terapéuticos en el organismo. En nuestro trabajo se han desarrollado nanoMOFs basados en los sistemas MIL-101(Fe) y MIL-100(Fe) con el agente antineoplásico camptotecina (CPT), con un contenido de fármaco cercano al 20% en peso, valor no alcanzado por ninguna otra nanomedicina.
- Los nanoMOFs preparados resultan ser muy estables en medio fisiológico, sin que se produzca liberación de CPT fuera de las células diana. Asimismo, los nanomateriales MIL-101(Fe) y MIL-100(Fe) desprovistos de fármaco presentan muy baja citotoxicidad. Ello permite la administración de dosis elevadas cuando sea necesario sin peligro de que se manifiesten efectos secundarios indeseados.

- Estos nanoMOFs pueden presentar una respuesta específica a estímulos biológicos concretos. En este sentido, se han preparado nanomedicinas de CPT sensibles al pH ácido basadas en el sistema MIL-101(Fe). Ello facilita la liberación del fármaco transportado (CPT) en el interior celular, concretamente en los lisosomas. Asimismo, el pH moderadamente ácido presente en la matriz extracelular de determinados tumores puede promover la descarga del fármaco en las proximidades de las células diana.
- Los nanoMOFs constituyen vehículos apropiados para la difusión segura y eficiente de agentes muy citotóxicos como la CPT a células cancerosas, lo que les confiere gran potencial para su aplicación *in vivo*.
- Los nanoMOFs basados en el análogo del azul de Prusia $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]$ presentan gran utilidad como agentes de mejora de contraste en resonancia magnética de imagen (RMI), ya que es posible preparar diversos sistemas con gran estabilidad en medio biológico y muy baja toxicidad. Estas propiedades demuestran su potencial como alternativa válida a los agentes de contraste actualmente utilizados en la práctica clínica, como las disoluciones de quelatos de Gd^{3+} , principalmente en aquellos casos donde el paciente presenta un perfil farmacocinético deficiente (por ejemplo, pacientes con insuficiencia renal), lo que incrementa la toxicidad potencial de las formas solubles del Gd^{3+} .
- Las nanopartículas de óxido de Gd-Si obtenidas mediante transformación alcalina del $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]$ nos han permitido desarrollar un nuevo agente de contraste para RMI con valores de relajatividad longitudinal y transversal *in vitro* mayores que las disoluciones comerciales de quelatos

de Gd^{3+} , y elevada capacidad de funcionalización superficial. Este material presenta un gran potencial como agente de contraste positivo en RMI.

- La incorporación de identidades activas en los procesos de relajación longitudinal (T_1) y transversal (T_2) en un agente de contraste dual para RMI proporciona información complementaria que puede ayudar a mejorar la seguridad del diagnóstico. Este efecto se manifiesta en un nuevo material híbrido obtenido por recubrimiento de las nanopartículas de $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]$ de tamaño y morfología controlados, con una delgada capa de sílice amorfa, mediante la hidrólisis y polimerización del silicato a pH neutro. Este sistema presenta valores de relajatividad longitudinal un orden de magnitud superior a los sistemas T_1 basados en Gd^{3+} y un contraste positivo mucho más fuerte en imágenes de RM *in vitro* e *in vivo*, debido al efecto sinérgico existente entre los centros magnéticos de Gd^{3+} y Fe^{3+} estrechamente conectados a través de enlaces tipo ciano en una estructura cristalina muy compacta. Este material presenta un gran potencial como agente de contraste positivo y negativo en RMI.
- Finalmente, todo lo expuesto anteriormente conduce a la afirmación de que los sistemas basados en nanopartículas de redes organometálicas (nanoMOFs), permiten preparar agentes terapéuticos y de imagen clínica estables, biocompatibles y muy activos, con gran potencial para reemplazar en un futuro cercano a los productos comerciales actuales.

ANEXO I

Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de los Compuestos Sintetizados

ANEXO I. Espectros de resonancia magnética nuclear de los compuestos sintetizados

I.1 Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto MeO-BTB-NH₂.

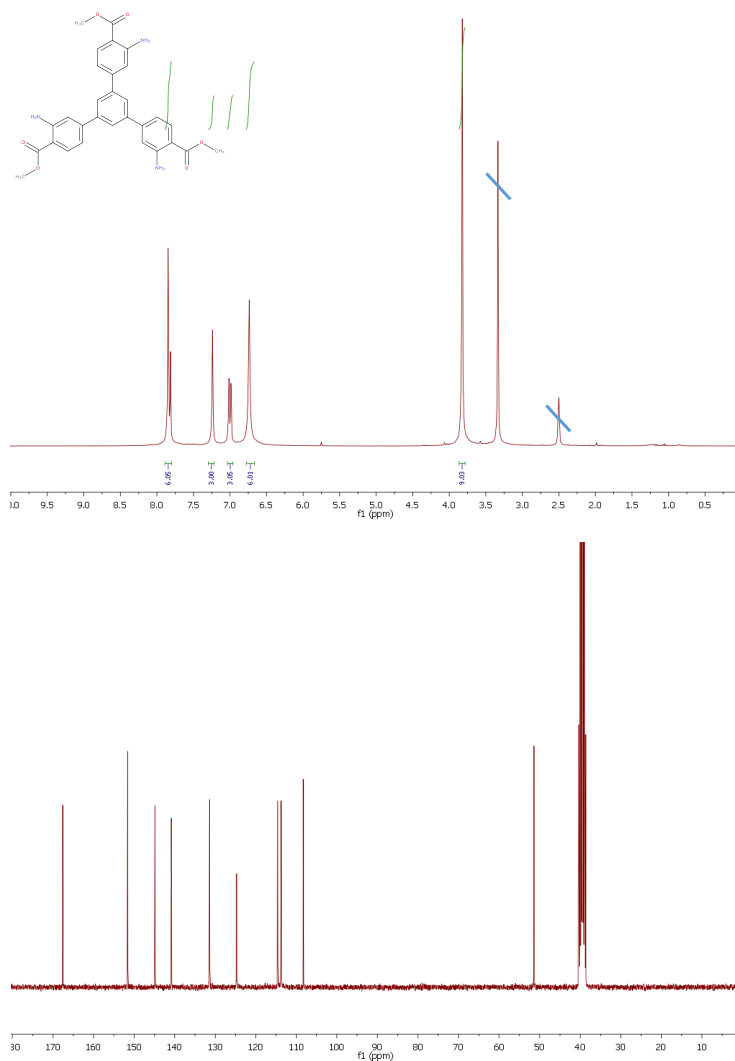


Figura I.1. Espectros de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ), arriba y ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6 , δ), abajo del compuesto MeO-BTB-NH₂.

I.2 Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto $\text{H}_3\text{BTB-NH}_2$.

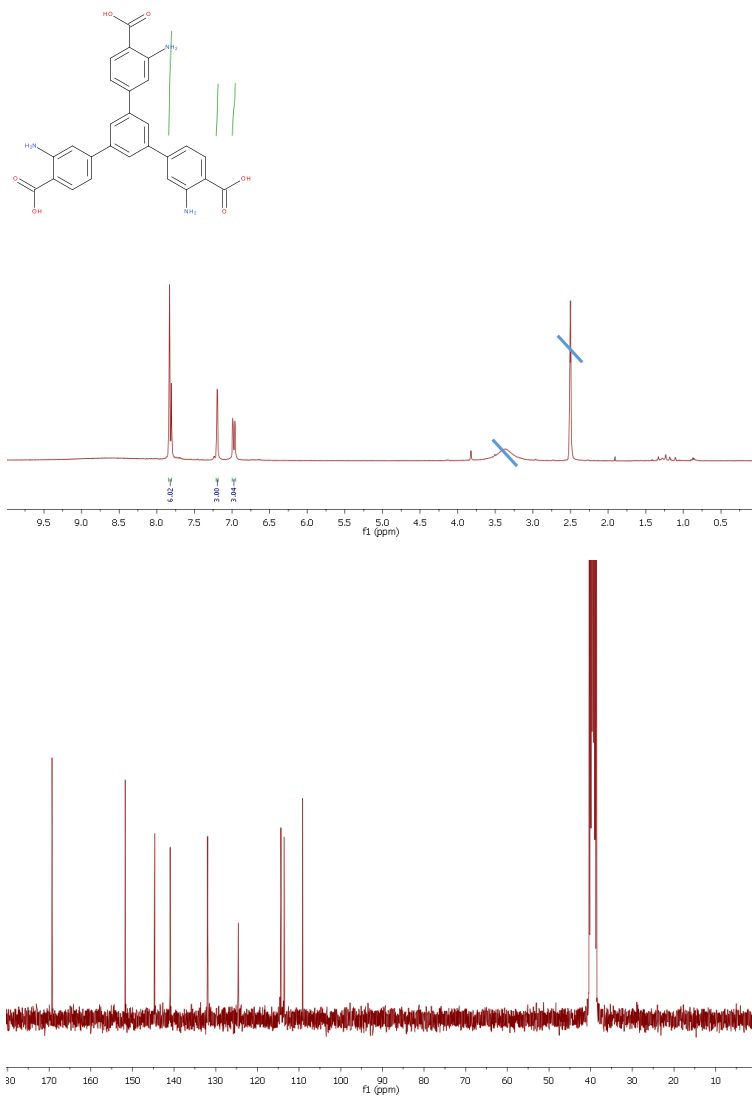


Figura I.2. Espectros de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ), arriba y ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ), abajo del compuesto $\text{H}_3\text{BTB-NH}_2$.

I.4 Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto CPT-5HA.

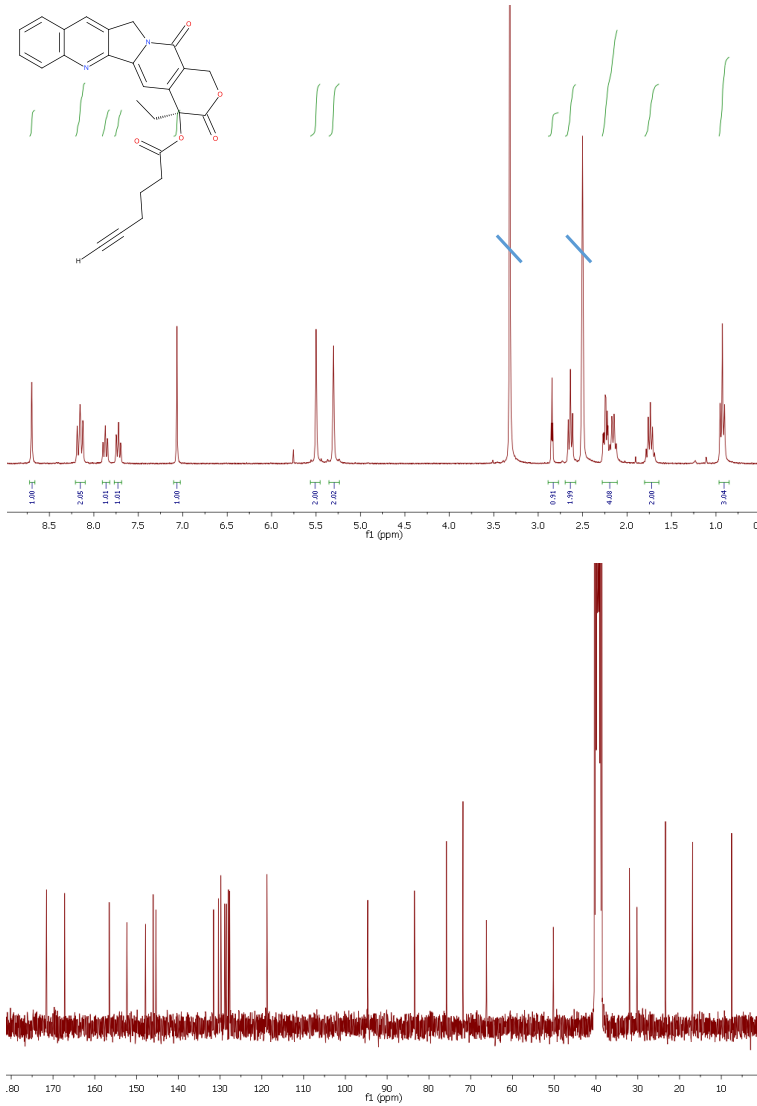


Figura I.4. Espectros de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ), arriba y ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ), abajo del compuesto CPT-5HA.

ANEXO II

Caracterización Adicional de Materiales para Liberación Controlada de Fármacos

ANEXO II. Caracterización adicional de materiales para liberación controlada de fármacos

1. MOFs de hierro (III) funcionalizados con grupos amino

II.1. Patrón de difracción de rayos X en polvo

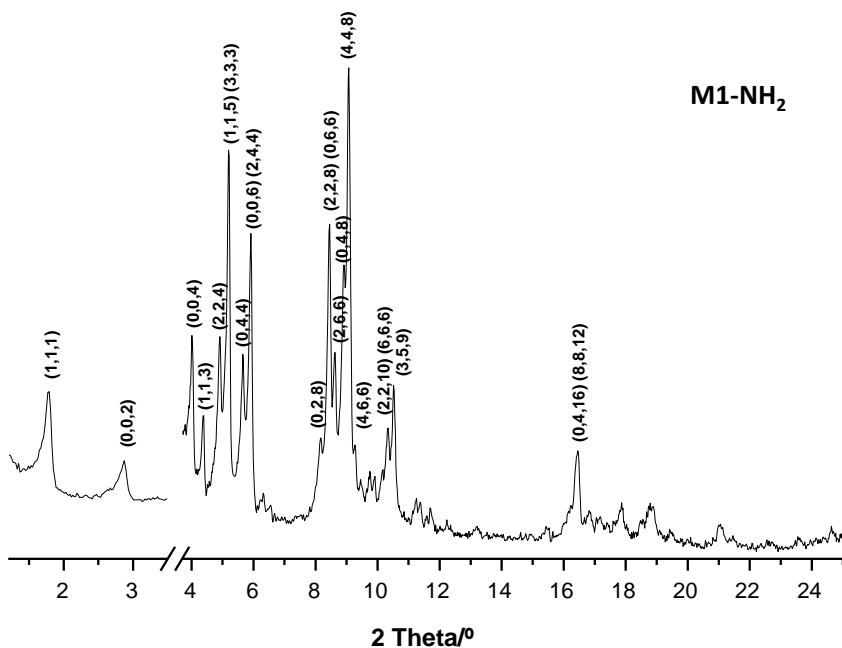


Figura II.1. Patrón de difracción de rayos X en polvo del material M1-NH₂. La rotura en el eje horizontal indica los dos programas de adquisición diferentes usados ($2\theta = 1-5^\circ$ y $2\theta = 2-25^\circ$).

II.2. Isotermas de adsorción-desorción de N₂

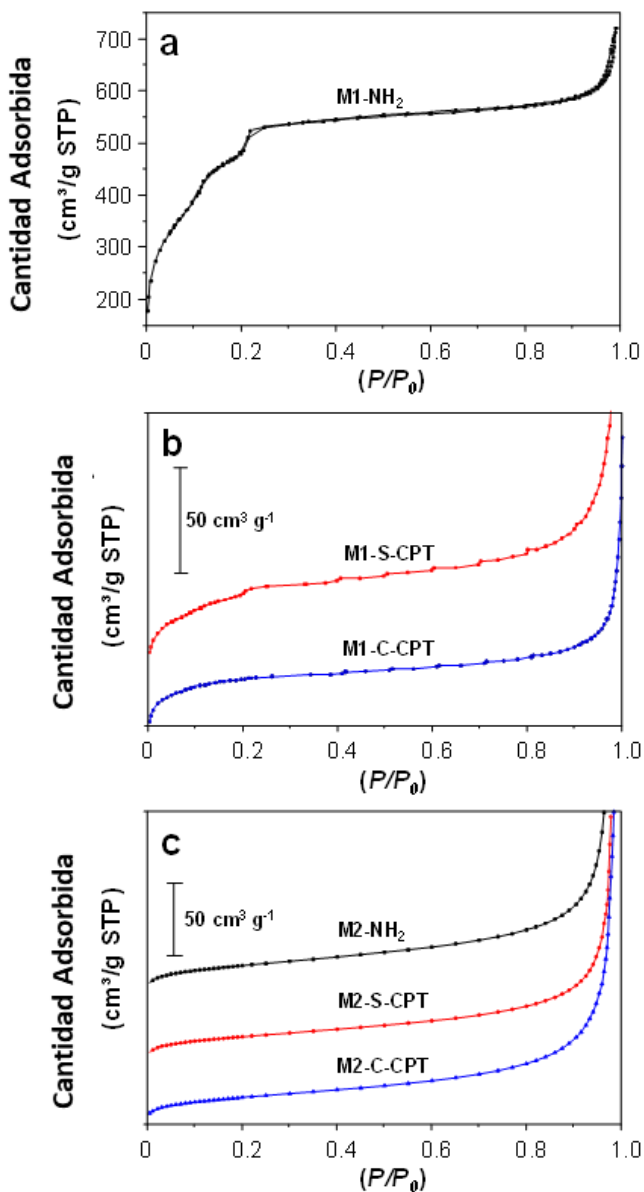


Figura II.2. Isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno de M1-NH₂ (a), M1-S-CPT y M1-C-CPT (b) y M2-NH₂, M2-S-CPT y M2-C-CPT (c).

2. MOFs cargados con CPT

II.2.1 Estudio de microscopía electrónica de transmisión de los MOFs con CPT enlazada.

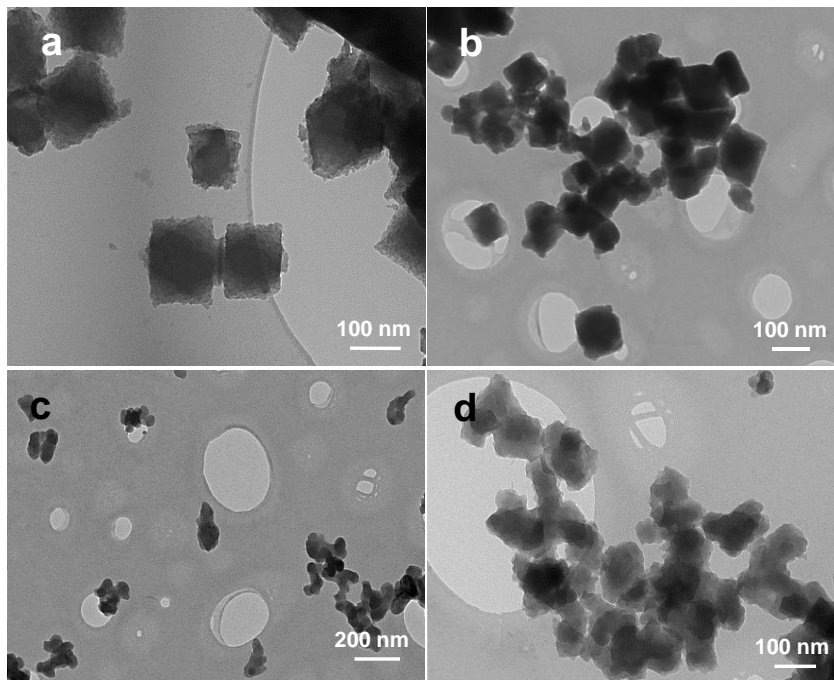


Figura II.3. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de (a) M1-S-CPT, (b) M1-C-CPT, (c) M2-S-CPT y (d) M2-C-CPT.

II.2.2 Patrones de difracción de rayos X en polvo de los MOFs con CPT enlazada

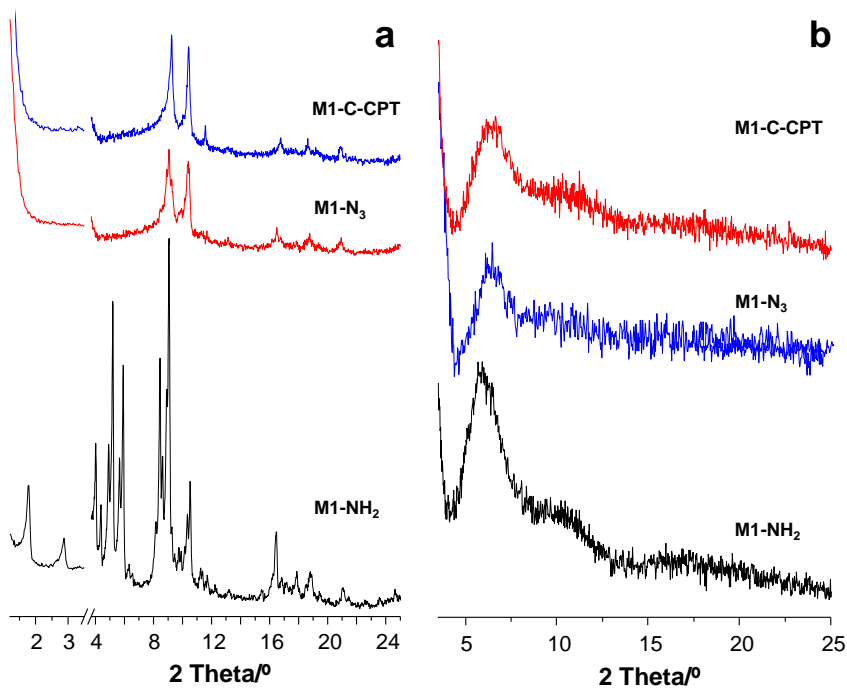


Figura II.4. Patrones de difracción de rayos X en polvo de los MOFs conjugados con CPT a través de química click. (a) M1-NH₂, MIL-101(Fe) modificado con grupos azida (M1-N₃) y MIL-101(Fe) funcionalizado con CPT a través de un anillo de triazol como unidad de unión (M1-C-CPT). La rotura en el eje horizontal indica los dos programas diferentes de adquisición utilizados ($2\theta = 1-5^\circ$ and $2\theta = 2-25^\circ$). (b) M2-NH₂, MIL-100(Fe) modificado con grupos azida (M2-N₃) y MIL-100(Fe) funcionalizado con CPT a través de un anillo de triazol como unidad de unión (M2-C-CPT).

II.2.3 Espectros de infrarrojo de los MOFs con CPT enlazada

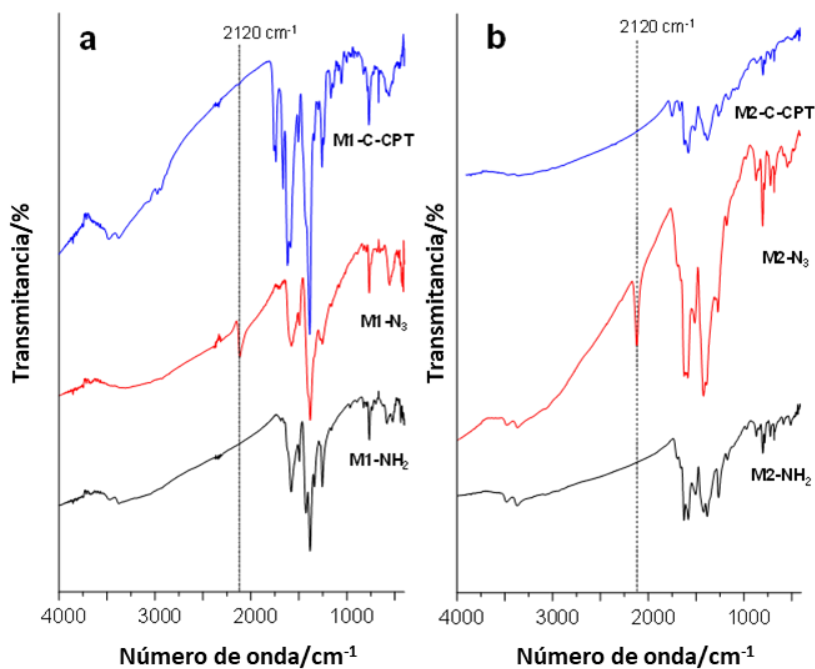


Figura II.5. Espectros FTIR de los MOFs modificados con grupos amino, sus derivados con grupos azida y los derivados de la química click, mostrando la evolución del proceso de adición [3 + 2] a través de química click gracias a la aparición de la banda de vibración νN_3 (2120 cm^{-1}) y su supresión una vez formado el anillo de triazol. (a) Derivados del MIL-101(Fe). (b) Derivados del MIL-100(Fe).

II.3 Materiales cargados con CPT por adsorción en la estructura

II.3.1 Patrones de difracción de rayos X en polvo de los MOFs con CPT adsorbida

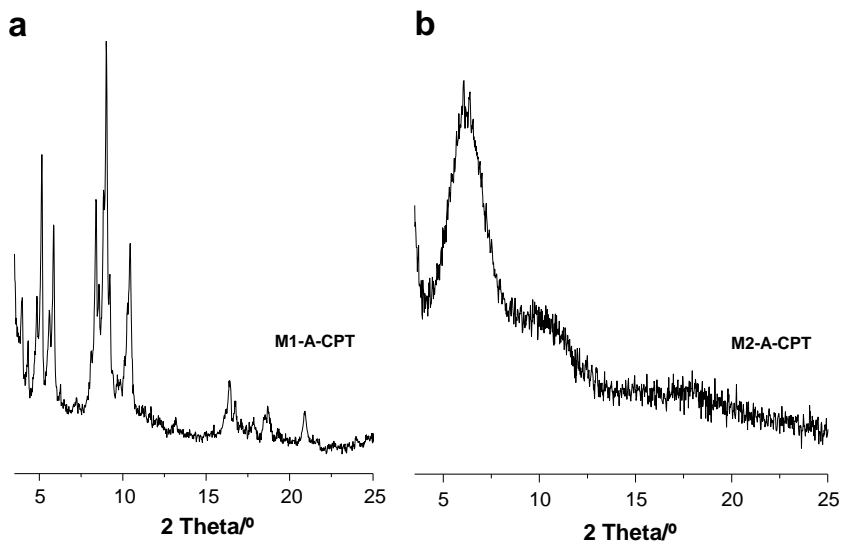


Figura II.6. Patrones de difracción de rayos X en polvo del M1-NH₂ tras la adsorción de CPT (M1-A-CPT) (a) y M2-NH₂ tras la adsorción de CPT (M2-A-CPT) (b).

II.3.2 Isotermas de adsorción-desorción de N₂ de los MOFs con CPT adsorbida

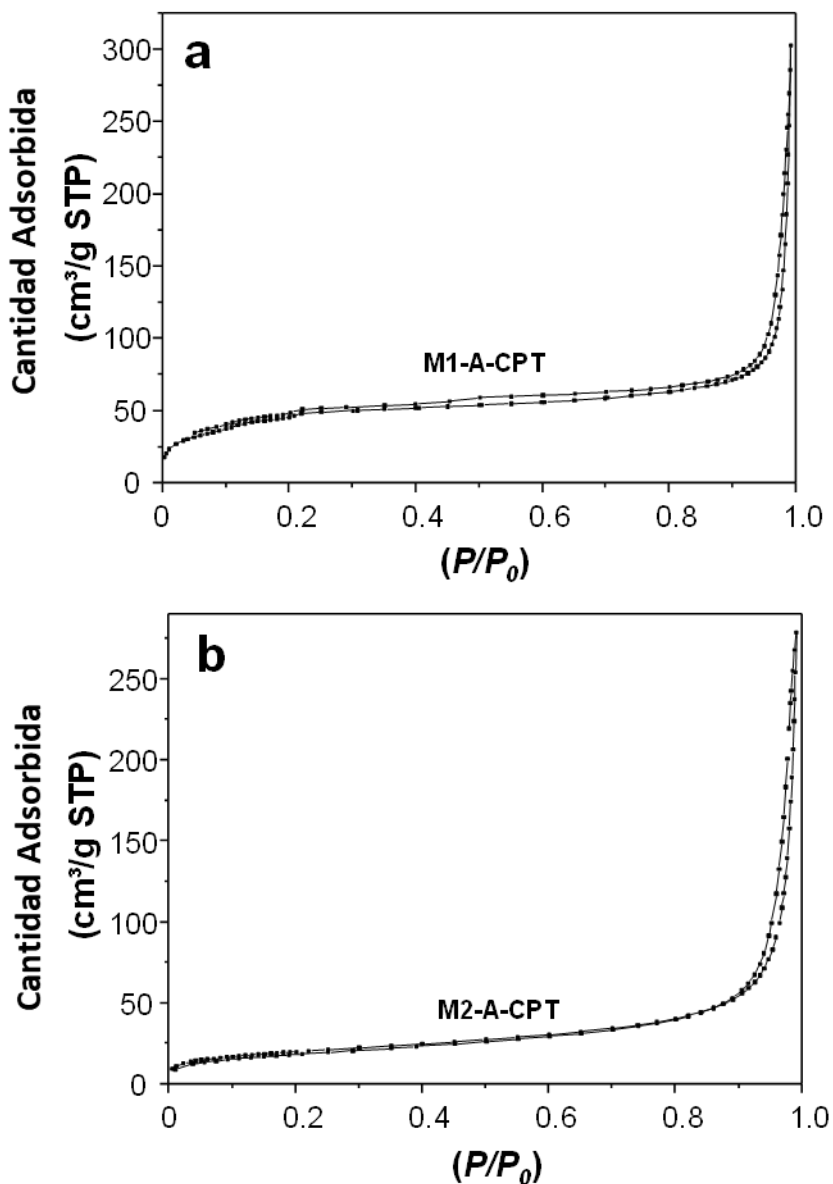


Figura II.7. Isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno de M1-A-CPT (a) y M2-A-CPT (b).

II.4 Estabilidad de los materiales e influencia del pH

II.4.1 Estudio de estabilidad de la muestra M1-A-CPT en DMEM (pH = 7.4)

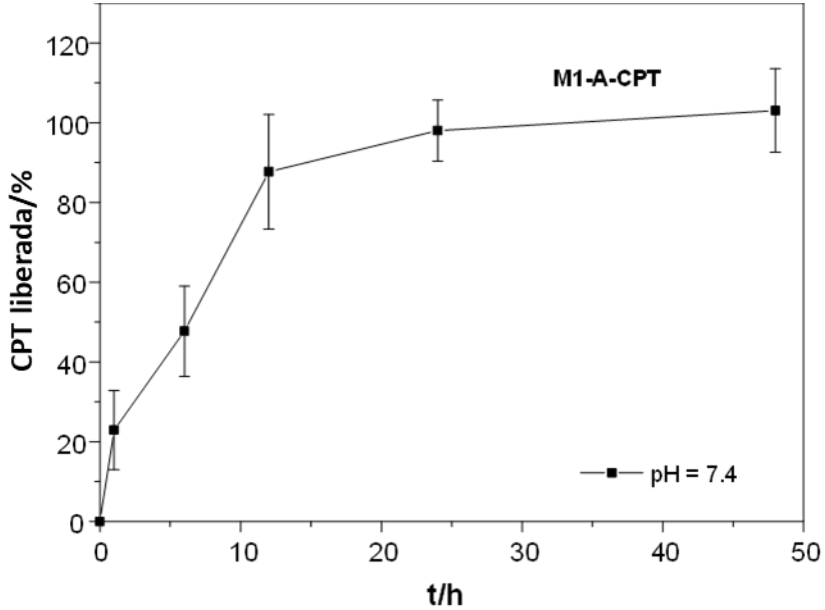


Figura II.8. Liberación de CPT del material M1-A-CPT en DMEM a pH = 7.4 y 37 °C.

II.4.2. Productos de degradación del M1-S-CPT y M1-C-CPT bajo condiciones ácidas (pH 5)

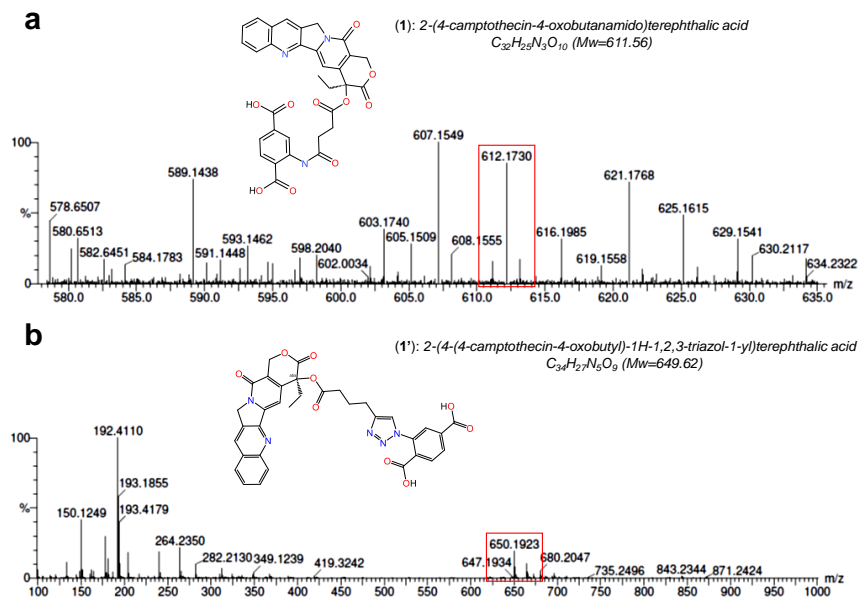


Figura II.9. Informe de UPLC-MS/MS obtenido para los fragmentos liberados por los derivados del MIL-101(Fe) con CPT covalentemente unida a pH 5. (a) Fragmento (1) liberado por la muestra M1-S-CPT. (b) Fragmento (1') liberado por la muestra M1-C-CPT.

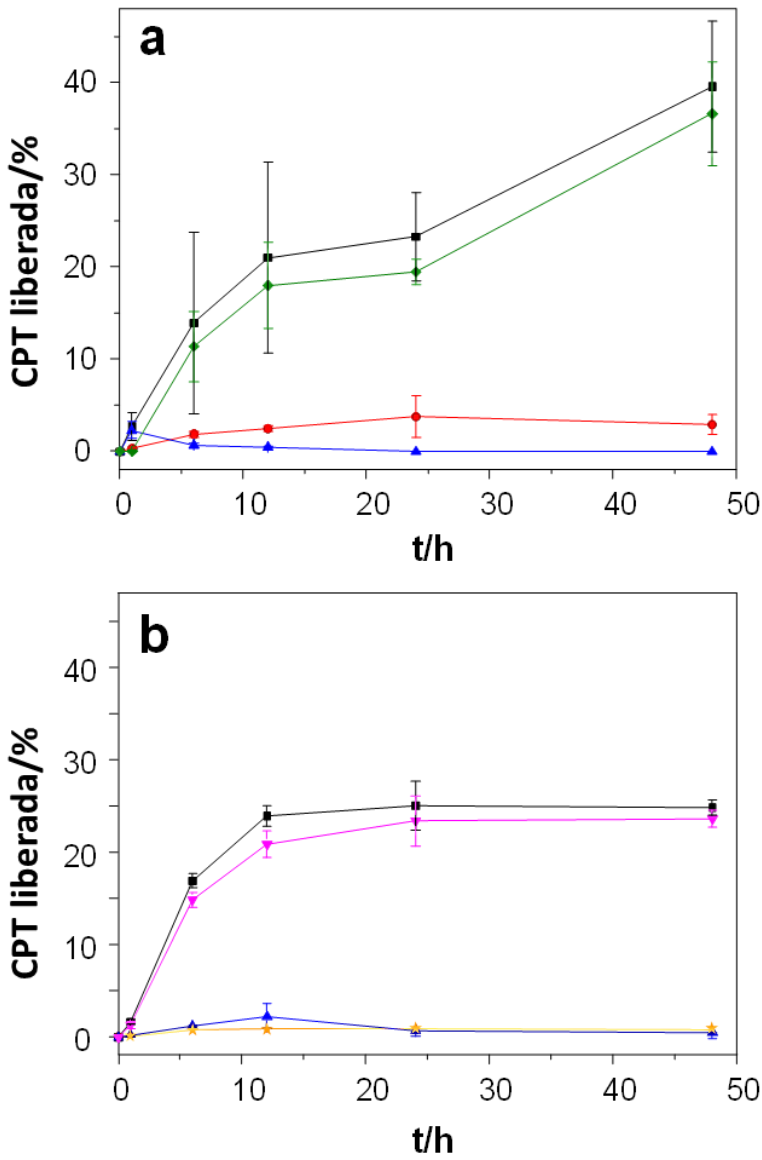


Figura II.10. Estudio de cinética de fragmentación de los materiales MIL-101(Fe) con CPT covalentemente unida a pH 5. El porcentaje de cada producto se expresa como equivalente de CPT liberado. (a) M1-S-CPT. (b) M1-C-CPT. Leyenda: (■) liberación total de CPT; (◆) compuesto (1); (▼) compuesto (1'); (●) CPT-Suc; (★) CPT-HA; (▲) CPT.

II.5 Estudio comparativo de citotoxicidad con camptotecina libre

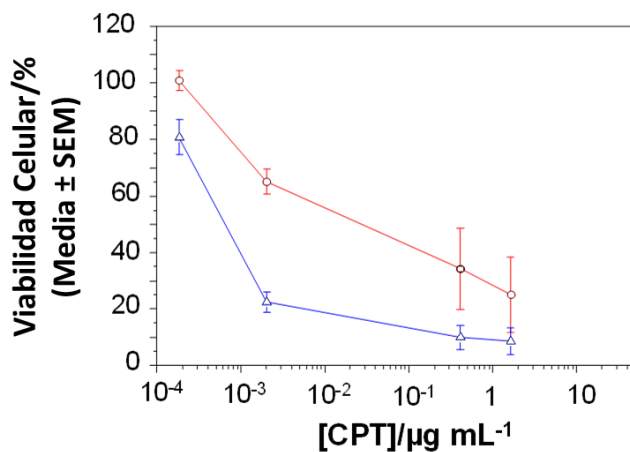


Figura II.11. Ensayos MTT de viabilidad celular de la CPT libre en las líneas celulares HeLa (\circ) y neuroblastoma SH-SY5Y (Δ). La concentración de muestra se refiere a equivalentes de CPT (escala inferior).

ANEXO III

Caracterización Adicional de Materiales para RMI

ANEXO III. Caracterización adicional de materiales para RMI

III.1. Patrón de difracción de rayos X del $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (GdFe).

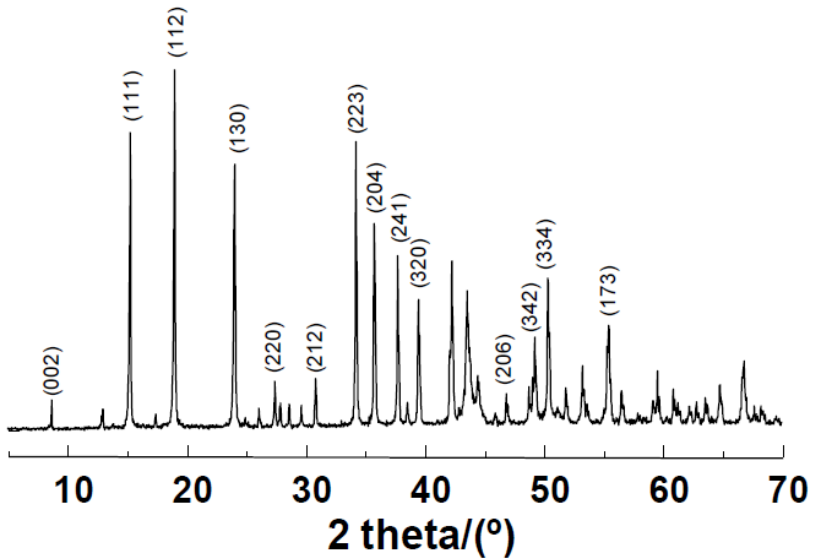


Figura III.1. Patrón de difracción de rayos X del GdFe preparado.

III.2. Estudio de microscopía electrónica mediante análisis espectroscópico de dispersión de energía de rayos X (EDS) de material $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (GdFe).

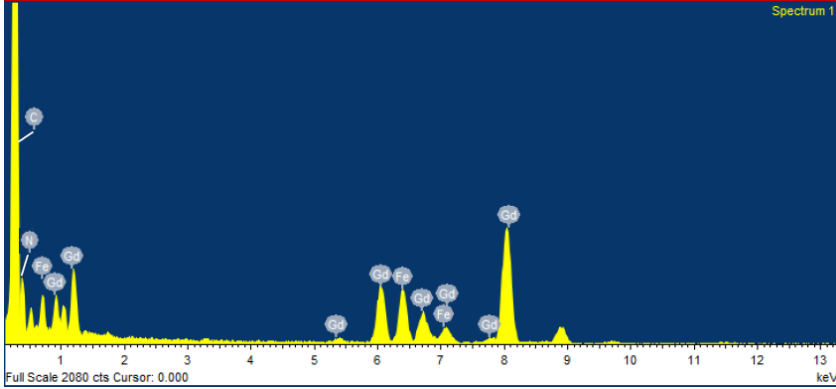


Figura III.2. Espectro de análisis EDS de la muestra GdFe mostrando los picos correspondientes a los elementos que lo componen. Aquellos picos no identificados corresponden a las señales de la rejilla (base de cobre o film de carbono).

III.3. Patrones de difracción de rayos X de los nanocomposites óxido/hidróxido de Gd-Si (GdSi)

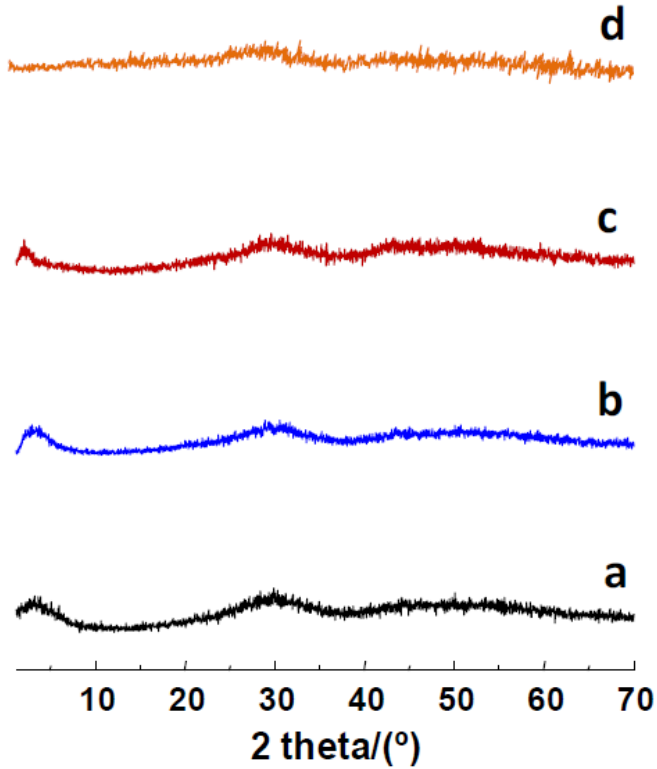


Figura III.3. Patrones de difracción de rayos X en polvo de la muestra densa GdSi preparada y los materiales porosos calcinados mGdSi-4 y mGdSi-48: (a) GdSi. (b) mGdSi-4 calcinado en aire a 500 °C durante 6 h. (c) mGdSi-48 calcinado en aire a 500 °C durante 6 h. (d) mGdSi-4 calcinado en aire a 700 °C durante 6 h.

III.4. Isotermas de adsorción-desorción de N₂

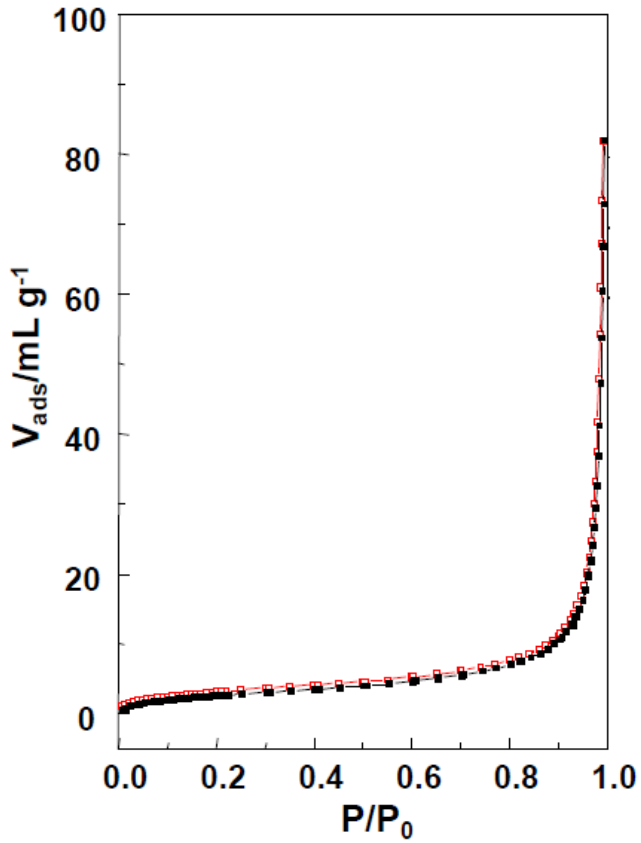


Figura III.4. Isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno de la muestra GdSi preparada.

III.5. Estudio de microscopía electrónica por análisis espectroscópico de dispersión de energía de rayos X.

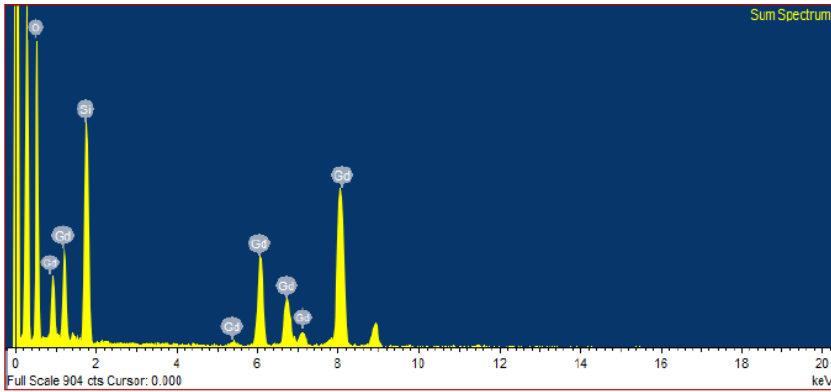


Figura III.5. Espectro del análisis EDS de la muestra GdSi, se muestran los picos correspondientes a los elementos en la muestra. Los picos no etiquetados corresponden a las señales de la rejilla (base de cobre o film de carbono).

III.6. Isotermas de adsorción-desorción de N₂ de las nanopartículas mesoporosas mGdSi.

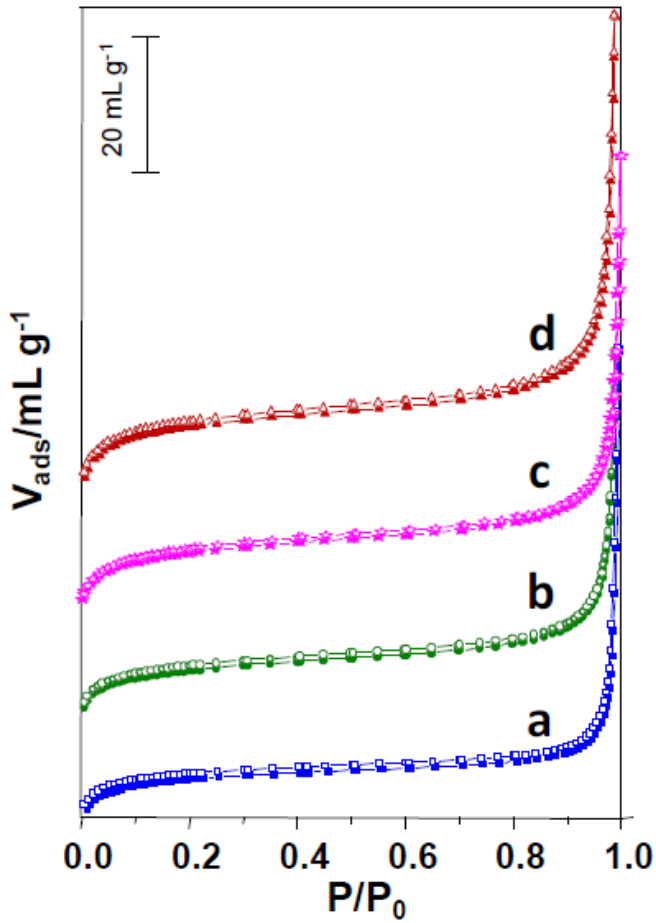


Figura III.6. Isotermas de adsorción-desorción de N₂ de las muestras mGdSi-*n* calcinadas: (a) mGdSi-4. (b) mGdSi-12. (c) mGdSi-24. (d) mGdSi-48.

III.7. Distribución de tamaños de poro en las muestras de nanopartículas de óxido de Gd-Si mesoporosas (mGdSi)

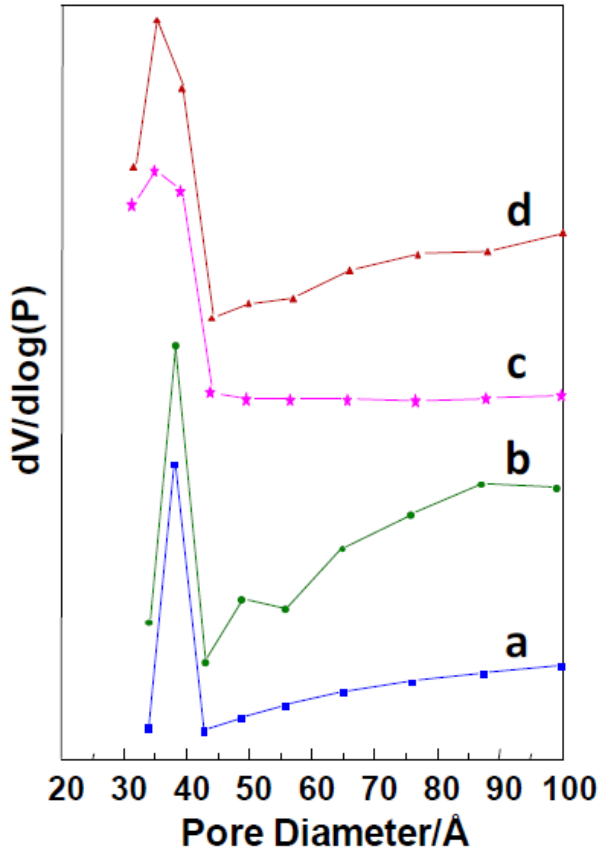


Figura III.7. Distribución de tamaños de poro en las muestras calcinadas mGdSi-n: (a) mGdSi-4. (b) mGdSi-12. (c) mGdSi-24. (d) mGdSi-48.

III.8. Estudio de microscopía electrónica usando TEM, STEM y FESEM de los materiales mGdSi-*n*.

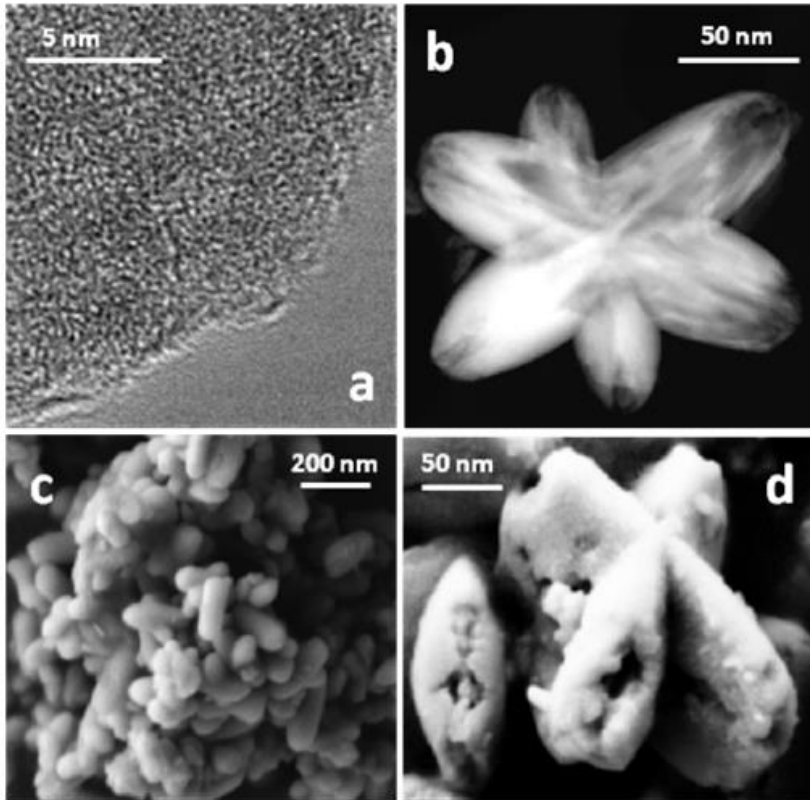


Figura III.8. Estudio de microscopía electrónica de nanocruces y nanovarillas de mGdSi-*n* obtenidas mediante transformación hidrotermal del material GdSi a 100 °C. (a): Imagen TEM del material mGdSi-12 mostrando detalles de la mesofase porosa irregular, tipo agujero de gusano, desordenada. (b): Imagen STEM de la muestra mGdSi-24 que, en raras ocasiones, las partículas de nanocruces también pueden crecer más resultando una morfología tipo asterisco. (c-d): Imágenes FESEM de partículas de nanopartículas mGdSi-4 (c) y mGdSi-48 (1 nanocruz, 1 nanobarra) que presentan un daño severo debido al tratamiento hidrotermal largo (d).

III.9. Imágenes STEM de los materiales mGdFe-n y análisis espectroscópicos de dispersión de energía de rayos X.

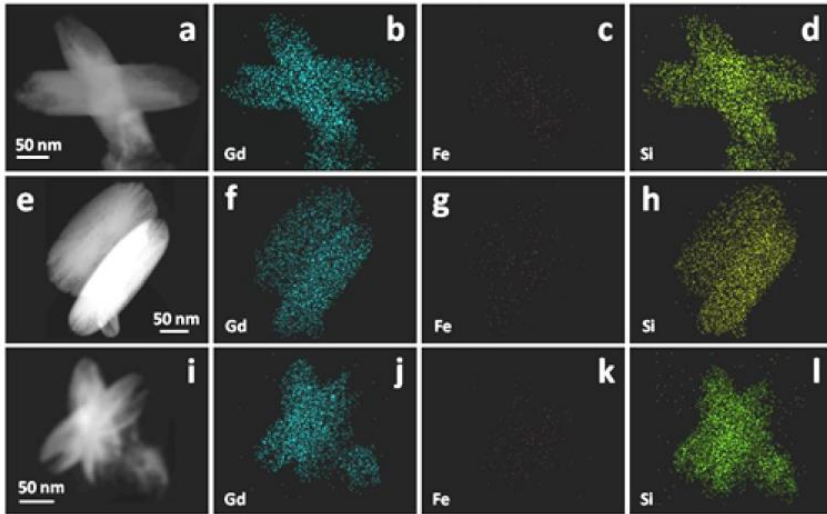


Figura III.9. Imágenes STEM (a, e, i) e imágenes de mapeo elemental (b-d, f-h, j-l) de una única partícula de las muestras mGdSi-12 (a-d), mGdSi-24 (e-h) y mGdSi-48 (i-l).

III.10. Difracción de rayos X en polvo de las nanovarillas de $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (GdFe) de 94 nm.

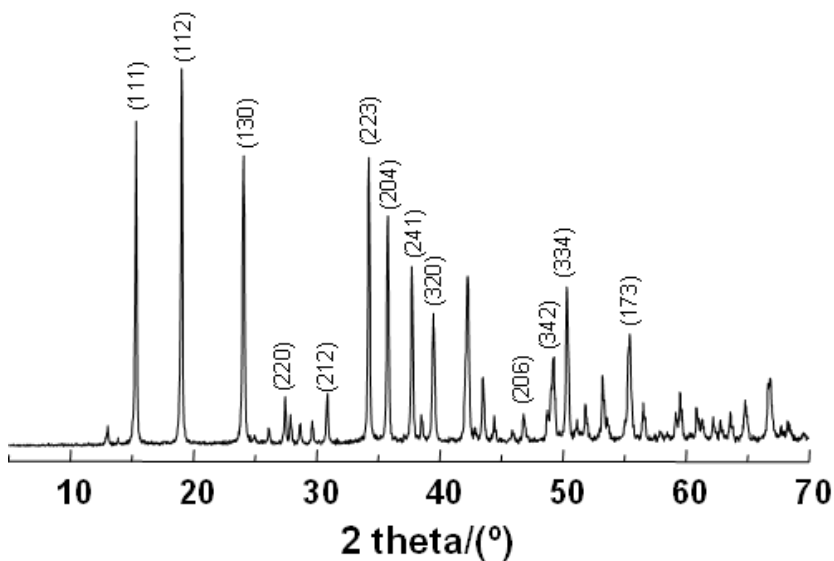


Figura III.10. Patrón de difracción de rayos X (DRX) de las nanovarillas de 94 nm del GdFe.

III.11. Tamaño de las nanoparvarillas de GdSi medidas a través de dispersión de luz difusa.

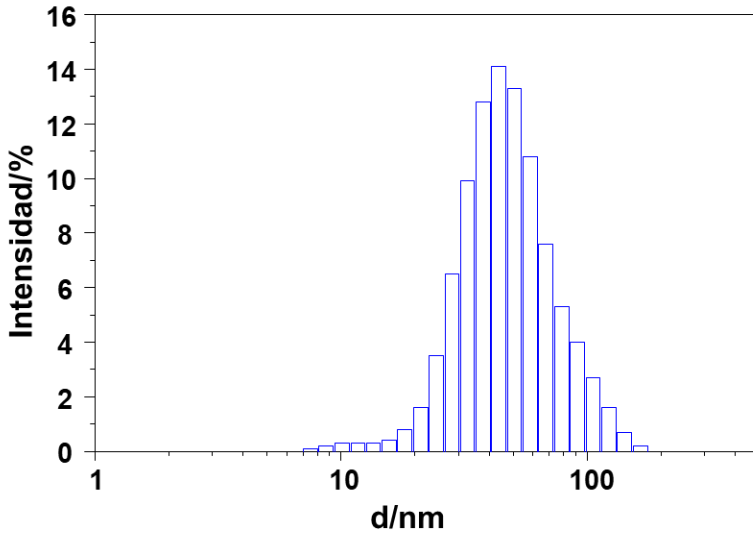


Figura III.11. Diámetro hidrodinámico de las partículas de la muestra GdSi determinado en agua mediante dispersión de la luz difusa.

III.12. Caracterización de materiales

Tabla III.12. Propiedades fisicoquímicas de los agentes de contraste duales GdFe^a

Muestra	Fórmula Molecular	Composición atómica ^b			Gd:Fe ^b (atómico)	TEM diámetro ^c (nm)	DLS diámetro ^d		Morfología (cruces:barras)	Área BET (m ² g ⁻¹)	Potencial ζ (mV)
		Gd (%)	Fe (%)	Si (%)			(nm)				
							Agua	PBS			
GdFe-1	Gd(H ₂ O) ₄ [Fe(CN) ₆]	47,2	52,8	0	0,89	94,3±35,5	<i>nd</i>	<i>nd</i>	1:99	<i>nd</i>	<i>nd</i>
GdFe-2	Gd(H ₂ O) ₄ [Fe(CN) ₆]	50,9	49,1	0	1,04	262,1±43,5	<i>nd</i>	<i>nd</i>	36:64	<i>nd</i>	<i>nd</i>
GdFeSi-1	Gd(H ₂ O) ₄ [Fe(CN) ₆]@SiO ₂	32,2	35,3	32,4	0,91	106,7±33,5	124,7±81,9/0,431	492,7±71,4/0,786	3:97	61,4	-12,3
GdFeSi-2	Gd(H ₂ O) ₄ [Fe(CN) ₆]@SiO ₂	39,9	41,1	19,0	1,28	230,3±35,5	343,7±154,1/0,201	806,8±231,6/0,620	32:68	57,6	-15,5
GdFeSi-1@PEG	Gd(H ₂ O) ₄ [Fe(CN) ₆]@SiO ₂ @PEG ₃	34,5	36,4	29,1	1,20	<i>nd</i>	111,4±62,7/0,317	299,3±58,9/0,328	3:97	4,8	-8,7
GdFeSi-2@PEG	Gd(H ₂ O) ₄ [Fe(CN) ₆]@SiO ₂ @PEG ₃	40,8	41,4	17,9	1,26	<i>nd</i>	228,9±79,3/0,120	600,3±147,4/0,357	32:68	27,7	-10,7

^a*nd* = no determinado. Las muestras GdFe son completamente solubles en agua (no adecuadas para hacer determinaciones de tamaño de partícula por DLS o Potencial Z), tampoco muestran porosidad externa (no adsorben N₂). Los materiales GdFeSi PEGilados presentan imágenes de TEM algo borrosas, haciendo muy difícil obtener medidas de tamaño de partícula precisas. ^bDeterminado a través del estudio EDS. ^cMedia±SD. Determinado por medidas de TEM de al menos 250 partículas. ^dDiámetro de partícula determinado mediante DLS (media ± SD)/Índice de polidispersión.

III.13. Dispersión de la luz dinámica (DLS)

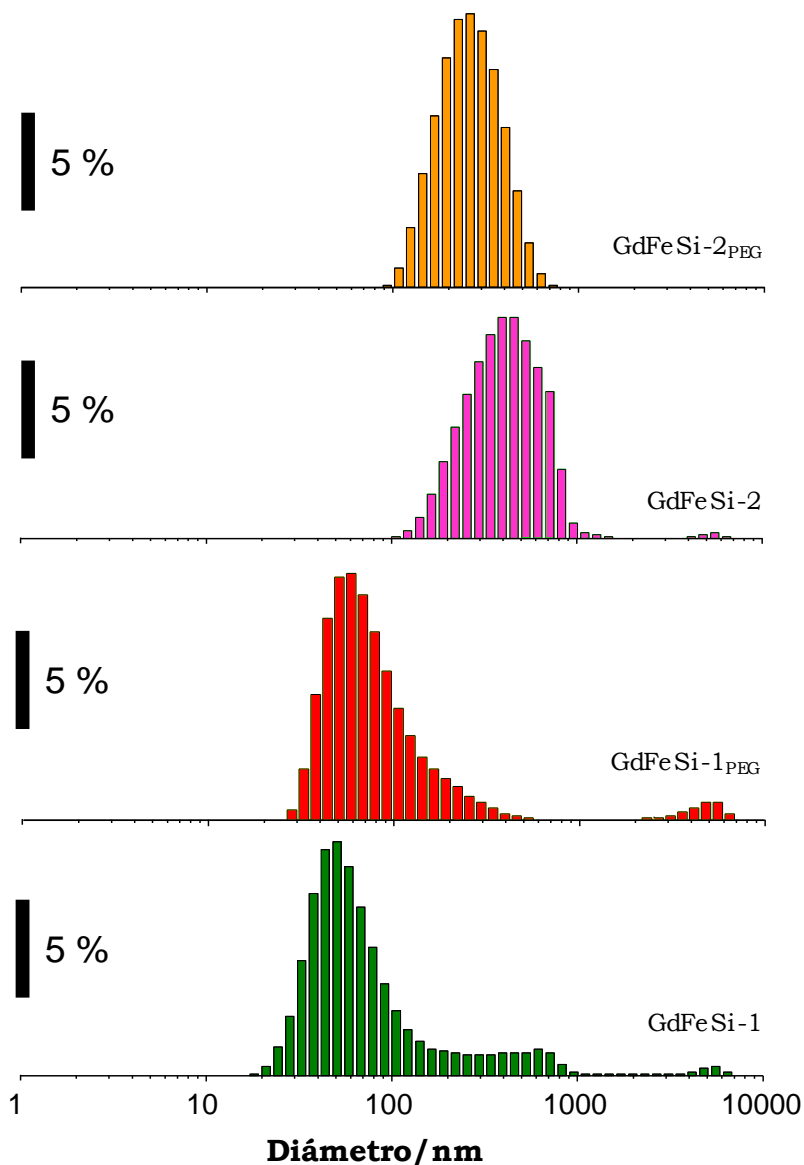


Figura III.13a. Diámetro hidrodinámico de las partículas de los materiales determinado en agua mediante DLS.

III.14. Dispersión de la luz dinámica (Continuación)

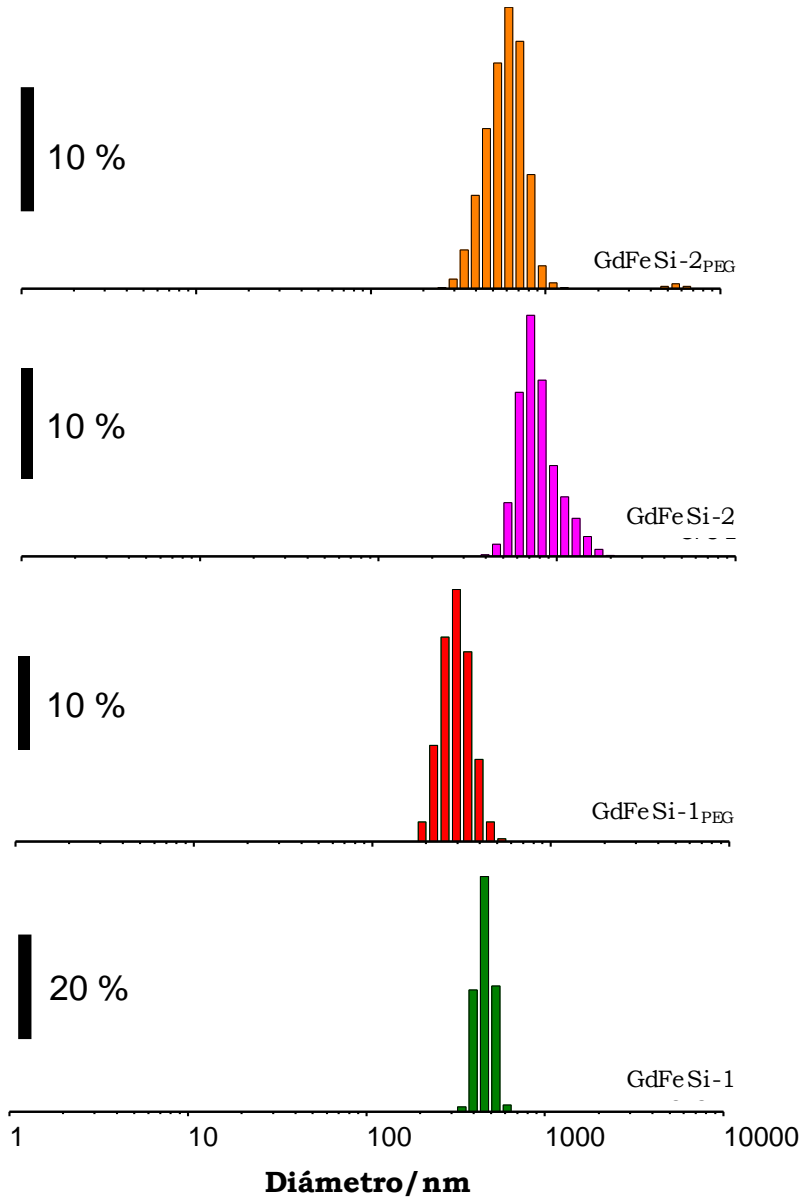


Figura III.13b. Diámetro hidrodinámico de las partículas de los materiales determinado en PBS mediante DLS.

III.14. Difracción de rayos X en polvo

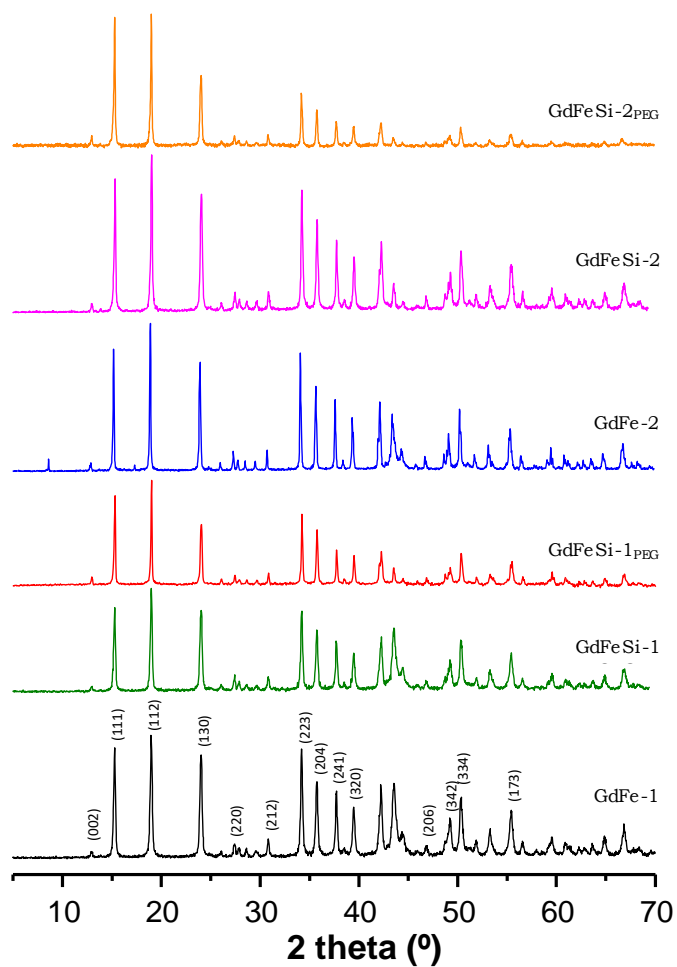


Figura III.14. Patrones de difracción de rayos X en polvo de los agentes de contraste duales de Gd y Fe.

III.15. Espectroscopía infrarroja

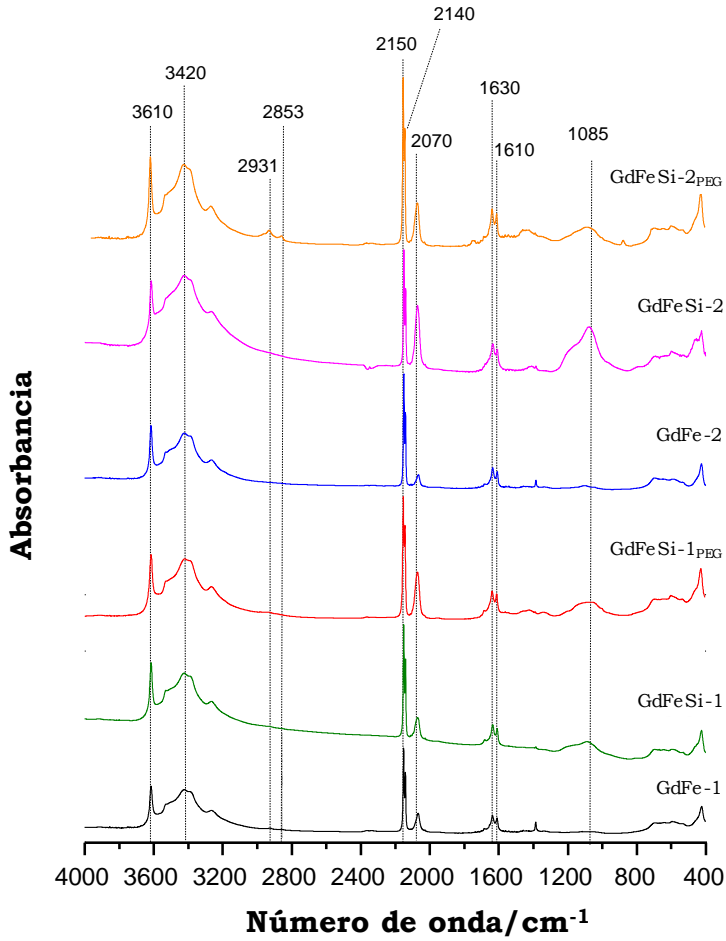


Figura III.15. Espectros FTIR de los materiales sintetizados como agentes de contraste duales T_1 - T_2 .

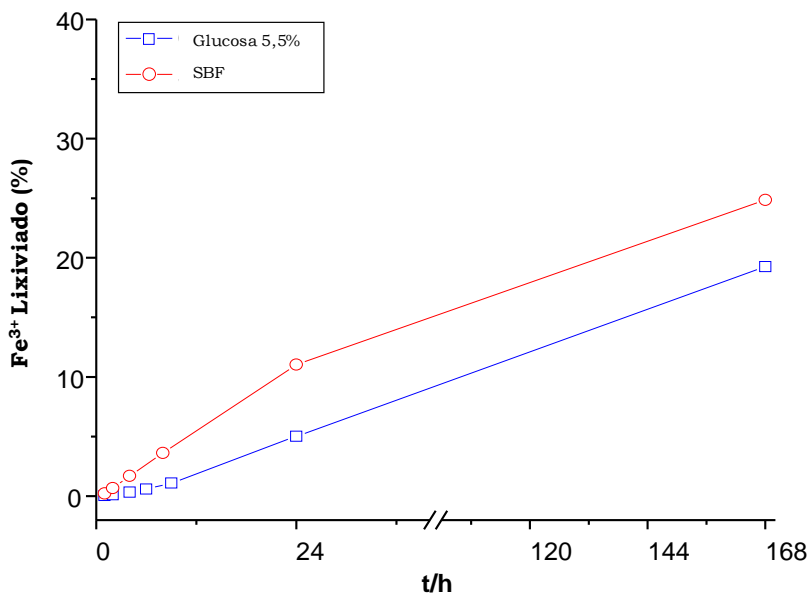
III.16. Estabilidad en disolución isotónica

Figura III.16. Representación gráfica de catión metálico (Fe^{3+}) lixiviado por la muestra $\text{GdFeSi-1}_{\text{PEG}}$ tras su incubación en una disolución isotónica de glucosa al 5,5% en masa (azul) y en fluido corporal simulado (rojo) a 37 °C, las determinaciones se hicieron por ICP.

III.17. Isotermas de Adsorción de N₂

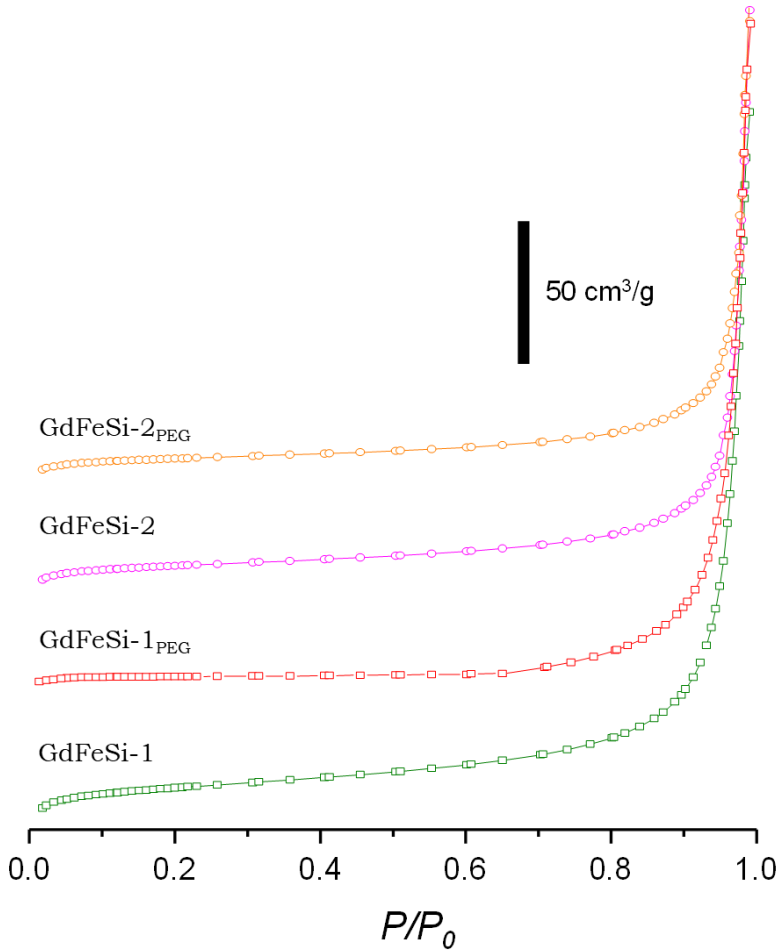


Figura III.17. Isotermas de adsorción de nitrógeno BET de los materiales preparados como agentes de contraste duales de Gd y Fe.

III.18. Medidas de relajatividad y RMI *in vitro*

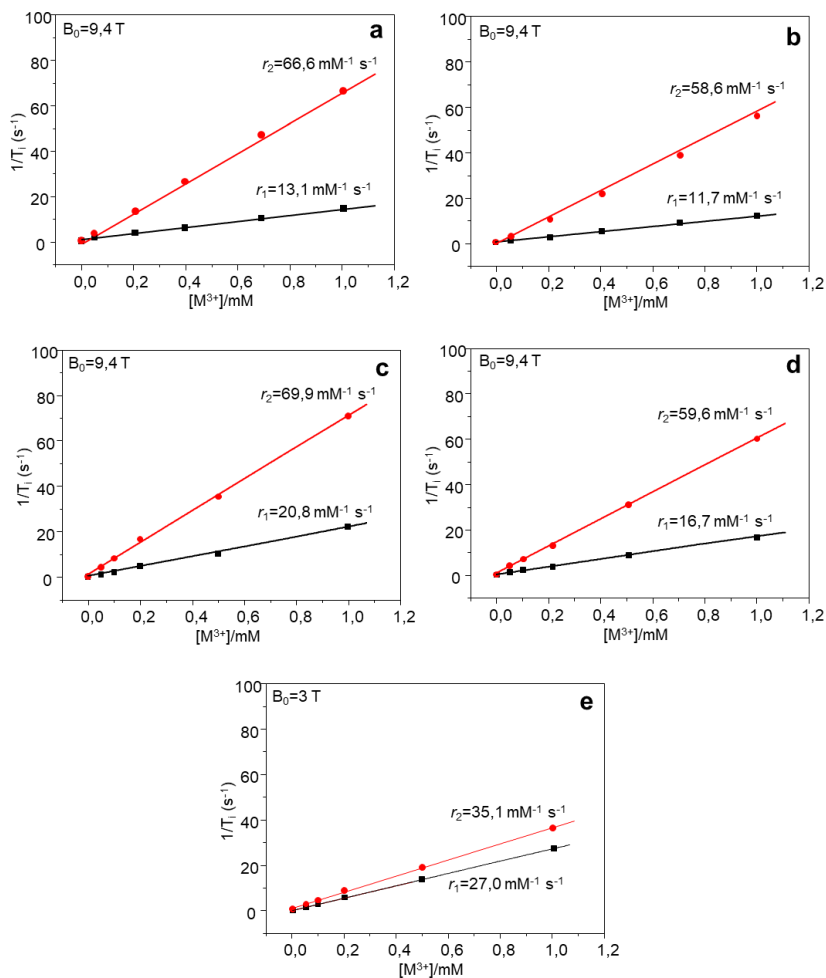


Figura III.18. Medidas de las velocidades de relajación (a) $1/T_1$ y (b) $1/T_2$, frente a la concentración de catión trivalente ($M=Gd^{3+}$ en las medidas de T_1 y Fe^{3+} en las de T_2) en suspensiones acuosas (0,1% goma de xantano) de los materiales GdFeSi en un campo magnético alto (9,4 T) y medio (3 T). (a) GdFeSi-1. (b) GdFeSi-2. (c) GdFeSi-1@PEG. (d) GdFeSi-2@PEG. (e) GdFeSi-1@PEG.

III.19. Estudio de citotoxicidad

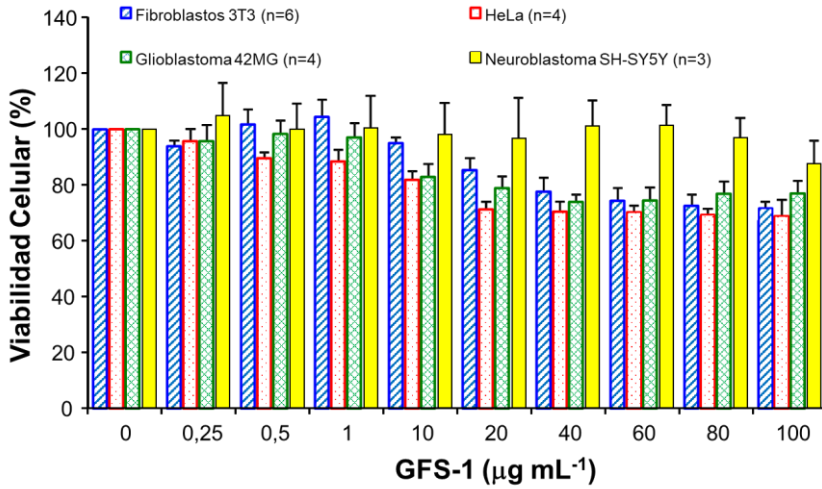


Figura III.19. Ensayos MTT *in vitro* de viabilidad celular en diferentes líneas celulares incubadas con concentraciones variables de nanovarillas magnéticas de GdFeSi-1 (media±SEM). *n*=número de experimentos.

ANEXO IV

Curriculum en Periodo de Tesis Doctoral

ANEXO IV. Curriculum en el periodo de tesis doctoral

Publicaciones relacionadas con la tesis

a) Artículos

1. A. Cabrera-García; E. Checa-Chavarria; E. Rivero-Buceta; V. Moreno; E. Fernández; P. Botella. Amino modified metal-organic frameworks MIL-100(Fe) and MIL-101(Fe) as pH-responsive nanoplatfoms for safety delivery of camptothecin. *J. Colloid Sci. Interfaces*. **Aceptado** (2019).
2. A. Cabrera García; E. Checa Chavarria; J. Pacheco Torres; Á. Bernabeu Sanz; A. Vidal Moya; E. Rivero Buceta; G. Sastre; E. Fernández; P. Botella. Engineered Contrast Agents in a Single Structure for T_1 - T_2 Dual Magnetic Resonance Imaging. *Nanoscale*. 10, pp. 6349-6360. Royal Society of Chemistry, 22/03/2018. Tipo de producción: Artículo científico. Tipo de soporte: Revista
3. A. Cabrera García; A. Vidal Moya; Á. Bernabeu; J. Pacheco Torres; E. Checa Chavarria; E. Fernández; P. Botella. Gd-Si Oxide Nanoparticles as Contrast Agents in Magnetic Resonance Imaging. *Nanomaterials*. 6, pp. 109-124. MDPI, 08/06/2016. Tipo de producción: Artículo científico. Tipo de soporte: Revista.
4. A. Cabrera García; A. Vidal Moya; Á. Bernabeu; J. Sánchez González; E. Fernández; P. Botella. Gd-Si Oxide mesoporous nanoparticles with pre-formed morphology prepared from a Prussian blue analogue template. *Dalton Transactions*. 44, pp. 14034-14041. Royal Society of Chemistry, 01/07/2015. Tipo de producción: Artículo científico. Tipo de soporte: Revista.

b) Patentes

Título propiedad industrial registrada: Material híbrido como agente de contraste en imágenes de resonancia magnética

Tipo de propiedad industrial: Patente de invención

Inventores/autores/obtentores: P. Botella Asunción; A. Cabrera García

Entidad titular de derechos: Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Nº de solicitud: PCT/ES2015/070595

País de inscripción: España, Comunidad Valenciana

Fecha de registro: 31/07/2014

Fecha de concesión: 04/02/2016

c) Trabajos presentados en congresos nacionales o internacionales

1 Título del trabajo: Multi-contrast agent platform for T_1 - T_2 dual Magnetic Resonance Imaging.

Nombre del congreso: BioNanoMed 2018

Ciudad de celebración: Graz, Austria

Fecha de celebración: 25/04/2018

Fecha de finalización: 27/04/2018

P. Botella; A. Cabrera García; E. Checa Chavarria; J. Pacheco Torres; A. Bernabeu Sanz; A. Vidal Moya; E. Rivero Buceta; G. Sastre; E. Fernández.

2 Título del trabajo: Mastering Contrast Agents in a Single Structure for T_1 - T_2 Dual Magnetic Resonance Imaging.

Nombre del congreso: IMAGINENANO

Ciudad de celebración: Bilbao, País Vasco, España

Fecha de celebración: 13/03/2018

Fecha de finalización: 15/03/2018

P. Botella; A. Cabrera García; E. Checa Chavarria; J. Pacheco Torres; Á. Bernabeu Sanz; A. Vidal Moya; E. Rivero Buceta; G. Sastre; E. Fernández.

3 Título del trabajo: Gd[Fe(CN)₆]₂@SiO₂ nanohybrids as dual mode T_1 and T_2 magnetic resonance imaging contrast agents

Nombre del congreso: Fifth International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials

Ciudad de celebración: Lisboa, Lisboa, Portugal

Fecha de celebración: 06/03/2017

Fecha de finalización: 10/03/2017

A. Cabrera García; A. Vidal Moya; Á. Bernabeu; J. Pacheco Torres; E. Checa Chavarria; E. Fernández; P. Botella.

4 Título del trabajo: Desarrollo de nuevos nanomateriales biocompatibles basados en redes organometálicas, útiles como vehículos para el transporte de fármacos

Nombre del congreso: III Encuentro de estudiantes de doctorado de la Universitat Politècnica de València

Ciudad de celebración: Valencia, España

Fecha de celebración: 30/06/2016

Fecha de finalización: 30/06/2016

A. Cabrera García; P. Botella.

5 Título del trabajo: Prussian Blue derivative nanoparticles as contrast agents for Magnetic Resonance Imaging

Nombre del congreso: 8th GERMN (RESQ)-5th Iberian NMR biennial meeting

Ciudad de celebración: Valencia, España

Fecha de celebración: 27/06/2016

Fecha de finalización: 29/06/2016

A. Cabrera García; A. Vidal Moya; Á. Bernabeu; J. Sánchez González; E. Fernández; P. Botella.

6 Título del trabajo: Novel hybrid materials by using metal-organic structures as hard templates

Nombre del congreso: 18th International Zeolite Conference

Ciudad de celebración: Rio de Janeiro, Brasil

Fecha de celebración: 19/06/2016

Fecha de finalización: 24/07/2016

A. Cabrera García; A. Vidal Moya; E. Fernández; P. Botella.

7 Título del trabajo: Desarrollo de nuevos nanomateriales con estructura de polímeros de coordinación, útiles como agentes de contraste para el diagnóstico clínico por resonancia magnética

Nombre del congreso: II Encuentro de estudiantes de doctorado de la Universitat Politècnica de València

Ciudad de celebración: Valencia, España

Fecha de celebración: 25/06/2015

Fecha de finalización: 25/06/2015

A. Cabrera García; P. Botella Asunción.

8 Título del trabajo: Prussian blue hybrids as contrast agents in magnetic resonance imaging

Nombre del congreso: Fourth International Conference on Multifunctional, Hybrids and Nanomaterials

Ciudad de celebración: Sitges, España

Fecha de celebración: 09/03/2015

Fecha de finalización: 13/03/2015

A. Cabrera-García; A. Vidal-Moya; P. Botella.

9 Título del trabajo: Desarrollo de nuevos nanomateriales con estructura de polímeros de coordinación, útiles como agentes de contraste para el diagnóstico clínico por resonancia magnética

Nombre del congreso: I Congreso Biomedicina Predocs de Valencia (I CONBIOPREVAL)

Ciudad de celebración: Valencia, España

Fecha de celebración: 27/11/2014

Fecha de finalización: 28/11/2014

A. Cabrera García, P. Botella

10 Título del trabajo: Desarrollo de nuevos materiales nanoestructurados basados en redes organometálicas con aplicaciones biomédicas.

Nombre del congreso: I Encuentro de estudiantes de doctorado de la Universitat Politècnica de València

Ciudad de celebración: Valencia, España

Fecha de celebración: 12/06/2014

Fecha de finalización: 12/06/2014

A. Cabrera García.

Otras publicaciones

a) Artículos

1. P. Botella; C. Muniesa; V. Vicente; A. Cabrera García. Effect of drug precursor in cell uptake and cytotoxicity of redox-responsive camptothecin nanomedicines. *Materials Science and Engineering C*. 58, pp. 692-699. Elsevier, 09/09/2015. Tipo de producción: Artículo científico. Tipo de soporte: Revista.
2. P. Botella; C. Muniesa; V. Vicente; K. Fabregat; A. Cabrera. Novel redox-responsive prodrugs and nanomedicines for glutathione-driven intracellular release of camptothecin. *Journal of Nanomaterials & Molecular Nanotechnology*. pp. 24-24. SciTechnol, 28/03/2014. Tipo de producción: Artículo científico. Tipo de soporte: Revista.

b) Proceedings y libros de congresos con ISBN

1. A. Cabrera García; Z. Díaz Betancor; V. Blay. The use of metal-organic frameworks as powerful contrast agents in magnetic resonance imaging. XII International Workshop on Sensors and Molecular Recognition: Libro de Artículos. XII, 12, pp. 214-216. 02/11/2018. ISBN 978-84-09-05881-5. Tipo de producción: Artículo científico. Tipo de soporte: Libro

2. V. Blay; A. Cabrera García; Z. Díaz Betancor; M. Niwa. Molecular recognition in catalysis by zeolites. XI International Workshop on Sensors and Molecular Recognition: Libro de Artículos. XI, pp. 33-35. 15/11/2017. ISBN 978-84-697-5069-8. Tipo de producción: Artículo científico. Tipo de soporte: Libro
3. V. Blay; A. Cabrera García; Z. Díaz Betancor; P. J. Miguel; A. Corma. Zeolites and MOFs: what they are and their use in sensing applications. X International Workshop on Sensors and Molecular Recognition: Libro de Artículos. X, pp. 128-131. 05/10/2016. ISBN 978-84-617-5330-7. Tipo de producción: Artículo científico. Tipo de soporte: Libro.
4. P. Botella; C. Muniesa; V. Vicente; K. Fabregat; A. Cabrera García. Controlled Intracellular Release of Camptothecin by Glutathione-Driven Mechanism. TechConnect World Technical Proceedings 2014. 2, pp. 347-350. 15/06/2014. Tipo de producción: Artículo científico. Tipo de soporte: Libro.
5. P. Botella; C. Muniesa; V. Vicente; A. Cabrera García; K. Fabregat. In Vitro Delivery of Docetaxel to Cancer Cells by Hybrid PLGA@Organosilica Nanoparticles with Redox-Sensitive Molecular Gates. TechConnect World Technical Proceedings 2014. 2, pp. 355-358. 15/06/2014. Tipo de producción: Artículo científico Tipo de soporte: Libro.

c) Libros

V. Blay; L. Francisco Bobadilla; A. Cabrera García (eds.). Zeolites and Metal-Organic Frameworks from Lab to Industry. Amsterdam University Press, 11/04/2018. ISBN 9789462985568 Tipo de producción: Libro o monografía científica Tipo de soporte: Libro.

d) Trabajos presentados en congresos nacionales o internacionales

1 Título del trabajo: The use of metal-organic frameworks as powerful contrast agents in magnetic resonance imaging.
Nombre del congreso: XII International Workshop on Sensors and Molecular Recognition XII IWOSMOR
Ciudad de celebración: Valencia, España
Fecha de celebración: 05/07/2018

Fecha de finalización: 06/07/2018

A. Cabrera García; Z. Díaz Betancor; V. Blay.

2 Título del trabajo: Molecular recognition in catalysis by zeolites

Nombre del congreso: XI International Workshop on Sensors and Molecular Recognition.

Ciudad de celebración: Valencia, España

Fecha de celebración: 06/07/2017

Fecha de finalización: 07/07/2017

V. Blay; A. Cabrera García; Z. Díaz Betancor; M. Niwa.

3 Título del trabajo: Nanomaterials in medicine: improving the contrast in magnetic resonance imaging.

Nombre del congreso: VII Congreso de Estudiantes de Farmacia de la UV (V Internacional)

Ciudad de celebración: Valencia, España

Fecha de celebración: 29/03/2017

Fecha de finalización: 31/03/2017

A. Cabrera García; V. Blay Roger; Z. Díaz Betancor.

4 Título del trabajo: Zeolites and MOFs: what they are and their use in sensing applications.

Nombre del congreso: X International Workshop on Sensors and Molecular Recognition

Ciudad de celebración: Valencia, España

Fecha de celebración: 07/07/2016

Fecha de finalización: 08/07/2016

V. Blay; A. Cabrera García; Z. Díaz Betancor; P. J. Miguel; A. Corma.

5 Título del trabajo: Controlled Intracellular Release of Camptothecin by Glutathione-Driven Mechanism

Nombre del congreso: TechConnect World, Innovation Conference & Expo 2014

Ciudad de celebración: Washington, E.E.U.U.

Fecha de celebración: 15/06/2014

Fecha de finalización: 18/06/2014

P. Botella; C. Muniesa; V. Vicente; K. Fabregat; A. Cabrera.

6 Título del trabajo: In Vitro Delivery of Docetaxel to Cancer Cells by Hybrid PLGA@Organosilica Nanoparticles with Redox-Sensitive Molecular Gates

Nombre del congreso: TechConnect World, Innovation Conference & Expo 2014

Ciudad de celebración: Washington, E.E.U.U.

Fecha de celebración: 15/06/2014

Fecha de finalización: 18/06/2014

P. Botella; M. Quesada; V. Vicente; A. Cabrera; K. Fabregat

7 Título del trabajo: Nanomedicinas en cáncer de próstata: Desarrollo de una nanoplataforma híbrida PLGA@órgano-silice con puertas moleculares.

Nombre del congreso: LXXIX Congreso Nacional de Urología

Ciudad de celebración: Adeje, Canarias, España

Fecha de celebración: 11/06/2014

Fecha de finalización: 14/06/2014

B. Plaza Viguer; P. Botella; M. Quesada; V. Vicente; A. Cabrera; K. Fabregat; C. D. Vera Donoso; F. Boronat Tormo

8 Título del trabajo: Controlled Intracellular Release of Camptothecin by Glutathione-Driven Mechanism

Nombre del congreso: II Congreso Internacional de Biotecnología y Biodiversidad (II CIBB 2014)

Ciudad de celebración: Guayaquil, Ecuador

Fecha de celebración: 09/06/2014

Fecha de finalización: 12/06/2014

P. Botella; C. Muniesa; V. Vicente; K. Fabregat; A. Cabrera.

9 Título del trabajo: In Vitro Delivery of Docetaxel to Cancer Cells by Hybrid PLGA@Organosilica Nanoparticles with Redox-Sensitive Molecular Gates

Nombre del congreso: II Congreso Internacional de Biotecnología y Biodiversidad (II CIBB 2014)

Ciudad de celebración: Guayaquil, Ecuador

Fecha de celebración: 09/06/2014

Fecha de finalización: 12/06/2014

P. Botella; M. Quesada; V. Vicente; K. Fabregat; A. Cabrera.

10 Título del trabajo: Delivery of hydrophobic drugs to cancer cells by redox-responsive PLGA@organosilica nanoparticles

Nombre del congreso: BioNanoMed 2014

Ciudad de celebración: Krems, Austria

Fecha de celebración: 26/03/2014

Fecha de finalización: 28/03/2014

P. Botella; M. Quesada; V. Vicente; A. Cabrera; K. Fabregat.

11 Título del trabajo: Novel redox-responsive prodrugs and nanomedicines for glutathione-driven intracellular release of camptothecin

Nombre del congreso: BioNanoMed 2014

Ciudad de celebración: Krems, Austria

Fecha de celebración: 26/03/2014

Fecha de finalización: 28/03/2014

P. Botella; C. Muniesa; V. Vicente; K. Fabregat; A. Cabrera

Proyectos

1) Nombre del proyecto: Desarrollo de una nueva generación de lentes intraoculares multifuncionales

Entidad de realización: Instituto de Tecnología Química

Investigador principal: P. Botella Asunción

Entidad financiadora: Ministerio de Economía y Competitividad

Nombre del programa: Subprograma INNPACTO

Cód. según financiadora: **IPT-2012-0574-300000**

Fecha de inicio-fin: 01/01/2013-31/12/2015 Duración: 3 años

Cuantía total: 1.165.539 €

2) Nombre del proyecto: Nuevas cubiertas biocompatibles y antiinflamatorias para electrodos neurales

Entidad de realización: Instituto de Tecnología Química

Investigador principal: P. Botella Asunción

Entidad financiadora: Ministerio de Economía y Competitividad

Nombre del programa: Subprograma de proyectos de investigación fundamental no orientada

Cód. según financiadora: **MAT2012-39290-C02-02**

Fecha de inicio-fin: 01/01/2013-31/12/2015 Duración: 3 años

Cuantía total: 46.800 €

3) Nombre del proyecto: Control de nanopartículas magnéticas para terapia guiada por imagen

Entidad de realización: CSIC

Investigador principal: J. M. Benlloch Baviera; P. Botella Asunción

Entidad financiadora: Ministerio de Economía y Competitividad

Nombre del programa: Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación Orientada a los retos de la Sociedad

Cód. según financiadora: **TEC2016-80976-R**

Fecha de inicio-fin: 01/01/2017-31/12/2019 Duración: 3 años

Cuantía total: 139.150 €

