

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA



Instituto Interuniversitario de Reconocimiento Molecular y Desarrollo
Tecnológico (IDM) y Departamento de Química Orgánica

DOCTORADO EN QUÍMICA



DESARROLLO DE SISTEMAS MESOPOROSOS MODIFICADOS QUÍMICAMENTE PARA EL TRANSPORTE Y LIBERACIÓN SELECTIVA Y CONTROLADA DE FÁRMACOS

Presentada por:

Daniel Ferri Angulo

Dirigida por:

Margarita Parra Álvarez

Pablo Gaviña Costero

València, Enero 2019



VNIVERSITAT Ò D VALÈNCIA

Margarita Parra Álvarez, Catedrática del Departamento de Química Orgánica de la Universitat de València y Pablo Gaviña Costero, Profesor Titular del Departamento de Química Orgánica de la Universitat de València

CERTIFICAN,

Que el trabajo titulado **“Desarrollo de sistemas mesoporosos modificados químicamente para el transporte y liberación selectiva y controlada de fármacos”** ha sido desarrollado por Daniel Ferri Angulo bajo su dirección en el Instituto Interuniversitario de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) en la Universitat de València, para optar al grado de Doctor en Química y autorizan la presentación de esta Tesis Doctoral para que se cumplan los trámites reglamentarios.

València, Enero 2019.

Margarita Parra Álvarez

Pablo Gaviña Costero

Als meus pares, al meu germà i a Sonia

"There's Plenty of Room at the Bottom"

Richard Feynman

*"Bien podrán los encantadores quitarme la ventura, pero el esfuerzo y
el ánimo será imposible"*

Don Quijote. (Cap. XVII, Parte II)

"Perquè hi haurà un dia que no podrem més i llavors ho podrem tot"

Vicent Andrés i Estellés

Agraïments

Arribats a aquest punt, cal tornar cap enrere i pensar en el camí recorregut. Un llarg camí que va començar per l'any 2011, quan després d'haver tingut al Prof. Pablo Gaviña com professor de Química Orgànica Avançada i del Laboratori de Química Orgànica II li vaig proposar de fer pràctiques voluntàries al seu grup d'investigació. Al cap d'uns dies, el grup dirigit per la Prof. Ana M. Costero e integrat per la Prof. Margarita Parra, el Prof. Salvador Gil i el Prof. Pablo Gaviña m'obrien les portes al camp de la investigació.

Primerament, vull agrair la supervisió i el suport durant tot el temps que ha durat la realització d'aquesta Tesi als meus directors Margarita Parra i Pablo Gaviña. Sense la vostra paciència, idees, consells i saber fer aquesta Tesi no haguera estat possible. Seguidament, vull agrair-li a Ana M. Costero l'oportunitat de desenvolupar la Tesi al seu grup d'investigació, així com per les seues idees i recolzament al llarg d'aquest camí. A més a més, vull donar-li les gràcies a Salvador Gil, pels seus consells i ajuda incondicional i per fer possible els convenis amb les empreses.

En segon lloc, m'agradaria donar les gràcies als meus companys de laboratori. Per la seua estima, amiatat i per fer que anar al laboratori dia rere dia valguera la pena: a la vall d'albaidina incansable, Almudena; a la cristal·lògrafa damali, Kathe; a l'alquimista de Suma, Raül; a la polifacètica PhyPhyPhy, Estefanía; a l'hondurenya xarlatana, Tania i a l'espeleòleg de Massama, Carlos. Tal vegada, algun dia tornem a ser companys de vitrines, reactius i dissolucions. També, donar les gràcies als companys del Lab 4.27 (Andrea, Alberto, Elena i Samuel)

pels moments compartits; i a Carlos Vila, per les converses i discussions a la cervesa dels dijous nit a Benimaclet.

Finalment, i sens dubte, el major agraïment és per a la meua família. Als meus pares, Reme i Eugenio, per estar sempre al meu costat, per ser els millors i per permetre'm arribar fins ací. Al meu germà, Eugeni, per ser simplement genial. Per últim, m'agradaria donar les gràcies a Sonia, per aquests fantàstics anys de recolzament i comprensió, sens dubte has sigut part fonamental en aquesta etapa. Sou el motor de la meua vida, la raó per la qual em sent una persona afortunada de tindre la família que tinc.

Resumen

La presente Tesis Doctoral titulada “Desarrollo de sistemas mesoporosos modificados químicamente para el transporte y liberación selectiva y controlada de fármacos” está centrada en el desarrollo de nuevos sistemas para la detección cromó-fluorogénica de moléculas objetivo, así como en el desarrollo de materiales híbridos orgánicos-inorgánicos para la liberación controlada de fármacos, colorantes y especies fluorescentes, utilizando para ello conceptos de Química Orgánica, Química Supramolecular y de Ciencia de los Materiales.

Tanto el desarrollo de procedimientos analíticos para la detección óptica de plaguicidas organofosforados (OPs) utilizando quimiosensores o quimiodosímetros, como la remediación de OPs utilizando complejos metálicos con aminoalcoholes, son campos de investigación relativamente nuevos y con grandes perspectivas de futuro. Es por ello que, en la primera parte de la Tesis Doctoral se desarrollan, mediante un primer capítulo de Introducción, los conceptos de quimiosensor y quimiodosímetro, se describe el descubrimiento, propiedades y características más relevantes de los plaguicidas organofosforados y, finalmente, se realiza una extensa revisión del estado del arte, recopilando ejemplos publicados de quimiosensores y quimiodosímetros, así como de métodos remediación de estos plaguicidas organofosforados.

En el Capítulo 3 se describe cómo, mediante la utilización de matrices colorimétricas, es posible detectar y discriminar diferentes plaguicidas organofosforados en disoluciones acuosas. La matriz

desarrollada está basada en una placa de sílica gel en la que se inmovilizan cromóforos que presentan grupos reactivos, como alcoholes, aminas o piridinas, capaces de reaccionar con ciertos plaguicidas provocando un cambio de color. Gracias a estos cambios de color se pueden detectar, discriminar y clasificar entre los diferentes plaguicidas utilizando herramientas estadísticas. Por otra parte, en el Capítulo 4, se describe la utilización de aminoalcoholes y sus complejos metálicos con oro como organocatalizadores para la remediación de plaguicidas organofosforados. Concretamente, se ha preparado y estudiado un complejo de oro (III) con un diaminoalcohol, que es capaz de promover la ruptura hidrolítica selectiva del enlace P-S en plaguicidas de la familia de los organotiofosfatos, como son el Azinphos-methyl y Methidathion.

La segunda parte de esta Tesis Doctoral se centra en el desarrollo de nuevos materiales híbridos orgánico-inorgánicos de sílice mesoporosa, tanto micro como nanométricos, para su aplicación en detección, así como en el campo de la liberación dirigida y controlada de fármacos. El Capítulo 5 es una Introducción general sobre los aspectos más relevantes de la nanotecnología y el desarrollo de materiales híbridos orgánicos-inorgánicos, así como sus posibles aplicaciones. En concreto, se describen algunos ejemplos representativos de materiales híbridos, basados en soportes de sílice mesoporosa y sensibles a estímulos externos, como sistemas de detección y de liberación controlada de fármacos/colorantes.

En el Capítulo 7 se describe la síntesis de nuevos nanomateriales híbridos orgánico-inorgánicos de sílice mesoporosa, cargados con distintos colorantes y funcionalizados en su superficie

externa con puertas moleculares, concretamente, con un derivado de trifluorometilcetona y con una cadena poliinsaturada semejante a los ácidos grasos. Por un lado, la trifluorometilcetona, selectiva frente al anión peroxinitrito, permite el control de masa desde el interior de los poros a la disolución o al citoplasma celular. Por otro lado, la cadena poliinsaturada, selectiva frente a radicales hidroxilo, es la responsable de permitir la liberación de la carga al medio de estudio. Finalmente, el Capítulo 8 se centra en el desarrollo de nuevos materiales híbridos orgánicos-inorgánicos micrométricos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales. Estos materiales se hallan funcionalizados en su superficie externa con un azoderivado que actúa como puerta molecular para el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales. Este azoderivado, en presencia de azoreductores, permite la liberación de la carga debido a la hidrólisis del enlace azo ($-N=N-$). Así mismo, se detallan los estudios realizados para el tratamiento de la colitis inducida por TNBS en ratas Wistar.

Resum

La present Tesi Doctoral titulada “Desenvolupament de materials mesoporosos modificats químicament per al transport i alliberació selectiva i controlada de fàrmacs” esta centrada en el desenvolupament de nous sistemes per a la detecció cromofluorogènica de molècules objectiu, així com el desenvolupament de materials híbrids orgànics-inorgànics per a l’alliberació controlada de fàrmacs, colorants i espècies fluorescents, utilitzant els conceptes de Química Orgànica, Química Supramolecular i de Ciència dels Materials.

Tant el desenvolupament de procediments analítics per a la detecció òptica de plaguicides organofosforats (OPs) utilitzant quimiosensors o quimiodosímetres, com la remediació d’OPs utilitzant complexos metàl·lics d’or amb aminoalcohols, son camps d’investigació relativament nous i amb grans perspectives de futur. Es per això que, en la primera part de la Tesi Doctoral es desenvolupen, mitjançant un primer capítol d’Introducció, els conceptes de quimiosensor i quimiodosímetre, es descriu el descobriment, propietats i característiques més rellevants dels plaguicides organofosforats i, finalment, es realitza una extensa revisió de l’estat de l’art, recollint exemples publicats de quimiosensors i quimiodosímetres, així com els mètodes de remediació d’aquests plaguicides organofosforats.

Al Capítol 3 es descriu com, mitjançant la utilització de matrius colorimètriques, es possible detectar i discriminar diferents plaguicides organofosforats en dissolucions aquoses. La matriu desenvolupada esta basada amb una placa de silica gel en la que s’immobilitzen

cromòfors que presenten grups reactius, com alcohols, amines o piridines, capaces de reaccionar amb certs plaguicides provocant canvis de color. Gràcies aquests canvis de color es poden detectar, discriminar i classificar entre els diferents plaguicides organofosforats utilitzant ferramentes estadístiques. Per altra part, al Capítol 4, es descriu la utilització d'aminoalcohols i els seus complexos metàl·lics amb or com organocatalitzadors per a la remediació de plaguicides organofosforats. Concretament, s'ha preparat i estudiat un complex d'or (III) amb un aminoalcohol que es capaç de promoure la ruptura hidrolítica selectiva de l'enllaç P-S en els plaguicides de la família dels organotiofosfats, como son l'Azinphos-methyl i el Methidathion.

La segona part de la Tesi Doctoral es centra en el desenvolupament de nous materials híbrids orgànics-inorgànics de sílica mesoporosa, tant micromètrics com nanomètrics, per a l'aplicació en detecció, així com en el camp de l'alliberació dirigida i controlada de fàrmacs. El Capítol 5 és una Introducció general sobre els aspectes més rellevants de la nanotecnologia i del desenvolupament de materials híbrids orgànics-inorgànics, així com les seues aplicacions. En concret, es descriuen alguns exemples representatius de la utilització de materials híbrids, basats en suports de sílica mesoporosa i sensibles a estímuls externs, com a sistemes de detecció i d'alliberació controlada de fàrmacs/colorants.

En el Capítol 7 es descriu la síntesis de nous nanomaterials híbrids orgànics-inorgànics de sílica mesoporosa, carregats amb diversos colorants i funcionalitzats a la superfície externa amb portes moleculars, concretament, amb un derivat de trifluorometilcetona i amb una cadena poliinsaturada semblant als àcids grassos. Per una

banda, la trifluorometilcetona, selectiva front a l'anió peroxinitrit, permet el control de massa des de l'interior dels porus fins la dissolució aquosa o fins al citoplasma cel·lular. Per altra banda, la cadena poliinsaturada selectiva front als radicals hidroxil, és la responsable de permetre l'alliberació de la càrrega al medi d'estudi. Finalment, el Capítol 8 es centra amb el desenvolupament de nous materials híbrids orgànics-inorgànics micromètrics per al tractament de malalties inflamatòries intestinals. Aquests materials es troben funcionalitzats a la superfície externa amb un azoderivat que actua com a porta molecular i que utilitzarem per al tractament de malalties inflamatòries intestinals. Aquest azoderivat, en presència d'azoreductors, permet l'alliberació de la càrrega degut a la hidròlisis de l'enllaç azo (-N=N-). Així mateix, es reporten els estudis realitzats per al tractament de la colitis induïda pel TNBS en rates Wistar.

Abstract

The present PhD Thesis entitled "Development of chemically modified mesoporous systems for selective and controlled drug delivery" is focused on the development of new chromo-fluorogenic systems for detection of target molecules, as well as the development of hybrid organic-inorganic materials for drug, dyes and fluorescent species controlled release, based using for this concepts of Organic Chemistry, Supramolecular Chemistry and Materials Science.

Both the development of analytical procedures for the optical detection of organophosphorus pesticides (OPs) using chemosensors or chemodosimeters, and the remediation of OPs using metal complexes with aminoalcohols, are relatively new fields of research with great future prospects. That is why, in the first part of this Thesis are detailed through an Introduction Chapter, the definitions that explain the different parts that make up the chemosensors and chemodosimeters, the discovery, the properties and the most relevant characteristics of organophosphorus pesticides. Finally, an extensive review of the state of the art, compiling published examples of chemosensors and chemodosimeters, as well as of methods for remediation of these organophosphorus pesticides are presented.

In Chapter 3 is described how by means of the use of colorimetric array it is possible to detect and discriminate different organophosphorus pesticides in aqueous solutions. The developed array consists of a silica gel plate covered with different chromophores having reactive groups, such as alcohols, amines or pyridines, able to react with certain pesticides causing a change in colour. These colour

changes allow the detected, discrimination and classification of different pesticides using statistical tools. On the other hand, the Chapter 4 focuses on the use of aminoalcohols and their gold complexes for the remediation of organophosphorus pesticides. Specifically, a diaminoalcohol gold (III) complex has been prepared and studied with is capable of the selective promoting hydrolytic rupture of the P-S bond in pesticides of the family of organothiophosphates, such as Azinphosmethyl and Methidathion.

The second part of this Thesis focuses on the development of new mesoporous silica organic-inorganic hybrid materials, both micro and nanometric sized, for their application in detection, as well as in drug controlled administration. Chapter 5 is a general Introduction of the most relevant aspects of nanotechnology and the development of organic-inorganic hybrid materials, as well as their possible applications. In particular, some representatives examples of hybrid materials are described, based on mesoporous silica supports, sensitive to external stimuli such as detection systems and drug/dyes controlled release.

In Chapter 7 is described the synthesis of new organic-inorganic hybrid nanomaterials, loaded with different dyes and functionalized on their external surface with molecular gates, specifically with a trifluoromethyl ketone derivative and with polyunsaturated chain similar to that of fatty acids. On the one hand, the trifluoromethyl ketone, selective in front of peroxy nitrite anion, allows the load control of the load from the interior of the pores to the solution or to the cellular cytoplasm. On the other hand, the polyunsaturated chain, selective to hydroxyl radicals, is responsible for

allowing the release of the load to the medium. Finally, Chapter 8 focuses on the development of new organic-inorganic hybrid micromaterials, functionalized on their external surface with an azo-derivative that acts as a molecular gatekeeper for the treatment of inflammatory bowel diseases. This azo-derivative, in the presence of azoreductors allows the liberation of the load, due to the hydrolysis of azo bond (-N=N-). In addition, the studies carried out for the treatment of TNBS-induced colitis in Wistar rats are detailed.

Publicaciones.

Las siguientes publicaciones y contribuciones son fruto del trabajo de investigación relacionado con esta Tesis Doctoral:

Daniel Ferri; Pablo Gaviña; Ana M. Costero; Margarita Parra; José-L. Vivancos; Ramón Martínez-Máñez. Detection and discrimination of organophosphorus pesticides in water by using a colorimetric probe array. *Sens. Actuators B. Chem.*, **2014**, *202*, 727.

-

D. Ferri; A. Barba-Bon; A. M. Costero; P. Gaviña; M. Parra; S. Gil. An Au(III)-amino alcohol complex for degradation of organophosphorus pesticides. *RSC Advances*, **2015**, *5*, 106941.

-

Adrián H. Teruel; Carmen Coll; Ana María Costero; Daniel Ferri; Margarita Parra; Pablo Gaviña; Marta González-Álvarez; Virginia Merino; M. Dolores Marcos, Ramón Martínez-Máñez; Félix Sancenón. Functional mesoporous silica materials containing magnetic microparticles capped with an azo-derivative: A promising colon drug delivery device. *Molecules*, **2018**, *23*, 375.

-

Adrián H. Teruel; Édgar Pérez-Esteve; Carmen Coll; Isabel González-Álvarez; Marta González-Álvarez; Ana M Costero; Daniel Ferri; Margarita Parra; Pablo Gaviña; Virginia Merino; Ramón Martínez-Máñez; Félix Sancenón. Smart gated magnetic silica mesoporous particles for targeted colon drug delivery: new approaches for inflammatory bowel diseases treatment. *J. Control. Release*, **2018**, *281*, 58.

-

Daniel Ferri; Pablo Gaviña; Margarita Parra; Ana Costero; Jamal El Haskouri; Pedro Amorós; Virginia Merino; Adrián H. Teruel; Félix Sancenón; Ramón Martínez-Máñez. Silica mesoporous microparticles capped with an azo derivative for the controlled and targeted release of dyes/drugs in colon. *R. Soc. open sci.*, **2018**, *5*, 180873.

Daniel Ferri; Pablo Gaviña; Margarita Parra; Ana Costero; Virginia Merino; Ramón Martínez-Mañez; Félix Sancenón; Adrián Teruel. Efficacy of Budesonide loaded mesoporous silica microparticles capped with azo-containing molecular gates in rats with TNBS-induced colitis model. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **Submitted.**

-

Adrián H. Teruel; Édgar Pérez-Esteve; Isabel González-Álvarez; Marta González-Álvarez; Ana M Costero; Daniel Ferri; Pablo Gaviña; Virginia Merino; Ramón Martínez-Mañez; Félix Sancenón. Double drug delivery with capped mesoporous silica particles for the effective treatment of Inflammatory Bowel Disease. *J. Control. Release.* **Submitted.**

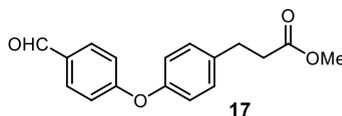
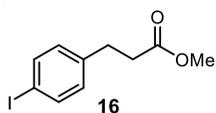
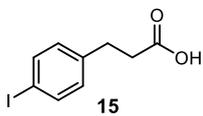
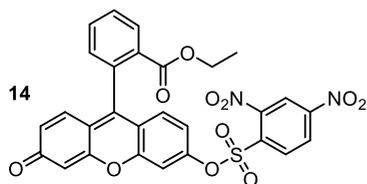
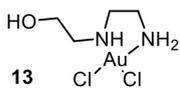
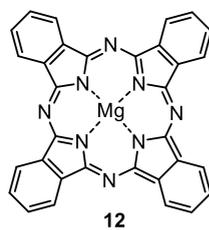
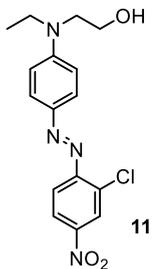
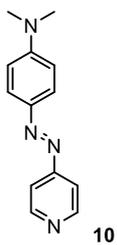
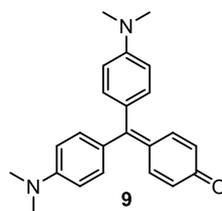
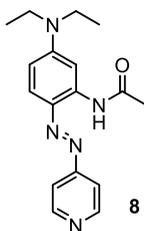
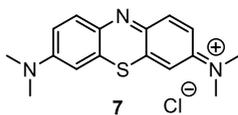
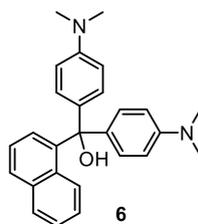
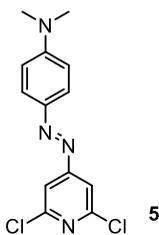
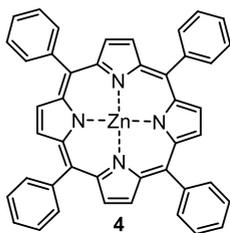
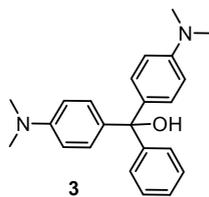
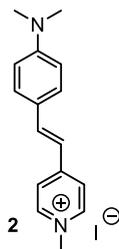
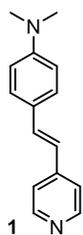
Abreviaturas

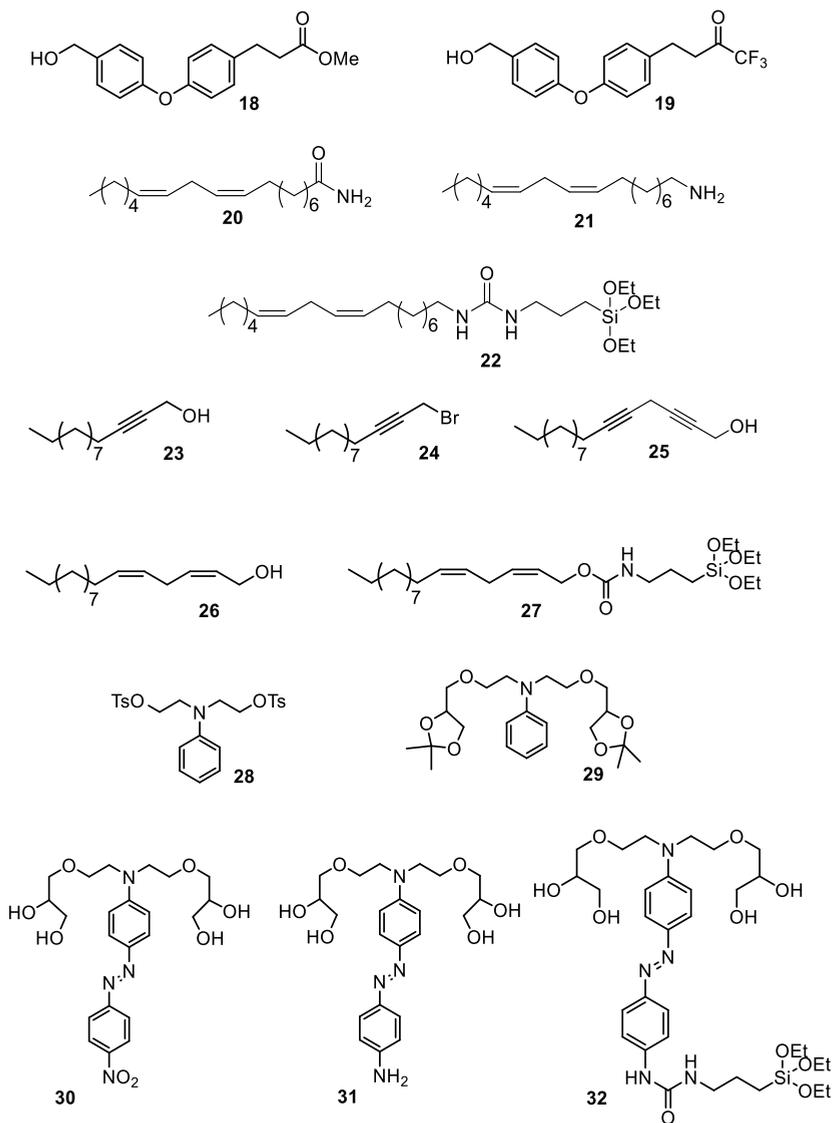
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
4-HNE	4-hidroxinonenal
5-ASA	Ácido 5-aminosalicílico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFM	Microscopio de fuerza atómica
ATP	Adenosina trifosfato
BET	Brunauer-Emmet-Teller
BJH	Barret-Joyner-Halenda
BODIPY	Borodipirrometeno
CAC	Comision Codex Alimentarius
CCPR	Codex Committe on Pesticides Residues
CD	Enfermedad de Crohn
CL ₅₀	Concentración letal media, mg/L
CT	Transferencia de carga
CTABr	Bromuro de cetiltrimetilamonio
d	Doblete
DCM	Diclorometano
DCNP	Dietilcianofosfato
dd	Doble doblete
DDT	1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano
DL ₅₀	Dosis letal media, mg/Kg
DLS	Dispersión dinámica de luz
DMAP	4-dimetilamino-piridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EA	Electrón aceptor
ED	Electrón dador
EDXA	Análisis por rayos X de energía dispersiva
EII	Enfermedades inflamatorias intestinales
ESI	Espectrometría de masas
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
Fmoc	Fluorenilmetoxicarbonilo
FTIR	Espectroscopia infrarroja-transformada de Fourier
GPX	Glutación peroxidasa
HCA	Análisis de conglomerados jerárquico
HMPA	Hexametilfosforamida
HOMO	Orbital molecular ocupado de mayor energía
HPCE	3'-Amino-6'-hidroxifluorano
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
INF-γ	Interferón γ

iNOS	Enzima óxido nítrico sintasa
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
JMPR	Joint Meeting on Pesticides Residues
LA	Ácido linoleico
LCT	Plantilla de cristal líquido
LPS	Lipopolisacáridos
LUMO	Orbital molecular no ocupado de más baja energía
m	Multiplete
MCM	Mobil Crystalline Material
MRL	Límite máximo de residuos
MTT	Sal de tetrazolio
O	Set de calibración
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPs	Plaguicidas organofosforados
PBS	Tampón fosfato
PC	Componente principal
PCA	Análisis de componentes principales
PLS	Modelo parcial de regresión de mínimos cuadrados
PMOs	Organosílicas periódicas mesoporosas
PUFA's	Ácidos grasos poliinsaturados
PXDR	Difracción de rayos X de polvo
QD	Puntos cuánticos
r.t	Temperatura ambiente
RGB	Rojo, Verde y Azul
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
s	Singlete
sat	Saturado
SBA	Santa Barbara Amorphous
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SEM/EDX	Microscopía de rayos X de energía dispersiva
SOD	Enzima superóxido dismutasa
STM	Microscopio de efecto túnel
SZ	Sulfasalazina
t	Triplete/tiempo
TBAOH	Hidróxido de tetrabutilamonio
TEA	Trietanolamina
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TEOS	Tetraetilortosilicato
TGA	Análisis termogravimétrico
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Thin Layer Chromatography

TMOS	Tetrametilortosilicato
TMS-CF ₃	Trifluorometiltrimetilsilano
TNBS	Ácido trinitrobenceno-sulfónico
TPA	Activador plasminógeno de tipo tisular
TPs	Productos de transformación
TRIS	Tampón tris(hidroximetil)aminometano
UC	Colitis ulcerosa
UV-vis	Ultravioleta-visible
VOCs	Compuestos Orgánicos Volátiles
δ	Desplazamiento químico
Δ	Set de validación
Φ	Rendimiento cuántico

Índice de figuras





Índice

Parte 1. Detección y remediación de plaguicidas organofosforados.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
1.1. Sensores moleculares: quimiosensores y quimiodosímetros ópticos.....	5
1.2. Plaguicidas. Detección y remediación.....	12
1.2.1. Plaguicidas organofosforados.....	14
1.2.2. Métodos de detección de plaguicidas organofosforados.....	16
1.2.3. Métodos de remediación de plaguicidas organofosforados.....	19
2. OBJETIVOS.....	23
3. MATRIZ DE SENSORES COLORIMÉTRICOS PARA LA DETECCIÓN Y DISCRIMINACIÓN DE PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS.....	27
3.1. Resultados y discusión.....	30
3.1.1. Mecanismo de reconocimiento de los quimiosensores frente a plaguicidas organofosforados.....	31
➤ Cromóforos “push-pull” basados en colorantes azoicos o derivados de estilbena.....	31
➤ Colorantes derivados de triarilmetanol.....	34
➤ Metaloporfirinas y Ftalocianinas.....	36
3.1.2. Síntesis de los colorantes.....	37
3.1.3. Preparación de un array colorimétrico y ensayos de detección y discriminación de plaguicidas.....	40
3.1.4. Estudios de cuantificación y de interferentes.....	45
3.1.5. Aplicación de la matriz colorimétrica sobre una muestra real.....	47

3.2. Conclusiones.....	49
3.3. Parte experimental.....	50
3.3.1. Síntesis de los sensores cromogénicos.....	50
3.3.2. Experimentos de detección con el array cromogénico y análisis estadístico.....	56
4. REMEDIACIÓN DE PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS MEDIANTE EL EMPLEO DE DIAMINOALCOHOLES Y Au(III).....	65
4.1. Resultados y discusión.....	67
4.1.1. Estudios de remediación de plaguicidas organofosforados empleando aminoalcoholes.....	67
4.1.2. Estudios de remediación de plaguicidas organofosforados empleando un complejo de Au(III) con 2-(2-aminoetilamino)-etanol.....	73
➤ Síntesis del complejo Au(III).....	73
➤ Estudios de remediación.....	74
❖ Ensayos de remediación de Azinphos-methyl.....	74
❖ Ensayos de remediación de Methidathion.....	76
4.2. Conclusiones.....	86
4.3. Parte experimental.....	86
4.3.1. Síntesis del complejo de Au(III).....	86
4.3.2. Síntesis del éster etílico de 2,4-dinitrobencenosulfonil fluoresceína.....	89
4.3.3. Hidrólisis de los plaguicidas organotiofosfatos.....	90
4.3.4. Estudios de fluorescencia.....	96
CONCLUSIONES PARTE 1.....	97

Parte 2. *Sistemas mesoporosos modificados para el transporte y liberación controlada de fármacos, colorantes y especies fluorescentes.*

5.	INTRODUCCIÓN GENERAL.....	103
5.1.	Nanomateriales y nanotecnología.....	105
5.2.	Materiales híbridos orgánico-inorgánicos.....	107
5.3.	Sílice mesoporosa como soporte inorgánico.....	108
5.3.1.	Síntesis de materiales de sílice mesoporosa.....	111
5.3.2.	Funcionalización de materiales de sílice mesoporosa.....	115
➤	Método de “grafting” o post-síntesis.....	115
➤	Método de co-condensación o síntesis directa.....	117
➤	Método de organosílicas periódicas mesoporosas.....	118
5.3.3.	Caracterización de materiales de sílice mesoporosa.....	119
5.4.	Aplicaciones de los materiales híbridos orgánico- inorgánicos. Puertas Moleculares.....	125
➤	Partículas de sílice mesoporosa con puertas moleculares como sensores.....	130
➤	Partículas de sílice mesoporosa con puertas moleculares para la liberación controlada de fármacos.....	136
6.	OBJETIVOS.....	145
7.	NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE MESOPOROSA CON PUERTAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO EN CÉLULAS.....	149
7.1.	Introducción. Estrés oxidativo.....	151

7.2. Sistemas mesoporosos con puertas que incorporan un derivado de trifluorometilcetona para la detección de peroxinitrito (ONOO ⁻).....	162
7.2.1. Resultados y discusión.....	163
➤ Síntesis de los materiales.....	165
➤ Caracterización de los materiales.....	168
➤ Estudios de liberación del colorante en presencia de ONOO ⁻	172
➤ Estudios preliminares en células.....	176
7.3. Sistemas mesoporosos con puertas basadas en derivados de ácidos grasos esenciales para la detección de radicales hidroxilos (•OH).....	179
7.3.1. Resultados y discusión.....	180
➤ Síntesis del material M-LA.....	180
➤ Caracterización del material M-LA.....	182
➤ Estudios de liberación de M-LA en presencia de un oxidante.....	185
➤ Estudios de liberación <i>in vitro</i> de M-LA.....	187
➤ Síntesis del material M-Ru(bpy) ₃	188
➤ Caracterización del material M-Ru(bpy) ₃	191
➤ Estudios de liberación de M-Ru(bpy) ₃	195
➤ Estudios de liberación <i>in vitro</i> de M-Ru(bpy) ₃	196
7.4. Conclusiones.....	198
7.5. Parte experimental.....	200
7.5.1. Reactivos químicos.....	200
7.5.2. Técnicas generales.....	201
7.5.3. Síntesis de las puertas moleculares.....	202
7.5.4. Síntesis de los materiales.....	213
7.5.5. Caracterización de los materiales.....	215
7.5.6. Síntesis del ONOO ⁻	217
7.5.7. Estudios de liberación con M-Sulf.....	218

7.5.8. Ozonólisis del ácido linoleico (LA).....	219
7.5.9. Estudios de liberación con M-LA.....	220
7.5.10. Estudios de liberación con M-Ru(bpy) ₃	220
7.5.11. Estudios de liberación <i>in vitro</i>	220

8. MICROPARTÍCULAS DE SÍLICE MESOPOROSA PARA LIBERACIÓN CONTROLADA EN LA MUCOSA COLÓNICA.....225

8.1. Introducción. Enfermedades inflamatorias intestinales.....	227
8.2. Micropartículas de sílice mesoporosa funcionalizadas con un azoderivado para la liberación controlada de colorantes/ fármacos. Síntesis y estudios de liberación <i>in vitro</i>	233
8.2.1. Diseño de los materiales.....	233
8.2.2. Síntesis de los materiales.....	235
8.2.3. Caracterización de los materiales.....	238
8.2.4. Estudios de liberación del colorante.....	243
8.3. Micropartículas de sílice mesoporosa funcionalizadas con un azoderivado para la liberación controlada de colorantes/ fármacos. Estudios de liberación <i>in vivo</i>	248
8.3.1. Inducción de la inflamación colónica en ratas Wistar y protocolo seguido para el estudio.....	252
8.3.2. Evaluación de la eficacia de las micropartículas M-Bud en el tratamiento de la colitis inducida por TNBS.....	254
8.4. Conclusiones.....	260
8.5. Parte experimental.....	262
8.5.1. Reactivos químicos.....	262
8.5.2. Técnicas generales.....	263
8.5.3. Síntesis de la puerta molecular.....	264
8.5.4. Síntesis de los materiales.....	269

Índice

8.5.5.	Caracterización de los materiales.....	272
8.5.6.	Estudios de liberación.....	274
8.5.7.	Estudios de liberación <i>in vivo</i>	278
8.5.8.	Evaluación de la inflamación y de la lesión producida en el colon.....	279
CONCLUSIONES PARTE 2.....		283
APÉNDICE.....		289

Parte 1. *Detección y remediación de
plaguicidas organofosforados*

1. Introducción general

1.1. SENSORES MOLECULARES: quimiosensores y quimiodosímetros ópticos.

El auge de la Química Supramolecular surgió a raíz de la concesión del Premio Nobel de Química en 1987, otorgado a Donald J. Cram, Jean-Marie Lehn y Charles J. Pedersen en reconocimiento a sus investigaciones en esta área.¹ La química supramolecular se puede definir como la parte de la química que estudia cómo las moléculas interactúan entre ellas, mediante enlaces no covalentes, para dar estructuras más complejas con propiedades distintas a las de las moléculas individuales; es decir, estudia la formación, estructura y propiedades de estas entidades químicas formadas por la asociación de dos o más moléculas, que se unen por enlaces no covalentes.

Una de las aplicaciones más relevantes de la química supramolecular es el diseño, síntesis y evaluación de sensores moleculares (quimiosensores) y sondas moleculares o dosímetros (quimiodosímetros).

Los quimiosensores se pueden definir como aquellas moléculas o agregaciones supramoleculares capaces de reconocer la presencia de un analito de forma selectiva y reversible (de forma irreversible en el caso de un quimiodosímetro) provocando un cambio simultáneo de una o más propiedades físicas observables del sistema. Este cambio es el que indica que se ha producido la interacción receptor-analito. En el caso de sensores moleculares ópticos, cuando se producen cambios en el color, hablaremos de sondas cromogénicas. Estas sondas en muchos

¹ a) C. J. Pedersen, *Angew. Chem.*, **1988**, *100*, 1053. b) D. J. Cram, *Angew. Chem.*, **1988**, *100*, 1041. c) J. M. Lehn, *Angew. Chem.*, **1988**, *100*, 91.

casos están basadas en moléculas orgánicas altamente conjugadas con subunidades electrón-dadoras o electrón-aceptoras. La presencia de ambas en una misma molécula induce la aparición de bandas de transferencia de carga (CT) en la zona visible del espectro electromagnético. Estos sistemas se conocen como “push-pull” y son especialmente atractivos, ya que la presencia del analito induce cambios en la banda CT que pueden apreciarse a simple vista. Si los cambios observados son en la intensidad de emisión de fluorescencia, hablaremos de sondas fluorogénicas.² La fluorescencia presenta como ventaja su gran sensibilidad, lo que permite trabajar a concentraciones muy bajas de analito. En ambos casos, la definición de quimiosensor engloba dos conceptos: el de reconocimiento y el de señalización de que ese reconocimiento se ha producido. Por tanto, este tipo de moléculas estarán compuestas por dos subunidades: una subunidad de reconocimiento y otra de señalización, capaz de convertir el fenómeno del reconocimiento en una señal física observable y cuantificable (Figura 1.1).

- **Unidad de reconocimiento o receptora:** es la parte del sensor molecular que va a interactuar con el analito de forma selectiva.
- **Unidad señalizadora o indicadora:** es la encargada de transformar el proceso microscópico de coordinación del analito en una señal macroscópica observable. Por lo general, las señales suelen ser cambios en las propiedades redox, cromogénicas o fluorescentes del sensor molecular.

² a) R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, *Chem. Rev.* **2003**, 103, 4419. b) M. Moragues, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón., *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 2593.

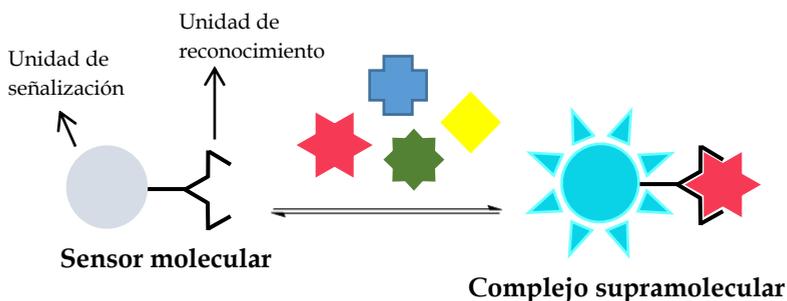


Figura 1.1 Representación esquemática de reconocimiento y detección para un sensor molecular. La interacción selectiva microscópica del analito con la subunidad receptora se pone de manifiesto en el mundo macroscópico a través de un cambio en una variable físico-química generado por la subunidad señalizadora.

En el diseño de los quimiosensores moleculares podemos encontrarnos con diferentes situaciones estructurales:

- La unidad de reconocimiento y la unidad de señalización se encuentran covalentemente unidas. El analito se coordina al centro de reconocimiento de forma irreversible, provocando un cambio en las propiedades físico-químicas de la unidad de señalización (Figura 1.2).³

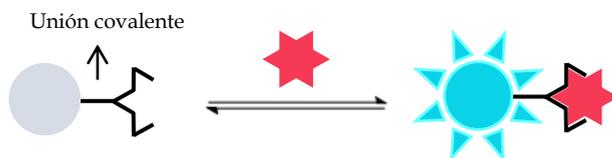


Figura 1.2 La interacción selectiva microscópica del analito con la subunidad receptora se pone de manifiesto en el mundo macroscópico a través de un cambio en una variable físico-química generado por la subunidad señalizadora, covalentemente unida a la primera.

³ a) J. J. Lavigne, E. V. Anslyn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3118. b) T. Gunnlaugsson, H. D. P. Ali, M. Glynn, P. E. Kruger, G. M. Hussey, F. M. Pfeffer, C. M. G. Dos Santos, J. Tierney, *J. Fluoresc.*, **2005**, *15*, 287. c) T. Gunnlaugsson, M. Glynn, G. M. Tocci, P. E. Kruger, F. M. Pfeffer, *Coord. Chem. Rev.*, **2006**, *250*, 3094. d) V. Amendola, D. Esteban-Gómez, L. Fabbrizzi, M. Lichelli, *Acc. Chem. Res.*, **2006**, *39*, 343.

Un ejemplo representativo de este tipo de sensores moleculares es el sintetizado por A. Tárraga y P. Molina, en el que la unidad de ferroceno se encuentra covalentemente unida a un anillo de benzimidazol fusionado a otro anillo, de tipo tiadiazol (I).⁴ En este ejemplo, los dos átomos de nitrógeno en posición relativa 1,4 forman una cavidad adecuada para la interacción reversible de determinados iones metálicos, provocando un cambio en las propiedades redox del ferroceno (II) (Figura 1.3).

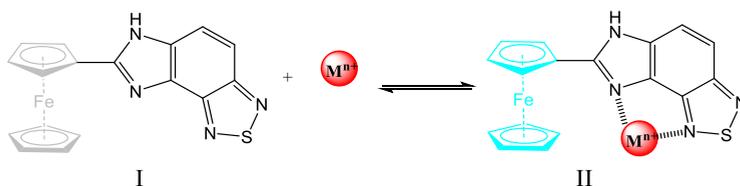


Figura 1.3. Quimiosensor molecular redox para determinados iones metálicos.⁴

○ La unidad de reconocimiento y la unidad de señalización forman un complejo supramolecular, de manera que la interacción con el analito lleve consigo el desplazamiento simultáneo de la unidad de señalización alojada en el centro de reconocimiento, provocando un cambio observable en sus propiedades físicas (Figura 1.4).⁵

⁴ M. Alfonso, A. Sola, A. Caballero, A. Tárraga, P. Molina., *Dalton Trans.*, **2009**, 9653.

⁵ a) S.L. Wiskur, H. Ait-Haddou, J.J. Lavagne, E. V. Anslyn, *Acc. Chem. Res.*, **2001**, 34, 963.

b) B. T. Nguyen, E. V. Anslyn, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, 250, 3118.

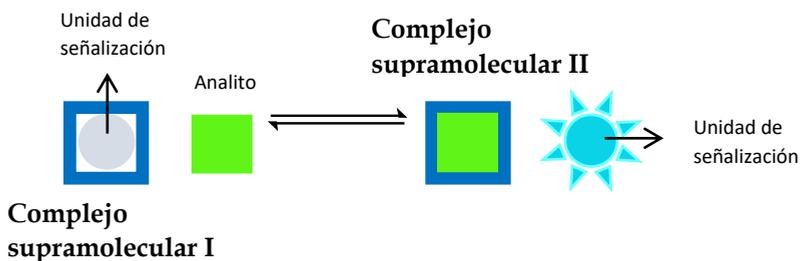


Figura 1.4 Ejemplo representativo del mecanismo de desplazamiento de la unidad de señalización en los procesos de reconocimiento.

Para que se produzca la señalización es necesario que el analito posea una mayor afinidad por la unidad receptora que la unidad señalizadora, y que las propiedades físicas de la unidad señalizadora complejada y libre sean claramente distintas. Esta situación queda perfectamente explicada con el complejo calix[4]pirrol-4-nitrofenolato sintetizado por P. A. Gale y J. L. Sessler. El complejo supramolecular de partida es incoloro (Figura 1.5),⁶ mientras que en presencia del ion fluoruro, éste desplaza el ion 4-nitrofenolato a la disolución, dando lugar a una fuerte coloración amarilla. Este cambio de coloración indica que el proceso de reconocimiento de iones fluoruro se ha producido.

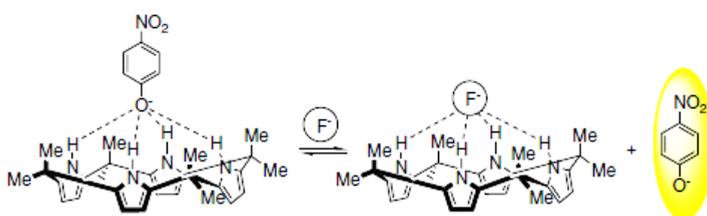


Figura 1.5. Quimiosensor molecular por desplazamiento para iones fluoruro.⁶

o Una tercera situación con la que nos podemos encontrar es que, tras la adición de un analito, se produzca una reacción química irreversible con el receptor, dando lugar a una molécula

⁶ P. A. Gale, L. J. Twyman, C. I. Handlin, J. L. Sessler., *Chem. Commun.* **1999**, 1851.

distinta, con propiedades físicas y químicas distintas (Figura 1.6). En este caso no es correcto hablar de quimiosensor molecular, puesto que el reconocimiento en los quimiosensores moleculares debe ser un proceso absolutamente reversible, sino que hablamos de quimiodosímetro óptico.⁷

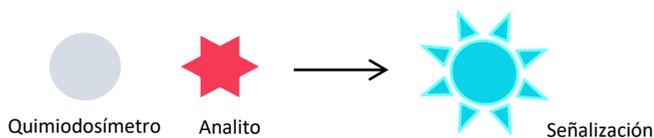


Figura 1.6. Esquema de mecanismo a través del que operan los quimiodosímetros en los procesos de reconocimiento y señalización.

Un ejemplo ilustrativo de este tipo de quimiosensores son los desarrollados en nuestro grupo de investigación para la detección de simulantes de agentes nerviosos (Figura 1.7).⁸ En este caso, la estrategia de reconocimiento se basa en una reacción de fosforilación del nitrógeno de la piridina del quimiodosímetro (III) provocando un cambio en sus propiedades espectroscópicas, pasando de un color naranja, antes de la fosforilación, a una coloración rosada una vez producida la reacción (IV).

⁷ a) D. T. Luang, J. S. Kim, *Chem. Rev.* **2010**, 110, 6280. b) Z. Yu, X. Chen, H. N. Kim, J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 127.

⁸ a) S. Royo, A. M. Costero, M. Parra, S. Gil, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón., *Chem. Eur. J.*, **2011**, 17, 6931. b) R. Gotor, S. Royo, A. M. Costero, M. Parra, S. Gil, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón., *Tetrahedron*, **2012**, 68, 8612. c) S. Royo, R. Gotor, A. M. Costero, M. Parra, S. Gil, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón., *New J. Chem.*, **2012**, 38, 1485. d) A. M. Costero, M. Parra, S. Gil, R. Gotor, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, S. Royo., *Eur. J. Org. Chem.*, **2012**, 4937.

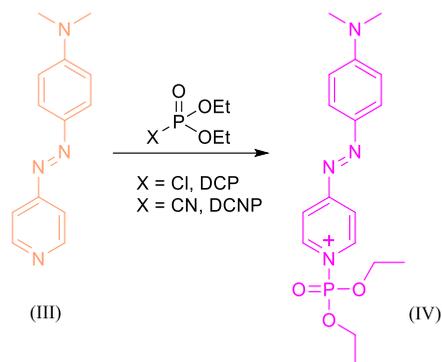


Figura 1.7. Reacción de fosforilación del quimiosímetro con simulantes de agentes nerviosos.⁸

Algunas de las ventajas más relevantes de los quimiosensores o quimiosíntesis ópticos frente a otros métodos de detección son:

- Permiten una detección rápida y a simple vista.
- Requieren una instrumentación sencilla, asequible y económica.
- Necesitan poca cantidad de muestra.
- Las medidas son llevadas a cabo en tiempo real.

Al estar basados en reacciones químicas irreversibles, los quimiosíntesis sólo pueden ser usados para una única determinación, aquí radica su principal desventaja. Sin embargo, si el analito en cuestión posee propiedades peligrosas, como puede ser una elevada toxicidad, lo que en principio era una desventaja, se puede convertir en una ventaja.

El número de quimiosensores cromogénicos o fluorogénicos para cationes y aniones es muy amplio,⁹ pero no lo es tanto el de

⁹ a) F. P. Schmitdchen, M. Berger, *Chem. Rev.*, **1997**, 97, 1609. b) P. D. Beer, P. A. Gale, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 486. c) R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, *Coord. Chem. Rev.*, **2006**, 250, 3081.

sensores moleculares ópticos de especies neutras. Sin embargo, en la naturaleza encontramos numerosas moléculas neutras con una gran relevancia en los procesos biológicos y medioambientales, por ello el diseño específico de estos sensores es un campo de gran interés. Además, existe una gran variedad de productos tóxicos y contaminantes de origen antropogénico o natural, como son los plaguicidas, cuya detección es muy importante.

1.2. PLAGUICIDAS.

Según la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) un plaguicida o pesticida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias con ingredientes químicos o biológicos destinados a repeler, destruir o controlar cualquier plaga, o a regular el crecimiento de las plantas. Los primeros compuestos orgánicos usados como plaguicidas fueron generalmente sustancias o mezclas de sustancias derivadas de extractos de tejidos vegetales. Entre estos extractos estaban los piretroides, los rotenoides y los nicotinoides, que todavía se utilizan y se obtienen en gran medida a partir de dichos extractos vegetales.

Aunque ya se conocían algunas sustancias químicas sintéticas usadas como plaguicidas, la gran revolución llegó con el inicio de la Segunda Guerra Mundial. Los descubrimientos más importantes fueron el DDT (Müller-1939), el 2,4-D (Jones-1945), el Lindano (Teunis van der Linden-1943), y los ésteres de fosfatos orgánicos (Schröder en

los años 30).¹⁰ Estos nuevos compuestos químicos eran más potentes que sus predecesores en cuanto a su actividad biológica, y desplazaron a casi todas las sustancias empleadas hasta el momento. Los derivados químicos actuales, descubiertos en su mayor parte en las décadas de los años 50 y 60 del siglo XX, son mayoritariamente evoluciones de estos compuestos.

Los plaguicidas se clasifican en función de algunas de sus características principales, como son la toxicidad aguda, la vida media, la estructura química o su uso.¹¹ En 1978, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció una clasificación basada en su peligrosidad o grado de toxicidad aguda, definida ésta como la capacidad del plaguicida de producir un daño agudo a la salud a través de una o múltiples exposiciones, en un período de tiempo relativamente corto. La toxicidad se mide a través de la dosis letal media (DL₅₀)[#] o de la concentración letal media (CL₅₀). Es importante señalar que estos indicadores no proporcionan información sobre los efectos crónicos, ni sobre la posible citotoxicidad de los compuestos.

De acuerdo a su estructura química, los plaguicidas se clasifican en diversas familias como podemos observar en la Tabla 1.1.

¹⁰ a) J. Beard., *Science of the Total Environment* 355, **2006**, 78–89. b) *Weed Science*, **2001**, 49, 290.

¹¹ M. Gil, A. Soto, J. Usma, O. Gutiérrez., *Producción + limpia*. **2012**, Vol. 7, No.2, 52.

[#] DL₅₀ es la estimación estadística de la cantidad de una sustancia tóxica por peso corporal (mg/Kg), necesaria para matar al 50% animales de experimentación (usualmente ratas de laboratorio) en los que se ensaya el efecto letal de la sustancia, administrándola por vía oral o dérmica, durante un período de tiempo determinado y seguimiento en un período postexposición. Cuando la exposición a la sustancia tóxica es a través del aire o el agua se le llama CL₅₀ y se expresa en mg/L.

Tabla 1.1. Clasificación de los plaguicidas, según su naturaleza química.¹²

<i>Familia Química</i>	<i>Ejemplos</i>
<i>Organoclorados</i>	<i>DDT, Aldrín, Endosulfán, Endrín</i>
<i>Organofosforados</i>	<i>Parathion, Diclorvos, Malathion</i>
<i>Carbamatos</i>	<i>Carbaryl, Methomyl, Propoxur</i>
<i>Tiocarbamatos</i>	<i>Ditiocarbamato, Mancozeb, Maneb</i>
<i>Piretroides</i>	<i>Cypermethrin, Fenvalerato, Permethrin</i>
<i>Derivados biperidilos</i>	<i>Clorfenatol, Diquat, Paraquat</i>
<i>Derivados de triazinas</i>	<i>Atrazina, Ametryn, Desmetryn, Simazine</i>
<i>Compuestos orgánicos de estaño</i>	<i>Cyhexatin, Dowco, Plictrán</i>
<i>Compuestos inorgánicos</i>	<i>Fosfito de magnesio, Cloruro de mercurio, Arseniato de plomo, Bromuro de metilo, Antimonio, Mercurio, Selenio y Fósforo</i>
<i>Compuestos de origen botánico</i>	<i>Rotenona, nicotina, aceite de canola</i>

1.2.1. Plaguicidas organofosforados.

Los plaguicidas organofosforados (organophosphorus pesticides, OPs), constituyen hoy en día, la clase de plaguicidas más ampliamente utilizada. Se emplean, en la agricultura, para proteger las plantas de enfermedades y de los insectos, en los huertos familiares y también en veterinaria. Los OPs son considerados más seguros que sus antecesores, los plaguicidas organoclorados, debido a que sufren degradación más rápida a través de procesos microbianos o ambientales.¹³ Químicamente, los OPs se pueden clasificar en tres grupos principales, como son, los organofosfatos, que contienen un

¹² F. P. García, S. Y. Cortés-Ascedio, J. C. Gaytán-Oyarzun, A. Ceruelo-Hernandez, P. Vazquez-Alavardo, *J. Res. Environ. Sci. Toxicol.*, **2012**, 1(11), 279.

¹³ a) C. Aprea, C. Colosio, T. Mammone, C. Minoia, M. Maroni, *Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **2002**, 769, 191. b) L. L. Van Eerd, R. E. Hoagland, R. M. Zablotowicz, J. C. Hall, *Weed Sci.*, **2003**, 5, 472. c) S. Malato, P. Fernández-Ibáñez, M. I. Maldonado, J. Blanco, W. Gernjak, *Catal. Today*. **2009**, 147, 1.

enlace P=O (oxones), los organotiofosfatos, en el que el oxígeno ha sido sustituido por un átomo de azufre, (P=S, los tiones), y los organofosfonatos (con enlace P-C) que están estrechamente relacionados con los agentes nerviosos como el sarín, somán o tabún (Figura 1.8).

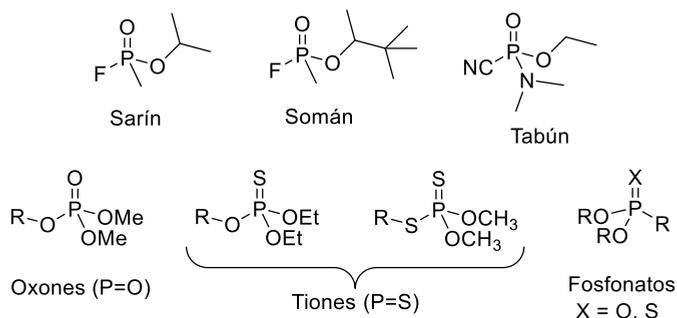


Figura 1.8. Derivados organofosforados estudiados en esta tesis y los agentes nerviosos Sarín, Somán y Tabún.

Los OPs no sólo son altamente tóxicos para los insectos, sino también para los seres humanos. De hecho, son una de las causas más comunes de la intoxicación de los seres humanos en todo el mundo, intoxicaciones que pueden tener lugar por inhalación, ingestión o por absorción a través de la piel.¹⁴ Las intoxicaciones por plaguicidas suponen aproximadamente el 3,5 - 4% de todas las intoxicaciones, y de ellas el 55 - 57% afectan a niños menores de 6 años.¹⁵ La toxicidad de los OPs hacia insectos y mamíferos se debe a su inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por fosforilación de un resto de serina en el centro activo del enzima (Figura 1.9). Esto da como resultado una

¹⁴ a) Y. Wang, P. Kruzik, A. Helsberg, I. Helsberg, W. D. Rausch., *Forensic Science International*, **2007**, 169, 157. b) B. Walker Jr, J. Nidiry, *Inhal. Toxicol.* **2002**, 14, 975. c) P. I. Beamer, R. A. Canales, A. C. Ferguson, J. O. Leckie, A. Bradman, *Int. J. Environ. Res. Publ. Health*, **2012**, 9, 73.

¹⁵ Organización Mundial de la Salud. Consecuencias sanitarias del empleo de plaguicidas en la agricultura. Ginebra: OMS; **1992**.

acumulación del neurotransmisor acetilcolina en las uniones sinápticas causando contracciones musculares, convulsiones, depresión respiratoria, e incluso la muerte por asfixia. Las grandes cantidades de OPs que se utilizan en los campos y en los jardines hacen que su acumulación en los suelos, frutas, verduras y agua, aumente el riesgo de exposición para los seres humanos. Debido a esta contaminación del medio ambiente y los riesgos para la salud humana, la detección de plaguicidas es un tema de gran interés.¹⁶

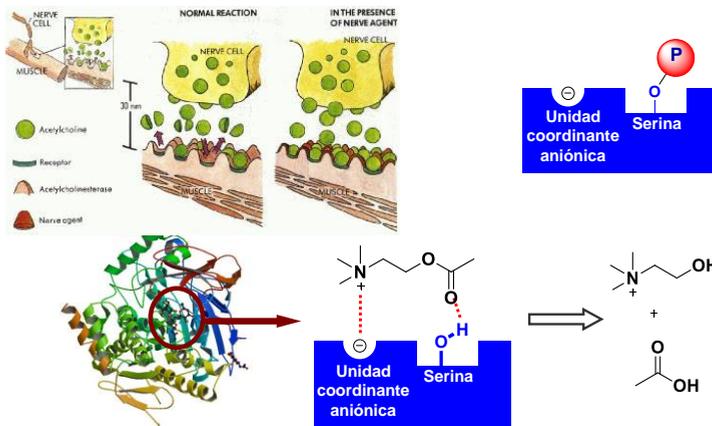


Figura 1.9. Representación esquemática del mecanismo de hidrólisis para el neurotransmisor acetilcolina mediado por la enzima acetilcolinesterasa, dando como subproductos colina y ácido acético. Sin embargo, en presencia de plaguicidas organofosforados se fosforila el resto serina impidiendo la degradación del neurotransmisor.

1.2.2. Métodos de detección de plaguicidas organofosforados.

Como hemos dicho anteriormente los plaguicidas organofosforados son la clase de plaguicidas más ampliamente

¹⁶ a) V. Andreu, Y. Picó, *Trends in Anal. Chem.*, **2004**, 23, 772. b) Y. Ishigea, S. Takedab, M. Kamahoria., *Biosens. Bioelectron.*, **2010**, 26, 1366. c) J. L. Martínez Vidal, P. Plaza-Bolaños, R. Romero-González, A. Garrido Frenich, *J. Chromatogr. A.*, **2009**, 1216, 6767.

utilizada. Se utilizan por la necesidad de incrementar la producción de alimentos ya que la población mundial sigue creciendo y la extensión de tierra cultivable por habitante disminuye en la misma proporción. Como curiosidad cabe destacar que se cultiva la misma superficie terrestre que en los años 50 del siglo XX, mientras que la población se ha triplicado.¹⁷

La consecuencia inmediata del gran uso de estos plaguicidas, es la aparición de diversas enfermedades y trastornos en los seres humanos.¹⁸ Por esta razón, la comunidad científica hace grandes esfuerzos por buscar y desarrollar nuevos métodos de detección de plaguicidas.

Existen diversos procedimientos analíticos para la detección de OPs basados en ensayos con biosensores¹⁹ o en técnicas instrumentales, tales como métodos electroquímicos, espectrometría de masas, FTIR o espectroscopía de RMN²⁰ que se han utilizado clásicamente para detectar estos compuestos. Sin embargo, la mayoría de estos métodos son complejos, requieren mucho tiempo, y los instrumentos necesarios no son portátiles. Como alternativa de gran interés está la detección óptica de OPs utilizando quimiosensores o sondas cromogénicas o fluorogénicas,²¹ debido a que estos métodos utilizan una

¹⁷ H. R. Köhler, R. Triebkorn, *Science.*, **2013**, 341, 759.

¹⁸ A. Shadboorestan, H. M. Vardanjani, M. Abdollahi, M. H. Goharbari, N. Khanjani, *J. Environ. Sci. Health C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.*, **2016**, 34, 187.

¹⁹ A. Mulchandani, W. Chen, P. Mulchandani, J. Wang, K. R. Rogers., **2001**, 16, 225.

²⁰ a) V. Kumar, N. Upadhyay, A. B. Wasit, S. Singh, P. Kaur., *Curr. World Environ.* **2013**, 8, 313. b) S. Wu, F. Huang, X. Lan, X. Wang, J. Wang, C. Meng, *Sensor Actuat. B-Chem.*, **2013**, 177, 724.

²¹ a) S. O. Obare, C. De, W. Guo, T. L. Haywood, T. A. Samuels, C. P. Adams, N. O. Masika, D. H. Murray, G. A. Anderson, K. Campbell, K. Fletcher., *Sensors*, **2010**, 10, 7018. b) S. Thakura, P. Kumar, M. V. Reddy, D. Siddavattam, A. K. Paul., *Sensor Actuat. B-Chem.*, **2013**, 178, 458.

instrumentación ampliamente disponible, y en el caso de los sensores cromogénicos, las modulaciones del color se pueden medir usando sistemas de bajo coste, y en algunos casos pueden ser fácilmente detectadas por el ojo humano.²² De hecho, hay pocas tecnologías tan baratas como la imagen visual.

Por otra parte, como discutiremos en más profundidad en el capítulo 3 de esta Tesis Doctoral, dentro del campo de la detección cromogénica, el diseño de sistemas basados en matrices o *arrays* de sensores colorimétricos, también conocidos como narices o lenguas optoelectrónicas (según se utilicen para detectar gases o analitos en disolución respectivamente) se está haciendo cada vez más popular, debido a su capacidad de detección multianalito, su versatilidad, y la posibilidad de ser aplicados en sistemas complejos.²³ De hecho, las narices optoelectrónicas, basadas en *arrays* relativamente simples de colorantes, se han aplicado con éxito para la detección de diferentes compuestos orgánicos volátiles (VOCs) incluyendo sustancias odoríferas, aminas volátiles,²⁴ o drogas²⁵ a través de modulaciones simples del color. Estas modulaciones o cambios de color son estudiados estadísticamente, por análisis de componentes principales (en inglés, Principal Component Analysis, PCA). El PCA es una técnica

²² a) D. Xiong, H. Li, *Nanotechnology*, **2008**, 19, 465502. b) M. Liang, K. Fan, Y. Pan, H. Jiang, F. Wang, D. Yang, D. Lu, J. Feng, J. Zhao, L. Yang, X. Yan, *Anal. Chem.*, **2013**, 85, 308. c) G. Fu, W. Chen, X. Yue, X. Jiang, *Talanta*, **2013**, 103, 110.

²³ a) Y. Liu, T. Minami, R. Nishiyabu, Z. Wang, P. Anzenbacher, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135, 7705. b) K. Chulvi, P. Gaviña, A. M. Costero, S. Gil, M. Parra, R. Gotor, S. Royo, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. L. Vivancos., *Chem. Commun.* **2012**, 48, 10105.

²⁴ a) K. S. Suslick, N. A. Rakow, A. Sen, *Tetrahedron*, **2004**, 60, 11133. b) Y. Salinas, J. V. Ros-Lis, J.-L. Vivancos, R. Martínez-Máñez, M. D. Marcos, S. Aucejo, N. Herranz, E. García, *Food Control*, **2014**, 35, 166.

²⁵ a) J. R. Askim, M. Mahmoudi, K. S. Suslick., *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 8649. b) L. A. Baumes, M. B. Sogo, P. Montes-Navajas, A. Corma, H. Garcia., *Chem-Eur. J.*, **2010**, 16, 4489.

de reducción del número de variables, que se puede utilizar para separar grupos, donde el analista asigna los grupos.

1.2.3. Métodos de remediación de plaguicidas organofosforados.

La degradación o remediación natural de los plaguicidas organofosforados (OPs) se produce por hidrólisis homogénea y heterogénea,²⁶ oxidación,²⁷ fotólisis²⁸ y por biodegradación,²⁹ mientras que los métodos más utilizados para la destrucción controlada de plaguicidas organofosforados son la remediación térmica, enzimática o fotoquímica, así como los tratamientos químicos utilizando fuertes oxidantes o nucleófilos.³⁰ Sin embargo, en muchos de estos procedimientos los productos de transformación (TPs) generados son aún más tóxicos que el compuesto original. En consecuencia, nos encontramos expuestos diariamente a una gran cantidad de residuos de plaguicidas. Es por ello que, desde el año 1963, se reúne anualmente un grupo “*ad hoc*” de expertos llamado Joint Meeting on Pesticide Residues, (JMPR) administrado conjuntamente por la FAO y la OMS con el propósito de armonizar el requerimiento y la evaluación de riesgo de los residuos de plaguicidas.³¹ Por otro lado, el Codex

²⁶ a) D. L. Macalady, N. L. Wolfe, *J. Agric. Food Chem.*, **1983**, 28, 372. b) B. Liu, L. L. McConnell, A. Torrents, *Chemosphere*, **2001**, 44, 1315.

²⁷ N. L. Wolfe, R. G. Zepp, J. A. Gordon, G. L. Baughman, D. M. Cline, *Environ. Sci. Technol.*, **1977**, 11, 88.

²⁸ M. B. Kralj, M. Franco, P. Trebse, *Chemosphere*, **2007**, 67, 99.

²⁹ O. Wanner, T. Egli, T. Fleischman, K. Lanz, P. Reichert, R. P. Schwarzenbach, *Environ. Sci. Technol.*, **1989**, 23, 1232.

³⁰ a) L. Kaihua, N. J. Stolowich, J. R. Wild, *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, 318, 59. b) L. Girbal, D. Hilaire, S. Leduc, L. Delery, J. L. Rols, N. D. Lindley, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2000**, 66, 1202. c) P. Vayron, P. Y. Renard, A. Valleix, C. Mioskowski, *Chem. Eur. J.*, **2000**, 6, 1050. d) N. M. Rougier, R. V. Vico, R. H. de Rossi, E. I. Buján, *J. Org. Chem.*, **2010**, 75, 3427.

³¹ <http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/pests/jmpr/en/>

Committee on Pesticides Residues, (CCPR),³² un cuerpo subsidiario a la Comisión del Código Alimentarius (CAC), se reúne a nivel intergubernamental con el objetivo de alcanzar acuerdos entre los gobiernos sobre límites máximos de residuos (MRL, en inglés), de plaguicidas en alimentos y componentes alimenticios que circulan en el comercio internacional. Es por ello que, el desarrollo de nuevos sistemas capaces de destruir plaguicidas transformándolos en subproductos inocuos es de gran interés para la sociedad.³³

En nuestro grupo de investigación surgió la idea de obtener un método de remediación de plaguicidas organofosforados a raíz de un trabajo realizado previamente. En este trabajo previo se estudiaron diferentes aminas, aminoalcoholes y glicoles como posibles organocatalizadores para la remediación del dietilcianofosfato (DCNP), un simulante del agente nervioso tabún.³⁴ Los experimentos permitieron establecer diferentes rutas de hidrólisis del DCNP, obteniéndose como productos finales el ácido dietilfosfórico, tetraetilpirofosfato o diferentes fosforamidas (dependiendo de la poliamina utilizada). Cabe destacar, que sin presencia de organocatalizador, la hidrólisis del DCNP ocurre principalmente a través de un proceso de autocatálisis.

La adición de aminas terciarias en cantidades subestequiométricas mejoraba la hidrólisis del DCNP mientras que las poliaminas no terciarias lo hacían más rápidamente. Se observó que los glicoles inducían un ligero aumento en la velocidad de hidrólisis,

³²https://ec.europa.eu/food/safety/international_affairs/standard_setting_bodies/codex/ccpr_en.

³³ V. Andreu, Y. Picó, *Trend Anal. Chem.*, **2004**, 23, 10.

³⁴ A. Barba-Bon, R. Martínez-Mañez, F. Sancenón, A. M. Costero, S. Gil, F. Pérez-Pla, E. Llopis., *J. Hazard. Mater.*, **2015**, 298, 73.

mientras que la presencia de ciertos aminoalcoholes, en concreto, el 2-(2-aminoetilamino)-etanol provocaba una rápida hidrólisis del DCNP. Con este compuesto la remediación del DCNP ocurrió 80 veces más rápida que en ausencia de organocatalizador. Los estudios cinéticos que se llevaron a cabo demostraron que la hidrólisis del DCNP en presencia de este aminoalcohol se producía a través de un proceso catalítico (Figura 1.10).

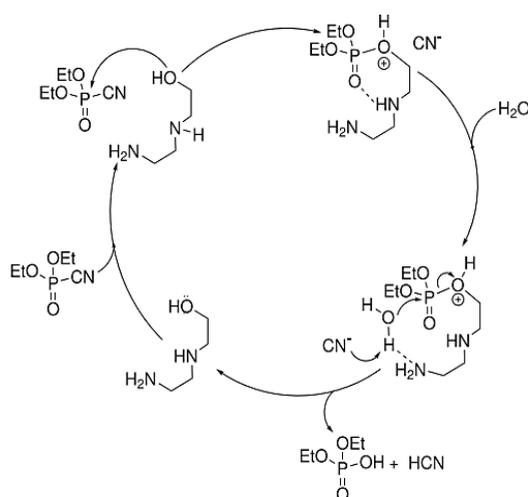


Figura 1.10. Mecanismo de hidrólisis propuesto para el DCNP en presencia del organocatalizador 2-(2-aminoetilamino)-etanol.³⁴

A partir de estos antecedentes nos planteamos la utilización de aminoalcoholes libres o complejados con oro, para la remediación de plaguicidas organofosforados, como se discutirá en el capítulo 4 de esta Tesis Doctoral.

2. Objetivos

Los objetivos que han servido de inspiración para el desarrollo de esta primera parte de la Tesis Doctoral se resumen en los puntos que se detallan a continuación:

❖ Aplicación de distintas sondas colorimétricas en la detección y discriminación de varios plaguicidas organofosforados, utilizando la aproximación de matrices colorimétricas, y el estudio estadístico de la respuesta de la matriz frente a los plaguicidas, empleando la técnica PCA. Este objetivo se desarrollará a lo largo del *Capítulo 3*.

❖ Estudio de la remediación hidrolítica de varios plaguicidas organofosforados de la familia de los tionos, utilizando aminoalcoholes, solos o complejados con Au(III), como catalizadores y empleando la técnica de resonancia magnética nuclear (RMN) para el estudio de los productos de descomposición. El desarrollo de este objetivo se detalla en el *Capítulo 4*.

3. Matriz de sensores colorimétricos para la detección y discriminación de plaguicidas organofosforados

Para lograr el primer objetivo propuesto, en el desarrollo de este capítulo de la Tesis Doctoral nos planteamos una serie de metas que son:

- Selección y síntesis de los colorantes, así como la preparación de los arrays.
- Estudio de la respuesta del array frente a los distintos plaguicidas. Capacidad de detección y discriminación.
- Ensayos de detección y clasificación de un plaguicida en una muestra real.

Concretamente, se estudiaron los siguientes OPs (Figura 3.1):

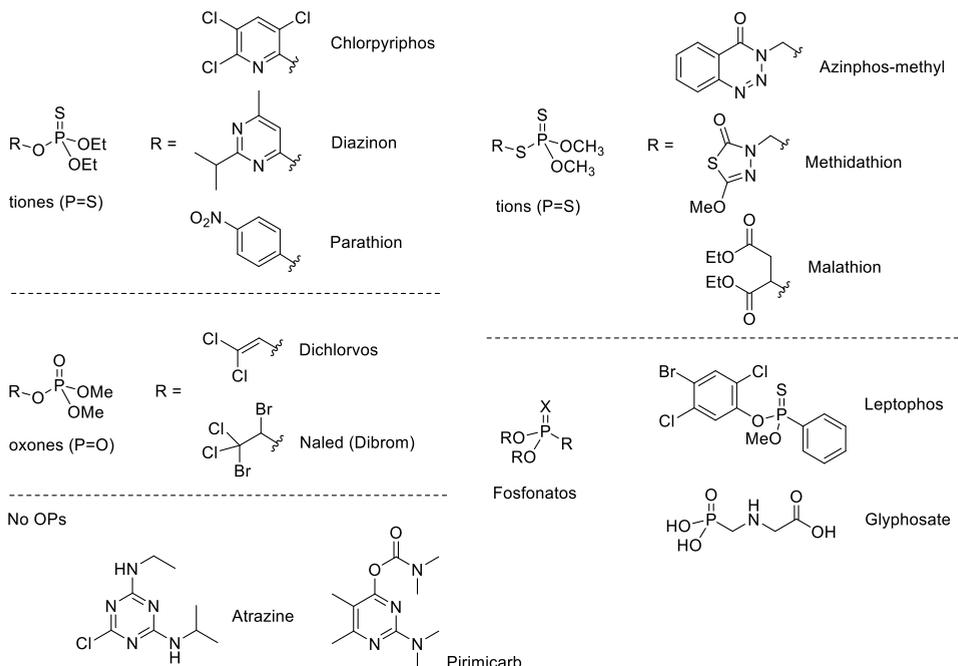


Figura 3.1. Estructura de los plaguicidas organofosforados utilizados.

3.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Las matrices de sensores colorimétricos (lenguas o narices optoelectrónicas) se basan, por lo general, en el uso de sondas cromogénicas que muestran una gran reactividad cruzada, además, de una amplia gama de interacciones intermoleculares entre los sensores moleculares y el analito. En nuestro caso, la mayor parte de los colorantes elegidos para la fabricación de las lenguas optoelectrónicas, son quimiodosímetros desarrollados con anterioridad en nuestro grupo de investigación. Se seleccionaron un total de 12 colorantes para la preparación del *array* (Figura 3.2). En ellos se incluyen cromóforos “push-pull” que contienen grupos reactivos capaces de ser fosforilados por los OPs, tales como piridina, alcoholes o aminas, además de compuestos capaces de coordinarse con los plaguicidas estudiados o con sus posibles productos de hidrólisis.

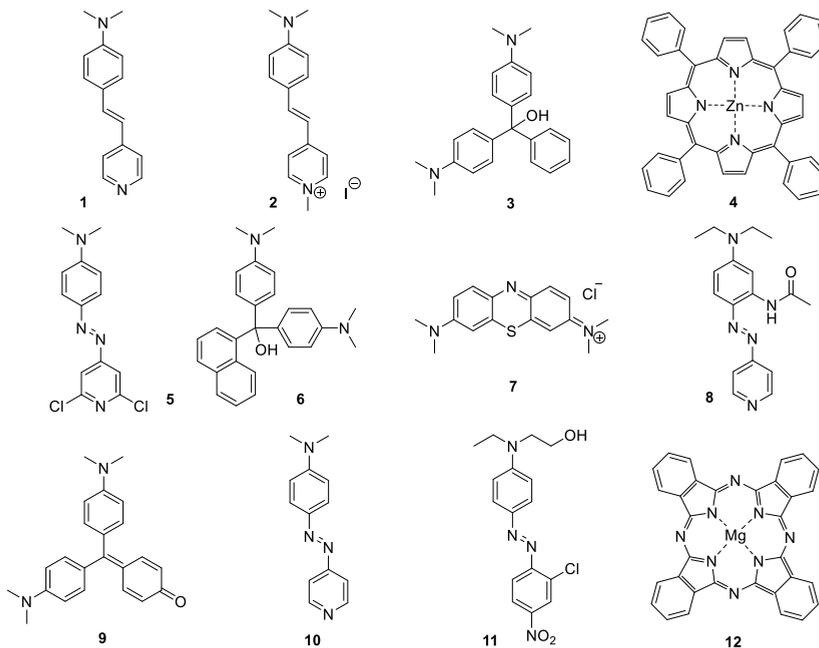


Figura 3.2. Estructura de los 12 colorantes utilizados en la matriz colorimétrica.

3.1.1. Mecanismo de reconocimiento de los quimiosensores frente a plaguicidas organofosforados.

Los reactivos cromogénicos fueron sintetizados o seleccionados con el objetivo de obtener un cambio en las propiedades físico-químicas de estos frente a los OPs que estudiamos. Dependiendo de la molécula quimiosensora, el mecanismo de reconocimiento frente a los diferentes plaguicidas organofosforados es distinto. A continuación, discutiremos más detalladamente los diversos tipos de mecanismo de reconocimiento que pueden operar en nuestra matriz colorimétrica en presencia de los OPs.

➤ Cromóforos “push-pull” basados en colorantes azoicos o derivados de estilbeno.

La estructura general de estos cromóforos *push-pull*, como ya hemos mencionado anteriormente, consiste en un anillo aromático que contiene un grupo electrón-dador (ED) conjugado con un grupo electrón-aceptor (EA) situado en el otro anillo aromático, dando una banda de transferencia de carga (CT) en el espectro ultravioleta visible (Figura 3.3). Ambos anillos aromáticos se hallan conectados por un puente $-Z=Z-$. En nuestro caso, hablaremos de colorantes *push-pull* estilbenos cuando $Z=CH$ (compuestos **1** y **2**) o de azoicos cuando $Z=N$ (compuestos **5**, **8**, **10** y **11**).

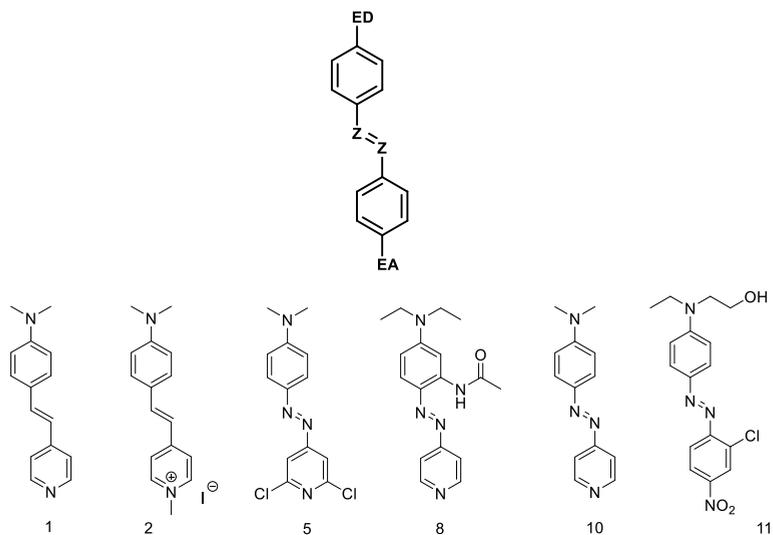


Figura 3.3 Estructura general de un cromóforo “push-pull” basado en un colorante azoico ($Z=N$) o en un estilbena ($Z=CH$), (donde ED es un grupo electrón-dador y EA un grupo electrón-aceptor) y estructura de los receptores cromogénicos *push-pull* utilizados en el *array*.

Los colorantes azoicos han sido extensamente utilizados como unidades señalizadoras para el diseño de receptores de cationes,³⁵ aniones³⁶ y moléculas neutras. Estos colorantes contienen un grupo azo ($-N=N-$), unidos a dos grupos arilo. En estas moléculas se pueden introducir otros grupos, llamados auxocromos que modifican el máximo de absorción en su espectro de UV-vis, desplazándolo hacia longitudes de onda mayores (desplazamiento batocrómico) o hacia longitudes de onda menores (desplazamiento hipsocrómico).

A modo de ejemplo, se muestra en la Figura 3.4 el mecanismo de reconocimiento colorimétrico de compuestos organofosforados

³⁵ a) F. Sancenón, R. Martínez-Máñez, J. Soto., *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 4321. b) Y. J. Chen, W. S. Chung, *Eur. J. Org. Chem.*, **2009**, 4770.

³⁶ a) K.H. Lee, H. Y. Lee, D. H. Lee, J. I. Hong., *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 5447. b) F. Sancenón, R. Martínez-Máñez, J. Soto, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 8, 41. c) J. V. Ros-Lis, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. Soto, K. Rurack, H. Weißhoff, *Eur. J. Org. Chem.*, **2007**, 2449.

utilizando un quimiodosímetro desarrollado en nuestro grupo de investigación, basado en un derivado azoico del tipo *push-pull* que posee como grupo electrón-dador y nucleófilo un grupo aminoetanol (V). Es conocido que el grupo hidroxilo da reacciones de fosforilación con fosfonatos y fosfatos que contengan un buen grupo saliente, para formar el intermedio VI. A continuación, el intermedio VI puede sufrir una *N*-alquilación intramolecular rápida para obtener la sal de amonio cuaternario VII con expulsión del correspondiente fosfato o tiofosfato. Esta reacción, anula la capacidad dadora del átomo de nitrógeno, y ello se refleja en un cambio en la correspondiente banda de transferencia de carga, lo que produce un cambio de color.³⁷

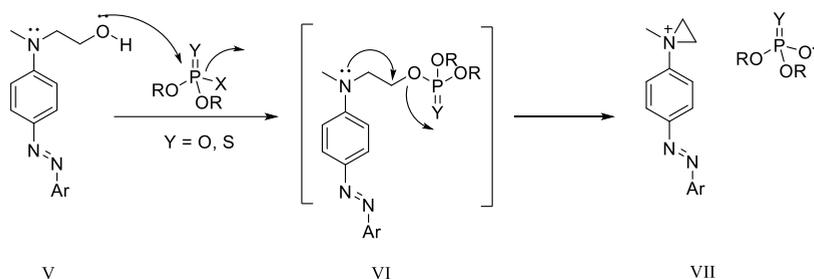


Figura 3.4 Protocolo de reconocimiento colorimétrico de un fosfato o tiofosfato basado en el empleo de 2-(metil(fenil)amino)etanol.

Por otro lado, hay estudios publicados³⁸ que indican, que tanto las aminas aromáticas, como las piridinas, pueden reaccionar con fosfatos y fosfonatos que contengan en su estructura un buen grupo saliente. Aunque existen estudios cinéticos y mecanísticos de reacciones de piridinólisis de clorofosfatos, no se encuentran descritos en la literatura ejemplos para la detección de organofosforados.

³⁷ A. M. Costero, S. Gil, M. Parra, P. M. E. Mancini, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, S. Royo., *Chem. Commun.*, **2008**, 0, 6002.

³⁸ a) A. J. Kirby, M. Younas., *J. Chem. Soc. B*, **1970**, 1165. b) M. T. Skoog, W. P. Jencks., *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 7597.

El mecanismo de reconocimiento sería similar para estilbenos y azocompuestos (colorantes **1**, **2**, **5**, **8** y **10**). En este caso el nitrógeno de la piridina (**VIII**) daría lugar a una reacción de fosforilación; al cuaternizarse el átomo de nitrógeno pasa a tener una carga positiva aumentando su capacidad electrón-aceptora (**IX**) (Figura 3.5). En consecuencia, hay un desplazamiento de la banda de transferencia de carga hacia longitudes de onda mayores, lo que se va a reflejar en un cambio de color.

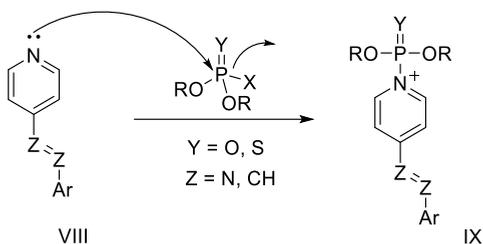


Figura 3.5. Protocolo de reconocimiento colorimétrico de un fosfato o tiofosfato basado en el empleo de derivados de piridina.

Por otra parte, el compuesto **7** no es ni un colorante azoico ni derivado de estilbeno, pero está estructuralmente relacionado con los anteriores y sobretodo en el modo de interacción por ataque nucleofílico por parte del nitrógeno de la tiazina (Figura 3.6).

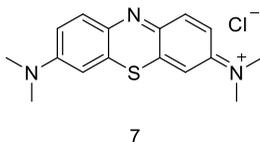


Figura 3.6. Estructura del receptor cromogénico **7**.

➤ **Colorantes derivados de triarilmetanol.**

Los compuestos basados en el triarilmetanol constituyen una clase de colorantes orgánicos muy importante, que dan lugar a sistemas

OFF-ON, en los que la detección visual se basa en la aparición de un producto coloreado a partir de un producto incoloro. A pesar de que se encuentran entre los primeros que se prepararon sintéticamente, se siguen describiendo continuamente nuevas aplicaciones.³⁹

Los quimiodosímetros basados en la agrupación triarilmetanol, como los colorantes **3** y **6**, son capaces de reaccionar con los derivados organofosforados a través del grupo alcohol y generar los correspondientes carbocationes altamente coloreados.⁴⁰

Una de las características más importante de estos compuestos es que su cambio de color depende del equilibrio de hidratación.⁴¹

Muchas sales de triarilmetano se obtienen por deshidratación de los correspondientes carbinoles (triarilmetanoles) en presencia de ácidos minerales para dar los carbocationes por pérdida del grupo saliente.⁴² Esta reacción de deshidratación genera un orbital *p* vacío, con carácter electrón-aceptor, el cual permite la conjugación entre los anillos aromáticos, dando lugar a la aparición de una banda de transferencia de carga que es la responsable de la aparición de color.

En presencia de derivados organofosforados se puede promover también esta formación de carbocationes y utilizarla para el reconocimiento de estas especies. El mecanismo de deshidratación

³⁹ a) P. J. Jiang, Z. J. Guo., *Coord. Chem. Rev.* **2004**, 248, 205. b) E. M. Nolan, S. J. Lippard., *Chem. Rev.* **2008**, 108, 3443. c) D. W. Domaille, E. L. Que, C. J. Chang., *Nat. Chem. Biol.* **2008**, 4, 168. d) X. Chen, T. Pradhan, F. Wang, J. S. Kim, J. Yoon., *Chem. Rev.* **2012**, 112, 1910.

⁴⁰ A. M. Costero, M. Parra, S. Gil, R. Gotor, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, S. Royo., *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 4937.

⁴¹ G. Bengtesson, *Acta Chem. Scand.* **1969**, 23, 455.

⁴² a) S. A. Gorman, J. D. Hepworth, D. Mason, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2000**, 1889. b) C. Villalonga-Barber, B. R. Steele , V. Kovac, M. Micha-Screttas, C. G. Screttas, *J. Organomet. Chem.*, **2006**, 961, 2785.

consta de dos etapas (Figura 3.7), fosforilación del alcohol terciario (estructura **XI**), seguido de la pérdida del derivado del ácido fosfórico correspondiente, para generar un carbocatión coloreado (estructura **XII**). El desplazamiento batocrómico inducido, es mayor o menor dependiendo de los grupos sustituyentes presentes en la estructura.⁴⁰

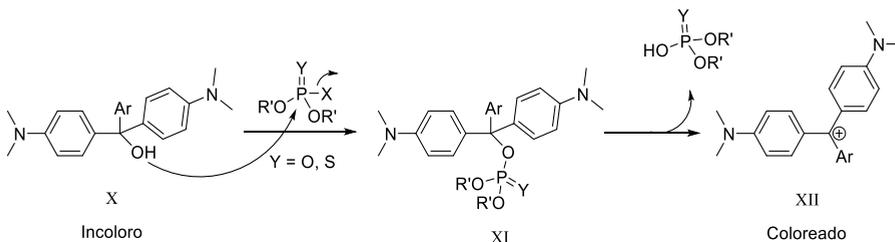


Figura 3.7 Protocolo de reconocimiento colorimétrico con triarilmetanol. El grupo hidroxilo experimenta una fosforilación seguida de una eliminación para generar el correspondiente carbocatión coloreado.

➤ Metaloporfirinas y ftalocianinas.

Los colorantes **4** y **12** del *array* pertenecen a estos tipos de compuestos. Las interacciones metaloporfirina-analito se encuentran ampliamente estudiadas en la bibliografía.⁴³ Las interacciones de los centros metálicos con los analitos causan un reordenamiento en el dipolo eléctrico de las porfirinas y ftalocianinas (Figura 3.8).⁴⁴ Esto provoca un cambio en el estado electrónico en los compuestos, modificando su espectro de absorción y por lo tanto su color.

⁴³ C.W. Pitt, A.G. James, M. M. Soe, Chemically responsive switching elements, *IEE Colloquium Mol. Electron. Lond.* **1990**, 133, 44.

⁴⁴ a) C.D. George, T. Richardson, M.E. Hofton, C.M. Vale, M.G.M. Neves, J.A.S. Cavaleiro. *Matter Sci. Eng. C.*, **1999**, 8-9, 559. b) H. Ding, V. Erokhin, M.K. Ram, S. Paddeu, L. Valkova, C. Nicollin. *Thin Solids Films.*, **2000**, 379, 279.

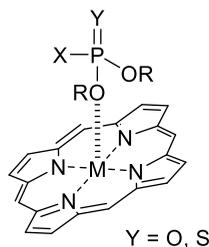


Figura 3.8. Protocolo de reconocimiento colorimétrico con porfirinas.

3.1.2. Síntesis de los colorantes.

En la Figura 3.9 se muestran las estructuras de los reactivos azoicos **5**, **8** y **10**, que se han sintetizado, y la del producto comercial Disperse Red 13 (**11**). Como se puede observar los reactivos **5**, **8** y **10** contienen un anillo de piridina nucleofílico, mientras que, el receptor **11** presenta un alcohol alifático como grupo reactivo.

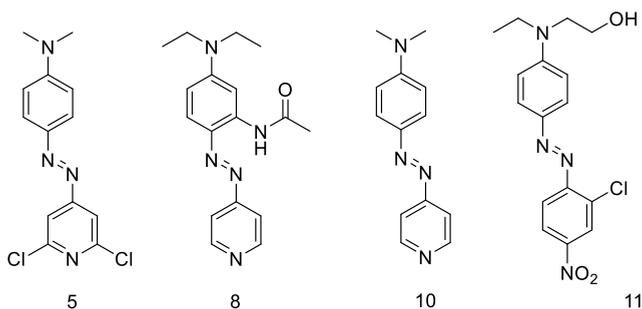


Figura 3.9. Reactivos cromogénicos azoicos empleados en este trabajo.

Los colorantes **5**, **8** y **10** se sintetizaron mediante una reacción de acoplamiento de la sal de diazonio adecuada, con las correspondientes dialquilanilinas como podemos ver a continuación (Figura 3.10).

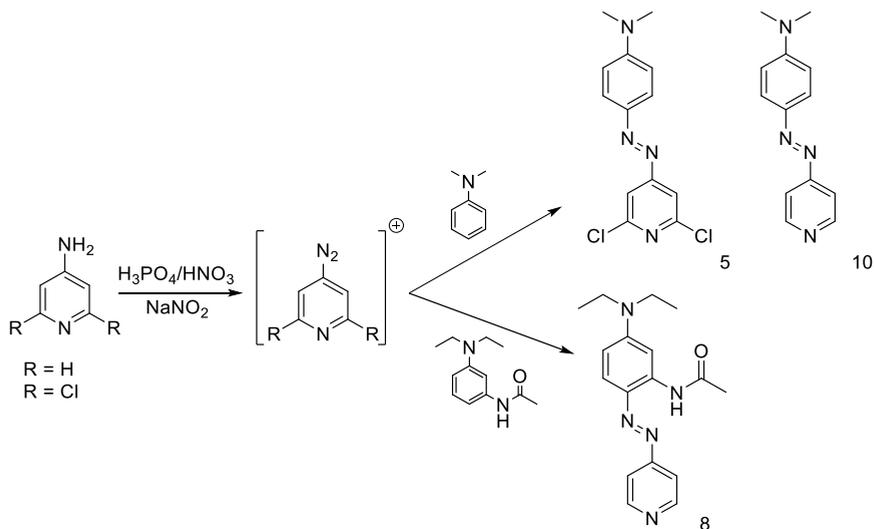


Figura 3.10. Síntesis de los colorantes azoicos utilizados.

Así, 4-aminopiridina o 2,6-dicloroaminopiridina, se trataron con una mezcla de $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{HNO}_3$ y se añadió NaNO_2 para formar la correspondiente sal de diazonio. A continuación, se añadieron las correspondientes dialquilanilinas lo que dio lugar a la formación de un precipitado coloreado que se aisló por filtración y se purificó. Se obtuvo así el colorante **5** con un rendimiento del 38%, el colorante **8** con un 41% y el colorante **10** con un 40%.

Los compuestos **6** y **9** se sintetizaron mediante la adición del compuesto organolítico correspondiente al carbonilo de la 4,4'-bis-dimetilaminobenzofenona (cetona de Michler's), mientras que el compuesto **3** se dispone de forma comercial (Figura 3.11).

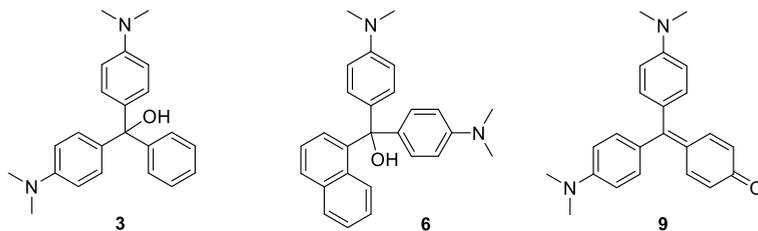


Figura 3.11. Derivados de triarilmetanol utilizados en el array.

El colorante **6** (sólido verde pálido, 22% de rendimiento) se sintetizó por reacción de 1-bromonaftaleno con *n*BuLi en THF a -78°C , seguido de adición de la cetona de Michler's y agitación durante 2h a temperatura ambiente (Figura 3.12).

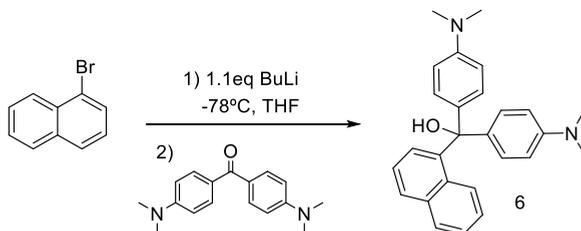


Figura 3.12. Síntesis del colorante triarilmetanol **6**.

El colorante **9** se sintetizó de manera similar a partir *p*-bromofenol, 2 equivalentes de *n*BuLi y la cetona de Michler's. Se obtuvo **9** como un sólido púrpura oscuro con un rendimiento del 87% (Figura 3.13).

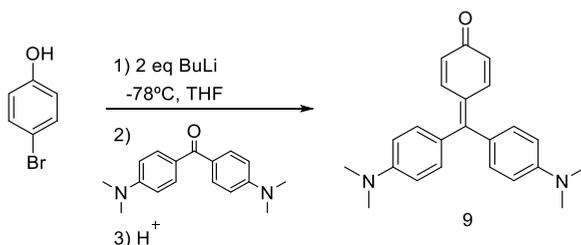


Figura 3.13. Síntesis del colorante **9**.

3.1.3. Preparación de un array colorimétrico y ensayos de detección y discriminación de plaguicidas.

Con el fin de detectar y discriminar los diferentes plaguicidas, se preparó un array colorimétrico añadiendo 2 μL de una disolución de cada uno de los colorantes en THF (con una concentración de 10^{-2} M o 10^{-3} M) sobre una placa de cromatografía de capa fina (TLC, Thin Layer Chromatography) de sílica sobre un soporte de aluminio de 5cm x 5cm, y dejando evaporar el disolvente. Posteriormente se analizó la respuesta de estos 12 colorantes frente a los plaguicidas organofosforados anteriormente mencionados: tiones (Chlorpyrifos, Diazinon, Parathion, Azinphos-methyl, Methidathion y Malathion), oxones (Dichlorvos, Dibrom), fosfonatos (Leptophos, Glyphosate) y dos plaguicidas no organofosforados (Atrazine y Pirimicarb). Las estructuras químicas de los plaguicidas estudiados se muestran en la Figura 3.1.

El experimento típico de detección consistió en depositar una gota (2 μL) de una disolución que contenía el correspondiente plaguicida (10^{-3} M, en $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$, 95:5 v/v) sobre cada sonda del array colorimétrico, y a continuación, dejar secar la matriz al aire durante 5 min. Otra matriz colorimétrica preparada al mismo tiempo y en ausencia de plaguicidas, se utilizó como control, mostrando pocas variaciones de color con el tiempo. Se realizaron cinco experimentos completamente independientes para cada uno de los plaguicidas con el fin de comprobar la reproducibilidad de la respuesta. Se utilizó un escáner convencional para obtener las imágenes de la matriz colorimétrica antes y después de la exposición a los plaguicidas, y a partir de las fotografías realizadas, utilizando un software de

procesamiento de imágenes, se obtuvieron las coordenadas RGB[&] (Figura 3.14). En estas coordenadas no hay pérdidas de información de color en el tratamiento de la imagen, puesto que, los colores primarios siguen existiendo como tal en su transmisión. Sin embargo, mediante este sistema, hay mucha información redundante. Por ejemplo, cada color lleva el valor de brillo de toda la imagen, de forma que esta información está por triplicado. Estos inconvenientes se solucionaron convirtiendo las coordenadas RGB en coordenadas Lab[§] mediante un algoritmo matemático.⁴⁵

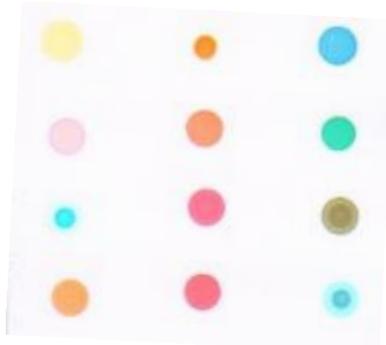


Figura 3.14. Matriz colorimétrica antes de la exposición a los plaguicidas.

[&] **Coordenadas RGB:** El modelo llamado RGB es el que se utiliza en todos los sistemas que forman imágenes a través de rayos luminosos, ya sea emitiéndolos o recibiendo. El modelo RGB está formado por los tres componentes de colores primarios aditivos y como mínimo un componente de sincronismo. Los componentes de color son las señales rojo, verde y azul (viniendo el nombre de las iniciales de su nomenclatura inglesa Red, Green, Blue); siendo transmitidos cada uno independiente y aislado del resto.

[§] **Coordenadas Lab:** Es el nombre abreviado de dos espacios de color diferentes. El **CIELAB** (estrictamente, **CIE 1976 L*a*b***) y el **Hunter Lab** (estrictamente, **Hunter L, a, b**). *Lab* es una abreviación informal, y puede confundirse con uno u otro espacio de color. Los espacios de color están relacionados en intención y propósito, pero son diferentes. Ambos espacios son derivados del espacio "maestro" CIE 1931 XYZ. Sin embargo, CIELAB se calcula usando raíces cúbicas, y Hunter Lab se calcula usando raíces cuadradas. El propósito de ambos espacios es producir un espacio de color que sea más "perceptivamente lineal" que otros espacios de color. *Perceptivamente lineal* significa que un cambio de la misma cantidad en un valor de color debe producir un cambio casi de la misma importancia visual. Lo anterior puede mejorar la reproducción de tonos cuando se almacenan colores en valores de precisión limitada

⁴⁵ M. D. Fairchild., *Colour appearance models, 3rd Edition*. 2013, Wiley-ID&T, Chichester, UK.

A continuación, se obtuvieron los mapas de diferencia de las coordenadas Lab en valores absolutos para cada colorante antes y después de la reacción con el plaguicida correspondiente (Figura 3.15).

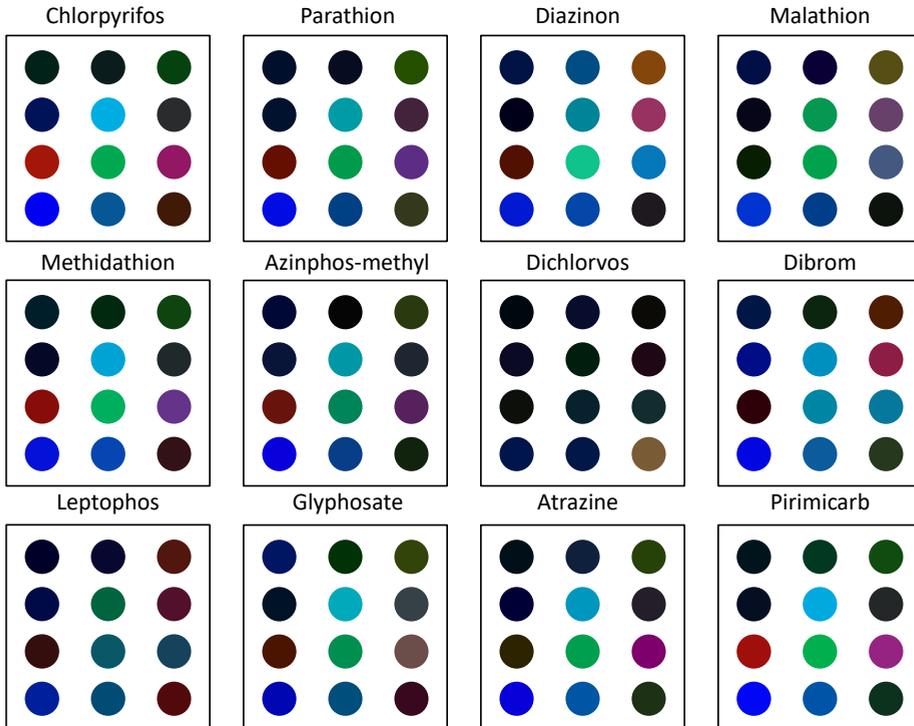


Figura 3.15. Mapa de diferencia de las coordenadas Lab para cada plaguicida.

Estas diferencias de color, se analizaron estadísticamente utilizando el análisis de componentes principales (PCA),⁴⁶ que es un poderoso procedimiento lineal sin supervisión de reconocimiento de patrones y un método adecuado y sencillo para proyectar datos en un plano de dos dimensiones. El PCA, descompone la matriz de datos primarios mediante la proyección de los datos multi-dimensionales establecidos sobre una nueva base de coordenadas, formado por las

⁴⁶ a) I. T. Jolliffe., *Principal Component Analysis*. 2014, Springer. b) R. Bro, A. K. Smilde., *Anal. Methods*, 2014, 6, 2812. c) I. T. Jolliffe, J. Cadima, *Phil. Trans. R. Soc. A.*, 2016, 374, 1.

direcciones ortogonales con los datos de máxima varianza. Los vectores propios de la matriz de datos se denominan componentes principales (PCs). Los PC, se ordenan de modo que PC1 muestra la cantidad más grande de la varianza, seguido por el siguiente PC más grande, el PC2, y así sucesivamente. En nuestro caso (ver Figura 3.16), el primer componente principal contenía 58,60% de la varianza de los datos. Los dos primeros componentes principales representan un 72,86% de la varianza total, mientras que se necesitaron siete PCs para dar cuenta de un 95% de la varianza. Se puede observar una agrupación clara de los datos para los plaguicidas Malathion, Leptophos, Dichlorvos, Dibrom y Diazinon.^δ

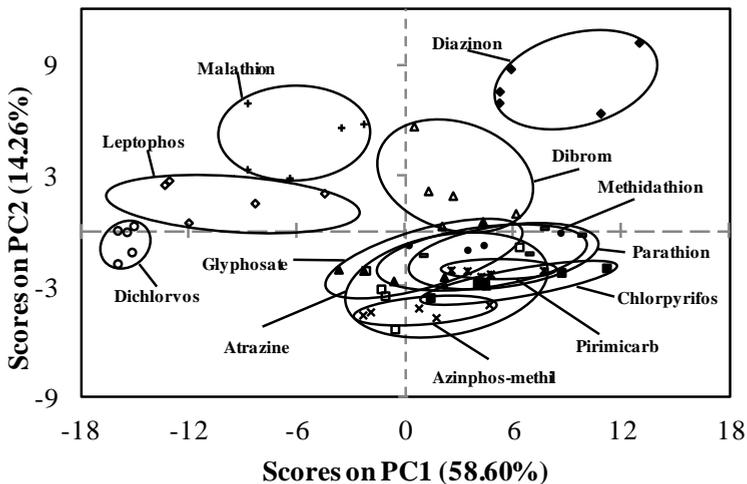


Figura 3.16. PCA de los plaguicidas.

Los cambios de color también se analizaron mediante análisis de conglomerados jerárquico (HCA), que es un método no supervisado

^δ Los tratamientos estadísticos que se muestran (PCA, HCA, PLS) fueron llevados a cabo en colaboración por el profesor J. L. Vivancos, del Instituto Interuniversitario de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) Universitat de València - Universitat Politècnica de València.

de análisis multivariante, que considera la dimensión completa de los datos. El HCA clasifica las muestras mediante la medición de las distancias entre puntos (en nuestro caso, distancia euclidiana[□]) de todas las muestras en el espacio N-dimensional. En este caso, para definir un clúster se utilizó el método de Ward⁴⁷ (varianza mínima[¥]). El análisis por HCA proporciona un gráfico en forma de un dendrograma. En este caso, al igual que ocurría con el análisis de componentes principales (PCA), el HCA también muestra una agrupación clara de los plaguicidas Malathion, Leptophos, Dichlorvos, Dibrom y Diazinon, como podemos ver en la Figura 3.17. Por otra parte, se aprecia que hay una agrupación de varios analitos. En particular, se observó un grupo (y sin una clara discriminación entre muestras individuales) para el Parathion, Chlorpyrifos, Pirimicarb, Glyphosate, Azinphos-methyl, Atrazine y Methidathion.

□ **La distancia euclídea** o métrica euclídea es la distancia "ordinaria" entre dos puntos que se podría medir con una regla, y viene dada por la fórmula de Pitágoras. Mediante el uso de esta fórmula como la distancia, el espacio euclidiano (o incluso cualquier espacio con producto interno) se convierte en un espacio métrico.

⁴⁷ Ward, J. H., Jr., *Journal of the American Statistical Association*, **1963**, 58, 236.

¥ **Método Ward de varianza mínima:** es un caso especial de la función objetivo de aproximación. Ward sugirió un procedimiento general de *aglomeración de clúster jerárquico* donde el criterio para la elección del par de clúster a mezclar en cada paso es basado en el valor óptimo de una función objetivo. Esta función objetivo podría ser "cualquier función que refleje el propósito del investigador".

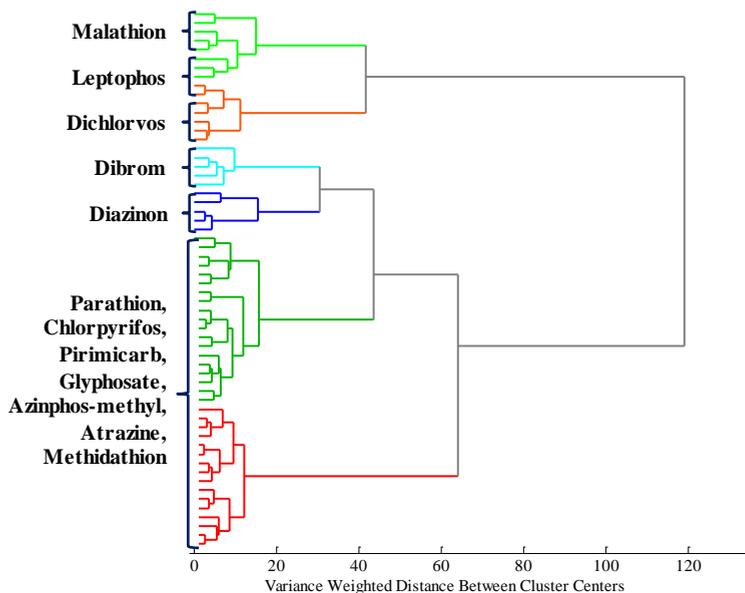


Figura 3.17. Dendrograma HCA con las distancias euclidianas entre los analitos.

3.1.4. Estudios de cuantificación y de interferentes.

Con el fin de estudiar la influencia de la concentración del plaguicida en la respuesta de la matriz cromogénica, para poder utilizar la matriz con fines cuantitativos, así como la influencia de la presencia de otros plaguicidas como interferentes se utilizó un modelo parcial de regresión de mínimos cuadrados (en inglés, partial least squares regression; PLS*). Como modelo de estudio nos planteamos, predecir la concentración de Diazinon en disoluciones acuosas, que también contenían Chlorpyrifos y Parathion como potenciales interferentes.

* PLS es un método estadístico que tiene relación con la regresión de componentes principales, en lugar de encontrar hiperplanos de mínima varianza entre la variable de respuesta y las variables independientes, se encuentra una regresión lineal mediante la proyección de las variables de predicción y las variables observables a un nuevo espacio. Debido a que tanto los datos de X e Y se proyectan a nuevos espacios, la familia de los modelos PLS se conoce como factor de modelos bilineales.

Estos plaguicidas se usan comúnmente en la agricultura, y además son de los más tóxicos.⁴⁸

Para el PLS se prepararon un total de dieciséis disoluciones acuosas que contenían combinaciones de diferentes niveles de concentración (10^{-5} , 10^{-4} y 10^{-3} M), de los correspondientes plaguicidas en cada muestra, y se expusieron a nuestra matriz colorimétrica. A continuación, se obtuvieron las coordenadas Lab del color para analizarlas por el modelo PLS.

En la Figura 3.18, se muestra el PLS resultante. En él, podemos ver las concentraciones reales añadidas de Diazinon (eje Y Measured 1), mientras que los valores predichos por el modelo, se calculan por el algoritmo PLS usando las coordenadas Lab de nuestra matriz cromogénica. Idealmente, los valores predichos deberían estar situados a lo largo de la línea diagonal (de color verde). Como puede observarse los valores predichos se aproximan mucho a los valores reales. El modelo de predicción PLS para las concentraciones de Diazinon muestra una buena concordancia entre los valores medidos y los predichos. Esto indica que la matriz puede distinguir y cuantificar el Diazinon en el rango de 10^{-3} M y 10^{-5} M incluso en presencia de distintas concentraciones de los plaguicidas Chlorpyrifos y Parathion.

⁴⁸ S. Obare, C. De, W. Guo, T. Haywood, T. Samuels, C. Adams, N. Masika, D. Murray, G. Anderson, K. Campbell, K. Fletcher, *Sensors* **2010**, 10, 7018.

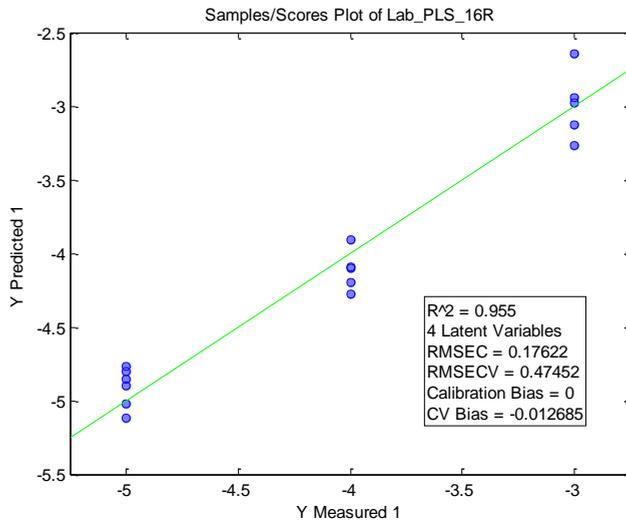


Figura 3.18. PLS del Diazinon en presencia de Parathion y Chlorpyrifos.

3.1.5. Aplicación de la matriz colorimétrica sobre una muestra real.

A la vista de los resultados obtenidos en el estudio de interferentes, se decidió probar nuestra matriz colorimétrica en muestras reales, con el fin de conseguir una aplicación más realista.

En concreto, se utilizó nuestra “lengua optoelectrónica” para detectar Diazinon en hojas de naranjo (Figura 3.19). El experimento consistió en pulverizar previamente las hojas de naranjo ecológico, el cual tiene certificado que no han sido tratado con plaguicidas de ningún tipo, con una cantidad conocida de este plaguicida (10 mL, 10^{-4} M). A continuación, se introdujeron las hojas en un Erlenmeyer y el plaguicida, se extrajo con MeOH. Tras evaporar el disolvente, el residuo se redisolvió con 10 mL de una mezcla H₂O:MeOH (95:5, v/v), y se expuso a nuestra matriz optoelectrónica. Tras dejar secar durante 5 minutos al aire, se escaneó la matriz y se obtuvieron las coordenadas

Lab del color, siguiendo un proceso similar a los descritos anteriormente.

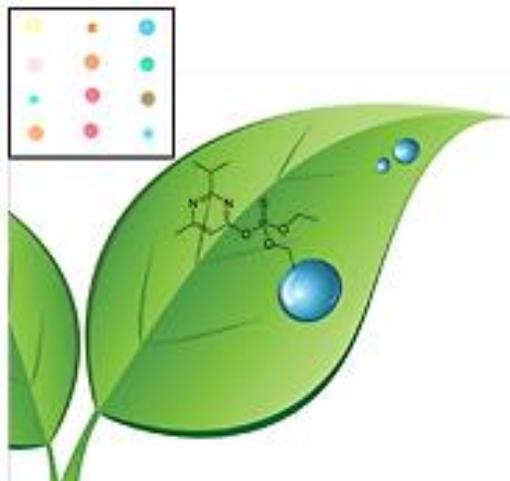


Figura 3.19. Aplicación real del plaguicida Diazinon sobre hojas de naranjo.

Como se puede ver en la Figura 3.20, la predicción de la concentración de Diazinon en el extracto, utilizando el modelo de predicción de PLS creado que se ha descrito anteriormente se ajustó bastante bien a los niveles reales de Diazinon en las hojas. El experimento sugiere por tanto que las matrices colorimétricas podrían ser utilizadas para la detección y cuantificación de plaguicidas en muestras reales.

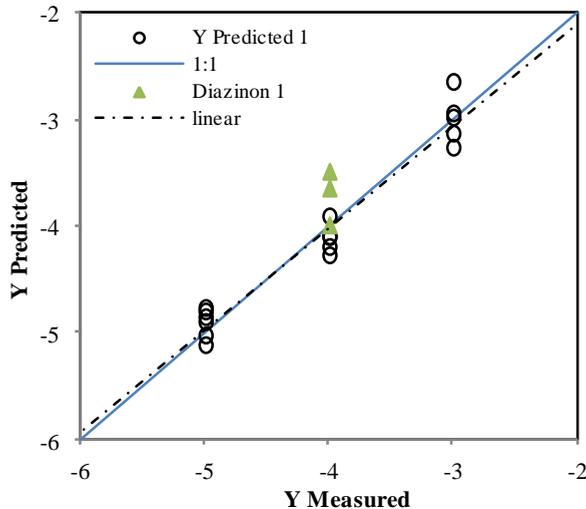


Figura 3.20. Modelo de predicción (PLS) de Diazinon para muestras preparadas (set de calibración), O y en hojas de naranjo (set de validación), Δ.

3.2. CONCLUSIONES.

En resumen, se ha diseñado una matriz colorimétrica con 12 sondas cromogénicas para la detección y discriminación de diferentes plaguicidas organofosforados (OPs) en disoluciones acuosas. La matriz optoelectrónica está basada en el uso de cromóforos “push-pull” que contienen sitios reactivos capaces de reaccionar con ciertos plaguicidas, y también compuestos capaces de coordinarse con los plaguicidas o con sus posibles productos de hidrólisis. La matriz cromogénica fue capaz de discriminar entre diferentes plaguicidas. Especialmente, se observó una clara clasificación para el Malathion, Leptophos, Dichlorvos, Dibrom y Diazinon. Además, los estudios de PLS demostraron que es posible predecir concentraciones de Diazinon en presencia de otros plaguicidas como posibles interferentes (Chlorpyrifos y Parathion).

Finalmente, la matriz diseñada fue capaz de detectar y predecir los niveles de concentración de Diazinon en hojas de naranjos ecológicos.

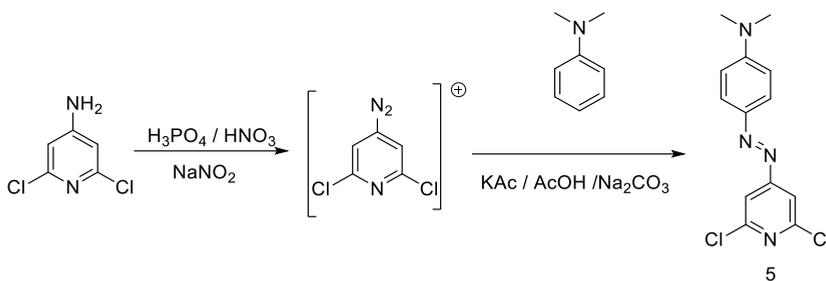
3.3. PARTE EXPERIMENTAL.

Todos los reactivos, colorantes **1, 2, 3, 4, 7, 11, 12** y disolventes se adquirieron comercialmente (Sigma-Aldrich) y se utilizaron sin necesidad de purificarlos previamente. Los espectros de ^1H y ^{13}C -RMN se registraron en un espectrómetro de RMN Bruker DPX300 (300 MHz). Todas las mediciones se llevaron a cabo utilizando el pico de disolvente residual como referencia interna. Las placas de TLC usadas como soportes sólidos para las matrices colorimétricas fueron gel de sílice disponible comercialmente en láminas de TLC sobre soporte de aluminio (5 cm x 5 cm) sin indicador de fluorescencia (Sigma-Aldrich). Se utilizó un escáner HP Laser Jet M1005 MFP para obtener imágenes de las matrices.

3.3.1. Síntesis de los sensores cromogénicos.

Todos los quimiosensores que se describen a continuación, fueron sintetizados siguiendo procedimientos descritos en la literatura.

➤ **Síntesis del colorante 5.**⁴⁹

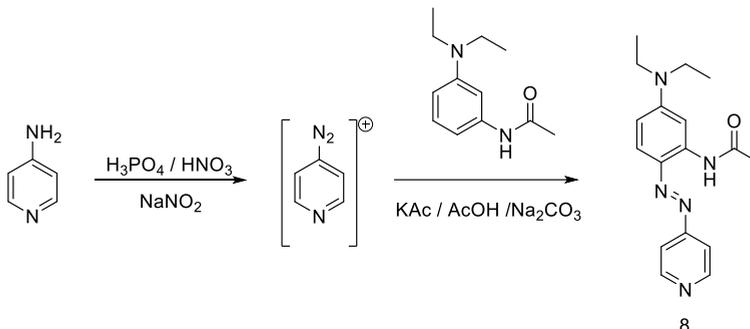


En un matraz de fondo redondo de 100 mL provisto de un imán se disolvió 4-amino-2,6-dicloropiridina (97%, 1,10 g, 6,77 mmol) en una mezcla de ácido fosfórico (85%, 3,5 mL) y ácido nítrico (68%, 1,7 mL). Se adicionó muy lentamente NaNO_2 (571 mg, 8,27 mmol) y se agitó hasta su completa disolución a 0°C. Al crudo resultante, se le añadió hielo picado (5 g) y se agitó durante 1 h, obteniéndose una disolución amarilla de la sal de diazonio. Por otro lado, en un vaso de 250 mL se disolvió ácido acético (7,09 g), acetato potásico (11,35 g) y carbonato de sodio (9,92 g) en 50 mL de agua. Finalmente, sobre esta disolución se adicionó *N,N*-dimetilanilina (1,48 mL, 11,7 mmol). A continuación, se enfrió la mezcla con un baño de agua-hielo y se añadió gota a gota la disolución amarilla recién preparada de la sal de diazonio, manteniendo la temperatura entre 0-5°C. Al cabo de 3 h el precipitado de color granate se aisló por filtración. Se purificó por cromatografía en columna de sílica gel, (hexano:AcOEt, 70:30, v/v), y se secó en una estufa a 70°C, obteniéndose el colorante 5 (752 mg, 38%).

⁴⁹ H. Li, C. Huang, Y. Zhou, X. Zhao, X. Xia, T. Li, J. Ba; *J. Mater. Chem.*, **1995**, 5, 11, 1871.

$^1\text{H-RMN}$ (300,1 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7,89 (d, $J = 9,3$ Hz, 2H), 7,61 (s, 2H), 6,75 (d, $J = 9,3$ Hz, 2H), 3,16 (s, 6H).

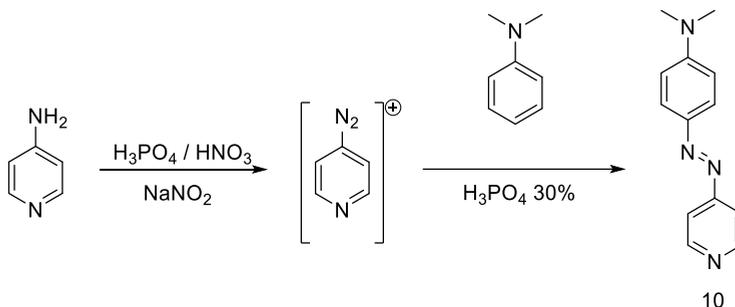
➤ **Síntesis del colorante 8.**⁴⁰



En un matraz de fondo redondo de 100 mL provisto de un imán se disolvió 4-aminopiridina (1,02 g, 11 mmol) en una mezcla de ácido fosfórico (85%, 10 mL) y ácido nítrico (68%, 5 mL). Se adicionó muy lentamente NaNO_2 (750 mg, 11 mmol) y se agitó hasta su completa disolución a 0°C . Al crudo resultante, se le añadió hielo picado (20 g) y se agitó durante 1 h, obteniéndose una disolución amarilla de la sal de diazonio. Por otro lado, en un vaso de 500 mL se disolvió ácido acético (5 g), acetato potásico (8 g) y carbonato de sodio (7 g) en 100 mL de agua. Finalmente, sobre esta disolución se adicionó 3-(*N,N*-dietilamino)acetanilida (2,95 g, 14,3 mmol). A continuación, se enfrió la mezcla con un baño de agua-hielo y se añadió gota a gota la disolución amarilla recién preparada de la sal de diazonio, manteniendo la temperatura entre 0 - 5°C . Al cabo de 12 h el precipitado de color rojo-púrpura se aisló por filtración. Se purificó por cromatografía en columna de sílica gel, (hexano:AcOEt, 70:30, v/v), y se secó en una estufa a 70°C , obteniéndose el colorante **8** (1,4 g, 38%).

$^1\text{H-RMN}$ (300,1 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 8,63 (d, $J = 6,3$ Hz, 2H), 8,20 (d, $J = 2,7$ Hz, 1H), 7,78 - 7,74 (m, 3H), 6,58 (dd, $J = 9,6$ Hz y 2,7 Hz, 1H), 3,58 (q, $J = 7,2$ Hz, 4H), 2,30 (s, 3H), 1,33 (s, 6H).

➤ **Síntesis del colorante 10.**⁵⁰



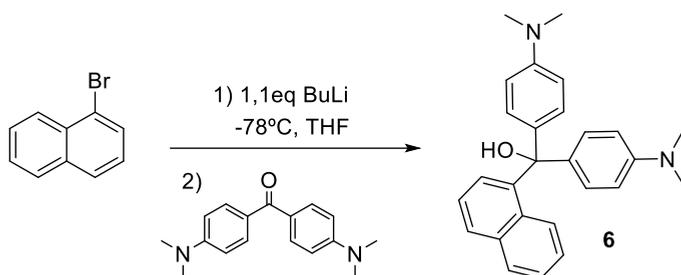
En un matraz de fondo redondo de 100 mL provisto de un imán se disolvió 4-aminopiridina (1,66 g, 17,7 mmol) en una mezcla de ácido fosfórico (85%, 9,25 mL) y ácido nítrico (68%, 4,63 mL). Se adicionó muy lentamente NaNO_2 (1,29 g, 18,8 mmol) y se agitó hasta su completa disolución a 0°C y se agitó 1,5 h a temperatura ambiente obteniéndose una suspensión de color amarillo-naranja de la sal de diazonio. Por otro lado, en un vaso de precipitados de 25 mL se disolvió N,N -dimetilanilina (2,9 mL, 23 mmol) ácido fosfórico 30% (5 mL). A continuación, se enfrió la mezcla con un baño de agua-hielo y se añadió gota a gota la disolución amarilla recién preparada de la sal de diazonio, manteniendo la temperatura entre 0 - 5°C . Al cabo de 1,5 h la reacción se neutralizó con NaHCO_3 (sat) y se extrajo con CH_2Cl_2 , se lavó con NaCl (sat) y se secó con MgSO_4 anhidrido. Se purificó por

⁵⁰ N. Mas, A. Agostini, L. Mondragón, A. Bernardos, F. Sancenón, M. D. Marcos, R. Martínez-Mañez, A. M. Costero, S. Gil, M. Merino-Sanjuán, P. Amorós, M. Orzáez, E. Pérez-Payá., *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 1346.

cromatografía en columna sílica gel (hexano:AcOEt, 1:1, v/v). Se obtuvo un sólido brillante de color naranja (1,61 g, 40%).

$^1\text{H-RMN}$ (300,1 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 8,71 (d, $J = 5,4$ Hz, 2H), 7,89 (d, $J = 9,3$ Hz, 2H), 7,64 (d, $J = 6,2$, 2H), 6,74 (d, $J = 9,3$ Hz, 2H), 3,11 (s, 6H).

➤ **Síntesis del colorante 6.**⁵¹



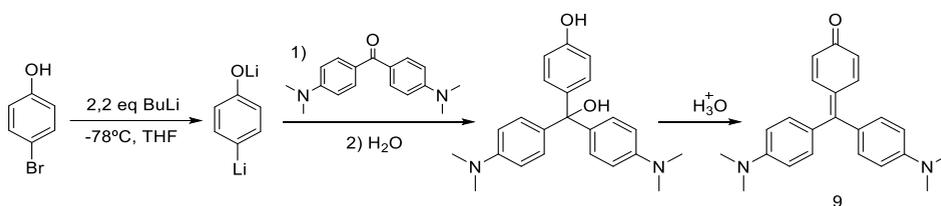
En un matraz de fondo redondo de 100 mL provisto de un imán se disolvió 1-bromonaftaleno (260 μL , 1,86 mmol) en THF (10 mL) bajo atmosfera de argón. Muy lentamente se adicionó *n*BuLi (2,3 M, 1 mL) y se agitó durante 1 h a -78°C . A continuación, se añadió gota a gota una disolución de 4,4'-bis(dietilamino)benzofenona (500 mg, 1,86 mmol) en THF (20 mL) la mezcla se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. La reacción se terminó añadiendo NaHCO_3 10% (20 mL). Se extrajo con AcOEt (3 x 15 mL), se lavó con NaCl (sat) y se secó con MgSO_4 anhidrido. Se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (hexano:AcOEt, 7:3, v/v). Se obtuvo el colorante 6 (162 mg, 22%) como un sólido de color verde muy pálido.

⁵¹ G. Hallas, K. N. Paskins, and D. R. Waring, *J. Chem. Soc. Perkin II.*, **1972**, 2281.

$^1\text{H-RMN}$ (300,1 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 8,24 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,83-7,75 (m, 2H), 7,37 (t, $J = 8,2$ Hz, 1H), 7,29-7,24 (m, 2H), 7,12 (d, $J = 9,0$ Hz, 4H), 6,96 (dd, $J = 7,4$ Hz, 1,3 Hz, 1H), 6,67 (d, $J = 9,0$ Hz, 4H), 2,94 (s, 12H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 150, 143, 136, 135, 132, 129, 128,9, 128,8, 128,7, 128, 125, 125, 124, 112, 83, 41.

➤ Síntesis del colorante 9.4



En un matraz de tres bocas de fondo redondo de 500 mL provisto de un imán se disolvió 4,4'-bis-dimetilaminobenzofenona en THF (225 mL) bajo atmosfera de argón. En otro matraz de tres bocas de fondo redondo de 250 mL provisto de un imán se disolvió p-bromofenol (2,71 g, 15,7 mmol) en THF (160 mL) bajo atmosfera de argón. La mezcla de reacción se enfrió a -78°C . A continuación, se adicionó muy lentamente *n*BuLi (24,6 mL, 34 mmol), y se agitó durante 30 minutos a -78°C . Sobre esta mezcla de reacción, se adicionó mediante una cánula la disolución de la cetona y se agitó bajo atmosfera inerte durante 24 h a temperatura ambiente. A continuación, se adicionaron 40 mL de agua. Se extrajo con AcOEt (3 x 20 mL), se lavó con NH_4Cl 10% (3 x 15 mL), con NaCl (sat) y finalmente se secó con MgSO_4 anhidrido. Se purificó por cromatografía en columna sílica gel

(previamente neutralizada con Et₃N), AcOEt:Hexano:Et₃N (4:2:1). Se obtuvo el colorante **9** (4,67 g, 87%) de un color púrpura oscuro.

¹H-RMN (300.1 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7,34 (d, J = 9,7 Hz, 2H), 7,21 (d, J = 9,0 Hz, 4H), 6,71 (d, J = 9,0 Hz, 4H), 6,53 (d, J = 9,7 Hz, 2H), 3,10 (s, 12H).

3.3.2. Experimentos de detección con la matriz cromogénica y análisis estadístico.

➤ Preparación de la matriz de sensores moleculares.

La matriz colorimétrica se preparó utilizando como soporte sólido una placa de sílica gel sin indicador fluorescente de dimensiones 5 cm x 5 cm, sobre soporte de aluminio (Sigma Aldrich). En ella se depositaron 2 μL de cada una de las disoluciones de los doce colorantes en THF (10⁻² o 10⁻³ M) con una micropipeta automática, quedando una matriz de 3 x 4 (Figura 3.14). Una vez depositados todos los colorantes la matriz se secó al aire a 25°C durante 5 min. A continuación, se escaneó el array con un escáner convencional (HP Laser Jet M1005 MFP). Las fotografías obtenidas se procesaron con un programa de procesamiento de imágenes (Photoshop) para obtener las coordenadas RGB de cada uno de los colorantes, obteniéndose así nuestra matriz colorimétrica lista para exponerla a los plaguicidas.

➤ Detección y discriminación de plaguicidas.

El experimento típico que se realizó para la detección de plaguicidas, consistió en depositar una gota (2 μL) de disolución del plaguicida correspondiente (10⁻³ M en H₂O:MeOH, 95:5 v/v) sobre

cada sensor molecular de la matriz colorimétrica mediante el uso de una micropipeta automática. A continuación, la matriz se secó al aire a 25°C durante 5 min. Transcurrido el tiempo la matriz se escaneó con un escáner convencional (HP Laser Jet M1005 MFP), y se compararon las coordenadas obtenidas con las de una matriz no expuesta a los plaguicidas, utilizada como referencia (blanco).

Los mapas de diferencias de color se obtuvieron mediante la diferencia de los colores rojo, verde y azul (coordenadas RGB) de cada sonda y para cada plaguicida con el blanco (patrón). Para facilitar la visualización, la paleta de colores del mapa de diferencia se mejoró mediante la ampliación de la gama de colores de 0-66 a 0-255. Además, cualquier cambio en las coordenadas RGB menor de cinco fue tratado como el ruido de fondo y se descartó.

➤ **Análisis por PLS.**

Los tratamientos estadísticos que se muestran a continuación (PCA, HCA, PLS) fueron llevados a cabo en colaboración por el profesor J. L. Vivancos, del Instituto Interuniversitario de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) Universitat de València - Universitat Politècnica de València.

El modelo de regresión de mínimos cuadrados parcial (PLS), se utilizó para la predicción de la concentración de Diazinon, en disoluciones acuosas (H₂O:MeOH, 95:5 v/v), que también contenían Chlorpyrifos y Parathion como interferentes.

El experimento fue diseñado pensando en los posibles efectos de las interacciones entre los plaguicidas. Mediante la aplicación del

diseño experimental, se estableció una cantidad de dieciséis muestras, así como la distribución de los niveles de plaguicida en cada muestra. Los niveles utilizados fueron concentraciones bajas (10^{-5} M), medias (10^{-4} M) y altas (10^{-3} M). Las 16 mezclas se estudiaron con la matriz cromogénica del mismo modo que hemos descrito.

	<i>Chlorpyrifos</i>	<i>Diazinon</i>	<i>Parathion</i>
<i>Run 1</i>	1.00E-05	1.00E-05	1.00E-05
<i>Run 2</i>	1.00E-04	1.00E-05	1.00E-05
<i>Run 3</i>	1.00E-03	1.00E-05	1.00E-04
<i>Run 4</i>	1.00E-05	1.00E-05	1.00E-03
<i>Run 5</i>	1.00E-04	1.00E-05	1.00E-03
<i>Run 6</i>	1.00E-03	1.00E-05	1.00E-03
<i>Run 7</i>	1.00E-05	1.00E-04	1.00E-05
<i>Run 8</i>	1.00E-04	1.00E-04	1.00E-05
<i>Run 9</i>	1.00E-03	1.00E-04	1.00E-05
<i>Run 10</i>	1.00E-05	1.00E-04	1.00E-04
<i>Run 11</i>	1.00E-04	1.00E-04	1.00E-03
<i>Run 12</i>	1.00E-05	1.00E-03	1.00E-04
<i>Run 13</i>	1.00E-04	1.00E-03	1.00E-04
<i>Run 14</i>	1.00E-05	1.00E-03	1.00E-03
<i>Run 15</i>	1.00E-04	1.00E-03	1.00E-05
<i>Run 16</i>	1.00E-03	1.00E-03	1.00E-04

➤ **Detección de Diazinon en hojas de naranjo.**

Se pesaron 50 g de hojas de naranjo ecológico recién cortadas, lavadas con agua y secadas cuidadosamente con papel. A continuación, se pulverizaron con 10 mL de una disolución acuosa 10^{-4} M de Diazinon en H₂O: MeOH (95:5 v/v). A continuación, las hojas se secaron al aire a temperatura de 25°C durante 15 minutos.

Para el análisis del contenido de Diazinon, se colocaron los 50 g de hojas de naranjo pulverizadas con el Diazinon en un erlenmeyer de 5 L, se añadió MeOH (1000 mL) para extraer el plaguicida y la mezcla se agitó magnéticamente durante 10 minutos. A continuación, se filtró por gravedad la disolución metanólica y se evaporó el metanol en el rotavapor. El residuo resultante se redisolvió en 10 mL de H₂O:MeOH (95:5 v/v), y se analizó utilizando nuestra matriz colorimétrica.

Con el fin de asegurar la reproducibilidad de los resultados se realizaron tres repeticiones por separado.

➤ **Análisis Estadístico Multivariante.**

Todos los análisis multivariantes se realizaron con Matlab (Versión 7.8.0.R2009a, MathWorks). El correcto tratamiento de los valores perdidos es fundamental, ya que en caso contrario puede aumentar considerablemente el error acumulado y/o obtenerse resultados imprecisos. Así pues, se aplicó el algoritmo de los K vecinos más cercanos (*K-Nearest Neighbours, KNN*) basado en la Información Mutua (IM). Este método encuentra los 'K' vecinos más cercanos mediante una eficiente métrica de distancia basada en la IM que considera la relevancia de cada característica de entrada para el problema de clasificación. De manera que el modelo de clasificación *KNN* incluye las probabilidades de cada muestra perteneciente a cada clase posible en el campo de probabilidades del modelo de clasificación. El análisis de componentes principales (PCA) se llevó a cabo mediante el software Solo 6.2 (*Eigenvector Research Incorporated, WA, USA*).

Se utilizaron las coordenadas Lab para el modelo PLS. Se calcularon estos valores de diferencia de color para cada colorante cuando se aplicaron las técnicas de PCA y HCA usando la ecuación 1.1 donde (L^*_0, a^*_0, b^*_0) y (L^*_1, a^*_1, b^*_1) son el color inicial y el color final después de la exposición en $L^*a^*b^*$:

$$(1.1) \quad \Delta E = \sqrt{(L^*_1 - L^*_0)^2 + (a^*_1 - a^*_0)^2 + (b^*_1 - b^*_0)^2}$$

➤ **Análisis de Componentes Principales (PCA).**

Análisis propio de la matriz de correlación.

	<i>Eigenvalues</i>	<i>Variance Captured (%)</i>	<i>Cumulative Variance Captured (%)</i>
1	55.022	58.60	58.60
2	13.388	14.26	72.86
3	10.727	11.42	84.28
4	4.126	4.39	88.67
5	3.393	3.61	92.29
6	2.231	2.38	94.66
7	1.651	1.76	96.42
8	0.976	1.04	97.46
9	0.900	0.96	98.42
10	0.587	0.63	99.05
11	0.501	0.53	99.58
12	0.395	0.42	100.00

<i>Sensor</i>	<i>PC 1 (58.60%)</i>	<i>PC 2 (14.26%)</i>	<i>Q Residuals (7.71%)</i>	<i>Hotelling (92.29%)</i>	<i>T^2</i>
1	3.45E-02	-3.38E-02	86.326	0.158	
2	6.06E-02	2.08E-01	11.015	9.311	
3	1.77E-01	2.64E-01	48.105	1.828	
4	2.35E-02	-7.34E-02	9.735	8.308	
5	3.50E-01	-1.78E-01	59.332	2.089	
6	9.43E-02	6.13E-01	24.494	7.337	
7	2.43E-01	-1.62E-01	56.250	2.378	
8	4.43E-01	4.58E-01	30.151	5.258	
9	4.37E-01	8.20E-02	32.969	4.155	
10	5.78E-01	-4.71E-01	9.107	9.599	
11	2.25E-01	9.13E-02	32.951	0.699	
12	-1.44E-02	-2.02E-02	26.840	3.880	

➤ **Modelo parcial de regresión de mínimos cuadrados (PLS) para la predicción de la concentración.**

Modelo PLS para el Diazinon y las concentraciones predichas (log M) en hojas de naranjos.

Se utilizó un pre-procesamiento de un centro medio, y cuatro variables latentes después de la validación del método, mostrándose cuatro números de divisiones de datos y 16 iteraciones.

Parte experimental

<i>Diazinon</i>	<i>Scores on LV 1</i> (35.49%)	<i>Scores on LV 2</i> (29.92%)	<i>Scores on LV 3</i> (8.74%)	<i>Scores on LV 4</i> (7.07%)	<i>Q Residuals</i> (18.78%)	<i>Hotelling T^2</i> (81.22%)	<i>Leverage</i>
<i>Run 1</i>	-7.868	5.407	-1.732	1.105	11.702	3.598	0.240
<i>Run 2</i>	-3.836	0.359	-4.252	2.686	16.243	3.899	0.260
<i>Run 3</i>	-3.981	-2.173	-0.812	-0.101	20.494	0.757	0.050
<i>Run 4</i>	-9.563	4.592	2.559	-5.079	5.190	8.537	0.569
<i>Run 5</i>	-2.454	-4.139	-2.474	-2.726	15.600	2.772	0.185
<i>Run 6</i>	-0.163	-7.772	-0.986	-4.136	6.509	5.059	0.337
<i>Run 7</i>	-6.704	0.895	5.764	2.238	7.159	6.451	0.430
<i>Run 8</i>	-1.016	-5.162	0.481	1.821	10.639	1.573	0.105
<i>Run 9</i>	-0.521	-8.877	2.057	3.767	6.675	5.705	0.380
<i>Run 10</i>	0.351	2.094	-3.843	1.877	36.729	2.599	0.173
<i>Run 11</i>	2.994	-1.559	-1.602	0.343	40.229	0.716	0.048
<i>Run 12</i>	6.509	7.122	-2.578	-1.548	9.357	4.434	0.296
<i>Run 13</i>	4.088	6.263	2.919	-0.258	21.749	3.075	0.205
<i>Run 14</i>	4.925	6.374	0.097	1.950	23.586	2.869	0.191
<i>Run 15</i>	7.701	1.562	3.361	0.110	6.113	3.386	0.226
<i>Run 16</i>	9.538	-4.987	1.040	-2.048	15.381	4.571	0.305
<i>Blank 1</i>	-7.119	9.106	-19.847	1.654	413.847	55.195	NaN
<i>Blank 2</i>	-7.453	9.929	-15.668	-6.512	305.041	43.290	NaN

Blank 3	-6.322	10.186	-17.114	-0.792	401.784	42.454	NaN
Diazinon1	0.287	5.807	-6.578	6.565	196.130	13.534	NaN
Diazinon2	0.719	4.213	0.708	0.589	76.814	0.794	NaN
Diazinon3	1.536	2.675	1.171	1.792	106.274	1.020	NaN

***4. Remediación de plaguicidas organofosforados
mediante el empleo de diaminoalcoholes y
Au(III)***

Los objetivos concretos que se plantearon para este capítulo de la tesis fueron los siguientes:

- Selección y evaluación de diferentes aminoalcoholes como posibles organocatalizadores, para la degradación hidrolítica de plaguicidas organofosforados de la familia de los organotiofosfatos.
- Síntesis de un complejo de Au(III) con un diaminoalcohol y evaluación mediante resonancia magnética nuclear de su capacidad para la remediación hidrolítica de diferentes organotiofosfatos.

Concretamente, se estudiaron los siguientes plaguicidas organotiofosfatos (Figura 4.1):

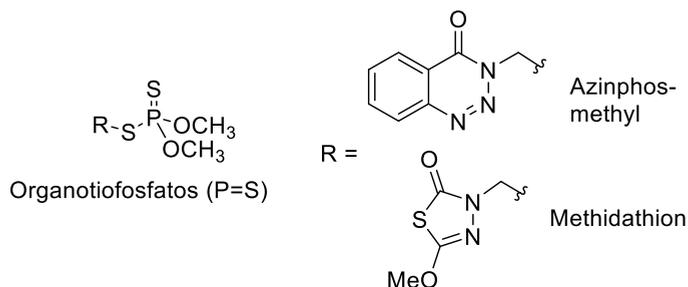


Figura 4.1. Estructura de los plaguicidas organotiofosfatos utilizados en este estudio.

4.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1.1. Estudios de remediación de plaguicidas organofosforados empleando aminoalcoholes.

Inspirados por los resultados obtenidos anteriormente en el grupo de investigación en los estudios de remediación del simulante de agente nervioso DCNP y que se han descrito en la introducción,

(Apartado 1.2.3), se decidió investigar la descomposición hidrolítica de los dos plaguicidas de la familia de los organotiofosfatos nombrados anteriormente (Figura 4.1) utilizando aminoalcoholes como organocatalizadores; en concreto etanolamina (XIII) y 2-(2-aminoetilamino)-etanol (L), que fue el que mejor resultados dio frente a la hidrólisis de simulantes de agentes nerviosos previamente estudiada (Figura 4.2).³⁴

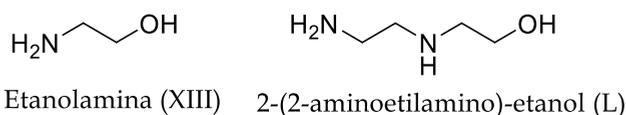


Figura 4.2. Estructura de los aminoalcoholes ensayados como organocatalizadores.

Los ensayos de ruptura hidrolítica de los plaguicidas se llevaron a cabo en mezclas $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ (95:5) a 25°C , con el fin de poder estudiar directamente las reacciones por resonancia magnética nuclear de protón y de fósforo-31 (^1H y ^{31}P -RMN) siendo este último de gran importancia, ya que el fósforo tiene un desplazamiento químico (δ) muy distinto según entorno químico.⁵²

Previamente a los estudios con aminoalcoholes y con el fin de obtener una identificación de todos los productos de hidrólisis de los plaguicidas, se decidió utilizar una base fuerte como el hidróxido de tetrabutilamonio (TBAOH) para la ruptura hidrolítica de éstos. En la literatura, se encuentran ejemplos de rupturas hidrolíticas de compuestos organofosforados mediante el uso de bases fuertes, así

⁵² a) A. J. Burn, S. K. Dewan, I. Gosney, P. S. G. Tan, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1990**, 2, 753. b) V. K. Balakrishnan, J. M. Dust, G. W. van Loon, E. Buncel, *Can. J. Chem.*, **2001**, 79, 157. c) V. K. Balakrishnan, E. Buncel, G. W. van Loon, *Environ. Sci. Technol.*, **2005**, 39, 5824. d) A. Mazumder, A. Kumar, A. K. Purohit, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2012**, 402, 1643.

como la caracterización de estos subproductos por ^{31}P -RMN (Figura 4.3).⁵³

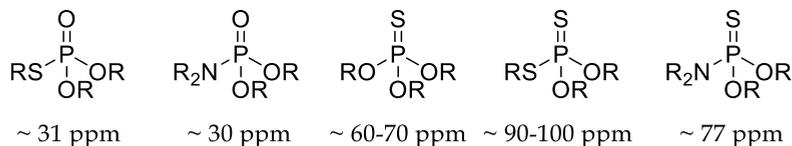


Figura 4.3. Intervalos de desplazamientos químicos en ^{31}P -RMN para diversos compuestos organofosforados.⁵³

Los resultados obtenidos con TBAOH mostraron que Azinphos-methyl se hidrolizaba dando unos subproductos fácilmente identificables, por lo que se decidió estudiar en profundidad este plaguicida.

El espectro de ^1H -RMN mostró que se había hidrolizado la mayor parte del plaguicida en presencia de un exceso de TBAOH (5 eq) tras 24 h. Esto se confirmó con el espectro de ^{31}P -RMN en el cual vimos cuatro señales nuevas, además de la del Azinphos-methyl a 94,7 ppm. Estos desplazamientos se han atribuido a las especies de fósforo que se muestran a continuación (Figura 4.4).

⁵³ a) R. D. Mortimer, B. A. Dawson., *J. Agric. Food Chem.* **1991**, 39, 911. b) I. S. Koo, D. Ali, K. Yang, Y. Park, A. Esbata, G. W. vanLoon, E. Buncel., *Can. J. Chem.* **2004**, 87, 433. c) S. O. Pehkonen, Q. Zhang., *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **2010**, 32, 2002. d) E. Dyguda-Kazimierowicz, S. Roszak, W. A. Sokalski., *J. Phys. Chem. B*, **2014**, 118, 7277. e) R. Sharma, B. Gupta, T. Yadav, S. Sinha, A. K. Sahu, Y. Karpichev, N. Gathergood, J. Marek, K. Kuca, K. K. Ghosh., *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2016**, 4, 5952.

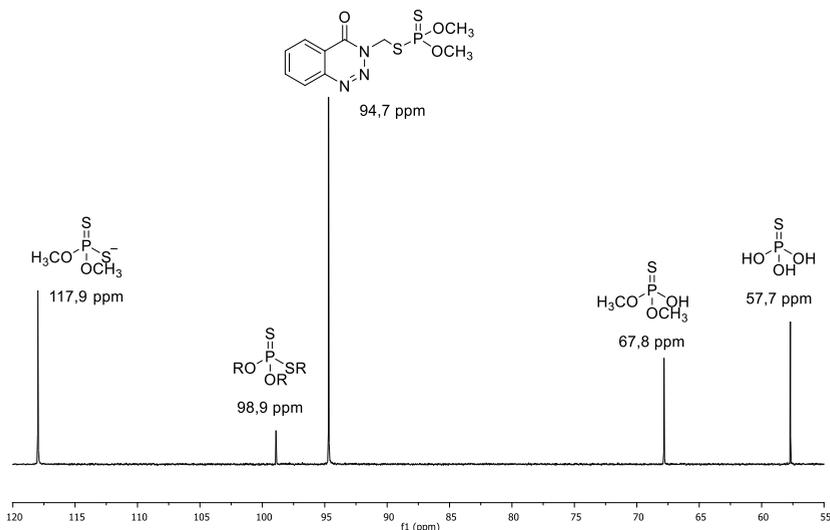


Figure 4.4. Productos de hidrólisis y desplazamiento químico en ^{31}P -RMN en ppm.

A continuación, se estudió el efecto de la etanolamina (**XIII**) y 2-(2-aminoetilamino)-etanol (**L**) como posibles organocatalizadores en la hidrólisis del Azinphos-methyl. Las mezclas de reacción se prepararon en tubos de RMN, introduciendo las disoluciones de concentración conocida del plaguicida ($5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$) más el aminoalcohol correspondiente a diferentes proporciones (0,1 eq, 1 eq, 5 eq y 10 eq). Pasadas las 24 h, registraron los espectros de ^1H y ^{31}P -RMN. Se observó que la degradación del plaguicida frente al ligando **L** era mayor que frente etanolamina en todas las proporciones estudiadas. Así mismo, se observó que la concentración óptima de aminoalcohol para la hidrólisis del plaguicida era de 1 equivalente.

En el espectro de ^1H -RMN del Azinphos-methyl en $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ (95:5) se puede ver el doblete característico del metileno (debido a su acoplamiento con el átomo de fósforo) a un desplazamiento químico de 5,41 ppm ($J = 15 \text{ Hz}$) (Figura 4.5).

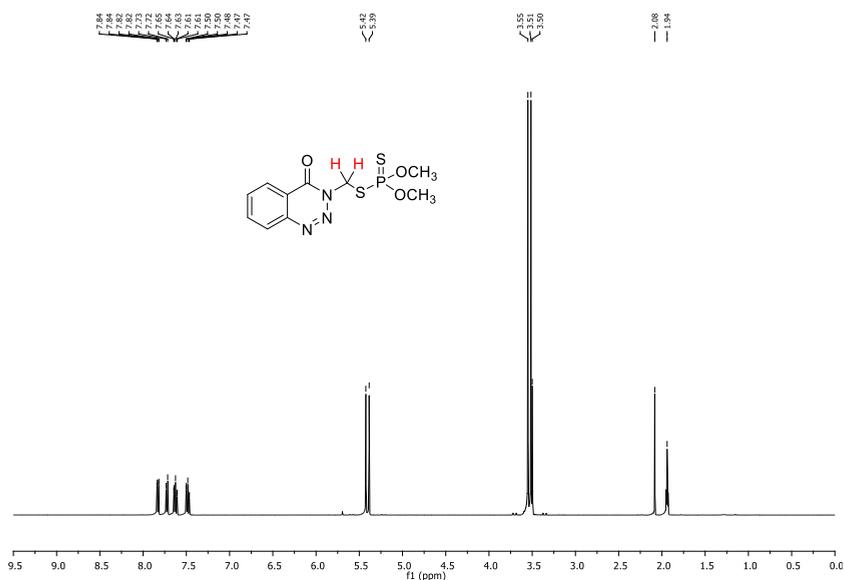


Figura 4.5. Espectro de ¹H-RMN del Azinphos-methyl en CD₃CN:D₂O (95:5).

Después de someter el plaguicida a la presencia de **L**, este metileno característico se desdobló en un doble cuadruplete con un desplazamiento químico entre 5,41-5,26 ppm (Figura 4.6). Pensamos que este desdoblamiento de la señal era debido a la adición del aminoalcohol **L** al fósforo (y eliminación de metanol) lo que genera un centro quiral en el plaguicida.

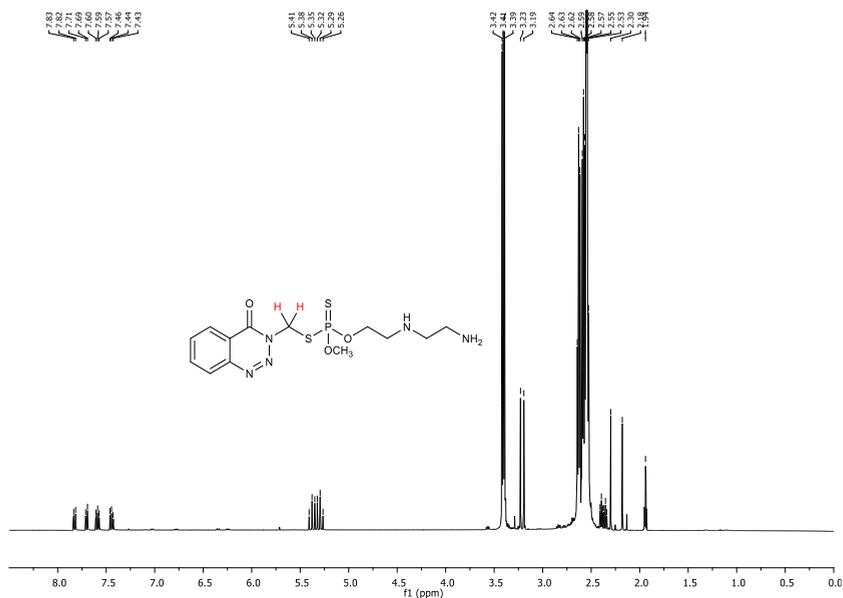


Figura 4.6. Espectro de ^1H -RMN del Azinphos-methyl tras reaccionar con el aminoalcohol **L** en $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ (95:5) y propuesta del posible producto de reacción.

Por otro lado, el espectro de ^{31}P -RMN mostró la completa desaparición de la señal a 94,7 ppm, correspondiente al Azinphos-methyl y la aparición de dos nuevos picos a 91,8 y 67,9 ppm que podrían corresponder al producto de sustitución de un grupo metoxi por **L** y al producto de hidrólisis del plaguicida (sustitución de un MeO- por un hidroxilo).

Los resultados obtenidos parecen indicar que, la ruptura hidrolítica se produce por el enlace P-O (en lugar del P-S) del plaguicida y es conocido que los subproductos correspondientes son altamente tóxicos.⁵⁴ Por ello, con objeto de favorecer la ruptura del enlace P-S y dar lugar a subproductos no tóxicos, se decidió estudiar el

⁵⁴ a) Y. C. Yang, L. L. Szafraniec, W. T. Beaudry., *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 6964. b) Y. C. Yang, F. J. Berg, L. L. Szafraniec, W. T. Beaudry, C. A. Bunton, A. Kumar., *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1997**, 2, 607.

uso de un complejo de oro con un aminoalcohol, dada la gran afinidad del oro por el azufre.⁵⁵

4.1.2. Estudios de remediación de plaguicidas organofosforados empleando un complejo de Au(III) con 2-(2-aminoetilamino)-etanol.

Con el fin de conseguir una ruptura hidrolítica del enlace P-S en los plaguicidas se decidió sintetizar un complejo con un metal de transición que tuviera gran afinidad por el átomo de azufre, como es el oro, utilizando como ligando el aminoalcohol **L**. En la bibliografía hay descritos algunos ejemplos de uso de cationes metálicos para catalizar la hidrólisis de tiofosfatos,⁵⁶ pero no tenemos constancia de ejemplos en los que se empleen ditiofosfatos como es el caso de los plaguicidas que nos proponíamos estudiar. Se decidió sintetizar un complejo de Au(III) que tiene la ventaja adicional de que al ser diamagnético se puede estudiar por resonancia magnética nuclear. Dada la gran afinidad del oro por el azufre, su unión con el plaguicida debería favorecer el carácter de grupo saliente del tiolato, además de mejorar la electrofilia del átomo de fósforo.⁵⁷

➤ **Síntesis del complejo de Au(III).**

La síntesis del complejo $[\text{AuLCl}_2]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**13**) entre el Au(III) y el ligando 2-(2-aminoetilamino)-etanol (**L**) se realizó por simple

⁵⁵ a) R. L. Whetten, R. C. Price, *Science*, **2007**, *318*, 407. b) C. Vericat, M. E. Vela, G. Benitez, P. Carro, R. C. Salverezza., *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1805. c) E. Pensa, E. Cortés, G. Corthey, P. Carro, C. Vericat, M. H. Fonticelli, G. Benítez, A. A. Rubert, R. C. Salverezza., *Acc. Chem. Rev.*, **2012**, *45*, 1183.

⁵⁶ a) J. M. Smolen, A. Stone., *Environ. Sci. Technol.*, **1997**, *31*, 1664. b) M. Wyer, G. W. vanLoon, J. M. Dust, E. Buncel., *Can. J. Chem.*, **2015**, *93*, 1266.

⁵⁷ T. Zou, C. T. Lum, S. S. T. Chui, C. M. Che., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *52*, 2930.

mezcla de la correspondiente sal del metal, en este caso tetracloroaurato (III) de sodio dihidrato ($\text{NaAuCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) con el ligando **L** en etanol absoluto (EtOH) a temperatura ambiente. Seguidamente el sólido resultante se purificó por recristalización en EtOH obteniéndose el complejo deseado con un buen rendimiento (69%), tal y como se describe en la bibliografía para la preparación de complejos semejantes de Au(III) con diaminas (Figura 4.7).⁵⁸

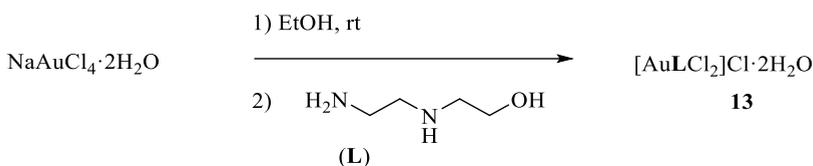


Figura 4.7. Síntesis del complejo $[\text{AuLCl}_2]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

➤ Estudios de remediación.

Se realizaron los estudios de remediación con los plaguicidas Azinphos-methyl y Methidathion en presencia de cantidades equimoleculares del complejo $[\text{Au}(\text{L})\text{Cl}_2]\text{Cl}$ en $\text{CD}_3\text{OD}:\text{D}_2\text{O}$ (9:1). Se utilizó esta mezcla de disolventes debido a la buena solubilidad del complejo de oro en disolventes alcohólicos.

❖ Ensayos de remediación del Azinphos-methyl.

Se disolvieron en una mezcla de $\text{CD}_3\text{OD}:\text{D}_2\text{O}$ (9:1) el plaguicida y el complejo de oro en proporciones equimoleculares. Se observó que la disolución resultante era turbia. La mezcla de reacción se calentó en un baño de agua a 50-60°C hasta completa disolución, formándose una disolución amarilla transparente. Al cabo de unos 5-10 min, se observó

⁵⁸ S. Zhu, W. Gorski, D. Powell, J.A. Walmsley., *Inorg. Chem.* **2006**, 45, 2688. b) A. B. Al-Maythalony, M. I. M. Wazeer, A. I. Anvarhusein., *Inorganica Chimica Acta*, **2009**, 362, 3109.

la aparición de un precipitado de color marrón claro. Se dejó a temperatura ambiente durante 12 h. Seguidamente, se separó la disolución incolora transparente del sólido marrón claro por filtración y se registraron los espectros de resonancia de la disolución incolora transparente, tanto de ^1H -RMN como de ^{31}P -RMN.

En los espectros que se registraron se observó que la fracción soluble en $\text{CD}_3\text{OD}:\text{D}_2\text{O}$ (9:1) estaba formada principalmente por Azinphos-methyl y por el complejo de oro (Figura 4.8). Sin embargo, la proporción de complejo de oro había aumentado con respecto al plaguicida. Ello implicaba que una parte significativa del plaguicida habría pasado a formar parte del sólido, bien como producto de hidrólisis o bien formando algún otro derivado insoluble.

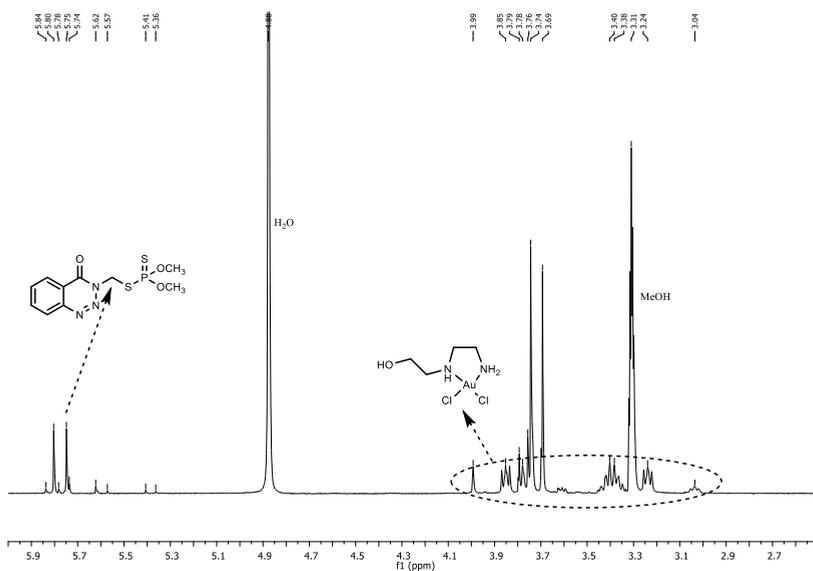


Figura 4.8. Espectro de ^1H -RMN de la fracción en disolución de la mezcla del Azinphos-methyl más el complejo $[\text{Au}(\text{L})\text{Cl}_2]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en $\text{CD}_3\text{OD}:\text{D}_2\text{O}$ (9:1).

Por otro lado, el espectro de ^1H -RMN de la fracción correspondiente al sólido se registró en $\text{DMSO-}d_6$ (debido a la escasa

solubilidad del sólido). En este caso, se obtuvieron señales correspondientes a dos compuestos orgánicos diferentes, el Azinphos-methyl de partida (minoritario), en el que el metileno aparecía a $\delta = 5,72$ ppm ($J = 15$ Hz) y otro subproducto, que fue asignado como 3-(mercaptometil)benzo[d][1,2,3]triazin-4(3H)-ona (XIV), donde el enlace $-\text{CH}_2-\text{S}-$ aparecía como un singulete a $\delta = 5,62$ ppm (Figura 4.9). Se calculó que, en el sólido, la proporción entre Azinphos-methyl y el tiol era aproximadamente 40:60.

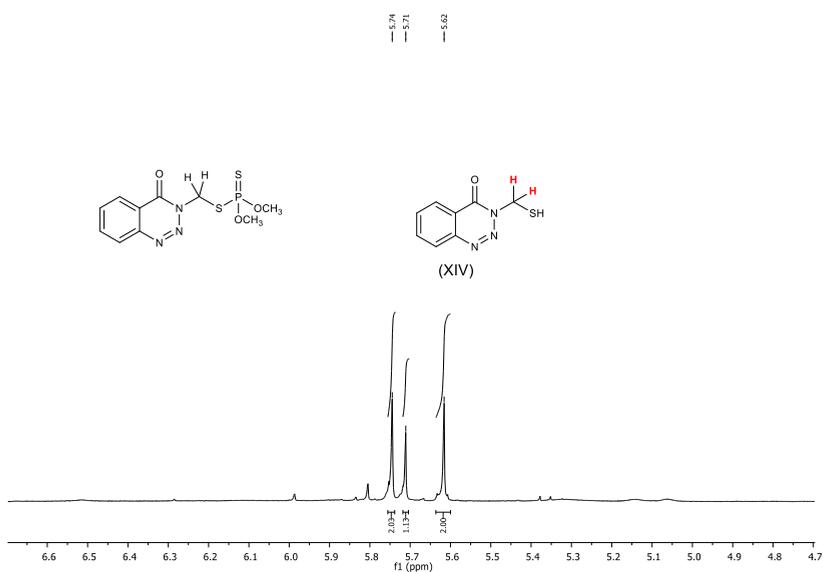


Figura 4.9. Espectro de ¹H-RMN (DMSO-d₆) de la fracción sólida obtenida de la reacción entre el Azinphos-methyl y el complejo [Au(L)Cl₂]Cl · 2H₂O.

❖ Ensayos de remediación del Methidathion.

Para los estudios de remediación con el Methidathion se procedió del mismo modo que en el caso del Azinphos-methyl. Se disolvió el plaguicida Methidathion y el complejo de oro en una disolución de CD₃OD:D₂O (9:1). A continuación, la disolución se

calentó en un baño de agua a 50–60°C y se observó la aparición de un precipitado de color marrón oscuro en menos de 30 segundos.

Asombrados por la rapidez en la que se produjo la hidrólisis decidimos repetir el experimento a temperatura ambiente. Se preparó de forma idéntica una nueva disolución y en este caso, se agitó durante unos 2-4 min. a temperatura ambiente. Como en el caso anterior, apareció un precipitado de color marrón oscuro y una disolución incolora transparente. El sólido se separó por filtración y se registraron los espectros de resonancia de ^1H y ^{31}P -NMR tanto de la fracción sólida como de la fracción hidroalcohólica.

En el espectro de ^1H -RMN de la fracción soluble se observó que, el doblete característico del plaguicida Methidathion (Figura 4.10a), debido a su acoplamiento con el fósforo, a un $\delta = 5,19$ ppm ($J = 18$ Hz), había desaparecido casi por completo. Además, se observó la presencia de dos nuevos singuletes procedentes de dos productos de hidrólisis nuevos a unos desplazamientos químicos de 5,16 y 5,09 ppm (Figura 4.10b). Estas nuevas señales se pueden asignar a los metilenos de los compuestos **XV** y **XVI**, presentes en la disolución en una proporción de 5:1. Además, la relación entre los productos hidrolizados **XV** y **XVI** *versus* Methidathion fue mayor al 80%.

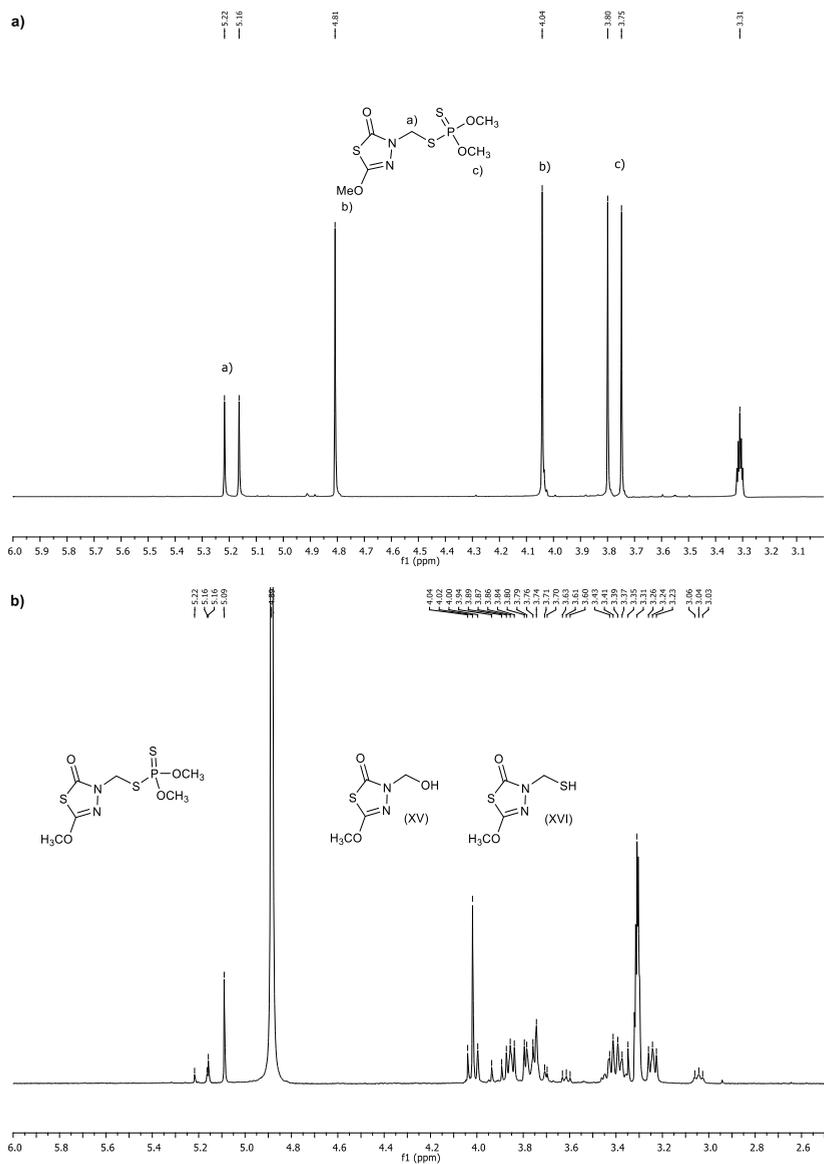


Figura 4.10. a) Espectro de ^1H -RMN del Methidathion en $\text{CD}_3\text{OD}:\text{D}_2\text{O}$ (9:1) y b) Espectro de ^1H -RMN del Methidathion más el complejo $[\text{Au}(\text{L})\text{Cl}_2]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en $\text{CD}_3\text{OD}:\text{D}_2\text{O}$ (9:1).

Por otro lado, los espectros de ^{31}P -RMN de la misma fracción soluble de la reacción mostraron dos señales distintas. Una de ellas a un desplazamiento químico de 98,15 ppm y que corresponde al

plaguicida Methidathion y una segunda señal a 27,78 ppm y que se puede atribuir al compuesto dimetiltiofosfato -SH (XVII). Por otro lado, también se observó una señal ancha, minoritaria, a 45,90 ppm, que se atribuyó a la presencia de una pequeña cantidad del tautómero dimetiltiofosfato -OH (XVIII) (Figura 4.11).⁵⁹

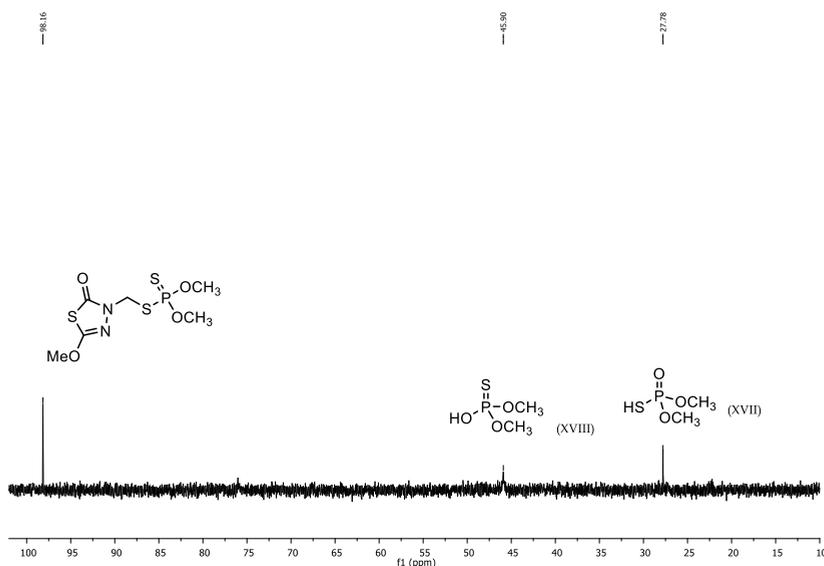


Figura 4.11. Espectro ^{31}P -RMN del Methidathion más el complejo $[\text{Au}(\text{L})\text{Cl}_2]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en $\text{CD}_3\text{OD}:\text{D}_2\text{O}$ (9:1).

Por otro lado, considerando que en el espectro de ^{31}P -RMN no se observó ninguna señal con un desplazamiento químico alrededor de 90 ppm (característica de dimetildifosfonatos, Figura 4.3), se puede concluir que durante el mecanismo de hidrólisis no se produce la ruptura del enlace C-S.⁶⁰ En consecuencia, el compuesto XV debería

⁵⁹ R. S. Edmundson, F. R. Hartley, ed., *The Chemistry of Organophosphorus Compounds*, Vol. 4, John Wiley & Sons Inc., Chichester, **1996**, p. 298.

⁶⁰ A. J. Burn, S. K. Dewan, I. Gosney, P. S. G. Tan, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1990**, 2, 753.

originarse a partir del compuesto **XVI** a través de una reacción de sustitución mediada por el oro (Figura 4.12).

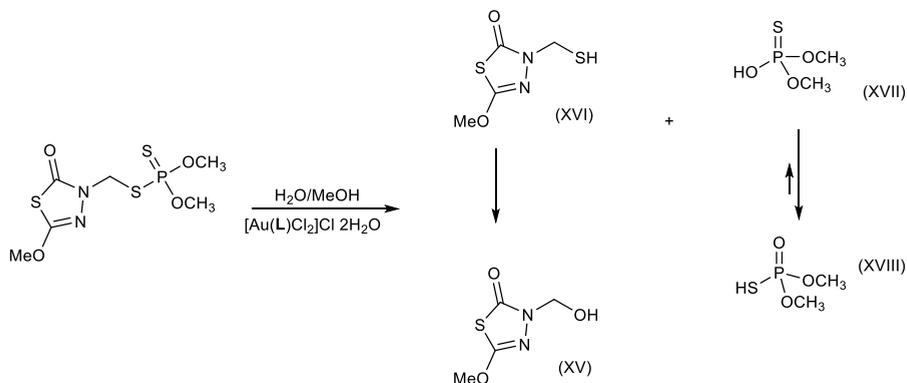


Figura 4.12. Productos de hidrólisis del Methidathion.

La integración de las señales en los espectros de ^1H -RMN del Methidathion mostró que la relación entre los compuestos **(XV + XVI)** / **XVIII** era alrededor de 1,5. Este resultado indica que parte del compuesto **XVIII** debía estar en el sólido amorfo previamente aislado. Debido a la alta insolubilidad de este sólido no se pudo registrar ningún espectro de RMN. Sin embargo, sí que se pudo estudiar por espectrometría de masas (ESI) y por análisis de rayos X de energía dispersiva (EDXA) para tener información sobre la composición del sólido. En base a los datos obtenidos (pico de MS a 583 uma. y la presencia de los elementos S, P y Au), uno de los posibles componentes del sólido podría ser el compuesto **XIX** (Figura 4.13). En la literatura se pueden encontrar ejemplos de complejos formados por dialquiltiofosfatos y diferentes cationes metálicos con una estructura semejante.⁶¹

⁶¹ M. Wyer, Metal ion promoted hydrolysis of the organophosphorus pesticide, diazinon, Master Thesis, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada, 2008, <http://hdl.handle.net/1974/1009>.

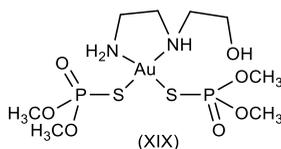


Figura 4.13. Estructura propuesta para el sólido aislado.

A partir de estos resultados obtenidos se decidió realizar un estudio por espectrometría de masas (ESI) del sobrenadante de cada uno de los plaguicidas para ver la existencia de las especies hidrolizadas por el enlace P-S.

Para el plaguicida Azinphos-methyl, se observó que el pico base correspondía al ion molecular del plaguicida ($m/z = 339,9$). También se encontraron fragmentos procedentes de la hidrólisis a m/z de 216,9 (XIV) y 165,9 (XVIII) uma. como se muestra la siguiente imagen (Figura 4.14).

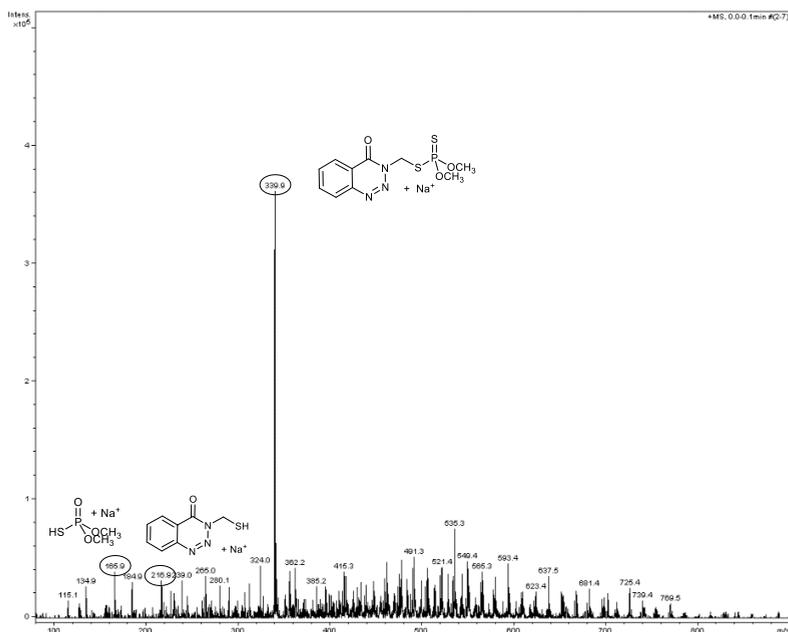


Figura 4.14. Espectro de masas de la fase líquida del plaguicida Azinphos-methyl más el complejo $[Au(L)Cl_2]Cl \cdot 2H_2O$.

Para el plaguicida Methidathion se observaron los picos de 304, 201, 184 y 165 una correspondientes al Methidathion, $[\text{XVI} + \text{Na}]^+$, $[\text{XV} + \text{Na}]^+$ y al $[\text{XVIII} + \text{Na}]^+$ respectivamente (Figura 4.15).

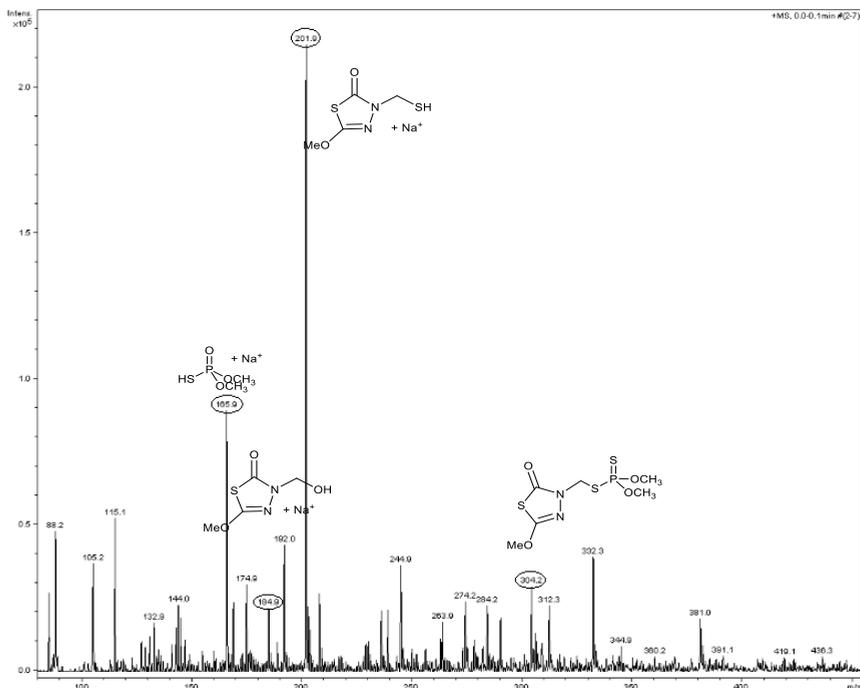


Figura 4.15. Espectro de masas del Methidathion en la fase líquida más el complejo $[\text{Au}(\text{L})\text{Cl}_2]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Finalmente, la hidrólisis del enlace P-S también se demostró mediante la detección del grupo tiol libre (procedente del plaguicida) por reacción con un sensor fluorescente de tioles: el éster etílico de 2,4-dinitrobenzenosulfonil fluoresceína (**14**), descrito en la literatura.⁶²

La sonda fluorogénica **14** prácticamente no es fluorescente en disolución (10^{-5} M) de acetonitrilo ($\Phi = 0,02$). Sin embargo, tras la

⁶² H. Maeda, H. Matsuno, M. Ushida, K. Katayanna, K. Daeki, N. Itoh., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 2922.

adición del plaguicida Methidathion previamente hidrolizado con el complejo de oro, se observó un incremento significativo de la fluorescencia a $\lambda_{em} = 485 \text{ nm}$ ($\Phi = 0,33$) al excitar a $\lambda_{ex} = 430 \text{ nm}$. Esto es debido a que en el medio de reacción se libera, después de reaccionar con el tiol (XVI), el éster etílico de la fluoresceína (XX), provocando la aparición de la fluorescencia (Figura 4.16).

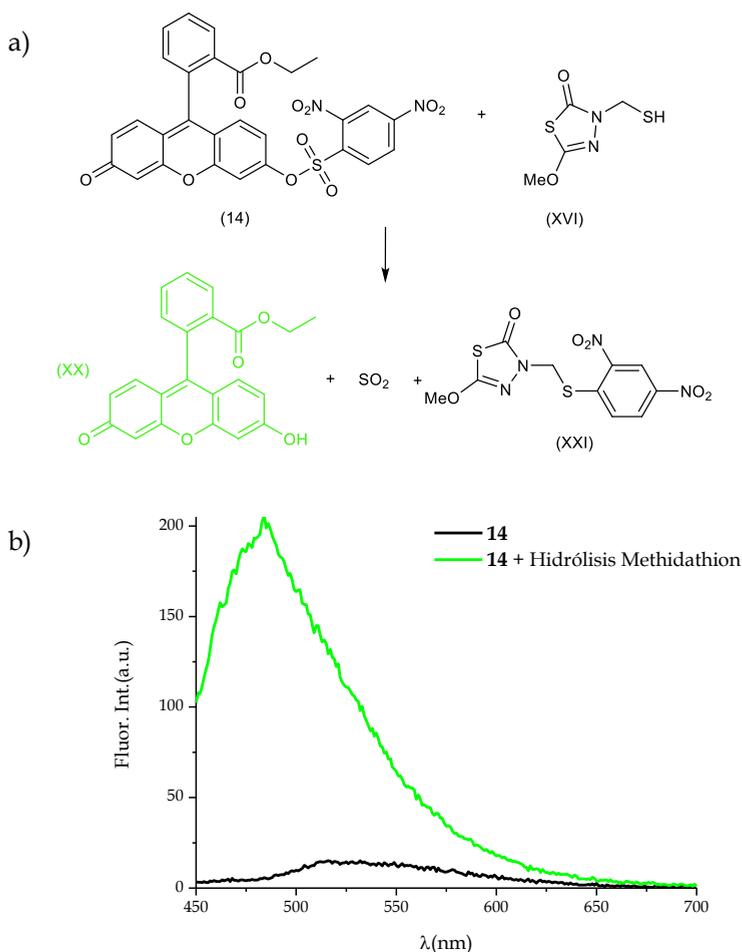


Figura 4.16. a) Detección selectiva del tiol XV y aparición de la fluorescencia debido al compuesto XX. b) Espectro de fluorescencia ($\lambda_{ex} = 430 \text{ nm}$) para el compuesto **14** (10^{-5} M en CH_3CN) antes (línea negra) y después de la adición del complejo $[\text{Au}(\text{L})\text{Cl}_2]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ más Methidathion en $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (línea verde).

Se realizaron numerosos experimentos de control para asegurar que la señal de fluorescencia fuera debida a la reacción del grupo tiol liberado (**XVI**) (después de la ruptura del enlace P-S) con el sensor **14** y no por otras especies posibles en disolución. Para ello, se registró la fluorescencia de la sonda en presencia de los plaguicidas (Methidathion y Azinphos-methyl), para el complejo de oro y para el ácido tioacético. Como podemos ver en la Figura 4.17 y 4.18, solo en la presencia de los productos resultantes de la reacción de los plaguicidas con el complejo de Au(III) (generando tioles libres) se produce un aumento de emisión de fluorescencia, mientras que para el resto de compuesto no se observa emisión de fluorescencia.

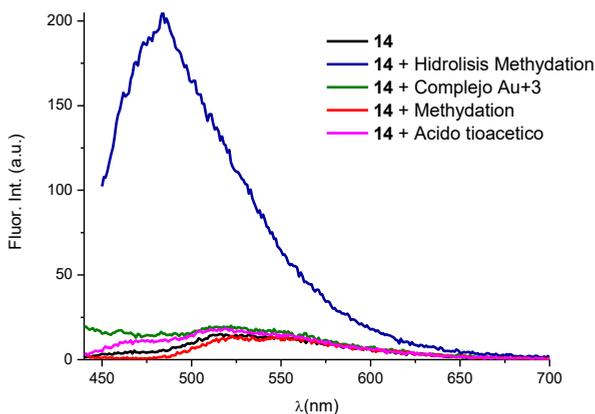


Figura 4.17. Espectro de emisión de fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}} = 430 \text{ nm}$) para el sensor **14** (10^{-5} M) únicamente (línea negra) y en presencia de Methidathion hidrolizado (línea azul), complejo Au^{+3} (línea verde), Methidathion (línea roja) y para el ácido tioacético (línea rosa).

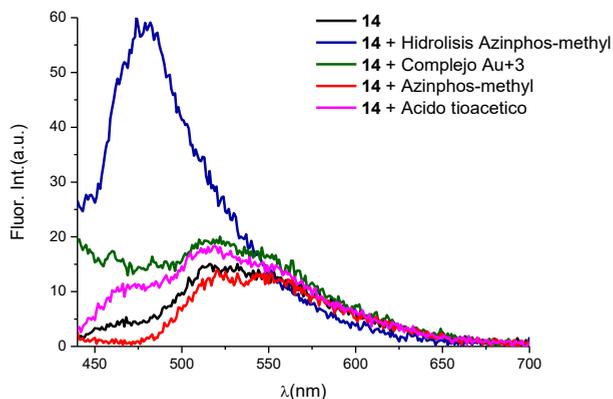


Figura 4.18. Espectro de emisión de fluorescencia (λ_{ex} = 430 nm) para el sensor **14** (10^{-5} M) únicamente (línea negra) y en presencia del Azinphos-methyl hidrolizado (línea azul), complejo Au⁺³ (línea verde), Azinphos-methyl (línea roja) y para el ácido tioacético (línea rosa).

Los estudios de fluorescencia nos confirmaron que en la fracción hidroalcohólica del Methidathion presentaba un mayor porcentaje de producto hidrolizado que la fracción correspondiente al Azinphos-methyl (Figura 4.19).

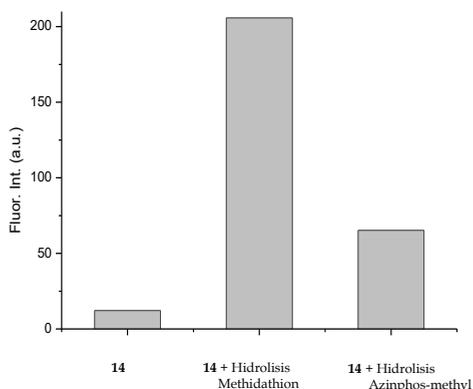


Figura 4.19. Respuesta fluorescente del sensor **14** con Methidathion y Azinphos-methyl después de 5 min de la adición del complejo de Au(III).

4.2. CONCLUSIONES.

Para finalizar, podemos decir que se ha sintetizado un complejo de Au⁺³ con un diaminoalcohol L que es capaz de promover la ruptura hidrolítica del enlace P-S de forma selectiva en los plaguicidas organofosforados Azinphos-methyl y Methidathion, dando lugar al correspondiente tiol y dimetiltiofosfato. Durante el proceso de degradación, se generó un sólido amorfo y altamente insoluble. Los resultados preliminares obtenidos en estos experimentos sugieren que el sistema es útil para la degradación de los OP de la familia de los organotiofosfatos. Cabe destacar que es necesario desarrollar nuevos complejos metálicos con otros cationes para obtener sistemas parecidos a este, pero con un menor coste.

4.3. PARTE EXPERIMENTAL

Todos los reactivos, disolventes y materiales de partida usados, fueron adquiridos comercialmente (Sigma-Aldrich) sin necesidad de una previa purificación. Los espectros de ¹H y ³¹P-RMN se registraron en un espectrómetro de resonancia magnética nuclear, Bruker AV 500 de RMN ¹H (500 MHz). Todas las mediciones se llevaron a cabo utilizando el pico de disolvente residual como referencia interna. Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se registraron en el modo de iones positivos en un espectrómetro AB SCIEX TripleTOF™ 5600 LC/MS. Los espectros de fluorescencia se registraron utilizando un espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse.

4.3.1. Síntesis del complejo de Au(III).

[Au(L)Cl₂]Cl · 2H₂O (13): NaAuCl₄ · 2H₂O (218 mg, 0.548 mmol) se disolvió en 19,5 mL de EtOH absoluto a temperatura ambiente. A continuación, se adicionó 0,5 mL de 2-(2-aminoetilamino) etanol (L) (1 M) y se agitó durante 20 min. El sólido naranja-marrón resultante se separó por filtración. Seguidamente, se purificó mediante recristalización en EtOH absoluto, dando lugar a un sólido amarillo correspondiente al complejo **13** deseado (175 mg; 79%).

¹H-NMR (500,1 MHz, CD₃OD), δ (ppm) 3,85 (m, 2H), 3,45-3,36 (m, 4H), 3,25(t, J = 5 Hz, 10 Hz, 2H).

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD), δ (ppm) 57,8, 51,8, 45,5, 36,8.

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para C₄H₁₂AuCl₂N₂O; 372,0065 [M+H]⁺; encontrada 371,1008.

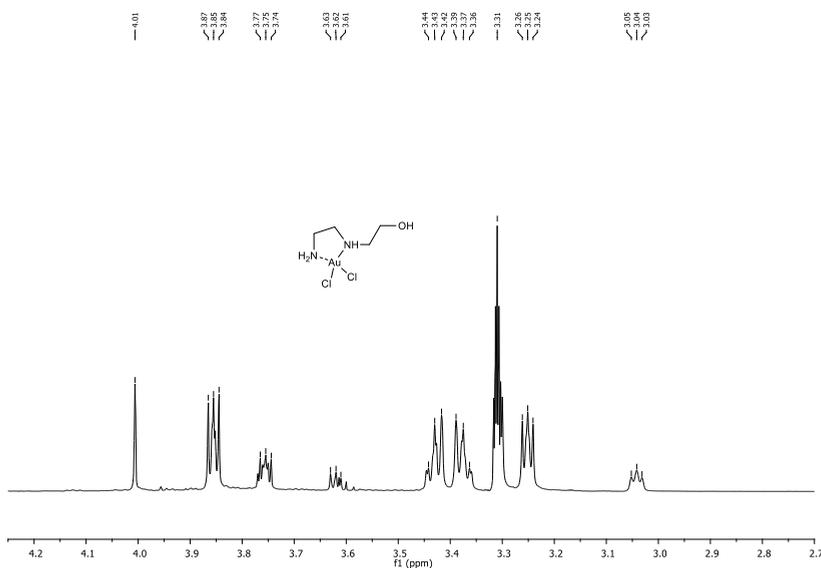


Figura 4.20. ¹H-RMN del complejo [Au(L)Cl₂]Cl · 2H₂O en CD₃OD.

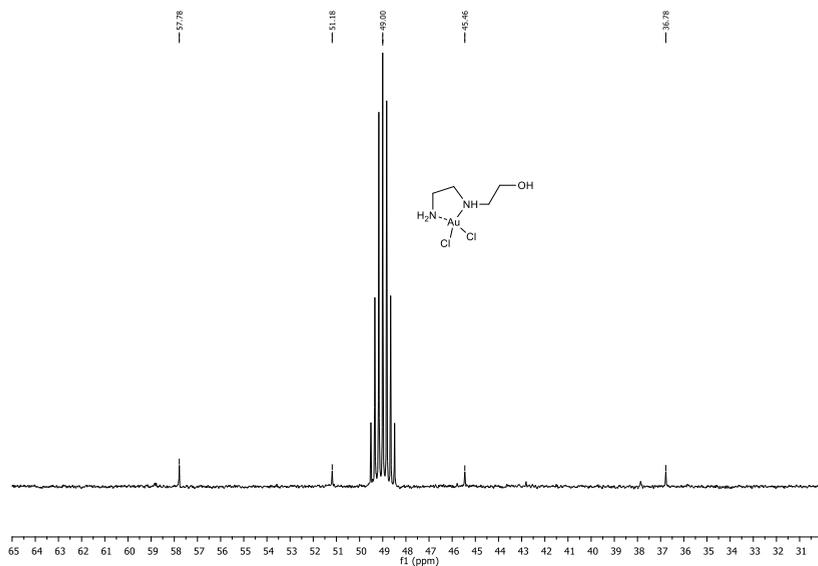


Figura 4.21. ^{13}C -RMN del complejo $[\text{Au}(\text{L})\text{Cl}_2]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en CD_3OD .

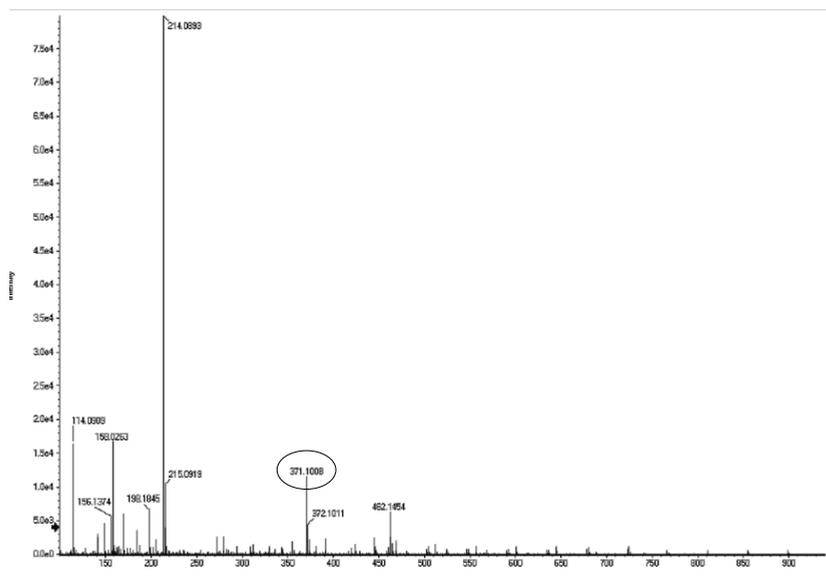


Figura 4.22. Espectro de masas del complejo $[\text{Au}(\text{L})\text{Cl}_2]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (ESI+).

4.3.2. Síntesis del derivado de fluoresceína (14).

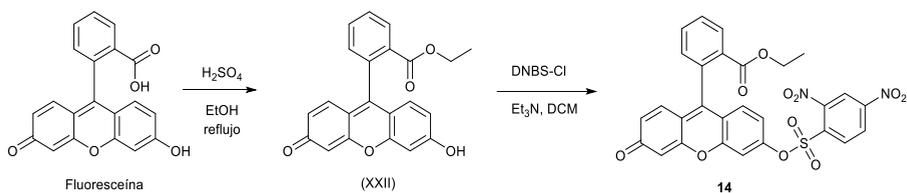


Figura 4.20. Secuencia sintética del sensor 14.

Fluoresceinato de etilo (XXII): En un matraz de fondo redondo (50 mL) provisto de un imán se disolvió fluoresceína (1 g, 3,01 mmol) en 20 mL de EtOH a temperatura ambiente. A continuación, se adicionó H_2SO_4 (1,5 mL) gota a gota. La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 18 h. Se evaporó el disolvente y la mezcla de reacción se diluyó en CHCl_3 . A continuación, se adicionó NaHCO_3 (s) hasta completa neutralización. La mezcla de reacción se filtró, se extrajo la fase orgánica y se evaporó el disolvente orgánico. El sólido resultante se recristalizó en EtOH, obteniéndose el compuesto **XXI**, un sólido cristalino de color naranja-marrón (920 mg; 93%).

$^1\text{H-NMR}$ (500,1 MHz, CD_3OD , δ (ppm) 8,31 (dd, $J = 7,8, 1,3$ Hz, 1H), 7,87 (td, $J = 7,5, 1,6$ Hz, 1H), 7,80 (td, $J = 7,6, 1,5$ Hz, 1H), 7,46 (dd, $J = 7,4, 1,3$ Hz, 1H), 7,06 (s, 1H), 7,03 (s, 1H), 6,78 (d, $J = 2,1$ Hz, 2H), 6,74 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H), 6,71 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H), 4,03 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H), 0,95 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H).

Compuesto 14: En un matraz de fondo redondo (20 mL) provisto de un imán se disolvió el compuesto **a** (108 mg, 0,3 mmol) y cloruro de 2,4-dinitrobenzenosulfonilo (240 mg, 0,9 mmol) en 10 mL de CH_2Cl_2 . Se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Se evaporó el disolvente y el crudo de la reacción se purificó por columna

[Au(L)Cl₂]Cl·2H₂O (10,0 mg, 2,5·10⁻² mmol) a la disolución. Inmediatamente después se observó la aparición de un sólido amorfo de color marrón oscuro (7,7 mg). El sólido se separó por filtración, y la disolución resultante se transfirió a tubos de RMN para la adquisición de los correspondientes espectros (Figuras 4.22, 4.23, 4.24 y 4.25).

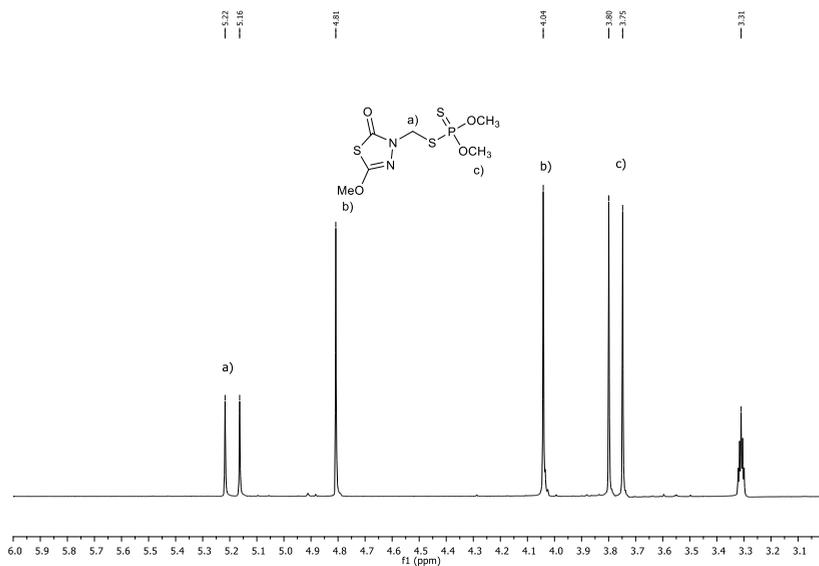


Figura 4.22. Espectro ¹H-RMN del plaguicida Methidathion en CD₃OD.

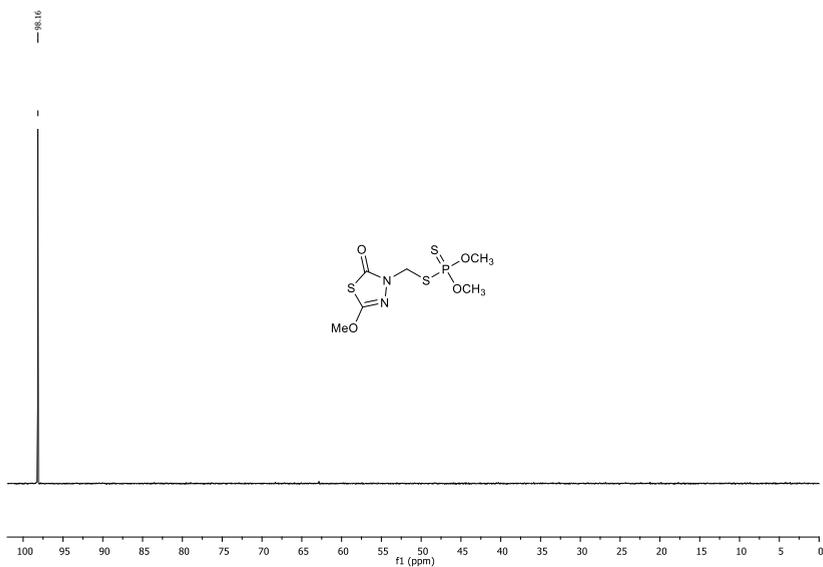


Figura 4.23. Espectro ^{31}P -RMN del plaguicida Methidathion en CD_3OD .

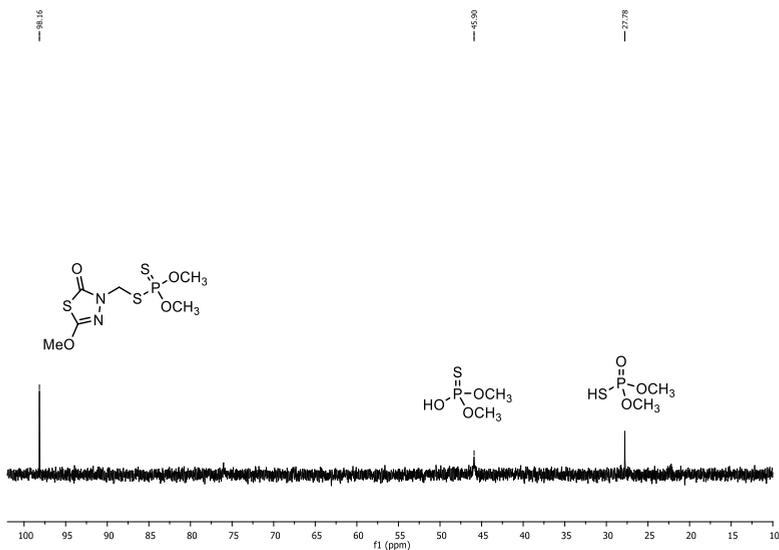


Figura 4.24. Espectro ^{31}P -RMN de la fracción hidroalcohólica del plaguicida Methidathion más el complejo $[\text{Au}(\text{L})\text{Cl}_2]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en $\text{CD}_3\text{OD}:\text{D}_2\text{O}$ (9:1).

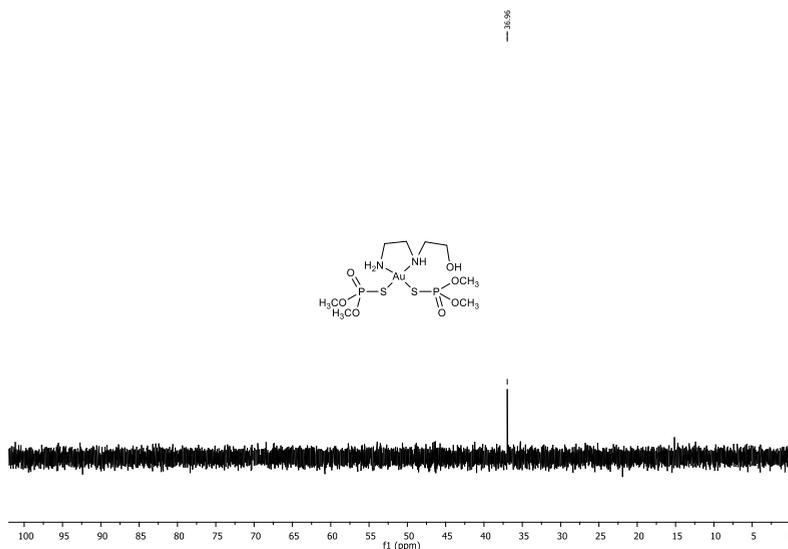


Figura 4.25. Espectro ^{31}P -RMN de la fracción sólida procedente del sólido amorfo después de la hidrólisis con el complejo $[\text{Au}(\text{L})\text{Cl}_2]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en DMSO-d_6 .

➤ **Remediación de Azinphos-methyl.**

Se disolvió Azinphos-methyl (7,9 mg, $2,5 \cdot 10^{-2}$ mmol) en 0,5 mL de $\text{CD}_3\text{OD:D}_2\text{O}$ (9:1). A continuación, se adicionó el complejo Au^{+3} (10,0 mg, $2,5 \cdot 10^{-2}$ mmol). La mezcla de reacción se calentó en un baño de agua a $50\text{-}60^\circ\text{C}$ hasta completa disolución, obteniéndose una disolución amarilla transparente. Tras 12 h a temperatura ambiente apareció un precipitado que se separó por filtración (7,3 mg). La fracción soluble en $\text{CD}_3\text{OD:D}_2\text{O}$ se estudió por RMN y se observó como ya hemos mencionado anteriormente, que estaba formada mayoritariamente por Azinphos-methyl y el complejo de oro (Figura 4.8). Por otro lado, el sólido amorfo se redisolvió en DMSO-d_6 y se estudió por RMN obteniéndose los correspondientes espectros (Figura 4.26, 4.27, 4.28 y 4.29).

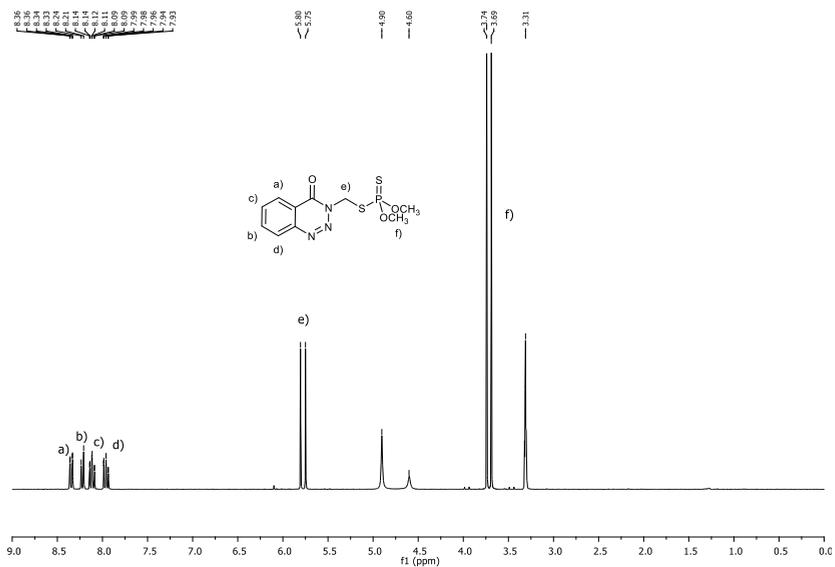


Figura 4.26. Espectro ^1H -RMN del plaguicida Azinphos-methyl en CD_3OD .

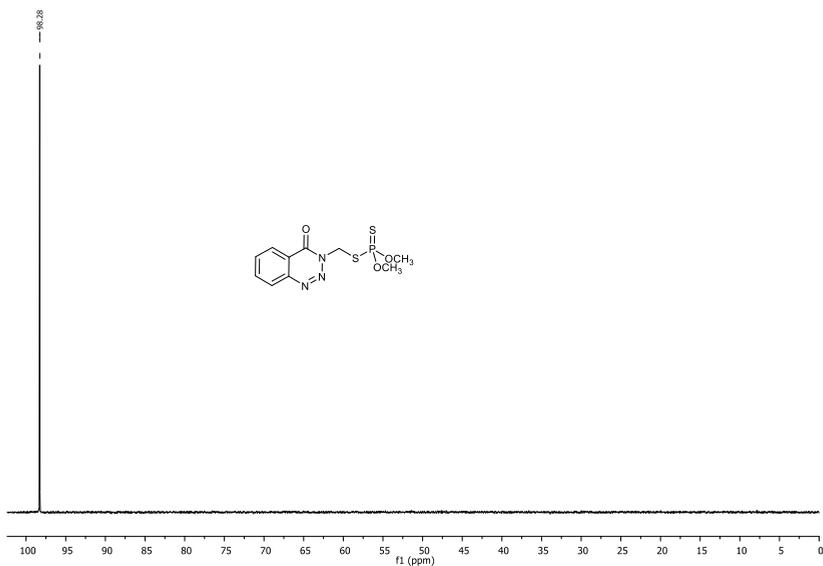


Figura 4.27. Espectro ^{31}P -RMN del plaguicida Azinphos-methyl en CD_3OD .

4.3.4. Estudios de fluorescencia.

Los rendimientos cuánticos fueron medidos a temperatura ambiente en atmosfera de N₂. Como referencia se eligió la fluoresceína 0,1 M en NaOH ($\Phi_F = 0,85$).⁶³ Los rendimientos cuánticos de fluorescencia se calcularon según la ecuación 4.1.⁶⁴ Donde F es la integral de la fluorescencia corregida, A es la absorbancia a la longitud de excitación, y n es el índice de refracción del medio de medida.

$$(4.1) \quad \Phi_{exp} = \Phi_{ref} \frac{F\{1 - \exp(-A_{ref} \ln 10)\}n^2}{F_{ref}\{1 - \exp(-A \ln 10)\}n_{ref}^2}$$

⁶³ K. G. Casey, E. L. Quitevis, *J. Phys. Chem.*, **1988**, 92, 6590.

⁶⁴ P. Didier, G. Ulrich, Y. Mely, R. Ziessel, *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, 7, 3639.

Conclusiones Parte 1

En el Capítulo 3, se ha demostrado que, mediante la utilización de una matriz colorimétrica compuesta por un total de doce sondas cromogénicas, fue posible la detección y discriminación de diferentes plaguicidas organofosforados en disoluciones acuosas. La matriz optoelectrónica basada en una placa de sílica gel en la cual se inmovilizaron, por una parte, de cromóforos "push-pull", los cuales, presentan grupos reactivos como, alcoholes, aminas y piridinas capaces de reaccionar con ciertos plaguicidas y, por otra parte, con compuestos capaces de coordinarse con los plaguicidas o con sus posibles productos de hidrólisis provocando, de este modo, un cambio de color. Gracias a estos cambios de color, se pudo discriminar y clasificar entre los diferentes plaguicidas, especialmente, se observó una clasificación clara para el Malathion, Leptophos, Dichlorvos, Dibrom y Diazinon. Además, se ha estudiado y demostrado la posibilidad de predecir concentraciones de Diazinon en presencia de otros plaguicidas como posibles interferentes (Chlorpyrifos y Parathion). Dando un paso más en las aplicaciones de estos sistemas, se ha comprobado que la matriz era capaz de predecir concentraciones de Diazinon en muestras reales, concretamente, en hojas de naranjo ecológico.

En el Capítulo 4, se ha demostrado la utilización de aminoalcoholes y sus complejos metálicos con oro como organocatalizadores para la remediación de plaguicidas organofosforados. En este aspecto, se ha comprobado que el complejo de oro (III) con el diaminoalcohol L fue capaz de promover la ruptura hidrolítica del enlace P-S de forma selectiva en los plaguicidas de la familia de los organotiofosfatos, como son, el Azinphos-methyl y Methidathion. Una vez demostrado que es posible hidrolizar estos plaguicidas, el siguiente paso sería desarrollar nuevos complejos

Conclusiones Parte 1

metálicos. Así, se podrían incluir, por ejemplo, otros cationes metálicos para obtener sistemas parecidos al descrito, pero con menor coste.

Parte 2. *Sistemas mesoporosos modificados para el transporte y liberación controlada de fármacos, colorantes y especies fluorescentes*

5. Introducción general

En esta introducción general se desarrollará brevemente el concepto de nanomateriales y nanotecnología para centrar la descripción, en los materiales de sílice mesoporosa, su síntesis y su funcionalización con moléculas orgánicas que actúan como puertas moleculares dando lugar a materiales híbridos orgánicos-inorgánicos con aplicaciones muy interesantes en el campo de la liberación controlada de fármacos, así como en el desarrollo de sensores moleculares cromó- y/o fluorogénicos.

5.1. NANOMATERIALES Y NANOTECNOLOGÍA.

Los nanomateriales y la nanotecnología surgieron y se consolidaron como un nuevo campo del conocimiento en los años 80 y 90 del siglo XX. Se considera que los padres de la nanotecnología han sido Richard Feynman, galardonado con el Premio Nobel de Física en 1965,⁶⁵ Norio Taniguchi, quien acuñó por primera vez el término “nanotecnología” en 1974,⁶⁶ y finalmente Eric Drexler quien publicó el primer libro sobre la nanotecnología molecular “*Engines of creation: the coming era of nanotechnology*” en 1986.⁶⁷ Desde este momento, se desarrolló y se popularizó un marco conceptual entorno a la nanotecnología y sus avances experimentales, capaces de actuar a nivel molecular o atómico. Algunos ejemplos que han permitido el desarrollo y avance de la nanotecnología al permitir el estudio/manipulación de la materia a nivel molecular o atómico son la invención del microscopio

⁶⁵ R. Feynman, *Caltech Engineering & Science* **1960**, 23, 22.

⁶⁶ N. Taniguchi, *Proc. Intl. Conf. Prod. Eng. Tokyo, Part II, Japan Society of Precision Engineering*, **1974**.

⁶⁷ E. Drexler. *The Coming Era of Nanotechnology*, Anchor Books, Doubleday, **1986**.

de efecto túnel (STM, *scanning tunneling microscopy*) en 1981 o el microscopio de fuerza atómica (AFM, *atomic force microscopy*) en 1986 desarrollados por Gerd Binnig, quién fue galardonado este mismo año con el Premio Nobel de Física.⁶⁸

Actualmente, la nanotecnología engloba el diseño, síntesis y aplicación de materiales, dispositivos y sistemas funcionales a escala nanométrica (1-100 nm) capaces de ser controlados a nivel atómico y molecular.⁶⁹ La nanotecnología es una ciencia interdisciplinar que alberga diversas disciplinas como la biología, física, química, ingeniería, ciencia de los materiales, biotecnología, etc. Las investigaciones y las aplicaciones asociadas a ésta, son igualmente diversas, desde la física de los dispositivos al desarrollo de nuevos nanomateriales.

La aparición de estos nanomateriales, ha otorgado numerosos progresos y beneficios en campos como la industria agroalimentaria, medicina, electrónica, cosmética, catálisis, etc.^{70,71} Entre estos materiales de escala nanométrica destacan los nanomateriales de carbono (fullerenos, nanotubos de carbono o el grafeno), nanopartículas de sílice, de metales o de óxidos metálicos, dendrímeros, fibras naturales o sintéticas y los conocidos como puntos cuánticos (QD, *quantum dots*), son algunos ejemplos.⁷²

⁶⁸ M. Wilson, K. Kannangara, G. Smith, M. Simmons, B. Raguse. *NANOTECHNOLOGY: Basic Science and Emerging Technologies*; Chapman & Hall/CRC, **2002**.

⁶⁹ a) S. L. Brock, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 14679. b) K. Narendra, S. Kumbhat. *Essentials in Nanoscience and Nanotechnology*; John Wiley & Sons, **2016**.

⁷⁰ Monique A. V. Axelos, Marcel Van de Voorde. *Nanotechnology in Agriculture and Food Science*, Wiley-VCH, **2017**.

⁷¹ A. P. Nikalje, *Med. Chem* **2015**, 5, 81.

⁷² K. Rurack, R. Martínez-Mañez. *The Supramolecular Chemistry of Organic-Inorganic Hybrid Materials*; John Wiley & Sons, **2010**.

5.2. MATERIALES HÍBRIDOS ORGÁNICO-INORGÁNICOS.

Los materiales híbridos orgánico-inorgánico son una nueva clase de materiales sintéticos que ha despertado, en los últimos años, líneas de investigación muy relevantes dentro de la ciencia de los materiales. Como su nombre indica, estos materiales están formados por al menos dos tipos de estructuras o unidades de distinta naturaleza, una orgánica y la otra inorgánica.⁷³ La conjugación de estas estructuras en un híbrido puede dar como resultado una mejora en sus propiedades físico-químicas en comparación con las de sus constituyentes individuales. Estas propiedades dependerán de la naturaleza y del grado de interacción entre sus constituyentes, obteniéndose materiales únicos y con múltiples aplicaciones.

Los sólidos híbridos combinan las ventajas de los materiales inorgánicos, como son su elevada estabilidad térmica, estructural y mecánica, o sus buenas propiedades ópticas, con las características de las moléculas orgánicas, es decir, flexibilidad, hidrofobicidad, nuevas propiedades ópticas o eléctricas y sobretodo su funcionalidad.⁷⁴ Por consiguiente, el anclaje de moléculas orgánicas, biomoléculas o supramoléculas a andamios inorgánicos con gran versatilidad de tamaño, forma, propiedades físico-químicas, etc. permite el desarrollo de nuevos materiales estructurados, dentro del campo de la

⁷³ G. Kickelbick, *Hybrid Materials. Synthesis, characterization and applications*. Ed. G. Kickelbick. Wiley-VCH, 2007.

⁷⁴ a) W. U. Huynh, J. J. Dittmer, A. P. Alivisatos, *Science*. 2002, 295, 2425. b) H. Liu, S. Cui, Y. Guo, Y. Li, C. Huang, Z. Zuo, X. Yin, Y. Song, D. Zhu, *J. Mater. Chem.* 2009, 19, 1031. c) H. Liu, Z. Zuo, Y. Guo, Y. Li, Y. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 2705.

nanociencia y la nanotecnología para fines concretos y muy específicos.⁷⁵

5.3. SÍLICE MESOPOROSA COMO SOPORTE INORGÁNICO.

En los últimos 25 años, se ha incrementado el interés por los materiales que presentan una porosidad periódica a lo largo de su estructura. A este gran interés contribuye la posibilidad de modulación de sus principales características, como son su composición, el entramado o andamio y el diámetro de poro, entre otras cosas. Según el diámetro de poro la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) permite clasificar estos materiales en tres grupos, *Microporosos* (diámetro de poro < 2 nm), *Mesoporosos* (diámetro de poro 2 – 50 nm) y *Macroporosos* (diámetro de poro > 50 nm).⁷⁶ A raíz de estas modulaciones en la estructura del material y a la gran superficie que presentan, surgen prometedoras aplicaciones en diversos campos como, catálisis,⁷⁷ procesos de filtración y separación,⁷⁸ adsorción y

⁷⁵a) A. E. Garcia-Bennett, *Nanomedicine* **2011**, *6*, 867. b) Q. Zhang, E. Uchaker, S. L. Candelaria, G. Cao, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 3127 c) C. Perego, R. Millini, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 3956. d) T. Wagner, S. Haffer, C. Weinberger, D. Klaus, M. Tiemann, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4036. e) N. Linares, A. M. Silvestre-Albero, E. Serrano, J. Silvestre-Albero, J. García-Martínez, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 7681.

⁷⁶ a) R. Murray, M. Gill. *MRS Bull.* **1994**, *19*, 1122. b) Z. Y. Yuan, B. L. Su, H. C. Zeng, U. Mueller, J. Pastre, H. Puetter, M. Schubert, K. Schierle-Arndt, F. Teich, *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 623.

⁷⁷ D. E. De Vos, M Dams, B. F. Sels, P. A. Jacobs., *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 3615.

⁷⁸ S. Cavenati, C. A. Grand, F. V. S. Lopes, A. E. Rodrigues., *Microporous Mesoporous Mater.*, **2009**, *121*, 114.

almacenamiento de gases,⁷⁹ inmovilización enzimática,⁸⁰ regeneración de tejidos,⁸¹ liberación controlada de fármacos,⁸² o incluso quimiosensores.⁸³

Un ejemplo ampliamente conocido de materiales microporosos son las zeolitas.⁸⁴ Inicialmente, estos materiales se usaban en la separación de gases a nivel industrial, pero hoy en día, muchas zeolitas son utilizadas en catálisis y en la industria petroquímica.⁸⁵ Sin embargo, aunque su uso es de gran importancia, su aplicabilidad es limitada debido a la poca modulación del diámetro de poro (3-15 Å).⁸⁶ Como consecuencia, la comunidad científica hizo grandes esfuerzos para obtener nuevos materiales capaces de ser sintetizados con tamaños de poro superiores a 1 nm. Finalmente, en 1992, científicos de la compañía *Mobil Oil* sintetizaron por primera vez una nueva familia de compuestos de sílice mesoporosa, conocidos como M41S.⁸⁷ Los materiales más conocidos son el sólido MCM-41 (*Mobil Crystalline Material*) con una disposición del mesoporo hexagonal, el MCM-48 con una disposición cúbica y el MCM-50 con una estructura laminar (Figura 5.1).⁸⁸ Estos nuevos compuestos poseen unas características únicas, como son una distribución ordenada de los poros, con un tamaño

⁷⁹ a) M. Kruk, M. Jaroniec., *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 3169. b) A. Corma, M. Moliner, M. J. Díaz-Cabañas, P. Serna, B. Femenia, J. Primo, H. García., *New J. Chem.* **2008**, *32*, 1338. c) C. Ispas, I. Sokolov, S. Andreescu., *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 543.

⁸⁰ N. Carlsson, H. Gustafsson, C. Thörn, L. Olsson, K. Holmberg, B. Åkerman., *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2014**, *205*, 339.

⁸¹ M. Vallet-Regí, M. Colilla, I. Izquierdo-Barba., *J. Biomed. Nanotechnol.* **2008**, *4*, 1.

⁸² I. I. Slowing, B. G. Trewyn, S. Giri, V. S. Y. Lin., *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*, 1225.

⁸³ a) K. A. Kilian, T. Böcking, K. Gaus, M. Gal, J. J. Gooding., *ACS Nano.* **2007**, *1*, 355. b) A. Jane, R. Dronov, A. Hodges, N. H. Voelcker., *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 230.

⁸⁴ M. E. Davis, C. Saldarriaga, C. Mantes, J. Garces, C. Crowdert., *Nature*, **1988**, *331*, 698.

⁸⁵ A. Corma., *Chem. Rev.*, **1997**, *97*, 2373.

⁸⁶ C. S. Cundy, P. A. Cox., *Chem. Soc. Rev.*, **2003**, *103*, 663.

⁸⁷ C. T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli, J. S. Beck., *Nature*, **1992**, *359*, 710.

⁸⁸ C. T. Kresge, W. J. Roth., *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 3663.

comprendido entre los 2 y 10 nm, un elevado volumen de poro, del orden de $1 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$, y una gran superficie específica comprendida entre 500 y $1000 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$, otorgándole una gran aplicabilidad. Por otro lado, y no menos importante, estos materiales presentan la peculiaridad de que se sintetizan a partir de precursores económicos y no peligrosos, lo cual facilita su producción a gran escala. Además, permiten una fácil funcionalización de su superficie mediante la química del óxido de silicio, ampliamente conocida.⁸⁹ El conjunto de todas estas características confiere a estos soportes inorgánicos la posibilidad de ser utilizados en catálisis, como absorbentes de moléculas pequeñas, como soportes para el reconocimiento molecular o como contenedores para la liberación controlada de su carga, tras la exposición a un estímulo externo. El desarrollo de esta última aplicación constituirá el objetivo esencial de esta segunda parte de esta Tesis Doctoral.

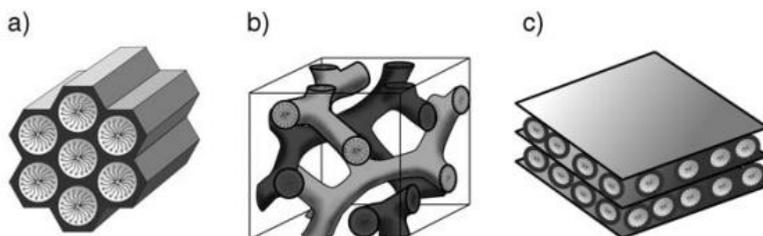


Figura 5.1. Estructura de los mesoporos M41S: a) MCM-41 (2D hexagonal, grupo espacial $p6mm$), b) MCM-48 (cúbica, grupo espacial $la3d$) y c) MCM-50 (laminar, grupo espacial $p2$). Reimpreso (adaptado) con permiso de F. Hoffmann, M. Cornelius, J. Morell, M. Fröba, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 3216. Copyright © 2006 Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

⁸⁹ C. R. Helms, E. H. Poindexter., *Rep. Prog. Phys.*, **1994**, 57, 791. b) O. W. Flörke, H. A. Graetsch, F. Brunk, L. Benda, S. Paschen, H. E. Bergna, W. O. Roberts, W. A. Welsh, C. Libanati, M. Ettlinger, D. Kerner, M. Maier, W. Meon, R. Schmoll, H. Gies, D. Schiffmann., *Ullmann's. Encyclopedia of Industrial chemistry*, **2008**, Weinheim: Wiley-VCH.

5.3.1. Síntesis de materiales mesoporosos de sílice.

Desde su descubrimiento en 1992, los M41S, han sido los sistemas mesoporosos más estudiados. El procedimiento habitual para la obtención de un sistema con una estructura altamente ordenada y con los poros homogéneos, implica la presencia de dos componentes fundamentales:

- La **plantilla**, normalmente, un tensioactivo, que actúa como agente director de la estructura formando micelas en disolución acuosa que se ordenan en estructuras concretas.
- El **precursor polimérico**, como los silicatos oligoméricos, que están presentes en la mezcla de reacción y pueden autoorganizarse alrededor de la plantilla y dar lugar a una estructura rígida mediante una reacción de polimerización.

Lograr una estructura altamente ordenada, requiere de una ruta sintética en la que el agente tensioactivo esté homogéneamente disuelto en el medio de reacción, en este caso, en agua. La innovación por parte de la compañía *Mobil Oil*, fue la utilización de surfactantes que formaban agregados supramoleculares. Concretamente, utilizaron haluros de alquiltrimetilamonio de cadena larga como agentes directores, en lugar de utilizar especies inorgánicas catiónicas, tradicionalmente utilizadas en la síntesis de zeolitas.⁹⁰ Es esencial comprender el comportamiento del agente director para conocer la función de éste en la formación del material mesoporoso que deseamos.

⁹⁰ J. S. Beck, J. C. Vartuli, W. J. Roth, M. E. Leonowicz, C. T. Kresge, K. D. Schmitt, C. T.-W. Chu, D. H. Olson, E. W. Sheppard, S. B. McCullen, J. B. Higgins, J. L. Schlenker., *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10834.

Los haluros de alquiltrimetilamonio de cadena larga ($[\text{R-N}(\text{CH}_3)_3]^+$), son moléculas orgánicas con carácter anfifílico, es decir, poseen una parte hidrófoba (cadena hidrocarbonada, R) y una parte hidrófila (grupo trimetilamonio). En disolución acuosa, las moléculas anfifílicas forman micelas en las que los grupos hidrófilos están en la superficie y las partes hidrófobas quedan inmersas en el interior de la micela, en una disposición que elimina los contactos desfavorables con el agua y maximiza las interacciones de London entre las cadenas.

Bajo condiciones específicas de concentración y composición química del tensioactivo, temperatura, pH y fuerza iónica de la disolución, se pueden obtener micelas de distintos tamaños y que se organizan dando distintas estructuras, las cuales podrán dar lugar a diversos materiales mesoporosos. Así, por ejemplo, es posible obtener materiales con diámetros de poro entre 2 y 50 nm, modulando la longitud de la cadena hidrocarbonada que va a formar la micela. Una vez obtenida la plantilla deseada, se agrega al medio de reacción el precursor de sílice (normalmente un trialquil ortosilicato), que dará origen mediante reacciones de policondensación la red porosa altamente ordenada y rígida. Por último, se debe eliminar el surfactante utilizado como plantilla. Para ello se utiliza normalmente la calcinación aeróbica del material, aunque también se pueden utilizar disolventes de extracción adecuados.⁹¹

Actualmente existen dos procedimientos para sintetizar estos materiales. En primer lugar, y más ampliamente utilizado, el procedimiento de plantilla de cristal líquido (LCT, *Liquid-Crystal Templating*) (Figura 5.2, **(1)**). Este procedimiento sintético se basa en la

⁹¹ F. Hoffmann, M. Cornelius, J. Morell, M. Fröba, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 3216.

formación de una mesofase (o cristales líquidos) por la acción combinada de la temperatura y de la alta concentración de surfactante en el medio (en este caso, agua) dando lugar a la formación de cristales líquidos liotrópicos ordenados en un empaquetamiento hexagonal sin necesidad de un precursor externo que favorezca la formación de estos cristales líquidos. El segundo procedimiento (Figura 5.2 (2)) es un procedimiento cooperativo del tipo de autoensamblaje. En este caso, se considera que cuando la formación de cristales líquidos es insuficiente, debido a la baja concentración de surfactante en el medio, esta formación puede ser promovida por un precursor inorgánico.⁹²

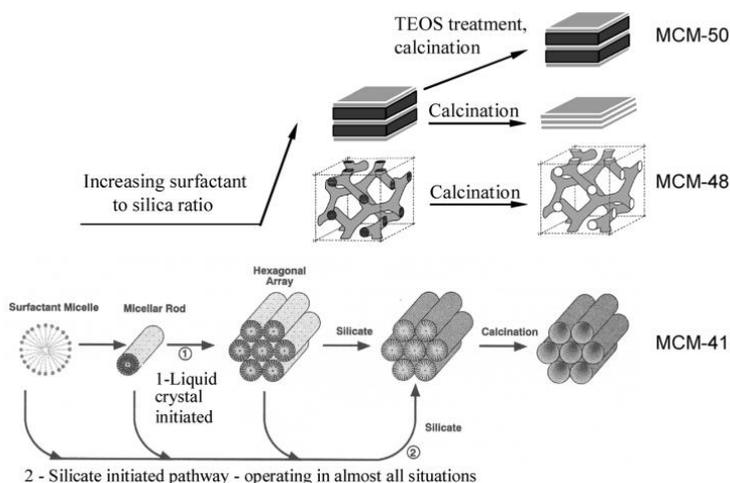


Figura 5.2. Representación esquemática de formación de materiales mesoporosos estructuralmente dirigidos por: (1) mecanismo LCT, (2) mecanismo cooperativo propuesto para la formación de los distintos materiales y sus consecutivas etapas. Reimpreso (adaptado) con permiso de C. T. Kresge, W. J. Roth, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 3663. Copyright © 2013. The Royal Society of Chemistry.

⁹² A. Monnier, F. O. Schuth, Q. Huo, D. Kumar, D. Margolese, R. S. Maxwell, G. D. Stucky, M. Krishnamurty, P. Petroff, A. Firouzi, M. Janicke, B. F. Chmelka., *Science* **1993**, 261 , 1299.

Estos procedimientos de obtención de materiales mesoporosos han sido ampliamente estudiados, y han surgido numerosas modificaciones, con el objetivo de obtener nuevos materiales topológica y morfológicamente distintos. Por ejemplo, el material llamado SBA (*Santa Barbara Amorphous*) en el que se utilizan bloques de copolímeros como plantillas y condiciones ácidas.⁹³ Sin embargo, el material mesoporoso de sílice más estudiado y probablemente utilizado es el MCM-41. Según las condiciones de síntesis, pH óptimo, temperatura y concentración este material se pueden obtener tanto micropartículas como nanopartículas de MCM-41. La síntesis consiste en la polimerización del precursor inorgánico, generalmente tetraetilortosilicato (TEOS) o tetrametilortosilicato (TMOS), en disolución acuosa (pH básico) alrededor de las micelas (cristales líquidos liotrópicos) formadas por el surfactante o plantilla (bromuro de cetiltrimetilamonio, CTABr), en las cuales las moléculas de surfactante se asocian entre sí, formando cristales líquidos siguiendo un empaquetamiento hexagonal compacto de cilindros. Tras la calcinación (eliminación del surfactante), se obtienen poros homogéneamente definidos de 2-3 nm (Figura 5.2).⁹⁴

Por otro lado, y muy importante, es que estos materiales se pueden funcionalizar con moléculas orgánicas, tanto en el interior como en el exterior de los poros.

⁹³ a) D. Zhao. *Science* **1998**, 279, 548. b) D. Zhao, Q. Huo, J. Feng, B. F. Chmelka, G. D. Stucky., *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 6024.

⁹⁴ C. Chen, H. Li, M. E. Davis., *Synthesis* **1993**, 2, 17-26.

5.3.2. Funcionalización de materiales de sílice mesoporosa.

La modificación o funcionalización de la superficie de la MCM-41, con moléculas orgánicas permite modular sus propiedades superficiales. La funcionalización de estos materiales es relativamente sencilla ya que existen en su superficie numerosos grupos silanol (Si-OH), capaces de reaccionar con moléculas orgánicas del tipo trialcoxisilanos ($R'-Si(OR)_3$), dando lugar a la formación de enlaces covalentes Si-O-Si. Normalmente, en estos trialcoxisilanos R' es una cadena alifática terminada en un grupo funcional (amino, tiol, alcohol, vinilo, epóxidos, isocianatos, haluros de alquilo, etc.) y -OR es un grupo metoxilo (-OCH₃) o etoxilo (-OCH₂CH₃) que será substituido por los grupos silanoles libres del material.⁹⁵

Existen tres rutas sintéticas para obtener materiales híbridos orgánicos-inorgánicos de sílice mesoporosa.⁹⁶ En primer lugar, el anclaje superficial mediante la utilización del método “*grafting*” o post-síntesis, la co-condensación o síntesis directa y finalmente el método de organosílicas periódicas mesoporosas (PMOs, *Periodic Mesoporous Organosilicas*).

➤ Método de “*grafting*” o post-síntesis.

Como su nombre indica, la funcionalización del sólido inorgánico se realiza después de su obtención. El procedimiento de funcionalización está basado en el anclaje de moléculas orgánicas en la

⁹⁵ a) D. M. Antonelli, J. Y. Ying, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1996**, *1*, 523. b) K. Moller, T. Bein, *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 2950. c) G. A. Ozin, E. Chomski, D. Khushalani, M. J. MacLachlan, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1998**, *3*, 181.

⁹⁶ A. Vinu, K. Z. Hossain, K. Ariga, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2005**, *5*, 347.

superficie externa del sólido mesoporoso, una vez el surfactante ha sido eliminado mediante calcinación o por extracción. Este proceso consiste en la reacción de un trialcoxisilano ($R'-Si(OR)_3$) con los grupos silanoles libres del material, como hemos indicado anteriormente. Es importante destacar que, la estructura inicial del material no se altera después de la funcionalización.

La concentración de los grupos funcionales procedentes de la molécula orgánica, así como, su distribución en el material, está influenciada por la reactividad del trialcoxisilano y por su accesibilidad a los silanoles de la superficie del material (Figura 5.3). Es evidente que la superficie externa del material es muchos más accesible a futuras reacciones que la superficie del interior de los poros (superficie interna).⁹⁷

Un factor a considerar en este tipo de reacciones es la policondensación del trialcoxisilano. Este precursor puede reaccionar consigo mismo en lugar de con los silanoles del material, si no se controlan distintos parámetros, como son: disolvente, temperatura de reacción, cantidad de agua adsorbida en la superficie y el tipo de trialcoxisilano.

⁹⁷ a) A. Stein, B. J. Melde, R. C. Schrodien, *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 1403. b) F. de Juan, E. Ruiz-Hitzky, *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 430.

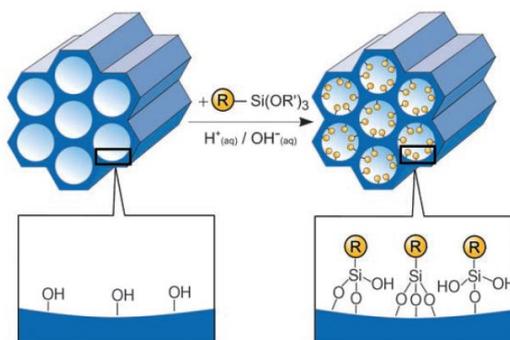


Figura 5.3. Representación esquemática de la funcionalización de la MCM-41 por grafting o post-síntesis. Reimpreso (adaptado) con permiso de F. Hoffmann, M. Cornelius, J. Morell, M. Fröba, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 3216. Copyright © 2006 Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

➤ Método de co-condensación o síntesis directa.

La co-condensación o síntesis directa, consiste en modificar la superficie del material en el mismo momento en que éste se sintetiza, mediante la inclusión del grupo trialcoxisilano en su estructura. Para ello, se introduce el precursor de sílice (TEOS o TMOS) y el trialcoxisilano ($R'-Si(OR)_3$) simultáneamente (Figura 5.4). Mediante este método es posible de obtener una gran variedad de grupos funcionales en el material, siempre y cuando, estos grupos funcionales no produzcan una ruptura o deformaciones en la estructura del material mesoporoso. Además, mediante este método los grupos orgánicos se encuentran homogéneamente distribuidos a lo largo del material.⁹⁸

Por otro lado, es importante destacar que este método sintético presenta algunas desventajas. En primer lugar, y como ya hemos comentado, un aumento de la concentración de trialcoxisilanos podría ser perjudicial para el material, podría interferir en la formación de los agregados micelares, disminuir el orden del mesoporo, o incluso

⁹⁸ M. H. Lim, A. Stein, *Chem. Mater.* **1999**, 11, 3285.

impedir la construcción del material. En segundo lugar, la policondensación del trialcoxisilano se ve favorecida, por consiguiente, hay un menor número de moléculas orgánicas incorporadas en la red del material. En tercer lugar, los grupos orgánicos incorporados pueden inducir una disminución en el diámetro de poro y en la superficie de área específica. Finalmente, como es de esperar, la eliminación del surfactante no se puede llevar a cabo mediante calcinación, ya que a temperaturas tan elevadas toda la materia orgánica sería eliminada. Normalmente, la eliminación del surfactante se realiza por extracción en medio ácido.

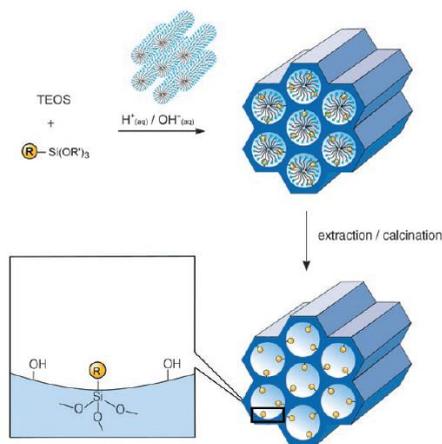


Figura 5.4. Representación esquemática de la funcionalización de la MCM-41 por co-condensación o síntesis directa. Reimpreso (adaptado) con permiso de F. Hoffmann, M. Cornelius, J. Morell, M. Fröba, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3216. Copyright © 2006 Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

➤ Método de organosílices periódicas mesoporosas.

Estos materiales presentan una alternativa a la síntesis de materiales mesoporosos que hemos visto anteriormente. Estos materiales se sintetizan mediante la reacción de condensación de precursores de sílice del tipo $[(RO)_3Si-R'-Si(OR)_3]$, en presencia de un

agente director. En este caso, las moléculas orgánicas se incorporan en la estructura tridimensional de la matriz sílicea por medio de dos enlaces covalentes, y estas se distribuyen homogéneamente por las paredes del material (Figura 5.5). Por medio de este método se consiguen obtener superficies de área específica del orden de $1800 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$, así como alta estabilidad térmica. Sin embargo, mediante este método se obtienen distribuciones de poros muy estrechos.⁹⁹

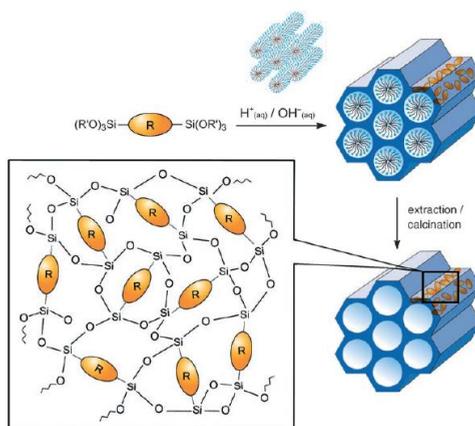


Figura 5.5. Representación esquemática de la funcionalización de la MCM-41 por organosílices periódicos mesoporosas. Reimpreso (adaptado) con permiso de F. Hoffmann, M. Cornelius, J. Morell, M. Fröba, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3216. Copyright © 2006 Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

5.3.3. Caracterización de los materiales híbridos orgánico-inorgánicos de sílice mesoporosa.

En esta sección, se describen las técnicas habituales que se utilizan para dilucidar la estructura y las propiedades físico-químicas de los materiales híbridos mesoporosos. Por lo general, al caracterizar un material híbrido mesoporoso se considera la integridad de la estructura del material, la morfología y tamaño de las partículas (sobre

⁹⁹ a) D. A. Loy, K. J. Shea, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 1431. b) B. Hatton, K. Landskron, W. Whitnall, D. Perovic, G. A. Ozin, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 305.

todo si hablamos de nanopartículas) y finalmente, la cantidad de materia orgánica que está presente (encapsulada y/o covalentemente unida) en el material. En la siguiente Tabla 5.1 se pueden observar las técnicas más utilizadas para la caracterización de estos materiales híbridos.

Tabla 5.1. Técnicas de caracterización utilizadas comúnmente para dilucidar la estructura y propiedades físico-químicas de los materiales híbridos mesoporosos.

Técnica de caracterización	Propiedad a caracterizar
Difracción de rayos X de polvo.	Periodicidad del material.
Microscopía electrónica de transmisión (TEM).	Morfología, tamaño de partícula y orden de poro.
Adsorción-desorción de nitrógeno.	Propiedades textuales (superficie específica, volumen y tamaño de poro).
Dispersión dinámica de luz (Dynamic Light Scattering, DLS).	Tamaño de partícula.
Microscopía electrónica de barrido (SEM).	Morfología de las partículas.
Análisis termogravimétrico.	Cuantificación de la materia orgánica presente en el material.
Análisis elemental.	Composición química del material.
Espectroscopía infrarroja (IR).	Caracterización de grupos funcionales.
Espectroscopía UV-vis.	Presencia de grupos cromóforos.
Espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS).	Composición química del material.

En cuanto al análisis de las propiedades estructurales de los materiales mesoporosos, normalmente se utilizan las técnicas de difracción de rayos X de polvo (*Powder X Ray Diffraction*, PXRD) y microscopía electrónica de transmisión (*Transmission electron microscopy*, TEM) para estudiar la integridad de la red mesoporosa del material. La técnica PXRD, se utiliza para identificar las fases cristalinas presentes en el material, siendo una técnica apropiada tanto para las

micropartículas como para las nanopartículas mesoporosas. Comúnmente, estos materiales presentan una disposición regular de poros y, en consecuencia, producen una reflexión del haz incidente (rayos X), a ángulos de difracción bajos. Para el caso particular del MCM-41, el difractograma de rayos X típico presenta un total de cuatro picos, que se identifican como picos de Bragg (100), (110), (200) y (210) de grupo espacial $P6mm$ (Figura 5.6).

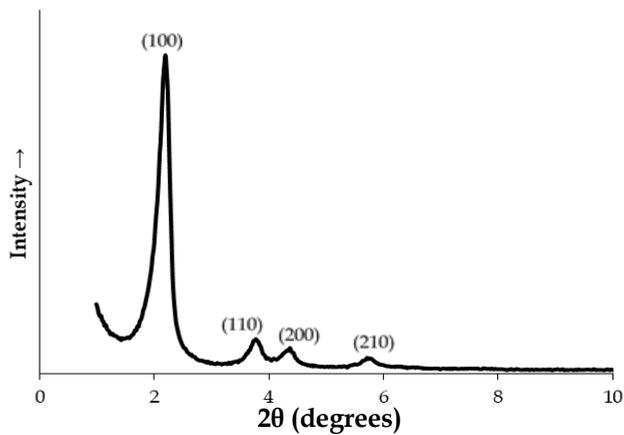


Figura 5.6. Difractograma de bajo ángulo (PXRD) para el material MCM-41.

Por otro lado, mediante la utilización del TEM, se puede estudiar de forma detallada la morfología, tamaño y distribución de poro, así como la simetría del material. Por ejemplo, en la Figura 5.7 se muestran dos materiales con una distribución de poro diferente; a) material MCM-41 mesoporoso, con distribución de poro ordenada y b) nanomaterial basado en sílice, con una distribución de poro desordenada. Como puede verse, las diferentes mesofases pueden distinguirse fácilmente, así como, el tamaño y morfología del material.

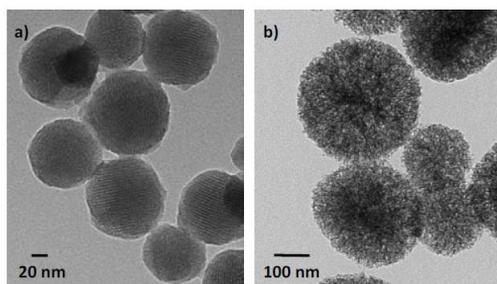


Figura 5.7. Imagen de TEM para MCM-41 a) y nanopartículas de sílice con una distribución desordenada en los mesoporos b).

Como técnicas complementarias al estudio estructural del material híbrido mesoporoso se utilizan comúnmente la técnica DLS, para medir el tamaño de partícula, estado de agregación o incluso el coeficiente de difusión de las partículas y el SEM, para comprobar la morfología del mismo.

En cuanto a las propiedades texturales (superficie específica, volumen y tamaño de poro) el análisis de fisisorción de nitrógeno es la técnica más utilizada. Las isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno a diversas presiones relativas proporcionan información sobre el área superficial, el volumen de poro y el tamaño de poro del material. Según la IUPAC, se pueden distinguir seis tipos de isothermas que reflejan la relación entre porosidad y adsorción (Figura 5.8).¹⁰⁰ El tipo de isoterma que se obtiene es característico para cada material. Por ejemplo, las isothermas tipo I, son características de materiales microporosos, las isothermas tipo II, III y VI son características de materiales no porosos o macroporosos, finalmente los materiales que presentan isothermas tipo IV y V son los materiales mesoporosos.

¹⁰⁰ a) K. S. W. Sing, D. H. Everett, R. a. W. Haul, L. Moscou, R. a. Pierotti, J. Rouquérol, T. Siemieniowska, *Pure Appl. Chem.* **1985**, *57*, 603. b) J. C. P. Broekhoff, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, **1979**, *3*, 663.

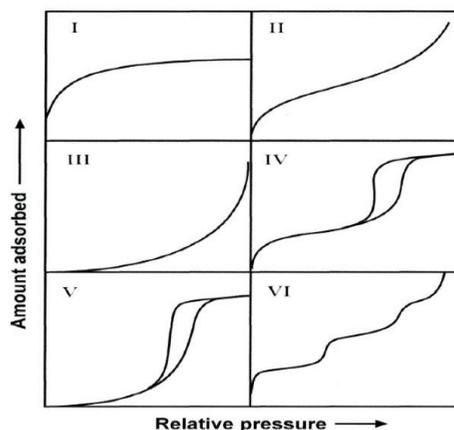


Figura 5.8. Clasificación IUPAC de los materiales porosos según las isothermas de adsorción-desorción. Nótese que los tipos IV y V presentan un bucle de histéresis. Reimpreso (adaptado) con permiso de *Pure & Appl. Chem.* **1985**, 57, 603, Copyright © 1985 IUPAC.

En los materiales mesoporosos, como la MCM-41, es ampliamente aceptado que existe una correlación entre la forma del bucle de histéresis y la textura (volumen, distribución de tamaño de poro, etc.) de un material mesoporoso.¹⁰¹ Este bucle de histéresis es debido principalmente a que en el proceso de adsorción de N_2 a presiones relativas intermedias, se produce una adsorción multicapa (Figura 5.9). Sin embargo, la desorción del gas adsorbido ocurre a presiones relativas más bajas, dando como resultado este tipo ciclos de histéresis.

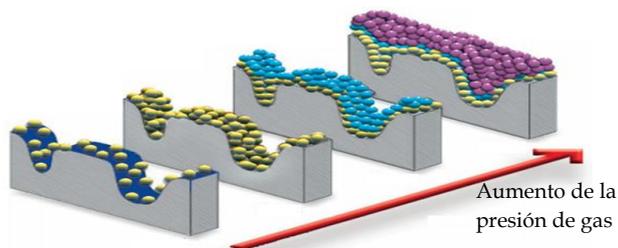


Figura 5.9. Representación esquemática de la formación de la multicapa a medida que aumenta la presión relativa de gas.

¹⁰¹ Z. A. AlOthman., *Materials*, **2012**, 5, 2874.

Estos ciclos de histéresis también han sido clasificados por la IUPAC (Figura 5.10). El bucle tipo H1 a menudo se asocia a materiales porosos con canales de poros bien definidos o aglomerados de esferas uniformes. El tipo H2, se atribuye a materiales donde la distribución del tamaño y la forma del poro no están bien definidos. Los materiales con un bucle tipo H3 son característicos de poros en forma de ranuras. Finalmente, los ciclos H4 se asocian a materiales con poros de hendidura estrecha.¹⁰²

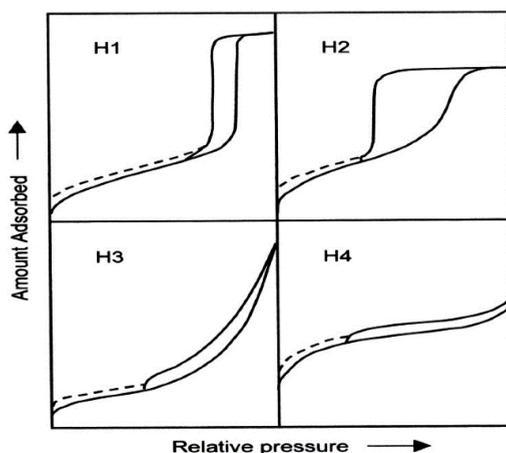


Figura 5.10. Relación entre la forma de poro y las isothermas de adsorción-desorción mediante el bucle de histéresis. Reimpreso (adaptado) con permiso de *Pure & Appl. Chem.* 1985, 57, 603, Copyright © 1985 IUPAC.

Además, se realizan estudios termogravimétricos (*Thermogravimetric Analysis*, TGA), análisis elemental (*Elemental Analysis*, EA) y espectroscopía infrarroja (*Fourier-Transform Infrared spectroscopy*, FT-IR) que nos proporcionan información sobre la cantidad de materia orgánica presente en el material híbrido. En algunos casos, es útil combinar estos métodos de caracterización con

¹⁰² J.E. Shields, S. Lowell, M. A. Thomas, M. Thommes., *Characterization of porous solids and powders: Surface Area, Pore Size and Density*, Kluwer Academic Publisher: Boston, MA, USA, 2004, 43.

otras técnicas como la microscopía electrónica de barrido junto con la espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (SEM/EDX) o la espectroscopía UV-Vis, para obtener una óptima identificación.

En resumen, todas estas técnicas de caracterización, nos permitirán conocer tamaño y forma de los materiales, su cristalinidad, sus propiedades texturales y la cantidad total de materia orgánica en el material, así como los grupos funcionales presentes.

5.4. APLICACIONES DE LOS MATERIALES HÍBRIDOS ORGÁNICOS-INORGÁNICOS: Puertas moleculares.

Existen numerosas aplicaciones para este tipo de materiales en campos muy diversos como la catálisis heterogénea,¹⁰³ la liberación controlada de especies químicas,¹⁰⁴ como materiales sensores¹⁰⁵ e incluso en aplicaciones medioambientales.¹⁰⁶ La utilización de materiales híbridos mesoporos capaces de transportar/encapsular¹⁰⁷ y provocar la liberación controlada¹⁰⁸ de especies de interés en lugares

¹⁰³ S. E. Park, and E. Y. Jeong, **2014**, *Heterogeneous Catalysis with Organic-Inorganic Hybrid Materials in Bridging Heterogeneous And Homogeneous Catalysis: Concepts, Strategies, And Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.

¹⁰⁴ a) M. Liong, J. Lu, M. Kovoichich, T. Xia, S. G. Ruehm, A. E. Nel, F. Tamanoi, J. I. Zink, *ACS Nano*, **2008**, 2, 889. b) K. K. Cotí, M. E. Belowich, M. Liong, M. W. Ambrogio, Y. A. Lau, H. A. Khatib, J. I. Zink, N. M. Khashab, J. F. Stoddart, *Nanoscale*, **2009**, 1, 16. c) J. M. Rosenholm, E. Peuhu, L. T. Bate-Eya, J. E. Eriksson, C. Sahlgren, M. Linden, *Small*, **2010**, 6, 1234.

¹⁰⁵ M. K Patra, K. Manzoor, M. Manoth, S. C. Negi, S. R. Vadera, N. Kumar, *Defence Sci J*, **2008**, 58, 636.

¹⁰⁶ S. S. Thakur, Chauhan G. S., *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2014**, 53, 4838.

¹⁰⁷ a) M. Liong, J. Lu, M. Kovoichich, T. Xia, S. G. Ruehm, A. E. Nel, F. Tamanoi, J. I. Zink, *ACS Nano*, **2008**, 2, 889. b) J. M. Rosenholm, E. Peuhu, L. T. Bate-Eya, J. E. Eriksson, C. Sahlgren, M. Linden, *Small*, **2010**, 6, 1234.

¹⁰⁸ K. K. Cotí, M. E. Belowich, M. Liong, M. W. Ambrogio, Y. A. Lau, H. A. Khatib, J. I. Zink, N. M. Khashab, J. F. Stoddart, *Nanoscale*, **2009**, 1, 16.

específicos requiere de una previa protección contra la degradación o salida no deseada de la carga, es decir, una eficaz encapsulación. Estas estrategias de sellado de los poros, normalmente, se pueden clasificar en tres tipos: por un lado, mediante el revestimiento completo de la superficie externa de la partícula,¹⁰⁹ por bloqueo de los poros, mediante el uso de puertas moleculares ancladas a la superficie de la partícula¹¹⁰ o por interacciones electrostáticas en el interior de los poros¹¹¹ (Figura 5.11).

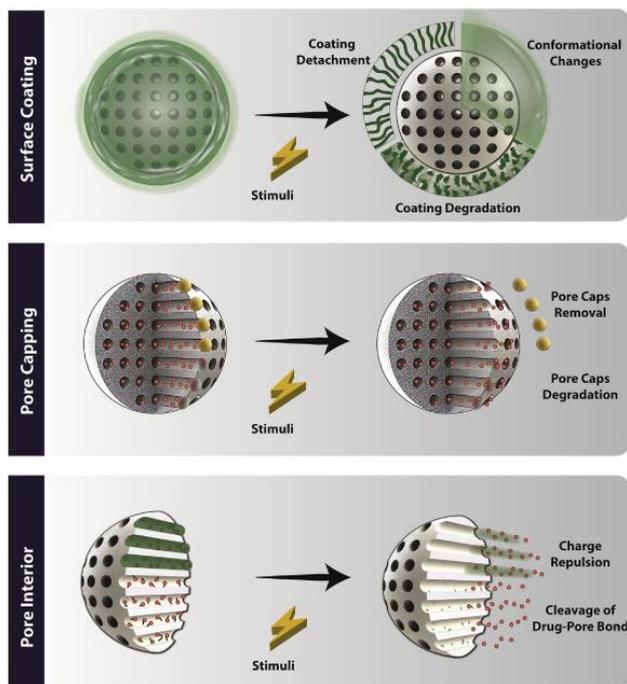


Figura 5.11. Representación de las estrategias más utilizadas para bloquear la salida de la carga en los materiales mesoporosos, por revestimiento superficial, bloqueo de los poros o a través de interacciones en el interior de los poros. Reimpreso (adaptado) con permiso de A. F. Moreira, D. R. Dias, I. J. Correia, *Microporous and mesoporous materials* 2016, 236, 141. Copyright © 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

¹⁰⁹ Y. Zhang, C. Y. Ang, M. Li, S. Y. Tan, Q. Qu, Z. Luo, Y. Zhao, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2015, 7, 18179.

¹¹⁰ N. Song, Y.W. Yang, *Chem. Soc. Rev.* 2015, 44, 3474.

¹¹¹ C.H. Lee, S.H. Cheng, I.P. Huang, J.S. Souris, C.S. Yang, C.Y. Mou, L.W. Lo, *Angew. Chem.* 2010, 49, 8214.

En esta Tesis Doctoral los materiales híbridos orgánico-inorgánicos desarrollados se basan, en el uso de puertas moleculares como sistemas de sellado de los poros.¹¹² Las puertas moleculares son moléculas orgánicas funcionales que tienen una doble función: por un lado, impedir la salida no deseada de la carga del material, tapando la salida del poro, como si fueran puertas. Y, por otro lado, permitir la salida controlada de la carga del material al medio exterior (disolución), en presencia de un estímulo externo (cambio en la carga, tamaño, polaridad, pH, temperatura, presencia de otras especies químicas, etc.).¹¹³ Por consiguiente, estos materiales están compuestos principalmente de dos subunidades: un soporte inorgánico poroso, en el cual se almacenan las sustancias químicas deseadas, y por otro lado, la puerta molecular, generalmente, anclada a la superficie del material (Figura 5.12). Las características descritas de estos materiales¹¹⁴ y su gran capacidad de carga, no solo de moléculas pequeñas sino también de una gran variedad de moléculas de tamaño intermedio como proteínas, oligonucleótidos o ácidos nucleicos, hacen que la aplicación más estudiada de estos sólidos esté estrechamente relacionada con el transporte y la liberación controlada de fármacos en aplicaciones

¹¹² a) A. B. Descalzo, R. Martínez-Mañez, F. Sancenón, K. Hoffman, K. Rurack, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 5924. b) F. Sancenón, L. Pascual, M. Oroval, E. Aznar, R. Martínez-Mañez, *ChemistryOpen*, **2015**, *4*, 418. c) E. Aznar, M. Oroval, L. Pascual, J. R. Murguía, R. Martínez-Mañez, F. Sancenón, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 561.

¹¹³ a) A. B. Braunschweig, B. H. Northrop, J. F. Stoddart, *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 32. b) S. Saha, K. C. F. Leung, T. D. Nguyen, J. F. Stoddart, J. I. Zink, *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*, 685. c) S. Angelos, E. Johansson, J. F. Stoddart, J. I. Zink, *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*, 2261. d) B. G. Trewyn, S. Giri, I. I. Slowing, V. S. Y. Lin, *Chem. Commun.* **2007**, *114*, 3236 e) E. Aznar, R. Martínez-Mañez, F. Sancenón, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2009**, *6*, 643. f) C. Park, H. Kim, S. Kim, C. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16614 g) Y. W. Yang, *MedChemComm* **2011**, *2*, 1033. h) G. Wang, J. Zhang, *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **2012**, *13*, 299. i) F. Wang, X. Liu, I. Willner, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, *54*, 1098. j) N. Song, Y. W. Yang, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 3474.

¹¹⁴ a) A. Stein, *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 763. b) V. Valtchev, L. Tosheva, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 6734.

biomédicas¹¹⁵ o también en procedimientos de detección y reconocimiento molecular.¹¹⁶

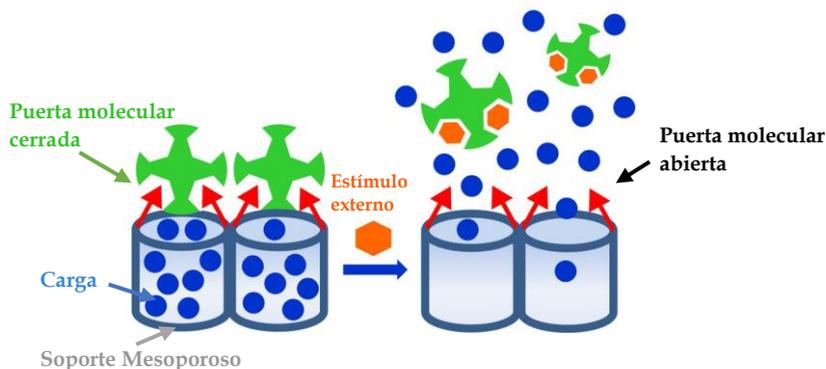


Figura 5.12. Representación esquemática de una puerta molecular que controla la liberación en presencia de un estímulo específico. Reimpreso (adaptado) con permiso de F. Sancenón, L. Pascual, M. Oroval, E. Aznar, R. Martínez-Mañez, *ChemistryOpen* **2015**, 4, 418. Copyright © 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

El primer ejemplo de puerta molecular fue descrito en 2003 por el Prof. M. Fujiwara y colaboradores, en el que funcionalizaron la superficie externa de soportes tipo MCM-41 con un derivado de cumarina.¹¹⁷ Los autores describieron un procedimiento en el cual eran capaces de cerrar la puerta molecular mediante una reacción de fotodimerización [2+2] de la cumarina, obteniéndose de este modo, el bloqueo de la carga, gracias a la formación de un dímero conteniendo un anillo de ciclobutano. Desde entonces, se encuentran descritos en la literatura múltiples ejemplos de materiales funcionalizados con puertas

¹¹⁵ a) J. A. Barreto, W. O'Malley, M. Kubeil, B. Graham, H. Stephan, L. Spiccia, *Adv. Mater.* **2011**, 23, 18. b) W. J. Stark, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 1242. c) Z. Li, J. C. Barnes, A. Bosoy, J. F. Stoddart, J. I. Zink, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 2590. d) T. L. Doane, C. Burda, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 2885.

¹¹⁶ C. Coll, A. Bernardos, R. Martínez-Mañez, F. Sancenón. *Acc. Chem. Res.* **2013**, 46, 339.

¹¹⁷ N. K. Mal, M. Fujiwara, Y. Tanaka. *Nature*, **2003**, 421, 350. b) N. K. Mal, M. Fujiwara, Y. Tanaka, T. Taguchi, M. Matsukata, *Chem. Mater.* **2003**, 15, 3385. c) Y. Zhu, M. Fujiwara, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 46, 2241.

moleculares de naturaleza orgánica,¹¹² inorgánica,¹¹⁸ polimérica¹¹⁹ o incluso ensamblajes supramoleculares.¹²⁰

Por otra parte, existen numerosos ejemplos de estímulos encargados de desencadenar la liberación de la carga en estos sólidos mesoporosos, los estímulos endógenos (como cambios en el pH,¹²¹ reacciones con (bio)moléculas,¹²² potenciales redox,¹²³ ...) que están presentes en los organismos vivos y no requieren de una acción externa para activar la liberación de la carga. Además, estos estímulos proporcionan una liberación intrínseca y autónoma. Sin embargo, el control de la dosificación mediante estímulos endógenos es menor que empleando sistemas que se abren mediante estímulos exógenos como

¹¹⁸ a) E. Aznar, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, F. Sancenon, J. Soto, P. Amorós, P. Guillem, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 6833. b) J. L. Vivero-Escoto, I. I. Slowing, C. Wu, V. S.-Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3462.

¹¹⁹ a) R. Liu, X. Zhao, T. Wu., P. Y. Feng, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14418. b) C. L. Zhu, X. Y. Song, W. H. Zhou, H. H. Yang, X. R. Wang, *J. Mater. Chem.*, **2009**, *19*, 7765.

¹²⁰ a) T. D. Nguyen, Y. Liu, S. Saha, K. C. F. Leung, J. F. Stoddart, J. I. Zink, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 626. b) R. Liu, Y. Zhang, P. Y. Feng, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15128.

¹²¹ a) S. Angelos, Y. W. Yang, K. Patel, J. F. Stoddart, J. I. Zink, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 2222 b) V. Cauda, C. Argyo, A. Schlossbauer, T. J. Bein, *J. Mater. Chem.*, **2010**, *20*, 4305. c) H. Meng, M. Xue, T. Xia, Y. L. Zhao, F. Tamanoi, J. F. Stoddart, J. I. Zink, E. A. Nel, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 12690. d) J. Liu, X. Du, *J. Mat. Chem.*, **2010**, *20*, 3642. e) W. Guo, J. Wang, S. J. Lee, F. Dong, S. S. Park, C. S. Ha, *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, 8641. f) A. Papat, J. Liu, G. Q. Lu, S. Z. Qiao, *J. Mater. Chem.*, **2012**, *22*, 11173, Y.Y. Yan, J.H. g) Y.L. Sun, Y.W. Yang, D.X. Chen, G. Wang, Y. Zhou, C.Y. Wang, J. F. Stoddart, *Small*, **2013**, *9*, 3224.

¹²² a) C. Coll, R. Casasús, E. Aznar, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. Soto, P. Amorós, *Chem. Commun.*, **2007**, *9*, 1957. b) E. Aznar, C. Coll, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. Soto, P. Amorós, J. Cano, E. Ruiz, *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 6877. c) Y. Zhao, B. G. Trewyn, I. I. Slowing, V. S.-Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 8398. d) Y. L. Choi, J. Jaworsky, M. L. Seo, S. J. Lee, J. H. Jung, *J. Mater. Chem.*, **2011**, *21*, 7882. e) A. Schulz, R. Woolley, T. Tabarin, C. McDonagh, *Analyst*, **2011**, *136*, 1722. f) J. Lee, J. Lee, S. Kim, C. -J. Kim, S. Lee, B. Min, Y. Shin, C. Kim, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2011**, *32*, 1357. g) I. Candel, A. Bernardos, E. Climent, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. Soto, A. Costero, S. Gil, M. Parra, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 8313. h) R. Villalonga, P. Díez, A. Sánchez, E. Aznar, R. Martínez-Máñez, J. M. Pingarrón, *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, 7889. i) M. Oroval, E. Climent, C. Coll, R. Eritja, A. Aviñó, M.D. Marcos, F. Sancenón, R. Martínez-Máñez, P. Amorós, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 5480.

¹²³ R. Mortera, J. Vivero-Escoto, I. I. Slowing, E. Garrone, B. Onida, V. S.Y. Lin, *Chem. Commun.*, **2009**, *22*, 3219.

la irradiación con luz,¹²⁴ campos magnéticos¹²⁵ o la temperatura,¹²⁶ es decir, requieren de una activación para iniciar el mecanismo de liberación. Por consiguiente, estos sistemas presentan un total control de la liberación temporal y espacial de los fármacos en los tejidos o células. Sin embargo, hoy en día estos sistemas presentan una gran limitación en estudios *in vivo*, ya que la penetración de los estímulos externos en los tejidos es muy baja, lo cual, limita su rendimiento.

De todo lo expuesto anteriormente, se puede deducir que los materiales mesoporosos con puertas moleculares son una herramienta novedosa y en constante desarrollo.¹²⁷ Las siguientes secciones de esta introducción general están dedicadas a ilustrar algunos ejemplos relevantes de materiales, según sus aplicaciones y en relación con el marco contextual de esta Tesis Doctoral.

5.4.1. Partículas de sílice mesoporosa con puertas moleculares como sensores.

La utilización de materiales funcionalizados con puertas moleculares como sensores de especies de interés es un gran avance. En

¹²⁴ E. Johansson, E. Choi, S. Angelos, M. Liang, J. I. Zink, *Sol. Gel Sci. Technol.*, **2008**, *46*, 313. b) J. Lai, X. Mu, Y. Xu, X. Wu, C. Wu, C. Li, J. Chen, Y. Zhao, *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 7370. c) Y.-L. Sun, B.-J. Yang, S.X.-A. Zhang, S. X.-A., Y.-W., Yang, *Chem.-Eur. J.*, **2012**, *18*, 9212.

¹²⁵ S. Giri, B.G. Trewyn, M.P. Stellmaker, V.S.-Y. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5038.

¹²⁶ a) C. Liu, J. Guo, W. Yang, J. Hu, C. Wang, S. Fu, *J. Mat. Chem.*, **2009**, *19*, 4764. b) J. Lai, X. Mu, Y. Xu, X. Wu, C. Wu, C. Li, J. Chen, Y. Zhao, *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 7370. c) C. R. Thomas, D. P. Ferris, J. H. Lee, E. Choi, M. H. Cho, E. S. Kim, J. F. Stoddart, J. S. Shin, J. Cheon, J. I. Zink, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 10623.

¹²⁷ a) B. G. Trewyn, I. I. Slowing, S. Giri, H. T. Chen, V. S. Y. Lin, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 846. b) Y. Zhao, J. L. Vivero-Escoto, I. I. Slowing, B. G. Trewyn, V. S. Y. Lin, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2010**, *7*, 1013 c) J. L. Vivero-Escoto, I. I. Slowing, B. G. Trewyn, V. S. Y. Lin, *Small* **2010**, *6*, 1952. d) D. Tarn, C. E. Ashley, M. Xue, E. C. Carnes, J. I. Zink, C. J. Brinker, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 792. e) Y. W. Yang, Y. L. Sun, N. Song, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 1950. f) A. Bansal, Y. Zhang, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 3052.

estos sistemas, el reconocimiento molecular (detección) de una determinada especie provoca la apertura de la puerta y la liberación de cromóforos o fluoróforos encapsulados en el interior de los poros (señalización). Esto hace que, la señalización se amplifique enormemente.¹²⁸ Por otro lado, este enfoque es completamente flexible debido a que se puede seleccionar el tipo de material mesoporoso y las moléculas indicadoras (cromóforos y fluoróforos) para la detección de un mismo analito. Esto abre un gran abanico de posibilidades al poder diseñar sistemas muy precisos para aplicaciones biomédicas muy particulares.

Desde que en 2006 el grupo del Prof. R. Martínez-Máñez sintetizara el primer material mesoporoso de tipo MCM-41 para la detección colorimétrica de adenosina trifosfato (ATP),¹²⁹ muchos grupos de investigación han desarrollado nuevos sensores moleculares basados en materiales mesoporosos para la detección de aniones.¹³⁰

El trabajo realizado por el grupo de R. Martínez-Máñez consistió en, cargar el material MCM-41 con $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]\text{Cl}_2$ como cromóforo/fluoróforo y posteriormente funcionalizar por “grafting” la

¹²⁸ R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, M. Hecht, M. Biyikal, K. Rurack., *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 399, 55.

¹²⁹ R. Casasús, E. Aznar, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. Soto, P. Amorós, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 6661

¹³⁰ a) C. Coll, R. Casasús, E. Aznar, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. Soto, P. Amorós, *Chem. Commun.* **2007**, 1957–1959. b) E. Aznar, C. Coll, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. Soto, P. Amorós, J. Cano, E. Ruiz, *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 6877. c) C. Coll, E. Aznar, R. Martínez-Máñez, M. D. Marcos, F. Sancenón, J. Soto, P. Amorós, J. Cano, E. Ruiz, *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 10048. d) V. C. Özalp, T. Schäfer, *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 9893. e) C. L. Zhu, C. H. Lu, X. Y. Song, H. H. Yang, X. R. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 1278. f) X. He, Y. Zhao, D. He, K. Wang, F. Xu, J. Tang, *Langmuir* **2012**, 28, 12909. g) Z. L. Zheng, X. Huang, M. Schenderlein, D. Borisova, R. Caos, H. Mahwald, D. Shchukin., *Adv. Funct. Mater.* **2013**, 23, 3307. h) V. C. Özalp, A. Pinto, E. Nikulina, A. Chuvilin, T. Schäfer, *Part. Part. Syst. Charact.* **2014**, 31, 161. i) L. Hou, C. Zhu, X. Wu, G. Chen, D. Tang, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 1441. j) L. Hou, C. Zhu, X. Wu, G. Chen, D. Tang., *Chem Commun.*, **2014**, 50, 1441.

superficie del material con 3-[2-(2-aminoetilamino)etilamino]propil trimetoxisilano. A pH neutro, la puerta molecular permanece abierta, y se observa la presencia del complejo de rutenio en la disolución (Figura 5.13). Sin embargo, en presencia de adenosina trifosfato (ATP), se inhibe la liberación del cromóforo por formación de complejos entre la poliamina (puerta molecular) y el ATP mediante interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno.

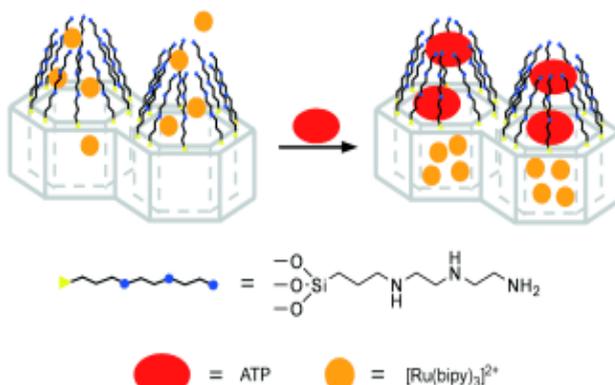


Figura 5.13. Representación esquemática de la detección de TATP mediante la inhibición $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$ en sistemas mesoporosos del tipo MCM-41. Reimpreso (adaptado) con permiso de R. Casasús, E. Aznar, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. Soto, P. Amorós, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6661. Copyright © 2006 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Así mismo, en otro estudio, los mismos autores descubrieron que esta poliamina podía modular la apertura/cierre de los poros únicamente mediante cambios en el pH.¹³¹ A pH ácido, la poliamina se encuentra protonada e inhibe la liberación del cromóforo catiónico de Ru(II) debido a las repulsiones coulombianas.

¹³¹ R. Casasús, E. Climent, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. Soto, P. Amorós, J. Cano, E. Ruiz, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1903.

Otro sistema de apertura mediado por cambios de pH más reciente, ha sido desarrollado en nuestro grupo de investigación.¹³² Se preparó un material funcionalizado con una puerta molecular autoinmolante que a pH básico desencadena la liberación de sulforodamina B, debido a la desprotonación del grupo fenol. Este fenolato, inicia una reacción intramolecular en cascada que acaba provocando la ruptura de la puerta molecular y, en consecuencia, la liberación de la carga al medio (Figura 5.14).

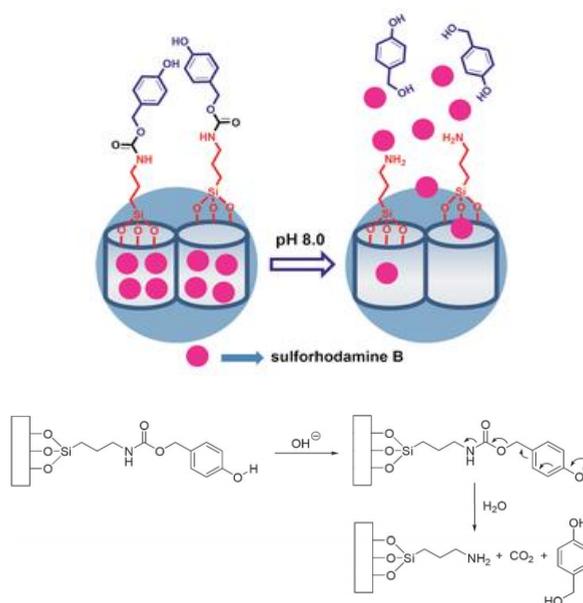


Figura 5.14. Representación esquemática para la liberación de sulforodamina B a pH = 8. Reimpreso (adaptado) con permiso de L. A. Juárez, E. Añón, C. Giménez, F. Sancenón, R. Martínez-Máñez, A. M. Costero, P. Gaviña, M. Parra, A. Bernardos., *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 14126. Copyright © 2016 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Otro ejemplo es el sistema desarrollado por el recientemente galardonado con el Premio Nobel en Química 2016, el Prof. J. Fraser

¹³² L. A. Juárez, E. Añón, C. Giménez, F. Sancenón, R. Martínez-Máñez, A. M. Costero, P. Gaviña, M. Parra, A. Bernardos., *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 14126.

Stoddart en 2013.¹³³ En donde, nanopartículas de sílice mesoporosa cargadas y funcionalizadas con nanoválvulas de pilar[5]areno[2]pseudorotaxano como puertas moleculares, operan en medios biológicos liberando su carga por cambios de pH o por agregación de un agente competitivo (Figura 5.15).¹³⁴

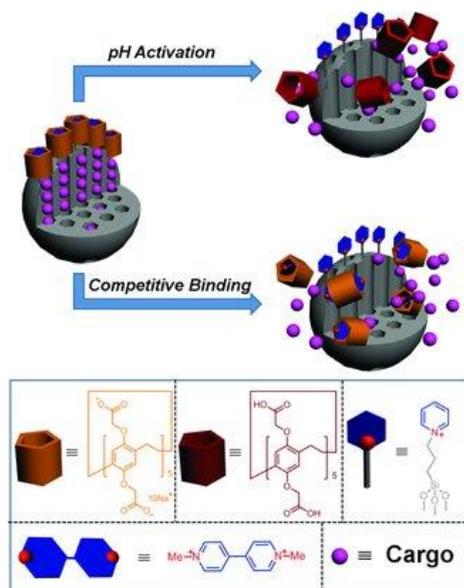


Figura 5.15. Representación esquemática de nanoválvulas de MCM-41 que operan mediante cambios de pH o por la interacción competitiva para la liberación de la carga. Reimpreso (adaptado) con permiso de Y. L. Sun, Y. W. Yang, D. X. Chen, G. Wang, Y. Zhou, C. Y. Wang, J. F. Stoddart., *Small*, **2013**, 9, 3224. Copyright © 2013 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

¹³³ a) S. Angelos, Y. W. Yang, K. Patel, J. F. Stoddart, J. I. Zink., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47, 2222. b) S. Angelos, Y. W. Yang, N. M. Khashab, J. F. Stoddart, J. I. Zink., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 11344. c) N. M. Khashab, M. E. Bolowich, A. Trabolsi, D. C. Friedman, C. Valente, Y. Lau, H. A. Khatib, J. I. Zink, J. F. Stoddart., *Chem. Commun.*, **2009**, 36, 5371. d) S. Angelos, N. M. Khashad, Y. W. Yang, A. Trabolsi, H. A. Khatib, J. F. Stoddart., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 12912. e) H. Meng, M. Xue T. Xia, Y. L. Zhao, F. Tamanoi, J. F. Stoddart, A. E. Nel, J. I. Zink., *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 12690. f) Y. L. Zhao, Z. Li, S. Kagehie, Y. Y. Botros, J. F. Stoddart, J. I. Zink., *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 13016. g) M. Xue, D. Cao, J. F. Stoddart, J. I. Zink., *Nanoscale* **2012**, 4, 7569. h) M. D. Yilmaz, M. Xue, M. W. Ambrogio, O. Buyukcakir, Y. Wu, M. Frascioni, X. Chen, M. S. Nassar, J. F. Stoddart, J. I. Zink., *Nanoscale* **2015**, 7, 1067.

¹³⁴ Y. L. Sun, Y. W. Yang, D. X. Chen, G. Wang, Y. Zhou, C. Y. Wang, J. F. Stoddart., *Small*, **2013**, 9, 3224.

Otro ejemplo reciente es el desarrollado en nuestro grupo de investigación para la detección de dióxido de nitrógeno.¹³⁵ El sistema de detección en nanopartículas de sílice, tipo MCM-41, cargadas con sulforodamina B y funcionalizadas con un derivado de borodipirrometano (BODIPY) a través de una hidrazona. Este enlace hidrazona se rompe de manera oxidativa en presencia de NO_2 , liberando así la carga del material. De esta manera es posible seguir la detección de dióxido de nitrógeno no solamente mediante la emisión de la sulforodamina B sino también monitorizando la fluorescencia del BODIPY que se libera (Figura 5.16). Este doble control minimiza cualquier falso positivo.

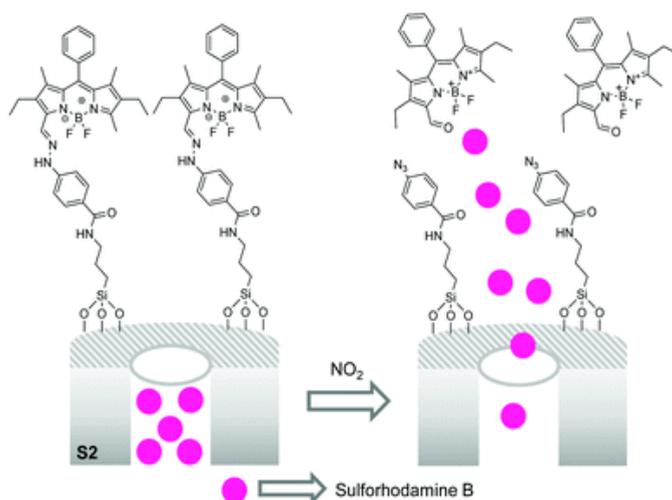


Figura 5.16. Representación esquemática de detección de NO_2 y posterior liberación del BODIPY y de la carga encapsulada. Reimpreso (adaptado) con permiso de L. A. Juárez, A. M. Costero, M. Parra, P. Gaviña, S. Gil, R. Martínez-Mañez, F. Sancenón., *Chem. Commun.*, **2017**, 53, 585. Copyright © 2007 The Royal Society of Chemistry.

¹³⁵ L. A. Juárez, A. M. Costero, M. Parra, P. Gaviña, S. Gil, R. Martínez-Mañez, F. Sancenón., *Chem. Commun.*, **2017**, 53, 585.

Existen en la actualidad numerosos ejemplos en la bibliografía de sensores basados en materiales mesoporosos con puertas moleculares.^{136,137}

5.4.2. Partículas de sílice mesoporosa con puertas moleculares para la liberación controlada de fármacos.

La posibilidad de utilizar materiales híbridos de sílice mesoporosa con puertas moleculares, para la liberación controlada y dirigida de fármacos en el organismo tiene un enorme interés en el campo de la biomedicina.¹³⁸ Estos materiales permiten la liberación de uno o más fármacos en lugares específicos por medio de interacciones con determinados estímulos biológicos que desencadenan la apertura de los poros y, en consecuencia, la liberación de la carga. Los sistemas de entrega controlada pueden reducir considerablemente la

¹³⁶ a) Y. F. Zhang, Q. Yuan, T. Chen, X. B. Zhang, Y. Chen, W. H. Tan, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 1956. b) Y. Wen, L. Xu, C. Li, H. Du, L. Chen, B. Su, Z. Zhang, X. Zhang, Y. Song, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 8410. c) Y. L. Choi, J. Jaworski, M. L. Seo, S. J. Lee, J. H. Jung, *J. Mater. Chem.*, **2011**, *21*, 7882. d) Z. Zhang, D. Balogh, F. Wang, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1934. e) L. Fu, J. Zhuang, W. Lai, X. Que, M. Lu, D. Tang, *J. Mater. Chem. B.*, **2013**, *1*, 6123. f) Z. Zhang, F. Wang, D. Balogh, I. Willner, *J. Mater. Chem. B.*, **2014**, *2*, 4449. g) H. Kim, B. A. Rao, J. Jeong, S. Angupillai, J. S. Choi, J. Oh Nam, C. S. Lee, Y. A. Son., *Sensors and Actuators B*, **2016**, *224*, 404.

¹³⁷ a) W. Zhao, H. Zhang, Q. He, Y. Li, J. Gu, L. Li, H. Li, J. Shi, *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 9459. b) I. Candel, A. Bernardos, E. Climent, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. Soto, A. M. Costero, S. Gil, M. Parra, *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 8313. c) L. Chen, Y. Wen, B. Su, J. Di, Y. Song, L. Jiang, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 13811. d) E. Climent, R. Martínez-Máñez, A. Maqueira, F. Sancenón, M. D. Marcos, E. M. Brun, J. Soto, P. Amorós, *ChemistryOpen*, **2012**, *1*, 251. e) Y. Salinas, A. Agostini, E. Pérez-Esteve, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, M. D. Marcos, J. Soto, A. M. Costero, S. Gil, M. Parra, P. Amorós, *J. Mater. Chem. A.*, **2013**, *1*, 3561. f) B. Zhang, B. Liu, J. Liao, G. Chen, D. Tang, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 9245. g) Z. Gao, D. Tang, M. Xu, G. Chen, H. Yang, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 6256. h) D. Tang, Y. Lin, Q. Zhou, Y. Lin, P. Li, R. Niessner, D. Knopp, *Anal. Chem.*, **2014**, *86*, 11451. i) P. Díez, A. Sánchez, M. Gamella, P. Martínez-Ruiz, E. Aznar, C. de La Torre, J. R. Murguía, R. Martínez-Máñez, R. Villalonga, M. J. Pingarrón, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, *136*, 9116. j) El Sayed, C. Giménez, E. Aznar, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, M. Licchelli, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 1017. k) E. Climent, M. Biyikal, K. Gawlitza, T. Dropa, M. Urban, A. M. Costero, R. Martínez-Máñez, K. Rurack., *Sensors and Actuators B*, **2017**, *246*, 1056.

¹³⁸ Z. Li, J. C. Barnes, A. Bosoy, J. F. Stoddart, J. I. Zink., *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2590.

dosificación y, por tanto, los efectos secundarios, convirtiéndolos, en prometedores sistemas para desarrollar nuevas terapias más seguras y eficaces como la liberación en células individuales o sobre los tejidos diana.

En los últimos 10 años, muchos investigadores han desarrollado nuevas puertas moleculares “biocontroladas”.¹³⁹ Normalmente, el estímulo utilizado para desencadenar la apertura de los poros es la presencia de enzimas capaces de romper la puerta molecular mediante mecanismos de hidrólisis enzimáticos.¹⁴⁰ El uso de enzimas, como estímulos, encargados de abrir el sistema, es fácilmente explicable debido a la gran importancia que presentan las enzimas en los procesos biológicos. Por ejemplo, existen condiciones patológicas de enfermedades como cáncer o inflamaciones sobre tejidos en donde las enzimas; tales como, esterasas, glicosidasas, amidasas, peptidasas, fosfolipasas, reductasas y DNAsas se encuentran sobreexpresadas y exhiben una mayor actividad enzimática, lo que provocaría, una liberación preferencial de la carga en estos lugares. Un aspecto crucial en estos materiales controlados por enzimas es la correcta selección de la puerta molecular: los grupos escindibles deben ser accesibles al sitio activo de la enzima.

El grupo del Prof. J. Fraser Stoddart desarrolló el primer material mesoporoso controlado por una esterasa, enzima que cataliza la hidrólisis de ésteres para dar ácidos y alcoholes. El sistema diseñado consistía en un soporte mesoporoso cargado con rodamina B y un

¹³⁹ A. Llopis-Lorente, B. Lozano-Torres, A. Bernardos, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón., *J. Mater. Chem. B*, **2017**, *5*, 3069.

¹⁴⁰ a) A. Schlossbauer, J. Kecht, T. Bein., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 3092. b) C. Park, H. Kim, S. Kim, C. Kim., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 16614.

[2]rotaxano formado entre un trietilenglicol y α -ciclodextrina como puerta molecular.¹⁴¹ Con el fin de evitar el deshebraje del rotaxano y la liberación del colorante, éste se funcionalizó en el extremo superior con una molécula voluminosa (un adamantano), mediante la formación de un éster. La posterior introducción de la enzima PLE hidrolizó el éster liberándose el adamantano y desencadenando la liberación de la carga (Figura 5.17).

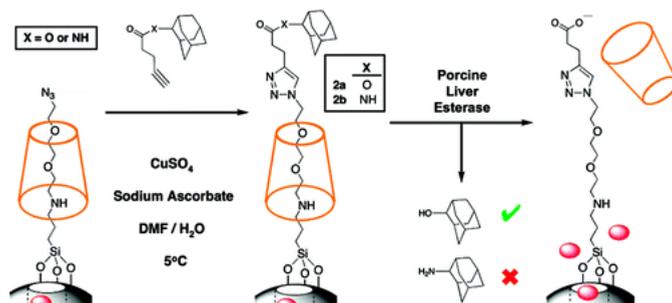


Figura 5.17. Representación esquemática de hidrólisis de un éster mediado por una esterasa. Reimpreso (adaptado) con permiso de K. Patel, S. Angelos, W. R. Dichtel, A. Coskun, Y. W. Yang, J. I. Zink, J. F. Stoddart, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2382. Copyright © 2008 American Chemical Society.

Un año más tarde, el grupo del Prof. R. Martínez-Máñez publicó el primer ejemplo de nanomaterial mesoporoso funcionalizado con un oligosacárido como puerta molecular. En presencia de enzimas glicosidasas se produce la hidrólisis del enlace glicosídico y la consiguiente degradación del oligosacárido permitiendo la liberación

¹⁴¹ K. Patel, S. Angelos, W. R. Dichtel, A. Coskun, Y. W. Yang, J. I. Zink, J. F. Stoddart, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2382

de la carga.¹⁴² Desde entonces son numerosos los ejemplos de materiales que se abren frente a glicosidasas.¹⁴³

En 2010, A. Heise y P. D. Thornton publicaron uno de los primeros trabajos de liberación controlada mediada por peptidasas.¹⁴⁴ En este trabajo, los autores describieron un método para la liberación controlada por enzimas peptidasas en partículas de sílice funcionalizadas con un derivado de péptido bioactivo terminado con un grupo fluorenilmetiloxycarbonilo (*Fmoc*) que actúa como puerta molecular impidiendo la salida de la carga. La hidrólisis enzimática específica del enlace peptídico elimina el voluminoso grupo, *Fmoc*, unido al ácido glutámico permitiendo la liberación selectiva. (Figura 5.18).

¹⁴² A. Bernardos, E. Aznar, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. Soto, J. M. Barat, P. Amorós, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 5884.

¹⁴³ a) C. Park, H. Kim, S. Kim, C. Kim, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 16614. b) A. Bernardos, L. Mondragón, E. Aznar, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. Soto, J. M. Barat, E. Pérez-Payá, C. Guillem, *ACS Nano*, **2010**, *4*, 6353. c) A. Agostini, L. Mondragón, A. Bernardos, R. Martínez-Máñez, M. D. Marcos, F. Sancenón, J. Soto, A. Costero, C. Manguan-Garca, R. Perona, M. Moreno-Torres, R. Aparicio-Sanchís, J.R Murguía, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10556. d) Z. W. Chen, Z. H. Li, Y. H. Lin, M. L. Yin, J. S. Ren, X. G. Qu, *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, 1778. e) C. Acosta, E. Pérez-Esteve, C. A. Fuenmayor, S. Benedetti, M. S. Cosio, J. Soto, F. Sancenón, S. Mannino, J. Barat, M. D. Marcos, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2014**, *6*, 6453. f) W. Guo, C. Yang, L. Cui, H. Lin, F. Qu, *Langmuir*, **2014**, *30*, 243. g) M. L. Yin, E. G. Ju, Z. W. Chen, Z. H. Li, J. S. Ren, K. G. Qu, *Chem. Eur. J.*, **2014**, *20*, 14012. h) Z. Wang, Z. Chen, Z. Liu, P. Shi, K. Dong, E. Ju, J. Ren, X. A. Qu, *Biomaterials*, **2014**, *35*, 9678. i) A. Hakeem, R. Duan, F. Zahid, C. Dong, B. Wang, F. Hong, X. Ou, Y. Jia, X. Lou, F. Xia, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 13268. j) C. Giménez, E. Climent, E. Aznar, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, M. D. Marcos, P. Amorós, K. Rurack, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2014**, *53*, 12629. k) Q. Zhao, J. Liu, W. Zhu, C. Sun, D. Di, Y. Zhang, P. Wang, Z. Wang, S. Wang, *Acta Biomater.*, **2015**, *23*, 147. l) C. Yang, W. Guo, N. An, L. Cui, T. Zhang, R. Tong, Y. Chen, H. Lin, F. Qu, *RSC Adv.*, **2015**, *5*, 80728. m) X. Chen, Z. Liu, *Macromol. Rapid Commun.* **2016**, *37*, 1533. n) A. Hakeem, F. Zahid, R. Duan, M. Asif, T. Zhang, Z. Zhang, Y. Cheng, Z. Lou, F. Xia, *Nanoscale*. **2016**, *8*, 5089.

¹⁴⁴ P. D. Thornton, A. Heise. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2024.

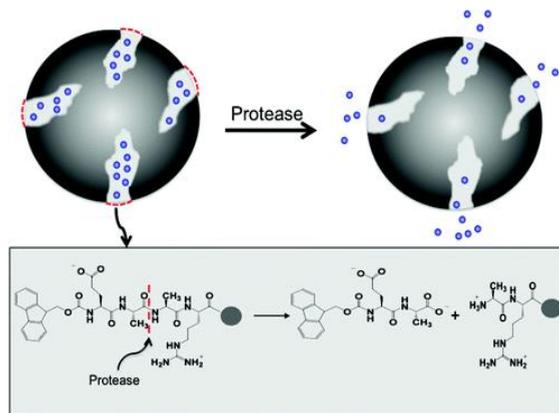


Figura 5.18. Representación esquemática de hidrólisis de un enlace peptídico mediada por proteasas y posterior liberación de la carga. Reimpreso (adaptado) con permiso de P. D. Thornton, A. Heise., *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2024. Copyright © 2010 American Chemical Society.

Posteriormente a estos hallazgos, muchos grupos de investigación han desarrollado numerosos sistemas de liberación controlada mediados por peptidasas.¹⁴⁵

- ¹⁴⁵ a) N. Singh, A. Karambelkar, L. Gu, K. Lin, J. S. Miller, C. S. Chen, M. J. Sailor, S. N. Bhatia, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 19582. b) C. Coll, L. Mondragón, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, M. D. Marcos, J. Soto, P. Amorós, E. Pérez-Payá, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2011**, *50*, 2138. c) X. J. Yang, F. Pu, C. E. Chen, J. S. Ren, X. G. Qu, *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 11133. d) I. Candel, E. Aznar, L. Mondragón, C. de la Torre, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, M. D. Marcos, P. Amorós, C. Guillem, E. Pérez-Payá, A. Costero, *Nanoscale*, **2012**, *4*, 7237. e) J. H. Xu, F. P. Gao, L. L. Li, H. L. Ma, Y. S. Fan, W. Liu, S. S. Guo, X. Z. Zhao, H. Wang, *Microporous Mesoporous Mater.*, **2013**, *182*, 165. f) J. Zhang, Z. F. Yuan, Y. Wang, W. H. Chen, G. F. Luo, S. X. Cheng, R. X. Zhuo, X. Z. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 5068. g) K. Radhakrishnan, S. Gupta, D. P. Gnanadhas, P. C. Ramamurthy, D. Chakravorty, A. M. Raichur, *Part. Part. Syst. Charact.*, **2014**, *31*, 449. h) C. de la Torre, L. Mondragón, C. Coll, F. Sancenón, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, P. Amorós, E. Pérez-Payá, M. Orzaez, *Chem. Eur. J.*, **2014**, *20*, 15309. i) J. M. Li, F. Liu, Q. Shao, Y. Z. Min, M. Costa, E. K. L. Yeow, B. G. Xing, *Adv. Healthcare Mater.*, **2014**, *3*, 1230. j) L. Mondragón, N. Mas, V. Ferragud, C. de la Torre, A. Agostini, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, P. Amorós, E. Pérez-Payá, M. Orzaez, *Chem. Eur. J.*, **2014**, *20*, 5271. k) A. Popat, S. Jambhrunkar, J. Zhang, J. Yang, H. Zhang, A. Meka, C. Yu, *Chem. Commun.*, **2014**, *50*, 5547. l) C. de la Torre, I. Casanova, G. Acosta, C. Coll, M. J. Moreno, F. Albericio, E. Aznar, R. Mangues, M. Royo, F. Sancenón, R. Martínez-Máñez, *Adv. Funct. Mater.*, **2015**, *25*, 687. m) S. H. van Rijt, D. A. Bölükbas, C. Argyo, S. Datz, M. Lindner, O. Eickelberg, M. Königshoff, T. Bein, S. Meiners, *ACS Nano*, **2015**, *9*, 2377. n) Y. J. Cheng, G. F. Luo, J. Y. Zhu, X. D. Xu, X. Zeng, D. B. Cheng, Y. M. Li, Y. Wu, X. Z. Zhang, R. X. Zhuo, H. Feng, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2015**, *7*, 9078. o) Y. Liu, X. Ding, J. Li, Z. Luo, Y. Hu, J. Liu, L. Dai, J. Zhou, C. Hou and K. Cai, *Nanotechnology*, **2015**, *26*, 145102. p) C. de la Torre, L.

Más recientemente, el grupo del Prof. C. Yu desarrolló un material, tipo MCM-48, cargado con sulfasalazina (SZ) y recubierto con proteína de soja que se hidroliza en presencia de enzimas pancreáticas (duodeno).¹⁴⁶ Posteriormente, en presencia de bacterias productoras de azoreductasas (enzimas presentes en la microflora intestinal del intestino delgado y colon) capaces de hidrolizar enlaces azo (-N=N-) en diaminas, convertían el profármaco SZ en su metabolito activo, el ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), para el tratamiento de enfermedades inflamatorias gastrointestinales.

El empleo de azoreductasas como estímulo endógeno para la apertura de puertas moleculares es muy reciente y solamente encontramos dos ejemplos en la literatura.

En el año 2013, el grupo del Prof. R. Martínez-Máñez publicó la síntesis de un nanomaterial del tipo MCM-41, cargado con rodamina B y funcionalizado en su superficie con una sal derivada de azopiridinio.¹⁴⁷ Los autores demostraron que la liberación de la carga solo ocurría en presencia de enzimas reductasas y estererasas, mientras que en ausencia de éstas no se observaba ninguna liberación (Figura 5.19).

Mondragón, C. Coll, A. García, F. Sancenón, R. Martínez-Máñez, P. Amorós, E. Pérez-Payá, M. Orzáez, *Chem. Eur. J.*, **2015**, *21*, 15506. q) R. Bhat, A. Ribes, N. Mas, E. Aznar, F. Sancenón, M. D. Marcos, J. R. Murguía, A. Venkataraman, R. Martínez-Máñez, *Langmuir*, **2016**, *32*, 1195. r) A. Tukkapa, A. Último, C. de la Torre, T. Pardo, F. Sancenón, R. Martínez-Máñez, *Langmuir*, **2016**, *32*, 8507. s) J. Liu, B. Zhang, Z. Luo, X. Ding, J. Li, L. s) J. Hu, L. Liu, Z. Y. Li, R. X. Zhuo, X. Z. Zhang, *J. Mater. Chem. B*, **2016**, *4*, 1932.

¹⁴⁶ A. Popat, S. Jambhrunkar, J. Zhang, J. Yang, H. Zhang, A. Meka, C. Yu, *Chem. Commun.*, **2014**, *50*, 5547.

¹⁴⁷ N. Mas, A. Agostini, L. Mondragón, A. Bernardos, F. Sancenón, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, A. M. Costero, S. Gil, M. Merino-Sanjuán, P. Amorós, M. Orzáez E. Pérez-Payá., *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, 1346.

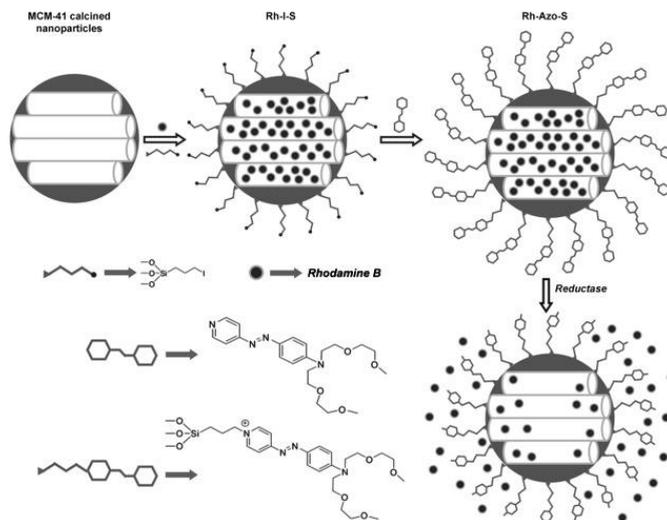


Figura 5.19. Representación esquemática del proceso de síntesis del material híbrido mesoporoso Rh-I-S y Rh-Azo-S y mecanismo de ruptura mediante enzimas reductasas en disolución. Reimpreso (adaptado) con permiso de N. Mas, A. Agostini, L. Mondragón, A. Bernardos, F. Sancenón, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, A. M. Costero, S. Gil, M. Merino-Sanjuán, P. Amorós, M. Orzáez E. Pérez-Payá., *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, 1346. Copyright © 2013 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Un enfoque similar, fue el desarrollado por el Prof. Y. Sun y colaboradores en 2014.¹⁴⁸ Publicaron la síntesis de nanopartículas de MCM-41 cargadas con ibuprofeno y funcionalizadas con un derivado de azobenceno. No se observó la liberación de ibuprofeno en líquido gástrico simulado ni en fluido intestinal. Finalmente, en fluido colónico simulado se observó la liberación de ibuprofeno debido a la presencia en este medio de azoreductasas.

En la segunda parte de esta Tesis Doctoral se presentan los estudios realizados empleando partículas híbridas de sílice mesoporosa, funcionalizadas con puertas moleculares. Por un lado, se ha estudiado la detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) y

¹⁴⁸ X. Li, T. Tang, Y. Zhou, Y. Zhang, Y. Sun., *Microporous and Mesoporous Materials*, **2014**, *184*, 83.

nitrógeno (RNS) en células, mediante el empleo de nanopartículas de MCM-41 funcionalizadas (*Capítulo 7*). Por otro lado, se ha estudiado el empleo de micropartículas de MCM-41, para el transporte y liberación controlada de fármacos en presencia de enzimas azoreductasas, presentes en la microflora intestinal para el tratamiento de enfermedades inflamatorias del colon (*Capítulo 8*).

6. Objetivos

Los objetivos que se plantean para esta segunda parte de la Tesis Doctoral se resumen en los puntos que se detallan a continuación:

❖ Desarrollo de sistemas sensores para la detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), basados en el uso de materiales mesoporosos nanométricos, cargados con colorantes y funcionalizados en su superficie con distintas puertas moleculares. Estas puertas se diseñarán de manera que sean capaces de fragmentarse únicamente en presencia de estas especies reactivas, liberando a la disolución el colorante responsable de la señal. Este objetivo se desarrolla en más profundidad en el *Capítulo 7*.

❖ Desarrollo, síntesis y caracterización de materiales mesoporosos micrométricos funcionalizados con un azocompuesto y cargados con colorantes o con un fármaco (concretamente, Budesonida) para el tratamiento de enfermedades inflamatorias del colon. Estos sistemas se diseñarán de manera que únicamente en presencia de las azoreductasas del colon se produzca la rotura reductiva de la puerta y la liberación del colorante o del fármaco. También se plantea el estudio de la eficacia de este material en ratas Wistar mediante el modelo de inducción de colitis ulcerosa TNBS. El desarrollo de este objetivo se detalla en el *Capítulo 8*.

***7. Nanopartículas de sílice mesoporosa con
puertas moleculares para la detección de estrés
oxidativo en células***

7.1. INTRODUCCIÓN: Estrés oxidativo.

Se entiende por estrés oxidativo, el daño celular causado por especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) en concreto, el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), radicales hidroxilo ($\cdot OH$), peróxidos ($ROO\cdot$), superóxido ($O_2^{\cdot-}$), oxígeno singlete (1O_2) y el ácido hipocloroso/hipoclorito ($HOCl/-OCl$) y por especies reactivas de nitrógeno (RNS, *reactive nitrogen species*) que incluyen, el óxido nítrico (NO), peroxinitrito ($ONOO^-$), el radical dióxido de nitrógeno ($NO_2\cdot$) y el anión nitrato (NO_3^-).¹⁴⁹

Estas especies altamente reactivas son producidas por la oxidación de numerosos sustratos para obtener energía (ATP) en el interior de las mitocondrias (Figura 7.1). En condiciones fisiológicas, las células permanecen en un equilibrio entre la generación de ROS/RNS y la neutralización de estas especies por parte de agentes antioxidantes endógenos como las enzimas superóxido dismutasa (SOD) o glutatión peroxidasa (GPX). En esta situación de equilibrio o de homeostasis, se favorece la supervivencia celular. Sin embargo, cuando se altera el equilibrio a favor de un aumento de las especies ROS/RNS, la célula entra en estrés oxidativo.¹⁵⁰ Bajo estas condiciones de estrés oxidativo las principales macromoléculas celulares como, proteínas, ácido desoxirribonucleico (ADN) y lípidos pueden sufrir oxidaciones.¹⁵¹ Como consecuencia, pueden producir respuestas anómalas que

¹⁴⁹ H. Sies, C. Berndt, D. P. Jones, *Annu. Rev. Biochem.*, **2017**, *86*, 715.

¹⁵⁰ B. D'Autréaux. M. B. Toledano., *Nature Reviews*, **2007**, *8*, 813.

¹⁵¹ A. Seven, S. Güzel, M. Aslan, V. Hamuryudan, *Clinical Biochemistry*, **2008**, *41*, 538.

conducen a una muerte celular e incluso al desarrollo de enfermedades graves.¹⁵²

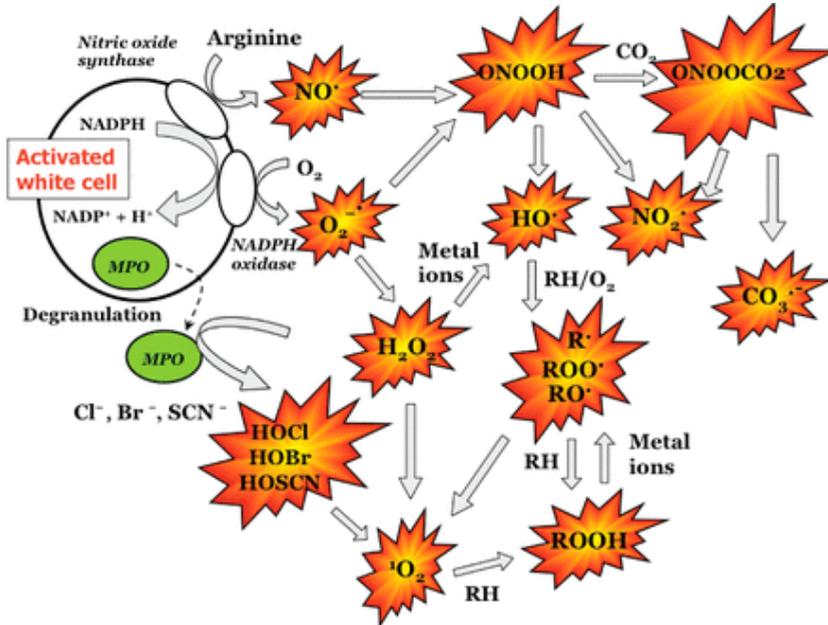


Figura 7.1. Representación esquemática de las especies reactivas, ROS y RNS, generadas a partir de leucocitos activados y su interconversión. Reimpreso y adaptado con permiso de M. J. Davies, *Biochem. J.* 2016, 473, 805. Copyright © 2016 Authors.

Algunos de los efectos nocivos del estrés oxidativo sobre las distintas macromoléculas son:

- **Proteínas:** Normalmente se suelen oxidar los grupos sulfuro de distintos aminoácidos presentes en las proteínas, como la metionina o cisteína. Además, la formación de nuevos grupos carbonilos (por oxidación de alcoholes) también comprometen la viabilidad de la célula a través de la pérdida de la funcionalidad de numerosas enzimas, receptores celulares, o de proteínas

¹⁵² a) D. Trachootham, W. Lu, M. A. Ogasawara, R. D. Nilsa, P. Huang, *Antioxid Redox Signal*, 2008, 10, 1343. b) J. J. Shacka, K. A. Roth, J. Zhang, *J. Front. Biosci.* 2008, 13, 718. c) A. Terman, U. T. Brunk, *Antioxid. Redox Signal.* 2006, 8, 197.

señalizadoras.¹⁵³ Por otro lado, esta oxidación puede producir reacciones secuenciales, denominadas reacciones de Maillard entre los carbohidratos (azúcares) y los grupos amino de las proteínas, dando lugar a productos que se caracterizan por su elevada reactividad y que contribuyen a su vez a una mayor generación de ROS.¹⁵⁴

- **ADN:** En el ADN ocurren fenómenos de mutación y carcinogénesis como consecuencia de la oxidación. Hay una pérdida de expresión génica^{152a} o capacidad de síntesis de proteínas causado por el daño oxidativo sobre algún gen específico (modificaciones en la desoxirribosa o en las bases púricas y pirimidínicas que conforman el ADN). De igual modo, la oxidación puede causar formación de agregados de ADN o de complejos ADN-proteína.¹⁵⁵ Los ROS también pueden reducir la expresión de las proteínas, mediante la metilación del ADN y de las histonas.¹⁵⁶ Además, como consecuencia del daño, se pueden activar procesos de parada de ciclo celular, apoptosis y senescencia celular.^{152c}

- **Lípidos:** En los lípidos es donde las especies reactivas de oxígeno producen un mayor daño. El proceso se conoce comúnmente como peroxidación lipídica.¹⁵⁷ Esta oxidación afecta fundamentalmente a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, *polyunsaturated fatty acids*) que son componentes esenciales de la

¹⁵³ a) O. Ioannidis, I. Varnalidis, G. Paraskevas, D. Botsios., *Digestion*. **2011**, 84, 89. b) A. H. Schapira, M. Gegg., *Parkinsons Dis.*, **2011**, 159160. c) Y. Wang, C. Yu, Y. Pan, X. Yang, Y. Huang, Z. Feng., *Inflammation*, **2012**, 35, 676. d) M. J. Davies, *Biochem. J.* **2016**, 473, 805.

¹⁵⁴ I. Dalle-Donne, A. Scaloni, D. Giustarini, E. Cavarra, G. Tell, G. Lungarella, *Mass. Spectrom. Rev.*, **2005**, 24, 594.

¹⁵⁵ a) H. Bartsch, J. Nair, *Langenbecks Arch. Surg.*, **2006**, 391, 499. b) M. Valko, D. Leibfrits, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur, J. Telser, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2007**, 39, 44.

¹⁵⁶ a) W. M. Grady, J. M. Carethers, *Gastroenterology*, **2008**, 135, 1079. b) F. Colotta, P. Allavena, A. Sica, C. Garlanda, A. Mantovani, *Carcinogenesis*, **2009**, 30, 1073.

¹⁵⁷ A. Catalá, *Chemistry and Physics of Lipids*, **2009**, 157, 1.

membrana celular. La peroxidación de lípidos de la membrana celular altera la permeabilidad produciendo edemas y la muerte celular.¹⁵⁸ Una vez iniciado el proceso de oxidación lipídica, un único radical, puede causar la oxidación de un gran número de moléculas de la membrana, este mecanismo se conoce como “mecanismo en cascada”. Un radical promueve la producción de más radicales libres que llevan a la formación de peróxidos y a otros subproductos electrofílicos, como el 4-hidroxinonenal (4-HNE) y el malondialdehído (MDA) para el caso de los ácidos grasos ω-6 (Figura 7.2), dos de los principales subproductos producidos por el estrés oxidativo en los PUFAs.¹⁵⁹

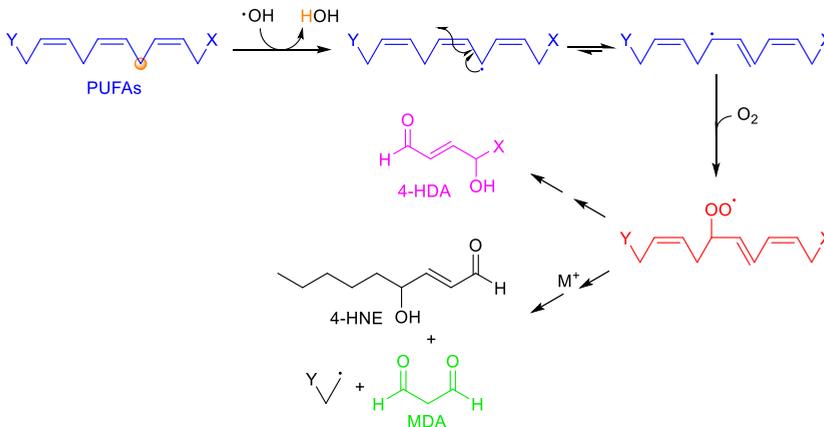


Figura 7.2. Esquema representativo de la peroxidación lipídica. Dependiendo del de la naturaleza del lípido se obtienen diferentes productos, pero siempre aparece el 4-HDA, MDA y aldehídos de cadena larga, por ejemplo, el 4-HNE.

Como vemos, los ROS y RNS producen importantes daños tanto en estructuras funcionales como en las células. Es por ello que, en los últimos 15 años, la comunidad científica ha desarrollado diversos

¹⁵⁸ A) Reylli PM, Burkley GB. *Br J Surg* **1990**, 77, 1324. b) E. Cadenas. *Annu Rev Biochem* **1997**, 58, 79. c) A. Jerlick, A. R. Pitt, R. J. Schaur, C. M. Spickett., *Free Radic Biol Med.*, **2000**, 28, 673. M. Maes, P. Galecki, Y. S. Chang, M. Berk., *Biol Psychiatry*. **2011**, 35, 676.

¹⁵⁹ V. Rangon, G. B. Bulkley., *Br Med Bull.*, **1993**, 49, 700.

sensores cromofluorogénicos para la detección de ROS y RNS.¹⁶⁰ En esta Tesis Doctoral decidimos centrarnos en el estudio de la detección cromofluorogénica de dos tipos de especies oxidantes: el peroxinitrito como ejemplo de RNS, y los radicales hidroxilo como ejemplo de especies ROS.

El peroxinitrito (ONOO⁻), se forma *in vivo* a través de la combinación de dos radicales: óxido nítrico (NO[•]) y superóxido O₂^{•-}.¹⁶¹ El peroxinitrito a su vez puede descomponer, en una reacción catalizada por protones, formando radicales [•]OH y [•]NO₂ altamente reactivos.¹⁶² Otra reacción relevante del peroxinitrito en medios biológicos es su adición nucleofílica al CO₂, que tras una ruptura homolítica conduce una vez más a la formación de radicales, en este caso, [•]NO₂ y CO₃^{•-}. Estos metabolitos secundarios atacan varias biomoléculas como hemos discutido anteriormente.¹⁶³ Como consecuencia, niveles anormalmente altos de peroxinitrito, contribuyen a efectos patogénicos, como accidentes cerebrovasculares, isquemia,

¹⁶⁰ a) L. C. Lo, C. Y. Chu, *Chem. Commun.*, **2003**, 21, 2728 b) Y. Koide, Y. Urano, S. Kenmoku, H. Kojima, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 10324. c) J. C. Sanchez, W. C. Trogler, *J. Mater. Chem.*, **2008**, 18, 5134. d) B. C. Dickinson, C. Huynh, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 5906. e) X. Chen, X. Tian, I. Shin, J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 4783. f) P. D. Ray, B. W. Huang, Y. Tsuji, *Cellular Signalling*, **2012**, 24, 981. g) X. Li, X. Gao, W. Shi, H. Ma, *Chem. Rev.*, **2014**, 114, 590 h) Q. Zhang, N. Zhang, Y. T. Long, X. Qian, Y. Yang, K. B. Li, L. Dong, S. Zhang, *Bioconjugate Chem.*, **2016**, 27, 341. i) W. Shi, W. P. Jia, D. M. Han, *Talanta*, **2017**, 165, 593.

¹⁶¹ a) J. S. Beckman, T. W. Beckman, J. Chen, P. A. Marshall, B. A. Freeman., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, 87, 1620. b) G. L. Squadrito, W. A. Pryor., *Free Radical Biol. Med.* **1998**, 25, 392. c) F. C. Fang., *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, 2, 820. d) C. Szabo, H. Ischiropoulos, R. Radi., *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2007**, 6, 662.

¹⁶² G. Merényi, J. Lind, S. Goldstein, G. Czapski, *Chem. Res. Toxicol.*, **1998**, 11, 712. b) C. Molina, R. Kissner, W. H. Koppenol, *Dalton Trans.*, **2013**, 42, 9898.

¹⁶³ a) R. Radi, J. S. Beckman, K. M. Bush, B. A. Freeman., *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 4244. b) C. Quijano, B. Alvarez, R. Gatti, O. Augusto, R. Radi., *Biochem. J.* **1997**, 322, 167. c) F. Violi, R. Marino, M. T. Milite, L. Loffredo, *Diabetes Metab. Res. Rev.*, **1999**, 15, 283. d) M. G. Bonini, O. Augusto., *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 9749. e) S. Bartesaghi, V. Valez, M. Trujillo, G. Peluffo, N. Romero, H. Zhang, B. Kalyanaraman., *Biochemistry*, **2006**, 45, 6813.

diabetes, aterosclerosis, enfermedades inflamatorias crónicas, cánceres y trastornos neurodegenerativos.¹⁶⁴

Atendiendo a la alta biorelevancia del peroxinitrito, es de gran importancia el desarrollo de técnicas sensibles y selectivas para la detección de ONOO⁻ *in vivo*. En este aspecto, en los últimos años se han desarrollado distintas sondas cromo-fluorogénicas, electroquímicas, por resonancia de espín y por métodos inmunohistoquímicos.¹⁶⁵ En general, las sondas fluorogénicas desarrolladas se basan en reacciones específicas del peroxinitrito, como la oxidación de fenoles a quinonas,¹⁶⁶ la nitración aromática,¹⁶⁷ la oxidación de cetonas activadas a dioxiranos reactivos,¹⁶⁸ la oxidación de compuestos de organoselenio o de organotelurio,¹⁶⁹ la escisión oxidativa de metilenos activados o la oxidación de boratos de arilo a fenoles.¹⁷⁰

¹⁶⁴ a) J. S. Beckman, M. Carson, C.D. Smith and W.H. Koppenol., *Nature*. **1993**, 364, 584. b) H. Wiseman and B. Halliwell., *Biochem. J.* **1996**, 313, 17. c) S. M. Schieke, K. Briviba, L. O. Klotz and H. Sies., *FEBS Lett.* **1999**, 448, 301. d) W. Kossenjans, A. Eis, R. Sahay, D. Brochman and L. Myatt., *Am. J. Physiol.: Heart Circ. Physiol.* **2000**, 278, 1311. e) P. Pacher, J. S. Beckman and L. Liaudet., *Physiol. Rev.* **2007**, 87, 315.

¹⁶⁵ a) A. Van der Vliet, J. P. Eiserich, C. A. O'Neill, B. Halliwell, C. E. Cross, *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, 319, 341. b) K. Dai, A. G. Vlessidis, N. P. Evmiridis, *Talanta*, **2003**, 59, 55. c) S. F. Peteu, R. Boukherroub, S. Szunerits, *Biosens. Bioelectron.* **2014**, 58, 359.

¹⁶⁶ Q. Zhang, Z. Zhu, Y. Zheng, J. Cheng, N. Zhang, Y.T. Long, J. Zheng, X. Qian, Y. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 18479.

¹⁶⁷ T. Ueno, Y. Urano, H. Kojima, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 10640.

¹⁶⁸ a) D. Yang, H.-L. Wang, Z.-N. Sun, N.-W. Chung, J. G. Shen, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 6004. b) Z. N. Sun, H. L. Wang, F. Q. Liu, Y. Chen, P. K. Hang Tam, D. Yang, *Org. Lett.*, **2009**, 11, 1887. c) T. Peng, D. Yang, *Org. Lett.*, **2010**, 12, 4932.

¹⁶⁹ a) F. Yu, P. Li, G. Li, G. Zhao, T. Chu, K. Han, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 11030. b) J. Tian, H. Chen, L. Zhuo, Y. Xie, N. Li, B. Tang, *Chem. Eur. J.*, **2011**, 17, 6626. c) F. Yu, P. Li, B. Wang, K. Han, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135, 7674.

¹⁷⁰ a) C. Liu, J. Pan, S. Li, Y. Zhao, L. Y. Wu, C. E. Berkman, A. R. Whorton, M. Xian., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2011**, 50, 10327. b) S. Rausaria, A. Kamadulski, N. P. Rath, L. Bryant, Z. Chen, D. Salvemini, W. L. Neumann., *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 4200. b) F. Yu, P. Song, P. Li, B. Wang, K. Han., *Analyst*, **2012**, 137, 3740 i) K. K. Lin, S. C. Wu, K. M. Hsu, C. H. Hung, W. F. Liaw, Y. M. Wang., *Org. Lett.*, **2013**, 15, 4242. c) X. Wang, J. Sun, W. Zhang, X. Ma, J. Lv. B. Tang., *Chem. Sci.*, **2013**, 4, 25. d) Z. J. Chen, W. Ren, Q. E. Wright, H. W. Ai, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135, 14940. e) J. T. Hou, J. Yang, K. Li, Y. X. Liao, K. K. Yu, Y. M. Xie, X. Q. Yu., *Chem. Commun.* **2014**, 50, 9947. f) X. Sun, K. Lacina, E. C.

Uno de los primeros ejemplos de sonda fluorogénica de peroxinitrito que aparece en la literatura es el desarrollado por el Prof. D. Yang en 2006.^{168a} Este sensor consistía en una unidad de diclorofluoresceína unida a una cetona activada (trifluorometilcetona) mediante un éter arílico (**XXIII**) (Figura 7.3). En presencia de ONOO⁻ la cetona, se oxida formando un dioxirano como intermedio de reacción, que posteriormente, oxida el anillo fenólico, dando como resultado la fragmentación del enlace éter, liberando al medio, el derivado de diclorofluoresceína (**XXIV**), altamente, fluorescente.

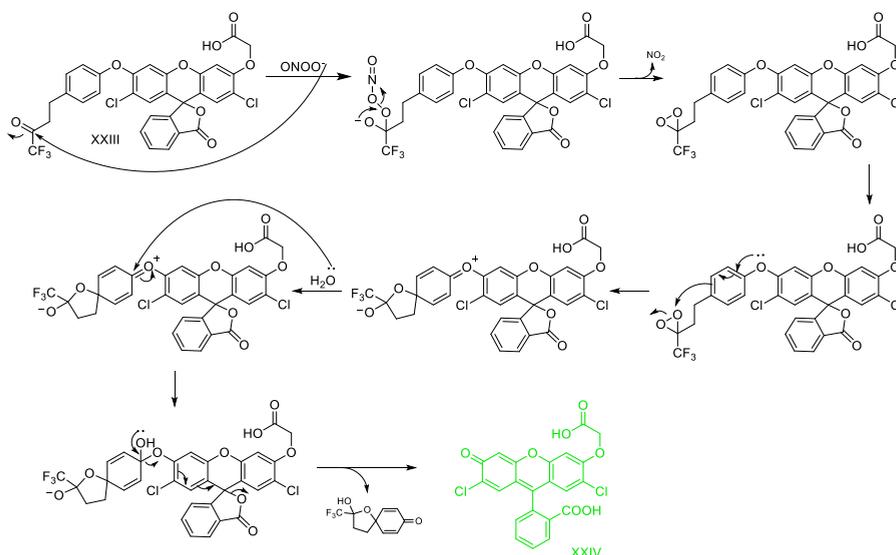


Figura 7.3. Mecanismo de reacción del peroxinitrito con el sensor **XXIII**.^{168a}

El mismo grupo de investigación desarrolló años más tarde, otras sondas de peroxinitrito basadas en el mismo tipo de reacción, pero empleando como fluoróforo un derivado de BODIPY^{168b} y un derivado de Rhodol fluorescente (HPCE).^{168c}

Ramsamy, S. E. Flower, J. S. Fossey, X. Qian, E. V. Anslyn, S. D. Bull, T. D. James, *Chem. Sci.*, **2015**, *6*, 2963.

En 2014, el Prof. Y. Yu desarrolló una sonda de peroxinitrito consistente en un derivado de éster borónico (XXV) capaz de producir una reacción en cascada mediada por el ONOO⁻,¹⁷¹ eliminando alcohol 4-hidroxibencílico y generando un fenóxido que reacciona intramolecularmente, para dar un derivado de cumarina fluorescente (XXVI) (Figura 7.4).

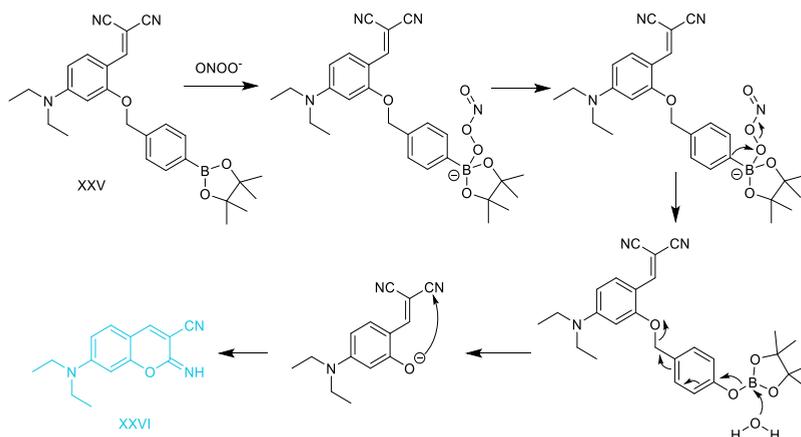


Figura 7.4. Mecanismo de detección para el peroxinitrito.¹⁷¹

Además de éste, en la literatura aparecen tres ejemplos más de sensores selectivos y específicos de ONOO⁻ basados en la química de los ésteres borónicos.¹⁷²

Por otra parte, como ya se ha mencionado, los radicales hidroxilo ([•]OH), juegan un papel importante en la degradación de biomoléculas. En consecuencia, es importante disponer de métodos de detección rápidos y fiables para estas especies. En la actualidad existe, por ejemplo, la espectroscopía de resonancia de espín (ESR) para la

¹⁷¹ J. Zhou, Y. Li, J. Shen, Q. Li, R. Wang, Y. Xu, X. Qian., *RSC Adv.*, **2014**, *4*, 5159.

¹⁷² a) X. Sun, Q. Xu, G. Kim, S. E. Flower, J. P. Lowe, J. Yoon, J. S. Fossy, X. Qian, S. D. Bull, T. D. James., *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3368. b) J. Zhang, Y. Li, W. Guo. *Anal. Methods.* **2015**, *7*, 4885. c) K. B. Li, L. Dong, S. Zhang, W. Shi, W. P. Jia, D. M. Han, *Talanta*, **2017**, *165*, 593.

detección e identificación de especies radicalarias. Sin embargo, mediante esta técnica difícilmente se puede cuantificar la cantidad de $\cdot\text{OH}$. Además, presenta los inconvenientes que no se puede medir en tiempo real y los equipos son costosos. Una alternativa eficaz que permite la monitorización en tiempo real de estas especies en muestras biológicas, son las sondas cromo-fluorogénicas.

En 1993, el Prof. S. Pou desarrolló el primer sistema fluorescente para la detección indirecta de radicales.¹⁷³ Consistió en el empleo de un fluoróforo funcionalizado con un radical nitróxido (XXVII) disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) (Figura 7.5). En ausencia de radicales hidroxilo, existe un “quenching” (anulación) del estado excitado singlete del fluoróforo provocado por la unidad nitroxídica del fluoróforo. Sin embargo, cuando el radical $\cdot\text{OH}$ reacciona con el DMSO, se produce una ruptura homolítica entre el azufre y el grupo metilo del DMSO, dando lugar a la formación del compuesto hidroximetilsulfóxido y el radical $\cdot\text{CH}_3$. Éste reacciona con el grupo nitróxido del fluoróforo (XXVIII) anulando el “quenching” y generando emisión de fluorescencia a 480 nm.

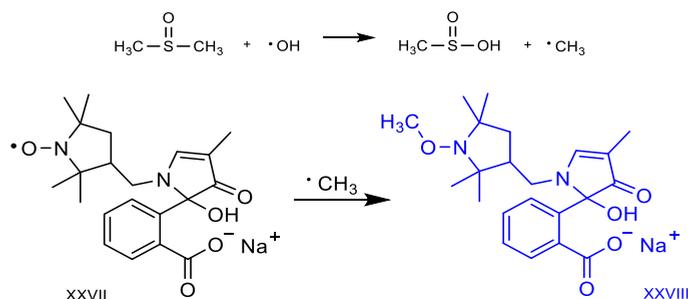


Figura 7.5. Mecanismo de detección de $\cdot\text{OH}$ mediante el uso de fluoróforos con grupos nitroxídicos en presencia de DMSO.¹⁷³

¹⁷³ S. Pou, Y. I. Huang, A. Bhan, V. S. Bhadi, R. S. Hosmane, S. Y. Wu, G. L. Cao, G. M. Rosen, *Anal. Biochem.* **1993**, 212, 85.

Siguiendo esta aproximación, muchos grupos de investigación han desarrollado numerosos sensores fluorescentes con el grupo nitróxido en su estructura.¹⁷⁴

Por otro lado, como ya se ha mencionado anteriormente, uno de los procesos biológicos más importantes relacionados con la química del $\cdot\text{OH}$ es la peroxidación lipídica producida en las membranas celulares. Sin embargo, únicamente se encuentra en la literatura un ejemplo de sensor de radicales hidroxilos que contenga un lípido en su estructura. En concreto, el desarrollado por los profesores N. Soh y T. Imato quienes prepararon un derivado de cumarina unido a un fosfolípido (Figura 7.6).¹⁷⁵ Gracias al resto fosfolípido, la sonda (XXIX), se intercala en las membranas celulares, formadas por lípidos. En presencia de una fuente de $\cdot\text{OH}$, la sonda exhibe fluorescencia debido a la formación del derivado 7-hidroxycumarina fuertemente fluorescente (XXX), obteniéndose de este modo un sensor de $\cdot\text{OH}$, que opera desde la membrana celular.

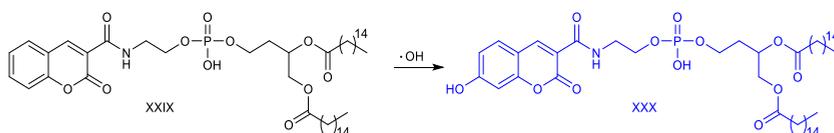


Figura 7.6. Mecanismo de reacción de XXIX con el radical hidroxilo.¹⁷⁵

Debido al interés en el desarrollo de sistemas capaces de detectar ROS y RNS nos planteamos en esta Tesis Doctoral la preparación de materiales nanométricos híbridos orgánico-

¹⁷⁴ a) X. F. Yang, X. Q. Guo, *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 434, 169. b) X. F. Yang and X. Q. Guo, *Analyst*, **2001**, 126, 1800. c) T. Maki, N. Soh, T. Fukaminato, H. Nakajima, K. Nakano, T. Imato, *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 639, 78. d) P. Li, T. Xie, X. Duan, F. Yu, X. Wang, B. Tang, *Chem. Eur. J.*, **2010**, 16, 1834.

¹⁷⁵ N. Soh, K. Makihara, T. Ariyoshi, D. Seto, T. Maki, H. Nakajima, K. Nakano, T. Imato, *Anal. Sci.*, **2008**, 24, 293.

inorgánicos, de tipo MCM-41, funcionalizados con puertas moleculares específicas para la detección de peroxinitrito y de radicales hidroxilos. En el apartado 7.2 de esta Tesis Doctoral se discute la síntesis de nanopartículas de sílice mesoporosa funcionalizadas con un derivado de trifluorometilcetona, que actúa como puerta molecular, y que en presencia de ONOO^\cdot se fragmenta desencadenando la liberación de la carga. En el apartado 7.3 de esta Tesis Doctoral, se discute la síntesis de un material híbrido orgánico-inorgánico consistente en nanopartículas de MCM-41 funcionalizadas con un análogo de un ácido graso esencial, diseñado para que en presencia de $^\cdot\text{OH}$ se fragmente desencadenando la liberación del colorante encapsulado en el interior de los mesoporos.

7.2. SISTEMAS MESOPOROSOS CON PUERTAS QUE INCORPORAN UN DERIVADO DE TRIFLUOROMETILCETONA PARA LA DETECCIÓN DE PEROXINITRITO (ONOO^\cdot).

Debido a la gran demanda de nuevos sistemas capaces de detectar *in vivo* peroxinitrito, decidimos sintetizar mediante la aproximación de materiales híbridos mesoporosos funcionalizados con puertas moleculares, un material cargado con un colorante y que incorporara como puerta molecular un derivado de 2-(p-hidroxifenil)etil trifluorometil cetona, semejante a los utilizados por el Prof. D. Yang en el diseño de sus sensores. Al reaccionar esta puerta con ONOO^\cdot se produciría su fragmentación con la consiguiente salida del colorante usado como indicador.

Se seleccionó como soporte inorgánico nanopartículas de MCM-41. La selección del tamaño nanométrico del material, es muy importante para dirigir la carga al interior de las células, dado que éstas son capaces de internalizar nanopartículas por endocitosis. La endocitosis es un mecanismo de internalización utilizado por todos los tipos de células que se encuentran en el cuerpo humano, ya que utilizan este proceso para comunicarse entre sí. La endocitosis es completamente independiente al proceso a través del cual las células internalizan iones y biomoléculas.¹⁷⁶ Es por ello que, las nanopartículas utilizadas en nanomedicina suelen oscilar entre los 20 y 200 nm, porque a tamaños superiores de 200 nm las partículas son filtradas mecánicamente por el bazo, mientras que las partículas de menos de 20 nm salen de los vasos sanguíneos por fenestraciones en el revestimiento endotelial.¹⁷⁷

7.2.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

A continuación, se describe el diseño, síntesis, caracterización y funcionamiento de los materiales mesoporosos funcionalizados con una puerta molecular autoinmolante y cargados con un colorante para la detección cromo-fluorogénica de peroxinitrito. La estructura de la puerta molecular y su mecanismo de apertura en presencia de ONOO⁻ se muestran en la Figura 7.7. La puerta posee un grupo 2-(*p*-hidroxifenil)etil trifluorometil cetona susceptible de reaccionar selectivamente con ONOO⁻. Además, se incorporó a través de un enlace

¹⁷⁶ O. Nuri, J. H. Park, *Int. J. Nanomedicine*, **2014**, 9, 51.

¹⁷⁷ a) P. Decuzzi, S. Lee, M. Decuzzi, M. Ferrari, *Ann. Biomed. Eng.*, **2004**, 32, 793. b) P. Decuzzi, S. Lee, B. Bhushan, M. Ferrari, *Ann. Biomed. Eng.*, **2005**, 33, 179. c) C. Bharti, U. Nagaich, A. K. Pal, N. Gulati, *Int. J. Pharm. Investig.*, **2015**, 5, 124.

éter el grupo 4-hidroxibencil alcohol (4-HBA), que por un lado actúa mejorando el bloqueo de la carga en el interior de los poros y, por otro lado, permite su fácil escisión, mediante una reacción intramolecular en cascada, en el momento de reacción con el peroxinitrito, permitiendo la liberación de la carga (Figura 7.7).

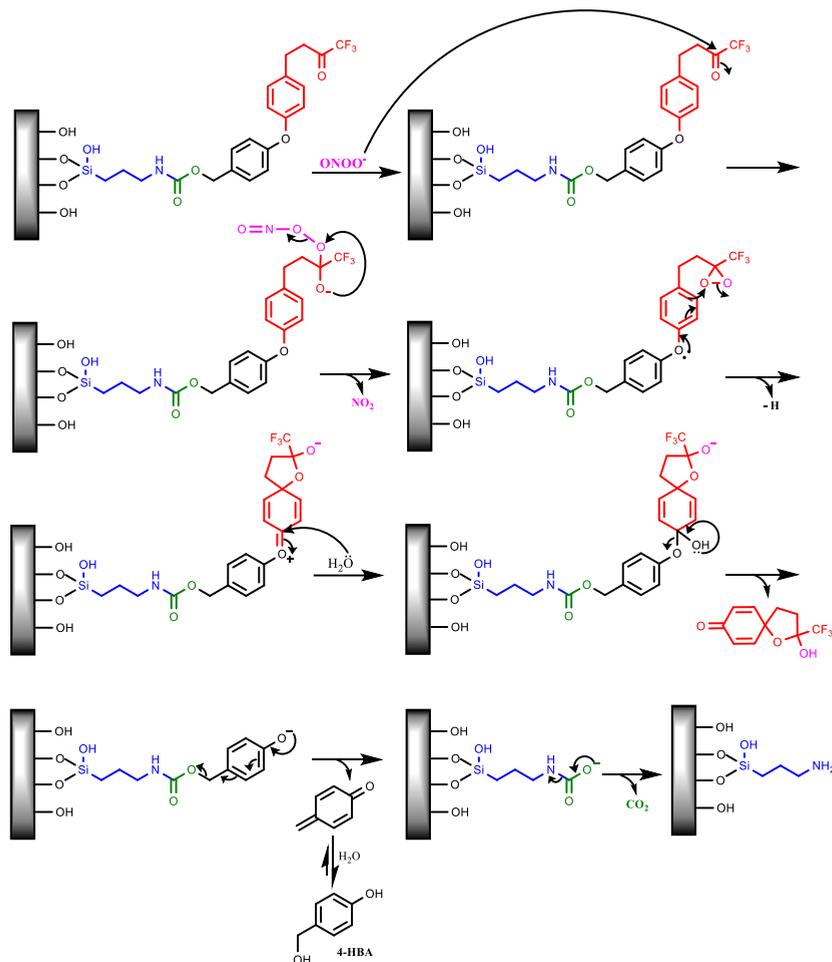


Figura 7.7. Mecanismo de apertura de la puerta molecular autoinmolante 19 en presencia de peroxinitrito.

Como material mesoporoso se utilizaron nanopartículas de sílice de tipo MCM-41. Los poros fueron cargados con los colorantes sulforodamina B (**M-Sulf**) o rodamina 6G (**M-Rod**). Estos cromóforos se utilizaron para monitorizar la apertura de la puerta molecular en presencia de peroxinitrito.

➤ **Síntesis de los materiales.**

La ruta sintética de la puerta molecular **19** se muestra en la Figura 7.8. Inicialmente, se procedió a la incorporación de un yodo en la posición *para* del anillo aromático del ácido hidrocínámico, mediante una sustitución electrofílica aromática, con peryodato potásico (KIO₄), en presencia de ácido acético (AcOH) y ácido sulfúrico (H₂SO₄) a reflujo durante 6 h obteniéndose, el compuesto **15** como un sólido de color blanco (54%).¹⁷⁸ A continuación, bajo condiciones de esterificación de Fisher, se obtuvo el éster metílico **16**, como un sólido amarillo pálido (89%). Seguidamente, un acoplamiento de tipo Ullman entre la correspondiente sal sódica del alcohol 4-hidroxibencílico y el compuesto **16**, en presencia de cloruro de cobre (I) (CuCl) y piridina a reflujo durante 48h, dio lugar al el difenil éter **17**, como un líquido incoloro transparente (40%).^{168a} A continuación, el grupo aldehído del compuesto **17**, se redujo al alcohol correspondiente con borohidruro de sodio (NaBH₄) en metanol a temperatura ambiente durante 2h obteniéndose, el compuesto **18** como un sólido de color amarillo pálido (93%). Finalmente, el grupo éster del compuesto **18**, se transformó en la correspondiente trifluorometil cetona por reacción con el reactivo de Ruppert (TMS-CF₃) en presencia de fluoruro de cesio (CsF) y tolueno a

¹⁷⁸ E. Christiansen, C. Urban, N. Merten, K. Liebscher, K. K. Karlsen, A. Hamacher, A. Spinrath, A. D. Bond, C. Drewke, S. Ullrich, M. U. Kassack, E. Kostenis, T. Ulven. *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 7061.

temperatura ambiente durante 24 h, dando lugar a la puerta molecular selectiva de peroxinitrito **19**, como un aceite incoloro transparente muy viscoso (45%).¹⁷⁹

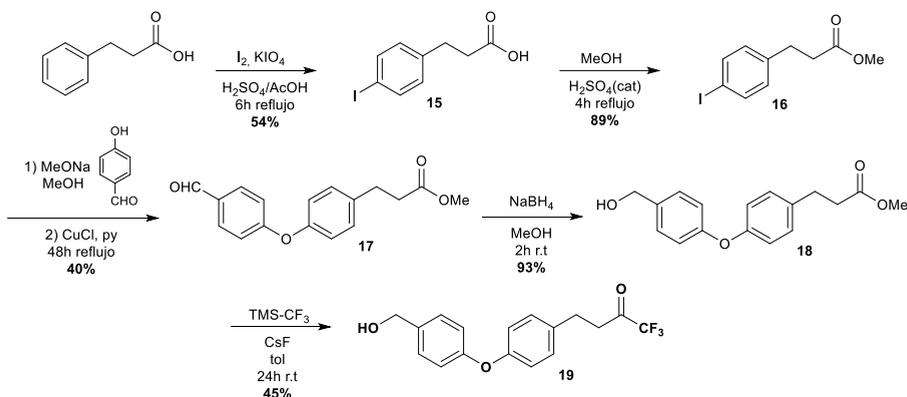


Figura 7.8. Ruta sintética de la puerta molecular selectiva de peroxinitrito **19**.

El soporte inorgánico nanométrico de MCM-41, se sintetizó siguiendo procedimientos descritos en la literatura.¹⁸⁰ Se utilizó bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTABr), como agente director o plantilla, que se disolvió en agua y seguidamente se basificó con NaOH 2 M bajo agitación suave y a 80°C. A continuación, se adicionó lentamente el precursor inorgánico tetraetilortosilicato (TEOS) bajo agitación vigorosa. Al momento, se observó la aparición de una suspensión blanca. La mezcla de reacción se envejeció a 80°C durante 2 h. El sólido resultante se recogió mediante filtración y se lavó consecutivamente con agua y posteriormente con EtOH. Finalmente, la calcinación aeróbica del sólido para eliminar el surfactante dio lugar a

¹⁷⁹ R. P. Singh, G. Cao, R. L. Kirchmeier, J. M. Shreeve, *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 2873.

¹⁸⁰ D. R. Radu, C. Y. Lai, K. Jęftinija, E. W. Rowe, S. Jęftinija, V. S. Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 13216.

las nanopartículas mesoporosas de MCM-41 utilizadas como soporte inorgánico de nuestro material.

La síntesis del sólido híbrido orgánico-inorgánico final, se realizó en tres etapas (ver Figura 7.9). En este sentido, el orden en el que se incorporan los distintos componentes sobre la MCM-41 es importante. En primer lugar, se cargaron los poros del material con el colorante elegido (sulfurodamina B o rodamina 6G) por simple difusión mediante la agitación de una suspensión de las nanopartículas en acetonitrilo en presencia de un exceso de colorante, a temperatura ambiente durante 24 h. A continuación, se procedió al anclaje del espaciador isocianato de 3-(trietoxisilil)propilo en la superficie externa del material cargado por condensación entre el grupo trietoxisililo y los grupos silanol libres (Si-OH) del material dando lugar a enlaces O-Si-O. Para ello, se adicionó el espaciador a la suspensión de las nanopartículas cargadas con el colorante y se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. Finalmente, se incorporó la puerta molecular **19**, mediante la reacción entre el grupo isocianato terminal del espaciador y el grupo alcohol de la puerta molecular **19** en presencia de una pequeña cantidad de sodio metálico dando lugar a un carbamato. El sólido resultante se filtró, se lavó reiteradamente con H₂O y EtOH y se secó durante 12 h a 70°C dando lugar a los sólidos **M-Sulf** y **M-Rod**, cargados con sulfurodamina B y con rodamina 6G respectivamente (Figura 7.9).

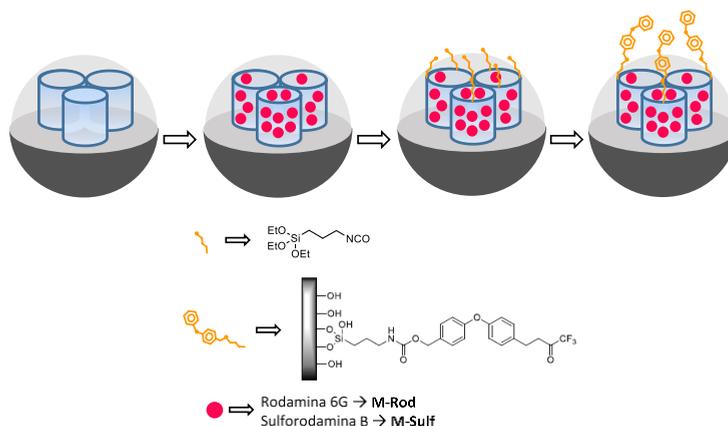


Figura 7.9. Representación esquemática de la síntesis del sólido híbrido **M-Sulf** (cargado con sulforodamina B) y del sólido híbrido **M-Rod** (cargado con rodamina 6G) para la detección de peroxinitrito.

➤ Caracterización de los materiales.

Los materiales híbridos orgánico-inorgánicos **M-Sulf** y **M-Rod** se caracterizaron, mediante las técnicas estándar descritas en la introducción; difracción de rayos X de polvo (PXRD), microscopía electrónica de transmisión (TEM), análisis termogravimétrico (TGA), análisis elemental (EA) y análisis de las isothermas de adsorción-desorción de N_2 .

La Figura 7.10 muestra los difractogramas de rayos X de polvo de los sólidos MCM-41 sin calcinar (antes de la eliminación del surfactante), MCM-41 calcinada, y de los sólidos **M-Sulf** y **M-Rod**. El PXRD a ángulos bajos, del material silíceo MCM-41 sin calcinar, (curva a), muestra los cuatro picos de reflexión característicos de un material mesoporoso hexagonal, que se identifican como los picos de Bragg (100), (110), (200) y (210) respectivamente.¹⁸¹ En la curva b, (MCM-41

¹⁸¹ J. S. Beck, J. C. Vartuli, W. J. Roth, M. E. Leonowicz, C. T. Kresge, K. D. Schmitt, C. T. W. Chu, D. H. Olson, E. W. Sheppard, S. B. McCullen, J. B. Higgins, J. L. Schlenker, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 10834.

calcinada), se observa un desplazamiento del pico de reflexión (100). Esto es debido, probablemente, a una contracción de la celda. Por otro lado, el ensanchamiento y desplazamiento de los picos (110) y (200) es debido, a la condensación de los grupos silanoles presentes en la superficie del material durante el proceso de calcinación.¹⁸² Finalmente, en las curvas c y d, podemos ver las curvas correspondientes a los materiales **M-Sulf** y **M-Rod**. En el difractograma de estos sólidos no se observan los picos (110) y (200). Esta reducción, es probablemente, producida por la presencia de la carga en el interior de los poros de la MCM-41.¹⁸³ Sin embargo, la presencia clara del pico (100) sugiere que el proceso de carga con el colorante y la posterior funcionalización de la superficie externa del sólido con la puerta molecular **19**, no modifican la estructura mesoporosa del material. Por otra parte, la presencia de una estructura mesoporosa se observó también por microscopía electrónica de transmisión (TEM). La Figura 7.11 muestra la morfología esférica, los diámetros (≈ 100 nm) de las nanopartículas obtenidas y los canales homogéneos característicos de la MCM-41 calcinada.

¹⁸² C. Y. Chen, H. X. Li, M. E. Davis, *Microporous Mater.*, **1993**, 2, 17.

¹⁸³a) L. Bonneviot, F. Béland, C. Danumah, S. Giasson, S. Kaliaguine, *Mesoporous Molecular Sieves*. **1998**, Elsevier Science B.V. Amsterdam, The Netherlands. b) S. Zheng, L. Gao, J. Guo, *J. Solid State Chem.* **2000**, 152, 447.

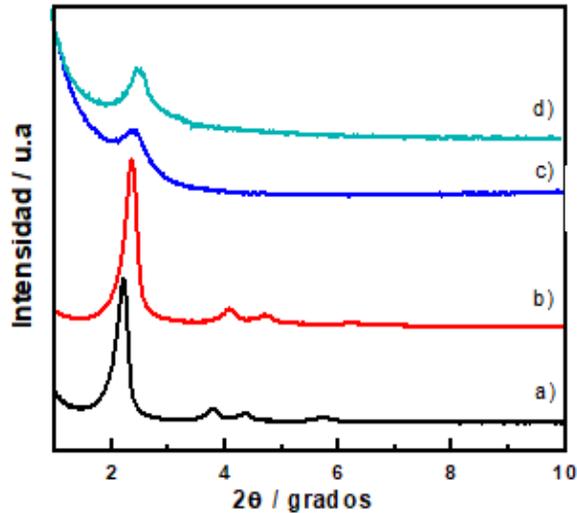


Figura 7.10. Difractogramas de rayos X de polvo de los sólidos a) MCM-41 pre-sintetizada, b) MCM-41 calcinada, c) material M-Sulf y d) material M-Rod.

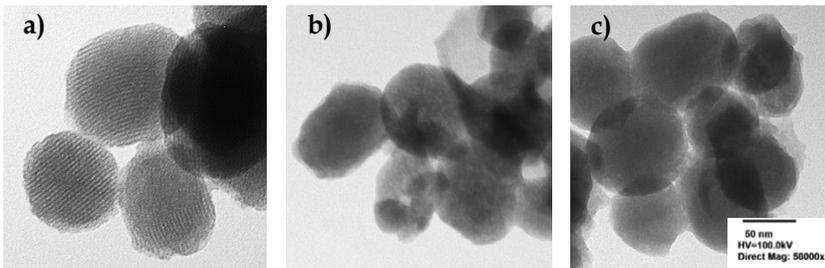


Figura 7.11. Imágenes TEM de a) MCM-41 calcinada, b) M-Sulf y c) M-Rod.

La porosidad del material se estudió en colaboración con el Prof. Pedro Amorós del ICMUV de la Universitat de València mediante el análisis de las isothermas de adsorción-desorción de N_2 (Figura 7.12). Gracias a esta técnica pudimos obtener el área superficial, el tamaño de poro y el volumen de éste. La isoterma de adsorción-desorción de N_2 del material MCM-41 calcinado (curva a), muestra un primer proceso de adsorción a presión parcial relativa (P/P_0) intermedia (intervalo entre 0,1-0,4). Este primer salto se corresponde a la condensación del nitrógeno por capilaridad dentro de los mesoporos, y que corresponde

a una isoterma de adsorción tipo IV. El segundo salto en la isoterma, a presión parcial relativa alta, superior a 0,8, presenta un ciclo de histéresis de tipo H1, que es típico de la adsorción de N₂ en los huecos interpartícula que se generan por la agregación de las nanopartículas de MCM-41. El diámetro de poro se calculó mediante el método BJH (Barret-Joyner-Halenda).¹⁸⁴ La ausencia de un ciclo de histéresis a presiones relativas intermedias indicó una alta uniformidad cilíndrica de los mesoporos. Para la obtención del área superficial, se aplicó el método BET (Brunauer-Emmett-Teller),¹⁸⁵ (Tabla 7.1). Se observó que, para los sólidos, **M-Sulf** y **M-Rod** las isotermas de adsorción-desorción de N₂ presentaban las características típicas de un material mesoporoso con los poros parcialmente llenos, es decir, una isoterma casi plana indicativa de la ausencia de porosidad (curvas b y c). Esta reducción en la superficie BET es de suponer que es causada por el llenado de los poros y por la posterior funcionalización de la superficie externa con la puerta molecular **19**.

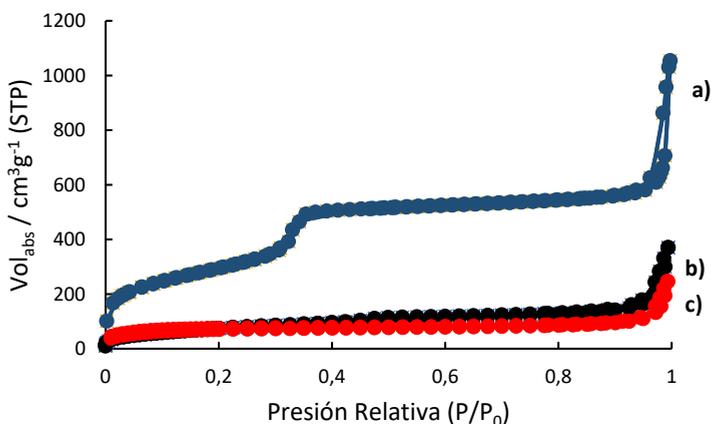


Figura 7.12. Isotermas de adsorción-desorción de N₂ para los sólidos a) MCM-41 calcinada, b) **M-Sulf** y c) **M-Rod**.

¹⁸⁴ E. P. Barrett, L. G. Joyner, P. P. Halenda, *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 373.

¹⁸⁵ S. Brunauer, P. H. Emmett, E. Teller, *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, 60, 309.

Tabla 7.1. Valores de la superficie total específica (BET), volumen de poro y tamaño de poro calculados a partir de las isotermas de adsorción-desorción de N₂ para los materiales seleccionados.

Sólido	S _{BET} (m ² g ⁻¹)	Volumen de poro (cm ³ g ⁻¹)	Tamaño de poro (nm)
MCM-41	1015	1	3,1
M-Sulf	271,4	0,3	-
M-Rod	106,9	0,2	-

Por otro lado, el contenido de materia orgánica se determinó mediante análisis elemental de los materiales **M-Sulf** y **M-Rod**, considerando que, el contenido de materia orgánica total del material es la suma de la materia orgánica aportada por la puerta molecular **19** anclada a la superficie del material inorgánico más el colorante encapsulado en el interior de los mesoporos (sulforodamina B o rodamina 6G para **M-Sulf** y **M-Rod** respectivamente).

Además, también se realizó un análisis termogravimétrico de los materiales **M-Sulf** y **M-Rod** que mostraron un comportamiento típico de los materiales mesoporosos funcionalizados, con una pérdida inicial de peso entre 25 y 150°C debido a la evaporación de los disolventes, un segundo paso, entre 150 y 800°C debido a la combustión de materia orgánica, y finalmente, una tercera pérdida en el rango de 800 a 1000°C relacionada con la pérdida de agua debida a la condensación de los grupos silanol del soporte inorgánico. A partir de los datos obtenidos en el termograma y, junto con los valores obtenidos por el análisis elemental su pudo estimar la cantidad de puerta y de colorante presente en los materiales.

➤ **Estudios de liberación del colorante en presencia de ONOO^- .**

Los estudios preliminares de liberación se realizaron con el sólido **M-Sulf** ya que fue el primer material sintetizado. Se estudió la liberación del colorante sulforodamina B desde el interior de los poros del material **M-Sulf** a la disolución acuosa mediante espectroscopía UV-vis y fluorescencia en presencia de peroxinitrito (Figura 7.13). Para ello, previamente se sintetizó el peroxinitrito mediante procedimientos descritos en la literatura.¹⁸⁶ Se preparó una disolución “stock” de ONOO^- mediante el tratamiento de una disolución acuosa de nitrito sódico con una combinación de peróxido de hidrógeno y ácido clorhídrico, seguido de adición de una disolución de hidróxido sódico. La disolución resultante, disolución “stock”, se almacenó a baja temperatura y a un pH fuertemente básico ya que, las disoluciones de ONOO^- son muy inestables y a valores de pH fisiológico el peroxinitrito se protona formando ácido peroxinitroso (ONOOH), el cual descompone en $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{NO}_2$.¹⁶³ Por otra parte, la concentración de ONOO^- se estimó midiendo la absorbancia de esta disolución “stock” a 302 nm mediante espectrometría UV-vis antes de su uso.¹⁸⁷

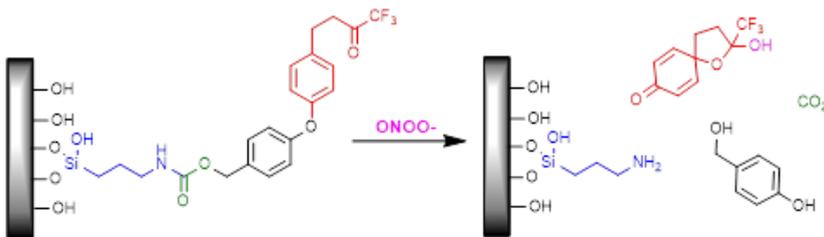


Figura 7.13. Representación esquemática de la apertura de la puerta molecular en presencia de ONOO^- .

¹⁸⁶ X. Jia, Q. Chen, Y. Yang, Y. Tang, R. Wang, Y. Xu, W. Zhu, X. Qian. *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, 138, 10778.

¹⁸⁷ M. N. Hughes, H. G. Nicklin. *J. Chem. Soc. (A)*, **1968**, 2, 450.

El experimento típico de liberación consistió en suspender en una pequeña cantidad del material **M-Sulf** (5 mg) en una disolución acuosa tamponada a pH 8 (tampón TRIS, 20 mL) a 0°C en ausencia y en presencia de ONOO⁻. En cada caso, cada cierto tiempo fijado, se recogieron alícuotas, se centrifugaron para eliminar las nanopartículas en suspensión y se registraron los espectros de absorbancia y fluorescencia de la disolución. Los resultados obtenidos, mostraron que se producía un ligero aumento de la banda de absorción de la sulforodamina B a 565 nm con el tiempo. Sin embargo, este aumento se dio tanto en ausencia como en presencia de ONOO⁻ (ver Figura 7.33, Parte experimental). Resultados similares se obtuvieron para los ensayos realizados por fluorescencia. En la Figura 7.14 se puede ver como la banda de emisión centrada a 585 nm correspondiente a la sulforodamina B aumenta progresivamente con el tiempo sin verse afectada por la presencia de ONOO⁻.

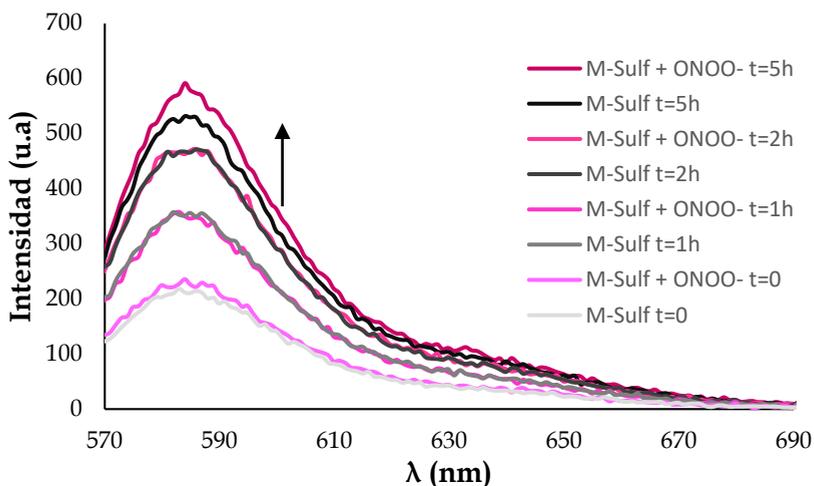


Figura 7.14. Espectros de emisión de fluorescencia del material **M-Sulf** en ausencia (líneas grises) y en presencia de ONOO⁻ (líneas violetas) a distintos tiempos.

A la vista de estos primeros resultados nos planteamos: a) que el peroxinitrito no fuera capaz de romper la puerta molecular y desencadenar la liberación del colorante o, b) que la rápida descomposición del peroxinitrito no permitiera una concentración suficiente durante el tiempo necesario para desencadenar la ruptura de la puerta. Por otro lado, el aumento observado tanto de absorción como de emisión de fluorescencia con el tiempo podría deberse a liberación de colorante retenido entre nanopartículas agregadas. En este punto de inflexión sobre los resultados obtenidos para el sólido **M-Sulf**, nos planteamos caracterizar nuevamente los materiales, utilizando otros equipos, ya que, los valores obtenidos anteriormente nos suscitaban algunas dudas. Paralelamente, se realizó un estudio de hidrólisis del sólido **M-Sulf** en medio fuertemente básico. Para ello, se hidrolizó una pequeña cantidad de **M-Sulf** (5 mg) en NaOH (5 M, 20 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Seguidamente, se registró la absorbancia de la disolución (por triplicado) y mediante una recta de calibrado se interpolaron los resultados. La concentración de colorante que obtuvimos (≈ 28 mg sulforodamina B/g sólido) nos indicó que efectivamente el material no estaba bien cargado. Este dato fue posteriormente corroborado mediante la nueva caracterización realizada. Se calculó, a partir de los datos obtenidos en el termograma, que el peso del residuo de sílice del material era de 70% para **M-Sulf** y de 72% para **M-Rod** (ver Figura 7.31, Parte experimental). Empleando este valor, junto con los valores de C, N y S obtenidos por análisis elemental (Tabla 7.6, Parte experimental) se pudo estimar la cantidad de puerta y de colorante presente en los materiales (Tabla 7.2). A la vista de estos resultados preliminares negativos obtenidos con el sólido **M-Sulf** se decidió sintetizar un nuevo material cargado con el colorante

rodamina 6G (**M-Rod**) el cual sí presentó un porcentaje de carga aceptable como se puede apreciar en la siguiente Tabla 7.2.

Tabla 7.2. Contenido de materia orgánica total, de colorante y de puerta molecular **19** por mg/g de SiO₂ para los sólidos sintetizados.

Sólido	Materia orgánica total (mg/g SiO ₂)	Colorante (mg/g SiO ₂)	Puerta molecular (mg/g SiO ₂)
M-Sulf	144	27	117
M-Rod	141	73	68

La diferencia en la cantidad de colorante encapsulado en los dos materiales finales podría ser debida a repulsiones electrostáticas en el interior de los poros. Así, mientras que la rodamina 6G está cargada positivamente (Figura 7.15a), la sulforodamina B presentan una carga neta de -1 (Figura 7.15b) por lo que en la etapa de carga podrían producirse repulsiones electrostáticas entre el colorante y los grupos silanol desprotonados de la MCM-41.

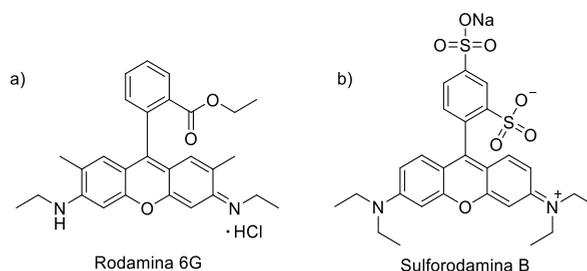


Figura 7.15. Estructura de los colorantes utilizados en el proceso de cargado de la MCM-41, a) Rodamina 6G y b) Sulforodamina B.

➤ Estudios preliminares en células.

A la vista de los resultados negativos de liberación obtenidos por espectroscopía de UV-vis y fluorescencia con el material **M-Sulf** decidimos estudiar la capacidad sensora y de liberación del sólido **M-**

Rod (que poseía una mayor carga de colorante) directamente en medio celular, ya que la generación del peroxinitrito en el laboratorio nos producía serias dudas de fiabilidad. Para ello, y en colaboración con la Prof. M^a Carmen Terencio del Departamento de Farmacología de la Universitat de València, se cultivaron células del tipo macrófagos RAW 264,7, ya que se sabe que generan ROS y RNS en procesos inmunológicos e inflamatorios.¹⁸⁸ Los macrófagos fueron estimulados durante una noche con diferentes reactivos (lipopolisacáridos (LPS, 1µg/mL) y activador plasminógeno de tipo tisular (TPA))¹⁸⁹ con el fin de sobreexpresar la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS), es decir, aumentar los niveles de NO, y además, inhibir la cadena de transporte mitocondrial favoreciendo de este modo la formación de superóxido (O₂⁻).¹⁹⁰ Por consiguiente, la reacción entre el NO y O₂⁻ produciría el ONOO⁻, como ya se ha discutido anteriormente. Una vez las células fueron estimuladas, se incorporó el sólido **M-Rod** previamente sonificado durante 15 minutos en una disolución de PBS (tampón fosfato, pH 7,4) a distintas concentraciones (10, 25, 50, 100 y 200 µg/mL) y se incubó con los macrófagos durante 3 h (Figura 7.16b). Posteriormente, las células se monitorizaron utilizando un microscopio de fluorescencia confocal. Las células incubadas con **M-Rod**, pero sin estimulación mostraron fluorescencia debido a la emisión de las propias nanopartículas **M-Rod** (Figura 7.16c), mientras que la emisión de fluorescencia en el citoplasma fue moderadamente superior (Figura 7.16d) después del tratamiento con los estimulantes. La escasa

¹⁸⁸ a) R. B. R. Muijsers, E. Van den Worm, G. Folkerts, C. J. Beukelman, A. S. Koster, D. S. Postma, F. P. Nijkamp. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *130*, 932. b) T. Salonen, O. Sareila, U. Jalonen, H. Kankaanranta, R. Tuominen, E. Moilanen. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *147*, 790.

¹⁸⁹ a) A. Morikawa, N. Koide, T. Sugiyama, M. M. Mu, F. Hassan, S. Islam, H. Ito, I. Mori, T. Yoshida, T. Yokochi, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **2004**, *41*, 211. b) A. C. Sedgwick, X. Sun, G. Kim, J. Yoon, S. D. Bull, T. D. James, *Chem. Commun.*, **2016**, *52*, 12350.

¹⁹⁰ M. A. Sharpe, C. E. Cooper. *J. Biol. Chem.*, **1998**, *47*, 30961.

diferencia en la emisión entre ambas muestras celulares podría ser debido a una moderada liberación del colorante, pero también a una inhibición de la iNOS sintasa en los macrófagos por parte del 4-HBA.¹⁹¹ Este agente antioxidante inhibiría la generación de RNS y, por consiguiente, la formación de peroxinitrito, provocando, una baja liberación del colorante. Por otro lado, se realizaron ensayos de citotoxicidad (ensayo de MTT) con el fin de conocer los límites citotóxicos de estas nanopartículas. Este ensayo se basa en la capacidad celular de reducir el MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) o sal de tetrazolio a formazán ((*E,Z*)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazano) por acción del enzima succinildeshidrogenasa mitocondrial, reacción que requiere NADH. Este enzima, presente en las células sobre las que se lleva a cabo directamente la reacción, es indicativo de un buen funcionamiento celular.¹⁹² La sal de tetrazolio (MTT), de color amarillo, pasa a un color púrpura cuando es reducida a formazán. La cantidad de formazán se cuantifica por absorbancia. Los ensayos realizados mostraron que a concentraciones superiores a 10 µg/mL de **M-Rod** se producía citotoxicidad celular (ver Figura 7.38, Parte Experimental). A la vista de estos resultados se ha decidido en un estudio futuro llevar a cabo estudios de citotoxicidad con la puerta molecular **19** para determinar si ésta es la causante de la muerte celular.

¹⁹¹ E. J. Lim, H. J. Kang, H. J. Jung, E. H. Park. *J. Pharm. Pharmacol.* **2007**, 59, 1235.

¹⁹² E. Borenfreund, H. Babich, N. Martin-Alguacil, *Toxicology in Vitro*, **1988**, 2, 1.

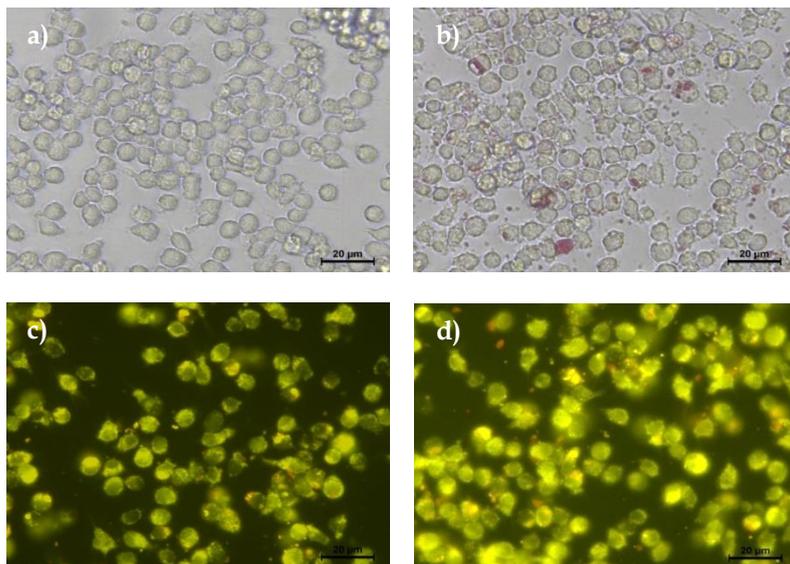


Figura 7.16. Imagen microscópica de los macrófagos RAW 264,7 antes (a) y después (b) de la incubación con las nanopartículas **M-Rod**. Así como las imágenes de fluorescencia confocal de los macrófagos RAW 264,7 en ausencia (c) y en presencia (d) de los agentes estimulantes.

7.3. SISTEMAS MESOPOROSOS CON PUERTAS BASADAS EN DERIVADOS DE ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES PARA LA DETECCIÓN DE RADICALES HIDROXILOS ($\cdot\text{OH}$).

En este apartado se detallan los resultados preliminares obtenidos en los estudios encaminados a la detección de radicales hidroxilo empleando materiales híbridos mesoporosos, cargados con un colorante y funcionalizados con puertas moleculares consistentes en cadenas lipídicas análogas a los ácidos grasos insaturados. El mecanismo de detección propuesto sería el siguiente: al reaccionar el radical $\cdot\text{OH}$ con los dobles enlaces no conjugados de la puerta molecular, se iniciaría un proceso análogo al de la peroxidación lipídica (Figura 7.2), conduciendo a la fragmentación de la puerta y provocando

la liberación del colorante encapsulado en el interior de los mesoporos del material (Figura 7.17). Las puertas moleculares sintetizadas se muestran en la Figura 7.17. Como soporte inorgánico para la síntesis de estos materiales se seleccionó la MCM-41 en tamaño de nanopartículas, ya que el objetivo era dirigir la carga hacia la membrana celular lugar donde los PUFAs sufren la oxidación.

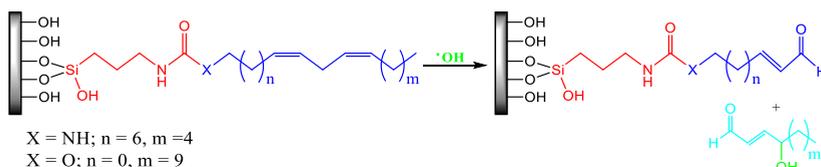


Figura 7.17. Puertas moleculares sintetizadas y representación esquemática de apertura de la puerta molecular mediada por radicales hidroxilo.

7.3.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

➤ Síntesis del material M-LA.

Inicialmente, se diseñó y se sintetizó una puerta molecular derivada del ácido linoleico (LA); ácido graso esencial que pertenece al grupo de los ácidos omega 6 (ω -6).

La ruta sintética de la puerta molecular **22** a partir de LA se muestra en la Figura 7.18. Inicialmente, se procedió a la obtención del cloruro de ácido correspondiente, mediante la reacción de LA con cloruro de tionilo y trietilamina en THF a temperatura ambiente durante 12 h.¹⁹³ Seguidamente, sin previa purificación, se burbujeó a través de la disolución una corriente de amoníaco gaseoso (1 ml/min)

¹⁹³ C. Fong, D. Wells, I. Krodkiewska, P. G. Hartley, C. J. Drummond, *Chem. Mater.*, **2006**, *18*, 594.

a temperatura ambiente durante 4 h. Esta reacción de adición-eliminación entre el amoniaco y el cloruro de ácido dio como resultado la amida primaria **20**, como un líquido viscoso de color marrón (67%). A continuación, se procedió a la reducción del grupo amida de **20** con hidruro de aluminio y litio en THF a reflujo durante 24 h, obteniéndose la amina **21** como un líquido viscoso de color marrón claro (70%). Finalmente, con el objetivo de introducir en la puerta un grupo trietoxisilano terminal, para su anclaje posterior sobre la superficie de sílice, el compuesto **21** se hizo reaccionar con el isocianato de 3-(trietoxisilil)propilo en THF a reflujo durante 12 h para formar la urea correspondiente. Tras purificación mediante una columna cromatográfica corta de silica gel, se obtuvo la puerta molecular **22** como un líquido viscoso incoloro transparente (60%).¹⁹⁴

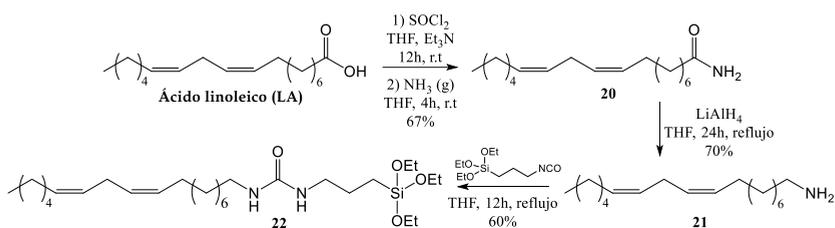


Figura 7.18. Ruta sintética de la puerta molecular **22**.

Por otra parte, el soporte de sílice mesoporosa nanométrica MCM-41, se sintetizó como se ha explicado anteriormente, mediante el uso de tetraetilortosilicato (TEOS), como precursor inorgánico, y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTABr), como agente director, seguido de eliminación del surfactante por calcinación aeróbica.

¹⁹⁴ E. Besson, A. Mehdi, C. Reyé, P. Gaveau, R. J. P. Corriu, *Dalton Trans.*, **2010**, 39, 7534.

Como colorante para incluir en el interior de los poros se eligió sulforodamina B (ver Figura 7.15), debido a su alta solubilidad en agua, estabilidad en un amplio rango de pHs y porque es ampliamente utilizado en estudios celulares, como por ejemplo para determinar la densidad celular.¹⁹⁵ El sólido híbrido orgánico-inorgánico final (**M-LA**), se ensambló en dos etapas sucesivas. En primer lugar, se cargaron los mesoporos de la MCM-41 calcinada por difusión. Para ello, simplemente se agitó una suspensión de las nanopartículas en acetonitrilo seco a temperatura ambiente y bajo atmosfera de argón durante 24 h en presencia de un exceso de colorante. En segundo lugar, la superficie externa del material cargado, se funcionalizó con la puerta molecular **22** por reacción del grupo trialcoxisilano con los restos silanol de la superficie de la sílice en MeCN a temperatura ambiente durante 24 h. El sólido resultante se filtró, se lavó reiteradamente con MeCN, H₂O y EtOH y se secó durante 12 h a 70°C dando lugar al material cargado y cerrado final, **M-LA**, como un sólido de color rosa-morado (Figura 7.19).

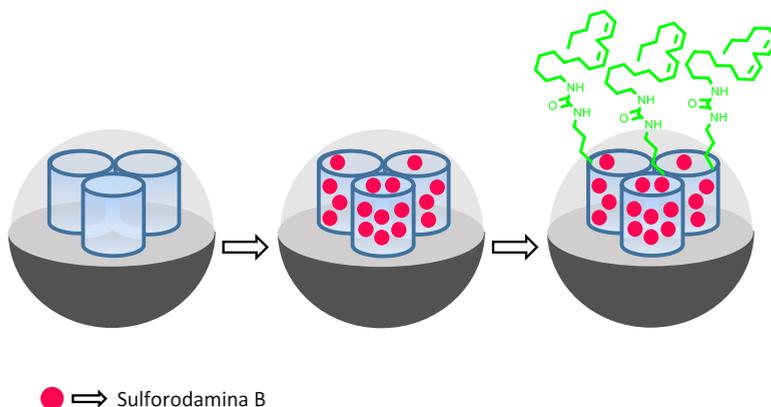


Figura 7.19. Representación esquemática de la síntesis del sólido híbrido **M-LA** para la detección de ROS.

¹⁹⁵ W. Viricel, A. Mbarek, J. Leblond, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 12743.

➤ **Caracterización del sólido M-LA.**

El sólido **M-LA** se caracterizó, mediante las técnicas estándar descritas en la introducción: PXRD, TEM, TGA, EA y mediante el análisis de las isotermas de adsorción-desorción de N₂.

La Figura 7.20 muestra los difractogramas de rayos X de polvo de los sólidos MCM-41 pre-sintetizada (antes de la eliminación del surfactante), MCM-41 calcinada, y el material **M-LA**. El PXRD a ángulos bajos, del material silíceo MCM-41 pre-sintetizado, (curva a) muestra los cuatro picos de reflexión característicos de un material mesoporoso hexagonal ((100), (110), (200) y (210)).¹⁸¹ En la curva b, (MCM-41 calcinada) se observa el correspondiente desplazamiento del pico de reflexión (100). Finalmente, en la curva c (material **M-LA**), se observa un difractograma típico de materiales cargados y funcionalizados con puertas moleculares, similar a los descritos anteriormente (apartado 7.2). Así mismo, la presencia de una estructura mesoporosa también se observó por TEM. La Figura 7.21 muestra la morfología esférica, los diámetros (≈ 100 nm) de las nanopartículas obtenidas y los canales homogéneos característicos de la MCM-41 calcinada.

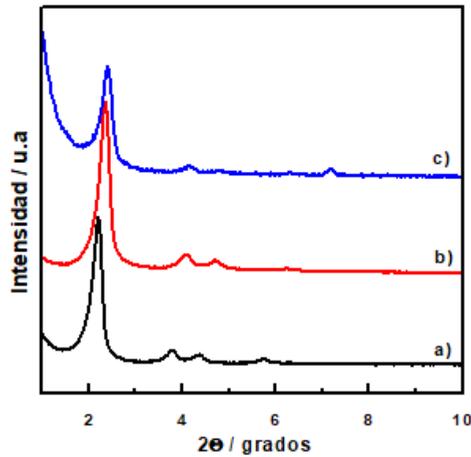


Figura 7.20. Difractogramas de rayos X de polvo de los sólidos a) MCM-41 pre-sintetizada, b) MCM-41 calcinada, c) material M-LA.

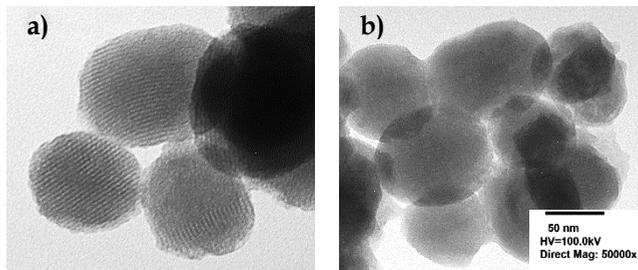


Figura 7.21. Imágenes TEM de a) MCM-41 calcinada, b) M-LA.

La porosidad del material se estudió por medio del análisis de las isothermas de adsorción-desorción de N_2 en colaboración con el Prof. Pedro Amorós del ICMUV de la Universitat de València (Figura 7.22). Las isothermas de adsorción-desorción de N_2 del material MCM-41 calcinado, curva a), muestra un primer proceso de adsorción a presión parcial relativa intermedia (intervalo entre 0,1-0,4) característico en este tipo de materiales mesoporosos. En Tabla 7.3 se muestran los valores de diámetro de poro (calculados mediante el método BJH)¹⁸⁴ y el área superficial (calculada mediante el método BET).¹⁸⁵ Se observó que, para

el material **M-LA** la isoterma de adsorción-desorción de N₂ presentaba un descenso del volumen de nitrógeno adsorbido y únicamente a presiones relativas altas (> 0,8) se observó una importante adsorción de N₂, debida a la absorción interpartícula.

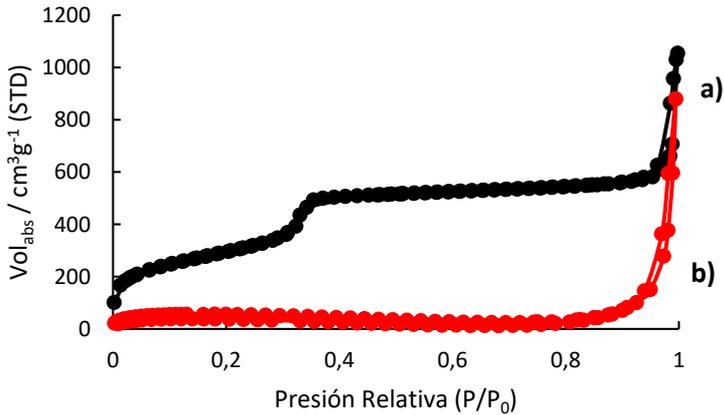


Figura 7.22. Isothermas de adsorción-desorción de N₂ para los sólidos a) MCM-41 calcinada y b) **M-LA**.

Tabla 7.3. Valores de la superficie total específica (BET), volumen de poro y tamaño de poro calculados a partir de las isotermas de adsorción-desorción de N₂ para los materiales seleccionados.

Sólido	S _{BET} (m ² g ⁻¹)	Volumen de poro (cm ³ g ⁻¹)	Tamaño de poro (nm)
MCM-41	1015	1	3,1
M-LA	19	0,14	-

Por otro lado, el contenido de materia orgánica del material **M-LA** se determinó mediante EA y TGA. A partir de los datos obtenidos en el termograma, se calculó que el peso del residuo de sílice del material (**M-LA**) era del 68% (ver Figura 7.31, Parte experimental). Con este valor y con los valores del análisis de combustión de C, N y S (ver Tabla 7.7, Parte Experimental) se calculó la cantidad de materia orgánica presente en el material **M-LA** (Tabla 7.4).

Tabla 7.4. Contenido de materia orgánica total, de colorante y de puerta molecular **22** por mg/g de SiO₂ para el sólido sintetizado.

Sólido	Materia orgánica total (mg/g SiO ₂)	Colorante (mg/g SiO ₂)	Puerta molecular (mg/g SiO ₂)
M-LA	138	68	70

➤ **Estudios de liberación de M-LA en presencia de un oxidante.**

Antes de estudiar la liberación de colorante a partir del sólido **M-LA**, se decidió estudiar la ruptura oxidativa del ácido linoleico (LA) mediante RMN.

Para romper los dobles enlaces no conjugados de la cadena hidrocarbonada, se pensó en utilizar una reacción de ozonólisis.¹⁹⁶ El mecanismo de esta reacción fue propuesto en 1953 por el Prof. R. Criegee,¹⁹⁷ y se inicia con una reacción de cicloadición 1,3-dipolar del ozono al doble enlace para dar lugar a un ozónido primario altamente inestable que rápidamente se reorganiza a un ozónido estable. Su reducción posterior da como resultado dos compuestos carbonílicos.

El experimento consistió en disolver ácido linoleico en diclorometano a -78°C y burbujear a través de la disolución una corriente de oxígeno enriquecido con ozono generado *in situ* hasta que la disolución tomó una tonalidad azulada (≈ 2 min). A continuación, se añadió trifenilfosfina como agente reductor para obtener los correspondientes aldehídos, fácilmente identificables mediante ¹H-

¹⁹⁶ a) P. S. Bailey, *Ozonation in Organic Chemistry*; Academic Press, New York, Academic Press 1978 ©. b) S. G. Van Ornum, R. M. Champeau, R. Pariza, *Chem. Rev.*, **2006**, *106*, 2990.

¹⁹⁷ R. Criegee, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1975**, *87*, 745.

RMN. Como podemos ver en la Figura 7.23, no se observan las señales correspondientes a los dobles enlaces de LA (multiplete a 5,55-5,33 ppm) y sí se observó la aparición de tres nuevas señales a 9,76, 9,76 y 9,75 ppm, correspondientes al grupo aldehído.¹⁹⁸

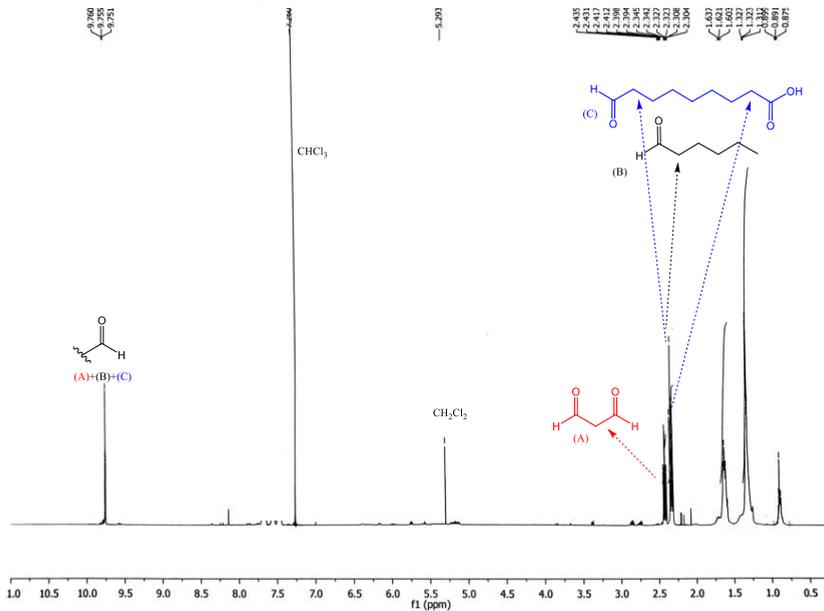


Figura 7.23. Espectro de ^1H -RMN de los productos de ozonólisis procedentes de la ruptura del ácido linoleico en CDCl_3 .

Una vez comprobado que se producía la ruptura de los dobles enlaces de LA mediante ozonólisis, se estudió la liberación de colorante a partir de una suspensión del sólido **M-LA** en diclorometano a -78°C en presencia de ozono en las mismas condiciones. Sin embargo, a los pocos segundos (≈ 5 s), se observó que el color rosado de la suspensión de nanopartículas de **M-LA** desaparecía para dar lugar a un sólido blanco. Estos resultados parecían indicar que la ozonólisis no solamente degradaba los dobles enlaces, sino que muy probablemente

¹⁹⁸ B. A. Wasmí, A. A. Al-Amiery, A. A. H. Kadhum, A. B. Mohamad, *J. Nanomater.*, **2014**, 715457, 7.

el colorante también sufría una descomposición oxidativa, lo que impedía evaluar el proceso de liberación mediante UV-vis o fluorescencia.

➤ **Estudios de liberación *in vitro* de M-LA.**

Dado que, las pruebas de liberación del sólido **M-LA** en presencia de ozono no permitieron la determinación y cuantificación de la liberación del colorante encapsulado, se pensó en estudiar el material **M-LA** en células con estrés oxidativo con el fin de evaluar la liberación de éste *in vivo*. Para ello, y en colaboración con la Prof. M^a Carmen Terencio del Departamento de Farmacología de la Universitat de València, se cultivaron células del tipo macrófagos RAW 264,7, ya que, como se ha mencionado anteriormente, son capaces de generar ROS.¹⁸⁸ Las células fueron estimuladas durante 24 h en presencia de los reactivos LPS y TPA.¹⁸⁹ A continuación, se prepararon disoluciones a distintas concentraciones de las nanopartículas de **M-LA**, se añadieron al cultivo celular y se incubaron durante 4 h. Posteriormente, las células se monitorizaron utilizando un microscopio de fluorescencia confocal ($\lambda_{\text{ex}}=565$ nm y $\lambda_{\text{em}}=582$ nm). Desgraciadamente no se observó ningún cambio significativo en la intensidad de emisión de fluorescencia, entre las células estimuladas y las no estimuladas, lo que indicaba que no se producía la liberación de la sulforodamina B al medio de cultivo (ver Parte Experimental, Figura 7.35). Una posible explicación podría estar en el propio diseño de la puerta molecular. Los dobles enlaces se encontraban muy alejados de la superficie del material y, en consecuencia, aunque se produjera la peroxidación lipídica y la consecuente fragmentación de la cadena alifática, el resto de cadena unido a la superficie todavía sería suficientemente larga como para

bloquear la salida de la carga. Así pues, se rediseñó la puerta molecular para que contuviera los dobles enlaces *cis* no conjugados más próximos a la superficie del material. Al mismo tiempo, se decidió sustituir también el colorante encapsulado en el material por uno que no se oxidara en presencia de ozono. Con esta finalidad se sintetizó el material **M-Ru(bpy)₃** que se describe en el apartado siguiente.

➤ **Síntesis del material M-Ru(bpy)₃.**

El material híbrido sintetizado (**M-Ru(bpy)₃**) consistió, como en los casos anteriores, en nanopartículas de MCM-41 en el cual los mesoporos fueron cargados con el colorante cloruro de tris(bipiridino)rutenio(III) ([Ru(bpy)₃]Cl₂). Se eligió este cromóforo debido a que estaba descrita su estabilidad frente condiciones de ozonólisis,¹⁹⁹ lo que nos permitiría monitorizar por UV-vis o fluorescencia el proceso de apertura de la puerta molecular anclada a la superficie externa del material.

La ruta sintética de la puerta molecular se muestra en la Figura 7.24. Inicialmente, se procedió a la reacción de 1-bromodecano con el dianión correspondiente del alcohol propargílico, mediante una sustitución nucleofílica en hexametilfosforamida (HMPA) y THF (20 mL; 1,05/1,0; v/v) a -78°C durante 3 h. Transcurrido este tiempo, el crudo de reacción se calentó suavemente hasta temperatura ambiente y se mantuvo en agitación durante 16 h, obteniéndose el compuesto **23** como un aceite amarillento (92%).²⁰⁰ A continuación, mediante la

¹⁹⁹ W. Qi, D. Wu, J. Zhao, Z. Liu, M. Xu, S. Anjum, G. Xu, *Analyst* **2013**, *138*, 6305.

²⁰⁰ Y. Zhou, Y. Huang, S. Li, P. Yang, J. Zhong, J. Yin, K. Ji, Y. Yang, N. Ye, L. Wang, M. Wang, M. Wang, Q. Bian, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2017**, *28*, 288.

reacción de Appel,²⁰¹ se procedió al intercambio del grupo alcohol por un bromo, utilizando tetrabromometano (CBr₄) y trifenilfosfina (PPh₃) en CH₂Cl₂ a 0°C durante 1 h, obteniéndose, el bromuro propargílico **24** como un aceite incoloro transparente (88%).²⁰² Seguidamente, mediante un acoplamiento en condiciones suaves, se incorporó el alcohol propargílico al compuesto **24**, utilizando cantidades estequiométricas de carbonato de cesio (CsCO₃), yoduro de cobre (I) CuI y yoduro de sodio (NaI) en dimetilformamida (DMF) a temperatura ambiente durante 20 h, obteniéndose el compuesto **25** como un aceite marrón (70%).²⁰³ El diino **25**, se redujo selectivamente al dieno Z, Z mediante hidrogenación (H₂ (1 atm)) de los triples enlaces en presencia del catalizador de Lindlar en EtOAc y piridina (9:1, v/v)) a temperatura ambiente durante 24 h, obteniéndose, el dieno **26** como un aceite incoloro transparente (96%).²⁰⁴ Finalmente, la formación de un carbamato entre el alcohol **26** y el isocianato de 3-trietoxisililpropilo en THF seco a 60°C durante 24 h dio lugar a la puerta molecular **27**, que se utilizó para la síntesis de los materiales híbridos orgánico-inorgánicos sin previa purificación, ya que los productos de partida no unidos a la sílice se pueden eliminar con los lavados posteriores.

²⁰¹ R. Appel, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1975**, *14*, 801.

²⁰² Y. Du, J. F. Zheng, Z. G. Wang, L. J. Jiang, Y. P. Ruan, P. Q. Huang, *J. Org. Chem.*, **2010**, *75*, 4619.

²⁰³ J. Grodner, W. M. Golebiewski, M. C. Willis, J. D. Osborne, M. Cucma, *Synthesis*, **2015**, *47*, 1181.

²⁰⁴ K. A. D. Kamanos, J. M. Withey, *Beilstein J. Org. Chem.*, **2012**, *8*, 1695.

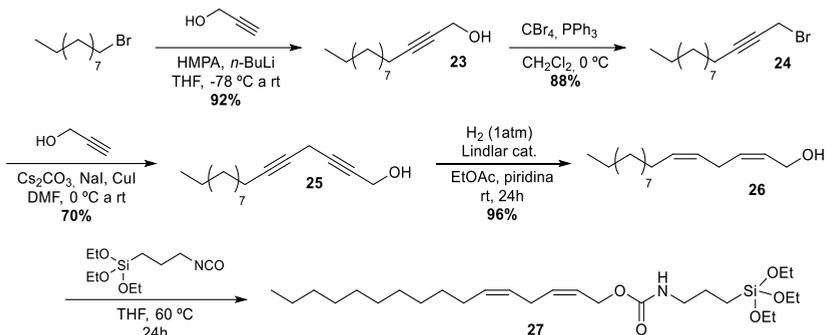


Figura 7.24. Ruta sintética de la puerta molecular 27.

Por otra parte, el soporte de sílice mesoporosa nanométrica MCM-41, se sintetizó como se ha explicado anteriormente, mediante el uso de tetraetilortosilicato (TEOS), como precursor inorgánico, y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTABr), como agente director, seguido de eliminación del surfactante por calcinación aeróbica.

El sólido híbrido orgánico-inorgánico final (**M-Ru(bpy)₃**), se ensambló en dos etapas sucesivas. En primer lugar, se cargaron los mesoporos de la MCM-41 calcinada con [Ru(bpy)₃]Cl₂ por difusión. Para ello, simplemente se agitó una suspensión de las nanopartículas en acetonitrilo seco a temperatura ambiente y bajo atmosfera de argón durante 24 h en presencia de un exceso de colorante. En segundo lugar, la superficie externa del material, previamente cargado, se funcionalizó con la puerta molecular 27 por reacción del grupo trialcoxilano con los restos silanol de la superficie de la sílice. Finalmente, el sólido se filtró, se lavó y se secó durante 12 h a 70°C obteniéndose el material **M-Ru(bpy)₃** (Figura 7.25).

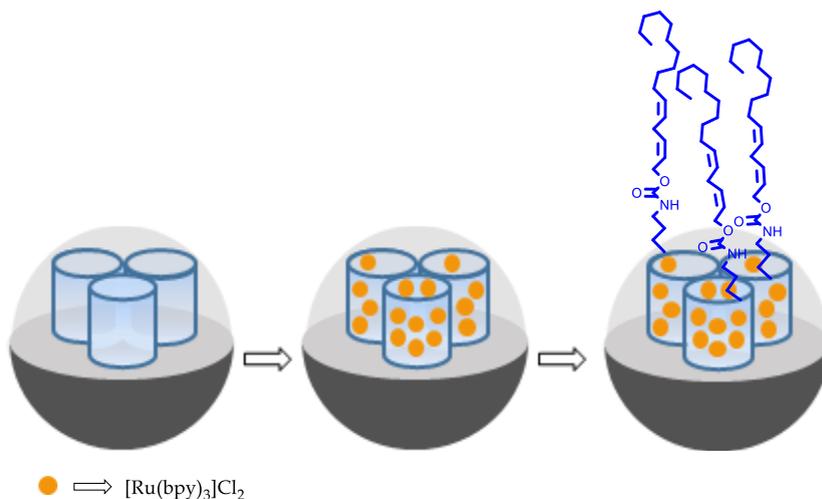


Figura 7.25. Representación esquemática de la síntesis del sólido híbrido **M-Ru(bpy)₃** para la detección de ROS.

➤ Caracterización del sólido **M-Ru(bpy)₃**.

El sólido **M-Ru(bpy)₃** se caracterizó, mediante las técnicas estándar descritas en la introducción: PXRD, TEM, TGA, EA y análisis de las isothermas de adsorción-desorción de N₂.

En la Figura 7.26 se observan los difractogramas de rayos X de polvo de los sólidos MCM-41 pre-sintetizada (antes de la eliminación del surfactante), MCM-41 calcinada, y el material **M-Ru(bpy)₃**. El PXRD a ángulos bajos, del material silíceo MCM-41 pre-sintetizado, (curva a) muestra los cuatro picos de reflexión característicos de un material mesoporoso hexagonal ((100), (110), (200) y (210)).¹⁸¹ En la curva b, (MCM-41 calcinada) se observa el correspondiente desplazamiento del pico de reflexión (100). Finalmente, en la curva c (material **M-Ru(bpy)₃**), se observa un difractograma típico de materiales cargados y funcionalizados con puertas moleculares, similar a los descritos anteriormente.^{182, 183} Así mismo, la presencia de una

estructura mesoporosa se observó por TEM. En la Figura 7.27 se puede observar la morfología esférica, los diámetros (≈ 100 nm) de las nanopartículas obtenidas y los canales homogéneos característicos de la MCM-41 calcinada.

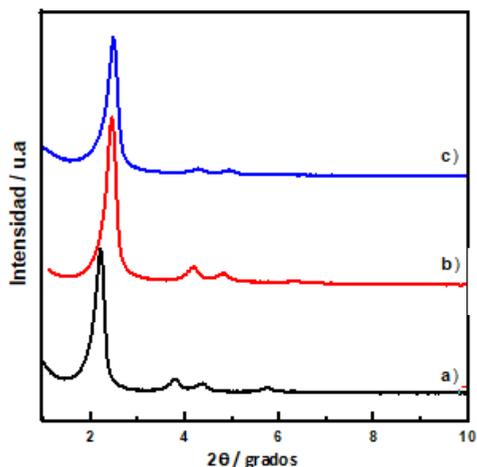


Figura 7.26. Difractogramas de polvo de rayos X de los sólidos a) MCM-41 pre-sintetizada, b) MCM-41 calcinada, c) material $M-Ru(bpy)_3$.

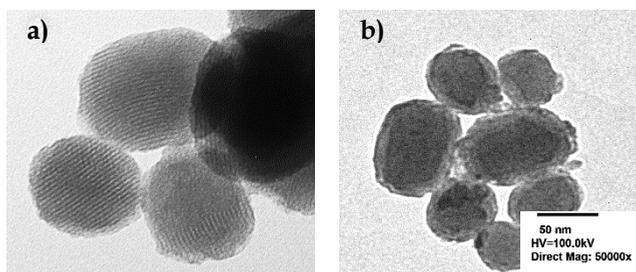


Figura 7.27. Imágenes TEM de a) MCM-41 calcinada, b) $M-Ru(bpy)_3$.

La porosidad del material se estudió por medio del análisis de las isothermas de adsorción-desorción de N_2 (Figura 7.28). Las isothermas de adsorción-desorción de N_2 del material MCM-41 calcinado, curva a), muestra un primer proceso de adsorción a presión parcial relativa intermedia (intervalo entre 0,1-0,4) característico en este tipo de

materiales mesoporosos. En Tabla 7.5 se muestran los valores de diámetro de poro (calculados mediante el método BJH)¹⁸⁴ y el área superficial (calculada mediante el método BET).¹⁸⁵ Por otro lado, para el material **M-Ru(bpy)₃** se observó que la isoterma de adsorción-desorción de N₂ presentaba un descenso del volumen de nitrógeno adsorbido. No obstante, se observó que había una importante adsorción de N₂ a presiones relativas altas (> 0,9). Esta adsorción se puede asociar a un cierto número de mesoporos que quedan sin bloquear o más probablemente a múltiples micro ($\varnothing < 2$ nm) o supermicroporos ($0,7 < \varnothing < 2$ nm)¹⁰⁰ que se generan al colapsar las cadenas hidrocarbonadas de la puerta molecular **27** sobre las entradas de los poros en las condiciones de presión y temperatura necesarias para la desgasificación de la muestra.²⁰⁵ En la Figura 7.28 se observa también, la distribución de tamaño de poros para el material **M-Ru(bpy)₃** obtenida por el modelo BJH, en la cual se puede ver un pico ancho y poco definido para valores inferiores a 2 nm. Estos valores están por debajo del alcance del equipo y, probablemente, estén en el rango de los supermicroporos.

²⁰⁵ E. Aznar, L. Mondragón, J. V. Ros-Lis, F. Sancenón, M^o. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, J. Soto, E. Pérez-Payá, P. Amorós, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, 50, 11172.

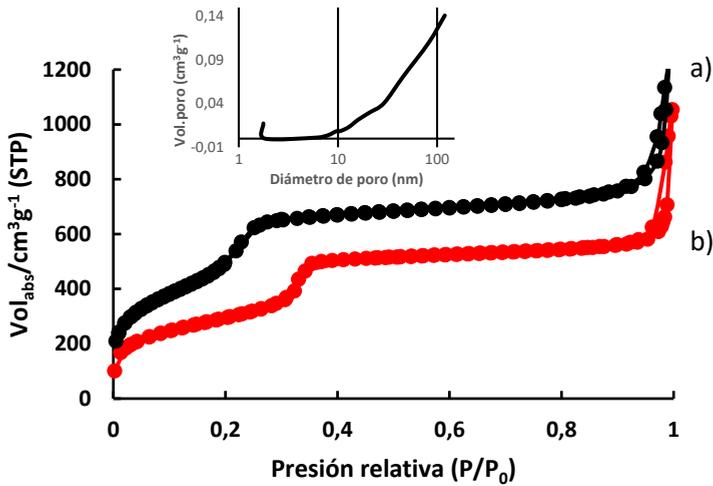


Figura 7.28. Isothermas de adsorción-desorción de N₂ para los sólidos a) MCM-41 calcinada y b) M-Ru(bpy)₃. Se muestra también la distribución de poro obtenida para el material M-Ru(bpy)₃.

Tabla 7.5. Valores de la superficie total específica (BET), volumen de poro y tamaño de poro calculados a partir de las isothermas de adsorción-desorción de N₂ para los materiales seleccionados.

Sólido	S _{BET} (m ² g ⁻¹)	Volumen de poro (cm ³ g ⁻¹)	Tamaño de poro (nm)
MCM-41	1015	1	3,1
M-Ru(bpy) ₃	780,7	0,7	2,97

Por otro lado, la cantidad de materia orgánica en el material M-Ru(bpy)₃ se determinó mediante EA y TGA. A partir de los datos obtenidos en el termograma (ver Figura 7.31, Parte experimental), se calculó que el peso del residuo de sílice del material (M-Ru(bpy)₃) era del 72%. Con este valor y, mediante las ecuaciones descritas anteriormente, ecuaciones 7.1 y 7.2 se calculó la cantidad de materia orgánica presente en el material M-Ru(bpy)₃ (Tabla 7.6).

Tabla 7.6. Contenido de materia orgánica total, de colorante y de puerta molecular **27** por mg/g de SiO₂ para el sólido sintetizado.

Sólido	Materia orgánica total (mg/g SiO ₂)	Colorante (mg/g SiO ₂)	Puerta molecular (mg/g SiO ₂)
M-Ru(bpy)₃	71	51	20

➤ Estudios de liberación de **M-Ru(bpy)₃**.

Para estudiar la liberación del colorante del sólido **M-Ru(bpy)₃**, se llevó a cabo la ruptura de la puerta molecular mediante una reacción de ozonólisis de los dobles enlaces. La liberación del colorante [Ru(bpi)₃]Cl₂ desde el interior de los poros del material **M-Ru(bpy)₃** hacia la disolución acuosa se registró mediante espectroscopía UV-vis y fluorescencia.

El experimento típico de liberación consistió en suspender una pequeña cantidad del material **M-Ru(bpy)₃** (5 mg) en una disolución acuosa (MeCN:H₂O, 95:5 v/v; 5 mL) a 0°C.²⁰⁶ Seguidamente, se burbujeó ozono recién generado durante 8 min. A continuación, la suspensión se purgó con oxígeno gas durante 2 min con el fin de eliminar el exceso de oxidante presente en la disolución. Se observó que, tras el proceso de oxidación, la disolución presentaba una coloración amarillenta debida a la liberación del [Ru(bpi)₃]⁺². Posteriormente, las nanopartículas se centrifugaron para eliminarlas de la suspensión y se registraron los espectros de absorbancia y fluorescencia del sobrenadante de color amarillo transparente. La aparición de la banda de absorción a 451 nm se relacionó directamente con la cantidad de colorante que se liberó desde el interior del material

²⁰⁶ C. E. Schiaffo, P. H. Dussault, *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 4688.

M-Ru(bpy)₃ a la disolución, siendo de **17,2 mg de [Ru(bpy)₃]⁺²/ g de sólido**. Por otro lado, también se estudió la liberación de **M-Ru(bpy)₃** mediante espectroscopia de fluorescencia. En la Figura 7.29 se puede ver como la banda de emisión centrada a 610 nm y que corresponde a la banda de emisión del colorante **[Ru(bpy)₃]⁺²** aumenta considerablemente después de haber sometido el material **M-Ru(bpy)₃** a la oxidación mediante ozonólisis.

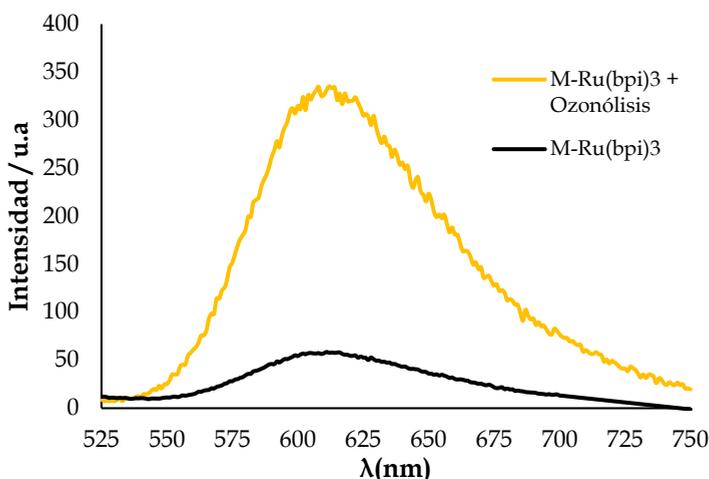


Figura 7.29. Espectros de emisión de fluorescencia del material **M-Ru(bpy)₃** antes (línea naranja) y después de la ozonólisis (línea azul).

➤ Estudios de liberación *in vitro* de **M-Ru(bpy)₃**.

Paralelamente, a los primeros estudios realizados de apertura de la puerta molecular mediante una reacción de ozonólisis de los dobles enlaces, se decidió exponer el material **M-Ru(bpy)₃** a células con estrés oxidativo con el fin de evaluar la liberación de éste *in vitro*. Para ello, y en colaboración con la Prof. M^a Carmen Terencio del Departamento de Farmacología de la Universitat de València, se cultivaron células del tipo macrófagos RAW 264,7, ya que, como se ha

mencionado anteriormente, son capaces de generar ROS.¹⁸⁸ Las células fueron estimuladas durante 24 h en por los reactivos LPS y TPA.¹⁸⁹ A continuación, se prepararon disoluciones a distintas concentraciones (10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de las nanopartículas de **M-Ru(bpy)₃** y se sonicaron durante 45 minutos en una disolución de tampón PBS (tampón fosfato). Pasado este tiempo, éstas se añadieron al cultivo celular y se incubaron durante 4 h. Posteriormente, las células se monitorizaron utilizando un microscopio de fluorescencia confocal ($\lambda_{\text{ex}}=355$ nm y $\lambda_{\text{em}}=460$ nm). Los resultados preliminares mostraron una emisión de fluorescencia similar entre las nanopartículas sin y con estrés oxidativo. Esta similitud en los resultados se asoció, por una parte, a que las nanopartículas no estaban bien lavadas y, por otra parte, a una baja internalización de las nanopartículas **M-Ru(bpy)₃**. La baja internalización en los macrófagos podría ser causada, como ya hemos mencionado, a una agregación en las nanopartículas. Esta agregación sería la causante de que en el proceso de endocitosis (procedimiento por el cual las sustancias ajenas a las células atraviesan la membrana celular) se viera imposibilitado debido al tamaño de las nanopartículas. De este modo, se pensó que una sonicación más eficiente, es decir, empleando un sonicador de punta de sable, favorecería la disgregación de estas y el proceso de internalización se vería mejorado. Para ello se realizó un nuevo estudio celular con la modificación en el sonicado de las nanopartículas, así como, en el tiempo de internalización, siendo este de 2 h. Como era de esperar, en este caso, si se produjo una mejoría en la internalización del material **M-Ru(bpy)₃**. Sin embargo, los resultados de fluorescencia mostraron que las células sin estimulación y con el tratamiento oxidativo presentaban una semejante intensidad de fluorescencia (Figura 7.30). Esto podría deberse, nuevamente, a que, en el proceso de disgregación

de las nanopartículas, éstas tuvieran retenido colorante en los huecos formados entre las cadenas alifáticas o en los propios huecos interpartículas.

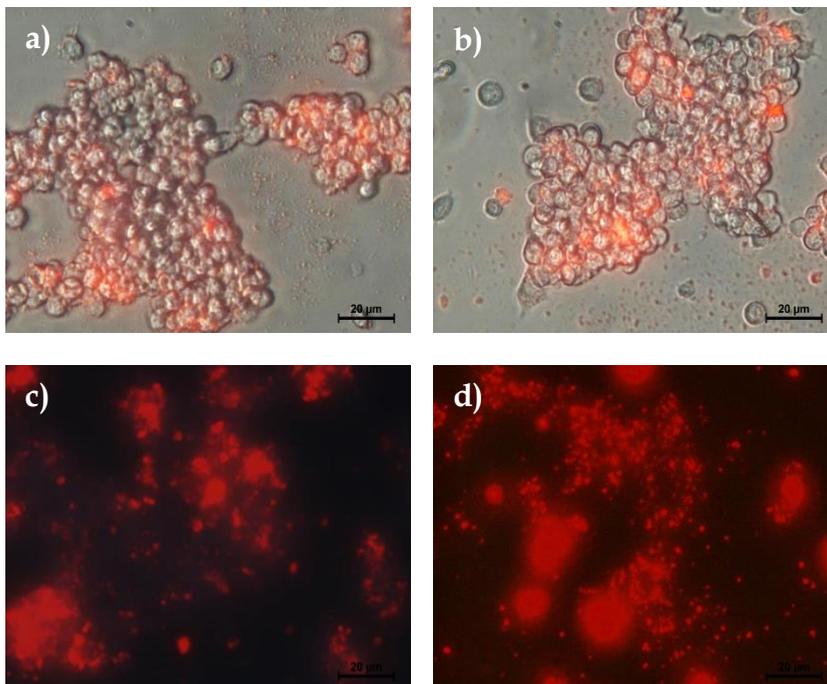


Figura 7.30. Imagen microscópica de los macrófagos RAW 264,7 antes (a) y después (b) de la incubación con las nanopartículas **M-Ru(bpy)₃**. Así como las imágenes de fluorescencia de los macrófagos RAW 264,7 en ausencia (c) y en presencia (d) de los agentes estimulantes.

7.4. CONCLUSIONES.

Para finalizar podemos decir que se han sintetizado y caracterizado unos materiales híbridos orgánico-inorgánicos (**M-Sulf**, **M-Rod**, **M-LA** y **M-Ru(bpy)₃**) consistentes en nanopartículas mesoporosas de sílice, cargadas con distintos colorantes, y

funcionalizadas en su superficie con puertas moleculares para ser utilizadas en la detección del estrés oxidativo en las células.

Los sólidos **M-Sulf** y **M-Rod** se funcionalizaron con una puerta molecular derivada de trifluorometilcetona con objeto de detectar peroxinitrito en medio acuoso y desencadenar la liberación del colorante encapsulado en su interior. Por otro lado, los sólidos **M-LA** y **M-Ru(bpy)₃** fueron funcionalizados en su superficie externa con cadenas hidrocarbonadas con dobles enlaces *cis* no conjugados, semejantes a los ácidos grasos esenciales. Estos hidrocarburos actuaron como puertas moleculares que, por un lado, mantienen los colorantes en el interior de los poros, y por otro lado son capaces de romperse en condiciones oxidativas y desencadenar la liberación del colorante encapsulado en su interior.

Así mismo, los estudios preliminares llevados a cabo en células para los sólidos **M-Rod** (detección de peroxinitrito) y **M-Ru(bpy)₃** (detección de radicales hidroxilo), mostraron que se producía una ligera liberación de la carga en el citoplasma de los macrófagos RAW 264,7, pudiéndose incrementar esta liberación con las pertinentes modificaciones en la puerta molecular. Actualmente, se están llevando a cabo estudios con el sólido **M-Rod** para evaluar la liberación *in vitro*, hacer los correspondientes perfiles de liberación en función del tiempo para comprobar la cantidad máxima de colorante que se puede liberar. Paralelamente, se están llevando a cabo estudios *in vitro*, de la puerta molecular **19** con cultivos celulares de macrófagos RAW 264,7 ya que en los estudios MTT realizados con el sólido **M-Rod** mostraron que se producía citotoxicidad. Con estos estudios pretendemos saber si el causante de la muerte celular es la propia puerta molecular (y no las

nanopartículas de sílice), alguno de sus fragmentos, una vez producida la ruptura por la reacción con el ONOO-, o sí, por el contrario, la presencia del antioxidante 4-HBA podría provocar la inhibición de la iNOS sintasa y, en consecuencia, inhibir la producción de NO necesario para la formación de peroxinitrito.

7.5. PARTE EXPERIMENTAL.

7.5.1. Reactivos químicos.

Todos los reactivos se adquirieron en Sigma-Aldrich y se utilizaron sin previa purificación. Así como los reactivos bioquímicos; tampón fosfato (PBS), macrófagos RAW 264,7, DMEN (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Gibco 10938025*), suero bovino fetal 10% (Sigma F-7524), L-glutamina (Sigma G-1517), penicilina 100 U/mL, estreptomina (Sigma P-3539), SBF (*simulated body fluid*), lipopolisacáridos (LPS), interferón- γ (INF- γ), HBSS con calcio (*Hank's Balanced Salt Solution*), TPA (tetradecanoilforbol-13-acetato), MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolino). Por otro lado, algunos de los disolventes utilizados fueron secados en el laboratorio antes de su utilización, por ejemplo, la piridina se secó sobre KOH, el tetrahidrofurano (THF) fue secado por calentamiento a reflujo en presencia de sodio metálico utilizando benzofenona como indicador, el acetonitrilo (MeCN) fue secado mediante calentamiento a reflujo en presencia de pentóxido de fósforo (P₂O₅), el tolueno se secó, primeramente, sobre tamiz molecular de 4 Å y, posteriormente, por calentamiento a reflujo en presencia de sodio metálico, finalmente, la hexametilfosforamida (HMPA) se secó sobre tamiz molecular de 4 Å.

7.5.2. Técnicas generales.

Resonancia magnética nuclear (RMN), difracción de polvo de rayos X (PXRD), análisis termogravimétrico (TGA), análisis elemental (EA), microscopía de transmisión (TEM), isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno, espectroscopía UV-vis, son las técnicas utilizadas para la caracterización de los materiales. Los espectros de ^1H , ^{19}F y ^{13}C -RMN se adquirieron con un espectrómetro Bruker DRX500 utilizando el "lock" del disolvente como referencia. Los espectros de difracción de polvo de rayo X se registraron en un difractómetro Bruker D5005 utilizando la radiación $\text{Cu}_{\text{K}\alpha}$. Los análisis termogravimétricos se realizaron con atmosfera oxidante (aire 80 mL/min) y una rampa de temperatura de 5°C por minuto hasta los 1000°C utilizando TG-DTA Pyris-Diamond. Las imágenes TEM se obtuvieron con un microscopio electrónico JEM-1010 (JEOL) de 100kV. Las isothermas de adsorción-desorción de N_2 se obtuvieron con un analizador de sorción automatizada Micrometrics ASAP2010. Las muestras fueron desgasificadas a vacío a 120°C durante una noche. El tamaño de poro se determinó siguiendo el modelo BJH.¹⁸⁴ El área superficial específica se calculó en la región de adsorción a bajas presiones utilizando el modelo Brunauer-Ummett-Teller (BET).¹⁸⁵ Los experimentos de ruptura de los dobles enlaces mediante irradiación UV se realizaron utilizando una lámpara UV Layrton 400 HEC-HSE-40/22. Los experimentos de ozonólisis de la puerta molecular se llevaron a cabo con un ozonizador Fischer Ozon-generator 500 ajustando el caudal a 40 L/h lo que equivalía a una producción de ozono de 1,5-2 g O_3 /h. Los espectros de absorción UV-vis se registraron en una cubeta cuarzo con 1 cm de paso óptico y con un espectrómetro Shimadzu UV-2101PC. La cantidad de células / pocillo fueron contabilizadas con un equipo Z1

de Beckman Coulter semiautomático que garantiza el suministro constante de CO₂ a los incubadores. La fluorescencia intracelular es detectada en un microscopio Leica DM IL LED (Solms, Alemania) y adquirida con una cámara digital Leica DFC425 C, mediante el programa Leica Application Suite.

7.5.3. Síntesis de las puertas moleculares.

➤ Síntesis del ácido 3-(4-yodofenil)propanoico (**15**).¹⁷⁸

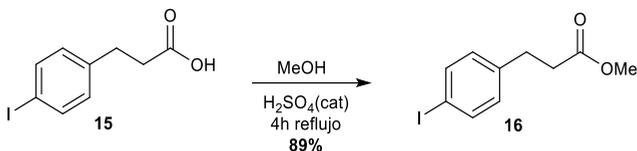


En un matraz de fondo redondo (250 mL) provisto de un imán se disolvió el ácido hidrocínámico (6 g, 40 mmol) en una mezcla de agua (25 mL), ácido acético (50 mL) y H₂SO₄ (2,5 mL). A continuación, se adicionó yodo (2,8 g, 11 mmol) y peryodato potásico (2,12 g, 9,2 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a reflujo. Seguidamente, una disolución de yodo (2,8 g, 11 mmol) en ácido acético (30 mL) se adicionó en porciones de 5 mL hasta que el color de la reacción cambió de violeta a naranja. Después de 6 horas, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se adicionó bisulfito sódico 1M (250 mL). El sólido formado se aisló por filtración y se lavó con agua fría. Seguidamente, se secó en un desecador durante 12 h obteniéndose, el compuesto **15** como un sólido cristalino blanco (5,9 g, 54%).

¹H-RMN (500,1 MHz, CDCl₃), δ (ppm) 2,66 (t, J = 5 Hz, 2H), 2,90 (t, J = 5 Hz, 2H), 6,96 (d, J = 5 Hz, 2H), 7,61 (d, J = 5 Hz, 2H).

^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3), δ (ppm) 30,2, 35,4, 91,7, 130,5, 137,7, 139,9, 178,5.

➤ **Síntesis de 3-(4-yodofenil)propanoato de metilo (16).**

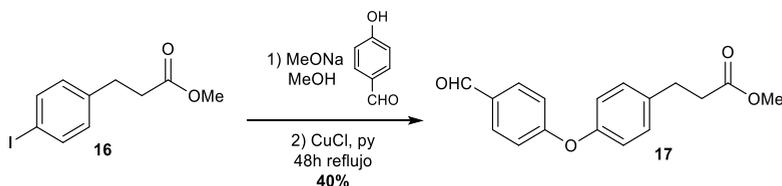


En un matraz de fondo redondo (50 mL) provisto de un imán se disolvió el compuesto **15** (3 g, 11 mmol) en una mezcla de MeOH (30 mL) y H_2SO_4 (0,2 mL). A continuación, la mezcla se calentó a reflujo durante 4 h. Se evaporó el metanol y el crudo se redisolvió en una mezcla de éter (30 mL) y agua (20 ml). Seguidamente, se neutralizó utilizando una disolución NaHCO_3 10% (3x20mL). Finalmente, la fase orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre Na_2SO_4 anhidrido. Se evaporó el disolvente y se obtuvo el compuesto **16** como un sólido cristalino de color amarillo pálido (2,95 g, 89%).

^1H -RMN (500,1 MHz, CDCl_3), δ (ppm) 2,60 (t, $J = 5$ Hz, 2H), 2,89 (t, $J = 5$ Hz, 2H), 3,66 (s, 3H), 6,95 (d, $J = 5$ Hz, 2H), 7,59 (d, $J = 5$ Hz, 2H).

^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3), δ (ppm) 30,5, 35,9, 51,8, 91,6, 130,5, 137,7, 140,3, 173,1.

➤ **Síntesis de 17.^{168a}**

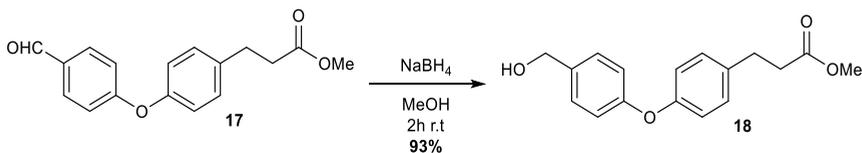


En un matraz de fondo redondo (50 mL) provisto de un imán se disolvió el compuesto **16** (1 g, 3,3 mmol), CuCl (331 mg, 3,3 mmol) y piridina (25 mL). La mezcla de reacción se calentó a 50°C. Por otro lado, se disolvió 4-hidroxibenzaldehído (490 mg, 4 mmol), NaOMe (312 mg, 6 mmol) en MeOH seco (10 mL). Al cabo de 30 min. se aisló la sal derivada de fenóxido sódico mediante evaporación del disolvente en el rotavapor y, seguidamente, se adicionó sobre la disolución piridínica. La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 48 h. A continuación, la reacción se acidificó con HCl 1M hasta pH 1-2. Posteriormente, se extrajo con AcOEt (3x20 mL), se lavó con salmuera y se secó con Na₂SO₄. Finalmente, el crudo se purificó por columna cromatográfica de silica gel (eluyentes: hexano (100%); hexano:AcOEt (90:10); hexano:AcOEt (80:20)) obteniéndose, el compuesto **17** como un aceite incoloro transparente (380 mg, 40%).

¹H-RMN (500,1 MHz, CDCl₃), δ (ppm) 2,66 (t, J = 5 H, 2H), 2,97 (t, J = 5 Hz, 2H), 3,69 (s, 3H), 7,01 (d, J = 10 Hz, 2H), 7,04 (d, J = 10 Hz, 2H), 7,24 (d, J = 10 Hz, 2H), 7,83 (d, J = 10 Hz, 2H), 9,92 (s, 1H).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm) 30,4, 35,8, 51,8, 117,5, 121,6, 130,1, 131,3, 132,1, 134,4, 153,6, 163,5, 173,3, 190,9.

➤ Síntesis de **18**.



En un matraz de fondo redondo (25 mL) provisto de un imán se disolvió el compuesto **17** (300 mg, 1,06 mmol) en MeOH seco (15 mL) bajo atmosfera de argón. A continuación, se enfrió la mezcla de reacción

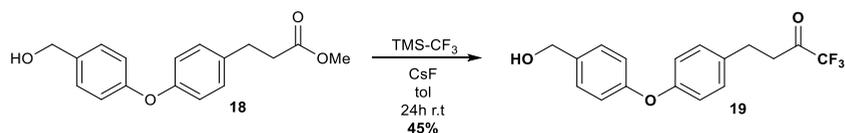
a 0°C y se adicionó muy lentamente el NaBH₄ (128 mg, 3,4 mmol). Seguidamente, la reacción se dejó a temperatura ambiente hasta la completa desaparición del aldehído, la reducción se controló por TCL. Al cabo de 2 h la reacción se terminó añadiendo NH₄Cl 10% (10 mL), se evaporó el MeOH y se extrajo el crudo con AcOEt (3x15 mL). Finalmente, se lavó con salmuera y se secó sobre Na₂SO₄ obteniéndose, el compuesto **18** como un sólido de color amarillo muy pálido (282 mg, 93%).

¹H-RMN (500,1 MHz, CDCl₃), δ (ppm) 2,63 (t, J = 5 Hz, 2H), 2,93 (t, J = 5 Hz, 2H), 3,68 (s, 3H), 4,66 (d, J = 5 Hz, 2H) 6,93 (d, J = 10 Hz, 2H), 6,98 (d, J = 10 Hz, 2H), 7,16 (d, J = 10 Hz, 2H), 7,33 (d, J = 10 Hz, 2H).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm) 30,4, 36, 51,8, 65,1, 118,9, 119,2, 128,8, 129,7, 135,7, 135,8, 155,7, 157,2, 173,4.

HRMS: [M+NH₄]⁺ encontrada: 304,1541, C₁₇H₁₈O₄ calculado 286,1205.

➤ Síntesis de **19**.¹⁷⁹



En un tubo Schlenk (5 mL) se secó a vacío CsF (40 mg, 0,25 mmol) utilizando un soplete. A continuación, el sólido se enfrió a temperatura ambiente bajo presión positiva de argón. Por otro lado, en un matraz de fondo redondo (10 mL) provisto de un imán se disolvió el compuesto **18** (600 mg, 2,0 mmol) en tolueno seco (2,5 mL) bajo

atmosfera de argón y seguidamente, se adicionó TMS-CF₃ (370 μL, 2,50 mmol). A continuación, se adicionó el CsF rápidamente y la reacción se dejó a temperatura ambiente durante 24 h. La reacción se controló por ¹⁹F-RMN. Seguidamente, se añadió una mezcla de HCl 5M (15 mL) y THF (15 mL) y se agitó durante 5 h a temperatura ambiente. El crudo se extrajo con Et₂O (3 x 15 mL), se lavó con salmuera y se secó sobre Na₂SO₄. Finalmente, el crudo se purificó por columna cromatográfica de silica gel (eluyentes; hexano:AcOEt (90:10), hexano:AcOEt (80:20), hexano:AcOEt (70:30)) obteniéndose, el compuesto **19**, como un aceite incoloro transparente muy viscoso (292 mg, 45%).

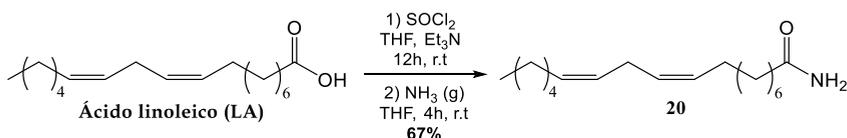
¹H-RMN (500,1 MHz, CDCl₃), δ (ppm) 2,96-2,99 (m, 2H), 3,03-3,06 (m, 2H), 4,67 (s, 2H), 6,94 (d, J = 10 Hz, 2H), 6,98 (d, J = 10 Hz, 2H), 7,16 (d, J = 10 Hz, 2H), 7,33 (d, J = 10 Hz, 2H).

¹⁹F-RMN (470 MHz, CDCl₃), δ (ppm) -79,7.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm) 27,8, 38,3, 65,1, 118 (q, ¹J_C = 290 Hz), 119, 119,3, 128,9, 129,7, 134,3, 135,9, 156,1, 157, 190,7 (q, ²J_C = 35 Hz).

HRMS: [M+NH₄]⁺ encontrada: 342,1173, C₁₇H₁₅F₃O₃ calculado 324,0973.

➤ **Síntesis de 20.**¹⁹³

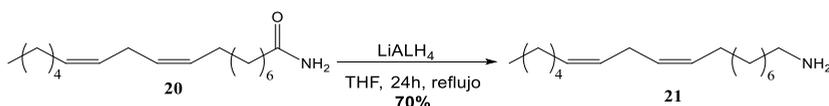


En un matraz de fondo redondo (50 mL) provisto de un imán se disolvió el ácido linoleico (LA) (2 mL, 6,4 mmol) y trietilamina (Et₃N) (1,5 mL) en THF seco (12 mL) bajo atmosfera de argón a 0°C. A continuación, se adicionó gota a gota el cloruro de tionilo (SOCl₂) (700 µL, 9,7 mmol) disuelto en THF seco (6 mL) a 0°C. Una vez terminada la adición, la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. A continuación, se burbujeó amoníaco gaseoso (NH₃(g)) a temperatura ambiente durante 4 h. Seguidamente, se evaporó el disolvente en el rotavapor y se extrajo con AcOEt (3x15 mL) en presencia de NaOH 0,5 M (3 x15 mL), las fases orgánicas se lavaron con salmuera y se secaron sobre MgSO₄ y, finalmente, se evaporó el disolvente, obteniéndose el compuesto **20** puro como un aceite viscoso de color marrón (1,21 g, 67%).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) 0,89 (t, J = 6 Hz, 3H), 1,31, (m, 14H), 1,68-1,58 (m, 2H), 2,08-2,01 (c, J = 9, 15 Hz, 4H), 2,21 (t, J = 9 Hz, 2H), 2,77 (t, J = 3 Hz, 2H), 5,42-5,28 (m, 4H) 5,55 (br, 2H, -NH₂).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm) 14,2, 22,7, 25,8, 27,0, 27,4, 27,4, 29,4, 29,5, 29,6, 29,7, 29,8, 31,7, 33,6, 128,1, 128,2, 130,3, 130,4, 173,6.

➤ Síntesis de **21**.



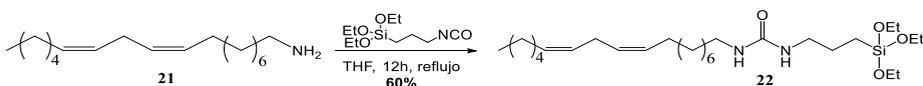
En un matraz de fondo redondo de tres bocas (50 mL) provisto de un imán se suspendió el hidruro de aluminio y litio (LiAlH₄) (230 mg, 6 mmol) en THF seco (10 mL) a temperatura ambiente bajo atmosfera de argón durante 30 min. A continuación, se adicionó gota a gota mediante un embudo de adición compensada el compuesto **20** (1

g, 3,6 mmol) disuelto en THF seco (20 mL). A continuación, la reacción se calentó a reflujo durante 24 h. La reducción de la amida primaria se controló por TLC y, a continuación, la reacción se paró mediante la adición de una disolución saturada de tartrato mixto de potasio y sodio (sal de Rochelle; $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Tras la adición, se formó una suspensión de color gris que se separó por filtración a gravedad. A continuación, se extrajo con AcOEt (3x20 mL), se lavó con salmuera y se secó sobre MgSO_4 . Finalmente, se evaporó el disolvente obteniéndose, el compuesto **21** puro como un aceite de color marrón (680 mg, 70%).

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3), δ (ppm) 0,89 (t, $J = 5$ Hz, 3H), 1,29 (m, 16H), 1,48-1,42 (m, 2H), 2,07-2,02 (c, $J = 10, 15$ Hz, 4H), 2,69 (t, $J = 5$ Hz, 2H), 2,77 (t, $J = 5$ Hz, 2H), 5,41-5,30 (m, 4H) 5,55 (br, 2H, $-\text{NH}_2$).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3), δ (ppm) 14,2, 22,7, 25,8, 27,0, 27,4, 27,4, 29,4, 29,5, 29,6, 29,7, 29,8, 31,7, 33,6, 42,3, 128,1, 128,2, 130,3, 130,4.

➤ **Síntesis de 22.**¹⁹⁴

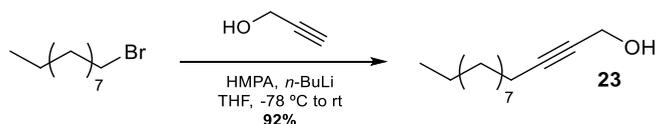


En un matraz de fondo redondo (25 mL) provisto de un imán se disolvió el compuesto **21** (367 mg, 1,4 mmol) en THF seco (10 mL) a temperatura ambiente bajo atmosfera de argón. A continuación, se adicionó el isocianato de 3-(trietoxisilil)propilo (342 μL , 1,4 mmol) y se calentó a reflujo durante 12 h. A continuación, se evaporó el THF y se purificó por columna cromatográfica de sílica gel utilizando como eluyentes CHCl_3 (100%), $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$ (99:1, v/v) previamente secados sobre tamiz molecular (4 Å), obteniéndose, la puerta molecular **22** como un aceite de color marrón (436 mg, 60%).

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3), δ (ppm) 0,63 (m, 2H), 0,89 (t, $J = 5$ Hz, 3H), 1,22 (t, $J = 10$ Hz, 9H), 1,28 (m, 16H), 1,64-1,56 (m, 4H), 2,07-2,02 (c, $J = 10, 15$ Hz, 4H), 2,77 (t, $J = 5$ Hz, 2H), 3,19-3,12 (m, 4H) 3,83 (c, $J = 5, 9$ Hz, 6H), 5,40-5,29 (m, 4H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3), δ (ppm) 8,8, 14,2, 18,4, 22,7, 24,0, 25,8, 27,0, 27,4, 27,4, 29,4, 29,5, 29,6, 29,7, 29,8, 31,7, 33,6, 39,9, 42,9, 58,4, 128,1, 128,2, 130,2, 130,4, 158,9.

➤ **Síntesis de 23.**²⁰⁰

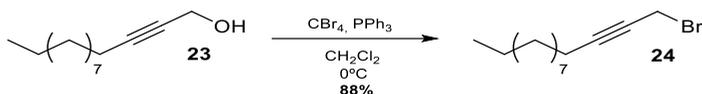


En un matraz de fondo redondo (50 mL) provisto de un imán se disolvió alcohol propargílico (1,2 mL, 20 mmol) en THF seco (10 mL) y HMPA seco (10,5 mL) bajo atmosfera de argón. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió a -78°C y se adicionó muy lentamente *n*-BuLi (2,5 M, 17 mL, 40 mmol). El crudo de reacción se calentó hasta -30°C y se agitó durante 3 h. A continuación, se adicionó 10-bromodecano (2,1 mL, 10 mmol) muy lentamente disuelto en THF seco (5 mL). El crudo de reacción se agitó durante 24 h desde -30°C hasta temperatura ambiente. Posteriormente, se neutralizó con NH_4Cl sat (25 mL) y se extrajo con Et_2O (3x20 mL), la fase orgánica se lavó con salmuera y se secó con Na_2SO_4 . Finalmente, el crudo se purificó por columna cromatográfica de silica gel ($\text{Et}_2\text{O}:\text{AcOEt}$, 9:1 v/v) obteniéndose, el compuesto **23** como un aceite de color amarillento (1,78 g, 92%).

$^1\text{H-RMN}$ (500,1 MHz, CDCl_3), δ (ppm) 0,88 (t, $J = 7$ Hz, 3H), 1,26, (m, 12H), 1,35-1,38 (m, 2H), 1,46-1,53 (m, 2H), 2,20 (tt, $J = 5$ Hz, 10 Hz, 2H), 4,25 (s, 2H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3), δ (ppm) 14,3, 19,9, 22,8, 28,8, 29,0, 29,3, 29,5, 29,7, 29,8, 32,0, 52,0, 78,4, 86,8.

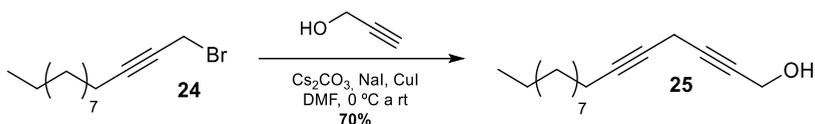
➤ **Síntesis de 24.**²⁰²



En un matraz de fondo redondo (100 mL) provisto de un imán se disolvió el compuesto **23** (1,77 g, 9 mmol) en CH_2Cl_2 seco (50 mL) bajo atmosfera de argón. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió a 0°C y se adicionó PPh_3 (2,83 g, 11 mmol), CBr_4 (3,6 g, 11 mmol) y se agitó durante 1 h a 0°C . Seguidamente, se adicionó pentano (60 mL). El sólido blanco formado se filtró a gravedad y el crudo de reacción se purificó por columna cromatográfica de silica gel ($\text{Et}_2\text{O}:\text{AcOEt}$, 9:1 v/v) obteniéndose, el compuesto **24** como un aceite incoloro transparente (2,05 g, 88%).

$^1\text{H-RMN}$ (500,1 MHz, CDCl_3), δ (ppm) 0,88 (t, $J = 7$ Hz, 3H), 1,26, (s, 12H), 1,35-1,39 (m, 2H), 1,46-1,54 (m, 2H), 2,23 (tt, $J = 2,5$ Hz, 7,2 Hz, 2H), 3,93 (t, $J = 2,5$ Hz, 2H).

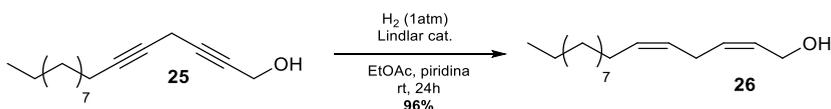
$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3), δ (ppm) 14,3, 15,9, 19,1, 22,8, 28,5, 28,9, 29,2, 29,5, 29,7, 29,8, 32,1, 75,4, 88,5.

➤ **Síntesis de 25.**²⁰³

En un matraz de fondo redondo (10 mL) provisto de un imán se disolvió Cs_2CO_3 (1,1 g, 3,3 mmol), NaI (644 mg, 4,3 mmol) y CuI (820 mg, 4,3 mmol) en DMF seco (5 mL) bajo atmosfera de argón. A continuación, el crudo de reacción se enfrió a 0°C y se adicionó el compuesto **24** (516 mg, 2,0 mmol) y posteriormente el alcohol propargílico (140 μL , 2,4 mmol). El crudo se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 20 h. Posteriormente, se añadió NH_4Cl sat (10 mL) y se extrajo con Et_2O (3x25 mL), la fase orgánica se lavó con H_2O fría (2x20 mL) y con salmuera. A continuación, se secó con Na_2SO_4 y finalmente, el crudo se purificó por columna cromatográfica de silica gel ($\text{Et}_2\text{O}:\text{AcOEt}$, 9:1 v/v) obteniéndose, el compuesto **25** como un aceite de color marrón (328 mg, 70%).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm) 0,88 (t, $J = 5,6$ Hz, 3H), 1,26 (s, 12H), 1,35-1,38 (m, 2H), 1,45-1,52 (m, 2H), 2,15 (tt, $J = 2,5, 7,2$ Hz, 2H), 3,19 (q, $J = 2,5$ Hz, 5 Hz, 2H), 4,26 (t, $J = 4$ Hz, 2H) 4,34 (s, 1H, -OH).

¹³C-RMN (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm) 10,0, 14,3, 18,4, 22,8, 28,8, 29,0, 29,3, 29,5, 29,7, 29,8, 32,0, 52,0, 73,4, 77,7, 78,5, 81,4.

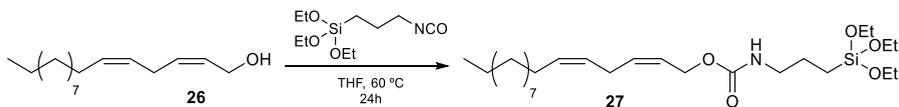
➤ **Síntesis de 26.**²⁰⁴

En un matraz de fondo redondo (10 mL) provisto de un imán se disolvió el compuesto **25** (290 mg, 1,23 mmol) en 3 mL de una mezcla de AcOEt y piridina (9:1, v/v). A continuación, se adicionó el catalizador de Lindlar (80 mg) y la mezcla de reacción se agitó durante 24 h bajo atmosfera de H₂ (1 atm) a temperatura ambiente. A continuación, el crudo se filtró a través de celita, se evaporó el disolvente. Finalmente, el crudo de la reacción se purificó por columna cromatográfica de sílica gel (hexano:AcOEt, 9:1, v/v) obteniéndose, el compuesto **26** como un aceite incoloro transparente (281 mg, 96%).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm) 0,88 (t, J = 7 Hz, 3H), 1,26, (s, 12H), 1,35-1,38 (m, 2H), 1,45-1,52 (m, 2H), 2,13 (tt, J = 5 Hz, 10 Hz, 2H), 3,19 (q, J = 2 Hz, 4,5 Hz, 2H), 4,23 (d, J = 5 Hz, 2H) 5,69-5,57 (m, 4H).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm) 14,3, 22,8, 25,9, 28,8, 29,0, 29,1, 29,3, 29,5, 29,7, 29,8, 32,0, 58,6, 127,8, 128,2, 129,9, 130,1.

➤ Síntesis de **27**.



En un matraz de fondo redondo (25 mL) provisto de un imán se disolvió el compuesto **26** (280 mg, 1,17 mmol) y isocianato de 3-(trietoxisilil)propilo (297 μL, 1,2 mmol) en THF seco (20 mL) bajo atmosfera de argón. A continuación, se calentó el crudo de reacción a 60°C durante 24 h. La obtención de la estructura del compuesto **27** se confirmó mediante RMN y se utilizó para el anclaje a la superficie del sólido MCM-41 sin previa purificación.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm) 0,59-0,62 (m, 2H), 0,88 (t, $J = 7$ Hz, 3H), 1,21 (t, $J = 7$ Hz, 9H), 1,25, (s, 12H), 1,32-1,35 (m, 2H), 1,42-1,49 (m, 2H), 1,57-1,63 (m, 2H), 2,11 (tt, $J = 5$ Hz, 10 Hz, 2H), 3,12-3,19 (m, 4H), 3,85 (c, $J = 7$ Hz, 6H), 4,65 (t, $J = 2$ Hz, 2H) 5,53-5,65 (m, 4H).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm) 7,3, 14,3, 18,2, 22,8, 23,3, 25,9, 28,8, 29,0, 29,1, 29,3, 29,5, 29,7, 29,8, 32,0, 41,8, 57,7, 64,2, 127,8, 128,2, 129,9, 130,1, 156,5.

7.5.4. Síntesis de los materiales.

Síntesis de las nanopartículas de sílice mesoporosa MCM-41.

La síntesis se llevó a cabo siguiendo los procedimientos descritos en la literatura.²⁰⁷ Para ello, se disolvió en un vaso de precipitados de 1 L provisto de un imán CTABr (1 g, 364,5 mol) en H₂O desionizada (480 mL). A continuación, se adicionó NaOH 2 M (3,5 mL) y se ajustó la temperatura a 80°C bajo agitación suave. Una vez alcanzada la temperatura se adicionó TEOS (5 mL) gota a gota bajo agitación vigorosa. Seguidamente, la mezcla de reacción se dejó durante 2 h a 80°C. Finalmente, el sólido blanco formado, se lavó con H₂O hasta pH neutro y se secó a 80°C durante 12 h. Para la obtención del material mesoporoso final (MCM-41), el sólido blanco obtenido se calcinó a 550°C durante 5 h para eliminar el surfactante que se utilizó como agente plantilla.

Síntesis de los materiales M-Sulf y M-Rod. En un matraz de fondo redondo (50 mL) provisto de un imán y de una trampa Dean-Stark se suspendieron el material mesoporoso MCM-41 (100 mg), y el

²⁰⁷ D. R. Radu, C. Y. Lai, K. Jeftinija, E. W. Rowe, S. Jeftinija, V. S. Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 13216.

colorante (100 mg, 0,21 mmol) en acetonitrilo seco (MeCN, 35 mL) bajo atmosfera de argón. A continuación, la mezcla se calentó a reflujo durante 1 h y la suspensión se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente, se adicionó el isocianato de 3-(trietoxisilil)propilo (170 μ L, 0,7 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. Transcurrido este tiempo, se adicionó una pequeña cantidad de sodio metálico (\approx 15 mg) junto a la puerta molecular **19** (160 mg, 0,5 mmol) disuelta en MeCN seco (3 mL). A continuación, el crudo se dejó en agitación durante 24 h a temperatura ambiente. Finalmente, se aisló el sólido por filtración y se lavó reiteradamente con MeCN, H₂O y EtOH hasta completa desaparición del colorante no encapsulado. Por último, el sólido se secó a 70°C durante 12 h. Obteniéndose de este modo los materiales **M-Sulf** (cargado con sulforodamina B) y **M-Rod** (cargado con rodamina 6G).

Síntesis del material M-LA. En un matraz de fondo redondo (50 mL) provisto de un imán y de una trampa Dean-Stark se suspendió el material mesoporoso MCM-41 (100 mg), y el colorante (100 mg, 0,21 mmol) en MeCN seco (35 mL) bajo atmosfera de argón. A continuación, la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 1 h y la suspensión se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente, se adicionó la puerta molecular **22** (256 mg, 0,5 mmol) disuelta en MeCN seco (3 mL). A continuación, el crudo se dejó en agitación durante 24 h a temperatura ambiente. Finalmente, se aisló el sólido por filtración y se lavó reiteradamente con MeCN, H₂O y EtOH hasta completa desaparición del colorante no encapsulado. Por último, el sólido se secó a 70°C durante 12 h.

Síntesis del material M-Ru(bpi)₃. En un matraz de fondo redondo (50 mL) provisto de un imán y de una trampa Dean-Stark se suspendieron el material mesoporoso MCM-41 (100 mg), y el colorante (100 mg, 0,21 mmol) en MeCN seco (35 mL) bajo atmosfera de argón. A continuación, se calentó la mezcla a reflujo durante 1 h y la suspensión se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente, se adicionó la puerta molecular **27** (243 mg, 0,5 mmol) disuelta en MeCN seco (3 mL). A continuación, el crudo se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. Finalmente, se aisló el sólido por filtración y se lavó reiteradamente con MeCN, H₂O y EtOH hasta completa desaparición del colorante no encapsulado. Por último, el sólido se secó a 70°C durante 12 h.

7.5.5. Caracterización de los materiales.

Utilizando los valores de C y N obtenidos por del análisis elemental (Tabla 7.7) junto con los valores del análisis termogravimétrico (Figura 7.31) de los materiales sintetizados, se calculó el contenido de materia orgánica total, de colorante y de puerta molecular mediante las ecuaciones 7.1 y 7.2.

$$(7.1) N_{total} = A_{Nx}X + A_{Ny}Y$$

$$(7.2) C_{total} = A_{Cx}X + A_{Cy}Y$$

El número total moles de nitrógeno (N_{total}) es igual a la suma del producto entre el número de moles de nitrógeno de la molécula anclada a la superficie del material (X) y el número de átomos de nitrógeno que posee la molécula anclada a la superficie del material (A_{Nx}) más, el producto entre el número de moles de nitrógeno de la molécula encapsulada en el interior del material (Y) y el número de

átomos de nitrógeno que posee la molécula encapsulada en el interior del material (A_{Ny}) (Ecuación 7.1). Por otro lado, y siguiendo el mismo razonamiento, el número total de carbonos (C_{total}) se calcularía de igual forma (Ecuación 7.2).

Tabla 7.7. Resultados del análisis elemental para los sólidos híbridos orgánico-inorgánicos sintetizados.

Nombre	Nitrógeno	Carbono	Hidrógeno	Azufre
M-Sulf	5,47	18,49	3,63	< 0,1
	5,37	18,42	3,06	< 0,1
	5,13	18,83	0,89	< 0,1
M-Rod	2,00	9,26	2,34	-
	1,89	9,21	1,98	-
	1,91	9,17	1,88	-
M-LA	2,45	15,53	2,96	< 0,1
	2,39	15,65	2,75	< 0,1
	2,33	15,59	2,85	< 0,1
M-Ru(bpi)₃	0,72	4,84	0,73	-
	0,78	4,88	0,73	-
	0,74	4,82	0,92	-

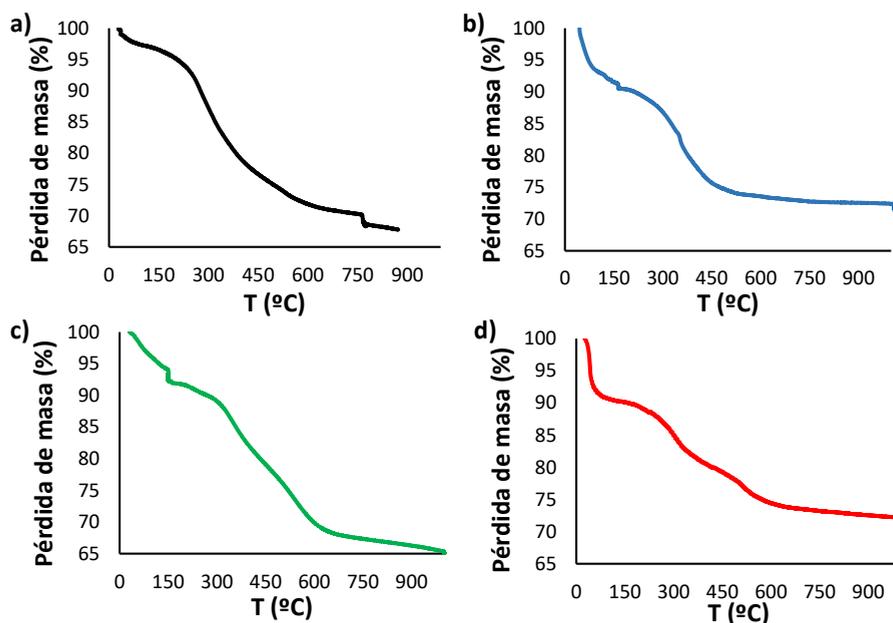


Figura 7.31. Termogramas de los materiales híbridos orgánico-inorgánicos sintetizados a) **M-Sulf** (línea negra), b) **M-Rod** (línea azul), c) **M-LA** (línea verde) y d) **M-Ru(bpi)₃** (línea roja).

7.5.6. Síntesis del ONOO⁻.

El peroxinitrito se sintetizó siguiendo los procedimientos descritos en la literatura.²⁰⁸ Se preparó una disolución “stock” de ONOO⁻ mediante la rápida combinación de tres disoluciones (previamente preparadas) a 0°C. a) disolución acuosa de peróxido de hidrógeno (0,7 M) y ácido clorhídrico (0,6 M), 1:1 (v/v); b) disolución acuosa de nitrito sódico (0,6 M) y finalmente, c) disolución acuosa de hidróxido sódico (1,5 M). A continuación, la disolución resultante se almacenó a -20°C hasta su utilización ya que, como se ha explicado anteriormente, las disoluciones de peroxinitrito son inestables y descomponen. La concentración de ONOO⁻ se estimó midiendo la

²⁰⁸ X. Jia, Q. Chen, Y. Yang, Y. Tang, R. Wang, Y. Xu, W. Zhu, X. Qian. *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, *138*, 10778.

absorción de esta disolución a 302 nm (Figura 7.32) y mediante la ecuación 7.3. El coeficiente de extinción molar del peroxinitrito en NaOH (0,1 M) es de $1670 \pm 50 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ a 302 nm.²⁰⁹

$$(7.3) C_{\text{ONOO}^-} = \frac{Abs_{302nm}}{1,67(mM)}$$

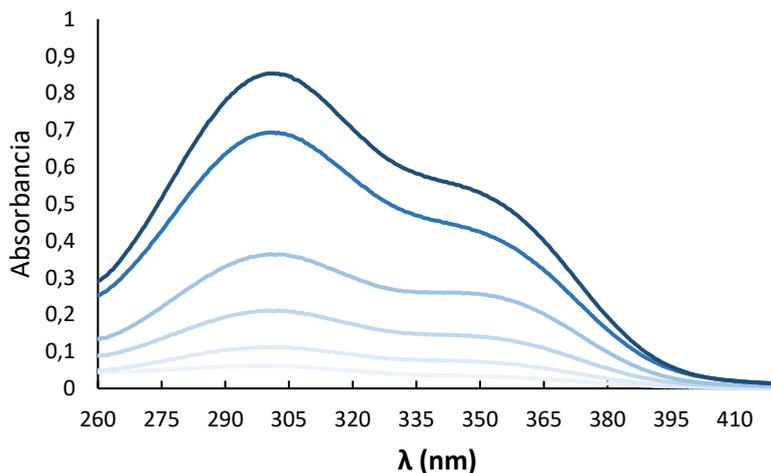


Figura 7.32. Espectros de absorción a distintas concentraciones de ONOO⁻ en NaOH 0,1 M.

7.5.7. Estudios de liberación con M-Sulf.

El experimento típico de liberación consistió en suspender en una pequeña cantidad del material **M-Sulf** (5 mg) en 20 mL de tampón fosfato (0,1 M, pH 7,4) a 0°C en ausencia y en presencia de ONOO⁻. A continuación, se tomaron alícuotas a tiempos fijados, se centrifugaron las nanopartículas en suspensión y se registraron los espectros de absorción y fluorescencia (Figuras 7.33 y 7.14, respectivamente).

²⁰⁹ M. N. Hughes, H. G. Nicklin. *J. Chem. Soc. (A)*, **1968**, 2, 450.

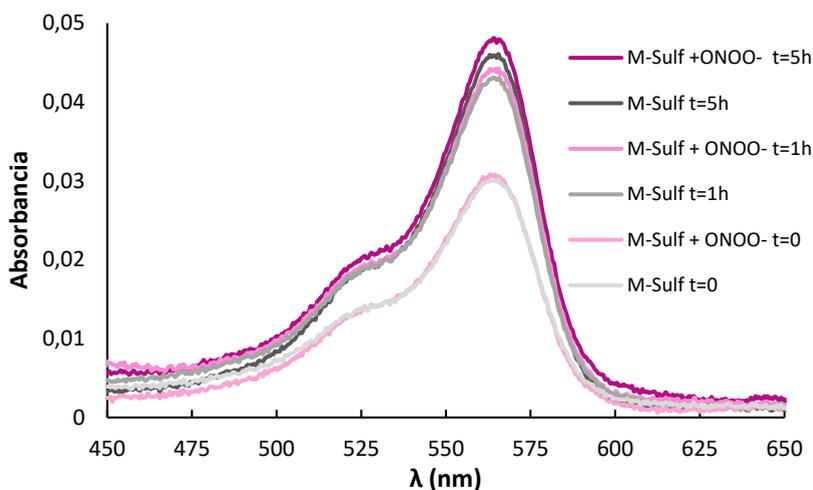


Figura 7.33. Espectros de absorción del material **M-Sulf** en ausencia (líneas grises) y en presencia de ONOO⁻ (líneas violetas) a distintos tiempos.

7.5.8. Ozonólisis del ácido linoleico (LA).

La ruptura de los dobles enlaces mediante la reacción de ozonólisis consistió en disolver el LA (20 mg) en CH₂Cl₂ (15 mL) a temperatura ambiente. Seguidamente, la disolución se enfrió a -78°C utilizando un baño de hielo seco (CO₂(s)) más acetona durante 20 min. A continuación, se burbujeó una corriente de O₃ generado *in situ* mediante un ozonizador y se agitó a -78°C durante 2 min (tiempo que tardó la disolución en adquirir una coloración azulada indicando, de este modo, la saturación de ozono en la disolución). A continuación, se adicionó PPh₃ (10 mg) y se agitó durante 30 min hasta alcanzar la temperatura ambiente. En ese momento, se observó la aparición de un sólido blanco insoluble, correspondiente al óxido de trifetilfosfina (POPh₃). A continuación, la disolución se purgó con nitrógeno gas y, posteriormente, se eliminó el óxido de trifetilfosfina mediante filtración a gravedad seguido de una percolación a través de una columna de sílica gel utilizando CH₂Cl₂ como eluyente. Se recogieron

las fracciones y se evaporó el disolvente mediante rotavapor y se registraron los espectros de RMN en CDCl_3 (Figura 7.23).

7.5.9. Estudios de liberación con M-LA.

La liberación del colorante sulforodamina B del material **M-LA** utilizando la reacción de ozonólisis consistió en suspender 5 mg de **M-LA** en CH_2Cl_2 (20 mL). Posteriormente, se procedió del mismo modo que en el estudio descrito anteriormente.

7.5.10. Estudios de liberación con M-Ru(bpy)₃.

El experimento típico de liberación del colorante $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{+2}$ consistió en suspender una pequeña cantidad de las nanopartículas **M-Ru(bpy)₃** (5 mg) en una disolución acuosa ($\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$, 95:5 v/v; 5 mL) a 0°C.²⁰⁶ A continuación, se burbujeó O_3 generado *in situ* mediante un ozonizador durante 8 min a 0°C. Transcurrido este tiempo, se burbujeó oxígeno durante 2 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó la suspensión y se registraron los espectros de fluorescencia (Figura 7.29).

7.5.11. Estudios de liberación *in vitro*.

Los estudios celulares se realizaron en colaboración con la Prof. M^a Carmen Terencio del Departamento de Farmacología de la Universitat de València.

➤ Cultivo de las células macrófagos RAW 264,7.

El mantenimiento del cultivo se realizó mediante siembras sucesivas en frascos estériles de 25 cm^2 ($2\text{-}4 \times 10^4$ células/ cm^2), en un

volumen de 10 ml de medio DMEM (Gibco 10938025) compuesto con suero bovino fetal al 10% (Sigma F-7524), L-glutamina 2 mM (Sigma G-1517), penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml (Sigma P-3539), a 37°C y 10% de CO₂, donde las células crecen adheridas formando una lámina fina con tendencia a la confluencia.

➤ **Generación de ONOO⁻ en células macrófagos RAW 264,7.**

La producción de peroxinitrito puede lograrse mediante la estimulación de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS), ya que, como su nombre indica, produce NO en los macrófagos murinos de la línea celular RAW 264,7 con la endotoxina bacteriana LPS. Al cabo de unas 18-24 horas, las células estimuladas presentan un marcado aumento en la síntesis de iNOS y, por tanto, el consiguiente incremento en la producción de NO. La posterior estimulación de estas células con TPA produce radicales superóxido que al reaccionar con el NO dará lugar a la formación de peroxinitritos.

➤ **Estudios de liberación *in vitro* con M-Rod.**

En microplacas de 96 pocillos se dispuso una suspensión de células (10⁶ células/mL) en medio de cultivo DMEM con 10% de SBF. A continuación, las células se incubaron a 37°C y con un 10% de CO₂ durante 2 h para permitir la adherencia de éstas a las microplacas. Seguidamente, se retiró el sobrenadante y se reemplazó con medio de cultivo DMEM al 10% SBF. Las células “blanco” crecieron en condiciones normales, mientras que las células “control” fueron estimuladas con LPS (Cf: 1 µg/mL) obtenido de *Escherichia coli* (serotipo 0111:B4, Colección Española de Cultivos Tipo). Tras 24 h, se

lavaron las células con PBS y se cambió el medio de cultivo para añadir la nanopartículas **M-Rod** previamente sonicadas durante 15 min en PBS (pH 7,4) (5 mL) a temperatura ambiente. Tras un periodo de internalización de 3 h, se volvieron a lavar las células, se añadió más HBSS con Ca^{2+} y se estimularon con TPA para generar las ROS que reaccionaran con el NO para dar lugar a la formación de peroxinitritos (ONOO \cdot). Finalmente, se registraron los espectros de fluorescencia (Figura 7.16).

➤ Estudios de liberación *in vitro* con M-LA.

Las células se incubaron en microplacas de 96 pocillos (400.000 células/pocillo) y se procedió del mismo modo que en el caso anterior. A continuación, se añadió, en este caso, las nanopartículas de **M-LA** previamente sonicadas durante 30 min en PBS (pH 7,4) (5 mL) a temperatura ambiente. Tras 4 h de internalización, se lavaron con PBS (2 veces) y, posteriormente, se añadió tampón HBSS con Ca^{2+} y las células fueron estimuladas con TPA (10^{-6} M) y finalmente, se registraron los espectros de fluorescencia (Figura 7.34).

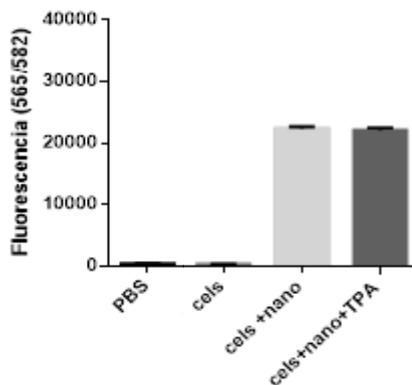


Figura 7.34. Espectro de fluorescencia del tampón PBS, células, células más M-LA y células más M-LA en presencia del estimulador TPA.

➤ **Estudios de liberación *in vitro* con M-Ru(bpy)₃.**

Las células macrófagos RAW 264,7, se incubaron en microplacas de 96 pocillos (10⁶/ml; 200.000 células/pocillo) del mismo modo que en los estudios anteriormente descritos. Tras 24 h, se cambió el medio (DMEM 10% sin rojo de fenol o tampón HBSS) y se introdujeron las nanopartículas de **M-Ru(bpi)₃** previamente sonicadas durante 30 min en PBS (pH 7,4) (5 mL). Tras 2 h de internalización, las células se lavaron 2 veces más con PBS. Posteriormente, se añadió tampón HBSS con Ca²⁺ y fueron estimuladas con TPA para generar los ROS y, finalmente, se monitorizó la liberación del colorante mediante fluorescencia (Figura 7.30).

➤ **Ensayo de viabilidad celular o citotoxicidad (MTT).**

El ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniletiazolio) es un método colorimétrico que permite determinar la viabilidad celular, es decir, conocer el porcentaje de células que sobreviven.¹⁸⁹

➤ **Protocolo experimental:**

Se sembraron las células (macrófagos RAW 264,7), como se ha descrito anteriormente, en microplacas de 96 pocillos. A continuación, se retiró el sobrenadante de los pocillos y se adicionaron 100 µl de la solución de MTT (0,5 mg/ml) sobre las células que quedan adheridas al pocillo, las cuales contienen las nanopartículas en su interior. A continuación, se incubaron las células durante 60 min a 37°C. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante, se añadieron 200 µl de DMSO para producir la lisis celular y disolver el formazán (molécula

indicadora) que se había formado. A continuación, se determinó la absorbancia a 535 nm. La relación lineal entre el número de células y la absorbancia obtenida, permite la cuantificación precisa en la tasa de proliferación celular, que está relacionada con la toxicidad del material híbrido orgánico-inorgánico que se internalizado (Figura 7.35).

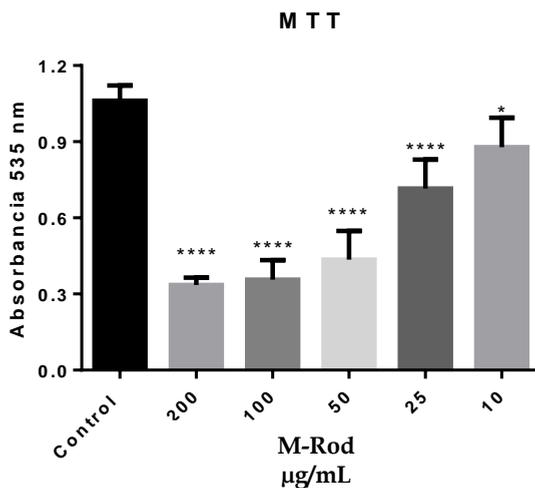


Figura 7.35. Estudio de citotoxicidad de M-Rod en células macrófagos RAW 264,7.

8. *Micropartículas de sílice mesoporosa para la liberación controlada de fármacos en la mucosa colónica*

8.1. INTRODUCCIÓN: Enfermedades inflamatorias intestinales (EII).

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es una enfermedad de tipo crónico, es decir, los pacientes presentan períodos de recaídas sistemáticas, y que afecta al intestino delgado y colon.²¹⁰ Los síntomas clínicos que presentan los pacientes con EII son dolores abdominales, diarrea, tenesmo y sangrado rectal producidos por la proctitis ulcerosa (recto) y proctosigmoiditis ulcerosa (recto y sigma).²¹¹ Por otro lado, todavía es desconocido el origen exacto de estas enfermedades, aunque se sabe que afecta a más del 1% de la población. La colitis ulcerosa (UC, *ulcerative colitis*) y la enfermedad de Crohn (CD, *Crohn's disease*) son dos de los trastornos crónicos inflamatorios más comunes dentro de las EII.²¹² La colitis ulcerosa afecta únicamente al colon y al recto, mientras que la enfermedad de Crohn puede afectar a cualquier parte del tracto digestivo. La UC es una enfermedad que causa inflamación y llagas (úlceras) en el revestimiento del intestino grueso. Por lo general, afecta a la sección inferior (colon sigmoide) y el recto, pero también puede afectar a todo el colon. Estas enfermedades han sido estudiadas en varios modelos de animales, y se han desarrollado y clasificado cuatro grupos de inflamaciones intestinales: la colitis espontánea, colitis inducible, transformaciones genéticas y modelos de transformaciones adoptivas.²¹³ De entre todos ellos, la colitis inducida por el ácido

²¹⁰ a) X. M. Xu, H.J. Zhang, *World J. Gastroenterol.*, **2016**, 22, 2206. b) G. C. Leitner, H. Vogelsang, *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* **2016**, 7, 5.

²¹¹ A. K. Pareek, S. K. Garg, P. Saini, P. Pitliya, S. L. Choudhary, D. Puri, S. Bhambu, *Int. J. Pharm. Sci. and Nanotech.*, **2014**, 7, 2320

²¹² a) B. B. Crohn, L. Ginzburg, G. D. Oppenheimer, *Mt. Sinai J. Med.*, **2000**, 67, 263. b) E. M. DeFilippis, R. Longman, M. Harbus, K. Dannenberg, E. J. Scherl, *Curr. Gastroenterol. Rep.*, **2016**, 18, 13.

²¹³ T. Hibi, H. Ogata, A. Sakuraba., *J. Gastroenterol.* **2002**, 37, 409.

trinitrobenceno-sulfónico (TNBS) se ha utilizado ampliamente.²¹⁴ Se piensa que el TNBS es un hapteno, que supuestamente se une a las proteínas endógenas de la mucosa colónica e induce una respuesta inmunológica local a través de macrófagos y células T activadas.²¹⁵ Las ventajas que presenta este modelo son su simplicidad y reproducibilidad y, además, el desarrollo de la inflamación depende directamente de la dosis y del tiempo de exposición.²¹⁶

Estas enfermedades inflamatorias intestinales se pueden tratar hoy en día con un gran número de medicamentos, incluyendo los derivados del ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) tales como la sulfasalazina y la mesalazine.²¹⁷ También se usan medicamentos inmunosupresores tales como la azatioprina y los agentes biológicos como el infliximab y adalimumab aunque estos tratamientos son menos comunes debido a sus factores de riesgo para la salud. Uno de los principales tratamientos para la colitis ulcerosa son los medicamentos de tipo corticoesteroides, como la prednisona que es un buen medicamento para un tratamiento de corta duración. Sin embargo, presenta numerosos inconvenientes para tratamientos de larga duración.²¹⁸ Por otro lado, la budesonida se considera un

²¹⁴ a) M. S. Crcarevska, M. G. Dodov, G. Petrushevka, I. Gjorgoski, K. Goracinova. *J. Drug Target*, **2009**, 10, 788. b) C. Mura, A. Nacher, V. Merino, M. Merino-Sanjuán, C. Carla, A. Ruiz, M. Manconi, G. Loy, A. M. Fadda, O. Diez-Sales., *Int. J. Pharm*, **2011**, 416, 145. c) A. Motavallian-Naeini, S. Andalib, M. Rabbani, P. Mahzouni, M. Afsharipour, M. Minaiyan., *Res Pharm Sci*. **2012**, 7, 159-69.

²¹⁵ K. Ishiguro, T. Ando, O. Maeda, O. Watanabe, H. Goto., *Biotechniques*, **2010**, 49, 641.

²¹⁶ H. Tozaki, T. Fujita, J. Komoike, S. I. Kim, H. Terashima, S. Muranishi, S. Okabe, A. Yamamoto. *J. Pharm. Pharmacol.*, **1999**, 51, 257.

²¹⁷ a) C. Mowat, A. Cole, A. Windsor, T. Ahmad, I. Arnott, R. Driscoll, S. Mitton, T. Orchard, M. Rutter, L. Younge, C. Lees, G. -T. Ho, J. Satsangi, S. Bloom, *Gut.*, **2011**, 60, 571. b) M. Fakhoury, R. Negruľj, A. Mooranian, H. Al-Salami, *J. Inflamm. Res.*, **2014**, 7, 113.

²¹⁸ a) F. Gomollón, J. Hinojosa, P. Nos, *Gastroenterol. Hepatol*. **1999**, 22, 525. b) J. Zeng, L. Lv, Z. C. Mei, *Gastroenterology and Hepatology*, **2017**, 32, 558.

corticoesteroide de segunda generación con una mejorada respuesta clínica en pacientes con colitis ulcerosa distal (Figura 8.1).²¹⁹ Este fármaco posee una mayor afinidad por los receptores de glucocorticoides intracitoplasmáticos que otros corticoesteroides, lo que aumenta considerablemente, su poder antiinflamatorio. Sin embargo, la administración directa de budesonida tiene una escasa biodisponibilidad sistémica debido al extenso metabolismo que sufre en el hígado, en donde, más del 90% de la dosis que llega a la sangre se transforma mayoritariamente en dos metabolitos inactivos: la 16 α -hidroxiprednisolona y la 6 β -hidroxibudesonida (Figura 8.1).²²⁰ Por consiguiente, la llegada del fármaco al sitio de acción se ve estrechamente limitada, y además, provoca diversos efectos adversos.

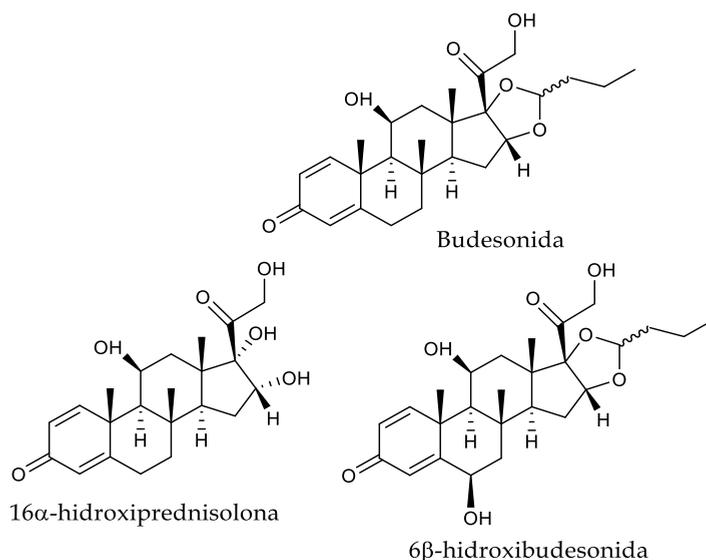


Figura 8.1. Estructura química de la budesonida y de dos de sus principales metabolitos.

²¹⁹ a) D. Kala, C. R. S. Nair, *J. Pharm. Pharm. Sci.*, **2016**, *8*, 159. b) R. Gareb, A. C. Eissens, J. G. W. Kosterink, H. W. Frijlink, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2016**, *103*, 32.

²²⁰ I. Marín-Jiménez, A. S. Peña, *Rev. Esp. Enferm. Dig.*, **2006**, *98*, 362.

Pese a que existen diversas formulaciones tanto orales como rectales para la administración de estos medicamentos, se publican continuamente estudios dirigidos a la preparación de formulaciones más eficientes.²²¹ En este contexto, existen formulaciones capaces de dirigirse al colon basadas en polímeros sensibles al pH, sistemas sensibles a la presión, materiales controlados por osmosis, materiales bio-adhesivos, formulaciones dependientes del tiempo, profármacos activados con enzimas o fármacos recubiertos con polímeros sensibles a enzimas producidas por la microbiota del colon (azoreductasa, β -galactosidasa, nitroreductasa, etc.).²²² Sin embargo, en numerosas ocasiones, éstas formulaciones presentan una baja bioeficacia debido a que el fármaco es eliminado por la diarrea (uno de los principales síntomas en pacientes con EII)²²³ o son degradados en el tracto intestinal superior sin llegar al sitio de acción.²²⁴ Por consiguiente, un buen sistema de administración de fármacos debería ser capaz de proteger el medicamento hasta su llegada al colon, en donde el fármaco se liberaría, y por tanto, se absorbería únicamente allí.²²⁵ Una aproximación muy interesante es la utilización de micropartículas mesoporosas,²²⁶ ya que, se encuentra descrito en la literatura que nano

²²¹ M. I. Abdalla, H. Herfarth, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, **2016**, *17*, 1549. . b) D. Kala, C. R. Sudhakaran Nair., *Int. J. Pharmacy and Pharmaceutical Sci.* **2016**, *8*, 159.

²²² a) K. J. Filipinski, M. V. Varma, A. F. El-Kattan, C. M. Ambler, R. B. Ruggeri, T. C. Goosen, K. O. Cameron, *Curr. Top. Med. Chem.*, **2013**, *13*, 776. b) S. Amidon, J. E. Brown, V. S. Dave, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **2015**, *16*, 731. c) S. Hua, E. Marks, J. J. Schneider, S. Keely, *Nanomedicine*, **2015**, *11*, 1117.

²²³ a) J. G. Hardy, S. S. Davis, R. Khosla, C. S. Robertson., *Int. J. Pharm*, **1988**, *48*, 79. b) P. J. Watts, L. Barrow, K. P. Steed, C. G. Wilson, R. C. Spiller, C. D. Melta, M. C. Davies., *Int. J. Pharm*, **1992**, *87*, 215.

²²⁴ a) O. A. Odeku, J.T. Fell., *J. Pharm. Pharmacol.* **2005**, *57*, 163. b) A. K. Philip, S. Dabas, K. Pathak. *J. Drug. Target.* **2009**, *17*, 235.

²²⁵ E. O. Akala, O. Elekwachi, V. Chase, H. Johnson, M. Lazarre, K. Scott. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* **2003**, *4*, 375.

²²⁶ a) P. Horcajada, T. Chalati, C. Serre, B. Gillet, C. Sebrie, T. Baati, J. F. Eubank, D. Heurtaux, P. Clayette, C. Kreuz, J.-S. Chang, Y. K. Hwang, V. Marsaud, P.-N. Bories, L. Cynober, S. Gil, G. Férey, P. Couvreur, R. Gref, *Nature Materials*, **2010**, *9*, 172. b) C.

y micropartículas con un diámetro superior a 10 μm no se eliminan por diarrea ya que están adheridas a la capa más gruesa de la mucosa colónica donde normalmente suele aparecer el área de la herida/úlceras.²²⁷

Como ya se ha mencionado anteriormente, estos materiales presentan unas propiedades únicas que los convierten en candidatos prometedores para un gran número de aplicaciones biológicas, farmacéuticas y médicas.²²⁸ El diseño de portadores capaces de liberar medicamentos en el sitio de acción para minimizar los efectos secundarios es un punto de referencia en el tratamiento de diferentes enfermedades (es lo que se denominan dianas terapéuticas). Por ello, el desarrollo de nuevos portadores de fármacos que disminuyan los efectos secundarios derivados de su pronta absorción y mejoren su eficacia para el tratamiento oral de la EII es un campo de gran interés.

Pese a que existen materiales de sílice mesoporosa cerrados con distintos grupos capaces de degradarse en presencia de enzimas producidas por la microbiota del colon (azoreductasas, β -galactosidasas, nitroreductasas, etc.),^{139,140} el uso de estos sistemas para

Argyo, V. Weiss, C. Brauchle, T. Bein, *Chem. Mater.* **2014**, 26, 435. c) X. Du, X. Li, L. Xiong, X. Zhang, F. Kleitz, S. Z. Qiao, *Biomaterials*, **2016**, 91, 90. d) J. Florek, R. Caillard, F. Kleitz, *Nanoscale*, **2017**, 9, 15252. e) J. G. Croissant, Y. Fatieiev, A. Almalik, N. M. Khashab, *Adv. Healthcare Mater.* **2018**, 7, 1700831. f) A. Noureddine, C. J. Brinker, *Chem. Eng. J.*, **2018**, 340, 125.

²²⁷ a) A. Lamprecht, U. Scheafer, C. M. Lehr., *Pharm. Res.*, **2001**, 18, 788. b) I. M. Van Der Lubben, F. A. Konings, G. Borchard, J. C. Verhoef, H. E. Junginger., *J. Drug Target*, **2001**, 9, 39. c) T. Oosegi, H. Onishi, Y. Machida. *Int. J. Pharm*, **2008**, 348, 80.

²²⁸ a) M. W. Ambrogio, C. R. Thomas, Y.-L. Zhao, J. I. Zink, J. F. Stoddart, *Acc. Chem. Res.*, **2011**, 44, 903. b) T. L. Doane, C. Burda, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 2885. c) P. Yang, S. Gai, J. Lin, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 3679. d) A. Bansal, Y. Zhang, *Acc. Chem. Res.*, **2014**, 47, 3052.

la administración específica en el colon de fármacos (como la budesonida) para el tratamiento de la EII, apenas se han explorado.²²⁹

Siguiendo el interés de nuestro grupo de investigación en el uso de materiales mesoporosos de sílice para la liberación controlada de fármacos, y específicamente en el tratamiento de las EII, se describe en este capítulo de la Tesis Doctoral la síntesis de micropartículas de sílice mesoporosa cargadas con un colorante (safranina O) o con un fármaco (budesonida), y funcionalizadas con una puerta molecular que contiene en su estructura un grupo azo, capaz de controlar la liberación del colorante/fármaco en el colon, desencadenada por las azoreductasas producidas en la microbiota del colon.²³⁰

La puerta molecular sintetizada en este trabajo se muestra en la Figura 8.2. Se trata de un azoderivado que contiene en uno de los anillos aromáticos una amina funcionalizada con dos derivados de glicerina y en el otro un grupo urea terminado en un organosilano para su anclaje a la superficie de las micropartículas. El material preparado se cargó con el colorante safranina O (**M-Saf**) o con el fármaco budesonida (**M-Bud**) para, inicialmente, llevar a cabo estudios de liberación *in vitro* (apartado 8.2) de ambos materiales a distintos pH y que posteriormente se realizaron estudios *in vivo* (apartado 8.3) con ratas Wistar.

²²⁹ a) A. Popat, S. Jambhrunkar, J. Zhang, J. Yang, H. Zhang, A. Meka, C. Yu, *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 5547. b) X. Li, T. Tang, Y. Zhou, Y. Zhang, Y. Sun, *Microporous Mesoporous Mater.*, **2014**, 184, 83.

²³⁰ A. Kumar, D. Singh, A. K. Shrivastava, *Am. J. PharmTech Res.*, **2016**, 6, 14.

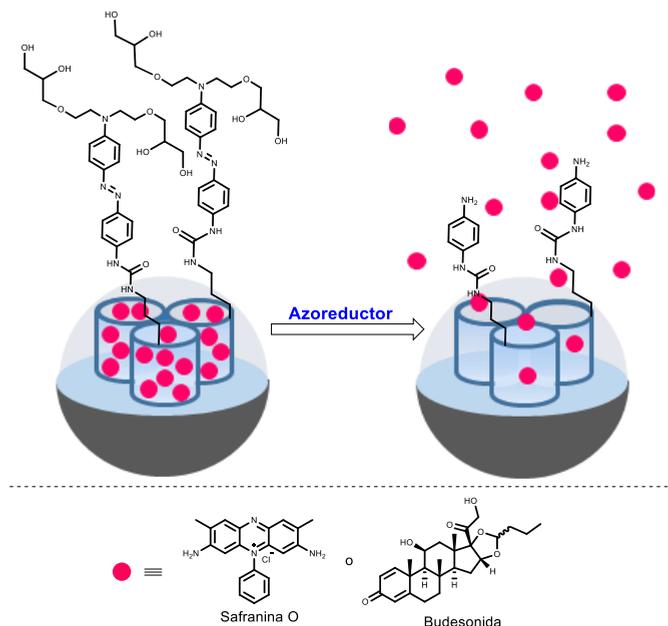


Figura 8.2. Representación esquemática de las micropartículas de sílice mesoporosas cargadas con safranina O (**M-Saf**) o budesonida (**M-Bud**) y funcionalizadas con una puerta molecular basada en un azoderivado.

8.2. MICROPARTÍCULAS DE SÍLICE MESOPOROSA FUNCIONALIZADAS CON UN AZODERIVADO PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE COLORANTES/FÁRMACOS. SÍNTESIS Y ESTUDIOS DE LIBERACIÓN *in vitro*.²³¹

8.2.1. Diseño de los materiales mesoporosos híbridos orgánico-inorgánicos.

A la hora de diseñar un material destinado al transporte y liberación controlada de sustancias, se han de plantear tres cuestiones

²³¹ D. Ferri, P. Gaviña, M. Parra, A. M. Costero, J. El Haskouri, P. Amorós, V. Merino, A. H. Teruel, F. Sancenón, R. Martínez-Máñez., *R. Soc. open sci.* **2018**, *5*, 180873.

importantes: (i) el estímulo externo encargado de abrir/romper la puerta molecular permitiendo, de este modo, la liberación de la carga, (ii) la puerta molecular encargada de cerrar los poros e inhibir la salida de la carga y, (iii) el soporte que contendría la carga.¹³⁸ En este trabajo, se seleccionó como soporte sólido sílice mesoporosa de tipo MCM-41, en forma de micropartículas. En este caso, el mayor tamaño de las micropartículas (con respecto a las nanopartículas clásicas) es muy importante para poder dirigir el material hasta el colon, evitando el paso de éste al torrente sanguíneo a través del intestino.²³² El material seleccionado posee poros uniformes de entre 2-3 nm, rango que permite introducir en su interior la carga seleccionada, mientras que la presencia de grupos silanol libres en su superficie permite el anclaje de la puerta molecular correspondiente mediante la formación de enlaces M-Si-O por condensación con alcoxisilanos. Como puerta molecular se eligió un azocompuesto voluminoso (compuesto **32**, Figura 8.3) que en presencia de azoreductasas presentes en la microbiota intestinal se hidrolizará dando lugar a la liberación de la carga. La puerta molecular **32** se diseñó también para que contuviera, en uno de sus extremos, un grupo voluminoso hidrofílico que impidiera la salida de la carga del interior de los poros y, al mismo tiempo, incrementaran la solubilidad en medio acuoso del residuo obtenido, una vez producida la ruptura enzimática. Finalmente, el compuesto **32** contiene en su otro extremo un grupo trialcoxisilano conectado al grupo azo a través de un grupo urea, que es resistente a la hidrólisis enzimática²³³ ya que, en un trabajo

²³² A. Viscido, A. Capannolo, G. Latella, R. Caprilli, G. Frieri, *Crohns Colitis*, **2014**, *8*, 903.

²³³ M. J. Perry, E. Mendes, A. L. Simplicio, A. Coelho, R. V. Soares, J. Iley, R. Moreira, A. P. Francisco, *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**, *44*, 3228.

previo del grupo de investigación se utilizó un carbamato como enlace de unión y se observó que se hidrolizaba parcialmente a $\text{pH} < 5$.²³⁴

8.2.2. Síntesis de los materiales.

La secuencia sintética seguida para la preparación de la puerta molecular **32** se muestra en la Figura 8.3 y comenzó con la ditosilación de *N*-fenildietanolamina con cloruro de tosilo en piridina a 0°C durante 5 h. A continuación, se adicionó H_2O y se observó la formación de un sólido blanco que se aisló por filtración, se lavó con H_2O fría y se secó durante 12 h en un desecador, obteniéndose el derivado ditosilado **28** con un rendimiento del 92%.²³⁵ Por otro lado, el compuesto DL-1,2-isopropilenglicerol, se desprotonó bajo atmósfera de argón con NaH en THF seco a reflujo durante 1 h. Una vez formada la sal sódica correspondiente, se adicionó el compuesto **28** disuelto en THF seco, y la reacción se agitó durante 24 h a reflujo bajo atmósfera inerte. Tras este tiempo, se añadió NH_4Cl (10%), se extrajo el crudo con CH_2Cl_2 y se purificó por columna cromatográfica de sílica gel obteniéndose, el compuesto **29** como un aceite de color marrón con un rendimiento del 68%.¹⁴⁷ A continuación, para llevar a cabo la formación del azocompuesto se preparó la sal de diazonio de la 4-nitroanilina por reacción de ésta con nitrito sódico en una disolución clorhídrica a 0°C durante 1 h. Una vez preparada la sal de diazonio se hizo reaccionar con el compuesto **29** disuelto en ácido clorhídrico acuoso durante 5 h a 0°C . El crudo de reacción se neutralizó con Na_2CO_3 (10%), se filtró y se purificó por columna cromatográfica de sílica gel, obteniéndose el

²³⁴ A. H. Teruel, C. Coll, A. M. Costero, D. Ferri, M. Parra, P. Gaviña, M. González-Álvarez, V. Merino, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, *Molecules*, **2018**, 23, 375.

²³⁵ S. M. Cheung, W. H. Chan, *Tetrahedron*, **2006**, 62, 8379.

compuesto **30** como un sólido rojo con un rendimiento del 60%.²³⁶ A continuación, se procedió a la reducción del grupo nitro del compuesto **30**. Para ello, se disolvió el compuesto **30** en metanol y se calentó a reflujo. Seguidamente se añadió sulfuro de sodio (Na_2S) y Na_2CO_3 disueltos en H_2O y el crudo de reacción se mantuvo a reflujo durante 2 h. A continuación, se extrajo con AcOEt , obteniéndose, el compuesto **31** como un sólido de color naranja (87%).²³⁷ Finalmente, para la obtención de la puerta molecular se hizo reaccionar el compuesto **31** con el isocianato de 3-trietoxipropilo en THF seco bajo atmosfera de argón y a reflujo durante 72 h, obteniéndose, el compuesto **32**. El compuesto **32** se obtuvo con una cierta cantidad de producto de partida pero que debido a su reactividad y a que no afectaba en la etapa siguiente se utilizó tal cual para funcionalizar las micropartículas de sílice mesoporosa de tipo MCM-41. Todos los productos fueron caracterizados por ^1H -RMN y ^{13}C -RMN.

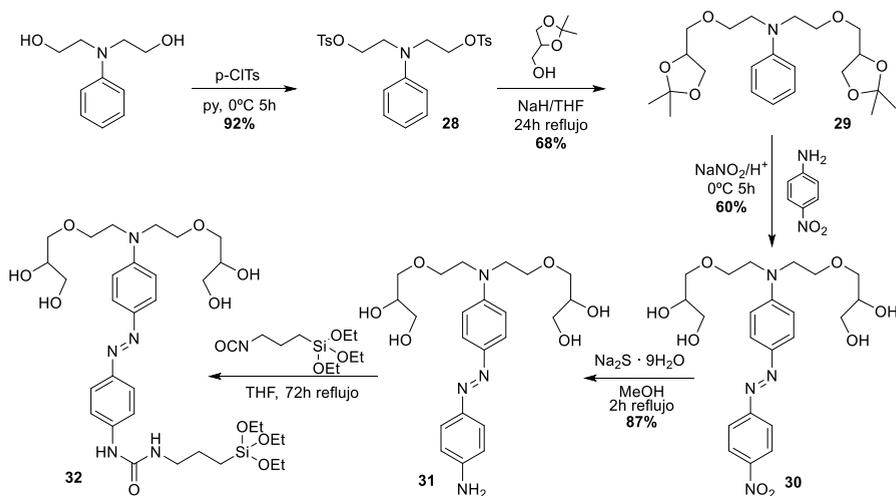


Figura 8.3. Ruta sintética para la preparación de la puerta molecular **32**.

²³⁶ Y. Wang, B. Tang, S. Zhang, *RSC Advances*, **2012**, 2, 11372.

²³⁷ A. M. Costero, P. Gaviña, G. M. Rodríguez-Muñiz, S. Gil, *Tetrahedron*, **2006**, 62, 8571.

Por otro lado, las micropartículas de sílice mesoporosa se prepararon siguiendo procedimientos descritos previamente en la literatura.²³⁸ Se utilizó el tetraetilortosilicato (TEOS) como precursor inorgánico y el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTABr) como agente director de la estructura del sólido. La posterior eliminación del tensioactivo mediante calcinación en aire a alta temperatura dio como resultado el soporte inorgánico mesoporoso de partida.

Se prepararon tres materiales mesoporosos híbridos orgánico-inorgánico finales, uno cargado con el colorante safranina O (**M-Saf**), otro con el fármaco budesonida (**M-Bud**) y finalmente un material sin carga pero funcionalizado con la puerta molecular **32** (**M-1**). Es importante mencionar que la preparación del material mesoporoso cargado con el colorante safranina O (**M-Saf**) permitió realizar los estudios iniciales de liberación, debido a que es un colorante, y que además, es fluorescente lo que permitió la realización de los estudios de liberación mediante UV-vis y fluorescencia, ya que, el empleo de técnicas espectroscópicas para seguir el procedimiento de liberación de fármacos es más difícil. Por tanto, el uso de un colorante permitió poner a punto el método, y estudiar el funcionamiento de la puerta molecular tanto, si libera, cómo, si no en condiciones reductoras.

Para la preparación de estos materiales se empleó un protocolo de dos etapas. En primer lugar, los poros del soporte inorgánico mesoporoso calcinado se cargaron con safranina O ó con budesonida simplemente agitando una suspensión de las micropartículas en una

²³⁸ S. Cabrera, J. El Haskouri, J. Guillem, J. Latorre, A. Beltrán, D. Beltrán, M. D Marcos, P. Amorós, *Solid State Sci.*, **2000**, 2, 405.

disolución de la carga en acetonitrilo seco a temperatura ambiente (en el caso de la safranina O) o a 50°C (para budesonida), en atmósfera de argón durante 24 h. En segundo lugar, la superficie externa del material previamente cargado se funcionalizó con la puerta molecular **32** por reacción del grupo trialcóxidosilano con los restos silanol de la superficie de la sílice. Mediante este procedimiento se obtuvieron los materiales cargados y cerrados finales, **M-Saf** y **M-Bud**, como sólidos rojo-rosado y amarillo, respectivamente. Para el material **M-1**, se procedió del mismo modo. Se suspendieron las micropartículas mesoporosas de tipo MCM-41 sin carga en THF y seguidamente se funcionalizó la superficie externa del material con la puerta molecular **32**, obteniéndose un sólido sin carga y con los poros cerrados de color amarillo, que posteriormente fue utilizado como control en los estudios *in vivo* con ratas Wistar (apartado 8.3).

8.2.3. Caracterización de los materiales.

El material mesoporoso MCM-41 de partida y los materiales finales **M-1**, **M-Saf** y **M-Bud** se caracterizaron mediante difracción de rayos X de polvo (PXRD), microscopía electrónica de transmisión (TEM), adsorción-desorción de N₂, análisis elemental (AE) y termogravimétrico (ATG), espectroscopía infrarroja (IR) y difracción láser (DLS). En la Figura 8.4 se muestran los difractogramas de rayos X de polvo de los sólidos: MCM-41 sin calcinar (antes de la eliminación del surfactante), MCM-41 calcinada, y los sólidos **M-1**, **M-Saf** y **M-Bud**. Los PXRD a ángulos bajos del material silíceo MCM-41 sin calcinar, curva a, muestra los cuatro picos de reflexión característicos de un material mesoporoso hexagonal, que se identifican como los picos de Bragg (100), (110), (200) y (210) (de izquierda a derecha sobre la Figura

8.4).¹⁸¹ En la curva b, MCM-41 calcinada, se observó un desplazamiento del pico de reflexión (100) en el PXRD y un ensanchamiento de los picos (110) y (200). Estos cambios están de acuerdo con la condensación de los grupos silanoles presentes en la superficie del material durante el proceso de calcinación.¹⁸² Finalmente, las curvas c, d y e, muestran el patrón de difracción de los sólidos **M-1**, **M-Saf** y **M-Bud** respectivamente. Para estos materiales, se observaron muy ligeramente las reflexiones (110) y (200). Esta reducción, es probablemente, producida por la presencia de la carga en el interior de los poros de la MCM-41 y por la funcionalización de la superficie externa del material.¹⁸³ Sin embargo, la presencia clara del pico (100) en los sólidos sugiere que en el proceso de carga con safranina O ó con budesonida, y en la posterior funcionalización de la superficie externa de las micropartículas con la puerta molecular **32**, no se modificó la estructura mesoporosa del material.

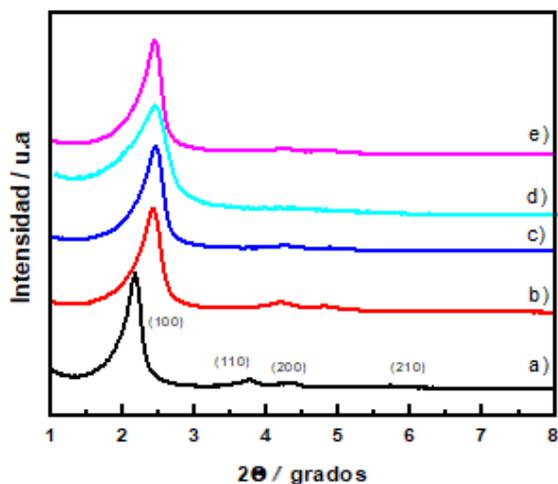


Figura 8.4. Difractograma de polvo de rayos X para a) MCM-41 sin calcinar, b) MCM-41 calcinada, c) **M-1**, d) **M-Saf** y e) **M-Bud**.

La presencia de una estructura mesoporosa en el material de partida (MCM-41 calcinada), **M-1**, **M-Saf** y **M-Bud** también se confirmó por microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Figura 8.5), donde se observó claramente la presencia de surcos o tiras blancas y negras alternativas (debido a los mesoporos ordenados). Sin embargo, para los sólidos **M-Saf** y **M-Bud** se detectó un grado de orden inferior en comparación con la sílice de partida, de acuerdo con los datos de PXRD. Se observa también que las partículas tienen formas irregulares, con un cierto grado de agregación que conduce a granos de escala micrométrica. Los tamaños promedio de grano, determinados mediante difracción láser (DLS) fueron aproximadamente de 3,2 y 7,2 μm para los sólidos **M-Saf** y **M-Bud** respectivamente (ver Figura 8.18, Parte experimental).

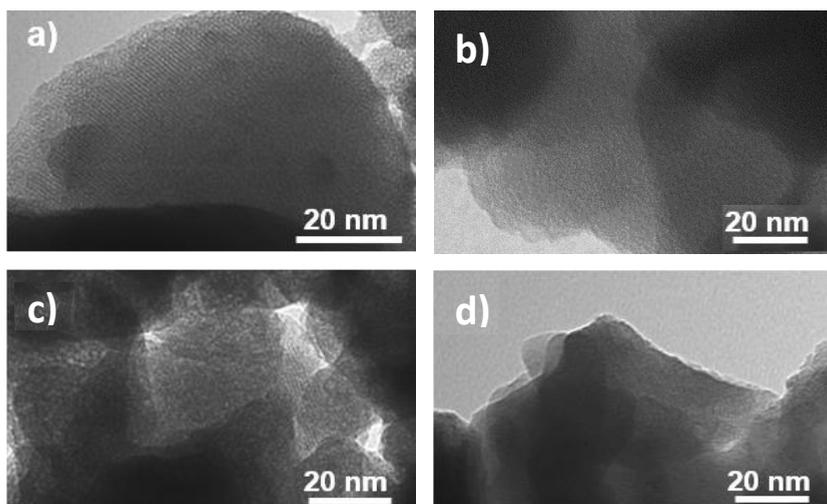


Figura 8.5. Imágenes TEM de a) MCM-41 calcinada, b) **M-1**, c) **M-Saf** y d) **M-Bud**.

Otra de las técnicas utilizadas para la caracterización y seguimiento de los procesos de cargado-funcionalización de los sólidos **M-Saf** y **M-Bud**, es la espectroscopia infrarroja (IR) (ver Figura 8.19,

Parte Experimental). El IR correspondiente al material MCM-41 calcinado muestra un espectro infrarrojo en el cual se pueden observar las bandas típicas de la matriz de sílice centradas a 1250, 1080 y 800 cm^{-1} , mientras que para los materiales **M-Saf** y **M-Bud** se pueden apreciar unas nuevas bandas centradas aproximadamente a 1600 cm^{-1} y que corresponden a la vibración del carbonilo de la urea de la puerta molecular **32**.

Con el objetivo de conocer el tamaño y volumen de poro de los materiales sintetizados se realizaron estudios en colaboración con el grupo de investigación del Prof. Pedro Amorós de las isothermas de adsorción-desorción de N_2 para las micropartículas calcinadas y para los sólidos **M-1**, **M-Saf** y **M-Bud** tal y como se muestran en la Figura 8.6. La curva a) corresponde a MCM-41 calcinada y mostró una curva típica para estos materiales, con un paso de adsorción a un valor de P/P_0 entre 0,1 y 0,3, característico de los materiales mesoporosos micrométricos. El diámetro y volumen de poro se calculó mediante el método BJH.¹⁸⁴ La ausencia de un ciclo de histéresis indicó la uniformidad cilíndrica de los mesoporos. El área superficial específica se calculó utilizando el modelo BET (Tabla 8.1).¹⁸⁵ Se observó que para los sólidos **M-1**, **M-Saf** y **M-Bud**, las isothermas de adsorción-desorción de N_2 presentaban las características típicas de materiales mesoporosos con los mesoporos parcialmente llenos (Figura 8.6, curvas b, c y d). Se determinó un volumen adsorbido de N_2 y un área superficial menor en comparación con la MCM-41 de partida (Figura 8.6, curva a). Esta reducción en la superficie BET puede explicarse por la presencia de carga en el interior de los poros de **M-Saf** y **M-Bud** y por la funcionalización en la superficie externa con la puerta molecular **32** en los tres materiales (**M-1**, **M-Saf** y **M-Bud**).

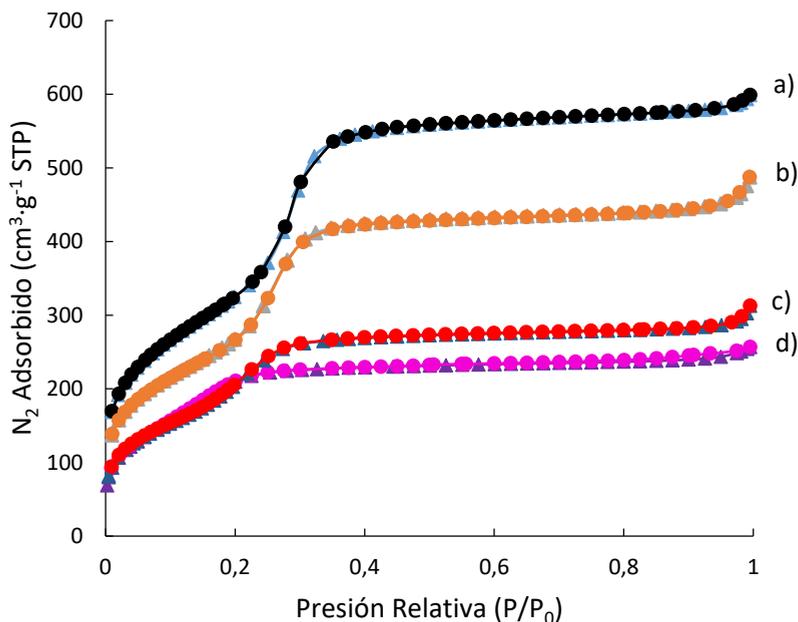


Figura 8.6. Isotermas de adsorción-desorción de N₂ a) MCM-41 calcinada, b) M-1, c) M-Saf y d) M-Bud.

Tabla 8.1. Superficie específica BET, volumen de poro y tamaño de poros calculados a partir de las isotermas de adsorción-desorción de N₂ para los materiales seleccionados.

	S_{BET} [m ² g ⁻¹]	BJH poro ^{a,b} [nm]	Volumen de poro total ^a [cm ³ g ⁻¹]
MCM-41	1193,4	2,56	0,99
M-1	930,9	2,55	0,74
M-Saf	820,4	2,47	0,52
M-Bud	761,2	2,53	0,54

a Volumen total de poro según el modelo BJH.

b Tamaño de poro estimado utilizando el modelo BJH aplicado en rampa de adsorción de la isoterma, para $P/P_0 < 0,6$, que puede asociarse a los mesoporos generados por el surfactante.

Por otro lado, el contenido de materia orgánica se determinó mediante AE y TGA (ver Tabla 8.3 y Figura 8.17, Parte experimental).

A partir de los datos obtenidos en el termograma, se calculó que el peso del residuo de sílice del material era del 80% para **M-1**, del 65% para **M-Saf** y del 67% para **M-Bud**. Con este valor y, mediante las ecuaciones descritas anteriormente, ecuaciones 7.1 y 7.2 se calculó la cantidad de materia orgánica presente en los materiales (Tabla 8.2).

Tabla 8.2. Cantidad orgánica total y cantidad de carga (en μg / mg de sólido) para las micropartículas **M-Saf** y **M-Bud**.

	Contenido orgánico ($\mu\text{g}/\text{mg}$ material)	Carga ($\mu\text{g}/\text{mg}$ material)
M-1	165	-
M-Saf	260	65
M-Bud	260	95

8.2.4. Estudios de liberación del colorante.

Los estudios de liberación controlada de la carga de los nuevos materiales preparados se realizaron midiendo la liberación del colorante safranina O cargado en el interior de los mesoporos del sólido **M-Saf**. Se eligió este colorante por su alta absortividad molar, solubilidad y estabilidad en agua en un amplio intervalo de pH. La liberación de la carga de **M-Saf** se estudió a diferentes pH, simulando de este modo, los valores de pH de los jugos gástricos (Tampón clorhídrico, pH 1,2), transición del estómago al intestino (Tampón acetato, pH 4,5) e intestino (Tampón fosfato, pH 6,8). Además, la liberación del material **M-Saf** se estudió en presencia de ditionito sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), el cual es conocido por ser capaz de reducir el enlace azo a aminas de manera similar a la producida por las enzimas

azoreductasas presentes en el colon.²³⁹ De este modo, nos permitió comprobar que la ruptura del grupo azo podía producir la liberación de la carga del material **M-Saf** en estudios *in vitro* preliminares. De esta manera, se estudió la ruptura del grupo azo, y la consiguiente liberación del colorante se monitorizó por espectroscopia UV-vis ($\lambda_{\text{max}}=520$ nm, $\lambda_{\text{em}}=550$ nm). Además, se empleó la Ley de Lambert-Beer ($\epsilon_{\text{safraninaO}} = 30675$ L mol⁻¹ cm⁻¹) para calcular cantidad de colorante que se liberó a la disolución.

El experimento típico consistió en suspender el sólido **M-Saf** (5 mg) en agua (17 mL) a diferentes pH (1,2, 4,5 y 6,8) en ausencia o en presencia de ditionito sódico (3 mg). Se tomaron alícuotas a tiempos programados. Las alícuotas se centrifugaron para eliminar las micropartículas suspendidas en la disolución y se registró la absorbancia de la safranina O liberada del interior de los poros de **M-Saf** (Figura 8.7). Como se puede observar, en ausencia del agente reductor, a pH neutro (6,8) y a pH moderadamente ácido (4,5), se observó una liberación despreciable de safranina O (3,7 y 6,3 μg safranina O/ mg de sólido a pH 6,8 y 4,5 respectivamente después de 24 h). Sin embargo, cuando las micropartículas **M-Saf** se suspendieron a pH 1,2, se encontró una liberación moderada de safranina O (17 μg safranina O/mg de sólido después de 24 h) en ausencia del agente reductor. Esta liberación se puede atribuir a una hidrólisis parcial de los enlaces de la urea en la puerta molecular **32** en el entorno fuertemente ácido en el que se llevó a cabo la liberación. Por otro lado, en presencia de Na₂S₂O₄ se observó un marcado incremento de la cantidad de safranina O liberada a los tres pH ensayados (Figura 8.7).

²³⁹ a) E. J. Weber, R. L. Adams, *Environ. Sci. Technol.*, **1995**, 29, 1163. b) Y. Y. Yang, M. Grammel, A. S. Raghavan, G. Charron, H. C. Hang, *Chem. Biol.* **2010**, 17, 1212.

Se observó casi la misma liberación de safranina O a pH 6,8 y 4,5 en presencia del agente reductor (aproximadamente 32 μg safranina O / mg de sólido después de 24 h). La mayor liberación de colorante se observó a pH 1,2 en presencia de ditionito sódico (38 μg safranina O / mg de sólido, que corresponde aproximadamente al 60% de la cantidad total de colorante en el material, después de 24 h). Esta liberación, se puede explicar con la ruptura del enlace azo en la puerta molecular **32** por el ditionito sódico que dio como resultado la apertura de los poros y la liberación de la safranina O al medio. Esta ruptura del enlace azo, también se confirmó mediante estudios de resonancia magnética nuclear (Figura 8.8). Se observó que 2 min después de la adición del agente reductor al compuesto **31**, precursor de la puerta molecular, no había señales correspondientes al producto de partida. Sin embargo, se observó la aparición de nuevas señales correspondientes a tres nuevos productos, dos procedentes de la total reducción del grupo azo, y que dieron lugar a las aminas correspondientes (compuestos **A** y **B**, Figura 8.8) y un tercer compuesto procedente de la reducción parcial del enlace azo (compuesto **C**, Figura 8.8).

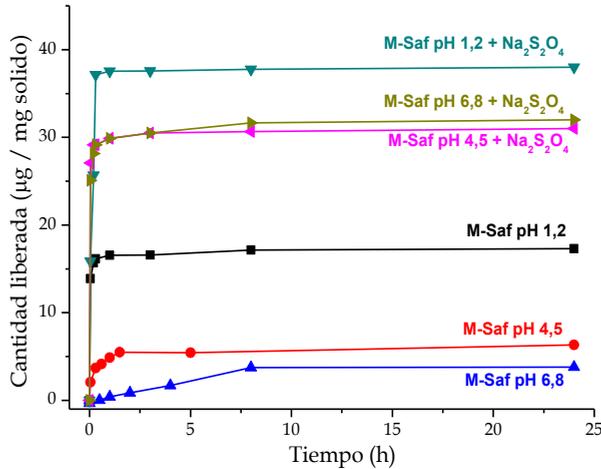


Figura 8.7. Perfiles de liberación de safranina O con el tiempo para el sólido **M-Saf** en agua a diferentes valores de pH en ausencia y en presencia de ditionito sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$).

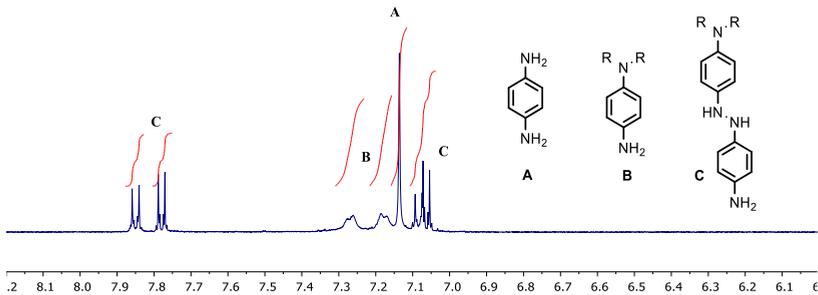


Figura 8.8. Espectro ^1H -RMN (D_2O , 300 MHz) del compuesto **31** después de la adición de ditionito sódico.

Finalmente, la liberación de la carga del sólido cargado con el fármaco budesonida (**M-Bud**) también se estudió a pH neutro en ausencia y en presencia de ditionito sódico. La liberación de budesonida fue estudiada por espectroscopía UV-vis monitorizando la banda de adsorción del fármaco centrada a 241 nm.²⁴⁰ Para ello, se

²⁴⁰ S. R. Naikwade, A. N. Bajaj, P. Gurav, M. M. Gatne, P. S. Soni, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **2009**, *10*, 993.

suspendió el material **M-Bud** (5 mg) en agua desionizada (20 mL) en ausencia o en presencia de ditionito sódico (3 mg). Se tomaron alícuotas a tiempos programados. Las alícuotas se centrifugaron para eliminar las micropartículas suspendidas en la disolución y se registró la absorbancia de la budesonida liberada del interior de los poros de **M-Bud**. Como se puede observar en la Figura 8.9, en ausencia de ditionito sódico aparece una banda de absorción centrada a 463 nm que se atribuyó a la banda de absorción de la puerta molecular. La intensidad de esta banda se mantuvo sin cambios con el tiempo, lo que indicó que el material **M-Bud** permanece cerrado bloqueando la salida del fármaco budesonida. Sin embargo, en presencia de ditionito sódico (1 mM), apareció una nueva banda de absorción centrada a 241 nm correspondiente a la budesonida (Figura 8.9). La máxima intensidad de esta banda (241 nm) se alcanzó al cabo de 4 h de la adición del agente reductor.

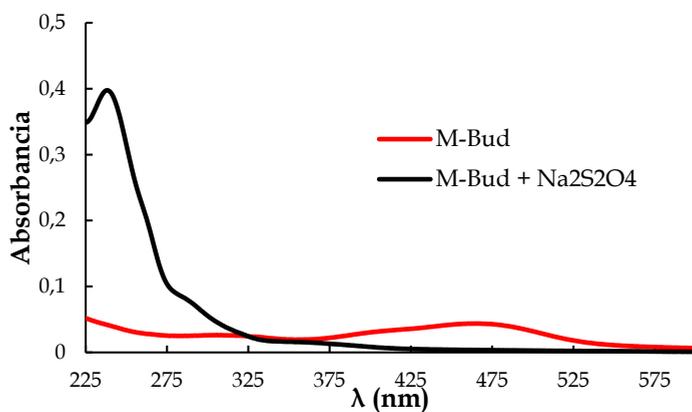


Figura 8.9. Espectro UV-vis de **M-Bud** en ausencia (línea roja) y en presencia de ditionito sódico (línea negra) después de 4 h.

Para determinar la cantidad de budesonida liberada del sólido **M-Bud**, se llevaron a cabo estudios mediante HPLC. Para ello, previamente se realizó una recta de calibración preparando

disoluciones estándar de budesonida a distintas concentraciones (100, 50, 25, 10, 5 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en una mezcla de MeOH/Agua (50:50, v/v) como disolvente (ver Parte Experimental). El experimento típico de liberación consistió en suspender las micropartículas de **M-Bud** (5mg) en agua desionizada a pH neutro (20 mL). Seguidamente, se adicionó un exceso de ditionito sódico (3 mg). Después de agitar a temperatura ambiente, se tomaron alícuotas a tiempos programados. Las alícuotas se centrifugaron para eliminar el sólido suspendido en la disolución, se filtraron y se analizaron por HPLC.²⁴¹ Estos estudios mostraron una liberación de 21,1 μg de budesonida / mg de sólido después de 5 min alcanzándose una liberación máxima de 31,2 μg de budesonida / mg de sólido al cabo de 4 h, lo que corresponde al 33% de la carga total del material **M-Bud**.

8.3. MICROPARTÍCULAS DE SÍLICE MESOPOROSA FUNCIONALIZADAS CON UN AZODERIVADO PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE COLORANTES/ FÁRMACOS. ESTUDIOS DE LIBERACIÓN *in vivo*.²⁴²

Una vez sintetizados los materiales y ensayada su liberación *in vitro* se decidió estudiar su actividad *in vivo* con ratas Wistar. Antes de eso, se decidió hacer algunos estudios con ratones con el fin de evaluar la liberación del colorante a lo largo del tracto gastrointestinal. Para ello, se llevaron a cabo estudios preliminares *in vivo* con ratones (C57BL/6) con el sólido **M-Saf**. Estos estudios fueron llevados a cabo

²⁴¹ S. R. Naikwade, A. N. Bajaj, *Sci Pharm.* **2009**, *77*, 419.

²⁴² D. Ferri, P. Gaviña, M. Parra, A. M. Costero, V. Merino, A. H. Teruel, F. Sancenón, R. Martínez-Máñez. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **submitted**.

bajo la supervisión de la Prof. Virginia Merino del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universitat de València. Para ello se suspendieron las micropartículas de **M-Saf** (10 mg) en agua (200 μ L) y posteriormente se administraron a los ratones mediante el empleo de una sonda oral. Al cabo de 4 h de la administración de **M-Saf**, se sacrificó al ratón, se extrajo el sistema digestivo y se diseccionó para determinar la presencia de micropartículas a lo largo de él. Como primera conclusión, se observó que las micropartículas de **M-Saf** habían pasado a través del tracto gastrointestinal sin causar ninguna úlcera. Por otro lado, se encontraron cantidades apreciables de micropartículas en estómago y en el intestino delgado. Se aislaron dichas micropartículas mediante disección de los órganos y se suspendieron en una disolución acuosa para comprobar si estaban cerradas, es decir, si conservaban todavía la carga en el interior de los poros. Se observó que la suspensión acuosa tanto, de las partículas procedentes del estómago como, del intestino delgado antes de exponerlas al agente reductor, presentaban una despreciable emisión de fluorescencia de safranina O a 550 nm (cuando se excitó a 520 nm) (Figura 8.10). Por otro lado, cuando las suspensiones acuosas de estos sólidos se trataron con el agente reductor, se observó una emisión notable a 550 nm (Figura 8.10). Los resultados obtenidos sugieren que la puerta molecular **32** unida en la superficie externa del sólido conserva su integridad química al pasar a través del tracto gastrointestinal durante, al menos, 4 h. Se repitió el mismo experimento, pero esta vez la localización y la integridad de las micropartículas se estudiaron después de 24 h de la administración oral de **M-Saf**. Al cabo de las 24 h, se sacrificó al ratón y se diseccionó el sistema digestivo como en el caso anterior. En este caso, se observaron cantidades inapreciables de micropartículas en estómago y en intestino

delgado. Además, las micropartículas encontradas en heces no contenían safranina, lo que significó que presumiblemente se había liberado en la última parte de tracto gastrointestinal, es decir, en el colon (Figura 8.11).

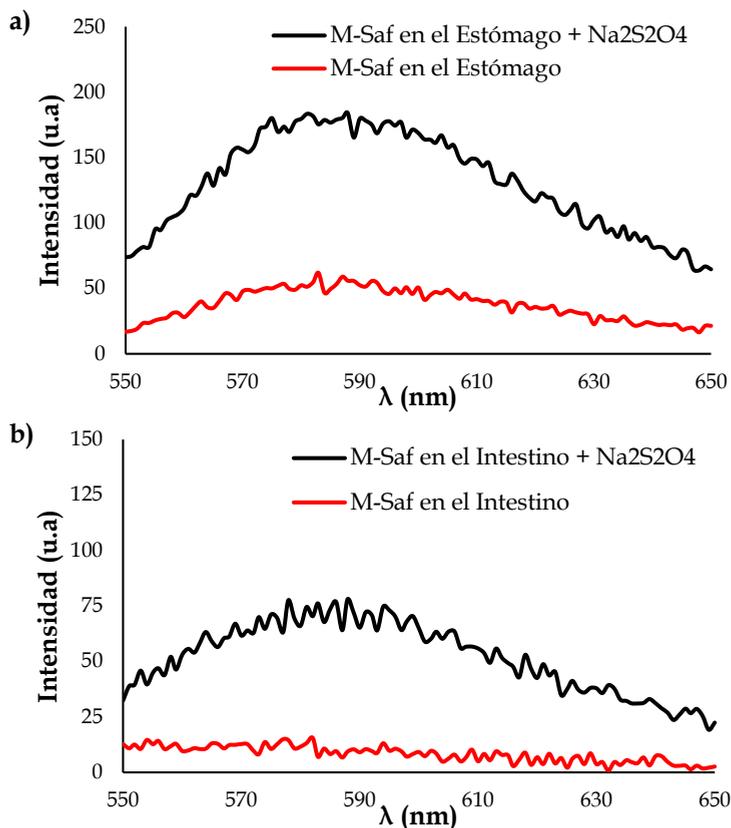


Figura 8.10. Espectro de emisión de la safranina O ($\lambda_{\text{ex}} = 520$ nm) a partir de las suspensiones acuosas (1,5 mL) de las micropartículas de M-Saf aisladas en el estómago a) y en el intestino b) al cabo de 4 h de la administración oral en ausencia (línea roja) y en presencia de ditionito sódico (línea negra).

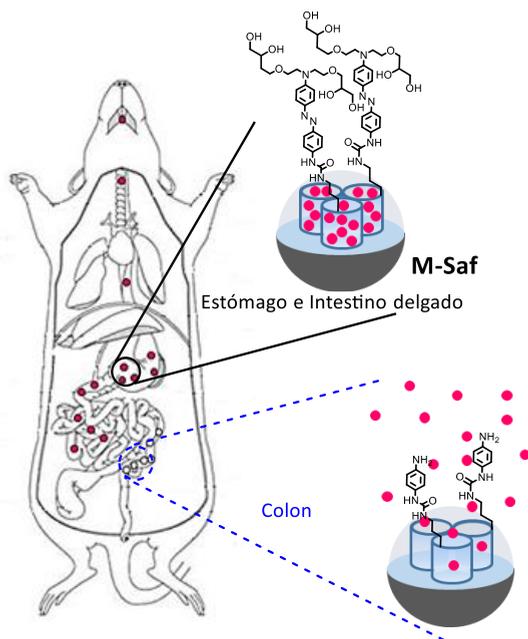


Figura 8.11. Representación esquemática de la localización de las micropartículas **M-Saf** en el estómago e intestino delgado las cuales permanecen cerradas y el material abierto en el colon, donde se produce la liberación de safranina O por acción de las enzimas azoreductasas.

Una vez se obtuvieron los prometedores resultados previos de liberación con los ratones y para comprobar la eficacia de **M-Bud** se estudió, mediante un modelo *in vivo* en ratas Wistar con colitis ulcerosa inducida por el ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS). El material **M-Bud** se comparó con las cápsulas comerciales de liberación controlada de budesonida (Entocord®, amablemente suministrado por *Tillots Pharma Spain*) como formulación de referencia. Así como, frente a micropartículas mesoporosas de sílice funcionalizadas vacías, es decir, sin carga (sólido **M-1**) y frente a suero salino al 0,9% (p/v) como controles positivos. La eficacia de estas cuatro formulaciones se determinó por la relación de peso colon / peso del animal, actividad clínica y por evaluación histológica.

8.3.1. Inducción de la inflamación colónica en ratas Wistar y protocolo seguido para el estudio.

Los estudios que se describen a continuación se adhieren a los principios de cuidado de animales de laboratorio (*Principles of Laboratory Animal Care*) que fueron aprobados por el comité de ética institucional de la Conselleria de Agricultura, Medio Ambiente, Desarrollo Rural y Cambio Climático (Generalitat Valenciana), según 2016/VSC/PEA/00158.

Estos estudios se llevaron a cabo bajo la supervisión de la Prof. Virginia Merino del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universitat de València. Se utilizaron ratas Wistar macho de entre 12 y 16 semanas y con un peso de 300-350 g. Los animales se mantuvieron en una habitación limpia con aire acondicionado a $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, y $55 \pm 5\%$ de humedad, con ciclos de luz /oscuridad de 12 h y con libre acceso a comida y agua durante todo el tiempo que duró el estudio. Para la inducción de la inflamación crónica en el colon de la rata, se seleccionó el método descrito por Morris, siguiendo alguna variación. Este método, consiste en la instalación intraluminal de una disolución hidroalcohólica con TNBS provocando, de este modo, ulceración e inflamación colónica.²⁴³ Se utilizaron un total de 29 ratas divididas al azar en 4 grupos según el tratamiento que iban a recibir. Al grupo 1, compuesto por 5 animales, se le administraría suero fisiológico (grupo control), al grupo 2, integradas por 7 animales, recibirían las micropartículas **M-1**, al grupo 3, compuesto por 8 ratas, se le administraría el sólido cargado con budesonida **M-Bud**, y

²⁴³ G. P. Morris, P. L. Beck, M. S. Herridge, W. T. Depew, M. Y. Szewczuk, J. L. Wallace. *Gastroenterology*, **1989**, 96, 795.

finalmente, las del grupo 4, formado por 8 ratas, recibirían una suspensión del granulado comercial Entocord®.

Antes de proceder a inocular la enfermedad las ratas fueron anestesiadas con isoflurano (1-cloro-2,2,2-trifluoroetil difluorometil éter) y luego, se les introdujo una cánula de goma graduada en el colon, de manera que, la punta estaba a 8 cm por proximal al ano. A continuación, se introdujeron 0,6 mL de TNBS en etanol al 50% (la dosis fue de 81 mg/Kg de peso corporal) en el lumen del colon a través de la cánula. Seguidamente a la introducción del hapteno, los animales se mantuvieron boca abajo durante unos minutos (2-3 min) con el fin de evitar la filtración del instalado intracolónico. Después de la inducción de la colitis con el TNBS, las ratas fueron monitorizadas diariamente para poder observar que la enfermedad fue efectivamente inducida. A partir del tercer día se les comenzó administrarle el tratamiento a cada grupo de ratas, es decir, al grupo 1 se les administró suero fisiológico, el grupo 2 recibieron las micropartículas **M-1**, al grupo 3 se le administró el sólido cargado con budesonida **M-Bud**, y finalmente, las del grupo 4 recibieron una suspensión del fármaco comercial Entocord®. La dosis de fármaco (budesonida encapsulada en **M-Bud**) se calculó a partir de la dosis de Entocord® (9 mg/día) empleada en humanos (70 Kg) utilizando un programa alométrico de escalado,²⁴⁴ dando como resultado una dosis de 0,15 mg **M-Bud** /día. Esta dosis se suspendió en agua purificada (1 mL) y se administró por sonda oral una vez al día durante el período inflamatorio más intenso (días 3, 4 y 5 después de la administración de TNBS) (Figura 8.12). Una dosis equivalente en masa de micropartículas **M-1** se utilizó como control en

²⁴⁴ A. B. Nair, S. Jacob, J. *Basic Clin. Pharm.*, **2016**, 7, 27.

el grupo 2. El desarrollo de la enfermedad se controló diariamente durante 10 días. Finalmente, las ratas se sacrificaron al décimo día después de la administración del TNBS con una sobredosis de anestesia (dolethal®). El desarrollo de la inflamación se evaluó mediante a la relación de peso del colon / peso de la rata, por la puntuación de la actividad clínica y por los cambios histológicos.

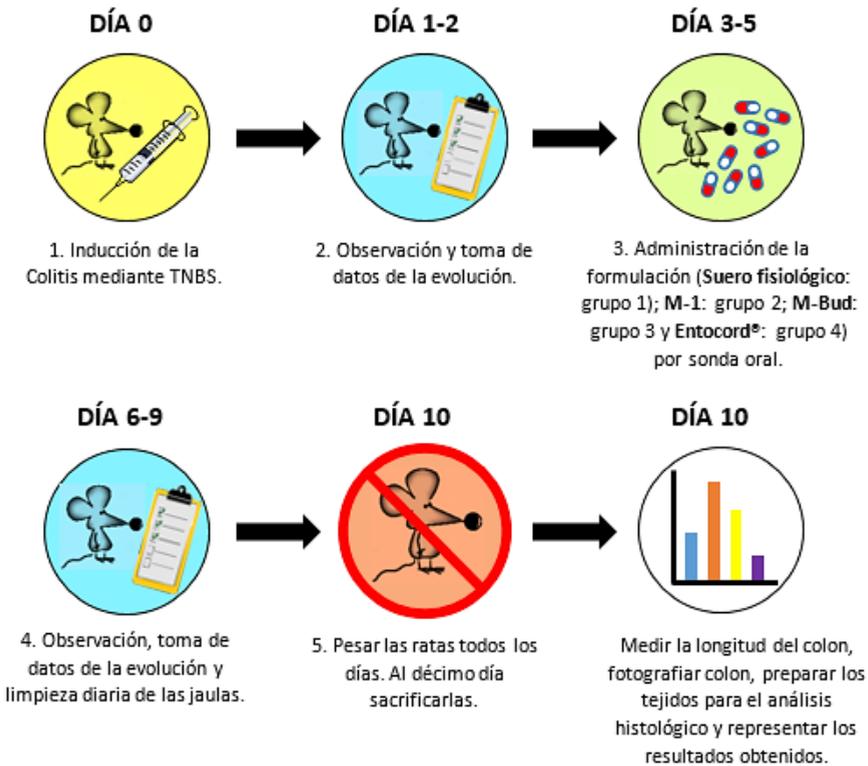


Figura 8.12. Protocolo del tratamiento seguido en este estudio.

8.3.2. Evaluación de la eficacia de las micropartículas M-Bud en el tratamiento de la colitis inducida por TNBS.

Para evaluar la eficacia del material **M-Bud** en el tratamiento de la colitis inducida por TNBS se compararon los resultados con los

obtenidos empleando las micropartículas funcionalizadas vacías (**M-1**) y suero fisiológico al 0,9% (p/v) como controles positivos a la enfermedad y frente a una suspensión de las cápsulas de liberación controlada Entocord® como tratamiento actual para esta enfermedad.

Después de la inducción de la colitis con el TNBS, las ratas fueron monitorizadas diariamente para poder observar que la enfermedad fue efectivamente inducida. A partir del tercer día se les comenzó administrar el tratamiento a cada grupo de animales. Las ratas tratadas con **suero fisiológico** (grupo 1) y con **M-1** (grupo 2) continuaron con diarrea y pérdida de peso después del tratamiento. Además, algunas de ellas sufrieron hemorragias rectales. Al décimo día, cuando los animales fueron sacrificados, se observó que el intestino era grueso y rígido y que presentaba zonas necróticas (Figura 8.13 b y c). Además, se observó que presentaban una grave ulceración. Es decir, la enfermedad seguía su evolución normal. Sin embargo, los animales tratados con **M-Bud** (grupo 3) y **Entocord®** (grupo 4) mostraron resultados positivos. En muchos casos se observó que las heces eran pastosas y semi-formadas, pero no se adherían al ano. Cuando se sacrificaron al décimo día después de la inducción de la colitis, muchos animales del grupo 3 y 4 no mostraron úlceras en el intestino, trombosis con proliferación endotelial, hiperplasia linfoide o necrosis con signos de demarcación, como en los grupos 1 y 2; las áreas lesionadas por la enfermedad eran muy reducidas, incluso en algunos casos parecían casi sanas (Figuras 8.13 d y e). Además, en muchos casos se observó una estructura intestinal normal.

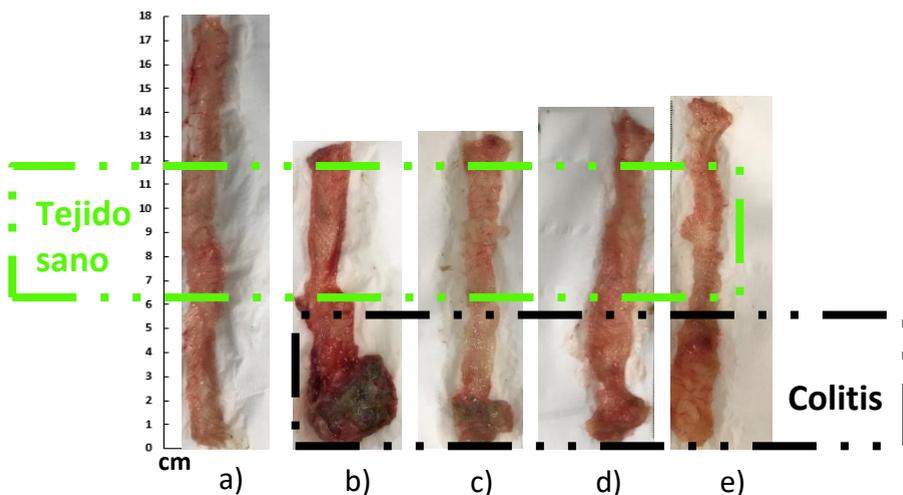


Figura 8.13. Fotografías del colon de una rata sana y el colon de las ratas sacrificadas después de la inducción con TNBS. a) Una rata saludable (Sin tratamiento con TNBS, control), b) Rata tratada con suero fisiológico (grupo 1), c) Rata tratada con una suspensión de micropartículas M-1 (grupo 2), d) Rata tratada con M-Bud (grupo 3) y e) Rata tratada con Entocord® (grupo 4).

Los datos para el índice de edema colónico, obtenidos por la pérdida de peso (relación peso colon / peso rata), la consistencia de las heces y el sangrado rectal, se muestran en las Figuras 8.14 y 8.15. Se consideró que este parámetro era menos relevante para la evaluación de la recuperación de la enfermedad que los otros dos parámetros evaluados, ya que hay muchos factores que pueden contribuir a enmascarar los resultados. Por ejemplo, para la pérdida de peso, el transcurso temporal de la pérdida de peso se consideró por separado de los otros parámetros, y se observó que estos datos no proporcionaron una información relevante. Como la colitis inducida no fue muy severa, la reducción de peso producida en los primeros tres días después de la instilación de TNBS no fue muy alta. Además, en el caso de que un animal muriera antes del día 10, se observó que se debía a una obstrucción intestinal. La posterior exploración del animal demostró que la cavidad intestinal estaba llena de heces. Teniendo en

cuenta todo esto, podemos decir que no se observó una diferencia estadística de peso entre los grupos. Sin embargo, la puntuación clínica de los grupos 3 y 4 sí fue significativamente más baja que la de las ratas de los grupos 1 y 2 (Entocord® ($p = 0,019$), **M-Bud** ($p = 0,045$)).

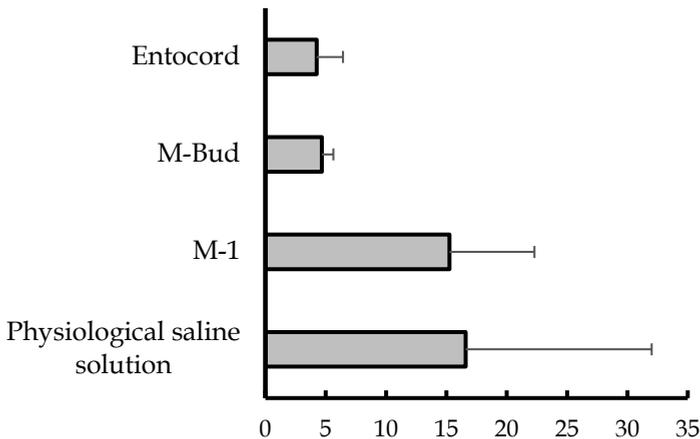


Figura 8.14. Relación peso de colon / peso rata para las ratas con colitis después de la inducción con TNBS tratadas con suero fisiológico (grupo 1), M-1 (grupo 2), M-Bud (grupo 3) y Entocord® (grupo 4). Cada barra es un valor promedio \pm S.D de 7 animales.

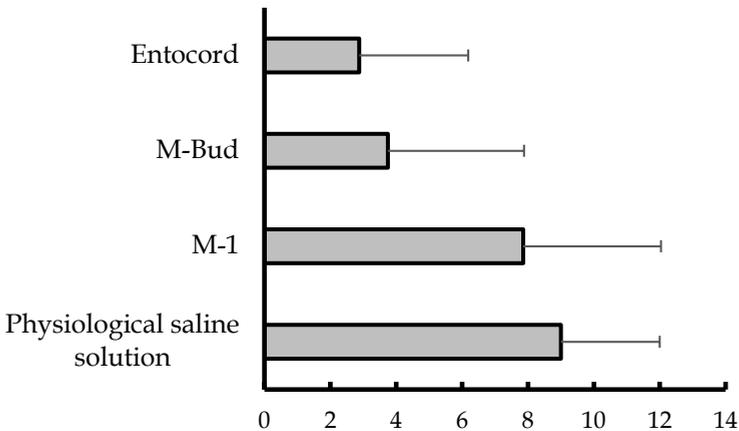


Figura 8.15. Actividad clínica para las ratas con colitis después de la inducción con TNBS tratadas con suero fisiológico (grupo 1), M-1 (grupo 2), M-Bud (grupo 3) y Entocord® (grupo 4). Cada barra es un valor promedio \pm S.D de 7 animales.

Por otro lado, los resultados más relevantes se obtuvieron mediante el examen histológico del tejido colónico. La examinación histológica para los animales pertenecientes a los grupos 1 y 2 mostraron cambios necróticos en la mucosa colónica, una inflamación transmural intensa, infiltraciones polimorfonucleares, proliferaciones en los vasos sanguíneos y signos de formación de tejido granular (Figura 8.16 b y c). En comparación con el tejido de una rata sana (no trata con TNBS) la cual presenta enterocitos, células caliciformes, tejido conjuntivo (lámina propia), mucosa muscularis y submucosa normal, además de la muscular externa como se puede ver en la Figura 8.16 a. Por el contrario, las ratas tratadas con **M-Bud** (grupo 3) y **Entocord®** (grupo 4) mostraron un tejido sustancialmente regenerativo y una estructura de la mucosa normal (Figura 8.16 d y e, respectivamente) solamente, se observó una ligera diferencia en el grosor del intestino.

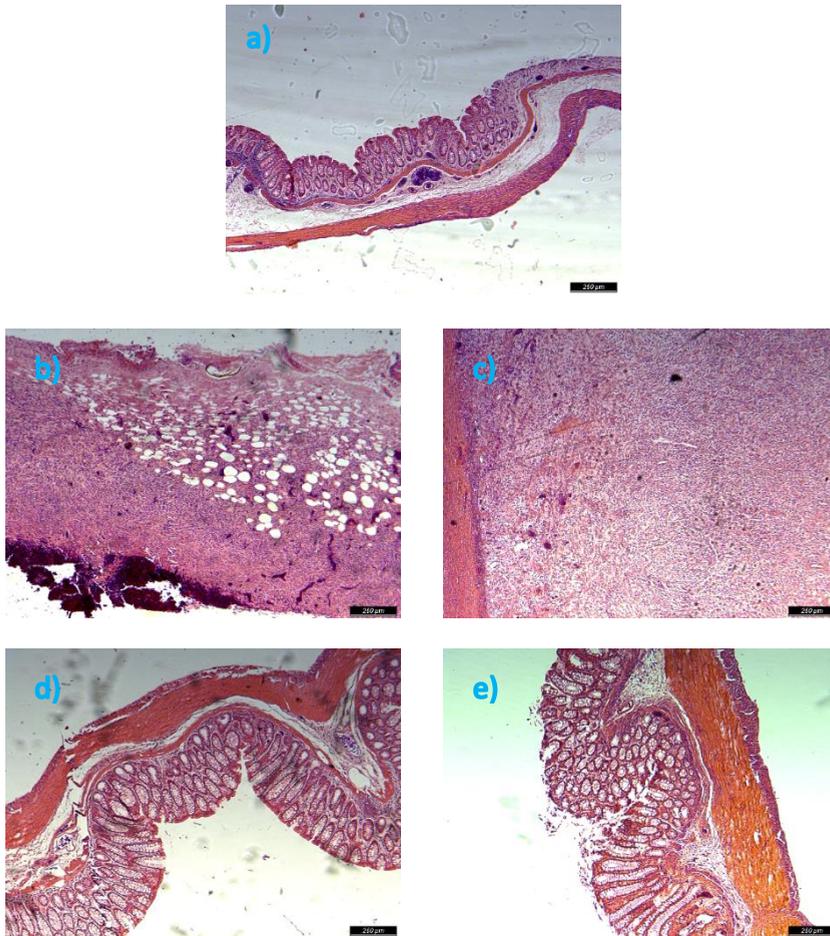


Figura 8.16. Fotografías del colon de las ratas después de la inducción de la colitis con TNBS y sacrificadas al décimo día: a) Rata sana (control) mostró una estructura de la mucosa normal; b) Rata tratada con suero fisiológico (grupo 1), mostró una completa destrucción de la estructura de la mucosa, ulceración y necrosis; c) Ratas tratadas con micropartículas M-1 (grupo 2), mostró cambios en la estructura de la mucosa así como infiltraciones polimorfonucleares; d) Ratas tratadas con M-Bud (grupo 3), mostró la regeneración de la estructura normal de la mucosa; e) Ratas tratadas con Entocord® (grupo 4), mostró también una estructura normal de la mucosa.

Aunque las puntuaciones clínicas de los dos grupos de tratamiento (grupo 3 y 4) no alcanzan el valor de cero después del tratamiento, la observación macroscópica de los tejidos, la relación peso colon/peso rata y la observación microscópica de los tejidos

confirmaron que la budesonida encapsulada en micropartículas de tipo MCM-41 y funcionalizadas con azoderivado proporcionaba una recuperación importante del daño causado por la inducción de la colitis mediante TNBS. Concretamente, la puntuación histológica (Figura 8.16) fue ligeramente inferior para **M-Bud** (0,37) que para Entocord® (0,50). Sin embargo, mientras que el 75% de las ratas mostraron una recuperación casi total con el tratamiento con Entocord®, el porcentaje aumentó hasta el 87% en el caso de los animales tratados con **M-Bud**. Por tanto, los resultados obtenidos mostraron que **M-Bud** es tan efectivo como Entocord® cuando se usan dosis similares. Además, la administración específica de budesonida en colon a partir de micropartículas de **M-Bud** podría minimizar los efectos adversos que pueden aparecer en el tratamiento con Entocord®, como problemas menstruales, erupciones o retraso en el crecimiento, entre otros, debido a su absorción en el íleon.

8.4. CONCLUSIONES.

En resumen, se han preparado y caracterizado micropartículas de sílice mesoporosa cargadas con el colorante safranina O (**M-Saf**), con el fármaco budesonida (**M-Bud**) o sin carga (**M-1**). La puerta molecular que se utilizó es un azoderivado voluminoso capaz de romperse en condiciones reductoras (como las que se presentan en la mucosa del colon). Se realizaron estudios de liberación a distintos pH con el sólido **M-Saf** utilizando la espectroscopía UV-vis para determinar la cantidad de colorante liberada. A pH neutro (6,8) o moderadamente ácido (4,5) se observó que se producía una escasa liberación de safranina O en

ausencia del agente reductor. Por otro lado, a pH ácido (1,2) se observó una moderada liberación de colorante, en ausencia de agente reductor, debido a la hidrólisis del grupo urea que unía la puerta molecular **29** con la superficie externa del material cargado. Sin embargo, en presencia de ditionito sódico (como mímico de la enzima azoreductasa), se observó una marcada liberación de safranina O. Esta liberación se atribuyó a la ruptura del enlace azo, lo que condujo a la apertura de los poros y a la posterior entrega del colorante. La encapsulación y liberación controlada del fármaco budesonida, utilizado en el tratamiento de la colitis ulcerosa, también se demostró con el sólido **M-Bud** en presencia de ditionito sódico mediante estudios de UV-vis y HPLC. Por otro lado, los estudios preliminares *in vivo* realizados con ratones indicaron que **M-Saf** conservó su integridad química en el estómago y en el intestino delgado y que era capaz de liberar la carga en la última parte de la mucosa colónica. Por lo tanto, se ha sintetizado un material micrométrico basado en sílice mesoporosa y funcionalizado con una puerta molecular capaz de abrirse selectivamente en el ambiente reductor de la microflora intestinal (azoreductasas) y que, además era biocompatible.

Por otro lado, gracias a la biocompatibilidad de los sólidos sintetizados podemos decir que se ha demostrado mediante estudios *in vivo* en ratas con colitis inducida por TNBS la eficacia de un nuevo material de administración de fármacos dirigidos al colon (**M-Bud**) para el tratamiento oral de la EII. Los resultados de curación de las suspensiones de **M-Bud** se compararon con los obtenidos con el medicamento comercial Entocord® y con micropartículas cerradas (funcionalizadas) y sin carga (**M-1**). Los resultados obtenidos utilizando el sólido **M-1** demuestran que este material en sí mismo no

tiene ningún efecto terapéutico. El análisis de la relación peso de colon/peso rata, la puntuación de actividad clínica y la evaluación histológica mostraron que el fármaco cargado en las micropartículas se libera efectivamente en el colon de las ratas, lo que lleva a resultados de curación similares a los obtenidos con Entocord®. Manteniendo la misma actividad de Entocord®, **M-Bud** podría presentar algunas ventajas. Por ejemplo, la liberación específica del fármaco en el colon podría evitar la aparición de los efectos adversos típicos que se observan con frecuencia en los tratamientos con esteroides. La budesonida ha sido elegida como una prueba de concepto de medicamento para demostrar la capacidad de las micropartículas de sílice mesoporosas cubiertas con un derivado azo voluminoso para liberar la carga en la última parte del intestino. De este modo, abrimos una infinidad de posibilidades para el desarrollo de micropartículas que podrían cargarse con otros medicamentos, específicamente requeridos para la EII, o para otras patologías localizadas en el colon, como el cáncer de colon.

8.5. PARTE EXPERIMENTAL.

8.5.1. Reactivos químicos.

Los reactivos tetraetilortosilicato (TEOS), bromuro de *n*-cetiltrimetilamonio (CTABr), hidróxido de sodio (NaOH), trietanolamina (TEA), safranina O, budesonida, ditionito sódico (Na₂S₂O₄), diclorometano, 3-(trietoxisilil(propil)) isocianato, acetonitrilo, ácido clorhídrico, 4-nitroanilina, nitrito sódico (NaNO₂), *N*-fenildietanolamina, cloruro de *p*-toluensulfonilo, piridina,

tetrahidrofurano (THF), metanol (MeOH) grado HPLC y sulfuro de sodio nonahidrato ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) se adquirieron de Sigma-Aldrich y fueron utilizados sin previa purificación por. Los disolventes n-hexano, y acetato de etilo se adquirieron de Scharlau. El carbonato de sodio (Na_2CO_3), sulfato de magnesio (MgSO_4) y cloruro de amonio (NH_4Cl) se compraron de VWR. Entocord® fue amablemente suministrado por *Tillots Pharma Spain*.

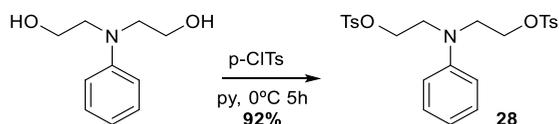
8.5.2. Técnicas generales.

Se emplearon las siguientes técnicas para la caracterización de los materiales sintetizados. Resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopía de masas, difracción de rayos X de polvo (PXRD), análisis termogravimétrico (TGA), microscopía electrónica de transmisión (TEM), isotermas adsorción-desorción de N_2 , espectroscopía UV-vis y de fluorescencia, HPLC. Los espectros de ^1H y ^{13}C -RMN se adquirieron con un espectrómetro Bruker DRX500. Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se registraron en el modo de iones positivos en un espectrómetro AB SCIEX TripleTOF™ 5600 LC / MS. Las mediciones de rayos X de polvo se registraron en un difractómetro Bruker D5005 mediante el uso de radiación $\text{CuK}\alpha$. Los estudios termogravimétricos se llevaron a cabo en un TG-DTA Pyris-Diamond utilizando una atmosfera oxidante (aire 80 mL min^{-1}) con una rampa de calentamiento de 5°C por minuto desde 393 a 1273 K y calentamiento isotérmico a esta temperatura de 30 min. Las imágenes TEM se obtuvieron con un microscopio JEM-1010 de 100kV (JEOL). La distribución del tamaño del grano se determinó utilizando un instrumento Malvern Mastersizer 2000 equipado con una unidad de dispersión de muestra de pequeño volumen. El agua fue el medio de

dispersión utilizado y cada muestra se midió por triplicado, acumulando datos de dispersión de luz durante 10 segundos (en cada medición, así como en el fondo). Con el fin de favorecer la dispersión de las partículas, las muestras se sonicaron durante 2 minutos a 15 vatios en tratamientos sucesivos hasta la estabilización de la distribución del tamaño de partícula. La adsorción-desorción de N₂ se registró con un analizador de sorción automático Micrometrics ASAP2010. Las muestras se desgasificaron a 120°C a vacío durante una noche. Las áreas superficiales específicas se calcularon a partir de los datos de adsorción en el rango de baja presión utilizando el modelo Brunauer-Ummett-Teller (BET). El tamaño de poro se determinó siguiendo el modelo BJH. Los espectros de absorción UV-vis se registraron en una cubeta de cuarzo con una longitud de paso óptico de 1 cm y se registraron con un espectrofotómetro Shimadzu UV-2101PC. Los estudios de espectroscopía fluorescente se llevaron a cabo con un espectrofotómetro fluorescente Varian Cary Eclipse. El análisis por HPLC se llevó a cabo en una columna analítica Yeknokroma® Brisa LC2 C18 (5 µm, 150 mm x 0,46 mm) conectada a un sistema HPLC (modelo Flexar Solvent Manager) (Perkin-Elmer) que consistía en una bomba LC binaria Flexar (Flexar / 291N1120202F), detector de diodos UV (Flexar / 292N1111504F) y 20 µL de bucle de inyección.

8.5.3. Síntesis de la puerta molecular.

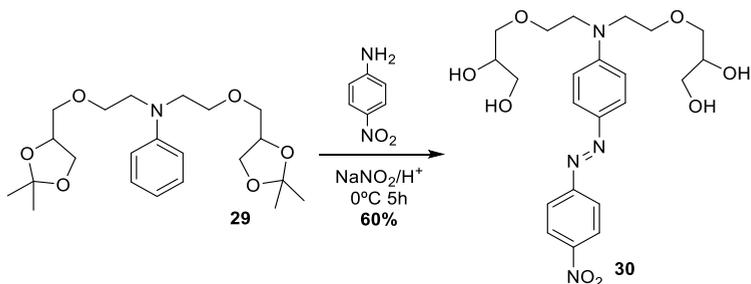
➤ Síntesis de 28.²³⁵



compensada y el crudo de reacción se agitó durante 24 h a reflujo. El crudo marrón obtenido se neutralizó con NH_4Cl 10% (30 mL) y el producto orgánico se extrajo con CH_2Cl_2 . La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con MgSO_4 , se filtró y se eliminó el disolvente en el rotavapor. El producto **29** se purificó por columna cromatográfica de sílice utilizando como eluyentes hexano/ AcOEt (8:2, v/v) dando como resultado un aceite marrón (560 mg, 68%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7,20 (dd, $J = 8,9, 7,2$ Hz, 2H), 6,75-6,62 (m, 3H), 4,29-4,21 (m, 2H), 4,03 (dd, $J = 8,2, 6,4$ Hz, 2H), 3,73-3,43 (m, 14H), 1,41 (s, 6H), 1,36 (s, 6H).

➤ **Síntesis de 30.**²³⁶



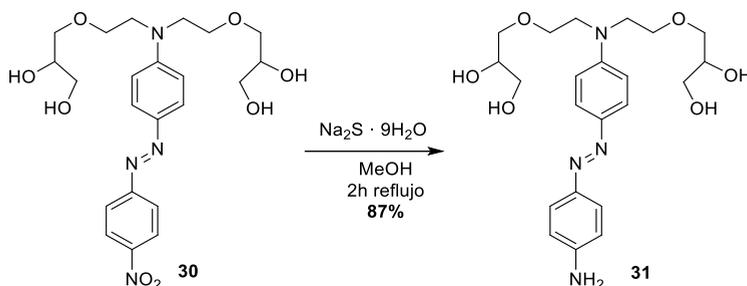
En un matraz de fondo redondo (25 mL) provisto de un imán se disolvió 4-nitroanilina (170 mg, 1,23 mmol) en una mezcla de ácido clorhídrico concentrado (310 μL) y agua (2,5 mL). La mezcla se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se adicionó rápidamente la disolución de NaNO_2 (103 mg, 1,5 mmol) en agua (700 μL) y se agitó a 0°C hasta completa disolución. A continuación, se adicionó una mezcla que contenía el compuesto **29** (500 mg, 1,23 mmol), ácido clorhídrico concentrado (200 μL) y agua (3,6 mL). La reacción se agitó a 0 - 5°C durante 5 h. El producto rojo oscuro fue neutralizado con NaCO_3 (sat),

se filtró y se lavó con agua fría. El producto **30** se purificó por columna cromatográfica de sílice utilizando como eluyentes AcOEt/MeOH (9:1, v/v) obteniéndose un sólido rojo (353 mg, 60%).

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, MeOD- d_4) δ (ppm) 8,35 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H), 7,94 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H), 7,87 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H), 6,93 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H), 3,79–3,71 (m, 10H), 3,60–3,46 ppm (m, 8H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, MeOD- d_4) δ (ppm) 158,3, 153,6, 148,8, 145,0, 127,2, 125,7, 123,6, 112,9, 73,8, 72,3, 70,1, 64,5, 52,2.

➤ **Síntesis de 31.**²³⁷



En un matraz de fondo redondo (50 mL) provisto de un imán se disolvió el compuesto **30** (300 mg, 0,63 mmol) en MeOH (25 mL) y se calentó a reflujo. El agente reductor se preparó de la siguiente forma: se disolvió $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (333 mg, 1,39 mmol) en la mínima cantidad de agua y se adicionó NaCO_3 (107 mg, 1,01 mmol) bajo agitación. La mezcla resultante se adicionó al crudo de reacción anterior. La mezcla resultante se agitó a reflujo durante 2 h. Finalmente, la reacción se terminó adicionando una mezcla de agua-hielo. El producto orgánico se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na_2SO_4 , se filtró a vacío y el disolvente se evaporó en el rotavapor

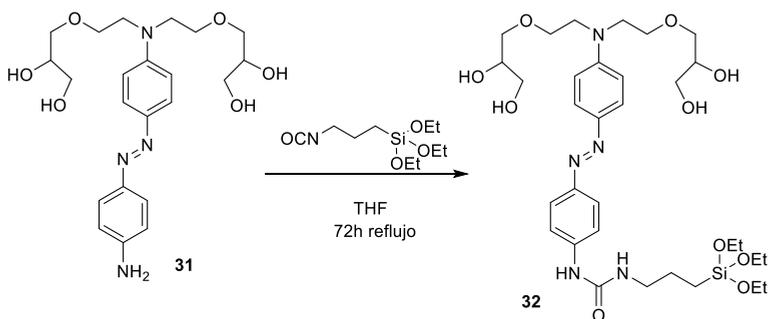
obteniéndose, el compuesto **31** puro como un sólido amarillo (247 mg, 87%).

¹H-RMN (500 MHz, MeOD-d₄) δ (ppm) 7,69 (d, J = 10,0 Hz, 2H), 7,61 (d, J = 5,0 Hz, 2H), 6,85 (d, J = 10,0 Hz, 2H), 6,74 (d, J = 5,0 Hz, 2H), 3,76 (ddd, J = 10,0, 6,0, 5,0 Hz, 2H), 3,71 (s, 8H), 3,60–3,47 (m, 8H).

¹³C-RMN (125 MHz, MeOD-d₄) δ (ppm) 151,9, 151,1, 146,2, 144,9, 125,1, 125,0, 115,5, 112,8, 73,7, 72,3, 70,1, 64,5, 52,1.

HRMS: MH⁺ encontrada: 449,2395, C₂₂H₃₂N₄O₆ calculado 449,2403.

➤ Síntesis de **32**.



En un matraz de fondo redondo (50 mL) provisto de un imán se disolvió el compuesto **31** (200 mg, 0,44 mmol) en THF seco (20 mL) bajo atmosfera de argón. La disolución se calentó a 40°C. A continuación, se adicionó isocianato de 3-(trietoxisilil)propilo (117 µL, 0,47 mmol). La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 72 h. Finalmente, el disolvente se eliminó a vacío dando lugar a la puerta molecular **32** como un sólido naranja (260 mg). El crudo de reacción se

utilizó sin previa purificación (contenía aprox. un 30% de la amina **31** de partida según el espectro de RMN).

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 8,71 (s, 1H), 7,71-7,67 (m, 4H), 7,52 (d, $J = 10,0$ Hz, 2H), 6,84 (d, $J = 10,0$ Hz, 2H), 6,26 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,64-4,62 (m, 2H), 4,48 (t, $J = 5,8$ Hz, 2H), 3,78-3,74 (m, 10H), 3,62-3,57 (m, 10H), 3,47-3,42 (m, 4H), 3,09-3,06 (m, 2H), 1,51-1,48 (m, 2H), 1,15 (t, $J = 7,0$ Hz, 9H), 0,59-0,55 (m, 2H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 154,9, 146,6, 142,5, 142,3, 131,8, 124,3, 122,8, 117,5, 111,3, 72,6, 70,6, 68,2, 63,1, 57,7, 50,4, 41,8, 23,3, 18,2, 7,3.

8.5.4. Síntesis de los materiales.

Síntesis de las micropartículas de MCM-41. Las micropartículas de sílice mesoporosas se sintetizaron siguiendo la ruta de los atranos.²⁴⁵ En un vaso de precipitados (250 mL) provisto de un imán se incorporó TEA (25,06 g, 168 mmol) y se adicionó NaOH (490 mg, 12 mmol) disueltos en agua desionizada (2mL). La mezcla de reacción se agitó a 120°C durante 20 min. Seguidamente, se apagó la calefacción y se dejó que la temperatura bajase hasta los 70°C. En este instante, se adicionó TEOS (10,6 mL, 45 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 120°C. Seguidamente, la temperatura se ajustó a 118°C y se adicionó CTABr (4,68 g) muy lentamente. Una vez terminada la adición, se ajustó nuevamente la temperatura a 70°C y se adicionó agua desionizada (80 mL) bajo agitación vigorosa. Seguidamente, se apagó la calefacción y poco después se observó la aparición de un precipitado

²⁴⁵ S. Cabrera, J. El Haskouri, C. Guillem, J. Latorre, A. Beltrán, B. Beltrán, M. D. Marcos, P. Amorós., *Solid State Sci.* **2000**, 2, 405.

blanco. La mezcla se envejece a temperatura ambiente durante una noche. El polvo resultante se recogió mediante filtración y se lavó con agua. Finalmente, el sólido se secó a 70°C (**MCM-41 sin calcinar**).

Para preparar el material poroso final (**MCM-41 calcinada**), el sólido mesoestructurado se calcinó a 550°C utilizando una mufla con atmosfera oxidante durante 5 h para eliminar el surfactante que actuó como agente plantilla.

Síntesis de M-Saf. En un matraz de fondo redondo (100 mL) provisto de un imán se incorporó el soporte inorgánico **MCM-41 calcinada** (1 g) y el colorante safranina O (500 mg) en acetonitrilo seco (40 mL). La mezcla se calentó bajo atmosfera de argón a 110°C para eliminar el agua adsorbida en el soporte inorgánico con la ayuda de un Dean-Stark mediante destilación. Se destilaron unos 10 mL de disolvente y posteriormente se apagó la calefacción. La suspensión se agitó durante 24 h a temperatura ambiente con el objetivo de cargar al máximo los poros del soporte inorgánico con el colorante. A continuación, se filtró y se lavó con acetonitrilo (1 vez) el sólido cargado. Seguidamente, se resuspendió este sólido cargado con safranina O en THF seco (25 mL) y se adicionó una punta de espátula de colorante con el fin de saturar la disolución con el colorante e impedir la salida de este de los poros de la MCM-41. A continuación, se adicionó la puerta molecular **32** (1 g, 1,44 mmol) disuelta en THF seco (25 mL). La mezcla se agitó toda la noche a temperatura ambiente bajo atmosfera de argón. El sólido **M-Saf** se filtró y se lavó con THF y luego con H₂O hasta la obtención de aguas de lavado completamente incoloras. Finalmente, se obtuvo un sólido rojo-anaranjado que se secó a 40°C durante 12 h.

Síntesis de M-Bud. En un matraz de fondo redondo (100 mL) provisto de un imán se incorporó el soporte inorgánico **MCM-41 calcinada** (1 g) y el fármaco budesonida (500 mg) en acetonitrilo seco (40 mL). La mezcla se calentó bajo atmosfera de argón a 110°C para eliminar el agua adsorbida en el soporte inorgánico con la ayuda de un Dean-Stark mediante destilación. Se destilaron 10 mL y posteriormente se apagó la calefacción. La suspensión se agitó durante 24 h a 60°C. Seguidamente, se resuspendió el sólido cargado con budesonida en THF seco (25 mL). A continuación, se adicionó la puerta molecular **32** (1 g, 1,44 mmol) disuelta en THF seco (25 mL). La mezcla se agitó toda la noche a temperatura ambiente bajo atmosfera de argón. El sólido **M-Bud** se filtró y se lavó con THF, H₂O hasta la obtención de aguas de lavado completamente incoloras. Finalmente, se obtuvo un sólido amarillo que se secó a 40°C durante 12 h.

Síntesis de M-1. En un matraz de fondo redondo (100 mL) provisto de un imán se suspendió el soporte inorgánico **MCM-41 calcinada** (1 g) en THF seco (25 mL). A continuación, se adicionó la puerta molecular **32** (1 g, 1,44 mmol) disuelta en THF seco (25 mL). La mezcla se agitó toda la noche a temperatura ambiente bajo atmosfera de argón. El sólido **M-1** se filtró y se lavó con THF, H₂O hasta la obtención de aguas de lavado completamente incoloras. Finalmente, se obtuvo un sólido amarillo que se secó a 40°C durante 12 h.

8.5.5. Caracterización de los materiales.

Tabla 8.3. Resultados del análisis elemental para los sólidos híbridos orgánico-inorgánicos sintetizados.

Nombre	Nitrógeno	Carbono	Hidrógeno
M-1	0,83	7,35	1,26
	0,82	7,35	1,40
	0,77	7,10	1,68
M-Saf	2,84	16,34	3,68
	2,83	16,10	3,32
	2,82	15,86	2,95
M-Bud	2,19	16,61	2,71
	2,18	16,67	2,82
	2,31	16,47	2,34

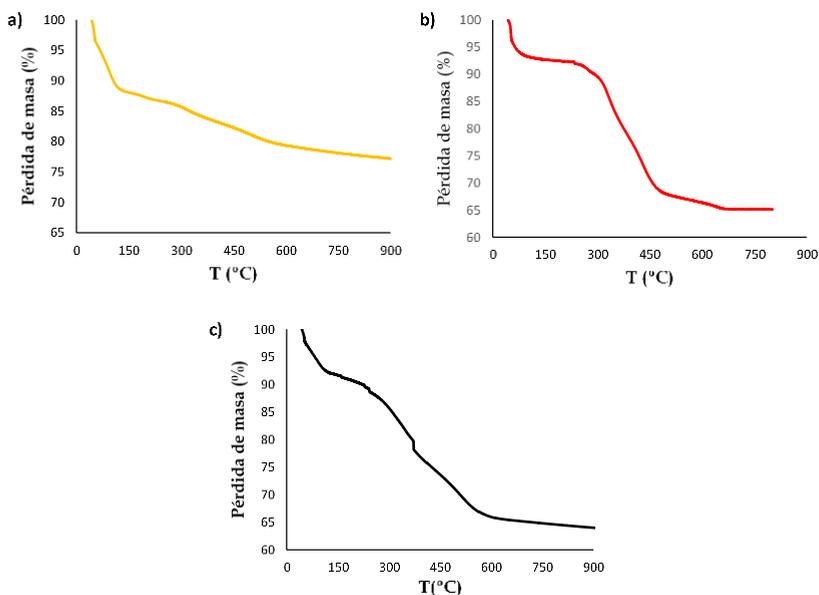


Figura 817. Termogramas de los materiales híbridos orgánico-inorgánicos sintetizados a) **M-1** (línea amarilla), b) **M-Saf** (línea roja), c) **M-Bud** (línea negra).

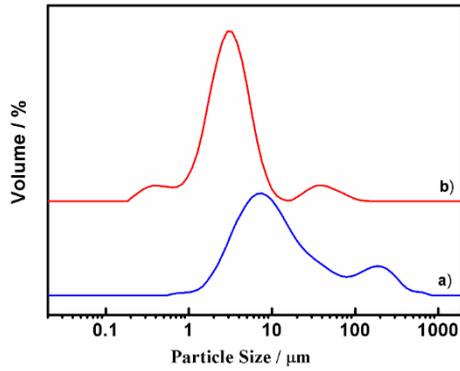


Figura 8.18. Distribución del tamaño de partícula por difracción laser (DLS) de a) M-Bud y b) M-Saf.

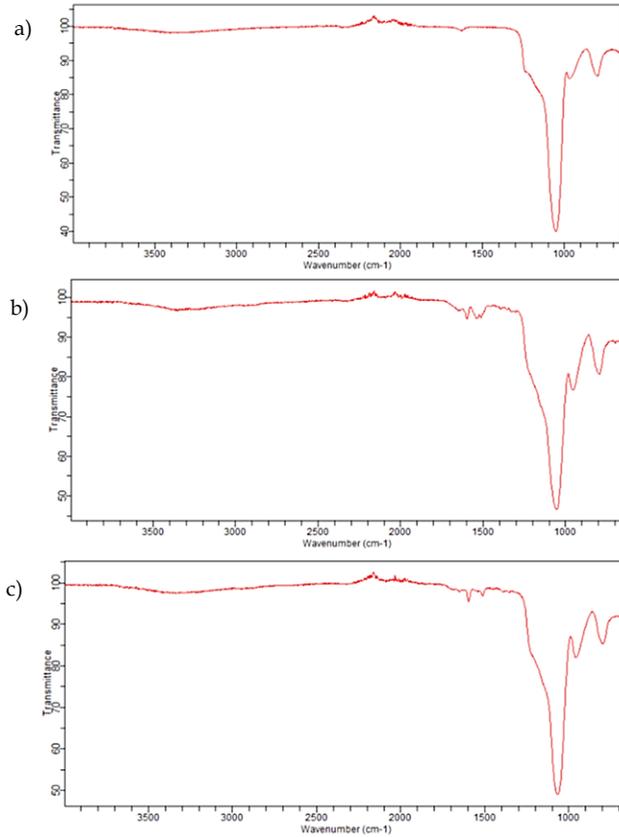


Figura 8.19. Espectro infrarrojo de los sólidos a) MCM-41 calcinada, b) M-Saf y c) M-Bud.

8.5.6. Estudios de liberación.

Liberación de Safranina O. Un experimento típico de liberación consistió en suspender el sólido híbrido orgánico-inorgánico **M-Saf** (5 mg) en agua (17 mL) a diferentes valores de pH (1,2, 4,5 y 6,8) preparados según la farmacopea europea para simular el tracto gastrointestinal. Para ello se disolvió NaCl en HCl 0,1M y se obtuvo el tampón clorhídrico pH 1,2. Por otro lado, el tampón acetato pH 4,5 se preparó mediante mezcla de acetato de sodio, ácido acético 2M más NaCl. Finalmente, el tampón fosfato pH 6,8 se preparó utilizando fosfato sódico monobásico, agua y NaCl. Se evaluó la liberación de safranina O en ausencia y en presencia de ditionito sódico como reductor (3 mg) mediante espectroscopía de UV-vis. Para ello, se tomaron alícuotas (4 mL) a tiempos fijos, se centrifugaron las alícuotas con el objetivo de separar las micropartículas suspendidas en la disolución y se registró la absorbancia de la safranina O liberada del interior de los poros de **M-Saf** (Figuras 8.20). Tras cada medida, se volvieron a introducir las alícuotas en el matraz de reacción con el objetivo de mantener constante el volumen de la disolución, ya que, posteriormente se calculó la cantidad de colorante liberado al medio empleando la ley de Lambert-Beer.

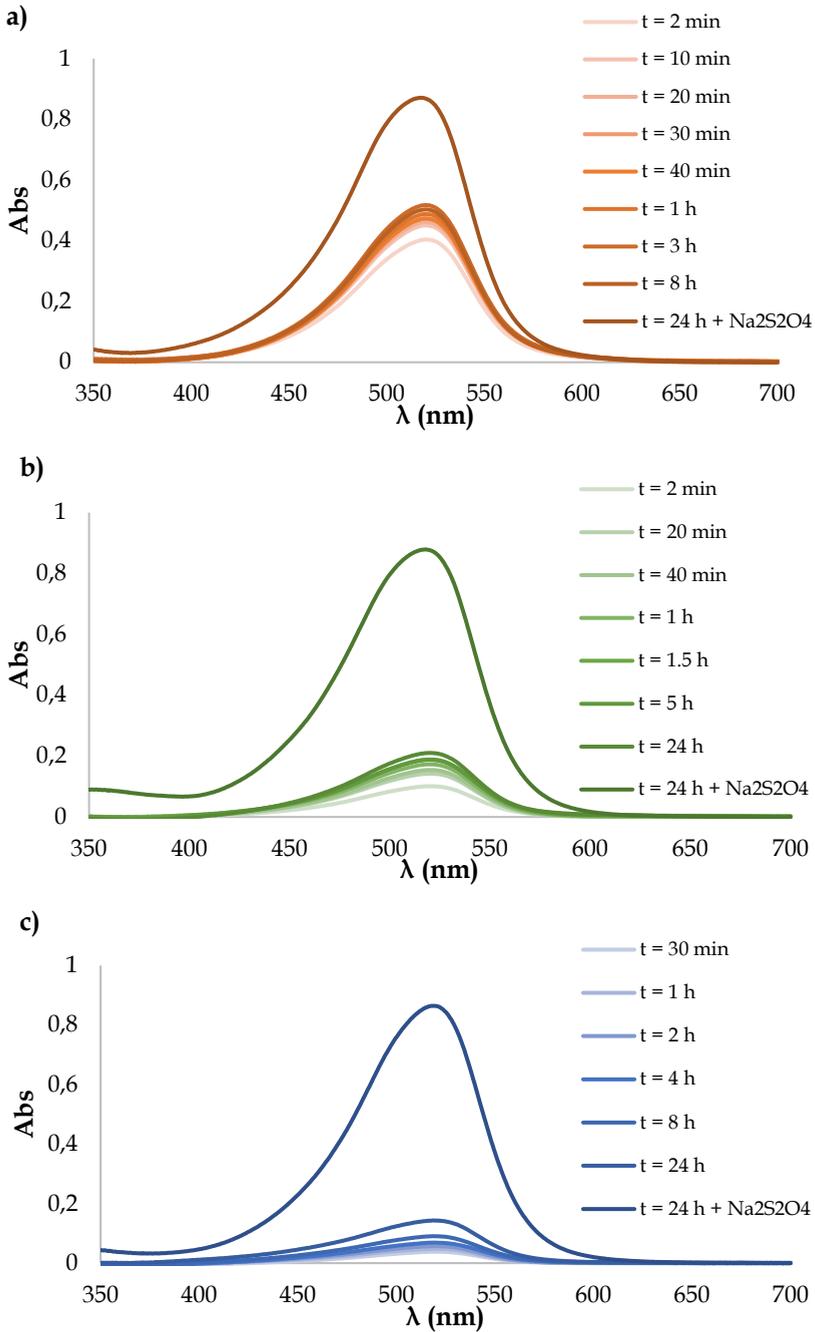


Figura 8.20. Espectros de absorción UV-vis a distintos tiempos de la safranina O procedente de la liberación del sólido **M-Saf** en ausencia y en presencia de ditionito sódico a distintos pH; a) tampón pH 1,2, b) tampón pH 4,5 y c) tampón pH 6,8.

Estudio cualitativo de liberación de budesonida por UV-vis.

El experimento de liberación se realizó siguiendo el mismo procedimiento experimental que para **M-Saf**. Se suspendieron las micropartículas **M-Bud** (5 mg) en agua (17 mL), se tomaron alícuotas a dos tiempos distintos y tras centrifugar para separar el sólido suspendido se registraron los espectros de UV-vis de la budesonida en ausencia y presencia de ditionito sódico (Figura 8.21).

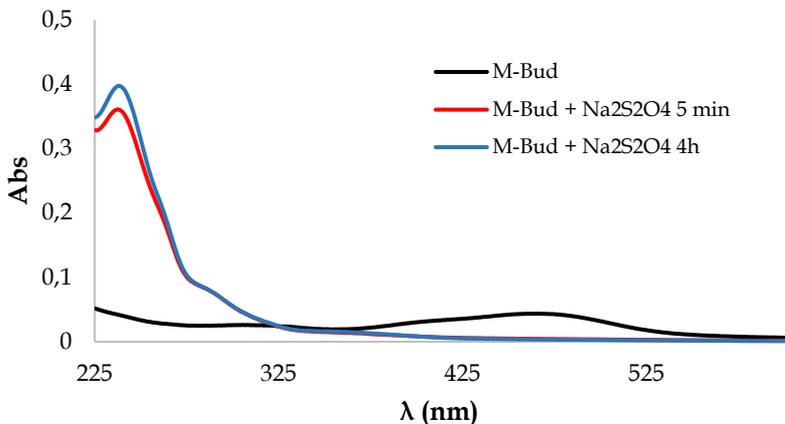


Figura 8.21. Espectro UV-vis de **M-Bud** en agua en ausencia de ditionito sódico (línea negra) y después de la adición de Na₂S₂O₄ a 5 min (línea roja) y después de 4 h (línea azul).

Estudio cuantitativo de liberación de budesonida por HPLC.

Para la preparación del método de calibración en HPLC se siguió el procedimiento descrito en la bibliografía.¹⁹⁵ La fase móvil consistió en MeOH:Agua (80:20, v/v). El flujo fue de 1 mL/min y la longitud de onda seleccionada fue de 244 nm (λ_{\max} para la budesonida). El volumen de inyección fue de 20 μ L.

Preparación de las disoluciones patrón y stock.

Metanol:Agua (50:50, v/v) fue el disolvente utilizado para la preparación de la disolución *stock*, así como para las disoluciones estándar. La disolución *stock* de budesonida se preparó disolviendo 10 mg del fármaco en 100 mL de disolución hidroalcohólica, obteniéndose de este modo una disolución de concentración 100 $\mu\text{g/mL}$ de budesonida. Esta disolución se diluyó con la disolución hidroalcohólica necesaria para preparar las diferentes disoluciones estándar (100, 50, 25, 10, 5 y 1 $\mu\text{g/mL}$). Las disoluciones estándar se analizaron por triplicado obteniéndose un método de regresión lineal que se utilizó para la evaluación de los datos. La relación del área de los picos del cromatograma correspondientes a la budesonida se representaron frente a las concentraciones teóricas de las disoluciones estándar (Figura 8.22). Finalmente, la linealidad se expresó como un coeficiente de correlación.

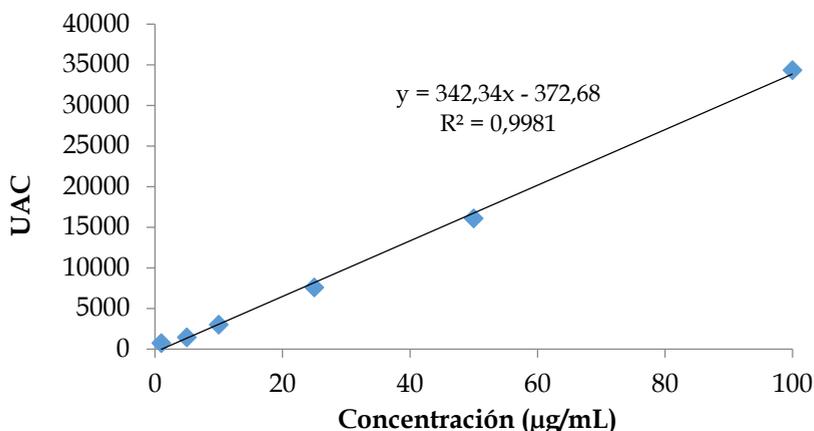


Figura 8.22. Recta de calibrado para el fármaco budesonida.

Liberación de M-Bud. El experimento típico de liberación consistió en suspender las micropartículas de **M-Bud** (5 mg) en agua

(10 mL). Seguidamente, se adiciono el agente reductor (3 mg) y se agitó a temperatura ambiente. Se separaron alícuotas después de la adición a los 5 min y a las 4 h, se centrifugaron y se filtraron. A continuación, se inyectaron en el HPLC. Los cromatogramas mostraron un único pico a $t_R = 4,20$ min y ninguna indicación de productos de degradación del fármaco a $t_R = 2,0$ min. Se seleccionó el área máxima de la budesonida a $t_R = 4,20$ min para el cálculo de la concentración liberada. Se obtuvo que a los 5 min se había producido una liberación de 24 μg de fármaco / mg de sólido y a las 4 h se observó una liberación de 31,2 μg de budesonida / mg de sólido.

8.5.7. Estudios de liberación *in vivo*.

Los estudios preliminares reportados aquí se adhieren a los principios de cuidado de animales de laboratorio (*Principles of Laboratory Animal Care*) y fueron aprobados por el comité de ética institucional de la Consellería de Agricultura, Medio Ambiente, Desarrollo Rural y Cambio Climático (Generalitat Valencia), según 2016/VSC/PEA/00158.

El experimento consistió en suspender el sólido híbrido orgánico-inorgánico **M-Saf** (10 mg) en agua (200 μL). La mezcla se administró a los ratones mediante una cánula provista de una punta redondeada. El ratón, con libre acceso a agua y alimentos, se observó durante 4 h. Al cabo de este tiempo, se sacrificó al ratón con una sobredosis de anestesia (doletal [®]) y posteriormente se extrajo el abdomen y se separó el sistema digestivo. El sistema digestivo se diseccionó minuciosamente con el fin de ubicar las micropartículas a través de él. El material aislado en estas secciones se evaluó con el

ditionito sódico y se monitorizó la liberación de safranina O mediante fluorescencia (Figuras 8.23). Por otro lado, otro ratón fue estudiado durante 24 h después de la administración oral de **M-Saf**. Al cabo de las 24 h el ratón fue sacrificado y se diseccionó el sistema digestivo siguiendo el mismo procedimiento, no detectándose presencia de safranina O en el estómago, intestino o colon, ni antes ni después de la evaluación frente al agente reductor. Adicionalmente, se recogieron las heces durante las 24 h, se homogenizaron y se suspendieron en agua (5 mL) durante 24 h a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó y el sobrenadante se separó. El sólido resultante se volvió a suspender en agua (5 mL) y se estudió la liberación de safranina O utilizando $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$.

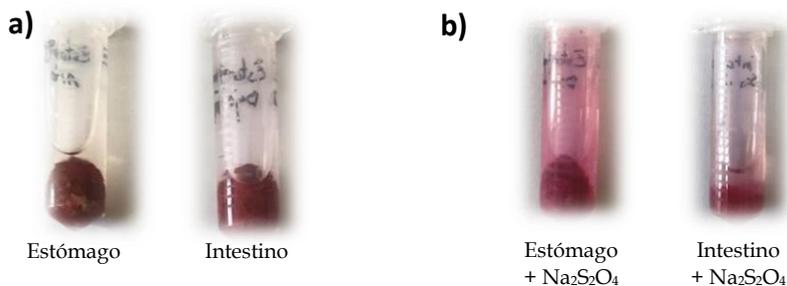


Figura 8.23. Micropartículas de **M-Saf** localizadas a lo largo del estómago y del intestino delgado después de 4 h en ausencia a) y en presencia b) de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$.

8.5.8. Evaluación de la inflamación y de la lesión producida en el colon.

La evaluación de la inflamación se basó en varios parámetros: sobre el puntaje de la actividad clínica, la relación peso colon / peso rata y la evaluación histológica. Cada parámetro se calculó de la siguiente manera.

➤ **Puntaje de la actividad clínica.**

Para el cálculo de la puntuación clínica se han tenido en cuenta tres parámetros: el porcentaje de pérdida de peso con respecto al día 0, la presencia y consistencia de las heces en las jaulas y el sangrado rectal.²⁴⁶ La no pérdida de peso se contabilizó con 0 puntos, 1 punto para pérdidas de peso entre el 1-5%, 2 puntos para pérdidas del 5-10%, 3 puntos para pérdidas del 20-20% y 4 puntos para pérdidas de peso >20%. Para la consistencia de las heces, se le otorgaron 0 puntos para heces granuladas y bien formadas, 2 puntos para heces pastosas y semi-formadas que no se pegaban al ano y 4 puntos para heces líquidas y que se pegaban al ano. El sangrado se puntuó como: 0 puntos para la ausencia de sangre, 2 puntos para la aparición de sangre y 4 puntos para una hemorragia grave. La suma de todos los valores formó el puntaje clínico que oscila entre 0 (rata saludable) y 12 (actividad máxima de la colitis).

➤ **Determinación de la relación peso colon/peso rata.**

Las ratas fueron sacrificadas mediante una sobredosis de anestesia (dolethal®), posteriormente, se abrió la cavidad abdominal y se separó rápidamente el colon por distal. A continuación, se abrió longitudinalmente a lo largo del borde mesentérico. Se cortó un segmento de 8 cm de colon por distal de cada rata, se lavó con suero fisiológico 0,9% (p/v) para eliminar restos de heces que había presentes. Seguidamente, se secó con mucho cuidado con papel trapicel

²⁴⁶ a) G. Hartmann, C. Bidlingmaier, B. Siegmund, S. Albrich, J. Schulze, K. Tschoep, A. Eigler, H. A. Lehr, S. Enders, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2000**, 292, 22. b) A. Lamprecht, N. Ubrich, H. Yamamoto, U. Scheafer, H. Takeuchi, P. Maincent, Y. Kawashima, C. M. Lehr. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2001**, 299, 775.

y se colocó con la superficie de la mucosa hacia arriba para posteriormente pesarlo.²⁴⁷ La relación de peso del colon / peso de la rata se calculó como un índice del edema producido en el tejido.

➤ **Evaluación histológica.**

Se extirparon dos muestras de tejidos de 3 cm desde distal a proximal de cada colon y se mantuvieron en formaldehído, para posteriormente, realizar los estudios microscópicos. Estas muestras de tejidos se incrustaron en parafina, se cortaron en secciones longitudinales de 5 µm de espesor y se tiñeron con hematoxilina y eosina para la evaluación microscópica de toda la sección. La evaluación microscópica con un microscopio óptico se realizó a ciegas en cortes codificados. El daño histológico se cuantificó en una escala de 0 a 3 de la siguiente manera: se asignó 0 puntos para la rata que no presentaba daños, 1 punto para el animal con inflamación insignificante, 2 puntos para las ratas con inflamación significativa e infiltraciones (una o dos regiones afectadas con el número de neutrófilos ligeramente aumentados) y 3 puntos para el animal que presentaban una severa inflamación (varias regiones inflamadas con muchos neutrófilos).²⁴⁸

➤ **Análisis estadístico.**

Se realizaron pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y U-Mann-Whitney para evaluar las diferencias entre los grupos. Las pruebas se realizaron utilizando el programa SPSS versión 22.0 para

²⁴⁷ K. Mladenovska, R. S. Raicki, E. I. Janevik, T. Ristoski, M. J. Pavlova, Z. Kavrakovski, M. G. Dodov, K. Goracinova. *Int. J. Pharm.*, **2007**, 342, 124.

²⁴⁸ M. Rodríguez, J. A. Antúnez, C. Taboada, B. Seijo, D. Torres. *J. Pharm. Pharmacol.*, **2001**, 53, 1207.

Parte experimental

Windows (SPSS Inc., EE.UU.). La significación estadística se fijó en $p < 0,05$.

Conclusiones Parte 2

El objetivo principal de esta segunda parte de la Tesis Doctoral fue el de contribuir a la expansión en el campo de la biotecnología y la nanomedicina. De hecho, todos los materiales híbridos aquí presentados se han diseñado y se han desarrollado como pruebas de concepto para intentar satisfacer diferentes necesidades biotecnológicas.

Por un lado, en el Capítulo 7, se han desarrollado unos nuevos nanomateriales híbridos orgánico-inorgánicos (**M-Sulf**, **M-Rod**, **M-LA** y **M-Ru(bpi)₃**) consistentes en nanopartículas mesoporosas de sílice, cargadas con distintos colorantes, y funcionalizadas en su superficie con puertas moleculares. Inicialmente, las nanopartículas de MCM-41 cargadas con sulforodamina B o rodamina 6G fueron funcionalizadas en la superficie externa del material con un derivado de trifluorometilcetona mediante un enlace carbamato, dando lugar a los sólidos **M-Sulf** y **M-Rod**. Esta trifluorometilcetona, selectiva frente al anión peroxinitrito, no dio resultados concluyentes de apertura y liberación de la carga a la disolución o al citoplasma celular, como se ha visto en los estudios preliminares realizados, ya que no se observó una diferencia significativa entre las muestras. Sin embargo, los ensayos de viabilidad en las células RAW 264,7 mostraron una cierta toxicidad para estos materiales, lo que implica la necesidad de mejorar estos materiales para su aplicación *in vivo* en la detección de peroxinitrito. Paralelamente, fueron desarrollados los materiales **M-LA** y **M-Ru(bpi)₃** funcionalizados con un derivado hidrocarbonado con dobles enlaces *cis* no conjugados. Estos materiales fueron desarrollados para liberar, de forma controlada, el colorante encapsulado en su interior en células en situación de estrés oxidativo, tras la ruptura de las puertas como consecuencia de un proceso de peroxidación lipídica. Se ha demostrado

que mediante una reacción de ozonólisis en medio acuoso el material **M-Ru(bpi)₃** libera el colorante encapsulado. Sin embargo, los primeros estudios celulares mostraron una baja internalización vía endocitosis que dificultó conocer el perfil de liberación intracelularmente.

Por otro lado, en el Capítulo 8, se han desarrollado unos nuevos materiales híbridos orgánicos-inorgánicos micrométricos basados en sílice mesoporosa y funcionalizados en su superficie externa con un azoderivado que actúa como puerta molecular.

Se han desarrollado tres materiales micrométricos **M-1**, **M-Saf** y **M-Bud** capaces de liberar, de forma controlada, un colorante, safranina O (**M-Saf**) o un fármaco, budesonida (**M-Bud**), empleando un azoreductor químico como, el ditionito sódico o enzimas como, las azoreductasas. Estos materiales pueden controlar la liberación del colorante/fármaco gracias a la utilización de ditionito sódico. Como se ha demostrado, en ausencia de ditionito sódico no se observa liberación de la carga. Sin embargo, en presencia de azoreductores se observa una liberación casi completa de la carga, debido a la hidrólisis del enlace azo (-N=N-) que se encuentra en la puerta molecular.

Así mismo, se ha demostrado la eficacia de las micropartículas mesoporosas cargadas con budesonida y funcionalizadas con una puerta molecular conteniendo un grupo azo (**M-Bud**) en el tratamiento de la colitis inducida por TNBS en ratas. Como se ha visto, este material dio lugar a la de regeneración de tejidos semejantes a los obtenidos con el fármaco comercial Entocord®. Además, los estudios llevados a cabo con las micropartículas vacías (**M-1**) mostraron que el sistema no era tóxico a las concentraciones del estudio.

De este modo, esta segunda parte de la Tesis Doctoral, supone una contribución al desarrollo de dispositivos capaces de liberar moléculas (colorantes o fármacos) de forma controlada, ya sea en líneas celulares o en el sistema digestivo. Como futuro trabajo quedaría optimizar estos dispositivos para su posible aplicación *in vivo*.

Apéndice

El orden de administración y la formulación a administrar a cada animal se realizó mediante un cálculo aleatorio como se muestra a continuación.

Identificación animal	Aleatorio	Formulación	Orden Aleatorio	Formulación 1	Salino
1	0,009604356	1	1	Formulación 2	M-1
2	0,349465651	1	2	Formulación 3	M-Bud
3	0,06933549	1	4	Formulación 4	Entocord®
4	0,810353417	2	4		
5	0,874009157	2	1		
6	0,248095737	2	3		
7	0,552926762	2	3		
8	0,484333652	2	4		
9	0,593926626	2	2		
10	0,463059086	2	3		
11	0,027295148	2	1		
12	0,76730637	3	3		
13	0,773262958	3	4		
14	0,312946458	3	4		
15	0,35205919	3	2		
16	0,978228125	3	2		
17	0,195313862	3	2		
18	0,087680759	3	2		
19	0,766510859	3	3		
20	0,227781512	4	3		
21	0,042010256	4	3		
22	0,92356203	4	2		
23	0,379497311	4	4		
24	0,408170568	4	4		
25	0,830283574	4	2		
26	0,052623355	4	4		
27	0,854785682	4	3		

Para el cálculo de puntuación se tuvieron en cuenta cuatro parámetros: el porcentaje de pérdida de peso con respecto al día 0, la presencia de heces y el aspecto de las mimas en la jaula, la presencia o ausencia de sangre y la evaluación histológica. De este modo, se preestableció un rango para cada uno de los parámetros de estudio (Tabla A.1) para asignarles un valor numérico, permitiendo obtener una puntuación de 0 a 12, indicativa del grado de la enfermedad, correspondiendo el valor de 0 a la ausencia de la misma y 12 al mayor grado de inflamación.

Control	Range	Point
Weightloss	<1%	0
	1-5%	1
	5-10%	2
	10-20%	3
	>20%	4
Stools	Normal Stools	0
	Loose or Diarrhea	2
	No feces	4
Presence of blood	No blood	0
	Few in stools	2
	Plenty in stools	4
Histological	No damage	0
	slow inflammation	1
	moderate inflammation	2
	severe inflammation	3

	Weightloss	Stools	Presence of blood	Histological Score	Clinical Activity Score	Colon/body Weigth (mg/g)
R1 (Saline Solution)	0	4	0	2	6	3,39
R2 (M-1)	3	1	0	2	6	11,33
R3 (Entocord)	4	2	0	3	9	9,00
R4 (Entocord)	0	0	0	0	0	2,36
R5 (Saline Solution)	0	4	0	2	6	3,39
R6 (M-1)	3	4	0	3	10	22,26
R7 (M-Bud)	0	0	0	0	0	4,06
R8 (Entocord)	0	0	0	0	0	3,24
R9 (M-1)	3	4	0	3	10	22,75
R10 (M-Bud)	4	4	0	3	11	6,23
R11 (Saline Solution)	3	4	2	0	9	x
R12 (M-Bud)	3	2	0	0	5	x
R13 (Entocord)	0	1	0	1	2	3,28
R14 (Entocord)	0	1	0	0	1	3,65
R15 (M-Bud)	0	1	0	0	1	3,74
R16 (M-1)	4	4	4	3	15	23,14
R17 (M-1)	0	2	0	0	2	9,81
R18 (M-1)	2	4	0	0	6	8,51
R19 (M-Bud)	3	3	0	0	6	x
R20 (Entocord)	1	1	0	0	2	4,04
R21 (M-1)	0	3	0	3	6	8,97
R22 (M-Bud)	0	0	0	0	0	4,55
R23 (Entocord)	3	4	0	0	7	x
R24 (M-Bud)	0	0	0	0	0	4,80
R25 (Entocord)	1	1	0	0	2	4,18
R26 (M-Bud)	3	4	0	0	7	x
R27 (Healthy rat)	0	0	0	0	0	3,80
R28 (Saline Solution)	4	4	1	3	12	32,66
R29 (Saline Solution)	4	4	1	3	12	26,93

