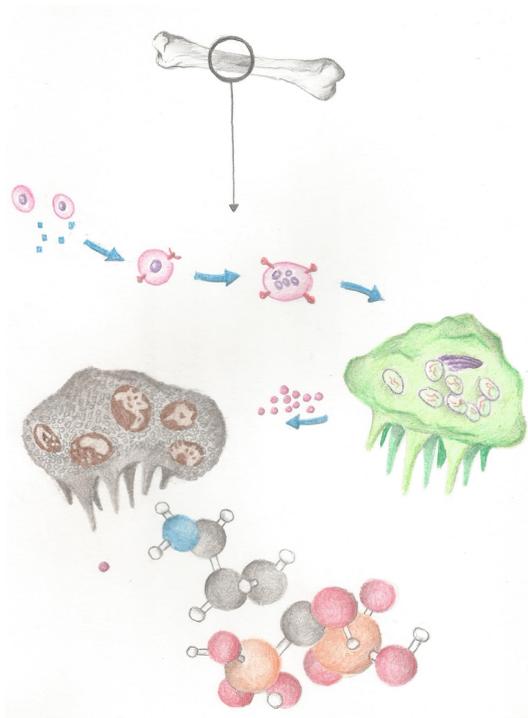




VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

**Desarrollo de sistemas mesoporosos con puertas
moleculares para el transporte y la liberación
selectiva v controlada de fármacos.**



Presentada por:

Elena Añón Herrero

Dirigida por :

Ana M^a Costero Nieto

Salvador Gil Grau

Valencia, Mayo 2019



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Instituto Interuniversitario de Reconocimiento Molecular y

Desarrollo Tecnológico.

Doctorado en Química

**Desarrollo de sistemas mesoporosos con puertas
moleculares para el transporte y la liberación selectiva y
controlada de fármacos.**

Tesis Doctoral

Presentada por:

Elena Añón Herrero

Dirigida por:

Prof. Ana M^a Costero Nieto

Prof. Salvador Gil Grau

Valencia Mayo 2019,

Dña. Ana María Costero Nieto, Catedrática de Universidad del Departamento de Química de la Universidad de Valencia

D. Salvador Gil Grau, Catedrático de Universidad del Departamento de Química de la Universidad de Valencia

CERTIFICAN:

Que el trabajo que presenta Dña. Elena Añón Herrero en esta memoria, bajo el título **“Desarrollo de sistemas mesoporosos con puertas moleculares para el transporte y la liberación selectiva y controlada de fármacos”** ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto Interuniversitario de Investigación en Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico de la Universidad de Valencia.

Y para que así conste, a efectos de su presentación para optar al grado de Doctora, expiden el presente certificado que firman en Valencia, Abril 2019

Dra. Ana M^a Costero Nieto

Dr. Salvador Gil Grau

A mis padres

Agradecimientos

Después de tanto tiempo y tanto esfuerzo se cierra una etapa que me ha permitido aprender mucho, crecer tanto a nivel profesional como personal, y por ello he de dar las gracias a muchas personas.

En primer lugar al grupo de investigación donde se me ha permitido realizar la tesis doctoral, a mis tutores Ana M^a Costero y Salvador Gil, y a Margarita Parra, que aunque no sea mi tutora de la tesis en el papel, ha ejercido también como tal durante todos estos años. A M^a Carmen Terencio, que cuando me encontraba perdida con los cultivos celulares estuvo ahí siempre sin ni si quiera conocerme. A las técnicas de cultivos (Carmen y Amparo, así como a Ana) que me enseñaron todo lo necesario para poder trabajar con células, que me ayudaron en todo lo que pudieron y me recibieron siempre con una sonrisa. A Pedro Amorós y Jamal por su ayuda en la caracterización de los materiales.

A mis compañeros, que han compartido conmigo el día a día en el laboratorio, las risas y las penas, la frustración cuando no sale nada, Estefanía, Silvia, Tania, Dani, Samuel, Carlos, Andrés gracias por todo. Por supuesto no me puedo olvidar de mis grandes amigos en el laboratorio, Alberto y Andrea, los que me han enseñado a trabajar allí, a cogerme las cosas con filosofía, a divertirme en el laboratorio y por supuesto con los que sé que puedo seguir contando siempre, gracias.

A ellas, las de siempre, María, Cande, Romi y Eva, por aguantarme estos duros cinco años de tesis, por ser siempre mi respaldo y estar ahí para todo, no sabéis cuanto agradezco vuestro apoyo.

A mis abuelos, por ser tan especiales.

Y como no podía ser de otra manera, por último, a mi hermana, y sobre todo a mis padres, que han sido los que me han permitido realizar la tesis, los que me han dado el apoyo moral y económico para poder llevar a cabo este proyecto, para poder llegar al final de esta etapa, gracias, gracias, gracias por estar incondicionalmente a mi lado, os quiero.

Publicaciones

- Juárez, L. A., Añón, E., Giménez, C., Sancenón, F., Martínez-Máñez, R., Costero, A. M., Gaviña, P., Parra, M., Bernardos, A. Self-Immolative Linkers as Caps for the Design of Gated Silica Mesoporous Supports. *Chem. Eur. J.*, **2016**, *22*, 14126-14130.
- Costero, A. M., González, A., Ortuño, M. A., Benavent, A., Añón, E. Evaluación del reflujo en los sistemas de administración intravenosa de MP. Exposición del personal de enfermería. *Rev. Toxicol.*, **2018**, *35*, 18-21.
- Añón, E.; Costero, A. M.; Gaviña, P.; Parra, M.; Gil, S.; El Haskouri, J.; Amorós, P.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F. Not always what closes best opens better: Mesoporous nanoparticles capped with organic gates. *Sci. Technol. Adv. Mater. In press*.
- Peptide capped mesoporous nanoparticles. Towards a more efficient internalization of Alendronate. En redacción.

Resumen

La presente tesis doctoral titulada “Desarrollo de sistemas mesoporosos con puertas moleculares para el transporte y la liberación selectiva y controlada de fármacos” se centra en la síntesis de materiales híbridos orgánico-inorgánicos.

En la primera parte de la tesis se lleva a cabo un estudio comparativo de la eficacia de diferentes clases de puertas moleculares valorando los criterios que hay que tener en cuenta a la hora de diseñar una. Para ello se ha preparado una serie de materiales funcionalizados con diferentes puertas moleculares con variaciones en el grupo funcional principal (éster o amida) y por lo tanto en el estímulo que desencadena su apertura (enzima esterasa o amidasa), el volumen estérico de la puerta molecular y el carácter autoinmolante o no de la misma.

En la segunda parte se lleva a cabo por un lado, la funcionalización del fármaco alendronato para hacer que sea una molécula fluorescente, y por otro, el diseño y la síntesis de un material híbrido orgánico-inorgánico con una puerta molecular que permita la liberación selectiva y controlada de fármacos en presencia de catepsina K, enzima presente en los osteoclastos que se encuentran implicados en la osteoporosis. Esta funcionalización ha permitido finalmente la realización de ensayos de liberación en cultivos celulares.

Abstract

The present PhD thesis entitled “Development of mesoporous materials functionalized with molecular gates for the transport and selective and controlled releasing of drugs” is focused on the synthesis of different organic-inorganic hybrid materials with different characteristics.

On one hand, a series of mesoporous materials functionalized with different types of molecular gates have been prepared and characterized. In these studies, the influence of the functional groups present in the molecular gates on the encapsulation and releasing properties has been evaluated. The designed molecular gates have ester or amide linker and the external stimuli used for the cargo release are enzymes (esterases or amidases respectively). In addition the effect of presence of self-immolative chains has also been evaluated.

On the other hand, several studies directed toward the preparation of more efficient alendronate formulations have been carried out. To carry out this research several stages were developed. First, alendronate functionalization with suitable fluorophores or chromophores was optimized. In addition, the design of peptic gates able to be broken by cathepsin K was carried out. The election was done based on the fact that cathepsin K is an enzyme present in the osteoclasts that are cells implicated in the disease osteoporosis. Finally, mesoporous materials filled with alendronate and capped with peptides were prepared and studied in vitro. The obtained results indicated that the new alendronate formulation showed better internalization properties than the commercial alendronate.

Abreviaturas:

Aa: aminoácido

APTS: 3-amino-propiltriethoxisilano

Atp6i: Isoforma de la ATPasa vacuolar osteoclastica

Atp6v0d2: Isoforma de la ATPasa vacuolar osteoclastica

Bcl-2: B-Cell CLL/lymphoma 2

BET: Brunauer-Emmett-Teller

BJH: Barret-Joyner-Halenda

CA II: Anhidrasa carbónica II

Cat K: Catepsina K

c-Fos: Factor de transcripción implicado en la diferenciación osteoblástica

CIC-7: Canal de cloro 7

cm: centímetro

CMH: célula madre hematopoyética

CPOC: célula precursora de osteoclastos

¹³C-RMN: Resonancia magnética nuclear de carbono 13

CSF: Factor estimulador de colonias

CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

DAP12: DNAX-activating protein de 12 kDa

DB24C8: Dibenzo-[24]-corona-8

DCC: N,N'-Diciclohexilcarbodiimida

DCM: Diclorometano

DC-STAMP: Dendritic cell specific transmembrane protein

DDQ: 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

DTT: DL-ditiotreitol

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGTA: ácido etilen glicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N',N'-tetraacético

FBS: Serum fetal bovino

FCRy: Receptores gamma para el Fc

FMOC-Cl: Cloruro de fluorenilmetiloxicarbonilo

g: Gramo

Gab2: proteína de unión 2 asociada a-GRB2

h: Horas

^1H -RMN: Resonancia magnética nuclear de protón

HRMS (ESI): Espectrometría de masas de alta resolución

K: Kelvin

KV: Kilovoltios

M: Molar

MCM-41: Mobile Crystalline Material

M-CSF: Factor estimulador de colonias de macrófagos

MHz: Megahercio

MITF: Microphthalmia-associated transcription factor

ml: Mililitro

mmol: Milimol

MSNs: Materiales mesoporosos

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

NBD-Cl: 4-cloro-7-nitrobenzafurazano

NFATc-1: Nuclear factor of activated T cells, cytoplasmatic

NF-kB: Factor nuclear kB

NIR: Near infrared

nm: Nanómetro

OC: Osteoclasto

OPG: Osteoprotegerina

³¹P-RMN: Resonancia magnética nuclear de fósforo 31

PBS: Tampón fosfato salino

Pd(Ph)₃: Tetrakis (trifenilfosfina) paladio

PNIPAAm: poli(N-isopropil acrilamida)

PER: Polímero estímulo respuesta

PNAS: Poli(N-acriloxisuccinimida)

PNAS-MS: Poli(N-acriloxisuccinimida) anclada al material mesoporoso

ppm: Partes por millón

PRTA: Polimerización radical por transferencia atómica

PTH: Parathormona humana o hormona paratiroidea endógena

PU-1: Factor de transcripción que regula la función de las células B

RANK: Receptor activador del factor nuclear kB (NF-kB)

RANKL: Ligando del receptor activador del factor nuclear kB (NF-kB)

rpm: Revoluciones por minuto

SCC: Carcinoma de células escamosas

SERM: Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos

TEM: Microscopía de transmisión electrónica

TEOS: Tetraetilortosilicato

TGA: Análisis termogravimétrico

THF: Tetrahidrofurano

THS: Terapia hormonal sustitutiva

TLC: Cromatografía en capa fina

TRAF-6: TNF receptor asociado factor 6

TRAP: Fosfatasa ácida tartrato resistente

Tris: tris(hidroximetil)aminometano

UI: Unidad internacional

Aminoácidos:

Arg/R: Arginina

Glu/E: Ácido glutámico

Gly/G: Glicina

Lys/K: Lisina

Leu/L: Leucina

Met/M: Metionina

Phe/F: Fenilalanina

Pro/P: Prolina

Gln/Q: Glutamina

Ser/S: Serina

Índice

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL	27
1.1 OSTEOPOROSIS	29
1.1.1 ENFERMEDAD	29
1.1.2 TRATAMIENTOS ACTUALES	34
1.2 MATERIALES MESOPOROSOS	41
1.2.1 ANTECEDENTES	41
1.2.3 FUNCIONALIZACIÓN MCM-41	49
1.2.4 CARACTERÍSTICAS	54
1.2.5 CARACTERIZACIÓN	55
1.2.6 APLICACIONES	60
1.3 PUERTAS MOLECULARES	61
1.3.1 DEFINICIÓN Y CLASES	61
1.3.2 MECANISMOS DE APERTURA PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA	64
1.3.2.1 pH	67
1.3.2.2 Temperatura	68
1.3.2.3 Potencial redox	71
1.3.2.4 Luz	73
1.3.2.5 Biomoléculas	75
1.3.2.5.1 Biomoléculas como puertas	75
1.3.2.5.2 Biomoléculas como estímulo	77
1.4 CULTIVOS CELULARES	80
1.4.1 CATEPSINA K	80
1.4.1.1 Estímulo de apertura	81
1.4.1.2 Células que expresan la catepsina K y sus precursores	83
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS	93
CAPÍTULO 3: INFLUENCIA DE LA ESTRUCTURA DE LAS PUERTAS MOLECULARES EN LA EFICACIA DEL CIERRE Y LIBERACIÓN	99
3.1 INTRODUCCIÓN	101
3.2 PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE MATERIALES	102
3.2.1 MATERIALES FUNCIONALIZADOS CON ÉSTERES DE CADENAS POLIETÉREAS	103
3.2.2 MATERIALES FUNCIONALIZADOS CON PUERTAS AUTOINMOLANTES	118
3.2.2.1 Ésteres	119
3.2.2.2 Amidas	131

3.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	141
3.4 CONCLUSIONES	161
<u>CAPÍTULO 4: ESTUDIO DE MARCAJE Y ENCAPSULACIÓN DE ALENDRONATO</u>	<u>165</u>
4.1 INTRODUCCIÓN	167
4.2 FUNCIONALIZACIÓN DEL ALENDRONATO	168
4.2.1 SÍNTESIS DE ALENDRONATO SUSTITUIDO CON UN FLUORÓFORO O UN CROMÓFORO	169
4.2.2. INTRODUCCIÓN DEL MARCADOR FLUORESCENTE SOBRE EL ALENDRONATO	181
4.3 DETECCIÓN POR UV	190
4.4 DISEÑO Y ANCLAJE DE LA PUERTA MOLECULAR	192
4.4.1 DISEÑO DE LA PUERTA	192
4.4.2 CARGA DEL MATERIAL Y ANCLAJE DE LA PUERTA MOLECULAR AL MATERIAL MESOPOROSO	194
4.4.2.1 Carga de los materiales	194
4.4.2.2 Anclaje de las puertas	196
4.4.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES	197
4.5 ESTUDIOS DE LIBERACIÓN CON LOS MATERIALES PATRÓN	200
4.6 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	206
4.7 CONCLUSIONES	221
<u>CAPÍTULO 5: ENSAYOS CELULARES</u>	<u>223</u>
5.1 DIFERENCIACIÓN DE OSTEOCLASTOS	225
5.2 VIABILIDAD CELULAR EN PRESENCIA DE MCM-41 Y DE ALENDRONATO	232
5.3 ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE CATEPSINA K EN CÉLULAS RAW 264.7 MURINAS Y SCC-13	233
5.4 MÉTODO DE DETECCIÓN INDIRECTA	237
5.4.1 ESTUDIO DE INTERNALIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS Y LIBERACIÓN DEL COLORANTE	238
5.4.2 ESTUDIO DE LIBERACIÓN DE ALENDRONATO MARCADO EN CÉLULAS	242
5.5 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	244
5.6 CONCLUSIONES	256
<u>CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES</u>	<u>259</u>

Capítulo 1:
Introducción general

1.1 Osteoporosis

1.1.1 Enfermedad

El esqueleto es el encargado de realizar una serie de funciones imprescindibles para el buen funcionamiento del cuerpo, como proporcionar soporte estructural para todo él y soporte a los músculos lo que permite el movimiento y la locomoción. Además, se encarga de proteger tanto los órganos como las estructuras vitales, así como de proporcionar el mantenimiento de la homeostasis y el balance ácido-base. Por último, actúa de reservorio para factores de crecimiento y citocinas y proporciona el ambiente adecuado para la hematopoyesis en los espacios medulares.

El hueso es un órgano rígido pero dinámico que está continuamente moldeándose y reparándose con el objetivo de mantener la fuerza ósea y la homeostasis mineral. Esta renovación continua se realiza a través de una unidad de remodelado de hueso formada por un grupo de células estrechamente acoplado compuesto por:

- Osteoclastos: son las únicas células que se conocen capaces de producir la resorción ósea. Son células multinucleadas que provienen de células precursoras mononucleares pertenecientes al linaje monocito-macrófago.
- Osteoblastos: son las células encargadas de sintetizar la matriz ósea. Son células grandes, de forma poliédrica y estirpe mesenquimal, y la mayoría de ellas se encuentran formando parte del estroma de la médula ósea o en otros compartimentos próximos a las superficies óseas.

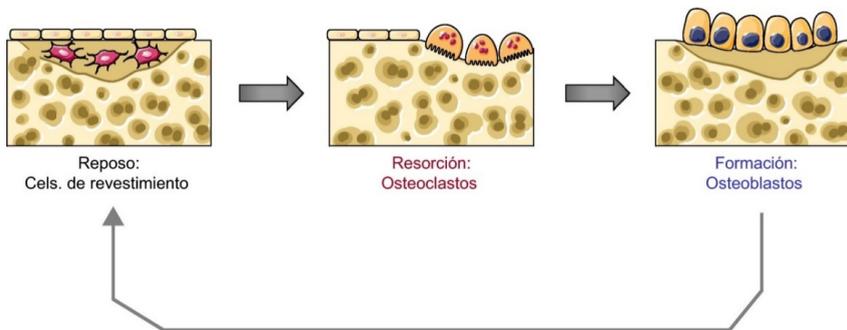


Figura I. Representación esquemática de las células implicadas en el remodelado óseo. (Extraída de *J. Reumatol. Clin.*, **2011**, 7, S1-S4).

En el proceso de remodelado óseo, en primer lugar, se produce la resorción, y para ello el primer paso es la activación de los osteoclastos, que implica el reclutamiento y la activación de sus precursores mononucleares monocito-macrófago de la circulación y la fusión de múltiples células mononucleares para formar los preosteoclastos multinucleados. Una vez están activados los osteoclastos, la resorción ósea tiene lugar a través de la secreción de H^+ y de la enzima catepsina K que estos producen. Los protones acidifican el compartimento de resorción debajo de los osteoclastos para disolver el componente mineral de la matriz ósea, mientras que la catepsina K digiere la matriz proteica que está formada mayoritariamente por colágeno tipo I¹.

Las células del linaje osteoblástico estimulan la resorción a través de la producción de RANKL (ligando del receptor activador del factor nuclear kB (NF-kB)), situado en la superficie de osteoblastos y pre-osteoblastos. La unión a RANKL del receptor RANK (receptor activador del factor nuclear kB), situado en la membrana de osteoclastos y pre-osteoclastos,

¹ Clarke, B. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, **2008**, 3, S131-S139.

² Sandhu, S. K., Hampson, G. J. *Clin. Pathol.*, **2011**, 64, 1042-1050.

produce la activación de vías intracelulares complejas, lo que da lugar a la inducción de genes osteoclastogénicos, originando así la formación y activación de osteoclastos y, por lo tanto, la resorción ósea. Además de RANKL, los osteoblastos producen osteoprotegerina (OPG), que es una proteína soluble que guarda una amplia similitud estructural con RANK, y que actúa como señuelo receptor evitando que RANKL se una a RANK, inhibiendo así su acción y, en consecuencia, la resorción ósea².

La ratio entre RANK y OPG es un factor clave en el remodelado óseo normal y en la fuerza y masa ósea. La formación, activación y actividad resorptiva de los osteoclastos está regulada principalmente por esta ratio, aunque también influyen IL-1, IL-6, factor estimulador de colonias (CSF), hormona paratiroidea, 1,25-dihidroxitamina D y calcitonina.

Tras la fase de resorción, se inicia la síntesis de nueva matriz ósea a través de los osteoblastos, que más adelante se mineralizará dando lugar a la formación de hueso nuevo que sustituye al viejo destruido por los osteoclastos.

Cuando los osteoclastos finalizan la resorción en una unidad de remodelado desaparecen por apoptosis. En cambio, los osteoblastos cuando finalizan la síntesis de matriz, aunque en una cierta proporción también sufren apoptosis, muchos de ellos quedan embebidos en la matriz que van sintetizando y se transforman en osteocitos. Finalmente, algunos osteoblastos se transforman en células de revestimiento que tapizan las superficies óseas.

² Sandhu, S. K., Hampson, G. J. *Clin. Pathol.*, **2011**, *64*, 1042-1050.

La microestructura del hueso está diseñada para proporcionar la máxima fuerza con la mínima masa, según las necesidades fisiológicas del organismo³. Sin embargo, el remodelado de los huesos que ocurre a microescala a través de todo el esqueleto, es imprescindible para mantener sus funciones normales, ya que se encarga de reparar microlesiones producidas por la fatiga (microfracturas) cuya acumulación podría poner en peligro la resistencia del hueso. El remodelado de los huesos también proporciona cierta adaptación de la estructura ósea a requerimientos físicos predominantes, y permite disponer de un reservorio de calcio fácilmente movilizable que ayuda a mantener la homeostasis en caso de trastornos que produzcan alteraciones en la calcemia⁴.

Aualmente se renueva aproximadamente el 10% del esqueleto, con lo que se renueva en su totalidad cada 10 años a lo largo de toda la vida adulta. Este proceso se inicia antes del nacimiento y se mantiene hasta la muerte, pero es crucial durante la adolescencia, etapa en la que la formación ósea es mayor que la resorción, lo que da lugar a la adquisición del 40% de la masa ósea total y al alcance del pico de masa ósea. A lo largo de los años posteriores se alcanza un equilibrio entre ambos procesos manteniéndose estable la masa ósea, pero antes de la menopausia en mujeres y a edades más avanzadas en hombres, el proceso de resorción supera al de formación y esto da lugar a una disminución paulatina de la masa ósea alcanzada al final de la maduración ósea⁵.

³ Boyle, W. J., Simonet, W. S., Lacey, D. L. *Nature*, **2003**, 423, 337-342.

⁴ Riancho, J. A., Delgado-Calle, J. *Reumatol. Clin.*, **2011**, 7, S1-S4.

⁵ Arboleya, L., Castañeda, S. *Reumatol Clin.*, **2013**, 9, 303-315.

En ausencia de enfermedad, el espacio de remodelado, que es la diferencia entre el corto periodo de resorción y el largo periodo de formación, no provoca consecuencias estructurales relevantes. Sin embargo, cuando existe un desequilibrio entre ambos procesos y aumenta la frecuencia de activación de unidades de remodelado, como sucede en la menopausia, el espacio de remodelado se incrementa y puede provocar un aumento de la fragilidad ósea, ya que hay muchas lagunas abiertas sin que haya finalizado el proceso de relleno osteoblástico.

Muchas enfermedades del esqueleto se producen por un exceso de actividad osteoclástica, que produce un desequilibrio en el remodelado óseo a favor de la resorción, como es el caso de la osteoporosis. Esta enfermedad se caracteriza por producir un desorden esquelético sistémico, que da lugar a una reducción de la fuerza ósea, un aumento de la susceptibilidad a sufrir fracturas y de la fragilidad esquelética y a una interrupción de la microarquitectura ósea.

La osteoporosis puede estar causada por diversos factores, como puede ser un fallo al alcanzar el pico de masa ósea, un exceso de resorción y/o un descenso de la formación ósea, estos dos últimos producidos durante el remodelado, pero también hay que tener en cuenta los factores genéticos ya que son los mayores determinantes del pico de masa ósea y de la pérdida de hueso.

La osteoporosis está ampliamente extendida y constituye un importante problema para la sociedad tanto a nivel sanitario como financiero, ya que afecta a 1 de cada 2 mujeres y 1 de cada 5 hombres. Tiene un mayor impacto en las mujeres sobre todo a partir de la menopausia puesto que

el remodelado óseo aumenta en la perimenopausia (etapa previa a la menopausia) y en la postmenopausia temprana, después se ralentiza con el envejecimiento, pero continúa en un grado más elevado que en mujeres premenopáusicas, y es conocido que el desequilibrio en el remodelado óseo en esta etapa está producido por la deficiencia de estrógenos, ya que estos poseen una potente acción antirresortiva directa o indirecta implicando a otras citocinas. En cambio, se cree que el remodelado aumenta levemente en los hombres a medida que envejecen.

Entre las consecuencias más graves de la enfermedad está la fractura de cadera junto con otras fracturas óseas, y además la osteoporosis se asocia con un aumento del riesgo de mortalidad y una reducción de la calidad de vida, con hasta un 50% de pacientes que quedan con movilidad reducida.

1.1.2 Tratamientos actuales

En la actualidad hay múltiples opciones terapéuticas disponibles para el tratamiento de la osteoporosis, cuyo objetivo es reducir el riesgo de fracturas, tanto vertebrales como no vertebrales. Como tratamiento no farmacológico, existe una serie de recomendaciones entre las que se encuentran: un aporte adecuado de calcio (1000 - 1200 mg diarios) y vitamina D (800 – 1000 UI diarias) procedentes de los alimentos o, en caso de que la ingesta sea insuficiente, mediante el uso de suplementos, puesto que el déficit de calcio puede reducir el pico de masa ósea y aumentar la pérdida de masa ósea asociada a la edad. Los aportes de calcio y vitamina D disminuyen el riesgo de fractura en mujeres de edad avanzada, pero hay poca evidencia de que los suplementos de calcio

disminuyan el riesgo de fractura en otros grupos de población. Aunque se utilicen de forma estandarizada, puesto que han formado parte de todos los ensayos de fármacos para la prevención de osteoporosis que han demostrado eficacia antifractura, probablemente con una dieta equilibrada que asegurara su aporte sería suficiente. Es especialmente importante una adecuada nutrición con vitamina D en ancianos que pueden estar confinados en casa y privados de la luz del sol.

Las recomendaciones también abarcan cambios en el estilo de vida que incluyan ejercicio físico, evitar el consumo de tabaco y el consumo excesivo de alcohol, así como medidas activas para la prevención de caídas⁶.

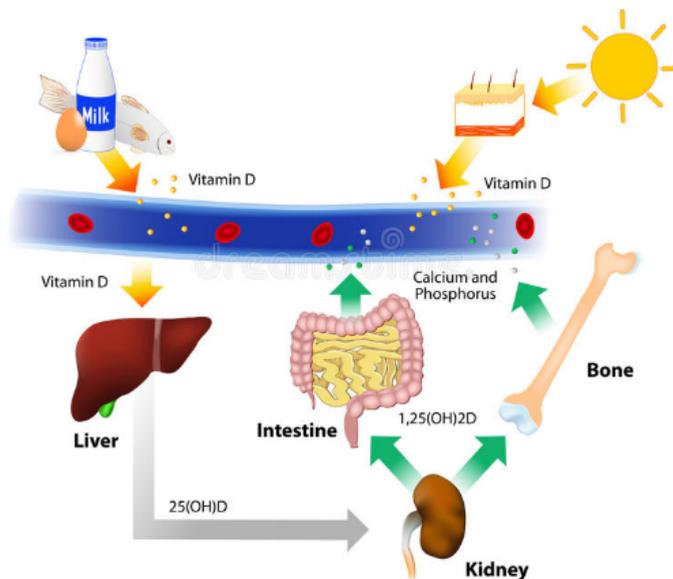


Figura II. Representación esquemática del metabolismo de la vitamina D.

⁶ Caamaño, M., Graña, J., Hernández, I., Mosquera, J. A., Romero, S. *Galicia. Clin (Supl1)*, 2014, 75, S5-S23.

Los fármacos empleados para el tratamiento de la osteoporosis se clasifican en cuatro categorías:

- los formadores de hueso o anabólicos
- los antirresortivos o anticatabólicos
- los que tienen una acción combinada de ambos efectos
- la terapia hormonal sustitutiva (THS)

En la categoría de los formadores de hueso se encuentra la teriparatida. La hormona paratiroidea endógena o parathormona humana (PTH) está formada por 84 aminoácidos (aa) y es la encargada principal del mantenimiento de la homeostasis del calcio, lo que significa que regula el metabolismo del calcio y del fósforo en el hueso y el riñón. La teriparatida es el fragmento activo de la PTH (del aa 1 al 34) cuyas acciones fisiológicas incluyen la estimulación de la formación de hueso por efecto directo sobre los osteoblastos, ya que éstos expresan el receptor de PTH y el aumento indirecto de la absorción intestinal de calcio por medio de la vitamina D, aumentando también la reabsorción tubular de calcio y la excreción de fosfato⁷. Este fármaco está indicado para el tratamiento de la osteoporosis en mujeres postmenopáusicas y varones con aumento de riesgo de fractura, pero presenta como inconveniente que es un fármaco inyectable que ha de administrarse diariamente⁸.

En la categoría de los fármacos que presentan acción combinada, encontramos el ranelato de estroncio y los moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERM). El ranelato de estroncio ha demostrado

⁷ Güerri, R., Sole, E., Nogués, X., Díez-Pérez, A. *Osteoporos. Metab. Miner.*, **2010**, 2, S18-S23.

⁸ Forsteo® Ficha Técnica. Disponible en: www.aemps.gob.es (CIMA).

en ensayos *in vitro* la capacidad de aumentar la formación de hueso en los cultivos de tejido óseo, así como la replicación de los precursores de osteoblastos y la síntesis de colágeno en los cultivos de células óseas. Además, reduce la pérdida de hueso al disminuir la diferenciación de los osteoclastos y la actividad de resorción. Esto da lugar a que el balance del recambio óseo se incline a favor de la formación de hueso. Este tratamiento está indicado para osteoporosis en mujeres postmenopáusicas y hombres adultos con alto riesgo de fracturas no aptos para recibir otro tratamiento alternativo, ya que presenta varias reacciones adversas de importancia (pérdida de memoria, parestesia, vértigo y tromboembolia venosa entre otras) que aparecen con frecuencia. Además, aunque se administra por vía oral, presenta una biodisponibilidad del 25% puesto que tiene una escasa absorción que se ve alterada con la ingesta de alimentos⁹.

Los moduladores selectivos de los receptores estrogénicos constituyen un grupo de fármacos con una estructura química que les confiere una alta afinidad para unirse a los receptores estrogénicos y que, dependiendo del tipo de célula y de tejido diana donde se realiza la unión, producen efectos agonistas o antagonistas. Los efectos biológicos de estos fármacos dependen también de la regulación de la expresión génica. Actúan como agonistas en el hueso, y como antagonistas en los tejidos uterino y mamario. A través de este mecanismo, disminuyen la resorción ósea, reducen los marcadores bioquímicos del recambio óseo al rango premenopáusico y aumentan la densidad mineral ósea. Dentro de esta familia de fármacos, los más utilizados son el raloxifeno y el bazedoxifeno. El raloxifeno está indicado para el tratamiento y la

⁹ Ranelato de estroncio Ficha Técnica. Disponible en www.aemps.gob.es (CIMA).

prevención de la osteoporosis en mujeres postmenopáusicas, mientras que el bazedoxifeno únicamente para el tratamiento en mujeres postmenopáusicas con riesgo incrementado de fracturas. Ambos se administran por vía oral, no se ven afectados por la ingesta con alimentos y se absorben rápido, pero presentan una biodisponibilidad muy baja, siendo para el raloxifeno del 2% y para el bazedoxifeno de aproximadamente el 6%¹⁰.

En la categoría de los antirresortivos o anticatabólicos, encontramos el denosumab y los bisfosfonatos. El RANKL se expresa como una proteína soluble o transmembrana y es esencial para la formación, función y supervivencia de los osteoclastos, el único tipo de célula responsable de la resorción ósea. Denosumab es un anticuerpo monoclonal humano (IgG2) que se dirige y se une con gran afinidad y especificidad al RANKL impidiendo la activación de su receptor, RANK, en la superficie de los precursores de los osteoclastos y en los osteoclastos, e impidiendo por lo tanto la resorción ósea. Este fármaco está indicado para el tratamiento de la osteoporosis en mujeres postmenopáusicas y varones con elevado riesgo de fracturas. Presenta una biodisponibilidad bastante elevada, del 62%, ya que se administra por vía subcutánea. Tiene la ventaja de que la dosis se administra cada 6 meses, pero lo tienen que hacer los profesionales de la salud¹¹.

Dentro de esta misma categoría tenemos los bisfosfonatos (Figura III). Por la experiencia acumulada en su uso y su precio, los bisfosfonatos orales son de primera elección para iniciar el tratamiento de la

¹⁰ (a) Raloxifeno Ficha Técnica. Disponible en: www.aemps.gob.es (CIMA) (b) Conbriza® Ficha Técnica. Disponible en: www.aemps.gob.es (CIMA).

¹¹ Prolia® Ficha Técnica. Disponible en: www.aemps.gob.es (CIMA).

osteoporosis y también para el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica. Además, son los inhibidores de la resorción ósea en uso clínico más potentes y efectivos. Los bisfosfonatos son análogos activos y estables de los pirofosfatos que actúan inhibiendo la resorción ósea, y a altas dosis pueden inhibir la mineralización.

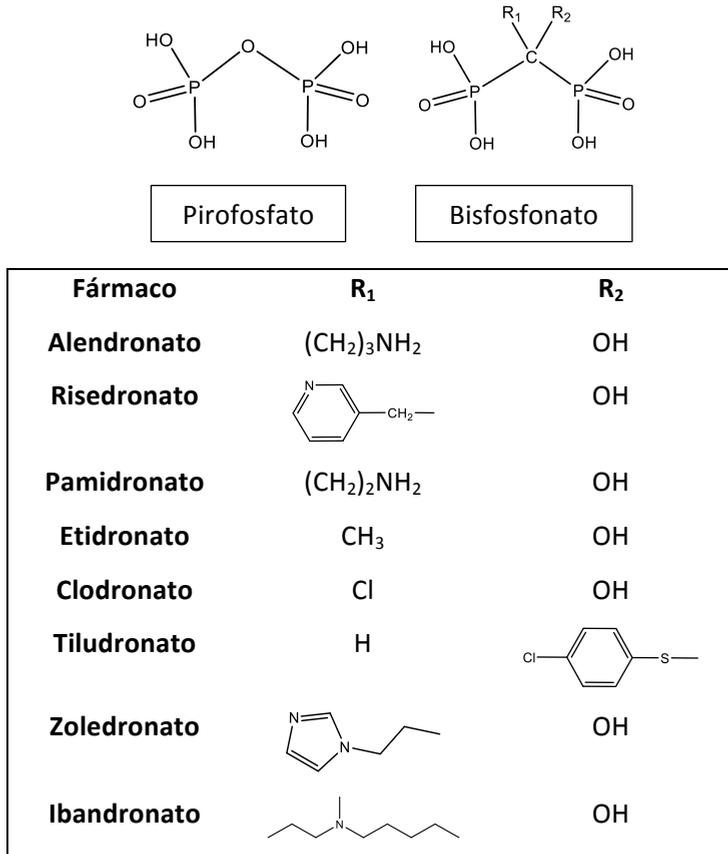


Figura III. Estructura del pirofosfato y sus análogos activos, los bisfosfonatos.

Los bisfosfonatos se pueden dividir en dos clases: los que contienen nitrógeno como el alendronato, risedronato y pamidronato entre otros, y los que no, como etidronato, clodronato y tiludronato. Debido a su estructura P-C-P y su capacidad de quelar iones de calcio, se dirigen

rápidamente al mineral óseo y esto, sumado a la presencia o ausencia de nitrógeno en su estructura, les confiere especificidad en la acción intracelular. Así, vemos que mientras la inducción de la apoptosis juega un papel clave en la inhibición de la resorción producida por etidronato y clodronato, en el caso del alendronato y el risedronato, la supresión de la resorción ósea es independiente de sus efectos sobre la apoptosis¹².

A partir de este momento nos centraremos especialmente en el alendronato puesto que es uno de los fármacos más utilizados en el tratamiento de la osteoporosis y el que se ha empleado para los estudios con fármaco realizados en esta tesis. El alendronato se localiza preferentemente en las zonas de resorción ósea, específicamente bajo los osteoclastos e inhibe la resorción ósea osteoclástica sin efecto directo sobre la formación de hueso. Sin embargo, como la formación ósea y la resorción van paralelas, se reduce también la formación, si bien esta supera a la resorción y así se gana progresivamente masa ósea. Durante la resorción ósea por los osteoclastos, el pH ácido en la laguna de resorción produce la disociación de los bisfosfonatos de la superficie mineral ósea, seguida por la absorción intracelular. La localización intracelular de estos compuestos son las vesículas endocíticas. La acidificación de estas vesículas intracelulares es necesaria para permitir el movimiento de los bisfosfonatos de las vesículas al citosol y presumiblemente a otros orgánulos como los peroxisomas, donde estos fármacos producen su efecto bioquímico¹³. El alendronato es un fármaco

¹² Halasy-Nagy, J. M., Rodan, G. A., Reszka, A. A. *Bone*, **2001**, 29, 553-559.

¹³ Rogers, M. J., Crockett, J. C., Coxon, F. P., Mönkkönen, J. *Bone*, **2011**, 49, 34-41.

que se administra por vía oral semanalmente, pero su principal problema es que presenta una biodisponibilidad muy baja, de tan solo el 0,64%¹⁴.

Por último, está la terapia hormonal sustitutiva que se considera tratamiento de última línea para la osteoporosis en mujeres postmenopáusicas. Sólo se emplea en casos de elevado riesgo de fractura en los que no se pueda poner en marcha otro tipo de medidas ni administrarse otro tipo de tratamiento, puesto que no se descarta que produzca un incremento de riesgo de cáncer de mama tras exposiciones prolongadas⁶.

1.2 Materiales mesoporosos

1.2.1 Antecedentes

Uno de los retos que se plantea en la actualidad en el desarrollo de medicamentos es encontrar nuevos métodos o sistemas de administración que representen alternativas más eficaces y seguras que las formas farmacéuticas ya disponibles. Algunos fármacos, que resultan adecuados para el tratamiento de la patología para la que están indicados, presentan un índice terapéutico estrecho o requieren niveles elevados en un determinado lugar del organismo. En estos casos el uso de formas de dosificación convencionales, que implican una distribución del principio activo en todo el organismo, de forma no selectiva, puede dar lugar a una toxicidad inaceptable o una respuesta terapéutica limitada. Por ello, en muchos casos, resulta conveniente buscar formas de dosificación alternativas que permitan un mejor acceso del fármaco a su lugar de acción.

¹⁴ Ácido alendrónico Ficha Técnica. Disponible en: www.aemps.gob.es (CIMA).

En la respuesta terapéutica y tóxica que producen los medicamentos deben considerarse dos aspectos: el tiempo que permanece el fármaco en el lugar de acción (aspecto temporal) y la cantidad de fármaco que llega a su diana terapéutica (aspecto espacial).

El aspecto temporal es posible modificarlo mediante los sistemas de *liberación controlada*, que tratan de conseguir una cinética de liberación de orden cero para obtener una concentración plasmática de fármaco que se sitúe en el ámbito terapéutico y se mantenga durante el tiempo que se prolongue la liberación del fármaco desde la forma farmacéutica que lo contiene. De esta forma disminuye la oscilación entre la concentración máxima y mínima, que se obtiene tras la administración de formas farmacéuticas convencionales de liberación rápida, y con ello se reducen o eliminan los efectos adversos derivados de la medicación relacionados con la oscilación de las concentraciones plasmáticas.

Conseguir un éxito en el aspecto espacial exige que la liberación del fármaco se produzca de forma selectiva en el lugar de acción lo que actualmente se conoce como vectorización de fármacos. Así pues, la liberación dirigida hacia lugares específicos trata de asegurar que el fármaco sea liberado en el lugar requerido, y al mismo tiempo se restrinja el acceso del mismo a cualquier otro lugar del organismo. En este caso, los fármacos requieren tener unas propiedades fisicoquímicas que les permitan atravesar las barreras fisiológicas, como son los epitelios, membranas celular y nuclear, así como ser estables tanto física como químicamente en fluidos biológicos.

Durante algún tiempo, en el caso de la liberación dirigida hacia lugares específicos, el interés de los investigadores se centró en el uso de

micelas, liposomas o nanopartículas poliméricas como transportadores. Más recientemente, se inició el empleo de materiales inorgánicos.

En función del tamaño de poro, los sólidos inorgánicos pueden ser clasificados como microporosos (diámetro de poro ≤ 2 nm), mesoporosos (diámetro de poro 2 - 50 nm) y macroporosos (diámetro de poro ≥ 50 nm)¹⁵. Entre los típicos materiales microporosos encontramos las zeolitas¹⁶, pero la mayor dimensión de poro encontrada es de 1,2 – 1,3 nm para algunos metalofosfatos¹⁷ y 1,4 nm para la cacoxenita¹⁸. Como ejemplos de sólidos mesoporosos encontramos las sílicas, pero son materiales invariablemente amorfos con poros de tamaño y distribución irregular. Por esta razón, tuvo tanta relevancia, en 1992, la aparición de una nueva familia de materiales sintéticos de sílice denominados M41S que podían actuar como soportes sólidos¹⁹. Estos sólidos se caracterizan por poseer una colección regular de canales uniformes cuya estructura y dimensión puede ser adaptada durante la síntesis modificando las condiciones de reacción. Esta familia consta de 3 clases: una hexagonal denominada MCM-41 (Mobile Crystalline Material), una cúbica denominada MCM-48 y una laminar denominada MCM-50.

¹⁵ IUPAC Manual of Symbols and Terminology, *Pure Appl. Chem.*, **1972**, 31, 578.

¹⁶ Davis, M. E., Saldarriaga, C., Montes, C., Garces, J., Crowder, C. *Nature*, **1988**, 331, 698.

¹⁷ Estermann, M., McCusker, L. B., Baerlocher, C., Merrouche, A., Kessler, H. *Nature*, **1991**, 352, 320.

¹⁸ Moore, P. B., Shen, J. *Nature*, **1983**, 306, 356.

¹⁹ (a) Kresge, C. T., Leonowicz, M. E., Roth, W. J., Vartuli, J. C., Beck, J.S. *Nature*, **1992**, 359, 710-712. (b) Beck, J. S., Vartuli, J. C., Roth, W. J., Leonowicz, M. E., Kresge, C. T., Schmitt, K. D., Chu, C. T. W., Olson, D. H., Sheppard, E. W. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 10834-10843.

En el campo de la liberación controlada de fármacos, los materiales mesoporosos (MSNs) de sílice han demostrado ser los sistemas de elección en muchas ocasiones²⁰. Así, desde que en el año 2001 se propuso por primera vez el uso de MCM-41 como un sistema para la liberación de fármacos, se ha generado un amplio conocimiento sobre las relaciones que se establecen entre las propiedades estructurales de este material y las de adsorción y liberación de los fármacos ocluidos. Por otra parte, las modificaciones químicas producidas por funcionalización con compuestos orgánicos han contribuido a un control más preciso tanto de los procesos de cargado como de liberación.

La liberación controlada presenta numerosas ventajas frente a la administración habitual como son las siguientes:

- No es necesario administrar el fármaco en forma de profármaco, es decir, no requiere una modificación de su estructura para que pueda atravesar determinadas barreras.
- Permite reducir los efectos secundarios y administrar menores dosis a la vez que protege al fármaco de la degradación por el medio, puesto que la liberación se produce únicamente en el lugar de acción, que es donde está presente el estímulo correspondiente.

²⁰ (a) Jin, S., Ye, K. *Biotechnol. Prog.*, **2007**, *23*, 32-41. (b) Andersson, J., Rosenholm, J., Areva, S., Linden, M. *Chem. Mater.*, **2004**, *16*, 4160-4167. (c) Balas, F., Manzano, M., Horcajada, P., Vallet-Regi, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 8116-8117. (d) Chung, T., Wu, S., Yao, M., Lu, C., Lin, Y., Hung, Y., Mou, C., Chen, Y., Hyang, D. *Biomaterials*, **2007**, *28*, 2959-2966. (e) Lai, C. Y., Trewyn, B. G., Jeftinija, D. M., Jeftinija, K., Xu, S., Jeftinija, S., Lin, V. S. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 4451-4459. (f) Munoz, B., Ramila, A., Perez-Pariente, J., Diaz, I., Vallet-Regi, M., *Chem. Mater.*, **2003**, *15*, 500-503. (g) Vallet-Regi, M., Balas, F., Arcos, D. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 7548-7558.

- La estructura mesoporosa, también ofrece la posibilidad de cargar una amplia variedad de biomoléculas, incluyendo aquellas que son impermeables a la membrana celular o incompatibles con fluidos biológicos, facilitando así su administración.
- Este método de encapsulación hace posible la liberación simultánea de uno o más agentes terapéuticos para conseguir sinergia terapéutica.
- Las propiedades farmacocinéticas y de biodistribución de la carga pueden ser controladas manipulando las propiedades de superficie de las nanopartículas.

Los materiales mesoporosos (MSNs) presentan una serie de características que les confieren un especial interés como son²¹:

- No son tóxicos y resultan biocompatibles.
- Pueden prepararse con grandes superficies, tamaños de poro variables y una estructura interna hexagonalmente ordenada y bien definida. Son pues muy versátiles.
- Presentan estabilidad térmica y química y una velocidad de degradación controlable.
- Su superficie es susceptible de ser modificada de modo controlado, dando lugar a materiales híbridos.

En la mayor parte de los sistemas descritos, el fármaco se encuentra adsorbido en el interior del MSN o como mucho retenido mediante interacciones electrostáticas por lo que con el tiempo se va produciendo

²¹ (a) Trewyn, B., Slowing, I., Giri, W., Chen, H., Lin, V. *Acc. Chem. Res.*, **2007**, *40*, 846-853. (b) Wang, L., Wang, K., Santra, S., Zhao, X., Hilliard, L., Smith, J., Wu, Y., Tan, W. *Anal. Chem.*, **2006**, *78*, 646-654.

su liberación. En este sentido, se han llevado a cabo estudios sobre la influencia que tienen sobre la velocidad de liberación factores tales como el tamaño y la geometría del poro o la funcionalización de la pared²².

Este tipo de materiales puede sintetizarse como nanopartículas o micropartículas en función de su tamaño lo que permite controlar si el fármaco penetra en las células o permanece fuera de las mismas. Hay estudios referentes a las propiedades de las nanopartículas que influyen en su internalización en las células, como la forma, la carga y las propiedades químicas de superficie, siendo la principal el tamaño.

La internalización de las nanopartículas se puede producir por transporte activo (en contra de gradiente y con consumo de energía) o pasivo (a favor de gradiente y sin consumo de energía) (figura IV). Dentro del transporte activo, las nanopartículas, al igual que aglomerados macromoleculares, partículas lipoprotéicas y virus, son encapsuladas y transportadas selectivamente al interior o exterior de las células vía endocitosis o exocitosis respectivamente. La endocitosis es un proceso biológico fundamental utilizado por las células para internalizar biomoléculas, y debido a su tamaño, también nanopartículas. Se puede producir por diferentes mecanismos en función del tamaño de la vesícula transportadora, las propiedades de carga y la maquinaria de internalización implicada. Los mecanismos son los siguientes:

²² (a) Brohede, U., Atluri, R., Garcia-Bennett, A. E., Strømme, M. *Curr. Drug Deliv.*, **2008**, *5*, 177-185. (b) Popovici, R. F., Seftel, E. M., Mihai, G. D., Popovici, E., Voicu, V. A. *J. Pharm. Sci.*, **2011**, *100*, 704-714.

- Fagocitosis: es una forma de endocitosis en la cual la célula envuelve grandes partículas. Puede ser llevada a cabo por células especializadas como macrófagos, neutrófilos y monocitos.
- Pinocitosis: consiste en la captación de material del espacio extracelular por invaginación de la membrana citoplasmática.

Además de entrar en las células por transporte activo, las nanopartículas también pueden atravesar la membrana celular mediante transporte pasivo. De hecho, para células carentes de maquinaria de endocitosis, cómo los glóbulos rojos, esta es la única opción.

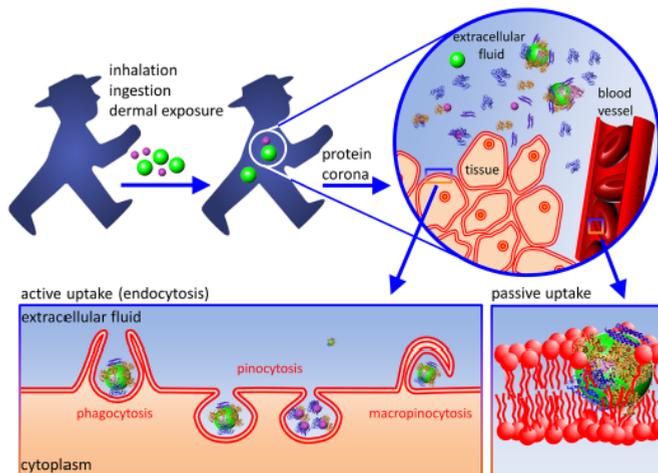


Figura IV. Esquema representativo de los mecanismos de captación celular.

(Extraído de *J. Nanobiotechnology*, 2014, 12, 5).

Aunque hay variaciones en función del tipo de nanopartículas y de células, el tamaño óptimo para la captación activa es 30 – 50 nm, mientras que en la captación pasiva de nanopartículas de sílice el tamaño

máximo que se adsorbe sin producir daños en la membrana celular es de 300 nm²³.

1.2.2 Síntesis de materiales mesoporosos

La síntesis de los sólidos mesoporosos ordenados requiere el empleo de tensoactivos en disolución acuosa, que forman agregados denominados micelas, cuya forma y tamaño depende esencialmente de la naturaleza y composición química de la molécula de tensoactivo, de su concentración y de la temperatura, aunque también influyen en el proceso de agregación micelar el pH de la disolución y la concentración salina total.

A su vez, las micelas se agrupan formando estructuras supramicelares, y la naturaleza de su fase varía en función de la concentración y la temperatura. En general, a temperaturas moderadas, las micelas cilíndricas se agrupan formando primeramente una fase hexagonal (MCM-41), que evoluciona a una fase cúbica (MCM-48) y posteriormente a una estructura laminar (MCM-50) a medida que la concentración de tensoactivo aumenta.

La MCM-41 es el soporte inorgánico elegido, en nuestro caso, debido a sus múltiples ventajas. En su preparación se emplea tetraetilortosilicato (TEOS) como precursor hidrolítico inorgánico y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) como surfactante. En el proceso de síntesis, los oligómeros de silicato presentes en disolución acuosa condensan entre sí alrededor de las micelas, que actúan a modo de plantilla, y se produce una fuerte interacción entre la parte polar

²³ (a) Shang, L., Nienhaus, K., Nienhaus, G. U. *J. Nanobiotechnology*, **2014**, *12*, 5.
(b) Lu, F., Wu, S., Hung, Y., Mou, C. *Small*, **2009**, *5*, 1408-1413.

hidrófila o cabeza de tensoactivo, cargada positivamente, y los oligómeros de silicato, cargados negativamente. Como resultado del proceso de ensamblaje de las especies de silicato en disolución y las micelas, se obtiene un producto sólido que contiene una elevada cantidad de tensoactivo ocluido en su interior. Posteriormente se elimina el tensoactivo mediante extracción del sólido con disolventes o mediante calcinación en aire a temperatura elevada dando lugar a los poros de la estructura de sílice mesoporosa²⁴ (figura VI).

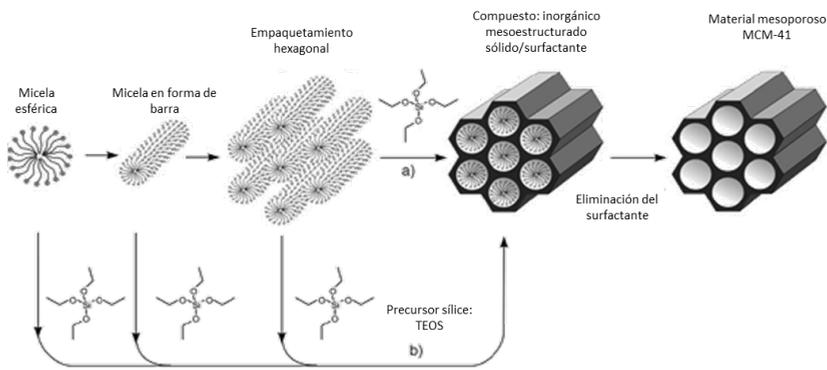


Figura VI. Representación esquemática de la síntesis de MCM-41. (Extraída de *Angew. Chem. Int. Ed*, **2006**, 45, 3216-3251).

1.2.3 Funcionalización MCM-41

Este tipo de soportes presenta facilidad de funcionalización, debido a que su superficie, tanto externa como interna, contiene una alta densidad de grupos silanol (Si–OH). Estos grupos silanol reaccionan, en condiciones suaves, con moléculas orgánicas conteniendo agrupaciones trialcoxisilánicas dando lugar a enlaces covalentes, tanto en el exterior

²⁴ Bernardos, A., Tesis doctoral “Desarrollo y síntesis de materiales híbridos, para la liberación controlada de moléculas bioactivas”, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, **2011**.

como en el interior de los poros. Esto permite manipular las condiciones de la superficie de carga y liberación del fármaco¹⁹. El proceso de funcionalización, en el cual se forman dichos enlaces covalentes, se puede llevar a cabo mediante dos procedimientos diferentes: co-condensación o *grafting*.

- Co-condensación: es el método de síntesis directa y se produce por la modificación de la superficie del sólido mesoporoso mediante la inclusión de un grupo orgánico en forma de alcoxisilano en el momento de la obtención del sólido. Este grupo orgánico puede influir en la morfología de las partículas, dependiendo de las propiedades de sus grupos funcionales para estabilizar o desestabilizar las micelas durante la formación del sólido (figura VII). De este modo, los grupos no polares estabilizan la formación de largas micelas cilíndricas individuales intercalando sus grupos hidrofóbicos dentro de las micelas, mientras que cuando la naturaleza del grupo funcional es hidrofílica, hay una menor estabilización de las mismas²¹.

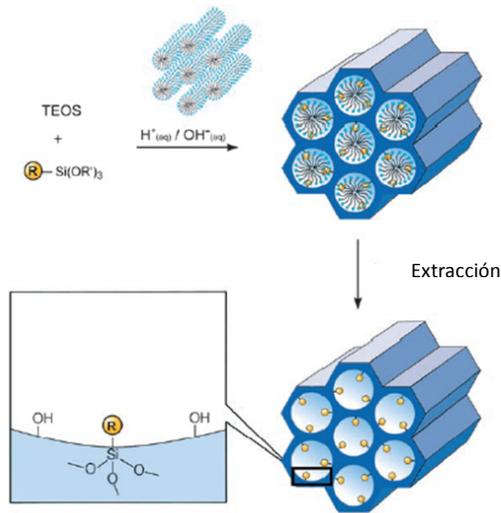


Figura VII. Representación esquemática de la funcionalización de la MCM-41 por co-condensación. (Extraída de *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 3216-3251).

Cómo ventajas, vemos que este método permite incorporar una amplia variedad de grupos funcionales, siempre y cuando no produzcan la rotura o deformación de la estructura del sólido mesoporoso. Sin embargo, presenta una serie de inconvenientes. El primero de ellos es que, en este procedimiento, la eliminación del surfactante no se puede llevar a cabo mediante calcinación, ya que a temperaturas tan elevadas la materia orgánica anclada sería eliminada junto con el surfactante. Por esta razón se elimina mediante extracción en medio ácido, que es un proceso más lento y menos eficiente. En segundo lugar, se observa que el grado de orden mesoscópico disminuye a medida que la concentración de trialkoxisilano aumenta en la reacción. Además, en este procedimiento la homocondensación entre grupos silanol aumenta, lo que significa que hay un menor

número de estos grupos disponibles para que las moléculas orgánicas con que queremos funcionalizar el sólido se anclen, y tampoco se puede garantizar una distribución homogénea de los grupos orgánicos a lo largo del sólido mesoporoso. Por último, pueden dar lugar a una reducción en el diámetro y volumen de poro y del área de superficie específica²⁵.

• *Grafting*: es el nombre que recibe el procedimiento de funcionalización de un sólido mesoporoso sintetizado previamente, y permite una modificación selectiva de la superficie del material. El método se basa en el anclaje de moléculas orgánicas en la superficie externa del sólido mesoporoso una vez ha sido eliminado el surfactante ocluido en su interior mediante calcinación o extracción²⁶ (figura VIII).

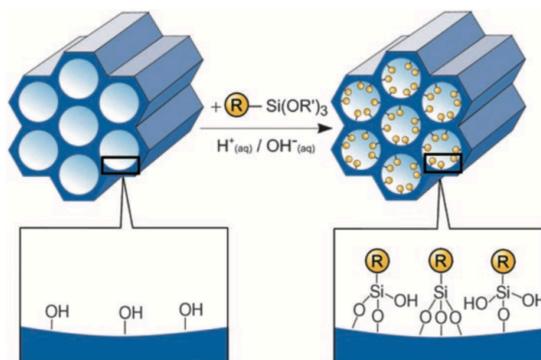


Figura VIII. Representación esquemática de la funcionalización de la MCM-41 por grafting. (Extraída de *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 3216-3251).

²⁵ (a) Moller, K., Bein, T. *Chem. Mater.*, **1998**, 10, 2950-2963. (b) Juárez, L.A., Tesis doctoral "*Design, synthesis and evaluation of chemosensors for NOx detection*", Universidad de Valencia, Valencia, **2016**

²⁶ Stein, A., Melde, B. J., Schrodin, R. C. *Adv. Mater.*, **2000**, 12, 1403-1419.

El anclaje de las moléculas orgánicas se produce mediante la formación de enlaces covalentes entre los grupos hidroxilo (Si-OH) presentes en la superficie del sólido mesoporoso y distintos derivados del alcoxilano, en función de qué grupos funcionales interese anclar. La distribución y concentración de los grupos funcionales está condicionada por la reactividad del derivado del alcoxilano y por su accesibilidad a los silanoles del sólido, que a su vez se ve limitada por factores estéricos y de difusión. De este modo, se observa que la distribución no es homogénea ya que la condensación está cinéticamente más favorecida en la superficie externa del sólido y cerca de las entradas del poro que en el interior de los canales, por lo que este procedimiento favorece la funcionalización externa del sólido.

La funcionalización por *grafting* presenta una serie de ventajas que la hacen deseable frente a la co-condensación. En primer lugar, este procedimiento ofrece la posibilidad de caracterizar el derivado orgánico del alcoxilano antes de la funcionalización. Además, permite una extracción del surfactante más rápida y eficiente ya que se puede llevar a cabo mediante calcinación. Por último, este método ofrece la posibilidad de cargar los poros con las moléculas de interés (generalmente colorante o fármaco) antes de funcionalizarlo por la superficie externa con otra serie de moléculas orgánicas que actuarán como “puertas moleculares” dando lugar a materiales híbridos que permitan una liberación controlada de la sustancia ocluida en su interior.

1.2.4 Características

Este tipo de soportes mesoporosos posee una serie de características que los hacen potencialmente muy útiles en aquellos procesos que requieran la adsorción de cantidades significativas de moléculas voluminosas. Presentan una matriz inorgánica adecuada debido a su porosidad regular, tanto en tamaño como en forma, y homogeneidad, con un tamaño de poro comprendido entre los 2 y 10 nm, elevado volumen de poro del orden de $1 \text{ cm}^3/\text{g}$, alta superficie específica comprendida entre $500 \text{ m}^2/\text{g}$ y $1000 \text{ m}^2/\text{g}$, estabilidad térmica de la estructura tridimensional, inercia química, biocompatibilidad, fácil reproducibilidad y, como se ha mencionado anteriormente, facilidad de funcionalización¹⁹. Además, los mesoporos internos de estos materiales pueden servir como microambiente seguro donde cargar las moléculas y que estén protegidas de la degradación o desactivación antes de alcanzar la diana terapéutica, y en el caso de las nanopartículas, su tamaño permite una rápida absorción y liberación de los compuestos seleccionados.

Hay varios factores que influyen en la eficiencia, cinética y mecanismo de captación intracelular de estos materiales:

- Propiedad de superficie: la funcionalización de la superficie externa de la MCM-41 puede emplearse para regular su captación por las células²⁷.
- Tamaño de partícula y afinidad de agregación: se ha investigado el efecto que tiene sobre la endocitosis tanto el

²⁷ Slowing, I., Trewyn, B. G., Lin, V. S. Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 14792-14793.

tamaño de las partículas, como la forma y aglomeración de las mismas, y se ha visto que las partículas más pequeñas con una mayor dispersabilidad en solución acuosa presentan mayor eficiencia de endocitosis y una cinética más rápida que partículas de mayor tamaño²⁸.

- Morfología de la partícula: la captación celular de la MCM-41 depende tanto de la morfología de la partícula como de la línea celular. Un estudio de Tang y colaboradores corroboró que hay una mayor eficiencia y velocidad de endocitosis para partículas de morfología tubular que esférica²⁹.

Todos estos factores inducen a pensar que la absorción intracelular de las nanopartículas de sílice mesoporosa puede ser regulada eligiendo una formulación apropiada, de manera que abre la posibilidad de lograr una alta especificidad y eficacia en la administración controlada de fármacos.

1.2.5 Caracterización

La caracterización de este tipo de materiales se lleva a cabo mediante una serie de técnicas que aportan información acerca de la estructura mesoporosa del sólido, la presencia de una matriz hexagonal regular y de canales uniformes, la morfología y el diámetro de las partículas, el diámetro y volumen de poro, la distribución de tamaño de poro, el área total específica y área de superficie, así como la uniformidad de los mesoporos. Se realiza una primera caracterización del material antes de

²⁸ Trewyn, B. G., Nieweg, J. A., Zhao, Y., Lin, V. S. Y. *Chem. Eng. J.*, **2008**, *137*, 23-29.

²⁹ Huang, X., Teng, X., Chen, D., Tang, F., He, J. *Biomaterials*, **2010**, *31*, 438-448.

la funcionalización, para determinar todos los parámetros arriba mencionados, y se vuelve a caracterizar una vez realizada la carga del mismo y la modificación superficial para determinar si se han producido variaciones sustanciales en el soporte inorgánico durante el proceso de preparación de los materiales híbridos.

El procedimiento estándar de caracterización incluye las siguientes técnicas:

- Microscopía de transmisión de electrones (TEM): las imágenes del TEM revelan la morfología de las partículas y su tamaño, permitiendo determinar el diámetro de partícula. Además, aportan información acerca del estado de los canales de la matriz hexagonal de las nanopartículas, puesto que si se trata del sólido inicial y los poros están vacíos, los canales se observan como rayas blancas y negras alternas, mientras que cuando se trata del sólido final en el que los poros están cargados, se ven los canales opacos^{19,30} (figura IX).

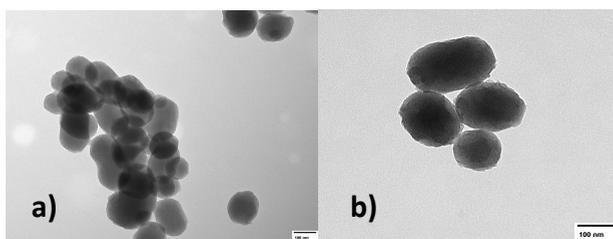


Figura IX. Imágenes del TEM: a) MCM-41 calcinada; b) MCM-41 cargada y cerrada con la puerta molecular.

³⁰ Juárez, L. A., Añón, E., Giménez, C., Sancenón, F., Martínez-Máñez, R., Costero, A. M., Gaviña, P., Parra, M., Bernardos, A. *Chem. Eur. J.*, **2016**, *22*, 14126-14130.

- Difracción de rayos X de polvo: aporta información acerca de la presencia de una estructura mesoporosa y de su estabilidad. Se realiza en la MCM-41 antes de calcinar, después de calcinar y una vez cargada con la molécula de interés y cerrada con la puerta molecular.

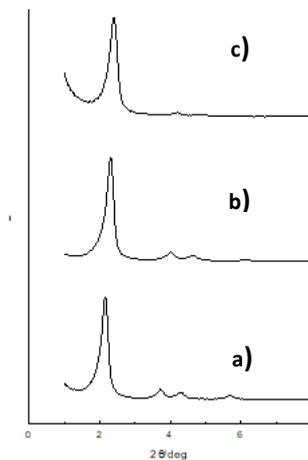


Figura X. Ejemplo de difracción de rayos X de polvo: a) MCM-41 antes de calcinar; b) MCM-41 calcinada; c) MCM-41 cargada y cerrada con una puerta molecular.

En la gráfica que proporciona esta técnica podemos ver que en la MCM-41 antes de calcinar se observan cuatro reflexiones características de bajo ángulo de una matriz hexagonal ordenada que aparecen a (100), (110), (200) y (210). En la MCM-41 calcinada se produce un desplazamiento significativo del pico de (100) que concuerda con la condensación de silanoles durante la calcinación. Por último, en la MCM-41 cargada y cerrada se observa un ensanchamiento de los picos a (100) y (200) debido a una

reducción en el contraste relacionado con el proceso de funcionalización y con la carga de los mesoporos. Sin embargo, la intensidad del pico de (100) en este patrón es la que indica que ni el proceso de carga ni el anclaje de la puerta molecular han modificado la estructura mesoporosa del sólido³⁰ (figura X).

- Porosimetría: La estructura porosa se analiza mediante isotermas de adsorción-desorción de N₂ a 77 K. Aporta información acerca del diámetro y el volumen de poro, la distribución de tamaño de poro y el área total específica. Se realiza tanto de la MCM-41 calcinada como de la cargada con la molécula de interés y cerrada con la puerta molecular. En el caso de la MCM-41 calcinada, la curva muestra un escalón de adsorción con un valor P/P_0 que corresponde con una isoterma tipo IV típica de materiales mesoporosos. Se emplea el modelo BJH (Barrett-Joyner-Halenda) en la curva de adsorción de la isoterma para calcular el diámetro y el volumen de poro, y el modelo BET (Brunauer-Emmett-Teller) para calcular el área total específica. Otra característica remarcable de la curva es el típico ciclo de histéresis H1 que aparece en la isoterma a relativamente alta presión ($P/P_0 > 0,8$) y está asociado con una amplia distribución de tamaño de poro. Corresponde al llenado de los espacios entre las nanopartículas debido a la textura porosa. En el caso de la MCM-41 cargada y cerrada, se observa un menor volumen de nitrógeno adsorbido y una menor área de superficie que si se compara con la MCM-41 inicial debido al llenado de los poros.

Además, en este caso, el sólido presenta una curva sin espacios a valores de presión relativamente bajos en comparación con la MCM-41 inicial³⁰ (figura XI).

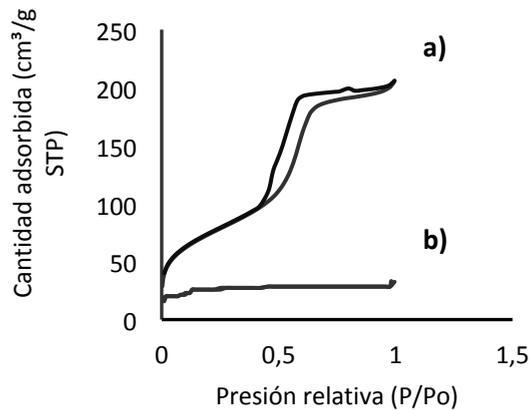


Figura XI. Isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno de (a) material mesoporoso calcinado MCM-41 y (b) material mesoporoso MCM-41 cargado de colorante y cerrado con la puerta molecular. (Extraída de *Chem. Eur. J.*, **2016**, *22*, 14126-14130).

- **Análisis termogravimétrico (TGA):** es una técnica analítica que permite medir la variación de peso de una muestra, frente a la temperatura o el tiempo, cuando se le aplica un programa de temperatura controlada y una atmósfera específica. Aporta información sobre la materia orgánica presente en la MCM-41, con lo que, junto con el análisis elemental se emplea para determinar la cantidad de puerta anclada al soporte inorgánico y la carga presente en el mismo.

1.2.6 Aplicaciones

Como se ha mencionado en puntos anteriores, este tipo de materiales inorgánicos pueden servir entre otras muchas aplicaciones para la liberación controlada y selectiva de fármacos, haciendo posible la entrega simultánea de uno o más agentes terapéuticos para lograr resultados sinérgicos, y además, las propiedades farmacocinéticas y de biodistribución de la carga pueden ser controladas mediante la manipulación de las propiedades superficiales del vehículo, es decir, de las partículas de sílice.

Los sólidos mesoporosos, al poder funcionalizarse de forma específica y tener una gran superficie interna, han demostrado ser útiles y ofrecer mejoras en la actividad, selectividad y estabilidad de una amplia variedad de reacciones catalíticas³¹ y procesos de absorción. Además, este tipo de sólidos se han empleado también para aplicaciones ópticas, así como para procesos de polimerización, adsorción y almacenamiento de gases³², sensores químicos y bioquímicos³³, procesos de filtración y separación³⁴, regeneración biomédica de tejido³⁵, inmovilización de especies biológicamente activas y aplicaciones medioambientales²⁶.

³¹ De Vos, D. E., Dams, M., Sels, B. F., Jacobs, P. A. *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 3615-3640.

³² Kruk, M., Jaroniec, M. *Chem. Mater.*, **2001**, *13*, 3169-3183.

³³ (a) Kilian, K. A., Böcking, T., Gaus, K., Gal, M., Gooding, J. J. *ACS Nano*, **2007**, *1*, 355-361. (b) Jane, A., Dronov, R., Hodges, A., Voelcker, N. H. *Trends. Biotechnol.*, **2009**, *27*, 230-239. (c) Ispas, C., Sokolov, I., Andreescu, S. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2009**, *393*, 543-554.

³⁴ Liu, X., Du, Y., Guo, Z., Gunasekaran, S., Ching, C., Chen, Y., Leong, S. S. J., Yang, Y. *Microporous Mesoporous Mater.*, **2009**, *122*, 114-120.

³⁵ Slowing, I. I., Trewyn, B. G., Giri, S., Lin, V. S.-Y. *Adv. Funct. Mater.*, **2007**, *17*, 1225-1236.

La flexibilidad en la elección de un soporte orgánico, inorgánico o híbrido, así como la amplia variedad de opciones a la hora de funcionalizarlo, tanto en la superficie interna como en la externa, permite controlar las propiedades del material y así, optimizarlo para cada aplicación.

1.3 Puertas moleculares

1.3.1 Definición y clases

Con el fin de mejorar el control en la liberación de fármacos se ha empleado una nueva aproximación que consiste en la preparación de “materiales inteligentes” que estén regulados mediante estímulos externos. El diseño de nano o micromateriales funcionalizados con puertas moleculares es un área de trabajo muy fértil y prometedora que está conduciendo a la química de coordinación tradicional y la química supramolecular a las fronteras de la nanociencia, la biología molecular y la bioquímica. Estos sistemas están inspirados en los bio-canales y las bio-puertas y en general en procesos biológicos que originan transformaciones desencadenadas por especies químicas específicas. Este tipo de compuestos se han empezado a preparar en los últimos años con fines tales como la translocación, el transporte molecular o la preparación de materiales nanoscópicos³⁶.

³⁶ (a) Casasús, R., Marcos, M. D., Martínez-Máñez, R., Ros-Lis, J. V., Soto, J., Villaescusa, L. A., Amorós, P., Beltrán, D., Guillem, C., Latorre, J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 8612-8613. (b) Aznar, E., Casasús, R., García-Acosta, B., Marcos, M. D., Martínez-Máñez, R., Sancenón, F., Soto, J., Amorós, P. *Adv. Mater.*, **2007**, *19*, 2228-2231. (c) Casasús, R., Climent, E., Marcos, M. D., Martínez-Máñez, R., Sancenón, F., Soto, J., Amorós, P., Cano, J., Ruiz, E. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 1903-1917.

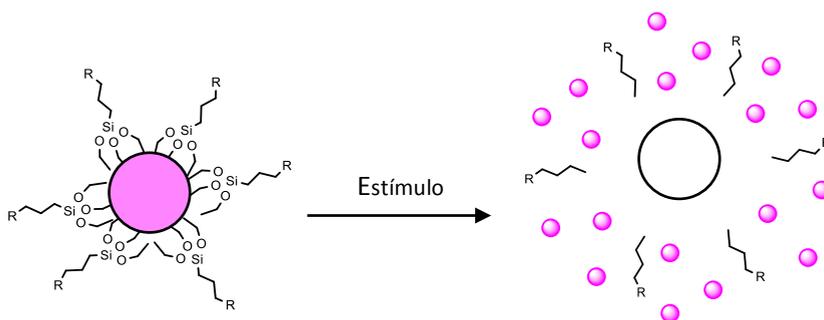


Figura XII. Esquema representativo del funcionamiento de una puerta molecular.

Teniendo en cuenta lo indicado anteriormente, el empleo de MSNs con poros cerrados por puertas moleculares que se puedan abrir en determinadas condiciones, garantizaría la llegada íntegra del fármaco a su punto de acción y supondría un extraordinario avance en el logro de una acción terapéutica más específica y por tanto más eficaz. En este campo, denominaríamos sistemas con puertas moleculares o supramoleculares aquellos dispositivos basados en materiales mesoporosos en los cuales el transporte de masa esté controlado por un estímulo externo que determine la situación (abierta o cerrada) en la que se encuentra la puerta. Una representación gráfica de este tipo de superestructuras se muestra en la figura XII. La figura muestra cómo la superficie externa del material está funcionalizada con moléculas adecuadas (“puertas”) y tras la actuación de un estímulo, dichas “puertas” se abren liberando su contenido, por ejemplo, un fármaco. La mayor utilidad de este sistema se obtendría cuando el estímulo externo estuviera provocado por algún compuesto o especie específica que se

encontrara en el medio como consecuencia de la situación patológica del entorno³⁷.

Con el fin de incrementar la eficacia de la apertura de la puerta se han preparado recientemente las denominadas puertas moleculares autoinmolantes. Estos sistemas están compuestos por moléculas autoinmolantes, que son agregados covalentes que, bajo la aplicación de un estímulo externo, inician una reacción de desensamblaje a través de una cascada de roturas de enlaces encadenadas, dando lugar a la liberación de sus fragmentos constituyentes³⁸. Este fenómeno químico, está normalmente favorecido por el aumento de la entropía y la formación de productos termodinámicamente estables, lo que hace que se produzca de forma espontánea e irreversible.

Los procesos autoinmolantes, se observan más comúnmente en especies aromáticas polisustituidas y ricas en electrones que tengan un sustituyente dador de electrones (como un residuo amino o hidroxilo) que esté en conjugación *orto* o *para* con un grupo saliente adecuado localizado en posición bencílica. Para modular la eliminación autoinmolante espontánea en condiciones fisiológicas en este tipo de compuestos, a veces es necesaria la incorporación de un grupo protector. El primer paso del proceso de autoinmolación implica un estímulo o desencadenante que da lugar a la eliminación del grupo

³⁷ (a) Patel, K., Angelos, S., Dichtel, W. R., Coskun, A., Yang, Y.-W., Zink, J. I., Stoddart, J. F. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 2382-2383. (b) Angelos, S., Yang, Y.-W., Patel, K., Stoddart, J. F., Zink, J. I. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 2222-2226. (c) Leung, K. C.-F., Nguyen, T. D., Stoddart, J. F., Zink, J. I. *Chem. Mater.*, **2006**, *18*, 5919-5928.

³⁸ Blencowe, C. A., Rusell, A. T., Greco, F., Hayes, W., Thornthwaite, D. W. *Polym. Chem.*, **2011**, *2*, 773-790.

protector y a la liberación del grupo funcional nucleófilo, iniciando así el proceso de desensamblaje³⁹. La eliminación autoinmolante también puede ser amplificada (figura XIII), y se define como la liberación de múltiples moléculas a partir de un único evento de activación.

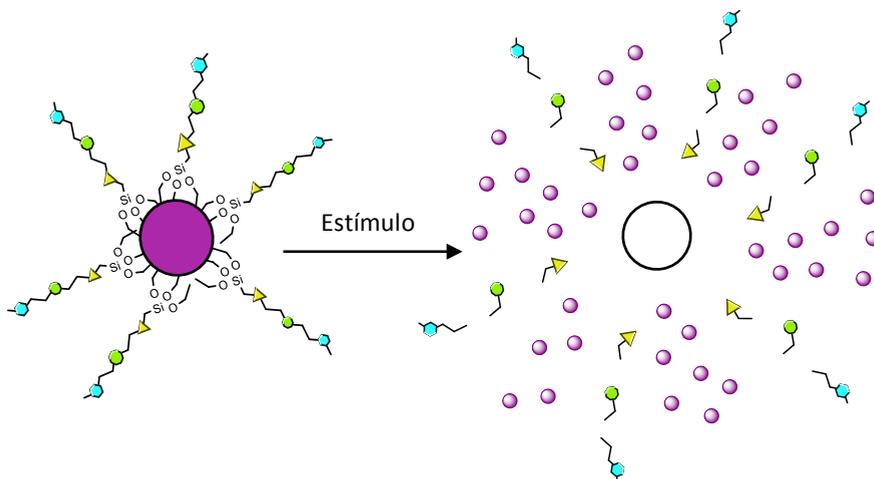


Figura XIII. Esquema representativo del funcionamiento de una puerta molecular autoinmolante.

1.3.2 Mecanismos de apertura para la liberación controlada

Como se ha comentado anteriormente, el diseño de materiales híbridos que contengan puertas moleculares capaces de liberar selectivamente la carga en presencia de un estímulo externo está atrayendo recientemente mucha atención. En este tipo de estructuras podemos diferenciar claramente dos partes: la primera de ellas es la puerta molecular, capaz de permanecer abierta o cerrada en función de un estímulo externo, mientras que la segunda, es un soporte inorgánico adecuado que actúe como reservorio donde se hallan ancladas las

³⁹ Alouane, A., Labruère, R., Le Saux, T., Schmidt, F., Jullien, L. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 7492-7509.

moléculas de puerta. Ambos componentes son importantes y de su elección depende la liberación del fármaco contenido en el interior del soporte⁴⁰.

Para conseguir una liberación espacial y temporal precisa de los agentes terapéuticos en el lugar de acción, se han introducido en MSNs una gran variedad de grupos sensibles a estímulos de diversa naturaleza, incluyendo grupos que responden a estímulos encontrados en el interior de sistemas biológicos como pH, temperatura, potencial redox o biomoléculas, y estímulos que pueden ser aplicados externamente como luz, ultrasonidos o campo eléctrico. Algunas de las respuestas a estos estímulos que provocan la apertura de la puerta molecular incluyen rotura de enlaces, unión competitiva o cambios conformacionales⁴¹.

Un ejemplo que permite explicar algunos de los mecanismos de apertura que puede haber al producirse un estímulo, sería el de Zink, Stoddart y colaboradores³⁷. Estos autores diseñaron un sistema supramolecular de nanoválvulas cuya puerta molecular está basada en dibenzo-[24]-corona-8 (DB24C8) y un ion dialquilamonio con funciones de pseudorotaxano, como se muestra en la figura XIV.

⁴⁰ Coll, C., Bernardos, A., Martínez-Máñez, R., Sancenón, F. *Accounts. Chem. Res.*, **2013**, *46*, 339-349.

⁴¹ Zhao, Y., Vivero-Escoto, J. L., Slowing, I. I., Trewyn, B. G., Lin, V. S.-Y. *Expert. Opin. Drug. Deliv.*, **2010**, *7*, 1013-1029.

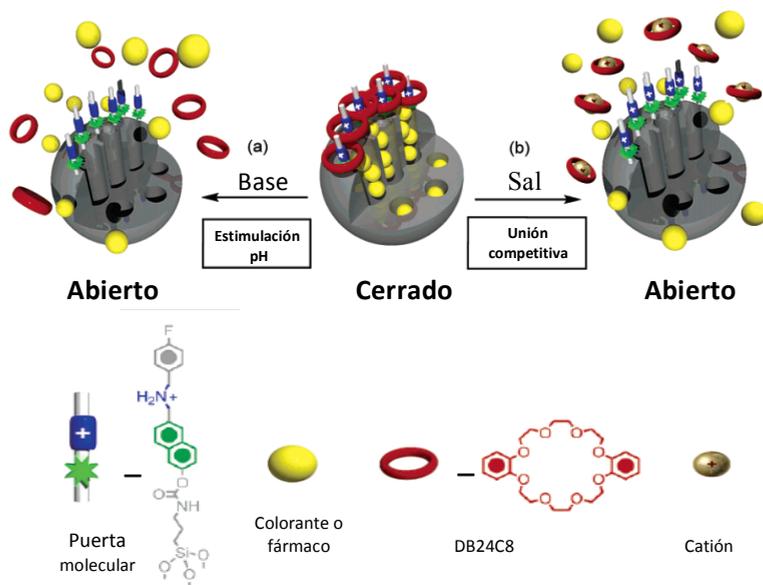


Figura XIV. Representación esquemática de la apertura de una puerta molecular mediante unión competitiva. (Extraída de *Chem. Mater.*, **2006**, *18*, 5919-5928.)

Este sistema tiene dos métodos de apertura: por un lado, la extracción de protones del dialquilamonio por acción de una base (como por ejemplo trietilamina) da lugar a la rotura de los puentes de hidrógeno entre el ion dialquilamonio y el anillo DB24C8, produciendo la disociación del anillo y por lo tanto la apertura de las nanoválvulas. Por otro lado, este sistema ofrece como método alternativo de apertura la unión competitiva del anillo DB24C8 a un agente de complejación. Esta activación, debería desplazar el equilibrio de complejación/decomplejación hacia la apertura de las nanoválvulas atrapando los anillos disociados de DB24C8 y evitando de esta forma que vuelvan a complejarse con el eje.

1.3.2.1 pH

Se han descrito puertas moleculares cuyos ciclos de apertura/cierre se pueden controlar a nivel nanoscópico mediante cambios en el pH del medio, como en el siguiente ejemplo descrito por Juárez y colaboradores³⁰. Estos autores diseñaron un material híbrido compuesto por nanopartículas de sílice, cargadas con el colorante sulforodamina B y cerradas mediante una puerta molecular autoinmolante sensible a pH, como se muestra en la figura XV. En la elección del tipo de nanopartículas se tuvo en cuenta que, para poder explotar esta condición, el vehículo debía ser estable a pH fisiológico y liberar la carga únicamente en ambientes básicos.

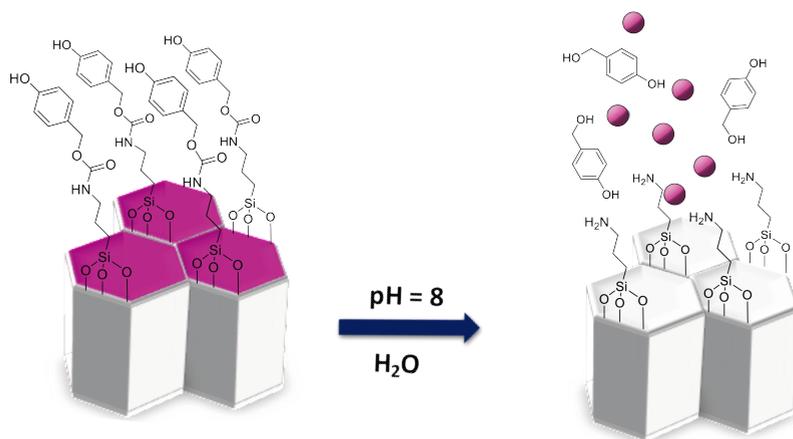


Figura XV. Representación esquemática del material híbrido sensible a cambios de pH. (Extraída de *Chem. Eur. J.*, **2016**, 22, 14126-14130).

A pH básico, se produce la desprotonación del grupo hidroxilo, lo que da lugar a la formación del anión fenolato que inicia un proceso autoinmolante de apertura de la puerta debido a la reacción concertada que se observa en la figura XVI, y por lo tanto a la liberación del colorante.

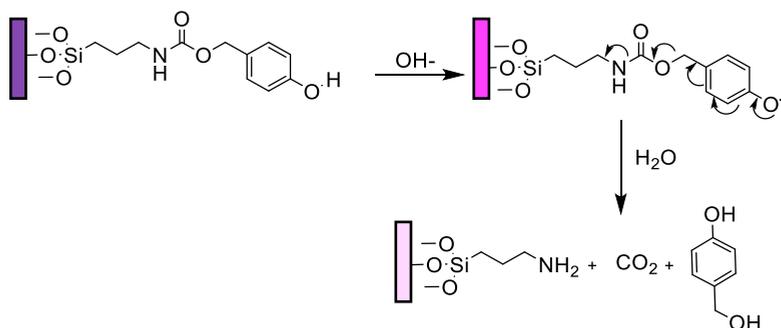


Figura XVI. Representación esquemática de la cascada de eliminación de electrones producida a pH básico. (Extraída de *Chem. Eur. J.*, **2016**, *22*, 14126-14130).

Para probar el mecanismo de apertura diseñado se realizaron medidas de la cinética de liberación del colorante a distintos pH mediante espectroscopia de fluorescencia. Así se observó, que a medida que aumentaba el pH se iba incrementando la liberación de colorante, siendo despreciable a pH ácido (10%) y pequeña a pH neutro (máximo 30%) ya que en ambos casos la puerta molecular permanece cerrada, mientras que, a pH básico al producirse la rotura de la puerta, se liberaba un 89% del colorante total almacenado en el interior de las nanopartículas. Con esta respuesta tan favorable, este sistema híbrido se podría utilizar para la liberación de fármacos a nivel intestinal, ya que al abrirse únicamente a pH básico podría atravesar el estómago, que presenta un pH ácido, con la medicación intacta.

1.3.2.2 Temperatura

La temperatura es otro estímulo interno que puede ser explotado para la activación de la liberación de fármaco en sitios específicos. En algunas enfermedades se producen variaciones locales de temperatura (generalmente aumento), como es el caso de la inflamación, la infección

o incluso los tumores que se producen en determinados tejidos. Por esta razón, vehículos portadores de fármaco sensibles a la temperatura, que únicamente liberen su contenido a temperaturas superiores a 37°C pero que lo mantengan encapsulado en la circulación, serían muy deseables. Sin embargo, en el diseño de estos materiales hay que tener en cuenta que las variaciones de temperatura producidas en estas enfermedades no son superiores a 4 o 5°C, con lo que requiere sistemas altamente sensibles que trabajen en un rango de temperatura realmente estrecho (35-45°C), ya que a mayores temperaturas puede haber muerte celular. La temperatura también puede ser utilizada como estímulo externo, y tiene la ventaja de que permite un fino control de la liberación de la dosis⁴².

Un ejemplo de la temperatura como estímulo para la liberación es el estudio de López y colaboradores⁴³, que se basa en el diseño de un material híbrido en el que emplean sílica como soporte inorgánico y un polímero estímulo-respuesta (PER) como puerta molecular, ya que se ha observado que la presencia de poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) en la red porosa, puede utilizarse para modular el transporte de solutos acuosos.

PNIPAAm es un polímero estímulo-respuesta muy estudiado que sufre una transición de solubilidad marcada por la temperatura en medio acuoso. Cuando PER está presente en la superficie, la transición de solubilidad se puede manifestar como un cambio en el volumen del

⁴² Aznar, E., Oroval, M., Pascual, L., Murguía, J. R., Martínez-Máñez, J., Sancenón, F. *Chem. Rev.*, **2016**, *116*, 561-718.

⁴³ Fu, Q., Rao, G. V. R., Ista, L. K., Wu, Y., Andrzejewski, B. P., Sklar, L. A., Ward, T. L., López, G. P. *Adv. Mater.*, **2003**, *15*, 1262-1266.

polímero y un cambio en la energía superficial. Así, observamos que, a bajas temperaturas, como por ejemplo a temperatura ambiente, el polímero se encuentra hidratado y extendido, de manera que actúa como una puerta molecular eficaz cerrando los poros de las nanopartículas e inhibiendo el transporte de solutos, mientras que, a altas temperaturas (50°C) se vuelve relativamente hidrofóbico, se deshidrata y se colapsa permitiendo la liberación de la carga por difusión, como se observa en la figura XVII.

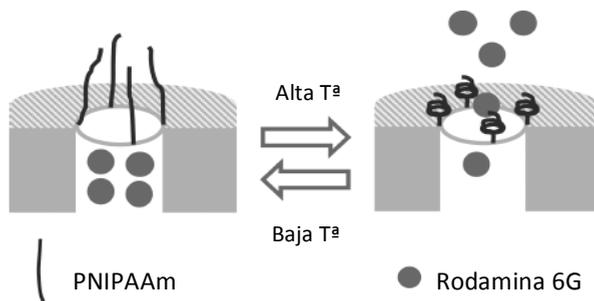


Figura XVII. Esquema representativo de un material híbrido cuya puerta molecular es un péptido. (Extraída de *Chem. Rev.*, **2016**, *116*, 561-718).

La polimerización se lleva a cabo mediante un proceso conocido como polimerización radical por transferencia atómica (PRTA), un método muy útil para la modificación de la superficie de los poros ya que, por un lado, la vida del radical en la superficie es alta, lo que da lugar a una proporción de polimerización relativamente baja que permite que el proceso sea uniforme. Por otro lado, la polimerización está restringida a la superficie, de modo que no se forma el polímero en solución, lo que previene la obstrucción de los poros con polímero libre y a su vez hace posible la uniformidad del proceso.

Para demostrar el funcionamiento óptimo del material híbrido, se realizaron estudios de la liberación del colorante empleando citometría de flujo y espectroscopia de fluorescencia. En estos estudios se observó que, en efecto, a bajas temperaturas el péptido permanece hidratado y extendido cerrando los poros, mientras que a medida que aumenta la temperatura, se colapsa y permite la liberación de la carga.

Aunque para realizar esta demostración se eligieron sílica y PNIPAAm, los principios de su diseño y los métodos de síntesis son aplicables a una amplia variedad de estructuras porosas y polímeros, así como a estímulos de diversa naturaleza, no sólo temperatura.

1.3.2.3 Potencial redox

A nivel intracelular encontramos agentes reductores endógenos que pueden ser atractivos como estímulos de apertura de materiales híbridos. En algunas enfermedades como el cáncer, se produce un incremento en la concentración de algunas especies redox activas, lo que ofrece una amplia aplicabilidad a este mecanismo de apertura en una liberación localizada y selectiva de fármacos.

El potencial de los enlaces disulfuro para reducirse a tioles libres como una respuesta a esta condición reductora ha atraído mucha atención para el diseño de sistemas de liberación controlada sensibles a variaciones de potencial redox, como por ejemplo el trabajo realizado por Feng y colaboradores⁴⁴, que diseñaron un material híbrido compuesto por nanopartículas de sílice mesoporosa y una válvula formada por una red polimérica con respuesta a estímulo redox.

⁴⁴ Liu, R., Zhao, X., Wu, T., Feng, P. Liu, R., Zhao, X., Wu, T., Feng, P. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 14418-14419.

El sistema, denominado PNAS-MS, consiste en MCM-41 como soporte inorgánico con poli(N-acriloxisuccinimida) (PNAS) anclada a su superficie, de manera que los polímeros se sitúen en la entrada de los poros de las nanopartículas de sílice. Una vez cargadas las moléculas de colorante en el interior de las nanopartículas, la apertura de PNAS-MS se bloquea mediante la adición de cistamina, una amina primaria bifuncional basada en un enlace disulfuro, que permite que las cadenas de polímero formen una red a través de la reacción entre la cistamina y los grupos N-oxisuccinimida presentes a lo largo de la cadena polimérica, como se observa en la figura XVIII.

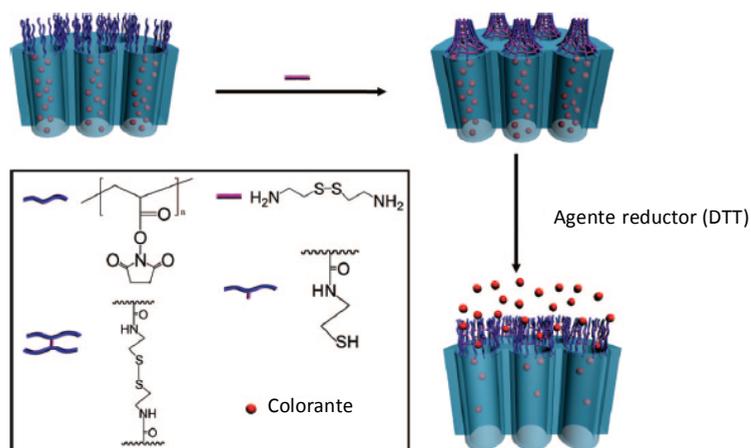


Figura XVIII. Representación esquemática de un material híbrido con una puerta molecular basada en una red polimérica con respuesta a estímulo redox. (Extraída de *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 14418-14419).

La apertura de la puerta molecular está basada en reacciones redox, de manera que en presencia de agentes reductores capaces de romper el enlace disulfuro de la cistamina, como el ditiotretitol (DTT), se produce la

ruptura del enlace, que da lugar a la apertura de la puerta y la consecuente liberación de la carga.

Para estudiar la respuesta redox de la puerta molecular anclada al nanomaterial híbrido, se cargó primero rodamina B en PNAS-MS, y a continuación se añadió cistamina a la mezcla para formar la red polimérica alrededor de los mesoporos de sílica. Antes de proceder a realizar las pruebas de liberación para estudiar el funcionamiento de la puerta, se comprobó la formación de la red polimérica mediante varios métodos espectroscópicos. La liberación del colorante se siguió, midiendo la absorbancia mediante espectroscopía de UV-vis. El primer estudio se realizó sin adicionar el agente reductor, observándose que la intensidad de la rodamina B se mantenía constante, lo que indica que no había fuga de las moléculas de colorante encapsuladas, mientras que al adicionar DTT, es decir, en presencia del estímulo, se produjo la liberación del colorante, más rápida cuanto mayor era la concentración de DTT, lo que lleva a pensar que, a bajas concentraciones, la puerta no se abre del todo, sino que queda entreabierta.

Como los enlaces disulfuro también se pueden romper empleando antioxidantes producidos a nivel celular, este sistema es prometedor tanto como biosensor como para la liberación específica de fármacos *in vivo*.

1.3.2.4 Luz

La luz puede actuar como un estímulo externo muy interesante, ya que puede inducir rápidamente la liberación del fármaco en un sitio específico mediante exposición a la radiación. Como se puede controlar fácilmente tanto el tiempo como el área irradiados, hay un mayor

control del proceso⁴¹. Además, este sistema presenta la ventaja de que el estímulo se aplica externamente, con lo que es una técnica no invasiva para el paciente y fácilmente focalizable al área seleccionada, evitando así la irradiación de los tejidos circundantes. Una limitación es que la luz UV es incapaz de penetrar en tejidos profundos. Por esta razón, en los últimos años, la atención ha estado centrada en la irradiación en la región del infrarrojo cercano (NIR) como fuente de luz, puesto que puede alcanzar una mayor penetración de tejido, pero este campo se encuentra todavía en desarrollo⁴².

Como ejemplo de este tipo de materiales, Fujiwara⁴⁵ y colaboradores diseñaron un sistema híbrido capaz de almacenar y liberar moléculas orgánicas del soporte MCM-41, cuyo mecanismo de apertura está basado en la dimerización intermolecular, fotocontrolada y reversible de derivados de la cumarina anclados a la parte externa de los poros.

La irradiación del sistema con luz UV a longitudes de onda mayores de 310 nm induce la fotodimerización, y esto produce como resultado un descenso gradual en la banda de absorción centrada a 324 nm, habiendo desaparecido casi por completo tras 50 minutos. En contraste, la irradiación con luz UV a longitudes de onda alrededor de 250 nm produce la regeneración de la banda de absorción de la cumarina tras 2-3 minutos, debido a la rotura de los dímeros inducida por la luz.

En este ejemplo, las moléculas de cumarina actúan como puertas moleculares. Al irradiar con luz a longitudes de onda superiores a 310 nm, las moléculas de cumarina se unen formando dímeros e impiden el acceso a los poros de MCM-41. Sin embargo, al irradiar a una longitud de

⁴⁵ Mal, N. K., Fujiwara, M., Tanaka, Y. *Nature*, **2003**, *421*, 350-353.

onda de 250 nm se produce la rotura de los dímeros, lo que da lugar a la apertura de la puerta.

1.3.2.5 Biomoléculas

En los últimos años han empezado a desarrollarse materiales híbridos nanoscópicos que emplean biomoléculas para controlar el transporte de materia. Las biomoléculas pueden tener dos funciones diferentes: por un lado, se puede tratar de azúcares, péptidos, anticuerpos o fragmentos de ADN, en cuyo caso actuarían como puertas moleculares, mientras que, por otro lado, las biomoléculas pueden ser antígenos o enzimas, cuya acción sería la de estímulo responsable de la apertura de la puerta.

1.3.2.5.1 Biomoléculas como puertas

En esta reciente aproximación, las biomoléculas son capaces de modificar la superficie de los soportes mesoporosos mediante interacciones moleculares y supramoleculares entre ciertos sitios de unión anclados a la parte externa de los poros y especies presentes en disolución, permitiendo la liberación controlada de especies químicas encapsuladas en el interior de los poros del material. Más concretamente, los soportes de sílice mesoporosos pueden ser funcionalizados con moléculas de naturaleza biológica como azúcares, anticuerpos, péptidos y oligonucleótidos entre otros, capaces de liberar su carga a través de mecanismos de hidrólisis provocados por diferentes ligandos.

La principal ventaja que presentan estos sistemas es su elevada especificidad, lo que los hace candidatos ideales tanto para aplicaciones

biomédicas concretas, como para la detección de determinadas moléculas.

Un ejemplo es el del estudio de Martínez-Máñez y colaboradores⁴⁶, que consiste en el diseño de un material híbrido basado en el paradigma que se muestra en la figura XIX.

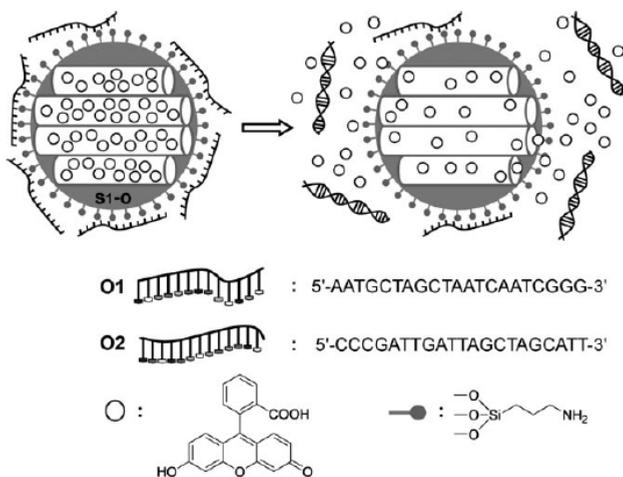


Figura XIX. Representación esquemática de un material híbrido con una puerta molecular formada por un oligonucleótido cuyo estímulo de apertura es una biomolécula. (Extraída de *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 7281-7283).

El sistema está compuesto por un material mesoporoso, que en este caso es MCM-41, cargado con fluoresceína y funcionalizado en la superficie externa con 3-amino-propiltriétoxosilano (APTS), cuyos grupos aminopropil están parcialmente cargados a pH neutro e interaccionan con oligonucleótidos (O1) cargados negativamente dando lugar al cierre de los mesoporos. La apertura, sucede mediante una reacción de

⁴⁶ Climent, E., Martínez-Máñez, R., Sancenón, F., Marcos, M. D., Soto, J., Maquieira, A., Amorós, P. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 7281-7283.

desplazamiento altamente efectiva en presencia de la cadena complementaria (O₂) del oligonucleótido que actúa como puerta molecular, produciéndose la hibridación de los dos oligonucleótidos, la apertura de los poros y la consiguiente liberación de la carga contenida en su interior.

Para investigar las propiedades de la puerta, se preparó una disolución del material híbrido en tampón de hibridación y se dividió en dos fracciones. A la primera se le añadió una alícuota de tampón de hibridación, mientras que, a la segunda una alícuota de tampón de hibridación que contenía el oligonucleótido complementario de la puerta molecular. En ambos casos el mecanismo de la puerta se monitorizó a través de la medida de la emisión de fluorescencia de la fluoresceína liberada, y los resultados mostraron que en ausencia del oligonucleótido complementario el sistema permanece estrechamente cerrado mientras que, en el caso contrario se produce la apertura de los poros y liberación del colorante.

Se realizaron estudios adicionales para comprobar la selectividad del sistema con lo que se probó la apertura de la puerta en presencia de otras cadenas de oligonucleótido, mostrando una apertura de la puerta pobre o nula, demostrando así que el sistema diseñado era altamente específico, lo que ofrece un amplio abanico de posibilidades en el diseño de bio-puertas que puedan ser abiertas selectivamente en presencia de estímulos específicos.

1.3.2.5.2 Biomoléculas como estímulo

Aunque no es tan popular como otros estímulos, el uso de enzimas para la apertura de puertas moleculares puede tener un gran atractivo y

potencial que proporcione elevada selectividad en el diseño de materiales híbridos para la liberación controlada de fármacos, puesto que se pueden sintetizar puertas moleculares personalizadas para enzimas específicas. De hecho, la sobreexpresión de enzimas, característica de determinadas enfermedades, puede ser útil para la liberación de fármacos en un tipo celular concreto, reduciendo así los efectos adversos y aumentando la efectividad del fármaco. Para que la puerta molecular sea efectiva en el cierre y a la vez responda al estímulo, es importante la orientación de su estructura, de manera que los grupos escindibles sean accesibles para el sitio activo de la enzima⁴².

Ciertos ejemplos han aprovechado la ventaja de utilizar esterasas, que son enzimas capaces de catalizar la hidrólisis de ésteres en ácidos y alcoholes. Zink, Stoddart y colaboradores³⁷ diseñaron un nuevo y biocompatible modelo de liberación controlada formado por nanocontenedores de sílica cerrados mediante un sistema que consiste en un [2]rotaxano anclado a la superficie de la nanopartícula en el cual está ensamblada una α -ciclodextrina que se encuentra rodeando una cadena de polietilenglicol y es retenida mediante un grupo voluminoso, unido por un enlace escindible que actúa como tope. Cuando el sistema está cerrado, alberga moléculas en el interior de los poros, pero cuando se rompe el enlace que ancla el adamantilo, que actúa como tope, se produce el desensamblaje de la α -ciclodextrina y como consecuencia la liberación de la carga.

Las moléculas se cargan en el interior de los poros mediante difusión y una vez están cargadas y el soporte modificado por la unión de la azida,

es incubado con la α -ciclodextrina en las condiciones que se especifican en la figura XX.

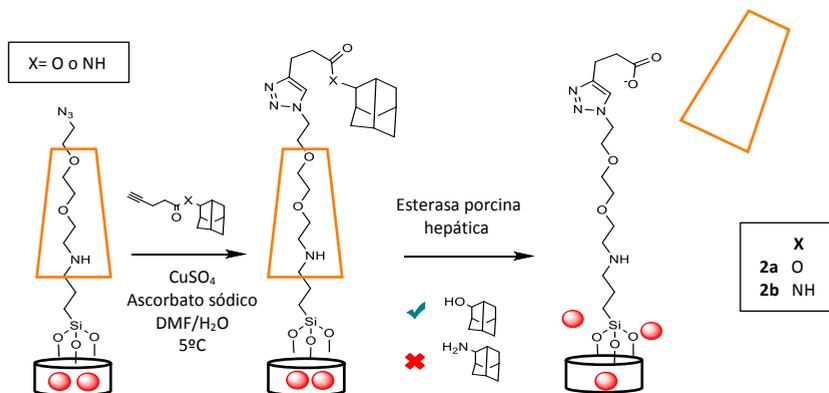


Figura XX. Representación esquemática de la síntesis y activación de una puerta molecular cerrada mediante un sistema basado en la presencia de un rotaxano con apertura inducida por enzima esterasa. (Extraída de *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 2382-2383).

Para probar la viabilidad del sistema, se diseñó un material híbrido activado por enzima esterasa porcina hepática. Para ello, se cargó un precursor con moléculas luminiscentes (rodamina B) y se cerró con el tope adamantilo unido mediante un enlace éster (**2a**). En este sistema, la enzima esterasa cataliza la hidrólisis del adamantilo produciendo el desensamblaje de la α -ciclodextrina y por lo tanto la liberación del colorante. Como control se preparó otro material híbrido utilizando como tope un análogo del adamantilo, pero unido mediante enlace amida en vez de éster, (**2b**), el cual no se hidroliza por la acción de la enzima esterasa, y por lo tanto no permite la liberación de la carga de las nanopartículas.

Así, utilizando espectroscopia luminiscente demostraron la capacidad de la esterasa porcina hepática para activar selectivamente el sistema con enlace éster mientras que el que contiene enlace amida permanece intacto ante la acción de dicha enzima. De este modo, obtuvieron un sistema biocompatible para la liberación controlada de fármacos con especificidad enzimática.

1.4 Cultivos celulares

1.4.1 Catepsina K

La catepsina K es un miembro de las cisteinproteasas de la superfamilia de la papaína que fue descubierta en 1994 a partir del análisis diferencial de ADN de osteoclastos y macrófagos en ratones. Posteriormente la enzima humana fue clonada⁴⁷. La catepsina K está constituida por 215 aminoácidos (aa), pero es secretada como una proenzima de 329 aa, de los cuales 15 aa constituyen una secuencia N-terminal, 99 aa son el propéptido y los 215 aa restantes constituyen la unidad catalítica.

La familia de las cisteinproteasas incluye una amplia variedad de catepsinas con un grado de similitud variable entre ellas. La catepsina K comparte acerca de un 60% de la secuencia proteica con las catepsinas L, S y V, pero menos del 35% con las catepsinas F, O, B, H y W.

La comparación de secuencias de 329 aa de pre-proteína catepsina K de diferentes especies revela que la secuencia enzimática tiene un alto grado de identidad sin ninguna inserción o deleción, teniendo un grado

⁴⁷ Muñoz-Torres, M., Reyes, R. *Rev. Esp. Enferm. Metab. Oseas*, **2006**, *15*, 88-90.

de similitud del 98,5% con el mono, 94,2% con el conejo, 87,5% con la rata y 86,6% con el ratón⁴⁸.

1.4.1.1 Estímulo de apertura

La catepsina K es una colagenasa que se expresa de forma predominante en los osteoclastos, aunque no exclusivamente ya que la podemos encontrar en otras células multinucleadas como las células de Langhans⁴⁹. Por el contrario, las otras formas de catepsina suelen presentar distribución en varios tejidos⁵⁰.

Catepsina K es la enzima proteolítica más abundante del osteoclasto, y su función predominante es degradar los principales colágenos del tejido conectivo: el colágeno tipo I (el más abundante en la matriz ósea) presente en las regiones helicoidal y telopeptídica y el colágeno tipo II localizado en la sinovial, aunque también degrada otras proteínas de la matriz ósea como la osteopontina y la osteonectina.

Se trata de una enzima lisosomal cuyo pH óptimo de actividad es ácido (pH= 5,5), y presenta limitada estabilidad a pH neutro. Se sintetiza en osteoclastos maduros, células que poseen una intensa actividad enzimática focalizada en el borde rugoso, como proenzima inactiva, y el paso de procatepsina K a catepsina K madura ocurre cuando el osteoclasto se acerca al hueso, lo que sugiere que factores locales pueden regular este proceso. Es por esta razón, que los osteoclastos

⁴⁸ Tada, S., Tsutsumi, K., Ishihara, H., Suzuki, K., Gohda, K., Teno, N. *J. Biochem.*, **2008**, *144*, 499-506.

⁴⁹ (a) Brömme, D., Lecaille, F. *Expert. Opin. Investig. Drugs.*, **2009**, *18*, 585-600.
(b) Rüniger, T. M., Quintanilla-Dieck, M. J., Bhawan, J. *J. Invest. Derm.*, **2007**, *127*, 293-297.

⁵⁰ Reyes, R., Muñoz-Torres, M. *Med. Clin.*, **2008**, *131*, 218-220.

situados en la superficie del hueso expresan exclusivamente la catepsina K en su forma madura⁵¹.

La activación *in vivo* de la enzima ocurre intracelularmente, puesto que se localiza en los lisosomas, donde se rompe por autoproteólisis para producir la forma activa y es entonces cuando puede ser secretada al entorno extracelular, pero se secreta específicamente a la laguna de resorción ósea situada debajo de los osteoclastos activos, donde es responsable de la degradación de los componentes de la matriz ósea. La secreción tanto de catepsina K como de otras cisteinproteasas asociadas con la resorción ósea producida por los osteoclastos, está regulada negativamente por acción de los estrógenos y positivamente por el factor de osteoclastogénesis RANKL.

Su presencia selectiva en los osteoclastos sugiere que la catepsina K es una importante enzima implicada en la resorción ósea, y consecuentemente puede representar un potencial objetivo para la intervención terapéutica de enfermedades que impliquen exceso de pérdida de masa ósea, como es el caso de la osteoporosis. Se han iniciado estudios bioquímicos, funcionales y estructurales de la catepsina K humana para un mayor desarrollo de este concepto⁵². De hecho, se ha demostrado que inhibidores de la cisteinproteasa como la leupeptina pueden inhibir la resorción ósea en cultivos de tejidos y más tarde en osteoclastos aislados, y se han descrito inhibidores selectivos de la

⁵¹ Dodds, R. A., James, I. E., Rieman, D., Ahern, R., Hwang, S. M., Connor, J. R., Thompson, S. D., Veber, D. F., Drake, F. H., Holmes, S., Lark, M. W., Gowen, M. *Journal of bone and mineral research*, **2001**, *16*, 478-486.

⁵² Bossard, M. J., Tomaszek, T. A., Thompson, S. K., Amegadzie, B. Y., Hannings, C. R., Jones, C., Kurdyla, J. T., McNulty, D. E., Drake, F. H., Gowen, M., Levy, M. A. *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, 12517-12524.

catepsina K humana como potentes inhibidores de la resorción ósea producida por los osteoclastos tanto *in vitro* como *in vivo*⁵³.

Así pues, la catepsina K constituye un objetivo atractivo para la terapia antirresortiva en la osteoporosis, mediante el desarrollo de inhibidores de la enzima altamente selectivos, lo que da lugar a la inhibición de la resorción ósea como se ha comentado anteriormente. Otro posible empleo es usarla como estímulo de apertura para la liberación de fármacos antirresortivos a partir de sistemas híbridos con puertas moleculares. Esta liberación se produciría específicamente en los osteoclastos debido a su predominante expresión en estas células lo que podría mejorar notablemente la efectividad de fármacos como los bisfosfonatos que tienen una biodisponibilidad realmente baja debido a que la mayor parte del medicamento no alcanza el lugar de acción.

1.4.1.2 Células que expresan la catepsina K y sus precursores

Las células con mayor expresión de la enzima catepsina K son los osteoclastos, sin embargo, estudios recientes han demostrado su presencia en otros tipos celulares como las células epiteliales tiroideas⁵⁴ y en otros órganos y tejidos como el pulmón⁵⁵ y el endometrio⁵⁶. También se encuentra presente en determinadas enfermedades como la

⁵³ Dodds, R. A. *Cel. Biochem. Funct.*, **2003**, 21, 231-234.

⁵⁴ Tepel, C., Brömme, D., Herzog, V., Brix, K. *J. Cell. Sci.*, **2000**, 113, 4487-4498.

⁵⁵ Bühling, F., Waldburg, N., Gerber, A., Häckel, C., Krüger, S., Reinhold, D., Brömme, D., Weber, E., Ansorge, S., Welte, T. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2000**, 477, 281-286.

⁵⁶ Jokimaa, V., Oksjoki, S., Kujari, H., Vuorio, E., Anttila, L. *Mol. Hum. Reprod.*, **2001**, 7, 73-78.

inflamación granulomatosa⁵⁷ y en una amplia variedad de cánceres, entre los que se encuentran: cáncer gástrico, carcinoma de células escamosas⁵⁸ (SCC), carcinoma de células basales, cáncer de mama, cáncer de pulmón, melanomas⁵⁹, tumores de próstata⁶⁰ y de riñón⁶¹. A pesar de su presencia en otras células, hay una gran diferencia en la actividad de la enzima, siendo ésta mucho mayor en los osteoclastos como se puede apreciar en la tabla I.

Tabla I. Tabla representativa de la actividad de escisión de la catepsina K en líneas celulares de cáncer de próstata frente a osteoclastos. Como control positivo se utilizaron osteoclastos generados a partir de médula ósea de ratón. CA 074 bloquea la actividad de la catepsina B, mientras que E64 bloquea la actividad de todas las cisteinproteasas. (Extraída de *J. Bone. Miner. Res.*, **2003**, 18, 222-230.

	Actividad	CA 074 (50 nM)	E64 (1 μ M)
Osteoclastos	7,59 \pm 0,64	1,88 \pm 0,43	0,581 \pm 0,36
LNCaP	0,150 \pm 0,053	0,038 \pm 0,010	0,017 \pm 0,006
DU 145	0,115 \pm 0,045	0,029 \pm 0,006	0,011 \pm 0,002
PC-3	0,024 \pm 0,005	0,012 \pm 0,004	0,009 \pm 0,003
Cat B humana	0,704 \pm 0,067	0,110 \pm 0,017	0,093 \pm 0,015

⁵⁷ Díaz, A., Willis, A. C., Sim, R. B. *Mol. Med.*, **2000**, 6, 648-659.

⁵⁸ (a) Yan, X., Takahara, M., Xie, L., Oda, Y., Nakahara, T., Uchi, H., Takeuchi, S., Tu, Y., Moroi, Y., Furue, M. *JEADV*, **2011**, 25, 362-365. (b) Bitu, C. C., Kauppila, J. H., Bufalino, A., Nurmenniemi, S., Teppo, S., Keinänen, M., Vilen, S. T., Lehenkari, P., Nyberg, P., Coletta, R. D., Salo, T. *PLoS ONE*, **2013**, 8, e70925.

⁵⁹ Quintanilla-Dieck, M. J., Codriansky, K., Keady, M., Bhawan, J., Rüniger, T. M. *J. Invest. Derm.*, **2008**, 128, 2281-2288.

⁶⁰ Brubaker, K. D., Vessella, R. L., True, L. D., Thomas, R., Corey, E. *J. Bone. Miner. Res.*, **2003**, 18, 222-230.

⁶¹ Tan, G. J., Peng, Z. K., Lu, J. P., Tang, F. Q. *World J. Biol. Chem.*, **2013**, 4, 91-101.

Mientras que las líneas celulares han proporcionado frecuentemente una herramienta de investigación de valor incalculable y se han utilizado ampliamente para descifrar los mecanismos implicados en la diferenciación de osteoblastos y la formación ósea, no existen líneas celulares inmortalizadas para osteoclastos maduros, puesto que son relativamente escasos y frágiles, y por su carácter de células multinucleadas los osteoclastos no se reproducen⁶², lo que hacía que experimentalmente fuera difícil tener un cultivo primario de estas células o una línea celular, y las pocas líneas celulares de pre-osteoclastos que se conocían, o bien no daban lugar a una diferenciación completa a osteoclastos o implicaban sistemas de co-cultivo y células que no estaban disponibles para todos los investigadores. Además, era difícil generar osteoclastos funcionales que realmente produjeran resorción ósea y expresaran las características de los osteoclastos maduros. Sin embargo, esto cambió cuando se descubrió la señal clave para la diferenciación de osteoclastos, RANKL, que es un factor de membrana expresado por osteoblastos y células estromales, con lo que se han desarrollado métodos para aislar estas células *in vitro* o para inducir su formación en cultivos de médula ósea⁶³.

Los osteoclastos son células fagocíticas que provienen de células madre hematopoyéticas diferenciadas a lo largo del linaje monocito/macrófago, por lo que hay dos formas de obtener los osteoclastos multinucleados, funcionales y maduros, o bien se obtienen directamente del hueso como fuente primaria, o bien se generan *in vitro* a partir de progenitores

⁶² Guerrero, C. A., Murillo, M. A., Cardozo de Martínez, C. A. *Medicina*, **2005**, *27*, 90-95.

⁶³ Helfrich, M. H., Ralston, S. H. "*Bone Research Protocols*", Humana Press (Nueva York), 2ª ed., **2012**, 187-202.

hematopoyéticos obtenidos de una fuente de células hematopoyéticas o macrófagos, tales como médula ósea, bazo, células mononucleares de sangre periférica o sangre del cordón umbilical, lo que es una fuente secundaria. Es necesario el contacto directo de los precursores mononucleares hematopoyéticos con osteoblastos/células estromales, puesto que este sistema permite la producción de dos factores hematopoyéticos que son necesarios y suficientes para la osteoclastogénesis, como son el factor de crecimiento glicoproteico M-CSF (factor estimulador de colonias de macrófagos) y la proteína de membrana RANKL (figura XXII). M-CSF regula específicamente la supervivencia, proliferación y diferenciación de la línea celular monocito-macróforo a través del receptor de superficie celular selectivamente expresado en este tipo de células. M-CSF es indispensable tanto para la proliferación de los progenitores de los osteoclastos, como para su diferenciación en osteoclastos maduros⁶⁴. Además, es el encargado de regular el receptor RANK en la superficie de los pre-osteoclastos. RANKL y M-CSF juntos, son necesarios para la expresión de genes que tipifican el linaje osteoclástico, incluyendo los que codifican la enzima TRAP (fosfatasa ácida tartrato resistente) y la catepsina K, que son regulados al alza en la diferenciación temprana de osteoclastos, y el receptor de calcitonina y la β_3 -integrina que sólo son expresados por osteoclastos maduros. Ambos factores (RANKL y M-CSF) han de estar presentes antes de que puedan diferenciarse a precursores de osteoclastos y proceder a fusionarse en osteoclastos multinucleados maduros y con función resortiva, puesto que RANKL es el responsable de estimular la diferenciación y formación de osteoclastos multinucleados cuando se

⁶⁴ Tanaka, S. *Am. J. Nephrol.*, **2007**, 27, 466-478.

ancla a su receptor RANK, expresado en los precursores mononucleares hematopoyéticos⁶⁵.

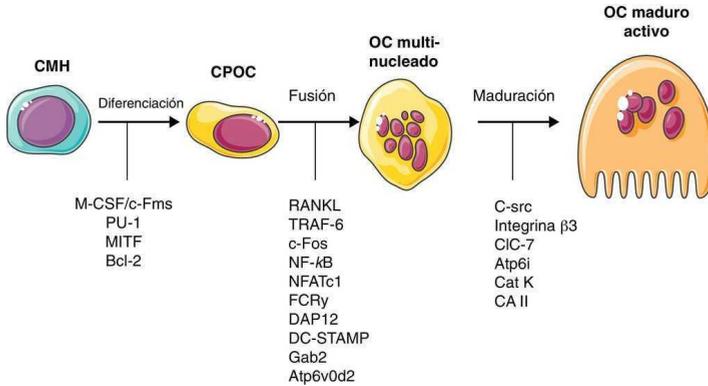


Figura XXII. Esquema representativo del control molecular de la diferenciación osteoclástica. CMH: célula madre hematopoyética. CPOC: célula precursora de osteoclastos. OC: osteoclasto. (Extraída de *Reumatol. Clin.*, **2013**, 9, 303-315.)

Así pues, este modelo de generación de osteoclastos *in vitro* a partir de células humanas mononucleares de sangre periférica mediante el uso de los factores M-CSF y RANKL recombinante está ampliamente aceptado, sin embargo, hay dificultades asociadas con el uso de estas células primarias, incluyendo limitada viabilidad y variación en los patrones de respuesta entre diferentes preparaciones. Además, una crucial limitación de los osteoclastos derivados de células primarias y sus precursores, es que ellos son virtualmente intransfectables, y por lo tanto son poco adecuados para la manipulación genética y estudios promotores⁶⁶.

El criterio utilizado generalmente para identificar los osteoclastos es la presencia de múltiples núcleos, la tinción positiva para la fosfatasa ácida

⁶⁵ Kartsogiannis, V., Wah Ng, K. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **2004**, 228, 79-102.

⁶⁶ Cuetara, B. L. V., Crotti, T. N., O'Donoghue, A. J., Mchugh, K. P. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, **2006**, 42, 182-188.

tartrato resistente (TRAP), la expresión de receptores de calcitonina y la habilidad para resorber matrices calcificadas. El método más simple para estimar el número de osteoclastos *in vitro* es contar el número de células multinucleadas que dan positivo a la tinción de TRAP o al receptor de vitronectina. Sin embargo, este método puede dar lugar a errores en el caso de cultivos prolongados (más de 7 días) puesto que en ese caso es frecuente que el receptor de calcitonina dé negativo (falsos negativos) y que haya macrófagos multinucleados con tinción de TRAP positiva (falsos positivos). Lo que sí se puede determinar con exactitud es que en ausencia de estos marcadores no hay osteoclastos⁶⁵.

La resorción ósea mediada por osteoclastos está modulada por tres procesos mayores: reclutamiento, actividad y ciclo vital de los osteoclastos. Los osteoclastos multinucleados maduros son activados por señales que permiten el inicio del remodelado óseo. El cuerpo celular del osteoclasto es polarizado, y en respuesta a la activación de RANK por su ligando, empiezan cambios estructurales internos que lo preparan para resorber hueso, como el reordenamiento del citoesqueleto de actina y la formación de una estrecha unión entre la superficie del hueso y la membrana basal para formar un compartimento sellado denominado laguna de resorción, donde el osteoclasto tiene la habilidad de secretar ácido (hidrogeniones) y enzimas lisosomales, como la catepsina K, para disolver el mineral óseo y de esta manera promover un ambiente óptimo para la degradación enzimática de la matriz ósea extracelular desmineralizada. Sólo los osteoclastos altamente diferenciados y activos secretan catepsina K, y es entonces cuando adquieren la habilidad para

degradar colágeno⁶⁷. Además, ensayos *in vitro* han demostrado que los osteoclastos grandes (≥ 10 núcleos) son más propensos a estar en un estado de resorción que osteoclastos pequeños (≤ 5 núcleos)⁶⁸. Los productos de degradación (fragmentos de colágeno, así como calcio y fosfato solubilizados) son procesados dentro del osteoclasto y liberados a la circulación³.

Se han establecido al menos dos líneas precursoras de osteoclastos como alternativa a las células hematopoyéticas frescas en el estudio de la osteoclastogénesis. La línea celular murina RAW 264.7 monocito/macrófago está bien caracterizada y ha empezado a ser un modelo útil y cada vez más utilizado con el que estudiar la formación y función de los osteoclastos. Además, a diferencia de las células de bazo murinas y las células madre de médula ósea, estas células producen espontáneamente M-CSF con lo que únicamente requieren ser tratadas con RANKL exógeno para estimular la formación de osteoclastos como policariones con capacidad para resorber hueso o sustratos de dentina, aunque sea pobremente⁶⁹. Las células RAW 264.7 expresan RANK, y pueden crecer indefinidamente como precursores de osteoclastos o diferenciarse cuando se cultivan con el ligando (RANKL). Los osteoclastos formados a partir de dichas células, expresan las características típicas de los osteoclastos formados *in vivo* y sus propiedades representativas,

⁶⁷ Cenni, E., Avnet, S., Granchi, D., Fotia, C., Salerno, M., Micieli, D., Sarpietro, M. G., Pignatello, R., Castelli, F., Baldini, N. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **2012**, *23*, 1285-1300.

⁶⁸ Manolson, M. F., Yu, H., Chen, W., Yao, Y., Li, K., Lees, R. L., Heersche, J. N. M. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 49271-49278.

⁶⁹ Holmes, S., Smith, S., Borthwick, L., Dunford, J., Rogers, M., Bishop, N., Grabowski, P. S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2008**, *365*, 840-845.

incluyendo TRAP y catepsina K⁷⁰. Sin embargo, tras exhaustivos estudios, se ha comprobado que no todas las células RAW 264.7 son capaces de generar osteoclastos, de hecho, tras clonar células RAW 264.7 y tratarlas con RANKL recombinante, se demostró que todos los clones expresan los genes marcadores osteoclásticos TRAP y catepsina K, pero sólo determinados clones son capaces de formar células grandes, multinucleadas y TRAP positivas con expresión de β_3 integrina y receptor de calcitonina, así como con capacidad para resorber matriz mineralizada. Así pues, muchas de las células RAW 264.7 se bloquean en las etapas iniciales de la diferenciación a osteoclastos, lo cual explica la capacidad limitada de esta línea celular para generar los mismos. Sin embargo, los clones de las células RAW 264.7 que exhiben los patrones fenotípicos y genotípicos de formación de osteoclastos mediante la adición de RANKL, retienen estas propiedades.

⁷⁰ Martins, C. A., Leyhausen, G., Volk, J., Geurtsen, W. *J. of Endodontics*, **2015**, *41*, 45-49.

Capítulo 2:

Objetivos

El objetivo principal que se espera conseguir en el desarrollo de esta tesis doctoral es la obtención de nuevos materiales híbridos orgánico-inorgánicos funcionalizados con moléculas orgánicas que actúen como puerta molecular permitiendo la liberación específica de la carga en presencia de un estímulo externo.

Dentro de este objetivo principal se engloban los siguientes objetivos específicos relacionados con las aplicaciones para las que se han diseñado estos sistemas híbridos:

- Preparar y caracterizar materiales híbridos orgánico-inorgánicos empleando soportes mesoporosos de tipo MCM-41 funcionalizados con puertas moleculares orgánicas cuyo estímulo de apertura sea una enzima esterasa o amidasa.
- Realizar un estudio comparativo de la efectividad de diferentes puertas moleculares en base al volumen estérico de la puerta, al tipo de estímulo de apertura y a si la puerta molecular presenta o no carácter autoinmolante.
- Marcar el ácido alendrónico con una molécula fluorescente que nos permita seguir el fármaco en los estudios de liberación.
- Preparar y caracterizar materiales híbridos orgánico-inorgánicos empleando soportes mesoporosos de tipo MCM-41 funcionalizados con puertas moleculares peptídicas diseñadas específicamente para su apertura por la enzima catepsina K, y que por lo tanto permitieran la liberación del ácido alendrónico selectivamente, evitando así la pérdida de fármaco antes de alcanzar el lugar de acción.

- Realizar estudios en cultivos celulares de la liberación de sulforodamina B y ácido alendrónico de los materiales híbridos diseñados específicamente para su uso en osteoclastos, comprobando así su posible aplicación farmacéutica.

Capítulo 3:

Influencia de la estructura de las puertas moleculares
en la eficacia del cierre y liberación

3.1 Introducción

Como se ha mencionado en la introducción, el estudio de materiales híbridos orgánico-inorgánicos es un área de trabajo que ha despertado un gran interés en los últimos años gracias a la amplia variedad de aplicaciones que presenta, pero en lo que nos vamos a centrar a lo largo de esta investigación es en el reconocimiento molecular y la liberación controlada y selectiva de moléculas, como por ejemplo fármacos, haciendo uso de estos materiales.

En este caso, los materiales híbridos se obtienen al combinar materiales inorgánicos que actúan como soportes, con moléculas orgánicas que actúan como puertas moleculares o supramoleculares y que se suelen anclar mediante enlaces covalentes. En el caso que nos ocupa los materiales híbridos son aquellos funcionalizados con una puerta molecular que, como se ha comentado anteriormente, puede adoptar dos posiciones, abierta o cerrada, siendo el cambio de estado inducido por un estímulo externo.

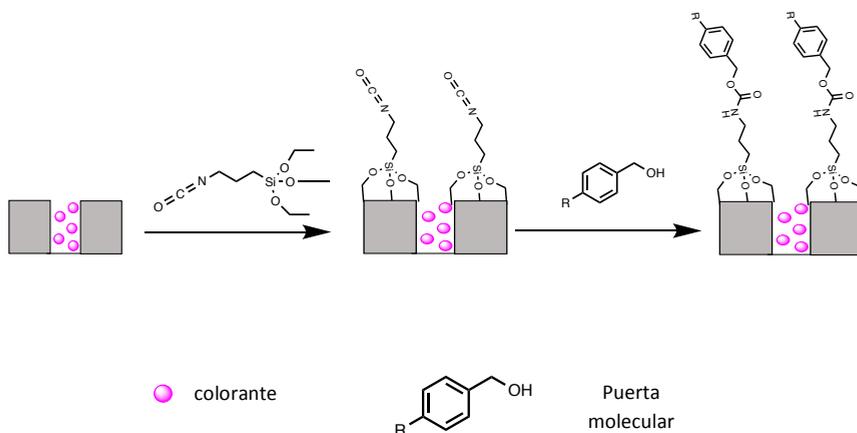
En el diseño de estos sistemas hay que considerar dos aspectos esenciales: (a) la capacidad de la puerta molecular para cerrar de forma eficaz el poro en las condiciones de trabajo y (b) la accesibilidad del estímulo externo (en muchas de las aplicaciones biológicas, enzimas) al centro reactivo que abrirá la puerta molecular liberando el sustrato encapsulado en su interior.

Debido a la importancia de estos dos factores, en este capítulo se realiza un estudio comparativo de la eficacia del cierre y liberación de diferentes puertas moleculares con respuesta a estímulo enzimático realizando variaciones en el tamaño de la puerta, en el grupo funcional susceptible

de ser escindido por la enzima; generando puertas con enlace éster y otras con enlace amida, y estudiando cómo afecta el carácter autoinmolante de la molécula que actúa como puerta molecular a la liberación de la carga.

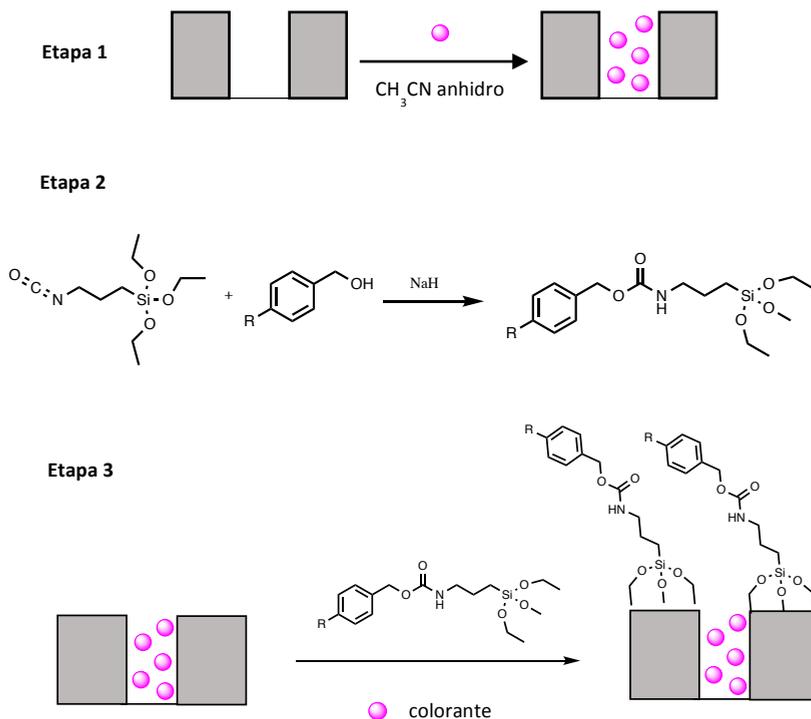
3.2 Preparación, caracterización y evaluación de materiales

Las puertas moleculares se unen al soporte inorgánico a través de grupos alcoxisilanos que forman enlaces covalentes con los grupos silanol de la superficie del material. Se pueden seguir dos rutas sintéticas distintas para el anclaje de la puerta molecular al soporte inorgánico MCM-41 mediante la formación de carbamatos. Así, se puede hacer la carga de las nanopartículas, el anclaje del derivado alcoxisilano y la unión de la puerta molecular de forma continuada en una única reacción como se muestra en el esquema 1:



Esquema 1. Esquema representativo de la carga de las nanopartículas de sílice y el anclaje de una puerta molecular mediante la formación de un carbamato en una única reacción.

O bien, se puede hacer la carga de las nanopartículas por un lado, el anclaje del alcoxisilano a la molécula de interés por otro y finalmente llevar a cabo la unión al soporte inorgánico de la puerta previamente preparada como se muestra en el esquema 2:

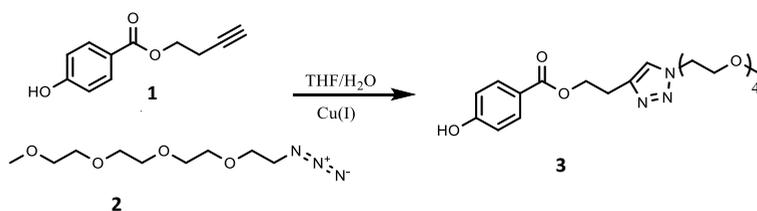


Esquema 2. Esquema representativo de la carga de las nanopartículas de sílice y el anclaje de una puerta molecular mediante la formación de un carbamato en varias etapas. Etapa 1: carga del colorante en las nanopartículas. Etapa 2: formación del carbamato entre el compuesto y el derivado alcoxisilano. Etapa 3: unión de la puerta molecular al soporte inorgánico.

3.2.1 Materiales funcionalizados con ésteres de cadenas polietéreas

Inicialmente se diseñaron puertas moleculares cuyo estímulo de apertura fuera una enzima esterasa. Era deseable que el grupo éster se

encontrara situado lo más cerca posible de la unión al soporte mesoporoso, para que al producirse la ruptura quedasen sobre éste residuos de cadena cortos que permitieran una liberación de la carga más eficaz. En el diseño también se tuvo en cuenta que una cadena de poliéter podía disminuir la lipofilia de la molécula resultante de la ruptura, proporcionándole así mayor solubilidad en medio acuoso a pH fisiológico. Con estas bases, se diseñó la siguiente puerta, p-hidroxibenzoato de 2-(1-(2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il) etilo (**3**), que se podía obtener mediante una reacción de cicloadición de Huisgen (reacción “click”) a partir de una azida y un alquino adecuados (esquema 3).



Esquema 3. Reacción de cicloadición de Huisgen (reacción “click”) para la obtención del compuesto **3**.

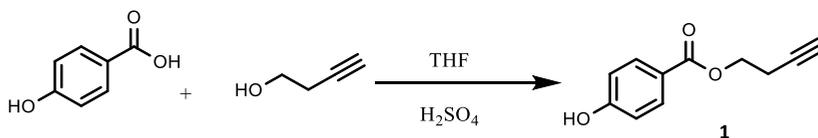
El concepto de la química “click” fue acuñado por Sharpless y colaboradores en 2001 como una nueva estrategia de síntesis orgánica⁷¹. Hay distintos tipos, pero el proceso de cicloadición 1,3-dipolar entre azidas y alquinos para la síntesis de triazoles se ha establecido como uno de los arquetipos de este tipo de química⁷². En 2002, Sharpless y Medal publicaron la cicloadición entre una azida y un alquino catalizada por

⁷¹ (a) Kolb, H. C., Finn, M. G., Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 2004-2021. (b) Moses, J. E., Moorhouse, A. D., *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, *36*, 1249-1262.

⁷² Huisgen, R. *Pure Appl. Chem.*, **1989**, *61*, 613-628.

cobre (I) dando lugar a la síntesis de 1,2,3- triazoles⁷³. Como características principales de esta reacción se encuentran la regioselectividad y la compatibilidad con una amplia variedad de grupos funcionales y condiciones de reacción. Además, se puede llevar a cabo a temperatura ambiente, en medio acuoso y al aire.

Para poder llevar a cabo la reacción era necesario obtener primero los precursores de la misma. En la obtención del alquino se utilizó ácido 4-hidroxibenzoico sobre el que se realizó una esterificación empleando 3-butín-1-ol. Esta reacción se llevó a cabo a través de una esterificación en condiciones de Fischer, es decir, por reflujo del ácido con un alcohol en presencia de un catalizador ácido que fue H₂SO₄ concentrado. Puesto que el ácido empleado como sustrato no era totalmente soluble en el alcohol, se empleó una cantidad suficiente de tetrahidrofurano (THF) como disolvente. La reacción funcionó correctamente y tras la purificación mediante columna cromatográfica, se obtuvo el producto **1** puro como un sólido marrón con un rendimiento del 47% (esquema 4).



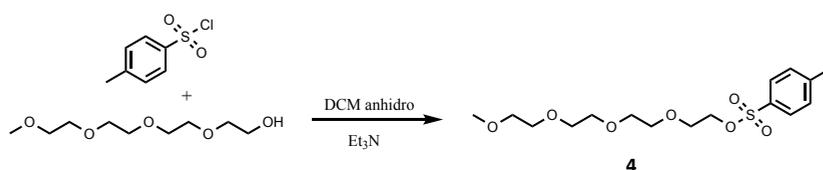
Esquema 4. Esterificación en condiciones de Fischer para la obtención del compuesto **1**.

A continuación, se pasó a realizar la síntesis de la azida^{74,75} necesaria para la reacción “click”. Puesto que los poliéteres lineales comerciales suelen

⁷³ Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 2596-2599.

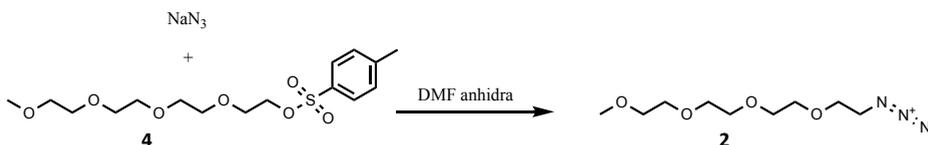
⁷⁴ Kohmoto, S., Mori, E., Kishikawa, K. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 13364-13365.

contener grupos hidroxilo libres, se pensó hacer una reacción de sustitución nucleofílica bimolecular con azida sódica y el poliéter previamente funcionalizado con un grupo saliente adecuado. Para ello, primero se realizó la transformación del hidroxilo en un tosilato mediante el uso de cloruro de p-toluensulfonilo. El producto **4** se obtuvo tras purificación por columna cromatográfica como un aceite naranja pálido con un rendimiento del 87% (esquema 5).



Esquema 5. Reacción de transformación del grupo hidroxilo en un tosilato para la obtención del producto **4**.

Una vez obtenido el poliéter con un buen grupo saliente, se pasó a realizar la síntesis de la azida. El proceso consistió en una reacción en la que el grupo tosilato se sustituyó por el grupo azida para dar lugar al producto deseado (**2**), que se obtuvo como un aceite amarillo con un rendimiento del 51% (esquema 6).

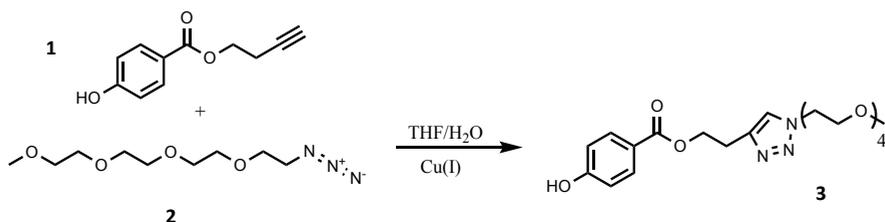


Esquema 6. Reacción de sustitución del grupo tosilato por el grupo azida para la obtención del compuesto **2**.

Una vez obtenidos los dos precursores, se pasó a realizar la reacción de cicloadición de Huisgen (reacción “click”).

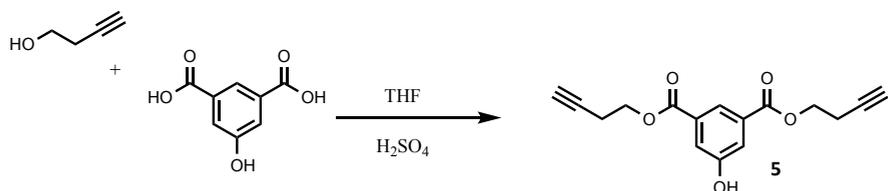
⁷⁵ Müller, M. K., Brunsveld, L. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 2921-2924.

En nuestro caso concreto, se utilizó acetato de cobre (II) que junto con ascorbato sódico da lugar, por reducción *in situ*, al Cu(I) necesario para catalizar la reacción⁷⁶. Tras la purificación mediante columna cromatográfica se obtuvo el producto **3** en forma de aceite amarillo con un rendimiento del 72% (esquema 3).



Esquema 3. Reacción de cicloadición de Huisgen (reacción click) para la obtención del producto **3**.

Paralelamente también se inició el estudio de la síntesis de otra puerta molecular utilizando ácido 5-hidroxiisoftálico, pensando que la introducción de dos cadenas polietéreas con los ácidos en posición meta podría cerrar la puerta de forma más eficaz.



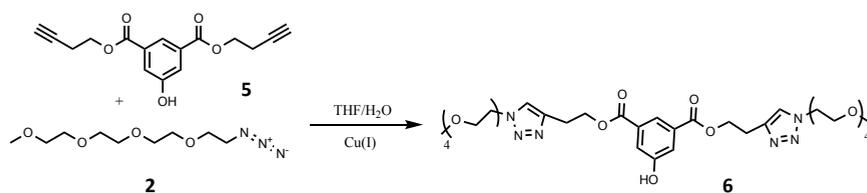
Esquema 7. Reacción de esterificación en condiciones de Fischer para la obtención del producto **5**.

La estrategia era la misma que la que se había seguido con el ácido 4-hidroxibenzoico. Tras la esterificación del ácido usando dos equivalentes del alcohol y la purificación del producto obtenido mediante columna

⁷⁶ Deobald, A. M., Camargo, L. R. S., Hörner, M., Rodrigues, O. E. D., Alves, D., Braga, A. L. *Synthesis*, **2011**, *15*, 2397-2406.

cromatográfica se obtuvo el producto **5** en forma de sólido amarillo pálido con un rendimiento del 43% (esquema 7).

Una vez obtenido el 5-hidroxiisofthalato de di-3-butinilo (**5**) se pasó a realizar la reacción “click” entre este compuesto y 13-azido-2,5,8,11-tetraoxatridecano (**2**) en las mismas condiciones que en el caso anterior, obteniéndose el producto **6** en forma de aceite amarillo con un rendimiento del 65% (esquema 8).

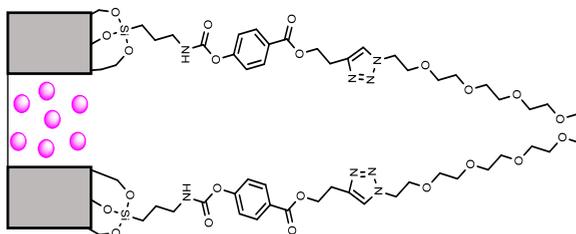


Esquema 8. Reacción de cicloadición de Huisgen (reacción click) para la obtención del producto **6**.

Una vez preparadas las moléculas objetivo, el siguiente paso fue la síntesis del material mesoporoso nanoparticulado de tipo MCM-41. Para ello, se siguió el procedimiento explicado en la parte experimental¹⁹, y se empleó tetraetilortosilicato (TEOS) como precursor hidrolítico inorgánico y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) como surfactante.

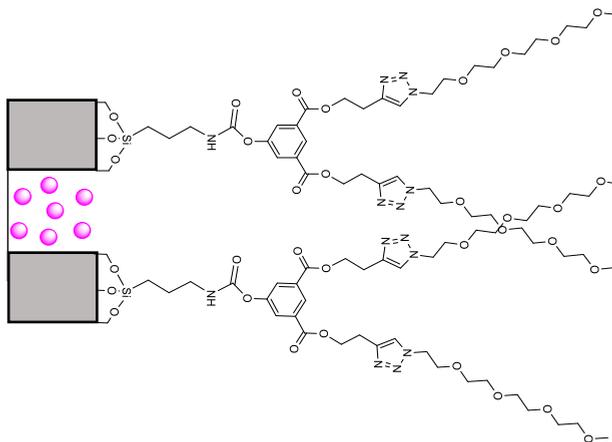
Una vez obtenidos los dos compuestos que se habían diseñado (**3** y **6**) y el soporte inorgánico MCM-41 pasamos a la siguiente etapa: la formación del carbamato correspondiente para cada compuesto a partir del reactivo isocianato de 3-(trietoxisilil) propilo que daría lugar a las puertas moleculares correspondientes. Para ello, se siguió la ruta sintética explicada anteriormente en el esquema 1, es decir, la reacción continuada en un único paso. Se realizó la carga del soporte mesoporoso con el colorante en acetonitrilo. Al sólido MCM-41 cargado de colorante,

se le adicionó isocianato de 3-(trietoxisilil) propilo y posteriormente el éster correspondiente (**3** o **6** respectivamente) y una pequeña porción de sodio metálico. Tras lavar, para eliminar los restos de colorante que pudieran quedar pegados a la parte externa del sólido, y dejarlo secar en la estufa a 70°C se obtuvieron, respectivamente, los sólidos inorgánicos **S1** y **S2** cargados con colorante y cerrados con la puerta molecular correspondiente. Se realizó todo el proceso en una única reacción porque el reactivo isocianato de 3-(trietoxisilil) propilo es un sistema bastante lábil y se pensó que de esta manera resistiría mejor.



Sólido 1 (S1)

Figura 1. Esquema representativo del sólido 1 que corresponde al soporte MCM-41 cargado de colorante rodamina 6G y cerrado con el carbamato formado a partir del producto **3**.



Sólido 2 (S2)

Figura 2. Esquema representativo del sólido 2, que corresponde al soporte MCM-41 cargado de colorante rodamina 6G y cerrado con el carbamato formado a partir del producto 6.

Una vez obtenidos los sólidos finales (figuras 1 y 2), se procedió a la caracterización de los mismos mediante las técnicas estándar. Las imágenes del TEM proporcionaron información acerca de la morfología y el tamaño de las nanopartículas, así como acerca del estado de los canales de la matriz hexagonal, es decir, de si estaban cargados de colorante y por lo tanto presentaban aspecto opaco, o vacíos, en cuyo caso se verían rayas alternas blancas y negras. Como se puede observar en la figura 3, los sólidos estaban cargados.

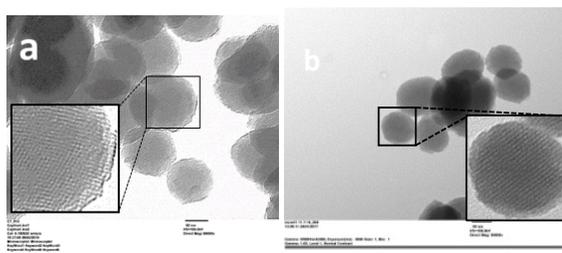


Figura 3. Imagen del TEM de (a) sólido **S1** (b) MCM-41 calcinada

La difracción de rayos X aportó información acerca de la presencia de una estructura mesoporosa y de su estabilidad. Así se observó, en la MCM-41 sintetizada, la presencia de las cuatro reflexiones características de bajo ángulo de una matriz hexagonal ordenada (100), (110), (200) y (210). En la MCM-41 ya calcinada se apreció un desplazamiento significativo del pico (100) que concuerda con la condensación de silanoles producida durante la calcinación. Por último, tanto en **S1** como en **S2**, se observó un ensanchamiento de los picos (100) y (200)

correspondiente a la reducción en el contraste relacionada con el proceso de funcionalización y con la carga de los mesoporos (figura 4).

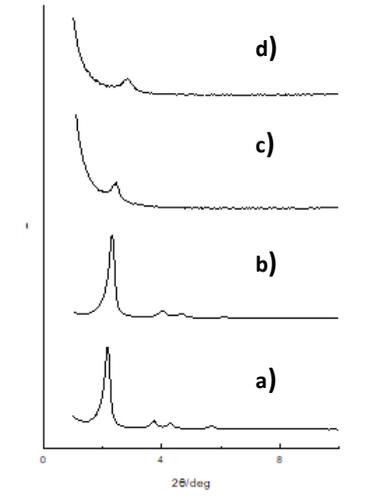


Figura 4. Difracción de rayos X de polvo. **a)** MCM-41 sintetizada **b)** MCM-41 calcinada **c)** S1 **d)** S2.

El análisis de isotermas de adsorción-desorción de N_2 aportó información acerca del diámetro y volumen de los poros, la distribución del tamaño de poro, así como el área específica total. La curva de las nanopartículas calcinadas muestra un escalón de adsorción a valores de P/P_0 entre 0,1 y 0,3 (isoterma tipo IV) que es típico de sólidos mesoporosos (figura 5). Con estas gráficas, mediante la aplicación del modelo BJH en la curva de adsorción de la isoterma, se calcularon el diámetro y el volumen de poro, recogidos en la tabla 1.

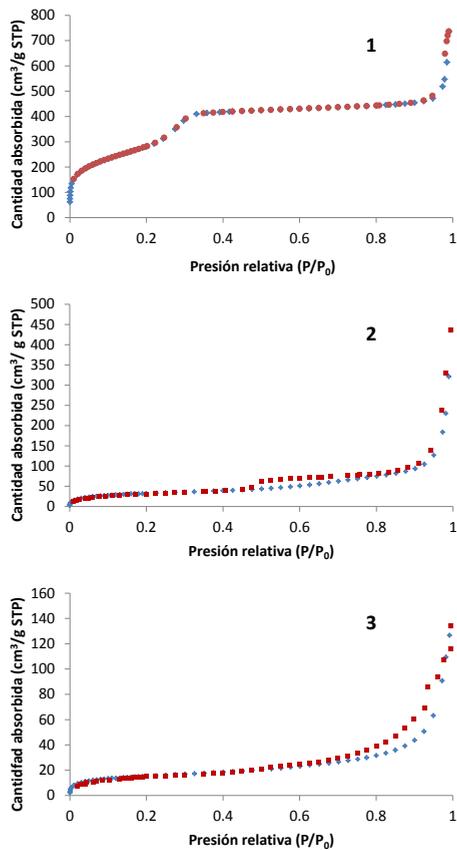


Figura 5. Isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno (1) MCM-41 calcinada (2) **S1** (3) **S2**.

El contenido de colorante en los sólidos **S1** y **S2** se determinó disgregando las nanopartículas con hidróxido sódico, midiendo la fluorescencia del colorante liberado y calculando la cantidad de colorante mediante la correspondiente curva de calibrado.

Por último, se llevó a cabo el análisis elemental tanto de **S1** como de **S2**, a partir del cual y dado que se conocía la carga se pudo determinar la cantidad de puerta molecular presente en cada uno de ellos.

Tabla 1. Valores BET de superficie específica, volumen de poro y tamaño de poro calculados a partir de isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno para MSNs calcinados y **S1-S2**.

	S_{BET} ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	Volumen Poro ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$) ^[a]	Tamaño de Poro (nm) ^[b]	Carga (%)	mg materia orgánica puertas/100 mg MCM-41
MSN	1005,7	0,78	2,59	-	-
Calcinado					
S1	79,6	0,38	3,23	0,57	16,97
S2	54,8	0,17	2,10	0,95	55,16

[a] Volumen de poro y tamaño de poro estaban asociados únicamente con los mesoporos intrapartícula. [b] Tamaños de poro estimados por el modelo BJH aplicado a la rama de absorción de la isoterma.

Una vez preparados y caracterizados los materiales, se pasó a realizar los estudios de liberación de los mismos. En primer lugar, se registraron los espectros de absorción y emisión tanto de la rodamina 6G (utilizado para la carga de **S1**) como de la sulforodamina B (utilizado para la carga de **S2**), para conocer sus máximos de absorción y de emisión en las condiciones de medida. Para ello se prepararon disoluciones de los colorantes en tampón tris(hidroximetil)aminometano (tampón tris) a pH 8,06, obteniéndose los siguientes máximos: rodamina 6G máximo de absorción a 520 nm y de emisión a 550 nm, sulforodamina B máximo de absorción a 565 nm y de emisión a 586 nm (figura 6).

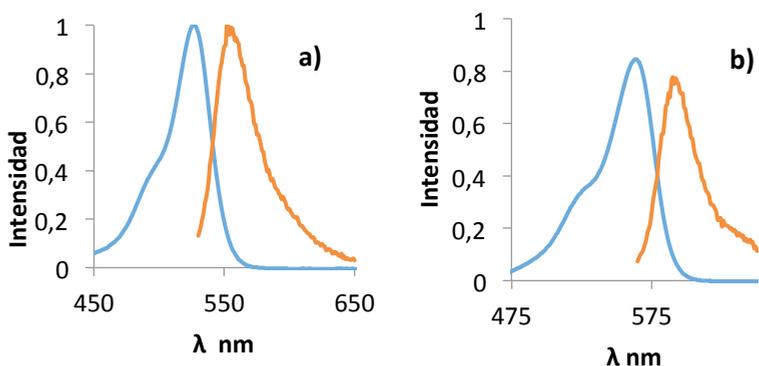


Figura 6. (a) Espectro con los máximos de absorción (línea azul, $2,30 \times 10^{-6} \text{M}$) y de emisión (línea naranja, $2,30 \times 10^{-6} \text{M}$) del colorante rodamina 6G en tampón Tris pH 8,06. (b) Espectro con los máximos de absorción (línea azul, $8,78 \times 10^{-6} \text{M}$) y de emisión (línea naranja, $1,75 \times 10^{-5} \text{M}$) del colorante sulforodamina B en tampón Tris pH 8,06.

Una vez conocidos los máximos tanto de absorción como de emisión, se procedió a realizar los estudios de liberación del colorante con ambos materiales. Para ello se prepararon las disoluciones de referencia (conocidas como blanco o control), a una concentración de 0,25 mg/ml, en las que no se añade el estímulo de apertura de la puerta (en nuestro caso la enzima) para comprobar el nivel de liberación en ausencia del estímulo. Por otra parte, se prepararon las disoluciones de medida, a una concentración de 0,25 mg/ml, a las cuales sí se les añade la esterasa (Sigma E3019-20KU). Todas las muestras se prepararon usando tampón Tris a pH 8,06. En ambos casos, inmediatamente después de la preparación de las muestras se inició el estudio de la cinética de liberación del colorante mediante espectroscopia de fluorescencia. Los posibles efectos de la enzima en las propiedades de fluorescencia de los colorantes utilizados se habían estudiado previamente y no se habían observado cambios apreciables en ningún caso.

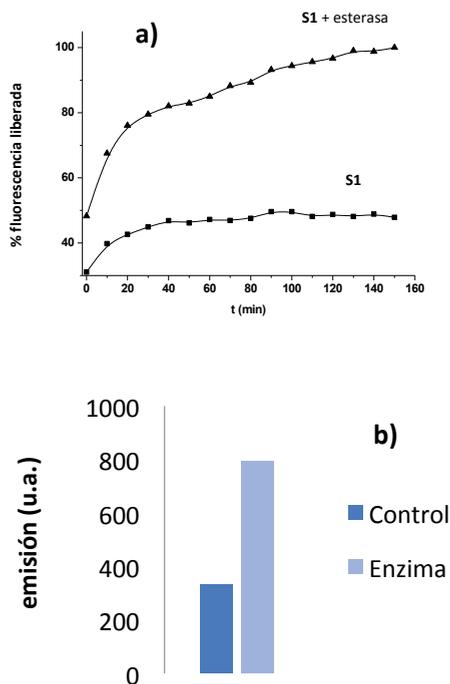


Figura 7. (a) Cinética de liberación del colorante de **S1** calculada a partir de la intensidad de fluorescencia del colorante liberado (la máxima concentración de colorante liberado en presencia del estímulo se considera el 100%). (b) Histograma representativo de la liberación de colorante (medida a partir de la intensidad de fluorescencia) del material **S1** en presencia y ausencia de enzima esterasa.

Cuando se comparan las concentraciones de colorante liberadas a un tiempo dado y conocido, en nuestro caso 2 horas, la relación de colorante liberado en ausencia y en presencia de enzimas da lugar a los valores reflejados en la figura 7b.

En el caso del sólido **S1** se observa que la velocidad de liberación del colorante es considerablemente mayor en presencia que en ausencia de la enzima y que dicha liberación crece hasta alcanzar una concentración

prácticamente constante que en el caso de la presencia del estímulo consideramos como el 100% de liberación (figura 7a).

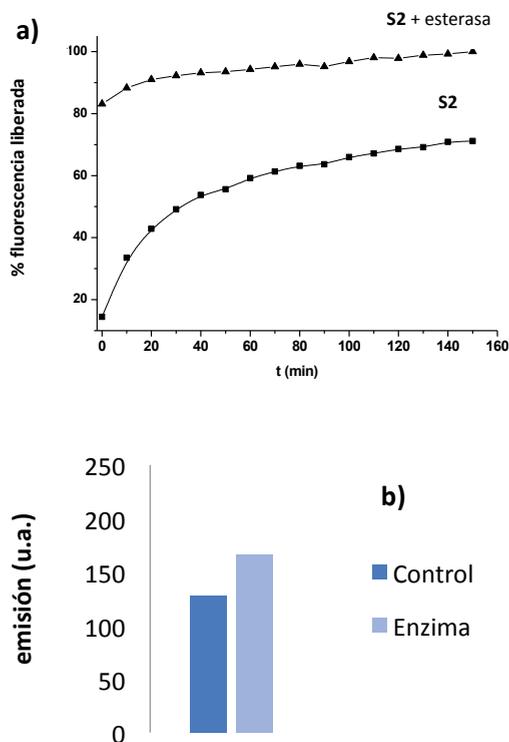


Figura 8. (a) Cinética de liberación del colorante de **S2** calculada a partir de la intensidad de fluorescencia del colorante liberado (la máxima concentración de colorante liberado en presencia del estímulo se considera el 100%). (b) Histograma representativo de la liberación de colorante (medida a partir de la intensidad de fluorescencia) del material **S2** en presencia y ausencia de enzima esterasa.

Un estudio similar, llevado a cabo con **S2**, da lugar a los datos que se recogen en la figura 8.

La mayor diferencia entre las puertas moleculares empleadas para sintetizar **S1** y **S2** es su volumen estérico. Como puede verse en la figura

9 esta diferencia hace que la liberación del colorante en ausencia del estímulo externo (en este caso la enzima) sea considerablemente menor en el material **S2** que en **S1**, a pesar de la mayor carga de colorante en **S2**. Ahora bien, cuando se compara la liberación en ausencia y presencia de enzima (figura 9) se observa que la actuación de la enzima sobre el material **S1** es mucho más eficaz que sobre el material **S2**.

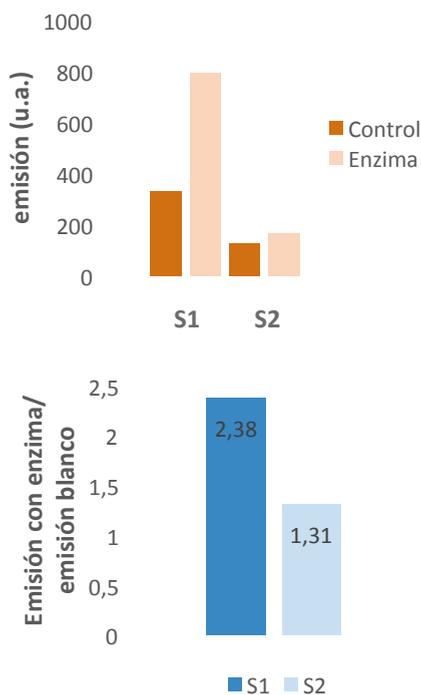


Figura 9. Estudio comparativo de la capacidad de cierre y liberación de los materiales **S1** y **S2**.

De hecho, la eficiencia de liberación es de más de 1,6 veces superior en **S1** que en **S2**. Este comportamiento puede estar relacionado con la accesibilidad de la enzima al punto de reacción debido a la distinta disposición espacial de las cadenas etéreas en los dos casos (figura 10).

En el caso de **S2** la sustitución en el anillo aromático es *meta* mientras que en **S1** es *para* lo que modifica claramente la geometría de la molécula. De estos resultados se puede concluir que la utilidad de una puerta, considerada como la relación entre eficacia de cierre/eficacia de liberación depende en gran medida de la estructura de la puerta molecular.

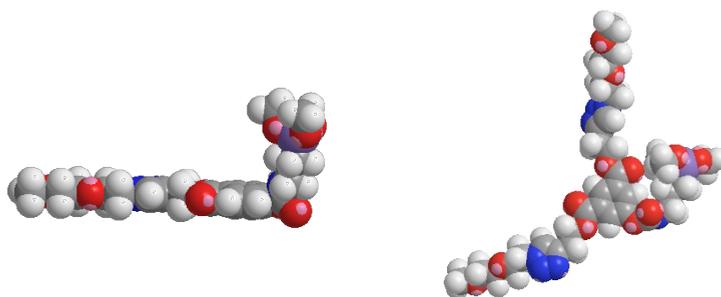
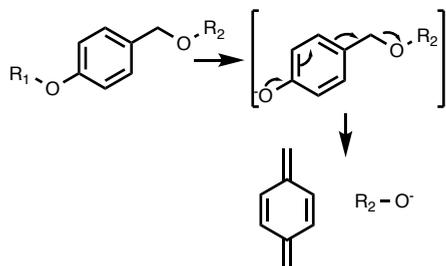


Figura 10. Modelización molecular de las moléculas orgánicas empleadas en la preparación de (izquierda) material **S1**, (derecha) material **S2**.

3.2.2 Materiales funcionalizados con puertas autoinmolantes

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, nos pareció interesante realizar estudios comparativos empleando sistemas autoinmolantes. Como se ha comentado en la introducción, las moléculas con características autoinmolantes, en presencia de un estímulo externo, se rompen en numerosos fragmentos lo que, en nuestro caso, facilitaría la apertura de los poros y la liberación del material encapsulado. Los compuestos que se decidió preparar eran derivados (ésteres o amidas), más o menos elaborados, del 4-hidroximetilfenol. La hidrólisis de este tipo de compuestos produce la rotura de toda la molécula de una forma concertada (esquema 9). Además en estos sistemas, al contrario de lo

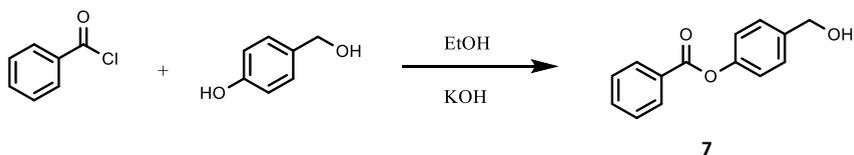
que ocurría en **S1** y **S2**, el enlace a romper está más accesible, lo que facilitaría la interacción con la enzima.



Esquema 9. Esquema representativo de la hidrólisis de compuestos autoinmolantes derivados del 4-hidroximetilfenol.

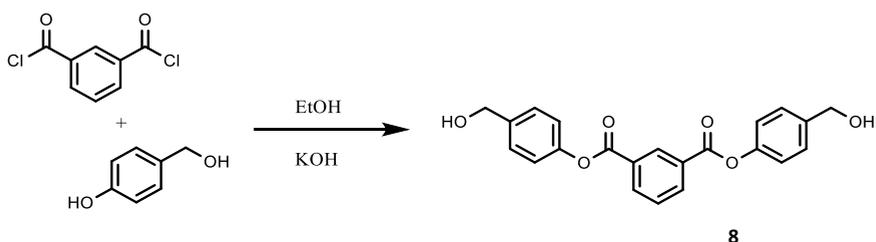
3.2.2.1 Ésteres

Dentro de esta estrategia el primer compuesto que se preparó fue el benzoato de 4-(hidroximetil)fenilo (**7**). Dada la presencia de dos grupos hidroxilo en el 4-hidroximetilfenol y con el fin de controlar la regioquímica de la reacción, la síntesis se efectuó mediante una reacción de Schotten-Baumann entre cloruro de benzoilo y 4-hidroxibencil alcohol, empleando hidróxido potásico como base para desprotonar el fenol manteniendo inalterado el alcohol. De este modo, tras purificación por columna cromatográfica, se obtuvo el producto deseado en forma de sólido blanco con un rendimiento del 38% (esquema 10).



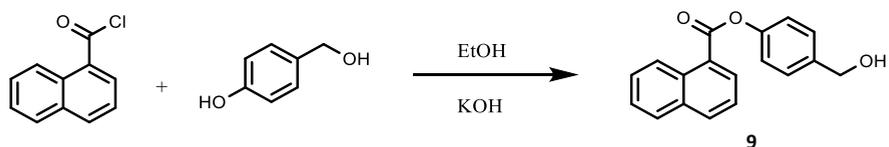
Esquema 10. Reacción de esterificación en condiciones de Schotten-Baumann para la obtención del producto **7**.

Al mismo tiempo se inició la síntesis de su homólogo doble el isoftalato de bis(4-(hidroximetil)fenilo mediante el mismo tipo de reacción, pero partiendo de los productos de partida adecuados. De esta manera, tras purificación mediante columna cromatográfica se obtuvo el compuesto **(8)** en forma de un sólido blanco con un rendimiento del 57% (esquema 11).



Esquema 11. Reacción de esterificación en condiciones de Schotten-Baumann para la obtención del producto **8**.

Con el fin de incrementar el volumen estérico del éster se pensó en aumentar el tamaño del sistema aromático sustituyendo el benceno por naftaleno o antraceno.

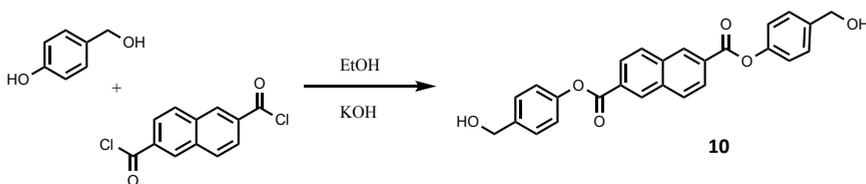


Esquema 12. Reacción de esterificación en condiciones de Schotten-Baumann para la obtención del producto **9**.

Para llevar a cabo estos estudios, se sintetizó 1-naftoato de 4-(hidroximetil)fenilo (**9**) a partir de ácido 1-naftoico y 4-hidroximetilfenol. Antes de hacer la reacción, el ácido se transformó en el cloruro de ácido correspondiente mediante reacción con cloruro de tionilo. Partiendo del cloruro de ácido y empleando las mismas condiciones indicadas

anteriormente, tras purificación por columna cromatográfica se obtuvo el producto deseado (**9**) en forma de sólido amarillo con un rendimiento del 36% (esquema 12).

Paralelamente, se llevó a cabo la síntesis de su homólogo doble el naftaleno-2,6-dicarboxilato de bis(4-(hidroximetil)fenilo) (**10**) partiendo del mismo alcohol y del ácido de partida correspondiente (ácido 2,6-naftalenodicarboxílico) transformado en el cloruro de ácido por reacción con cloruro de tionilo. La esterificación se llevó a cabo de la misma manera que en el caso anterior sólo que requirió más tiempo. Se obtuvo el producto prácticamente puro sin necesidad de columna cromatográfica como un sólido blanco con un rendimiento del 82% (esquema 13).

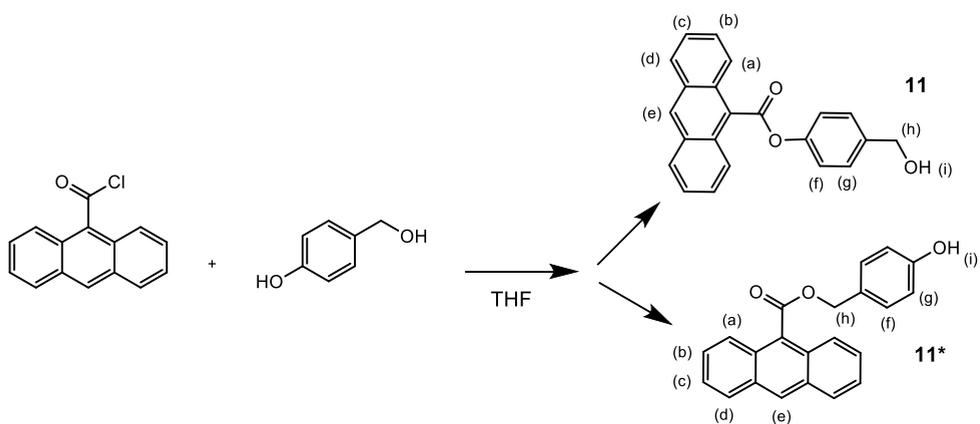


Esquema 13. Reacción de esterificación en condiciones de Schotten-Baumann para la obtención del producto **10**.

En tercer lugar, se intentó llevar a cabo la síntesis del éster (**11**) a partir del ácido 9-antracenocarboxílico y el 4-hidroximetil fenol. En este caso se realizaron varias pruebas con diferentes disolventes (diclorometano, benceno y dimetilformamida) y diferentes reactivos (cloruro de oxalilo y cloruro de tionilo) para la obtención del cloruro de ácido. Finalmente se realizó la síntesis a reflujo utilizando el cloruro de tionilo como disolvente⁷⁷ y posteriormente haciendo reaccionar el producto obtenido

⁷⁷ Bawa, R. A., Jones, S. *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 2765-2770.

con el alcohol correspondiente en THF sin el empleo de ninguna base para desprotonar el fenilo debido a que en caso de usarla, se obtenían muchos productos secundarios. No obstante, la preparación de los ésteres del cloruro del ácido 9-antraceno carboxílico con el 4-hidroximetilfenol es una reacción que depende mucho de las condiciones utilizadas y con una reproducibilidad limitada ya que en ocasiones se obtiene el éster correspondiente al alcohol bencílico y en otras el del fenol, siendo en todos los casos difícil la purificación mediante columna cromatográfica del producto mayoritario que siempre se obtiene con rendimientos bajos (esquema 14).



Esquema 14. Reacción de esterificación del ácido 9-antraceno caboxílico con 4-hidroximetilfenol.

Los dos productos que se obtenían en la reacción se pudieron diferenciar tanto por sus espectros de ^1H NMR (tabla 2) como por los de ultravioleta y fluorescencia.

Tabla 2. Desplazamiento químico de los señales de los hidrógenos de **11** y **11***

	H _a	H _b	H _c	H _d	H _e	H _f	H _g	H _h	H _i
11	8,10(d)	7,57(t)	7,50(t)	8,27(d)	8,78(s)	7,62(d)	7,49(d)	4,67(s)	----
11*	7,68(t)	7,70(d)	7,60(t)	7,74(d)	8,41(d)	7,15(d)	6,81(d)	4,45(s)	10,80

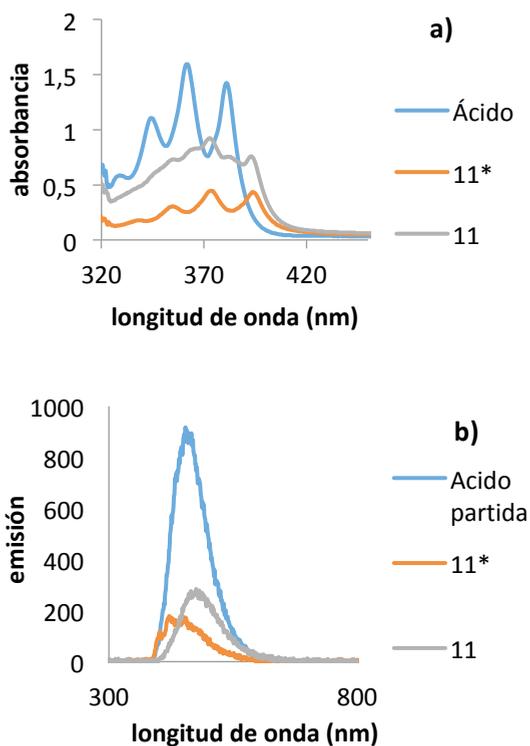


Figura 11. (a) Espectro de absorción del ácido 9-antracencarboxílico y de los productos de reacción (b) Espectro de emisión de fluorescencia del ácido 9-antracencarboxílico y de los productos de reacción.

En la figura 11 se muestran los espectros de absorción y de emisión de fluorescencia tanto del ácido de partida (ácido 9-antracencarboxílico)⁷⁸ como del producto de la reacción (**11** y **11***).

Una vez finalizada la síntesis de los ésteres objeto de nuestro estudio, se intentó llevar a cabo la preparación de los materiales modificados con puertas moleculares mediante la formación del carbamato correspondiente para cada compuesto a partir del reactivo isocianato de 3-(trietoxisilil) propilo. Se inició con el compuesto **11**, para ello, se siguió la ruta sintética explicada anteriormente en el esquema 1, es decir, la reacción continuada en un único paso, y se realizó la carga de las nanopartículas y el cierre de las mismas con el mismo procedimiento explicado para las moléculas **3** y **6**. Se obtuvieron así dos sólidos diferentes llamados, sólido 3 (**S3**) y sólido 4 (**S4**), cargados ambos con sulforodamina B y cerrados uno con la puerta molecular correspondiente al compuesto **11** y el otro con la correspondiente al **11***. Cuando se lavaron los sólidos obtenidos con acetona, se comprobó que se producía por una parte la liberación del colorante que había en su interior, pero simultáneamente se comprobó la presencia en la disolución de los ésteres de partida correspondientes por lo que se dedujo que el cierre de los poros era debido a razones hidrofóbicas producidas por el antraceno y no a una unión covalente de los ésteres. Como experimentos posteriores de hidrólisis de los ésteres de partida con la esterasa dieron lugar a resultados negativos, este sistema se desestimó y no se llevaron a cabo más estudios.

⁷⁸ (a) Lekha, P. K., Prasad, E. *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, 3699-3706. (b) Schwarz, F. P., Wasik, S. P. *Anal. Chem.*, **1976**, *48*, 524-528.

En el caso de los compuestos **7**, **8**, **9** y **10**, se intentó seguir la misma ruta sintética, la explicada en el esquema 1, no obstante, una vez obtenidos los sólidos, no se podían lavar de forma adecuada, y además se comprobó que habían perdido la estructura mesoporosa. Se pensó que el problema podía estar en que para la formación del carbamato se añadía una pequeña porción de sodio metálico (cantidad catalítica), pero puesto que esta porción no se podía pesar con exactitud, no siempre era la misma y en el caso de que hubiera un exceso, se podría generar sosa que destruiría las nanopartículas. Así pues, se buscó una ruta sintética alternativa para la unión a la MCM-41 de estas moléculas. Por ello, se decidió emplear la ruta explicada anteriormente en el esquema 2, es decir, realizar la formación del carbamato en primer lugar y una vez formado anclar los alcoxisilanos correspondientes (figura 12) al soporte inorgánico ya cargado de colorante.

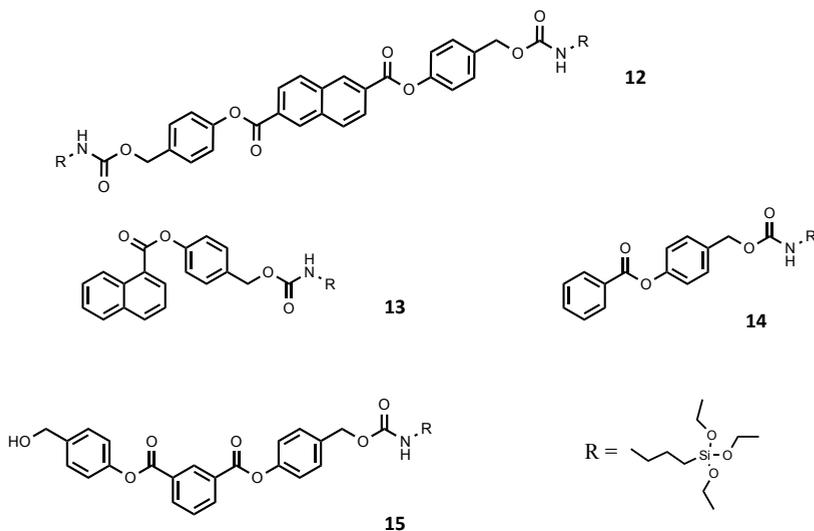


Figura 12. Representación de la estructura de las puertas moleculares **12**, **13**, **14** y **15**.

Para llevar a cabo esta reacción, se probaron varias condiciones hasta dar con las adecuadas: diferentes disolventes (acetonitrilo anhidro (CH_3CN) y THF anhidro), diferentes bases para desprotonar los alcoholes y diferentes tiempos de reacción (Tabla 3). Inicialmente se probó la reacción con sodio metálico, pero posteriormente se pensó que era mejor utilizar hidruro sódico puesto que en este caso podíamos poner una cantidad más exacta de reactivo.

Tabla 3. Condiciones de reacción para la formación de los diferentes carbamatos a partir de los reactivos de partida correspondientes junto con isocianato de 3- (trietoxisilil) propilo e hidruro sódico.

Producto	Reactivo partida	Disolvente	Tiempo	T ^º	Aspecto	Rto (%)	Relación pto:pto de partida	Sólido final
12	10	THF anhidro	24h	Reflujo	Sólido amarillo	50	50:50	S5
13	9	CH_3CN anhidro	72h	Reflujo	Aceite amarillo	90	-	S6
14	7	CH_3CN anhidro	72h	Reflujo	Aceite amarillo	50	50:50	S7
15	8	CH_3CN anhidro	2h	Reflujo	Aceite amarillo claro	75	-	S8

Una vez formados todos los carbamatos, se cargó la MCM-41 con rodamina 6G en las mismas condiciones que se han explicado anteriormente, y se ancló en cada caso la puerta molecular correspondiente. Dejando como último paso el lavado de los materiales para eliminar los restos de colorante. De este modo, empleando **12**, **13**, **14** y **15** se obtuvieron **S5**, **S6**, **S7** y **S8** respectivamente.

El siguiente paso consistió en la caracterización de los materiales obtenidos mediante las técnicas estándar (TEM, difracción de rayos X de polvo, porosimetría y análisis elemental).

A título de ejemplo se incluyen algunos de los resultados obtenidos que presentaron las características esperadas.

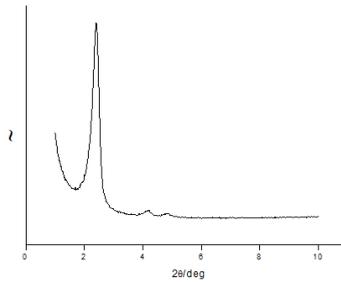


Figura 13. Difracción de rayos X de polvo de S7.

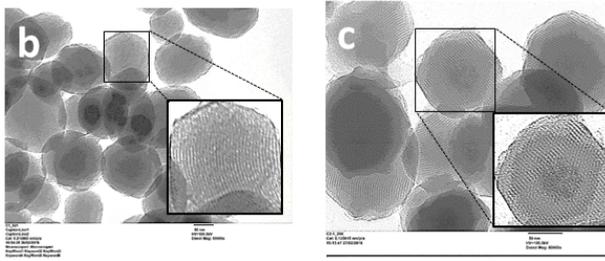


Figura 14. Imagen del TEM de (b) S7 (c) S6.

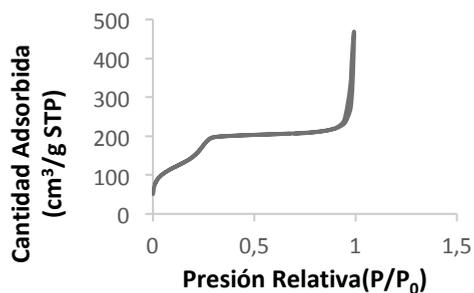


Figura 15. Isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno de **S6**.

Tabla 4. Valores BET de superficie específica, volumen de poro y tamaño de poro calculados a partir de isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno para MSN calcinado y **S6-S7**.

	S_{BET} ($m^2 g^{-1}$)	Volumen Poro ($cm^3 g^{-1}$) ^[a]	Tamaño de Poro (nm) ^[b]
MSN Calcinado	1119,9	0,93	3,31
S6	535,6	0,41	3,07
S7	118,3	0,11	2,24

[a] Volumen de poro y tamaño de poro estaban asociados únicamente con los mesoporos intrapartícula. [b] Tamaños de poro estimados por el modelo BJH aplicado a la rama de absorción de la isoterma.

Tabla 5. Valores de la carga (%) y de la cantidad de materia orgánica correspondiente a las puertas moleculares (mg) presente en cada uno de los sólidos (**S5-S8**) por cada 100 mg de MCM-41 calculados a partir del análisis elemental de la muestra.

	Carga (%)	Cantidad de materia orgánica (mg materia orgánica puertas/100 mg MCM-41)
S5	1,15	94,7
S6	1,17	57,5
S7	1,05	58,7
S8	0,85	57,9

Una vez preparados y caracterizados los materiales, se pasó a realizar los estudios de liberación de los mismos. Para ello se prepararon las disoluciones de referencia (a una concentración de 0,33 mg/ml) conocidas como blanco o control en las cuales no se añade el estímulo de apertura de la puerta, en nuestro caso la enzima esterasa, para comprobar el nivel de liberación en ausencia del estímulo, y las disoluciones de medida (también a una concentración de 0,33 mg/ml) a las cuales si se les añade la enzima. Al igual que en el caso de **S1** y **S2**, inmediatamente después de la adición de la enzima se inició la cinética de liberación del colorante mediante espectroscopia de fluorescencia.

Al igual que en el apartado anterior, la principal diferencia entre las distintas puertas moleculares empleadas para sintetizar los sólidos (**S5-S8**) es su volumen estérico, puesto que todas ellas presentan el mismo sistema de apertura, a partir de la ruptura del enlace éster por la enzima esterasa.

En la figura 16 se puede observar la comparación de la liberación de colorante que se produce en cada uno de los materiales en presencia y ausencia de la enzima esterasa, en la gráfica superior se observa que el material que menos colorante libera en ausencia del estímulo externo es **S5** que es el que presenta un mayor volumen estérico. Este efecto es más limitado que en el caso de **S8**, puerta doble derivada del ácido isoftálico. Las puertas simples presentan una capacidad de cierre similar, aunque como era de esperar, la que contiene un anillo de naftaleno (**S6**) cierra mejor que la que contiene un anillo de benceno (**S7**). En presencia de la enzima esterasa se observa que conforme el volumen estérico de la puerta aumenta, la capacidad de apertura se ve disminuida

probablemente por la dificultad de aproximación de la enzima al centro reactivo. Así **S5** es el material que menos colorante libera mientras que **S7** es el que libera más. En cualquier caso las eficacias de liberación conseguidas con estas puertas moleculares es en general mayor que las conseguidas con los sistemas no autoinmolantes usados en la preparación de **S1** y **S2**.

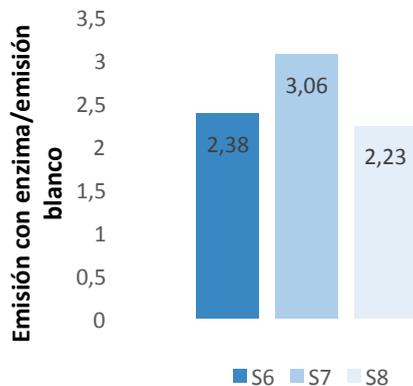
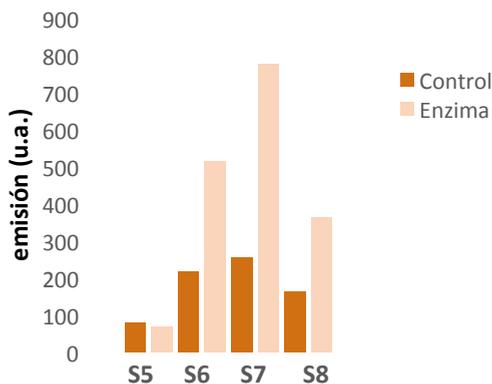
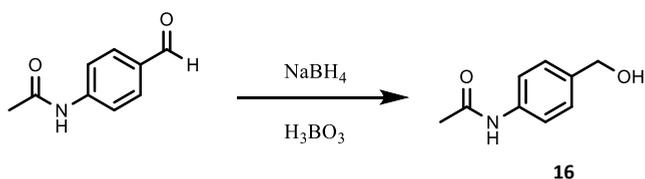


Figura 16. Histograma representativo de la liberación de colorante (medida a partir de la intensidad de fluorescencia) de los materiales **S5-S8** en presencia y ausencia de enzima esterasa.

Al observar el gráfico de la parte inferior de la figura 16, podemos ver que el material que presenta una mayor eficacia de cierre/eficacia de liberación es el material **S7**, seguido por **S6** y después por **S8**. Al analizar estos datos vemos que es necesario un control fino en el volumen estérico de la puerta molecular puesto que ha de ser lo suficientemente voluminosa como para tapar los poros de las nanopartículas, pero no en exceso para que no impida el acceso del estímulo externo al punto de reacción.

3.2.2.2 Amidas

Se sintetizaron también puertas moleculares con estructuras similares, pero con un enlace amida en lugar de éster para observar las diferencias en efectividad que podrían aparecer al cambiar el estímulo de una esterasa a una amidasa. Así, se diseñó el compuesto N-(4-(hidroximetil)fenil) acetamida (**16**) que se obtuvo, por reducción de 4-acetamidobenzaldehído⁷⁹, como un sólido amarillo que no necesitó mayor purificación, con un rendimiento del 38% (esquema 15).

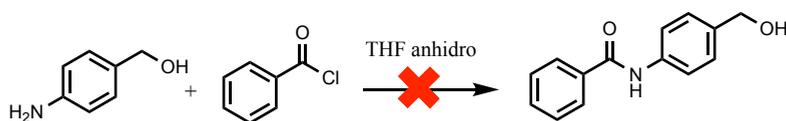


Esquema 15. Reacción de reducción de aldehído a alcohol para la obtención del producto **16**.

Por último, se pasó a realizar la síntesis de N-(4-(hidroximetil)fenil)benzamida (**17**). Para ello se llevaron a cabo varios intentos hasta conseguir obtener el producto deseado. En primer lugar,

⁷⁹ Cho, B. T., Kang, S. K., Kim, M. S., Ryu, S. R., An, D. K. *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 8164-8168.

se inició la síntesis a partir de 4-hidroximetilanilina con cloruro de benzoilo⁸⁰ utilizando como base formiato de sodio o trietilamina, y posteriormente sin utilizar ninguna base (esquema 16), pero en ninguno de los tres casos se obtuvo el producto, ya que en presencia de una base el reactivo de partida, 4-hidroximetil anilina, se degradaba, mientras que en el tercer caso, aunque a partir de los espectros de RMN de protón (¹H RMNs) parecía que podía estar el producto mezclado con reactivos de partida, la purificación cromatográfica no dio lugar a los resultados esperados. Por ello, se decidió probar la síntesis utilizando una vía alternativa.



Condiciones de reacción ensayadas:

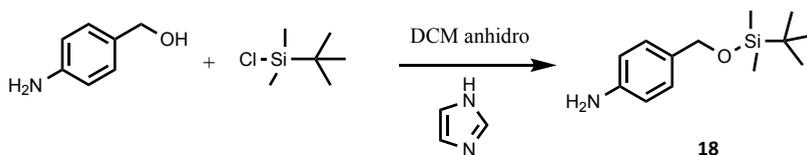
- Formiato de sodio
- Et₃N

Esquema 16. Formación de una amida a partir de 4-hidroximetilanilina y cloruro de benzoilo para la obtención del producto **17**.

Así, se probó la síntesis protegiendo el alcohol con cloruro de tert-butildimetilsililo⁸¹ (esquema 17) para a continuación, hacer reaccionar el alcohol protegido con cloruro de benzoilo (esquema 18).

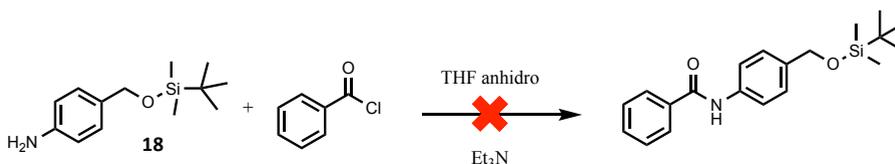
⁸⁰ (a) An, Y., Lee, E., Yu, Y., Yun, J., Lee, M. Y., Kang, J. S., Kim, W.-Y., Jeon, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2016**, *26*, 3067-3072. (b) Pignarato, L., Bovio, C., Civera, M., Piarulli, U., Gennari, C. *Chem. Eur. J.*, **2012**, *18*, 10368-10381.

⁸¹ Zhang, H., Xu, C., Liu, J., Li, X., Guo, L., Li, X. *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 7031-7034.



Esquema 17. Reacción de protección del grupo alcohol con tert-butildimetilsililo para la obtención del producto **18**.

Si bien se obtuvo el producto protegido, la reacción posterior de amidación no dio los resultados esperados, puesto que se obtuvo una mezcla de productos entre los que podía estar el producto deseado, pero cuya purificación por cromatografía en columna no fue viable debido a la mala separación que se observaba en cromatografía de capa fina y además el rendimiento estimado del producto deseado era bajo.

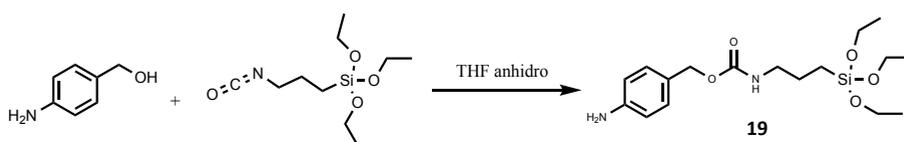


Esquema 18. Formación de una amida a partir del producto **18** y el cloruro de benzoilo.

Finalmente, se pensó que una alternativa interesante sería proteger el grupo hidroxilo haciendo reaccionar la 4-hidroximetilanilina con isocianato de 3-(trietoxisilil)propilo (la unión al soporte mesoporoso se produce a partir de este reactivo) para después llevar a cabo la síntesis de la amida por reacción con cloruro de benzoilo.

Para conseguir este objetivo, se probó sodio metálico como base para desprotonar el alcohol e incrementar de este modo su nucleofilia. En

esta reacción se obtuvo un crudo cuyo $^1\text{H-RMN}$ presentaba buen aspecto, aunque no estuviera puro. De cualquier modo, nos abstuvimos de purificarlo debido a su baja solubilidad y probamos directamente a hacerlo reaccionar con cloruro de benzoilo. Al no dar resultado la reacción, probamos la síntesis del compuesto (**19**) sin utilizar sodio metálico, en este caso el producto obtenido presentaba mejor aspecto (esquema 19).



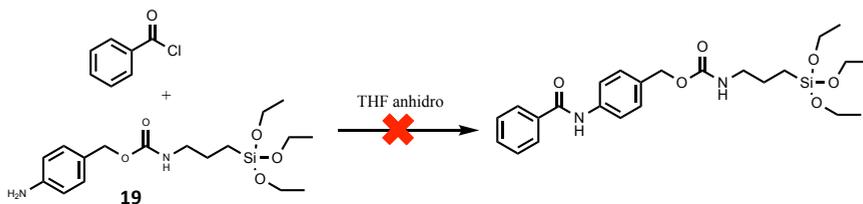
Condiciones de reacción ensayadas:

- Con Na
- Sin Na

Esquema 19. Reacción de formación de un carbamato entre 4-hidroximetilanilina y 3-(trietoxisilil)propil isocianato en presencia y ausencia de sodio metálico para la obtención del producto **19**.

Debido a la dificultad que presentaba el producto para disolverse, lo pusimos a reaccionar con cloruro de benzoilo sin mayor purificación utilizando inicialmente trietilamina, después con $\text{N,N}'$ -diciclohexilcarbodiimida (DCC)⁸² (esquema 20) que no generaba ácido para ver si de esta manera no se producía la pérdida de los grupos etoxilo observada anteriormente. Desafortunadamente en ningún caso se obtuvo el producto deseado.

⁸² Valeur, E., Bradley, M. *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, *38*, 606-631.

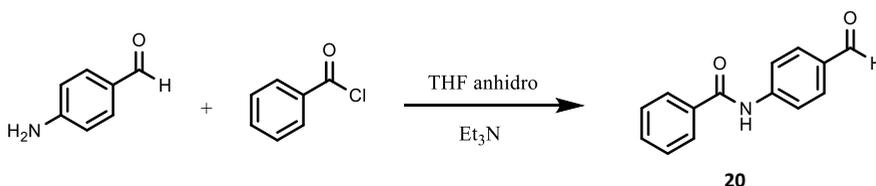


Condiciones de reacción ensayadas:

- Et₃N
- DCC

Esquema 20. Formación de una amida entre el producto **19** y cloruro de benzoilo.

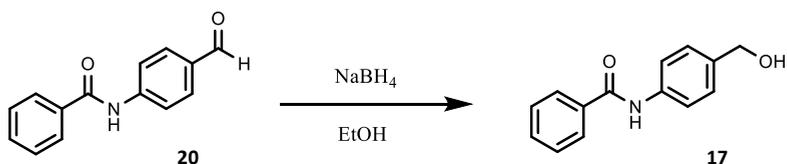
Dado que todos los intentos realizados para obtener el compuesto mediante la formación de la amida partiendo de la 4-hidroximetilanilina habían resultado infructuosos, se planteó la posibilidad de llevar a cabo la preparación del mismo a través de una ruta alternativa: hacer reaccionar 4-aminobenzaldehído con cloruro de benzoilo (esquema 21) y posteriormente reducir el aldehído a alcohol para obtener el producto deseado⁸³ (**17**) (esquema 22). En la primera etapa de nuestra secuencia, se obtuvo N-(4-formilfenil)benzamida (**20**) en forma de sólido amarillo con un rendimiento del 64%.



Esquema 21. Formación de una amida entre 4-aminobenzaldehído y cloruro de benzoilo para la obtención del producto **20**.

⁸³ An, Y., Lee, E., Yu, Y., Yun, J., Lee, M. Y., Kang, J. S., Kim, W.-Y., Jeon, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2016**, *26*, 3067-3072.

La reducción se probó inicialmente empleando borohidruro de sodio (NaBH_4) y ácido bórico (H_3BO_3)⁷⁹, pero eran reactivos demasiado fuertes con lo que además de producirse la reducción al alcohol, se producía también la rotura de la amida. Vistos estos resultados, se buscaron condiciones más suaves⁸⁴. Así se realizó la reacción en etanol con NaBH_4 , obteniéndose el producto **17** en forma de sólido amarillo pálido con un rendimiento del 72% (esquema 22).



Esquema 22. Reacción de reducción del grupo aldehído a alcohol para la obtención del producto **17**.

Una vez obtenidas las dos moléculas orgánicas que iban a emplearse en la preparación de las puertas moleculares que se habían diseñado pasamos al siguiente paso, la formación del carbamato correspondiente para cada puerta a partir del isocianato de 3-(trietoxisilil)propilo. En este punto seguimos dos estrategias sintéticas distintas. Para la puerta molecular sintetizada a partir del compuesto **16**, se siguió la ruta sintética representada anteriormente en el esquema 1, es decir, la reacción continuada en un único paso, denominándose el sólido final **S9**, mientras que en el caso de la puerta molecular sintetizada a partir del compuesto **17**, se siguió la ruta sintética representada en el esquema 2, varios pasos de reacción para la obtención del sólido final, por un lado la carga de la MCM-41 con el colorante, por otro lado la formación del

⁸⁴ Brown, H. C. *J. Chem. Educ.*, **1961**, *38*, 173-179.

carbamato a partir del compuesto **17**, y a continuación el anclaje de la puerta molecular para la obtención del sólido **S10**.

Así, en el caso de la puerta molecular formada a partir del compuesto **17**, el primer paso fue la síntesis del carbamato correspondiente (**21**) (figura 17), para lo que se siguió el mismo procedimiento que en el caso de las puertas con grupo éster.

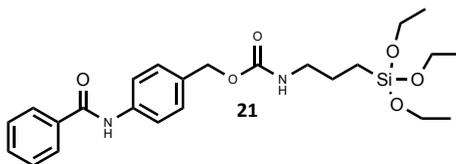


Figura 17. Representación de la estructura de la puerta molecular **21**.

Tabla 6. Condiciones de reacción para la formación del carbamato a partir del reactivo de partida **17** junto con 3- (trietoxisilil) propil isocianato e hidruro sódico.

Producto	Reactivo partida	Disolvente	Tiempo	T ^º	Aspecto	Rto (%)	Relación producto:product o de partida	Sólido final
21	17	CH ₃ CN anhidro	24h	Reflujo	Sólido amarillo	50	50:50	S10

Una vez preparado el carbamato, se realizó la carga de la MCM-41 con rodamina 6G en las mismas condiciones que se han explicado anteriormente.

Una vez obtenidos los sólidos finales (**S9** y **S10**), se procedió a la caracterización de los mismos mediante las técnicas estándar (TEM, difracción de rayos X de polvo, porosimetría y análisis elemental).

A título de ejemplo se incluyen el espectro de rayos X y la porosimetría correspondiente a **S9** que presentaron las características esperadas.

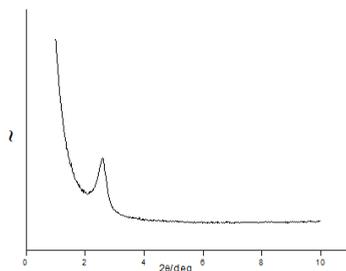


Figura 18. Rayos X de **S9**.

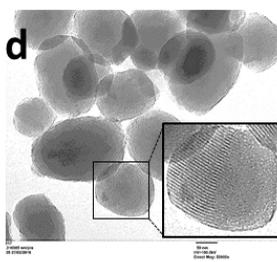


Figura 19. Imagen del TEM de **S9**

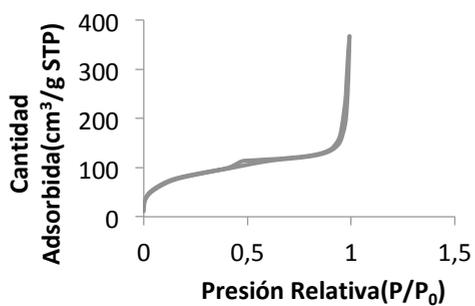


Figura 20. Isotherma de adsorción/desorción de nitrógeno de **S9**.

Tabla 7. Valores BET de superficie específica, volumen de poro y tamaño de poro calculados a partir de isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno para MSNs calcinados, **S9** y **S10**.

	S_{BET} ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	Volumen Poro ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$) ^[a]	Tamaño de Poro (nm) ^[b]	Carga (%)	Cantidad de puerta molecular (mg puerta/100 mg MCM-41)
MSN	1005,7	0,80	3,19		
Calcinado					
S9	300,7	0,28	3,85	0,64	41,6
S10	298,5	0,18	2,16	1,58	62,2

[a] Volumen de poro y tamaño de poro estaban asociados únicamente con los mesoporos intrapartícula. [b] Tamaños de poro estimados por el modelo BJH aplicado a la rama de absorción de la isoterma.

Una vez caracterizados los materiales, se pasó a realizar los estudios de liberación con los mismos. Para ello se prepararon las disoluciones de referencia (a una concentración de 0,33 mg/ml) conocidas como blanco o control en las cuales no se añade el estímulo de apertura de la puerta, en nuestro caso la enzima amidasa (Sigma P3319-2,5KU), para comprobar el nivel de liberación en ausencia del estímulo, y las disoluciones de medida (también a una concentración de 0,33 mg/ml) a las cuales si se les añade la enzima. Al igual que en los casos anteriores, se inició el estudio de liberación inmediatamente después de la adición de la enzima, que se siguió por espectroscopía de fluorescencia.

La figura 21 (arriba) muestra una comparación de los resultados obtenidos con los sólidos **S7** y **S10**. Las puertas moleculares empleadas en ambos sólidos solo se diferencian en el grupo funcional, mientras que en **S7** hay presente un éster en **S10** hay una amida. Sin embargo, esta diferencia hace que la eficacia en el cierre de los poros sea claramente diferente. La puerta con amida cierra mejor que la del éster

probablemente por la posibilidad de formar puentes de hidrógeno que presentan las amidas.

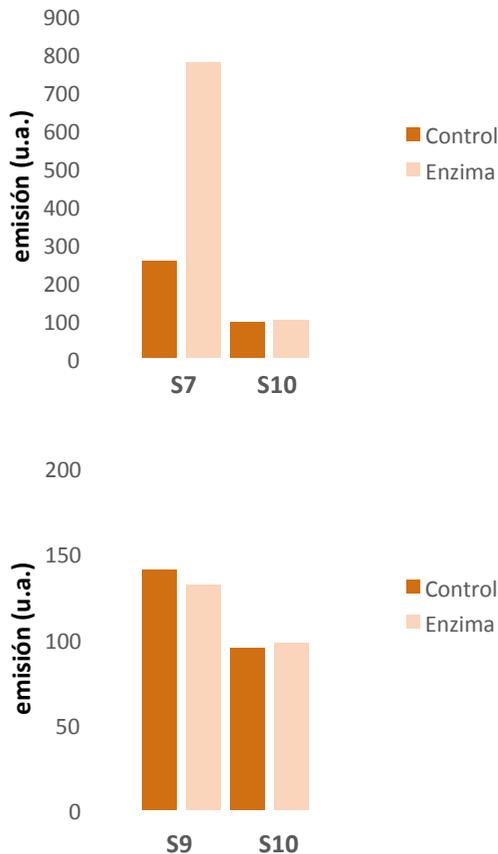


Figura 21. (Arriba) Estudio comparativo de los sólidos **S7** y **S10**. (Abajo) Histograma representativo de la liberación de colorante (medida a partir de la intensidad de fluorescencia) de los materiales **S9** y **S10** en presencia y ausencia de enzima amidasa.

Otro punto de interés es que la liberación en presencia del estímulo externo es mucho mayor en el caso de **S7** que en el caso de **S10**. Teniendo en cuenta que el impedimento estérico es similar en ambos materiales, esta diferencia solo se puede relacionar con la menor

reactividad de las amidas en las reacciones de hidrólisis. El efecto es similar (dentro del error experimental) en **S9** y en **S10** por lo que podemos concluir que es un efecto general de las puertas moleculares conteniendo amidas (figura 21, abajo).

3.3 Procedimiento experimental

Procedimiento general:

Los reactivos comerciales empleados se utilizaron sin purificación adicional. Para las cromatografías en capa fina (TLC) se utilizó sílica gel 60 F254 adsorbida sobre láminas de aluminio de la marca comercial Merck. Los espectros ^1H -RMN y ^{13}C -RMN se registraron en espectrómetro Bruker 300, 400 o 500 MHz. Los desplazamientos químicos se presentan en ppm con tetrametilsilano como patrón interno. Los espectros de masas de alta resolución se registraron en modo ion positivo en un espectrómetro TRIPLETOFT5600 (ABSciex): LC/MS. Los espectros de absorción y fluorescencia se registraron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2600 y un espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse respectivamente (en ambos casos se utilizaron cubetas de cuarzo de longitud de trayectoria de 1 cm). Las imágenes de microscopía electrónica TEM se obtuvieron en un microscopio de transmisión de electrones JEOL-1010 a 100 KV. Los estudios termogravimétricos se llevaron a cabo en un TG-DTA Pyris-Diamond utilizando una atmósfera oxidante (aire 80 mL/min) con un calentamiento programado que consistía en una etapa de calentamiento a 5 °C por minuto desde 393 hasta 1273 K y otra de calentamiento isotérmico a esta temperatura durante 30 minutos.

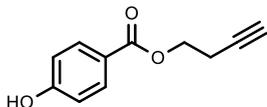
Elaboración de disoluciones tamponadas:

- Tampón Acético acetato 0,1 M pH 5,1: 570 μ l de ácido acético en 100 ml de agua desionizada. Para ajustar el pH se utilizó NaOH 2 M.
- Tampón Borax 0,1 M pH 8: 3,81 g tetraborato de sodio decahidratado en 100 ml de agua desionizada. Para ajustar el pH se utilizó HCl 1 M.
- Tampón Borax 0,025 M pH 10,4: 0,95 g tetraborato de sodio decahidratado en 100 ml de agua desionizada. Para ajustar el pH se utilizó NaOH 2 M.
- Tampón Tris 0,26 M pH 8: 3,15 g de tris(hidroximetil)aminometano en 100 ml de agua desionizada. Para ajustar el pH se utilizó una disolución de HCl 0,2 M.
- Tampón Tris 0,26 M pH 7,81: 3,15 g de tris(hidroximetil)aminometano en 100 ml de agua desionizada. Para ajustar el pH se utilizó una disolución de HCl 0,2 M.
- Tampón sodio acetato 50 mM pH 5,5: 1,36g de acetato de sodio trihidratado, 74,44 mg de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 154,24 mg de DL-Ditiotreitol (DTT) en 200 mL de agua desionizada. Para ajustar el pH se utilizó ácido acético glacial.
- Tampón fosfato 100 mM pH 7: 2,84 g de fosfato de disodio en 200 ml de agua desionizada. Para ajustar el pH se utilizó una disolución de HCl 0,2M.

Secado de disolventes:

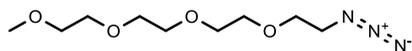
- Tetrahidrofurano: con sodio metálico y benzofenona
- Diclorometano: cloruro cálcico
- Acetonitrilo: cloruro cálcico y pentóxido de fósforo

Síntesis de p-hidroxibenzoato de 3-butinilo (1)



En un matraz de fondo redondo de 25 ml, se disolvieron ácido 4-hidroxibenzoico (0,7 g, 5 mmol) y 3-butin-1-ol (1,51 ml, 20 mmol) en 5 ml de THF. Se añadió 0,1 ml de ácido sulfúrico concentrado y la mezcla se agitó a reflujo durante 24 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se vertió sobre hielo picado. La mezcla se extrajo con éter etílico y la combinación de las fases orgánicas se lavó con una disolución de bicarbonato sódico al 10%, se secó con MgSO₄ anhidro y se concentró. El producto se purificó por cromatografía en columna (eluyente: hexano/acetato de etilo 1:2) para obtener el correspondiente éster (0,45 g, 47%) como un sólido marrón.¹H RMN (300 MHz, Cloroformo-d) δ (ppm) 7,95 (d, *J*= 8,9 Hz, 2H, 2Ar-H), 6,87 (d, *J*= 8,9 Hz, 2H, 2Ar-H), 4,40 (t, *J*= 6,8 Hz, 2H, -COOCH₂-), 2,65 (td, *J*= 6,8 y 2,7 Hz, 2H, -CH₂C≡), 2,03 (t, *J*= 2,7 Hz, 1H, -C≡CH).¹³C RMN (75 MHz, Cloroformo-d) δ 167,0, 161,0, 132,5, 122,3, 115,7, 80,5, 70,4, 62,9, 20,2 ppm. HRMS (ESI): *m/z* calcd. para C₁₁H₁₀O₃ (M⁺+ 1) 191,0703, encontrado 191,0701.

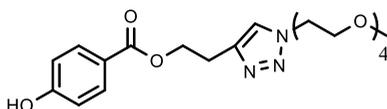
Síntesis de 13-azido-2,5,8,11-tetraoxatridecano (2)



En un matraz de fondo redondo de 250 ml, se disolvió azida sódica (6,8 g, 0,1 mol) en 80 ml de dimetilformamida seca. Se añadió 4-metilbencenosulfonato de 2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-ilo (7,57 g, 0,02 mol) y la reacción se mantuvo con agitación, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón, durante 1 semana. Pasado ese tiempo, se

añadió agua y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. La combinación de las fases orgánicas se lavó con bicarbonato sódico al 10% y salmuera, se secó con MgSO_4 anhidro y se evaporó el disolvente para obtener la correspondiente azida (2,41 g, 51%) cómo un aceite amarillo sin ulterior purificación. ^1H RMN (300 MHz, Cloroformo-*d*) δ 3,67 – 3,59 (m, 12H, 6 – CH_2O -), 3,55 – 3,50 (m, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3,37 (m, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3,35 (s, 3H, CH_3). ^{13}C RMN (75 MHz, Cloroformo-*d*) δ 72,1, 70,9, 70,8, 70,7, 70,2, 59,1, 50,9 ppm. HRMS (ESI): *m/z* calcd. para $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$ (M^++1) 234,1448, encontrado 234,1444.

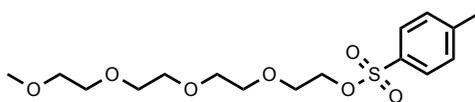
Síntesis de p-hidroxibenzoato de 2-(1-(2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il) etilo (**3**)



En un matraz de fondo redondo de 25 ml, se disolvieron 13-azido-2,5,8,11-tetraoxatridecano (0,23 g, 1 mmol) y p-hidroxibenzoato de 3-butinilo (0,21 g, 1,1mmol) en una mezcla de THF (2,48 ml) agua (1,42 ml). Se añadieron 7 mg de acetato de cobre y 14 mg de ascorbato de sodio en 0,58 ml de agua y la reacción se agitó 24 horas a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se añadió salmuera y se extrajo con diclorometano (3 x 5 ml). La fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó con MgSO_4 anhidro y se evaporó el disolvente. El producto se purificó por cromatografía en columna (eluyente: hexano/acetato de etilo 3:7) para obtener el correspondiente éster (0,31 g, 72%) como un aceite amarillo. ^1H RMN (300 MHz, Cloroformo-*d*) δ (ppm) 7,85 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H, 2Ar-H), 7,61 (s, 1H, H-heterociclo), 6,87 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H, 2Ar-H), 4,54 – 4,45 (m, 4H, $-\text{COOCH}_2-$ y $-\text{CH}_2\text{N}$), 3,79 (dd, $J = 5,5$ y $4,4$ Hz, 2H, $-\text{OCH}_2-$),

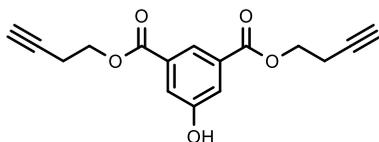
3,62 – 3,47 (m, 12H, 6-OCH₂-), 3,32 (s, 3H, -OCH₃), 3,16 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H, -CH₂-N.).¹³C RMN (75 MHz, Cloroformo-*d*) δ 166,8, 162,4, 144,4, 132,1, 123,5, 121,3, 115,9, 72,1, 70,8, 70,7, 70,6, 70,5, 69,7, 63,6, 59,2, 50,7, 25,8 ppm. HRMS (ESI): *m/z* calcd. para C₂₀H₂₉N₃O₇ (M⁺+1) 424,2078, encontrado 424,2080.

Síntesis de 4-metilbencenosulfonato de 2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-ilo (4)



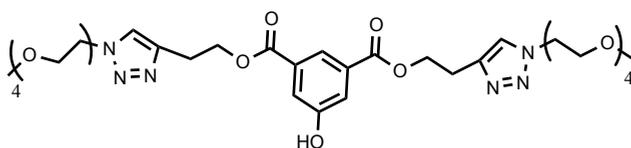
En un matraz de fondo redondo de 250 ml, tetraetilenglicol mono metil éter (5 g, 24 mmol) y trietilamina (10,45 ml, 75 mmol) se añadieron a 37,5 ml de diclorometano anhidro. La mezcla se agitó a 0°C (en baño de hielo y agua) durante 10 minutos bajo atmósfera de argón. A continuación se agregó gota a gota una disolución de cloruro de *p*-toluensulfonilo (9,13 g, 48 mmol) en 71,9 ml de diclorometano anhidro y la reacción se mantuvo con agitación a temperatura ambiente toda la noche. La mezcla se extrajo con agua y la fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con MgSO₄ anhidro y se evaporó el disolvente. El producto se purificó por cromatografía en columna (eluyente: hexano/acetato de etilo 2:1) para obtener el producto puro (7,57 g, 87%) como un aceite naranja pálido.¹H RMN (300 MHz, Cloroformo-*d*) δ (ppm) 7,78 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H, 2Ar-H), 7,32 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H, 2Ar-H), 4,16 – 4,10 (dd, *J* = 6,0 y 4,5 Hz, 2H, -CH₂OSO₂-), 3,69 – 3,49 (m, 14H, -CH₂O-), 3,35 (s, 3H, CH₃), 2,42 (s, 3H, CH₃).¹³C RMN (75 MHz, Cloroformo-*d*) δ 145,1, 133,4, 130,2, 128,3, 72,3, 71,1, 71,0, 70,9, 70,9, 70,8, 69,6, 69,0, 59,4, 22,0 ppm.

Síntesis de 5-hidroxiisofталato de di-3-butinilo (5)



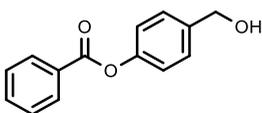
En un matraz de fondo redondo de 25 ml, se disolvieron ácido 5-hidroxiisofталico (0,91 g, 5 mmol) y 3-butin-1-ol (1,51 ml, 20 mmol) en 5 ml de THF. Se añadió 0,1 ml de ácido sulfúrico concentrado y la mezcla se agitó a reflujo durante 24 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se vertió sobre hielo picado. La mezcla se extrajo con éter etílico y la combinación de las fases orgánicas se lavó con una disolución de bicarbonato sódico al 10%, se secó con MgSO_4 anhidro y se evaporó el disolvente. El producto se purificó por cromatografía en columna (eluyente: hexano/acetato de etilo 1:2) para obtener el correspondiente éster (0,61 g, 43%) cómo un sólido amarillo pálido. ^1H RMN (300 MHz, Cloroformo-d) δ (ppm) 8,28 (t, $J = 1,5$ Hz, 1H, Ar-H), 7,77 (d, $J = 1,5$ Hz, 2H, 2Ar-H), 6,06 (s, 1H, -OH), 4,45 (t, $J = 6,8$ Hz, 4H, 2 - CH_2OCO -), 2,68 (dt, $J = 6,8$ y 2.7 Hz, 4H, 2 - $\text{CH}_2\text{C}\equiv$), 2,04 (t, $J = 2,7$ Hz, 2H, 2 $\equiv\text{CH}$). ^{13}C RMN (75 MHz, Cloroformo-d) δ 165,8, 156,6, 132,1, 123,4, 121,4, 81.4, 70,6, 63,4, 19,5 ppm. HRMS (ESI): m/z calcd. para $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$ ($\text{M}^+ + 1$) 287,0914, encontrado 287,0915.

Síntesis de bis(2-(1-(2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)etil) 5-hidroxiisofталato (6)



En un matraz de fondo redondo de 25 ml, se disolvieron 13-azido-2,5,8,11-tetraoxatridecano (0,20 g, 0,86 mmol) y 5-hidroxiisofталato de di-3-butinilo (0,10 g, 0,35 mmol) en una mezcla de THF (4,96 ml) agua (2,84 ml). Se añadieron 14 mg de acetato de cobre y 28 mg de ascorbato sódico en 1,16 ml de agua y la reacción se agitó 72 horas a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se añadió salmuera y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó con $MgSO_4$ anhidro y se evaporó el disolvente para obtener el correspondiente éster (0,17 g, 65%) cómo un aceite amarillo sin ulterior purificación. 1H RMN (300 MHz, Cloroformo-*d*) δ (ppm) 8,05 (s ancho, 1H, Ar-H), 7,61 (s, 2H, H-heterociclo), 7,59 (d, $J = 1,5$ Hz, 2H, 2Ar-H), 4,54 (t, $J = 5,0$ Hz, 4H, $-COOCH_2-$), 4,48 (t, $J = 5,0$ Hz, 4H, $-CH_2N$), 3,80 (t, $J = 5,0$ Hz, 4H, $-OCH_2-$), 3,62 – 3,45 (m, 24H, $-OCH_2-$), 3,27 (s, 6H, $-OCH_3$), 3,14 (t, $J = 5,0$ Hz, 4H, $-CH_2-Het.$). ^{13}C RMN (75 MHz, Cloroformo-*d*) δ 165,8, 157,8, 144,1, 131,9, 123,4, 122,3, 121,3, 72,2, 71,0, 70,9, 70,8, 70,6, 69,8, 64,4, 59,2, 50,6, 25,8 ppm. HRMS (ESI): m/z calcd. para $C_{34}H_{52}N_6O_{13}$ ($M+1$)⁺, 753,3671, encontrado 753,3622.

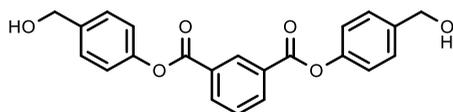
Síntesis de de 4-(hidroximetil)fenil benzoato (7)



En un matraz de fondo redondo de 25 ml, 4-hidroxibencil alcohol (0,25 g, 2 mmol) se añadió a una disolución de KOH (0,11 g, 2 mmol) en etanol (5 ml). La mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se agregó cloruro de benzoilo (0,23 ml, 2 mmol) y la

reacción se mantuvo con agitación durante 24 horas. Pasado ese tiempo se evaporó el disolvente y el crudo de reacción se redisolvió en acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó con MgSO_4 anhidro y se evaporó el disolvente. El producto se purificó por cromatografía en columna (eluyente: hexano/acetato de etilo 2:1) para obtener el éster correspondiente (0,17 g, 38%) como un sólido blanco ^1H RMN (300 MHz, Cloroformo-*d*) δ (ppm) 8,21 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H, 2Ar-H), 7,65 (t, $J = 9,0$ Hz, 1H, Ar-H), 7,52 (t, $J = 9,0$ Hz, 2H, 2Ar-H), 7,44 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H, 2Ar-H), 7,22 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H, 2Ar-H), 4,73 (s, 2H, Ar- CH_2O). ^{13}C RMN (75 MHz, Cloroformo-*d*) δ 165,7, 150,8, 139,0, 134,0, 130,6, 129,9, 129,0, 128,5, 122,2, 65,2 ppm.

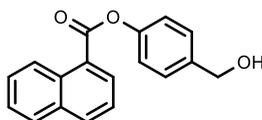
Síntesis de bis(4-(hidroximetil)fenil) isoftalato (8)



En un matraz de fondo redondo de 25 ml, 4-hidroxibencil alcohol (0,24 g, 1,97 mmol) se añadió a una disolución de KOH (0,11 g, 1,97 mmol) en etanol (5 ml). La mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadió cloruro de isoftaloilo (0,2 g, 0,99 mmol) y se mantuvo en agitación toda la noche. Pasado ese tiempo, se evaporó el disolvente y el producto se redisolvió en acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó con MgSO_4 anhidro y el disolvente se evaporó en el rotavapor. El producto se purificó por cromatografía en columna (eluyente: hexano/acetato de etilo 1:1) para obtener el correspondiente éster (0,21 g, 57%) como un sólido blanco. ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 8,79 (t, $J = 1,8$ Hz, 1H, Ar-H), 8,47 (dd,

J = 7,8 y 1,8 Hz, 2H, 2Ar-H), 7,87 (t, J = 7,8 Hz, 1H, Ar-H), 7,43 (d, J= 9,0 Hz, 4H, 2Ar-H), 7,29 (d, J= 9,0 Hz, 4H, 2Ar-H), 5,29 (s ancho, 2H, -OH), 4,54 (s, 4H, 2Ar-CH₂O). ¹³C RMN (75 MHz, DMSO-d₆) δ 164,3, 149,5, 140,9, 135,2, 131,0, 130,2, 127,9, 115,1, 62,7 ppm. HRMS (ESI): m/z calcd. para C₂₂H₁₈O₆ (M⁺+Na) 401,0996, encontrado 401,0994.

Síntesis de 4-(hidroximetil)fenil-1-naftoato (9)



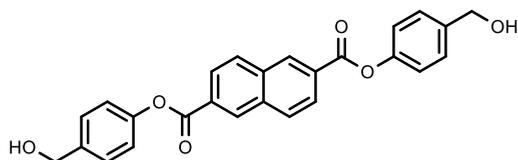
Ácido 1-naftoico (0,57 g, 3,31 mmol) y cloruro de tionilo (4,8 ml, 66,2 mmol) se añadieron a un matraz de fondo redondo de 10 ml y la mezcla se calentó a reflujo durante 3 horas y media. Pasado ese tiempo se evaporó el disolvente, se lavó el residuo con éter etílico, se filtró y la fase orgánica se concentró para obtener el correspondiente cloruro de ácido.

En un matraz de fondo redondo de 50 ml, 4-hidroxibencil alcohol (0,41 g, 3,31 mmol) se añadió a una disolución de KOH (0,19 g, 3,31 mmol) en etanol (17 ml). La mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente y a continuación, se añadió el cloruro de naftaloilo disuelto en 2 ml de etanol. La reacción se mantuvo con agitación y a reflujo durante 3 horas. Pasado ese tiempo, se evaporó el disolvente y se redisolvió el crudo de reacción en acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó con MgSO₄ anhidro y se concentró. El producto se purificó por cromatografía en columna (eluyente: hexano/acetato de etilo desde 2:1 hasta 1:1) para obtener el correspondiente éster (0,33 g, 36%) como un sólido amarillo. ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8,83 (d, J = 8,5 Hz, 1H, Ar-H), 8,45 (dd, J = 7,3 y 1,3 Hz, 1H, Ar-H), 8,33 – 8,28 (m, 1H,

Ar-H), 8,10 (dd, J = 7,9 y 1,8 Hz, 1H, Ar-H), 7,76 – 7,62 (m, 3H, Ar-H), 7,45 (d, J = 8,5 Hz, 2H, 2Ar-H), 7,33 (d, J = 8,5 Hz, 2H, 2Ar-H), 5,28 (t, J = 5,7 Hz, 1H, -OH), 4,56 (d, J = 5,7 Hz, 2H, -CH₂O). ¹³C RMN (75 MHz, DMSO-d₆) δ 165,8, 149,7, 140,7, 134,6, 133,8, 131,3, 130,0, 129,3, 128,6, 128,0, 126,9, 125,9, 125,4, 122,0, 62,8 ppm. HRMS (ESI): m/z calcd. para C₁₈H₁₄O₃ (M⁺+1) 279,1016, encontrado 279,1015.

Síntesis de bis(4-(hidroximetil)fenil) naftaleno-2,6-dicarboxilato

(10)

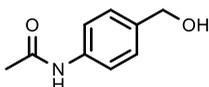


Acido naftaleno-2,6-dicarboxílico (0,55 g, 2,54 mmol) y cloruro de tionilo (4,3 ml, 59,8 mmol) se añadieron a un matraz de fondo redondo de 10 ml y la mezcla se calentó a reflujo durante 3 horas. Pasado ese tiempo, se evaporó el disolvente para obtener el correspondiente cloruro de ácido.

En un matraz de fondo redondo de 25 ml, alcohol 4-hidroxibencílico (0,63 g, 5,08 mmol) se añadió a una disolución de KOH (0,28 g, 5,08 mmol) en etanol (13 ml). La mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, y a continuación, se añadió el dicloruro del ácido naftaleno-2,6-dicarboxílico previamente formado. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. Seguidamente, se filtró a vacío, se lavó el sólido con acetato de etilo y se concentró para obtener el correspondiente éster, que no necesitó ulterior purificación (0,93 g, 82%), como un sólido blanco. ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 8,97 (d, J = 1,6 Hz, 2H, Ar-H), 8,41 (d, J = 8,7 Hz, 2H, Ar-H), 8,28 – 8,19 (m, 2H,

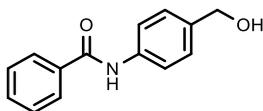
Ar-H), 7,44 (d, $J = 6$ Hz, 4H, 2Ar-H), 7,31 (d, $J = 6$ Hz, 4H, 2Ar-H), 4,55 (s, 4H, 2Ar-CH₂O). ¹³C RMN (75 MHz, DMSO-d₆) δ 164,9, 149,7, 140,8, 134,8, 131,5, 130,7, 129,2, 128,0, 126,4, 121,9, 62,7 ppm. HRMS (ESI): m/z calcd. para C₂₆H₂₀O₆ (M⁺+1) 429,1333, encontrado 429,1322.

Síntesis de N-(4-(hidroximetil)fenil)acetamida (16)



Una mezcla de 4-acetamidobenzaldehído (0,4 g, 2,45 mmol), NaBH₄ (0,29 g, 7,35 mmol) y ácido bórico (0,45 g, 7,35 mmol) se molió en un mortero de porcelana con su correspondiente mano durante 20 minutos. La mezcla se inactivó con una disolución saturada de NaHCO₃ (75 ml) y diclorometano (75 ml). La fase acuosa se extrajo con diclorometano (3 x 75 ml), la combinación de las fases orgánicas se secó con MgSO₄ anhidro y el disolvente se evaporó para obtener el correspondiente alcohol (0,15 g, 38%) como un sólido amarillo sin posterior purificación. ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 9,88 (s, 1H, NH), 7,52 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H, 2Ar-H), 7,22 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H, 2Ar-H), 5,08 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H, -OH), 4,42 (d, $J = 5,6$ Hz, 2H, ArCH₂O-), 2,03 (s, 3H, CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, DMSO-d₆) δ 170,1, 137,6, 137,4, 127,6, 119,8, 63, 23,9 ppm.

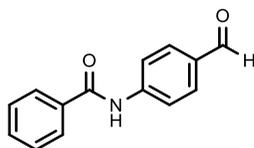
Síntesis de N-(4-(hidroximetil)fenil)benzamida (17)



En un matraz de fondo redondo de 25 ml se disolvieron N-(4-formilfenil)benzamida (0,097 g, 0,43 mmol) y NaBH₄ (0,018, 0,47 mmol)

en 7 ml de etanol y se agitaron a temperatura ambiente durante 135 minutos. Se eliminó el disolvente y el crudo de reacción se redisolvió en acetato de etilo. Se lavó la fase orgánica con una disolución acuosa de cloruro amónico y se secó con MgSO_4 anhidro. Por último, se evaporó el disolvente para obtener el correspondiente alcohol (0,071 g, 72%) como un sólido amarillo pálido que no necesitó ulterior purificación. ^1H NMR (300 MHz, Metanol- d_4) δ (ppm) 7,93 (d, $J = 6,0$ Hz, 2H, 2Ar-H), 7,67 (d, $J = 6,0$ Hz, 2H, 2Ar-H), 7,63 – 7,42 (m, 4H, 2Ar-H), 7,36 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H, 2Ar-H), 4,59 (s, 2H, Ar- CH_2O). ^{13}C NMR (126 MHz, Metanol- d_4) δ 167,5, 137,6, 134,9, 131,5, 129,2, 128,2, 127,9, 127,2, 120,8, 63,5.

Síntesis de N-(4-formilfenil)benzamida (**20**)



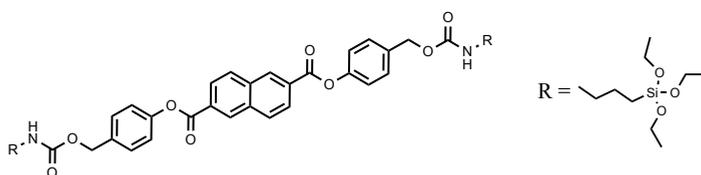
En un matraz de fondo redondo de 100 ml bajo atmósfera de argón, trietilamina (0,29 ml, 2,06 mmol) se añadió a una disolución de 4-aminobenzaldehído (0,25 g, 2,06 mmol) disuelto en 50 ml de THF anhidro, y la mezcla se mantuvo en agitación durante 30 minutos. Pasado ese tiempo, se añadió cloruro de benzoilo (0,24 ml, 2,06 mmol) y la reacción se mantuvo con agitación y a temperatura ambiente durante toda la noche. A continuación, se calentó a reflujo durante 7 horas. Una vez fría, se filtró, se evaporó el disolvente y el crudo de reacción se redisolvió en acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con una disolución saturada de bicarbonato sódico, se secó con MgSO_4 anhidro y se evaporó el disolvente. El producto se purificó por cromatografía en columna (eluyente: hexano/acetato de etilo 8:2) para obtener la correspondiente

amida (0,30 g, 64%) cómo un sólido amarillo.¹H RMN (300 MHz, Cloroformo-d) δ (ppm) 9,95 (s, 1H, -COH-), 8,08 (s, 1H, -CONH-), 7,94 – 7,82 (m, 5H, 5Ar-H), 7,63 – 7,56 (m, 2H, 2Ar-H), 7,55 – 7,48 (m, 2H, 2Ar-H).¹³C NMR (75 MHz, Cloroformo-d) δ 191,0, 165,9, 143,6, 132,4, 131,2, 128,9, 128,7, 127,4, 127,2, 119,7.

Procedimiento general de síntesis de carbamatos

En un matraz de fondo redondo de 50 ml se disolvió el correspondiente alcohol en 15 mL de acetonitrilo anhidro y se añadió hidruro sódico del 60%. La mezcla se agitó bajo atmósfera de Ar. Media hora más tarde, se añadió isocianato de 3-(trietoxisilil)propilo y se mantuvo la reacción a reflujo durante el tiempo especificado en cada caso. Pasado ese tiempo, se centrifugó la mezcla de reacción a 11000 rpm durante 3 minutos y se concentró el sobrenadante, obteniéndose así el producto.

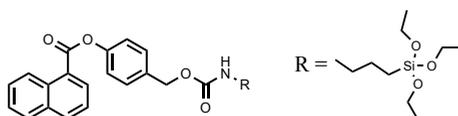
Síntesis de bis(4-(8,8-dietoxi-3-oxo-2,9-dioxa-4-aza-8-silaundecil)fenil)naftaleno-2,6-dicarboxilato (**12**)



Siguiendo el procedimiento arriba descrito pero empleando THF anhidro en este caso, se hicieron reaccionar bis(4-(hidroximetil)fenil)naftaleno-2,6-dicarboxilato (0,1 g, 0,23 mmol) con hidruro sódico del 60% (0,02g, 0,75 mmol) y con isocianato de 3-(trietoxisilil)propilo (112 μ l, 0,45 mmol). La reacción se mantuvo a reflujo durante 24 horas. Se obtuvo el producto cómo un sólido amarillo (0,21g) que contiene un 50% del

producto esperado y otro 50% de producto de partida determinado por ^1H RMN. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 8,98 (s, 2H, 2Ar-H), 8,42 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, 2Ar-H), 8,24 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, 2Ar-H), 7,46 (m, 4H, 4Ar-H), 7,34 (m, 4H, 4Ar-H), 5,78 (t, $J = 5,9$ Hz, 2H, 2OC-NH-), 5,06 (s, 4H, 2Ar-CH₂O), 3,74 (q, $J = 7,0$ Hz, 12H, -SiOCH₂-), 3,02 - 2,89 (m, 4H, 2NHCH₂), 1,47 - 1,33 (m, 4H, 2-Si-CH₂CH₂CH₂-), 1,14 (t, $J = 7,0$ Hz, 18H, -SiOCH₂CH₃) 0,57 - 0,47 (m, 4H, 2-SiCH₂). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 158,3, 149,3, 134,4, 131,0, 129,0, 128,1, 127,7, 126,1, 121,5, 119,2, 62,3, 57,7, 41,9, 23,4, 18,2, 7,1 ppm

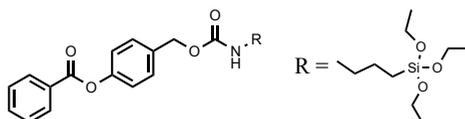
Síntesis de 4-(8,8-dietoxi-3-oxo-2,9-dioxa-4-aza-8-silaundecil)fenil 1-naftoato (13)



Seguindo el procedimiento arriba descrito, se hicieron reaccionar 4-(hidroximetil)fenil-1-naftoato (0,05 g, 0,18 mmol) con hidruro sódico del 60% (4,3 mg, 0,18 mmol) y con isocianato de 3-(trietoxisilil)propilo (44,4 μl , 0,18 mmol). La reacción se mantuvo a reflujo durante 72 horas. El producto se obtuvo sin purificación cómo un aceite amarillo (0,085 g, 90%). ^1H NMR (300 MHz, Cloroformo- d) δ (ppm) 9,03 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, 1Ar-H), 8,48 (dd, $J = 7,3$ y 1,3 Hz, 1H, 1Ar-H), 8,12 (d, $J = 8,2$, 1H, 1Ar-H), 7,93 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, 1Ar-H), 7,69 - 7,53 (m, 3H, Ar-H), 7,47 (d, $J = 8,7$, 2H, 2Ar-H), 7,29 (d, $J = 8,7$, 2H, 2Ar-H), 4,74 (s, 2H, Ar-CH₂O), 3,82 (q, $J = 7,0$ Hz, 6H, -OCH₂-), 3,22 - 3,08 (m, 2H, -NHCH₂-), 1,67 - 1,56 (m, 2H, -Si-CH₂CH₂CH₂-), 1,23 (t, $J = 7,0$ Hz, 9H, -CH₂CH₃), 0,69 - 0,58 (m, 2H, -SiCH₂-). ^{13}C NMR (75 MHz, Cloroformo- d) δ 166,3, 150,8, 139,1, 134,8, 134,3,

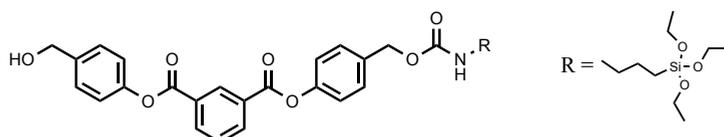
132,1, 131,6, 129,1, 128,6, 126,8, 126,2, 126,1, 124,9, 122,4, 65,2, 58,9, 30,1, 23,9, 18,7, 8,0 ppm.

Síntesis de 4-(8,8-dietoxi-3-oxo-2,9-dioxa-4-aza-8-silaundecil)fenil benzoato (14)



Siguiendo el procedimiento arriba descrito, se hicieron reaccionar benzoato de 4-(hidroximetil)fenilo (**7**) (0,05 g, 0,22 mmol) con hidruro sódico del 60% (8,75 mg, 0,37 mmol) y con isocianato de 3-(trietoxisilil)propilo (54,2 μl , 0,22 mmol). La reacción se mantuvo a reflujo durante 72 horas. El producto se obtuvo en forma de aceite amarillo (0,066g) que contiene un 50% del producto esperado y otro 50% de producto de partida **7** determinado por ^1H RMN. ^1H NMR (300 MHz, Cloroformo-d) δ (ppm) 8,20 (d, $J = 7,0$ Hz, 2H, 2Ar-H), 7,64 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H, Ar-H), 7,51 (t, $J = \text{Hz}$ 2H, 2Ar-H), 7,46 – 7,36 (m, 2H, 2Ar-H), 7,24 – 7,11 (m, 2H, 2Ar-H), 4,72 (s, 2H, Ar-CH₂O), 3,80 (q, $J = 7,0$ Hz, 6H, -OCH₂-), 3,22 – 3,08 (m, 2H, -NHCH₂-), 1,66 – 1,56 (m, 2H, -CH₂CH₂CH₂-), 1,22 (t, $J = 7,0$ Hz, 9H, -CH₂CH₃), 0,66 – 0,51 (m, 2H, -SiCH₂-). ^{13}C NMR (126 MHz, Cloroformo-d) δ 172,6 , 158,3 , 138,8, 137,8 , 133,6, 130,0, 129,6 , 128,9 , 121,3 , 115,5 , 64,6 , 58,4 , 29,7, 23,6 , 18,2, 7,8.

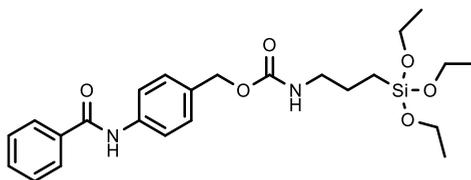
Síntesis de isoftalato de 4-(8,8-dietoxi-3-oxo-2,9-dioxa-4-aza-8-silaundecil)fenil (4-(hidroximetil)fenil) (15)



En un matraz de fondo redondo de 50 ml se disolvió isoftalato de bis(4-(hidroximetil)fenilo) (0,05 g, 0,13 mmol) en 15 ml de acetonitrilo anhidro y se añadió hidruro sódico del 60% (6,3 mg, 0,26 mmol). La mezcla se mantuvo en agitación bajo atmósfera de Ar. Media hora más tarde, se añadió isocianato de 3-(trietoxisilil)propil (65,4 μ l, 0,26 mmol) y se mantuvo la reacción a reflujo durante 105 minutos y en agitación a temperatura ambiente 75 minutos más. Pasado ese tiempo, se centrifugó la mezcla de reacción a 11000 rpm durante 3 minutos y se concentró el sobrenadante. A continuación, se lavó filtrando a vacío, primero con hexano y después con metanol. Se concentró la fracción del metanol obteniéndose el producto en forma de un aceite amarillo claro (0,062 g, 75%). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 8,78 (s, 1H, Ar-H), 8,47 (dd, $J = 7,9, 1,8$ Hz, 2H, 2Ar-H), 7,86 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H, Ar-H), 7,46 (d, $J = 8,6$ Hz, 4H, 4Ar-H), 7,29 (d, $J = 8,5$ Hz, 4H, 4Ar-H), 5,04 (s, 2H, Ar-CH $_2$ O), 4,54 (s, 2H, Ar-CH $_2$ O), 3,74 (q, $J = 7,0$ Hz, 6H, -OCH $_2$ -), 3,03 – 2,89 (m, 2H, -NHCH $_2$ -), 1,51 – 1,33 (m, 2H, -CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ -), 1,14 (t, $J = 7,1$ Hz, 9H, -CH $_2$ CH $_3$), 0,59 – 0,43 (m, 2H, -SiCH $_2$ -). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 164,6, 156,1, 149,6, 140,5, 131,1, 129,5, 128,8, 128,4, 122,2, 121,9, 115,2, 62,8, 58,2, 42,4, 23,7, 18,5, 7,3 ppm.

Síntesis de 4-benzamidobencil (3-(trietoxisilil)propil)carbamato

(21)



Siguiendo el procedimiento arriba descrito, se hicieron reaccionar N-(4-(hidroximetil)fenil)benzamida (**17**) (0,05 g, 0,22 mmol) con hidruro sódico del 60% (8,8 mg, 0,36 mmol) y con isocianato de 3-(trietoxisilil)propilo (54,4 μ l, 0,22 mmol). La reacción se mantuvo a reflujo durante 24 horas. El producto se obtuvo en forma de aceite amarillo (0,071 g) que, por ^1H RMN, se determinó que contiene un 50% del producto esperado y otro 50% de producto de partida **17**. ^1H NMR (300 MHz, Cloroformo-d) δ (ppm) 7,87 (d, J = 8,1 Hz, 2H, 2Ar-H), 7,64 – 7,60 (m, 2H, 2Ar-H), 7,56 – 7,50 (m, 1H, 1Ar-H), 7,49 – 7,40 (m, 2H, 2Ar-H), 7,33 (d, J = 8,4 Hz, 2H, 2Ar-H), 5,05 (brs, 2H, Ar-CH₂O), 3,81 (q, J = 7,0 Hz, 6H, OCH₂-), 3,21 – 3,12 (m, 2H, -NHCH₂-), 1,68 – 1,50 (m, 2H, -CH₂CH₂CH₂-), 1,21 (t, J = 7,0 Hz, 9H, -CH₂CH₃-), 0,66 – 0,56 (m, 2H, -SiCH₂-). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 166,0 , 156,6 , 139,3 , 138,2 , 135,4 , 132,0 , 128,9 , 128,1 , 127,2 , 120,6 , 63,1 , 58,2 , 43,5 , 23,5 , 18,7 , 7,6 ppm.

Síntesis de nanopartículas mesoporosas MCM-41

Bromuro de n-cetiltrimetilamonio (CTABr, 1,00 g, 2,74 mmol) se disolvió en 480 ml de agua desionizada mediante agitación suave (150 rpm) antes de añadir 3,5 ml de una disolución de NaOH 2M hasta obtener un pH de 8. Se calentó la disolución hasta 80°C y una vez alcanzada esta temperatura, se añadió gota a gota tetraetilortosilicato (TEOS, 5,0 ml, 22,4 mmol) a la disolución surfactante a máxima agitación observándose una suspensión blanca. La mezcla se agitó 2 horas a 80°C. Se obtuvo un precipitado blanco que se aisló por centrifugación. Una vez aislado, el sólido se lavó con agua desionizada hasta obtener un pH neutro en la disolución, y el sólido se secó a 70°C durante toda la noche.

Para preparar el material poroso final (MCM-41), se calcinó el sólido sintetizado 3 horas hasta 550°C y 5 horas a 550°C utilizando una atmósfera oxidante con la finalidad de eliminar los restos de surfactante.

Procedimiento de carga del material y anclaje de la puerta molecular:

➤ Reacción continuada

En un matraz de fondo redondo de 100 mL provisto de agitación magnética y atmósfera de argón se añaden 100 mg de MCM-41, 100 mg de colorante y 20 mL de acetonitrilo anhidro. Se calienta a reflujo y con ayuda de un Dean-Stark se elimina el agua. Una vez se han eliminado 10 mL de agua se deja a temperatura ambiente durante 12 horas. Pasado ese tiempo se añade el isocianato de 3-(trietoxisilil)propilo y se mantiene en agitación a temperatura ambiente 5 horas. A continuación, se añade la molécula de interés y dos pequeñas porciones de sodio metálico (cantidad catalítica). Se mantiene en agitación a temperatura ambiente 12 horas. Pasado ese tiempo se lava el material con agua desionizada centrifugando (11.000 rpm, 15 minutos cada vez) para eliminar los restos de colorante y se seca en estufa a 70°C.

➤ Reacción por pasos

En un matraz de fondo redondo de 25 mL provisto de agitación magnética y atmósfera de argón, se añaden 25 mg de MCM-41 cargada de colorante, y la puerta molecular correspondiente (0,125 mmoles) en 5 mL de acetonitrilo anhidro. Se mantiene durante 5 horas, y pasado ese tiempo se lava con agua desionizada centrifugando a 11.000 rpm 15 minutos cada vez para eliminar los restos de colorante (hasta que el agua sale transparente) y se seca en estufa a 70 °C.

Preparación suspensiones liberación:

Disolución de enzima esterasa: 6 mg enzima + 20 mL tampón tris pH 8,06 (concentración: 0,3 mg/mL que equivalen a 6 UK/mL).

Disolución enzima amidasa: 6,39 μ L enzima amidasa + 993,60 μ L tampón tris pH 7,81 (concentración: 6 UK/mL)

➤ **S1 – S2**

Control: 1 mg material correspondiente + 4 mL tampón tris pH 8,6

→ Se utilizaron 3 mL de esta suspensión para realizar la medida.

Enzima 1: 1 mg material correspondiente + 4 mL tampón tris pH

8,6 → Se utilizaron 2 mL de esta suspensión y se añadieron 20 μ L disolución enzima esterasa para realizar la medida.

➤ **S5 – S8**

Control: 1mg material correspondiente + 3 mL tampón tris pH 8,6

Enzima: 1mg material correspondiente + 3 mL tampón tris pH 8,6 + 20 μ L disolución enzima esterasa

➤ **S9 – S10**

Control: 1 mg material correspondiente + 3 mL tampón tris pH 7,81

Enzima: 1 mg material correspondiente + 3 mL tampón tris pH 7,81 + 20 μ L disolución enzima amidasa

Condiciones de medida de la fluorescencia:

S2 → λ_{ex} : 565nm; λ_{em} : 586 nm; Slit_{ex}: 2,5; Slit_{em}: 5

S9 → λ_{ex} : 565nm; λ_{em} : 586 nm; Slit_{ex}: 5; Slit_{em}: 2,5

S1, S5 – S8, S10 → λ_{ex} : 520m; λ_{em} : 550 nm; Slit_{ex}: 5; Slit_{em}: 2,5

Determinación de la carga de los materiales:

Inicialmente se elaboraron rectas patrón tanto de sulforodamina B (NaOH 0,5 M) como de rodamina 6G (en mezcla de disolventes 10% de metanol y 90% de NaOH 0,5 M, puesto que el colorante no era totalmente soluble en hidróxido sódico). A continuación, se disolvió 1 mg de cada uno de los sólidos (**S1**, **S2**, **S5-S10**) en 3 mL del medio básico correspondiente y tras dejarlo actuar 24 horas se midió la absorbancia o la fluorescencia (dependiendo del caso) de cada disolución.

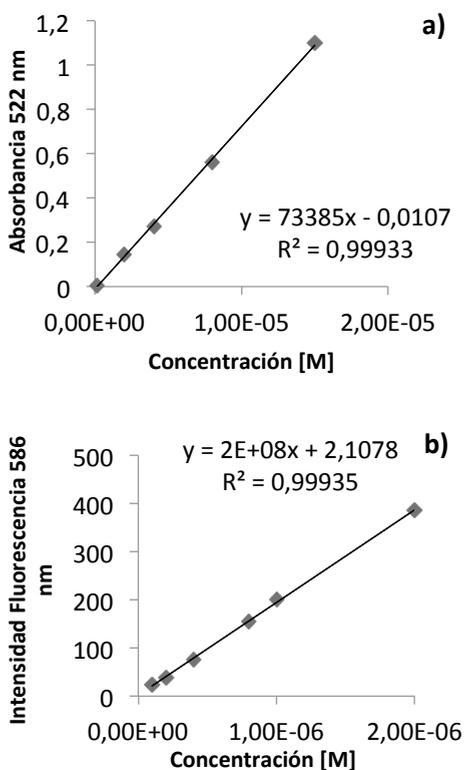


Figura 22. (a) Recta patrón de rodamina 6G en 90% NaOH 0,5 M- 10% MeOH.
(b) Recta patrón de sulforodamina B NaOH 0,5 M.

Tabla 8. Valores de colorante presente en el interior de las nanopartículas (S1, S2, S5-S10) por cada 100 mg de MCM-41.

	A ₅₂₂ (1 mg material en 3mL)	IF ₅₈₆ (1 mg material en 3mL)	Carga (%)
S1	0,2716	-	0,57
S2	0,4772	-	0,95
S5	0,5777	-	1,15
S6	0,5905	-	1,17
S7	0,527	-	1,05
S8	0,4267	-	0,85
S9	-	*248,74	0,64
S10	0,7987	-	1,58

*Esta IF corresponde a una dilución de 1/3 de la disolución inicial de 1 mg de material en 3 mL de NaOH 0,5 M.

3.4 Conclusiones

A partir de los datos discutidos anteriormente, se puede concluir que, en general, en sistemas autoinmolantes la eficiencia de liberación es mayor que en los no autoinmolantes, siendo **S7** el más útil de los materiales obtenidos, puesto que la liberación de la carga en este material con respecto a su disolución blanco es más del triple.

También podemos decir que la eficiencia de la puerta molecular en el cierre de las nanopartículas de sílice es un balance entre la habilidad de la molécula para bloquear los poros y mantener por lo tanto la carga en su interior y la accesibilidad del estímulo externo a la molécula orgánica. En general, el alto impedimento estérico da lugar a una menor liberación de la carga en ausencia del estímulo externo, pero este hecho no garantiza la eficiente liberación de la carga en presencia del estímulo. Por otro lado, la comparación entre puertas moleculares con grupos éster o amida con el mismo impedimento estérico demuestra que el grupo amida es más eficiente para tapan el material. Sin embargo, mientras que

la amidasa no funciona adecuadamente en las condiciones estudiadas, la esterasa induce la hidrólisis del éster y la liberación de la carga.

Capítulo 4:
Estudio de marcaje y encapsulación de
alendronato

4.1 Introducción

Como se ha comentado en la introducción general, los fármacos de administración oral, entre ellos los bisfosfonatos, empleados para el tratamiento de la osteoporosis son poco efectivos debido a las dificultades que presentan para alcanzar el lugar de acción. Una de las razones de la baja eficacia de los bisfosfonatos se debe a la dificultad para atravesar la membrana celular que presentan estos compuestos debido a su estructura química polar. También se ha indicado en la introducción que el empleo de materiales híbridos orgánico-inorgánicos funcionalizados con puertas moleculares para encapsular fármacos ha demostrado ser una estrategia de trabajo muy interesante por dos razones:

1. Se evita la pérdida de parte del fármaco a lo largo del recorrido por el cuerpo antes de alcanzar el lugar de acción, que en este caso concreto son los huesos, mitigando de esta forma efectos adversos que pueda generar el fármaco en otras zonas.
2. Se puede mejorar la cantidad de fármaco absorbida, que sabemos que con el sistema actual es muy baja.

Como se ha comentado en capítulos anteriores, estos sistemas están compuestos por un soporte inorgánico al que se ancla una puerta molecular compuesta por una molécula orgánica que cierra los poros, permitiendo la encapsulación del fármaco. La puerta molecular se diseña de forma tal que se abra mediante un estímulo externo específico, en este caso la enzima catepsina K que se encuentra sobreexpresada en los osteoclastos (células disgregadoras de hueso), y que son las células donde actúa el alendronato y por lo tanto nuestro objetivo.

Uno de los objetivos del presente trabajo, era diseñar un material orgánico-inorgánico que fuera capaz de liberar alendronato dentro de las células de una forma específica. Para ello había que disponer de distintos elementos.

1. Un material mesoporoso que sería la MCM-41.
2. Funcionalizar el alendronato, que fue el bisfosfonato de elección por ser el más empleado, con un fluoróforo o un cromóforo que permitiera detectar y cuantificar su liberación en células.
3. Diseñar una puerta molecular que se abriera como consecuencia de la presencia de catepsina K.

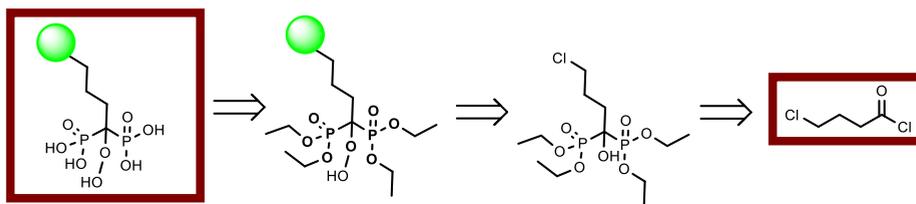
4.2 Funcionalización del alendronato

En un primer momento se pensó que la mejor forma para poder detectar y cuantificar el alendronato sería marcar el fármaco con algún fluoróforo mediante un enlace covalente, de manera que se pudiera seguir fácilmente la liberación del mismo mediante fluorescencia y cuantificarlo a través de la elaboración de una recta patrón. Para llevar a cabo la funcionalización del alendronato se propusieron dos estrategias diferentes:

- Llevar a cabo la síntesis del alendronato e introducir el marcador fluorescente o cromogénico en alguna de las etapas de la ruta sintética.
- Emplear alendronato comercial para funcionalizar con un fluoróforo o un cromóforo el grupo amino del compuesto.

4.2.1 Síntesis de alendronato sustituido con un fluoróforo o un cromóforo

Siguiendo los datos que aparecen en la bibliografía⁸⁵ se planteó llevar a cabo la preparación del alendronato marcado siguiendo la ruta sintética reflejada en el esquema 1.

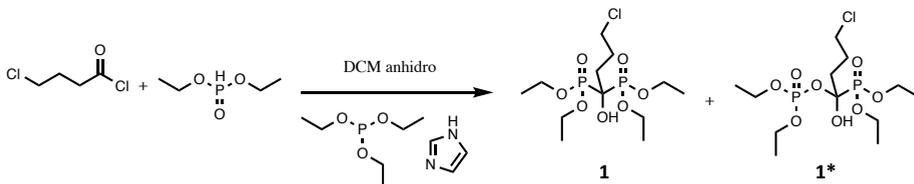


Esquema 1. Análisis retrosintético para la preparación de alendronato marcado.

Así, se procedió, en primer lugar, a hacer reaccionar el cloruro de 4-clorobutanoilo con fosfito de dietilo en presencia de fosfito de trietilo e imidazol (esquema 2) obteniéndose tanto el producto **1** como el **1*** que es un monofosfato producido en una reacción de transposición. También estaba presente en el crudo el fosfito de dietilo utilizado en la síntesis (Figura 1), por lo que se intentó aislar el compuesto antes de pasar a la siguiente etapa. Observando el espectro de ³¹P, se pueden apreciar las señales correspondientes a los fosfitos de partida situadas ambas a un desplazamiento entre 7 y 9 ppm. También se observa como el producto **1** da lugar a una única señal de fósforo debido a la simetría de la molécula, mientras que el producto **1*** da lugar a dos dobletes que

⁸⁵ Vachal, P., Hale, J. J., Lu, Z., Streckfuss, E. C., Mills, S. G., MacCoss, M., Yin, D. H., Algayer, K., Manser, K., Kesiosoglou, F., Ghosh, S., Alani, L. L. *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 3060-3063.

corresponden a los dos átomos de P presentes en la molécula y que acoplan mutuamente.



Esquema 2. Etapa 1 del proceso de síntesis del alendronato.

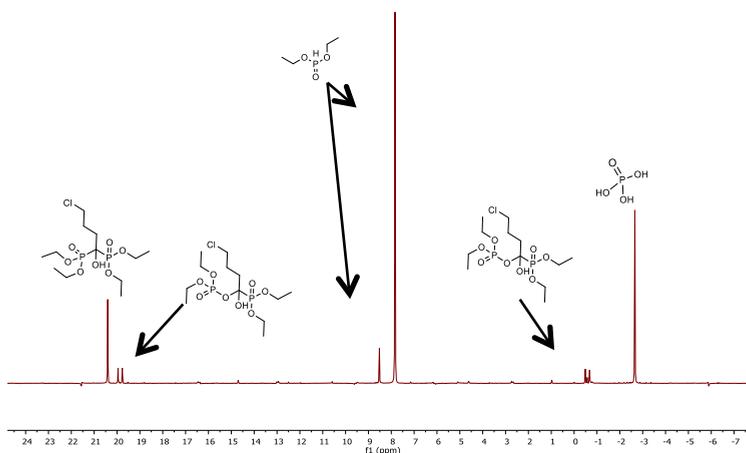
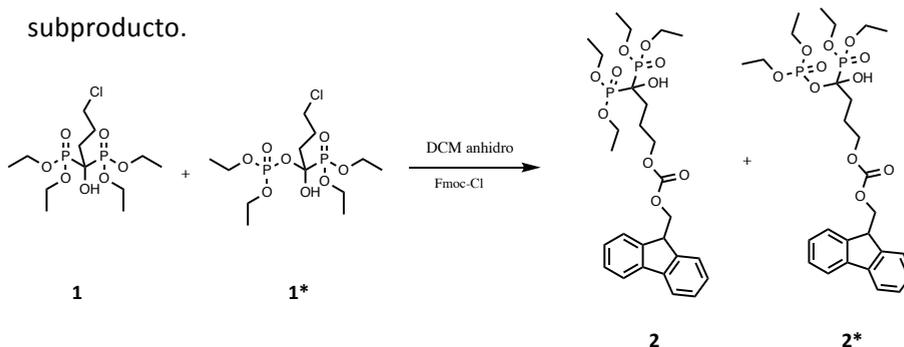


Figura 1. Espectro de ^{31}P RMN de la primera etapa de la síntesis del alendronato.

Se intentaron distintos métodos de purificación tales como columna cromatográfica, lavado del producto con agua y extracción con diclorometano o destilación en horno de bolas. Ninguno de los procedimientos permitió aislar el producto por lo que se decidió emplear el crudo de reacción para llevar a cabo la siguiente etapa. Así, la mezcla

de **1** y **1*** se hizo reaccionar con fluorenilmetiloxicarbonilo (fmoc-Cl)⁸⁶ para obtener el precursor del alendronato ya marcado con una molécula fluorescente (compuesto **2**), como se muestra en el esquema 3. La reacción funcionó adecuadamente obteniéndose la mezcla de los dos productos esperados (Figura 2) si bien también aparecía algún que otro subproducto.



Esquema 3. Reacción de marcaje del precursor del alendronato (**1**) con fmc-Cl para la obtención del producto **2**.

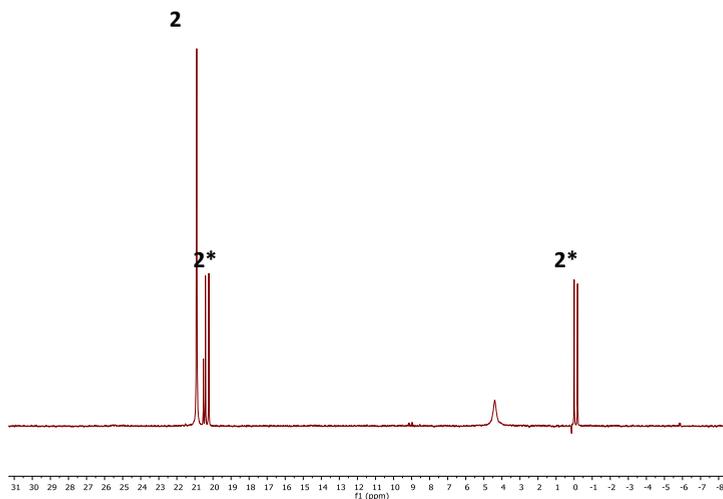


Figura 2. Espectro de ³¹P RMN del crudo de la reacción con el marcador fluorescente.

⁸⁶ Anson, H., Boning, A. J. *Anal. Lett.*, **1979**, *12*, 25-35.

Se intentó purificar el producto **2** mediante columna cromatográfica sin éxito y este hecho, unido a que el rendimiento de la reacción no era alto y nos encontrábamos en las etapas iniciales de una síntesis larga, nos decidió a intentar otra ruta alternativa tanto para la síntesis como para el marcaje.

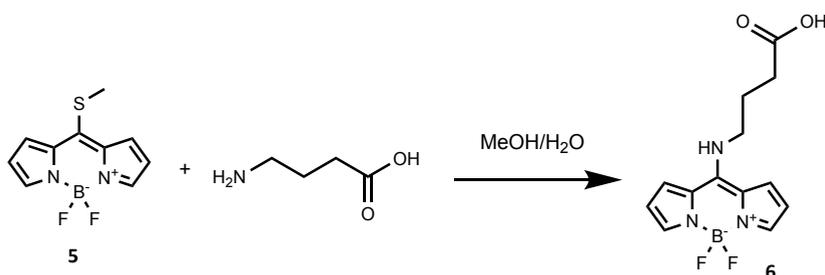
Como el grupo de investigación tiene una dilatada experiencia en el trabajo con derivados de borodipirrometeno (BODIPY), se pensó en usar como marcador para el alendronato un derivado de este tipo. Esto se debe a que los BODIPYs son compuestos que presentan propiedades muy ventajosas, como una intensa fluorescencia a longitudes de onda de excitación/emisión en el rango del visible, coeficientes de absorción molar y rendimiento cuántico relativamente altos y una vida media fluorescente en el rango de los nanosegundos. Además, son relativamente insensibles a los cambios de pH, presentan buena solubilidad, resistencia a la autoagregación en disolución y robustez frente a la luz y las sustancias químicas⁸⁷. Por otra parte, está descrito en la bibliografía⁸⁸ que el 8-tiometil-BODIPY experimenta en condiciones muy suaves reacciones de desplazamiento del grupo tiometilo con distintos nucleófilos, entre ellos aminas. Por esta razón se pensó en utilizar esta reactividad para obtener la molécula objetivo tal y como se recoge en el esquema 4.

⁸⁷ (a) Ziessel, R., Ulrich, G., Harriman, A. *New J. Chem.*, **2007**, *31*, 496-501. (b) Ulrich, G., Ziessel, R., Harriman, A. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 1184-1201.

⁸⁸ Bañuelos, J., Martín, V., Gómez-Durán, A., Arroyo, I. J., Peña-Cabrera, E., García-Moreno, I., Costela, A., Pérez-Ojeda, M. E., Arbeloa, T., López, I. *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 7261-7270.

La última reacción para la obtención del 8-tiometil-BODIPY consistió en la reacción del compuesto **4** con trietilamina y trifluoruro de boro dietileterato para obtener, tras purificación por columna cromatográfica, el compuesto **5** como un sólido rojo con un rendimiento del 38%.

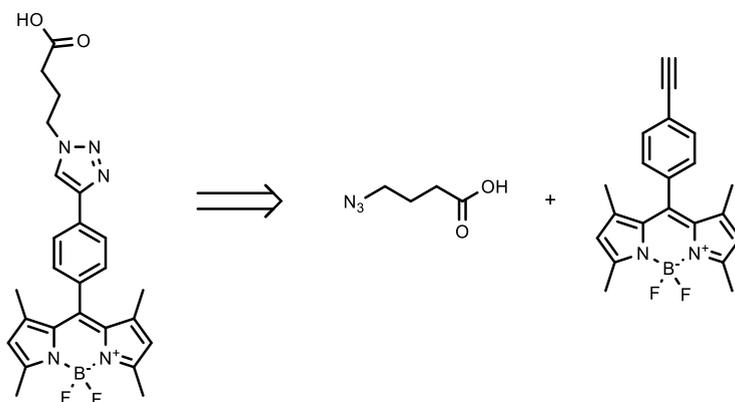
Una vez que dispusimos de 8-tiometil-BODIPY se llevó a cabo la primera etapa de síntesis como se recoge en el esquema 6. Dicha reacción condujo al aislamiento del producto **6** con un rendimiento del 70%.



Esquema 6. Reacción de marcaje del ácido γ -aminobutírico con 8-tiometil-BODIPY para la obtención del producto **6**.

El siguiente paso consistió en la síntesis del alendronato sódico usando como sustrato el compuesto **6**. En primer lugar, se activó el ácido transformándolo en el cloruro de ácido correspondiente mediante el uso de cloruro de tionilo, y a continuación se intentó la introducción de los grupos fosfonato en las mismas condiciones que en el caso anterior⁸⁵, no obstante, la reacción no funcionó adecuadamente lo que podría estar relacionado con la presencia de una amina en el producto **6**. Por esa razón se planteó la posibilidad de preparar otro derivado de BODIPY que no contuviera aminas susceptibles de reaccionar con los derivados de fósforo imprescindibles en la síntesis.

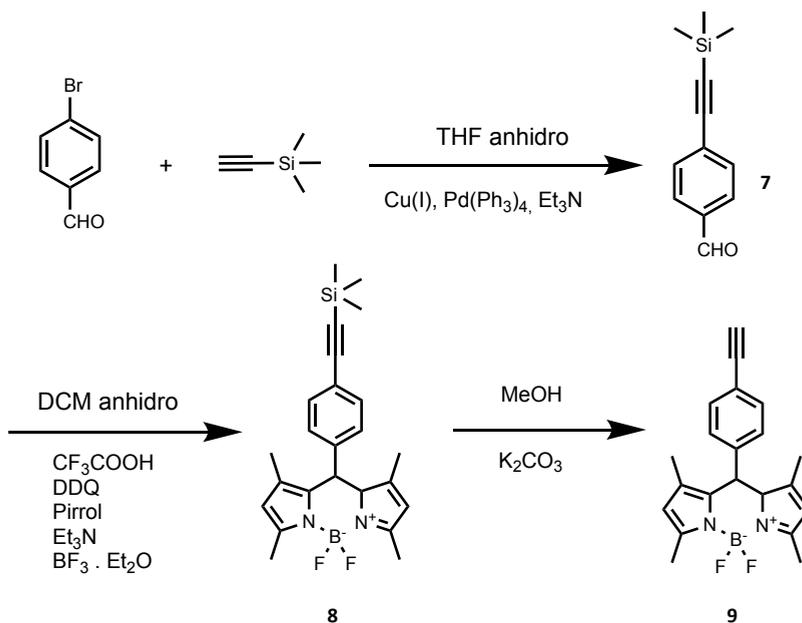
En este sentido, se propuso marcar el alendronato mediante una reacción de cicloadición [3 + 2] (reacción “click”) a partir de un BODIPY con un alquino terminal, que actuaría como molécula fluorescente, y un compuesto con una cadena alifática de 4 carbonos que tuviera un grupo azida a partir de la cual sintetizar el alendronato una vez estuviera el compuesto unido covalentemente al marcador. Para llevar a cabo este proceso era necesario, por un lado, sintetizar el compuesto de partida que aportaría la cadena lateral, y por otro el BODIPY que actuaría como fluoróforo.



Esquema 7. Análisis retrosintético para la introducción del fluoróforo haciendo uso de una reacción “click”

Para llevar a cabo esta síntesis, el primer paso fue la preparación del derivado de BODIPY que se realizó mediante la siguiente secuencia sintética⁹⁰:

⁹⁰ Wang, H., Vicente, M. G. H., Fronczek, F. R., Smith, K. M. *Chem. Eur. J.*, **2014**, *20*, 5064-5074.



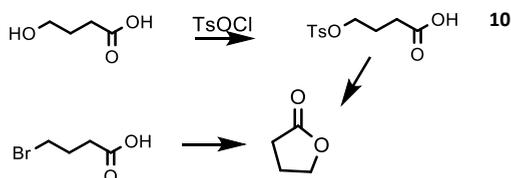
Esquema 8. Reacción de síntesis del compuesto 9.

En primer lugar, se efectuó una reacción de acoplamiento entre el 4-bromobenzaldehído y el trimetilsililacetileno para obtener el compuesto **7**, que tras purificación por columna cromatográfica se aisló como un sólido negro cristalino con un rendimiento del 85% (esquema 8).

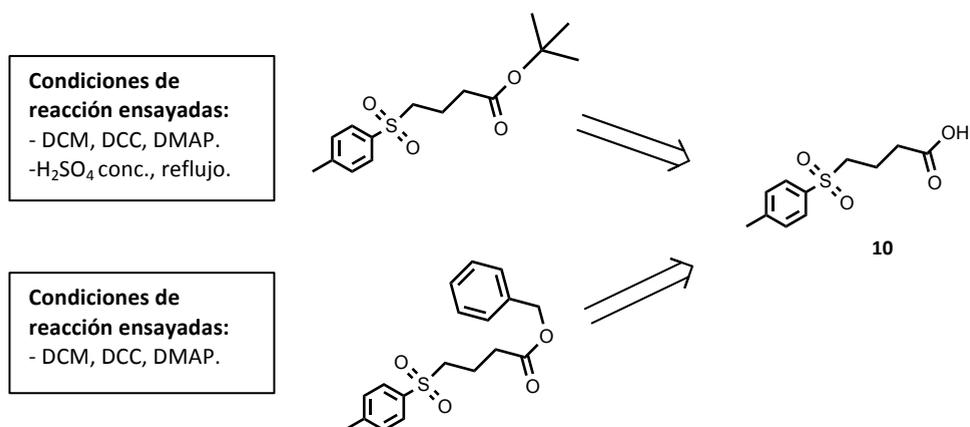
El siguiente paso consistió en la reacción de formación del BODIPY entre el compuesto **7** y el 2,4-dimetilpirrol para la síntesis del compuesto **8**, que tras purificación por columna cromatográfica se obtuvo en forma de un sólido rojizo con un rendimiento del 59%.

Una vez obtenido el compuesto **8** sólo faltaba la desprotección del alquino terminal que se hizo mediante el tratamiento con carbonato potásico. Se obtuvo el producto **9** en forma de un sólido marrón oscuro con un rendimiento del 100% sin necesidad de purificación.

Una vez obtenido el BODIPY, se pasó a realizar la síntesis del otro compuesto de partida, la azida. Para llevar a cabo esta síntesis se podía partir del ácido 4-hidroxibutírico y transformarlo en su correspondiente tosilato o bien del ácido 4-bromobutírico. La síntesis del tosilato⁷⁴ se llevó a cabo satisfactoriamente aunque con un rendimiento bajo (20%) pero, de cualquier manera, ni con este compuesto ni con el bromo derivado se consiguió llevar a cabo la reacción de sustitución para generar la azida ya que siempre el producto mayoritario era la correspondiente lactona (esquema 9).



Esquema 9. Reactividad de distintos derivados en la posición 4 del ácido butírico.

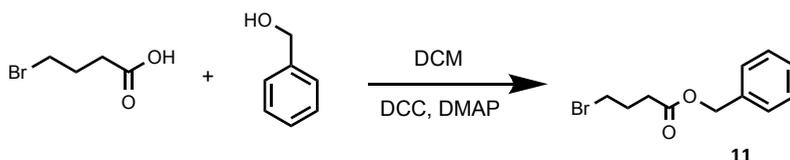


Esquema 10. Reacción de protección del ácido 4-(fenilsulfonil)butanoico.

Con el fin de evitar el problema de la formación de la lactona se decidió proteger el ácido carboxílico. En el caso del tosilato (**10**) se intentó

proteger el producto como éster de tert-butanol y de alcohol bencílico pero en las condiciones que se probaron (esquema 10)⁸² se observaba la degradación del producto inicial.

En el caso del ácido 4-bromobutírico (reactivo comercial) la reacción con el alcohol bencílico, permitió obtener el producto **11** en forma de un sólido blanco⁹¹ (esquema 11).



Esquema 11. Protección del ácido 4-bromobutanoico con alcohol bencílico.

Una vez protegido el grupo ácido la síntesis de la azida se llevó a cabo mediante una reacción de sustitución con azida sódica⁷⁵ (esquema 12).



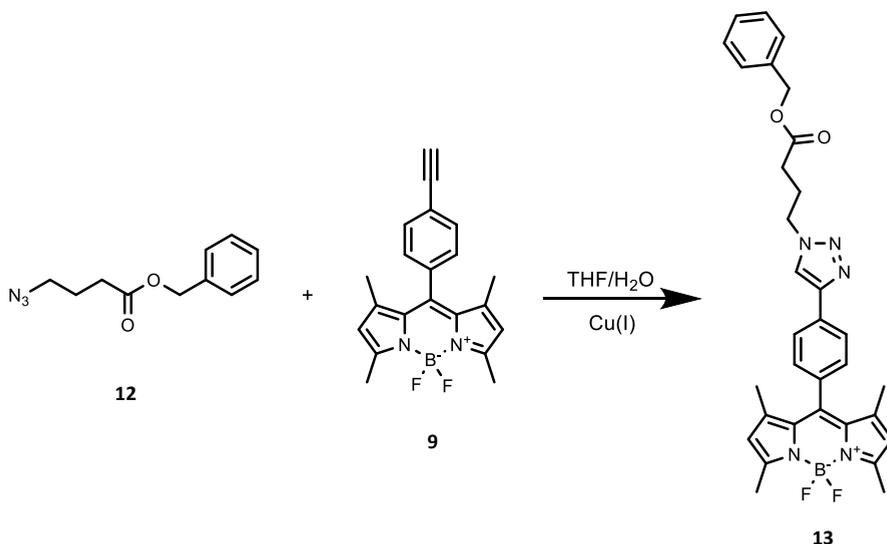
Esquema 12. Reacción de sustitución de un bromo por una azida para obtener el compuesto **12**.

Tras purificación por columna cromatográfica se obtuvo el producto **12** como un aceite amarillo con un rendimiento del 40%.

El siguiente paso fue llevar a cabo la reacción “click” entre el BODIPY **9** y la azida con el grupo ácido protegido en forma de éster (compuesto **12**). Se realizó la reacción utilizando THF/H₂O y en presencia de Cu(I) (Cu(OAc)₂ que se reduce a Cu (I) en presencia de ascorbato sódico) como

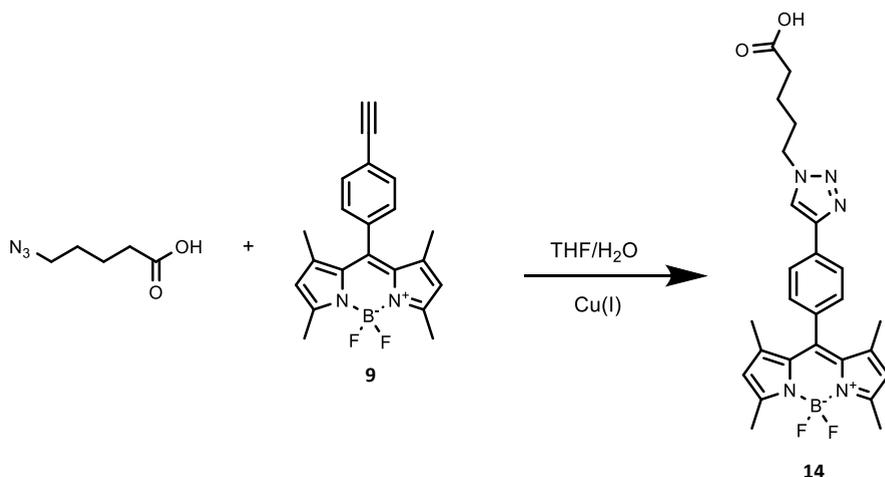
⁹¹ Neises, B., Steglich, W. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1978**, *17*, 522-524.

catalizador (esquema 13). La reacción dio lugar al aislamiento del producto deseado (**13**), aunque con un rendimiento muy bajo, puesto que en el $^1\text{H-RMN}$ se observaba que quedaba mucha azida de partida.



Esquema 13. Reacción “click” entre los productos **9** y **12**.

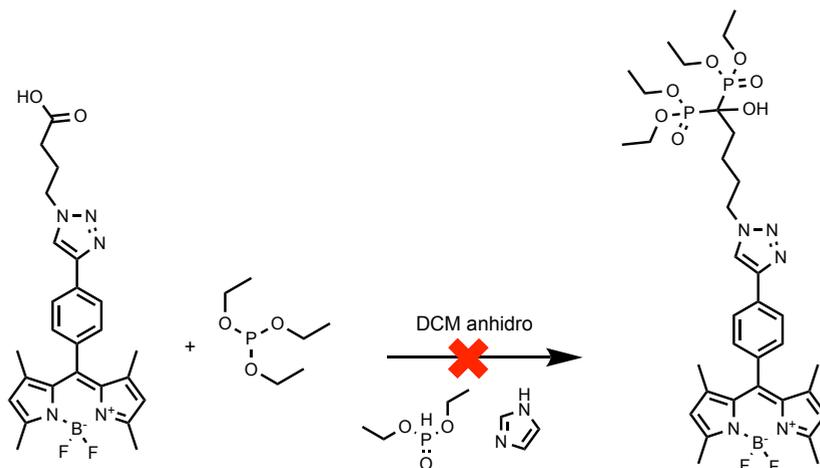
Sorprendidos por los bajos rendimientos obtenidos, y teniendo en cuenta todos los problemas que habíamos observado con las cadenas de cuatro átomos de carbono, decidimos hacer una prueba final empleando en la reacción “click” el compuesto comercial ácido 5-azidopentanoico en las mismas condiciones empleadas anteriormente. En este caso la reacción funcionó perfectamente obteniéndose el producto **14** en forma de un sólido naranja con un rendimiento del 92% (esquema 14), lo que demostró que el problema venía derivado de la longitud de la cadena lateral.



Esquema 14. Reacción “click” entre el ácido 5-azidopentanoico y un bodipy con un alquino terminal.

Dado que el producto **14** se había obtenido con muy buen rendimiento se intentó generar la estructura de bisfosfonato haciendo uso de las reacciones anteriormente empleadas (esquema 15). Para ello, se llevó a cabo la preparación del cloruro de ácido correspondiente empleando cloruro de oxalilo en benceno como disolvente, y seguidamente se pasó a la reacción de síntesis del bisfosfonato correspondiente. Desafortunadamente, solo se aislaron los productos de partida.

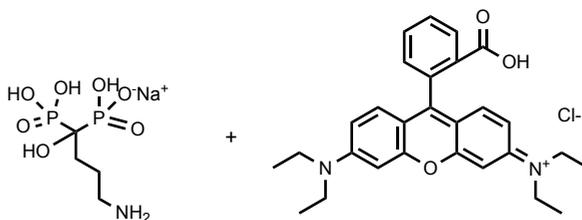
Dados los resultados obtenidos hasta este momento se pensó en abordar la segunda estrategia anteriormente indicada, es decir, introducir el marcador directamente en el alendronato.



Esquema 15. Reacción de síntesis del alendronato a partir del compuesto 14.

4.2.2. Introducción del marcador fluorescente sobre el alendronato

Haciendo uso de esta segunda aproximación, en primer lugar, se pensó en marcar el alendronato mediante interacciones iónicas que era la aproximación más sencilla posible. Para ello, se hizo reaccionar alendronato sódico con rodamina B (como se muestra en el esquema 16) empleando agua como disolvente.



Esquema 16. Reacción de marcaje del alendronato sódico con rodamina B mediante enlace iónico.

Para comprobar si se había obtenido la sal correspondiente se realizaron diversas pruebas. En primer lugar, se hizo un espectro de ^1H -RMN donde

se observó que las señales se habían desplazado un poco con respecto al reactivo de partida, como se muestra en la figura 3.

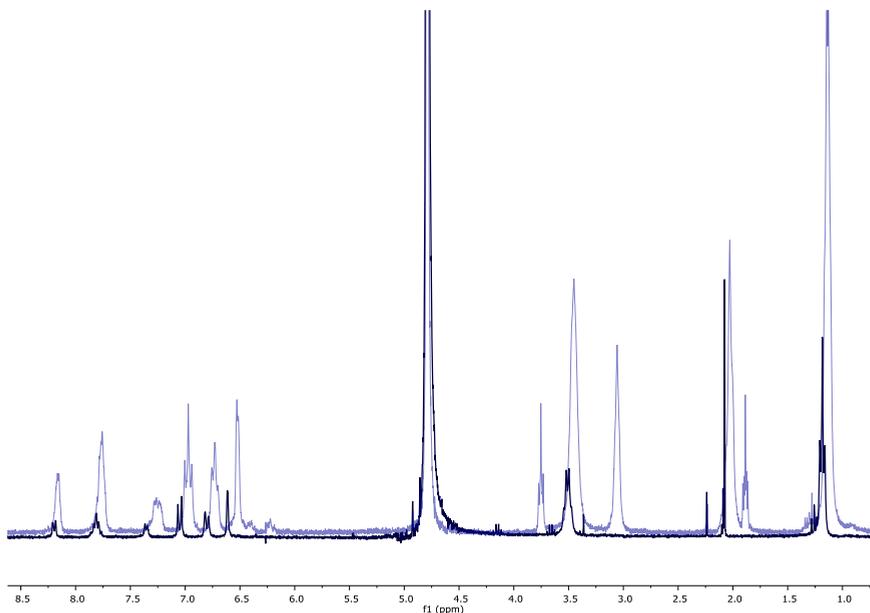


Figura 3. Espectro de ¹H RMN de rodamina B (azul oscuro) y de rodamina B + alendronato (malva).

En el espectro correspondiente al producto de reacción (malva) además del pequeño desplazamiento de las señales aromáticas correspondientes a la rodamina B producido después de la reacción, se observa la presencia de las señales de la cadena alifática del alendronato situadas a un desplazamiento entre 1 y 4.

Seguidamente se realizaron medidas de absorbancia y fluorescencia para comprobar si había cambios con respecto a los espectros de la rodamina B de partida, y se observó que, aunque no había variación en las longitudes de onda de absorción y emisión, se observaba en ultravioleta un claro efecto hipocrómico en presencia de alendronato (figuras 4 y 5).

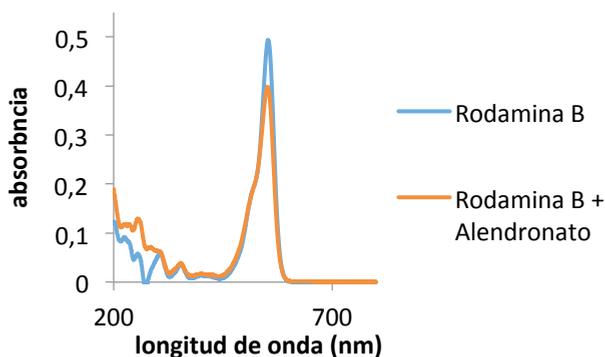


Figura 4. Espectro UV de la rodamina B sola y junto al alendronato.

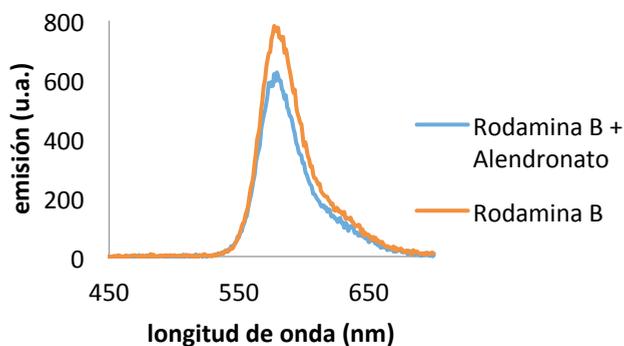
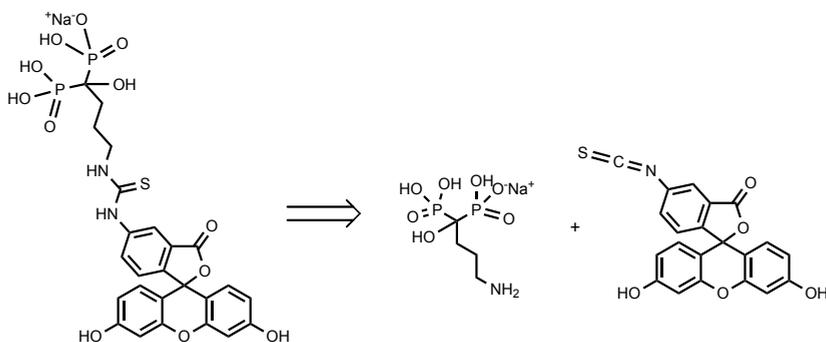


Figura 5. Espectro de emisión de fluorescencia de la rodamina B sola y junto al alendronato.

A pesar de que parecía que la sal se había formado, no fue posible separarla de los productos de partida por lo que se abandonó esta aproximación.

Desechada la idea de utilizar interacciones iónicas se pensó en la formación de enlaces covalentes. En primer lugar se hizo reaccionar la amina del alendronato con isotiocianato de fluoresceína para formar una

tiourea (esquema 17)⁹². Inicialmente la reacción se realizó en acetonitrilo anhidro, pero no funcionó probablemente como consecuencia de la baja solubilidad del alendronato en disolventes orgánicos. Para resolver este problema, se intentó realizar la reacción en condiciones de transferencia de fase utilizando acetato de etilo como fase orgánica y agua destilada como fase acuosa. Bajo estas condiciones se observó que se producía la hidrólisis tanto del isotiocianato de fluoresceína dando lugar a fluoresceína amina, como del alendronato.



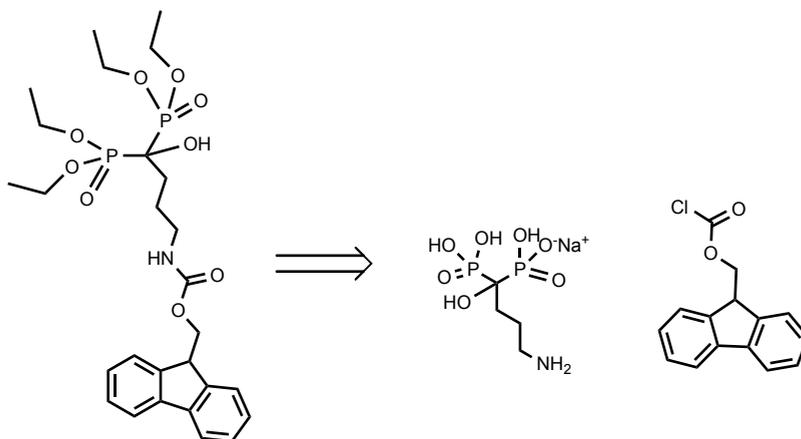
Esquema 17. Propuesta de formación de una tiourea a partir de alendronato sódico e isotiocianato de fluoresceína.

Seguidamente se intentó marcar el alendronato con cloruro de fluorenilmetiloxicarbonilo (fmoc-Cl)⁸⁶ mediante la formación de un carbamato con la amina del alendronato⁹³. Se probaron varias condiciones como se muestra en el esquema 18. En algunos casos, el espectro de ¹H-RMN sugería que se había obtenido el compuesto, sin embargo, el espectro de ³¹P-RMN no mostraba las señales

⁹² (a) De Marco, J. D., Biffar, S. E., Reed, D. G., Brooks, M. A. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1989**, *7*, 1719-1727. (b) Romanenko, V. D., Kukhar, V. P. *ARKIVOC*, **2012**, 127-166.

⁹³ Myers, A. G., Gleason, J. L., Yoon, T., Kung, D. W. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 656-673.

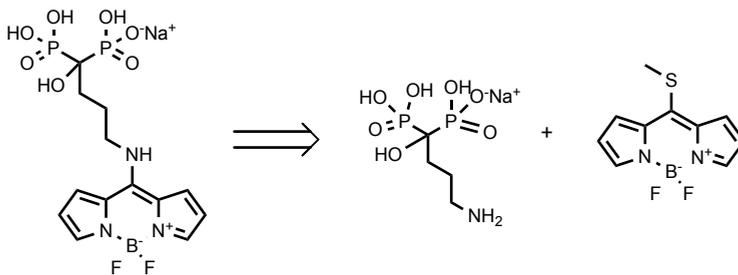
correspondientes a los grupos fosfonato del alendronato, por lo tanto, se desechó la idea de haber obtenido el producto y se buscó una vía alternativa.



-Condiciones de reacción ensayadas:
 - H₂O/Dioxano, NaHCO₃, 5 °C.
 - NaOH 2M
 - CHCl₃ anhidro, alendronato activado, reflujo.

Esquema 18. Propuesta de formación de un carbamato a partir de alendronato sódico y cloruro de fluorenilmetiloxicarbonilo.

En el apartado anterior se ha indicado que el 8-tiometil-BODIPY es capaz de reaccionar con nucleófilos en condiciones suaves, por ello dado que ya se había procedido a la síntesis del mismo se planteó la posibilidad de hacerlo reaccionar con el grupo amino del alendronato. La reacción se llevó a cabo utilizando diferentes condiciones como se muestra en el esquema 19, pero en todos los casos se recuperaron los productos de partida inalterados.



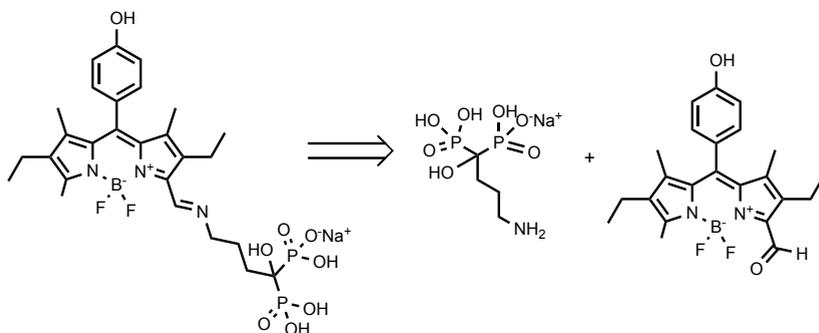
-Condiciones de reacción ensayadas:

- DCM, 18-corona-6.
- DCM/H₂O.
- MeOH/H₂O, alendronato activado.
- En seco (molturación).

Esquema 19. Esquema retrosintético de la reacción de sustitución nucleofílica entre el azufre del 8-tiometilbodipy y la amina del alendronato sódico.

En primer lugar se utilizó diclorometano como disolvente y 18-corona-6 como catalizador de transferencia de fase debido a su capacidad para la transferencia de compuestos iónicos, no obstante, la reacción no se produjo puesto que se obtuvieron los reactivos de partida inalterados. Teniendo en cuenta la mala solubilidad del alendronato en disolventes orgánicos, en la siguiente prueba se empleó diclorometano como disolvente y una cantidad mínima de agua para disolver el alendronato, pero tampoco funcionó, presumiblemente debido a la inmiscibilidad de ambos disolventes. Seguidamente se probó a realizar la reacción activando primero el alendronato sódico de modo que fuera más reactivo. Para ello, se disolvió el alendronato en ácido acético acuoso al 10% y tras dos horas en agitación se liofilizó para eliminar todo el agua⁶⁷, pasando entonces a la reacción entre el alendronato y el BODIPY. En esta ocasión para llevar a cabo la reacción se utilizó metanol como disolvente

mayoritario debido a su miscibilidad con el agua y al igual que en el caso anterior se empleó una cantidad mínima de agua para ayudar a disolver el alendronato, no obstante tampoco esta vez se produjo la reacción deseada, pues se obtuvo una fracción insoluble correspondiente al alendronato y una fracción soluble que tras ser basicada dio lugar a un producto indeterminado que carecía de señales aromáticas, y que por lo tanto no nos interesaba. Por último, se decidió probar la reacción en seco mediante molturación en un mortero de vidrio, pero ni si quiera en estas condiciones que no requerían disolvente tuvo lugar la reacción, pues los reactivos de partida permanecieron inalterados.



-Condiciones de reacción ensayadas:

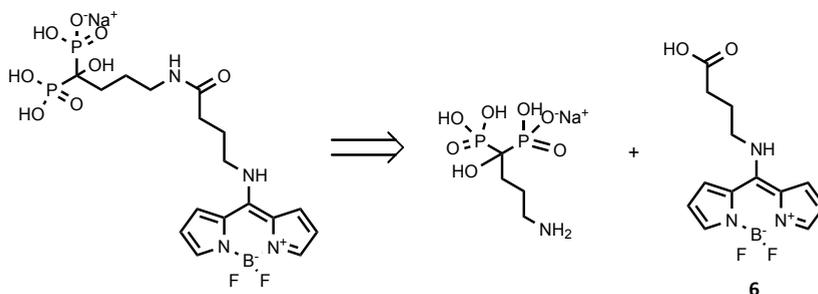
- CHCl₃ anhidro.
- Tolueno anhidro.
- Tolueno anhidro, reflujo, Dean-Stark.
- CHCl₃ anhidro, reflujo, Dean-Stark, tamiz.

Esquema 20. Esquema retrosintético de la propuesta de reacción de formación de una imina entre el alendronato sódico y el derivado del BODIPY representado en este esquema.

Una alternativa de funcionalización haciendo uso de la amina del alendronato era hacerla reaccionar con un grupo aldehído para formar

una imina. Para ello, se hizo uso del derivado de BODIPY que se indica en el esquema 20 que se encontraba disponible en el laboratorio pero los resultados fueron negativos a pesar de las distintas condiciones de reacción ensayadas, según se indica en el esquema 20⁹⁴.

En vista de que el producto **6** se había obtenido con buen rendimiento y que la síntesis del alendronato a partir de este compuesto no funcionaba, se pensó en utilizar dicho producto como marcador fluorescente y hacerlo reaccionar directamente con alendronato sódico comercial mediante la formación de una amida (esquema 21).



-Condiciones de reacción ensayadas:

- DMSO, BDP activado (EDC, NHS), alendronato activado.
- H₂O/acetona, alendronato activado.
- DMSO, BDP activado (cloruro tionilo), alendronato activado.

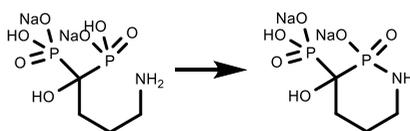
Esquema 21. Reacción de marcaje del alendronato sódico con el compuesto **6**.

Se llevó a cabo la reacción en diferentes condiciones (como se muestra en el esquema 21) siempre con el alendronato activado mediante ácido acético al 10%, no obstante la reacción únicamente pareció funcionar en el primer caso dando lugar a lo que parecían ser dos BODIPYs distintos, como si el alendronato hubiera reaccionado tanto a partir de la amina

⁹⁴ Barba, A., *Design, Synthesis and Evaluation of Chromo-fluorogenic Probes for contaminating species*, Universitat Politècnica de València, Valencia, **2014**.

como del alcohol dando lugar a la amida y al éster correspondientes. En vista de estos resultados, se intentó optimizar la reacción modificando algunas condiciones, no obstante los resultados que se obtuvieron no fueron buenos y se decidió seguir con el marcaje por otra vía.

Como ninguno de los intentos llevados a cabo para funcionalizar el grupo amino del alendronato había sido fructuoso, se pudo concluir que dicho grupo tiene unas características especiales que pueden estar relacionadas con la estructura del alendronato. En efecto, no sería descartable que en las condiciones de reacción (fundamentalmente medios orgánicos) se produjera una reacción de formación de una fosforamida que disminuyera la concentración de amina libre y por tanto limitara la reactividad deseada (esquema 22).



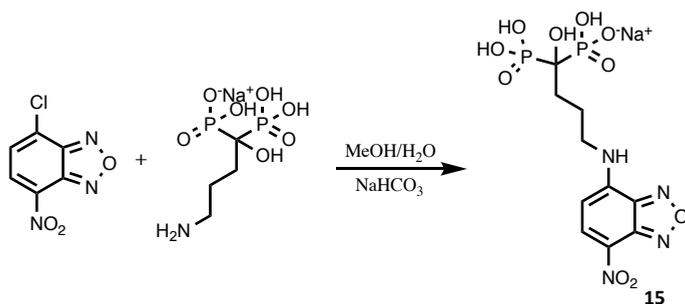
Esquema 22. Propuesta de reactividad del alendronato

Otra dificultad procedería de la solubilidad del alendronato que es muy soluble en agua pero muy poco en disolventes orgánicos.

Teniendo en cuenta la posible influencia de la solubilidad en los resultados obtenidos previamente, se pensó en usar una reacción de funcionalización que se llevara a cabo en agua o en medios muy polares. Para ello se hizo uso de una reacción de sustitución nucleofílica sobre 4-cloro-7-nitrobenzofurazano (NBD-Cl)⁹⁵. Se sabe que este compuesto es

⁹⁵ Bern, M., Badea, F., Draghici, C., Caproiu, M. T., Vasilescu, M., Voicescu, M., Beteringhe, A., Caragheorgheopol, A., Maganu, M., Constantinescu, T., Balaban, A. T. *ARKIVOK*, **2007**, 87-104.

capaz de reaccionar con aminas en medio agua/metanol dando lugar a una reacción de sustitución nucleofílica aromática con rendimientos prácticamente cuantitativos. El procedimiento está estandarizado para la cuantificación de aminoácidos y otros compuestos aminados. Siguiendo uno de los procedimientos descritos en la bibliografía⁹⁵ se obtuvo el producto **15** (esquema 23).



Esquema 23. Reacción de sustitución nucleofílica entre el alendronato sódico y NBD-Cl para la obtención del producto **15**.

Se comprobó que la reacción se había producido mediante espectroscopia de UV ya que mientras que el NBD-Cl absorbe a 330 nm el alendronato marcado lo hace a 350 nm. Por su parte el alendronato sin marcar solo presenta una banda muy débil en torno a 420 nm, que únicamente se observa a concentraciones dos órdenes de magnitud superiores. Aunque no se identificó completamente el producto, este método sirvió para cuantificar la concentración de alendronato mediante el uso de una recta patrón como se explicará en el siguiente punto.

4.3 Detección por UV

Una vez marcado el alendronato sódico con un compuesto cromogénico, el siguiente paso fue la elaboración de una recta de calibrado a partir de la cual poder cuantificar la liberación de fármaco en los ensayos

posteriores. Para la elaboración de la recta se empleó como disolvente una mezcla de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)/tampón de lisis A (97:3) puesto que era el medio que se iba a utilizar en los ensayos celulares. Como puede verse en la figura 6, no hay ninguna absorción correspondiente al medio de trabajo que pueda afectar la medida correspondiente al alendronato marcado.

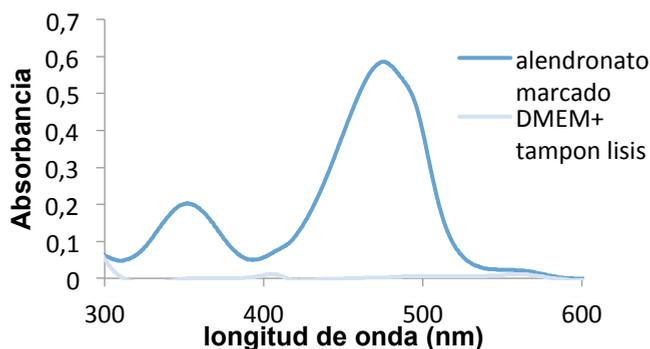


Figura 6. Espectro de UV del alendronato marcado en el medio de cultivo. Comparación con el medio de cultivo (curva gris).

La recta patrón obtenida se muestra en la figura 7.

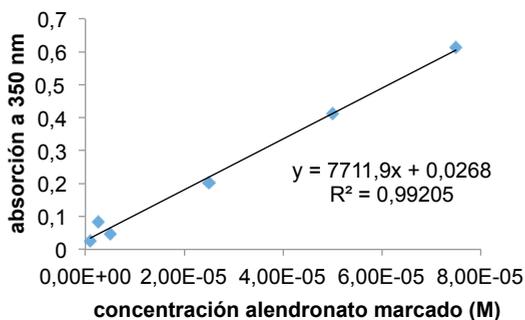


Figura 7. Recta patrón a 350 nm del alendronato unido a un marcador (compuesto 15) en medio DMEM/tampón de lisis A.

4.4 Diseño y anclaje de la puerta molecular

4.4.1 Diseño de la puerta

Con el alendronato ya marcado y habiendo hallado el modo de cuantificarlo, nos centramos en la búsqueda de una puerta molecular adecuada para ser abierta únicamente por la enzima catepsina K. Sabiendo que esta enzima es una proteasa y que por lo tanto su función principal es la rotura de péptidos, llegamos a la conclusión de que la puerta molecular tenía que ser un péptido con la estructura adecuada para romperse específicamente con dicha enzima. Así, encontramos referencias bibliográficas donde se habían realizado ensayos para determinar los puntos principales de escisión entre diferentes aminoácidos (y los porcentajes) que llevaba a cabo la catepsina K, que eran Met-Gly (86%), Arg-Gly (89%) y Ser-Gly (100%), así como la determinación de péptidos específicos para dicha enzima⁹⁶. A partir de esta información, se decidió realizar los ensayos con dos puertas moleculares distintas constituidas por secuencias peptídicas diferentes. Para la primera de ellas, se pensó utilizar la secuencia péptidica Abz-KPRGSKQ-EDDnp (siendo Abz ácido o-aminobenzoico y EDDnp N-(2,4-dinitrofenil)etilendiamina) descrita en la bibliografía como específica para la catepsina K y que además presentaba resistencia a la hidrólisis tanto por la catepsina B como por la L⁹⁷. No obstante, se pensó que la secuencia era demasiado breve con lo que quizá el volumen del péptido no fuera suficiente para tapar los poros de la MCM-41, por lo que se

⁹⁶ (a) Nosaka, A. Y., Kanaori, K., Teno, N., Togame, H., Inaoka, T., Takai, M., Kokubo, T. *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, 7, 375-379. (b) Alves, M. F. M., Puzer,

⁹⁷ L., Cotrin, S. S., Juliano, M. A., Juliano, L., Brömme, D., Carmona, A. K. *Biochem. J.*, **2003**, 373, 981-986.

decidió que la puerta molecular sería una repetición triple de dicha secuencia peptídica con algunas modificaciones en la terminación del péptido, de manera que este terminara en un grupo amina para facilitar la unión al soporte inorgánico. La secuencia peptídica **1** que haría las veces de puerta molecular quedaría de la siguiente manera:



En el caso de la segunda secuencia peptídica se hicieron algunas modificaciones a partir de la primera, puesto que se pensó que, debido al elevado número de lisinas que presentaba, esta podía encontrarse en un grado de protonación que dificultara el cierre de los poros. Además, en la segunda secuencia, se incluyó un alquino terminal de manera que la unión al soporte inorgánico se produjera, en este caso, a través de una reacción “click”, quedando la secuencia peptídica **2** de la siguiente manera:



El diseño de este segundo péptido se basó en los datos existentes en la bibliografía⁹⁷ que describen que la secuencia de aminoácidos KLXFS, (donde X puede ser distintos aminoácidos) se hidroliza específicamente en la subunidad S1 de catepsina K produciéndose la hidrólisis entre los aminoácidos X-F. De los posibles aminoácidos (X) el que conduce a una velocidad mayor de hidrólisis es la arginina (R). Con el fin de lograr una mayor electroneutralidad del péptido se intercalaron unidades de ácido glutámico (E) para compensar la presencia de lisinas (K) imprescindibles en el proceso. Como se ha indicado en el caso anterior, las secuencias se repitieron tres veces con el fin de disponer de una molécula lo

suficientemente voluminosa como para producir el cierre eficaz de los poros.

4.4.2 Carga del material y anclaje de la puerta molecular al material mesoporoso

Una vez obtenidos tanto el soporte inorgánico MCM-41 como las secuencias peptídicas (**1** y **2**) que harían de puertas moleculares, se pasó a la siguiente etapa que consistió en la carga del soporte con el colorante (sulforodamina B) y con el alendronato marcado respectivamente y el anclaje de la puerta molecular, en cada caso mediante un tipo de reacción distinta.

4.4.2.1. Carga de los materiales

El proceso de carga de los materiales se llevó a cabo de forma diferente dependiendo de cuál fuese la molécula susceptible de ser cargada.

En primer lugar, se realizó la carga de la MCM-41 con sulforodamina B, y para ello se agitaron cantidades iguales en peso de material inorgánico y colorante en acetonitrilo anhidro a reflujo y con ayuda de un Dean-Stark durante dos horas para eliminar los restos de agua que pudieran quedar, y a continuación se mantuvo la agitación 12 horas a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo el material ya estaba cargado y solo faltaba centrifugar para eliminar el disolvente y dejarlo secar en la estufa a 70 °C.

En el caso de la carga del alendronato sódico unido al marcador fluorescente se realizaron diversas pruebas hasta hallar el método óptimo para cargar las nanopartículas con el fármaco, puesto que basándonos en referencias bibliográficas^{20c} consideramos que el uso de

la MCM-41 aminada podría ser ventajoso, ya que en las condiciones de carga (pH 4,8) la interacción producida entre el grupo silanol de la MCM-41 no modificada y el grupo fosfonato del fármaco adsorbido es más débil que la interacción producida entre la amina y el fosfonato. Así, se probaron dos métodos distintos y dos tipos de nanopartículas diferentes, dando un total de 3 pruebas:

- MCM-41 + alendronato marcado empleando como disolvente una disolución tamponada de acético/acetato a pH 4,8, manteniendo la reacción en agitación a 70 °C durante 24 horas.
- MCM-41 aminada + alendronato marcado empleando como disolvente una disolución tamponada de acético/acetato a pH 4,8, manteniendo la reacción en agitación a 70°C durante 24 horas.
- MCM-41 + alendronato marcado empleando como disolvente una disolución tamponada de acético/acetato a pH 4,8. Se compactó el soporte inorgánico hasta obtener finos discos que fueron colocados en una placa Petri²⁰ tras haber añadido la disolución tamponada de alendronato. Se dejó a 37 °C 24 horas.

Tras realizar estas pruebas se estableció que el segundo procedimiento era el mejor, por lo que es el que se siguió para la carga de fármaco en las nanopartículas que se centrifugaron para eliminar el disolvente y se dejaron secar en la estufa a 70 °C.

4.4.2.2. Anclaje de las puertas

Para poder anclar el péptido al material mesoporoso, en ambos casos se hizo una reacción previa para unir a la MCM-41 ya cargada (con el colorante o con el fármaco) un derivado de trimetilsililo tal y como se ha descrito en el capítulo 3 apartado 3.2.1, y posteriormente se llevó a cabo el anclaje de la secuencia peptídica correspondiente al material.

En el caso de la secuencia **1**, se empleó como derivado isocianato de 3-trietoxisililpropilo que reaccionó con la amina terminal del péptido dando lugar a la formación de una urea, como se muestra en la figura 8.

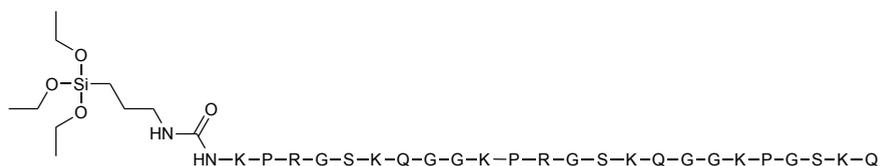


Figura 8. Puerta molecular compuesta por el péptido **1**.

Mientras que en el caso del péptido **2** se aprovechó que tenía un alquino terminal para hacerlo reaccionar con la azida del compuesto 3-(azidopropil)trietoxisilano en una reacción “click” dando lugar a la puerta molecular representada en la figura 9.

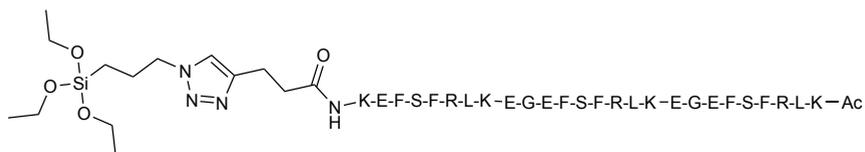


Figura 9. Puerta molecular compuesta por el péptido **2**.

Tras lavar para eliminar los restos de carga que pudieran quedar adsorbidos en la parte externa de los poros y dejarlos secar en la estufa a 70°C se obtuvieron, respectivamente, los sólidos inorgánicos **P1**

(secuencia 1) y **P2** (secuencia 2) cargados con colorante y cerrados con la puerta molecular correspondiente y los sólidos inorgánicos **P3** (secuencia 1) y **P4** (secuencia 2) cargados con el fármaco marcado y cerrados con la puerta molecular correspondiente.

4.4.3 Caracterización de los materiales

Una vez obtenidos los sólidos finales, se pasó a la caracterización de los mismos mediante las técnicas estándar. A título de ejemplo se incluyen algunos de los resultados obtenidos que presentaron las características esperadas.

Las imágenes del TEM proporcionaron información acerca de la morfología y el tamaño de las nanopartículas, así como acerca del estado de los canales de la matriz hexagonal, es decir, de si estaban cargados y por lo tanto presentaban aspecto opaco, o vacíos, en cuyo caso se verían rayas alternas blancas y negras. Como se puede observar en la figura 10, los sólidos estaban cargados.

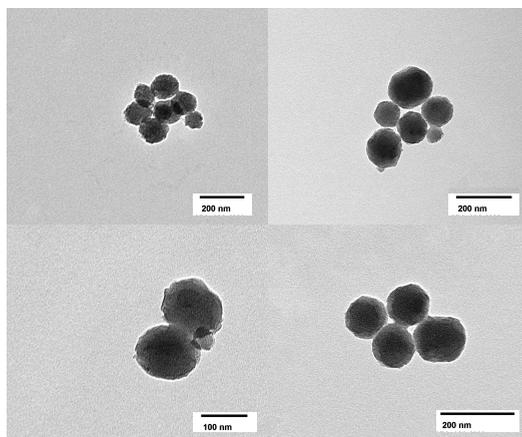


Figura 10. Imagen del TEM de los sólidos. (Arriba izquierda) **P1**. (Arriba derecha) **P3**. (Abajo izquierda) **P2**. (Abajo derecha) **P4**.

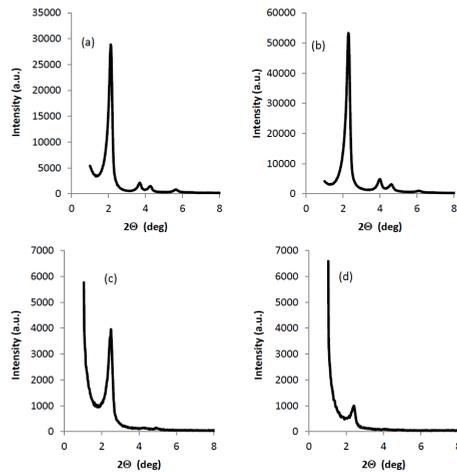


Figura 11. Difracción de rayos X de polvo: a) MCM-41 sintetizada b) MCM-41 calcinada c) **P2** d) **P4**.

La difracción de rayos X aportó información acerca de la presencia de una estructura mesoporosa y de su estabilidad. Así se observó, en la MCM-41 sintetizada, la presencia de las cuatro reflexiones características de bajo ángulo de una matriz hexagonal ordenada (100), (110), (200) y (210). En la MCM-41 ya calcinada se apreció un desplazamiento significativo del pico (100) que concuerda con la condensación de silanoles producida durante la calcinación. Por último, tanto en **P2** como en **P4** se observó una ampliación de los picos (100) y (200) correspondiente a la reducción en el contraste relacionada con el proceso de funcionalización y con la carga de los mesoporos (figura 11).

Se determinó la porosidad del material mediante análisis de isothermas de adsorción-desorción de N₂ (figura 12) para **P2** y **P4**. Esta técnica proporcionó información acerca del área superficial, el tamaño de poro así como el volumen del mismo. El diámetro de poro se calculó siguiendo el método BJH (Barret-Joyner-Halenda), mientras que para obtener el

área superficial se empleó el método BET (Brunauer-Emmett-Teller) (tabla 1).

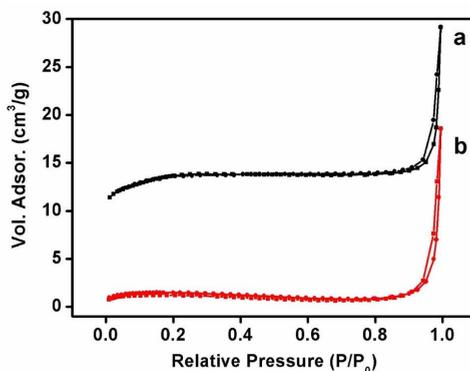


Figura 12. Porosimetría correspondiente a: a) **P2** y b) **P4**. El eje Y se ha desplazado para mayor claridad.

El contenido de colorante en los sólidos se determinó disgregando las nanopartículas con hidróxido sódico y midiendo la absorbancia y resultó ser 0,64 y 0,59 % para **P1** y **P2** respectivamente . El contenido de fármaco en los sólidos **P3** y **P4**, 8,20% en ambos, se determinó por análisis de fósforo mediante ICP-masas.

Por último, se llevó a cabo el análisis elemental tanto de **P2** como de **P4**, a partir del cual y dado que se conocía la carga se pudo determinar la cantidad de puerta molecular presente en cada uno de ellos. El dato de materia orgánica superficial/ 100 mg de material para **P2** fue 44 mg y 42 mg de materia orgánica superficial/ 100 mg de material para **P4**. En este último caso, además de la materia orgánica correspondiente a la puerta molecular en el valor obtenido estaba incluido el exceso de propilamina procedente de la aminación de las nanopartículas, si bien la cantidad era muy pequeña dada la relación de los contenidos de cada uno de los elementos analizados.

4.5 Estudios de liberación con los materiales patrón

Una vez preparados y caracterizados los materiales, se pasó a realizar los estudios de liberación en disolución mediante medidas de fluorescencia utilizando los materiales cargados con el colorante (**P1** y **P2**). Estos estudios eran imprescindibles para tener información sobre dos aspectos fundamentales del sistema:

1. Si los péptidos actuaban correctamente como puertas moleculares y
2. En caso de que el cierre fuera adecuado, comprobar la apertura en presencia de la enzima catepsina K.

Para llevar a cabo estos estudios se prepararon, por un lado, las muestras de referencia conocidas como blanco o control que eran suspensiones de los materiales en distintos medios y a distintos pH y las muestras de medida que eran muestras idénticas a las anteriores pero a las que se había añadido el estímulo (catepsina K, Merck 219461-25UG). Los estudios se realizaron registrando los espectros de fluorescencia y midiendo la intensidad relativa de emisión a $\lambda = 586$ nm ($\lambda_{exc} = 563,5$ nm), puesto que ya se habían realizado ensayos de liberación de sulforodamina B en capítulos anteriores y se conocían sus máximos de absorción y emisión (capítulo 3 apartado 3.2.1).

Iniciamos las pruebas con el sólido **P1**. En un principio, se realizaron los estudios de liberación en tampón acetato de sodio pH 5,5 puesto que era el medio óptimo para la enzima especificado en las referencias bibliográficas⁹⁸, no obstante los resultados obtenidos no fueron buenos, ya que no se apreciaba cambio alguno en la liberación del colorante,

⁹⁸ Hou, W-S., Li, Z., Büttner, F. H., Bartnik, E., Brömme, D. *Biol. Chem.*, **2003**, *384*, 891-897.

entre la presencia y la ausencia de enzima. En vista de estos resultados, se pensó que el problema podía estar en el elevado número de lisinas de la estructura peptídica, que a pH ácido o neutro y debido a la protonación de los grupos amina, éstos se repelieran y provocaran la liberación del colorante (como se ha comentado anteriormente). Para confirmarlo, se realizó la liberación en tampón fosfato a pH 7, en tampón tris a pH 8 y en agua desionizada (que presentaba un pH ligeramente ácido) sin el uso de la enzima, y en los tres casos se produjo la liberación del colorante.

Finalmente se decidió que el estudio debía realizarse en medio DMEM (pH 7.4 que es también el mismo pH de la mezcla DMEM-tampón de lisis A) puesto que estos eran los medios de cultivo y de lisado de las células y por lo tanto los que se utilizarían en los ensayos celulares, además de ser el pH en el que menos liberación pasiva se producía (figura 13).

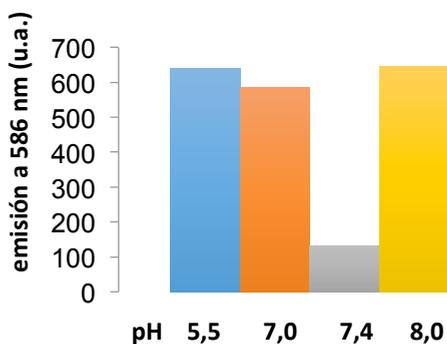


Figura 13. Variación de la liberación pasiva del colorante del material **P1** en función del pH.

Para poder cuantificar la cantidad de sulforodamina B que se había liberado tanto en presencia como en ausencia de la enzima, se registró

una recta de calibrado del colorante utilizando como disolvente medio DMEM/tampón de lisis A (figura 14).

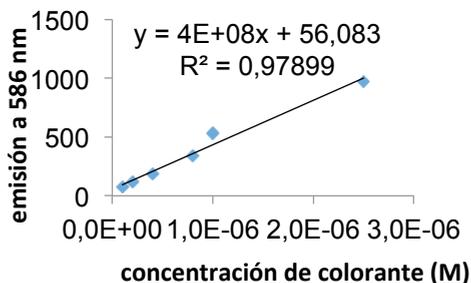
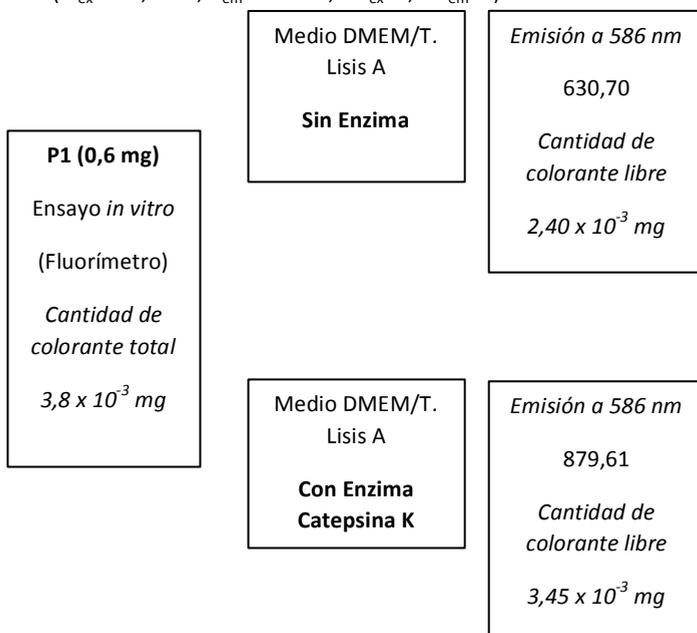


Figura 14. Recta de calibrado de sulfurodamina B en medio DMEM/tampón de lisis (λ_{ex} : 563,5 nm; λ_{em} : 586 nm; $slit_{ex}$: 5; $slit_{em}$: 5).



A partir de la recta de calibrado y la IF_{586} calculamos la cantidad de colorante liberada (mg). Conociendo estos datos, así como la cantidad total de colorante que había inicialmente en el material, se obtiene el % de liberación.

Figura 15. Esquema explicativo de la obtención de los diferentes porcentajes de liberación para el sólido **P1**.

La concentración de colorante liberado en ausencia de la enzima, evaluado por interpolación en la recta de calibrado en este medio, era $1,4 \times 10^{-6}$ M. Este dato permitía conocer la masa de colorante libre en la disolución. Por otra parte, el grado de funcionalización del material, que había sido previamente evaluado (0,64%), permitía calcular la cantidad inicial de colorante que se encontraba en el interior de las nanopartículas. Con estos dos datos se pudo estimar que la liberación pasiva del material era del 63 % (figura 15). Haciendo un estudio análogo pero esta vez en presencia del enzima catepsina K se pudo evaluar la liberación cuando el estímulo estaba presente en el medio. Este valor era del 90 %. Comparando el valor del porcentaje de liberación en ausencia y en presencia del estímulo (enzima catepsina K) se observó que se producía un incremento del 43 % en la emisión lo que demostraba la eficacia del enzima para llevar a cabo la apertura de la puerta molecular (figura 16).

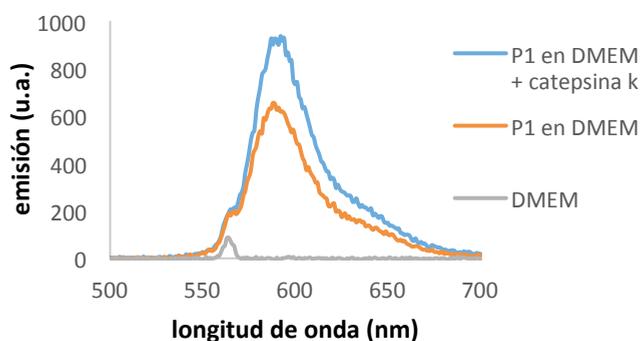


Figura 16. Espectro de fluorescencia del ensayo de liberación del colorante del sólido **P1** en presencia y ausencia de enzima catepsina k ($\lambda_{exc} = 563,5$ nm).

En el caso del sólido **P2**, se realizaron las mismas pruebas que con el sólido **P1**.

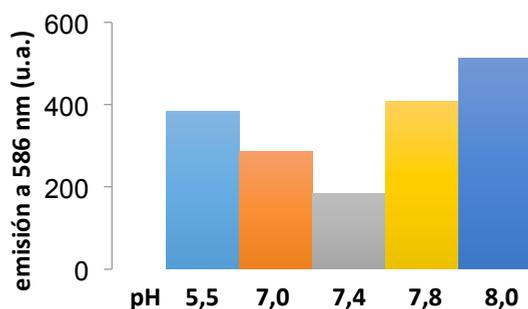


Figura 17. Variación de la liberación pasiva del colorante del material **P2** en función del pH.

En primer lugar, se estableció cual era el pH del medio en el que la liberación del colorante en ausencia del enzima era mínima. Como puede verse en la figura 17, también en este caso la liberación pasiva era menor a pH=7,4.

Para poder cuantificar la cantidad de sulforodamina B que se había liberado tanto en presencia como en ausencia de la enzima, igual que en el caso anterior, se registró una recta de calibrado del colorante utilizando como disolvente medio DMEM/tampón de lisis A (figura 18) pero modificando algunas condiciones de medida en el aparato para evitar la saturación de la señal.

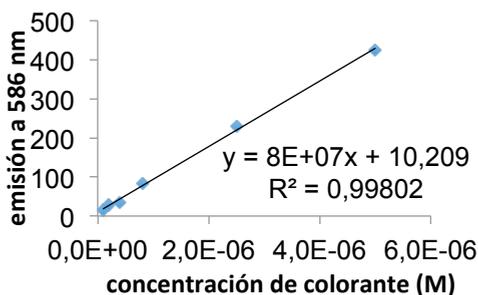


Figura 18. Recta de calibrado de sulfurodamina B en medio DMEM/tampón de lisis (λ_{ex} : 563,5 nm; λ_{em} : 586 nm; slit_{ex}:2, 5; slit_{em}: 5).

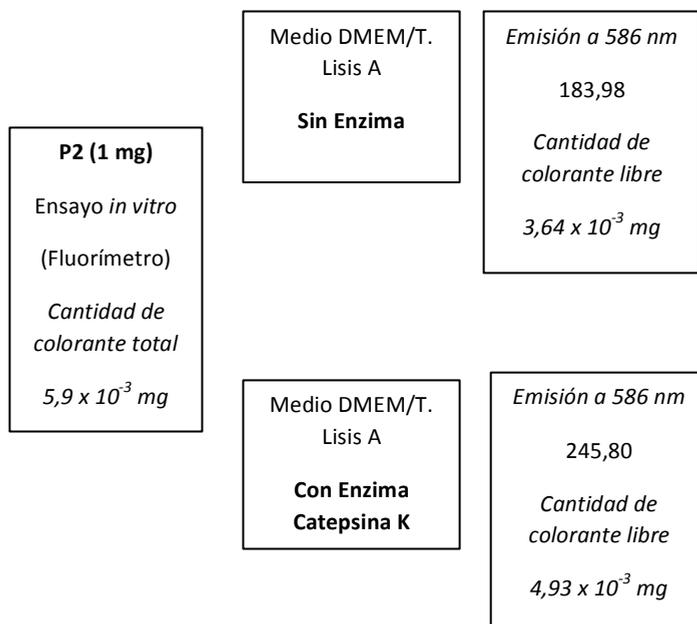


Figura 19. Esquema explicativo de la obtención de los diferentes porcentajes de liberación para el sólido **P2**.

La evaluación del porcentaje de liberación pasiva en este caso, calculado de forma análoga a la indicada anteriormente fue del orden del 62 %. Este valor significaba que la modificación de la secuencia peptídica no

había tenido el resultado esperado puesto que no había mejorado la eficacia en el cierre de los poros. Por contra, la liberación del colorante era inferior en este caso que en el anterior, siendo de un 84 %. Este hecho podría estar relacionado con la secuencia del péptido que en estas condiciones parecía menos adecuada para la acción del enzima.

De cualquier modo, el % de incremento observado en la liberación (35%) era de orden similar al calculado anteriormente.

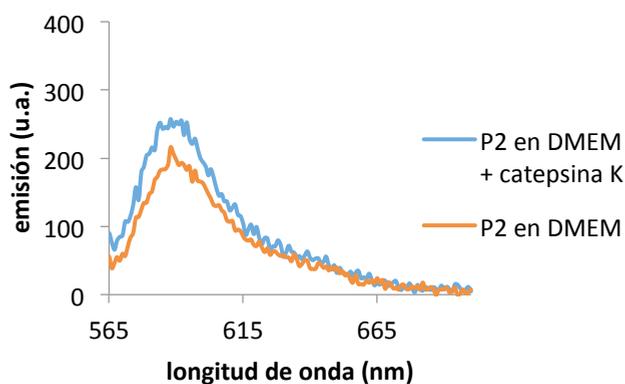


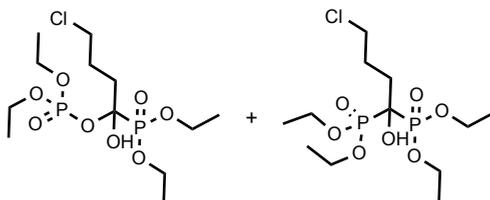
Figura 20. Espectro de fluorescencia del ensayo de liberación del colorante del sólido **P2** en presencia y ausencia de enzima catepsina K ($\lambda_{exc} = 563,5$ nm).

4.6 Procedimiento experimental

Elaboración de disoluciones tamponadas:

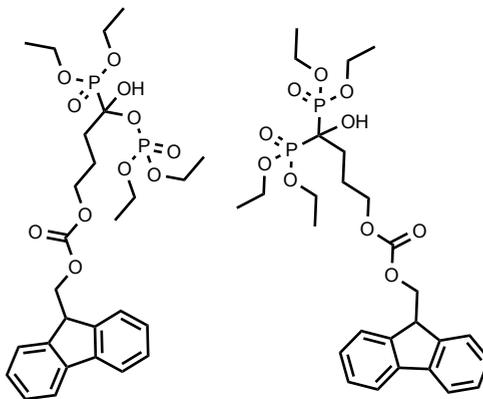
- Tampón de lisis A: compuesto por 10 mM HEPES pH 8,0, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM KCl, (1 mM DTT (ditiotreitil), 5 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 10 mM Na_2MoO_4 , 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptina, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ aprotinina, 0,5 mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo).

Síntesis de tetraetil (4-cloro-1-hidroxi-butano-1,1-diil) bis(fosfonato) (1)



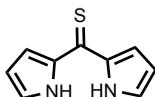
En un matraz de fondo redondo de 50 ml bajo atmósfera de argón, se introdujo cloruro de 4-butirilo (0,79 ml, 7,09 mmol) y se añadió, gota a gota, a 0°C y con agitación, fosfito de trietilo (1,21 ml, 7,09 mmol). Se dejó alcanzar la temperatura ambiente y 15 minutos más tarde se añadieron secuencialmente 20 ml de diclorometano anhidro, fosfito de dietilo (0,76 ml, 7,80 mmol) e imidazol (0,48 g, 7,09 mmol). Una hora más tarde se lavó el producto con una disolución acuosa de ácido clorhídrico 1M y la mezcla se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se secó con MgSO₄ y se evaporó el disolvente para obtener una mezcla de productos (**1** y **1***) (2,24 g) como un aceite amarillo en proporción 1:1, calculado a partir del ¹H-RMN. ¹H RMN (300 MHz, Cloroformo-d) (**1**) δ (ppm) 5,57 (s, 1H, OH), 4,11 (q, J = 26,4 Hz, 9,1, 8H, -CH₂CH₃), 3,50 (t, J = 6,4, 2H, -CH₂Cl), 2,06 (m, 4H, -CH₂CH₂CH₂Cl), 1,28 (t, 12H, -CH₂CH₃). ³¹P RMN (300 MHz, Cloroformo-d) δ (ppm) 20,40. (**1***) δ (ppm) 5,45 (s, 1H, OH), 4,17 (dq, 8H, -CH₂CH₃), 3,50 (t, J = 6,4, 2H, -CH₂Cl), 2,06 (m, 2H, -CH₂CH₂CH₂Cl), 1,96 (m, 2H, -CH₂CH₂CH₂Cl), 1,34 (t, 12H, -CH₂CH₃). ³¹P RMN (300 MHz, Cloroformo-d) δ (ppm) 19,85 (d, J = 26 Hz), - 0,59.(d, J = 26 Hz).

Síntesis de carbonato de (9H-fluoren-9-il)metil (4,4-bis(dietoxifosforil)-4-hidroxitulito) (2)



En un matraz de fondo redondo de 50 ml provisto de atmósfera de argón se disolvió una mezcla de los productos **1** y **1*** (0,24 g, 0,64 mmol) y fmoc-Cl (0,5 g, 1,93 mmol) en 15 ml de diclorometano anhidro. La reacción se mantuvo en agitación a 60 °C 17 horas. Pasado ese tiempo se concentró y tras purificación por columna cromatográfica (eluyente: primero con AcOEt y por último se realiza un lavado con MeOH) se obtuvo una mezcla de los productos **2** y **2*** (0,19 g, 60% de **2** y 40% de **2*** calculado a partir del ³¹P RMN) como un aceite amarillo. ³¹P RMN (121 MHz, Cloroformo-d) (**2**) δ (ppm) 20,9, (**2***), 20,4 (d, J = 22,6 Hz), - 0,1 (d, J = 22,6 Hz).

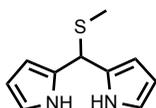
Síntesis de di(3H-pirrol-2-il)metanotona (3)



En un matraz de fondo redondo de 250 ml bajo atmósfera de argón se disolvió tiofosgeno (1 ml, 0,013 moles) en 45 ml de tolueno anhidro frío

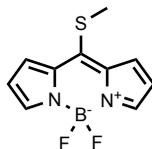
con agitación vigorosa. Se añadió gota a gota pirrol (1,56 g, 0,023 moles) disuelto en 40 ml de éter anhidro. Diez minutos más tarde se adicionaron 32,7 ml de metanol con un 10% de agua y la reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se concentró y se purificó el producto mediante cromatografía en columna (eluyente: hexano/acetato de etilo 8:2) para obtener el producto **1** (0,19 g, 39%) como un sólido rojo. ^1H RMN (300 MHz, Cloroformo-d) δ (ppm) 9,77 (s, 2H, 2 -NH-), 7,21 (td, $J = 2,7, 1,3$ Hz, 2H), 7,05 (ddd, $J = 3,8, 2,4, 1,4$ Hz, 2H), 6,41 (dt, $J = 4,0, 2,5$ Hz, 2H).

Síntesis de 2,2'-((metiltio)metileno)bis(3H-pirrol) (**4**)



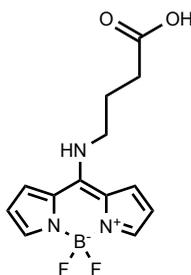
En un matraz de fondo redondo de 25 ml bajo atmósfera de argón se disolvió el producto **3** (0,89 g, 5,02 mmol) en 13 ml de diclorometano anhidro. Se añadió ioduro de metilo (1,56 ml, 25 mmoles) y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente 24 horas. Se concentró obteniéndose el producto **4** (1,69 g) en forma de un sólido marrón metalizado y se pasó a la siguiente reacción sin purificación.

Síntesis de 5,5-difluoro-10-(metiltio)-5H-4,5-dipirrol[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinina (**5**)



En un matraz de fondo redondo de 25 ml bajo atmósfera de argón se disolvió el producto **4** (0,97 g, 5,02 mmol) en 10 ml de diclorometano anhidro. Se añadió gota a gota trietilamina (1,05 ml, 7,54 mmol) y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos. Pasado ese tiempo se añadió trifluoruro de boro dietil eterato (0,97 ml, 7,89 mmol). Dos horas y media después se concentró y se purificó por cromatografía en columna (eluyente: hexano/acetato de etilo 8:2) obteniéndose el producto **5** (0,45 g, 38%) como un sólido rojo. ^1H RMN (300 MHz, Cloroformo- d) δ (ppm) 7,82 – 7,75 (m, 2H), 7,39 (d, J = 3,8 Hz, 2H), 6,51 (d, J = 3,8 Hz, 2H), 2.88 (s, 3H, S- CH_3).

Síntesis del ácido 4-((5,5-difluoro-5H-4l4,5l4-dipirrol[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinina-10-il)amino)butanoico (**6**)

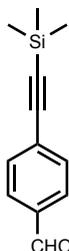


En un matraz de fondo redondo de 10 ml se disolvió 8-tiometilbodypy (0,051 g, 0,21 mmol) en 2,54 ml de metanol. Por otro lado, se disolvió ácido γ -aminobutírico (0,066 g, 0,64 mmol) en 160,96 μl de agua y se añadió a la reacción. Se mantuvo en agitación a temperatura ambiente 50 minutos. Pasado ese tiempo se concentró, y tras purificación por columna cromatográfica (eluyente: hexano/AcOEt 1:1) se obtuvo el producto **6** (43,8 mg, 70%) en forma de un sólido amarillo fluorescente. ^1H RMN (300 MHz, Acetona- d_6) δ (ppm) 11,67 (s, 1H, NH), 7,55 – 7,45 (m, 2H), 7,24 – 7,10 (m, 2H), 6,31 (ddd, J = 57,3, 4,0, 2,2 Hz, 2H), 3,61 (s,

210

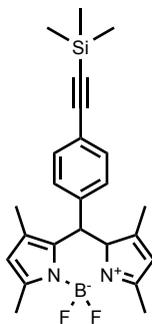
2H, $-\underline{\text{CH}_2\text{COOH}}$, 2,56 – 2,41 (m, 2H, $-\underline{\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{COOH}}$), 1,87 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$).

Síntesis de 4-((trimetilsilil)etnil)benzaldehído (7)



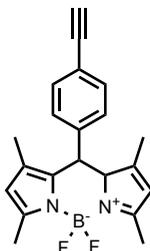
En un matraz de fondo redondo de 100 ml provisto de atmósfera de argón se disolvieron 4-bromobenzaldehído (2,00 g, 0,01 mol), yoduro de cobre (I) (0,21 g, $1,08 \times 10^{-3}$ mol) y paladio-tetrakis(trifenilfosfina) (0,50 g, $0,43 \times 10^{-3}$ mol) en 33 ml de THF anhidro. A continuación, se añadió trietilamina (6,02 ml, 0,04 mol) y trimetilsililacetileno (2,28 ml, 0,02 mol) y se mantuvo la reacción en agitación a temperatura ambiente durante 12 horas. Pasado ese tiempo se filtró, se lavó el sólido con AcOEt (3 x 5 ml) para arrastrar todo el producto y se concentró la fracción disuelta. Tras purificación por columna cromatográfica (eluyente: hexano/acetato de etilo 8:2) se obtuvo el producto **7** (1,86 g, 85%) como un sólido negro cristalino. ^1H RMN (300 MHz, Cloroformo-d) δ (ppm) 9,92 (s, 1H, CHO), 7,75 (d, J = 8,6 Hz, 2H, 2Ar-H), 7,53 (d, J = 8,6 Hz, 2H, 2Ar-H), 0,22 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$).

Síntesis de 5,5-difluoro-1,3,7,9-tetrametil-10-(4-((trimetilsilil)etnil)fenil)-9a,10-dihidro-5H-5l4,6l4 dipirrolo[1,2c:2',1'f][1,3,2]diazaborinina (**8**)



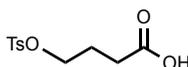
En un matraz de fondo redondo de 500 ml provisto de agitación y atmósfera de argón se disolvieron el producto **7** (0,6 g, 2,96 mmol) y 2,4-dimetilpirrol (0,59 g, 6,22 mmol) en 150 ml de diclorometano anhidro. A continuación, se añadió ácido trifluoroacético (11,39 μ l, 0,15 mmol). Media hora más tarde se adicionó 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ) (0,67 g, 2,96 mmol) disuelta en 50 ml de diclorometano anhidro. Tras esperar 50 minutos, se añadió trietilamina (6,39 ml, 45,8 mmol), y media hora después se añadió boro trifluoruro dietileterato (6,39 ml, 51,8 mmol) y se mantuvo la reacción en agitación durante dos horas y media más. Pasado ese tiempo se concentró y tras purificación por columna cromatográfica (eluyente: hexano/acetato de etilo 8:2) se obtuvo el producto **8** (0,73 g, 59%) como un sólido marrón oscuro. ^1H RMN (300 MHz, Cloroformo-d) δ (ppm) 7,63 (d, $J = 8,2$ Hz 2H, 2Ar-H), 7,27 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, 2Ar-H), 6,00 (s, 2H), 2,57 (s, 6H, 2-CH₃), 1,42 (s, 6H, 2-CH₃), 0,30 (s, 9H, Si(CH₃)₃).

Síntesis de 10-(4-etinilfenil)-5,5-difluoro-1,3,7,9-tetrametil-9a,10-dihidro-5H-5l4,6l4-dipirrol[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinina (9)



En un matraz de fondo redondo de 100 ml se disolvieron el producto **8** (0,70 g, 1,66 mmol) y carbonato potásico (0,34 g, 2,49 mmol) en 50 ml de metanol y se mantuvo la reacción en agitación a temperatura ambiente durante dos horas. Pasado ese tiempo se filtró a vacío para eliminar los sólidos y se concentró en el rotavapor, obteniéndose el producto **9** (0,58 g, 100%) como un sólido marrón oscuro sin necesidad de purificación. ^1H RMN (300 MHz, Metanol- d_4) δ (ppm) 7,65 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, 2Ar-H), 7,34 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, 2Ar-H), 6,07 (s, 2H), 3,34 (s, 1H), 2,48 (s, 6H, 2- CH_3), 1,43 (s, 6H, 2- CH_3).

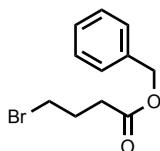
Síntesis del ácido 4-(tosiloxi)butanoico (10)



En un matraz de fondo redondo de 100 ml provisto de atmósfera de argón y a 0°C se disolvió ácido 4-hidroxibutírico (1,00 g, 7,93 mmol) y trietilamina (3,42 ml, 24,53 mmol) en 20 ml de diclorometano anhidro. Por otro lado se disolvió cloruro de tosilo (3,01 g, 15,8 mmol) en 15 ml de diclorometano anhidro y se adicionó gota a gota a la reacción durante media hora. Se mantuvo la reacción en agitación y a temperatura

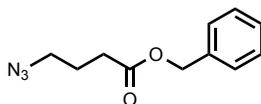
ambiente 12 horas. Pasado ese tiempo se filtró para quedarnos con la fase orgánica que se lavó con agua y posteriormente con salmuera. Tras concentrar se obtuvo el producto **10** (1,56 g, 76%) como un líquido marrón oscuro sin necesidad de purificación. ^1H RMN (300 MHz, Cloroformo-d) δ (ppm) 7,85 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, 2Ar-H), 7,35 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, 2Ar-H), 4,28 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H, OCH_2), 2,47 – 2,35 (m, 5H, Ar- CH_3 , CH_2COOH), 2,26 – 2,13 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$).

Síntesis de bencil 4-bromobutanoato (**11**)



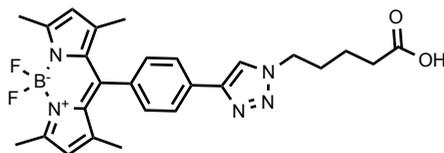
En un matraz de fondo redondo de 100 ml a 0°C se disolvió bencilalcohol (0,17 ml, 1,58 mmol) en 15 ml de diclorometano. Una vez estuvo fría la disolución, se adicionó lentamente DCC (0,69 g, 3,34 mmol). En un vaso de precipitados se disolvieron ácido 4-bromobutírico (0,4 g, 2,38 mmol) y DMAP (cantidad catalítica) en 15 ml de diclorometano y se adicionaron a la reacción. Se mantuvo en agitación a temperatura ambiente 24 horas. Pasado ese tiempo se lavó con salmuera, se extrajo la fase acuosa con éter dietílico y la suma de las fases orgánicas se lavó con agua. Tras secar con MgSO_4 y concentrar en el rotavapor se obtuvo el producto **11** (0,63 g) como un sólido blanco. Se pasó a la siguiente etapa con el crudo de reacción. ^1H RMN (300 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) 7,35 – 7,30 (m, 5H, 5Ar-H), 5,06 (s, 2H, Ar- CH_2O), 3,51 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H- BrCH_2), 2,48 – 2,45 (m, 2H, COOCH_2), 2,03 (m, 2H, BrCH_2CH_2).

Síntesis de bencil 4-azidobutanoato (**12**)



En un matraz de fondo redondo de 50 ml provisto de agitación magnética y atmósfera de argón se disolvieron el producto **11** (0,35 g, 1,35 mmol) y azida sódica (0,19 g, 1,67 mmol) en 20 ml de dimetilformamida anhidra. La reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 12 horas. Pasado ese tiempo se extrajo el producto con acetato de etilo y agua y a continuación se lavó la fase orgánica con salmuera. Tras purificación por columna cromatográfica (eluyente: hexano/acetato de etilo 2:1) se obtuvo el producto **12** (0,12 g, 40%) como un aceite amarillo. ¹H RMN (300 MHz, Cloroformo-d) δ (ppm) 7,39 – 7,34 (m, 5H, 5Ar-H), 5,14 (s, 2H, Ar-CH₂O), 3,35 (t, J = 6,7 Hz, 2H, N₃CH₂), 2,47 (t, J = 7,3 Hz, 2H, CH₂COO), 1,99 – 1,87 (m, 2H, N₃CH₂CH₂).

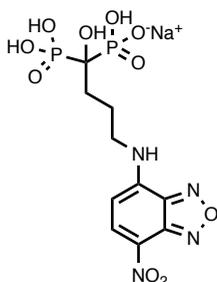
Síntesis del ácido 5-(4-(4-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetrametil-5H-4l4,5l4-dipirrol[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinina-10-il)fenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)pentanoico (**14**)



En un matraz de fondo redondo de 10 ml se disolvieron ácido 5-azidopentanoico (0,03 g, 0,23 mmol) y el producto **9** (0,08 g, 0,23 mmol) en una mezcla THF/H₂O 1,5:0,5 ml. En un vial se disolvieron acetato de cobre (4,63 mg, 0,023 mmol) y ascorbato sódico (9,19 mg, 0,046 mmol) en 1 ml de agua y se adicionó esta disolución a la mezcla anterior. Se

mantuvo en agitación a temperatura ambiente 12 horas. Pasado ese tiempo, se extrajo con diclorometano y se lavó con salmuera. La fase orgánica se secó con MgSO_4 y se concentró obteniéndose el producto **14** (0,11 g, 92%) como un sólido naranja sin mayor purificación. ^1H RMN (300 MHz, Cloroformo-d) δ (ppm) 7,97 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, 2Ar-H), 7,87 (s, 1H, CHCHN_3), 7,35 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, 2Ar-H), 5,98 (s, 2H), 4,46 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H, NCH_2CH_2), 2,54 (s, 6H, 2 CH_3), 2,13 – 1,98 (m, 2H, CH_2COOH), 1,80 - 1,61 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 1,43 (s, 6H, 2 CH_3).

Síntesis de sodio hidrógeno (1-hidroxi-4-((7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-il)amino)-1-fosfonobutil)fosfonato (**15**)



En un matraz de fondo redondo de 100 ml provisto de agitación magnética se disolvieron alendronato sódico (0,25 g, 0,77 mmol) y bicarbonato sódico (0,39 g, 4,61 mmol) en 30 ml de agua. En un vaso de precipitados se disolvió NBD-Cl (0,31 g, 1,53 mmol) en 30 ml de metanol y se adicionaron al matraz. La reacción se mantuvo en agitación a $50\text{ }^\circ\text{C}$ durante 4 horas. Pasado ese tiempo, se rotavaporó para eliminar el metanol, se lavó con cloroformo 3 veces empleando bastante cantidad de disolvente, y a continuación se tamponó el alendronato ya marcado adicionando 228,8 μl de ácido acético y ajustando el pH a 4,8 con ácido clorhídrico hasta llevarlo a un volumen final de 40 ml.

Procedimiento de carga del material y anclaje de la puerta molecular:

Carga de fármaco: en un matraz de fondo redondo de 10 ml provisto de agitación magnética se introdujeron 25 mg de alendronato marcado (**15**) disueltos en 4 ml de tampón acético/acetato a pH 4,8 y 25 mg de MCM-41 aminada. Se mantuvo la reacción en agitación a 70 °C 24 horas, y pasado ese tiempo se centrifugó para eliminar el disolvente y se secó el sólido en la estufa a 70 °C.

Carga de colorante: en un matraz de fondo redondo de 100 ml provisto de agitación magnética se introdujeron 100 mg de sulforodamina B y 100 mg de MCM-41 en 20 ml de acetonitrilo anhidro. Se mantuvo la reacción a reflujo con ayuda de un Dean-stark dos horas (hasta haber recogido aproximadamente 10 ml) y a continuación se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 12 horas. Pasado ese tiempo se centrifugó para eliminar el disolvente y se secó el sólido en la estufa a 70 °C.

- **P1** (sulforodamina B) y **P3** (alendronato marcado): En un vial provisto de agitación magnética se introdujeron 27 mg de MCM-41 cargada, 7 mg de sulforodamina B o de alendronato marcado (dependiendo de si era **P1** o **P3**) y 45 µl de trietilamina que se disolvieron en 2,5 ml de acetonitrilo. En otro vial se suspendieron 27 mg del péptido **1** en 2,5 ml de agua y se adicionó al primer vial. La reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 horas. Pasado ese tiempo se lavó con agua destilada centrifugando (9.500 rpm, 15 min, 10 ml aprox. cada vez) para eliminar los restos de colorante o alendronato (hasta

que el agua era transparente). Se secó el sólido en la estufa a 70 °C.

➤ **P2** (sulforodamina B) y **P4** (alendronato marcado): Se realizó el anclaje de la puerta molecular al material mesoporoso en dos pasos:

- Paso 1: en un matraz de fondo redondo de 25 ml provisto de agitación magnética y atmósfera de argón se disolvieron 7,5 mg de sulforodamina B o de alendronato marcado (según el caso) en 10 ml de acetonitrilo anhidro. A continuación, se añadieron 50 mg de MCM-41 cargada y 63 µl de 3-(azidopropil) trietoxisilano. La reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 horas. Pasado ese tiempo se centrifugó 1 vez (11.000 rpm, 15 minutos) para eliminar el disolvente y se secó el sólido en la estufa a 70 °C.
- Paso 2: en un matraz de fondo redondo de 50 ml provisto de agitación magnética se introdujeron 50 mg del material obtenido en el paso 1, y 7,5 mg de sulforodamina B o alendronato marcado (según el caso) disuelto en 15 ml de dimetilformamida. Se añadieron 50 mg del péptido **2** disueltos en 15 ml de agua, 45 µl de una disolución de acetato de cobre 1×10^{-2} M y 45 µl de una disolución de ascorbato sódico 1×10^{-2} M. Se mantuvo la reacción a 70 °C durante 12 horas. Pasado ese tiempo se lavó centrifugando con agua destilada (9,500 rpm, 15 min, 20 ml aprox. cada vez) para eliminar

los restos de colorante o alendronato (hasta que el agua sale transparente). Se secó el sólido en la estufa a 70 °C.

Preparación de suspensiones de liberación:

Disolución de enzima catepsina K: 25 µg enzima catepsina K + 100 µl tampón sodio acetato 50 mM pH 5,5 (concentración: $9,3 \times 10^3$ nM)

➤ **P1**

Control: 0,6 mg P1 + 3 ml medio DMEM.

Medida: 0,6 mg P1 + 3 ml medio DMEM + 20 µL disolución de enzima catepsina K.

Se midió la intensidad de fluorescencia de las suspensiones pasadas 24h.

➤ **P2**

Control: 1 mg P2 + 3 ml medio DMEM

Medida: 1 mg P2 + 3 ml medio DMEM + 2 µL disolución enzima catepsina K.

Se midió la intensidad de fluorescencia de las suspensiones pasadas 24h.

Condiciones de medida de la fluorescencia:

➤ **P1** → λ_{ex} : 563,5 nm; λ_{em} : 586 nm; slit_{ex}: 5; slit_{em}: 5

➤ **P2** → λ_{ex} : 563,5 nm; ; λ_{em} : 586 nm; slit_{ex}: 2,5; slit_{em}: 5

➤ **Patrón Figura 14** → λ_{ex} : 563,5 nm; ; λ_{em} : 586 nm; slit_{ex}: 5; slit_{em}: 5

➤ **Patrón Figura 18** → λ_{ex} : 563,5 nm; ; λ_{em} : 586 nm, slit_{ex}: 2,5; slit_{em}: 5

Determinación de la carga de los materiales:

Como se ha comentado en el capítulo anterior, se elaboró una recta patrón de sulforodamina B en NaOH 0,5 M para la determinación de la carga de los materiales. Se disolvió 1 mg de cada uno de los materiales en 3 ml de NaOH 0,5 M y tras dejarlo actuar 24 horas se midió la absorbancia de las disoluciones.

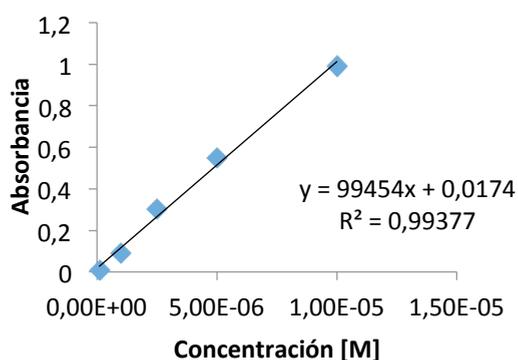


Figura 20. Recta patrón de sulforodamina B en NaOH 0,5 M (Abs 563,5 nm).

Tabla 3. Valores de colorante presente en el interior de las nanopartículas (**P1**, y **P2**) por cada 100 mg de MCM-41.

	$A_{563,5}$ (1 mg material en 3mL)	Carga (%)
P1	0,3876	0,64
P2	0,3864	0,59

En el caso de los sólidos **P3** y **P4**, se determinó la carga de alendronato marcado mediante análisis de fósforo por ICP-masas, obteniéndose una carga del 8,20 % (8,20 mg de alendronato marcado/100 mg de material)

en ambos casos puesto que se realizó una única carga y a partir de ese material se obtuvieron los sólidos **P3** y **P4**.

4.7 Conclusiones

A partir de los datos expuestos en este capítulo se pueden extraer varias conclusiones: en primer lugar, que los sólidos funcionalizados tanto con la secuencia peptídica **1** como con la **2** no son muy efectivos en el cierre del material inorgánico ya que dan lugar a liberaciones pasivas superiores al 60%. En segundo lugar, se ha comprobado que la liberación del colorante aumenta en torno a un 35% aproximadamente cuando la enzima se encuentra presente en el medio. Por tanto se puede afirmar que las secuencias peptídicas se abren en presencia de la enzima catepsina K.

Capítulo 5:
Ensayos celulares

Una vez realizados los ensayos de liberación de sulforodamina B mediante la medida de la intensidad de fluorescencia para comprobar el funcionamiento de las dos puertas moleculares peptídicas, se pasó a la siguiente etapa, que era el estudio en cultivos celulares.

5.1 Diferenciación de osteoclastos

Como se ha indicado en la introducción, los osteoclastos son las células donde se produce la resorción ósea y por tanto el objetivo del alendronato. En estas células está sobreexpresada la catepsina K y por ello, en un primer momento, el objetivo de nuestro trabajo era la obtención de osteoclastos para comprobar en ellos la eficacia de los materiales preparados. Este tipo de cultivo presenta una dificultad añadida, ya que, como se ha comentado en la introducción, no existen líneas celulares inmortalizadas para osteoclastos maduros, puesto que son relativamente escasos y frágiles, y por su carácter de células multinucleadas, los osteoclastos no se reproducen⁶². Estos hechos hacen que experimentalmente sea difícil tener un cultivo primario o una línea celular de estas células.

Los osteoclastos son células fagocíticas que provienen de células madre hematopoyéticas diferenciadas a lo largo del linaje monocito/macrófago, por lo que había dos formas de obtener los osteoclastos multinucleados, funcionales y maduros, o bien se obtenían directamente del hueso como fuente primaria, o bien se generaban *in vitro* a partir de progenitores hematopoyéticos obtenidos de una fuente de células hematopoyéticas o macrófagos, tales como médula ósea, bazo, células mononucleares de sangre periférica o sangre del cordón umbilical, lo que era una fuente secundaria⁶⁵.

En nuestro caso se eligió la fuente secundaria como punto de partida para la obtención de osteoclastos. Este modelo de generación de osteoclastos *in vitro* a partir de células mononucleares de sangre periférica se basaba en el uso de los factores M-CSF y RANKL recombinante para estimular la diferenciación, sin embargo, había dificultades asociadas con el uso de estas células primarias, incluyendo limitada viabilidad y variación en los patrones de respuesta entre diferentes preparaciones.

En primer lugar, se compró un kit de diferenciación de osteoclastos (Lonza Poietics™ Osteoclast Precursor Cell System) que incluía las células precursoras de osteoclastos criopreservadas y el medio de cultivo enriquecido con los suplementos necesarios para la diferenciación (RANKL, M-CSF y FBS), así como unas instrucciones muy detalladas de los pasos a seguir para la obtención de los osteoclastos, no obstante los resultados del cultivo no fueron positivos.

Se diseñó un estudio muy detallado que incluía todos los ensayos que queríamos realizar en osteoclastos, puesto que al tratarse de un cultivo primario una vez diferenciadas las células sólo disponíamos de una semana para realizar todas las pruebas. Este estudio incluía un control negativo (es decir células sin diferenciar), un control positivo (células diferenciadas a las que no se les adicionó nada más), ensayos de liberación de colorante a partir de nuestras nanopartículas a distintas concentraciones así como un ensayo con inhibidor de la enzima catepsina K a la concentración más alta de nanopartículas (cargadas de colorante), ensayos de liberación de fármaco a partir de nuestras nanopartículas a distintas concentraciones así como un ensayo con

inhibidor de la enzima catepsina K a la concentración más alta de nanopartículas (cargadas de fármaco), ensayos con alendronato sin encapsular, una prueba con un sustrato fluorescente de la catepsina K para determinar la presencia de la misma en las células y con inhibidor de la enzima, y por supuesto 3 réplicas de cada prueba para que los datos fueran fiables. Una vez listos todos los preparativos se inició el cultivo siguiendo paso por paso las instrucciones incluidas en el kit de diferenciación de osteoclastos, según el cual a los 7 días de haber iniciado el cultivo se habrían obtenido osteoclastos maduros y funcionales, con lo que pasado ese tiempo comenzamos con los ensayos de liberación. Se hizo uso de diferentes marcadores fluorescentes, puesto que tanto el ensayo de viabilidad celular en las células con alendronato como la determinación de la cantidad de colorante liberada en las células se iba a realizar mediante el uso de un microscopio de fluorescencia apto para la medida de cultivos celulares vivos o fijados (IN Cell Analyzer 2000), y el uso de estos marcadores nos permitiría por un lado contabilizar las células vivas y muertas, y por otro delimitar tanto la membrana celular como determinados orgánulos de cada célula (como por ejemplo los lisosomas). A lo largo de la semana en la que se realizaron los ensayos a diferentes tiempos se nos presentaron una serie de problemas, como la contaminación de los pocillos que pudimos observar en las primeras medidas en el microscopio de fluorescencia, puesto que se observaba suciedad en el fondo que falseaba los resultados debido a que el programa del microscopio en ocasiones reconocía esas “formas” como células, haciendo un recuento de células vivas y muertas erróneo. Frente a esta situación decidimos continuar midiendo el ensayo de liberación del colorante en el microscopio de

fluorescencia pero realizar los ensayos de viabilidad celular mediante el uso del test MTT, para evitar de este modo que se falsearan los resultados.

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (que presenta color amarillo) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa para dar un compuesto de color azul (Formazan). Esta prueba permite determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas puesto que requiere NADH que proviene de las mismas células y requiere un correcto funcionamiento celular. Este método ha sido muy utilizado para medir tanto la supervivencia como la proliferación celular⁹⁹, puesto que la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de Formazan producido.

Una vez finalizadas todas las pruebas y tras analizar los datos, descubrimos por un lado que la contaminación de las células era fruto de uno de los marcadores fluorescentes que no había sido correctamente esterilizado y que los ensayos no habían dado ningún resultado concluyente, ni positivo ni negativo, lo que nos llevó a pensar que el problema principal era que en ningún momento se habían obtenido osteoclastos funcionales y maduros (a pesar de haber seguido detalladamente el protocolo).

En vista de estos resultados, se decidió utilizar como punto de partida para la osteoclastogénesis la línea celular murina RAW 264.7 monocito/macrófago puesto que estaba bien caracterizada y había empezado a ser un modelo útil y cada vez más empleado para estudiar la

⁹⁹ Borenfreund, E., Babich, H., Martin-Alguacil, N. *Toxicol. In vitro.*, **1988**, *2*, 1-6.

formación y función de los osteoclastos^{63,66,68}. Además, a diferencia de las células de bazo murinas y las células madre de médula ósea, estas células producían espontáneamente M-CSF con lo que únicamente requerían ser tratadas con RANKL exógeno para estimular la formación, aunque escasa, de osteoclastos como policariones con capacidad para resorber hueso o sustratos de dentina⁶⁹. Otra característica ventajosa de estas células era que podían crecer indefinidamente como precursores de osteoclastos y diferenciarse únicamente al ser cultivadas con el ligando RANKL.

Dada la dificultad para que la diferenciación se produjera, había que tener en cuenta varios factores a la hora de llevar a cabo el cultivo:

- La confluencia de células por pocillo debía ser la adecuada (en caso de haber un exceso de células, estas no se diferenciarían).
- Las células no debían tener demasiados pases, pues este también era un factor negativo para su diferenciación.
- La calidad del RANKL.
- La concentración de RANKL en el pocillo.

Se realizaron varios intentos de obtención de osteoclastos a partir del cultivo de células murinas RAW 264.7 en las condiciones que se describen en la parte experimental.

En un primer intento, las células una vez sembradas se trataron con disolución de RANKL (R&D Systems 462-TR-010) y se incubaron durante varios días cambiando el medio frecuentemente y añadiendo de nuevo el factor de crecimiento RANKL⁶⁶. Dado que el criterio generalmente utilizado para identificar la presencia de múltiples núcleos se basa en el empleo de la tinción para identificar la presencia de la enzima TRAP

(fosfatasa ácida tartrato resistente) se utilizó el kit de detección de dicha enzima (Sigma 387A-1KT Acid phosphatase leukocyte (TRAP) kit)⁶⁶. La identificación de la enzima es positiva cuando la preparación muestra una coloración roja. Como el kit comercial utilizado incluía un componente (hematoxilina) que tiene un intenso color azul, se pensó que dicho compuesto podía enmascarar una tinción positiva (viéndose azul en lugar de roja) dando lugar a falsos negativos. Hecho este que se comprobó cuando a una tinción positiva (roja) se le agregó hematoxilina que hizo que pasara a color azul, poniendo claramente de manifiesto la posibilidad de que se produjeran falsos negativos.

Haciendo uso de este método de trabajo se pudo observar la diferenciación pero en un número pequeño de células que no era suficiente para llevar a cabo los estudios con los materiales preparados.

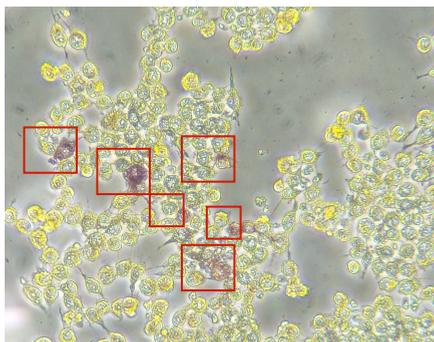


Figura 1. Imagen del microscopio de las células diferenciadas con RANKL con tinción TRAP positiva.

Como el número de células multinucleadas obtenido era muy escaso, se modificó el protocolo de trabajo introduciendo un nuevo factor, un anticuerpo monoclonal (R&D Systems His Tag Antibody MAB050-100)⁶⁶. Estos experimentos permitieron observar que el empleo de anticuerpo

monoclonal no mejoraba los resultados obtenidos empleando únicamente RANKL ya que en las preparaciones de ambos tipos (RANKL solo y RANKL + anticuerpo) se observó la diferenciación de algunas células pero en número insuficiente para nuestras necesidades.

Con el fin de estudiar el efecto del tiempo sobre la diferenciación celular se estudiaron los cultivos, tanto empleando únicamente RANKL solo como usando RANKL más el anticuerpo monoclonal y se pudo concluir que 12 días después de la siembra la diferenciación ya se había producido pero la cantidad de células diferenciadas no aumentaba.

De los resultados obtenidos en estos ensayos se pudo concluir que el cultivo de osteoclastos a partir de células RAW 264.7 era complicado y no permitía obtener un número de osteoclastos suficiente para poder realizar nuestros ensayos. Una explicación a este hecho se encuentra en la bibliografía⁶⁶ ya que se ha demostrado que tras clonar células RAW 264.7 y tratarlas con RANKL recombinante, todos los clones expresaban los genes marcadores osteoclásticos TRAP y catepsina K, pero sólo determinados clones eran capaces de formar células grandes, multinucleadas y TRAP positivas con expresión de β_3 integrina y receptor de calcitonina, así como con capacidad para resorber matriz mineralizada. Así pues, muchas de las células RAW 264.7 se bloquean en las etapas iniciales de la diferenciación a osteoclastos, lo cual explica la capacidad limitada de esta línea celular para generar los mismos.

5.2 Viabilidad celular en presencia de MCM-41 y de alendronato

Aunque el número de osteoclastos obtenidos era muy bajo se pensó en realizar pruebas de viabilidad celular con la MCM-41 y el alendronato a distintas concentraciones para establecer las concentraciones óptimas para el ensayo de liberación del fármaco de las nanopartículas.

El test que se realizó para comprobar la viabilidad celular fue el MTT. Para llevar a cabo las pruebas de viabilidad se diferenciaron osteoclastos de la forma indicada anteriormente y a una serie de pocillos se les añadió una suspensión de MCM-41 y a otra serie soluciones de alendronato comercial de tres concentraciones diferentes (10, 20 y 30 $\mu\text{g/ml}$). En el caso de las muestras tratadas con MCM-41 se comprobó que incluso 48 horas después de la adición no se apreciaba disminución significativa de la viabilidad celular (0% de toxicidad tomando como referencia los pocillos control). Sin embargo en el caso del alendronato comercial aunque a 24 horas no había cambios apreciables de viabilidad a 48 horas si se observó una disminución apreciable de viabilidad.

Los resultados de los estudios llevados a cabo 5 días después de haber añadido las disoluciones no fueron concluyentes puesto que las células llevaban demasiados días en cultivo sin cambio del medio.

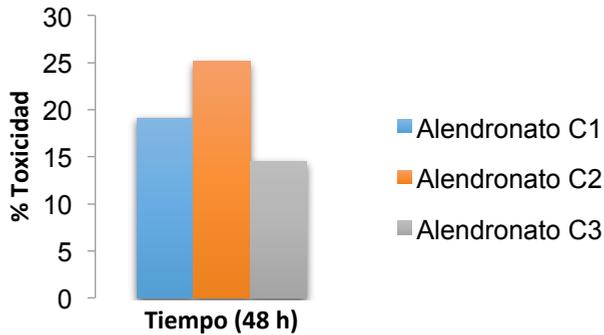


Figura 2. Diagrama de barras que muestra el porcentaje de toxicidad del alendronato a diferentes concentraciones (C1= 10 $\mu\text{g/ml}$, C2= 20 $\mu\text{g/ml}$ y C3= 30 $\mu\text{g/ml}$) a las 48 horas de ser añadido a las células (las diferencias observadas entre las distintas concentraciones puede encontrarse dentro del error del método).

De estos resultados se puede concluir que el material silíceo MCM-41 no origina toxicidad celular en la concentración empleada por lo que podía usarse en los experimentos posteriores. Por su parte, la lenta actuación del alendronato comercial es una prueba más de las dificultades que este compuesto presenta para atravesar las paredes celulares.

5.3 Estudios de expresión de catepsina K en células

RAW 264.7 murinas y SCC-13

En vista de la dificultad que presentaba la diferenciación de células RAW 264.7 murinas a osteoclastos, se pensó que tal vez estas células por ser precursoras de los osteoclastos también expresaran la enzima catepsina K y nos pudieran servir para la realización de los ensayos de liberación.

Para comprobar la presencia o ausencia de enzima catepsina K en las células RAW 264.7 murinas se hizo uso de un sustrato fluorescente

Ante estos resultados se decidió realizar la prueba sin células, directamente en el fluorímetro con tampón acetato sódico a pH 5,5 (que era el medio óptimo para la enzima), enzima y sustrato fluorescente para poder determinar de este modo la concentración óptima de sustrato fluorescente (figura 4).

Como se puede observar en la figura 4, en ausencia de la enzima el sustrato no presentaba fluorescencia, y al adicionarla, el sustrato comenzó a romperse dando lugar a un producto fluorescente que alcanzó la máxima intensidad de fluorescencia una hora después de la adición de la enzima. Esto significaba que ya teníamos la concentración óptima de sustrato para realizar el ensayo, así como el tiempo necesario de actuación de la enzima.

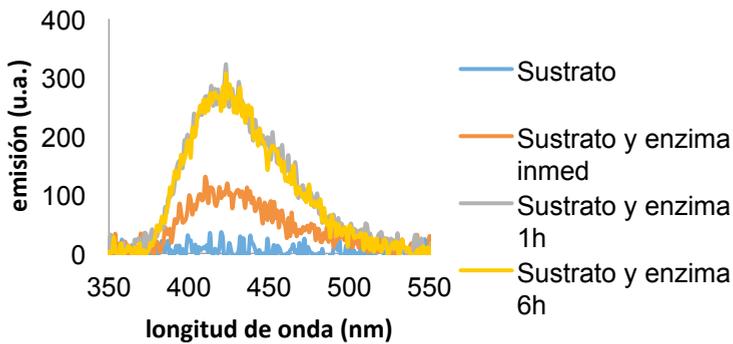


Figura 4. Espectro de fluorescencia del sustrato fluorescente de la catepsina K.

Con el fin de confirmar esta suposición se llevó a cabo un cultivo celular que fue utilizado para hacer un lisado celular a partir del cual obtener la parte proteica de las células RAW 264.7 con la que realizar un ensayo con el sustrato fluorescente de la catepsina K y el inhibidor de la enzima, y

comprobar de esta forma la presencia o ausencia de enzima catepsina K en dichas células.

El procedimiento para lisar las células consistió, en primer lugar, en centrifugarlas para eliminar el medio de cultivo y a continuación, se añadió el tampón de lisis A que se dejó actuar durante 10 minutos en frío. Una vez lisadas, se centrifugaron para eliminar los restos de orgánulos celulares y dejar únicamente la parte proteica de las células (el sobrenadante). Para determinar la concentración de proteínas en el lisado celular, se utilizó el método de Bradford, que se basa en el cambio de color del compuesto azul brillante G-250 en respuesta a diferentes concentraciones proteicas. Este compuesto interacciona con aminoácidos básicos y aromáticos dando lugar a un cambio en el máximo de absorción del colorante que pasa de 465 a 595 nm puesto que se produce un cambio del color rojo al azul cuando el colorante se une a las proteínas. En base a esto, se elaboró una recta patrón de BSA a partir de la cual se determinó que el contenido de masa proteica era de 276 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$.

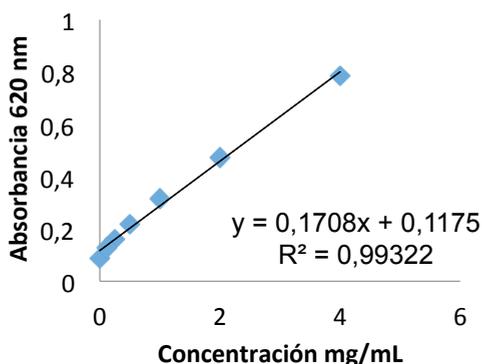


Figura 5. Recta patrón de tampón de lisis Bradford (Abs 620 nm).

El ensayo contaba con tres muestras:

- **Control +:** lisado celular + tampón sodio acetato pH 5,5 + sustrato fluorescente
- **Inhibidor:** lisado celular + tampón sodio acetato pH 5,5 + sustrato fluorescente + inhibidor
- **Control -:** tampón sodio acetato pH 5,5 + sustrato fluorescente

Teniendo en cuenta los componentes, si en las células hubiera catepsina K la muestra **Control +** debería ser fluorescente mientras que las muestras **Inhibidor** y **Control -** no deberían serlo. Realizado el experimento se comprobó que ninguna de las muestras presentaba fluorescencia. Con estos datos se descartó definitivamente que las células RAW 264.7 murinas expresaran la enzima catepsina K.

En la bibliografía está descrito⁸ que las células escamosas de carcinoma (SCC) expresan la enzima catepsina K⁵ y, dado que disponíamos de la línea celular SCC-13, decidimos estudiar la presencia de la enzima en estas células. Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo el mismo protocolo que el usado con las RAW 264.7. Los resultados obtenidos demostraron que tampoco estas células contenían cantidades apreciables de catepsina K.

5.4 Método de detección indirecta

Ante la imposibilidad de obtener células que expresaran suficiente enzima catepsina K para poder realizar los ensayos de liberación a partir de los materiales preparados, se diseñó un procedimiento alternativo. El fundamento del método consistía en cultivar células RAW 264.7 e incubarlas durante un tiempo adecuado con una cantidad conocida del

material a estudiar. Una vez producida la internalización del material, las células se lavarían con tampón fosfato salino hasta retirar todas las nanopartículas que no se hubieran internalizado y se lisarían. En el lisado se encontrarían las nanopartículas internalizadas por las células y por tanto la adición a ese lisado de catepsina K nos permitiría evaluar la cantidad de carga (colorante o alendronato marcado) que habría entrado en la células y se habría liberado en presencia de la enzima. Es decir, tendríamos una medida indirecta de la eficacia de dispensación del fármaco en el interior celular.

5.4.1 Estudio de internalización de las nanopartículas y liberación del colorante

Estos estudios se llevaron a cabo empleando los materiales **P1** y **P2** que se encontraban cargados con sulforodamina B (0.59% y 0.98% para **P1** y **P2** respectivamente) y cerrados cada uno de ellos con el péptido correspondiente. Las células se incubaron con las suspensiones de los materiales (que previamente habían sido sonicadas para evitar la agregación de las nanopartículas). Tras la incubación se procedió al lisado de las células y las muestras así obtenidas se dividieron en dos fracciones: una de ellas se empleó como muestra control y a la otra se le añadió catepsina K para comprobar la utilidad del enzima como estímulo para la apertura de las diferentes puertas.

Los resultados obtenidos con el material **P1** demostraron que la fluorescencia de las muestras era prácticamente igual en presencia y en ausencia de la enzima. Estos resultados pueden deberse a dos efectos distintos: por una parte la puerta no cierra adecuadamente en las condiciones de estudio, lo que ya se había observado previamente pero

también puede influir que la enzima no rompa de forma eficaz el péptido en las condiciones empleadas.

En el caso del material **P2**, los resultados fueron más interesantes ya que, en presencia del enzima, se observaba un incremento de la fluorescencia (figura 6) lo que confirmaba que **P2** era internalizado por las células y que, en presencia de catepsina K, se abría la puerta molecular liberándose el colorante.

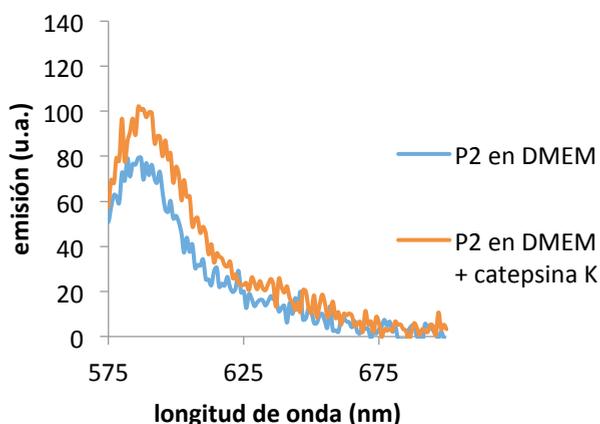


Figura 6. Espectros de fluorescencia de las muestras lisadas en ausencia y en presencia de enzima catepsina K para el material **P2** (prueba a c_2 : 30 $\mu\text{g/ml}$).

Para poder cuantificar la cantidad de sulforodamina B que se había liberado en el interior de las células se realizó una recta patrón en las condiciones exactas de este estudio (figura 7).

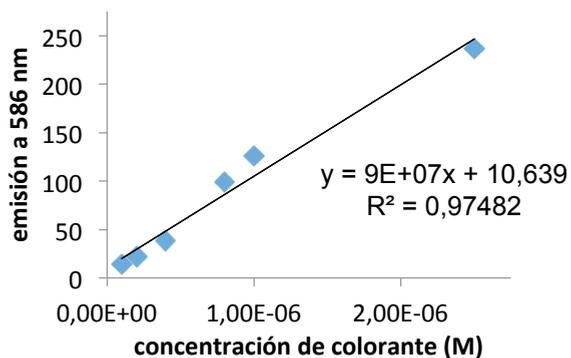


Figura 7. Recta de calibrado de sulforodamina B en medio DMEM/tampón de lisis. (λ_{ex} : 565 nm; λ_{em} : 586 nm; slit_{ex}:5; slit_{em}: 2,5)

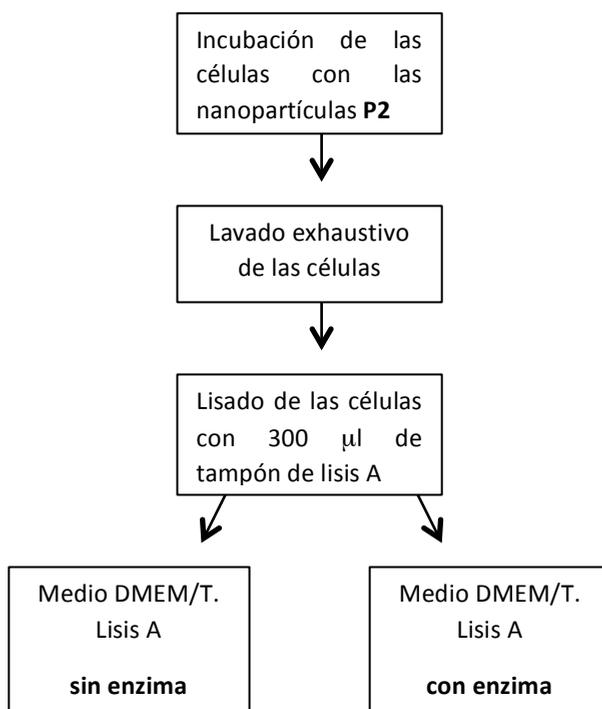


Figura 8. Esquema explicativo del proceso de liberación *in vitro* (en células) para el material **P2**.

Los experimentos se llevaron a cabo como se esquematiza en la figura 8. En primer lugar, se cultivaron las células con una cantidad conocida de **P2** durante 24 h, transcurrido este tiempo, se procedió al lavado exhaustivo de las células para retirar todas las nanopartículas que no hubieran sido internalizadas y proceder al lisado de las células empleando 0,3 mL de tampón de lisis A. A continuación se completó con medio DMEM hasta un volumen final de 6 ml y el lisado se dividió en dos fracciones iguales, una de las cuales fue estudiada directamente mientras que la otra se trató con catepsina K (5 μ l disolución enzima catepsina k) durante 24 horas y posteriormente fue estudiada.

Al medir la fluorescencia de la primera fracción, aquella que no había sido tratada con el enzima, se determinó que la masa de colorante liberado era de 1,27 μ g. Asumiendo que la liberación que se producía en estas condiciones era la misma que la observada en el laboratorio (62 %) (Esta asunción se basa en que en los dos casos el medio de medida era el mismo,) y teniendo en cuenta la masa inicial de colorante que se había puesto a incubar con las células se pudo determinar que el grado de internalización de las partículas en las condiciones empleadas era de 10,9 %.

La emisión de la segunda fracción, la tratada con el enzima, fue también medida y se comprobó que, en este caso, la masa de colorante liberada era de 1,70 μ g. Ambas fracciones, la tratada con enzima y la sin tratar, procedían de la misma disolución inicial y por ello el grado de internalización en esta muestra tenía que ser el mismo que se había determinado anteriormente. Con estos dos datos y el de la masa inicial

de colorante que se había añadido se determinó un porcentaje de liberación del colorante del orden del 82 %.

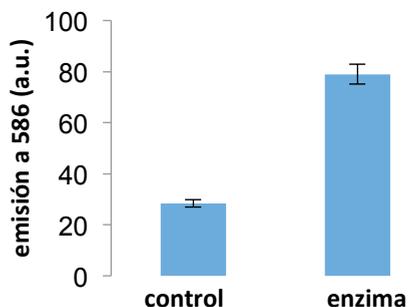


Figura 9. Diagrama de barras correspondiente al incremento de emisión de lisado de las células tratadas con **P2** a 586 nm después de lisadas en ausencia y en presencia de catepsina K (prueba c_1 : 20 $\mu\text{g/ml}$).

5.4.2 Estudio de liberación de alendronato marcado en células

Teniendo en cuenta los resultados indicados en el apartado anterior los experimentos de liberación en células del alendronato marcado se centraron en el empleo de **P4**. Los experimentos se llevaron a cabo en las mismas condiciones que se había empleado anteriormente lo que hacía lícito asumir que la internalización de las nanopartículas sería del mismo orden que la calculada para **P2** (10,9 %). En efecto, ambos materiales tienen el mismo tamaño de partícula y están recubiertos por la misma puerta molecular que son los dos parámetros que afectan a la internalización ya que se ha trabajado en ambos casos con el mismo tipo de células. En los experimentos realizados con **P4** se siguió el mismo protocolo descrito en la figura 7. En este caso la medida del material liberado se evaluó mediante ultravioleta (absorción a 350 nm) y haciendo uso de la correspondiente recta de calibrado elaborada en las mismas condiciones de medida (figura 10)

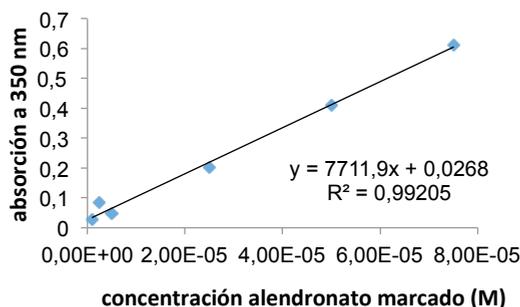


Figura 10. Recta de calibrado del alendronato marcado en las condiciones de medida.

La medida del ultravioleta de la fracción lisada que no había sido tratada con el enzima indicaba una liberación de alendronato marcado prácticamente inapreciable. Sin embargo, en el caso de la fracción tratada con el enzima, las medidas de ultravioleta permitieron determinar una masa de alendronato marcado de 3,76 μg . Teniendo en cuenta este dato junto con el de internalización del material y la cantidad de material inicial empleado, se puede estimar que la liberación del alendronato marcado era del 41%. Este valor de liberación era claramente inferior al observado para **P2** (82 %). Dado que el péptido empleado en ambos materiales era el mismo y el medio de medida también, este resultado solo podía estar relacionado con la interacción del alendronato marcado con el propio material silíceo que lo retiene con más fuerza que a la sulforodamina B. Este resultado no es extraño debido a la alta polaridad del alendronato que puede interaccionar con los grupos amino del material aminado empleado en la preparación de **P4**.

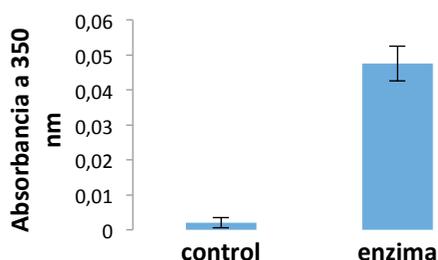


Figura 11. Diagrama de barras correspondiente al incremento de absorción a 350 nm en ausencia y en presencia de catepsina k para **P4**.

Finalmente se procedió a evaluar el dato que permitiría comparar la biodisponibilidad del alendronato comercial, que según la bibliografía es del 0,64%. con la de **P4**. Así, el material suministrado a las células contenía una cantidad de alendronato marcado de 85 μg y el material internalizado por las células y liberado por tratamiento con catepsina K era de 3,76 μg . Esto quiere decir que en el caso de **P4** la biodisponibilidad es del 4,4%, es decir, cerca de 7 veces mayor que la del alendronato comercial. Es cierto que en este caso el fármaco está derivatizado, por desgracia, estudios comparativos con células incubadas directamente con el compuesto marcado no pudieron llevarse a cabo ya que la toxicidad del compuesto era muy alta en las condiciones de trabajo.

5.5 Procedimiento experimental

Proceso para descongelar células:

Las células se descongelan rápido en baño de agua a 37°C. Se diluyen en 10 ml de medio celular porque se congelan con un 10 % de DMSO para evitar que se formen cristales, pero al descongelarlas esa concentración puede ser tóxica (volumen total de aproximadamente 12 ml). Se

centrifuga 400 g, 6 min, 21°C (se hace todo el proceso a temperatura ambiente). Se retira el medio dejando el pellet y se resuspende en 4 ml de medio nuevo. Se realiza el conteo celular. Para ello se cogen 10 µl de suspensión de células y 10 µl de azul de tripán, se mezclan y de ahí se cogen 10 µl con los que se realiza el recuento. Se añaden 2 ml de medio de manera hay un volumen final de 6 ml que se reparte en dos frascos de 25 cm² y se completa en ambos casos hasta un volumen final de 8 ml. Se dejan las células en la incubadora a 37°C con un 5 % de CO₂.

Proceso para realizar un pase:

Se retira el medio de cultivo del frasco. Se añaden 10 ml de medio de cultivo nuevo. Se rascan las células suavemente con un rascador para despegarlas del frasco. Se realiza el conteo celular. En función del número de células que hayan salido y del tipo de frasco que se necesite para el estudio se siembran en frascos de 25 cm² con un volumen final de 8 ml o en frascos de 75 ml con un volumen final de 15 ml.

Preparación disoluciones de medida para ensayos celulares:

RANKL: Patrón: 10 µg de RANKL se reconstituyeron en 200 µl de PBS con un 0,1 % de BSA. Disolución intermedia: 50 µl patrón que se llevaron a un volumen final de 8,3 ml. De esta disolución se pipeteaban 10 µl por pocillo para los ensayos de diferenciación, obteniéndose una concentración de 15 ng/ml de RANKL en cada pocillo.

Anticuerpo monoclonal: Patrón: 100 µg de anticuerpo se reconstituyeron en 200 µl de PBS. Disolución intermedia: 0,2 ml de patrón se llevaron a un volumen final de 10 ml. De esta disolución se pipeteaban 100 µl por pocillo para los ensayos de diferenciación, obteniéndose una concentración de 0,5 µg/ml de anticuerpo en cada pocillo.

Diferenciación de osteoclastos a partir de la línea celular murina

RAW 264.7

Prueba 1: Diferenciación de osteoclastos usando RANKL

Se inició descongelando células RAW 264.7 P1 (pase 1), haciendo el recuento de las mismas, sembrándolas en frascos de 25 cm² con medio DMEM, y dejándolas en la incubadora a 37°C con un 5% de CO₂. 3 días después las células habían crecido lo suficiente, por lo que era el momento de hacerles un pase. Para sembrarlas se eligieron placas de 96 pocillos puesto que eran las que se recomendaban en el kit de Lonza que se había comprado. Se sembraron 2 placas con diferente número de células por pocillo (**placa 1** con 3520 células/pocillo y **placa 2** con 5000 células pocillo), ambas placas tenían 5 pocillos de control y otros 5 a los que se les añadió una disolución de RANKL (R&D Systems 462-TR-010) y se dejaron en la incubadora.

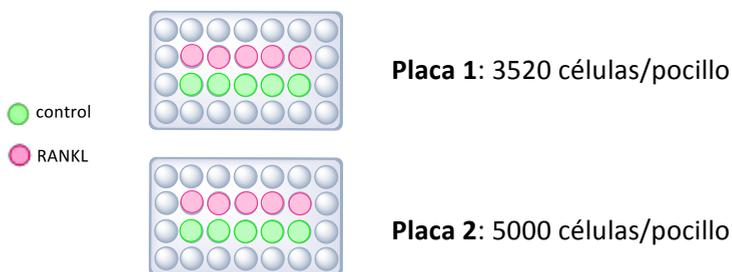


Figura 12. Esquema representativo de las placas de cultivo y la distribución de los pocillos.

3 días después se retiró parte del medio de cultivo de cada pocillo y se sustituyó por medio nuevo. También se añadió a los pocillos que se estaban diferenciando la disolución de RANKL. 2 días después volvió a repetirse el mismo procedimiento, y las células no presentaban un aspecto diferente. 2 días después, los pocillos presentaban un color

amarillento (en vez de rosado que era lo habitual debido al color del medio), lo que significaba que habían crecido demasiado y no les quedaban nutrientes, por lo que se les cambió el medio completo.

A la **placa 1** se le añadió disolución de RANKL y se dejó en la incubadora. A la **placa 2** se le hizo la tinción para la enzima TRAP utilizando el kit de detección de dicha enzima (Sigma 387A-1KT Acid phosphatase leukocyte (TRAP) kit). Para ello, se retira el medio de cultivo y se lava cada pocillo 2 veces con 100 μ l de PBS. Se añaden a cada pocillo 200 μ l de disolución fijadora (dejando que alcance previamente la temperatura ambiente) y tras 30 segundos se retira. Se lava 2 veces cada pocillo con 200 μ l de agua desionizada. Se añade la disolución de tinción preparada en el momento, 200 μ l por pocillo y se deja actuar protegida de la luz en la estufa a 37°C durante 1 hora. La disolución de tinción se preparó con 45 ml de agua desionizada a 37°C, 1 ml de solución Fast Garnet GBC, 0,5 ml de solución de naftol, 2 ml de disolución de acetato y 1 ml de solución de tartrato. Transcurrida la hora, se retiró la disolución y se lavó cada pocillo con agua destilada (200 μ l) dos veces. Se deja secar al aire. El resultado fue negativo (figura 13).

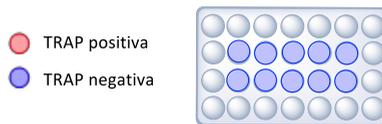


Figura 13. Esquema representativo de la tinción TRAP en la placa de cultivo 2.

Tres días después el aspecto de las células de la **placa 1**, que estaba en la incubadora, no había cambiado. Se les volvió a hacer un cambio de medio, se añadió la disolución de RANKL a los pocillos correspondientes, y se volvió a dejar la placa en la incubadora. 2 días después se realizó la prueba TRAP, pero sin añadir el componente hematoxilina. Bajo estas

condiciones el resultado fue positivo, aunque se obtuvieron muy pocos osteoclastos diferenciados y sólo en algunos pocillos, no en todos los que se diferenciaron.

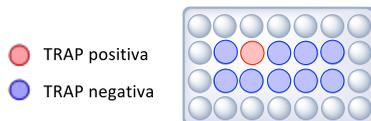


Figura 14. Esquema representativo de la tinción TRAP de la **placa 1**.

Prueba 2. Estudio de la influencia de la adición de un anticuerpo monoclonal en la diferenciación de osteoclastos

Se descongelaron células que en este caso eran de P2 (pase 2). A los 3 días de descongeladas, las células habían crecido lo suficiente y se sembraron en 2 placas de 96 pocillos (**placa 1** y **placa 2**). En cada placa, una serie de 5 pocillos se empleó como control, en la segunda serie de 5 pocillos se añadió la disolución de RANKL, y en la tercera serie además del RANKL se añadió un anticuerpo monoclonal (R&D Systems His Tag Antibody MAB050-100).



Figura 15. Esquema representativo de la distribución de pocillos en la placa de cultivo.

Tras 3 días se cambió parte del medio, se añadió RANKL y anticuerpo a los pocillos correspondientes y las dos placas se dejaron en la incubadora. Transcurridos 2 días, se repitió el mismo procedimiento, y al observar las células al microscopio daba la impresión de que hubieran crecido más en número las células control que las del resto de pocillos. 2 días después se cambió todo el medio y se añadió RANKL y anticuerpo a

los pocillos correspondientes, y se dejaron de nuevo las placas en la incubadora. 3 días más tarde se realizó la prueba TRAP en la **placa 1**, y se pudo observar que no había diferencia alguna entre los pocillos control, los RANKL y los RANKL + anticuerpo, las células no se habían diferenciado. En la **placa 2** se cambió el medio completo, se añadió RANKL y anticuerpo a los pocillos correspondientes y se dejó en la incubadora. 2 días después se cambió todo el medio y se añadió RANKL y anticuerpo a los pocillos correspondientes y se dejó la placa en la incubadora. Transcurridos 2 días se realizó la prueba TRAP y se observó un resultado positivo en algunos pocillos de RANKL y de RANKL + anticuerpo, en número escaso. También se apreció que había células deformadas, pero estas estaban presentes en los 3 tipos de pocillos con lo que se pensó que eran células apoptóticas.

Prueba 3. Influencia del tiempo en la diferenciación de osteoclastos

Siguiendo el mismo protocolo descrito en la prueba 2, se prepararon 3 placas idénticas para determinar el tiempo de cultivo óptimo



Figura 16. Esquema representativo de la distribución de pocillos en las placas de la prueba 3, donde había pocillos de células RAW 264.7 control y pocillos a los que se les añadió RANKL y anticuerpo para la diferenciación a osteoclastos.

A los 9 días desde la siembra de las células en placas se hizo la prueba TRAP a la primera placa. El resultado fue negativo, y dos días después, es decir, 12 días después de la siembra de las células, se hizo la prueba TRAP a la segunda placa que ya dio positivo, pudiéndose observar la presencia de algunos osteoclastos al mirar al microscopio.

Estudio de la toxicidad del alendronato comercial y la MCM-41 sobre los osteoclastos generados

Se prepararon tres placas (**placa 1**, **placa 2** y **placa 3**) siguiendo el protocolo anterior con el fin de medir la toxicidad a diferentes tiempos y diferentes concentraciones. Una vez diferenciados los osteoclastos se añadió a los pocillos correspondientes las distintas disoluciones: alendronato a diferentes concentraciones (C1= 10 $\mu\text{g/ml}$ C2= 20 $\mu\text{g/ml}$ y C3= 30 $\mu\text{g/ml}$) y MCM-41 (100 $\mu\text{g/ml}$). El test que se realizó para comprobar la viabilidad celular fue el MTT. Para ello, al sobrenadante del cultivo celular, se le añaden 100 μl de una solución de MTT 1:10 en medio de cultivo preparada en el momento a partir de una solución stock de 5 mg/ml (en PBS estéril conservada en nevera en frasco topacio). Se incubaba a 37°C 1 hora y posteriormente se elimina el sobrenadante. Sobre las células se adicionan 50 μl de DMSO y se agita suavemente para redissolver el precipitado. Finalmente se mide la absorbancia a 490 nm.



Figura 17. Esquema representativo de la distribución de pocillos en las placas de la prueba de la toxicidad del alendronato y de la MCM-41 en osteoclastos

24 horas después de haber añadido las distintas disoluciones se hizo el ensayo MTT a la **placa 1**, y se observó que la viabilidad celular no variaba entre la presencia o la ausencia de alendronato a ninguna de las concentraciones del ensayo, ni tampoco parecía afectar la presencia de la MCM-41.

48 horas después de haber añadido las disoluciones se hizo el ensayo MTT a la **placa 2**. En este caso los pocillos con MCM-41 continuaron teniendo la misma viabilidad celular que los pocillos control, pero sí se vio una disminución significativa de la viabilidad celular en los pocillos con alendronato.

5 días después de haber añadido las disoluciones se hizo el ensayo MTT en la **placa 3**, pero los resultados que se obtuvieron no fueron concluyentes.

Estudio de la toxicidad del alendronato comercial y la MCM-41 sobre células murinas RAW 264.7

Se prepararon 2 placas idénticas (**placa 1** y **placa 2**) de células RAW 264.7 sin diferenciar (para poder valorar la toxicidad a diferentes tiempos). Se añadió a los pocillos correspondientes las distintas disoluciones del material (MCM-41 cerrada con la secuencia peptídica **P1**) a diferentes concentraciones (C1= 50 µg/ml C2= 100 µg/ml y C3= 200 µg/ml) y la placa se dejó incubando 24 horas. Transcurrido este tiempo a los otras tres series de pocillos se les añadió alendronato a diferentes concentraciones (C1= 2 µg/ml C2= 6 µg/ml y C3= 11 µg/ml)



Figura 18. Esquema representativo de la distribución de pocillos en la placa.

5 días después de la siembra de las células se hizo el ensayo MTT en la **placa 1**. Realizada la prueba se determinó que el alendronato a la concentración C1 era inocuo para las células, mientras que a C2 y C3 daba lugar a muerte celular pero con bastante variabilidad. En vista de

estos resultados, se decidió triplicar las concentraciones de alendronato en la placa que quedaba incubando. En el caso de los pocillos que llevaban el sólido se observó que la muerte celular era mayor (a cualquier concentración) que en los pocillos control.

7 días después de la siembra de las células se realizó el ensayo MTT de la **placa 2**, y en todos los casos (incluidos los controles) se había producido mucha muerte celular.

Estudio de la presencia de catepsina k en células RAW 264.7

En la realización de este estudio la siembra de las células se realizó igual que en el caso anterior. En dos series de pocillos no se añadió nada y en otras dos se añadió el inhibidor de la enzima (en una de ellas a una $C = 20 \mu\text{g/ml}$ y en la otra a una $C = 40 \mu\text{g/ml}$) y la placa se dejó incubando durante una hora. Transcurrido este tiempo se agregó el sustrato específico para la catepsina K (a dos concentraciones distintas $C_1 = 50 \text{ nM}$ y $C_2 = 100 \text{ nM}$) y después de incubar la placa durante 2 horas se midió la fluorescencia empleando un microscopio apto para la medida de cultivos celulares vivos o fijados (IN Cell Analyzer 2000). No se apreció en ningún caso diferencia alguna.

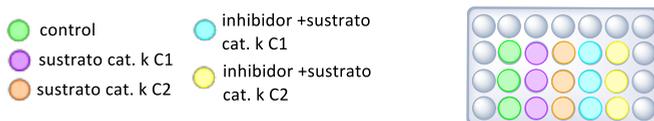


Figura 19. Esquema representativo de la distribución de pocillos en la placa 2. En esta placa además de los pocillos control como referencia, había pocillos con sustrato de la catepsina k a diferentes concentraciones (50 y 100 nM) y pocillos con sustrato de la catepsina K + inhibidor de la enzima a distintas concentraciones (20 y 40 $\mu\text{g/ml}$).

Estudio de la presencia de catepsina k en células escamosas de carcinoma (SCC-13)

Se descongelaron las células SCC 13 P8 (pase 8) siguiendo el mismo procedimiento que en el caso de las células RAW 264.7, se sembraron en placas de 6 pocillos (un pocillo de 500.000 células y otro de 324.450 células) y se dejaron incubando. 2 días más tarde se realizó el lisado celular con el que llevar a cabo el estudio. El procedimiento para lisar las células consistió en primer lugar en centrifugarlas para eliminar el medio de cultivo, a continuación, se procedió a la adición del tampón de lisis (se utilizó tampón de lisis A) que se dejó actuar en frío durante 10 minutos. Pasado ese tiempo se centrifugó para eliminar los restos de orgánulos celulares (el pellet) y se reservó el sobrenadante. Se determinó la concentración de proteínas en el lisado a partir del método Bradford. Para ello se centrifugaron las células a 1.000 g durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante. Al pellet se le añadieron 200 µl de tampón de lisis A. Se resuspendieron con ayuda del vórtex y se dejaron en hielo 10 minutos. Se centrifugó a 10.000 g y se desechó el pellet. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 620 nm para a partir de una recta patrón obtener la concentración de proteínas de la muestra, que resultó ser de 0,775 mg/ml. El lisado se dividió en dos fracciones cuyo pH se ajustó a 5,5 con un tampón de acetato sódico. Una fracción se trató con el sustrato fluorescente de catepsina K y la otra con sustrato fluorescente de catepsina K + inhibidos de catepsina K. Los resultados fueron negativos.

Medidas de detección indirectas

	Material	Concentración C1	Concentración C2
Placa 1	P3	● 20 µg/ml	● 30 µg/ml
Placa 2	P4	● 20 µg/ml	● 30 µg/ml
Placa 3	P1	● 14,8 µg/ml	● 22,2 µg/ml
Placa 4	P2	● 20 µg/ml	● 30 µg/ml
Placa 5	Alendronato comercial	● 20 µg/ml	● 40 µg/ml

*Las concentraciones especificadas corresponden a la concentración de sustrato (alendronato marcado o sulforodamina B que se pretendía que hubiera en el interior celular, calculada a partir de la concentración de nanopartículas puesta en cada pocillo, que a su vez se basaba en la carga real de las nanopartículas).

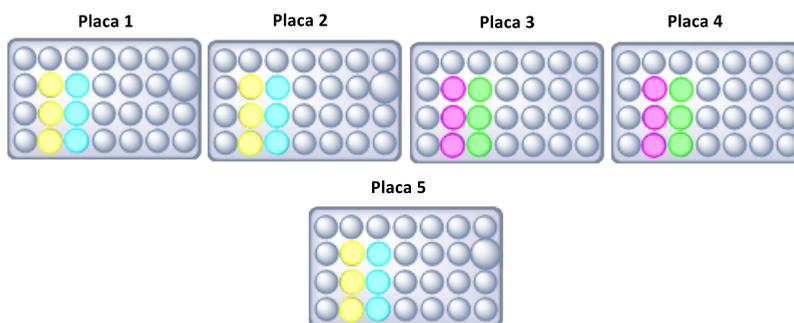


Figura 20. Esquema representativo de la distribución de pocillos en las **Placas 1-5**.

Se prepararon 5 placas con células RAW 264.7 siguiendo el procedimiento previamente descrito (**placas 1-4**). A cada placa se le añadió uno de los materiales preparados (**P1-P4**) respectivamente en las concentraciones que se indican en la tabla.

Los sólidos se prepararon de la siguiente manera: **P1**: 31,6 mg sólido **P1** en 0,5 ml de medio DMEM. De esta disolución se pipetearon 80 μ l en los pocillos que se quería alcanzar una concentración de colorante de 14,8 μ g/ml y 120 μ l en los pocillos que se quería alcanzar una concentración de colorante de 22,2 μ g/ml. **P2**: 26,4 mg sólido **P2** en 1 ml de medio DMEM. De esta disolución se pipetearon 100 μ l en los pocillos que se quería alcanzar una concentración de colorante de 20 μ g/ml y 150 μ l en los pocillos que se quería alcanzar una concentración de colorante de 30 μ g/ml. **P3** y **P4**: 17,1 mg del sólido correspondiente en 1 ml de medio DMEM. De esta disolución se pipetearon 80 μ l en los pocillos que se quería alcanzar una concentración de alendronato marcado de 20 μ g/ml y 120 μ l en los pocillos que se quería alcanzar una concentración de alendronato marcado de 30 μ g/ml.

Para llevar a cabo los estudios, se descongelaron células RAW 264.7 (pase 2) siguiendo el procedimiento descrito anteriormente y se sembraron en un frasco de 25 cm² que se dejó en la incubadora. 4 días después se realizó un pase de las células a frascos de 75 ml y se dejaron en la incubadora. 3 días más tarde se sembraron 5 placas de 6 pocillos y se dejaron en la incubadora. 3 horas más tarde (momento en el cual las células ya se habrían adherido a los pocillos) se añadieron las disoluciones de nanopartículas a los pocillos correspondientes (previa sonicación de las disoluciones para que las nanopartículas no estuvieran agregadas) y se dejaron las placas en la incubadora. 24 horas más tarde se retiró el medio y se lavaron los pocillos 3 o 4 veces con PBS para eliminar las nanopartículas no internalizadas. A continuación, se retiró el PBS y se lisaron las células siguiendo el mismo procedimiento que se ha explicado anteriormente. El siguiente paso consistió en pasar a tubos de

centrífuga el lisado celular correspondiente a cada pocillo, completar con medio DMEM hasta un volumen final de 6 ml y a continuación dividirlo en dos fracciones, de modo que 3 ml de cada pocillo sirvieron como control y a los otros 3 ml se les añadió la enzima catepsina K.

24 horas más tarde se realizaron las medidas de fluorescencia para calcular el porcentaje de liberación tanto de sulforodamina B como de alendronato marcado.

Condiciones de medida de la fluorescencia:

- **P2_c** → λ_{ex} : 565 nm; λ_{em} : 586 nm; slit_{ex}: 5; slit_{em}: 2,5
- **P4** → λ_{abs} : 350 nm
- **Patrón Figura 7** → λ_{ex} : 565 nm; λ_{em} : 586 nm; slit_{ex}: 5; slit_{em}: 2,5
- **Patrón Figura 9** → λ_{abs} : 350

5.6 Conclusiones

A partir de los datos obtenidos en los ensayos realizados en este capítulo se puede concluir que el soporte inorgánico MCM-41 no es tóxico para las células, pudiéndose utilizar por tanto como vehículo para la liberación de fármacos *in vitro*. Que la secuencia peptídica **P1** no es adecuada para el cierre de las nanopartículas puesto que no se aprecia diferencia de liberación en presencia y ausencia de la enzima catepsina K, ya sea porque la puerta no cierra adecuadamente o porque la enzima no rompe de forma eficaz el péptido en las condiciones de estudio. Y por último, que el material inorgánico cerrado con la secuencia peptídica **P2** ha permitido multiplicar por siete la liberación de alendronato en células pasando del 0,64 descrito en la bibliografía al 4,4 %.

Capítulo 6:
Conclusiones

Finalmente, podemos concluir que en la realización de esta tesis doctoral se han cumplido los objetivos fijados al inicio de la misma, puesto que por un lado, se ha llevado a cabo un estudio comparativo en el que se ha demostrado que generalmente la eficiencia de liberación es mayor en sistemas híbridos con puertas moleculares autoinmolantes que no autoinmolantes, y en puertas moleculares con el grupo éster que con el grupo amida (aunque en puertas moleculares con el mismo impedimento estérico sea más eficaz en el cierre de los poros la amida que el éster). A partir de estos datos, se ha podido concluir que la eficiencia de una puerta molecular a la hora de cerrar las nanopartículas depende tanto de la habilidad de la molécula para bloquear los poros como de la accesibilidad del estímulo externo a la molécula orgánica que permita la apertura de la puerta.

En relación con los cultivos celulares, se ha intentado obtener osteoclastos siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía tanto para el cultivo como para la diferenciación de los mismos a partir de células murinas RAW 264.7. Debido a la imposibilidad de obtener la cantidad suficiente de osteoclastos como para realizar los estudios de liberación del fármaco, se ha seguido una ruta alternativa realizando los estudios de forma indirecta en células murinas RAW 264.7.

Por otro lado, se han obtenido materiales híbridos cerrados con dos secuencias peptídicas distintas que nos han permitido sacar las siguientes conclusiones:

- La secuencia peptídica 1 no es una puerta molecular eficaz para llevar a cabo la liberación del alendronato marcado en el lisado celular.
- La secuencia peptídica 2 en cambio ha dado buenos resultados en los ensayos de liberación a nivel celular en ensayos *in vitro* permitiéndonos multiplicar por siete la liberación de alendronato en células, pasando del 0,64% descrito en la bibliografía, al 4,4 %.