

GRADO EN CIENCIAS EXPERIMENTALES

Curso académico 2023/2024

Trabajo Fin de Grado



**Síntesis y caracterización de sistemas nanoestructurados
basados en sílice mesoporosa y estudio de su potencial
actividad biológica.**

Autor: Cantos Carrobles, Álvaro

Director: Méndez Arriaga, José Manuel

Codirector: Jimenez Falcao, Sandra

Índice

1. Abreviaturas	2
2. Resumen	3
3. Introducción	4
3.1 Método «de arriba hacia abajo»	4
3.2 Método «de abajo hacia arriba»	5
3.3 Propiedades de los nanomateriales	7
3.4 Nanopartículas orgánicas	8
3.5 Nanopartículas inorgánicas	9
3.6 Cáncer e hipoxia	10
3.7 Especies reactivas de oxígeno (Reactive oxygen species o ROS)	11
4. Objetivos	12
5. Métodos experimentales	13
5.1 Síntesis de MCM-41	13
5.2 Funcionalización con distintos ligandos	14
5.2.1 Preparación de MCM-41-Nitro 4 y MCM-41-Nitro 8	14
5.2.2 Preparación de MCM-41-Nitro 2, MCM-41-Nitro 3 y MCM-41-Nitro 5	15
5.2.3 Preparación de MCM-41-Nitro 6 y MCM-41-Nitro 7	16
5.3 Síntesis de N5Cu	16
5.4 Adsorción de los complejos sobre TiO ₂	17
5.5 Evaluación del efecto del pH sobre los ligandos Nitro	17
5.6 Evaluación de la respuesta de los ligandos en condiciones de hipoxia y en presencia de un reductor	18
5.7 Ensayo ninhidrina	19
5.8 Ensayo Biuret	20
5.9 Ensayo ROS	20
5.9.1 Generación de ROS por parte de TiO ₂	21
5.9.2 Generación de ROS por parte de ligandos con grupos nitro adsorbidos sobre TiO ₂	21
6. Discusión de Resultados	21
6.1 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	21
6.2 Análisis mediante espectroscopia infrarroja (IR)	22
6.3 Análisis mediante difracción de rayos X	23
6.4 Evaluación del efecto del pH sobre los ligandos nitro	24
6.5 Evaluación de la respuesta de los ligandos en condiciones de hipoxia y en presencia de un reductor	25
6.6 Ensayo ninhidrina	28
6.7 Ensayo Biuret	32
6.8 Evaluación de la potencial generación de radicales libres	33
6.8.1 Generación de ROS por parte de TiO ₂	33
6.8.2 Generación de ROS por parte de ligandos con grupos nitro adsorbidos sobre TiO ₂	35
7. Conclusiones	37
8. Bibliografía	38

1. Abreviaturas

CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

EDC: 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida hidrocioruro

HTPA: Ácido 2-hidroxitereftálico

MCM-41: *Mobil Crystalline Material*, material mesoporoso compuesto por sílice

MCM-41-APTES: 3-aminopropil) trietoxisilano soportado sobre MCM-41

MCM-41-Br: 3-Bromopropil)trimetilsilano soportado sobre MCM-41

MCM-41-N5Cu: Nitro 5Cu soportado sobre MCM-41

MCM-41-Nitro 2: Nitro 2 soportado sobre MCM-41-APTES

MCM-41-Nitro 3: Nitro 3 soportado sobre MCM-41-APTES

MCM-41-Nitro 4: Nitro 4 soportado sobre MCM-41

MCM-41-Nitro 5: Nitro 5 soportado sobre MCM-41-APTES

MCM-41-Nitro 6: Nitro 6 soportado sobre MCM-41-Br

MCM-41-Nitro 7: Nitro 7 soportado sobre MCM-41-Br

MCM-41-Nitro 8: Nitro 8 soportado sobre MCM-41

MES: Ácido 2-morfolinoetanosulfónico monohidratado

N2TiO₂: Nitro 2 soportado en TiO₂

N5Cu: Es un complejo metalico compuesto por 4 moléculas del ligando Nitro 5 y 2 moléculas de agua unidas a dos centros de Cu(II), en forma de aspas de molino

N5CuTiO₂: Complejo de nitro 5 soportado en TiO₂

N6TiO₂: Nitro 6 soportado en TiO₂

NHS: N-hidroxisuccinimida

Nitro 2: Ácido 2-nitrobenzoico

Nitro 3: Ácido 3-nitrobenzoico

Nitro 4: 4-nitro-N- [3-(trietoxisilil) propil] benzamida

Nitro 5: Ácido 4-nitrobenzoico

Nitro 6: Alcohol 3-nitrobencílico

Nitro 7: Alcohol 4-nitrobencílico

Nitro 8: 3-Bromuro de nitrobencil

ROS: *Reactive oxygen species*

TEOS: Ortosilicato de tetraetilo

TPA: Ácido tereftálico

2. Resumen

Los nanomateriales se han convertido en un interesante campo de estudio para muchas ramas de la ciencia, debido a su capacidad para diseñar a medida sus propiedades físico-químicas de manera sencilla durante su síntesis o posterior funcionalización. Se ha demostrado su gran potencial tanto a nivel industrial como en el campo de la medicina, como por ejemplo en el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer.

Actualmente los tratamientos que se usan conllevan grandes efectos secundarios. Esto ocurre porque los fármacos son poco selectivos y afectan a células tumorales y sanas. Diseñar un tratamiento que actúe de forma específica sobre las células enfermas es todo un reto. Sin embargo, existen diferencias entre las células sanas y las tumorales y muchas de las vías de investigación actuales pretenden valerse de dichas variaciones para atacar selectivamente a las células enfermas. En una zona tumoral, el riego sanguíneo es deficiente y provoca una falta de O_2 . Esta región hipóxica se puede usar como diana para que un fármaco actúe únicamente en estas condiciones. Los compuestos nitroaromáticos son conocidos por su reactividad, ya que durante la reducción del grupo NO_2 a NH_2 , se generan especies intermedias que son las responsables de liberación de electrones y generación de radicales. El mecanismo de reducción de estas sustancias puede darse mediante dos rutas, en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. En condiciones anaeróbicas se producen las especies citotóxicas, por lo que estos compuestos podrían usarse como nuevas alternativas contra el cáncer gracias a su selectividad en ambientes hipóxicos.

El objetivo de este trabajo es estudiar el potencial biológico que tienen distintos compuestos nitroaromáticos, así como la funcionalización de nanopartículas con este tipo de moléculas para lograr una potencial biodistribución más efectiva.

Para ello se han sintetizado, caracterizado y funcionalizado nanopartículas de sílice mesoporosa y óxido de titanio. Se han estudiado los compuestos tipo nitro sometidos a diferentes condiciones como variación de pH, ambiente hipóxico o la presencia de un reductor. Se ha observado que los efectos de un reductor y las condiciones de hipoxia son muy parecidos, pero que no son suficientes para reducir el grupo nitro por completo. Sin embargo, se ha demostrado la generación de estos radicales intermedios que aparecen durante la reducción del grupo NO₂ y que además cuanto mayor es el tiempo que se somete a las condiciones de hipoxia, mayor es la generación de estos radicales.

3. Introducción

El interés por estudiar los nanomateriales ha crecido en las últimas décadas gracias al potencial que presentan en diferentes áreas de la ciencia. Se denominan nanomateriales a aquellos sistemas en los que al menos una de sus dimensiones se encuentra en el rango entre 1 a 100 nm. Las propiedades de los nanomateriales dependen de su tamaño y su forma (1). La principal ventaja que ofrecen los nanomateriales es su versatilidad, ya que se pueden controlar las condiciones de síntesis para variar su morfología y de ese modo obtener nanopartículas de un mismo tipo, pero con características distintas. En base a esto, existen dos metodologías generales de síntesis denominados «de arriba hacia abajo» (*top down*, con la que se pretende dividir sólidos en partículas más pequeñas) y un segundo grupo «de abajo hacia arriba» (*bottom up*, busca condensar átomos o moléculas que se encuentren en disolución o en fase gaseosa) (2).

3.1 Método «de arriba hacia abajo»

Dentro del grupo «de arriba hacia abajo» existen diferentes técnicas (1):

a) La evaporación térmica, que trata de calentar un material hasta su evaporación para luego condensarlo. Todo ello se lleva a cabo en una cámara de vacío, y dado que mediante este método es muy sencillo que aparezcan imperfecciones, es importante llevar un control preciso de las condiciones de todo el proceso.

b) Deposito químico en fase vapor, que se usa principalmente en compuestos basados en carbono y cuyo objetivo es formar una delgada capa de compuesto mediante una reacción química de los reactivos en fase gaseosa. Se coloca un material que actúa como sustrato en un horno a alta temperatura para posteriormente introducir los reactivos en forma de gas, los carbonos de los reactivos se desprenderán y se recombinarán en el sustrato formando por ejemplo nanotubos de carbono.

c) Ablación láser. Mediante este método se usa un potente laser que incide sobre el material de partida formando nanopartículas. Esta técnica es muy usada para formar nanopartículas de metales nobles ya que no requiere de un agente estabilizante. Este método además ofrece la posibilidad de modificar las propiedades de las nanopartículas resultantes variando por ejemplo la longitud de onda del láser.

d) Implantación de iones, que consiste en adherir iones de un material a un sólido con la intención de modificar las propiedades físicas y químicas de sólido, dado que las partículas cargadas pueden modificar la estructura del sólido y generar imperfecciones. Los iones utilizados son del mismo material que el sólido. En una cámara se aceleran los iones de forma electrostática y se envían contra el sólido.

e) La molienda, en la que se parte de partículas de un tamaño macro o micrométrico y mediante molinos de alta eficiencia se obtiene una mezcla de diferentes tamaños a una escala nanométrica.

3.2 Método «de abajo hacia arriba»

En las técnicas «de arriba hacia abajo» se emplean técnicas que requieren de instrumentos muy complejos y caros, lo que los convierte en una opción menos interesante que su contraparte. La categoría «de abajo hacia arriba» se caracteriza por mecanismos químicos permitiendo la obtención de partículas de menor tamaño y más uniformes (1):

a) El método coloidal, en el que se parte de partículas individuales, de mayores que un átomo, pero del tamaño justo para que puedan realizar movimientos brownianos. Si las partículas son de mayor tamaño, la gravedad será predominante y las partículas se sedimentarán, mientras que si las partículas son más pequeñas que una partícula coloidal lo que ocurrirá es que se mantendrán en suspensión y su movimiento será irregular. El objetivo es disolver una sal u óxido de la nanopartícula que nos interese, un reductor y un estabilizante que suele ser un líquido. Una de las ventajas que ofrece este método es la posibilidad de modificar el tamaño y la forma de las nanopartículas variando la concentración de los reactivos (sal o el óxido de las nanopartículas), del reductor o del estabilizante.

b) Reducción fotoquímica y radioquímica, que se caracteriza por usar reductores muy fuertes o especies excitadas que sean muy activas para así modificar el sistema químico de nanopartículas metálicas. Permiten generar nanopartículas sólidas y a temperaturas bajas, y además no generan impurezas, como si ocurriría si se usase una reducción química. La reducción fotoquímica se usa normalmente para obtener nanopartículas de metales nobles, mientras que la reducción radioquímica se emplea para obtener partículas con estados de oxidación inestables.

c) Irradiación con microondas. Esta técnica permite sintetizar partículas en un rango de tamaño muy pequeño, a diferencia de otras técnicas que ofrecen una dispersión de tamaños mucho mayor. Las microondas crean un campo eléctrico de alta frecuencia que calienta el material, con lo que se consigue que la temperatura del medio se mantenga estable y de esta manera se logra un crecimiento más homogéneo de las nanopartículas. Se ha convertido en un método muy atractivo ya que es rápido, efectivo y permite que las nanopartículas obtenidas sean más uniformes.

d) Método de las micelas inversas, que consiste en una emulsión de agua y aceite. De forma normal la parte hidrofóbica de las micelas apuntaría a un centro formado por aceite, sin embargo, en el método inverso la parte hidrofóbica de las micelas se orienta en contra del núcleo que está formado en este caso por agua. Esta estructura es la que origina la formación de las nanopartículas y rige su tamaño, variando la concentración de agua se puede modificar el tamaño de las partículas, por ello este método ofrece un control preciso del tamaño de las nanopartículas. Este es el método que se ha empleado para la síntesis de las nanopartículas de sílice mesoporosa.

e) Síntesis solvotermal e hidrottermal, que permite disolver reactivos que en condiciones normales no se disolverían, ya sea por acción del propio disolvente o de otro agente de la mezcla. Cuando no se usa agua como disolvente estamos hablando de síntesis solvotermal. Es común el uso de compuestos que ayuden a disolver los reactivos, y además se utilizan especies que funcionan como núcleos que generan nanopartículas porosas.

f) Método Sol-Gel, es muy usado para sintetizar nanomateriales basados en metales. Su nombre viene dado por que durante la síntesis tenemos una hidrólisis en la que el metal junto con el agua, y con ayuda de un alcohol, permite obtener un sólido que posteriormente se convertirá en un gel. Esta técnica ofrece numerosas ventajas, no es costosa económicamente, genera partículas homogéneas y es una manera sencilla de obtener partículas con estructuras complicadas. Es la técnica que se utilizará en este Trabajo fin de Grado para la síntesis de nanopartículas.

3.3 Propiedades de los nanomateriales

La materia puede variar sus propiedades dependiendo de la escala a la que se encuentre. Un material que por lo general no conduce el calor, a escala nanométrica puede presentar esa característica. Un ejemplo sería el cobre, en su forma macroscópica es opaco, pero cuando se encuentra como nanopartícula pasa a ser transparente (3). Algunas de las propiedades más comunes que pueden variar son las siguientes: el área superficial, que por norma general esta propiedad aumenta en gran medida cuando se encuentra a escala nanométrica; el magnetismo, ya que un material no magnético puede serlo si posee el tamaño de una nanopartícula como es el caso de los quantum dots de CdSe(4); y la conductividad eléctrica o térmica también es susceptible de variar, siendo el mejor ejemplo en este caso la diferencia entre el grafito y el grafeno (1). Algunos materiales como el platino pueden convertirse en catalizadores en su forma de nanopartículas, siendo originalmente inertes (3).

Las nanopartículas pueden clasificarse en base a diferentes criterios. Una forma de clasificarlos es a partir de cuántas dimensiones se encuentran por debajo de los 100 nanómetros (**Figura 1**). Los materiales de dimensión 0 (0D), tienen todas sus dimensiones por debajo de los 100 nm. Los que tienen una dimensión por encima de los 100 nm serían los 1D. Los de dimensión 2 (2D) son aquellos que tienen dos de sus dimensiones mayores de 100 nm y por último tendríamos los que tienen tres de sus dimensiones fuera del rango de los 100 nm (3D) (5).

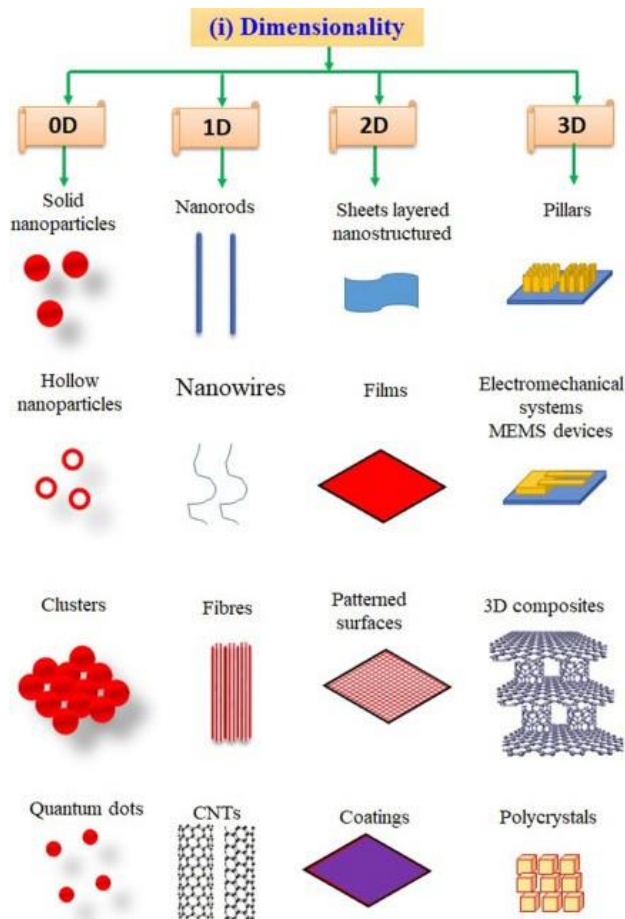


Figura 1: Clasificación de nanomateriales en función de su dimensionalidad (5).

3.4 Nanopartículas orgánicas

A su vez, las nanopartículas pueden clasificarse según su naturaleza, orgánica o inorgánica (**figura 2**). Por un lado, las nanopartículas orgánicas son compuestos que pueden estar formados por lípidos, o tener estructuras muy características como lo serían los polímeros. Algunos de los tipos de nanopartículas orgánicas son los siguientes: dendrímeros, cuya estructura está formada por diferentes ramificaciones que parten de un núcleo (similar a las dendritas de las neuronas), son capaces de soportar múltiples tipos de agentes; liposomas, que son nanopartículas con forma de esfera formados por una doble capa lipídica que pueden ser usados para elaborar compuestos hidrofílicos o hidrofóbicos y cuya principal desventaja es su rápida eliminación del organismo; micelas, compuestos coloidales que poseen un extremo que se comporta de forma hidrofílica y un extremo contrario de forma hidrofóbica, utilizados como vehículos para compuestos apolares; o las nanopartículas

poliméricas, que se usan en gran medida en medicina, pero no son particularmente específicas y no son capaces de almacenar grandes cantidades de compuesto (6).

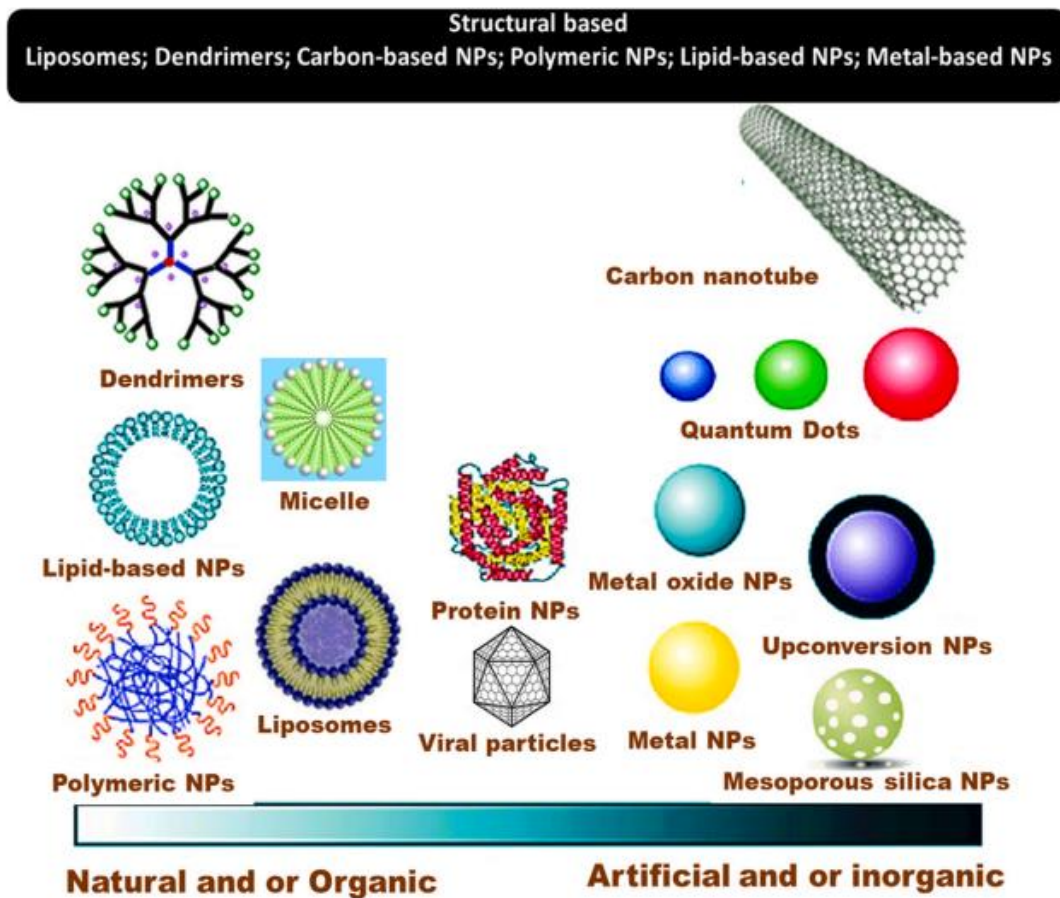


Figura 2: Clasificación de nanopartículas orgánicas e inorgánicas (7).

3.5 Nanopartículas inorgánicas

Dentro de las nanopartículas inorgánicas tenemos materiales formados principalmente por metales, como lo serían el oro, el platino o el silicio. Los Quantum Dots (QD) se usan como herramientas de diagnóstico ya que presentan propiedades muy útiles para ello, como es la emisión fluorescente y su fotoestabilidad. Sin embargo, su uso médico está muy limitado ya que no son biodegradables por el organismo. Las nanopartículas de óxido de hierro poseen propiedades muy interesantes para la biomedicina, son biocompatibles, biodegradables y se pueden monitorizar por resonancia magnética nuclear. Otro ejemplo de nanopartículas inorgánicas son las nanopartículas de oro, que tienen características que las hacen muy útiles para la óptica y la electrónica (6).

Existen también nanopartículas formadas por dióxido de titanio (TiO_2) con propiedades muy interesantes y que se pueden aprovechar en distintos campos de la ciencia y la tecnología actuales. El dióxido de titanio absorbe radiación UV-VIS, gracias a esto es usado en áreas de la cosmética como agente anticorrosivo o como sensor de gases. También se usa en medicina aprovechado su capacidad de generación de radicales libres para estudiar cómo tratar tumores *in vitro*, fotoexcitando las nanopartículas de TiO_2 . Los principales métodos de síntesis del TiO_2 son el método Sol-Gel y el hidrotermal (3).

Los materiales de sílice mesoporosa, y concretamente, las nanopartículas de sílice mesoporosa (MSN), pertenecen al grupo de las nanopartículas inorgánicas. Este tipo de partículas han ganado mucha relevancia convirtiendo a la sílice mesoporosa y su uso en distintos campos científicos en una prometedora área de investigación. La principal característica de este tipo de nanopartículas es que presenta poros en su superficie, cuyo tamaño oscila entre los 2 nm hasta los 50 nm, confiriendo al material elevada porosidad, así como una gran área superficial. Debido a esto, las MSN presentan dos superficies, una interna y otra externa, que pueden ser funcionalizadas. Son nanopartículas con buena estabilidad, biocompatibles con el cuerpo humano. Su síntesis es sencilla y fácilmente modificable, pudiendo variar su tamaño, su forma y las propiedades texturales de sus poros. Todo esto hace que sean capaces de alojar grandes cantidades de otros compuestos, ya sean fármacos, proteínas o sustancias sensoras, quedando las moléculas que se almacenen en los poros protegidas del exterior (3).

3.6 Cáncer e hipoxia

El cáncer es una de las enfermedades que más muertes causa en la actualidad. Existen numerosos tipos de cáncer que afectan a distintos tejidos y órganos y, por ello, cada uno es tratado de maneras muy distintas. Las células sanas actúan al unísono con el resto de las células para funcionar correctamente, mientras que una célula cancerígena comienza a reproducirse de forma descontrolada, comprometiendo a las células vecinas y dando lugar a un tumor. A pesar de ser un conjunto de enfermedades muy estudiadas y de gran importancia, todavía no se ha dado con un tratamiento efectivo y que no conlleve tantos efectos secundarios. Los tratamientos que se usan de forma predominante actualmente son la radioterapia, la quimioterapia, la inmunoterapia o la extracción quirúrgica del tumor. Sin embargo, estas terapias presentan el inconveniente principal de ser insuficientes en presencia de metástasis, convirtiendo cualquier tratamiento en un método ineficaz. Los agentes químicos tradicionales más conocidos son el cisplatino, el paclitaxel y la ciclofosfamida. Desgraciadamente, ninguno de ellos presenta una selectividad muy alta y actúan también en las células

sanas. La similitud entre las células sanas y las tumorales hacen que sea sumamente complicado encontrar un compuesto que solo afecte a las células deseadas, esto supone todo un desafío que requiere estudiar nuevos agentes quimioterapéuticos (8).

Cuando aparece un tumor, se forma una nueva red vascular con la que obtiene su propio suministro sanguíneo. El nuevo sistema vascular del tumor es muy distinto al de un tejido sano, los nuevos vasos sanguíneos son irregulares y tortuosos haciendo que el suministro de oxígeno disminuya conforme las células se alejan del capilar (**figura 3**), dando lugar a una región hipóxica (9). Durante muchos años la hipoxia se ha visto como un problema dado que genera resistencia a muchos tratamientos anticancerígenos, además es un factor que acelera la progresión del tumor. Ha sido recientemente cuando se ha empezado a estudiar como un mecanismo para producir fármacos más selectivos frente al cáncer (10).

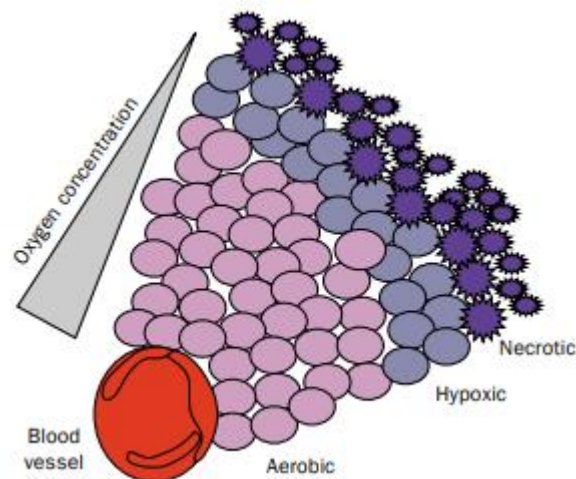


Figura 3: Representación del gradiente de oxígeno en un tumor crecido en torno a un capilar (11).

3.7 Especies reactivas de oxígeno (*Reactive oxygen species* o ROS)

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son entidades formadas por radicales libres, como ejemplo el $O_2^{\bullet-}$ y el HO^{\bullet} . Son especies muy reactivas y participan en el control del crecimiento celular. Una variación en los niveles de estas especies puede originar daños muy graves llegando a provocar la muerte celular (12). En un cáncer, las ROS pueden incrementar la actividad de las células cancerígenas promoviendo su proliferación o desarrollando resistencias a tratamientos (13).

En los últimos años se han centrado los esfuerzos en estudiar el uso de compuestos formados por grupos nitro como sustancias anticancerígenas. Estos compuestos pueden volverse tóxicos para las

células a través de varios mecanismos, uno de ellos se basa su capacidad para reducirse en condiciones de hipoxia. Algunos compuestos como los nitroaromáticos o los heteroaromáticos, generan toxicidad de forma selectiva y son básicos en quimioterapia, por esta razón se están buscando alternativas con estructuras similares para usarse no solo en nuevos tratamientos para el cáncer, sino también en algunas infecciones (14). Existen dos mecanismos para la reducción de grupos nitro. En condiciones aeróbicas, se forma un radical nitro que interacciona con el oxígeno para formar $O_2^{\bullet-}$, mientras que en condiciones anaeróbicas el radical nitro se reduce hasta formar una amina primaria (**Figura 4**) (15).

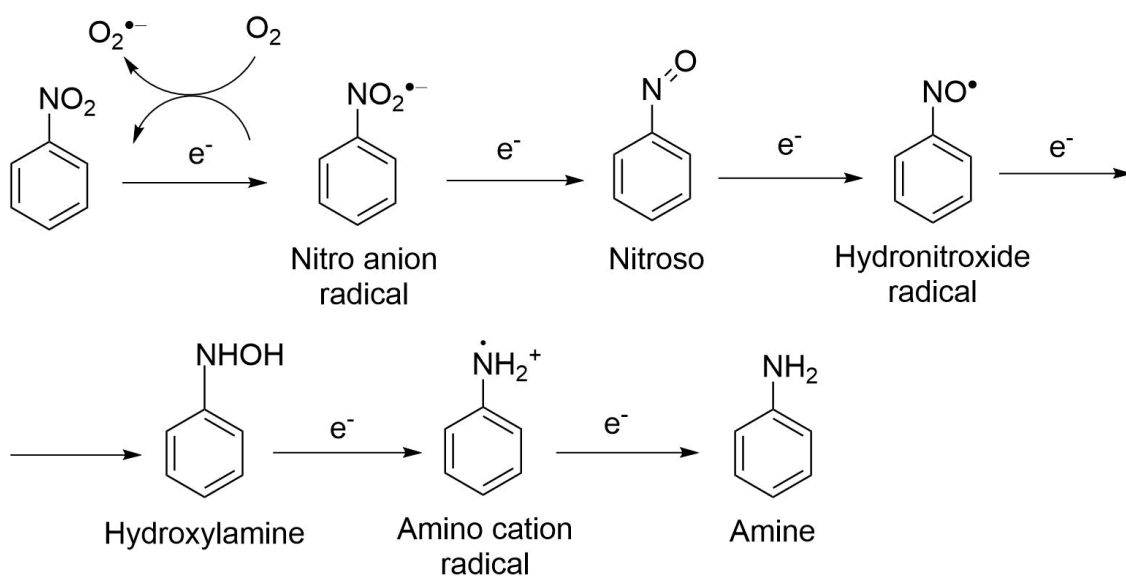


Figura 4: Ruta anaeróbica de un compuesto nitroaromático (16).

4. Objetivos

El objetivo de este trabajo es el estudio de distintos ligandos con estructuras similares a los compuestos nitroaromáticos así como la preparación, caracterización y funcionalización de sistemas basados en sílice mesoporosa y TiO_2 con este tipo de ligandos. La finalidad es evaluar la actividad de los ligandos en condiciones de hipoxia y su potencial generación de radicales libres.

En primer lugar, se sintetizarán las nanopartículas de sílice mesoporosa y se funcionalizarán con los distintos ligandos, actuando de igual forma con el TiO_2 . Se realizarán análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y también se llevará a cabo una completa caracterización espectroscópica y textural de los distintos ligandos y nanomateriales que se van a utilizar.

Se realizarán ensayos mediante UV-VIS para estudiar los efectos de la hipoxia, la normoxia y la acción de biorreductores sobre los ligandos, comprobando los efectos que tiene una variación del pH.

Para evaluar si los ligandos de tipo nitro se han reducido hasta la amina primaria, se realizarán ensayos para determinar la presencia de grupos amino, empleando test como el método de la ninhidrina o de Biuret. También se evaluarán otros aminoácidos más conocidos, como la cisteína o la glutamina, como control para comprobar que los métodos funcionan.

Para estudiar la capacidad de generar radicales libres, se compararán los resultados de nanopartículas de TiO_2 sin modificar con los ligandos soportados sobre TiO_2 . De esta manera se podrá evaluar el efecto que tienen los ligandos en comparación con el TiO_2 por sí mismo. Además, se estudiará si un aumento del tiempo en condiciones de hipoxia implica una mayor generación de radicales o por el contrario dificulta su aparición. La generación de radicales se estudiará mediante la formación de HTPA (por las siglas en inglés del ácido 2-hidroxitereftálico), un indicador fluorescente que se forma mediante la reacción de estos radicales y el TPA.

5. Métodos experimentales

5.1 Síntesis de MCM-41

La síntesis del material de partida comienza con la preparación de una disolución formada por 1 g de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), 480 mL de agua milli-Q y 3,5 mL de NaOH 2 M. Se calienta hasta una temperatura de unos 80°C. Una vez alcanzada la temperatura, se añaden 5 mL de ortosilicato de tetraetilo (TEOS), dejando en agitación la disolución durante 2 horas. Pasado este tiempo, se obtiene un precipitado blanco, que se filtra y se lava con agua milli-Q y posteriormente con metanol. Tras esto, se deja en la estufa durante 12 horas a una temperatura de 70°C. Por último, pasadas las 12 horas se calcina a una temperatura de 550°C durante 24 horas.

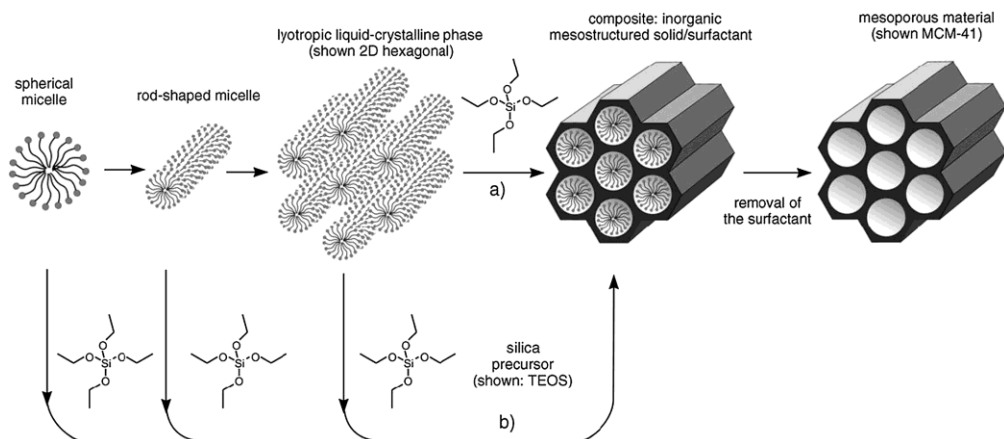


Figura 5: Mecanismo de formación de MCM-41 (17).

5.2 Funcionalización con distintos ligandos

5.2.1 Preparación de MCM-41-Nitro 4 y MCM-41-Nitro 8

Para la formación de MCM-41-Nitro 4 se han empleado 400 mg de MCM-41 y 400 mg (1,07 mmol) de Nitro 4 (4-nitro-N- [3-(trietoxisilil) propil] benzamida) y para MCM-41-Nitro 8, 200 mg de MCM-41 y 200 mg (0,92 mmol) de Nitro 8 (3-Bromuro de nitrobenil). Primero se añade la cantidad correspondiente de MCM-41, se deja a vacío y secándose a 110°C durante 12 horas. Posteriormente se añade el ligando (Nitro 4 o Nitro 8) y 30 mL de Tolueno y se deja reaccionar durante 48 horas. Posteriormente se recupera el sólido mediante centrifugación a 6000 rpm durante 5 minutos y se lava con tolueno. Finalmente se mete en la estufa 12 horas.

Los compuestos MCM-41-APTES y MCM-41-Br se preparan siguiendo el mismo procedimiento, a partir de 800 mg de MCM-41 y 844 μ L (3,61 mmol) de (3-aminopropil) trietoxisilano) para el MCM-41-APTES y para MCM-41-Br, 800 mg de MCM-41 y 850 mg (3,49 mmol) de (3-Bromopropil)trimetilsilano).

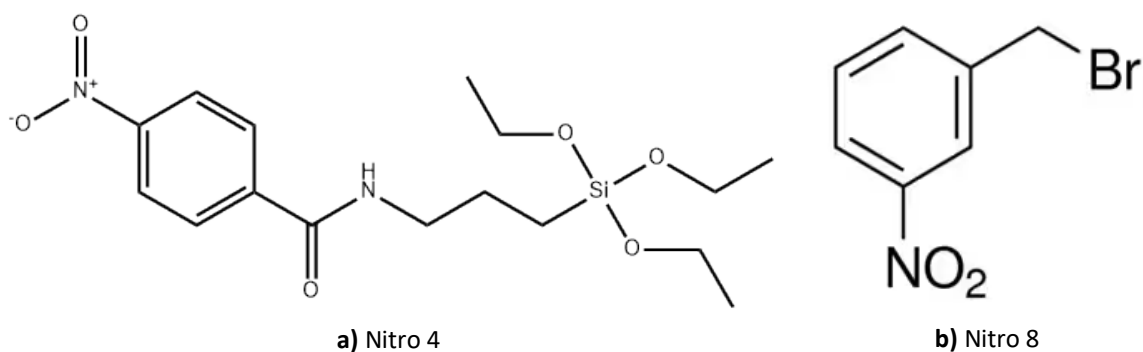


Figura 6: Ligandos Nitro soportados sobre MCM-41.

5.2.2 Preparación de MCM-41-Nitro 2, MCM-41-Nitro 3 y MCM-41-Nitro 5

Primero se prepara un buffer MES en el que se disuelven 7,3 g (124,91 mmol) de cloruro de sodio y 5,325 g (24,73 mmol) de MES (Ácido 2-morfolinoetanosulfónico monohidratado) en 250 mL de agua.

Se suspenden 150,9 mg (0,9 mmol) de ligando ya sea Nitro 2 (Ácido 2-nitrobenzoico), Nitro 3 (Ácido 3-nitrobenzoico) o Nitro 5 (Ácido 4-nitrobenzoico) en 15 mL de buffer MES. Posteriormente se añaden 259 mg (1,35 mmol) de EDC (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida hidrocloreuro) y 233 mg (2,02 mmol) de NHS (N-hidroxisuccinimida) se deja reaccionando a temperatura ambiente durante 45 minutos. Por último, se añaden 200 mg de MCM-41-APTES y se deja 2 horas a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se centrifuga, se lava con metanol 2 veces y se deja secando en la estufa.

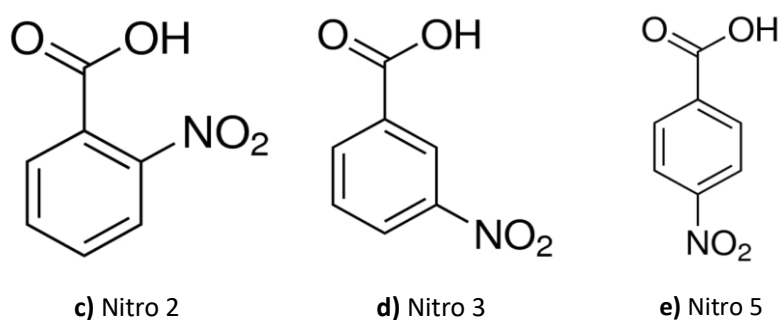


Figura 7: Ligandos Nitro soportados sobre MCM-41-APTES.

5.2.3 Preparación de MCM-41-Nitro 6 y MCM-41-Nitro 7

Se sigue el método utilizado para sintetizar los compuestos de MCM-41-Nitro 4 y MCM-41-Nitro 8 con la diferencia de que se emplean 200 mg de MCM-41-Br y 115 μL (0,96 mmol) de Nitro 6 (Alcohol 3-nitrobencílico) para formar el MCM-41-Nitro 6 o 200 mg (1,3 mmol) de Nitro 7 (Alcohol 4-nitrobencílico) en el caso de MCM-41-Nitro 7.

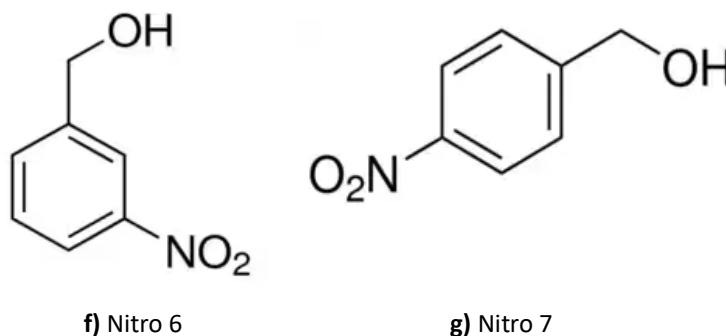


Figura 8: Ligandos Nitro soportados sobre MCM-41-Br.

5.3 Síntesis de N5Cu

El material N5Cu es un complejo metálico previamente sintetizado por el grupo de investigación en el que se realizó el Trabajo Fin de Grado. Está compuesto por 4 moléculas del ligando Nitro 5 y 2 moléculas de agua unidas a dos centros de Cu(II), en forma de aspas de molino. Para su preparación se pesan 100 mg (0,26 mmol) de Nitro 5 y se disuelve en la mínima cantidad de agua posible. En paralelo se pesan 24 mg (0,13 mmol) de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ y se disuelve también en la mínima cantidad de agua posible. Una vez disueltos los materiales, se vierte la disolución de Nitro 5 sobre la de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ y se deja agitando 30 minutos a 80°C. Pasados los 30 minutos se filtra el precipitado, obteniendo un sólido de color azul turquesa (**Figura 9**).

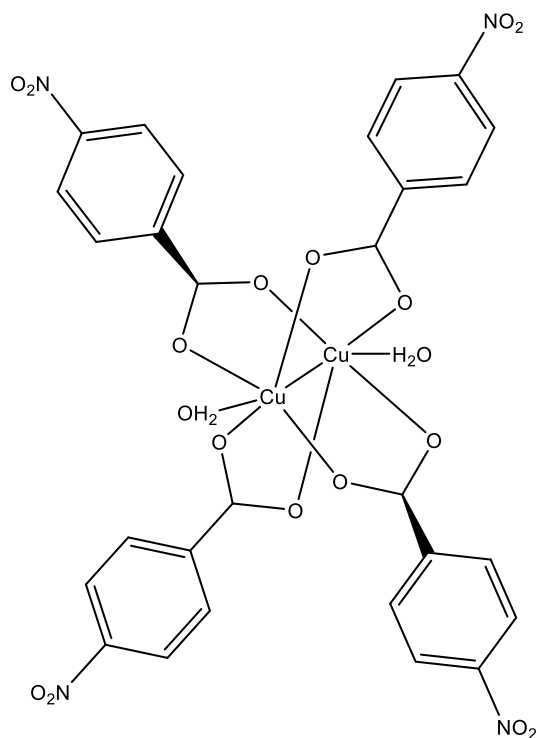


Figura 9: Complejo metálico de Nitro 5 con cobre (II).

5.4 Adsorción de los complejos sobre TiO_2

A continuación, se van a preparar distintas adsorciones sobre nanopartículas de TiO_2 . Para ello se pesan 80 mg (0,47 mmol) de Nitro 2, 80 mg (0,21 mmol) de N5Cu y 62 μL (0,51 mmol) de Nitro 6. Por otra parte, se añaden 400 mg de TiO_2 a cada compuesto. Después se añade 30 mL de etanol y se deja a temperatura ambiente y en agitación durante 24 horas. Al día siguiente se centrifuga a 6000 rpm durante 5 minutos y se lava con etanol varias veces. Finalmente retiramos el etanol del sólido para recuperar el material.

5.5 Evaluación del efecto del pH sobre los ligandos Nitro

Para estudiar el comportamiento de los ligandos a diferentes pH se preparan dos disoluciones, una con un pH ácido y otra con un pH básico con las que poder ajustar el pH de las disoluciones de los ligandos. Se prepara una disolución acida 2 M de ácido clorhídrico, para ello se toman 24,4 mL (0,5 mol) de HCl comercial y se diluyen en un volumen de agua destilada de 250 mL. Para conseguir un pH básico se va a usar una disolución de hidróxido de sodio 2 M, para preparar esta disolución se pesa 19,99 g (0,5 mol) de NaOH comercial y se disuelven en 250 mL de agua destilada.

Se preparan varias disoluciones 1 mM de los ligandos Nitro 2, Nitro 3 y Nitro 8. Para los ligandos Nitro 6 y Nitro 7 la concentración será de 0,025 mM. Se pesan 16 mg (0,095 μ mol) de Nitro 2 y Nitro 3 y se disuelven en 100 mL de agua destilada. Para Nitro 6 y Nitro 7, se toman 11 μ L (0,084 mmol) y 15,3 mg (0,09 mmol) respectivamente y se disuelven en 100 mL de agua destilada. Se toman 0,5 mL de las disoluciones de Nitro 6 y Nitro 7 y se diluyen hasta un volumen final de 20 mL. Por último, para el ligando Nitro 8 se pesan 21,6 mg (0,1 mmol) y se disuelven en 100 mL de agua destilada.

Se ajusta el pH de las disoluciones de los ligandos añadiendo gota a gota las disoluciones de HCl 2 M y NaOH 2 M, finalmente se tienen disoluciones de cada ligando a un pH de 2, 4 y 7. Para observar el comportamiento de los ligandos, se mide el espectro UV de cada uno en un rango de (200-500 nm).

5.6 Evaluación de la respuesta de los ligandos en condiciones de hipoxia y en presencia de un reductor

Se estudia el efecto de las condiciones de hipoxia y la presencia de un reductor sobre los ligandos. Tendremos muestras de los ligandos en condiciones de hipoxia, en condiciones de hipoxia y con un reductor, en contacto con el aire y por último en contacto con el aire y con reductor. Después se mide en un espectrofotómetro UV-Vis (200-500 nm).

Para recrear las condiciones de hipoxia se burbujea nitrógeno durante 5 minutos para desoxigenar la muestra y para evitar el contacto con el aire se usan unos viales con septum (**Figura 10**), luego se deja agitando la muestra hasta pasados 30 minutos que se volverá a desoxigenar la muestra durante 1 minuto y luego se deja agitando hasta pasada 1 hora, donde finalmente se medirá en el espectrofotómetro UV-Vis (200-500 nm).

Se preparan 6 disoluciones de 25 mL y 4 mM de los distintos ligandos, para la disolución de Nitro 2 se toman 16,7 mg ácido 2-nitrobenzoico, para Nitro 3 se usan 16,7 mg ácido 3-nitrobenzoico, para Nitro 5 se cogen 16,7 mg de ácido 4-nitrobenzoico. Para Nitro 6 se usan 12 μ L de alcohol 3-nitrobenzoico, Nitro 7 se toman 15,304 mg alcohol 4-nitrobenzoico y para Nitro 8 se usan 21,603 mg de bromuro 3-nitrobenzoico y posteriormente se enrasan todas las disoluciones hasta los 25 mL con agua destilada.

Para los reductores, se preparan distintas disoluciones madre de 50 mL y 0,2 M. Para su preparación se toman 1,801 g de glucosa, 1,921 g de ácido cítrico, 1,211 g de cisteína y 3,073 g de glutatión reducido. Para el ácido ascórbico se pesan 17,613 mg para obtener una disolución de 50 mL y 2 mM.

Se preparan muestras de 10 mL de cada ligando a una concentración de 0,025 mM y 20 mM de reductor en el caso de que haya reductor, a excepción del ácido ascórbico cuya concentración será de 0,2 mM. Se toma 1 mL de la disolución madre de reductor, 62,5 μ L de ligando y 8,9 mL de agua destilada.

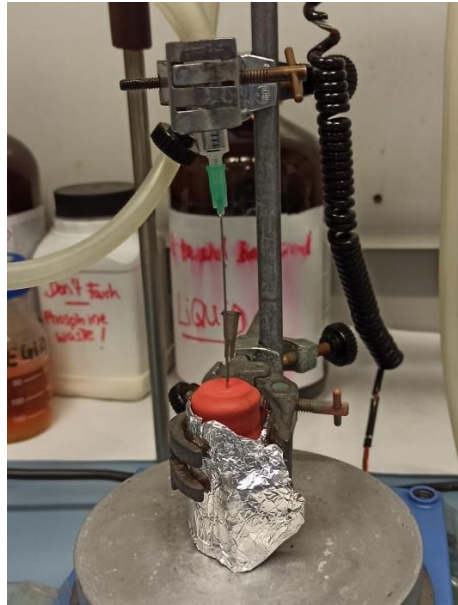


Figura 10: Montaje para inducir condiciones de hipoxia en los viales que contienen ligandos objeto de estudio.

5.7 Ensayo ninhidrina

Se preparan las muestras en presencia de ninhidrina y se incuban en un baño de aceite a 90°C durante 6 minutos. Para simular condiciones de hipoxia se aprovechan los 6 minutos de incubación para realizar el burbujeo de nitrógeno. Pasado el tiempo de incubación se deja enfriar las muestras y se mide su espectro UV (200-700 nm).

Se prepara una disolución madre de ninhidrina 0,02 M. Para ello se pesan 87 mg (0,48 mmol) de ninhidrina y se disuelven en 10 mL de etanol y 15 mL de agua destilada.

Se preparan muestras de cada uno de los ligandos a una concentración de 25 μ M por duplicado (el ensayo de la ninhidrina se va a realizar con los ligandos en condiciones de hipoxia y en contacto con el aire). Las muestras estarán compuestas por 900 μ L (0,019 M) de la disolución madre de ninhidrina y 33 μ L (4 mM) de ligando y se diluirá hasta un volumen final de 5400 μ L.

Además, para comprobar que el método funciona se analizan muestras de cisteína y glutamina. Se prepara una disolución madre de cisteína, pesando 2,42 g (19,97 mmol) y se disuelven en 25 mL de agua destilada. Se prepara una disolución más diluida de cisteína a partir de la anterior, se toman 2500 μL (0,79 M) y se diluyen en hasta los 10 mL con agua destilada. Se estudian tres muestras de cisteína con concentraciones distintas: C2 (0,2 M), C3 (0,02 M) y C4 (0,002 M). Para C2 se toman 1350 μL (0,79 M), para C3 se cogen 540 μL (0,19 M) y para C4 se cogen 54 μL (0,19 M) de las disoluciones de cisteína, por último, se añaden los 900 μL (0,019 M) de ninhidrina y se enrasa con agua destilada hasta los 5400 μL . Para la glutamina, se prepara una disolución de 25 mL (0,024 M), se pesan 87 mg (0,49 mmol) y se disuelven en agua destilada. Se preparan dos muestras de glutamina 0,02 M una con la presencia de ninhidrina y la otra no, de este modo se puede identificar la señal de la ninhidrina.

5.8 Ensayo Biuret

Es un método que se utiliza para determinar proteínas, se basa en la reacción que tiene el Cu^{2+} con los grupos amino de los aminoácidos para dar un producto de color violeta. Primero se preparan 25 mL de reactivo de biuret, se pesan 81 mg (0,32 mmol) de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$), 225 mg (0,79 mmol) de Tartrato de sodio potásico tetrahidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) y 590 mg (14,75 mmol) de hidróxido de sodio (NaOH).

Se preparan distintos viales de muestra con un volumen final de 3,5 mL, de los cuales 3 mL corresponden al reactivo de Biuret y 0,5 mL a los distintos compuestos que se van a medir, glutamina, los ligandos Nitro 2 y Nitro 6, metilamina, 2,6-dietilanilina y ciclohexilamina, todos ellos a una concentración de 2 mM. Posteriormente se deja a temperatura ambiente durante 30 minutos. Para los ligandos Nitro 2 y Nitro 6 se preparan dos viales adicionales que se someterán a condiciones de hipoxia. Una vez que se tienen los viales con los ligandos y el reactivo de Biuret, se dejan 30 minutos incubando. Para simular las condiciones de hipoxia, dado que el experimento solo dura 30 minutos se burbujea nitrógeno una única vez durante los primeros 5 minutos de la media hora. Pasada la media hora se analiza la absorbancia fijando la longitud de onda a 540 nm.

5.9 Ensayo ROS

Para estudiar la generación de ROS por parte de materiales basados en TiO_2 se preparan muestras con los distintos materiales en presencia de TPA (ácido tereftálico). Estas muestras se incuban durante 1 hora, posteriormente se medirán en un Fluorímetro (longitud de onda de excitación: 307 nm y longitud de onda de emisión: 350-550 nm) y se volverán a incubar esta vez bajo luz ultravioleta durante 1 hora.

Además, se irán realizando medidas cada cierto tiempo durante el periodo de incubación con luz UV a los 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos y pasada 1 hora. Se prepara una disolución de TPA 0,25 mM, se disuelven 2,07 mg (0,012 mmol) en 50 mL de agua destilada.

También se realiza una recta de calibrado de HTPA (ácido 2-hidroxitereftálico). Las diluciones para la recta de calibrado se prepararon a partir de una disolución de HTPA 0,55 mM, en un rango de 0,5-10 μ M. Para la disolución madre de HTPA, pesaron 6,25 mg (0,034 mmol) de HTPA y se disolvieron en 50 mL.

5.9.1 Generación de ROS por parte de TiO_2

Se preparan 3 viales en los que se suspenderán 1 mg de TiO_2 en 4 ml (0,25 mM) de la disolución de TPA. Uno de los viales se somete a hipoxia durante la primera hora de incubación (5 minutos de desoxigenación iniciales y 1 minuto de desoxigenación a los 30 minutos). En la segunda hora de incubación, para mantener las condiciones de hipoxia y que reciba toda la luz UV posible, se cambia el septum por una capa de parafina. Los dos viales restantes estarán en contacto con el oxígeno y en uno de los viales se coloca parafina para comparar el efecto que tiene.

5.9.2 Generación de ROS por parte de ligandos con grupos nitro adsorbidos sobre TiO_2

Se evalúa la generación de ROS de los distintos ligandos soportados sobre TiO_2 . Además, se compara el efecto que tiene someter a las muestras en condiciones de hipoxia a un tiempo de desoxigenación mayor. Se pesan 1 mg de N2TiO_2 (Nitro 2 soportado en TiO_2), 1 mg de N5CuTiO_2 (Complejo de Nitro 5 soportado en TiO_2) y 1 mg de N6TiO_2 (Nitro 6 soportado en TiO_2) y se suspenden en 4 mL de TPA (0,25 mM). Todas las muestras se preparan por duplicado y se someten a condiciones de hipoxia, la mitad tendrá un tiempo de desoxigenación de 5 minutos y en la otra mitad serán 15 minutos de desoxigenación.

6. Discusión de Resultados

6.1 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Los materiales de MCM-41 han sido caracterizados mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), pudiéndose conocer su morfología, así como su tamaño. Tal y como se muestra en la **figura 11**,

las partículas MCM-41 presentan morfología esférica con un diámetro medio de 47 ± 8 nm. Los datos obtenidos mediante la microscopia TEM han sido tratados con el programa ImageJ, obteniendo el histograma de la **figura 11**.

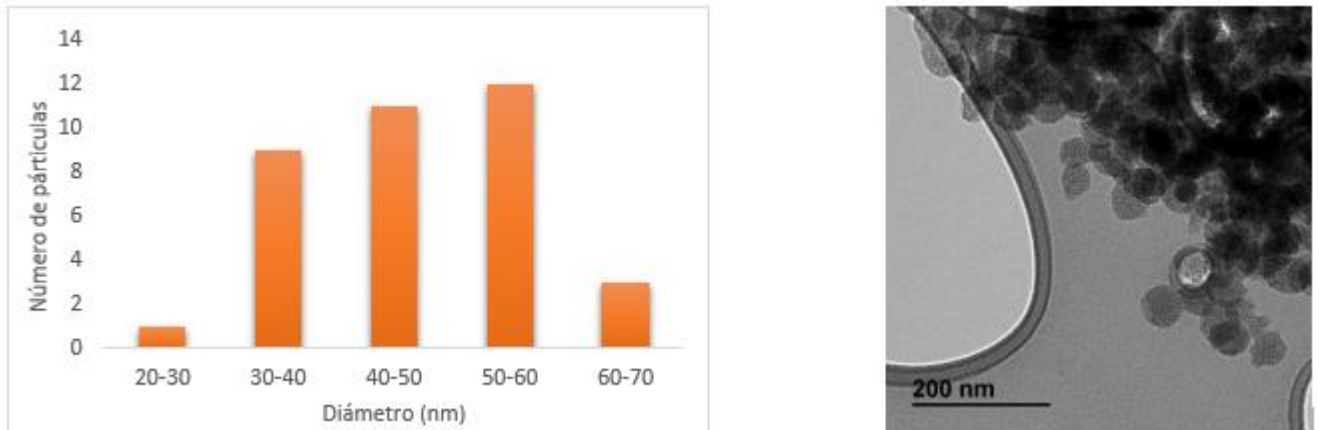


Figura 11: Histograma de MCM-41 e imagen TEM.

6.2 Análisis mediante espectroscopia infrarroja (IR)

Como se puede observar en la **figura 12**, el espectro IR muestra las bandas características de las nanopartículas de sílice. La banda a 3400 cm^{-1} (banda a), y la banda que se encuentra en 1630 cm^{-1} (banda b) corresponden a las vibraciones del enlace O-H. La banda más característica del espectro 1080 cm^{-1} (banda c) junto a 463 cm^{-1} (banda e) pertenecen a la vibración de enlaces Si-O-Si y la banda a 800 cm^{-1} (banda d) pertenece al enlace Si-O (18). En la **figura 12** se pueden ver bandas más representativas de los ligandos, en 2950 cm^{-1} (banda f) tenemos una banda asociada a los enlaces C-H de los distintos ligandos. Entre 1500 y 1460 cm^{-1} (banda g) tenemos una región que pertenecería a enlaces del tipo C=C, en 1350 cm^{-1} (banda h) tenemos una pequeña señal perteneciente a un enlace con un grupo -NO₂. Por último, se encuentra un pico en 1242 cm^{-1} (banda i) que correspondería a un enlace C-O. En

la **figura 12** se muestra el espectro IR de TiO_2 donde las bandas más características serían a 3430 cm^{-1} (a) y a 1630 cm^{-1} (b) correspondiente a las vibraciones de los enlaces O-H (19).

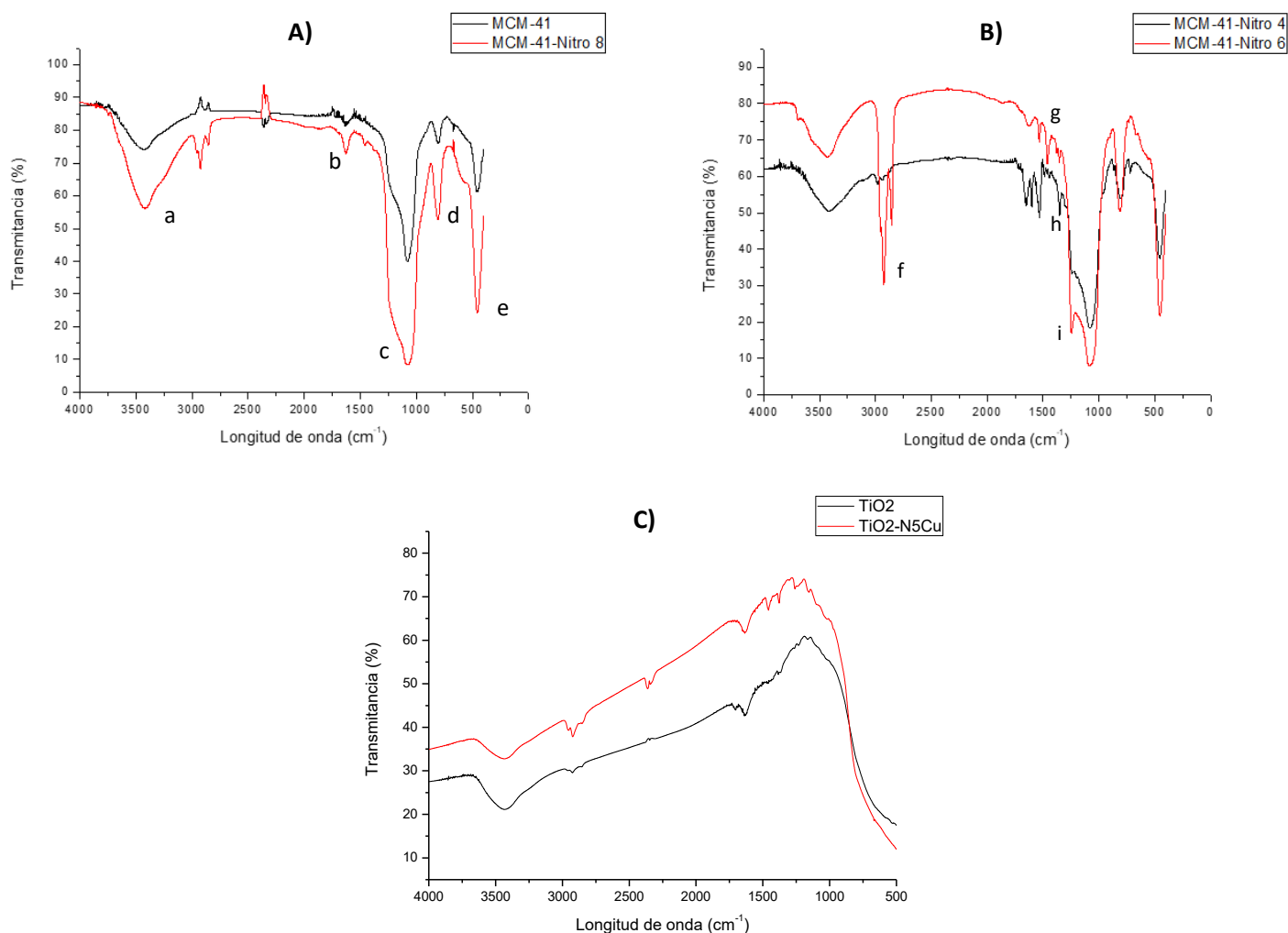


Figura 12: Espectros de infrarrojos de nanopartículas de sílice MCM-41 Y MCM-41 funcionalizada con el ligando Nitro 8 (A) y nanopartículas de sílice MCM-41 funcionalizadas con los ligandos Nitro 4 y Nitro 6. (B) Nanopartículas de TiO_2 y TiO_2 funcionalizado con el ligando N5Cu (C).

6.3 Análisis mediante difracción de rayos X

En la **figura 13**, la muestra de MCM-41 presenta un único pico de difracción debido a que los poros todavía están libres. La ocupación de los mismos tras la funcionalización se ve claramente cuando en la muestra MCM-41-nitro 2 el pico de difracción decrece hasta prácticamente desaparecer.

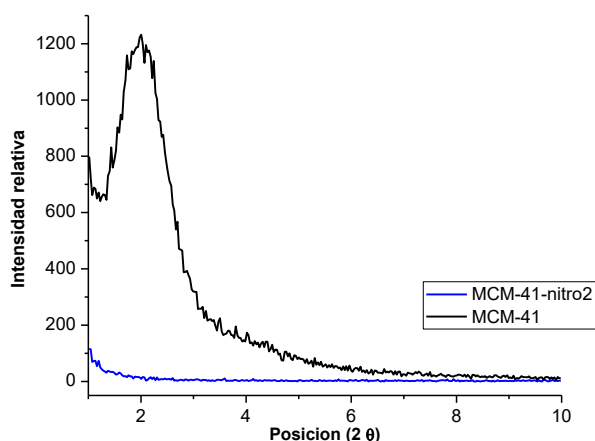


Figura 13: Difracción de rayos X de muestras de MCM-41 y MCM-41 funcionalizada con el ligando Nitro 2.

6.4 Evaluación del efecto del pH sobre los ligandos nitro

Para estudiar el efecto del pH en los ligandos, se han preparado varias disoluciones con pH distintos, pero manteniendo la misma concentración. Originalmente las disoluciones de los ligandos tienen un pH de 4. En la **tabla 1** están recogidos los máximos de absorbanza de cada disolución de ligando con pH más ácidos y más básicos. En el caso del Nitro 2 no se observan cambios en los máximos de absorción, manteniéndose en valores cercanos al 0,5 además, no sufre ningún desplazamiento de longitud de onda cuando varía el pH del ligando. Los ligandos Nitro 3 y Nitro 7 al contrario que Nitro 2, sí que sufren un aumento de la señal cuando la disolución tiene un pH ácido. Por último, para los ligandos Nitro 6 y Nitro 8 sí que hay una variación de los máximos de absorción, tanto para pH ácidos como básicos. En el Nitro 8 se da también un desplazamiento de la señal pasando de 213 nm de la disolución original a 218 nm cuando se modifica su pH.

Tabla 1: Máximos de absorción de los distintos ligandos a distinto pH. La concentración de Nitro 2, Nitro 3 y Nitro 8 es de 1mM y para Nitro 6 y Nitro 7 es 0,025 mM.

	Nitro 2	Nitro 3	Nitro 6	Nitro 7	Nitro 8
	Absorbancia (267 nm)	Absorbancia (222 nm)	Absorbancia (269 nm)	Absorbancia (277 nm)	Absorbancia
pH 2	0,53	1,762	0,777	0,312	0,14 (218 nm)
pH 4	0,504	1,439	0,594	0,244	0,08 (213 nm)
pH 7	0,54	1,493	0,786	0,278	0,14 (218 nm)

6.5 Evaluación de la respuesta de los ligandos en condiciones de hipoxia y en presencia de un reductor

El objetivo de este ensayo es comprobar si se produce la reducción del grupo nitro en condiciones de hipoxia y en presencia de un reductor cuyo mecanismo sería el que se muestra en la **figura 14**. En el caso de que se haya producido la reducción del grupo nitro a grupo amino, debería reflejarse en los espectros con la aparición o desaparición de las señales o también mediante desplazamientos de la longitud de onda del máximo de absorbancia.

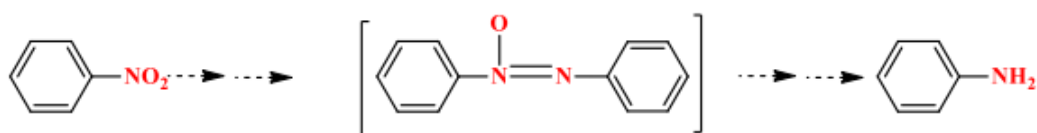


Figura 14: Mecanismo de reducción de un compuesto nitroaromático (20).

Se han analizado los espectros de absorbancia de cada uno de los ligandos en condiciones de hipoxia (Sin O₂), normoxia (O₂), hipoxia y reductor (Sin O₂ + Red) y por último normoxia y reductor (O₂ + Red). Para ello se midieron los espectros UV-VIS de los ligandos en las condiciones descritas tal y como se aprecia en la **figura 15**.

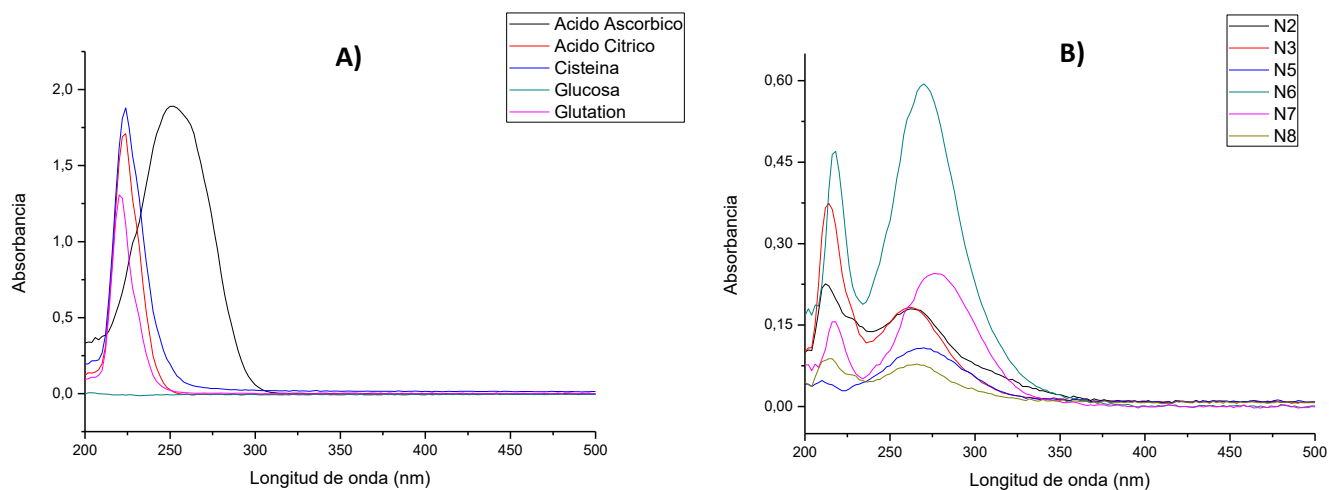


Figura 15: (A) Espectros de absorción de los distintos reductores a una concentración de 20 mM, excepto el ácido ascórbico que sería 0,2 mM. (B) Espectro de absorción de los ligandos, pH 4 y 0,025 mM. Nitro 2 (N2), Nitro 3 (N3), Nitro 5 (N5), Nitro 6 (N6), Nitro 7 (N7) y Nitro 8 (N8).

Al analizar los espectros de los ligandos y reductores por separado vemos que la señal de los reductores interfiere con la de los ligandos ya que ambas señales aparecen en el mismo rango. Además, cabe destacar que la glucosa apenas da señal, por lo que es el único reductor que en principio no interferirá con la señal de los ligandos. Después de analizar todas las muestras y estudiar sus espectros de absorción UV-VIS (**ANEXO**), los más interesantes fueron las muestras de ligando Nitro 6 junto con el ácido ascórbico y el de la glucosa, ya que son los espectros en los que se puede apreciar una mayor diferencia entre sus señales.

En el caso del Nitro 6 sería el alcohol 3-aminobencil y cuyos máximos de absorción se encuentran a 231 y 280 nm (20), y si observamos la **figura 16**, en el espectro de la glucosa vemos que el efecto de los reductores y de las condiciones de hipoxia es similar, se reduce la absorbancia, pero no hay un desplazamiento de los picos y tampoco aparecen nuevas señales. En el caso del ácido ascórbico (**figura 16**), vemos que en condiciones de hipoxia se reduce la señal, pero al igual que con la glucosa, ni aparece ni se desplaza la señal, sin embargo, cuando añadimos el ácido ascórbico como reductor aparece un pico en ~250 nm perteneciente al propio ácido ascórbico.

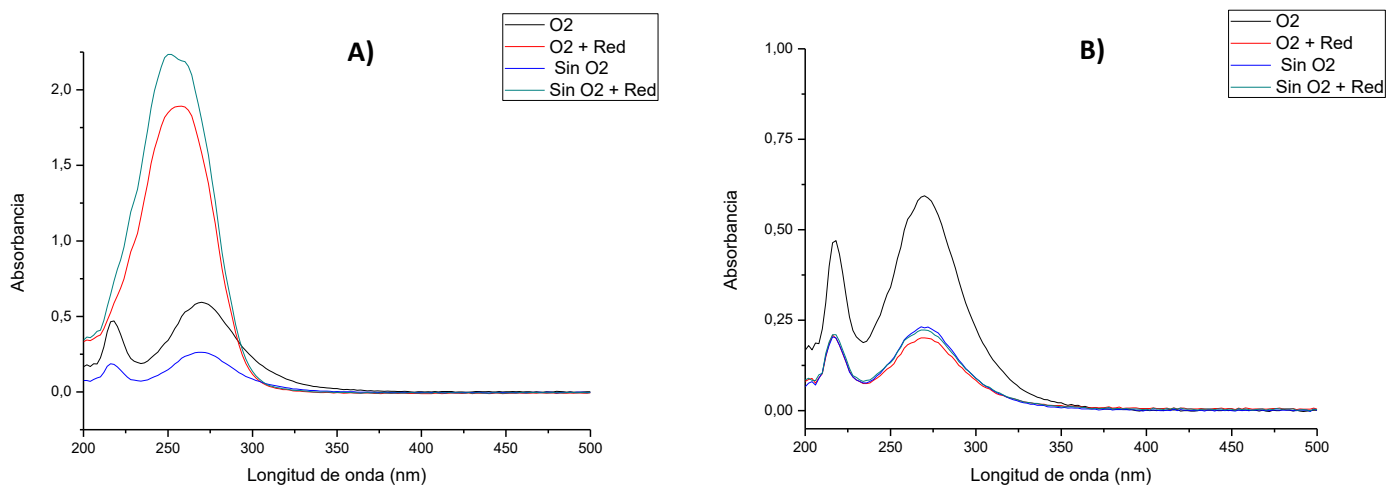


Figura 16: Espectros de absorción del ligando Nitro 6 (0,025 mM), **(A)** con ácido ascórbico (0,2 mM) y **(B)** con glucosa (20 mM).

El ligando Nitro 2 tiene un máximo a 217 nm, sin embargo en el artículo de Jana et al (21) estudia la reducción del Nitro 2 y se puede ver como el máximo de absorbancia a 267 nm se va reduciendo a la vez que se desplaza hasta los ~307 nm. Si se comparan los espectros de la **figura 17**, se puede ver como al someter las muestras a condiciones simuladas de hipoxia, la señal a 267 nm sufre un ligero desplazamiento y la absorbancia también se reduce. Se ve además que la presencia de los reductores en condiciones de hipoxia incrementa la señal con respecto a los reductores en presencia de O₂. La ventaja que ofrece la glucosa en comparación al ácido ascórbico es que nos permite estudiar lo que ocurre con el máximo de absorbancia a 267 nm. En la **figura 17** se ve que el efecto de las condiciones de hipoxia (sin O₂) y la presencia de reductor (O₂ + Red) es el mismo ya que tanto la absorbancia como el desplazamiento de longitud de onda es prácticamente idéntico. Además, se ve que estos efectos no se suman, ya que, de ser así, la señal correspondiente al máximo de absorbancia a 267 nm en condiciones de hipoxia y en presencia de la glucosa (Sin O₂ + Red) sería menor y sufriría un mayor desplazamiento.

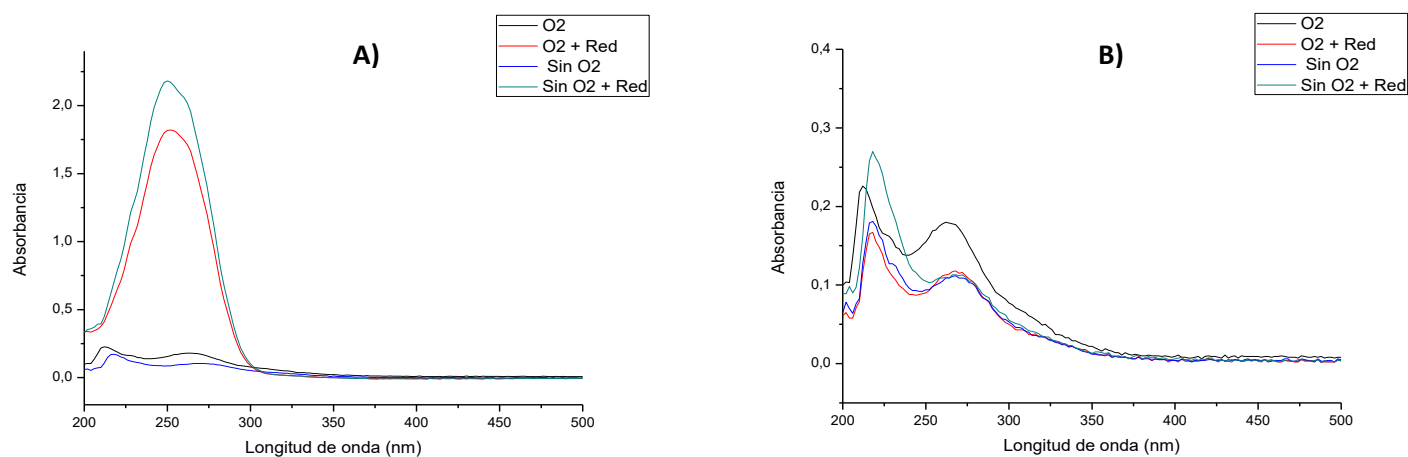


Figura 17: Espectros de absorción del ligando Nitro 2 (0,025 mM), **(A)** con ácido ascórbico (0,2 mM) y **(B)** con glucosa (20 mM).

Con el ligando Nitro 3 ocurre lo mismo (**figura 18**) hay un pequeño desplazamiento pero que sigue sin ser el máximo de absorción del compuesto reducido del Nitro 3, el ácido 3-aminobenzoico (304 nm)(22). Los resultados del resto de ligandos no aportan prácticamente información, no hay variación en las señales y en el caso de haberlas la variación no es muy significativa, aparte de que se mantiene el problema de interferencia de los reductores.

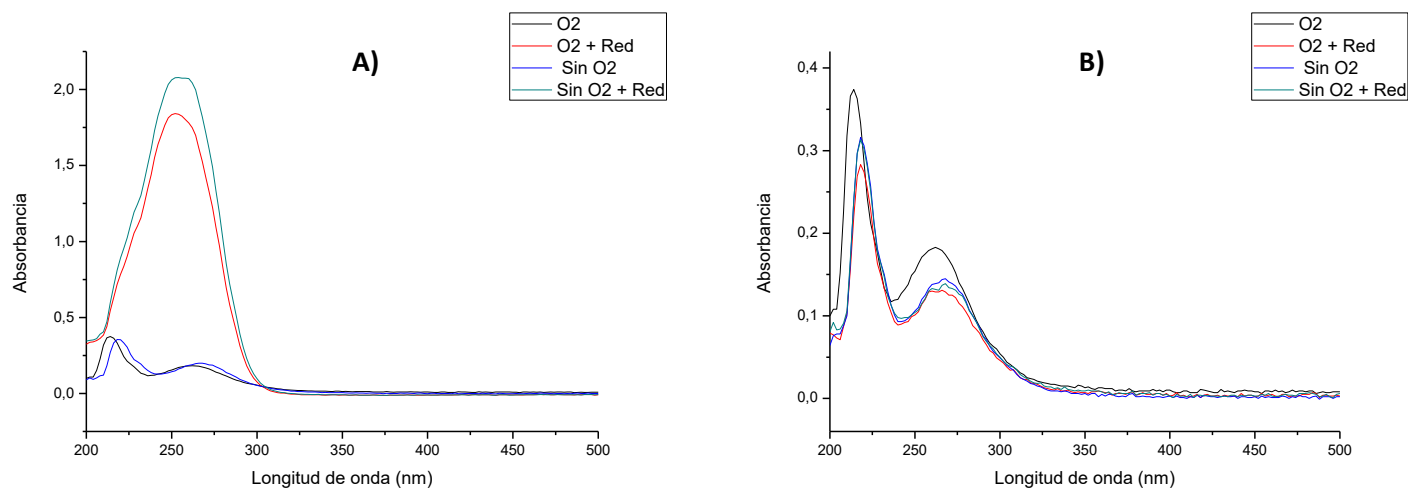


Figura 18: Espectros de absorción del ligando Nitro 3 (0,025 mM), **(A)** con ácido ascórbico (0,2 mM) y **(B)** con glucosa (20 mM).

Los espectros de los ligandos nitro 2, nitro 3 y nitro 6 en condiciones de hipoxia y en presencia de un reductor difieren del espectro del ligando original en especial en el caso nitro 6. Estos resultados sugieren un posible cambio estructural del ligando como consecuencia de las condiciones de hipoxia y la presencia de un agente reductor como la glucosa.

6.6 Ensayo ninhidrina

El objetivo de este experimento sería la detección de los grupos $-NH_2$ que aparecerían como consecuencia de la reducción de los grupos NO_2 de los ligandos. Las muestras desoxigenadas (condiciones de hipoxia) deberían de interaccionar con la ninhidrina y formar el Púrpura de Rühemann que emite una señal en el espectro UV a 570 nm (23).

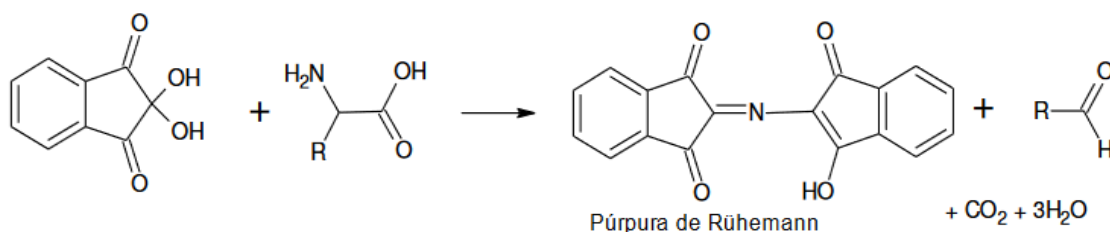


Figura 19: Reacción general de la ninhidrina con aminoácidos (24).

La ninhidrina se usa principalmente para determinar aminoácidos que tengan grupos amino libres, por lo que para comprobar que el método que se emplea es correcto se realizó el ensayo con dos aminoácidos conocidos como la cisteína y la glutamina. En el caso de la cisteína aparece una región saturada que va desde los 340 nm hasta los 420 nm, además esta región va disminuyendo conforme se reduce la concentración de cisteína. A 570 nm tenemos una absorbancia de 0,17 para C2, 0,09 para C3 y 0,04 para C4 (**figura 20**). El método de la ninhidrina presenta algunas excepciones ya que hay algunos aminoácidos que al interactuar con la ninhidrina no emiten señal a 570 nm sino a 440 nm, estas excepciones serían la prolina, la hidroxiprolina y la cisteína (25). Por lo que esta región saturada probablemente pertenezca a la señal de la cisteína y la señal a 570 nm se debe a la presencia de la forma oxidada de la cisteína, la cistina.

Posteriormente se midió el espectro UV de la glutamina para comprobar que la señal no interfería con el Púrpura de Rühemann. Después se analizó la glutamina a la misma concentración de cisteína que no había dado una señal saturada y en este caso apareció una señal a 570 nm perteneciente al Púrpura de Rühemann (**figura 20**). Estos resultados demuestran que el procedimiento es correcto.

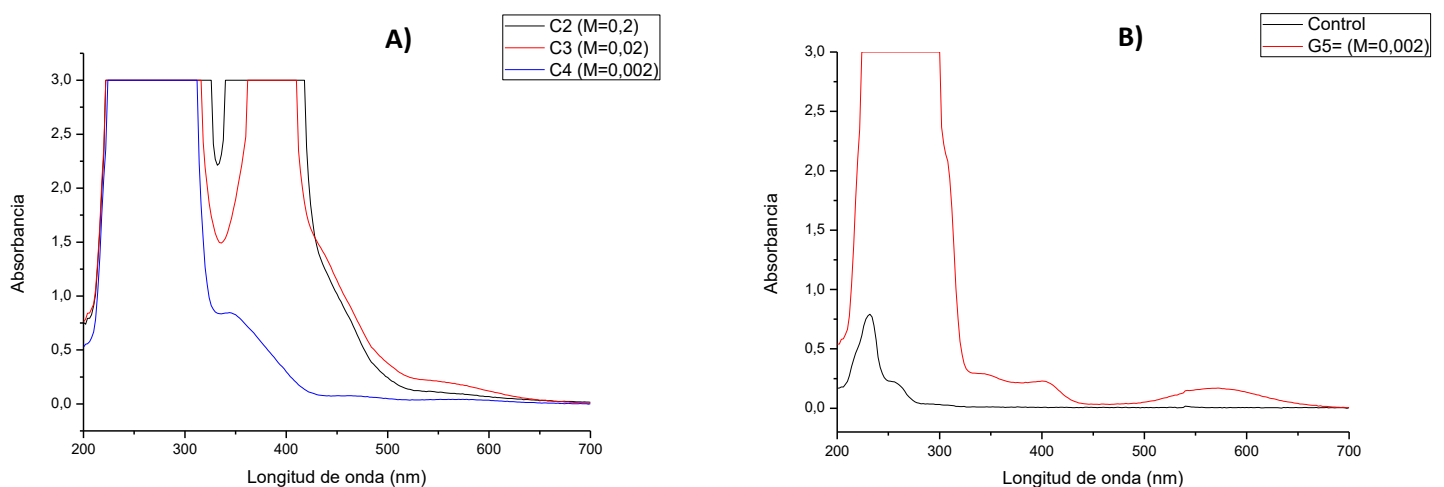


Figura 20: (A): Espectros UV de Cisteína a distintas concentraciones en presencia de ninhidrina. **(B):** Espectros UV de Glutamina (control) y de glutamina en presencia de ninhidrina (G5).

Después se analizó una disolución solo de ninhidrina y posteriormente de los distintos ligandos en presencia de ninhidrina y en condiciones de hipoxia. Se agruparon sus espectros donde podemos ver que todos son prácticamente idénticos (**figura 21**). El espectro satura en un rango que va desde los 220 nm hasta los 300 nm como consecuencia de la presencia de ninhidrina, pero si nos fijamos en la

longitud de onda que nos interesa 570 nm no vemos ninguna señal que indique que se haya formado el Púrpura de Rühemann, por lo que concluimos que no se ha producido la formación de grupos amino libres y por tanto los grupos NO_2 de los ligandos no se han reducido.

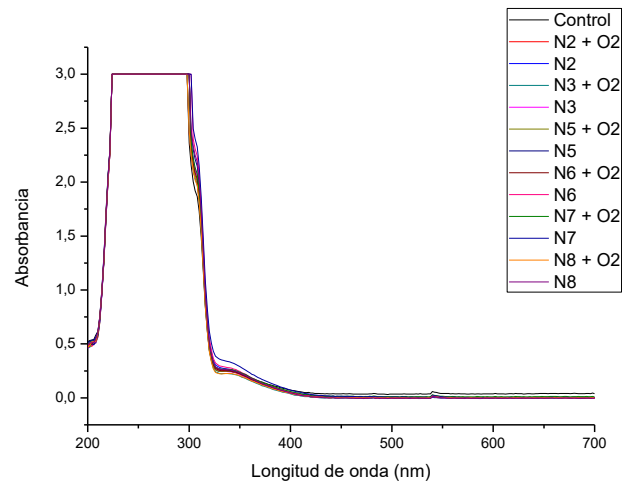


Figura 21: Espectro UV de los ligandos (25 μM) en presencia de ninhidrina. Muestra de ninhidrina (control), en presencia de O_2 (ligando + O_2) y condiciones de hipoxia (ligando).

Una razón por la que los ligandos no han dado señal mientras que la cisteína y la glutamina si podría ser la concentración. Al encontrarse a una concentración más baja podría no formarse suficiente cantidad de aminos libres como para que de señal, similar a lo que ocurre con la cisteína. Por este motivo se decidió repetir el análisis aumentando la concentración de los ligandos a 2 mM (**figura 22**). Se observa un aumento en el intervalo de longitudes de onda en el que se produce saturación (llegando hasta los 330 nm) pero sigue sin aparecer una señal a 570 nm.

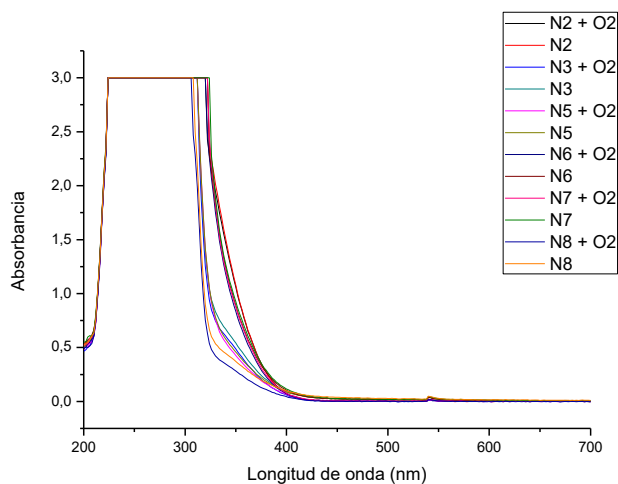


Figura 22: Espectro UV de los ligandos (2 mM) en presencia de ninhidrina. En presencia de O₂ (ligando + O₂) y condiciones de hipoxia (ligando).

En el caso de que la concentración fuese insuficiente se optó por aumentar todavía más la concentración de los ligandos, analizando en este caso los ligandos Nitro 2 y Nitro 6 a una concentración de 40 mM (**figura 23**). Al igual que en el caso anterior no aparece ninguna señal a 570 nm y la zona de saturación ha aumentado como consecuencia de una mayor concentración de los ligandos. Concluimos por tanto que por mucho que se aumente la concentración de los ligandos, no aparece ninguna señal a 570 nm como consecuencia de la formación del Púrpura de Rühemann. Esto demuestra que en condiciones de hipoxia o normoxia no se forman grupos amino libres como consecuencia de la reducción de los grupos nitro de los ligandos.

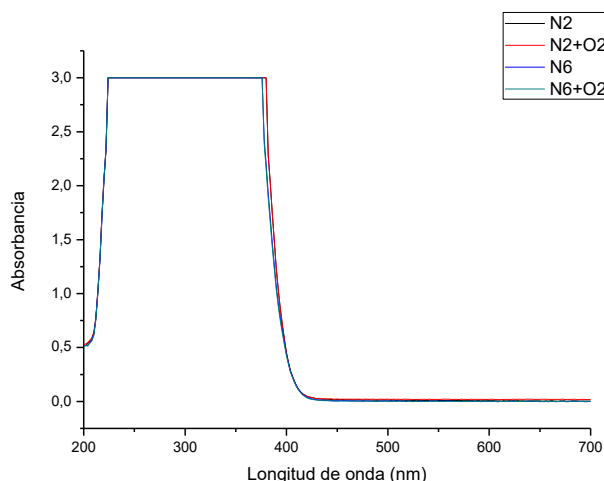


Figura 23: Espectro UV de los ligandos Nitro 2 y Nitro 6 (40 mM) en presencia de ninhidrina. En presencia de O₂ (ligando + O₂) y condiciones de hipoxia (ligando).

6.7 Ensayo Biuret

Dado que en el ensayo de la ninhidrina no se obtuvo resultado alguno de que los ligandos se estuvieran reduciendo, se optó por confirmar los resultados obtenidos con otra técnica de cuantificación de aminoácidos que sería el método de Biuret. Esta técnica se basa en la interacción entre el Cu²⁺ y los grupos NH₂ de las proteínas (26) dando un producto de color violeta. En este caso sería con los grupos aminos de los ligandos reducidos. Además, se usó glutamina como referencia y se analizó también metilamina, 2,6-dietilanilina y ciclohexilamina para comprobar si este método funcionaba con compuestos que no fuesen aminoácidos, pero sí que tuvieran grupos amino (**Tabla 2**).

Tabla 2: Absorbancia medida a una longitud de onda fija de distintas sustancias (2mM) sometidas al ensayo Biuret.

Muestra	Absorbancia (540 nm)	Ligandos	Absorbancia (540 nm)
Glutamina	0,092	Nitro 2	0,085
Metilamina	0,092	Nitro 2 (hipoxia)	0,094
2,6-Dietilanilina	0,108	Nitro 6	0,095
Ciclohexilamina	0,107	Nitro 6 (hipoxia)	0,134

La glutamina es un aminoácido con dos grupos amino por lo que forma enlaces con el Cu del Biuret, sin embargo su reactividad mediante este método es bastante baja en comparación a otros aminoácidos como lo sería su análogo con un carbono menos, la asparagina (27). La absorbancia de la metilamina, 2,6-dietilanilina y de la ciclohexilamina es bastante similar a la glutamina por lo que este método funciona para detectar grupos amino. Sin embargo, la absorbancia de los ligandos Nitro 2 y

Nitro 6 es también muy parecida a la glutamina, el problema de estos compuestos es que no presentan ningún grupo amino, ya que son los compuestos nitro sin reducir. Esto nos indica que a pesar de que el método permite la determinación de grupos amino, como nos demuestran los valores de absorbancia de la glutamina y de otras moléculas con grupos amino. En los ligandos objeto de estudio no se observan grupos amino como consecuencia de un hipotético proceso de reducción de los grupos nitro de origen.

6.8 Evaluación de la potencial generación de radicales libres

6.8.1 Generación de ROS por parte de TiO_2

Primero se midió la generación de ROS por parte de nanopartículas de TiO_2 con el fin de compararla con la capacidad de generación de ROS de sistemas complejos constituidos por ligandos soportados sobre TiO_2 . Para medir la generación de ROS se utilizó un indicador fluorescente, el HTPA sintetizado in situ como consecuencia de la reacción entre el TPA y ROS (**figura 24**). Con el fin de cuantificar la cantidad de ROS generados se realizó una recta de calibrado de HTPA (**ANEXO**) que confirma la relación entre la presencia de HTPA y el incremento de la señal de fluorescencia con un máximo de emisión a 425 nm (28).

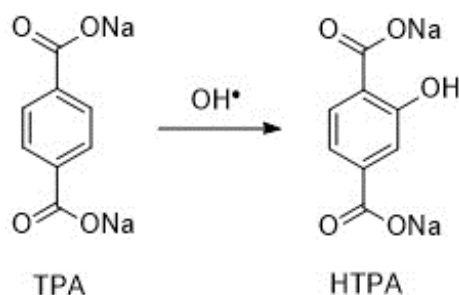


Figura 24: Mecanismo de reacción de TPA con ROS para formar HTPA (28).

Posteriormente se midieron tres suspensiones de TiO_2 con distintas condiciones a lo largo de una hora de incubación con luz ultravioleta, que es el agente desencadenante de la generación de ROS por parte de TiO_2 (**figura 25**). Las condiciones ensayadas fueron (A) en presencia de O_2 , (B) en presencia de O_2 y con parafina y (C) sometido a hipoxia y con parafina. La parafina tiene la misma función que el septum en otros experimentos, mantener las condiciones de hipoxia evitando el contacto con el aire. En el

caso (A) no hay un espectro tan claro como en los otros dos casos, pero sí que se puede ver que pasados 60 minutos de incubación bajo luz UV, aparece el máximo de emisión a 425 nm aunque con una intensidad mucho menor que en los casos (B) y (C). Comparando los casos (B) y (C) se observa que el efecto de la hipoxia genera de forma más progresiva compuestos ROS, ya que en la muestra (C) que no está sometida a hipoxia se observa una señal máxima en los primeros 5 minutos y que luego desciende hasta alcanzar unos valores de intensidad de fluorescencia similares a los tiempos finales de (B).

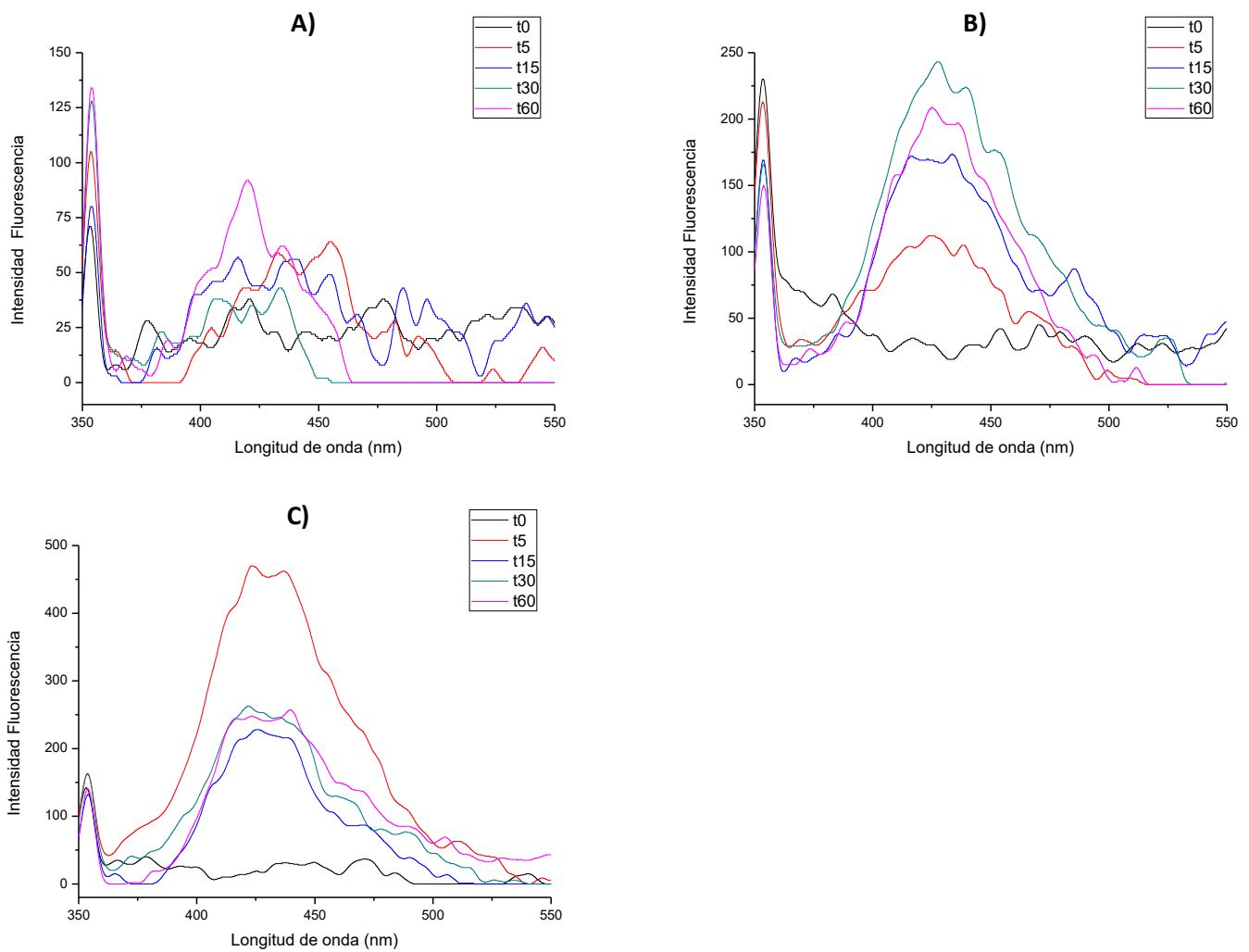


Figura 25: Espectros de Fluorescencia de (A) TiO₂ en presencia de O₂ sin parafina, (B) TiO₂ hipoxia y parafina, (C) TiO₂ en presencia de O₂ y parafina. Medidos en distintos tiempos bajo luz UV: t0 (0 min), t5 (5 min), t15 (15 min), t30 (30 min) y t60 (60 min).

6.8.2 Generación de ROS por parte de ligandos con grupos nitro adsorbidos sobre TiO₂

Se analizaron los ligandos Nitro 2, Nitro 6 y el complejo de N5Cu soportados en nanopartículas de TiO₂, además se va a comparar el efecto que tiene un aumento en el tiempo de desoxigenación. El mecanismo de reducción de los compuestos nitroaromáticos genera ROS por lo que en el caso de que los ligandos se hayan reducido, la intensidad de fluorescencia debería de ser similares o incluso mayores que los del caso (B) de la **figura 25** ya que el método para detectar los ROS es a través de la formación de HTPA. Las condiciones de hipoxia (salvo el tiempo de desoxigenación) y el uso de la parafina se mantienen igual.

Al comparar los espectros de fluorescencia del Nitro 2 (**figura 26**) se ve que un tiempo de 15 minutos de desoxigenación dificulta la generación de ROS y por tanto la formación de HTPA de ahí que su espectro sea difuso y su máximo de emisión se dé en t₀ y además a una longitud de onda que no es 425 nm. En el caso de los 5 minutos de desoxigenación los resultados se parecen mucho a los resultados obtenidos en el caso (B) de la **figura 25**, sin embargo, mientras que al TiO₂ le cuesta 30 minutos llegar a los valores máximos de absorbancia, con la presencia de Nitro 2 se ve que pasados 5 minutos ya alcanza el nivel máximo de emisión.

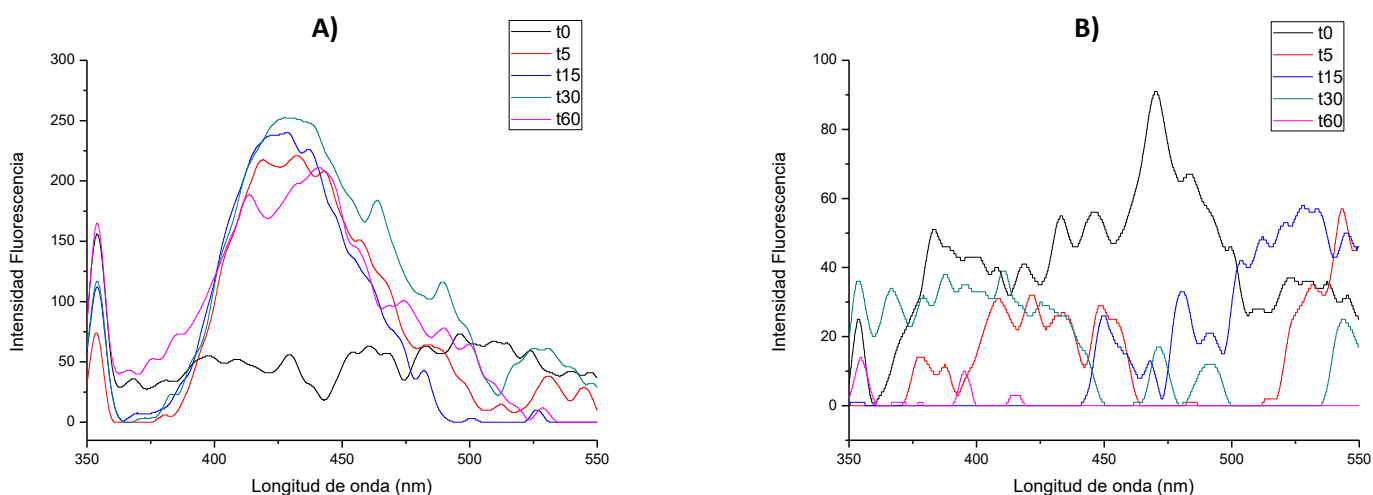


Figura 26: Espectros de Fluorescencia Nitro 2 soportado en TiO₂. Tiempo de desoxigenación: **(A)** 5 minutos y **(B)** 15 minutos. Tiempo bajo luz UV: t₀ (0 min), t₅ (5 min), t₁₅ (15 min), t₃₀ (30 min) y t₆₀ (60 min).

Según los espectros de la **figura 27** el caso del complejo N5Cu es al contrario que con el Nitro 2. Al analizar las disoluciones preparadas a las mismas concentraciones que en el caso anterior, con 5 minutos de desoxigenación no aparece la curva característica de la formación de HTPA mientras que con 15 minutos de desoxigenación sí. La presencia de N5Cu tiene un efecto más potente que el Nitro

2 ya que la diferencia entre los máximos de intensidad de emisión es de 70 unidades. Comparando también el N5Cu con el TiO_2 se ve que la presencia del ligando acelera la aparición de HTPA al igual que ocurría con el ligando Nitro 2.

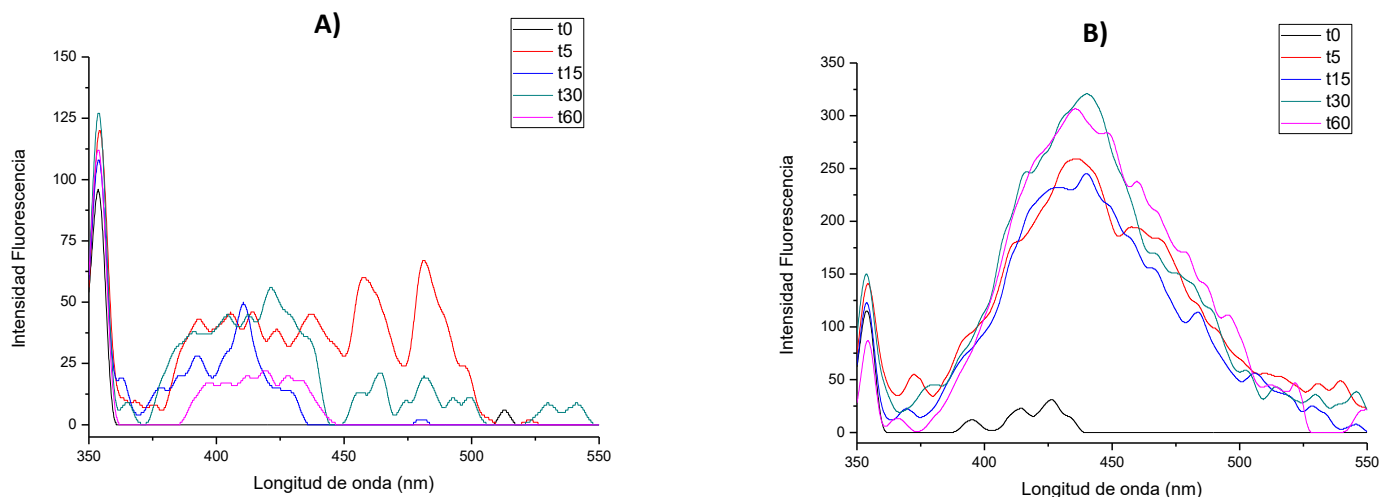


Figura 27: Espectros de Fluorescencia complejo N5Cu soportado en TiO_2 . Tiempo de desoxigenación: **(A)** 5 minutos y **(B)** 15 minutos. Tiempo bajo luz UV: t0 (0 min), t5 (5 min), t15 (15 min), t30 (30 min) y t60 (60 min).

En la **figura 28** se ve que un incremento del tiempo de desoxigenación genera un aumento de la señal de casi el doble. En ambos casos el nivel máximo de intensidad de emisión a la que llegan ocurre pasados 15 minutos bajo luz UV, por lo que tardan más tiempo en alcanzar el máximo que los ligandos Nitro 2 y el complejo N5Cu pero consiguen valores de absorbancia más altos que estos.

Después de analizar todos los espectros, se puede ver que la presencia de los ligandos hace la que la señal de fluorescencia sea mayor en comparación al TiO_2 por sí solo, esto quiere decir que los ligandos se han reducido y como consecuencia han generado ROS. Esto explicaría la diferencia entre las señales de TiO_2 y TiO_2 con los ligandos. Además, el efecto de cada ligando es distinto, para Nitro 2 y N5Cu la generación de ROS es prácticamente inmediata ya que a los 5 minutos bajo luz UV ya alcanzan el máximo de intensidad de fluorescencia, mientras que en el caso de Nitro 6 la generación de ROS es mucho más progresiva. Por otro lado, vemos que cuanto mayor sea el tiempo de desoxigenación, mayor es la generación de ROS, aunque para el Nitro 2 esto no se cumpla.

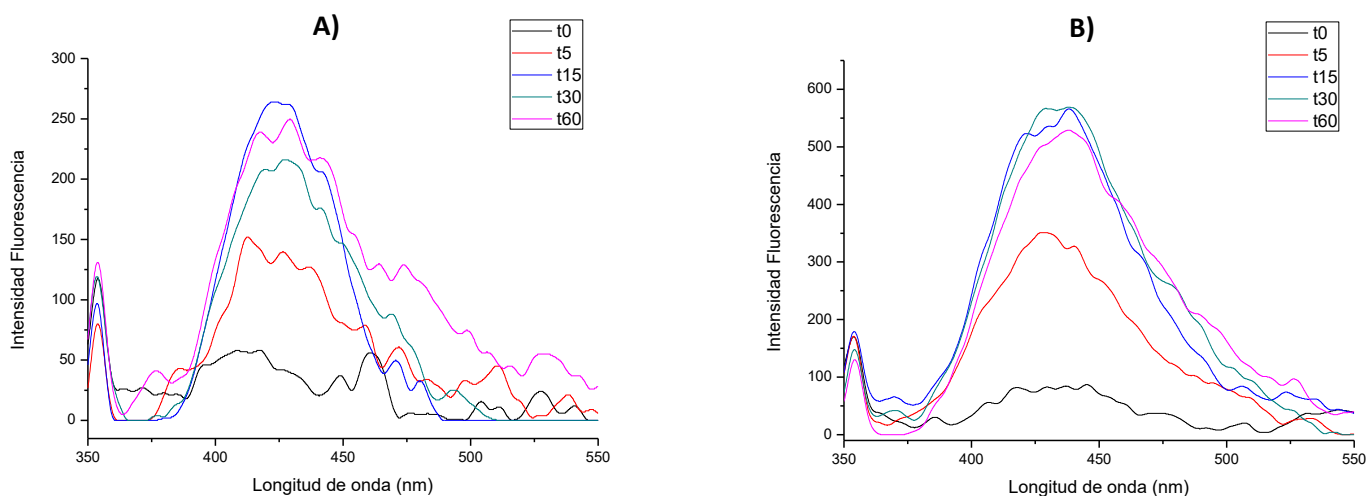


Figura 28: Espectros de Fluorescencia Nitro 6 soportado en TiO_2 . Tiempo de desoxigenación: **(A)** 5 minutos y **(B)** 15 minutos. Tiempo bajo luz UV: t0 (0 min), t5 (5 min), t15 (15 min), t30 (30 min) y t60 (60 min).

La inmovilización de los ligandos sobre nanopartículas MCM-41 pretendía estudiar la capacidad de generación de ROS por parte de los ligandos objetivo de estudio sobre un soporte inerte desde el punto de vista de la generación de ROS, y comparar estos resultados con los obtenidos en el caso del soporte de TiO_2 . Por cuestiones de tiempo no ha sido posible disponer de estos resultados en la fecha de presentación de este trabajo, pero la investigación deberá continuar y determinar este aspecto.

7. Conclusiones

Al estudiar los efectos que tenían los distintos pH sobre los ligandos se observó que los ligandos Nitro 3 y Nitro 7 presentaban cambios únicamente a pH ácido. En cambio, los ligandos Nitro 6 y Nitro 8 se ven afectados al encontrarse tanto a pH ácido como básico, llegando incluso a producirse un desplazamiento de longitud de onda para Nitro 8. Sin embargo, a pesar de los cambios, las longitudes de onda de los máximos de absorción no coinciden con los compuestos reducidos de los ligandos. Por lo que se deduce que el efecto del pH es sutil y no provoca la reducción de los ligandos.

Al simular los efectos de la hipoxia y estudiar el comportamiento de los ligandos en presencia de un reductor, se observó que los casos más interesantes son los ligandos Nitro 2, Nitro 3 y Nitro 6 junto con la glucosa como agente reductor. Lo más interesante de este experimento es que el efecto sobre los ligandos es el mismo en condiciones de hipoxia, en presencia de un reductor en contacto con el

aire o cuando tenemos los ligandos en condiciones de hipoxia y con un reductor. Los máximos de absorbancia se reducen en la mayoría de los casos, pero no aparece ninguna señal nueva o un desplazamiento de la longitud de onda significativo. Esto demuestra que el efecto de la hipoxia o la presencia de un reductor es insuficiente para la reducción del grupo nitro a grupos amino lo cual se comprobó mediante los ensayos de ninhidrina y de Biuret.

Por último, se evaluó la generación de radicales libres y al comparar los resultados de TiO_2 con los ligandos soportados sobre TiO_2 , donde se vio que la presencia de los ligandos aumentaba los niveles de ROS con respecto a TiO_2 y que además cuanto mayor fuera el tiempo de desoxigenación durante la hipoxia, más aumentaba la presencia de ROS.

Estos resultados nos indican que las condiciones de hipoxia no son suficientes para reducir los grupos nitro a grupos amino, sin embargo, si se ha detectado la presencia de ROS. Es probable que el grupo nitro se haya reducido a especie intermedia en vez de al grupo amino final, esto explicaría la generación de ROS y que no se haya detectado la presencia de grupos amino en los ensayos de la ninhidrina y del Biuret.

Los estudios llevados a cabo a lo largo de este trabajo demuestran que los ligandos objeto de estudio no tienen la capacidad de reducirse espontáneamente en las condiciones de hipoxia simulada (con la consiguiente generación de radicales libres), por lo que se descarta su potencial terapéutico como principio activo en entornos de hipoxia.

Sin embargo, sí se ha observado una mejora en la generación de ROS en sistemas complejos constituidos por los ligandos nitro 2, nitro 6 y nitro 5 Cu soportados sobre TiO_2 . A pesar de que hubiera sido deseable disponer de datos sobre la generación de ROS en sistemas constituidos por ligandos soportados sobre MCM-41 no ha sido posible por cuestión de tiempo.

Por lo tanto, esta línea de investigación deberá determinar la importancia de la naturaleza del soporte inorgánico sobre el que se anclan los ligandos, así como el efecto terapéutico en cultivos celulares.

8. Bibliografía

1. Baig N, Kammakam I, Falath W. Nanomaterials: a review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. Mater Adv. 2021;2(6):1821-71.
2. Zanella R. Metodologías para la síntesis de nanopartículas controlando forma y tamaño. MN [Internet]. 6 de marzo de 2014 [citado 26 de julio de 2023];5(1). Disponible en: <http://www.mundonano.unam.mx/ojs/index.php/nano/article/view/45167>

3. Mosquera E, Rosas N, Debut A, Hugo Guerrero V. Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de Dióxido de Titanio Obtenidas por el Método de Sol-Gel. 36(3).
4. Meulenberg RW, Lee JRI, McCall SK, Hanif KM, Haskel D, Lang JC, et al. Evidence for Ligand-Induced Paramagnetism in CdSe Quantum Dots. *J Am Chem Soc.* 27 de mayo de 2009;131(20):6888-9.
5. Saleh TA. Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities. *Environmental Technology & Innovation.* noviembre de 2020;20:101067.
6. Llinàs MC, Sánchez-García D. Nanopartículas de sílice: preparación y aplicaciones en biomedicina. 2014;
7. Emmanuel SS, Adesibikan AA, Saliu OD, Opatola EA. Greenly biosynthesized bimetallic nanoparticles for ecofriendly degradation of notorious dye pollutants: A review. *Plant Nano Biology.* febrero de 2023;3:100024.
8. Berchesi A. Desarrollo de profármacos selectivos en hipoxia para el tratamiento de tumores sólidos derivados de N5,N10-dióxido de fenazinas.
9. Vaupel P. The Role of Hypoxia-Induced Factors in Tumor Progression. *The Oncologist.* 1 de noviembre de 2004;9(S5):10-7.
10. Brown JM. The Hypoxic Cell: A Target for Selective Cancer Therapy—Eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture.
11. Denny WA. The role of hypoxia-activated prodrugs in cancer therapy. *The Lancet Oncology.* septiembre de 2000;1(1):25-9.
12. Hao N, Yang H, Li L, Li L, Tang F. The shape effect of mesoporous silica nanoparticles on intracellular reactive oxygen species in A375 cells. *New J Chem.* 11 de junio de 2014;38(9):4258.
13. Lu W, Ogasawara MA, Huang P. Models of reactive oxygen species in cancer. *Drug Discovery Today: Disease Models.* 2007;4(2):67-73.
14. Nepali K, Lee HY, Liou JP. Nitro Group Containing Drugs. *Journal of Medicinal Chemistry.*
15. Chin Chung M, Longhin Bosquesi P, Leandro Dos Santos J. A Prodrug Approach to Improve the Physico-Chemical Properties and Decrease the Genotoxicity of Nitro Compounds. *CPD.* 1 de noviembre de 2011;17(32):3515-26.
16. Kovacic P, Somanathan R. Nitroaromatic compounds: Environmental toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, therapy and mechanism: Nitro aromatic pollutants. *J Appl Toxicol.* agosto de 2014;34(8):810-24.
17. Alahmad S. Modification of Mesoporous Silica MCM-41 and its Applications- A review. *Orientjchem.* 18 de marzo de 2012;28(1):01-11.
18. Díaz-García D, Fischer-Fodor E, Vlad CI, Méndez-Arriaga JM, Prashar S, Gómez-Ruiz S. Study of cancer cell cytotoxicity, internalization and modulation of growth factors induced by transferrin-conjugated formulations of metallodrug-functionalized mesoporous silica nanoparticles. *Microporous and Mesoporous Materials.* agosto de 2021;323:111238.

19. Al-Amin M, Dey SC, Rashid TU, Shamsuddin S. Solar Assisted Photocatalytic Degradation of Reactive Azo Dyes in Presence of Anatase Titanium Dioxide.
20. Baba A, Ouahbi H, Hassine A, Sebti J, Laasri L, Sebti S. Efficient reduction of aromatic nitro compounds catalyzed by nickel chloride supported on natural phosphate. *MediterrJChem.* 28 de noviembre de 2018;7(5):317-27.
21. Jana S, Pande S, Panigrahi S, Praharaj S, Basu S, Pal A, et al. Exploitation of Electrostatic Field Force for Immobilization and Catalytic Reduction of *o*-Nitrobenzoic Acid to Anthranilic Acid on Resin-bound Silver Nanocomposites. *Langmuir.* 1 de agosto de 2006;22(16):7091-5.
22. Rajendiran N, Thulasidhasan J, Jenita MJ. Guest-Host Inclusion Complex Formation of 2-, 3-, and 4-Aminobenzoic Acids with Native and Modified Cyclodextrins. *ILCPA.* 12 de agosto de 2016;69:10-21.
23. Novo JVJ, Díaz MNA, Ruiz JAB. 11. Separación de aminoácidos por cromatografía en capa fina y detección mediante reacción con ninhidrina.
24. Medina JP, Lozano JJ. SEPARACIÓN DE AMINOÁCIDOS CONTENIDOS EN UNA MUESTRA DE YOGURT POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.
25. Moore S, Stein WH. PHOTOMETRIC NINHYDRIN METHOD FOR USE IN THE CHROMATOGRAPHY OF AMINO ACIDS. *Journal of Biological Chemistry.* octubre de 1948;176(1):367-88.
26. Martina V, Vojtech K. A COMPARISON OF BIURET, LOWRY AND BRADFORD METHODS FOR MEASURING THE EGG'S PROTEINS. 2015;
27. Hortin GL, Meilinger B. Cross-Reactivity of Amino Acids and Other Compounds in the Biuret Reaction: Interference with Urinary Peptide Measurements. *Clinical Chemistry.* 1 de agosto de 2005;51(8):1411-9.
28. Page SE, Arnold WA, McNeill K. Terephthalate as a probe for photochemically generated hydroxyl radical. *J Environ Monit.* 2010;12(9):1658.