



Universitat de les Illes Balears

**SÍNTESIS DE COMPUESTOS HÍBRIDOS NANOESTRUCTURADOS Y EVALUACIÓN DE
SU COMPORTAMIENTO SUPRAMOLECULAR Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

Tesis Doctoral

Kenia A. López Brito

2013



Universitat de les Illes Balears

Departament de Química

Àrea de Química Orgànica

**SÍNTESIS DE COMPUESTOS HÍBRIDOS NANOESTRUCTURADOS Y EVALUACIÓN DE
SU COMPORTAMIENTO SUPRAMOLECULAR Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

MEMORIA

Presentada para optar al grado de

Doctora en Ciencia y Tecnología Química

por Kenia A. López Brito

Palma de Mallorca, octubre de 2013

El Dr. Jeroni Morey Salvà, Profesor Titular del Departamento de Química y la Dra. María de las Nieves Piña Capó, colaboradora del Grupo de Química Supramolecular del Departamento de Química, de la Universitat de les Illes Balears

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado “Síntesis de compuestos híbridos nanoestructurados y evaluación de su comportamiento supramolecular y actividad biológica” ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Química (Área de Química Orgánica) de la Universitat de les Illes Balears por la Sra. Kenia A. López Brito durante los años 2009-2013, constituyendo la Memoria que presenta para optar al grado de Doctora en Ciencias Químicas.

Palma de Mallorca, 1 de octubre de 2013.

Fdo. Jeroni Morey Salvà

Fdo. M. Nieves Piña Capó

AGRADECIMIENTOS

Hace seis años, cuando comencé mi aventura en la investigación siendo todavía alumna colaboradora este día se veía muy muy lejano. Sin embargo, finalmente ha llegado y ahora me toca decir adiós.

Una tesis no refleja el trabajo de una sola persona. Es el resultado de la contribución e implicación de muchos. Es por ese motivo, que quisiera expresar, en las siguientes líneas, mi agradecimiento a todos aquellos que lo han hecho posible.

En primer lugar quiero agradecer a mis directores, el Dr. Jeroni Morey y la Dra. Neus Piña porque sin ellos todo el trabajo que presento en esta memoria no hubiera sido posible. Muchísimas gracias a ambos por todo el tiempo dedicado y por estar siempre dispuestos a ayudarme y por haberme enseñado tanto. Hoy por hoy, estoy convencida que elegirles fue mi mejor decisión porque es impensable concebir mejores directores.

Igualmente quiero extender mi agradecimiento al Grupo de Investigación Clínica y Traslacional de la UIB por colaborar con nosotros para realizar los ensayos celulares. Especialmente quiero agradecer a la Dra. Regina Alemany por dedicarme su tiempo e introducirme en el fascinante mundo “bio”.

De igual forma quiero agradecer a todo el Grupo de Química Supramolecular por todo el apoyo durante estos años y a los compañeros de laboratorio que he tenido.

También quiero agradecer al Servei Cientifictècnic de la UIB, especialmente a Rosa, Biel y Jose por estar siempre dispuestos a ayudarme.

Muchas gracias también a la Dra. Soledad Penadés por permitirme realizar mi estancia en su grupo de investigación. Fueron tres meses increíbles en los que aprendí muchísimo gracias a todos los chicos del grupo.

A los amigos que he hecho en el transcurso de estos años tanto del laboratorio como de fuera, especialmente a Elena y Gabi. Muchas gracias a ambos sobre todo por el “apoyo informático”.

Quiero agradecer también a la Conselleria d’Educació, Cultura i Universitats del Govern Balear y al Fondo Social Europeo por la beca concedida.

Finalmente agradecer a toda mi familia porque sin ellos esta aventura no hubiera sido posible.

A mis padres por estar siempre a mi lado y no dejarme desistir.

A mi pequeña Ariana por hacerme siempre sonreír.

ÍNDICE

1. Introducción y objetivos	1
1.1 Nanociencia y nanotecnología	1
1.2 Introducción a la síntesis de nanopartículas de óxidos de hierro.....	2
1.2.1 Método de coprecipitación.....	5
1.2.2 Método sol-gel	6
1.2.3 Método de síntesis hidrotérmal	8
1.2.4 Método de inyección en flujo	8
1.2.5 Método electroquímico	9
1.2.6 Método de aerosol/vapor	9
1.2.7 Método de descomposición sonoquímica	10
1.2.8 Método de nanorreactores.....	11
1.2.9 Métodos microbianos	13
1.2.10 Nuevas tendencias en la síntesis de nanopartículas.....	14
1.3 Nanopartículas de óxidos de hierro con diferentes morfologías.....	15
1.4 Estabilización de nanopartículas de óxidos de hierro	17
1.5 Introducción a las aplicaciones de nanopartículas en química supramolecular y biomedicina	19
1.6 Objetivos generales	20
2. Nanopartículas de óxidos de hierro funcionalizadas con escuaramidas como receptores en química supramolecular	21
2.1 Introducción.....	21
2.1.1 Nanopartículas como receptores de iones en química supramolecular	21
2.2 Introducción a las escuaramidas	27
2.2.1 Propiedades de las escuaramidas.....	27
2.2.2 Escuaramidas y otros derivados de ácido escuárico como receptores de iones en química supramolecular.....	30
2.3 Objetivos.....	38
2.4 Síntesis y caracterización de nanopartículas de óxidos de hierro funcionalizadas con restos escuaramídicos	40
2.4.1 Síntesis de escuaramidas	43
2.4.2 Síntesis de diescuaramidas (C1-C4).....	45
2.4.3 Síntesis de bis-diescuaramidas (C5-C11).....	48
2.4.4 Síntesis de nanopartículas de óxidos de hierro funcionalizadas con escuaramidas.....	52

2.4.5 Caracterización de diescuaramidas y bis-diescuaramidas.....	54
2.4.6 Caracterización de nanopartículas de óxidos de hierro por FT-IR.....	57
2.4.7 Caracterización de nanopartículas de óxidos de hierro funcionalizadas con diescuaramidas y bis-diescuaramidas por FT-IR.....	57
2.5 Estudio de la complejación selectiva de carboxilatos a nanopartículas funcionalizadas con escuaramidas en H ₂ O	61
2.6 Estudio de nanopartículas funcionalizadas con escuaramidas para la eliminación de iones de metales pesados en H ₂ O	75
2.7 Conclusiones.....	98
2.8 Parte experimental.....	101
2.8.1 Métodos generales	101
2.8.2 Síntesis de escuaramidas	102
2.8.2.1 Síntesis de la diescuaramida C1	102
2.8.2.2 Síntesis de la diescuaramida C2	102
2.8.2.3 Síntesis de la diescuaramida C3	103
2.8.2.4 Síntesis de la diescuaramida C4	104
2.8.2.5 Síntesis de la diescuaramida C4 a partir de C2	104
2.8.2.6 Síntesis de la bis-escuaramida 2.27	105
2.8.2.7 Síntesis de la bis-escuaramida 2.28	106
2.8.2.8 Síntesis de la bis-escuaramida 2.29	106
2.8.2.9 Síntesis de la bis-escuaramida 2.30	107
2.8.2.10 Síntesis de la bis-escuaramida 2.31	107
2.8.2.11 Síntesis de la bis-escuaramida 2.32	108
2.8.2.12 Síntesis de la bis-diescuaramida C5	109
2.8.2.13 Síntesis de la bis-diescuaramida C6	109
2.8.2.14 Síntesis de la bis-diescuaramida C7	110
2.8.2.15 Síntesis de la bis-diescuaramida C8	111
2.8.2.16 Síntesis de la bis-diescuaramida C9	112
2.8.2.17 Síntesis de la bis-diescuaramida C10	112
2.8.2.18 Síntesis de la bis-diescuaramida C11	113
2.8.2.19 Síntesis de la semiescuaramida 2.39	114
2.8.2.20 Síntesis de la diescuaramida C12	114
2.8.2.21 Síntesis de la diescuaramida C13	115
2.8.3 Síntesis de nanopartículas de Fe ₃ O ₄	116
2.8.4 Síntesis de nanopartículas de Fe ₃ O ₄ funcionalizadas con escuaramidas	116
2.8.4.1 Síntesis de NP-C1	116
2.8.4.2 Síntesis de NP-C2	116
2.8.4.3 Síntesis de NP-C3	116

2.8.4.4 Síntesis de NP-C4	117
2.8.4.5 Síntesis de NP-C5	117
2.8.4.6 Síntesis de NP-C6	117
2.8.4.7 Síntesis de NP-C7	118
2.8.4.8 Síntesis de NP-C8	118
2.8.4.9 Síntesis de NP-C9	118
2.8.4.10 Síntesis de NP-C10	118
2.8.4.11 Síntesis de NP-C11	119
2.8.4.12 Síntesis de NP-C12	119
2.8.5 Ensayos por fluorescencia.....	120
2.8.6 Ensayos por ¹ H-RMN	120
2.8.6.1 Estimación del número de cadenas de escuaramidas sobre la superficie de las nanopartículas	120
2.8.6.2 Cuantificación de carboxilatos retenidos por nanopartícula	122
2.8.6.3 Valoraciones de C13 con Hg ²⁺ y Pb ²⁺	122
2.8.7 Ensayos por ITC	122
2.8.8 Ensayos por cromatografía iónica.....	123
2.8.9 Ensayos para la determinación de Hg ²⁺ por la técnica de vapor frío	123
2.8.10 Ensayos para la determinación de cationes metálicos por ICP-OES.....	123
2.8.11 Ensayos por RMN: ¹⁹⁹ Hg-RMN y ²⁰⁷ Pb-RMN	123
2.8.12 Ensayos por HRMS-ESI(+)	123
2.8.13 Ensayos por MALDI/TOF	124

3. Nanopartículas de óxidos de hierro como transportadores de antifolatos.....125

3.1 Nanopartículas como transportadores de fármacos	125
3.2 Nanopartículas como transportadores de fármacos antineoplásicos.....	128
3.3 Nanopartículas de óxidos de hierro como transportadores de antifolatos.....	134
3.4 Objetivos.....	138
3.5 Estrategia de inclusión vs unión covalente en el transporte de antifolatos a través de nanopartículas de óxidos de hierro.....	140
3.6 Conclusiones.....	159
3.7 Parte experimental	162
3.7.1 Métodos generales	162
3.7.2 Síntesis de nanopartículas de Fe ₃ O ₄	162

3.7.3 Síntesis de nanopartículas de Fe ₃ O ₄ funcionalizadas	162
3.7.3.1 Síntesis de NP-APTES	162
3.7.3.2 Síntesis de NP-APTES-RTX y NP-APTES-PTX	163
3.7.3.3 Síntesis de NP-DMSA	163
3.7.3.4 Síntesis de NP-DMSA-C2 y NP-DMSA-C4	163
3.7.4 Ensayos por HPLC.....	164
3.7.4.1 Estimación de la cantidad de RTX y PTX unido covalentemente a NP-APTES-RTX y NP-APTES-PTX	164
3.7.4.2 Cuantificación de RTX y PTX liberado de NP-APTES-RTX y NP-APTES-PTX	164
3.7.4.3 Cuantificación de RTX, PTX y MTX retenido por NP-DMSA-C2 y NP-DMSA-C4	165
3.7.4.4 Cuantificación de RTX, PTX y MTX liberado por NP-DMSA-C2 y NP-DMSA-C4	165
3.7.5 Cultivos celulares y viabilidad	165
3.7.5.1 Cultivos celulares y tratamientos.....	165
3.7.5.2 Ensayos de viabilidad celular	166
3.7.5.3 Captación intracelular de NP-APTES-RTX y NP-APTES-PTX	166
4. Conclusiones generales	167
5. Resumen bibliografía	169
6. Colección de espectros	185

PRINCIPALES ABREVIATURAS

AFM	Microscopía de fuerzas atómicas
APTES	3-aminopropiltriétoxosilano
A549	Línea celular humana de adenocarcinoma de pulmón
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CH ₃ CN	Acetonitrilo
CHCl ₃	Cloroformo
¹³ C-RMN	Resonancia magnética nuclear de ¹³ C
DLS	Dynamic Light Scattering
DMF	Dimetilformamida
DMSA	Ácido meso 2,3-dimercaptosuccínico
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDX	Espectrometría de dispersión de energía de rayos X
EM	Espectrometría de masas
Et ₂ O	Éter dietílico
EtOH	Etanol
FA	Ácido fólico
FR	Receptores de folato
FT-IR	Espectroscopía Infrarroja
HPLC	Cromatografía líquida a alta presión
HRMS-ESI	Espectrometría de masas de alta resolución
¹ H-RMN	Resonancia magnética nuclear de ¹ H
MALDI	Desorción/Ionización Láser asistida por Matriz
MeI	Yoduro de metilo
MeOH	Metanol
MTX	Metotrexato
NP	Nanopartícula(s)
PBS	Tampón fosfato salino
ppm	Partes por millón
PTX	Pemetrexed
RTX	Raltitrexed
RX	Espectroscopía de rayos X
t. a.	Temperatura ambiente
TEM	Microscopio de transmisión electrónica

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA

La observación de la materia a escala molecular y la capacidad de manipularla a este nivel ha despertado un gran interés en todas las áreas de la ciencia debido principalmente, al hecho de que muchos materiales a esta escala muestran diferentes propiedades ópticas, eléctricas, físicas y químicas. Así la observación, manipulación y utilización de los materiales en la escala en la que el comportamiento cuántico y comportamiento clásico comienzan a solaparse puede ser considerada como nanociencia.¹

Generalmente el prefijo nano se aplica a la escala comprendida entre 1-1000 nm y las principales definiciones de nanotecnología se suelen referir a esta escala de longitud. Sin embargo, para ciertas funciones esta definición se ha mejorado acotando dicha escala a un límite máximo de 100 nm. La "regla de 1 a 100 nm" propone definir a una nanopartícula como cualquier partícula generada intencionadamente donde alguna de sus dimensiones esté comprendida entre 1-100 nm, y sus propiedades no sean compartidas por partículas con la misma composición química fuera de la escala nanométrica.²

De acuerdo con el programa de "National Nanotechnology Initiative" (Iniciativa Nacional de Nanotecnología) de los Estados Unidos, la nanotecnología se refiere a la investigación y desarrollo tecnológico a nivel atómico, molecular o macromolecular, en el rango de 1 a 100 nm, para proporcionar una comprensión fundamental de los fenómenos y materiales en la nanoescala, y por otra parte, crear y usar estructuras, dispositivos y sistemas con propiedades y funciones novedosas debido a sus tamaños. La investigación y desarrollo de la nanotecnología incluye la manipulación controlada de sus estructuras y su integración en componentes, sistemas y arquitecturas de mayor tamaño.¹

Actualmente un gran número de publicaciones están relacionadas con la nanotecnología. El desarrollo investigativo en áreas como física, química, ingeniería, ciencia de materiales, electroquímica, metalúrgica, ciencia de polímeros, entre otros, convierten a la nanotecnología en una prometedora ciencia multidisciplinar.³

¹ V. R. Devadasu, V. Bhardwaj, M. N. V. R. Kumar, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 1686-1735.

² M. Auffan, J. Rose, J.-Y. Bottero, G. V. Lowry, J.-P. Jolivet, M. R. Wiesner, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 634-641.

³ (a) A. Mogoutov, B. Kahane, *Res. Policy* **2007**, *36*, 893-903; (b) A. Porter, J. Youtie, P. Shapira, D. Schoeneck, *J. Nanopart. Res.* **2008**, *10*, 715-728; (c) C. Huang, A. Notten, N. Rasters, *J. Technol. Transfer* **2011**, *36*, 145-172.

1.2 INTRODUCCIÓN A LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE HIERRO

La nanotecnología, tal como se ha comentado anteriormente, ha revolucionado todas las áreas de la ciencia y se ha convertido en una palabra clave de interés público por los avances implicados tanto a nivel social como económico en su desarrollo. Hoy por hoy, forma parte de nuestra vida diaria y el impacto tecnológico que llegará a tener en un futuro aún se desconoce dado que afecta aspectos de la vida humana que van desde materiales de construcción novedosos a electrónica, cosméticos, productos farmacéuticos y medicina.⁴

En los últimos años, las nanopartículas han comenzado a considerarse los componentes más importantes de la nanotecnología. El rango actual de nanopartículas existentes va desde relativamente simples nanopartículas de óxido de titanio, utilizadas en protectores solares, hasta sistemas de nanopartículas altamente complejos tales como nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro recubiertas con múltiples funcionalidades utilizadas como sistemas para el transporte y administración de fármacos.⁵ Todas estas nanopartículas artificiales y de ingeniería tienen un nexo común: sus características químicas, físicas y biológicas difieren considerablemente de las propiedades de los materiales macroscópicos. Por ejemplo, los óxidos de hierro ferromagnéticos tales como magnetita y maghemita pierden su magnetización permanente si sus diámetros son inferiores a 30 nm.⁶ Por lo tanto, pueden ser considerados como materiales totalmente nuevos cuyo impacto toxicológico en los seres humanos y en el medio ambiente no se conoce todavía en detalle.

Dentro de las nanopartículas de óxidos de hierro, la magnetita (Fe_3O_4) y maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) son las más representativas y han recibido una considerable atención en campos como la medicina o la farmacia debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad.⁷

Estos coloides de nanoferritas se caracterizan por tener una estructura cristalina de espinela donde los iones de oxígeno forman el empaquetamiento cúbico compacto y los iones de hierro se sitúan en los intersticios tetraédricos (Td) y octaédricos (Oh). En la estructura de la magnetita, los cationes Fe^{2+} ocupan sólo posiciones Oh, mientras que los iones Fe^{3+} se distribuyen entre las posiciones Td y Oh (ecuación 1.1). La estructura de la maghemita sólo presenta iones Fe^{3+} que se distribuyen entre los huecos Td y Oh

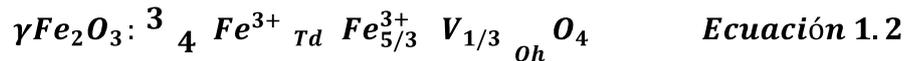
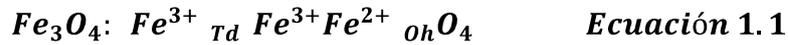
⁴ A. D. Maynard, *Ann. Occup. Hyg.* **2007**, *51*, 1-12.

⁵ (a) P. Guo, O. Coban, N. M. Snead, J. Trebley, S. Hoerich, S. Guo, Y. Shu, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 650-666; (b) E. L. Romero, M. J. Morilla, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 576-588; (c) K. R. Vega-Villa, J. K. Takemoto, J. A. Yáñez, C. M. Remsberg, M. L. Forrest, N. M. Davies, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 929-938; (d) A. Petri-Fink, M. Chastellain, L. Juillerat-Jeanneret, A. Ferrari, H. Hofmann, *Biomaterials* **2005**, *26*, 2685-2694.

⁶ M. Mahmoudi, A. S. Milani, P. Stroeve, *Int. J. Biomed. Nanosci. Nanotechnol.* **2010**, *1*, 164-201.

⁷ (a) C. Sun, J. S. H. Lee, M. Zhang, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1252-1265; (b) V. I. Shubayev, T. R. Pisanic, S. Jin, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 467-477; (c) A. K. Gupta, M. Gupta, *Biomaterials* **2005**, *26*, 3995-4021; (d) J. D. G. Durán, J. L. Arias, V. Gallardo, A. V. Delgado, *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 2948-2983.

(ecuación 1.2). La diferencia entre ambas estructuras radica en la presencia de vacantes (V) en los huecos Oh de esta última estructura. Estas vacantes pueden distribuirse totalmente al azar, parcial o completamente ordenadas. Se ha demostrado a través de la combinación de Espectroscopía infrarroja (FT-IR) y Difracción de rayos X (RX) que sólo en las nanopartículas cuyos tamaños exceden los 5 nm se observa un ordenamiento en dichas vacantes.⁸



La magnetización de las nanopartículas de Fe_3O_4 surge del acoplamiento antiferromagnético entre los iones Fe^{3+} en los intersticios Oh y Td, dejando los momentos magnéticos de los iones Fe^{2+} , en posiciones Oh, como los responsables de la magnetización de la celda unidad.

El creciente interés en este tipo de materiales ha permitido el desarrollo de diversas metodologías sintéticas. La síntesis de nanopartículas (NP) superparamagnéticas es un proceso complejo debido a la naturaleza coloidal de las mismas. El principal reto químico consiste en definir las condiciones experimentales apropiadas para generar una población de nanopartículas monodispersas de un tamaño determinado. El segundo punto crítico recae en la selección de un proceso reproducible y que permita ser industrializado sin la necesidad de llevar a cabo procesos de purificación complejos.⁹

Las principales vías de síntesis propuestas para la preparación de NP de Fe_3O_4 se resumen en tres categorías:

1. Métodos físicos como la deposición en fase gaseosa o la litografía de haz de electrones. El principal inconveniente de estos métodos es la imposibilidad para controlar el tamaño de las partículas y mantenerlas en la escala nanométrica.¹⁰

⁸ M. P. Morales, S. Veintemillas-Verdaguer, M. Montero, C. J. Serna, A. Roig, L. Casas, B. Martínez, F. Sadiumenge, *Chem. Mater.* **1999**, *11*, 3058-3064.

⁹ (a) C. E. Sjogren, C. Johansson, A. Naevestad, P. C. Sontum, K. Briley-Saebo, A. K. Fahlvik, *Magn. Reson. Imaging* **1997**, *15*, 55-67; (b) A. C. Nunes, Z. C. Yu, *J. Magn. Magn. Mater.* **1987**, *65*, 265-268; (c) S. Thurm, S. Odenbach, *J. Magn. Magn. Mater.* **2002**, *252*, 247-249; (d) L. Babes, B. Denizot, G. Tanguy, J. J. Le Jeune, P. Jallet, *J. Colloid Interface Sci.* **1999**, *212*, 474-482.

¹⁰ (a) J. G. King, W. Williams, C. D. W. Wilkinson, S. McVitie, J. N. Chapman, *Geophys. Res. Lett.* **1996**, *23*, 2847-2850; (b) A. Rishton, Y. Lu, R. A. Altman, A. C. Marley, C. Bian, R. Viswanathan, G. Xiao, W. J. Gallagher, S. S. P. Parkin, *Microelectron. Eng.* **1997**, *35*, 249-252; (c) C. S. Lee, H. Lee, R. M. Westervelt, *Appl. Phys. Lett.* **2001**, *79*, 3308-3310; (d) S. Mathur, S. Barth, U. Werner, F. Hernández-Ramírez, A. Romano-Rodríguez, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 1550-1554.

1. Introducción y objetivos

2. Métodos químicos como la síntesis sol-gel,¹¹ el método de coprecipitación,¹² las reacciones hidrotermales,¹³ la síntesis por inyección en flujo,¹⁴ el método electroquímico,¹⁵ el método de aerosol/vapor,¹⁶ las reacciones de descomposición sonoquímica,¹⁷ y la síntesis usando nanorreactores.¹⁸
3. Métodos microbianos, que son generalmente simples, versátiles y eficientes con un control apreciable sobre la composición y geometría de las nanopartículas resultantes.¹⁹

Alternativamente, se ha despertado un gran interés por el desarrollo de óxidos de hierro dopados con otros metales donde las propiedades magnéticas se ven mejoradas. Como consecuencia, se han propuesto varios métodos para la síntesis de estos óxidos mixtos de tipo MFe_2O_4 , donde M puede ser Mn, Fe, Zn, Ni, Co, etc.²⁰

Los métodos sintéticos químicos se han convertido en los más utilizados en las diferentes investigaciones. Algunos de éstos se han desarrollado en gran medida ofreciendo como ventajas la capacidad para modular a medida las características de las nanopartículas preparadas. Sin embargo, el método clásico de coprecipitación continúa siendo el más común para la síntesis de nanopartículas de magnetita.

¹¹ (a) G. M. da Costa, E. de Grave, P. M. A. de Bakker, R. E. J. Vandenberghe, *Solid State Chem.* **1994**, *113*, 405-412; (b) H. Itoh, T. Sugimoto, *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *265*, 283-295.

¹² (a) R. Massart, *IEEE Trans. Magn.* **1981**, *17*, 1247-1248; (b) J. H. Wu, S. P. Ko, H. L. Liu, S. Kim, J. S. Ju, Y. K. Kim, *Mater. Lett.* **2007**, *61*, 3124-3129.

¹³ (a) Y. B. Kholam, S. R. Dhage, H. S. Potdar, S. B. Deshpande, P. P. Bakare, S. D. Kulkarni, S. K. Date, *Mater. Lett.* **2002**, *56*, 571-577; (b) F. Chen, Q. Gao, G. Hong, J. Ni, *J. Magn. Magn. Mater.* **2008**, *320*, 1775-1780.

¹⁴ G. Salazar-Álvarez, M. Muhammed, A. A. Zagorodni, *Chem. Eng. Sci.* **2006**, *61*, 4625-4633.

¹⁵ (a) L. Cabrera, S. Gutiérrez, N. Menéndes, M. P. Morales, P. Herrasti, *Electrochem. Acta* **2008**, *53*, 3436-3441; (b) R. F. C. Marques, C. García, P. Lecante, J. L. Ribeiro, L. Noé, N. J. O. Silva, V. S. Amaral, A. Millan, M. Verelst, *J. Magn. Magn. Mater.* **2008**, *320*, 2311-2315.

¹⁶ R. Strobel, S. E. Pratsinis, *Adv. Powder Technol.* **2009**, *20*, 190-194.

¹⁷ (a) N. Enomoto, J. Akagi, Z. Nakagawa, *Ultrason. Sonochem.* **1996**, *3*, S97-S103; (b) F. Dang, N. Enomoto, J. Hojo, K. Enpuku, *Ultrason. Sonochem.* **2009**, *16*, 649-654.

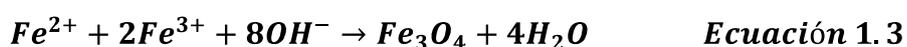
¹⁸ (a) M. Breulmann, H. Colfen, H. P. Hentze, M. Antonietti, D. Walsh, S. Mann, *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 237-241; (b) M. A. Bakar, W. L. Tan, N. H. H. A. Bakar, *J. Magn. Magn. Mater.* **2007**, *314*, 1-6.

¹⁹ (a) J. W. Moon, Y. Roh, R. J. Lauf, H. Vali, L. W. Yearly, T. J. Phelps, *J. Microbiol. Methods* **2007**, *70*, 150-158; (b) J. W. Moon, C. J. Rawn, A. J. Rondinone, L. J. Love, Y. Roh, S. M. Everett, R. J. Lauf, T. J. Phelps, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *37*, 1023-1031.

²⁰ (a) X. M. Liu, G. Yang, S. Y. Fu, *Mater. Sci. Eng. C* **2007**, *27*, 750-755; (b) J. L. Gunjekar, A. M. More, V. R. Shinde, C. D. Lokhande, *J. Alloys Compd.* **2008**, *465*, 468-473; (c) K. P. Naidek, F. Bianconi, T. C. R da Rocha, D. Zanchet, J. A. Bonacin, M. A. Novak, M. G. F. Vaz, H. Winnischofer, *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *358*, 39-46.

1.2.1 MÉTODO DE COPRECIPITACIÓN

El método de coprecipitación es la vía química más simple y eficiente para sintetizar nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro con diámetros medios típicamente por debajo de 50 nm.²¹ La reacción se lleva a cabo en medio acuoso donde se produce la nucleación y el crecimiento de los núcleos de hidróxido de hierro. El procedimiento sintético se basa en la precipitación de hidróxidos férricos y ferrosos mediante la adición de una base (por ejemplo, NH₄OH o NaOH) a una disolución de sales de Fe³⁺ y Fe²⁺ (ecuación 1.3). De acuerdo con la termodinámica de esta reacción, la completa precipitación de Fe₃O₄ se produce a un pH entre 8 y 14 con una relación estequiométrica (Fe³⁺/Fe²⁺) 2:1 en un medio en ausencia de oxígeno.



La magnetita no es un material muy estable. Es sensible a la oxidación por lo que en presencia de oxígeno se transforma fácilmente en maghemita.²² Por este motivo, al llevar a cabo la síntesis de este tipo de NP a través de este método, se hace necesaria la estabilización de las mismas calentando el precipitado obtenido en presencia de surfactantes, como por ejemplo el ácido oleico.

La principal desventaja de este método es la dificultad para obtener nanopartículas en un rango de tamaños acotados. Para obtener nanopartículas de óxido de hierro con un determinado diámetro, capacidad de respuesta magnética, y propiedades superficiales, es necesario controlar todas las condiciones experimentales que afectan a estas características y que son: la mezcla estequiométrica de sales ferrosas y férricas en el medio acuoso, la fuerza iónica y el pH del medio, la presencia de oxígeno, los flujos de inyección, el tipo de sales utilizadas (percloratos, cloruros, sulfatos o nitratos), la temperatura, la naturaleza y concentración del medio alcalino y el agente surfactante empleado para la estabilización.²¹

Controlando todos los factores mencionados anteriormente se pueden llegar a obtener NP con una distribución de tamaños pequeña tal como se muestra en la imagen de TEM (Microscopio de Transmisión Electrónica) de la Figura 1.1. Estas nanopartículas preparadas por Delgado^{21b} a través del método de coprecipitación presentan tamaños uniformes y acotados en un rango definido.

²¹ (a) M. T. López-López, J. D. G. Durán, A. V. Delgado, F. González-Caballero, *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *291*, 144-151; (b) J. L. Viota, J. D. G. Durán, F. González-Caballero, A. V. Delgado, *J. Magn. Magn. Mater.* **2007**, *314*, 80-86.

²² J. P. Jolivet, C. Chaneac, E. Tronc, *Chem. Commun.* **2004**, *5*, 481-483.

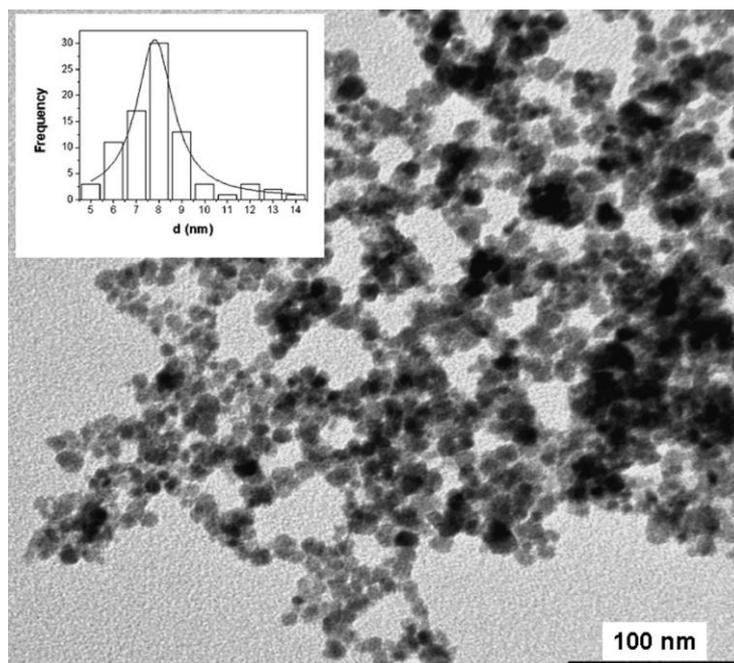


Fig. 1.1. Imagen de TEM de nanopartículas de óxidos de hierro preparadas por el método de coprecipitación.

1.2.2 MÉTODO SOL-GEL

El método sol-gel se basa en la hidroxilación y la condensación de precursores moleculares en disolución, originando un "sol" de partículas nanométricas. La posterior condensación y polimerización inorgánica del sol conducen a la obtención de un gel formado por una red tridimensional del óxido metálico. Debido a que estas reacciones se realizan a temperatura ambiente se hace necesario un tratamiento térmico final para alcanzar un estado cristalino.²³

A partir de investigaciones previas descritas en bibliografía, se ha comprobado que las propiedades del gel dependen de la estructura creada en la etapa previa. Los principales parámetros que influyen en la cinética, las reacciones de crecimiento, la hidrólisis, las reacciones de condensación y, por consiguiente, la estructura y las propiedades del gel son, el disolvente, la temperatura, la naturaleza y concentración de las sales precursoras utilizadas, el pH, y agitación.²⁴

La principal ventaja que ofrece este método es que se puede controlar adecuadamente tanto la estructura de las NP como sus tamaños. Como muestra de esto, en la Figura 1.2 se presentan las imágenes de TEM de nanopartículas uniformes de magnetita y maghemita con diferentes formas preparadas por Sugimoto^{11b} a través de este método.

²³ X. Q. Liu, S. W. Tao, Y. S. Shen, *Sens. Actuators A* **1997**, *40*, 161-165.

²⁴ C. Cannas, D. Gatteschi, A. Musinu, G. Piccaluga, C. Sangregorio, *J. Phys. Chem.* **1998**, *102*, 7721-7726.

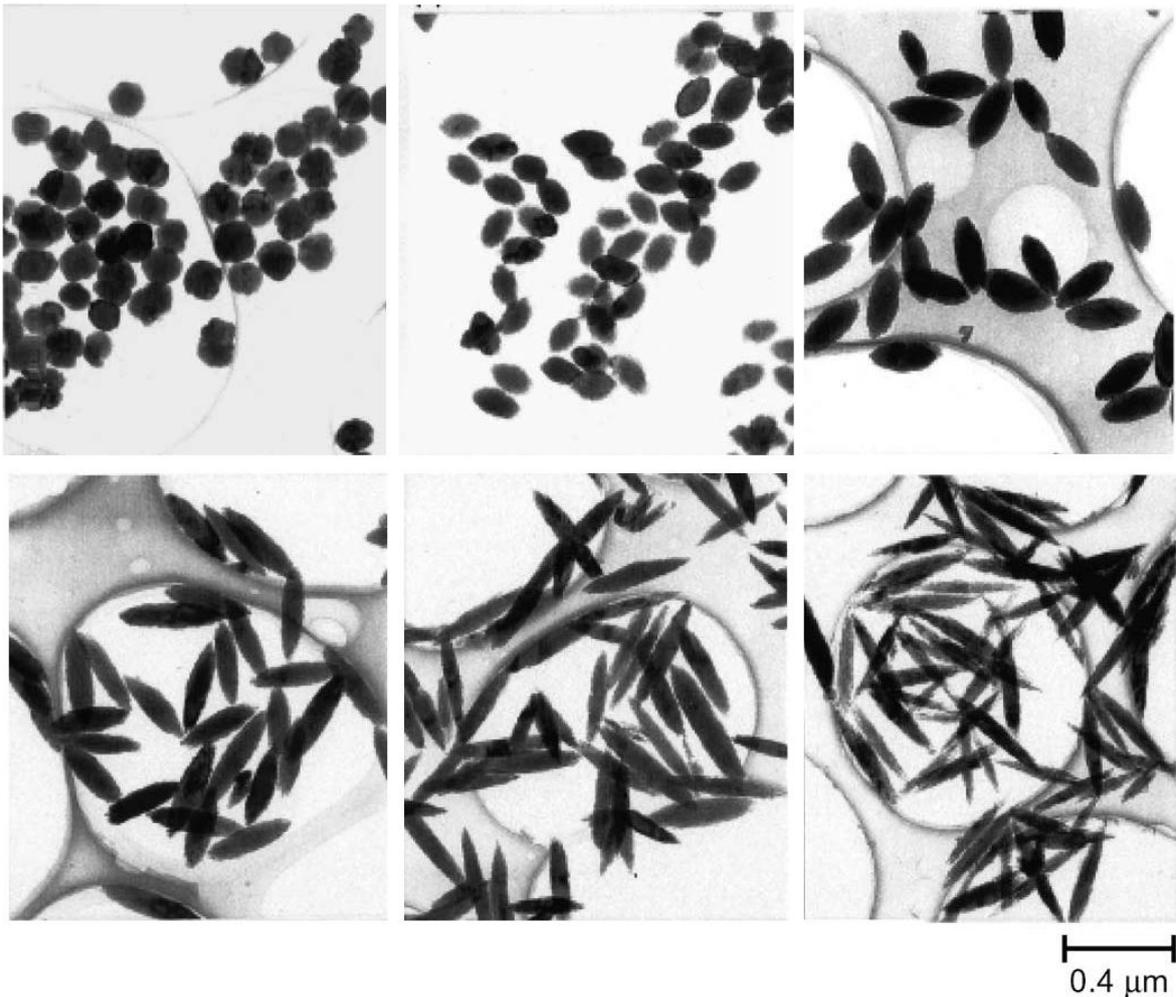


Fig. 1.2. Imágenes de TEM de nanopartículas de óxidos de hierro con diferentes formas preparadas por el método sol-gel.

El procedimiento sintético puede optimizarse fácilmente incorporando surfactantes a la fase de la disolución. De esta forma se pueden controlar las etapas de nucleación y crecimiento cristalino además de evitar la agregación de las partículas insolubles dando como resultado una dispersión de nanopartículas estabilizada. Sin embargo, el uso de surfactantes puede modificar la morfología y la carga superficial de dichas nanopartículas a pesar de que la estructura cristalina no se vea afectada.²⁵ De forma alternativa se sugirió el uso de polioles, por ejemplo, mono, di, tri, o poli (etilenglicol), propilenglicol, etc., para controlar el crecimiento de las NP asegurando un alto grado de cristalinidad y para evitar la agregación de las mismas. En este caso la formación de las nanopartículas se produce cuando el precursor del metal se suspende en el poliol y se calienta hasta su punto de ebullición, bajo agitación constante. Los polioles generalmente ofrecen propiedades atractivas: actúan como disolventes para los compuestos inorgánicos debido a sus elevadas constantes dieléctricas y ofrecen un amplio rango de temperaturas de funcionamiento para la preparación de compuestos inorgánicos debido a sus puntos de

²⁵ K. Byrappa, S. Ohara, T. Adschiri, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 299-327.

ebullición relativamente altos.²⁶ Por último, la adición de pequeñas cantidades de sales de Ag o Pt facilita la formación de partículas de tamaños pequeños lo cual favorece una nucleación heterogénea.²⁷

1.2.3 MÉTODO DE SÍNTESIS HIDROTERMAL

El método de síntesis hidrotérmal permite sintetizar nanopartículas magnéticas en medios acuosos dentro de reactores o autoclaves a alta temperatura y presión.²⁸ Las altas temperaturas aceleran la nucleación y el crecimiento de las partículas recién formadas, lo cual conlleva a la formación de nanopartículas de tamaños pequeños.

Esta técnica permite controlar la geometría de las nanopartículas optimizando parámetros experimentales tales como el tiempo de reacción, la temperatura, la concentración de reactivos y su estequiometría, el tipo de disolvente y la adición de agentes de nucleación.

Un ejemplo son los nanocristales dodecaédricos de magnetita preparados por Ni^{12b} utilizando FeCl₂ y ácido etilendiaminotetraacético (AEDT) como reactivos, mostrados en las imágenes de SEM (Microscopio de Barrido Electrónico) de la Figura 1.3.

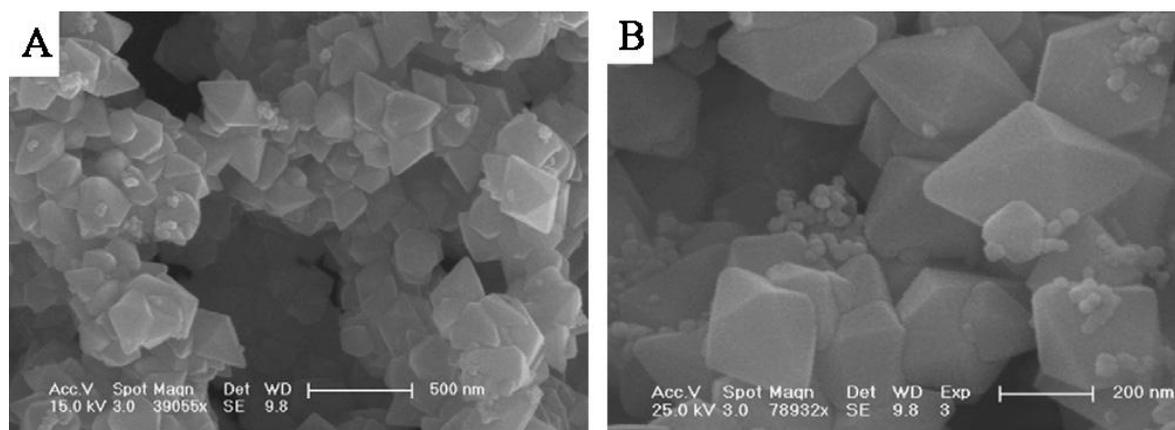


Fig. 1.3. Imágenes de SEM de nanocristales dodecaédricos de magnetita obtenidos a 180 °C tras 10 h de reacción.

1.2.4 MÉTODO DE INYECCIÓN EN FLUJO

La síntesis por inyección en flujo consiste en una mezcla continua o segmentada de los reactivos bajo un régimen de flujo laminar en un reactor capilar. Esta técnica, desarrollada por Salazar-Álvarez¹⁴ presenta ventajas significativas, tales como una buena reproducibilidad, una alta homogeneidad de la mezcla y un control preciso del proceso.

²⁶ (a) C. Feldmann, H. O. Jungk, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 359-362; (b) J. Ding, K. Tao, J. Li, S. Song, K. Sun, *Colloids Surf. B* **2010**, *79*, 184-192; (c) C. Cheng, F. Xu, H. Gu, *New J. Chem.* **2011**, *35*, 1072-1079.

²⁷ (a) P. Toneguzzo, G. Viau, O. Acher, F. Fiévet-Vincent, F. Fiévet, *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 1032-1035; (b) G. Viau, F. Fiévet-Vincent, F. Fiévet, *J. Mater. Chem.* **1996**, *6*, 1047-1056.

²⁸ S. Ge, X. Shi, K. Sun, C. Li, J. R. Baker, M. M. B. Holl, B. G. Orr, *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 13593-13599.

Como ejemplo, en la Figura 1.4 se presenta una imagen de TEM de las nanopartículas de Fe_3O_4 preparadas utilizando este método y su respectiva distribución de tamaños en el rango de 2-7 nm.

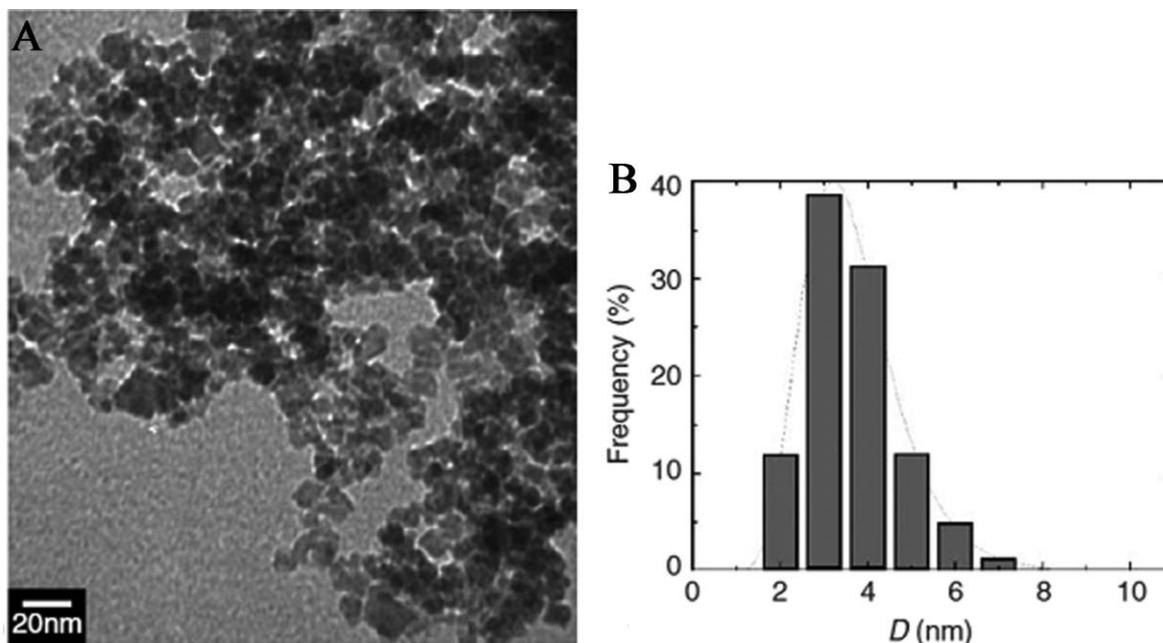


Fig. 1.4. (A) Imagen de TEM de nanopartículas de Fe_3O_4 sintetizadas por el método de inyección en flujo y (B) su respectiva distribución de tamaños.

1.2.5 MÉTODO ELECTROQUÍMICO

El método electroquímico, llevado a cabo bajo condiciones de oxidación también se puede utilizar para sintetizar nanopartículas de óxidos de hierro.¹⁵ Basándose en un método electroquímico previo, Favier²⁹ preparó nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ y Fe_3O_4 , de diámetros comprendidos en el rango de 3-8 nm, a partir de un ánodo de hierro y una lámina de platino como cátodo, utilizando una disolución de bromuro de tetraoctilamonio en *N,N*-dimetilformamida (DMF) como el electrolito de soporte. Las NP resultantes se estabilizaron utilizando un surfactante catiónico. El control de los tamaños de las partículas se consiguió fácilmente variando la densidad de corriente.

1.2.6 MÉTODO DE AEROSOL/VAPOR

En este método una disolución de sales férricas y un agente reductor conjuntamente en un disolvente orgánico se pulveriza en sobre un sustrato. Tras la evaporación del disolvente orgánico, las finas gotas resultantes se transforman en nanopartículas cuyo tamaño depende del tamaño de las gotas iniciales. De esta forma se han obtenido NP de

²⁹ C. Pascal, J. L. Pascal, F. Favier, M. L. Elidrissi Moubtassim, C. Payen, *Chem. Mater.* **1999**, *11*, 141-147.

maghemita con tamaños entre 5 y 60 nm con diferentes formas según la sal de hierro precursora.³⁰

Siguiendo esta metodología Pratsinis¹⁶ ha sintetizado nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemita), Fe_3O_4 (magnetita) y FeO (wustita) en atmósfera controlada a través de un proceso escalable. En la Figura 1.5 se presentan las imágenes de TEM de diferentes nanopartículas de óxidos de hierro preparadas modificando las condiciones de la llama.

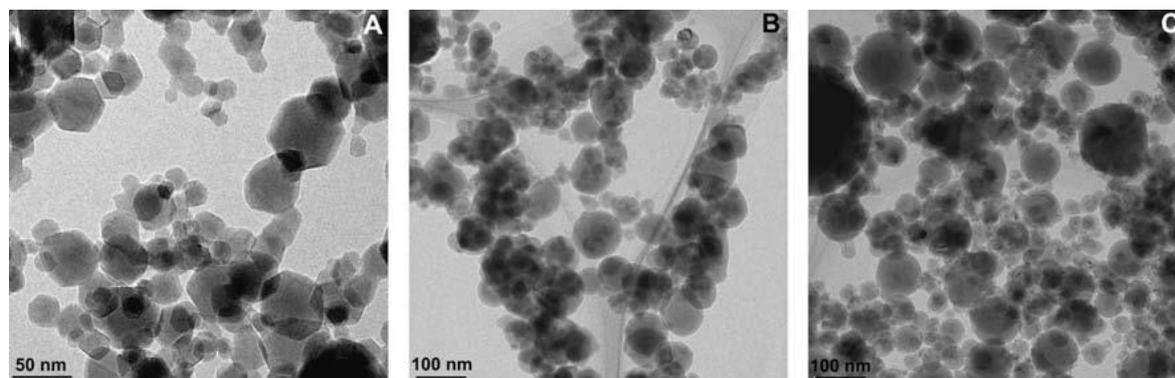


Fig. 1.5. Imágenes de TEM de (A) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, (B) Fe_3O_4 y (C) una mezcla de Fe_3O_4 y FeO preparadas por el método de aerosol/vapor.

1.2.7 MÉTODO DE DESCOMPOSICIÓN SONOQUÍMICA

La también llamada técnica de sonólisis facilita la formación de nanopartículas de óxidos de hierro con una distribución de tamaños estrecha a partir de un precursor organometálico.³¹ A partir de un complejo de hierro, como el acetato de hierro (III), en agua doblemente destilada y en ausencia de oxígeno se pueden sintetizar NP de Fe_3O_4 con diámetros aproximados de 10 nm. Las correspondientes NP se obtienen irradiando la disolución con ultrasonidos de alta intensidad bajo atmósfera de argón y temperatura ambiente durante al menos 3 h.³² El control sobre el tamaño de las partículas se puede conseguir cambiando el precursor utilizado o variando la temperatura. En este último caso, las nanopartículas pueden ser generadas tras someter un complejo de hierro (como por ejemplo, $\text{Fe}(\text{CO})_5$) en un disolvente orgánico (por ejemplo, tolueno) a una temperatura muy elevada manteniendo la irradiación con ultrasonidos. Este proceso, denominado descomposición térmica, permite la conversión de la sal ferrosa en nanopartículas de Fe_3O_4 . En esta síntesis se utilizan estabilizadores como oleilamina y ácido oleico los cuales, además, funcionalizan la superficie de las NP.

En el año 2002, Sun³³ describió la síntesis de nanopartículas de Fe_3O_4 monodispersas utilizando una variante del método de descomposición térmica descrito anteriormente.

³⁰ T. González-Carreño, M. P. Morales, M. Gracia, C. J. Serna, *Mater. Lett.* **1993**, *18*, 151-155.

³¹ V. F. Puentes, K. M. Krisnan, A. P. Alivisatos, *Science* **2001**, *291*, 2115-2117.

³² R. Vijayakumar, Y. Koltypin, I. Felner, A. Gedanken, *Mater. Sci. Eng. A* **2000**, *286*, 101-105.

³³ S. Sun, H. Zeng, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8204-8205.

La principal ventaja de este método radica en la capacidad de modular el tamaño de las nanopartículas obtenidas variando levemente las condiciones de síntesis.

La síntesis consiste en un calentamiento por etapas del precursor de hierro, típicamente $\text{Fe}(\text{CO})_5$ o $\text{Fe}(\text{acac})_3$ en presencia de oleilamina, ácido oleico, 1,2-hexadecanediol y el disolvente orgánico difeniléter o dibenciléter. La utilización de uno u otro disolvente así como los tiempos de reacción, modifican los tamaños finales de las nanopartículas obtenidas. Sin embargo, el paso clave para la síntesis de nanopartículas monodispersas siguiendo esta metodología radica en calentar la mezcla inicial hasta los 200 °C y mantenerla a esta temperatura un determinado tiempo antes de pasar a la siguiente etapa de calentamiento.³⁴

En la Figura 1.6 se presentan tres imágenes de TEM de nanopartículas de Fe_3O_4 de diferentes tamaños, sintetizadas a través de este método, donde se observa la homogeneidad de sus tamaños.^{33,34}

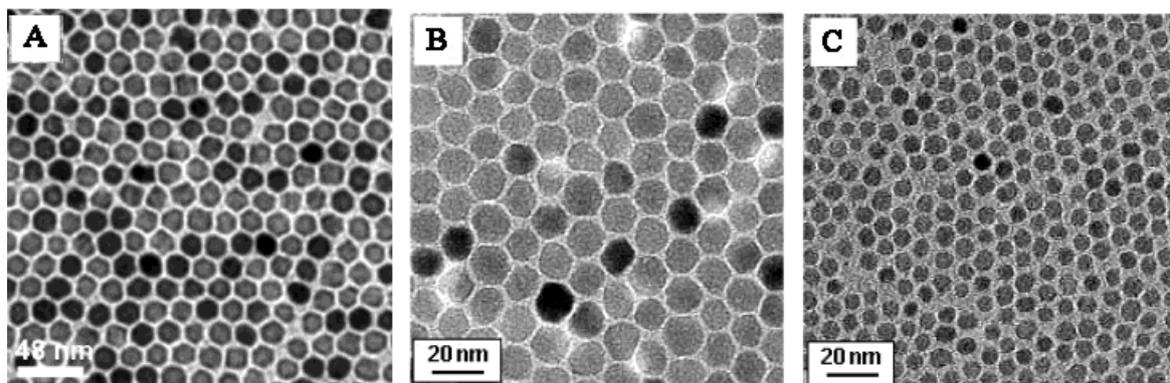


Fig. 1.6. Imágenes de TEM de nanopartículas de Fe_3O_4 de (A) 16 nm, (B) 12 nm y (C) 6 nm sintetizadas por el método de descomposición térmica.

1.2.8 MÉTODO DE NANORREACTORES

Los nanorreactores se han utilizado para preparar con éxito nanopartículas de dimensiones definidas dado que en estas condiciones de confinamiento espacial, el crecimiento de las mismas puede ser perfectamente controlado.¹⁸ Por ejemplo, emulsiones de agua en aceite han servido como nanorreactores para sintetizar NP con un rango de tamaños estrecho y propiedades físicas uniformes. El método se basa en la formación de nanogotas de la fase acuosa, bien definidas y estabilizadas por un agente surfactante en una fase oleosa continua. La principal ventaja de este enfoque es la posibilidad de controlar con precisión el tamaño de NP mediante el control de: el diámetro de las gotas acuosas, el pH, el surfactante, los agentes reductores usados y la concentración y el tipo de iones metálicos empleados.

³⁴ (a) S. H. Sun, H. Zeng, D. R. Robinson, S. Raoux, P. M. Rice, S. X. Wang, G. X. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 273-279; (b) C. J. Xu, S. H. Sun, *Polym. Int.* **2007**, *56*, 821-826.

Bakar^{18b} utilizó dos variantes de esta metodología para la síntesis de nanopartículas de magnetita. Tal como se muestra en la Figura 1.7 obtuvieron nanopartículas de forma cúbica y de diferentes tamaños según las variaciones aplicadas.

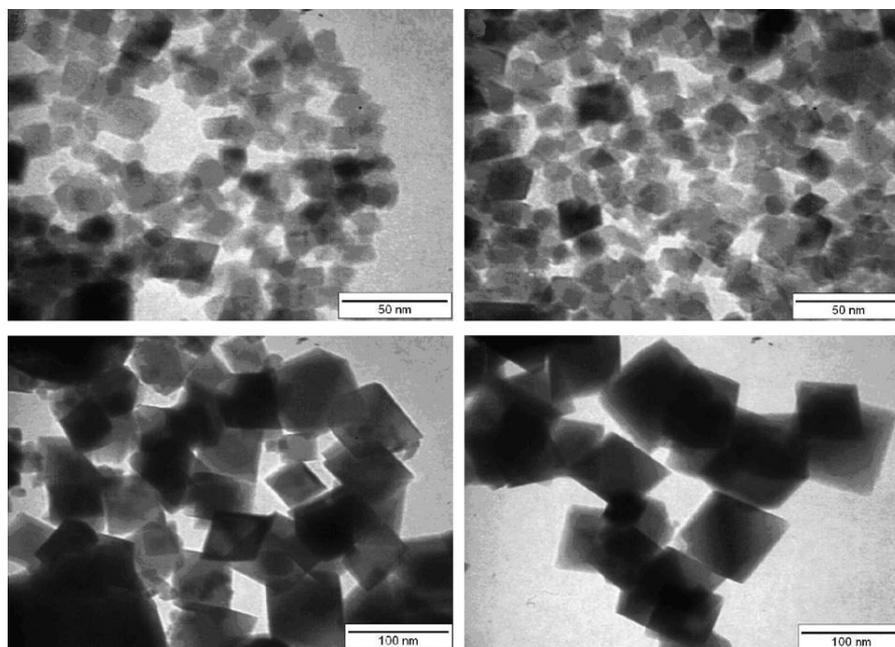


Fig. 1.7. Imágenes de TEM de nanopartículas de Fe_3O_4 preparadas por el método de nanorreactores.

Otras versiones de este método incluyen el uso de surfactantes anfóteros (que forman estructuras micelares invertidas en disolventes no polares),³⁵ ciclodextrinas,³⁶ dendrímeros,³⁷ membranas de fosfolípidos (que forman vesículas),³⁸ entre otros. Esta ruta sintética también permite la preparación de óxidos de metales mixtos, aleaciones o NP recubiertas por capas de metales nobles (por ejemplo, oro), con el fin de proteger sus núcleos frente a la oxidación y funcionalizar sus superficie para diversas aplicaciones, entre ellas, biomédicas.³⁹

³⁵ S. Santra, R. Taped, N. Theodoropoulou, J. Dobson, A. Hebard, W. Tan, *Langmuir* **2001**, *17*, 2900-2906.

³⁶ Y. Hou, H. Kondoh, M. Shimojo, E. O. Sako, N. Ozaki, T. J. Kogure, T. Ohta, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 4845-4852.

³⁷ E. Strable, J. W. M. Bulte, B. Moskowitz, K. Vivekanandan, M. Allen, T. Douglas, *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 2201-2209.

³⁸ C. Sangregorio, J. K. Wiemann, C. J. O'Connor, Z. Rosenzweig, *J. Appl. Phys.* **1999**, *85*, 5699-5701.

³⁹ (a) J. Rivas, R. D. Sánchez, A. Fondado, C. Izco, A. J. García-Bastida, J. García-Otero, J. Mira, D. Baldomir, A. González, I. Lado, M. A. López-Quintela, S. B. Oseroff, *J. Appl. Phys.* **1994**, *76*, 6564-6566; (b) J. A. López-Pérez, M. A. López-Quintana, J. Mira, J. Rivas, *IEEE Trans. Magn.* **1997**, *33*, 4359-4362; (c) E. E. Carpenter, *J. Magn. Magn. Mater.* **2001**, *225*, 17-20.

1.2.9 MÉTODOS MICROBIANOS

Recientemente se ha demostrado la utilidad de procesos microbianos para la producción a gran escala de NP de Fe_3O_4 .¹⁹ Este enfoque garantiza: elevado rendimiento, alta reproducibilidad, buena escalabilidad y bajo costo. Las bacterias capaces de reducir Fe(III) , como las especies *Thermoanaerobacter* (*Thermoanaerobacter ethanolicus* cepa TOR 39) y *Shewanella* (*Shewanella loihica* cepa PV-4) poseen la capacidad de sintetizar nanopartículas de Fe_3O_4 bajo condiciones anaeróbicas. La fermentación se lleva a cabo incubando, desde varios días hasta tres semanas, un precursor de hierro con las bacterias y manteniendo la temperatura a 65 °C. Además es necesario adicionar intermitente donadores de electrones tales como la glucosa. Este proceso es capaz de producir nanopartículas de entre 5 y 90 nm.

A modo de ejemplo, en la Figura 1.8 se presentan tres imágenes de TEM donde se observa la cadena de magnetosomas (cristales de Fe_3O_4 o Fe_3S_4 generalmente dispuestos en filas paralelas al eje de la célula e individualmente rodeados por una membrana lipídica) sintetizadas por la especie *Magnetospirillum gryphiswaldense*.⁴⁰

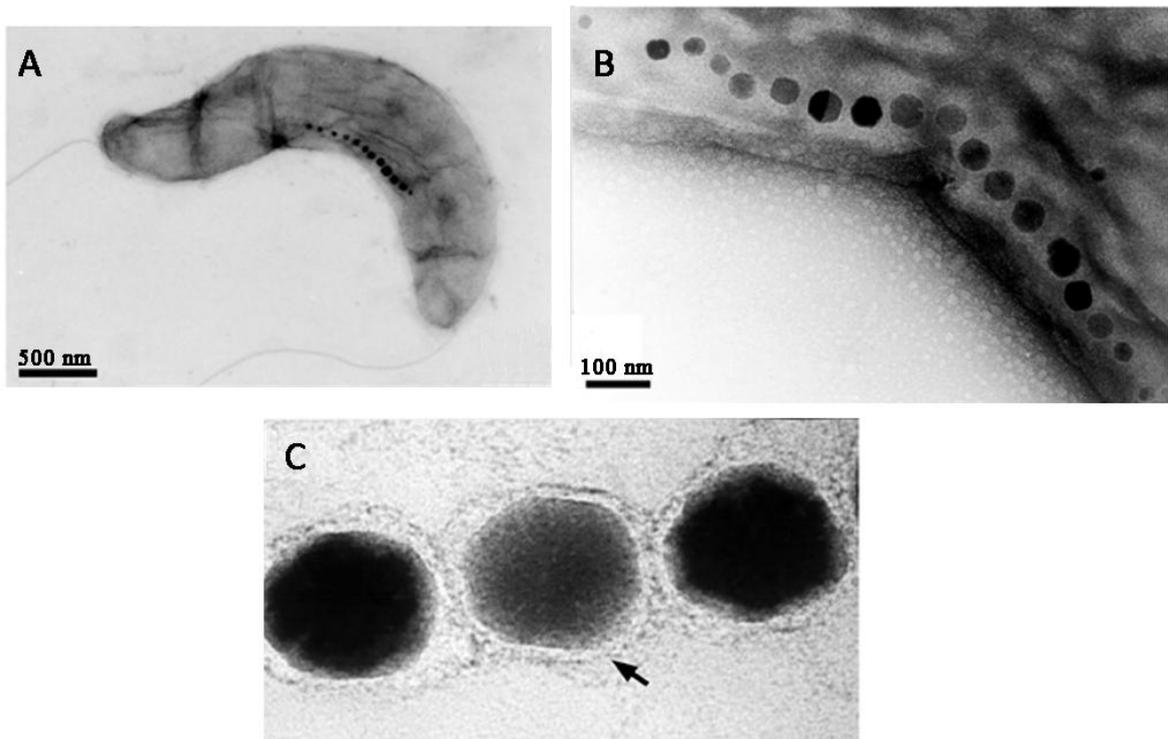


Fig. 1.8. Imágenes de TEM de células de *Magnetospirillum gryphiswaldense* donde se observa la cadena de magnetosomas. (A) *M. gryphiswaldense* individual con la cadena de magnetosomas localizada en la mitad de la célula. (B) Vista ampliada de la cadena de magnetosomas. (C) Imagen de magnetosomas aislados donde se observan sus membranas intactas.

⁴⁰ C. Lang, D. Schüler, *J. Phys. Condens. Matter*. **2006**, *18*, S2815-S2828.

1.2.10 NUEVAS TENDENCIAS EN LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS

Los crecientes problemas relacionados con la contaminación ambiental han llevado a la implementación de la “química verde” en el mundo de la nanotecnología. Específicamente en los aspectos sintéticos, actualmente se comienzan a utilizar procesos más respetuosos con el medio ambiente para la preparación de diversos tipos de nanopartículas.⁴¹

Aunque se han perfeccionado con éxito una gran variedad de técnicas para la síntesis de nanopartículas, algunas de ellas continúan siendo costosas e implican el uso de productos químicos peligrosos o contaminantes. Por lo tanto, existe un interés creciente en el desarrollo de métodos sostenibles y respetuosos con el medio ambiente.⁴² Al mismo tiempo, los efectos adversos de algunos nanomateriales son todavía relativamente desconocidos, motivo por el cual se plantea que para la síntesis de dichos materiales se utilicen reactivos biocompatibles y biosostenibles para reducir la toxicidad de los materiales resultantes y el impacto ambiental de los subproductos.⁴³ Para alcanzar este objetivo se intentan utilizar disolventes no tóxicos (preferiblemente agua), reactores cerrados, técnicas "verdes" donde el medio de reacción no esté en contacto con el aire (ultrasonidos, microondas, métodos hidrotermales, magnéticos, biológicos, entre otros) y temperaturas bajas. Actualmente, las rutas sintéticas biosostenibles para la preparación de nanopartículas y nanomateriales están relacionadas con extractos de plantas y otros productos naturales.⁴⁴

Las técnicas para la obtención de nanopartículas utilizando reactivos de origen natural, tales como vitaminas, azúcares, extractos de plantas, polímeros biodegradables, microorganismos como agentes reductores y estabilizantes, se consideran atractivas para la nanotecnología. Estas síntesis han dado lugar a la fabricación de un número limitado de nanopartículas inorgánicas (principalmente nanopartículas metálicas, aunque también se han descrito varios óxidos y sales metálicas).⁴⁵ Entre los reactivos mencionados anteriormente, los materiales extraídos de plantas parecen ser los mejores candidatos dado que podrían ser adecuados para la biosíntesis de nanopartículas a gran escala.⁴⁶

⁴¹ O. V. Kharissova, H. V. R. Dias, B. I. Kharisov, B. Olvera, V. M. Jiménez, *Trends Biotechnol.* **2013**, *31*, 240-248.

⁴² K. B. Narayanan, N. Sakthivel, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2010**, *156*, 1-13.

⁴³ R. S. Carma, *Curr. Opin. Chem. Eng.* **2012**, *1*, 123-128.

⁴⁴ P. P. Gan, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **2012**, *11*, 169-206.

⁴⁵ (a) J. Xie, J. Y. Lee, D. I. C. Wang, Y. P. Ting, *Small* **2007**, *3*, 672-682; (b) Y. Zhou, W. Lin, J. Huang, W. Wang, Y. Gao, L. Lin, Q. Li, L. Lin, M. Du, *Nanoscale Res. Lett.* **2010**, *5*, 1351-1359; (c) J. Huang, Guowu Zhan, B. Zheng, D. Sun, F. Lu, Y. Lin, H. Chen, Z. Zheng, Y. Zheng, Q. Li, *Eng. Chem. Res.* **2011**, *50*, 9095-9106; (d) N. C. Sharma, S. V. Sahi, S. Nath, J. G. Parsons, J. L. Gardea-Torresdey, T. Pal, *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 5137-5142; (e) A. R. Vilchis-Nestor, M. Avalos-Borja, S. A. Gómez, J. A. Hernández, A. Olivas, T. A. Zepeda, *Appl. Catal. B: Environ.* **2009**, *90*, 64-73; (f) M. Du, G. Zhan, X. Yang, H. Wang, W. Lin, Y. Zhou, J. Zhu, L. Lin, J. Huang, D. Sun, L. Jia, Q. Li, *J. Catal.* **2011**, *283*, 192-201; (g) G. Zhan, J. Huang, M. Du, D. Sun, I. Abdul-Rauf, W. Lin, Y. Hong, Q. Li, *Chem. Eng. J.* **2012**, *187*, 232-238.

⁴⁶ S. Iravani, *Green Chem.* **2011**, *13*, 2638-2650.

Además, se proyecta que la síntesis biosostenible de nanopartículas proporciona ventajas sobre otros métodos ya que suelen ser métodos simples, rentables, relativamente reproducibles y que permite obtener materiales estables.⁴⁷ Así, por ejemplo, a partir de extractos vegetales se han sintetizado nanopartículas superparamagnéticas de Fe₃O₄ esféricas con un diámetro promedio de 8 nm a temperatura ambiente y presión atmosférica.⁴⁸

Algunos microorganismos también han sido utilizados para la preparación de nanopartículas, tal como se describió en el apartado anterior, aunque la síntesis es lenta y sólo son factibles un número limitado de tamaños y formas en comparación con las rutas que implican materiales a base de plantas.

Ciertas especies de hongos se han descrito como nano-fábricas para la síntesis de nanopartículas.⁴⁹ Los materiales biológicos también son efectivos métodos de química verde debido a que no se hace necesaria la utilización de productos químicos o tóxicos.⁵⁰

1.3 NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE HIERRO CON DIFERENTES MORFOLOGÍAS

El control de la morfología de las nanopartículas de óxidos de hierro ha recibido una atención significativa debido a las peculiares propiedades magnéticas derivadas de la anisotropía de sus formas. Los usos de nanopartículas no esféricas han sido muy poco estudiados en comparación con la extensa investigación que han recibido las nanopartículas esféricas. Esto se debe, en parte, al reto que supone la preparación de ferritas nanoestructuradas en una dimensión (1-D). La alta simetría de la estructura de espinela desfavorece el crecimiento en 1-D en ausencia de restricciones adicionales.⁵¹ Sin embargo, en estudios recientes se han desarrollado de forma exitosa y controlada diferentes síntesis de nanopartículas de óxidos de hierro con morfologías cúbicas,⁵² hexagonales,⁵³ de barra (nanorod)⁵⁴ y de otras formas.⁵⁵

Algunos métodos sintéticos para la preparación de nanopartículas de óxidos de hierro no esféricas se han comentado anteriormente. En este apartado se expondrán y comentarán brevemente algunos nuevos ejemplos.

⁴⁷ R. Kalaiarasi, *Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol.* **2010**, *11*, 1-16.

⁴⁸ Y. Cai, Y. Shen, A. Xie, S. Li, X. Wang, *J. Magn. Mater.* **2010**, *322*, 2938-2943.

⁴⁹ G. S. Dhillon, S. K. Brar, S. Kaur, M. Verma, *Crit. Rev. Biotechnol.* **2012**, *32*, 49-73.

⁵⁰ J.G. Parsons, J.R. Peralta-Videa, J.L. Gardea-Torresdey, *Dev. Environ. Sci.* **2007**, *5*, 463-485.

⁵¹ S. Chen, J. Feng, X. Guo, J. Hong, W. Ding, *Mater. Lett.* **2005**, *59*, 985-988.

⁵² (a) A. Shavel, L. M. Liz-Marzan, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 3762-3766; (b) H. Yang, T. Ogawa, D. Hasegawa, M. Takahashi, *J. Appl. Phys.* **2008**, *103*, 07D526; (c) N. Lee, Y. Choi, Y. Lee, M. Park, W. K. Moon, S. H. Choi, T. Hyeon, *Nano Lett.* **2012**, *12*, 3127-3131.

⁵³ J. Cheon, N.-J. Kang, S.-M. Lee, J.-H. Lee, J.-H. Yoon, S. J. Oh, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1950-1951.

⁵⁴ (a) S.-J. Park, S. Kim, S. Lee, Z. G. Khim, K. Char, T. Hyeon, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8581-8582; (b) I. Milosevic, H. Jouni, C. David, F. Warmont, D. Bonnin, L. Motte, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 18999-19004.

⁵⁵ (a) M. R. Buck, R. E. Schaak, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6154-6178; (b) Q. He, T. Yuan, S. Wei, N. Haldolaarachchige, Z. Luo, D. P. Young, A. Khasanov, Z. Guo, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8842-8845.

Por ejemplo, Motte^{54b} describió la síntesis de nanopartículas magnéticas en forma de barra (nanorods) en agua, a través de un método simple de reducción asistido por microondas, usando como precursores akaganeita (β -FeOOH en forma de pequeños nanorods) e hidracina como reductor. El precursor de akaganeita en forma de nanorod fue preparado utilizando dopamina como un agente de “química verde” para el control de la morfología. La rápida reducción a través del microondas induce un cambio magnético y estructural dependiendo de los ciclos de irradiación. En la Figura 1.9 se observa la influencia del número total de ciclos de microondas sobre la forma final del óxido de hierro. Comparado con el nanorod precursor, tras cuatro ciclos (Figura 1.9 A), los autores demuestran que no se afecta la forma de las nanopartículas, solamente se observa un aumento en el ancho y una disminución en el largo de las mismas. Sin embargo, tras seis u ocho ciclos (Figura 1.9 C, E) la morfología de las NP cambia a hexagonal. Al mismo tiempo, el tamaño de las NP se incrementa con el número de ciclos. Todos estos hechos sugieren que el proceso de reducción por microondas transcurre a través de un mecanismo de disolución-recristalización.

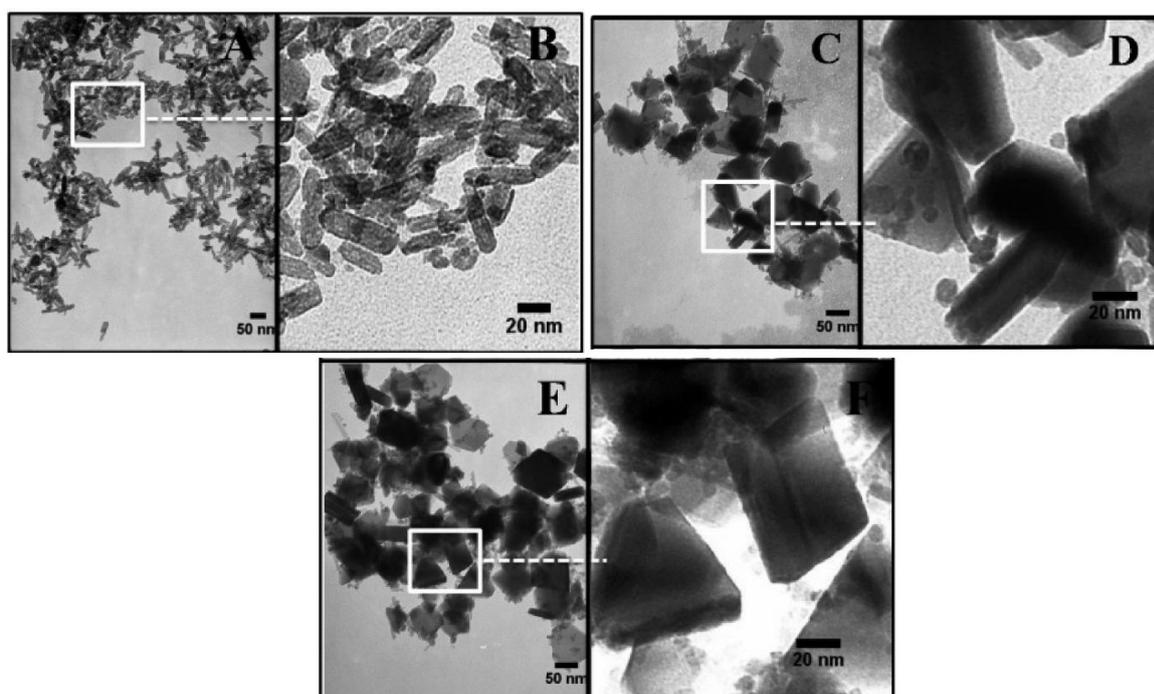


Fig. 1.9. Influencia del número de ciclos de microondas en la forma final de las nanopartículas de óxido de hierro. Las imágenes de TEM (B), (D) y (F) son aumentos de (A), (C) y (E) respectivamente. Número de ciclos de microondas: 4 (A), 6 (C) y 8 (E).

Recientemente, Lalatonne⁵⁶ ha descrito la preparación de nanopartículas de óxido de hierro con morfologías: esférica, cúbica, hexagonal y de barra. Para la obtención de las tres primeras se basó en el método de descomposición térmica variando solamente el orden de adición de los reactivos y los tiempos de calentamiento. Para la síntesis de las

⁵⁶ C. de Montferrand, L. Hu, I. Milosevic, V. Russier, D. Bonnin, L. Motte, A. Brioude, Y. Lalatonne, *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 6150-6157.

partículas en forma de barra utilizó la metodología por microondas descrita por Motte.^{54b} En la Figura 1.10 se muestran las imágenes de TEM donde se aprecian las diferentes formas de las NP sintetizadas.

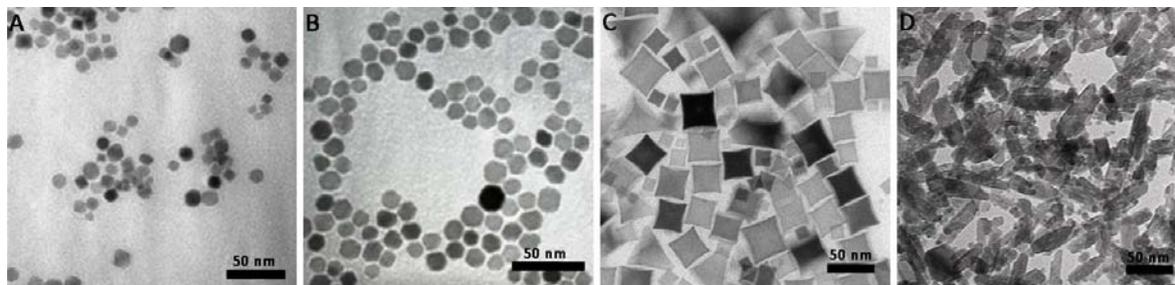


Fig. 1.10. Imágenes de TEM de ferritas con morfologías: (A) esférica, (B) hexagonal, (C) cúbica y (D) nanorod.

1.4 ESTABILIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE HIERRO

Las nanopartículas de óxidos de hierro son materiales extremadamente reactivos frente a agentes oxidantes, al agua e incluso al aire. Es por este motivo que su protección es de vital importancia para tener sistemas coloidales tanto física como químicamente estables. Esta estabilización se consigue a través del recubrimiento de la superficie de las NP, lo cual además de mejorar la estabilidad física y coloidal de las mismas, aumenta su dispersabilidad en agua y proporciona una funcionalización adecuada para la posterior conjugación con moléculas de interés.⁵⁷

Tal como se esquematiza en la Figura 1.11⁵⁸ la estabilización se puede alcanzar mediante:

1. El recubrimiento de la superficie de la nanopartícula. Para ello se pueden utilizar estabilizadores poliméricos o surfactantes de tipo dextrano,⁵⁹ alcohol polivinílico (PVA),⁶⁰ polietilenglicol (PEG).⁶¹

⁵⁷ (a) D. L. Ma, J. W. Guan, F. Normandin, S. Denommee, G. Enright, T. Veres, B. Simard, *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 1920-1927; (b) S. Chen, Y. Li, C. Guo, J. Wang, J. Ma, X. Liang, L. R. Yang, H. Z. Liu, *Langmuir* **2007**, *23*, 12669-12676; (c) H. Liu, J. Guo, L. Jin, W. Yang, C. J. Wang, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 3315-3321.

⁵⁸ L. Harivardhan, J. L. Arias, J. Nicolas, P. Couvreur, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 5818-5878.

⁵⁹ (a) J. W. Bulte, Y. Hoekstra, R. L. Kamman, R. L. Magin, A. G. Webb, R. W. Briggs, K. G. Go, C. E. Hulstaert, S. Miltenyi, T. H. The, L. D. Leij, *Magn. Reson. Med.* **1992**, *25*, 148-157; (b) C. C. Berry, S. Wells, S. Charles, A. S. G. Curtis, *Biomaterials* **2003**, *24*, 4551.

⁶⁰ T. Y. Liu, S. H. Hu, K. H. Liu, D. M. Liu, S. Y. Chen, *J. Control. Release* **2008**, *126*, 228-236.

⁶¹ (a) M. D. Butterworth, L. Illum, S. S. Davis, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **2001**, *179*, 93-102; (b) J. F. Lutz, S. Stiller, A. Hoth, L. Kaufner, U. Pison, R. Cartier, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 3132-3138.

1. Introducción y objetivos

También se pueden recubrir las superficies con una capa de un metal, (por ejemplo, oro),⁶² de elementos no metálicos (como grafito)⁶³ o incluso superficies de óxido (por ejemplo, SiO₂).⁶⁴

2. La formación de una estructura polimérica evita el crecimiento de los clústeres después de la nucleación y mantiene las nanopartículas como dominios individuales, separados entre sí, a pesar de las fuerzas de atracción que puedan existir. De esta forma se pueden formar nanoesferas,⁶⁵ donde las nanopartículas individuales están dentro de una matriz polimérica, o nanocápsulas,⁶⁶ donde una disolución acuosa u oleosa de las nanopartículas está rodeada por una capa polimérica.
3. La formación de revestimientos lipídicos alrededor de los núcleos magnéticos.^{40,67}

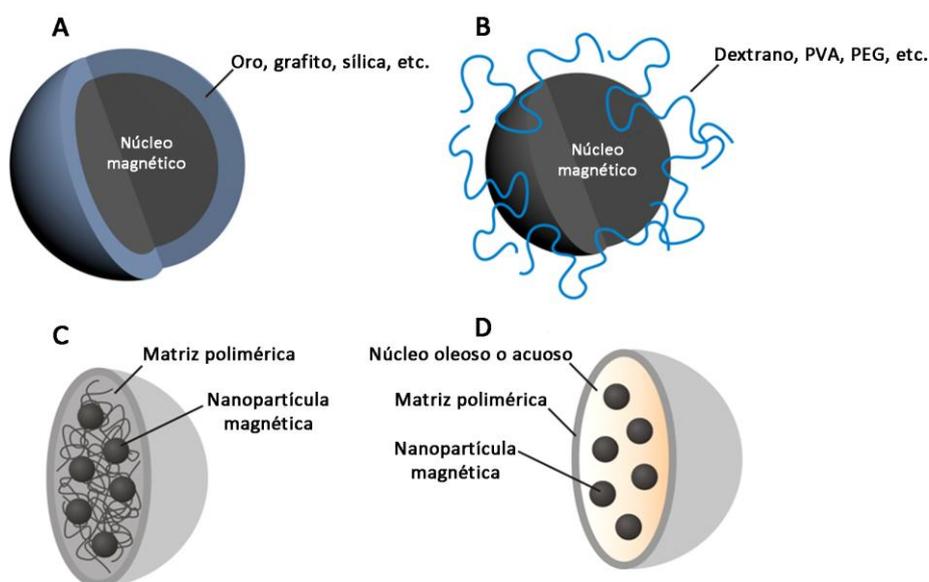


Fig. 1.11. Representación esquemática de algunas formas de estabilizar nanopartículas de óxidos de hierro. Recubrimiento de superficies con materiales (A) inorgánicos, (B) orgánicos. Encapsulación en (C) nanoesferas y (D) nanocápsulas.

⁶² (a) J. Gallo, I. García, D. Dlanco, B. Arnaiz, S. Penadés, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 10010-10020; (b) J. Jeong, T. H. Ha, B. H. Chung, *Anal. Chim. Acta* **2006**, *569*, 203-209.

⁶³ W. S. Seo, J. H. Lee, X. Sun, Y. Suzuki, D. Mann, Z. Liu, M. Terashima, P. C. Yang, M. V. McConnell, D. G. Nishimura, H. Dai, *Nat. Mater.* **2006**, *5*, 971-976.

⁶⁴ M. Chastellain, A. Petri, A. Gupta, K. V. Rao, H. Hofmann, *Adv. Eng. Mater.* **2004**, *6*, 235-241.

⁶⁵ (a) J. L. Arias, V. Gallardo, F. Linares-Molinero, A. V. Delgado, *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *299*, 599-607; (b) J. L. Arias, M. López-Viota, E. Sáez-Fernández, M. A. Ruiz, A. V. Delgado, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **2011**, *384*, 157-165.

⁶⁶ S. Lecommandoux, O. Sandre, F. Chécot, R. Perzynski, *Prog. Solid State Chem.* **2006**, *34*, 171-179.

⁶⁷ (a) E. Peira, P. Marzola, V. Podio, S. Aime, A. Sbarbati, M. R. Gasco, *J. Drug Target.* **2003**, *11*, 19-24; (b) M. Gonzales, K. M. Krishnan, *J. Magn. Magn. Mater.* **2005**, *293*, 265-270; (c) M. H. Hsu, Y. C. Su, *Biomed. Microdevices* **2008**, *10*, 785-793.

1.5 INTRODUCCIÓN A LAS APLICACIONES DE NANOPARTÍCULAS EN QUÍMICA SUPRAMOLECULAR Y BIOMEDICINA

En la frontera de la nanotecnología con la química, específicamente en áreas como la química supramolecular, se han abierto nuevos campos de investigación. La síntesis de diversos tipos de nanopartículas y la capacidad de controlar sus propiedades a través de sus tamaños y formas, así como la fácil funcionalización de las superficies de las mismas, ha llevado a explorar nuevas aplicaciones. Todas estas características han permitido que nanopartícula y funcionalidades, en su conjunto, actúen como entidades supramoleculares para llevar a cabo funciones que van desde el reconocimiento molecular de analitos de interés biológico o medioambiental, hasta el establecimiento de interacciones supramoleculares específicas con biomoléculas o estructuras celulares.⁶⁸

Generalmente, el reconocimiento supramolecular se relaciona con un diseño racional y un esfuerzo sintético considerable para preparar receptores con un alto nivel de preorganización, sobre todo cuando se pretende establecer selectividad en el proceso.⁶⁹ Estos inconvenientes se han intentado superar a través del uso de la nanotecnología. Siguiendo esta línea, en los últimos años se ha comenzado a estudiar la capacidad de inducir preorganización y por ende selectividad en el proceso de reconocimiento supramolecular mediante el uso de soportes como pueden ser las nanopartículas.⁷⁰

Por otra parte, la nanotecnología ofrece un enorme potencial para el futuro de la biomedicina. Características como superparamagnetismo, propiedades fluorescentes y dimensiones comparables a las biomoléculas convierten a estos materiales nanoestructurados en posibles agentes de diagnóstico y terapéuticos novedosos.⁷¹

La necesidad de encontrar métodos más específicos, eficaces y con menos efectos secundarios para el tratamiento de enfermedades que cada vez tienen más incidencia mundial, como el cáncer, ha llevado a desarrollar nuevas investigaciones en conjunto con la nanotecnología.

Muchas de las líneas actuales de investigación en este campo están centradas en la utilización de nanopartículas como vehículos para el transporte de fármacos que han demostrado tener un efecto antitumoral. A través de diversas estrategias de transporte se intenta lograr que la entrada de los fármacos se produzca selectivamente en las células tumorales, lo cual se traduciría en una disminución significativa de efectos secundarios. Además, a través del uso de nanopartículas se pretende mejorar el efecto citotóxico que produce el fármaco por sí solo.

⁶⁸ (a) P. A. Venter, A. Dirksen, D. Thomas, M. Manchester, P. E. Dawson, A. Schneemann, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2293-2301; (b) Z. Liu, X. Sun, N. Nakayama-Ratchford, H. Dai, *ACS Nano* **2007**, *1*, 50-56.

⁶⁹ R. W. Saalfrank, H. Maid, A. Scheurer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8794-8824.

⁷⁰ C. M. Drain, G. Smeureanu, S. Patel, X. Gong, J. Garnod, J. Arijeloye, *New J. Chem.* **2006**, *30*, 1834-1843.

⁷¹ C. Xu, S. Sun, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 732-743.

1.6 OBJETIVOS GENERALES

El creciente interés por introducir la nanotecnología tanto en la química supramolecular como en la biomedicina, nos ha hecho plantearnos los siguientes objetivos generales que se desarrollarán a lo largo de esta Tesis.

1. Síntesis y caracterización de nanopartículas de óxidos de hierro funcionalizadas.
2. Evaluación del comportamiento supramolecular de varias nanopartículas de óxidos de hierro convenientemente funcionalizadas, estudiando su capacidad para actuar como sensores y/o receptores de carboxilatos e iones de metales pesados.
3. Estudio de la actividad biológica de varias nanopartículas de óxidos de hierro funcionalizadas, evaluando su capacidad para transportar de fármacos antineoplásicos.

2. NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE HIERRO FUNCIONALIZADAS CON ESCUARAMIDAS COMO RECEPTORES EN QUÍMICA SUPRAMOLECULAR

2. NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE HIERRO FUNCIONALIZADAS CON ESCUARAMIDAS COMO RECEPTORES EN QUÍMICA SUPRAMOLECULAR

2.1 INTRODUCCIÓN

Los avances en el desarrollo de nuevos materiales están ejerciendo un gran impacto en la Química Supramolecular. Las nanopartículas se han convertido en plataformas adecuadas para el desarrollo de una nueva generación de herramientas para la detección de especies químicas. La introducción de grupos funcionales orgánicos, conjuntamente con las nanopartículas, ha llevado al desarrollo de materiales híbridos, que muestran un comportamiento supramolecular cooperativo que no se manifiesta independientemente en las moléculas orgánicas por sí solas o en las nanopartículas no funcionalizadas. Estos materiales híbridos altamente versátiles pueden desempeñar funciones especializadas tales como la adsorción o complejación de una gran variedad de especies iónicas en disoluciones acuosas.

2.1.1 NANOPARTÍCULAS COMO RECEPTORES DE IONES EN QUÍMICA SUPRAMOLECULAR

El reconocimiento molecular asociado a nanopartículas está directamente ligado a los grupos o restos que funcionalizan la superficie de las mismas. La detección de analitos de interés biológico o medioambiental es un objetivo prioritario en química supramolecular. Por este motivo, el desarrollo de receptores y sensores selectivos que no requieran un elevado grado de manipulación química son especialmente atractivos desde el punto de vista práctico. La utilización de la nanotecnología puede dar un nuevo impulso en esta dirección.

El reconocimiento, detección y cuantificación de aniones han sido intensamente estudiados debido a su importancia tanto en el ecosistema como en el ámbito biológico. De hecho, más de dos tercios de los cofactores y sustratos implicados en las transformaciones biológicas son de naturaleza aniónica.⁷² Diversos tipos de nanopartículas se han empleado en esta dirección.

⁷² J. L. Sessler, P. A. Gale, W.-S. Cho, *Anion Receptor Chemistry*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2006.

Por ejemplo, nanopartículas de oro convenientemente funcionalizadas se han utilizado para el reconocimiento selectivo de sulfuro,⁷³ yoduro⁷⁴ o fluoruro⁷⁵ y no selectivo de aniones como H_2PO_4^- ,⁷⁶ HSO_4^- , AcO^- , NO_3^- ,⁷⁷ Cl^- , Br^- y I^- .⁷⁸

Análogamente, nanopartículas de sílica,⁷⁹ cobre,⁸⁰ plata y mixtas⁸¹ se han funcionalizado para actuar como sensores de diversos aniones. Cabe destacar en este apartado las nanopartículas descritas recientemente por Costa, Alarcón y García-España en el reconocimiento del anión sulfato⁸² en disoluciones acuosas, debido a que es uno de los pocos ejemplos descritos en la bibliografía de nanopartículas funcionalizadas con restos escuaramídicos que se utilizan con este propósito. El sistema se compone de una amina cuaternaria conectada a través de un resto n-propilo con una unidad escuaramida covalentemente unida a la superficie de nanopartículas de $\gamma\text{-AlO}(\text{OH})$ (boehmita), o de boehmita recubiertas con una delgada capa de sílice. Estas nanopartículas funcionalizadas son capaces de discriminar sulfato, de fosfato y de otros aniones monovalentes en agua pura. Los autores destacan que ni el grupo amonio cuaternario, ni la función escuaramida, ni combinaciones de ellos, conduce, en ausencia de las nanopartículas, a una interacción significativa con este anión en agua. Por tanto, las nanopartículas desempeñan un papel en la organización y pre-concentración de las moléculas receptoras que probablemente favorecen la interacción de las especies asociadas.

Las nanopartículas de óxidos de hierro también han sido usadas como la base para el desarrollo de receptores o sensores de diferentes aniones aunque sus aplicaciones en esta área no se han ampliado considerablemente, puesto que en la bibliografía se describen pocos ejemplos relacionados con este campo. Uno de ellos, presentado por Yilmaz⁸³ en 2009 muestra la preparación de nanopartículas de Fe_3O_4 funcionalizadas en

⁷³ J. Zhang, X. Xu, X. Yang, *Analyst* **2012**, *137*, 1556-1558.

⁷⁴ K. Y. Lee, D. W. Kim, J. Heo, J. S. Kim, J.-K. Yang, G.-W. Cheong, S. W. Han, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2006**, *27*, 2081-2083.

⁷⁵ (a) P. Sokkalingam, S.-J. Hong, A. Aydogan, J. L. Sessler, C.-H. Lee, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 5860-5867; (b) R. Velu, V.T. Ramakrishnan, P. Ramamurthy, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2011**, *217*, 313-320.

⁷⁶ D. P. Cormode, J. J. Davis, P. D. Beer, *J. Inorg. Organomet. Polym.* **2008**, *18*, 32-40.

⁷⁷ (a) D. Astruc, M.-C. Daniel, J. Ruiz, *Chem. Commun.* **2004**, 2637-2649; (b) W.L. Daniel, M.S. Han, J.S. Lee, C.A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6362-6363.

⁷⁸ S. Watanabe, M. Sonobe, M. Arai, Y. Tazume, T. Matsuo, T. Nakamura, K. Yoshida, *Chem. Commun.* **2002**, 2866-2867.

⁷⁹ (a) P. Calero, M. Hecht, R. Martínez-Mañez, F. Sancenón, J. Soto, J. L. Vivanco, K. Rurack, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 10599-10601; (b) I. Candel, P. Calero, R. Martínez-Mañez, F. Sancenón, M. D. Marcos, T. Pardo, J. Soto, *Inorg. Chim. Acta* **2012**, *381*, 188-194; (c) M. Becuwe, F. Cazier, P. Woisel, F. Delattre, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **2013**, *433*, 88-94; (d) E. Climent, M. D. Marcos, R. Martínez-Mañez, F. Sancenón, J. Soto, K. Rurack, P. Amorós, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8519-8522.

⁸⁰ J. Liu, J. Chen, Z. Fang, L. Zeng, *Analyst* **2012**, *137*, 5502-5505.

⁸¹ (a) J. Zhang, X. Xu, C. Yang, F. Yang, X. Yang, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 3911-3917; (b) J. Zhang, Y. Yuan, X. Xu, X. Wang, X. Yang, *Appl. Mater. Interfaces* **2011**, *3*, 4092-4100.

⁸² E. Delgado-Pinar, C. Rotger, A. Costa, M. N. Piña, H. R. Jiménez, J. Alarcón, E. García-España, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 2609-2611.

⁸³ F. Ozcan, M. Ersoz, M. Yilmaz, *Mat. Sci. Eng. C* **2009**, *29*, 2378-2383.

un primer paso con 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS) para introducir grupos reactivos sobre la superficie de la nanopartícula. En un segundo paso, se inmovilizaron derivados calix[4]arenos sobre la superficie por formación de un enlace amida (Figura 2.1). Las nanopartículas magnéticas funcionalizadas obtenidas (**2.1**) resultaron ser eficaces para la extracción y eliminación de aniones dicromato a valores pH comprendidos entre 2,5 y 4,5. Los autores sugieren un mecanismo de extracción del par iónico en el que el Na^+ se coordina con el residuo calix[4]areno mientras que los aniones HCr_2O_7^- se introducen en la cavidad hidrofóbica generada por el calixareno. Como ventaja adicional se comenta la facilidad de regeneración del material (85-90%) usando una disolución de HCl. Posteriormente, en 2010, Yilmaz,⁸⁴ modificó parcialmente su síntesis previa. En este caso, unió diamidas del *p-tert*-butilcalix[4]areno con nanopartículas de magnetita previamente funcionalizadas con un derivado trimetoxisilano (**2.2**). La capacidad de adsorción de arseniato y dicromato fue investigada, esta vez, a pH 1,5-4,5 demostrando que los nuevos ligandos eliminaban dichos aniones de disoluciones acuosas a través de interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno entre la amina con capacidad de adquirir un protón de la unidad piridinio y los oxígenos de dichos aniones.

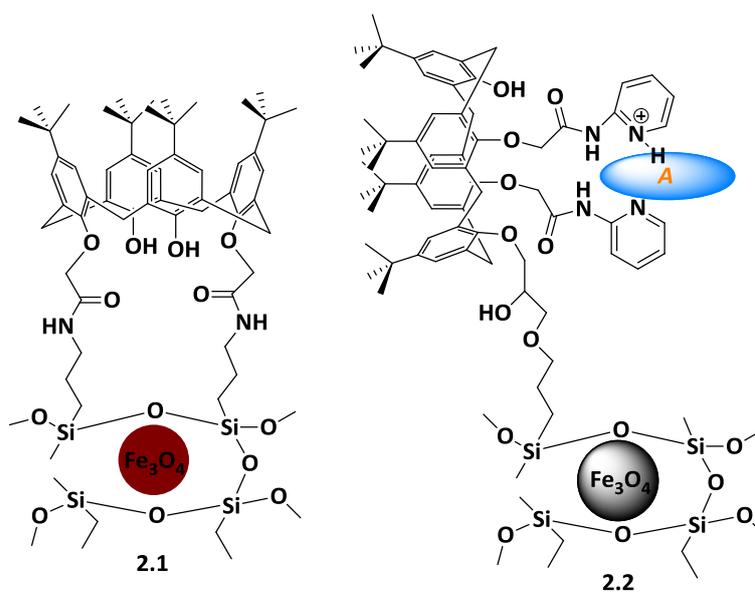


Fig. 2.1. Nanopartículas de Fe_3O_4 funcionalizadas con derivados calix[4]arenos para la eliminación de H_2AsO_4^- y HCr_2O_7^- de disoluciones acuosas.

Para la eliminación de arseniato de disoluciones acuosas, Tong y Hou⁸⁵ también modificaron nanopartículas de Fe_3O_4 con el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB). La funcionalización con CTAB aumentaba la capacidad de adsorción de As(V) de las Fe_3O_4 desde 7,6 mg/g hasta 23,1 mg/g. La tasa de eliminación de arseniato fue superior al 90% en un amplio rango de pH (3-9) y su eliminación no se afectaba por la presencia de

⁸⁴ S. Sayin, F. Ozcan, M. Yilmaz, *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.* **2011**, *48*, 365-372.

⁸⁵ Y. Jin, F. Liu, M. Tong, Y. Hou, *J. Hazard. Mater.* **2012**, *227-228*, 461- 468.

materia orgánica ni de aniones competitivos como sulfato, bicarbonato, silicato o fosfato en la disolución. Además, las nanopartículas podían regenerarse hasta 5 veces y su capacidad de eliminación continuaba siendo del 85%. Nanopartículas con la misma funcionalización también fueron utilizadas para la eliminación, preconcentración y determinación de trazas de picrato en muestras de agua. La metodología propuesta por Parham,⁸⁶ era comparable a técnicas más sofisticadas como la cromatografía líquida o la espectroscopía por fluorescencia, siendo mucho más rápida, simple y sensible.

El reconocimiento selectivo de aniones carboxilato a través de nanopartículas funcionalizadas, en general, ha sido poco estudiado. Uno de los pocos ejemplos encontrados en la bibliografía es el descrito por Ahn⁸⁷ en 2009. El sistema de detección colorimétrico desarrollado estaba basado en nanopartículas de oro funcionalizadas con un residuo de reconocimiento aniónico, *o*-(carboxamido)trifluoroacetofenona, soluble en agua. Las nanopartículas reconocían selectivamente isómeros específicos de dicarboxilatos. Así, discriminaban un fumarato, que es un dicarboxilato trans de un maleato que es su isómero cis, y un benceno-1,4-dicarboxilato de sus isómeros benceno-1,2 y 1,3-dicarboxilato en agua. Anteriormente, Ahn⁸⁸ había propuesto otro sistema colorimétrico basado en nanopartículas de oro funcionalizadas con unidades *o*-(trifluoroacetil)carboxanilida para reconocer selectivamente fumarato de maleato.

El reconocimiento de carboxilatos utilizando como soporte nanopartículas de óxidos de hierro se ha investigado muy poco pese a las propiedades magnéticas de dichas nanopartículas que permitirían la eliminación de los mismos tras la coordinación. Uno de los pocos ejemplos en esta línea es el electrodo modificado con nanopartículas de Fe₃O₄ funcionalizadas con β-ciclodextrinas para la detección de triptófano preparado por Shuang.⁸⁹

Por su parte, el reconocimiento y detección de cationes utilizando nanopartículas ha ido en aumento en los últimos años. El creciente interés por desarrollar sensores de cationes cada vez más selectivos se debe principalmente a la concienciación sobre la contaminación ambiental, por ejemplo, por metales pesados, y a la búsqueda de soluciones plausibles. En esta línea de investigación se ha recurrido a diversas estrategias y tipos de nanopartículas, siendo las más utilizadas las de oro y de óxidos de hierro. A modo de ejemplo, Chen⁹⁰ en 2007, desarrolló un sensor fluorescente, basado en nanopartículas de oro funcionalizadas con Rodamina 6G para la detección de Hg²⁺ en disolución acuosa con un límite de detección de 0,012 ppb. Por otra parte, más recientemente, Li⁹¹ describió la síntesis de nanopartículas de oro funcionalizadas en su

⁸⁶ H. Parham, B. Zargar, M. Rezazadeh, *Mat. Sci. Eng. C* **2012**, *32*, 2109-2114.

⁸⁷ A. Chatterjee, D. J. Oh, K. M. Kim, K.-S. Youk, K. H. Ahn, *Chem. Asian J.* **2008**, *3*, 1962-1967.

⁸⁸ K.-S. Youk, K. M. Kim, A. Chatterjee, K. H. Ahn, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 3652-3655.

⁸⁹ H. Wang, Y. Zhou, Y. Guo, W. Liu, C. Dong, Y. Wu, S. Li, S. Shuang, *Sens. Actuators B Chem.* **2012**, *173*, 171-178.

⁹⁰ J. L. Chen, A. F. Zheng, A. H. Chen, Y. C. Gao, C. Y. He, X. M. Kai, G. H. Wu, Y. C. Chen, *Anal. Chim. Acta* **2007**, *599*, 134-142.

⁹¹ Y. Yao, Z. Sun, Z. Zou, H. Li, *Nanotechnology* **2011**, *22*, 435502.

superficie con derivados de la quinolina a través de “química click”.⁹² En este caso, inicialmente la fluorescencia se inactivaba por la transferencia de electrones entre las nanopartículas y la quinolina. Sin embargo, tras la adición de Cd^{2+} a la disolución se observaba una respuesta fluorescente debido a que la coordinación entre quinolina y Cd^{2+} bloqueaba eficazmente la transferencia de electrones. Este sensor fluorescente era capaz de detectar eficientemente Cd^{2+} en disolución acuosa, con un límite de detección de $1,0 \times 10^{-5}$ M (1,1 ppm).

De igual forma, se ha recurrido a las nanopartículas magnéticas de óxidos de hierro para la eliminación de cationes de metales pesados sobre todo de disoluciones acuosas. Por ejemplo, en 2007 Jang,⁹³ describió la preparación de nanopartículas de Fe_3O_4 encapsuladas con poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT). Dichas nanopartículas se utilizaron como un eficiente adsorbente de Ag^+ , Pb^{2+} y Hg^{2+} , reutilizable y capaz de ser separado de la disolución bajo un campo magnético externo. La adsorción de cationes de metales pesados se monitorizó en función del tiempo determinándose que a las 2 h se alcanzaba la saturación del nanomaterial. La cantidad de Ag^+ , Pb^{2+} y Hg^{2+} adsorbida era de 27,96; 16,02 y 14,99 mmol/g respectivamente. La máxima capacidad de adsorción de las Fe_3O_4 -PEDOT (437 mg/g) fue unas 7 veces superior a la de las nanopartículas de Fe_3O_4 funcionalizadas con quitosán que habían sido descritas previamente.⁹⁴ De forma similar, Yantasee y Warner⁹⁵ en 2007 funcionalizaron nanopartículas de Fe_3O_4 con ácido dimercaptosuccínico (DMSA) para adsorber de forma efectiva iones de metales como Hg, Ag, Pb, Cd y Tl debido a su interacción con estos ligandos. Las nanopartículas mostraron una elevada afinidad especialmente por Hg^{2+} y Pb^{2+} . Posteriormente, Jiang⁹⁶ preparó nanopartículas de Fe_3O_4 recubiertas con ácido húmico (HA) para la eliminación de Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} y Cu^{2+} de disoluciones acuosas. En este estudio se demostró que las nanopartículas de Fe_3O_4 -HA presentaban una mejor estabilidad y eficiencia en la eliminación de estos cationes comparado con las nanopartículas sin funcionalizar. El recubrimiento con HA redujo con eficacia la agregación de las nanopartículas además de incrementar significativamente la eliminación de los metales a pH ácido. Asimismo, en el trabajo se remarca que las nanopartículas preparadas no ejercían efectos negativos sobre el medio ambiente. Otras metodologías sintéticas probadas han llevado a recubrir las nanopartículas de Fe_3O_4 con sílica⁹⁷ para su posterior funcionalización dando buenos

⁹² El término “química click” se refiere a la reacción de cicloadición entre una azida y un alquino para dar 1,2,3-triazoles.

⁹³ S. Shin, J. Jang, *Chem. Commun.* **2007**, 4230-4232.

⁹⁴ R. Navarro, J. Guzmán, I. Saucedo, J. Revilla, E. Guibal, *Macromol. Biosci.* **2003**, 3, 552-561.

⁹⁵ W. Yantasee, C. L. Warner, T. Sangvanich, R. S. Addleman, T. G. Carter, R. J. Wiacek, G. E. Fryxell, C. Timchalk, M. G. Warner, *Environ. Sci. Technol.* **2007**, 41, 5114-5119.

⁹⁶ J.-F. Liu, Z.-S. Zhao, G.-B. Jiang, *Environ. Sci. Technol.* **2008**, 42, 6949-6954.

⁹⁷ (a) P. I. Girginova, A. L. Daniel-da-Silva, C.B. Lopes, P. Figueira, M. Otero, V. S. Amaral, E. Pereira, T. Trindade, *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, 345, 234-240; (b) M. Park, S. Seo, I. S. Lee, J. H. Jung, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 4478-4480; (c) L. Sun, Y. Li, M. Sun, H. Wang, S. Xu, C. Zhang, Q. Yang, *New J. Chem.* **2011**, 35, 2697-2704.

resultados en la eliminación de metales pesados. En esta misma línea cabe destacar los resultados presentados recientemente por Addleman⁹⁸ donde demuestran que se puede modificar la capacidad de adsorción de una nanopartícula de óxido de hierro a través del dopaje con un elemento inorgánico. En este caso, el dopaje con Mn aumentó significativamente la capacidad adsorbente del material comparado con las nanopartículas Fe₃O₄ solas. Además, la afinidad del material adsorbente hacia un analito de interés se pudo variar ajustando la cantidad del dopante.

Las investigaciones actuales para el reconocimiento tanto de cationes como aniones están encaminadas hacia la selectividad. Las nanopartículas, como se ha discutido en este apartado, actúan como soporte, pero la selectividad se debe alcanzar a través de la funcionalización tanto con moléculas orgánicas como con materiales inorgánicos. Por este motivo, se deben seguir desarrollando compuestos que permitan crear o simular entidades supramoleculares con el fin de lograr la selectividad deseada. En buena lógica, la funcionalización de nanopartículas con escuaramidas o derivados escuáricos, que en general ha sido poco estudiada, promete características favorables para el reconocimiento de cationes y aniones. Por ello, a priori, esta conjunción puede ser una opción satisfactoria.

⁹⁸ C. L. Warner, W. Chouyyok, K. E. Mackie, D. Neiner, L. V. Saraf, T. C. Droubay, M. G. Warner, R. S. Addleman, *Langmuir* **2012**, *28*, 3931-3937.

2.2 INTRODUCCIÓN A LAS ESCUARAMIDAS

Las escuaramidas son sistemas de anillos de cuatro miembros, derivados de ácido escuárico con la capacidad de formar hasta cuatro enlaces de hidrógeno. La elevada afinidad para formar estos enlaces de hidrógeno está relacionada con aumento en la aromaticidad del anillo cuando se producen las interacciones. Estas características en combinación con la rigidez estructural, han sido utilizadas en muchas de las aplicaciones de estos compuestos. Como ventaja adicional está el hecho de que las escuaramidas sustituidas pueden obtenerse a través de una síntesis modular bajo condiciones suaves de reacción e incluso en disoluciones acuosas, haciendo a estas unidades ideales para la bioconjugación y para la química supramolecular.

2.2.1 PROPIEDADES DE LAS ESCUARAMIDAS

Las escuaramidas, derivados del ácido escuárico, se sintetizaron por primera vez en 1959 por Cohen.⁹⁹ Desde su síntesis se han efectuado diversos estudios teóricos además de desarrollar numerosas aplicaciones. Sin embargo, no ha sido hasta hace relativamente poco tiempo que se han determinado al completo las inusuales propiedades que presenta esta estructura química.

El anillo de ciclobutenodiona, también conocido como ácido escuárico (**2.3**) se preparó inicialmente a través de la hidrólisis del 1,2-dicloro-3,3,4,4-tetrafluorociclobuteno.⁹⁹ La formación del correspondiente dianión **2.4** se caracteriza por una doble acidez inusualmente alta ($pK_{a1} = 0,54$; $pK_{a2} = 3,58$).¹⁰⁰ Este hecho es remarcable ya que son pocos los sistemas que pueden acomodar fácilmente una doble carga. La formación de dicho dianión¹⁰¹ está fuertemente estabilizada por la deslocalización de los electrones π . Esta estabilidad explica que el ácido escuárico sea más aromático a medida que se desprotona (Figura 2.2).

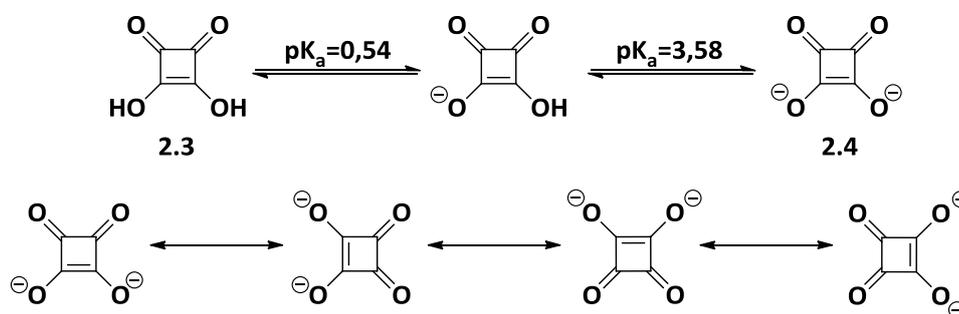


Fig. 2.2. Acidez y deslocalización de electrones del ácido escuárico.

⁹⁹ S. Cohen, S. G. Cohen, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 1533-1536.

¹⁰⁰ L. M. Schwartz, L. O. Howard, *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 1798-1803.

¹⁰¹ R. West, D. L. Powell, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2577-2579.

Las escuaramidas pueden ser consideradas como análogas a las amidas. Una de las principales características que tienen en común con estos grupos funcionales, es la elevada capacidad para formar enlaces de hidrógeno¹⁰² (Figura 2.3A). Esta capacidad aceptor-donador se ve acentuada por la conjugación del grupo carbonilo con su sustituyente más alejado¹⁰³ debido a la deslocalización del par de electrones libres del nitrógeno a través del sistema aromático ciclobutenodiona (Figura 2.3B). El dipolo representado por la forma zwitteriónica de las escuaramidas implica una cierta restricción en la rotación del enlace C-N.

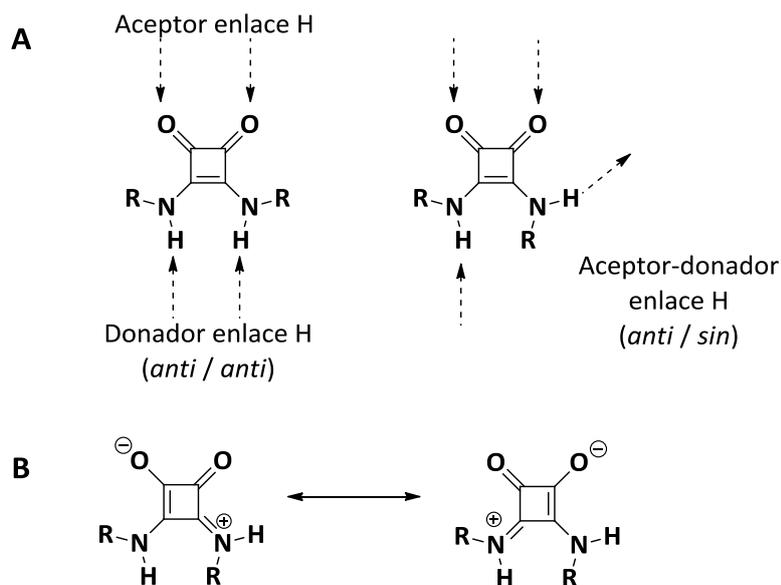


Fig. 2.3. (A) Representación de los posibles enlaces de hidrógeno que pueden formar las escuaramidas según sea su conformación anti/anti o anti/sin. (B) Formas zwitteriónicas de las escuaramidas.

A pesar de las evidentes similitudes entre amidas y escuaramidas, una característica distintiva de éstas últimas es la estructura rígida y planar del anillo ciclobutenodiona que contiene dos carbonilos coplanares y dos NH que son casi coplanares. Esta disposición, estabilizada por las formas zwitteriónicas descritas en la Figura 2.3B, permite que los residuos escuaramídicos sean adecuados para el reconocimiento molecular de cationes y aniones, simultáneamente, a través de enlaces de hidrógeno.¹⁰⁴ De hecho, estudios teóricos han demostrado que el carácter aromático parcial las escuaramidas aumenta al máximo posible tras la formación de complejos con cationes y aniones conjuntamente.^{102,105} Estas interacciones cooperativas coinciden con la capacidad de

¹⁰² D. Quiñonero, A. Frontera, P. Ballester, P. M. Deyà, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 2001–2005.

¹⁰³ G. Cerioni, R. Janoscheck, Z. Rappaport, T. T. Tidwell, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6212–6217.

¹⁰⁴ D. Quiñonero, R. Prohens, C. Garau, A. Frontera, P. Ballester, A. Costa, P. M. Deyà, *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *351*, 115–120.

¹⁰⁵ D. Quiñonero, C. Garau, A. Frontera, P. Ballester, A. Costa, P. M. Deyà, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 433–438.

complejación de los receptores escuaramídicos para fosfolípidos,¹⁰⁶ cationes tetralquilamonio¹⁰⁷ y aniones como carboxilatos,¹⁰⁸ nitratos y sulfatos.¹⁰⁹

La presumible rotación restringida alrededor del enlace C-N de una escuaramida daría lugar a una mezcla de conformémeros. Para una diescuaramida estándar como **2.5**, la simultánea participación de los dos grupos NH en un complejo escuaramida-carboxilato fuerza a la escuaramida a adoptar una conformación extendida anti/anti¹⁰⁷ (Figura 2.4). El estado sin/anti también se ha observado en algunos sistemas específicamente diseñados, como por ejemplo en la escuaramida mixta *N*-acil **2.6**, donde el acetato puede establecer un enlace de H intramolecular con el NH adyacente, estabilizando así esta conformación.¹¹⁰ Sin embargo, el conformémero sin/sin **2.7** no ha sido observado, probablemente debido a la mayor energía libre de Gibbs de esta conformación causada por el impedimento estérico de los sustituyentes R.¹¹¹ Las conformaciones anti/anti y sin/anti se han observado en disolución por RMN. La interconversión entre ambos conformémeros está separada por una barrera energética de ~ 63 kJ/mol.¹¹¹

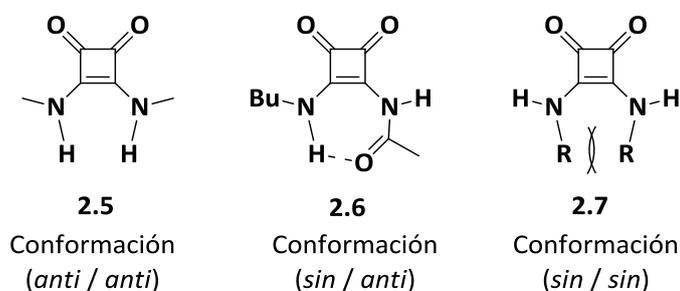


Fig. 2.4. Posibles conformaciones de escuaramidas. **2.5** y **2.6** han sido determinadas en disolución por RMN.

La capacidad para formar enlace de H de las escuaramidas se ha comparado con la de las ureas,¹¹² que también han demostrado ser excelentes donadores de enlaces de H, en base a la estabilidad de los complejos que forman con aniones. Se ha descrito que las constantes de asociación (K_{as}) de carboxilatos con ureas en DMSO están en el rango entre 50-150 M^{-1} . En cambio, para las escuaramidas se ha demostrado experimentalmente que las K_{as} para complejos entre diescuaramidas y acetato de tetrametilamonio en DMSO, se encuentran entre 217-1980 M^{-1} . Se evidencia así la superior capacidad de formación de

¹⁰⁶ S. Tomas, R. Prohens, G. Deslongchamps, P. Ballester, A. Costa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2208-2211.

¹⁰⁷ S. Tomas, R. Prohens, M. Vega, M. C. Rotger, P. M. Deyà, P. Ballester, A. Costa, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9394-9401.

¹⁰⁸ R. Prohens, S. Tomas, J. Morey, P. M. Deyà, P. Ballester, A. Costa, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1063-1066.

¹⁰⁹ C. Rotger, B. Soberats, D. Quiñonero, A. Frontera, P. Ballester, J. Benet-Buchholz, P. M. Deyà, A. Costa, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 1864-1868.

¹¹⁰ A. P. Davis, S. M. Draper, G. Dunne, P. Ashton, *Chem. Commun.* **1999**, 2265-2266.

¹¹¹ M. C. Rotger, M. N. Piña, A. Frontera, G. Martorell, P. Ballester, P. M. Deyà, A. Costa, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2302-2308.

¹¹² V. Amendola, G. Bergamaschi, M. Boiocchi, L. Fabbrizzi, M. Milani, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 4368-4380.

enlaces de H de las escuaramidas.¹¹³ Por otra parte, los potenciales electrostáticos sugieren que el hecho de que las escuaramidas tengan dos grupos carbonilos les permite formar interacciones más fuertes en un rango de posiciones más amplio que en las ureas, dado que éstas solo presentan un grupo carbonilo.¹¹⁴

2.2.2 ESCUARAMIDAS Y OTROS DERIVADOS DE ÁCIDO ESCUÁRICO COMO RECEPTORES DE IONES EN QUÍMICA SUPRAMOLECULAR

Tal como se ha explicado en el apartado anterior, los restos escuaramídicos presentan una notable capacidad para formar enlaces de H debido al aumento de aromaticidad en el anillo tras la coordinación con cationes y aniones. Esta característica se ha utilizado para la síntesis de diversos receptores con aplicaciones en el campo de la Química Supramolecular. Por ejemplo, Fusi y Micheloni¹¹⁵ han descrito la preparación de un criptando macrocíclico (**2.8**) que forma un complejo con Cu^{2+} a través de la base “poliaza” en el interior de la cavidad tridimensional que posteriormente, puede coordinar F^- , Cl^- y Br^- pero no I^- debido a su mayor tamaño. Este tipo de receptores tiene usos potenciales en el reconocimiento selectivo de iones relevantes a nivel biológico (Figura 2.5). Análogamente, en 2011, a través del mismo criptando macrocíclico formando un complejo con Zn^{2+} fueron capaces de coordinar F^- y Cl^- a pH fisiológico.¹¹⁶

Frontera, Quiñonero y Morey¹¹⁷ diseñaron un receptor escuaramídico heteroditópico (**2.9**). En este caso, un éter corona fue conjugado a un naftaleno a través de una escuaramida para generar un receptor capaz de disolver benzoato y acetato sódico en CHCl_3 , sales que son insolubles en este tipo de disolventes. La estructura de rayos X (RX) del cristal muestra enlaces de hidrógeno intramoleculares entre los grupos NH escuaramídicos y el éter corona (Figura 2.5).

Muthyala y Ramalingam¹¹⁸ prepararon un receptor para iones Cl^- (**2.10**) basado en escuaramidas, cuya cavidad de unión puede abrirse y cerrarse utilizando grupos carbonilo como válvulas. Este sensor ha sido diseñado para que las difenil-escuaramidas adopten preferentemente una conformación Z,Z. De este modo, en disolventes no polares los sustituyentes carbonilos impiden la unión del Cl^- por la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares, mientras que en disolventes polares, la ruptura de los enlaces intramoleculares reorienta los grupos carbonilo y abre la cavidad de

¹¹³ V. Amendola, L. Fabbrizzi, L. Mosca, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 3889-3915.

¹¹⁴ (a) D. Quiñonero, A. Frontera, G. A. Suñer, J. Morey, A. Costa, P. Ballester, P. M. Deyà, *Chem. Phys. Lett.* **2000**, 326, 247-254; (b) J. Alemán, A. Parra, H. Jiang, K. A. Jorgensen, *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 6890-6899; (c) V. Amendola, L. Fabbrizzi, L. Mosca, F.-P. Schmidtchen, *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 5972-5981.

¹¹⁵ G. Ambrosi, M. Formica, V. Fusi, L. Giorgi, A. Guerri, M. Micheloni, P. Paoli, R. Pontellini, P. Rossi, *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 702-712.

¹¹⁶ G. Ambrosi, M. Formica, V. Fusi, L. Giorgi, E. Macedi, M. Micheloni, P. Paoli, R. Pontellini, P. Rossi, *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 1670-1682.

¹¹⁷ A. Frontera, M. Orell, C. Garau, D. Quiñonero, E. Molins, I. Mata, J. Morey, *Org. Lett.* **2005**, 7, 1437-1440.

¹¹⁸ V. Ramalingam, M. E. Domaradzki, S. Jang, R. S. Muthyala, *Org. Lett.* **2008**, 10, 3315-3318.

coordinación. Este tipo de sensores podría tener futuras aplicaciones en el tratamiento de enfermedades como la fibrosis quística, rectificando un problema de transporte de iones (Figura 2.5).

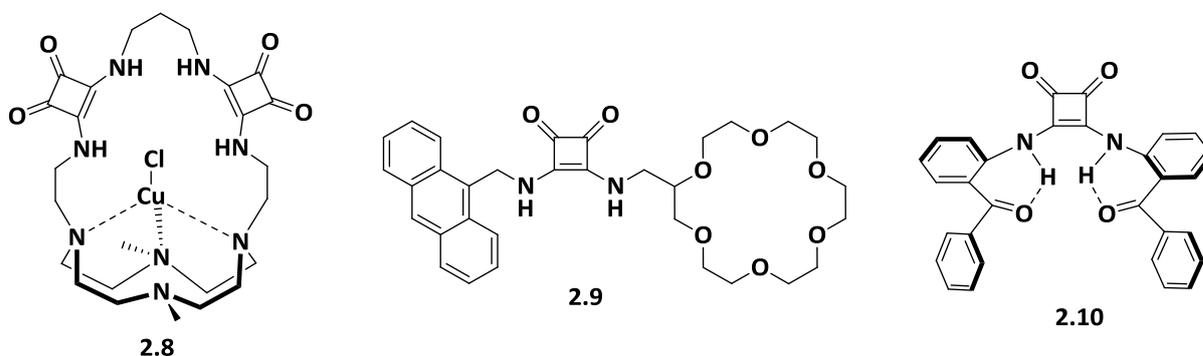


Fig. 2.5. Receptores para aniones basados en restos escuaramídicos.

Además de los ya mencionados, en los últimos años, muchos otros derivados escuaramídicos neutros y cargados se han utilizado para complejar aniones, como por ejemplo F^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , HPO_4^{2-} .^{110,119}

Una parte importante de la química de coordinación de aniones es la complejación selectiva de carboxilatos a través de receptores naturales y sintéticos.¹²⁰ El gran interés que despiertan estas especies en áreas como la química bioorgánica es debido a su implicación en diversos fenómenos de reconocimiento molecular de interés biológico. Los receptores sintéticos para el reconocimiento de carboxilatos generalmente se basan en grupos cargados como guanidinio o amidinio,¹²¹ o grupos donadores de enlace de hidrógeno neutros como amidas,¹²² ureas y tioureas,¹²³ pirroles¹²⁴ y aminoácidos naturales.¹²⁵

¹¹⁹ (a) M. N. Piña, B. Soberats, C. Rotger, P. Ballester, P. M. Deyà, A. Costa, *New J. Chem.* **2008**, 32, 1919-1923; (b) M. N. Piña, C. Rotger, B. Soberats, P. Ballester, P. M. Deyà, A. Costa, *Chem. Commun.* **2007**, 963-965; (c) A. Rostami, A. Colin, X. Y. Li, M. G. Chudzinski, A. J. Lough, M. S. Taylor, *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 3983-3992; (d) A. Rostami, C. J. Wei, G. Guérin, M. S. Taylor, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 2107-2110; (e) A. Rostami, C. J. Wei, G. Guérin, M. S. Taylor, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 2059-2062; (f) C. Jin, M. Zhang, L. Wu, Y. Guan, Y. Pan, J. Jiang, C. Lin, L. Wang, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 2025-2027; (g) C. Jin, M. Zhang, C. Deng, Y. Guan, J. Gong, D. Zhu, Y. Pan, J. Jiang, L. Wang, *Tetrahedron Lett.* **2013**, 54, 796-801; (h) R. Prohens, G. Martorell, P. Ballester, A. Costa, *Chem. Commun.* **2001**, 1456-1457.

¹²⁰ (a) R. J. Fitzmaurice, G. M. Kyne, D. Douheret, J. D. Kilburn, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2002**, 841-864; (b) C. Seel, J. de Mendoza, *Comprehensive Supramolecular Chemistry*; F. Vogtle, Ed.; Elsevier Science: Amsterdam, **1996**; Vol. 2, pp. 519.

¹²¹ (a) M. D. Best, S. L. Tobey, E. V. Anslyn, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, 240, 3-15; (b) A. Terfort, G. von Kiedrowski, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 654-656.

¹²² C. R. Bondy, S. J. Loeb, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, 240, 77-99.

¹²³ K. Choi, A. D. Hamilton, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, 240, 101-110.

¹²⁴ J. L. Sessler, S. Camiolo, P. A. Gale, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, 240, 17-55.

¹²⁵ (a) W. Guo, J. Wang, J. He, Z. Li, J.-P. Cheng, *Supramol. Chem.* **2004**, 16, 171-174; (b) K. Tanaka, M. Shionoya, K. Shigemori, *Chem. Commun.* **1999**, 2475-2478.

Siguiendo esta tendencia, también se han sintetizado receptores basados en unidades escuaramídicas para el reconocimiento molecular de carboxilatos. Por ejemplo, en 1999, Prohens y Costa¹²⁶ describieron la síntesis de un grupo de di y bis-escuaramidas, (**2.11**, **2.12** y **2.13**, Figura 2.6), demostrando que podían servir como unidades para coordinar este tipo de aniones aunque sin mostrar ninguna selectividad especial en la interacción. Recientemente, Al-Sayah y Branda¹²⁷ han demostrado la capacidad del receptor escuaramídico **2.14** para interactuar con acetato, comparándolo con un receptor análogo donde el anillo escuaramídico fue sustituido por una tiourea. En este estudio específico no se alude a la selectividad del proceso. Un ejemplo de receptor selectivo es el que describieron en 2006 Frontera, Morey y Anslyn.¹²⁸ El diseño tripodal del receptor **2.15** permite la formación de complejos estables con tricarboxilatos.

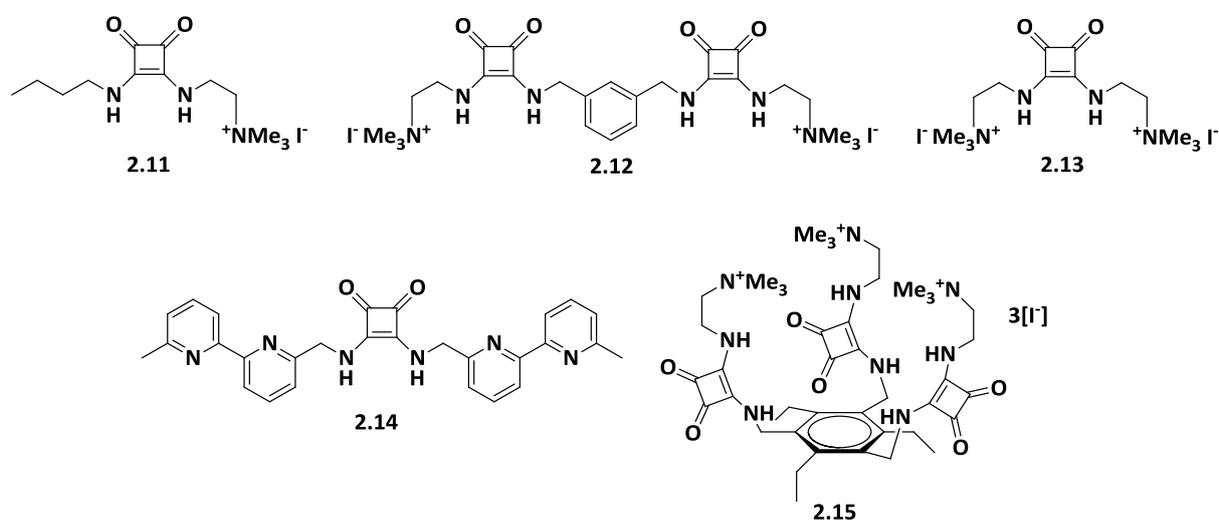


Fig. 2.6. Receptores para carboxilatos basados en restos escuaramídicos.

Los receptores tripodales **2.16** y **2.17** fueron preparados y utilizados para el reconocimiento de fólico y folatos antineoplásicos (metotrexato, raltitrexed y pemetrexed) en agua.¹²⁹ (Figura 2.7). En este estudio se demuestra la utilidad potencial de las unidades escuaramida-amonio en la interacción con los dicarboxilatos derivados de fólico, enfatizando en el papel fundamental de los enlaces de hidrógeno que se establecen entre los escuaratos y el anillo pteridina.

¹²⁶ R. Prohens, M. C. Rotger, M. N. Piña, P. M. Deyà, J. Morey, P. Ballester, A. Costa, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 4993-4936.

¹²⁷ M. H. Al-Sayah, N. R. Branda, *Thermochimica Acta* **2010**, *503-504*, 28-32.

¹²⁸ A. Frontera, J. Morey, A. Oliver, M. N. Piña, D. Quiñero, A. Costa, P. Ballester, P. M. Deyà, E. V. Anslyn, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7185-7195.

¹²⁹ D. Quiñero, K. A. López, P. M. Deyà, M. N. Piña, J. Morey, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 6187-6194.

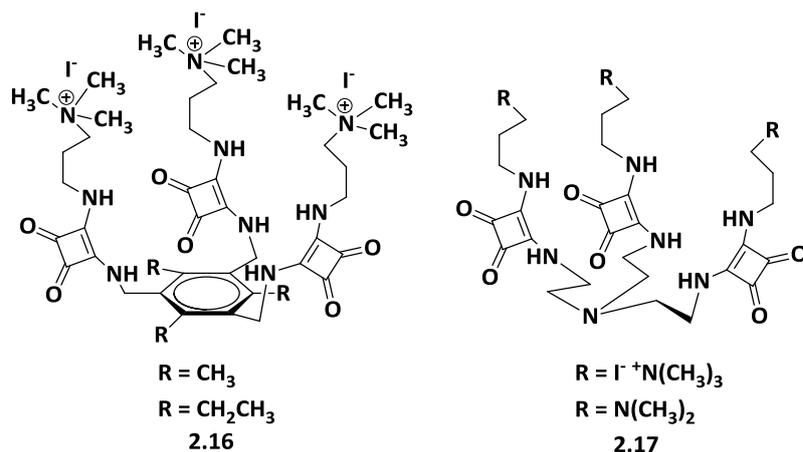


Fig. 2.7. Receptores tripodales para folatos basados en restos escuaramídicos.

Las unidades escuarato, como se ha comentado en los apartados anteriores, también son capaces de reconocer cationes. En este sentido, algunos de los estudios realizados se han enfocado en desarrollar quimiosensores para detectar la presencia de determinados iones metálicos en disolución. Los primeros ensayos de coordinación del dianión escuarato **2.4** con metales divalentes: Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} y Mg^{2+} y trivalentes: Al^{3+} , Fe^{3+} y Cr^{3+} fueron descritos por West y Niu en 1963.¹³⁰ Inicialmente, se propuso un modelo de coordinación η^2 (Figura 2.8A). Específicamente para los metales divalentes la estructura propuesta consistía en una cadena polimérica donde cada ión escuarato coordinaba dos iones metálicos diferentes dando un ordenamiento plano cuadrado a los oxígenos que se asociaban al metal (Figura 2.8B). Finalmente, dos moléculas de H_2O ocupaban las posiciones restantes para completar la geometría octaédrica del catión. Trabajos posteriores mostraron que la distancia entre los oxígenos de los carbonilos, impuesta por el anillo de ciclobuteno (3,3 Å) era demasiado larga para mantener la coordinación con los metales de transición del cuarto y quinto período que requieren 2,6 Å. Se sugirió en su lugar un modelo de coordinación η^1 como por el ejemplo el bis-monodentado¹³¹ esquematizado en la Figura 2.8C. Este tipo de coordinación es menos fuerte y específica que la formación de un quelato, por tanto, el desarrollo de un sensor específico para metales, incorporando restos de escuaratos, requería rediseñar la coordinación con el metal.

¹³⁰ R. West, H. Y. Niu, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2589-2590.

¹³¹ (a) M. Habenschuss, B. C. Gerstein, *J. Chem. Phys.* **1973**, *61*, 852-860; (b) A. Weiss, E. Riegler, C. Z. Robl, *Naturforsch. B: Chem. Sci.* **1986**, *41*, 1329-1332; (c) A. Weiss, E. Riegler, C. Z. Robl, *Naturforsch. B: Chem. Sci.* **1986**, *41*, 1332-1336; (d) X. Solans, M. Aguiló, A. Gleizes, J. Faus, M. Julve, M. Verdaguer, *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 775-784; (e) M. I. Khan, Y.-D. Chang, Q. Chen, J. Salta, Y.-S. Lee, C. J. O'Connor, J. Zubieta, *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 6340-6350; (f) M. Hilbers, M. Meiwald, R. Z. Mattes, *Naturforsch. B: Chem. Sci.* **1996**, *51*, 57-67.

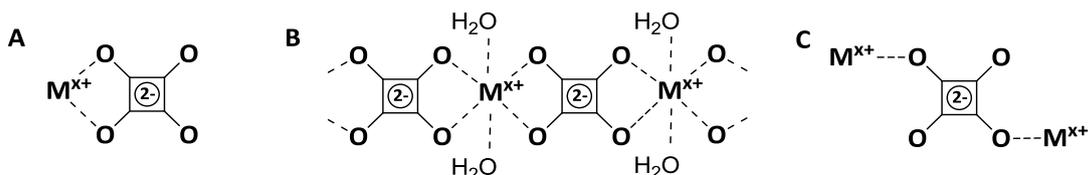


Fig. 2.8. A) Modelo de coordinación η^2 entre dianión escuárico e iones de metales. B) Estructura inicial propuesta para el complejo entre dianión escuárico y metales divalentes. C) Modelo de coordinación η^1 más acertado entre dianión escuárico y cationes metálicos.

Para lograr una mejor quelatación de metales se diseñaron derivados éster de ácidos escuáricos *N*-hidroxilamida como **2.18**. Se ha descrito que los aniones de ácidos hidroxámico quelatan Fe^{3+} con gran selectividad y que este complejo presenta una gran estabilidad termodinámica.¹³² Los modelos moleculares sugieren que el anión de estos análogos de ácido hidroxámico presentan las distancias apropiadas para la quelatación con este tipo de iones (2,8 Å entre los oxígenos) y que forman un metalociclo de seis miembros (Figura 2.9). Inicialmente diversos ésteres metílicos de ácidos escuáricos *N*-hidroxilamida fueron estudiados con Fe^{3+} y la coordinación sólo se observó bajo condiciones anhidras en disolventes apróticos, apuntando así, a una baja estabilidad para estos complejos.¹³³ Posteriormente, en 2003, Brückner¹³⁴ comparó la capacidad de quelatación de metales de los derivados éster y amida de ácidos escuáricos *N*-hidroxilamida **2.18** y **2.19** en disoluciones acuosas. En estas condiciones **2.19** pudo coordinar Fe^{3+} mientras que **2.18** no mostró ninguna señal de quelatación. En los últimos años también se ha estudiado la interacción de este tipo de derivados con otros metales, como por ejemplo Zn^{2+} , dado que estos compuestos pueden actuar como inhibidores de metaloproteasas¹³⁵ o derivados de esteroides.¹³⁶

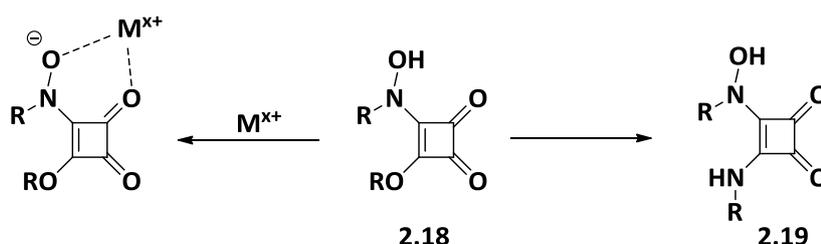


Fig. 2.9. Derivados éster y amida de ácidos escuáricos *N*-hidroxilamida (**2.18** y **2.19** respectivamente). Representación del ciclo de 6 miembros originado por la quelatación del metal a través del derivado hidroxámico.

¹³² R. C. Mehrota, *Comprehensive Coordination Chemistry*; G. Wilkinson, R. D. Gillard, J. A. McCleverty, Eds.; Pergamon Press: Oxford, 1987; Vol. 2, pp 505-514.

¹³³ G. Zinner, J. Grünefeld, *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)* **1985**, *318*, 977-983.

¹³⁴ N. C. Lim, M. D. Morton, H. A. Jenkins. C. Brückner, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9233-9241.

¹³⁵ (a) M. B. Onaran, A. B. Comeau, C. T. Seto, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10792-10802; (b) S. Hanessian, V. Vinci, L. Auzzas, M. Marzic, G. Giannini, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4784-4787.

¹³⁶ X. Zhang, Z. Zuo, J. Tang, K. Wang, C. Wang, W. Chen, C. Li, W. Xu, X. Xiong, K. Yuntai, J. Huang, X. Lan, H.-B. Zhou, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 3793-3797.

Además de los ácidos escuáricos *N*-hidroxilamida, las escuaraínas, otros derivados del ácido escuárico, han sido investigadas por su capacidad para coordinar diferentes cationes metálicos. Por ejemplo, en 1997, Das¹³⁷ diseñó una escuaraína (**2.20**) capaz de actuar como un sensor cromogénico para la detección selectiva de trazas de metales de transición y lantánidos en disoluciones acuosas (Figura 2.10). Con este sensor la concentración mínima detectable para Cu²⁺, La³⁺, Gd³⁺ y Lu³⁺ se encontraba entre 50-80 nM, para Hg²⁺ > 2 μM, para Pb²⁺ > 20 μM y para Mn²⁺ > 50 μM. Por otra parte, en el año 2000, Akkaya¹³⁸ describió la síntesis de la escuaraína **2.21** cuya respuesta fluorescente dependía de la estequiometría de la complejación con Zn²⁺ (Figura 2.10). A pesar de que cálculos teóricos previos¹³⁹ habían demostrado que la transferencia de carga en estas moléculas se centraba en el resto escuarilo, lo que convertía a los oxígenos de dicho anillo en los donadores de electrones principales, en este trabajo se demostró que dichos oxígenos por sí solos no eran capaces de quelatar al Zn²⁺, lo que sugería que el reconocimiento no se daba sólo a través de este grupo, sino que habían otros grupos funcionales implicados. Posteriormente, en 2009, Anslyn¹⁴⁰ describió la síntesis de un sensor (**2.22**) que permitía la diferenciación una serie de iones metálicos y ciertos tioles. Los metales y tioles actuaban como analitos o moduladores de la respuesta de la escuaraína. De esta forma, Hg²⁺, Pd²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺ y Ni²⁺ podían ser diferenciados cuando se combinaba la escuaraína con alguno de estos tioles: propanotiol, ácido 3-mercaptopropiónico, 2-naftalenotiol, 2,3-dimercaptopropanol y ácido 2-acetilamino-3-mercaptopropiónico. Del mismo modo, los cinco tioles propuestos podían ser identificados utilizando la misma escuaraína con alguno los cinco cationes metálicos (Figura 2.10). En este receptor, los oxígenos de la escuaraína tampoco eran los responsables del reconocimiento de los iones metálicos. Recientemente, en el año 2010 Whang y Cheng¹⁴¹ describieron la variación conformacional en disolución acuosa de un polímero derivado de escuaraína (**2.23**). La isomerización de esta poliescuaraína estaba inducida por la superficie de metales activos como Fe, Cu, Zn, Rh, Pt, Ag y Pb. A diferencia del cambio irreversible inducido por cationes en solución, la conformación plegada inducida por metales activos revertía a su estructura original tras eliminar el contacto entre dichos metales y la disolución (Figura 2.10).

¹³⁷ K. G. Thomas, K. J. Thomas, S. Das, M. V. George, *Chem. Commun.* **1997**, 597-598.

¹³⁸ G. Dilek, E. U. Akkaya, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 3721-3724.

¹³⁹ R. W. Bigelow, H. J. Freund, *Chem. Phys.* **1986**, *107*, 159-174.

¹⁴⁰ H. S. Hewage, E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13099-13106.

¹⁴¹ (a) H.-C. Lu, W.-T. Whang, B.-M. Cheng, *Chem. Phys. Lett.* **2010**, *500*, 267-271; (b) H.-C. Lu, W.-T. Whang, B.-M. Cheng, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 2568-2576.

2. Nanopartículas de óxidos de hierro funcionalizadas con escuarainas como receptores en Química Supramolecular

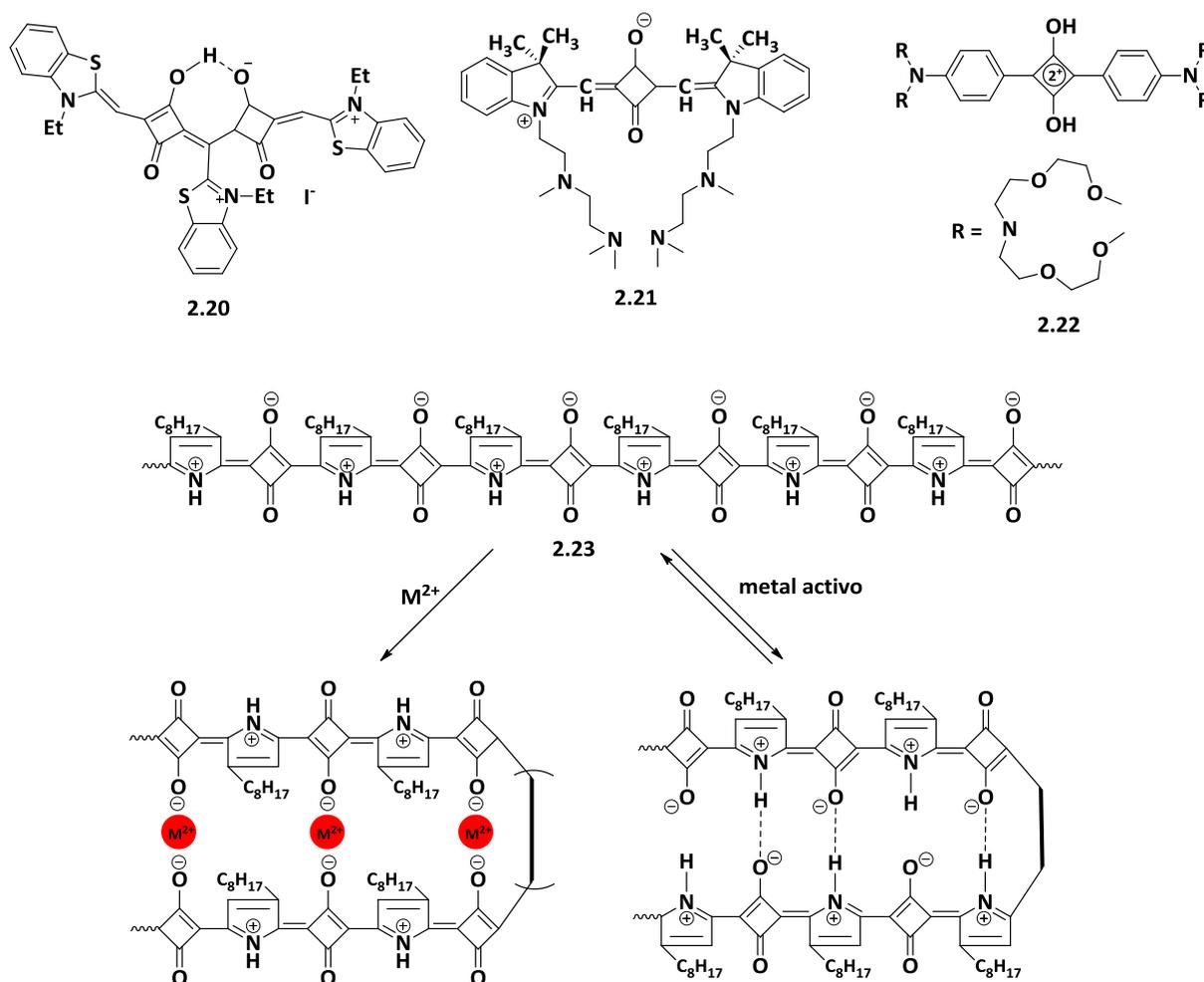


Fig. 2.10. Receptores de metales basados en escuarainas.

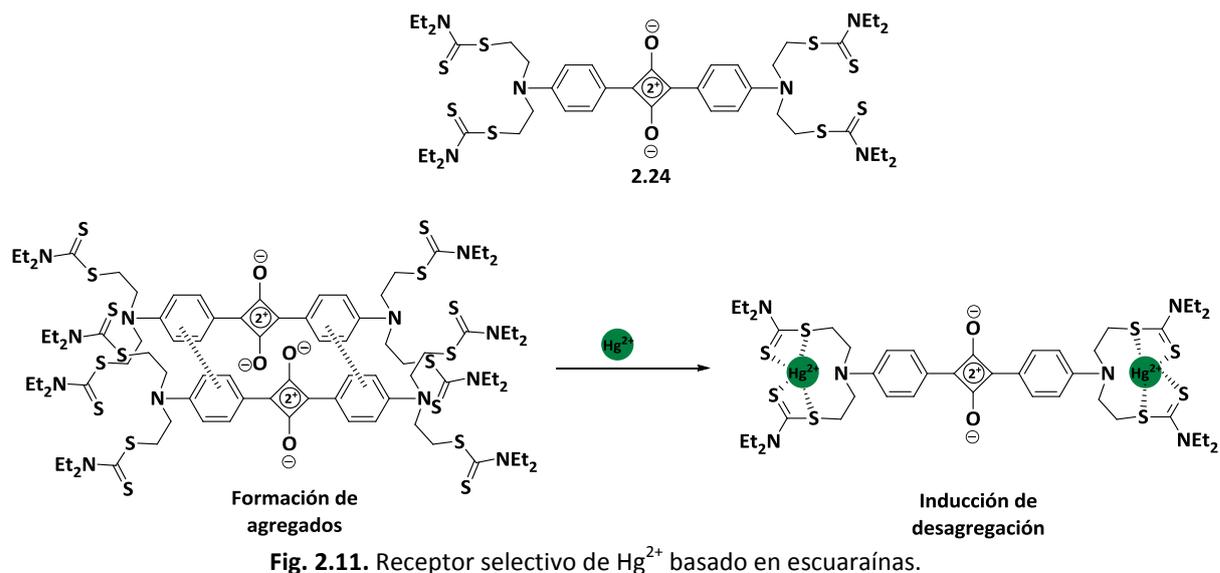
Además de estos receptores, en los últimos años se han desarrollado otros, también basados en escuarainas, con una mayor selectividad.¹⁴² Tal es el caso del receptor **2.24** descrito por Fu y Yuang¹⁴³ en 2011. En mezclas (40:60, v/v) de AcOH-H₂O, los iones Hg²⁺ se coordinan con **2.24** lo que causa una desagregación del receptor que induce a la aparición de un color y por tanto a cambios espectrales de absorción, así como una fuerte fluorescencia. En cambio, la adición de otros metales (Pb²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Al³⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Fe³⁺, Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺, Na⁺ o Ag⁺) no conduce a ninguna variación (Figura 2.11). En 2012, Fu¹⁴⁴ describió un receptor análogo a **2.24** que mostraba mayor selectividad y sensibilidad hacia Hg²⁺ y Ag⁺ en comparación con otros iones metálicos. Además, el complejo formado entre la escuaraina y el Hg²⁺ funcionaba también como un sensor colorimétrico y fluorescente para biomoléculas con grupos tioles.

¹⁴² J. V. Ros-Lis, M. D. Marcos, R. Martínez-Mañez, K. Rurack, J. Soto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4405-4407.

¹⁴³ C. Chen, R. Wang, L. Guo, N. Fu, H. Dong, Y. Yuan, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1162-1165.

¹⁴⁴ J. Fan, C. Chen, Q. Lin, N. Fu, *Sens. Actuators B Chem.* **2012**, *173*, 874-881.

2. Nanopartículas de óxidos de hierro funcionalizadas con escuaramidas como receptores en Química Supramolecular



Hasta el momento, todos los receptores descritos, derivados del ácido escuárico, se coordinan con los iones metálicos a través de uno de los carbonilos del anillo, o mediante grupos funcionales capaces de interactuar con los cationes en cuestión. En el año 2007, Ramaiah¹⁴⁵ describió un nuevo quimiosensor colorimétrico y fluorescente selectivo para Hg^{2+} . El sensor, basado en una semiescuaraína, se diferenciaba de los previamente referidos en la bibliografía por su interacción con el metal a través de los dos grupos carbonilos del anillo escuárico. En el trabajo se sugiere que la selectividad hacia Hg^{2+} puede atribuirse a su carácter de ácido débil,¹⁴⁶ así como al tamaño de los iones de mercurio. Además, se remarca que la distancia fija de 3,3 Å entre los dos grupos carbonilo del resto escuarilo puede acomodar idealmente a un ion de mercurio cuyo diámetro es de 2,2 Å.

Los antecedentes sobre derivados escuáricos desarrollados hasta este momento, sugieren que la selectividad en el proceso de reconocimiento tanto de cationes como aniones está relacionada con la preorganización del receptor o sensor en cuestión. La preparación de este tipo de receptores requiere un diseño racional y un esfuerzo sintético considerable.

¹⁴⁵ R. R. Avirah, K. Jyothish, D. Ramaiah, *Org. Lett.* **2007**, 9, 121-124.

¹⁴⁶ (a) A. Kunze, R. Gleiter, F. Rominger, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, 621-627; (b) J.-H. Huang, W.-H. Wen, Y.-Y. Sun, P.-T. Chou, J.-M. Fang, *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 5827-5832.

2.3 OBJETIVOS

Dadas las características tanto de las nanopartículas magnéticas de óxidos de hierro como de las escuaramidas, en este trabajo se decidió estudiar la capacidad de la conjunción NP-escuaramida como receptores para carboxilatos e iones de metales pesados. Así, se plantearon los objetivos específicos que se detallan a continuación.

1. Síntesis y caracterización de nuevas di y bis-diescuaramidas asimétricas. Para el posterior acoplamiento con nanopartículas de óxidos de hierro, todas las escuaramidas sintetizadas tendrán en uno de sus extremos un agente de unión o "linker" adecuado para esta reacción. La caracterización de todas las nuevas moléculas se realizará a través de las técnicas de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H (^1H -RMN), Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C (^{13}C -RMN), Espectrometría de Masas (EM) o Desorción/Ionización Láser asistida por Matriz (MALDI) y Espectroscopía Infrarroja (IR).
2. Síntesis y caracterización de nanopartículas de óxido de hierro (Fe_3O_4) funcionalizadas con di y bis-diescuaramidas (Fe_3O_4 -ESQ). La caracterización básica para comprobar la correcta funcionalización de las nanopartículas se realizará a través de IR. Una vez sintetizadas estas nanopartículas híbridas se evaluará la solubilidad de las mismas en disoluciones acuosas y se elegirán las más apropiadas para efectuar los posteriores ensayos.
3. Evaluación de la capacidad de reconocimiento de carboxilatos que presentan las Fe_3O_4 -ESQ en disoluciones acuosas. Para ello se realizarán experimentos por competición mediante técnicas de fluorescencia.
4. Estudio de la selectividad de Fe_3O_4 -ESQ en el reconocimiento de mono, di y tricarboxilatos. En este punto se evaluará la capacidad de coordinación selectiva que pueden presentar dichas nanopartículas funcionalizadas sin preorganización alguna comparándolas con receptores escuaramídicos previamente descritos.
5. Cuantificación de carboxilatos coordinados a Fe_3O_4 -ESQ. A través de ^1H -RMN se efectuará la cuantificación de carboxilatos retenidos por diferencia respecto a las cantidades iniciales.
6. Evaluación de la capacidad de coordinación y eliminación de metales pesados en disoluciones acuosas que presentan Fe_3O_4 -ESQ. Se estudiarán nanopartículas de óxidos de hierro funcionalizadas con di y bis-diescuaramidas respectivamente para establecer posibles diferencias al utilizar una o dos unidades escuaramídicas dentro de la misma cadena. Para ello se cuantificarán mediante el Plasma de Acoplamiento Inductivo con un Espectrómetro de Emisión Óptica (ICP-OES) el remanente de metales en las disoluciones tratadas con las diversas nanopartículas.

2. Nanopartículas de óxidos de hierro funcionalizadas con escuaramidas como receptores en Química Supramolecular

7. Estudio de la selectividad de Fe₃O₄-ESQ en el reconocimiento de metales pesados en disolución acuosa. Para ello se comparará cuantitativamente la retención de cada uno de estos metales por parte de las nanopartículas funcionalizadas cuando se encuentran solas en disolución o en presencia de una mezcla de diferentes metales.
8. Establecimiento de un modelo análogo de escuaramidas sin nanopartículas para estudiar de forma adecuada el papel del grupo escuaramídico en la coordinación con diferentes metales pesados. Los estudios se llevarán a cabo utilizando técnicas como EM, MALDI y ¹H-RMN.

2.4 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE HIERRO FUNCIONALIZADAS CON RESTOS ESCUARAMÍDICOS.

El acoplamiento directo entre una nanopartícula de magnetita y un escuarato o escuaramida no es una reacción factible. Para la síntesis de nanopartículas de óxidos de hierro, funcionalizadas covalentemente con restos escuaramídicos, se requiere la conjugación previa de las escuaramidas a un agente de unión (linker) o un espaciador que sirva de nexo entre ambas especies.

En los últimos años se han utilizado diferentes “linkers”¹⁴⁷ con dos objetivos principales:

1. Estabilización de las nanopartículas en medios hidrofóbicos o hidrofílicos frente a fenómenos como agregación, lixiviación, oxidación, entre otros.
2. Facilitar la posterior funcionalización de las nanopartículas con moléculas específicas a partir de grupos funcionales reactivos en las posiciones terminales del linker.

Algunos de los más utilizados en la funcionalización de nanopartículas de óxidos de hierro son: carboxilatos, sulfatos, fosfatos, metoxi o etoxisilanos y catecoles.¹⁴⁸ También se han utilizado recubrimientos de materiales inorgánicos como sílica, oro, polímeros como el polietilenglicol (PEG)¹⁴⁹, polivinilalcohol (PVA), chitosán, dextrano entre otros. Todos ellos tienen en común grupos funcionales con oxígeno, dado que los átomos de hierro reaccionan con átomos de oxígeno de forma preferencial y con mucha facilidad.

En este trabajo se ha elegido como conexión entre las nanopartículas de magnetita y las diferentes escuaramidas, la dopamina y el 3-(aminopropil)triethoxisilano (APTES). En la Figura 2.12 se presentan las estructuras químicas de ambos compuestos donde se han señalado con dos colores diferentes los grupos funcionales que permiten la conjunción entre las nanoferritas y las escuaramidas. Los hidroxilos fenólicos y los grupos etoxisilanos (ambos en rojo) reaccionan con los iones de hierro de la superficie de la nanopartícula. Por su parte, las aminas primarias terminales presentes tanto en la dopamina como en el APTES (en azul) son los puntos de reacción con los escuaratos o escuaramidas.

Es conocido que los escuaratos reaccionan fácilmente con aminas (principalmente primarias y alifáticas) en condiciones muy suaves de reacción; temperatura ambiente y agitación durante varias horas.

¹⁴⁷ S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst, R. N. Muller, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2064-2110.

¹⁴⁸ (a) Y. Sahoo, H. Pizem, T. Fried, D. Golodnitsky, L. Burstein, C. N. Sukenik, G. Markovich, *Langmuir* **2001**, *17*, 7907-7911; (b) L. Lartigue, K. Oumzil, Y. Guari, J. Larionova, C. Guérin, J. L. Montero, V. Barragan-Montero, C. Sangregorio, A. Caneschi, C. Innocenti, T. Kalaivani, P. Arosio, A. Lascialfari, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2992-2995; (c) J. Xie, K. Chen, H.-Y. Lee, C. Xu, A. R. Hsu, S. Peng, X. Chen, S. Sun, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7542-7543.

¹⁴⁹ (a) A. K. Gupta, S. Wells, *IEEE Transc. Nanobioscience* **2004**, *3*, 66-73; (b) Y. Zhang, N. Kohler, M. Zhang, *Biomaterials* **2002**, *23*, 1553-1561.

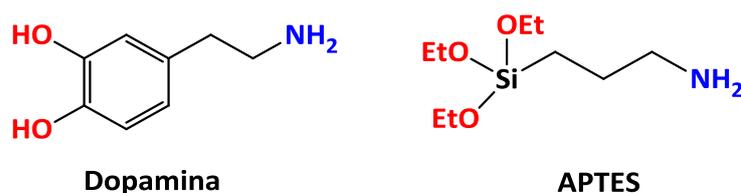


Fig. 2.12. Estructura química de los linkers utilizados para unir las escuaramidas a las nanopartículas. En rojo se han señalado los puntos de unión a la superficie de las nanopartículas a través de los iones de Fe. En azul se muestran los puntos de reacción con los derivados escuaramídicos.

La dopamina se ha utilizado desde hace años para funcionalizar la superficie de nanopartículas de óxidos de hierro debido a que es un linker robusto, y que permite la posterior incorporación de moléculas funcionales a través de la amina terminal.¹⁵⁰ Algunos derivados del catecol recientemente estudiados han demostrado formar disoluciones coloidales de NP Fe₃O₄ altamente estables.¹⁵¹ Estudios espectroscópicos sugieren que los ligandos bidentados enediolos como la dopamina convierten los átomos de Fe superficiales sub-coordinados en átomos iguales al resto de la estructura. Estos ligandos ofrecen un entorno octaédrico (*Oh*) a los iones Fe³⁺. Por este motivo se considera que el enlace entre la dopamina y la superficie de óxido de hierro es fuerte.¹⁵² La estabilidad de dicho enlace superficial se ve incrementada por la reestructuración de la superficie de la nanopartícula inducida por el ligando. La sub-coordinación de los átomos superficiales, en general, potencia la reactividad de las superficies de los óxidos metálicos.¹⁵³ El enlace metal-catecolato es altamente covalente con contribución tanto σ como π lo que aumenta la estabilidad global del complejo.^{52a,154}

Por otra parte, se ha comprobado a través de isothermas de Langmuir que la desorción de la dopamina de la superficie de nanopartículas de óxidos metálicos es menos favorable que la adsorción. En estas nanopartículas, un gran porcentaje de la superficie se recubre de este tipo de ligandos. Aquellos puntos donde no se produce la quelatación es, probablemente, debido al impedimento estérico entre moléculas de dopamina vecinas.

¹⁵⁰ (a) C. Xu, K. Xu, H. Gu, R. Zheng, H. Liu, X. Zhang, Z. Guo, B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9938-9939; (b) N. Kemikli, H. Kavas, S. Kazan, A. Baykal, R. Ozturk, *J. Alloys Compd.* **2010**, *502*, 439-444; (c) H. Qu, D. Caruntu, H. Liu, C. J. O'Connor, *Langmuir* **2011**, *27*, 2271-2278; (d) D. Losic, Y. Yu, M. S. Aw, S. Simovic, B. Thierry, J. Addai-Mensah, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6323-6325; (e) K. V. Korpany, F. Habib, M. Murugesu, A. S. Blum, *Mater. Chem. Phys.* **2013**, *138*, 29-37; (f) P. An, F. Zuo, Y. P. Wue, J. H. Zhang, Z. H. Zheng, X. B. Ding, Y. X. Peng, *Chin. Chem. Lett.* **2012**, *23*, 1099-1102.

¹⁵¹ (a) E. Amstad, T. Gillich, I. Bilecka, M. Textor, E. Reimhult, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 4042-4048; (b) E. Amstad, A. U. Gehring, H. Fischer, V. V. Nagaiyanallur, G. Hähner, M. Textor, E. Reimhult *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 683-691.

¹⁵² L. X. Chen, T. Liu, M. C. Thurnauer, R. Csencsits, T. Rajh, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 8539-8546.

¹⁵³ A. K. L. Yuen, G. A. Hutton, A. F. Masters, T. Maschmeyer, *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 2545-2559.

¹⁵⁴ A. S. de Dios, M. E. Díaz-García, *Anal. Chim. Acta* **2010**, *666*, 1-22.

La estabilidad del enlace entre la dopamina y los átomos metálicos de las nanopartículas es mayor que la estabilidad proporcionada por grupos como carboxilatos, fosfatos o silanos.¹⁵⁵

Tras la preparación inicial de nanopartículas recubiertas con grupos aminosilano en 2003 por Ma,¹⁵⁶ en los últimos años también se ha recurrido con frecuencia a la funcionalización con APTES.¹⁵⁷ La afinidad de los grupos silano por los grupos hidroxilo presentes en la superficie de las NP Fe₃O₄ lleva a la formación de enlaces Si-O, dejando la amina terminal de estos grupos libre para futuros pasos de reacción. Diversos estudios realizados evidencian la formación de una capa polimérica de aminosilanos debido a la formación de enlaces Si-O-Si entre dos moléculas colindantes. Además, recientes análisis termogravimétricos (TGA) revelan que la reacción superficial entre Fe₃O₄ y los derivados trietoxisilano es lenta y requiere tiempos de reacción elevados.¹⁵⁸

La funcionalización de nanopartículas de óxidos de hierro en general, se puede realizar siguiendo dos metodologías diferentes tal como se esquematiza en la Figura 2.13. La primera de ellas (Figura 2.13A) es una funcionalización por pasos, donde inicialmente se recubre la superficie de la nanopartícula con un linker apropiado y, a partir de los grupos reactivos libres de dicho linker, se procede a introducir nuevas moléculas de interés. La segunda metodología (Figura 2.13B) se basa en sintetizar primero la molécula final que se quiere unir a la nanopartícula, con el linker en uno de sus extremos, y finalmente realizar el acoplamiento a la superficie de la nanopartícula.

La funcionalización de nanopartículas de magnetita con escuaramidas se realizó siguiendo la segunda metodología descrita, ya que así se consigue tener el máximo número de escuaramidas sobre la superficie. Si las nanopartículas se funcionalizan inicialmente con el linker y se hacen reaccionar con las escuaramidas en un segundo paso, el grado de funcionalización con escuaramidas dependerá del rendimiento general de la reacción de acoplamiento y del impedimento estérico que se genere. En cambio, siguiendo la segunda metodología, el grado de funcionalización con escuaramidas dependerá solamente del impedimento estérico que se genere entre las cadenas. Debido a que serán las propias escuaramidas las que actuarán como receptores, se precisa la mayor cantidad posible de las mismas para favorecer la interacción con carboxilatos o iones de metales pesados.

¹⁵⁵ (a) T. Rajh, L. X. Chen, K. Lukas, T. Liu, M. C. Thurnauer, D. M. Tiede, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 10543-10552; (b) T. Rajh, O. Poluektov, A. A. Dubinski, G. Wiederrecht, M. C. Thurnauer, A. D. Trifunac, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *344*, 31-39.

¹⁵⁶ M. Ma, Y. Zhang, W. Yu, H. Y. Shen, H. Q. Zhang, N. Gu, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **2003**, *212*, 219-226.

¹⁵⁷ (a) Z. Sun, V. Yathindranath, M. Worden, J. A. Thliveris, S. Chu, F. E. Parkinson, T. Hegmann, D. W. Miller, *Int. J. Nanomedicine* **2013**, *8*, 961-970; (b) Y. Cui, Y. Li, Y. Yang, X. Liu, L. Lei, L. Zhou, F. Pan, *J. Biotechnol.* **2010**, *150*, 171-174; (c) M. Zhu, M. Z. Lerum, W. Chen, *Langmuir* **2012**, *28*, 416-423.

¹⁵⁸ F. Galeotti, F. Bertini, G. Scavia, A. Bolognesi *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *360*, 540-547.

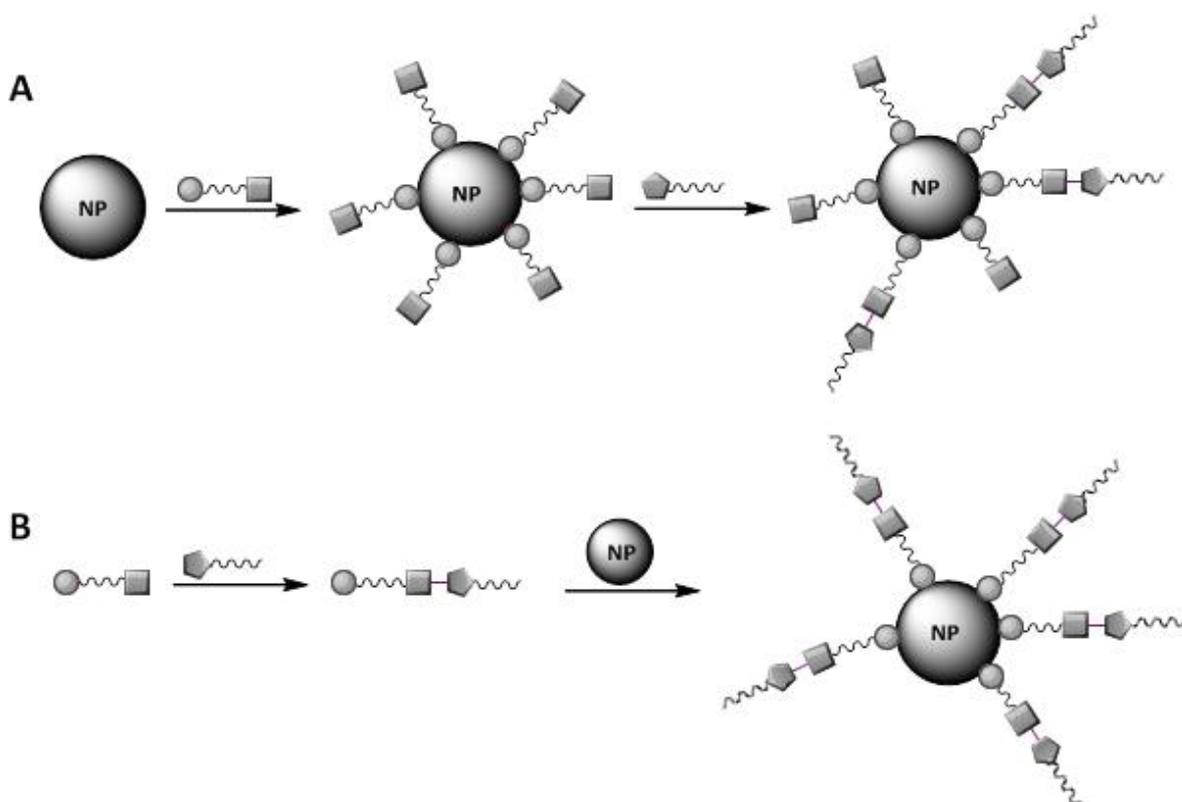


Fig. 2.13. Representación esquemática de las dos metodologías para funcionalizar nanopartículas de óxidos de hierro.

2.4.1 SÍNTESIS DE ESCUARAMIDAS

La síntesis de escuaramidas ha sido ampliamente investigada durante los últimos años. Las rutas sintéticas que conducen a diescuaramidas (una unidad de escuarato) y a bis-diescuaramidas (dos unidades de escuarato), actualmente, están completamente optimizadas.

Los ésteres (metílico, etílico, propílico y butílico) del ácido escuárico ofrecen la posibilidad de crear uniones covalentes a partir de una amina alifática con relativa facilidad y en condiciones suaves de reacción. Las aminas de naturaleza aromática precisan condiciones de reacción más enérgicas para la condensación con escuaratos. Los rendimientos de todas estas reacciones suelen ser elevados, lo cual desde el punto de vista sintético, convierte a las escuaramidas en compuestos muy atractivos.

La metodología general de síntesis se fundamenta en la fácil condensación del escuarato de dietilo con aminas tanto primarias como secundarias. Las condiciones de reacción permiten obtener selectivamente monoescuaramidas-éster o diescuaramidas. Tal como se muestra en la Figura 2.14 para la síntesis de monoescuaramidas-éster (o semiescuaramidas) se emplea 1 equivalente de la amina, utilizando éter dietílico como disolvente.

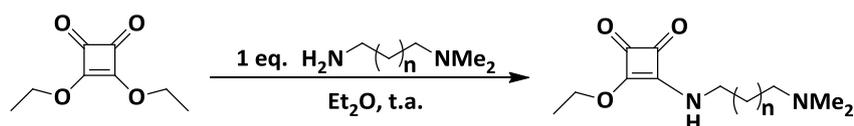


Fig. 2.14. Síntesis de monoescuaramidas-éster.

Para la síntesis de diescuaramidas no simétricas se parte de la monoescuaramida-éster, que se condensa con la segunda amina utilizando etanol como disolvente. En cambio, para la obtención de diescuaramidas simétricas (Figura 2.15) se utilizan 2 equivalentes de la amina y se emplea como disolvente etanol. Esta regioselectividad se ve inducida por la insolubilidad de las escuaramidas-éster en éter dietílico^{134,159} y resulta muy ventajoso para conseguir productos de monocondensación con rendimientos, en general, por encima del 85%.

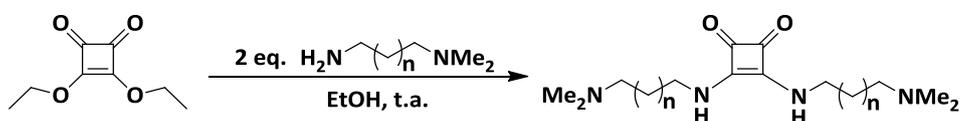


Fig. 2.15. Síntesis de diescuaramidas simétricas.

Para sintetizar bis-diescuaramidas simétricas se siguen las mismas metodologías descritas anteriormente. (Figura 2.16). En este caso, se hacen reaccionar 2 equivalentes de escuarato de dietilo con uno de diamina, utilizando como disolvente el éter dietílico que provoca la precipitación de la bis-monoescuaramida diéster. Posteriormente, en presencia de etanol y 2 equivalentes adicionales de la amina se obtiene la correspondiente bis-diescuaramida.

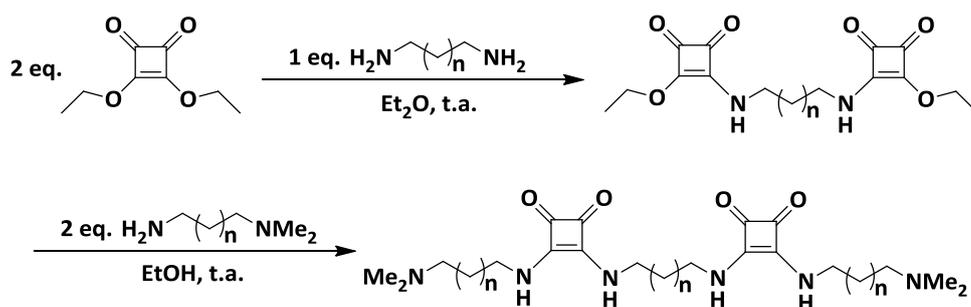


Fig. 2.16. Síntesis de bis-diescuaramidas simétricas.

Para sintetizar bis-diescuaramidas asimétricas, es decir, aquellas en las que se utilicen dos aminas terminales diferentes, se sigue un procedimiento muy similar al anterior, tal como se muestra en la Figura 2.17. A partir de la bis-monoescuaramida diéster se adicionan, en 2 pasos diferentes, cada una de las aminas correspondientes.

¹⁵⁹ A. H. Schmidt; *Synthesis* **1980**, *12*, 961-994.

2. Nanopartículas de óxidos de hierro funcionalizadas con escuaramidas como receptores en Química Supramolecular

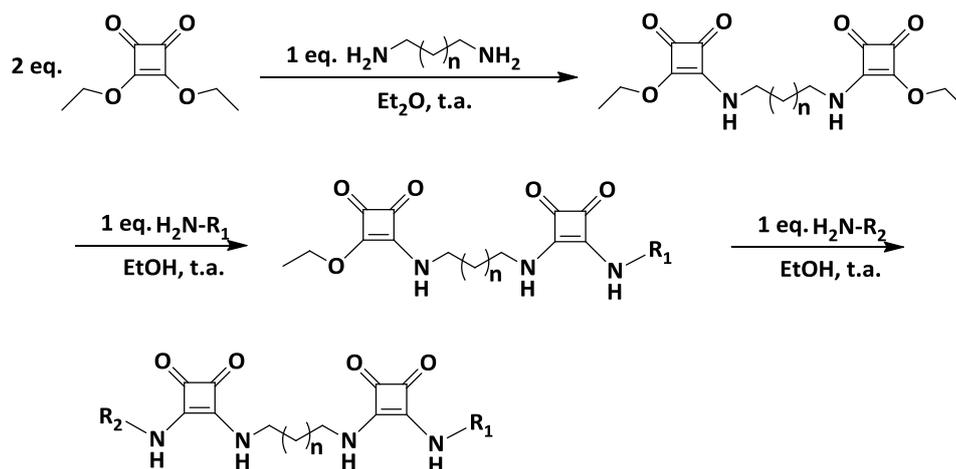


Fig. 2.17. Síntesis de bis-diescuaramidas asimétricas.

Finalmente, las escuaramidas catiónicas se pueden obtener fácilmente a partir de diaminas con unidades *N,N*-dimetilamino, que tras una exhaustiva metilación se transforman en restos alquilamonio.

En la bibliografía se describen tanto diescuaramidas como bis-diescuaramidas que actúan como sensores supramoleculares. Por este motivo, para este trabajo se sintetizaron diescuaramidas y bis-diescuaramidas, para evaluar y comparar la capacidad de interacción supramolecular con carboxilatos y cationes de metales pesados una vez unidas a las nanopartículas. Cabe mencionar, que todas las escuaramidas sintetizadas en este trabajo son asimétricas debido a la presencia de uno de los dos linkers anteriormente mencionados en un extremo.

2.4.2 SÍNTESIS DE DIESCUARAMIDAS (C1-C4)

En la Figura 2.18 se muestra un resumen de todas las diescuaramidas que fueron sintetizadas para su posterior funcionalización con nanopartículas de óxido de hierro.

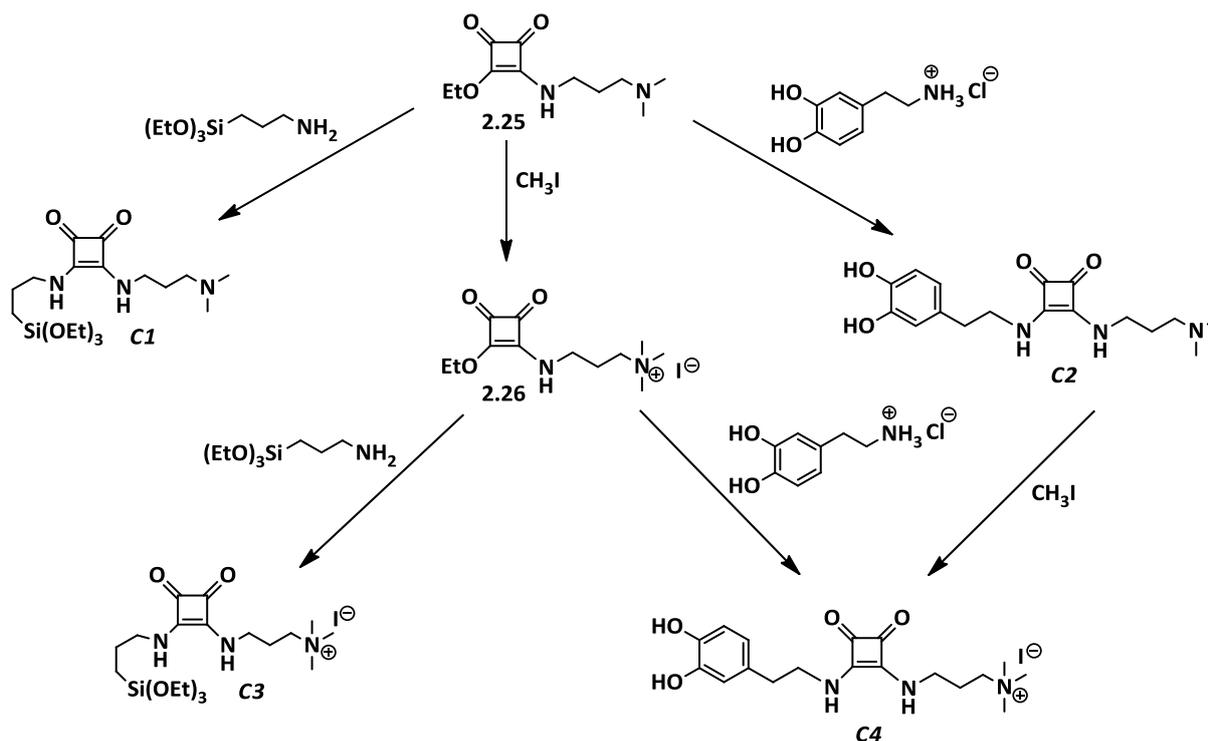


Fig. 2.18. Resumen sintético de las diescuaramidas preparadas.

Para la síntesis de las diescuaramidas **C1-C4** se siguió la metodología descrita anteriormente. Partiendo del escuarato de dietilo se pudo obtener la monoescuaramida **2.25**, tal como se describe en la Figura 2.19. La posterior metilación con yoduro de metilo en DMF/Acetona permitió obtener la sal de amonio **2.26** con buen rendimiento. Ambos productos han sido descritos con anterioridad en nuestro grupo de investigación.^{111,119b}

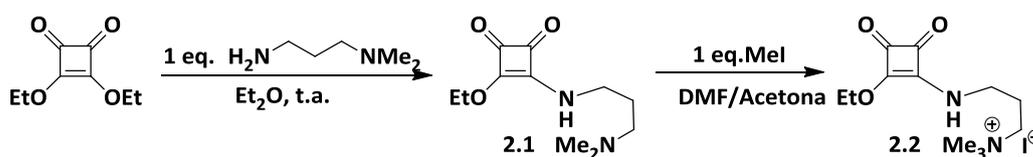


Fig. 2.19. Esquema de síntesis para monoescuaramidas-éster **2.25** y **2.26**.

A partir de los productos **2.25** y **2.26** se obtuvo directamente la familia de diescuaramidas **C1-C4**, por condensación con las aminas dopamina y APTES (3-aminopropiltri-etoxisilano) tal como se muestra en las Figuras 2.20 y 2.21.

La preparación de la escuaramida asimétrica etoxisilano **C1** se realizó fácilmente por asociación de la escuaramida **2.25** con la correspondiente amina primaria APTES. Para evitar la hidrólisis¹⁶⁰ del grupo alquiltri-etoxisilano, fue necesario el uso de etanol anhidro como disolvente. Se ha observado el intercambio de estos grupos, etoxi por hidroxilo, en las

¹⁶⁰ (a) M. D. Hawley, S. V. Tatawawadi, S. Piekarski, R. N. Adams, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 447-450; (b) M. B. Smith, J. March, *March's Advanced Organic Chemistry. Reactions, Mechanisms, and Structure*, 5ta ed.; John Wiley & Sons Inc, **2001**, pp. 1517-1518.

condiciones experimentales utilizadas, que se caracterizan por largos tiempos de reacción, generalmente 12 horas, a pH básico.

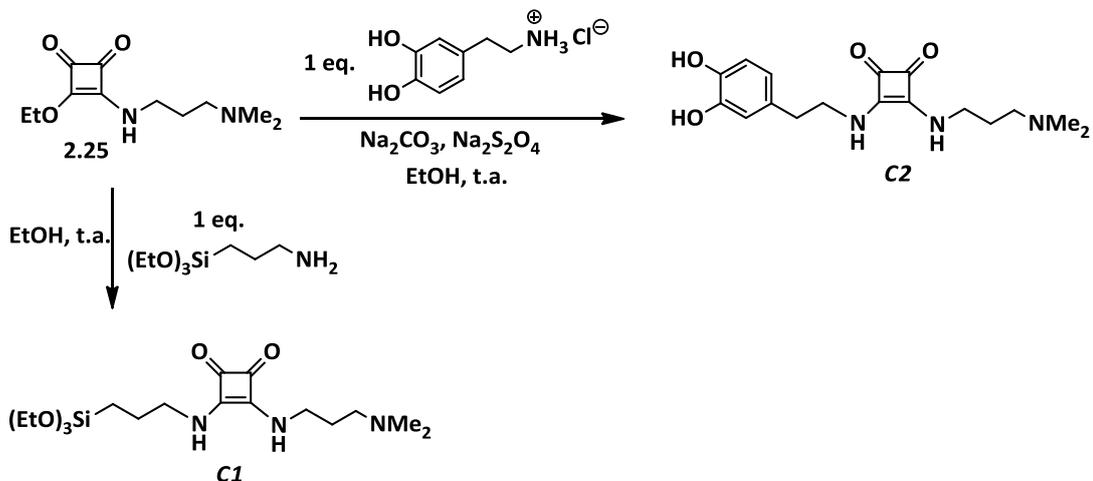
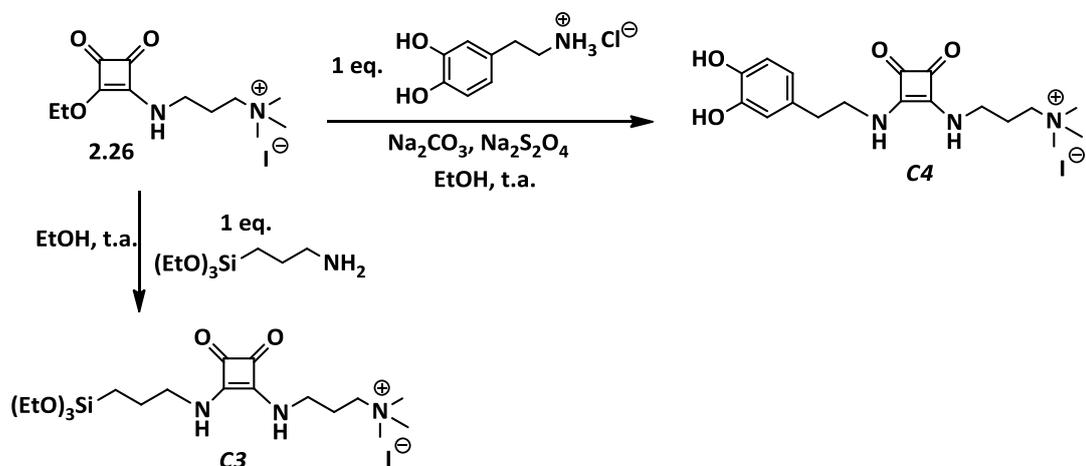


Fig. 2.20. Síntesis de **C1** y **C2** a partir del producto **2.25**.

Por su parte, la escuaramida asimétrica **C2** se obtuvo por condensación de la escuaramida **2.25** con la dopamina en un rendimiento moderado. Para reducir al mínimo la fácil y no deseada formación de la orto-quinona de la dopamina,¹⁶¹ dopaquinona (DQ), se procedió adicionando un exceso de ditionito sódico sólido (1,5 equivalentes) al medio de reacción.¹⁶² Este reactivo reductor impide la oxidación del grupo catecol y aumenta el rendimiento de la reacción. La presencia de DQ se observa experimentalmente por la aparición de un color negro en la mezcla de reacción. Además, para desprotonar la amina terminal de la dopamina, que comercialmente se encuentra como sal de amonio, se añadió un exceso de carbonato sódico sólido (4 equivalentes). Finalmente, la mezcla de reacción se aisló del oxígeno del aire y de la luz, manteniendo el conjunto experimental en atmósfera de argón en la oscuridad.



¹⁶¹ J. Morey, J. M. Saá, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 105-112.

¹⁶² G. S. Caravajal, D. E. Leyden, G. R. Quinting, G. E. Maciel, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1776-1786.

Fig. 2.21. Síntesis de **C3** y **C4** a partir del producto **2.26**.

Para la obtención de las sales de yoduro de amonio asimétricas trimetilalquil escuaramidas, **C3**⁸² y **C4**, se partió de la escuaramida **2.26** y se procedió de igual forma que para la obtención de las escuaramidas previas **C1** y **C2** (Figura 2.21). Cabe mencionar finalmente, que el compuesto **C4** se puede obtener por metilación directa de **C2** (Figura 2.22), sin la protección de los hidroxilos aromáticos, debido a que el pH al que se trabaja no es apropiado para la formación del éter dimetoxi aromático (reacción de Williamson) desde el residuo catecol de la dopamina.

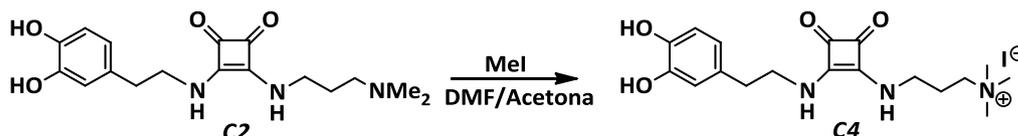


Fig. 2.22. Síntesis de **C4** a partir **C2**.

2.4.3 SÍNTESIS DE BIS-DIESCUARAMIDAS (C5-C11)

La síntesis de bis-diescuaramidas transcurrió a través de las bis-escuaramidas **2.27-2.29** y su posterior reacción con una amina para dar las bis-monoescuaramidas (**2.30-2.32**) tal como se esquematiza en la Figura 2.23.

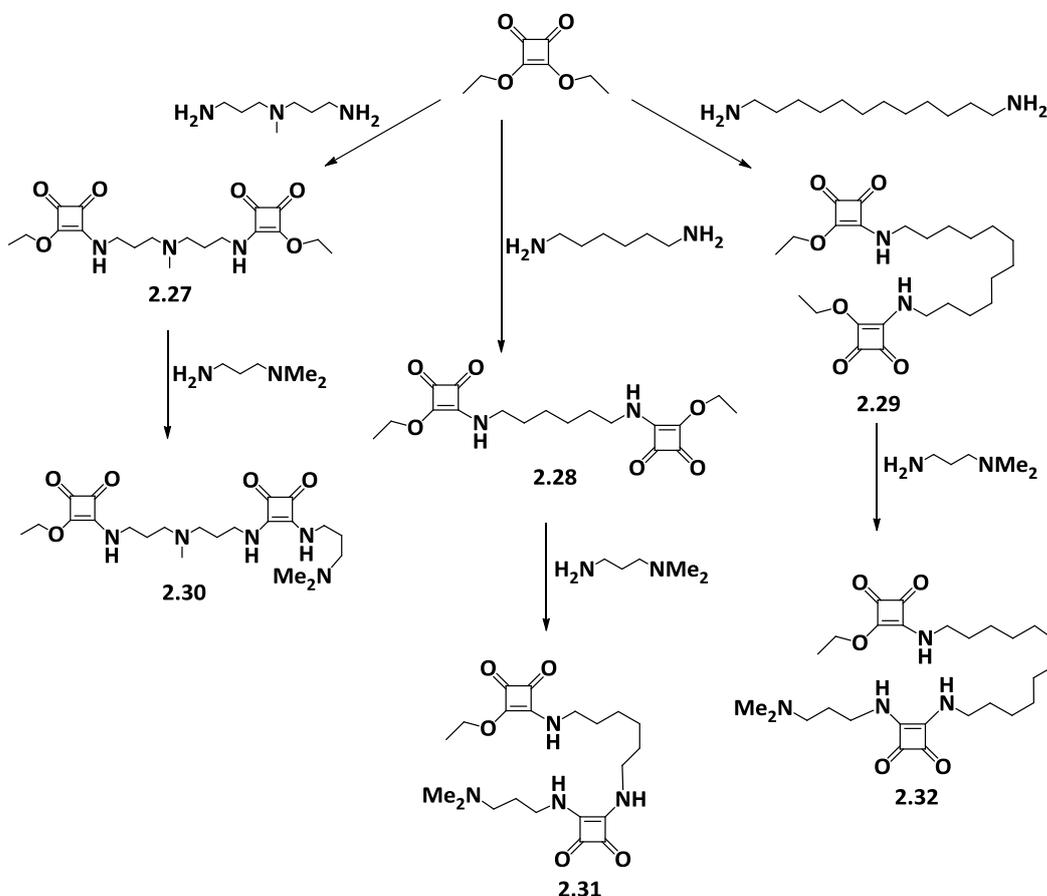


Fig. 2.23. Resumen sintético de las bis-escuaramidas preparadas.

Para la síntesis de los compuestos **2.27-2.29** se siguió una metodología muy similar a la descrita en apartados anteriores con pequeñas modificaciones. (Figuras 2.24, 2.25 y 2.26) Partiendo de 2 equivalentes de escuarato de dietilo y en presencia de 1 equivalente de las correspondientes diaminas se obtuvieron las bis-escuaramidas simétricas **2.27**, **2.28** y **2.29**. En estas síntesis específicamente, no se utilizó éter dietílico debido a la baja solubilidad que presentaban las diaminas en este disolvente. Se optó por utilizar disolventes más polares como etanol o metanol.

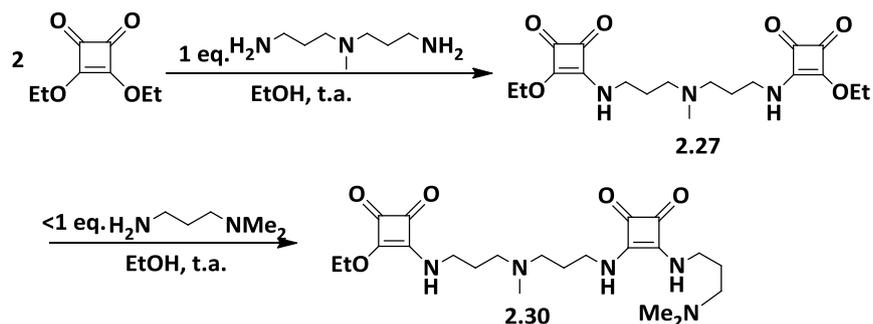


Fig. 2.24. Esquema de síntesis para la bis-semiescuaramida **2.27** y bis-monoescuaramida **2.30**.

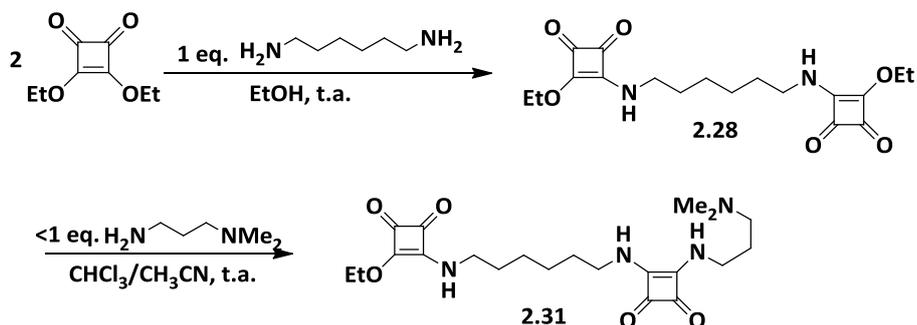


Fig. 2.25. Esquema de síntesis para la bis-semiescuaramida **2.28** y bis-monoescuaramida y **2.31**.

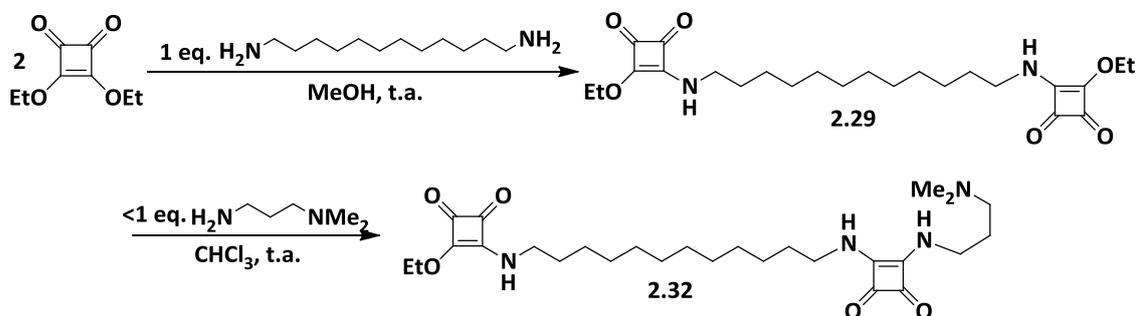


Fig. 2.26. Esquema de síntesis para la bis-semiescuaramida **2.29** y bis-monoescuaramida y **2.32**.

El paso clave en la síntesis de las bis-diescuaramidas asimétricas fue la preparación de los intermedios **2.30**, **2.31** y **2.32**. El acoplamiento con 3-(dimetilamino)-1-propilamina requirió un pequeño exceso molar de las bis-semiescuaramidas simétricas **2.27**, **2.28** y

2.29. La condensación se llevó a cabo en EtOH para obtener el intermedio **2.30**, en una mezcla 2/1 (v/v) de cloroformo/acetonitrilo para el intermedio **2.31** y en cloroformo para el intermedio **2.32** debido a las diferentes solubilidades de dichos productos.

A partir del intermedio **2.30** (Figura 2.27) se prepararon directamente las bis-diescuaramidas **C5** y **C6** por condensación con los linkers dopamina y APTES en las mismas condiciones descritas para las diescuaramidas **C1** y **C2**. La metilación de **C6** se efectuó en presencia de 2 equivalentes de CH_3I y utilizando como disolvente una mezcla DMF/Acetona. En cambio, estas mismas condiciones de reacción con **C5** no condujeron al producto de doble metilación análogo a **C7**. La mejor manera de obtener un compuesto escuaramídico con grupos trietoxisilano y yoduro de tetralquilamonio, simultáneamente, consiste en preparar primero el escuarato yoduro de tetralquilamonio y en el paso final adicionar el APTES en las condiciones óptimas descritas previamente.

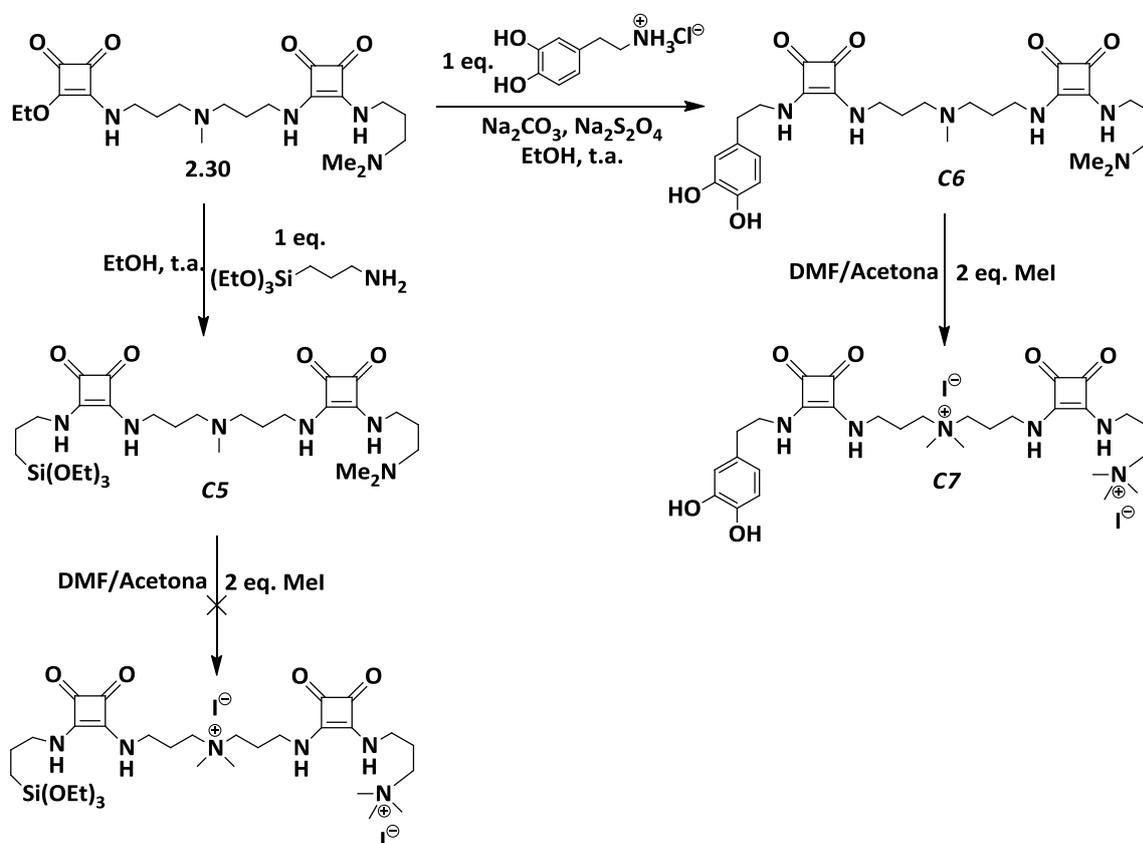


Fig. 2.27. Esquema de síntesis para las bis-diescuaramidas **C5**, **C6** y **C7**.

De forma análoga, a partir de los intermedios **2.31** y **2.32** (Figuras 2.28 y 2.29) se prepararon las bis-diescuaramidas **C8** y **C10** por condensación con dopamina utilizando en esta ocasión una mezcla metanol/DMSO como disolvente y manteniendo las condiciones de Na_2CO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, temperatura ambiente, atmósfera inerte y agitación a oscuras. La posterior metilación en las condiciones normales (DMF, MeI) permitió obtener finalmente las sales de amonio **C9** y **C11**.

2. Nanopartículas de óxidos de hierro funcionalizadas con escuaramidas como receptores en Química Supramolecular

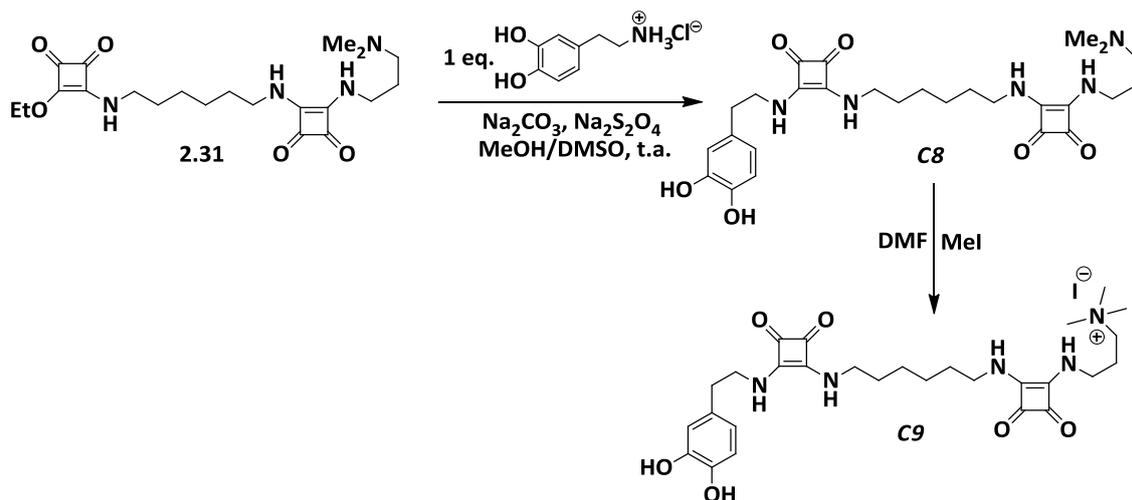


Fig. 2.28. Esquema de síntesis para las bis-diescuaramidas **C8** y **C9**.

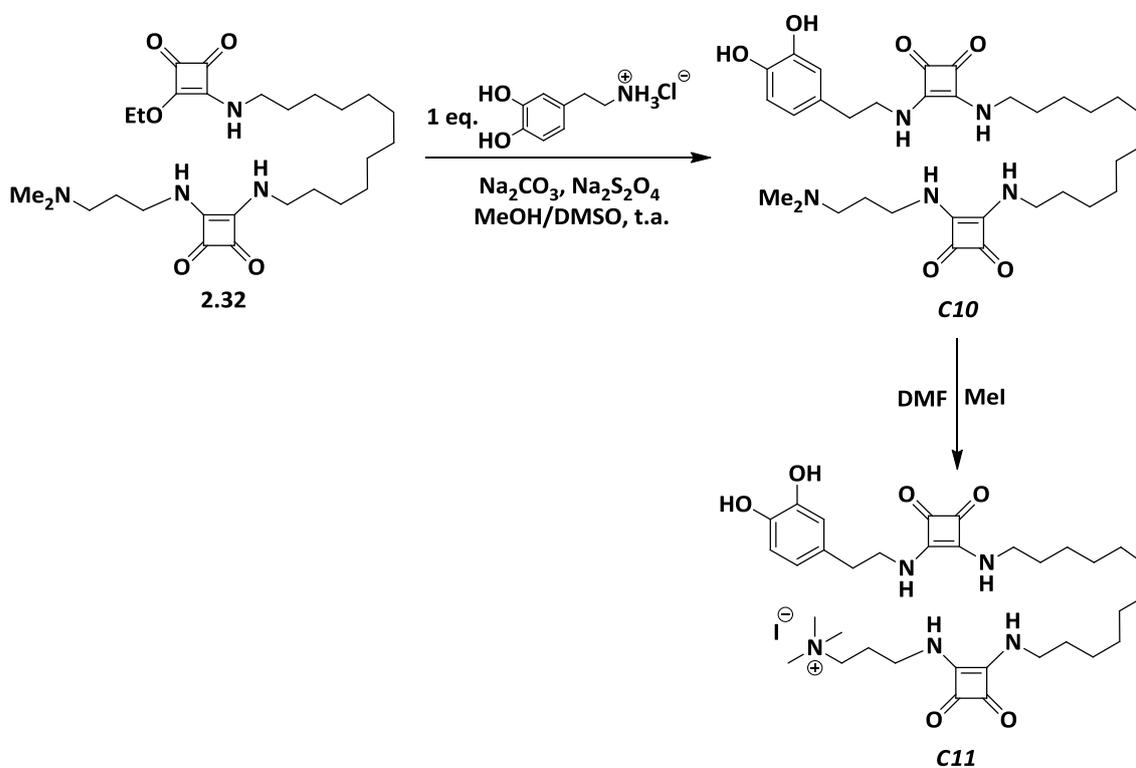


Fig. 2.29. Esquema de síntesis para las bis-diescuaramidas **C10** y **C11**.

Todas las mono y bis-diescuaramidas asimétricas, con grupos catecol o etoxisilano, se sintetizaron por condensación modular en condiciones suaves, con rendimientos de moderados a altos para cada etapa de síntesis, con la ventaja añadida de que no se requirió cromatografía para su purificación. Los lavados reiterados del crudo de reacción con disolventes orgánicos, condujeron a un material de calidad de alta pureza como se infiere de la masa exacta y de los datos espectroscópicos obtenidos. Ver espectros en la colección de espectros anexa.

2.4.4 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE HIERRO FUNCIONALIZADAS CON ESCUARAMIDAS

En los últimos años, la síntesis de nanopartículas se ha intensificado debido al gran interés científico en estos materiales y a la variedad de aplicaciones tecnológicas que se les confiere. Una de las primeras nanopartículas en utilizarse fueron las de óxidos de hierro, de tipo magnetita (Fe_3O_4) u óxidos de hierro simples como maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).

Actualmente, se utilizan dos métodos diferentes para la síntesis de este tipo de nanopartículas y su posterior funcionalización. El primero de ellos es el método clásico de coprecipitación, que a pesar de ser una síntesis muy sencilla, presenta inconvenientes para acotar los tamaños de las nanopartículas obtenidas a un intervalo determinado. El método que ha sustituido al clásico de coprecipitación, es el de descomposición a alta temperatura. Esta síntesis de calentamiento por etapas, ofrece evidentes ventajas ya que modificando parámetros como el disolvente o el tiempo de reacción se obtienen nanopartículas en un rango de tamaños definidos.^{33,34a}

Inicialmente, en este estudio las nanopartículas fueron sintetizadas por el método de descomposición térmica utilizando el acetilacetato de hierro (III), en presencia de oleilamina, ácido oleico y 1,2-hexadecanodiol en dibenciléter. La mezcla de reacción se calentó en una primera etapa hasta los 200°C durante 1h y posteriormente se aumentó la temperatura a 265°C durante 2 h, con agitación magnética vigorosa, a reflujo en atmósfera inerte. De esta forma se prepararon nanopartículas de aproximadamente 8-10 nm.

Para funcionalizar las nanopartículas de Fe_3O_4 se siguió la metodología que se resume en la Figura 2.13B. La reacción consiste en un intercambio entre los grupos surfactantes que recubren la superficie (ácido oleico y oleilamina) y las escuaramidas. Tal como se esquematiza en la Figura 2.30, las nanopartículas se pusieron en contacto con una disolución de la correspondiente diescuaramida o bis-diescuaramida, previamente acoplada a uno de los linkers descritos (dopamina o APTES) para que se produjera el intercambio de ligandos.

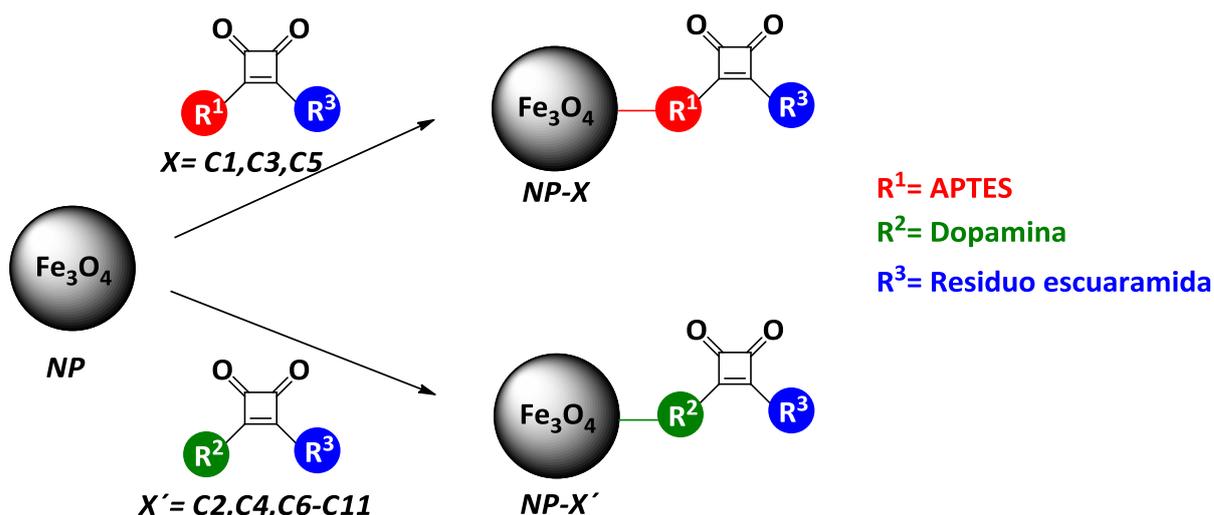


Fig. 2.30. Esquema de síntesis para funcionalización de nanopartículas con di-escuaramidas y/o bis-escuaramidas.

El recubrimiento de ácido oleico y oleilamina que adquieren las Fe_3O_4 durante la síntesis las mantiene en suspensión en disolventes orgánicos, generalmente hexano, evitando así la posible oxidación y la agregación de las mismas. Para eliminar parte de este recubrimiento antes de funcionalizarlas, se precipitan con etanol o metanol y se lavan varias veces con cualquiera de estos disolventes decantando magnéticamente la disolución cada vez.

El intercambio de ligandos es relativamente fácil de llevar a cabo ya que permite utilizar una amplia gama de disolventes. Para la funcionalización, en general, es necesario que el ligando a intercambiar, en este caso escuaramidas, esté perfectamente solubilizado en un disolvente o una mezcla de disolventes. Las nanopartículas dispersas en esta misma disolución se van funcionalizando a través de los hidroxilos fenólicos de la dopamina o los grupos etoxi de la etoxisililamina (APTES) que forman un enlace covalente con los iones Fe superficiales.

Para la funcionalización con las escuaramidas se utilizaron diversos disolventes en función de la solubilidad específica de cada una de ellas. En todos los casos, la mezcla se agitó a temperatura ambiente y en atmósfera inerte toda una noche. Los derivados de dopamina, adicionalmente, se mantuvieron protegidos de la luz para evitar la fácil oxidación de los grupos catecol. Finalmente, las nanopartículas funcionalizadas se aislaron de la disolución con ayuda de un imán y se lavaron repetidamente con el mismo disolvente o mezcla de disolventes utilizados para la reacción.

La reacción con las di-escuaramidas **C2** y **C4**, (linker dopamina) se llevó a cabo en EtOH, en cambio, para las di-escuaramidas **C1** y **C3** (linker APTES) se utilizó una mezcla EtOH/ CH_3CN debido a la moderada solubilidad de las mismas en EtOH.

La funcionalización con las bis-escuaramidas **C5**, **C6**, **C8** y **C10** se realizó en una mezcla de EtOH/DMSO, mientras que para **C7**, **C9** y **C11** se utilizó MeOH/DMSO para mejorar la solubilidad de las mismas.

Finalmente, se intentó dispersar las nanopartículas funcionalizadas con escuaramidas en un disolvente apropiado para evitar la agregación de las mismas, dado que este proceso termina siendo irreversible si se dejan en este estado durante mucho tiempo.

La funcionalización de las nanopartículas no impide la agregación de las mismas. Existen diferentes factores que influyen en este proceso. Como se ha comentado anteriormente, esta reacción es un intercambio de ligandos y como tal, está regido por un equilibrio. Si el equilibrio no está completamente (o mayoritariamente) desplazado hacia la funcionalización con las escuaramidas, o lo que es lo mismo, si quedan restos de surfactantes sobre la superficie de las nanopartículas, se hacen menos solubles en disolventes polares. Por otra parte, si las escuaramidas por sí solas son poco solubles (en cualquier disolvente), será muy improbable que las nanopartículas finales puedan dispersarse adecuadamente, incluso si la funcionalización se ha realizado completamente.

En nuestro caso, se ha observado que el grado de recubrimiento con escuaramidas depende de la concentración inicial del ligando utilizado; de modo que a medida que se aumenta la concentración de dichas escuaramidas, se sustituyen en mayor medida las moléculas del surfactante hasta llegar a un punto donde a pesar de aumentar mucho la concentración inicial, ya no se sustituyen más.

En nuestra investigación se lograron obtener todas las nanopartículas funcionalizadas con los respectivos restos escuaramídicos. El mayor problema derivado de esta síntesis fue encontrar el medio adecuado para dispersarlas. De hecho, no se pudo encontrar un disolvente o una mezcla de ellos que fuera capaz de mantenerlas dispersas por períodos prolongados. En todos los casos, tras un cierto tiempo, se comenzaba a observar la paulatina precipitación de las partículas, lo cual, conllevaba a la posterior agregación de las mismas. Este hecho era más acusado en el caso de las nanopartículas funcionalizadas con bis-diescuaramidas, mientras que las funcionalizadas con diescuaramidas, específicamente, **C2** y **C4** se mantenían más tiempo en disolución. La baja solubilidad de todas las escuaramidas utilizadas por sí solas, provocó que una vez unidas a las nanopartículas magnéticas disminuyera aún más su solubilidad y que el conjunto NP-escuaramida no pudiera mantenerse en disolución.

2.4.5 CARACTERIZACIÓN DE DIESCUARAMIDAS Y BIS-DIESCUARAMIDAS

Las escuaramidas sintetizadas fueron caracterizadas por ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, FT-IR y HRMS-ESI(+) o MALDI-TOF. A pesar de que todas estas técnicas son de suma importancia para caracterizar adecuadamente tanto las diescuaramidas como las bis-diescuaramidas, nos centraremos en la espectroscopía de infrarrojo (FT-IR) dado que es la forma más directa de caracterizar la conjunción NP-escuaramida.

En la Figura 2.31 se muestra el espectro de IR de la diescuaramida **C2**. Las bandas más destacables se encuentran señaladas con flechas rojas. La primera es una banda poco intensa a 1800 cm^{-1} que corresponde a la vibración de tensión C=O del anillo de escurato. A continuación aparece una banda muy intensa a 1650 cm^{-1} que se asocia a

vibraciones de tensión de C=O de amida. Finalmente, la banda de mayor intensidad a 1570 cm^{-1} se relaciona con vibraciones de deformación de tipo N-H de amidas.

Al analizar el espectro de otra diescuaramida, en este caso, **C3** (Figura 2.32) se observan las mismas bandas anteriormente descritas. Las vibraciones de tensión del enlace Si-O,¹⁶³ específicamente Si-O-CH₂CH₃ se presentan como un doblete muy intenso y ancho entre 1079 y 1100 cm^{-1} .

Los espectros de las bis-diescuaramidas no presentan mayores diferencias. En éstos se observan, igualmente, las bandas típicas de escuaramidas y las bandas Si-O para aquellas con APTES como linker. Como ejemplo se presenta el espectro de la bis-diescuaramida **C5**, (Figura 2.33) donde aparecen exactamente las mismas bandas presentes en la diescuaramida **C3**.

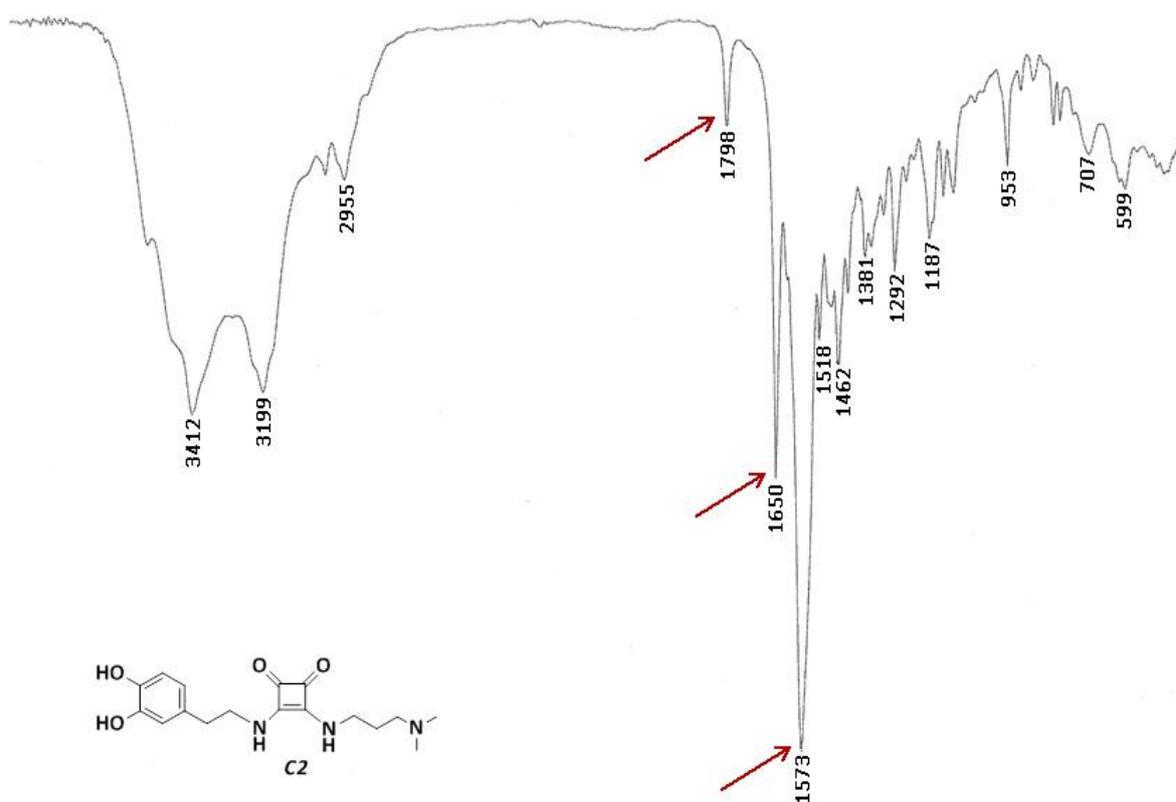
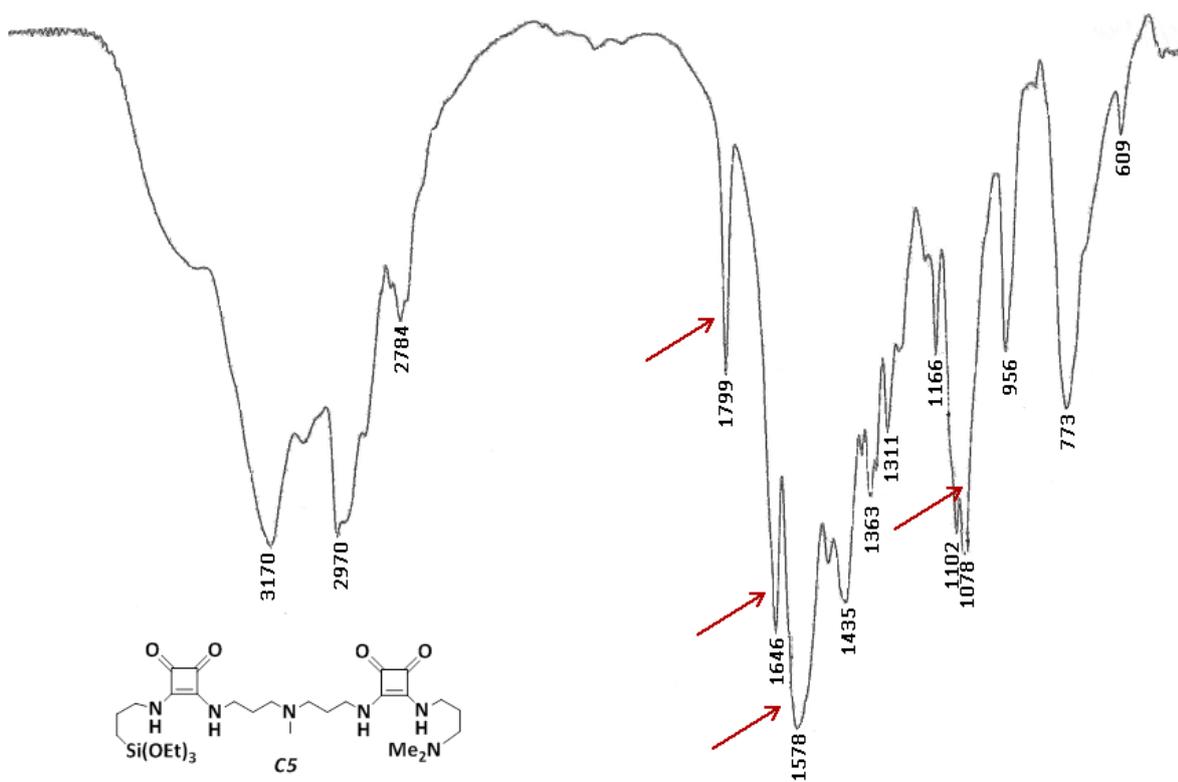
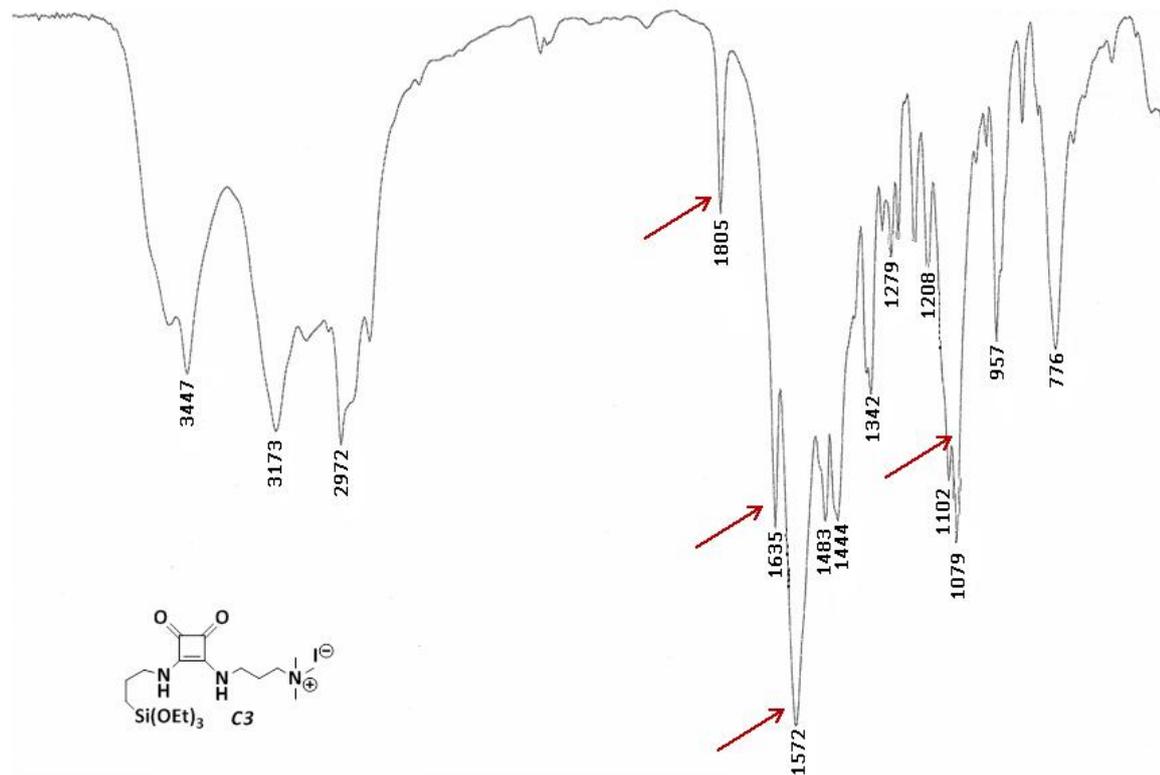


Fig. 2.31. Espectro FT-IR de la diescuaramida C2.

¹⁶³ R. T. Conley, *Espectroscopía Infrarroja*, Editorial Alhambra, Madrid, 1979.

2. Nanopartículas de óxidos de hierro funcionalizadas con escuaramidas como receptores en Química Supramolecular



Conocer las principales bandas de absorción de las escuaramidas es relevante para caracterizar las nanopartículas funcionalizadas, ya que su presencia es un indicativo de la correcta unión a la magnetita.

2.4.6 CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE HIERRO POR FT-IR

Los espectros de IR de las nanopartículas de óxidos de hierro sin funcionalizar son simples (Figura 2.34). Las bandas señaladas con las flechas rojas a ~ 570 y 440 cm^{-1} son las más importantes de este tipo de materiales. Se trata de las vibraciones de tensión típicas de Fe-O dentro del conjunto de la nanopartícula de Fe_3O_4 . Por otra parte, también se aprecian dos bandas de poca intensidad a ~ 2920 y 2850 cm^{-1} que corresponden a las vibraciones C-H de la oleilamina y ácido oleico, que recubren la superficie de las nanopartículas tras la síntesis. Finalmente, las bandas de gran intensidad presentes a ~ 3410 y 1630 cm^{-1} son debidas a la vibración de moléculas de H_2O adsorbidas¹⁶⁴ en la muestra, y a la presencia de grupos hidroxilo en la superficie.

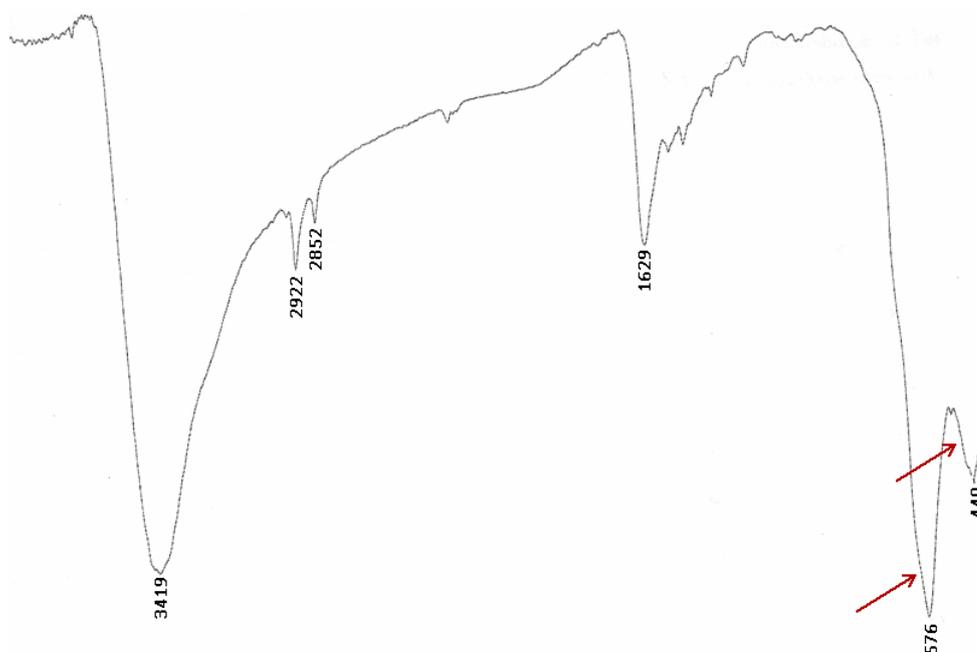


Fig. 2.34. Espectro FT-IR de nanopartículas de Fe_3O_4 .

2.4.7 CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE HIERRO FUNCIONALIZADAS CON DIESCUARAMIDAS Y BIS-DIESCUARAMIDAS POR FT-IR

La técnica más sencilla y rápida utilizada para la caracterización de este tipo de nanopartículas es el FT-IR. Una vez conocidas las bandas de absorción más importantes y representativas, tanto de las nanopartículas solas como de las cadenas de escuaramidas utilizadas para funcionalizarlas, resulta muy fácil su caracterización.

¹⁶⁴ L. H. Little, *Infrared Spectra of Adsorbed Species*; Academic Press: London, 1966.

El espectro de IR de las nanopartículas conjugadas permite determinar inequívocamente si la reacción se ha llevado a cabo, es decir, si se ha producido el intercambio de ligandos entre las escuaramidas y las moléculas surfactantes.

En la Figura 2.35 se presenta el espectro de la nanopartícula funcionalizada **NP-C2**. En éste, se observan las típicas bandas de escuaramida junto con las bandas de Fe-O mencionadas anteriormente. Un aspecto a mencionar es que a través del espectro de IR de la nanopartícula funcionalizada se puede inquirir el grado de funcionalización según el tamaño relativo de las bandas de ácido oleico u oleilamina respecto a las bandas del nuevo ligando, especialmente la banda a 1800 cm^{-1} . Anteriormente se ha mencionado que dos de las bandas más características de los surfactantes utilizados se encuentran a ~ 2920 y 2850 cm^{-1} y que corresponden a las vibraciones C-H. La presencia de estas bandas después del intercambio de ligandos es indicativo de la presencia de dichos surfactantes, en mayor o menor medida, sobre la superficie; es decir que el intercambio no ha sido completo. En la Figura 2.35 se observa que estas bandas son relativamente pequeñas respecto a las bandas de escuaramida, lo cual sugiere que el intercambio se ha producido en un elevado porcentaje.

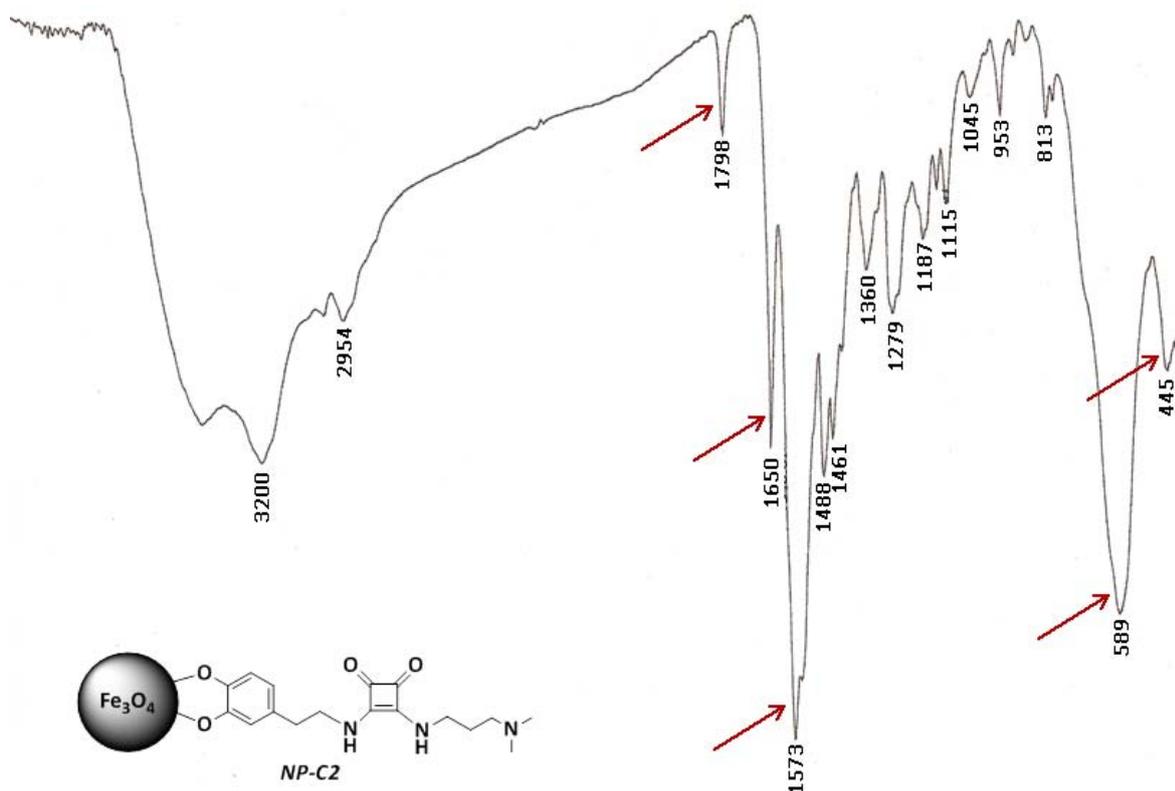


Fig. 2.35. Espectro FT-IR de **NP-C2**.

Si se estudia el espectro de **NP-C3** (Figura 2.36), se observa que las bandas de surfactantes son más intensas respecto a la banda carboxílica del anillo escuárico a 1800 cm^{-1} , comparado con **NP-C2**. Este hecho sugiere que las **NP-C2** están más funcionalizadas con escuaramidas que las **NP-C3**.

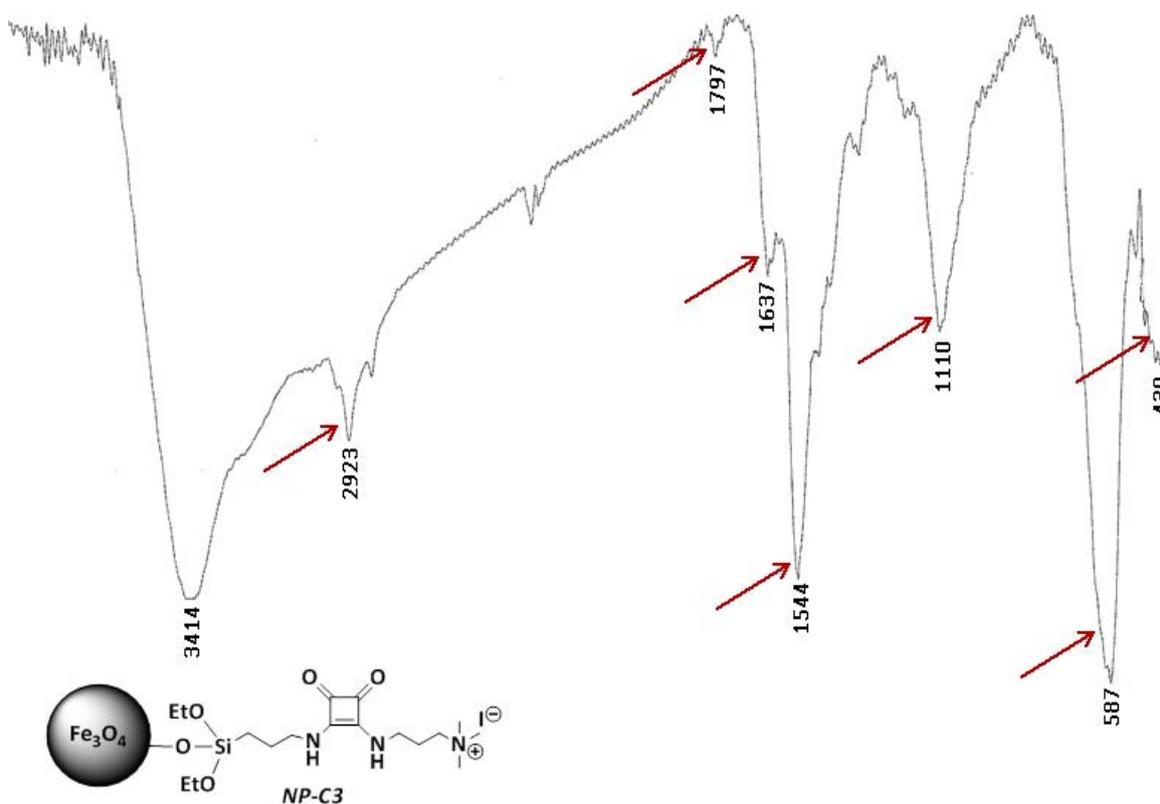


Fig. 2.36. Espectro FT-IR de NP-C3.

Para promover el mayor grado de intercambio de ligandos posible hay que tener en cuenta dos factores. Por una parte se debe procurar que en el medio de reacción haya un exceso del ligando a intercambiar, en este caso escuaramidas; y por otra parte, el medio debe facilitar la solubilidad de los surfactantes una vez que estén fuera de la superficie de la nanopartícula. Si los surfactantes inicialmente unidos a las nanopartículas, como el ácido oleico, no se solubilizan por sí solos en medio de reacción, se ha comprobado que el intercambio de ligandos se produce en menor medida.

La caracterización por IR de la unión NP-bis-diescuaramidas transcurre de igual manera obteniéndose espectros con las mismas bandas descritas anteriormente, tal como se muestra en la Figura 2.37.

2. Nanopartículas de óxidos de hierro funcionalizadas con escuaramidas como receptores en Química Supramolecular

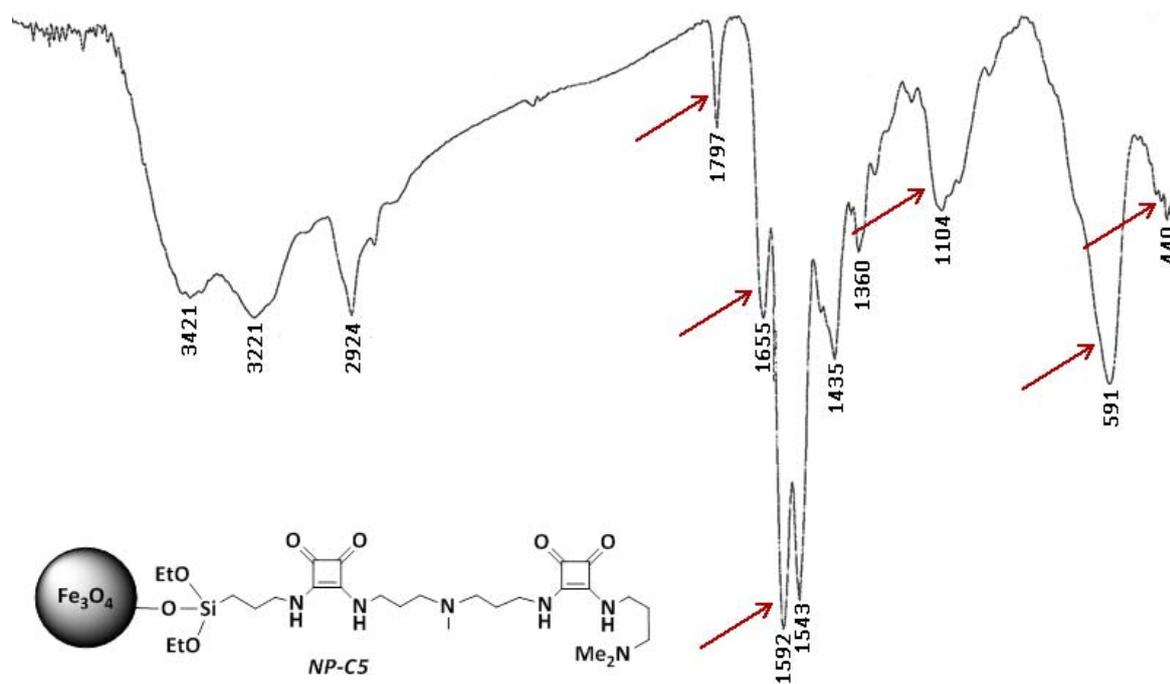


Fig. 2.37. Espectro FT-IR de NP-C5.

2.5 ESTUDIO DE LA COMPLEJACIÓN SELECTIVA DE CARBOXILATOS A NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS CON ESCUARAMIDAS EN H₂O.

Las sales de amonio de diescuaramidas y bis-diescuaramidas se han utilizado de forma eficiente en combinación con varios espaciadores orgánicos para el reconocimiento molecular de aniones inorgánicos, como sulfato e hidrógeno fosfato y tricarboxilatos de tipo citrato, isocitrato, trimesoato y tricarbollato.^{119h,126,128,165} Una parte importante de la química de coordinación de aniones, por su trascendencia en la química bioorgánica, es la complejación selectiva de carboxilatos a través de receptores naturales y sintéticos,¹⁶⁶ debido a que estas especies están involucradas en varios fenómenos de reconocimiento molecular de interés biológico. Por ejemplo, el reconocimiento de carboxilatos juega un papel significativo en la determinación de la actividad biológica de la familia de antibióticos vancomicina,¹⁶⁷ o del folato.¹⁶⁸

En general, la detección de aniones en la química de coordinación se lleva a cabo en medio acuoso a un pH específico y controlado. Por esta razón, un inconveniente importante a superar es la solubilidad en agua de todas las especies que intervienen en los fenómenos de coordinación.

Se han descrito en la bibliografía diferentes receptores escuaramídicos que actúan como sensores selectivos de aniones, por ejemplo tricarboxilatos. La selectividad viene inducida por la rigidez y preorganización que aportan espaciadores como el 1,3,5-trietilbenceno.

Las nanopartículas, como por ejemplo las de óxido de hierro,^{147,169} proporcionan un soporte adaptable para la incorporación de una gran variedad de funcionalidades. El reconocimiento de aniones a través de nanopartículas funcionalizadas ha sido poco estudiado. Por este motivo, se pensó que la combinación de nanopartículas de óxidos de hierro con sales de amonio escuaramídicas podía formar un conjunto eficaz para generar un sensor de aniones carboxilato en agua. La idea era probar que la utilización de estas

¹⁶⁵ M. N. Piña, M. C. Rotger, A. Costa, P. Ballester, P. M. Deyà, *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 3749-3752.

¹⁶⁶ (a) P. A. Gale, *Coord. Chem. Rev.* **2001**, 213, 79-128; (b) P. D. Beer, P. A. Gale, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 486-516; (c) P. A. Gale, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 199, 181-233; (d) C. Caltagirone, P. A. Gale, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 520-563; (e) A. Bianchi, K. Bowman-James, E. García-España, *Supramolecular Chemistry of Anions*, Wiley-VCH, New York, **1997**; (f) J. L. Atwood, J. W. Steed, *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*, Marcel Dekker, New York, **2004**; (g) E. A. Katayev, Y. A. Ustynyuk, J. L. Sessler, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, 250, 3004-3037; (h) M. D. Best, S. L. Tobey, E. V. Anslyn, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, 240, 191-221.

¹⁶⁷ (a) K. C. Nicolaou, C. N. C. Boddy, S. Bräse, N. Winssinger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2096-2152; (b) D. H. Williams, B. Bardsley, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1172-1193.

¹⁶⁸ (a) H. I. Morrison, D. Schaubel, M. Desmeules, D. T. Wigle, *JAMA.* **1996**, 275, 1893-1896; (b) O. Nygard, S. M. Vollset, H. Refsum, I. Stensvold, A. Tverdal, J. E. Nordrehaug, P. M. Ueland, G. Kvale, *JAMA.* **1995**, 274, 1526-1533; (c) E. B. Rimm, W. C. Willet, F. B. Hu, L. Sampson, G. A. Colditz, J. E. Manson, C. Hennekens, M. J. Stampfer, *JAMA.* **1998**, 279, 359-364.

¹⁶⁹ (a) R. M. Comell, U. Schwertmann, *The Iron Oxide: Structures, Properties, Occurrences and Uses*, Wiley-VCH, Weinheim, **2003**; (b) A.-H. Lu, E. L. Salabas, F. Schüth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 1222-1244.

nanopartículas sencillas, era capaz de generar un entorno preorganizado, apto para inducir una cierta selectividad en el reconocimiento de determinados carboxilatos.

Para el desarrollo de este sensor inicialmente se seleccionaron las nanopartículas **NP-C2** y **NP-C4** debido a su mayor solubilidad en agua. La diferencia entre ambas radica en la sal de amonio de **C4** frente a la amina terciaria de **C2**.

Para asegurar la completa desprotonación de los carboxilatos, los ensayos de detección se llevaron a cabo a pH básico (pH=8). En el reconocimiento de aniones, las cargas positivas de las escuaramidas juegan un papel primordial ya que son un punto de interacción significativo. Por lo tanto, era necesario determinar el estado de protonación de la amina terminal **C2** al pH de este ensayo. Por esta razón se calculó el pK_a de la amina a través de una valoración por ITC (Isothermal Titration Calorimetry). Se utilizó el compuesto **2.25**, precursor de **C2**, para que el equilibrio ácido-base de los fenoles no interfiera en el cálculo. En el ensayo, una disolución $1,3 \times 10^{-3}$ M de **2.25** fue valorada con HCl 0,01 M. La curva fue ajustada con el programa Origin 7.0 y se muestra en la Figura 2.38. La constante de asociación (K_{as}) para el equilibrio estudiado fue de $1,78 \times 10^6 M^{-1} \pm 1,09 \times 10^5$ que corresponde a un $pK_a=7,8$.

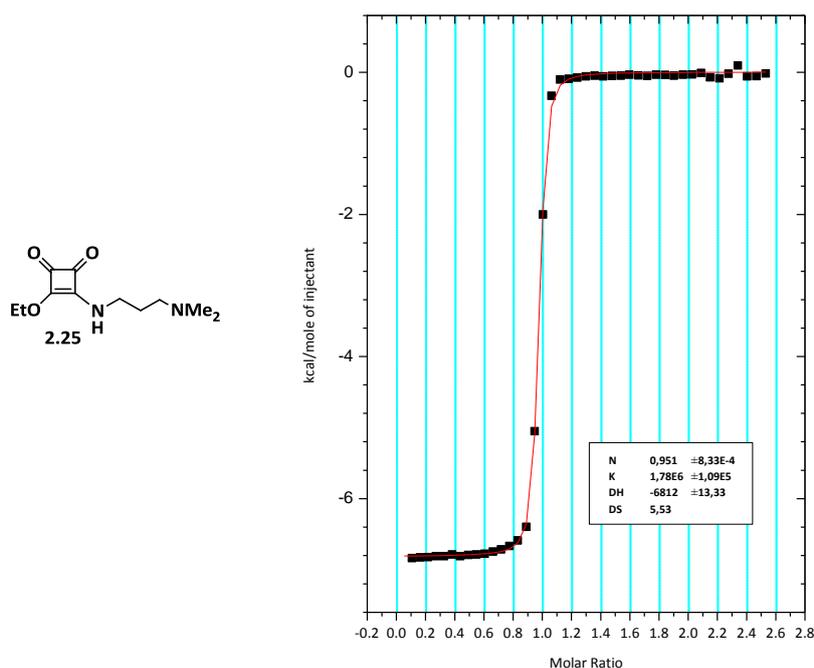


Fig. 2.38. Curva de valoración ácido-base del compuesto **2.25** obtenida por ITC.

Este resultado indicó que a pH=8 habría en disolución un equilibrio entre la forma protonada y desprotonada de la amina terminal. Por este motivo, se decidió utilizar **NP-C4** donde todos los restos escuaramídicos sobre la superficie presentan una carga positiva facilitando así la interacción con los carboxilatos.

Las **NP-C4** sintetizadas como se describe en el apartado **2.4.4**, fueron caracterizadas por FT-IR, TEM (Microscopía de Transmisión Electrónica), RX (Difracción de Rayos X), AFM

2. Nanopartículas de óxidos de hierro funcionalizadas con escuaramidas como receptores en Química Supramolecular

(Microscopía de Fuerzas Atómicas) y DLS (Dynamic Light Scattering). El espectro de FT-IR de **NP-C4** (Figura 2.39B) presentaba las bandas típicas de escuaramidas: 1798, 1649 y 1573 cm^{-1} (Figura 2.39A) y las bandas de absorción Fe-O a 589 y 447 cm^{-1} , confirmando así la correcta funcionalización con la diescuaramida **C4**. La imagen del TEM (Figura 2.39C) mostraba tamaños de núcleo de $\sim 6\text{-}8$ nm, en concordancia con el valor esperado según la síntesis realizada. Los estudios de DLS (insertado en la Figura 2.39C) revelaron que el radio hidrodinámico de las partículas era de ~ 50 nm. La imagen del AFM (Figura 2.39D), mostró también tamaños de nanopartículas en el rango de 6-8 nm. Finalmente, el análisis por RX permitió determinar que tras la funcionalización la estructura de espinela inversa de la magnetita se mantenía (Figura 2.39E).

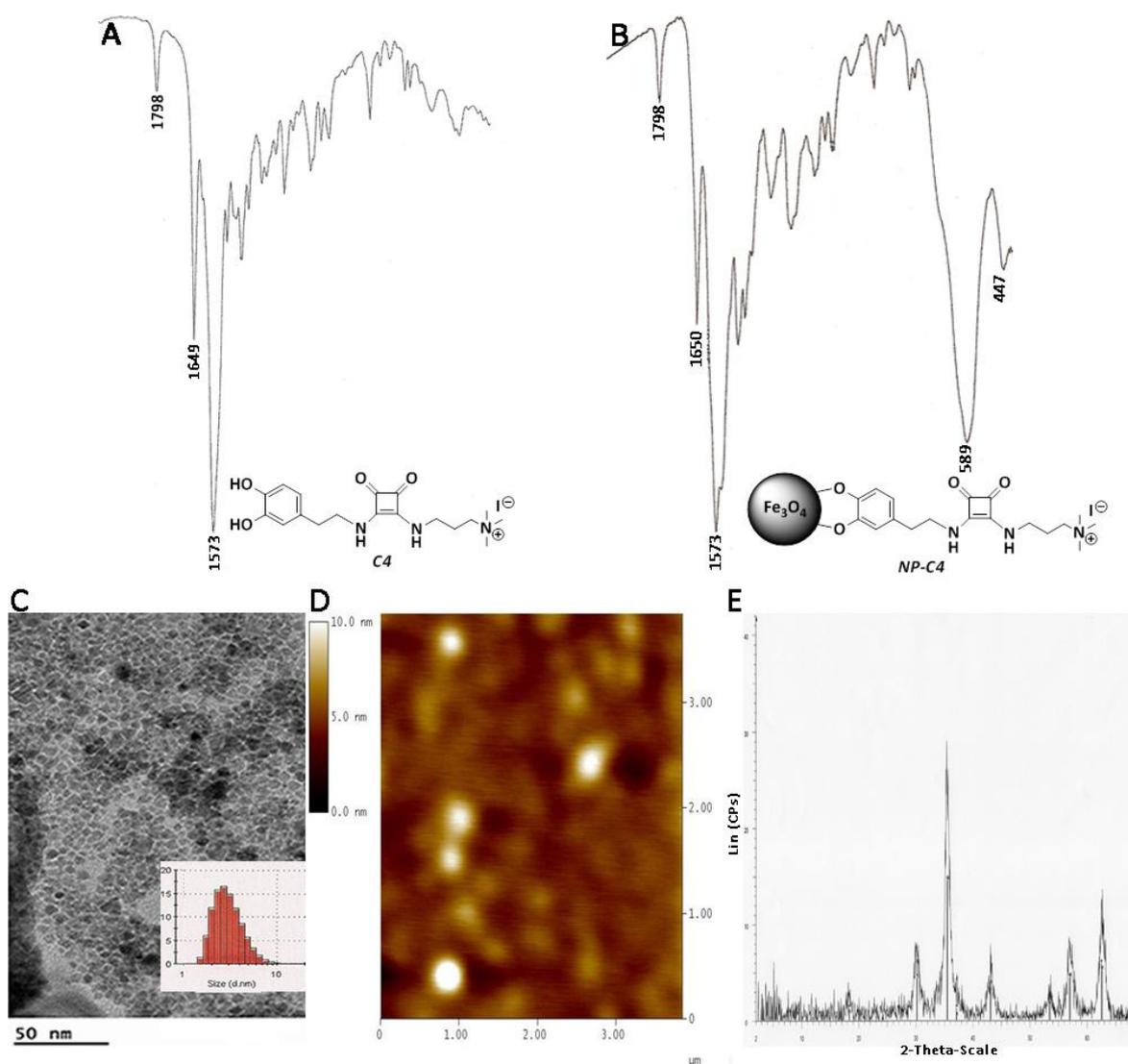


Fig. 2.39. Caracterización de **NP-C4**. A) FT-IR de **C4**, B) FT-IR de **NP-C4**, C) TEM de **NP-C4**, insertado DLS de **NP-C4**, D) AFM de **NP-C4** y E) RX de **NP-C4**.

Debido a que la coordinación con los carboxilatos se produce a través de los restos escuaramídicos, es importante que el grado de funcionalización en las nanopartículas sea elevado. Con el fin de determinar el número cadenas de **C4** por partícula se utilizó el método de adición estándar mediante ¹H-RMN, aplicando las ecuaciones 2.1 y 2.2.^{156,170}

$$N = \frac{\pi}{6} \frac{D^3 \rho}{PM} \quad \text{Ecuación 2.1}$$

$$\frac{1}{N} = \frac{\text{nanopartículas}}{\text{molFe}_3\text{O}_4} \quad \text{Ecuación 2.2}$$

Donde 1/N es el número de partículas en cada mol de Fe₃O₄; D es el diámetro promedio de las nanopartículas expresado en cm; ρ es la densidad del Fe₃O₄ (5,196 g/cm³) y PM es el peso molecular de Fe₃O₄ (232,5 g/mol).

A partir del peso total de nanopartículas utilizado inicialmente se puede se puede calcular el número de partículas de Fe₃O₄ dividiendo por el PM para pasarlo a moles y multiplicando este valor por 1/N.

Por otra parte, el número de moles de **C4** conjugados con las nanopartículas se calculó por diferencia respecto al número de moles iniciales. Concentrando los lavados residuales de la reacción se aplicó el método analítico de adición estándar seguido por ¹H-RMN para determinar la concentración inicial de **C4** en dichos residuos. A partir de este valor se calculó el total de moléculas de **C4** multiplicando por el número de Avogadro. Finalmente al dividir este valor por el número total de partículas de Fe₃O₄ se estimó el número de moléculas de **C4** por nanopartícula que resultó ser 363. En la Tabla 2.1 se resumen los principales datos utilizados. Este resultado está en concordancia con otros descritos en la bibliografía.^{148c}

Tabla 2.1: Estimación del número de moléculas de **C4** sobre la superficie de **NP-C4**.

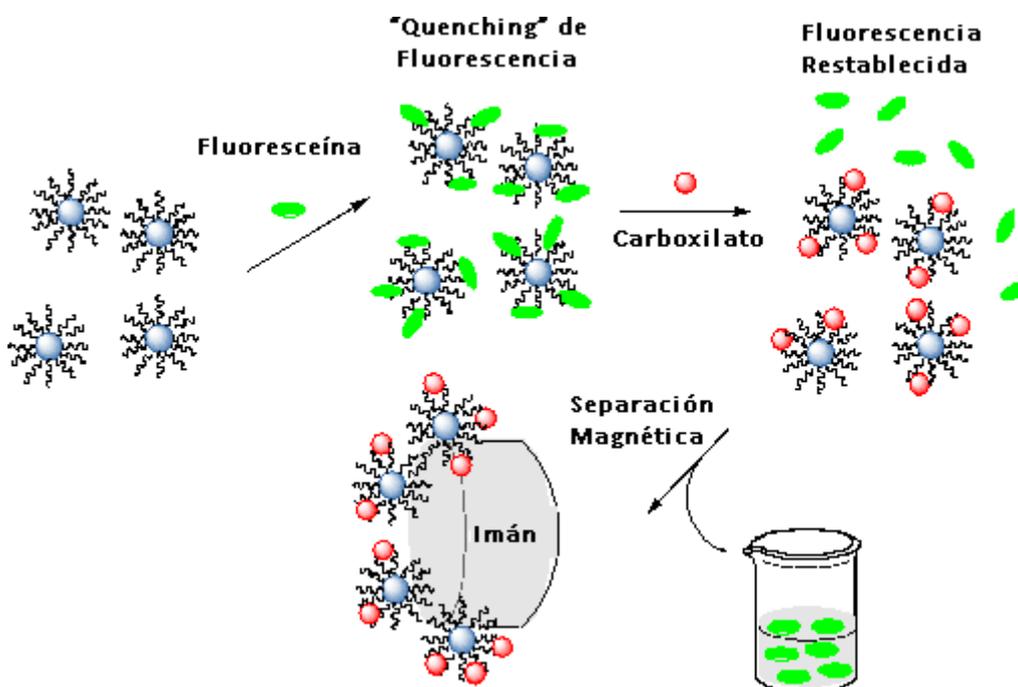
Tamaño promedio de NP de Fe ₃ O ₄ (nm)	6
Peso total de Fe ₃ O ₄ (mg)	10
Número total de nanopartículas de Fe ₃ O ₄	1,7 x 10 ¹⁶
Peso total de C4 en la NP (mg)	3,42
Número total de moléculas de C4	6,18 x 10 ¹⁸
Número de C4 por nanopartícula	363

Una vez caracterizadas las **NP-C4** se procedió a explorar la capacidad de este material en la detección de carboxilatos. Para estudiar la posible interacción con estos aniones se

¹⁷⁰ (a) D. A. R. Williams, *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Chichester, **1986**, pp. 257; (b) L. Wang, J. Luo, Q. Fan, M. Suzuki, I. S. Suzuki, M. H. Engelhard, Y. Lin, N. Kim, J. Q. Wang, C.-J. Zhong, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 21593-21601; (c) Y. Pan, M. J. C. Long, X. Li, J. Shi, L. Hedstrom, B. Xu, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 945-948.

siguió la metodología basada en el desplazamiento competitivo de un indicador fluorescente,¹⁷¹ la fluoresceína. Este enfoque se ha utilizado y descrito ampliamente en la bibliografía, ya que permite que receptores sintéticos actúen como sensores sin la introducción de una estructura covalente complementaria.

En un ensayo típico, (Esquema 2.1), entre 5-20 mg de **NP-C4** se dispersaron en 2 mL de una disolución de fluoresceína (2×10^{-5} M) tamponada a pH=8 (0,5 M Tris: HCl). La suspensión se irradió con ultrasonidos durante un minuto observándose inmediatamente una disminución de la intensidad de fluorescencia debido a la coordinación entre **NP-C4** y la fluoresceína. A esta disolución tamponada se le añadieron entre 5 y 40 mg de carboxilatos. La mezcla se agitó durante 30 minutos y posteriormente, las nanopartículas se aislaron mediante filtración magnética. La disolución remanente, más fluorescente que la inicial, se filtró con un filtro de teflón de 0,45 μm , y la intensidad de la fluorescencia se registró para cada muestra ($\lambda_{\text{exc}}=490$ nm).



Esquema 2.1. Ensayo por desplazamiento de un indicador fluorescente.

Diferentes mono, di y tricarboxilatos fueron ensayados siguiendo la metodología propuesta en el Esquema 2.1. Específicamente, se probaron los carboxilatos que se presentan en la Figura 2.40: benzoato (**2.33**), tartrato (**2.34**), citrato (**2.35**), acetato (**2.36**), glutamato (**2.37**) y 1,3,5-ciclohexanotricarboxilato (**2.38**).

¹⁷¹ E. V. Anslyn, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 687-699.

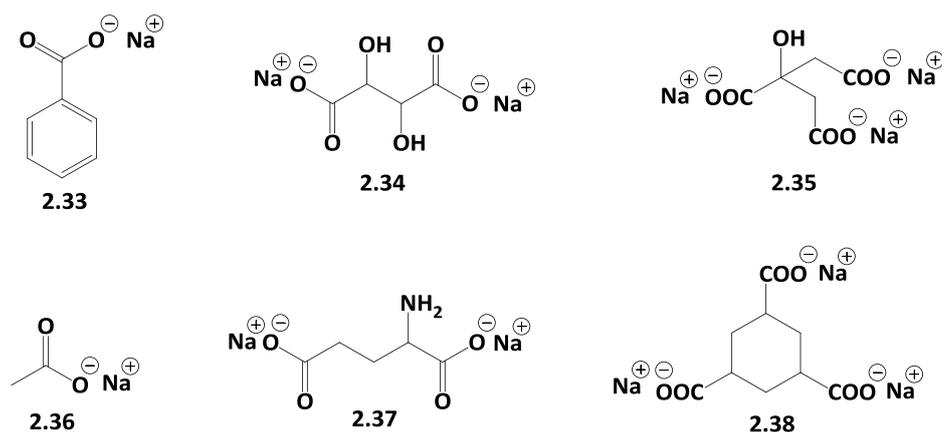


Fig. 2.40. Diferentes mono, di y tricarboxilatos ensayados con **NP-C4**.

La Figura 2.41A muestra los cambios en la intensidad de fluorescencia cuando se añadieron cantidades crecientes de benzoato sódico (**2.33**). El espectro de mayor intensidad corresponde a la disolución inicial de fluoresceína y el más bajo en intensidad es el de la disolución de fluoresceína tras haber estado en contacto con **NP-C4** en ausencia de benzoato. El resto de espectros cuyas intensidades van aumentando de forma progresiva, se corresponden con las adiciones de cantidades cada vez mayores de este anión (5, 10, 20, 30 y 40 mg respectivamente). A medida que aumentaba la cantidad de benzoato, se observaba un aumento regular en el correspondiente espectro de emisión de fluorescencia. Debido al equilibrio competitivo entre la fluoresceína y el carboxilato en ningún caso se recuperó completamente la intensidad de fluorescencia. Para el benzoato la saturación se alcanzó tras adicionar aproximadamente 40 mg de este anión.

Análogamente, cuando se adicionaron cantidades crecientes (10, 20 y 30 mg respectivamente) de tartrato (**2.34**), (Figura 2.41B), se observó la misma tendencia descrita anteriormente en los espectros de fluorescencia. Sin embargo, adiciones progresivas (5, 10, 20, 30 y 40 mg) de citrato (**2.35**), (Figura 2.41C), no aumentaron gradualmente la intensidad de fluorescencia como en los casos anteriores. Este hecho muestra cómo el desplazamiento del indicador fluorescente (**I**) del complejo, debido a la adición del analito/anión (**A**), (donde **R** es el receptor), sólo se produce para monocarboxilatos y dicarboxilatos y no para tricarboxilatos (Ecuación 2.3).



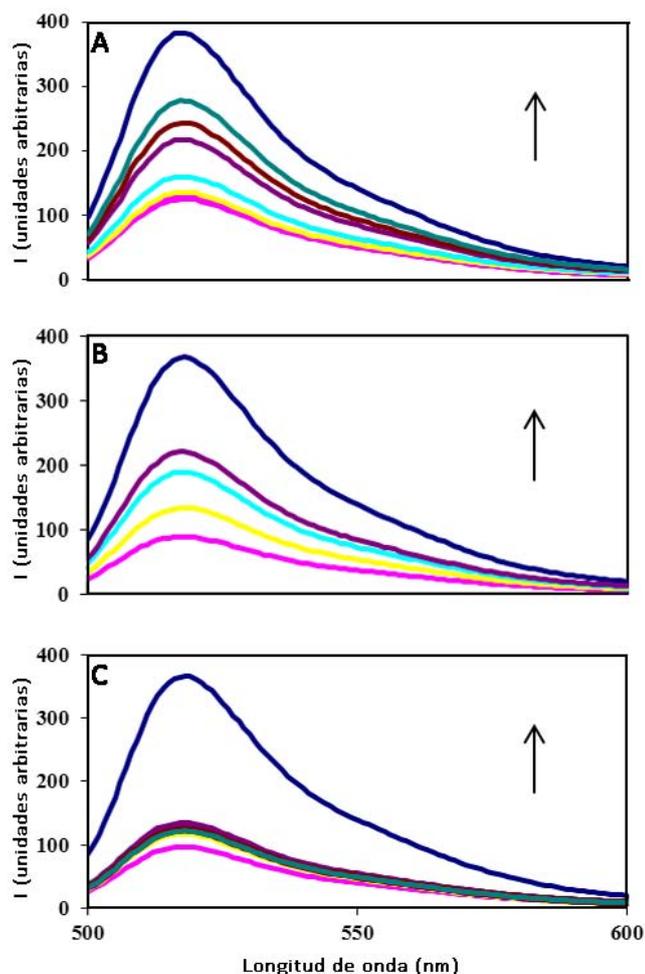


Fig. 2.41. Espectro de emisión de fluorescencia de fluoresceína $2,0 \times 10^{-5}$ M antes (curva superior, azul oscuro) y después de la adición del receptor **NP-C4** (curva inferior, rosa). Respuesta de emisión de fluorescencia con varias adiciones de: **(A)** benzoato sódico [5 (amarillo), 10 (azul claro), 20 (morado), 30 (marrón) y 40 (verde) mg], **(B)** tartrato sódico [10 (amarillo), 20 (azul claro), y 30 (morado) mg] y **(C)** citrato sódico [5 (amarillo), 10 (azul claro), 20 (morado), 30 (marrón) y 40 (verde) mg].

La capacidad de reconocimiento del receptor **NP-C4** también fue estudiada con otros carboxilatos: acetato (**2.36**), glutamato (**2.37**), y 1,3,5-ciclohexanotricarboxilato (**2.38**), (Figura 2.40), para comprobar si se seguía la misma tendencia que con los carboxilatos anteriormente descritos. En la Figura 2.42 se presentan los resultados obtenidos siguiendo la misma metodología del Esquema 1 pero con una sola adición de los carboxilatos **2.36**, **2.37** y **2.38**. El espectro de mayor intensidad corresponde nuevamente a la disolución inicial de fluoresceína y el más bajo es el de la disolución de fluoresceína tras haber estado en contacto con **NP-C4** en ausencia de carboxilatos. Las curvas restantes corresponden a la adición de 30 mg de **2.38**, **2.37** y **2.36** respectivamente. Con este ensayo se demostró que los nuevos carboxilatos seguían la

misma tendencia, dado que el mono y el dicarboxilato se coordinaron con éxito a **NP-C4**, mientras que el tricarboxilato mostró una pobre coordinación.

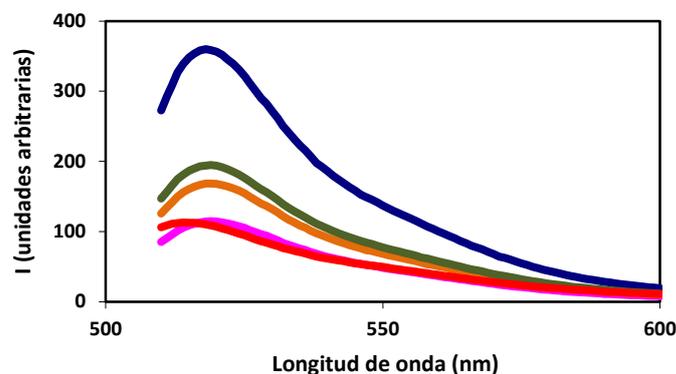


Fig. 2.42. Curva de emisión de fluorescencia de fluoresceína $2,0 \times 10^{-5}$ M antes (curva superior, azul oscuro) y después de la adición del receptor **NP-C4** (curva inferior, roja). Respuesta de emisión de fluorescencia tras la adición respectiva de 30 mg de 1,3,5-ciclohexanotricarboxilato (rosa), glutamato (naranja) y acetato (verde).

El cálculo de las constantes de asociación de los complejos entre **NP-C4** y los aniones carboxilato a partir de las curvas de valoración no fue factible debido a que no era posible saber, con exactitud, la concentración de receptor presente.

A fin de determinar si **NP-C4** podía coordinarse con aniones diferentes a carboxilatos, se evaluó la capacidad de reconocimiento de dicho receptor con algunos aniones inorgánicos presentes en las muestras acuosas, tales como F^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , PO_4^{3-} y SO_4^{2-} . Los ensayos por fluorescencia efectuados (Figura 2.43) muestran que estos aniones no son reconocidos por **NP-C4**.

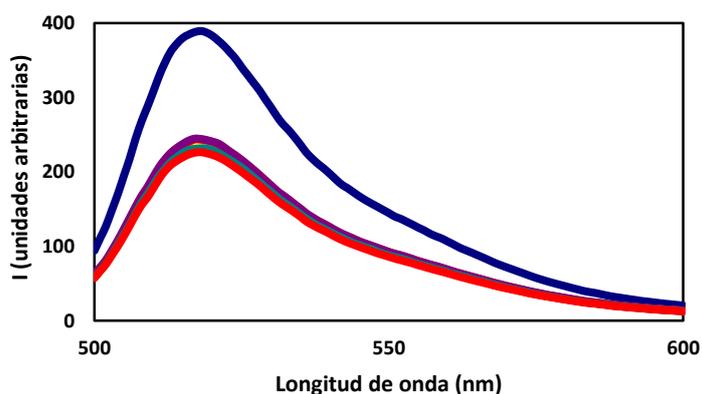


Fig. 2.43. Curva de emisión de fluorescencia de Fluoresceína $2,0 \times 10^{-5}$ M antes (curva superior, azul oscuro) y después de la adición del receptor **NP-C4** (curva inferior, rojo). Respuesta de emisión de fluorescencia tras la adición de 30 mg de NaF (verde), NaBrO₃ (amarillo), NaCl (rosa), NaBr (morado), NaNO₃ (marrón), Na₃PO₄ (naranja) y Na₂SO₄ (azul claro).

Para confirmar estos resultados se realizó un análisis de muestras de agua certificadas por cromatografía iónica, antes y después del tratamiento con **NP-C4**. Analizando los espectros obtenidos, (Figura 2.44) se confirmó que este nanomaterial no era capaz de retener estos aniones.

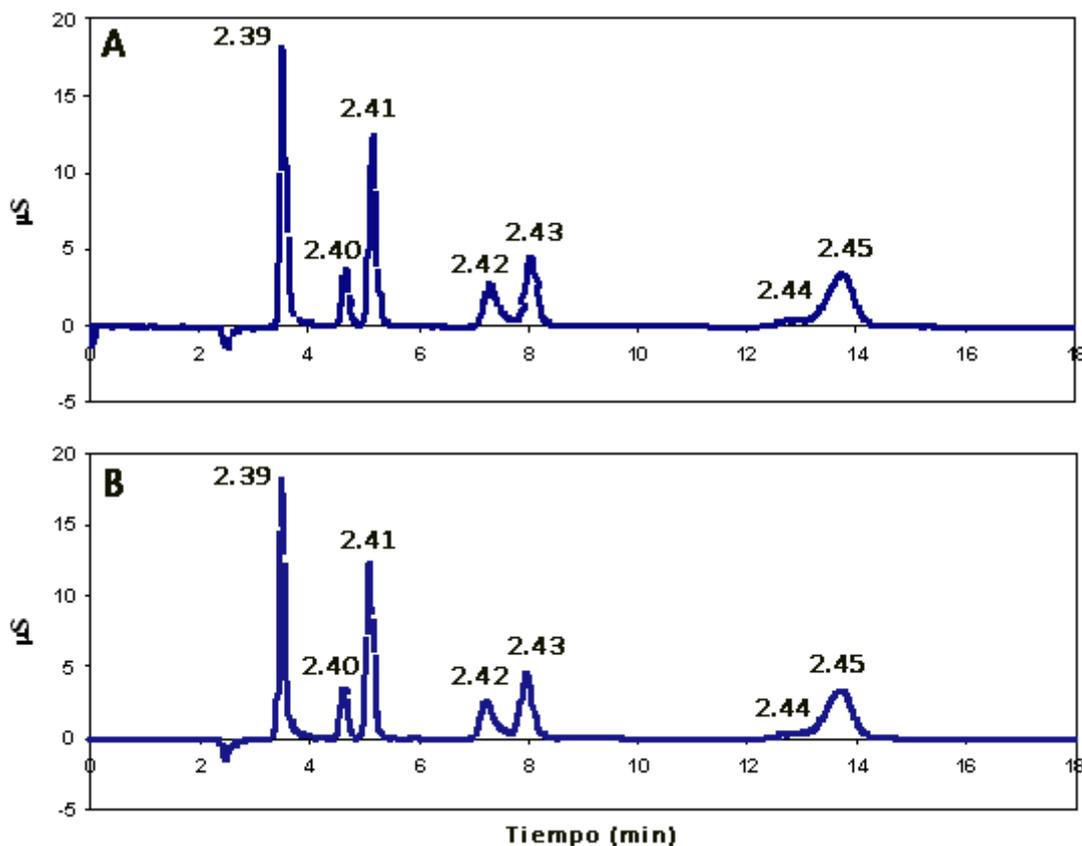


Fig. 2.44. Cromatografía iónica de muestra de agua certificada con los aniones F^- , BrO_3^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , PO_4^{3-} y SO_4^{2-} : A) antes y B) después de tratamiento con **NP-C4**. Volumen de muestra inyectado: 25 μ L. Columna: IonPac AS9-HC + IonPac AG9-HC. Eluyente: Disolución de carbonato 9,0 mM. Velocidad de flujo: 0,38 mL/min.

En la Tabla 2.2 se presenta un resumen de este ensayo, donde para cada anión estudiado se muestra su tiempo de retención y el área del pico antes y después del tratamiento con **NP-C4**. Dada la nula retención de estos aniones ambos valores son prácticamente iguales.

Tabla 2.2. Resumen del ensayo por cromatografía iónica.

Ref.	Anión	t (min) ^[1]	Área pico ^[2]	Área pico ^[3]
2.39	F ⁻	3,48	2,5911	2,4548
2.40	BrO ₃ ⁻	4,65	0,5465	0,5481
2.41	Cl ⁻	5,13	1,9865	1,9780
2.42	Br ⁻	7,30	0,8800	0,8504
2.43	NO ₃ ⁻	8,05	1,2400	1,2410
2.44	PO ₄ ³⁻	13,18	0,2234	0,2082
2.45	SO ₄ ²⁻	13,73	1,8814	1,8358

^[1]Tiempo de retención (min), ^[2] antes y, ^[3] después del tratamiento con NP-C4.

Cuando probamos otros receptores escuaramídicos, como **C4**, o el receptor de ditópico **2.46**^{119b} (Figura 2.45) con los carboxilatos estudiados: benzoato (**2.33**), tartrato (**2.34**) y citrato (**2.35**), en las mismas condiciones experimentales, no se observó variación alguna en los espectros de emisión de fluorescencia (Figura 2.46). Estos resultados ponen de manifiesto que en estas condiciones, la poca capacidad de reconocimiento de estos receptores, especialmente del receptor **2.46** con dos sitios de unión, es debido a su falta de preorganización.

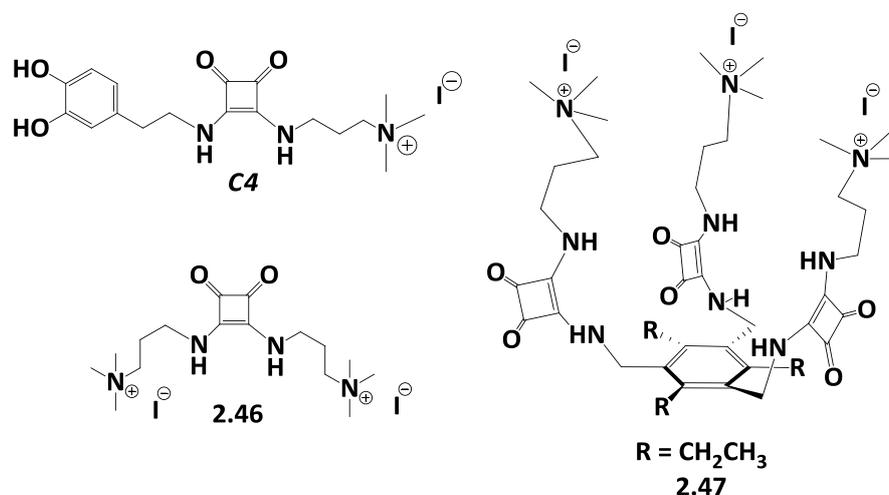


Fig. 2.45. Receptores escuaramídicos.

En la Figura 2.46, se muestra la variación de la intensidad de fluorescencia cuando se añaden diferentes cantidades de benzoato, tartrato y citrato a una disolución de los receptores **C4** y **2.46**.

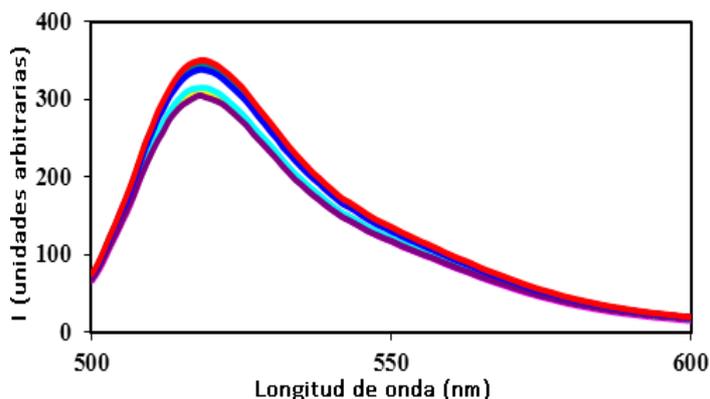


Fig. 2.46. Curva de emisión de fluorescencia de fluoresceína $2,0 \times 10^{-5}$ M antes (rojo) y después de la adición de los receptores **C4** (morado) y **2.46** (amarillo). La respuesta de emisión de fluorescencia tras la adición de 30 mg de benzoato (azul oscuro), tartrato (azul claro) y citrato (rosa) respectivamente muestra que no hay una variación significativa en los espectros de fluorescencia.

Por el contrario, el receptor trifuncional **2.47**, altamente preorganizado y con las mismas unidades de unión que **C4**, muestra una mayor afinidad por tricarboxilatos que por mono y dicarboxilatos, en disoluciones acuosas al mismo pH.¹²⁸ Por ejemplo, para citrato, $K_a = 1.1 \times 10^5$, mientras que para glutarato, $K_a = 2,8 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$. Por tanto, utilizando el mismo resto de unión, en este caso la sal de amonio escuaramídica, es posible inducir selectividad dependiendo del grado de preorganización del grupo espaciador. Las nanopartículas **NP-C4**, en principio no preorganizadas, muestran una cierta selectividad comparable a los receptores orgánicos altamente preorganizadas como **2.47**.

La selectividad en la retención de carboxilatos por las **NP-C4** fue nuevamente estudiada, pero esta vez de forma cuantitativa. Para ello se llevó a cabo un ensayo siguiendo una metodología muy similar a la descrita anteriormente. De forma breve, 5 mg de **NP-C4** se dispersaron en 2 mL de disolución tampón y se irradió con ultrasonidos durante 1 min. A continuación, se añadieron 20 mg de los carboxilatos **2.33**, **2.34**, **2.35**, **2.36**, **2.37** y **2.38** respectivamente en la disolución anterior. La mezcla se agitó durante 30 minutos y finalmente, las nanopartículas se aislaron por filtración magnética y se lavaron con agua. La disolución proveniente de los lavados se concentró para eliminar el disolvente.

La cuantificación de la cantidad restante de cada uno de los carboxilatos se hizo por ¹H-RMN. Los resultados se muestran en la Figura 2.47. En todos los casos, la retención de mono y dicarboxilatos fue mayor que la de tricarboxilatos. Resultados similares se obtuvieron cuando el ensayo se realizó utilizando una disolución de todos los carboxilatos juntos (Figura 2.48).

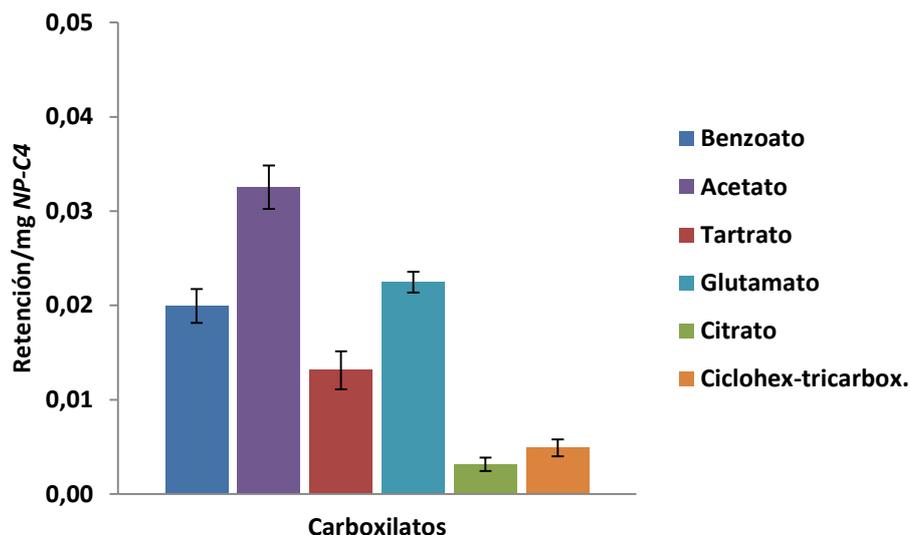


Fig. 2.47. Cuantificación de carboxilatos retenidos por **NP-C4**. La representación corresponde a los mmol de carboxilato retenido / mg **NP-C4**.

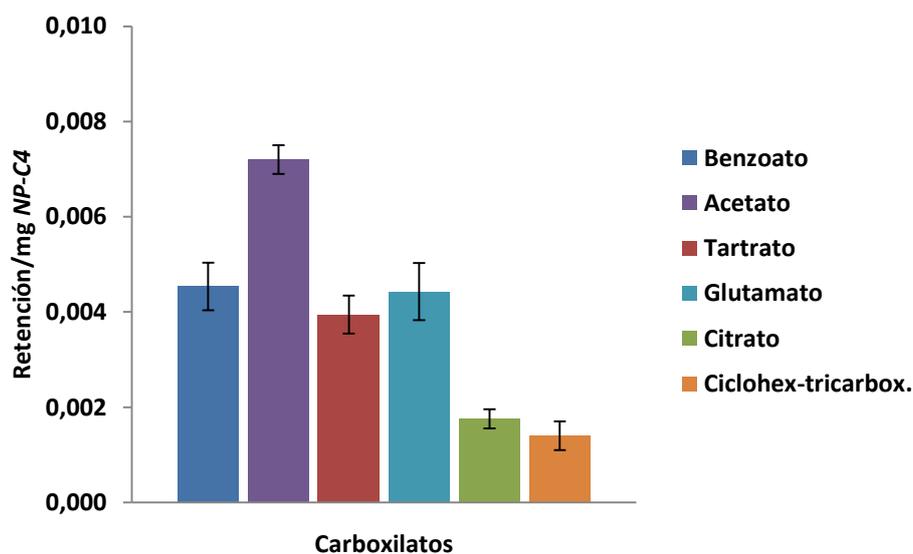


Fig. 2.48. Cuantificación de carboxilatos retenidos por **NP-C4** en ensayo utilizando una disolución de todos los carboxilatos juntos. La representación corresponde a los mmol de carboxilato retenido / mg **NP-C4**.

Los restos **C4** no se distribuyen de manera uniforme sobre la superficie de la nanopartícula estratégicamente para ajustarse al tamaño molecular de estos sustratos. Por tanto, en ciertas regiones de la superficie habrá una mayor coincidencia de restos escuaramídicos que en otras partes. El reconocimiento de un tricarboxilato, por ejemplo citrato o 1,3,5-ciclohexanotricarboxilato, requiere la convergencia de tres restos escuaramídicos ubicados en la proximidad. Este hecho es estadísticamente menos probable que la existencia de un resto aislado o la convergencia de dos restos escuaramídicos, lo que conduce a la formación de complejos con mono y dicarboxilatos selectivamente (Figura 2.49).

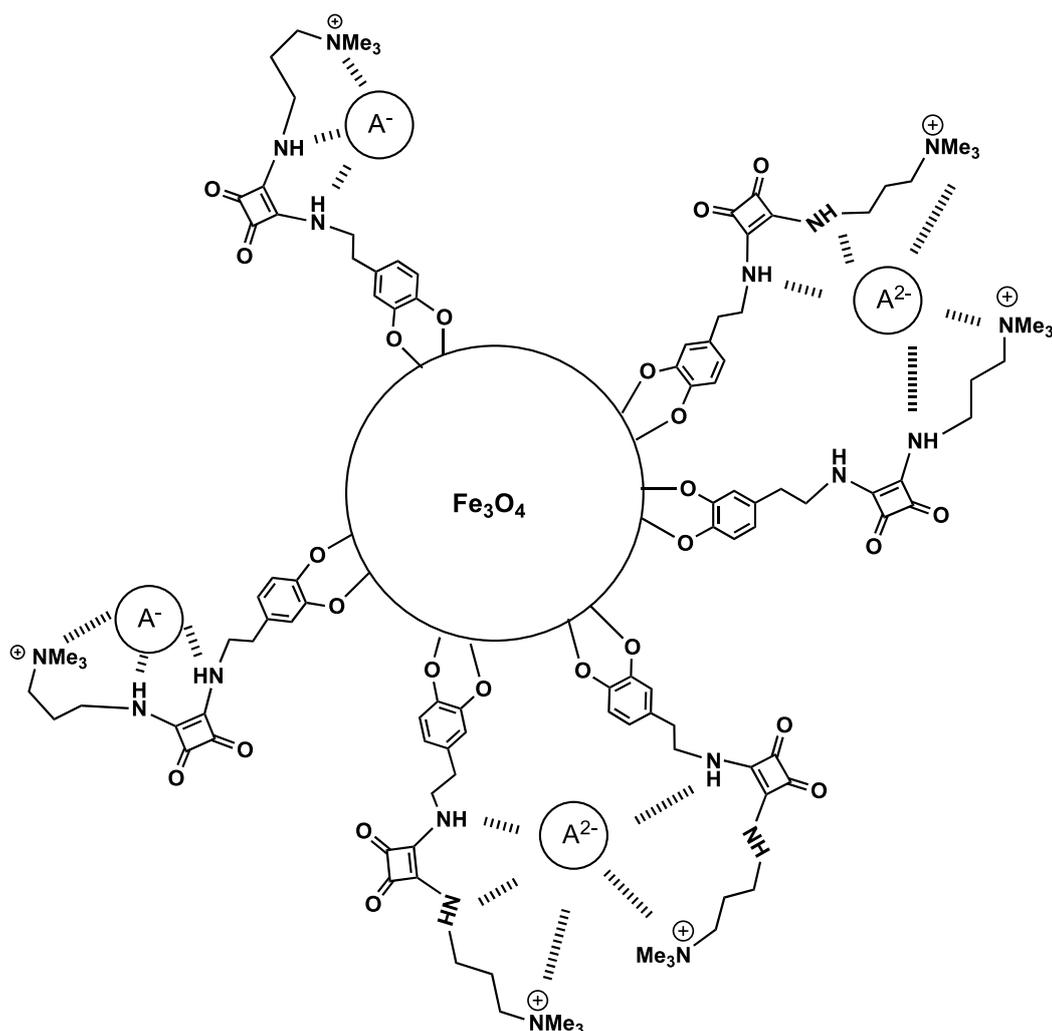


Fig. 2.49. Representación esquemática del reconocimiento de mono y dicarboxilatos por **NP-C4**. El reconocimiento de monocarboxilatos solo implica una unidad **C4**, en cambio, para el reconocimiento de dicarboxilatos al menos dos restos **C4** son necesarios. Es lógico pensar que la retención de mono y dicarboxilatos es más eficaz que la de tricarboxilatos debido a la mayor probabilidad de encontrar uno o dos restos **C4** con la conformación apropiada para unirse a un mono o un dicarboxilato.

A lo largo de este apartado se ha demostrado que **NP-C4** a pesar de no ser un receptor preorganizado es capaz de inducir una cierta selectividad en el reconocimiento de carboxilatos, uniéndose preferentemente a mono y dicarboxilatos. Por otra parte, se ha descrito en la bibliografía que las nanopartículas de óxidos de hierro sin funcionalizar presentan una alta afinidad por los carboxilatos. Por ejemplo, en el caso de fluoresceína,¹⁷² la adsorción en la superficie es prácticamente constante en el intervalo de pH entre 3-11. Ensayos realizados por fluorescencia, similares a los descritos anteriormente, confirman que estas nanopartículas presentan una escasa selectividad en la coordinación de carboxilatos. En la Figura 2.50, se muestran las bandas de

¹⁷² S. Pirillo, L. Cornaglia, M. L. Ferreira, E. H. Rueda, *Spectrochimica Acta, part A* **2008**, 71, 636-643.

fluorescencia tras la adición de disoluciones de citrato y benzoato respectivamente. En este caso, ambos carboxilatos tuvieron comportamientos similares entre sí, dado que se recuperó en gran medida la intensidad de fluorescencia para los dos. La no distinción entre mono y tricarboxilato, en este ensayo, demuestra la nula selectividad de las nanopartículas sin funcionalizar.

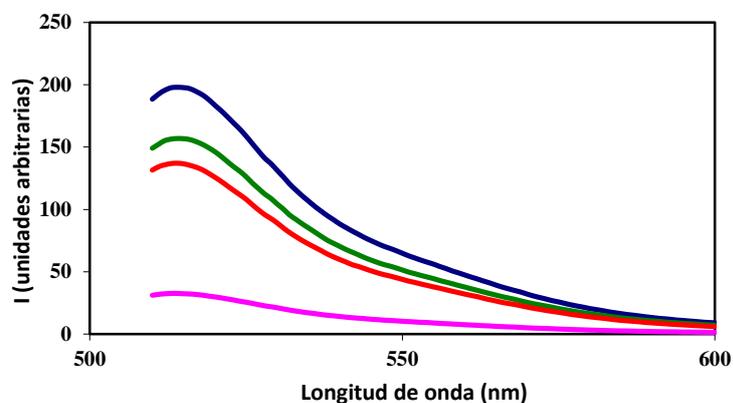


Fig. 2.50. Curva de emisión de fluorescencia de fluoresceína $2,0 \times 10^{-5}$ M antes (curva superior, azul oscuro) y después de la adición de nanopartículas sin funcionalizar (curva inferior, rosa). Respuesta de emisión de fluorescencia tras la adición de 30 mg de citrato (rojo) y benzoato (verde) respectivamente.

2.6 ESTUDIO DE NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS CON ESCUARAMIDAS PARA LA ELIMINACIÓN DE IONES DE METALES PESADOS EN H₂O

La encapsulación y eliminación de metales pesados y de transición, tales como: Hg²⁺, Pb²⁺, Cd²⁺, Cr³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, y sus compuestos en el medio ambiente, es un tema de gran interés debido a su elevada toxicidad.¹⁷³ Por ejemplo, el envenenamiento por Pb²⁺ puede afectar a casi todos los órganos y sistemas del cuerpo humano, particularmente en los niños, causando diversos síntomas tales como anemia, daño renal, trastornos hematológicos, pérdida de memoria, parálisis muscular, y retraso mental.¹⁷⁴ Estudios sobre la toxicidad de Cd²⁺ muestran que éste afecta a huesos, riñones, sistema nervioso y tejidos, lo que deriva en disfunción renal, trastornos del metabolismo del calcio y un aumento de la incidencia de ciertas formas de cáncer.¹⁷⁵ Especialmente en este sentido, el Hg²⁺ se considera altamente peligroso debido a su elevada toxicidad¹⁷⁶ y los múltiples daños que causa a los riñones y a los sistemas digestivo y neurológico. Tanto el mercurio elemental como el iónico puede ser convertido en metilmercurio por bacterias en el medio ambiente, y posteriormente se bioacumula en la cadena alimentaria.¹⁷⁷

Recientemente, se han desarrollado nuevos absorbentes: poliméricos,¹⁷⁸ dendríticos,¹⁷⁹ materiales mesoporos de sílice,¹⁸⁰ zeolitas,¹⁸¹ biopolímeros,¹⁸² entre otros, con una mayor capacidad de adsorción y selectividad para metales pesados.

¹⁷³ (a) L. M. Campbell, D. G. Dixon, R. E. Hecky, *J. Toxicol. Environ. Health Part B*, **2003**, *6*, 325-356; (b) J. O. Nriagu, J. M. Pacyna, *Nature* **1988**, *333*, 134-139.

¹⁷⁴ (a) N. Rifai, G. Cohen, M. Wolf, L. Cohen, C. Faser, J. Savory, L. DePalma, *Ther. Drug Monit.* **1993**, *15*, 71-74; (b) J. S. Liu-Fu, *Lead Poisoning, A Century of Discovery and Rediscovery, in Human Lead Exposure*, ed. H. L. Needleman, Lewis Publishing, Boca Raton, FL, **1992**.

¹⁷⁵ S. Dobson, *Cadmium: Environmental Aspects*; World Health Organization: Geneva, **1992**.

¹⁷⁶ La cantidad máxima permitida de Hg²⁺ en agua potable según los estándares de la Agencia de Protección Ambiental es de 2 ppb.

¹⁷⁷ (a) D. W. Boening, *Chemosphere* **2000**, *40*, 1335-1341; (b) J. M. Benoit, W. F. Fitzgerald, A. W. Damman, *Environ. Res.* **1998**, *78*, 118-133.

¹⁷⁸ (a) A. R. Meier, U. S. Schubert, *Chem. Commun.* **2005**, 4610-4612; (b) R. Haag, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 278-282.

¹⁷⁹ (a) M. Liu, K. Kono, J. M. J. Frechet, *J. Control. Release* **2000**, *65*, 121-131; (b) M. S. Diallo, S. Christie, P. Swaminathan, J. H. Johnson Jr, W. A. Goddard III, *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 1366-1377.

¹⁸⁰ X. Feng, G. E. Fryxell, L.-Q. Wang, A. Y. Kim, J. Liu, K. M. Kemner, *Science* **1997**, *276*, 923-926.

¹⁸¹ U. Wingenfelder, C. Hansen, G. Furrer, R. Schulz, *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 4606-4613.

¹⁸² J. Kostal, A. Mulchandani, W. Chen, *Macromolecules* **2001**, *34*, 2257-2261.

En los últimos años, se han comenzado a utilizar diversas nanopartículas,¹⁸³ entre ellas las de óxidos de hierro,^{95,96,184} para la eliminación de metales pesados, aprovechando las excepcionales propiedades que presentan estos materiales. Diversos grupos de investigación dedicados a la síntesis y funcionalización de nanopartículas de Fe₃O₄, han utilizado sus características magnéticas y la capacidad de coordinar metales que presentan algunas moléculas orgánicas, para eliminar selectivamente, estos tóxicos de disoluciones acuosas.^{96,185}

Las nanopartículas de magnetita sin funcionalizar permiten la adsorción en su superficie de metales pesados como Cr(VI) y no metales como As(III) y As(V) en una pequeña proporción.^{184d} La idea de funcionalizar la superficie de las nanopartículas ha permitido en la mayoría de los casos aumentar la proporción de metal complejoado⁹⁶ y en ciertos casos, establecer selectividad en el proceso.

Por su parte, la capacidad de las escuaramidas para complejar metales pesados no ha sido estudiada. Anteriormente, se han descrito otros derivados escuarícos, específicamente escuaraínas, capaces de complejar Hg²⁺. Cabe remarcar el ejemplo de coordinación selectiva entre Hg²⁺ y la semiescuaraína descrita Ramaiah en 2007.¹⁴⁵ En este complejo la coordinación se efectúa a través de los grupos carbonilo del anillo de escuarato dado que el Hg²⁺ presenta el tamaño adecuado para colocarse entre los dos oxígenos de dichos grupos (Figura 2.51). Para otros metales como Cd²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ y Cr³⁺, debido a sus menores tamaños, esta coordinación no es factible. Sin embargo, para iones de tamaños similares a Hg²⁺ como por ejemplo el Pb²⁺ no se ha sugerido en la bibliografía ningún modelo de coordinación.

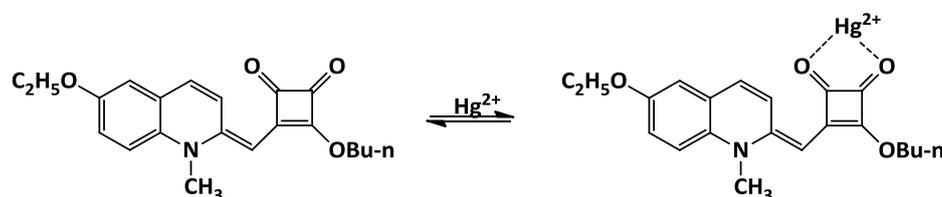


Fig. 2.51. Esquema de coordinación selectiva entre semiescuaraína¹⁴⁵ y Hg²⁺.

Dado que no se encontraron datos bibliográficos se decidió evaluar la capacidad de las nanopartículas funcionalizadas con escuaramidas en relación a su capacidad para coordinar y eliminar selectivamente metales pesados de disoluciones acuosas. Además, se propuso ensayar distintos tipos de escuaramidas (diescuaramidas y bis-

¹⁸³ (a) N. Savage, M. S. Diallo, *J. Nanopart. Res.* **2005**, *7*, 331-342; (b) S. M. Ponder, J. G. Darab, T. E. Mallouk, *Environ. Sci. Technol.* **2000**, *34*, 2564-2569.

¹⁸⁴ (a) J. Hu, M. C. Lo, G. H. Chen, *Water Sci. Technol.* **2004**, *50*, 139-146; (b) J. Hu, G. Chen, M. C. Lo, *Water Res.* **2005**, *39*, 4528-4536; (c) Y.-C. Chang, D.-H. Chen, *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *283*, 446-451; (d) A.-F. Ngomsik, A. Bee, M. Draye, G. Cote, V. Cabuil, *C. R. Chimie* **2005**, *8*, 963-970; (e) C. T. Yavuz, J. T. Mayo, W. W. Yu, A. Prakash, J. C. Falkner, S. Yean, L. Cong, H. J. Shipley, A. Kan, M. Tomson, D. Natelson, V. L. Colvin, *Science* **2006**, *314*, 964-967; (f) L.-S. Zhong, J.-S. Hu, H.-P. Liang, A.-M. Cao, W.-G. Sun, L.-J. Wan, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 2426-2437.

¹⁸⁵ A. M. Donia, A. A. Atia, K. Z. Elwakeel, *J. Hazard. Mat.* **2008**, *151*, 372-379.

diescuaramidas) unidas a nanopartículas para determinar si la capacidad de coordinación mejoraba aumentando el número de unidades escuarato en la cadena.

Para realizar los estudios correspondientes se eligieron dos tipos de nanopartículas funcionalizadas con escuaramidas ya descritas: **NP-C2** y **NP-C8** (Figura 2.52). Ambas escuaramidas tienen una amina terciaria terminal que en función del pH de la disolución puede encontrarse protonada o no, lo cual puede modificar el reconocimiento de los iones metálicos. Por este motivo, se incluyó en el ensayo un nuevo tipo de nanopartícula no descrita (**NP-C12**) con una nueva diescuaramida (**C12**) que contiene un resto *N*-butilo totalmente independiente del pH.

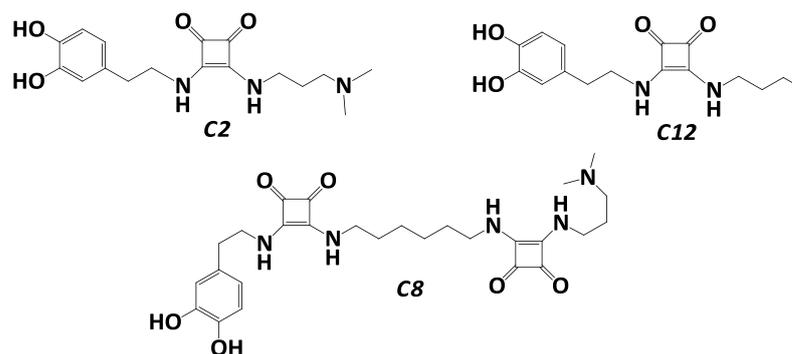


Fig. 2.52. Estructura de di y bis-diescuaramidas unidas a **NP** para ensayo con iones metálicos.

La síntesis de la diescuaramida asimétrica **C12** se realizó siguiendo la metodología descrita anteriormente. Partiendo del escuarato de dietilo, utilizando Et₂O como disolvente y 1 equivalente de *N*-butilamina se obtuvo el producto de monoentrada **2.39**, tal como se describe en la Figura 2.53. La posterior condensación con dopamina en presencia de carbonato y ditionito sódico, utilizando como disolvente MeOH, en atmósfera inerte y en ausencia de luz llevó a la obtención del producto deseado (**C12**).

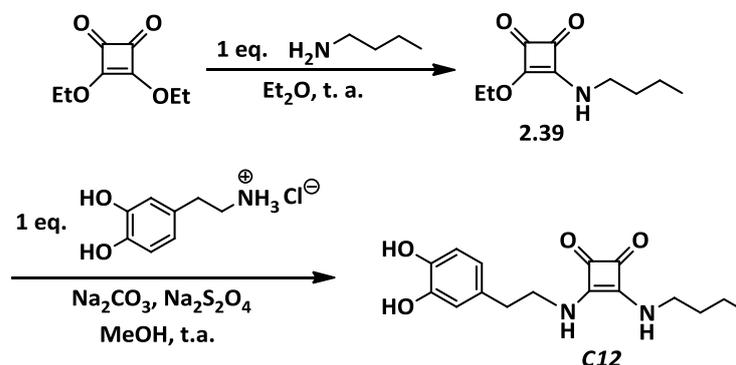


Fig. 2.53. Esquema de síntesis de **C12**.

El acoplamiento entre **C12** y las nanopartículas de Fe₃O₄ se efectuó tal como fue descrito para las diescuaramidas **C2** y **C4** utilizando MeOH como disolvente. Las

2. Nanopartículas de óxidos de hierro funcionalizadas con escuaramidas como receptores en Química Supramolecular

nanopartículas funcionalizadas resultantes (**NP-C12**) mostraron una adecuada solubilidad en agua.

Las nanopartículas (**NP-C2**, **NP-C8** y **NP-C12**) fueron caracterizadas por FT-IR, obteniéndose las bandas típicas de escuaramidas y de Fe-O descritas en apartados anteriores (Figura 2.54). Las imágenes del TEM mostraron un núcleo esférico de entre 8-10 nm con una distribución de tamaños homogénea.

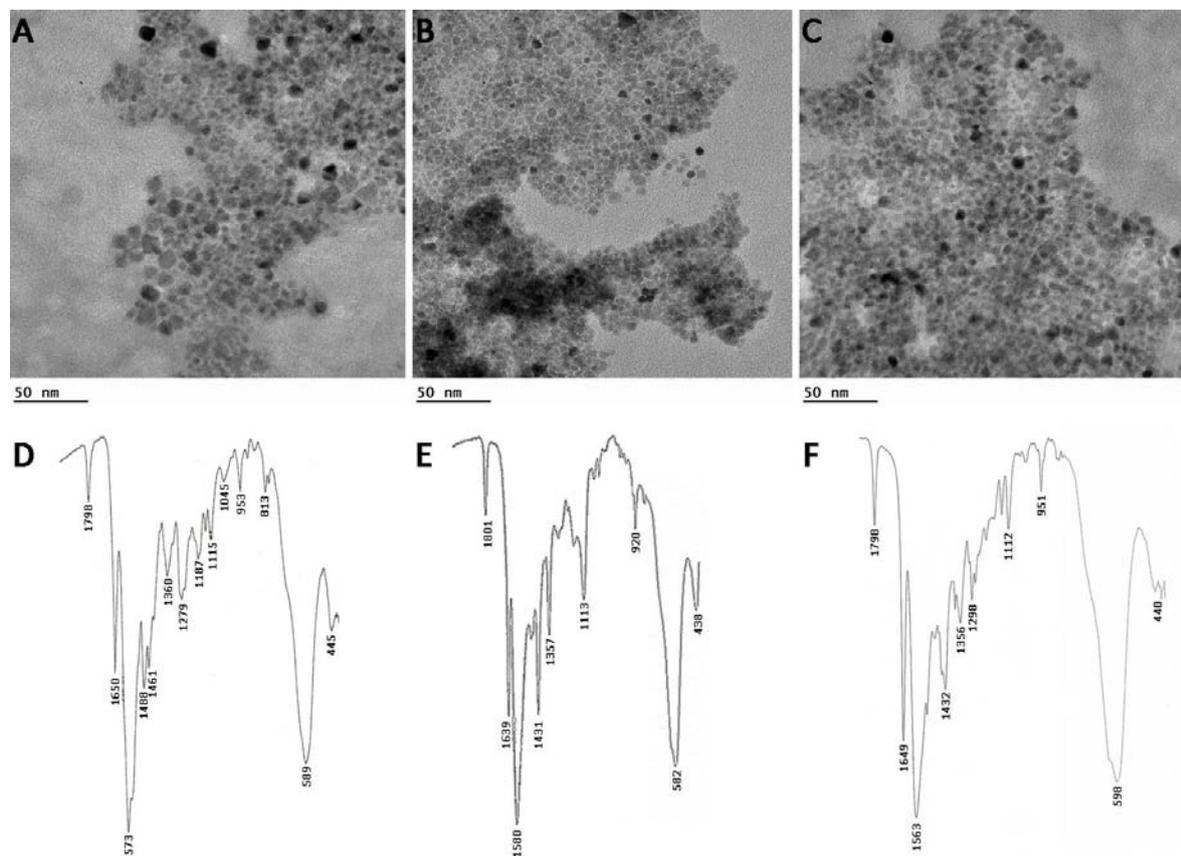


Fig. 2.54. Caracterización mediante TEM de: A) **NP-C2**, B) **NP-C8** y C) **NP-C12**. Espectros de IR D) **NP-C2**, E) **NP-C8** y F) **NP-C12**.

En un primer ensayo se determinó la capacidad de reconocimiento de Hg^{2+} de las nanopartículas descritas anteriormente. Con el fin de establecer la influencia del pH sobre la capacidad de coordinación de estas nanopartículas se realizaron pruebas a tres pH diferentes: dos ácidos (3 y 5,5) y uno neutro (7). No se ensayó ningún pH básico para evitar la precipitación de los hidróxidos de los metales pesados. En este experimento, 5 mg de **NP-C2**, **NP-C8** y **NP-C12** se suspendieron, respectivamente, en 10 mL de una disolución de Hg^{2+} de 5 ppm. El pH se ajustó a 3; 5,5 y 7 para cada una de ellas. Tras la agitación de la mezcla durante 30 min las nanopartículas se aislaron mediante filtración magnética y las disoluciones resultantes fueron filtradas con un filtro de teflón de 0,45 μm . La concentración de Hg^{2+} remanente se cuantificó gracias una técnica de generación de hidruros mediante un sistema de inyección en flujo.¹⁸⁶ Una alícuota de 5 mL de las

¹⁸⁶ A. M. Serra, J.M. Estela, V. Cerdà, *Talanta* **2008**, 77, 556-560.

diferentes disoluciones se mezcló con 1 mL de una disolución de $K_2Cr_2O_7$ 0,5% y se diluyó con HNO_3 2,5% hasta un volumen total de 10 mL. Los resultados (Figura 2.55) mostraron que **NP-C12** presentaba la mayor capacidad para retirar Hg^{2+} de las disoluciones a todos los pH estudiados. Esto se debe, presumiblemente, a que el resto neutro (radical n-butilo) que presenta la diescuaramida **C12** no se afectaba por el pH de la disolución. Por otra parte, en este ensayo se demostró que las **NP-C8**, funcionalizadas con una bis-diescuaramida no retenía una mayor cantidad de Hg^{2+} a pesar de tener dos unidades escuarato en una misma cadena. De hecho, tanto a pH=3 como a pH=7 **NP-C2** presentó una capacidad de retención superior a la bis-diescuaramida. Es posible que la bis-diescuaramida soportada en la nanopartícula ofrezca un entorno más impedido para la interacción con el metal pesado, además de verse afectada por el pH de la disolución como **NP-C2**. Por último, cabe mencionar que la presencia de la amina terminal protonada en el compuesto escuaramídico empeoraba la interacción con Hg^{2+} , a los pH estudiados. A la luz de estos resultados se decidió seguir los ensayos utilizando **NP-C12**.

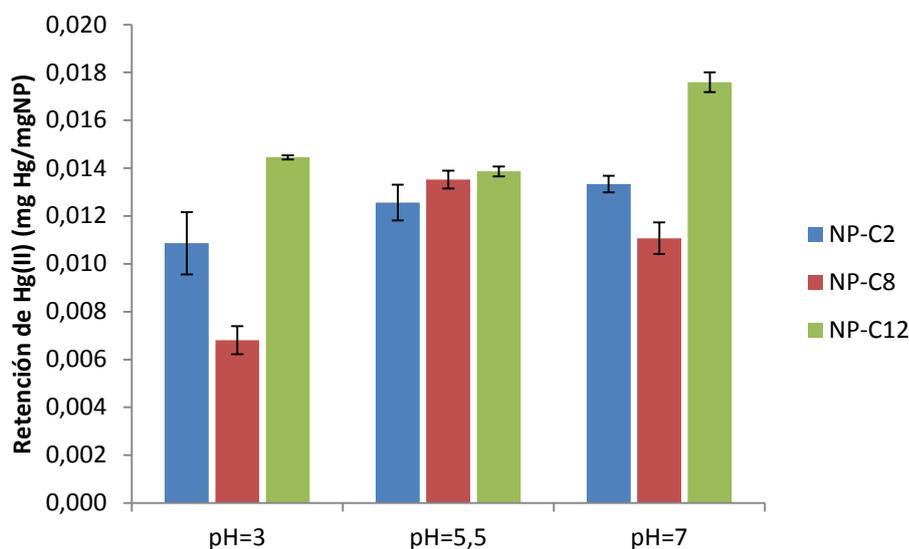


Fig. 2.55. Retención de iones $Hg(II)$ por las nanopartículas funcionalizadas con escuaramidas: **NP-C2**, **NP-C8** y **NP-C12** a diferentes pH.

Para probar la capacidad de eliminación de otros metales pesados con **NP-C12**, se llevó a cabo un experimento similar al anterior en el que las nanopartículas se pusieron en contacto con disoluciones de 5 ppm de los metales: Cd^{2+} , Co^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} y Zn^{2+} . La mezcla se trató tal como se describió en ensayo anterior con la única diferencia que, en este caso, la cuantificación se realizó por ICP. El mismo ensayo se repitió pero utilizando esta vez nanopartículas sin funcionalizar (**NP control**) como control negativo, para determinar si la funcionalización con escuaramidas ofrecía ventajas en la coordinación y eliminación de dichos metales. Ambos ensayos se repitieron también para el Hg^{2+} y su cuantificación se efectuó nuevamente a través de la técnica de generación de hidruros. Los resultados (Figura 2.56) representados en función de los ppm del metal retenido / mg de la nanopartícula utilizada mostraron una buena retención para todos los metales,

especialmente para el Hg^{2+} y Pb^{2+} cuando se trataban con **NP-C12**. Por su parte, las **NP control** sólo fueron capaces de eliminar parcialmente Hg^{2+} y Pb^{2+} . La retención y por ende la coordinación con el resto de metales fue muy pequeña, casi ínfima en ciertos casos como el Zn^{2+} . Este ensayo, además, demostró que la funcionalización con escuaramidas incrementaba considerablemente la capacidad de coordinación de los diferentes iones. La conjunción nanopartícula-escuaramida induce un efecto sinérgico positivo. Así, por una parte las unidades escuaramídicas permiten una mayor coordinación de los metales pesados y por otra las nanopartículas de Fe_3O_4 confieren un soporte adecuado para la eliminación de los mismos de disoluciones acuosas.

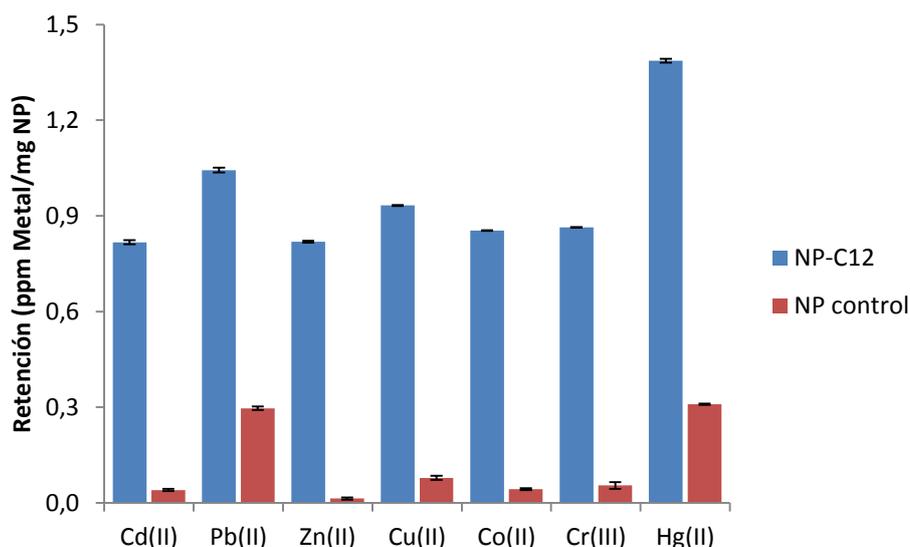


Fig. 2.56. Ensayo de retención de cationes de metales pesados por **NP-C12** y **NP control**.

Además de los porcentajes de retención representados en la Figura 2.56 se calculó, para cada uno de los metales, el coeficiente de distribución o partición K_d . Mientras que el porcentaje de retención es una medida de la cantidad total de analito retirado de la disolución, el valor de K_d es una medida directa de la afinidad del adsorbente por el analito en las condiciones del ensayo.¹⁸⁷ Este valor es un coeficiente de reparto de masa ponderado entre la fase líquida (sobrenadante) y la fase sólida (material adsorbente) y deriva de la ecuación 2.4; donde C_0 y C_f son las concentraciones iniciales y finales de cada analito, V es el volumen de las disoluciones expresado en mL y M es la masa en gramos del material adsorbente, en este caso **NP-C12**.

$$K_d = \frac{C_0 - C_f}{C_f} \times \frac{V}{M} \quad \text{Ecuación 2.4}$$

¹⁸⁷ G. E. Fryxell, Y. Lin, S. Fiskum, J. C. Birnbaum, H. Wu, K. Kemner, S. Kelly, *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 1324-1331.

Un valor de K_d elevado indica una mayor capacidad de interacción y retención del analito. Generalmente, valores de 10^3 se consideran razonablemente buenos y valores por encima de 10^4 se asumen como excelentes. En la Tabla 2.3 se presentan los valores de K_d calculados para los diferentes metales estudiados. Para Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} y Cr^{3+} con **NP-C12** se obtuvieron valores en el orden de $10^3 - 10^4$, mientras que para Pb^{2+} y Hg^{2+} se observó una superior capacidad de interacción dado que los valores alcanzados fueron del orden de 10^5 . Para las **NP control** en general se obtuvieron valores bajos de K_d . Los ejemplos más remarcables fueron los del Hg^{2+} y Pb^{2+} donde se observó una cierta afinidad por parte de estas nanopartículas sin funcionalizar.

Otros materiales para eliminar Hg^{2+} y Pb^{2+} recientemente descritos en la bibliografía muestran retenciones similares a las descritas para **NP-C12**. Tal es el caso de las nanopartículas de Fe_3O_4 dopadas con Mn descritas por Addelman.⁹⁸ Sin embargo, en este mismo estudio se observan retenciones superiores para Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} y Cd^{2+} . Por otra parte, las nanopartículas de Fe_3O_4 recubiertas con un polímero de tiofeno descritas por Jang⁹³ retiran mucho menos Hg^{2+} y Pb^{2+} que **NP-C12**, pero en cambio, las nanopartículas de Fe_3O_4 funcionalizadas con ácido húmico preparadas por Jiang⁹⁶ demuestran mejores resultados.

Tabla 2.3: Retención de metales con **NP-C12** y **NP control** expresado como K_d .

Metal	Cd(II)	Pb(II)	Zn(II)	Cu(II)	Co(II)	Cr(III)	Hg(II)
K_d^a	$1,17 \times 10^4$	$1,28 \times 10^5$	$8,46 \times 10^3$	$2,04 \times 10^4$	$1,11 \times 10^4$	$1,36 \times 10^4$	$1,86 \times 10^5$
K_d^b	8,41	$7,88 \times 10^2$	28,45	$1,69 \times 10^2$	87,31	$1,15 \times 10^2$	$1,69 \times 10^3$

^a: valores obtenidos del ensayo con **NP-C12**, ^b: valores obtenidos del ensayo con **NP control**

Con el fin de evaluar la selectividad de las **NP-C12** se realizó un ensayo análogo utilizando una disolución de todos los cationes metálicos juntos. La cuantificación de los diferentes metales en disolución se hizo por ICP y se ha representado el porcentaje retenido de cada ion (Figura 2.57). Partiendo de una concentración inicial de 5 ppm de cada uno de ellos para Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} y Cr^{3+} la retención no supera el 2%, mientras que para Pb^{2+} y Hg^{2+} se incrementa hasta el 90 y 92% respectivamente. Esta elevada retención selectiva sugiere una interacción más fuerte entre las citadas nanopartículas funcionalizadas y los iones Hg^{2+} y Pb^{2+} comparada con el resto de metales.

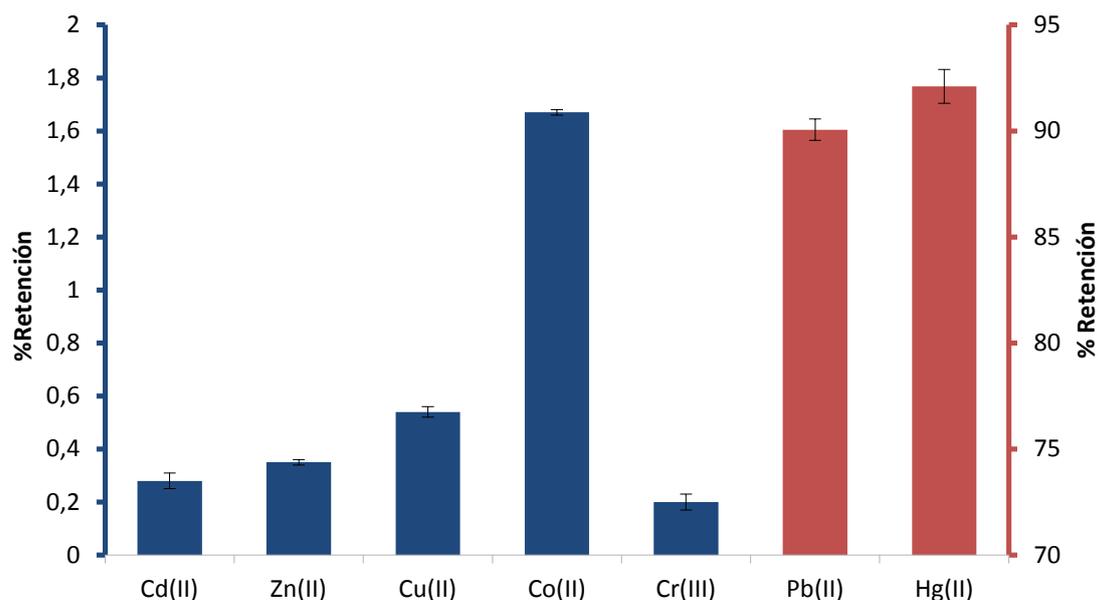


Fig. 2.57. Ensayo de retención de los diferentes metales pesados por **NP-C12** cuando se encuentran en una misma disolución.

Adicionalmente, para demostrar la interacción entre los restos escuaramídicos con Hg^{2+} y con Pb^{2+} a través de las técnicas RMN, MALDI y HRMS-ESI(+), se sintetizó una diescuaramida (**C13**) (Figura 2.58), análoga al resto de **NP-C12**. No se utilizó directamente la diescuaramida **C12** debido a que los fenoles podían establecer nuevos puntos de interacción con los citados iones. En cambio, en **C13**, al estar en forma de grupos metoxi, se presentan los mismos puntos de interacción que en **NP-C12**.

La síntesis se realizó a partir de **2.25** en presencia de 1 eq. del compuesto comercial 3,4-dimetoxifenetilamina y utilizando como disolvente metanol (Figura 2.58). Finalmente se caracterizó mediante ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, FT-IR y HRMS-ESI(+).

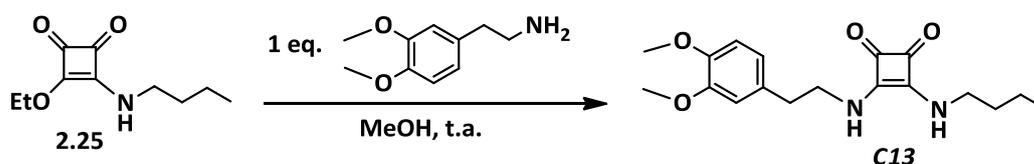


Fig. 2.58. Esquema de síntesis de la diescuaramida **C13**.

Las primeras evidencias de formación de los complejos se obtuvieron a partir de los ensayos seguidos por ^{199}Hg -RMN y ^{207}Pb -RMN en CD_3CN (Figura 2.59). En el espectro se observó un desplazamiento a campo bajo (de -2050 a -2020 ppm) de la señal de ^{199}Hg del $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ cuando se añadió **C13** para formar el complejo. De igual manera, se observó un desplazamiento, pero esta vez a campo alto, (de -3165 a -3211 ppm) de la señal de ^{207}Pb cuando se forma el complejo entre la diescuaramida **C13** y el $\text{Pb}(\text{ClO}_4)_2$.

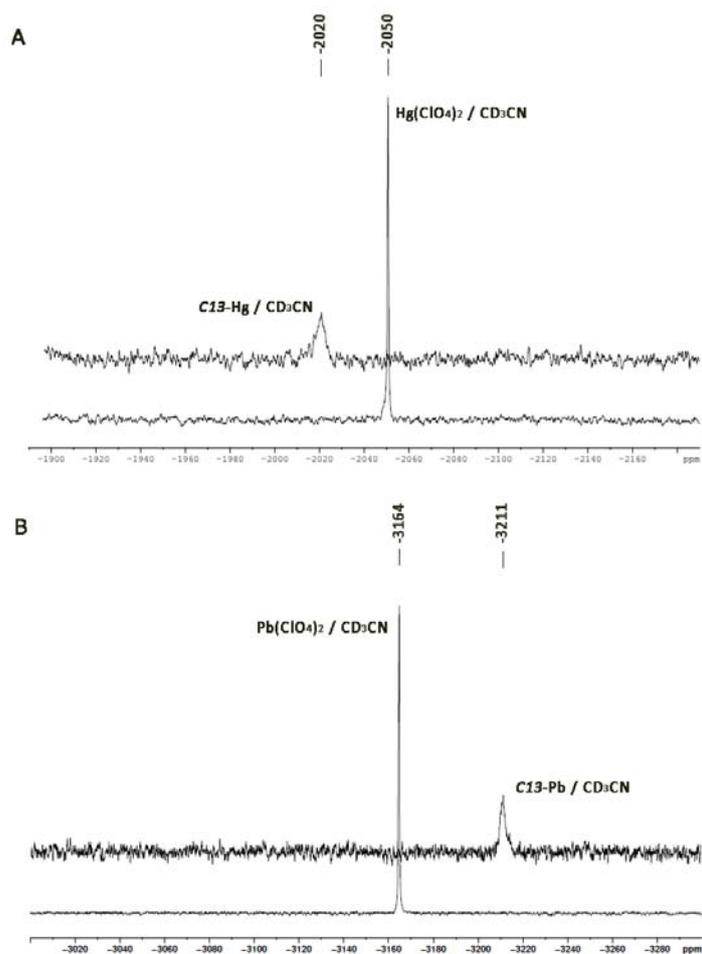


Fig. 2.59. A) ^{199}Hg -RMN de $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ y de **C13**-Hg en CD_3CN y B) ^{207}Pb -RMN de $\text{Pb}(\text{ClO}_4)_2$ y de **C13**-Pb en CD_3CN .

La presencia de ambos complejos se comprobó en disolución por HRMS-ESI(+). Para Hg^{2+} se observó la formación del complejo 1:1 $[\text{Hg}(\text{C13})]^+$ y 1:2 $[\text{Hg}(\text{C13})_2]^+$ y 2:2 $[\text{Hg}_2(\text{C13})_2]^+$ en CH_3CN . En estas condiciones el complejo 1:2 fue el mayoritario. Para Pb^{2+} encontramos la formación del complejo 1:1 $[\text{Pb}(\text{C13})]^+$ y 1:2 $\{[\text{Pb}(\text{C13})](\text{ClO}_4)\}^+$ en CH_3CN . Para este catión, el complejo mayoritario en estas condiciones resultó ser el 1:1. La comparación de los patrones de isotópicos teóricos y experimentales coinciden perfectamente tal como se observa en las Figuras 2.60 y 2.61.

2. Nanopartículas de óxidos de hierro funcionalizadas con escuaramidas como receptores en Química Supramolecular

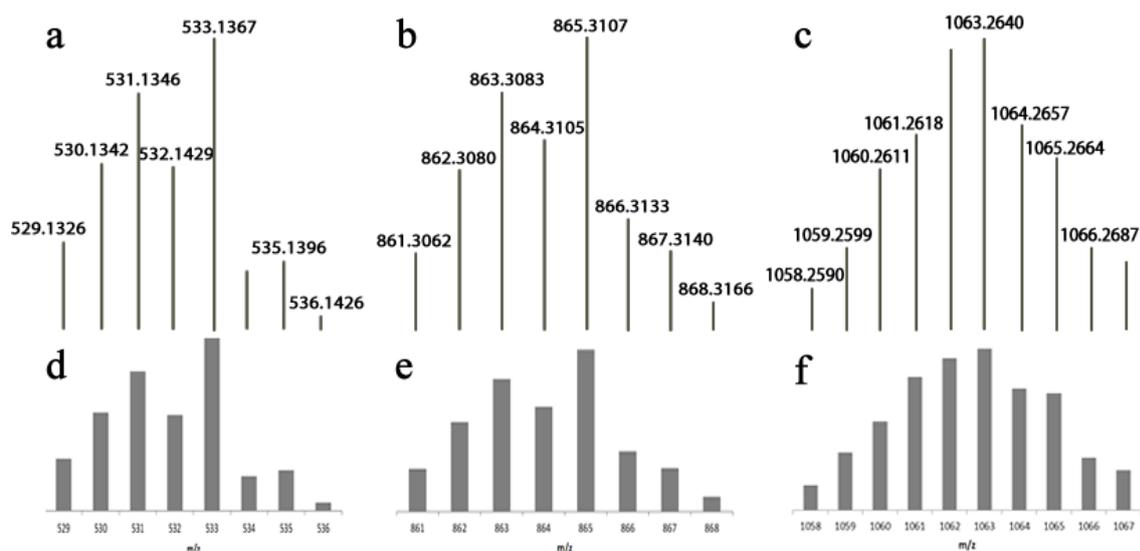


Fig. 2.60. HRMS-ESI(+) de una disolución de **C13** en presencia de Hg^{2+} en CH_3CN . Las señales a m/z (a) 533,1367; (b) 865,3107 y (c) 1063,2640 corresponden, respectivamente a $[\text{Hg}(\text{C13})]^+$, $[\text{Hg}(\text{C13})_2]^+$ y $[\text{Hg}_2(\text{C13})_2]^+$. Las distribuciones isotópicas calculadas para (d) $[\text{Hg}(\text{C13})]^+$, (e) $[\text{Hg}(\text{C13})_2]^+$ y (f) $[\text{Hg}_2(\text{C13})_2]^+$ también se muestran.

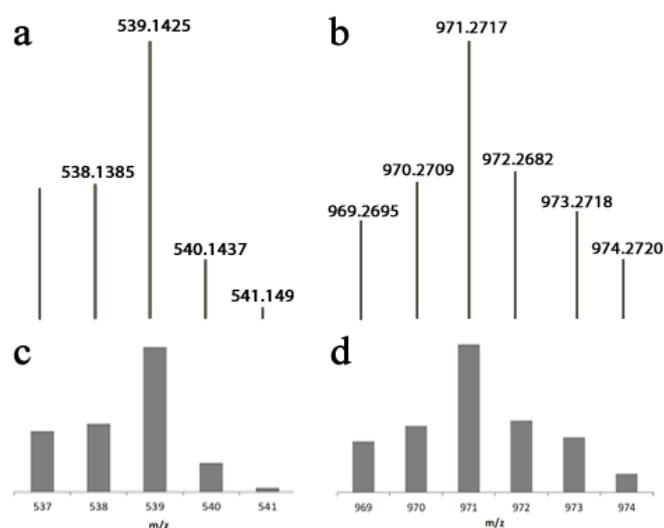


Fig. 2.61. HRMS-ESI(+) de una disolución de **C13** en presencia de Pb^{2+} en CH_3CN . Las señales a m/z (a) 539,1425 y (b) 971,2717 corresponden respectivamente a $[\text{Pb}(\text{C13})]^+$ y $\{[\text{Pb}(\text{C13})](\text{ClO}_4)\}^+$. Las distribuciones isotópicas calculadas para (c) $[\text{Pb}(\text{C13})]^+$ y (d) $\{[\text{Pb}(\text{C13})](\text{ClO}_4)\}^+$ también se muestran.

Ambos complejos también fueron detectados por MALDI/TOF a partir de una disolución de **C13** en presencia de las respectivas sales en CH_3CN . Se utilizaron 50 μL de DCTB (E-2-(3-(4-t-butil-fenil)-2-metil-2-propeniliden)-malononitrilo) como matriz y 10 μL de muestra. Para Hg^{2+} se observaron nuevamente los complejos 1:1, 1:2 y 2:2 mientras que para Pb^{2+} se observaron los complejos 1:1 y 1:2. En este caso, las distribuciones isotópicas calculadas y obtenidas de los complejos también están en concordancia. (Figuras 2.62 y 2.63).

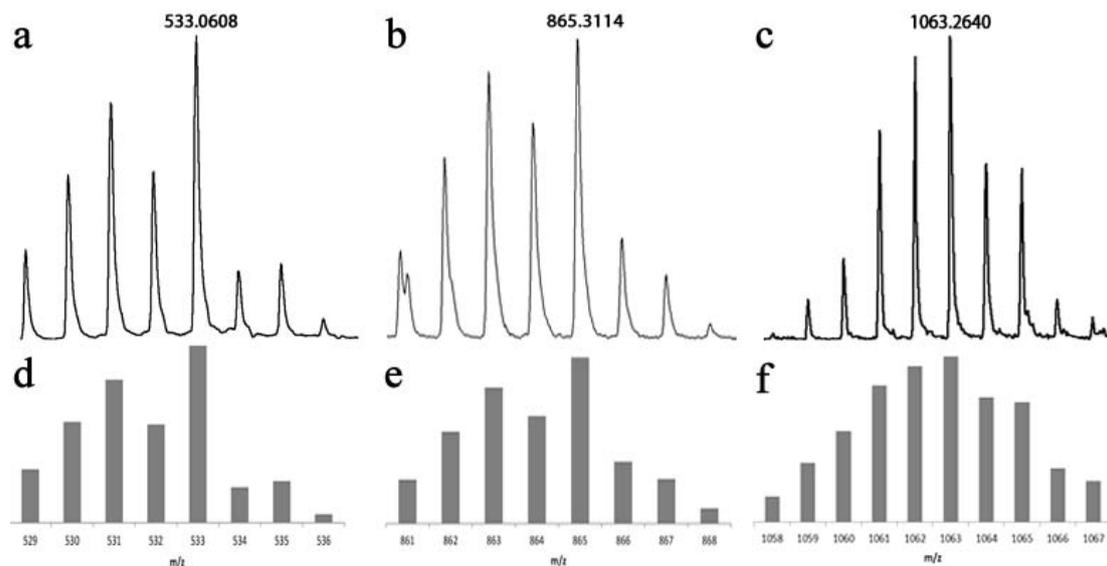


Fig. 2.62. MALDI/TOF de una disolución de **C13** en presencia de Hg^{2+} en CH_3CN . Las señales a m/z (a) 533,0608; (b) 865,3114 y (c) 1063,2640 corresponden, respectivamente a $[\text{Hg}(\text{C13})]^+$, $[\text{Hg}(\text{C13})_2]^+$ y $[\text{Hg}_2(\text{C13})_2]^+$. Las distribuciones isotópicas calculadas para (d) $[\text{Hg}(\text{C13})]^+$, (e) $[\text{Hg}(\text{C13})_2]^+$ y (f) $[\text{Hg}_2(\text{C13})_2]^+$ también se muestran.

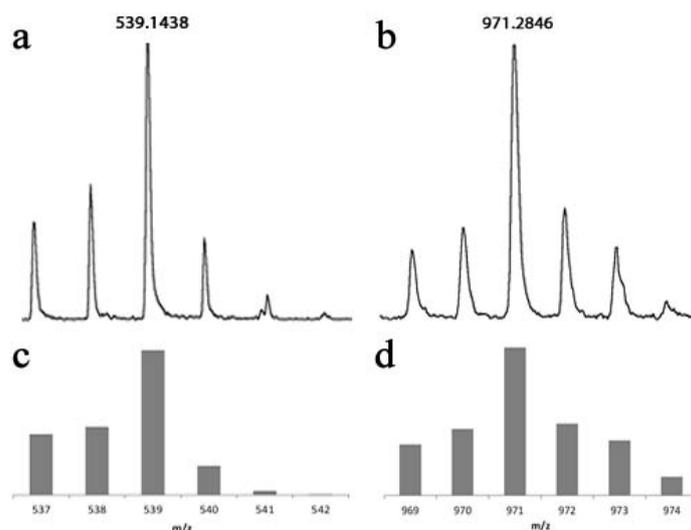


Fig. 2.63. MALDI/TOF de una disolución de **C13** en presencia de Pb^{2+} en CH_3CN . Las señales a m/z (a) 539,1438 y (b) 971,2846 corresponden respectivamente a $[\text{Pb}(\text{C13})]^+$ y $\{[\text{Pb}(\text{C13})](\text{ClO}_4)\}^+$. Las distribuciones isotópicas calculadas para (c) $[\text{Pb}(\text{C13})]^+$ y (d) $\{[\text{Pb}(\text{C13})](\text{ClO}_4)\}^+$ también se muestran.

A través del MALDI/TOF también se detectaron complejos de tipo $\{[\text{M}(\text{C13})](\text{X})\}^+$, $[\text{M}(\text{C13})]^+$, $[\text{M}(\text{C13})_2]^+$ y $\{[\text{M}(\text{C13})_2](\text{X})\}^+$ para los metales Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} y Cr^{3+} . (M= catión, X= contraión). (Figuras 2.64 y 2.65). La preparación de las muestras se realizó de la misma forma descrita anteriormente, utilizando DCTB como matriz, excepto para Cu^{2+} donde se utilizó DHB (ácido dihidroxibenzoico). Tanto para Co^{2+} como para Cu^{2+} y Zn^{2+} se obtuvieron complejos 1:1, mientras que para Cd^{2+} y Cr^{3+} se evidenciaron complejos 1:2. Un punto interesante a remarcar es que la masa exacta del complejo con Cu^{2+} no

coincidió con la esperada en el caso que este metal tuviera un estado de oxidación +2. Para este complejo particular la masa experimental obtenida sugería que el estado de oxidación del Cu era +1. Esto es debido a que el Cu^{2+} , en MALDI, es reducido a Cu^+ por un intercambio de carga con moléculas de la matriz en fase gas. Este hecho ha sido estudiado y descrito anteriormente en la bibliografía.¹⁸⁸

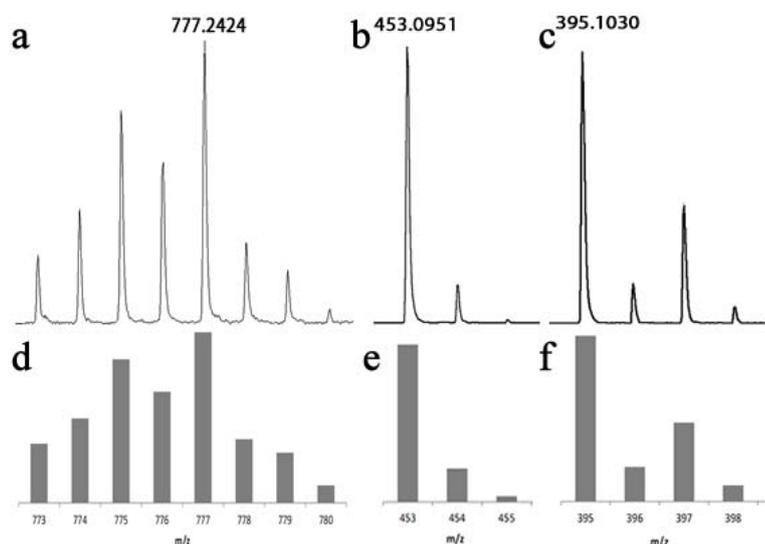


Fig. 2.64. MALDI/TOF de una disolución de **C13** en presencia de Cd^{2+} , Co^{2+} y Cu^{2+} en CH_3CN . Las señales a m/z (a) 777.2424, (b) 453.0951 y (c) 395.1030 corresponden respectivamente a $\text{Cd}(\text{C13})_2^+$, $\{\text{Co}(\text{C13})(\text{NO}_3)\}^+$ y $[\text{Cu}(\text{C13})]^+$. Las distribuciones isotópicas calculadas para (d) $\text{Cd}(\text{C13})_2^+$, (e) $\text{Co}(\text{C13})(\text{NO}_3)^+$ y (f) $[\text{Cu}(\text{C13})]^+$ también se muestran.

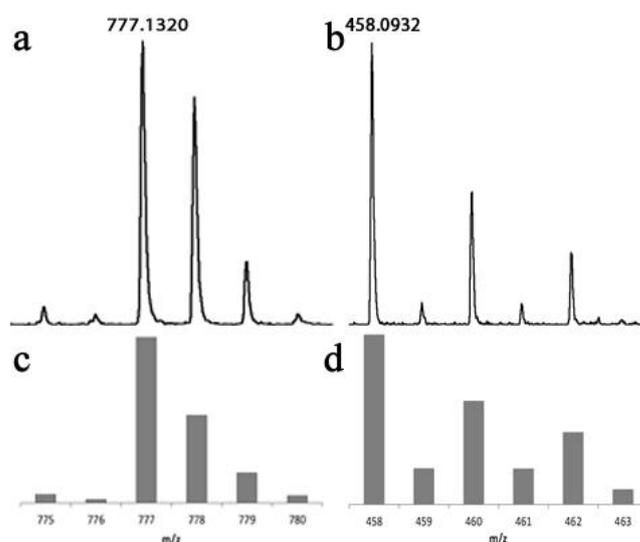


Fig. 2.65. MALDI/TOF de una disolución de **C13** en presencia de Cr^{3+} y Zn^{2+} en CH_3CN . Las señales a m/z (a) 777.1320 y (b) 458.0932 corresponden respectivamente a $\{\text{Cr}(\text{C13})_2(\text{NO}_3)\}^+$ y $\{\text{Zn}(\text{C13})(\text{NO}_3)\}^+$. Las distribuciones isotópicas calculadas para (c) $\{\text{Cr}(\text{C13})_2(\text{NO}_3)\}^+$ y (d) $\{\text{Zn}(\text{C13})(\text{NO}_3)\}^+$ también se muestran.

¹⁸⁸ J. Zhang, V. Frankevich, R. Knochenmuss, S. D. Friess, R. Zenobi, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, *14*, 42-50.

Los resultados de los ensayos por HRMS-ESI(+) y MALDI/TOF permitieron confirmar inequívocamente la formación de los diversos complejos entre los cationes estudiados y **C13**, a partir de la masa exacta.

Para estudiar más a fondo los complejos formados se realizaron valoraciones por ^1H -RMN utilizando CD_3CN como disolvente a temperatura ambiente y manteniendo constante la concentración del receptor **C13**.

En la valoración con Hg^{2+} (Figura 2.66) se observó un ligero desplazamiento a campo bajo de ciertas las señales alifáticas y aromáticas. Lo más destacado de esta valoración fue la aparición de nuevas señales en el espectro. Una de ellas es un doblete en la zona aromática (6,7-7 ppm) que aumentaba paulatinamente a medida que se añadían equivalentes de Hg^{2+} . Por otra parte, aparecieron dos nuevos singletes junto a los singletes iniciales de los grupos metoxi (3,7-3,8 ppm). Finalmente, se observaron nuevas señales en la zona alifática comprendida entre 1,2-1,8 ppm en forma de multipletes. La señal de H_2O , inicialmente a 2,14 ppm, se desplazó hacia campo bajo dado que su concentración aumentaba a medida que aumentaban los equivalentes añadidos de Hg^{2+} . Esto es debido a que la sal de mercurio utilizada estaba hidratada.

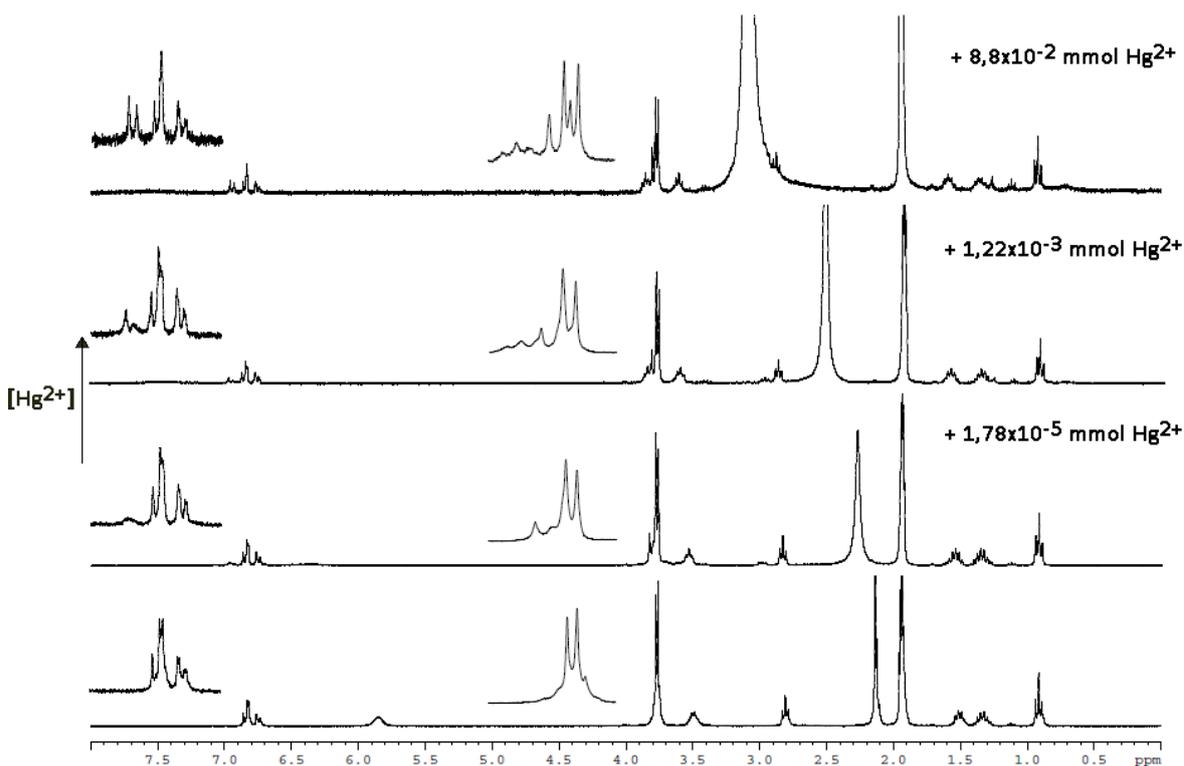


Fig. 2.66. Espectros de la valoración por ^1H -RMN de **C13** con Hg^{2+} en CD_3CN . El espectro inferior corresponde a **C13** antes de la adición de Hg^{2+} y el superior al último punto de la valoración. Los dos espectros restantes corresponden a puntos intermedios de la valoración. En cada espectro se muestra una ampliación de la zona aromática (entre 6,6-7 ppm) y de los singletes de los grupos metoxi (entre 3,7-3,9 ppm).

Por su parte, en la valoración con Pb^{2+} (Figura 2.67) se observó un desplazamiento a campo bajo de señales tanto aromáticas como alifáticas pero no aparecieron en el

espectro nuevas señales como sucedía con el Hg^{2+} . El movimiento más significativo fue el de los protones de los grupos NH, que se desplazaron aproximadamente 1,2 ppm (de 5,8 a 7,1 ppm).

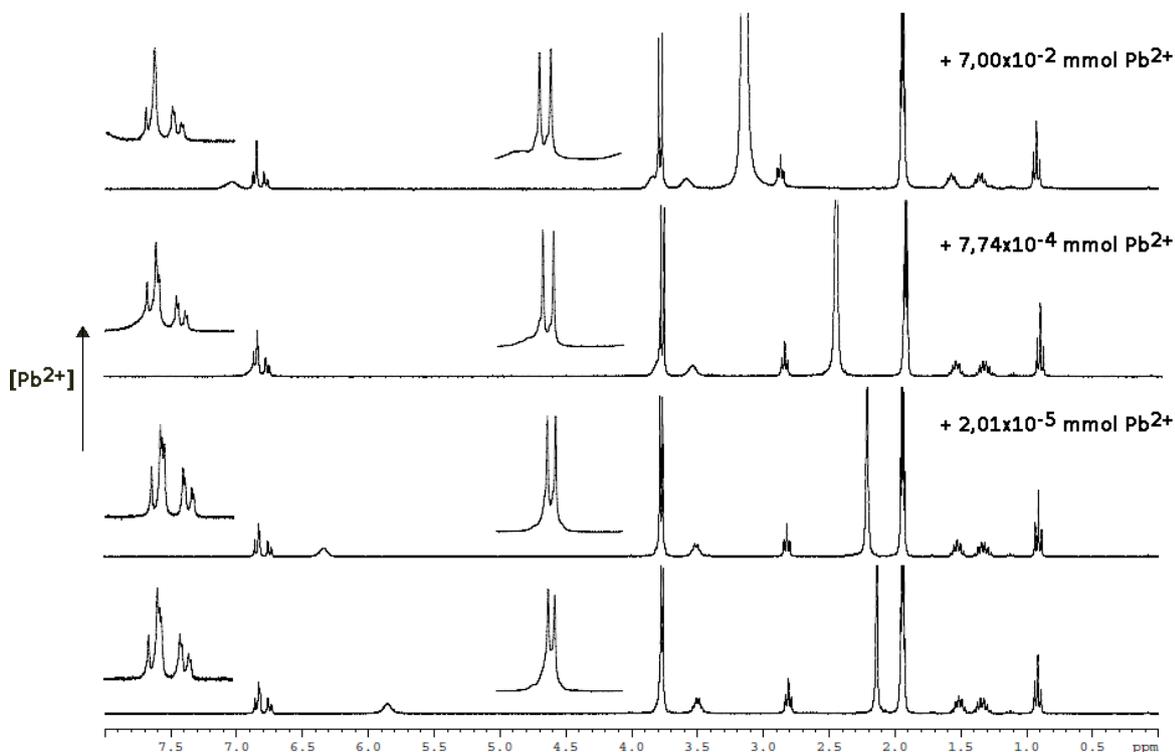


Fig. 2.67. Espectros de la valoración por ^1H -RMN de **C13** con Pb^{2+} en CD_3CN . El espectro inferior corresponde a **C13** antes de la adición de Pb^{2+} y el superior al último punto de la valoración. Los dos espectros restantes corresponden a puntos intermedios de la valoración. En cada espectro se muestra una ampliación de la zona aromática (entre 6,6-7 ppm) y de los singletes de los grupos metoxi (entre 3,7-3,9 ppm).

Estos resultados apuntaban a que existían grandes diferencias en la coordinación de cada uno de estos cationes con **C13**. Los desplazamientos de las diferentes señales en esta última valoración implicaban una interacción entre dicho catión y la diescuaramida. Sin embargo, la aparición de nuevas señales en la valoración con Hg^{2+} sugería una reacción entre el ion Hg^{2+} y el anillo aromático activado, que pudo interpretarse como la formación de un enlace entre uno de los carbonos aromático y Hg. El aspecto de la ^1H -RMN en la zona aromática coincidía con un derivado del benceno 1,2,4,5-tetrasustituido.

A partir de los datos obtenidos en la valoración con Pb^{2+} se llevó a cabo el ajuste de los protones NH, aromáticos y alifáticos utilizando el programa HypNMR10 (Protonic Software, versión 2008).¹⁸⁹ El mejor ajuste se consiguió de acuerdo a un modelo 1:2 donde β está definida por las ecuaciones 2.5 y 2.6, siendo R = receptor (**C13**) y A = analito (Pb^{2+}). El ajuste de los datos se presenta en la Figura 2.68.

¹⁸⁹ P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Talanta* **1996**, *43*, 1739-1753.

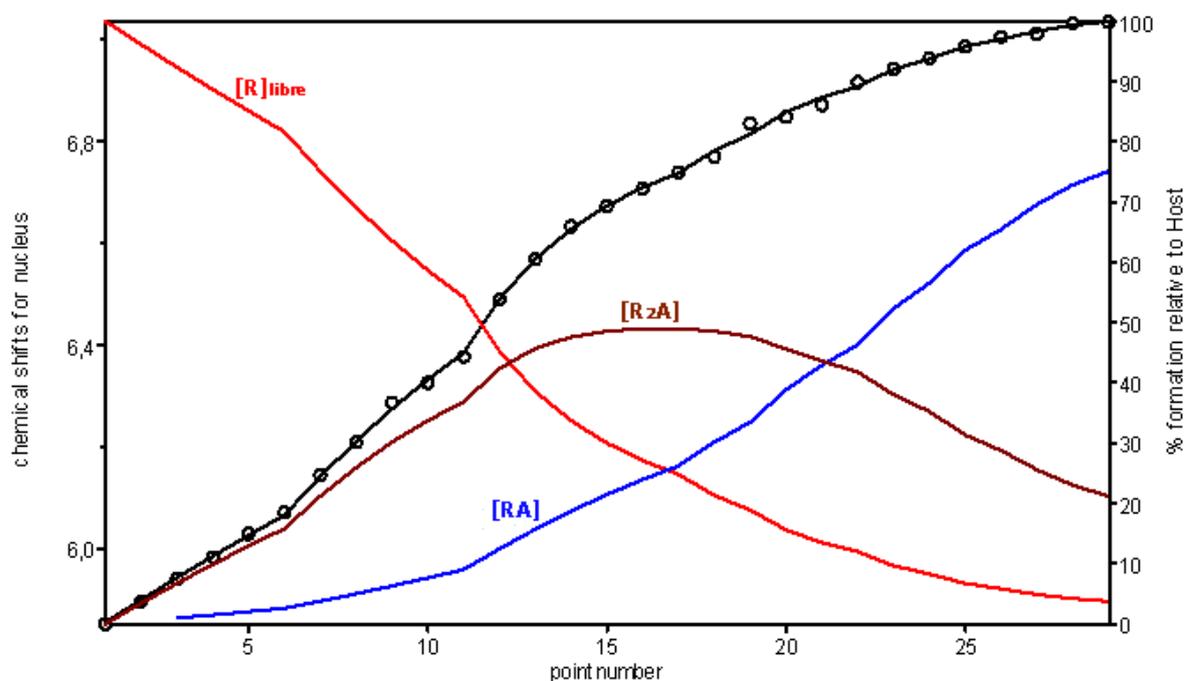
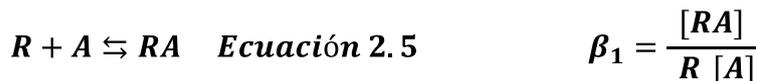


Fig. 2.68. Ajuste de los datos de la valoración por ^1H -RMN de **C13** con Pb^{2+} . Los puntos representan los desplazamientos químicos experimentales de protones NH. Las líneas corresponden a los mejores ajustes de las curvas calculadas por regresión no-lineal.

Las constantes de asociación obtenidas para la valoración de Pb^{2+} fueron: $\log \beta_1 = 2,62 \pm 0,06$ ($\beta_1 = 4,2 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$) y $\log \beta_2 = 5,49 \pm 0,06$ ($\beta_2 = 3,1 \times 10^5 \text{ M}^{-2}$). El ajuste propone la formación de un complejo 1:2, lo cual estaba en concordancia con los resultados obtenidos por HRMS-ESI(+) y MALDI donde se observaba la formación de los complejos 1:1 y 1:2. No se pudo calcular la constante de asociación para Hg^{2+} debido a que a medida que se añadían alícuotas de la disolución de este catión aparecía un precipitado.

A partir de la evaporación lenta del disolvente CHCl_3 , con un pequeño porcentaje de DMSO de una disolución de $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ y **C13**, en una relación molar 1:1 se obtuvo un cristal óptimo para su estudio por rayos X (RX) (Figura 2.69).¹⁹⁰

¹⁹⁰ Agradecemos la colaboración del Dr. Pablo Ballester del ICIQ en la resolución del cristal por RX.

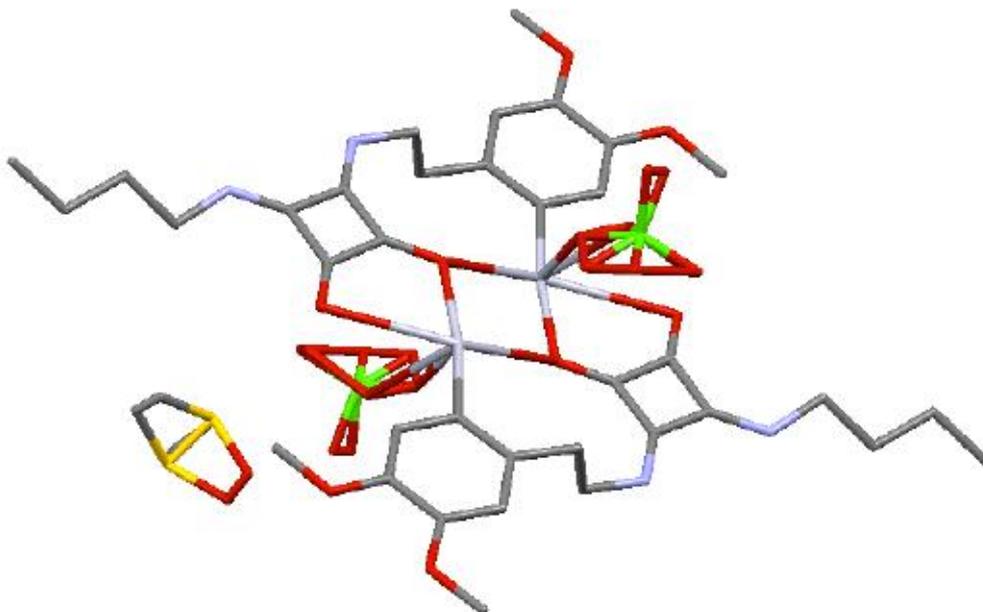


Fig. 2.69. Modelo representativo de la estructura de la unidad compleja $[(\text{Hg}\cdot\text{C13}\cdot\text{ClO}_4)_2\cdot\text{DMSO}]$ determinada por RX.¹⁹¹

La estructura del cristal¹⁹² mostró la formación de un complejo 2:2 donde cada átomo de Hg estaba coordinado a los dos grupos carbonilo de una diescuaramida (distancias de enlace 2,117 y 2,942 Å) y a un grupo carbonilo de una segunda diescuaramida (distancia de enlace 2,977 Å). Más relevante fue la formación de un enlace entre cada átomo de Hg y uno de los carbonos aromáticos de la segunda diescuaramida (distancia de enlace 2,036 Å). La esfera de coordinación del Hg se completaba con un átomo de O de una molécula vecina de perclorato (distancia de enlace promedio 2,87 Å).

La estructura de cristal también contenía moléculas de DMSO provenientes del disolvente. Estas moléculas, al igual que las de perclorato se encontraban desordenadas, es decir, no ocupando siempre una posición específica, lo cual explica que en la resolución de la unidad compleja los diferentes átomos aparezcan repetidos (Figura 2.69).

Con respecto a las interacciones intermoleculares (Figura 2.70), la estructura presentaba enlaces de hidrógeno entre los grupos NH escuaramídicos y las moléculas de DMSO (distancia promedio 2,80 Å). Además se observaron otras interacciones entre las que cabe destacar la interacción anión- π entre un átomo de oxígeno del perclorato y el centroide del anillo escuaramídico a una distancia promedio de 3,01 Å.

¹⁹¹ Para la visualización de la estructura se ha utilizado el programa Mercury de Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC).

¹⁹² Coordenadas del cristal depositadas en CCDC: 949852.

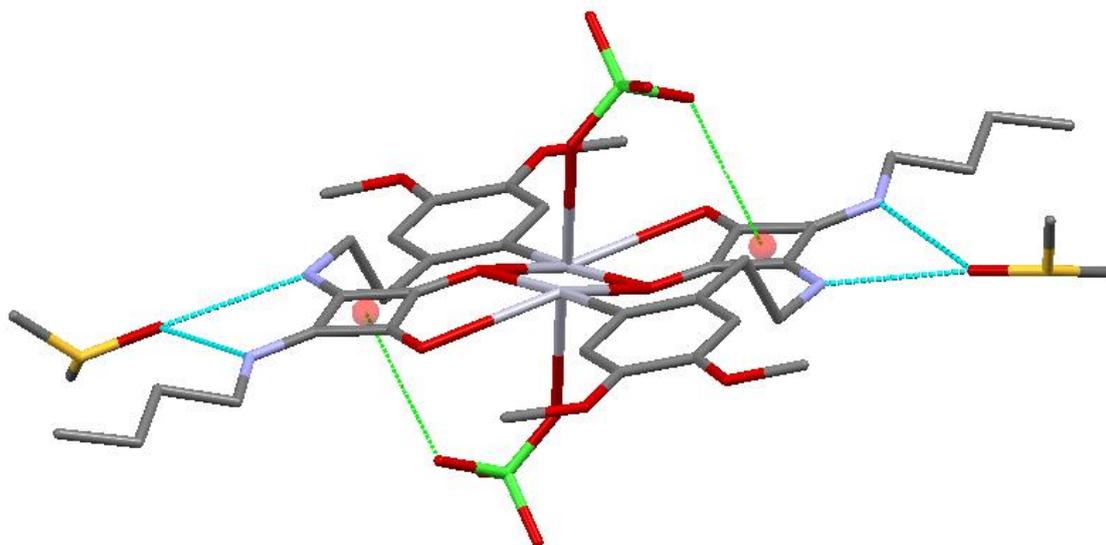


Fig. 2.70. Interacciones intermoleculares observadas en la estructura de la unidad compleja.

Respecto al empaquetamiento del cristal (Figura 2.71), las unidades 2:2 formaban capas y a su vez se organizaban en filas donde las moléculas de DMSO y perclorato se encontraban alineadas en el centro de estas estructuras, separándolas. Este hecho se observa con más claridad en la Figura 2.72.

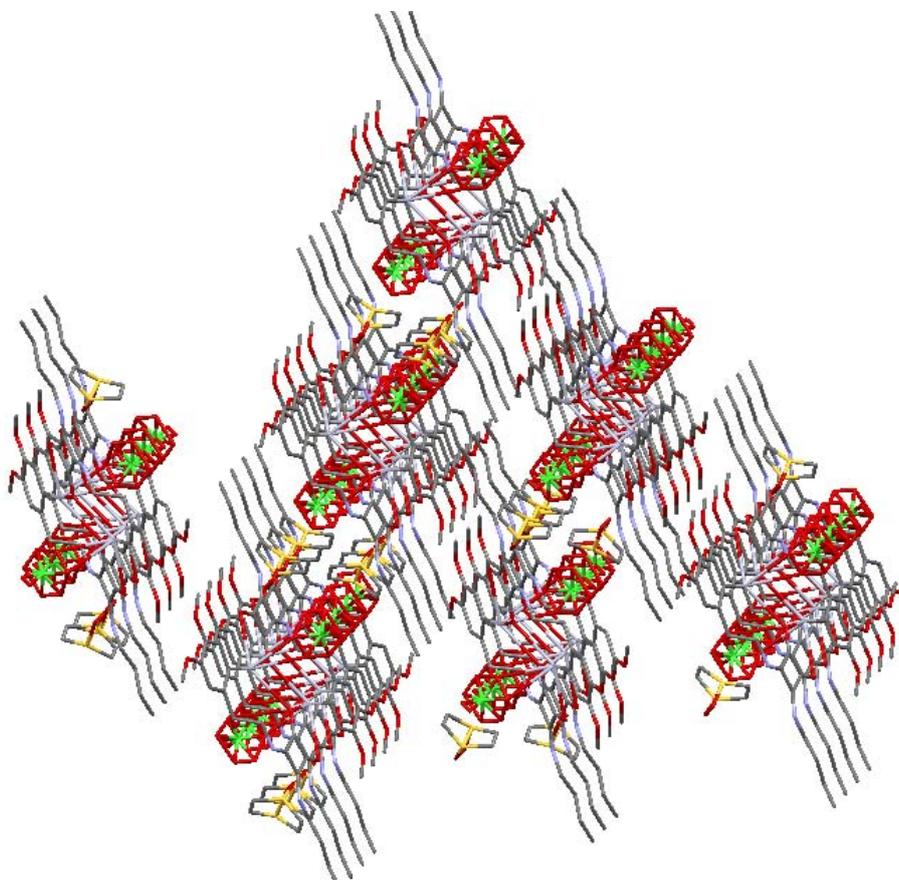


Fig. 2.71. Modelo representativo del empaquetamiento de la estructura de la unidad compleja donde se observa la formación de capas.

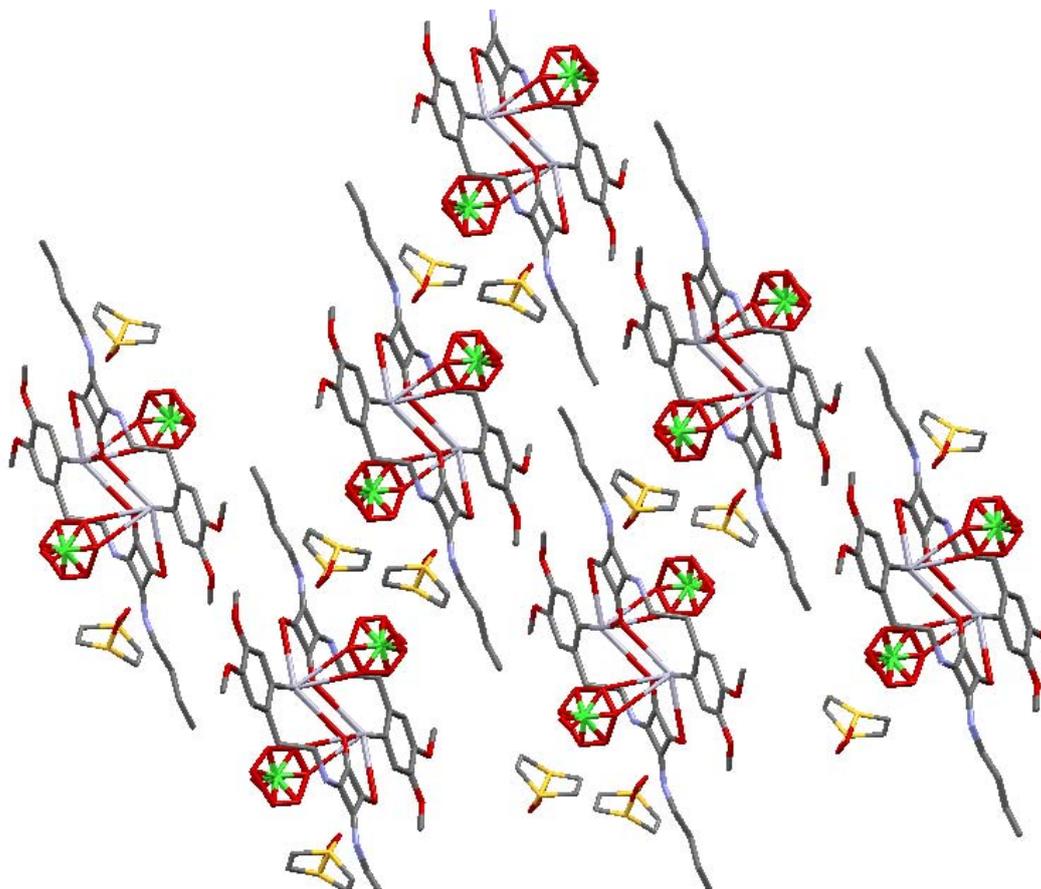


Fig. 2.72. Empaquetamiento de la estructura de la unidad compleja donde se observa con más detalle la alineación de las moléculas de perclorato y DMSO entre las diferentes filas.

La información extraída de la estructura cristalina demostró dos hechos importantes: la coordinación del Hg^{2+} con los carbonilos de las unidades escuarato y la formación de un enlace entre el Hg^{2+} y un carbono del anillo aromático. La coordinación a través de los carbonilos de las unidades escuarato dio lugar a los complejos 1:1, 1:2 y 2:2 detectados en disolución por HRMS-ESI(+) y en fase gas por MALDI/TOF. A su vez, esto provocó un desplazamiento en las señales tanto aromáticas como alifáticas de **C13** observado por ^1H -RMN. La formación del enlace C-Hg explicaba la aparición de las nuevas señales en el espectro, más evidentes en la parte aromática, debido a que esta reacción cambiaba completamente el acoplamiento de los H aromáticos.

En los estudios realizados con Pb^{2+} no se detectó la aparición de nuevas señales en los espectros de ^1H -RMN, ni se observó la aparición de ningún precipitado durante la valoración para determinar la constante. De estos hechos se pudo deducir que con este catión se produjo la coordinación con la diescuaramida pero no la formación de un enlace Pb-C aromático.

Se ha descrito que la distancia de 3,3 Å entre los carbonilos, fijada por el anillo escuárico, es ideal para acomodar un ion Hg^{2+} cuyo diámetro es de 2,2 Å.⁷³ Debido al similar diámetro iónico del Pb^{2+} (2,4 Å) se puede proponer un mismo comportamiento para este. Por esta razón sería lógico pensar que la coordinación del Pb^{2+} con la diescuaramida se produce a través de los oxígenos de los grupos carbonilo. El resto de

cationes estudiados al tener un diámetro iónico muy inferior no pueden manifestar este tipo de interacción.

La mercuriación directa del anillo 1,2-dimetoxibenceno, aunque inesperada en nuestra investigación, es la ruta más importante para la obtención de compuestos arilmercuriales. Se trata de una reacción de sustitución electrofílica aromática típica facilitada por una sal de mercurio altamente iónica y la activación del anillo aromático debido a los grupos donadores de electrones. De hecho, los derivados arilmercuriales y en general los compuestos aromáticos polimercuriados con diversos grupos funcionales orgánicos se preparan de esta manera. (Figura 2.73). La mayor desventaja que presenta esta reacción es que a menudo da como resultado mezclas de isómeros *orto*, *meta* y *para*.

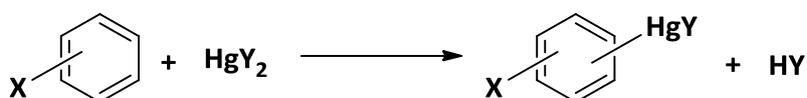


Fig. 2.73. Esquema general de síntesis de arilmercuriales.

La importancia de los restos escuaramídicos sobre la superficie de las nanopartículas, para retirar cationes de metales pesados de disoluciones acuosas, ha quedado demostrada en los diferentes ensayos descritos hasta el momento. A través de RMN, MALDI y HRMS-ESI(+) se ha comprobado la capacidad de coordinación con metales de este tipo de compuestos, y específicamente de los derivados escuaramídicos **C12** y **C13**. Sin embargo, la relativa facilidad con que se produce la mercuriación directa nos llevó a querer estudiar un poco más la importancia de la presencia del anillo escuárico en la complejación con el Hg(II).

Inicialmente, se comprobó que esta reacción también podía tener lugar en un anillo aromático sin la presencia de la escuaramida. Para ello se utilizó el compuesto comercial 3,4-dimetoxitolueno, cuya sustitución y grupos activadores eran iguales que en **C12**. A una disolución de 3,4-dimetoxitolueno en CD_3CN se le adicionó un exceso de $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ y se comparó el espectro de ^1H -RMN inicial y final.

El espectro de 3,4-dimetoxitolueno en CD_3CN (Figura 2.74 inferior) era bastante simple. En la zona entre 6,6-6,9 ppm aparecían las señales correspondientes a los 3 protones aromáticos (H_a , H_b y H_c) que se pudieron asignar fácilmente por el acoplamiento específico entre ellos. Los grupos metoxi (3,6-3,8 ppm) se observaron como dos singletes muy próximos entre sí y finalmente el metilo se apareció a 2,26 ppm como un singlete. Al analizar el espectro después de haber adicionado la sal de Hg^{2+} (Figura 2.74 superior) se observaron cambios evidentes similares a los descritos en la valoración de **C13** con este catión. Por una parte, en la zona aromática aparecieron nuevamente dos señales entre 6,85-6,95 ppm. Además, se observaron 4 señales en forma de singletes correspondientes a los grupos metoxi. Asimismo, apareció una nueva señal, en forma de singlete en la zona donde inicialmente estaba el grupo metilo. Todos estos cambios fueron un indicativo de que la reacción de mercuriación se producía. Tal como se esperaba, esta reacción no

estaba relacionada con la presencia o no del grupo escuaramídico, dependiendo solamente de la activación del anillo aromático.

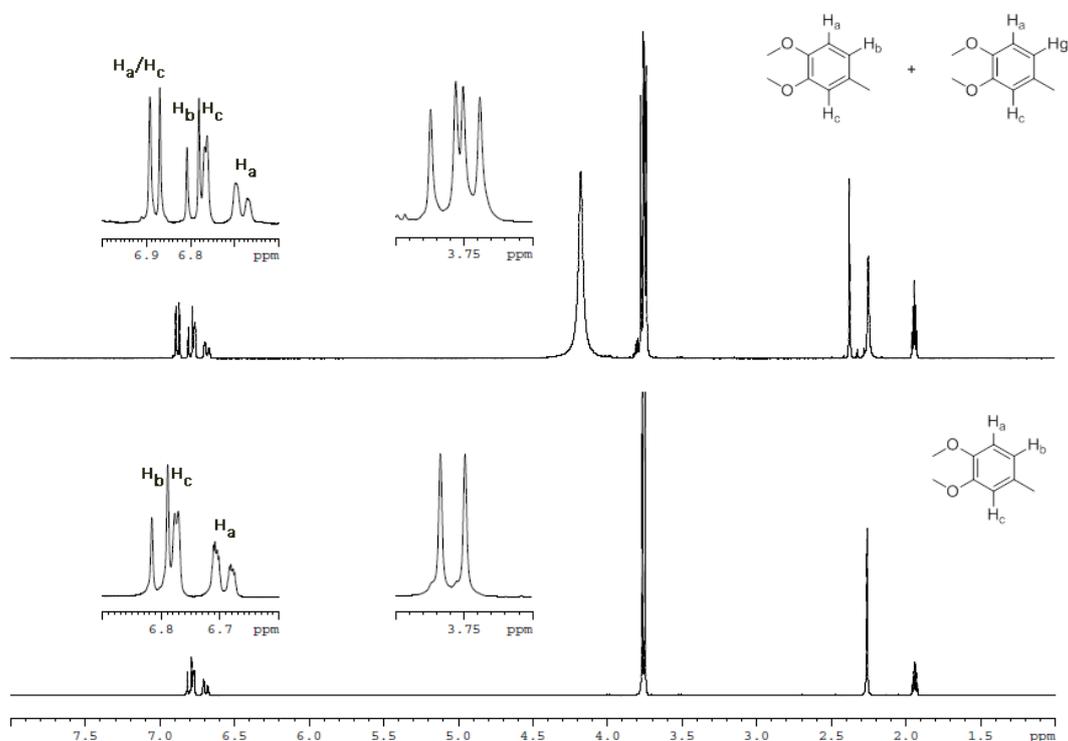


Fig. 2.74. Espectros del compuesto 3,4-dimetoxitolueno antes (inferior) y después (superior) de la adición de un exceso molar de Hg(ClO₄)₂.

Además de las nuevas señales, en el espectro seguían apareciendo las señales correspondientes al producto de partida. Esto indicaba que dicho producto también estaba presente y que el espectro final tras la adición de Hg²⁺ correspondía a una mezcla del mismo y del derivado arilmercurial. Analizando un poco más el espectro, se pudo deducir que la mercuriación se producía en una sola posición. En caso contrario se visualizarían más señales de grupos metoxi diferentes y de metilos. A partir de las señales aromáticas se dedujo que el H aromático que se sustituía era H_b puesto que en otra posición el acoplamiento aromático sería diferente. En este caso, sólo aparecían dos singletes, lo cual probaba la presencia de 2H en *para* entre sí. La estructura de RX del complejo entre Hg(ClO₄)₂ y **C13** confirmó que la mercuriación se producía en esta misma posición, sugiriendo que ésta era la más activada. Cabe destacar que este ensayo no proporcionaba información sobre la presencia de un derivado arilmercurial en forma de monómero o de dímero dado que en caso de que se formara un dímero simétrico se obtendrían exactamente las mismas señales.

A fin de estudiar un poco más la regioselectividad de la reacción de mercuriación con **C13** se calculó el potencial electrostático en los núcleos (EPN) debido a que estudios

previos¹⁹³ han demostrado que dichos valores pueden reflejar cuantitativamente efectos regioespecíficos de los sustituyentes en los anillos aromáticos. Los resultados mostraron que el valor de EPN más elevado se encontraba en el átomo de carbono número 5 indicando que ésta era la posición más favorecida para la mercuriación (Figura 2.75).¹⁹⁴

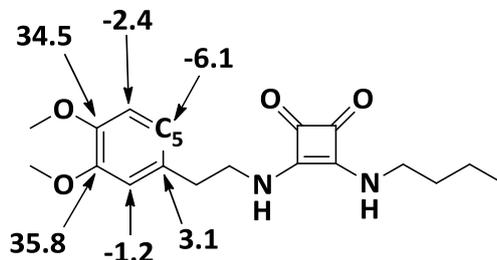


Fig. 2.75. Potenciales electrostáticos (en kcal mol⁻¹) de diferentes núcleos en **C13**.

La importancia de la unidad escuaramídica en la coordinación de Hg²⁺ quedó demostrada al establecer cualitativamente las diferentes velocidades de reacción utilizando **C13** y 3,4-dimetoxitolueno en las mismas condiciones experimentales. Para ello se prepararon disoluciones 1 x 10⁻³ M de **C13** y 3,4-dimetoxitolueno respectivamente en CD₃CN. A cada una de ellas se le adicionaron los equivalentes de Hg(ClO₄)₂ necesarios para establecer una relación molar 1:1 y se registraron los espectros de ¹H-RMN a t = 0, t = 2 h y t = 4 h. Las señales aromáticas y de los grupos metoxi se integraron tomando como referencia un patrón interno de CH₂Cl₂. En las Figuras 2.76 y 2.77 se muestran los espectros correspondientes.

¹⁹³ B. Gabalov, V. Nikolova, S. Ilieva, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 5149-5155.

¹⁹⁴ Agradecemos al Dr. David Quiñonero los cálculos teóricos realizados para confirmar la regioselectividad de la reacción de mercuriación.

2. Nanopartículas de óxidos de hierro funcionalizadas con escuaramidas como receptores en Química Supramolecular

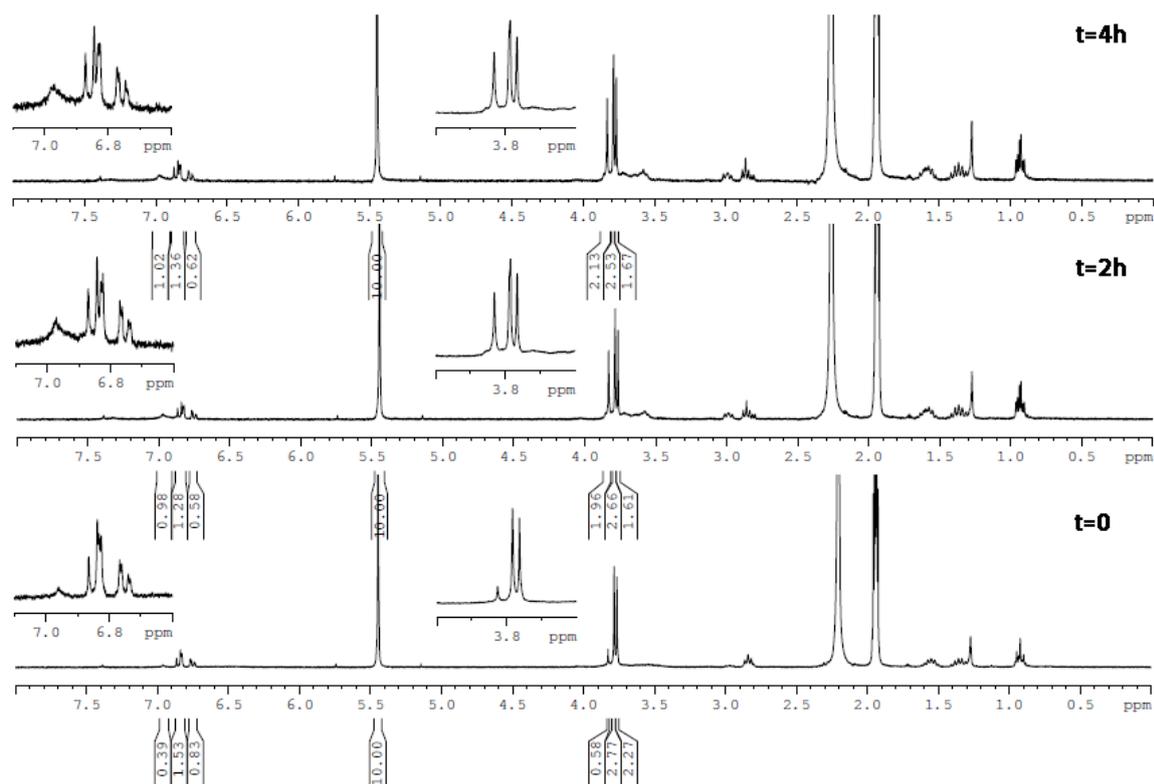


Fig. 2.76. Espectros de ^1H -RMN de una disolución 1:1 molar de **C13** y $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ en CD_3CN a $t = 0$, $t = 2 \text{ h}$ y $t = 4 \text{ h}$. Se ha utilizado como patrón interno CH_2Cl_2 ($1 \mu\text{L}$).

A $t = 0$, es decir, inmediatamente después de preparar cada disolución se obtuvo el primer espectro (Figura 2.76). En el caso de **C13** ya comenzaba a ser evidente la formación del derivado arilmercurial puesto que se intuían dos nuevas señales, una en la zona aromática y otra en la zona de los grupos metoxi. A las 2 h, se observó el avance de dicha reacción dado que el área de las nuevas señales aumentó considerablemente. A las 4 h se registró el último espectro y se observó el mismo comportamiento descrito anteriormente, aunque cabe mencionar que el incremento de las integrales de las nuevas señales no fue tan acusado. A tiempos superiores (24 h) no se observó ningún cambio significativo lo cual indicaba que la reacción había llegado a su fin.

2. Nanopartículas de óxidos de hierro funcionalizadas con escuaramidas como receptores en Química Supramolecular

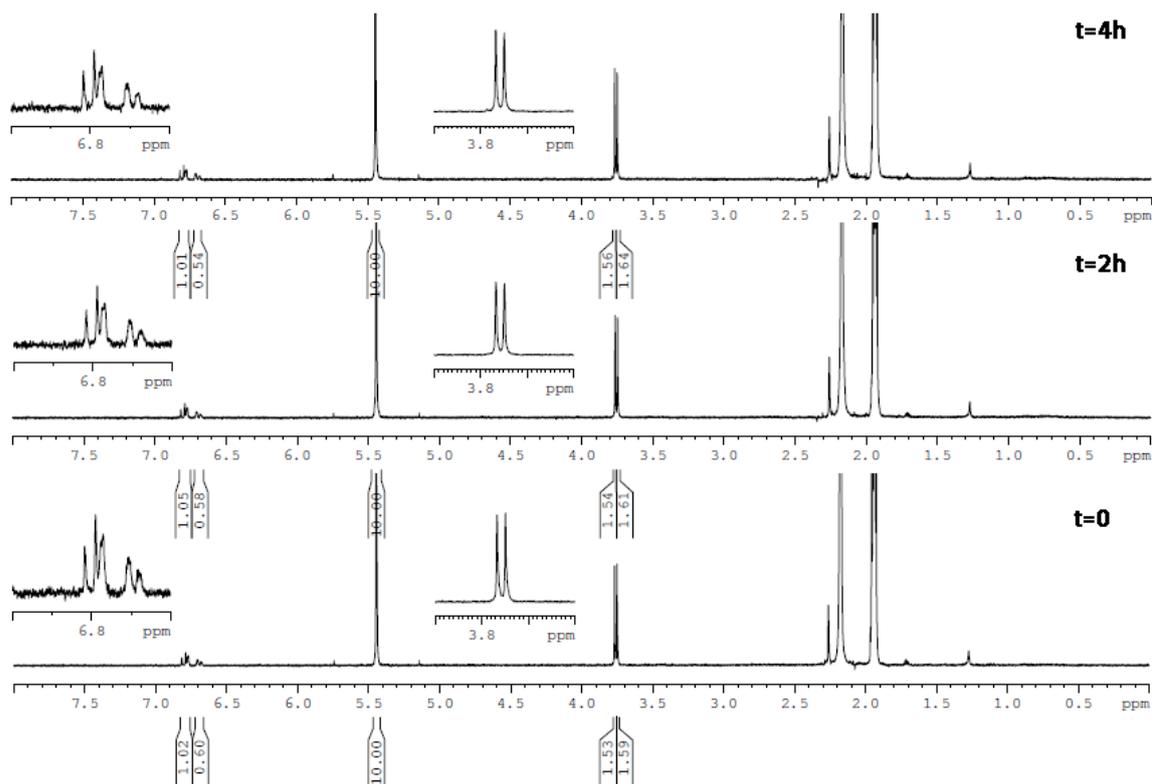


Fig. 2.77. Espectros de $^1\text{H-RMN}$ de una disolución 1:1 molar de 3,4-dimetoxitolueno y $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ en CD_3CN a $t = 0$, $t = 2\text{ h}$ y $t = 4\text{ h}$. Se ha utilizado como patrón interno CH_2Cl_2 (1 μL).

Para 3,4-dimetoxitolueno, en cambio, no se observó en este mismo tiempo ningún cambio significativo en los espectros (Figura 2.77). Estos resultados demostraron la importancia del grupo escuaramídico. La coordinación inicial del Hg^{2+} con los grupos carbonilo del resto escuárico probablemente posiciona a dicho ion cerca del anillo aromático favoreciendo así la reacción. Por otra parte, el hecho de que transcurridas 4 h no se observara el avance de la reacción con 3,4-dimetoxitolueno está directamente relacionado con las concentraciones de los reactivos, dado que al utilizar concentraciones superiores se observó la formación del arilmercúrico con mayor rapidez.

2.7 CONCLUSIONES

A modo de resumen del trabajo presentado en este capítulo, se pueden extraer las siguientes conclusiones.

1. Se han sintetizado y caracterizado nuevas di y bis-diescuaramidas asimétricas con grupos catecol o etoxisilano por condensación modular en condiciones suaves de reacción, obteniéndose con rendimientos entre moderados y altos en cada etapa de síntesis. Como ventaja añadida de estas síntesis se puede mencionar que no ha sido necesaria la purificación a través de cromatografía por columna o por capa fina del producto final. Los reiterados lavados con disolventes orgánicos han sido suficientes para la preparación de escuaramidas con un aceptable grado de pureza, como se deduce de la masa exacta obtenida y las diferentes técnicas espectroscópicas utilizadas para su caracterización.
2. Se han sintetizado y caracterizado nanopartículas de óxidos de hierro funcionalizadas con las di y bis-diescuaramidas previamente preparadas en condiciones suaves de reacción. La funcionalización de las mismas se comprobó, principalmente, a través de sus espectros de IR donde las bandas típicas de las escuaramidas fueron fácilmente identificadas. La solubilidad de las nanopartículas híbridas en disoluciones acuosas no fue favorable dada la baja o nula solubilidad de la mayoría de las di y bis-diescuaramidas utilizadas en este tipo de disoluciones. Por este motivo, se seleccionaron las nanopartículas híbridas **NP-C2** y **NP-C4** para los posteriores ensayos realizados dado que presentaban una mayor solubilidad en agua.
3. Se ha evaluado la capacidad de reconocimiento de carboxilatos en disoluciones acuosas con las nanopartículas funcionalizadas **NP-C4**, debido especialmente a la presencia de la carga positiva del grupo amonio terminal. A través de los ensayos competitivos estudiados por fluorescencia se demostró que este nanomaterial híbrido era apropiado para detección de carboxilatos incluso en medios muy competitivos como es el caso de las disoluciones acuosas.
4. Además, a través de estos ensayos por fluorescencia se ha comprobado la selectividad en el proceso de reconocimiento de carboxilatos. Tanto mono como dicarboxilatos se coordinaron exitosamente a **NP-C4**, mientras que el reconocimiento de tricarboxilatos por este nanomaterial fue nulo. Esta selectividad se relaciona con el número de unidades **C4** implicadas en la coordinación de cada carboxilato y su disposición aleatoria sobre la superficie de la nanopartícula. Así, dado que para la coordinación de mono y dicarboxilatos se requiere la convergencia de una y/o dos moléculas de **C4** dispuestas con una conformación adecuada, hecho estadísticamente más probable, se hace más factible y efectiva la coordinación de este tipo de carboxilatos. En cambio, para la

coordinación de tricarboxilatos se requiere la convergencia de al menos tres restos escuaramídicos situados convenientemente a nivel molecular, y dado que este hecho es menos viable, el reconocimiento de estos carboxilatos resulta más difícil.

5. A través de ^1H -RMN se ha cuantificado la retención de cada uno de los carboxilatos ensayados. Los resultados obtenidos en este análisis, en concordancia con los ensayos cualitativos previos, demostraron la superior coordinación de mono y dicarboxilatos con **NP-C4** respecto a tricarboxilatos. De esta forma, se confirmó la particular selectividad de estas nanopartículas no preorganizadas, comparable con receptores altamente preorganizados y que en Química Supramolecular sólo se consiguen a través de un esfuerzo sintético considerable. Por tanto, se sugiere que la conjunción de nanopartículas con unidades de reconocimiento sencillas, como las diescuaramidas utilizadas en este trabajo, pueden ser la base para el desarrollo de nuevos sensores basados en nanomateriales híbridos.
6. Por otra parte, se ha evaluado la capacidad de coordinación y eliminación de metales pesados en disoluciones acuosas por parte de diversas nanopartículas funcionalizadas con di y bis-diescuaramidas. Los resultados de los ensayos llevados a cabo inicialmente con Hg^{2+} , en disolución acuosa y a diferentes pH demostraron que las nanopartículas funcionalizadas con la diescuaramida **C12** presentaban en cada caso una retención más elevada. Este hecho se relacionó con el resto neutro (radical n-butilo) de dicha diescuaramida que no se ve afectado por el pH de la disolución. Los diversos ensayos posteriores realizados con **NP-C12** demostraron la elevada capacidad de retención de este nanomaterial con los iones metálicos Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Cr^{3+} , Pb^{2+} y Hg^{2+} .
7. También se ha estudiado la selectividad en el proceso de reconocimiento de los citados iones metálicos con **NP-C12**. A través de la comparación cuantitativa de la retención de cada uno de ellos al formar parte de una misma disolución, se determinó la preferente coordinación de Pb^{2+} y Hg^{2+} a las nanopartículas híbridas. Estos resultados fueron explicados teniendo en cuenta el mayor tamaño de ambos cationes en relación al resto, lo cual permite una coordinación con los restos escuaramídicos a través de los dos grupos carboxílicos del anillo escuárico.
8. Finalmente, a través de un modelo químico análogo a **NP-C12**, basado únicamente en un resto escuaramídico, se ha estudiado con más detalle la coordinación con los diferentes cationes metálicos. La formación de todos los complejos se comprobó a través de MALDI y los complejos con Pb^{2+} y Hg^{2+} también fueron detectados y estudiados en disolución por EM, ^1H -RMN, ^{199}Hg -RMN y ^{207}Pb -RMN. A partir de las valoraciones realizadas por ^1H -RMN se demostró la fortaleza del complejo de Pb^{2+} con la diescuaramida y la formación de un nuevo compuesto arilmercurio. La existencia del derivado arilmercurio se comprobó gracias al estudio por RX de un cristal obtenido. Cálculos teóricos

2. Nanopartículas de óxidos de hierro funcionalizadas con escuaramidas como receptores en Química Supramolecular

confirmaron la regioselectividad de la reacción del ataque electrófilo al anillo de dopamina. Además, se comprobó que la presencia del anillo escuárico facilita la formación del enlace C-Hg, aumentando la velocidad de reacción.

2.8 PARTE EXPERIMENTAL

2.8.1 MÉTODOS GENERALES

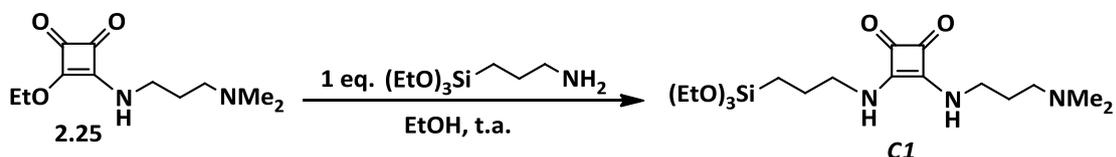
Los disolventes utilizados fueron adquiridos de las casas comerciales Scharlau y Panreac. Los reactivos comerciales como: escuarato de dietilo, clorhidrato de dopamina, 3-aminopropiltriétoxosilano (APTES), éter dibencílico, oleilamina, ácido oleico, 1,2-hexadecanediol, bromuro potásico y fluoresceína fueron suministrados por Sigma-Aldrich. El acetil acetato de hierro y las sales sódicas: carbonato, ditionito, hidróxido, benzoato, tartrato citrato, fluoruro, cloruro, bromuro, nitrato, fosfato, sulfato, acetato, glutamato y 1,3,5-ciclohexanotricarboxilato fueron suministrados por Fluka. El agua utilizada para preparar las diferentes disoluciones se purificó por electroósmosis con un equipo ELIX10 (Millipore) y, posteriormente, por tratamiento a través de un equipo MilliQ (Millipore) hasta alcanzar una resistividad máxima de 18,2MΩ. Los disolventes deuterados utilizados para los experimentos de resonancia, se compraron con calidad espectroscópica RMN con una riqueza del 99,98% y se usaron sin purificar posteriormente.

Los espectros de RMN 1D (^1H , ^{13}C) se registraron en un instrumento *Bruker AVANCE-300*. Los desplazamientos químicos están expresados en ppm y referenciados a la señal residual del disolvente utilizado. Los espectros de RMN 1D (^{199}Hg , ^{207}Pb) fueron registrados en un espectrómetro *Bruker AVANCE-600*, usando $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ y $\text{Pb}(\text{ClO}_4)_2$ como patrón interno respectivamente. Los espectros de FT-IR se registraron con un espectrofotómetro *Bruker Tensor 27* mediante pastillas de KBr. Los espectros de masas, se registraron con un espectrómetro de masas de alta resolución (HRMS) *MICROMASS Autospec3000*, provisto de una entrada de muestra mediante electrospray (ESI). Los espectros de MALDI fueron realizados en un *Autoflex III MALDI-TOF/TOF* (Bruker Daltonics). Los ensayos por fluorescencia se llevaron a cabo con un espectrofotómetro *VARIAN Cary*, en cubetas de cuarzo de 10 mm de paso óptico. Las imágenes del TEM (Transmission Electron Microscopy) fueron realizadas en un *Philips JEOL JEM-2100F* o *HITACHI H-600 ABS*. Los espectros de RX (Rayos X) se llevaron a cabo en difractómetro *Siemens 6000*. Las fotos de AFM (Atomic Force Microscopy) fueron realizadas en *VEECO* con un controlador *NANOSCOPE IV*. Las medidas de DLS (Dynamic Light Scattering) fueron determinadas directamente en un *Malvern Zetasizer Nano ZS* (Malvern Instruments). Los ensayos de ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry) se realizaron en un instrumento *PERKIN ELMER Optima 5300 DV*. Los ensayos de cromatografía iónica se realizaron en un equipo *DIONEX DX120*. Los ensayos por ITC (Isothermal Titration Calorimetry) se llevaron a cabo en un *MCS ITC (Microcal Inc.)*. Para la cuantificación de Hg^{2+} de disoluciones acuosas se utilizó un sistema MSFIA (Multi Syringe Flow Injection Analysis) a través de la técnica de vapor frío para la generación de hidruros detectados mediante fluorescencia atómica. Los puntos de fusión no están corregidos.

2.8.2 SÍNTESIS DE ESCUARAMIDAS

2.8.2.1 SÍNTESIS DE LA DIESCUARAMIDA C1

N,N-dimetil-*N'*-(2-(3-trietoxisilil)aminopropil-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)propilamina

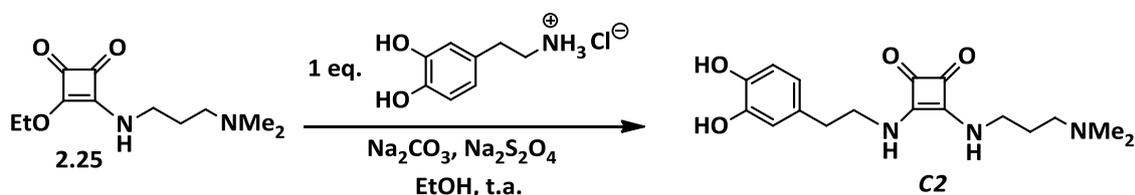


En un matraz de fondo redondo de 100 mL se disuelven 500 mg (2,2 mmol) de la semiescuaramida **2.25** en 25 mL de EtOH anhidro. Con ayuda de una jeringuilla y en atmósfera de Ar, se añaden 0,65 mL (2,63 mmol) de la sililamina (APTES). Una vez acabada la adición, la mezcla se deja en agitación y en atmósfera inerte durante 12 h. Transcurrido este tiempo, se elimina a sequedad el disolvente obteniéndose un aceite marrón. Este aceite se deja en el balón destapado y al cabo de 24 h aproximadamente se solidifica poco a poco llegando a obtenerse un sólido gomoso. A continuación se adicionan 10 mL de Et₂O anhidro y se lava el crudo, rascando con una espátula hasta que se obtiene un sólido amarillo. El sólido se lava tres veces con Et₂O con unas gotas (entre 5 a 10) de EtOH frío (3 x 10 mL). Decantado el disolvente, se deja secando al aire. Como resultado de estas operaciones se obtienen 488 mg del producto esperado. Rendimiento: 56%.¹⁹⁵

Punto de fusión: 198 °C. ¹H-RMN (D₂O) 3,63 (m, 2H); 2,74 (m, 2H); 2,4 (m, 2H); 2,27 (s, 3H); 2,24 (s, 3H); 1,84 (m, 2H); 1,70 (m, 2H); 1,21 (t, 2H) ppm. ¹³C-RMN (DMSO-d₆) δ: 189,50; 182,57; 181,53; 168,04; 165,45; 65,61; 60,68; 59,39; 56,53; 45,38; 29,05; 24,64; 15,56; 8,30 ppm. **FT-IR** (KBr): 3439, 2938, 1799, 1659, 1597, 1545, 1439, 1360, 1118, 775, 697 cm⁻¹. **EM** (HRMS-ESI(+)) m/z (%) calculada para C₁₈H₃₅N₃O₅Si [M+Na]⁺: 424,2244, encontrada: 424,2260.

2.8.2.2 SÍNTESIS DE LA DIESCUARAMIDA C2

3-(3,4-dihydroxifeniletilamino)-4-(3-(dimetilamino)propilamino)ciclobut-3-ene-1,2-diona.



En un matraz de fondo redondo de 100 mL, se introduce una mezcla de 100 mg de carbonato sódico (0,9 mmol) y 37 mg de ditionito sódico (0,21 mmol) en 10 mL de EtOH.

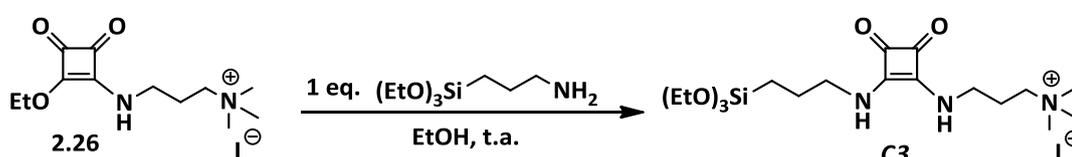
¹⁹⁵ La pureza de las escuaramidas obtenidas de esta forma es la adecuada y no se necesita ningún otro paso de purificación ulterior.

Sobre ésta, se añaden en agitación constante, 35 mg de clorhidrato de dopamina (0,18 mmol) disueltos en 7 mL de EtOH. Posteriormente, se adiciona gota a gota y manteniendo la agitación, una disolución de 50 mg de la semiescuaramida **2.25** (0,22 mmol) en 5 mL de EtOH. Se ajusta el pH de la disolución a 7 adicionando unas gotas de NaOH 1M. La mezcla se deja en agitación bajo atmósfera inerte durante 2 h. Pasado este tiempo, se filtra la disolución para eliminar el precipitado de carbonato sódico y ditionito sódico. Para obtener el producto sólido se evapora a sequedad el disolvente de reacción. El sólido amarillo se lava con de una mezcla 1:1 de Et₂O/hexano 3 x 5 mL. Finalmente, se lava con acetona (3 x 5 mL). El sólido blanco se traspasa a un matraz de fondo redondo de 25 mL y se evaporan a sequedad los restos de disolvente. Se obtienen 76 mg de la escuaramida deseada. Rendimiento: 40%.¹⁹⁵

Punto de fusión: 203 °C. **¹H-RMN** (DMSO-d₆) δ: 8,71 (br, NH); 7,30 (br, NH); 6,60 (m, 2H); 6,45 (m, 1H); 3,62 (t, 2H); 3,45 (t, 2H); 2,62 (t, 2H); 2,21 (t, 2H); 2,08 (s, 6H); 1,60 (q, 2H) ppm. **¹³CRMN** (DMSO-d₆) δ: 182,87; 168,14; 145,59; 144,17; 129,66; 119,82; 116,59; 115,97; 56,43; 45,54; 42,00; 36,94; 29,13 ppm. **FT-IR** (KBr): 3415; 3173; 2957; 1797; 1646; 1579; 1431; 1384; 1254; 1118; 955; 611; 414 cm⁻¹. **EM** (HRMS-ESI(+)) m/z (%) calculada para C₁₇H₂₄N₃O₄ [M+H]⁺: 334,1767, encontrada: 334,1771.

2.8.2.3 SÍNTESIS DE LA DIESCUARAMIDA C3

Yoduro de 3-{{3,4-dioxo-2-((3-(triethoxisilil)propil)amino)ciclobut-1-en-1-il}amino}-N,N,N-trimetilpropan-1-amonio

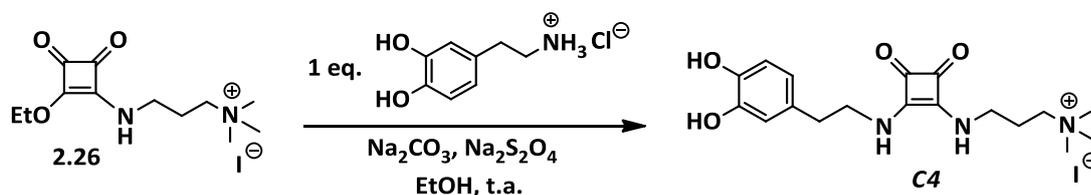


En un matraz de fondo redondo de 100 mL se disuelven 500 mg (1,36 mmol) de la semiescuaramida **2.26** en 75 mL de EtOH anhidro. Con ayuda de una jeringa y en atmósfera de argón, se añaden 375 µL (1,6 mmol) de sililamina (APTES). Una vez acabada la adición, la mezcla se deja en agitación y en atmósfera inerte durante 12 h. Transcurrido este tiempo, se obtiene un sólido blanquecino suspendido en la disolución. Se evapora a sequedad el disolvente y se lava, el crudo de reacción, con pentano y unas gotas (entre 5 a 10) de EtOH (3 x 10 mL). El sólido resultante se seca al vacío. Se obtienen 0,61 g del producto deseado. Rendimiento: 85%.¹⁹⁵

Punto de fusión: 258 °C. **¹H-RMN** (DMSO-d₆) δ: 7,52 (br, NH); 3,82 (q, 6H); 3,80 (m, 2H); 3,64 (m, 2H); 3,40 (t, 2H); 3,13 (s, 9H); 2,04 (m, 2H); 1,68 (m, 2H); 1,23 (t, 9H); 0,66 (t, 2H) ppm. **¹³C-RMN** (DMSO-d₆) δ: 183,01; 168,28; 63,38; 61,39; 52,83; 50,70; 46,30; 30,16; 28,99; 24,64 ppm. **FT-IR** (KBr): 3446; 3173; 2972; 1804; 1635; 1571; 1482; 1444; 1342; 1102; 1079; 956; 776 cm⁻¹. **EM** (HRMS-ESI(+)) m/z (%) calculada para C₁₉H₃₈N₃O₅Si [M-I]⁺: 416,2581, encontrada: 416,2577.

2.8.2.4 SÍNTESIS DE LA DIESCUARAMIDA C4

Yoduro de 3-[[3,4-dioxo-2-(3-(3,4-dihidroxifenetil)amino)ciclobut-1-en-1-il]amino}-N,N,N-trimetilpropan-1-amonio

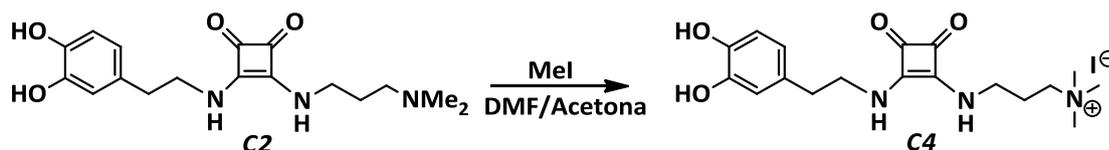


En un matraz de fondo redondo de 100 mL, se introduce una mezcla de 100 mg de carbonato sódico (0,9 mmol) y 37 mg de ditionito sódico (0,11 mmol) en 10 mL de EtOH. Sobre ésta mezcla, se añade, en agitación constante, 23 mg de clorhidrato de dopamina (0,11 mmol) disueltos en 5 mL de EtOH. Posteriormente, se adiciona gota a gota y manteniendo la agitación, una disolución de 50 mg de la semiescuaramida **2.26** (0,14 mmol) en 15 mL de EtOH. Se ajusta el pH de la disolución a 7 adicionando unas gotas de NaOH 1M. La mezcla se deja en agitación bajo atmósfera inerte durante 2 h. Pasado este tiempo, se filtra la disolución para eliminar el precipitado de carbonato sódico y ditionito sódico. Para obtener el producto sólido se evapora a sequedad el disolvente de reacción. El sólido amarillo se lava con una mezcla 1:1 de éter/hexano 3 x 5 mL. Finalmente, se lava con acetona 3 x 5 mL. El sólido blanco se traspasa a un matraz de fondo redondo de 25 mL y se evaporan a sequedad los restos de disolvente. Se obtienen 35 mg de la sal esperada. Rendimiento: 53%.¹⁹⁵

Punto de fusión: 250 °C. ¹H-RMN (DMSO-d₆) δ: 8,74 (d, 2H); 7,40 (br, 2 NH); 6,61 (m, 2H); 6,58 (m, 1H); 3,63 (t, 2H); 3,51 (t, 2H); 3,02 (s, 9H); 2,63 (t, 2H); 1,92 (q, 2H) ppm. ¹³C-RMN (DMSO-d₆) δ: 182,85; 168,42; 145,57; 144,18; 129,61; 119,87; 116,65; 115,99; 63,38; 52,78; 45,39; 36,84; 25,03 ppm. **FT-IR** (KBr): 3412; 3199; 2954; 1798; 1649; 1572; 1518; 1461; 1432; 1381; 1291; 1187; 1114; 952; 811; 706; 599; 481 cm⁻¹. **EM** (HRMS-ESI(+)) m/z (%) calculada para C₁₈H₂₆N₃O₄ [M-I]⁺: 348,1923, encontrada: 348,1916.

2.8.2.5 SÍNTESIS DE LA DIESCUARAMIDA C4 A PARTIR DE C2

Yoduro de 3-[[3,4-dioxo-2-(3-(3,4-dihidroxifenetil)amino)ciclobut-1-en-1-il]amino}-N,N,N-trimetilpropan-1-amonio



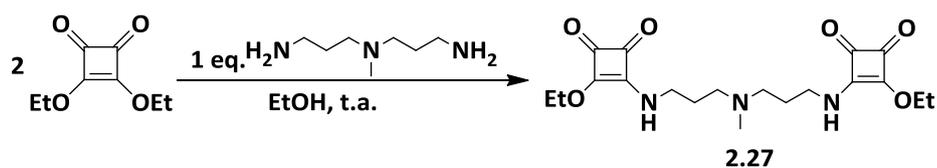
En un matraz de fondo redondo de 50 mL se introducen 50 mg de la escuaramida **C2** (0,15 mmol) y se disuelven en la menor cantidad posible de DMF, aproximadamente unos 2-3 mL. Posteriormente, se adicionan 15 mL de acetona. Con la ayuda de una jeringuilla

se introducen 10 μl de MeI (0,16 mmol) gota a gota. La mezcla de reacción se deja a reflujo y en atmósfera inerte durante 12 h. Pasado este tiempo, se enfría la disolución a temperatura ambiente y se adicionan unos 10 mL de acetona fría, 10 mL de pentano y se coloca la mezcla en un baño de agua-hielo para facilitar la precipitación del producto. El sólido blanco obtenido se separa por centrifugación, este proceso se repite hasta que ya no precipite más producto. Con estas operaciones se obtienen 35 mg del producto final. Rendimiento: 50%.¹⁹⁵

Punto de fusión: 250 °C. **¹H-RMN** (DMSO- d_6) δ : 8,74 (d, 2H); 7,40 (br, 2 NH); 6,61 (m, 2H); 6,58 (m, 1H); 3,63 (t, 2H); 3,51 (t, 2H); 3,02 (s, 9H); 2,63 (t, 2H); 1,92 (q, 2H) ppm. **¹³C-RMN** (DMSO- d_6) δ : 182,85; 168,42; 145,57; 144,18; 129,61; 119,87; 116,65; 115,99; 63,38; 52,78; 45,39; 36,84; 25,03 ppm. **FT-IR** (KBr): 3412; 3199; 2954; 1798; 1649; 1572; 1518; 1461; 1432; 1381; 1291; 1187; 1114; 952; 811; 706; 599; 481 cm^{-1} . **EM** (HRMS-ESI(+)) m/z (%) calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M}-\text{I}]^+$: 348,1923, encontrada: 348,1916.

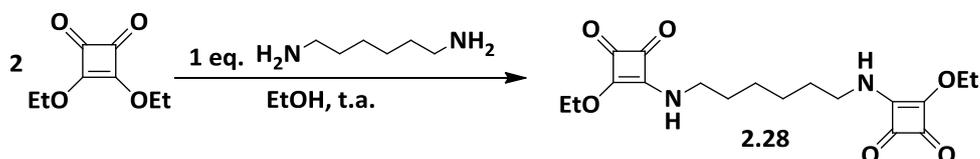
2.8.2.6 SÍNTESIS DE LA BIS-ESCUARAMIDA 2.27

N,N-bis ((2-etoxi-3,4-dioxo-1-ciclobutenil) aminopropil)metilamina



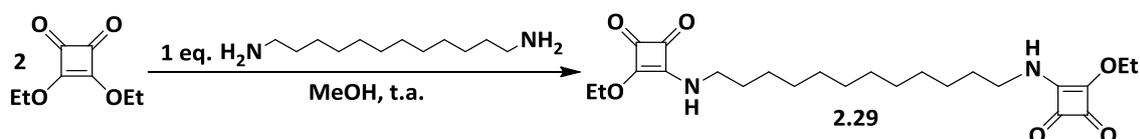
En un matraz de fondo redondo de 100 mL se introducen 1,5 g de escurato de dietilo (8,8 mmol) y se disuelven en 5 mL de Et₂O anhidro. Con la ayuda de un embudo de adición y bajo atmósfera de argón se adiciona, gota a gota, una disolución de 464 μl de diamina en 60 mL de Et₂O anhidro. Una vez acabada la adición, la mezcla de reacción se deja durante 12 h en agitación y atmósfera inerte. Pasado este tiempo, se añade pentano al crudo y se enfría en un baño de agua-hielo. Se observa así la aparición de un precipitado blanco. Cuando finaliza la precipitación se decanta el líquido y se lava el sólido resultante con pentano y unas gotas de Et₂O (3 x 20 mL). Se deja secar al aire. Se obtienen 0,88 g del producto esperado. Rendimiento: 74%.¹⁹⁵

Punto de fusión: 101 °C. **¹H-RMN** (DMSO- d_6) δ : 8,88 (s, NH); 8,68 (s, NH); 4,75 (q, 4H); 3,57 (t, 4H); 2,41 (m, 4H); 2,22 (s, 3H); 1,76 (t, 4H); 1,45 (t, 6H) ppm. **¹³C-RMN** (CDCl₃) δ : 190,2; 183,5; 177,9; 173,1; 70,2; 56,2; 44,3; 42,0; 27,8; 16,4 ppm. **FT-IR** (KBr): 3448; 1801; 1653; 1600; 1540; 1457 cm^{-1} . **EM** (HRMS-ESI(+)) m/z (%) calculada para $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 416,1798, encontrada: 416,1778.

2.8.2.7 SÍNTESIS DE LA BIS-ESCUARAMIDA 2.28*1,6-bis(2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)hexanodiamina*

En un matraz de fondo redondo de 100 mL se disuelven 1,5 g (8,8 mmol) de escuarato de dietilo en 5 mL de EtOH anhidro. Con un embudo de adición se añade lentamente (la adición puede durar hasta dos horas) una disolución de 0,35 g (3 mmol) de la diamina en 50 mL de EtOH. Acabado el proceso, se deja la mezcla de reacción en agitación y en atmósfera de argón durante 12 h. Transcurrido este tiempo, se observa la aparición de un sólido blanco en el seno de la disolución. Se añaden unos 30 mL de éter a la disolución y se enfría en un baño de agua-hielo durante 1 h para que precipite el producto. Finalmente se filtra el sólido blanco obtenido y se lava con EtOH (2 x 10 mL) y con Et₂O (2 x 10 mL). Se deja secando al aire. Se obtienen 0,99 g del producto deseado. Rendimiento: 91%.¹⁹⁵

Punto de fusión: 164 °C. ¹H-RMN (DMSO-d₆) δ: 8,81 (br, NH); 8,60 (br, NH); 4,65 (q, 4H); 3,45 (q, 2H); 3,27 (q, 2H); 1,50 (m, 4H); 1,36 (t, 6H); 1,28 (m, 4H) ppm. ¹³C-RMN (DMSO-d₆) δ: 190,32; 182,99; 177,90; 177,35; 173,58; 173,20; 69,69; 44,63; 44,30; 31,20; 30,69; 26,24; 16,57 ppm. **FT-IR** (KBr): 3284, 2944, 1804, 1703, 1598, 1517, 1461, 1388, 1340, 1288, 1106, 1043, 1009, 817 cm⁻¹. **EM** (HRMS-ESI(+)) m/z (%) calculada para C₁₈H₂₄N₂O₆Na [M+Na]⁺: 387,1532 encontrada: 387,1533.

2.8.2.8 SÍNTESIS DE LA BIS-ESCUARAMIDA 2.29*1,12-bis(2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)dodecanodiamina*

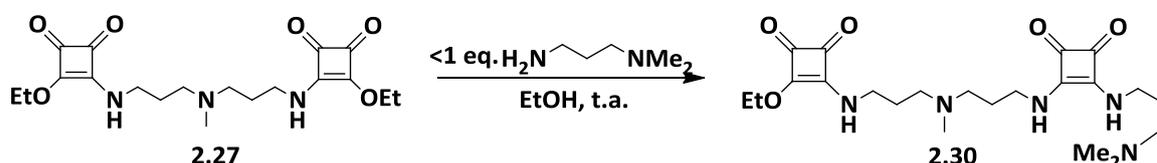
En un matraz de fondo redondo de 100 mL se disuelven 1,5 g de escuarato de dietilo (8,8 mmol) en 5 mL de MeOH anhidro. Con un embudo de adición se añade lentamente (la adición puede durar hasta dos horas) una disolución de 0,61 g (3,3 mmol) de la diamina en 50 mL de MeOH. Acabado el proceso, se deja la mezcla de reacción en agitación y atmósfera de argón durante 12 h. Transcurrido este tiempo, se elimina a sequedad el disolvente, obteniéndose un aceite amarillo. A continuación se añaden unos 30 - 40 mL de pentano (o éter de petróleo) a la disolución y la mezcla se coloca en un baño de agua-hielo. De esta manera, se consigue la precipitación de un sólido blanco. Se deja precipitar durante 1 h. Posteriormente, se filtra y se lava con pentano (3 x 10 mL) y

con Et₂O (2 x 10 mL). Se deja que se seque al aire. Con estas operaciones se obtienen 1,07 g del producto final. Rendimiento: 80%.¹⁹⁵

Punto de fusión: 116 °C. ¹H-RMN (DMSO-d₆) δ: 8,80 (br, NH); 8,60 (br, NH); 4,66 (q, 4H); 3,47 (q, 2H); 3,27 (q, 2H); 1,50 (m, 4H); 1,36 (t, 6H); 1,24 (m, 16H) ppm. ¹³C-RMN (DMSO-d₆) δ: 190,31; 182,98; 177,93; 177,37; 173,57; 71,31; 69,65; 44,74; 44,33; 31,33; 30,77; 29,85; 29,39; 26,77; 16,58 ppm. **FT-IR** (KBr): 3259, 2924, 1807, 1704, 1649, 1599, 1525, 1409, 1384, 1340, 1104, 1056 cm⁻¹. **EM** (HRMS-ESI(+)) m/z (%) calculada para C₂₄H₃₆N₂O₆Na [M+Na]⁺: 471,2471 encontrada: 471,2472.

2.8.2.9 SÍNTESIS DE LA BIS-ESCUARAMIDA 2.30

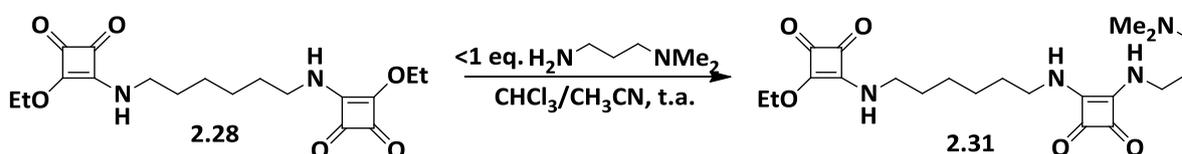
N-[(2-etoxi-3,4-dioxo-1-ciclobutenil)aminopropil]-N-[(2-N,N-dimetilpropildiamino-3,4-dioxo-1-ciclobutenil)aminopropil metilamina



En un matraz de fondo redondo de 100 mL se disuelve 1 g (2,5 mmol) de la bis-esquaramida **2.27** en 10 mL de EtOH anhidro. Con un embudo de adición se añade lentamente una disolución de 213 mL de la diamina (1,7 mmol) en 50 mL de EtOH. La adición puede durar hasta dos horas. Acabado el proceso, se deja la mezcla de reacción en agitación y atmósfera de Ar durante 12 h. Transcurrido este tiempo se elimina a sequedad el disolvente obteniéndose un sólido amarillo que resulta ser la mezcla del producto de partida y el producto deseado. Esta mezcla de productos se utilizará para la síntesis de bis-esquaramida **C5** y **C6** (ver más adelante).

2.8.2.10 SÍNTESIS DE LA BIS-ESCUARAMIDA 2.31

1-[(2-N,N-dimetilpropildiamino-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)]-6-[(2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)]hexanodiamina



En un matraz de fondo redondo de 100 mL se disuelven 0,5 g (1,37 mmol) de la diesquaramida **2.28** en 10 mL de CHCl₃ y 5 mL de CH₃CN. Con un embudo de adición se añade lentamente una disolución de 115 μl (0,9 mmol) de la diamina en 50 mL de CHCl₃. La adición puede durar hasta dos horas. Acabado el proceso, se deja la mezcla de reacción en agitación y atmósfera de argón durante 12 h. Transcurrido este tiempo, se observa la aparición de un sólido blanco en la disolución. Se elimina a sequedad el disolvente y el

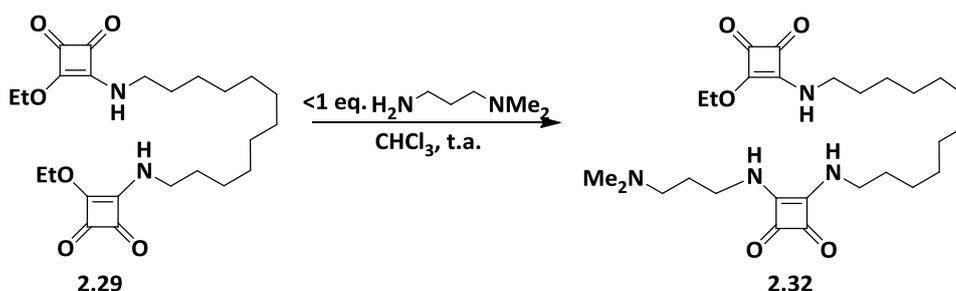
2. Parte experimental

sólido blanco obtenido se lava (3 x 5 mL) con Et₂O. Posteriormente, se lava con una mezcla 1:1 de Et₂O/CHCl₃ (5 x 5 mL) y con una mezcla 1:1 de Et₂O/CH₃CN (5 x 5 mL). Finalmente, se deja el sólido secándose al aire. Se obtienen 0,24g de la bis-escuaramida esperada. Rendimiento: 63%.¹⁹⁵

Punto de fusión: 185 °C. **¹H-RMN** (DMSO-d₆) δ: 8,79 (s, 1H); 8,58 (s, 1H); 7,32 (br, 3H); 4,63 (q, 2H); 3,47 (t, 4H); 3,32 (t, 2H); 2,25 (t, 2H); 2,12 (s, 6H); 1,65 (m, 2H); 1,51 (m, 4H), 1,36 (t, 3H); 1,27 (m, 4H) ppm. **¹³C-RMN** (DMSO-d₆) δ: 189,85; 182,96; 182,53; 177,51; 176,89; 173,05; 172,67; 168,33; 69,20; 56,40; 45,36; 44,22; 43,88; 43,63; 42,00; 31,19; 30,73; 30,38; 28,85; 25,65; 16,30 ppm. **FT-IR** (KBr): 3171, 2942, 1803, 1703, 1639, 1584, 1518, 1432, 1357 cm⁻¹. **EM** (HRMS-ESI(+)) m/z (%) calculada para C₂₁H₃₂N₄O₅Na [M+Na]⁺: 443,2270 encontrada: 443,2276.

2.8.2.11 SÍNTESIS DE LA BIS-ESCUARAMIDA 2.32

1-[(2-N,N-dimetilpropildiamino-3,4-dioxocyclobut-1-en-1-il)]-12-[(2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)]dodecanodiamina

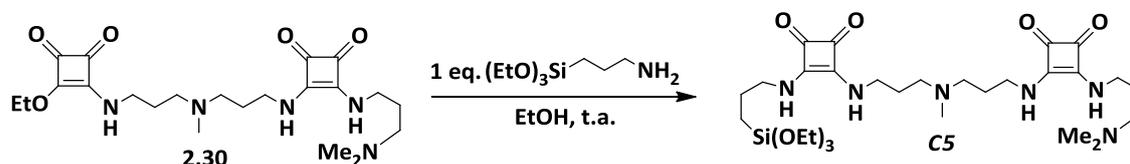


En un matraz de fondo redondo de 100 mL se disuelven 0,5 g de la bis-escuaramida **2.29** (1,11 mmol) en 5 mL de CHCl₃. Con un embudo de adición se añade lentamente (la adición puede durar hasta dos horas) una disolución de 95 μL de la diamina (0,75 mmol) en 50 mL de CHCl₃. Acabado el proceso, se deja la mezcla de reacción en agitación y atmósfera de argón durante 12 h. Transcurrido este tiempo, se observa la aparición de un sólido blanco en la disolución. Se elimina a sequedad el disolvente y se añade al sólido 10 mL de Et₂O y 10 mL de pentano. Se filtra el sólido blanco obtenido, y este se lava con Et₂O (2 x 5 mL) en primer lugar, y posteriormente, con una mezcla 1:1 de Et₂O/acetona (3 x 10 mL). Finalmente, se deja el sólido secándose al aire. Se obtienen 0,25 g de la bis-escuaramida esperada. Rendimiento: 66%.¹⁹⁵

Punto de fusión: 162 °C. **¹H-RMN** (DMSO-d₆) δ: 8,79 (s, 1H); 8,59 (s, 1H); 7,32 (br, 3NH); 4,65 (q, 2H); 3,48 (t, 4H); 3,26 (t, 2H); 2,24 (t, 2H); 2,13 (s, 6H); 1,64 (m, 2H); 1,49 (m, 4H); 1,36 (t, 3H); 1,24 (m, 16H) ppm. **¹³C-RMN** (DMSO-d₆) δ: 183,12; 168,91; 69,41; 56,86; 45,99; 44,30; 42,64; 41,28; 31,74; 29,83; 26,77; 16,35 ppm. **FT-IR** (KBr): 3194, 2917, 2849, 1802, 1699, 1581, 1450, 1384, 1345, 1101, 1054 cm⁻¹. **EM** (HRMS-ESI(+)) m/z (%) calculada para C₂₇H₄₄N₄O₅Na [M+Na]⁺: 527,3209 encontrada: 527,3200.

2.8.2.12 SÍNTESIS DE LA BIS-DIESCUARAMIDA C5

N-[(2-(3-(triethoxisililpropilamino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)aminopropil]-*N*-[(2-*N,N*-dimetilpropildiamino-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)aminopropil]metilamina

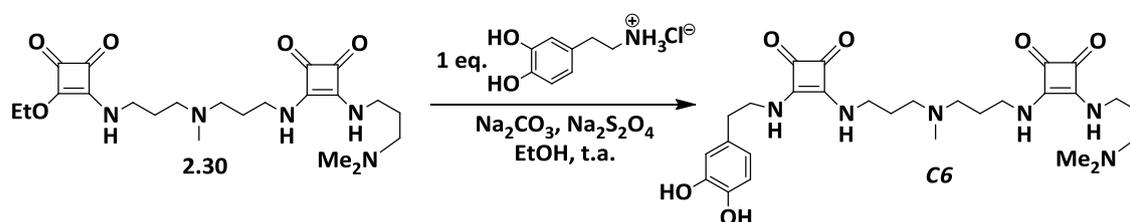


En un matraz de fondo redondo de 100 mL, en 10 mL de EtOH anhidro, se disuelve la bis-escuaramida **2.30** (mezcla de productos) obtenida anteriormente. Con un embudo de adición se añade lentamente una disolución de 304 μL (1,3 mmol) de sililamina (APTES) en 50 mL de EtOH. La adición puede durar hasta dos horas. Acabado el proceso, se deja la mezcla de reacción en agitación y atmósfera de argón durante 12 h. Transcurrido este tiempo se elimina a sequedad el disolvente obteniéndose un sólido amarillo. El sólido se lava con Et₂O (3 x 10 mL) y posteriormente con acetona fría (3 x 10 mL) para separar las bis-escuaramidas de partida 2.27 y 2.30 del crudo de reacción. El sólido se deja secar al aire. Se obtienen 1,04 g del producto final deseado. Rendimiento global de la reacción a partir del producto **2.27**: 98%.¹⁹⁵

Punto de fusión: 220 °C. ¹H-RMN (DMSO-d₆) δ : 7,42 (br, 4NH); 3,78 (q, 2H); 3,54 (t, 8H); 2,35 (t, 4H); 2,29 (t, 2H); 2,16 (s, 9H); 1,69 (m, 6H); 1,59 (m, 2H); 1,18 (t, 9H); 0,60 (t, 2H) ppm. ¹³C-RMN (DMSO-d₆) δ : 183,06; 168,41; 58,38; 56,45; 54,78; 46,34; 45,66; 42,19; 29,06; 25,04; 18,71; 7,35 ppm. FT-IR (KBr): 3170, 2970, 2783, 1799, 1646, 1578, 1435, 1363, 1311, 1166, 1102, 1078, 956, 773 cm⁻¹. EM (HRMS-ESI(+)) m/z (%) calculada para C₂₉H₅₃N₆O₇Si [M+H]⁺: 625,3745 encontrada: 625,3736.

2.8.2.13 SÍNTESIS DE LA BIS-DIESCUARAMIDA C6

N-[(2-(2-(3,4-dihidroxifenetil)amino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)aminopropil]-*N*-[(2-*N,N*-dimetilpropildiamino-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)aminopropil]metilamina



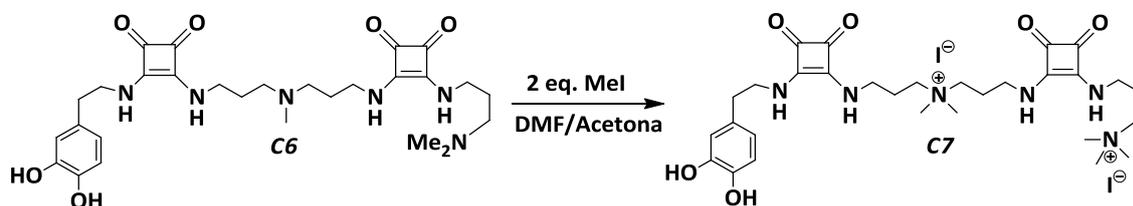
En un matraz de fondo redondo de 100 mL se disuelven 0,47 g (2,5 mmol) de clorhidrato de dopamina en aproximadamente 40 mL de EtOH. Posteriormente, se añaden a esta disolución 400 mg de carbonato sódico (3,6 mmol) y 200 mg de ditionito sódico (0,59 mmol). La mezcla se comienza a agitar y se añaden 3 o 4 gotas de NaOH 1M para que el pH sea levemente básico (pH= 8). A continuación y con ayuda de un embudo

de adición se añade gota a gota la escuaramida **2.30** obtenida anteriormente (mezcla de productos) disuelta en 10 mL de EtOH. La mezcla se deja agitando 1 h en atmósfera inerte y a oscuras. Transcurrido una hora se filtra la disolución por gravedad a un nuevo matraz de fondo redondo, eliminando así el carbonato y el ditionito sólido. La nueva disolución se deja agitando 3 o 4 h en atmósfera de argón y a oscuras. Acabado el proceso, se obtiene un sólido amarillo en el seno de la disolución. Se elimina a sequedad el disolvente. El sólido amarillo se lava con Et₂O y unas gotas (de 3 a 5) de CH₂Cl₂ (5 x 10 mL) para separar las bis-escuaramidas de partida 2.27 y 2.30 del crudo de reacción. Con estas operaciones se obtienen 0,67 g del producto final esperado. Rendimiento global de la reacción a partir del producto **2.27**: 70,5%.¹⁹⁵

Punto de fusión: 243 °C. **¹H-RMN** (DMSO-d₆) δ: 8,81 (br, 2H); 7,53 (br, 4NH); 6,66 (m, 2H); 6,52 (m, 1H); 2,65 (t, 6H); 2,50 (s, 9H); 2,31 (t, 4H); 2,23 (t, 2H); 1,63 (m, 6H) ppm. **¹³C-RMN** (DMSO-d₆) δ: 183,14; 168,21; 145,64; 144,25; 129,69; 119,94; 116,71; 116,05; 54,65; 45,59; 42,10; 37,05; 29,06 ppm. **FT-IR** (KBr): 3421; 3169; 2952; 1801; 1647; 1592; 1545; 1487; 1446 cm⁻¹. **EM** (HRMS-ESI(+)) m/z (%) calculada para C₂₈H₄₁N₆O₆ [M+H]⁺: 557,3088, encontrada: 557,3086.

2.8.2.14 SÍNTESIS DE LA BIS-DIESCUARAMIDA C7

Diyoduro de N-[(3-(3,4-dihidroxifenetil)amino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il]amino propil]-N-[(3-N,N,N-trimetilpropilendiamino-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il]N,N-dimetilamonio



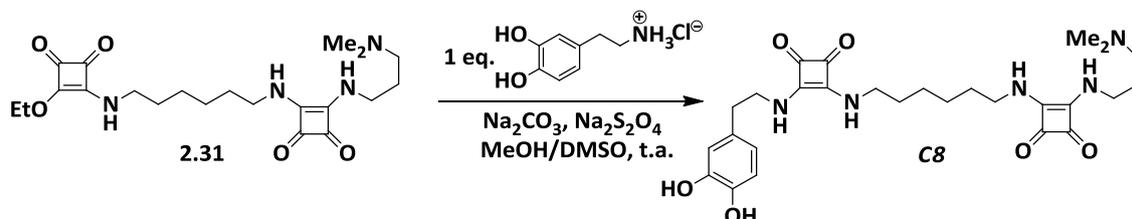
En un matraz de fondo redondo de 100 mL se disuelven 0,6 g (1,08 mmol) de la bis-escuaramida **C6** en la menor cantidad posible de DMF, aproximadamente 10 mL, calentando la disolución para lograr que se disuelva completamente. A continuación se añaden 15 mL de acetona y con la ayuda de una jeringuilla se adicionan gota a gota 0,26 mL (4,32 mmol) de MeI. La mezcla se coloca en un baño de aceite a reflujo (aproximadamente 100°C) y se mantiene en estas condiciones y en atmósfera de Ar durante 12 h. Transcurrido este tiempo se adiciona acetona a la disolución y se deja que precipite el sólido (amarillo-marrón) en un baño de agua hielo durante 4 h. Se centrifuga la mezcla para separar el sólido y se lava con acetona (3 x 5 mL) para purificar el producto final. Finalmente se deja secar al aire. De esta forma se obtienen 0,15 g de la bis-escuaramida deseada. Rendimiento: 17%.¹⁹⁵

Punto de fusión: 123 °C. **¹H-RMN** (DMSO-d₆) δ: 8,75 (br, 2H); 7,59 (br, 4NH); 6,62 (m, 2H); 6,51 (m, 1H); 3,70 (m, 6H); 3,10 (s, 15H); 2,80 (t, 2H); 2,70 (t, 2H); 2,01 (m, 6H) ppm. **¹³C-RMN** (DMSO-d₆) δ: 183,38; 168,47; 145,97; 144,14; 129,49; 120,08; 116,15; 63,57; 61,21;

52,84; 51,01; 25,11 ppm. **FT-IR** (KBr): 3421, 1801, 1654, 1595, 1543, 1479, 1443 cm^{-1} . **EM** (HRMS-ESI(+)) m/z (%) calculada para $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{O}_6$ $[\text{M-I}]^+$: 713,2524 encontrada: 713,2521.

2.8.2.15 SÍNTESIS DE LA BIS-DIESCUARAMIDA C8

1-[(2-N,N-dimetilpropildiamino-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)]-6-[(2-(3,4-dihidroxifenetil) amino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il]]hexanodiamina

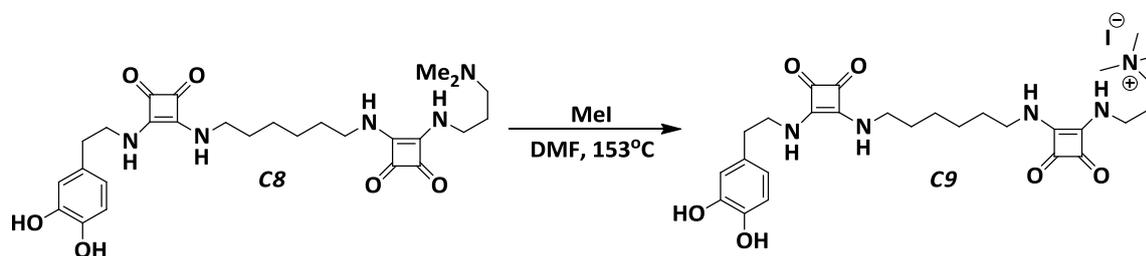


En un matraz de fondo redondo de 100 mL se disuelven 0,17 g (0,88 mmol) de clorhidrato de dopamina en 5 mL de MeOH. Posteriormente, se añaden a esta disolución 400 mg de carbonato sódico (3,6 mmol) y 200 mg de ditonito sódico (0,59 mmol). La mezcla se comienza a agitar y se añaden 3 o 4 gotas de NaOH 1M para que el pH sea ligeramente básico (pH= 8). A continuación y con la ayuda de un embudo de adición se añade gota a gota la bis-escuaramida **2.31** (0,25 g; 0,59 mmol) parcialmente disuelta en 55 mL de MeOH y 10 mL de DMSO. La mezcla se deja agitando 12 h en atmósfera inerte y a oscuras. Transcurrido este tiempo se obtiene una disolución con un producto blanco en suspensión. Se evapora parcialmente el disolvente para disminuir el volumen total de la disolución. La mezcla se coloca en un baño de agua-hielo y se le adicionan unos 20 mL de MeOH para facilitar la precipitación del sólido. Se deja en estas condiciones unos 30 min. Se filtra el sólido y se lava con MeOH (5 x 10 mL). Finalmente, el crudo de reacción se lava con acetona (2 x 10 mL). El sólido se seca al aire. Se obtienen 0,24 g de la bis-escuaramida deseada. Rendimiento: 77%.¹⁹⁵

Punto de fusión: 244 °C. **¹H-RMN** (DMSO- d_6) δ : 8,79 (s, 1H); 8,70 (s, 1H); 7,70 (br, 2NH); 7,38 (br, 2NH); 6,64 (m, 2H); 6,48 (m, 1H); 3,49 (t, 8H); 2,67 (t, 2H); 2,49 (t, 2H); 2,26 (s, 6H), 1,72 (m, 2H); 1,52 (m, 4H); 1,31 (m, 4H) ppm. **¹³C-RMN** (DMSO- d_6) δ : 183,45; 168,84; 146,10; 144,66; 130,21; 120,36; 117,10; 116,49; 56,11; 45,82; 44,88; 44,06; 37,43; 31,51; 28,66; 26,30 ppm. **FT-IR** (KBr): 3170, 2931, 1799, 1641, 1582, 1432, 1357 cm^{-1} . **EM** (MALDI-TOF/TOF(+)) m/z (%) calculada para $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{M+Na}]^+$: 550,2636 encontrada: 550,2646.

2.8.2.16 SÍNTESIS DE LA BIS-DIESCUARAMIDA C9

Yoduro de 3-((2-((6-((2-((3, 4- dihidroxifenil) amino) -3,4- dioxociclobut -1-en-1-il) amino)hexil)amino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-N,N,N-trimetilpropan-1-amonio

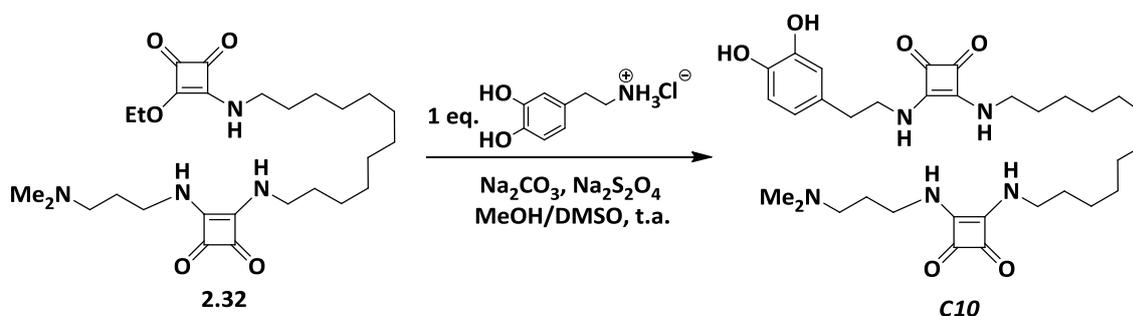


En un matraz de fondo redondo de 100 mL se disuelven 0,5 g (0,95 mmol) de la escuaramida **C8** en 7 mL de DMF, calentando la disolución para lograr que se disuelva completamente. A continuación, con la ayuda de una jeringuilla se adicionan gota a gota 0,24 mL (3,80 mmol) de MeI. La mezcla se coloca a reflujo (153°C) y en atmósfera de argón durante 12 h. Transcurrido este tiempo se adicionan 30 mL de acetona a la disolución y se deja que precipite el sólido marrón en un baño de agua hielo. Se centrifuga el sólido y se lava con MeOH frío (3 x 10 mL) y con acetona fría (3 x 10 mL). Finalmente se seca al vacío. Con estas operaciones se obtienen 0,19 g de la sal esperada. Rendimiento: 30%.¹⁹⁵

Punto de fusión: 230 °C. **¹H-RMN** (DMSO-d₆) δ: 8,77 (br, 1H); 8,68 (br, 1H); 7,41 (br, 4NH); 6,63 (m, 2H); 6,47 (m, 1H); 3,64 (t, 2H); 3,47 (m, 6H); 3,10 (s, 9H); 2,65 (t, 2H); 1,97 (m, 1H); 1,82 (m, 1H); 1,50 (m, 4H); 1,30 (m, 4H) ppm. **¹³C-RMN** (DMSO-d₆) δ: 182,21; 167,79; 145,08; 143,74; 129,31; 119,33; 116,06; 115,48; 54,38; 54,19; 44,86; 43,17; 36,41; 30,65; 25,41 ppm. **FT-IR** (KBr): 3171, 1800, 1645, 1583, 1434, 1384, 1357, 1284, 1116, 617 cm⁻¹. **EM** (MALDI-TOF/TOF(+)) m/z (%) calculada para C₂₈H₄₀N₅O₆ [M-I]⁺: 542,2973, encontrada: 542,3003.

2.8.2.17 SÍNTESIS DE LA BIS-DIESCUARAMIDA C10

1-[(2-N,N-dimetilpropildiamino-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)]-12-[(2-(3,4-dihidroxifenil) amino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)]dodecanodiamina

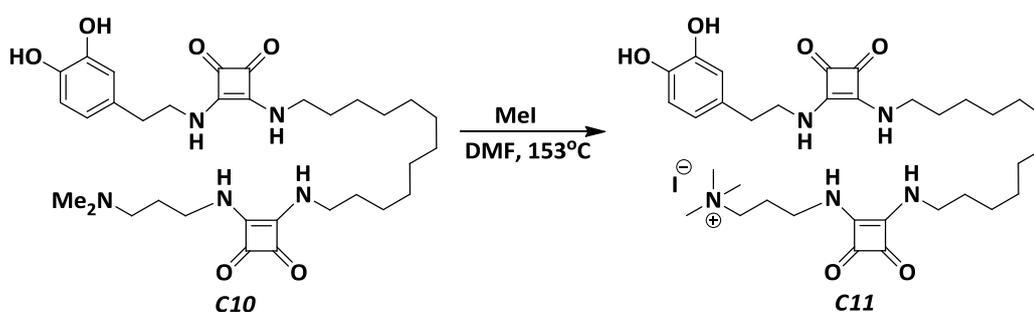


En un matraz de fondo redondo de 100 mL se disuelven 0,14 g del clorhidrato de dopamina (0,74 mmol) en 5 mL de MeOH. Posteriormente, se añaden a esta disolución 100 mg de carbonato sódico (0,9 mmol) y 50 mg de ditionito sódico (0,15 mmol). La mezcla se agita y se añaden 3 o 4 gotas de NaOH 1M para que el pH sea levemente básico (pH= 8). A continuación, y con ayuda de un embudo de adición se añade lentamente una disolución de la bis-escuaramida **2.32** (0,25 g, 0,49 mmol) parcialmente disuelta en 55 mL de MeOH y 10 mL de DMSO. La mezcla se deja agitando 12 h en atmósfera inerte y a oscuras. Transcurrido este tiempo, se obtiene sólido blanco en suspensión. Se elimina parcialmente el disolvente y la mezcla se coloca en un baño de agua-hielo. Se adicionan unos 20 mL de MeOH para facilitar la precipitación del sólido. Se deja en estas condiciones unos 30 minutos. A continuación se filtra el sólido y se lava con MeOH frío (5 x 10 mL). Finalmente, se lava con acetona (3 x 10 mL). Se deja secar al aire. Se obtienen 0,28 g de la bis-escuaramida deseada. Rendimiento: 92%.¹⁹⁵

Punto de fusión: 219 °C. **¹H-RMN** (DMSO-d₆) δ: 8,74 (br, 2H); 7,39 (br, 4NH); 6,61 (m, 2H); 6,46 (m, 1H); 3,64 (t, 4H); 3,48 (t, 2H); 2,40 (t, 2H); 2,22 (s, 6H); 1,70 (m, 2H); 1,49 (m, 4H); 1,25 (m, 16H) ppm. **¹³C-RMN** (DMSO-d₆) δ: 182,88; 168,30; 145,58; 144,29; 129,78; 119,94; 116,57; 55,69; 45,33; 44,04; 31,60; 29,53; 27,98; 26,16 ppm. **FT-IR** (KBr): 3172, 2920, 2848, 1799, 1650, 1585, 1434, 1356, 1281, 1114 cm⁻¹. **EM** (MALDI-TOF/TOF(+)) m/z (%) calculada para C₃₃H₄₉N₅O₆Na [M+Na]⁺: 634,3575 encontrada: 634,3569.

2.8.2.18 SÍNTESIS DE LA BIS-DIESCUARAMIDA **C11**

Yoduro de 3-((2-((12-((2-((3,4-dihidroxifenetil) amino) -3,4- dioxociclobut-1-en-1-il) amino) dodecil) amino) -3,4- dioxociclobut-1-en-1-il) amino) -N,N,N-trimetilpropano-1-amonio

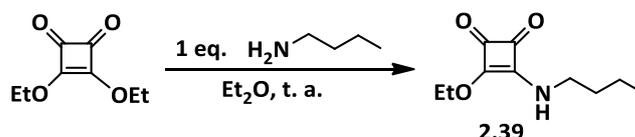


En un matraz de fondo redondo de 100 mL se disuelven 0,16 g (0,26 mmol) de la escuaramida **C10** en 6 mL de DMF calentando la disolución para lograr que se disuelva completamente. A continuación, con la ayuda de una jeringuilla se adicionan gota a gota 0,065 mL (1,04 mmol) de MeI. La mezcla se coloca a reflujo (153°C) en atmósfera de argón durante 12 h. Transcurrido este tiempo se adicionan 30 mL acetona a la disolución y se deja que precipite el sólido marrón en un baño de agua hielo. Se separa el sólido por centrifugación y se lava con MeOH frío (3 x 10 mL), y a continuación con acetona fría (3 x 10 mL). Finalmente se seca al vacío. Se obtienen 0,063 g de la sal esperada. Rendimiento: 32%.¹⁹⁵

Punto de fusión: 238 °C. ¹H-RMN (DMSO-d₆) δ: 8,82 (br, 1H); 8,70 (br, 1H); 7,63 (br, 2NH); 7,44 (br, 2NH); 6,64 (m, 2H); 6,45 (m, 1H); 3,64 (t, 4H); 3,06 (s, 9H); 2,74 (t, 2H); 2,65 (t, 2H); 2,00 (m, 2H); 1,79 (m, 2H); 1,50 (m, 4H); 1,25 (m, 16H) ppm. ¹³C-RMN (DMSO-d₆) δ: 182,27; 167,55; 145,14; 143,70; 129,17; 119,27; 116,09; 115,52; 62,80; 54,92; 52,23; 44,72; 43,57; 43,19; 36,45; 30,67; 28,89; 28,55; 27,19; 25,80; 24,48 ppm. **FT-IR** (KBr): 3174, 2917, 2848, 1800, 1652, 1585, 1437, 1362, 1281, 1119, 618 cm⁻¹. **EM** (MALDI-TOF/TOF(+)) m/z (%) calculada para C₃₄H₅₂N₅O₆ [M-I]⁺: 626,3912 encontrada: 626,3943.

2.8.2.19 SÍNTESIS DE LA SEMIESCUARAMIDA 2.39

3-(butilamino)-4-etoxiciclobut-3-en-1,2-diona

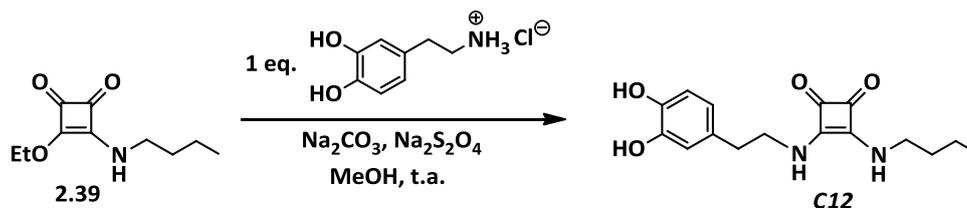


En un matraz de fondo redondo de 100 mL se introducen 2 g de escuarato de dietilo (11,8 mmol) y se disuelven en 15 mL de Et₂O anhidro. Con la ayuda de un embudo de adición y bajo atmósfera de argón se adiciona gota a gota una disolución de 1 mL de la amina (10,1 mmol) en 10 mL de Et₂O anhidro. Una vez acabada la adición, la mezcla de reacción se deja durante 12 h en agitación y atmósfera inerte. Pasado este tiempo, se evapora a sequedad el disolvente y el aceite amarillo obtenido se lava con pentano (3 x 20 mL) y con Et₂O frío (5 x 20 mL). Con estas operaciones solidifica la semiescuaramida (sólido blanco). Se deja secar al aire. Se obtienen 1,5 g del producto esperado. Rendimiento: 75%.¹⁹⁵

Punto de fusión: 38 °C. ¹H-RMN (DMSO-d₆) δ: 8,79 (br, NH); 8,59 (br, NH); 4,65 (q, 2H); 3,47 (q, 2H); 1,50 (m, 2H); 1,37 (t, 3H); 1,28 (m, 2H); 0,87 (t, 3H) ppm. ¹³C-RMN (DMSO-d₆) δ: 185,42; 174,79; 44,25; 33,38; 20,02; 14,34 ppm. **FT-IR** (KBr): 3428, 3212, 2955, 2928, 1816, 1682, 1622, 1543, 1460, 1420, 1362, 1339, 1237, 639 cm⁻¹. **EM** (HRMS-ESI(+)) m/z (%) calculada para C₂₀H₃₀N₂O₆Na [2M+Na]⁺: 417,2002, encontrada: 417,2002.

2.8.2.20 SÍNTESIS DE LA DIESCUARAMIDA C12

3-(butilamino)-4-((3,4-dihidroxifenetil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona



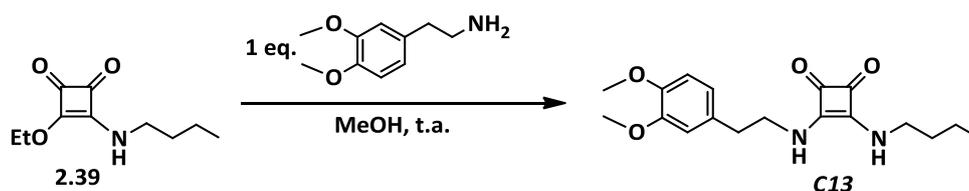
En un matraz de fondo redondo de 100 mL se disuelven 1,06 g del clorhidrato de dopamina (5,58 mmol) en 20 mL de MeOH anhidro. Posteriormente, se añaden a esta

disolución 400 mg de carbonato sódico (3,6 mmol) y 200 mg de ditionito sódico (0,59 mmol). A la mezcla en agitación se añaden 3 gotas de NaOH 1M para que el pH sea levemente básico (pH= 8). A continuación, y con la ayuda de un embudo de adición se añade lentamente una disolución de la escuaramida **2.39** (1 g, 5,07 mmol) disuelta en 10 mL de MeOH. La mezcla se deja agitando 12 h en atmósfera inerte y a oscuras. Transcurrido este tiempo, se evapora a sequedad el disolvente y el sólido blanco obtenido se lava con una mezcla 5:1 Et₂O/CH₂Cl₂ (5 x 10 mL). A continuación se deja secar al aire. Como resultado de estas operaciones se obtienen 0,75 g de la escuaramida deseada. Rendimiento: 49%.¹⁹⁵

Punto de fusión: 213 °C. **¹H-RMN** (DMSO-d₆) δ: 8,57 (br, 2H); 7,80 (br, 2NH); 6,61 (m, 2H); 6,46 (m, 1H); 3,63 (t, 2H); 3,47 (t, 2H); 2,64 (t, 2H); 1,46 (m, 2H); 1,31 (m, 2H); 0,88 (t, 3H) ppm. **¹³C-RMN** (DMSO-d₆) δ: 182,67; 168,24; 145,44; 144,14; 129,83; 119,94; 116,71; 116,03; 45,53; 43,50; 36,94; 33,30; 19,51; 14,05 ppm. **FT-IR** (KBr): 3170, 2959, 1799, 1649, 1582, 1432, 1357, 1298, 1146, 1112, 951, 815, 757, 614 cm⁻¹. **EM** (HRMS-ESI(+)) m/z (%) calculada para C₁₆H₂₀N₂O₄Na [M+Na]⁺: 327,1321, encontrada: 327,1324.

2.8.2.21 SÍNTESIS DE LA DIESCUARAMIDA C13

3-(butilamino)-4-((3,4-dimetoxifenetil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona



En un matraz de fondo redondo de 100 mL se introducen 0,5 g de **2.39** (2,5 mmol) y se disuelven en 10 mL de MeOH. Con la ayuda de un embudo de adición y bajo atmósfera de argón, se adiciona, gota a gota, una disolución de 0,51 mL de la amina (3 mmol) en 20 mL de MeOH. Una vez acabada la adición, la mezcla de reacción se deja durante 12 h en agitación y atmósfera inerte. Pasado este tiempo, se evapora a sequedad el disolvente y el sólido blanco obtenido se lava en primer lugar con MeOH frío (5 x 15 mL), y a continuación con Et₂O frío (3 x 10 mL). Se deja secar al aire. Al final de estas operaciones se obtienen 0,65 g de la escuaramida esperada. Rendimiento: 80%.¹⁹⁵

Punto de fusión: 182 °C. **¹H-RMN** (DMSO-d₆) δ: 7,34 (br, 2NH); 6,82 (m, 2H); 6,74 (m, 1H); 3,73 (s, 3H); 3,71 (s, 3H); 3,47 (t, 2H); 3,32 (m, 2H); 2,76 (t, 2H); 1,46 (m, 2H); 1,29 (m, 2H); 0,88 (t, 3H) ppm. **¹³C-RMN** (DMSO-d₆) δ: 182,54; 167,87; 148,75; 147,44; 130,95; 120,73; 112,73; 111,94; 55,52; 44,78; 42,95; 36,66; 33,00; 19,11; 13,62 ppm. **FT-IR** (KBr): 3167, 2957, 1799, 1645, 1575, 1518, 1453, 1384, 1359, 1314, 1144, 1027, 809, 764, 608 cm⁻¹. **EM** (HRMS-ESI(+)) m/z (%) calculada para C₁₈H₂₄N₂O₄Na [M+Na]⁺: 355,1634, encontrada: 355,1627.

2.8.3 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE Fe₃O₄

En un matraz de fondo redondo de 100 mL, se introducen 0,71 g de Fe(acac)₃ (2 mmol), 3 mL de oleilamina (*cis*-1-amino-9-octadeceno) (6 mmol), 2 mL de ácido oleico (6 mmol), 2,58 g de 1,2-hexadecanediol (10 mmol) y 20 mL de dibenciléter. La disolución se calienta a 200 °C durante 1 h. Transcurrido este tiempo, se refluye a 300 °C durante 2 h más. Posteriormente, la disolución se deja enfriar a temperatura ambiente. A continuación se adicionan 25 mL de EtOH, separando el precipitado negro formado por centrifugación a 8.000 rpm. El sólido se lava con EtOH (3 x 15 mL) por centrifugación. Finalmente el sólido se re-suspende en 25 mL de una disolución 75 mM de oleilamina y 75 mM de ácido oleico en hexano.

FT-IR (KBr): 3385, 2921, 2851, 1627, 1512, 578 cm⁻¹.

2.8.4 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE Fe₃O₄ FUNCIONALIZADAS CON ESCUARAMIDAS

2.8.4.1 SÍNTESIS DE NP-C1

En un matraz de fondo redondo de 100 mL se introduce el volumen (mililitros) equivalente a 50 mg de nanopartículas dispersas en hexano. Las NP se precipitan y se lavan con EtOH (2 x 7 mL) utilizando un imán. A continuación, se adicionan otros 5 mL de EtOH y se irradia con ultrasonidos durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se añaden 200 mg de la escuaramida **C1** (0,36 mmol) disuelta en 30 mL de una mezcla 3:1 CH₃CN/EtOH. La mezcla se agita en atmósfera inerte durante 12 h. Posteriormente, las NP ya funcionalizadas se separan de la disolución con la ayuda de un imán. A continuación, estas se lavan con una mezcla 3:1 CH₃CN/EtOH (3 x 10 mL). Finalmente se dispersan en una mezcla 1:1 CH₃CN/EtOH.

FT-IR (KBr): 3415, 2923, 1798, 1636, 1527, 1461, 1093, 593 cm⁻¹.

2.8.4.2 SÍNTESIS DE NP-C2

En un matraz de fondo redondo de 100 mL se introduce el volumen (mililitros) equivalente a 100 mg de nanopartículas dispersas en hexano. Las NP se precipitan y se lavan con EtOH (2 x 7 mL) utilizando un imán. A continuación, se adicionan otros 5 mL de EtOH y se irradia con ultrasonidos durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se añaden 400 mg de la escuaramida **C2** (1,19 mmol) disuelta en unos 40-50 mL de EtOH. La mezcla se agita en atmósfera inerte durante 12 h. Posteriormente, las NP ya funcionalizadas se separan de la disolución con la ayuda de un imán. A continuación, estas se lavan con EtOH (3 x 10 mL). Finalmente se dispersan en este mismo disolvente, EtOH.

FT-IR (KBr): 3421, 1798, 1649, 1573, 1461, 1361, 1291, 1187, 1115, 952, 814, 594 cm⁻¹.

2.8.4.3 SÍNTESIS DE NP-C3

En un matraz de fondo redondo de 100 mL se introduce el volumen (mililitros) equivalente a 50 mg de nanopartículas dispersas en hexano. Las NP se precipitan y se lavan con EtOH (2 x 7 mL) utilizando un imán. A continuación, se adicionan otros 5 mL de

EtOH y se irradian con ultrasonidos durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se añaden 220 mg de la escuaramida **C3** (0,4 mmol) disuelta en 30 mL de una mezcla 3:1 CH₃CN/EtOH. La mezcla se agita en atmósfera inerte durante 12 h. Posteriormente, las NP ya funcionalizadas se separan de la disolución con ayuda de un imán. A continuación, estas se lavan con la mezcla 3:1 CH₃CN/EtOH (3 x 10 mL). Finalmente se dispersan en una mezcla 1:1 CH₃CN/EtOH.

FT-IR (KBr): 3419, 2923, 1798, 1637, 1544, 1110, 587, 421 cm⁻¹.

2.8.4.4 SÍNTESIS DE NP-C4

En un matraz de fondo redondo de 100 mL se introduce el volumen (mililitros) equivalente a 100 mg de nanopartículas dispersas en hexano. Las NP se precipitan y se lavan con EtOH (2 x 7 mL) utilizando un imán. A continuación, se adicionan otros 5 mL de EtOH y se irradian con ultrasonidos durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se añaden 340 mg de la escuaramida **C4** (0,98 mmol) disuelta en unos 40-50 mL de EtOH. La mezcla se agita en atmósfera inerte durante 12 h. Posteriormente, las NP ya funcionalizadas se separan de la disolución con ayuda de un imán. Se lavan con EtOH (3 x 10 mL). Finalmente se dispersan en EtOH.

FT-IR (KBr): 3421, 1798, 1649, 1573, 1461, 1361, 1291, 1187, 1115, 952, 814, 594 cm⁻¹.

2.8.4.5 SÍNTESIS DE NP-C5

En un matraz de fondo redondo de 100 mL se introduce el volumen (mililitros) equivalente a 50 mg de nanopartículas dispersas en hexano. Las NP se precipitan y se lavan con EtOH (2 x 7 mL) utilizando un imán. A continuación, se adicionan otros 5 mL de EtOH y se irradian con ultrasonidos durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se añaden 400 mg de la escuaramida **C5** (0,64 mmol) disuelta en 30 mL de una mezcla 3:1 DMSO/EtOH. La mezcla se agita en atmósfera inerte durante 12 h. Posteriormente, las NP ya funcionalizadas se separan de la disolución con la ayuda de un imán. Se lavan con una mezcla 3:1 DMSO/EtOH (3 x 10 mL). Finalmente se dispersan en una mezcla 1:1 DMSO/EtOH.

FT-IR (KBr): 3384, 1798, 1593, 1543, 1405, 583, 414 cm⁻¹.

2.8.4.6 SÍNTESIS DE NP-C6

En un matraz de fondo redondo de 100 mL se introduce el volumen (mililitros) equivalente a 50 mg de nanopartículas dispersas en hexano. Las NP se precipitan y se lavan con EtOH (2 x 7 mL) utilizando un imán. A continuación, se adicionan otros 5 mL de EtOH y se irradian con ultrasonidos durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se añaden 400 mg de la escuaramida **C6** (0,7 mmol) disuelta en 15 mL de una mezcla 3:1 EtOH/DMSO. La mezcla se agita en atmósfera inerte durante 12 h. Posteriormente, las NP ya funcionalizadas se separan de la disolución con la ayuda de un imán. Se lavan con una mezcla 3:1 EtOH/DMSO (3 x 10 mL). Finalmente se dispersan en una mezcla 1:1 EtOH/DMSO.

FT-IR (KBr): 3396, 2923, 1798, 1652, 1596, 1544, 1485, 1265, 587, 416 cm^{-1} .

2.8.4.7 SÍNTESIS DE NP-C7

En un matraz de fondo redondo de 100 mL se introduce el volumen (mililitros) equivalente a 50 mg de nanopartículas dispersas en hexano. Las NP se precipitan y se lavan con EtOH (2 x 7 mL) utilizando un imán. A continuación, se adicionan otros 5 mL de EtOH y se irradian con ultrasonidos durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se añaden 600 mg de la escuaramida **C7** (0,7 mmol) disuelta en 30 mL de una mezcla 3:1 DMSO/EtOH. La mezcla se agita en atmósfera inerte durante 12 h. Posteriormente, las NP ya funcionalizadas se separan de la disolución con la ayuda de un imán. Se lavan con una mezcla 3:1 DMSO/EtOH (3 x 10 mL). Finalmente se dispersan en una mezcla 1:1 DMSO/EtOH.

FT-IR (KBr): 3445, 1798, 1600, 1596, 1485, 1127, 970, 628, 494 cm^{-1} .

2.8.4.8 SÍNTESIS DE NP-C8

En un matraz de fondo redondo de 100 mL se introduce el volumen (mililitros) equivalente a 100 mg de nanopartículas dispersas en hexano. Las NP se precipitan y se lavan con EtOH (2 x 7 mL) utilizando un imán. A continuación, se adicionan otros 5 mL de EtOH y se irradian con ultrasonidos durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se añaden 500 mg de la escuaramida **C8** (0,95 mmol) disuelta en 25 mL de una mezcla 4:1 DMSO/EtOH. La mezcla se agita en atmósfera inerte durante 12 h. Posteriormente, las NP ya funcionalizadas se separan de la disolución con la ayuda de un imán. Se lavan con la mezcla 4:1 DMSO/EtOH (3 x 10 mL). Finalmente se dispersan en una mezcla 1:1 DMSO/EtOH.

FT-IR (KBr): 3420, 3165, 2929, 1801, 1640, 1580, 1431, 1357, 1113, 618, 490 cm^{-1} .

2.8.4.9 SÍNTESIS DE NP-C9

En un matraz de fondo redondo de 100 mL se introduce el volumen (mililitros) equivalente a 100 mg de nanopartículas dispersas en hexano. Las NP se precipitan y se lavan con EtOH (2 x 7 mL) utilizando un imán. A continuación, se adicionan otros 5 mL de EtOH y se irradian con ultrasonidos durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se añaden 500 mg de la escuaramida **C9** (0,75 mmol) disuelta en 40 mL de una mezcla 4:1 DMSO/EtOH. La mezcla se agita en atmósfera inerte durante 12 h. Posteriormente, las NP ya funcionalizadas se separan de la disolución con la ayuda de un imán. Se lavan con la mezcla 4:1 DMSO:EtOH (3 x 10 mL). Finalmente se dispersan en una mezcla 1:1 DMSO/EtOH.

FT-IR (KBr): 3445, 2926, 1803, 1645, 1590, 1430, 1361, 1115, 615, 487 cm^{-1} .

2.8.4.10 SÍNTESIS DE NP-C10

En un matraz de fondo redondo de 100 mL se introduce el volumen (mililitros) equivalente a 100 mg de nanopartículas dispersas en hexano. Las NP se precipitan y se

lavan con EtOH (2 x 7 mL) utilizando un imán. A continuación, se adicionan otros 5 mL de EtOH y se irradian con ultrasonidos durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se añaden 600 mg de la escuaramida **C10** (0,98 mmol) disuelta en 50 mL de una mezcla 4:1 DMSO/EtOH. La mezcla se agita en atmósfera inerte durante 12 h. Posteriormente, las NP ya funcionalizadas se separan de la disolución con la ayuda de un imán. Se lavan con la mezcla 4:1 DMSO/EtOH (3 x 10 mL). Finalmente se dispersan en una mezcla 1:1 DMSO/EtOH.

FT-IR (KBr): 3388, 3169, 2921, 2850, 1798, 1646, 1586, 1482, 1436, 1358, 1262, 1126, 618, 437 cm^{-1} .

2.8.4.11 SÍNTESIS DE NP-C11

En un matraz de fondo redondo de 100 mL se introduce el volumen (mililitros) equivalente a 100 mg de nanopartículas dispersas en hexano. Las NP se precipitan y se lavan con EtOH (2 x 7 mL) utilizando un imán. A continuación, se adicionan otros 5 mL de EtOH y se irradian con ultrasonidos durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se añaden 600 mg de la escuaramida **C11** (0,8 mmol) disuelta en 50 mL de una mezcla 4:1 DMSO/EtOH. La mezcla se agita en atmósfera inerte durante 12 h. Posteriormente, las NP ya funcionalizadas se separan de la disolución con la ayuda de un imán. Se lavan con la mezcla 4:1 DMSO/EtOH (3 x 10 mL). Finalmente se dispersan en una mezcla 1:1 DMSO/EtOH.

FT-IR (KBr): 3398, 2923, 1800, 1646, 1585, 1480, 1439, 1358, 1126, 615, 437 cm^{-1} .

2.8.4.12 SÍNTESIS DE NP-C12

En un matraz de fondo redondo de 100 mL se introduce el volumen (mililitros) equivalente a 100 mg de nanopartículas dispersas en hexano. Las NP se precipitan y se lavan con EtOH (2 x 7 mL) utilizando un imán. A continuación, se adicionan otros 5 mL de EtOH y se irradian con ultrasonidos durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se añaden 400 mg de la escuaramida **C12** (1,31mmol) disuelta en 15 mL de MeOH. La mezcla se agita en atmósfera inerte durante 12 h. Posteriormente, las NP ya funcionalizadas se separan de la disolución con la ayuda de un imán. Se lavan con MeOH (3 x 10 mL). Finalmente se dispersan en MeOH.

FT-IR (KBr): 3420, 2924, 1801, 1594, 1543, 1489, 1269, 1117, 588, 420 cm^{-1} .

2.8.5 ENSAYOS POR FLUORESCENCIA

Para realizar los ensayos por fluorescencia basados en el desplazamiento competitivo del indicador fluorescente, fluoresceína, se dispuso entre 5-20 mg de **NP-C4** y se dispersaron en 2 mL de una disolución de fluoresceína (2×10^{-5} M) tamponada a pH=8 (0,5 M Tris:HCl). La suspensión se irradió con ultrasonidos durante un minuto. Posteriormente se añadieron al medio de reacción, entre 5 y 40 mg de carboxilatos. La mezcla se agitó durante 30 minutos. Finalmente, las nanopartículas se aislaron mediante filtración magnética. La disolución remanente, más fluorescente que la inicial, se filtró con un filtro de teflón de 0,45 μ m, registrándose la intensidad de la fluorescencia de la disolución filtrada para cada muestra ($\lambda_{exc}=490$ nm; $\lambda_{em}=520$ nm).

2.8.6 ENSAYOS POR ^1H -RMN

2.8.6.1 ESTIMACIÓN DEL NÚMERO DE CADENAS DE ESCUARAMIDAS SOBRE LA SUPERFICIE DE LAS NANOPARTÍCULAS

Para determinar el número de cadenas de diescuaramida **C4** conjugadas a la superficie de las nanopartículas de hierro, se ensayó el siguiente método de análisis.

Aproximadamente 20 mg de nanopartículas de Fe_3O_4 , previamente caracterizadas por TEM para conocer su tamaño, se precipitaron y se lavan con EtOH (2 x 5 mL) utilizando un imán. A continuación, se adicionaron otros 5 mL de EtOH y se irradiaron con ultrasonidos durante 30 min. En este punto las nanopartículas se separaron de la disolución por centrifugación y se llevaron a sequedad. 10 mg exactos de las Fe_3O_4 lavadas se pusieron en contacto con una disolución de concentración conocida de la diescuaramida **C4** en EtOH (30 mg de **C4** en 15 mL EtOH). La suspensión se agitó en atmósfera inerte y en ausencia de luz durante 12 h. Posteriormente, las NP ya funcionalizadas se separaron de la disolución por centrifugación y se lavaron con EtOH (3 x 5 mL).

La disolución remanente de la reacción de conjugación de la diescuaramida con las NP, junto con los lavados se llevó a sequedad. El crudo resultante se re-disolvió en un volumen exacto de DMSO- d_6 (700 μ L). Una alícuota de esta disolución (200 μ L) se traspasó a un tubo de RMN donde se adicionó un patrón interno (1 μ L de CH_2Cl_2) como referencia para la posterior integración de las señales y la disolución se llevó a un volumen final de 600 μ L utilizando DMSO- d_6 .

Por otra parte, se preparó una disolución de concentración conocida de **C4** en este mismo disolvente. Para ello se pesaron 30 mg de **C4** y se disolvieron en 0,5 mL de DMSO- d_6 .

Siguiendo el método de adición estándar, inicialmente se registró el espectro de ^1H -RMN de la disolución de concentración desconocida de **C4**, y tras cada adición de alícuotas de la disolución de **C4** de concentración conocida se registró un nuevo espectro.

Para el tratamiento de datos se eligió la integral de la señal correspondiente a los N-metilos. En cada espectro se asignó un valor de 1H a la señal patrón de CH_2Cl_2 dado que

los moles o mg de este disolvente permanecen constantes a pesar de la variación del volumen. En cada espectro, incluso el inicial, se integró la señal de los N-metilos correspondientes y el valor de dichas integrales se representó frente a los mg de **C4** adicionados en cada punto (Figura 2.78).

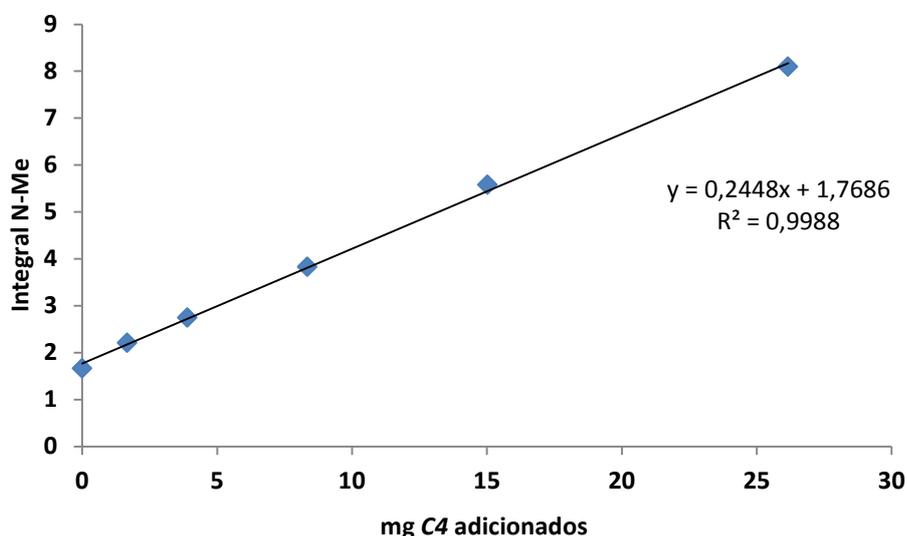


Fig. 2.78. Cuantificación de número de diacuaramidas unidas a NP de Fe_3O_4 .

Al extrapolar la recta obtenida ($y = 0$) se obtuvo, en valor absoluto, los mg iniciales de **C4** presentes en la disolución valorada. Recalculando este valor, por la dilución inicial, se pudo conocer los mg de **C4** que no se conjugaron a las nanopartículas. Comparando este valor con el de **C4** pesado y puesto a reaccionar inicialmente, permitió calcular la cantidad de **C4** unida a las nanopartículas.

A partir de los mg de **C4** conjugados se calcularon los moles y finalmente el número de cadenas multiplicando por el número de Avogadro.

Por otra parte, conociendo los tamaños de los núcleos de Fe_3O_4 a partir del TEM, se utilizaron las ecuaciones 2.1 y 2.2 para calcular el número de nanopartículas por mol de Fe_3O_4 . $1/N$ es el número de partículas en cada mol de Fe_3O_4 ; D es el diámetro promedio de las nanopartículas expresado en cm; ρ es la densidad del Fe_3O_4 ($5,196 \text{ g/cm}^3$) y PM es el peso molecular de Fe_3O_4 ($232,5 \text{ g/mol}$).

$$N = \frac{\pi}{6} \frac{D^3 \rho}{PM} \quad \text{Ecuación 2.1}$$

$$\frac{1}{N} = \frac{\text{nanopartículas}}{\text{molFe}_3\text{O}_4} \quad \text{Ecuación 2.2}$$

A partir del peso total de nanopartículas utilizado inicialmente (10 mg) se calcularon los moles de Fe_3O_4 . Al multiplicar este valor por $1/N$ se obtuvo el número total de nanopartículas utilizadas para conjugarse con **C4**.

Finalmente, dividiendo el número de cadenas de **C4** que reaccionaron entre el número total de nanopartículas calculado anteriormente se obtuvo el número de cadenas de **C4** sobre cada nanopartícula.

2.8.6.2 CUANTIFICACIÓN DE CARBOXILATOS RETENIDOS POR NANOPARTÍCULAS

Para la cuantificación de carboxilatos retenidos por las **NP-C4** se procedió de la siguiente manera. 5 mg exactos de nanopartículas de Fe_3O_4 previamente precipitadas, lavadas con EtOH y secadas, tal como se describió en el apartado anterior, se dispersaron en 2 mL de una disolución tamponada a pH= 8 de Tris: HCl 0,5 M. A continuación, la suspensión se irradió con ultrasonidos durante un minuto y posteriormente se añadieron 20 mg de cada uno de los carboxilatos ensayados de forma independiente disueltos en 1 mL de la misma disolución tamponada. La mezcla se agitó durante 30 minutos y las nanopartículas fueron aisladas mediante filtración magnética una vez transcurrido este tiempo y lavadas con 2 mL de H_2O . La disolución remanente de reacción y lavado se filtró y se tomó una alícuota de 3 mL para concentrar a sequedad. El sólido resultante de cada carboxilato se disolvió en 0,5 mL de D_2O con 2 μL de acetona como patrón interno.

Por otra parte se prepararon disoluciones de concentración conocida de cada carboxilato pesando entre 2 y 5 mg de cada uno de ellos respectivamente y disolviéndolos en 0,5 mL de D_2O con 2 μL de acetona como patrón interno también.

Se procedió a realizar los espectros de ^1H -RMN de la disolución de concentración desconocida y conocida de cada carboxilato respectivamente. A cada espectro se le asignó un valor de 1H a la señal de la acetona. Posteriormente para cada carboxilato se eligió una señal significativa en cada uno de los espectros (concentración conocida y desconocida) y comparando los valores de sus integrales se dedujo la concentración de carboxilato deseada. Recalculando este valor por las diluciones realizadas se obtuvo la cantidad de cada carboxilato no retenido, y por diferencia con la cantidad inicial, los mg retenidos por las nanopartículas **NP-C4**.

2.8.6.3 VALORACIONES DE **C13** CON Hg^{2+} y Pb^{2+}

Las valoraciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente utilizando CD_3CN como disolvente. La concentración de **C13** ($5 \times 10^{-3}\text{M}$) se mantuvo constante. Se realizaron un total de 25 adiciones de volúmenes crecientes de las correspondientes disoluciones de los iones metálicos (0,075M), registrando en cada punto el espectro de ^1H -RMN. El ajuste de los desplazamientos de los diferentes protones se realizó utilizando el programa HypNMR10 (Protonic Software, versión 2008).

2.8.7 ENSAYOS POR ITC

Para determinar el pK_a del compuesto **2.25** se llevó a cabo una valoración por ITC. En el ensayo, una disolución $1,3 \times 10^{-3}\text{M}$ de **2.25** fue valorada con una disolución estándar de HCl 0,01 M. La curva fue ajustada con el programa Origin 7.0.

2.8.8 ENSAYOS POR CROMATOGRAFÍA IÓNICA

Para realizar estos ensayos se utilizó una muestra de agua certificada (Riverwater Thames). Se llevó a cabo una dilución para que las concentraciones finales de aniones fueran adecuadas para su detección. Para ello, una alícuota de 25 mL se llevó a 100 mL totales utilizando H₂O MilliQ. 20 mg de **NP-C4** se pusieron en contacto con 15 mL de la disolución diluida preparada anteriormente. La mezcla se irradió con ultrasonidos durante un minuto y posteriormente se agitó durante 30 minutos. Las nanopartículas se aislaron mediante filtración magnética y la disolución remanente se filtró un filtro de teflón de 0,45 µm. La disolución resultante se analizó por cromatografía iónica bajo las condiciones descritas a continuación. Volumen de muestra inyectado: 25 µL. Columna: IonPac AS9-HC + IonPac AG9-HC. Eluyente: Disolución de carbonato 9,0 mM. Velocidad de flujo: 0,38 mL/min.

2.8.9 ENSAYOS PARA LA DETERMINACIÓN DE Hg²⁺ POR LA TÉCNICA DE VAPOR FRÍO

Para determinar la concentración de Hg²⁺ en las diferentes disoluciones tras haber estado en contacto con nanopartículas funcionalizadas con diescuaramidas, las disoluciones remanentes se filtraron un filtro de teflón de 0,45 µm. A 5 mL de cada disolución se le adicionó 1 mL de K₂Cr₂O₇ al 0,5% y posteriormente se diluyeron con HNO₃ al 2,5% hasta un volumen total de 10 mL. Las muestras se analizaron en un sistema MSFIA (Multisyringe flow injection analysis) a través de la técnica de vapor frío para la generación de hidruros detectados mediante fluorescencia atómica.

2.8.10 ENSAYOS PARA LA DETERMINACIÓN DE CATIONES METÁLICOS POR ICP-OES

Para determinar las concentraciones de los diferentes iones metálicos en las diferentes disoluciones tras haber estado en contacto con nanopartículas funcionalizadas con diescuaramidas, las disoluciones remanentes se filtraron un filtro de teflón de 0,45 µm. 1 mL de cada disolución se diluyó con HNO₃ al 2% hasta un volumen final de 10 mL para que las concentraciones finales de cada catión estuvieran en el rango de 1-1000 ppb. Finalmente, las muestras se analizaron por ICP utilizando un sistema de detección óptico.

2.8.11 ENSAYOS POR RMN: ¹⁹⁹Hg-RMN y ²⁰⁷Pb-RMN

Para realizar estos ensayos se prepararon inicialmente tubos de resonancia donde se disolvió Hg(ClO₄)₂ y Pb(ClO₄)₂ en CD₃CN respectivamente. Ambas disoluciones se utilizaron como patrones internos. Posteriormente, se prepararon disoluciones de **C13** + Hg(ClO₄)₂ y **C13** + Pb(ClO₄)₂ en proporción molar 3:1 también en CD₃CN y se registraron los correspondientes espectros de ¹⁹⁹Hg y ²⁰⁷Pb-RMN.

2.8.12 ENSAYOS POR HRMS-ESI(+)

Para la detección de complejos entre **C13** y los correspondientes iones metálicos en disolución se prepararon disoluciones en CH₃CN con una relación molar 1:1 entre la diescuaramida y el catión, manteniendo una concentración total no superior a 5 mg de

muestra en 10 mL totales de disolución. Las masas exactas encontradas tienen un error inferior a 5 ppm.

2.8.13 ENSAYOS POR MALDI/TOF

Para la detección de complejos entre **C13** y los correspondientes iones metálicos en fase gas se prepararon disoluciones en CH₃CN con una relación molar 1:1 entre la diescuaramida y el catión, manteniendo una concentración total no superior a 1 mg de muestra en 1 mL total de disolución. Se utilizaron 50 µL de DCTB (E-2-(3-(4-t-butil-fenil)-2-metil-2-propeniliden)malononitrilo) o DHB (ácido dihidroxibenzoico) como matriz y 10 µL de la disolución del complejo para cada determinación. Las masas exactas encontradas tienen un error inferior a 5 ppm.

3. NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE HIERRO COMO TRANSPORTADORES DE ANTIFOLATOS

3. NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE HIERRO COMO TRANSPORTADORES DE ANTIFOLATOS

3.1 NANOPARTÍCULAS COMO TRANSPORTADORES DE FÁRMACOS

A finales de los años setenta se comenzó a investigar el transporte de fármacos a través de nanopartículas. La principal limitación a la que se enfrentaba esta nueva estrategia era la no biocompatibilidad de los primeros materiales utilizados para su preparación (principalmente polímeros poliacrilamida¹⁹⁶ o polimetilmetacrilato¹⁹⁷), por lo que la aplicación de nanopartículas para la administración sistémica a humanos seguía siendo inaccesible. El desarrollo de nanodispositivos basados en materiales biocompatibles ha abierto el camino para aplicaciones clínicas principalmente en el campo de la oncología donde ya existen tratamientos aprobados y muchos más en desarrollo clínico y preclínico.¹⁹⁸

A pesar de los considerables progresos realizados en el diseño de nanopartículas dirigidas a tratar enfermedades específicas sólo una pequeña porción de ellas ha llegado al mercado ya que muchas no han sido capaces de mejorar la actividad de un gran número de fármacos. Esta nueva línea de investigación ha tenido que superar diversos problemas.¹⁹⁹ En primer lugar, la cantidad de fármaco transportado por las nanopartículas era baja, en general menos del 5% (% en peso del fármaco transportado con respecto al material de soporte). Esto se traducía en que la cantidad de fármaco administrado, en muchos casos, no era suficiente para alcanzar una concentración farmacológicamente activa en el cuerpo, o que la cantidad del material de soporte requerida era demasiado elevada, lo que conllevaba a una toxicidad o efectos secundarios indeseables. En segundo lugar la liberación del fármaco después de la administración era demasiado rápida. Como consecuencia de ello, una parte importante del fármaco se liberaba antes de llegar a su sitio diana en el organismo, lo cual se traducía en una menor actividad y más efectos secundarios.

Por este motivo, las líneas de investigación actuales buscan introducir mejores materiales y más compatibles a nivel biológico para el transporte de fármacos que puedan proporcionar una carga más eficiente y una liberación controlada de un gran número de compuestos prometedores para los que todavía no hay un sistema de transporte eficaz disponible.

En este sentido, el diseño de nanopartículas multifuncionales se ha planteado como otro reto en este campo. La combinación de diversos fármacos que actúen sobre dianas biológicas complementarias es un enfoque atractivo que podría dar lugar a una actividad

¹⁹⁶ P. Couvreur, P. Tulkens, M. Roland, A. Trouet, P. Speiser, *FEBS Lett.* **1977**, *84*, 323-326.

¹⁹⁷ G. Birrenbach, P.P. Speiser, *J. Pharm. Sci.* **1976**, *65*, 1763-1766.

¹⁹⁸ S. Sultana, M. R. Khan, M. Kumar, S. Kumar, M. Ali, *J. Drug Targ.* **2013**, *21*, 107-125.

¹⁹⁹ P. Couvreur, *Ad. Drug Del. Rev.* **2013**, *65*, 21-23.

terapéutica mejorada, mucho más efectiva que la actividad farmacológica individual de cada compuesto.²⁰⁰ La asociación de un fármaco y un agente de imagen en la misma nanopartícula para obtener simultáneamente un tratamiento personalizado y un diagnóstico es otro ejemplo de nanopartículas multifuncionales.²⁰¹

La mayoría de los esfuerzos de investigación en este campo, hasta ahora, se han centrado en el desarrollo de nanopartículas como nuevos soportes. Por el contrario, se le ha dedicado mucha menos atención al estudio de los tipos de moléculas terapéuticas que dichas nanopartículas pueden transportar así como sus posibles aplicaciones. Tomando como ejemplo el desarrollo de nanopartículas en quimioterapia, muchas de las investigaciones preclínicas y clínicas se han centrado en el transporte de fármacos como Doxorrubicina, Daunorrubicina (Daunomicina), Paclitaxel (Taxol) y Docetaxel (Figura 3.1).

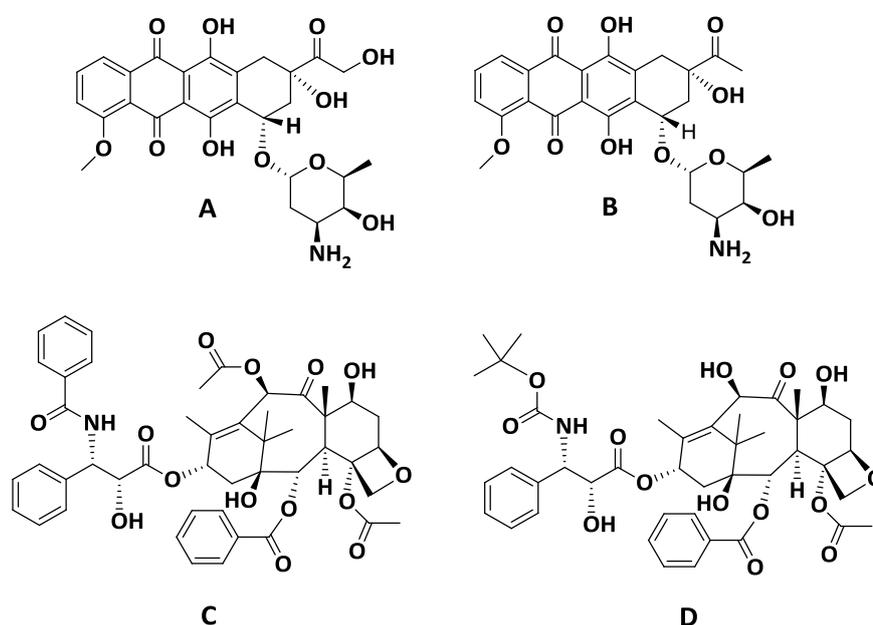


Fig. 3.1. Estructura química de A) Doxorrubicina, B) Daunorrubicina, C) Paclitaxel y D) Docetaxel. A y B pertenecen a la familia de las antraciclina, C y D pertenecen a la familia de los taxanos.

²⁰⁰ S. Sengupta, D. Eavarone, I. Capila, G. Zhao, N. Watson, T. Kiziltepe, R. Sasisekharan, *Nature* **2005**, 7050, 568-572.

²⁰¹ (a) J. L. Arias, L. H. Reddy, M. Othman, B. Gillet, D. Desmaële, F. Zouhiri, F. Dosio, R. Gref, P. Couvreur, *ACS Nano* **2011**, 22, 1513-1521; (b) F. Sonvico, S. Mornet, S. Vasseur, C. Dubernet, D. Jaillard, J. Degrouard, J. Hoebeke, E. Duguet, P. Colombo, P. Couvreur, *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16, 1181-1188; (c) O. Veiseh, C. Sun, J. Gunn, N. Kohler, P. Gabikian, D. Lee, N. Bhattarai, R. Ellenbogen, R. Sze, A. Hallahan, J. Olson, M. Zhang, *Nano Lett.* **2005**, 5, 1003-1008; (d) T. K. Jain, M. A. Morales, S. K. Sahoo, D. L. Leslie-Pelecky, V. Labhasetwar, *Mol. Pharm.* **2005**, 2, 194-205; (e) N. Kohler, G. E. Fryxell, M. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 7206-7211.

Las nanopartículas pueden ser diseñadas con precisión para poseer tamaño, forma, composición y propiedades superficiales únicas.²⁰² Por este motivo, su utilización como vehículos de transporte permite modificar algunas de las propiedades de los fármacos cargados, tales como solubilidad, respuesta inmunológica y estabilidad. Esta capacidad abre nuevas posibilidades para el desarrollo de compuestos terapéuticos.

El desarrollo de nuevos fármacos, tradicionalmente, se ha apoyado en modificaciones químicas para mejorar propiedades desfavorables de compuestos con actividad reconocida. Aunque estos cambios podían ser válidos, también podían comprometer su eficacia terapéutica y conducir a nuevas toxicidades. Así, el proceso tradicional para el desarrollo de fármacos conllevaba a la obtención de pocos compuestos eficaces y con buenos perfiles tanto farmacocinéticos como de toxicidad. Por el contrario, el uso de nanopartículas en combinación con estos compuestos podría disminuir estos inconvenientes sin la necesidad de efectuar modificaciones químicas. De esta forma, a través de las nanopartículas se podrían desarrollar nuevos tratamientos con fármacos que inicialmente se desecharon debido a problemas asociados a su distribución. Uno de los ejemplos más recientes en este campo fue aportado por Karve y Werner²⁰³ en 2012. En su investigación desarrollaron un tipo de nanopartículas a partir de un polímero lipídico en las que encapsularon Wortmanina (Wtmn). Este compuesto natural fue descubierto por primera vez hace más de cinco décadas y resultó ser un prometedor agente antineoplásico en estudios preclínicos, aunque posteriormente fue descartado debido a su baja solubilidad, estabilidad, y elevada toxicidad. Los autores demostraron que la combinación de Wtmn con nanopartículas mejoraba la solubilidad, estabilidad y toxicidad convirtiendo al dicho conjugado en un fármaco potencial (Figura 3.2).

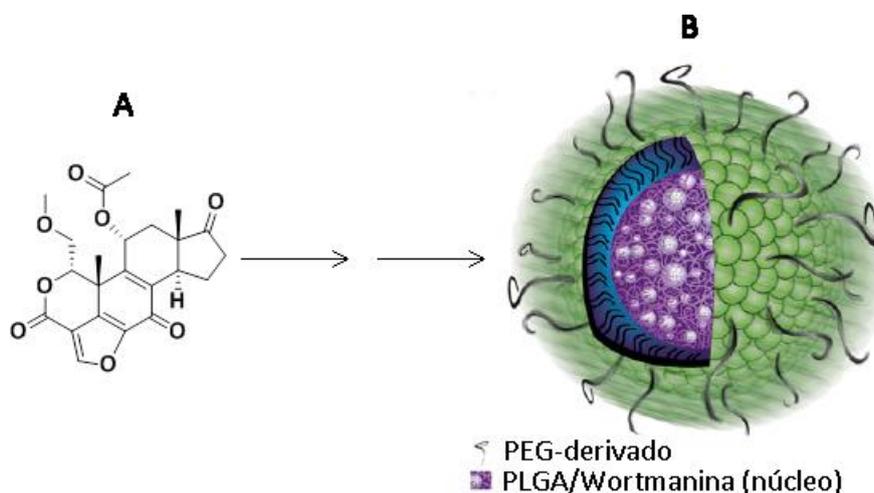


Fig. 3.2. A) Estructura química de la Wortmanina. B) Esquemización de nanopartículas lipídicas con Wortmanina encapsulada

²⁰² (a) S. Mitragotri, J. Lahann, *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 15-23; (b) M. C. Daniel, D. Astruc, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293-346; (c) F. X. Redl, C. T. Black, G. C. Papaefthymiou, R. L. Sandstrom, M. Yin, H. Zeng, C. B. Murray, S. P. O'Brien, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14583-14599.

²⁰³ S. Karve, M. E. Werner, R. Sukumar, N. D. Cummings, J. A. Copp, E. C. Wang, C. Li, M. Sethi, R. C. Chen, M. E. Pacold, A. Z. Wang, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 8230-8235.

3.2 NANOPARTÍCULAS COMO TRANSPORTADORES DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS

El cáncer se ha convertido en una de las principales causas de muerte entre las diferentes poblaciones del mundo²⁰⁴ y los tratamientos vigentes se limitan a la quimioterapia, la radiación, y cirugía. Es por este motivo que muchas de las líneas de investigación actuales en el área de la nanotecnología están encausadas en la búsqueda nuevos posibles tratamientos. El transporte de agentes anticancerígenos específicamente a los sitios de acción en las células tumorales es indispensable para maximizar el efecto antitumoral y reducir al mínimo los efectos secundarios sistémicos. Se han hecho progresos significativos en la modificación de diversos fármacos antineoplásicos²⁰⁵ utilizando diferentes sistemas transportadores²⁰⁶ para mejorar la liberación selectiva de estos agentes en las células tumorales.

La utilización de nanopartículas como vehículos para llegar a las células cancerígenas ha demostrado ventajas sobre otros sistemas. Por una parte, pueden ser localizadas directamente en las células tumorales mediante el uso de diferentes estrategias además de concentrar los fármacos para su posterior liberación controlada. Su tamaño nanométrico hace que sean adecuadas para inyección intravenosa, intramuscular y subcutánea reduciendo la irritación en el sitio de la inyección en comparación con las formulaciones convencionales.¹⁹⁸ Su tamaño también les permite interactuar con biomoléculas tanto en las superficies celulares como dentro de las células.²⁰⁷

Los procesos de transporte biológicos a nivel celular se ven afectados por las características físicas de los nano-vehículos utilizados, incluyendo tamaño, forma, flexibilidad, y por sus características químicas, por ejemplo, la capacidad para incorporar ligandos activos para el reconocimiento y la activación de los receptores biológicos. Por lo tanto, es importante preparar nanoestructuras con un alto grado de uniformidad, controlando sus características físicas y químicas. Las nanopartículas pueden ser construidas a partir de varios materiales (por ejemplo, polímeros, lípidos, metales) y pueden alojar una amplia gama de componentes activos, incluyendo agentes quimioterapéuticos, agentes de contraste, proteínas y ácidos nucleicos, para diversas aplicaciones biomédicas. En la Figura 3.3²⁰⁸ se muestra una representación de algunos tipos de nanopartículas propuestas para el diagnóstico tratamiento específico del cáncer.

²⁰⁴ A. Jemal, R. Siegel, E. Ward, T. Murray, J. Xu, C. Smigal, M. J. Thun, *CA Cancer J. Clin.* **2006**, *56*, 106-130.

²⁰⁵ T. Nomura, A. Saikawa, S. Morita, T. Sakaeda, F. Yamashita, K. Honda, Y. Takakura, M. Hashida, *J. Control. Release* **1998**, *52*, 239-252.

²⁰⁶ W. Junping, K. Takayama, T. Nagai, Y. Maitani, *Int. J. Pharm.* **2003**, *251*, 13-21.

²⁰⁷ S. E. McNei, *J. Leukoc. Biol.* **2005**, *78*, 585-594.

²⁰⁸ Imagen modificada de: Z. Li, J. C. Barnes, A. Bosoy, J. F. Stoddart, J. I. Zink, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2590-2605.

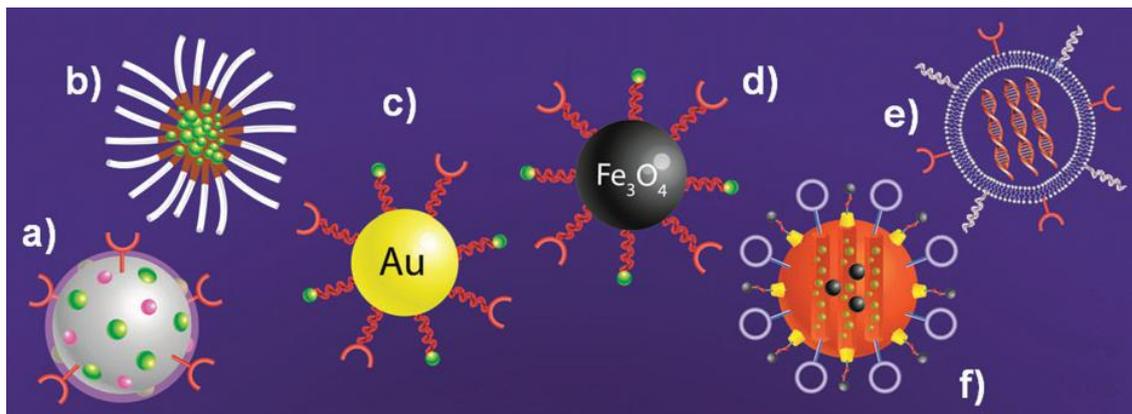


Fig. 3.3. Representación de varios tipos de nanopartículas para el diagnóstico y tratamiento selectivo de cáncer. Los ligandos conjugados para llegar al sitio diana específico se representan como círculos o semicírculos. Los fármacos transportados se representan como esferas verdes. Las esferas púrpuras representan agentes de contraste. Se esquematizan a) nanogeles poliméricos, b) micelas poliméricas, c) nanopartículas de oro, d) nanopartículas de óxidos de hierro, e) liposomas y f) mesoporos de sílica.

Las nanopartículas poliméricas²⁰⁹ han recibido gran interés debido a la versatilidad con la que sus estructuras pueden ser modificadas para empaquetar y entregar su carga en el sitio deseado de acción o para responder a los estímulos fisiológicos o externos específicos.

Dentro de este grupo de nanopartículas poliméricas hay que destacar las micelas. La estructura de estos compuestos supramoleculares (con un exterior hidrofílico y un núcleo hidrofóbico) se ha adaptado al transporte selectivo de fármacos debido a la facilidad tanto para modificar sus tamaños como para funcionalizar sus superficies, unido a su alta monodispersidad y estabilidad.^{179b} Los núcleos hidrofóbicos funcionan como medios adecuados para la incorporación de los fármacos mientras que el exterior hidrofílico aporta una gran estabilidad coloidal impidiendo la agregación. Se han planteado dos rutas para llevar el cabo el transporte de los fármacos utilizando micelas poliméricas: la conjugación y la encapsulación.

En la conjugación se utilizan fármacos no solubles en agua como núcleos hidrófobos de las micelas y éstos se unen a la cadena principal del polímero hidrófilo a través de linkers químicamente biodegradables²¹⁰ para la posterior liberación del fármaco. Por ejemplo, en 2006 Duncan²¹¹ estudió conjugados de polietilenglicol (PEG) con doxorubicina (DOX) a través de linkers peptídicos. En su estudio se investigaron diversos factores influyentes en la administración de fármacos como los perfiles de liberación, la citotoxicidad in vitro y la biodistribución respecto a la estructura lineal o ramificada de los polímeros PEG-DOX. Recientemente, Stenzel²¹² ha descrito la preparación de micelas poliméricas de diferentes tamaños a las que ha unido covalente un fármaco de platino

²⁰⁹ M. Elsabahy, K. L. Wooley, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2545-2561.

²¹⁰ F. M. Veronese, O. Schiavon, G. Pasut, R. Mendichi, L. Andersson, A. Tsirk, J. Ford, G. Wu, S. Kneller, J. Davies, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 775-784.

²¹¹ R. Duncan, *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 688-701.

²¹² W. Scarano, H. T. T. Duong, H. Lu, P. L. De Souza, M. H. Stenzel, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 962-975.

para determinar su actividad biológica frente a líneas celulares cancerígenas como A549 (adenocarcinoma de pulmón humano) y OVCAR-3 (adenocarcinoma de ovario humano). Los resultados mostraron una mayor actividad de las nanopartículas en OVCAR-3.

La encapsulación de los fármacos se produce a partir de emulsiones de los mismos en presencia de copolímeros anfifílicos. En estos casos, los fármacos quedan atrapados físicamente en el núcleo hidrofóbico de las micelas. El ácido poli(láctico-glicólico) (PLGA) es uno de los polímeros más utilizados para la encapsulación.²¹³ Sus enlaces éster que se hidrolizan dentro de la célula, permitiendo la liberación del fármaco. A modo de ejemplo, en 2008 Haam y Huh²¹⁴ prepararon nanopartículas de PLGA recubiertas con ácido hialurónico para encapsular DOX. Las nanopartículas mostraron una elevada actividad antitumoral frente a células humanas de cáncer de mama comparado con otras líneas no tumorales. Más recientemente, Tae²¹⁵ describió la preparación de nanopartículas de PLGA posteriormente funcionalizadas con chitosán o heparina. Con esta funcionalización se logró mejorar la eficiencia relativamente de las nanopartículas de PLGA solas para la entrada y acumulación en tumores. Los ensayos se realizaron in vivo en ratones con tumores y se demostró que la acumulación de PLGA-chitosán y PLGA-heparina era 2,4 y 2,2 veces mayor respectivamente que PLGA sola. En otros estudios publicados se han utilizado múltiples anillos de benceno como núcleo hidrofóbico. Si los fármacos también presentan anillos de benceno, las interacciones π - π que se establezcan pueden afectar tanto la encapsulación como los perfiles de liberación de dicho fármaco.²¹⁶

Dentro de las nanopartículas poliméricas también se encuentran las vesículas bicapa que corresponden a lípidos, copolímeros o similares con una porción hidrofóbica y otra hidrofílica con la capacidad de autoensamblarse para formar vesículas. La principal diferencia con las micelas es que el núcleo continúa siendo hidrofílico por lo que son adecuadas para transportar fármacos o biomateriales solubles en agua.²¹⁷

A nivel clínico se han obtenido progresos significativos y actualmente varias formulaciones se han aprobado para su uso en nanomedicina y otras están en fases clínicas avanzadas. En la tabla que se presenta a continuación se resumen las principales nanopartículas poliméricas aprobadas para la terapia anticancerígena.

²¹³ (a) S. Acharya, S. K. Sahoo, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 170-183; (b) S. W. Jung, Y. L. Jeong, Y. H. Kim, K. C. Choi, S. H. Kim, *J. Microencapsul.* **2005**, *22*, 901-911.

²¹⁴ W. Hyung, H. Ko, J. Park, E. Lim, S. B. Park, Y. Park, H. G. Yoon, J. S. Suh, S. Haam, Y. Huh, *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *99*, 442-454.

²¹⁵ Y. Chung, J. C. Kim, Y. H. Kim, G. Tae, S. Lee, K. Kim, I. C. Kwon, *J. Control. Release* **2010**, *10*, 374-382.

²¹⁶ E. Lim, Y. Huh, J. Yang, K. Lee, J. Suh, S. Haam, *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 2436-2442.

²¹⁷ (a) D. D. Lasic, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 1685-1698; (b) P. Tanner, P. Baumann, R. Enea, O. Onaca, C. Palivan, W. Meier, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 1039-1049.

Tabla 3.1. Nanopartículas poliméricas aprobadas para su uso en clínica.

Nombre	Indicación	Compuesto activo
Abraxane ^{212,218}	Varios tipos de cáncer de mama metastásicos.	Paclitaxel-Albúmina
Transdrug ²¹⁹	Hepatocarcinoma	Doxorrubicina
Doxil ^{218,220}	Cáncer de ovario, varios tipos de cáncer de mama metastásicos y Sarcoma Kaposi	Doxorrubicina encapsulada en liposomas recubiertos con PEG
Myocet ²²¹	Cáncer de mama	Doxorrubicina encapsulada en liposomas sin PEG
Daunoxone ²¹⁸	Sarcoma Kaposi	Daunorrubicina encapsulada en liposomas
Caelyx ²²²	Cáncer de ovario y mama metastásico, Sarcoma Kaposi	Doxorrubicina
Mylotarg ²²³	Leucemia mielógena aguda	Anti-CD33 conjugado con Gemtuzumab ozogamicin
Zevalin ²²⁴	Linfoma No-Hodking (Radioterapia)	IgG1 (ibritumomab) conjugado con un agente quelante (tiuxetan) con un isótopo radioactivo (⁹⁰ Y) incorporado.
Bexxar ²²⁵	Linfoma No-Hodking (Radioterapia)	IgG2a (tosiumomab) conjugado al isótopo radioactivo ¹³¹ I.

²¹⁸ (a) F. Danhier, O. Feron, V. Préat, *J. Control. Release* **2010**, *148*, 135-146; (b) M. Davis, Z. Chen, D. Shin, *Nature Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 771-782.

²¹⁹ S. Kim, K. Park, *Polymer micelles for drug delivery*, CRC Press (Taylor and Francis Group), Boca Ratón, FL, USA, Chapter 19, pp 513-543.

²²⁰ (a) Z. Symon, A. Peyser, D. Tzemach, O. Lyass, E. Sucher, E. Shezen and A. Gabizon, *Cancer* **1999**, *86*, 72-78; (b) J. Huwyler, J. Drewe, S. Krahënühl, *Int. J. Nanomedicine* **2008**, *3*, 21- 29; (c) P. Ma, R. J. Mumper, *Nano Today* **2013**, *8*, 313-331.

²²¹ E. Curtit, P. Nouyrgat, N. Dohollou, E. Levy, A. Lortholary, J. Gligorov, T. Facchini, D. Jaubert, N. Maille, X. Pivot, V. Grangé, L. Cals, *Eur. J. Cancer* **2011**, *47*, 2396-2402.

²²² P. Zarogoulidis, M. Mavroudi, K. Porpodis, K. Domvri, A. Sakkas, N. Machairiotis, A. Stylianaki, A. Tsiotsios, N. Courcoutsakis, K. Zarogoulidis, *OncoTargets and Therapy* **2012**, *5*, 231-236.

²²³ (a) M. Jawad, N. Yu, C. Seedhouse, K. Tandon, N. H. Russell, M. Pallis, *BMC Cancer* **2012**, *12*, 431-445; (b) K. Naito, A. Takeshita, K. Shigeno, S. Nakamura, S. Fujisawa, K. Shinjo, H. Yoshida, K. Ohnishi, M. Mori, S. Terakawa, R. Ohno, *Leukemia* **2000**, *14*, 1436-1443.

²²⁴ (a) B. L. Schlechter, S. M. Kim, R. M. Joyce, *Int. J. Hematol. Oncol.* **2013**, *2*, 163-178; (b) D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, *Nanotechnology* **2007**, *2*, 751-760.

²²⁵ I. Navarro-Teulon, C. Lozza, A. Pelegrin, E. Vives, J.-P. Pouget, *Immunotherapy* **2013**, *5*, 467-487.

Diversas nanopartículas de materiales inorgánicos, por ejemplo, óxidos de hierro,^{58,226} oro,²²⁷ sílica²⁰⁸ y mixtas²²⁸ también han utilizado para aplicaciones biomédicas. Controlar las interacciones entre estas nanopartículas y los biosistemas es esencial para su uso en biomedicina. Utilizando diferentes estrategias, estas nanopartículas se han funcionalizado con una variedad de ligandos, tales como moléculas pequeñas, surfactantes, polímeros, dendrímeros, y biomoléculas. Estas estructuras han permitido incorporar múltiples compuestos terapéuticos o biomacromoléculas²²⁹ por conjugación covalente o no covalente para posteriormente evaluar su comportamiento frente a sistemas vivos tanto *in vitro* como *in vivo*.²³⁰ La facilidad para llevar a cabo dichas funcionalizaciones ha permitido crear nanopartículas híbridas óptimas para su aplicación en clínica.

Por ejemplo, Pérez²³¹ en 2009 describió la preparación de nanopartículas multifuncionales de óxido de hierro que permitían ser utilizadas para la obtención de imágenes ópticas y por resonancia magnética además de como un tratamiento selectivo de ciertos tipos de cáncer. Las nanopartículas con un núcleo de Fe₃O₄ eran recubiertas en un primer paso con el polímero PAA (ácido poliacrílico). Las cavidades hidrofóbicas de la matriz polimérica del PAA se utilizaron para encapsular un colorante lipofílico y un compuesto anticancerígeno también hidrofóbico: Taxol (Figura 3.1C). Finalmente, a través de química clic las nanopartículas se funcionalizaron con ácido fólico para permitir la entrada selectiva en células cancerígenas con receptores de ácido fólico sobre-expresados. Las nanopartículas demostraron ser efectivas para la obtención de imágenes por fluorescencia (debido al colorante fluorescente) y por resonancia magnética (por el núcleo de Fe₃O₄). Además se evidenció una notable disminución en la viabilidad celular de la línea tumoral A549 al ser ensayada con dichas nanopartículas, mientras que células de cardiomiocito humanas (H9c2) igualmente tratadas no se vieron afectadas. Análogamente, en 2013 Wang y Guo²³² sintetizaron nanopartículas multifuncionales con la misma intención. En este caso el núcleo de γ -Fe₂O₃ inicialmente se recubrió con una capa de sílica dopada con el colorante fluorescente Rodamina 6G (R6G). Posteriormente las nanopartículas se modificaron con ácido 4-oxo-4-(3-(trietoxisilil)propilamino)butanoico (OTPBA) para aportar ácidos carboxílicos a la superficie que permitieran la

²²⁶ M. Mahmoudi, H. Hofmann, B. Rothen-Rutishauser, A. Petri-Fink, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 2323-2338.

²²⁷ (a) E. C. Dreaden, A. M. Alkilany, X. Huang, C. J. Murphy, M. A. El-Sayed, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2740-2779; (b) L. Dykmana, N. Khlebtsov, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2256-2282; (c) A. Llevota, D. Astruc, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 242-257.

²²⁸ (a) J. H. Maeng, D.-H. Lee, K. H. Jung, Y.-H. Bae, I.-S. Park, S. Jeong, Y.-S. Jeon, C.-K. Shim, W. Kim, J. Kim, J. Lee, Y.-M. Lee, J.-H. Kim, W.-H. Kim, S.-S. Hong, *Biomaterials* **2010**, *31*, 4995-5006; (b) B.-Q. Lu, Y.-J. Zhu, G.-F. Cheng, Y.-J. Ruan, *Mat. Lett.* **2013**, *104*, 53-56.

²²⁹ K. E. Sapsford, W. R. Algar, L. Berti, K. B. Gemmill, B. J. Casey, E. Oh, M. H. Stewart, I. L. Medintz, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 1904-2074.

²³⁰ D. F. Moyano, V. M. Rotello, *Langmuir* **2011**, *27*, 10376-10385; (b) S. Rana, A. Bajaj, R. Mout, V. M. Rotello, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *64*, 200-216.

²³¹ S. Santra, C. Kaittanis, J. Grimm, J. M. Pérez, *Small* **2009**, *5*, 1862-1868.

²³² J. Wang, X. Wang, Y. Song, C. Zhu, J. Wang, K. W. Z. Guo, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2786-2788.

coordinación con el compuesto terapéutico cis-monoclorodiaminoplatino (II) (CMDP). La capacidad antitumoral de las nanopartículas fue probada en las líneas A549 y A549R resistentes al cisplatino (A549R). El nanocompuesto resultó ser más citotóxico que el cisplatino frente a A549R demostrando su potencial para superar la resistencia al cisplatino que presentan estas células. Como ventaja adicional se planteó que tanto la distribución celular como la acumulación del fármaco podían ser monitoreadas por imágenes de fluorescencia *in vitro* e *in vivo*.

Este tipo de nanopartículas que permiten ser utilizadas tanto para el tratamiento como para el diagnóstico de diversos tipos de cáncer han sido clasificadas como “teracnósticas”, proveniente de los términos en inglés “therapy + diagnostic”. Además de los ejemplos ya mencionados, muchos otros sistemas de este tipo, basados en nanopartículas de óxidos de hierro, se han descrito en la bibliografía.²³³

Las investigaciones actuales basadas en la utilización de nanopartículas como transportadoras de fármacos antineoplásicos se centran en lograr cada vez más una especificidad que permita distinguir un tejido u órgano sano de uno tumoral a través de diferentes estrategias. Así, cada vez se encuentran más publicaciones donde en vez de hablar de tratamientos antineoplásicos en general se habla de tratamientos selectivos para cáncer de mama,²³⁴ gliomas,²³⁵ cáncer de próstata, etc.

²³³ (a) H. He, A. David, B. Chertok, A. Cole, K. Lee, J. Zhang, J. Wang, Y. Huang, V. C. Yang, *Pharm. Res.* DOI 10.1007/s11095-013-0982-y; (b) M. I. Majeed, Q. Lu, W. Yan, Z. Li, I. Hussain, M. N. Tahir, W. Tremel, B. Tan, *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 2874-2884; (c) G. Y. Lee, W. P. Qian, L. Wang, Y. A. Wang, C. A. Staley, M. Satpathy, S. Nie, H. Mao, L. Yang, *ACS Nano* **2013**, *7*, 2078-2089; (d) B. Sahoo, K. S. P. Devi, R. Banerjee, T. K. Maiti, P. Pramanik, D. Dhara, *Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 3884-3893; (e) M. Howell, C. Wang, A. Mahmoud, G. Hellermann, S. S. Mohapatra, S. Mohapatra, *Drug Deliv. Transl. Res.* **2013**, *3*, 352-363.

²³⁴ (a) J.-O. You, P. Guo, D. T. Auguste, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4141-4146; (b) A. Marcu, S. Pop, F. Dumitrache, M. Mocanu, C. M. Niculite, M. Gherghiceanu, C. P. Lungu, C. Fleaca, R. Ianchis, A. Barbut, C. Grigoriu, I. Morjan, *App. Surf. Sci.* **2013**, *281*, 60-65.

²³⁵ (a) N. Y. Hernández-Pedro, E. Rangel-López, R. Magaña-Maldonado, V. Pérez de la Cruz, A. Santamaría del Angel, B. Pineda, J. Sotelo, *BioMed Res. Int.* <http://dx.doi.org/10.1155/2013/351031>; (b) D. Le Broc-Ryckewaert, R. Carpentier, E. Lipka, S. Daher, C. Vaccher, D. Betbeder, C. Furman, *Int. J. Pharmaceut.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.05.018>.

3.3 NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE HIERRO COMO TRANSPORTADORES DE ANTIFOLATOS

En los últimos años, las nanopartículas de óxido de hierro se han utilizado como soportes para aumentar y mejorar el contraste de imágenes por resonancia magnética,^{7a,236} además de como transportadores de fármacos en quimioterapia.¹ La mayoría de estas nanopartículas están funcionalizadas con ligandos dirigidos a llevar fármacos antineoplásicos específicamente a las células cancerígenas.

Una de las estrategias utilizadas para facilitar la entrada en las células de los compuestos antitumorales es la conjugación de ácido fólico (FA) a las nanopartículas.²³⁷ La eficacia de esta estrategia se debe a que los receptores de folato (FR) están sobre-expresados en las membranas celulares de muchas células cancerígenas en comparación con los tejidos normales.²³⁸ La sobre-expresión de los FR se asocia a diversos tipos de cáncer humanos, por ejemplo, de ovario, endometrio, colorrectal, mama, pulmón, renal y cerebral. Dicho receptor tiene dos isoformas α y β . FR- α se encuentra frecuentemente sobre-expresado en cánceres epiteliales, mientras que la expresión de FR- β se relaciona con la leucemia mieloide y los macrófagos asociados a enfermedades inflamatorias crónicas.²³⁹ Basándose en la elevada afinidad del folato por FR ($K_d \sim 10^{-10}$ M) diversos transportadores (liposomas, micelas, nanopartículas inorgánicas, etc.) han conjugado FA a sus superficies para entrar a las células tumorales por endocitosis a través de estos receptores.²⁴⁰

La entrada a las células de los conjugados de FA a través de los FR se esquematiza en la Figura 3.4. En primer lugar el derivado de FA se une al receptor FR debido a la elevada afinidad entre ambos (1) lo que permite su internalización por endocitosis (2). En los

²³⁶ (a) J. R. McCarthy, R. Weissleder, *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2008**, *60*, 1241-1251; (b) O. Veisoh, J. W. Gunn, M. Zhang, *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2010**, *62*, 284-304; (c) D.-E. Lee, H. Koo, I.-C. Sun, J. H. Ryu, K. Kim, I. C. Kwon, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2656-2672; (d) C. I. Olariu, H. H. P. Yiu, L. Bouffier, T. Nedjadi, E. Costello, S. R. Williams, C. M. Halloran, M. J. Rosseinsky, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 12650-12659.

²³⁷ (a) F. Sonvico, S. Mornet, S. Vasseur, C. Dubernet, D. Jaillard, J. Degrouard, J. Hoebeke, E. Duguet, P. Colombo, P. Couvreur, *Bioconjug. Chem.* **2005**, *16*, 1181-1188; (b) B. Stella, V. Marsaud, S. Arpicco, G. Geraud, L. Cattel, P. Couvreur, J.-M. Renoir, *J. Drug Target.* **2007**, *15*, 146-153; (c) Y. Wang, Y. Wang, J. Xiang, K. Yao, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 3531-3538; (d) S. P. Chakraborty, S. K. Mahapatra, S. K. Sahu, P. Pramanik, S. Roy, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2011**, *1*, 29-38; (e) G. Zuber, L. Zammuto-Italiano, E. Dauty, J.-P. Behr, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2666-2669.

²³⁸ (a) X. Pan, R. Lee, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2004**, *1*, 7-17; (b) F. Sirotnak, B. Tolner, *Annu. Rev. Nutr.* **1999**, *19*, 91-122; (c) A. Gabizon, A. Horowitz, D. Goren, D. Tzemach, F. Mandelbaum-Shavit, M. Qazen, S. Zalipsky, *Bioconjug. Chem.* **1999**, *10*, 289-298; (d) S. D. Weitman, R. H. Lark, L. R. Coney, D. W. Fort, V. Frasca, V. R. Zurawski, *Cancer Res.* **1992**, *52*, 3396-3401.

²³⁹ X. Zhao, H. Li, R. J. Lee, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2008**, *5*, 309-319.

²⁴⁰ (a) R. Lee, P. Low, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 3198-3204; (b) C. J. Mathias, S. Wang, R. J. Lee, D. J. Waters, P. S. Low, M. A. Green, *J. Nucl. Med.* **1996**, *37*, 1003-1008; (c) W. Gao, B. Xiang, T.-T. Meng, F. Liu, X.-R. Qi, *Biomaterials* **2013**, *34*, 4137-4149.

endosomas se rompen las interacciones del derivado de FA con el receptor (3). Posteriormente los endosomas se fusionan con lisosomas que contienen proteasas a un pH bajo permitiendo la liberación del fármaco (3). Finalmente el fármaco pasa al citoplasma donde ejerce su actividad celular (4) y el receptor se recicla hacia la superficie de la célula (5).

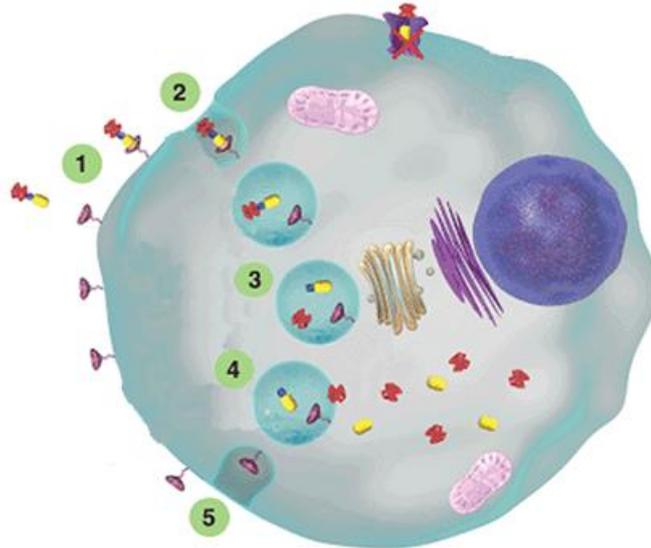


Fig. 3.4. Representación esquemática de la entrada de conjugados de FA a través de los FR por endocitosis.²⁴¹

Basándose en esta misma estrategia, algunos compuestos estructuralmente similares al FA conocidos como antifolatos, por ejemplo metotrexato (MTX), raltitrexed (RTX) y pemetrexed (PTX), se han utilizado en quimioterapia. En la Figura 3.5 se pueden observar las estructuras químicas de estos compuestos. Todos ellos tienen en común un ácido dicarboxílico terminal (en rojo), un derivado de pteridina en el otro extremo (en azul) y un derivado del ácido *para*-aminobenzoico en la parte central (en negro).

²⁴¹ Figura modificada de Endocyte Inc: www.endocyte.com

3. Nanopartículas de óxidos de hierro como transportadores de antifolatos

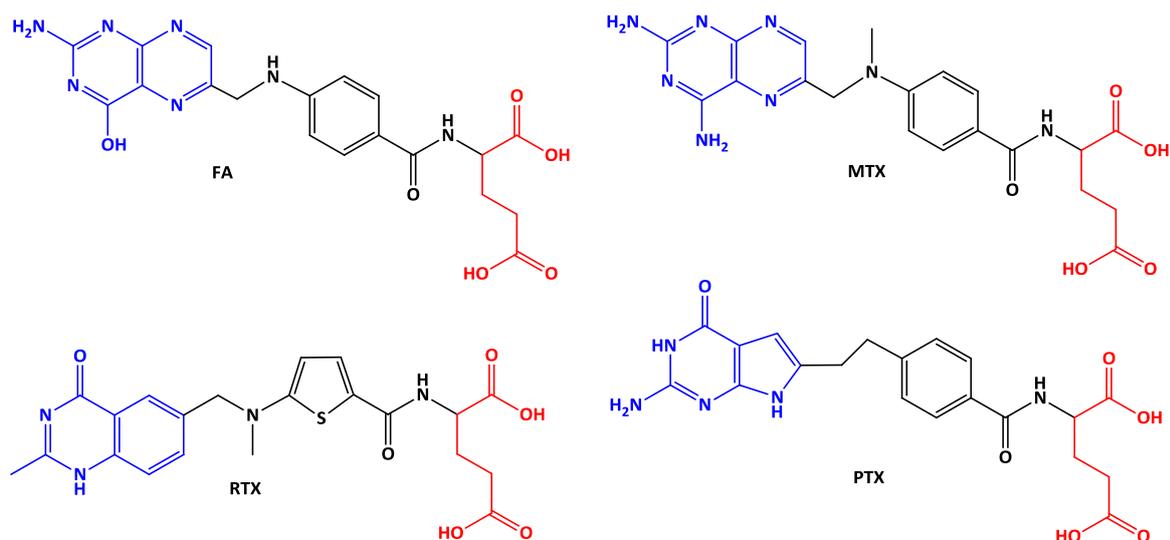


Fig. 3.5. Estructuras químicas de FA y antifolatos. Se han destacado con diferentes colores las similitudes más remarcables de estos compuestos entre sí.

Estos compuestos, una vez dentro de la célula actúan como inhibidores competitivos del enzima dihidrofolato reductasa y/o timidilato sintasa deteniendo así el ciclo del ácido fólico y por tanto disminuyendo la viabilidad celular.

A pesar de la potencial actividad citostática de estos compuestos y de la capacidad de las nanopartículas como plataformas para transportar fármacos, únicamente se ha estudiado el efecto citotóxico de la conjugación de nanopartículas con MTX, debido a que este antifolato fue de los primeros en utilizarse como agente antitumoral.²⁴²

En general para el transporte de fármacos por parte de las nanopartículas se han desarrollado dos enfoques diferentes:^{237c,243}

- ✓ El primero de ellos consiste en acoplar los fármacos de forma covalente a la superficie de las nanopartículas mediante linkers apropiados.
- ✓ El segundo consiste en la adsorción física, interacción electrostática y/o formación de enlaces de hidrógeno entre moléculas unidas a las nanopartículas y a los fármacos en cuestión.

La unión covalente requiere ruptura directa del enlace químico entre el fármaco y el linker unido a la superficie de la nanopartícula. La correcta elección del linker puede dar

²⁴² (a) N. Kohler, C. Sun, J. Wang, M. Zhang, *Langmuir* **2005**, *21*, 8858-8864; (b) K. Wosikowski, E. Biedermann, B. Rattel, N. Breiter, P. Jank, R. Löser, G. Jansen, G. Peters, *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 1917-1926; (c) Y. Zhang, T. Jin, R.-X. Zhuo, *Colloids Surf. B: Biointerf.* **2005**, *44*, 104-109; (d) N. Kohler, C. Sun, A. Fichtenholtz, J. Gunn, C. Fang, M. Zhang, *Small* **2006**, *2*, 785-792; (e) Y.-H. Chen, C.-Y. Tsai, P.-Y. Huang, M.-Y. Chang, P.-C. Cheng, C.-H. Chou, D.-H. Chen, C.-R. Wang, A.-L. Shiau, C.-L. Wu, *Mol. Pharm.* **2007**, *4*, 713-722; (f) R. Dhanikula, A. Argaw, J.-F. Bouchard, P. Hildgen, *Mol. Pharm.* **2008**, *5*, 105-116; (g) X. Yang, Q. Zhang, Y. Wang, H. Chen, H. Zhang, F. Gao, L. Liu, *Colloids Surf. B: Biointerf.* **2008**, *61*, 125-131; (h) D.-H. Seo, Y.-I. Jeong, D.-G. Kim, M.-J. Jang, M.-K. Jang, J.-W. Nah, *Colloids Surf. B: Biointerf.* **2009**, *69*, 157-163; (i) R. C. Huxford, K. K. E. de, W. S. Boyle, D. Liu, W. Lin, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 198-204.

²⁴³ (a) Y.-C. Chen, W.-F. Lee, H.-H. Tsai, W.-Y. Hsieh, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2012**, *100A*, 1279-1292; (b) J. Yang, J. Lee, J. Kang, S. J. Oh, H.-J. Ko, J.-H. Son, K. Lee, J.-S. Suh, Y.-M. Huh, S. Haan, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 1-4.

lugar a la liberación específica del fármaco por acción de un sistema enzimático, térmico o inducido por el pH. Esta metodología es la más utilizada porque además de la selectividad anteriormente mencionada la fortaleza del enlace hace que los derivados nanopartícula-fármaco sean altamente estables.

La unión de fármacos de forma no covalente requiere un entorno que estabilice el fármaco eficazmente hasta que éste se libere, lo cual en ocasiones puede resultar difícil. No obstante esta metodología de transporte tiene algunas ventajas únicas. En primer lugar, los fármacos utilizados no necesitan ser modificados químicamente de modo que se conserva su eficacia terapéutica. Además, una vez optimizado el transporte no covalente de un cierto fármaco se puede aplicar a otros fármacos con propiedades similares, lo que permite una evaluación más amplia de la función las nanopartículas en ensayos in vivo.²⁴⁴ Estas interacciones requieren compuestos aptos para establecer interacciones electrostáticas o con notable capacidad donador-aceptor de enlaces de hidrógeno.

En esta línea, las escuaramidas son compuestos idóneos debido a su capacidad para establecer este tipo de asociaciones.^{119h,128,165,245} En un trabajo previo se ha descrito un receptor escuaramídico abiótico para folatos con afinidad lo suficientemente alta como para detectar específicamente FA, MTX, PTX y RTX en agua.¹²⁹

Los derivados escuaramídicos con grupos tetraalquilamonio, se coordinan fuertemente con aniones debido a la acción cooperativa de interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno. En el capítulo anterior, se demostró que la conjunción entre diescuaramidas y nanopartículas podía actuar como un receptor selectivo para ciertos carboxilatos (mono y dicarboxilatos).²⁴⁶ Por tanto, se podría pensar que la combinación entre nanopartículas y escuaramidas podría utilizarse como transportador de antifolatos tal como se esquematiza en la Figura 3.6.

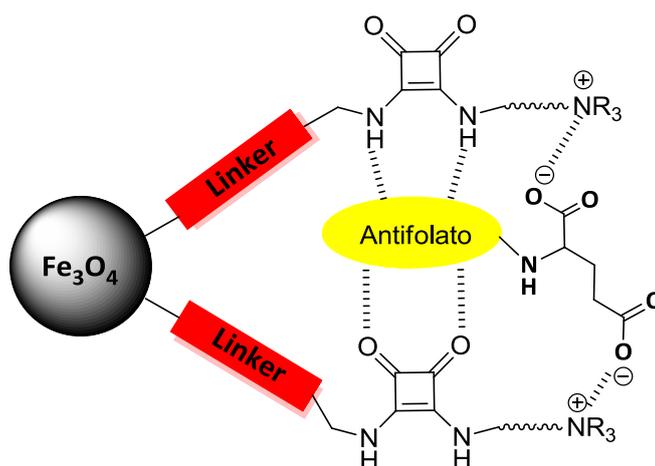


Fig. 3.6. Esquematización de las interacciones entre antifolatos y derivados escuaramídicos.

²⁴⁴ T. L. Doane, C. Burda, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2885-2911.

²⁴⁵ R. I. Storer, C. Aciro, L. H. Jones, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2330-2346.

²⁴⁶ K. A. López, M. N. Piña, J. Morey, *Sens. Actuators B Chem.* **2013**, *181*, 267-273.

3.4 OBJETIVOS

Dados los antecedentes presentados en los apartados anteriores, en este trabajo se decidió evaluar la capacidad de las nanopartículas de óxidos de hierro como vehículos para el transporte de antifolatos, tanto de forma covalente como a través de interacciones electrostáticas o enlaces de hidrógeno, estudiando para cada estrategia la eficacia antitumoral con una línea celular. Para ello, se plantearon los objetivos específicos que se detallan a continuación.

1. Síntesis y caracterización de nanopartículas de óxidos de hierro (Fe_3O_4) conjugadas con antifolatos de forma covalente a través de un linker apropiado. La caracterización de las nanopartículas funcionalizadas se realizará mediante FT-IR, TEM, DLS y Espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDX).
2. Síntesis y caracterización de nanopartículas de óxido de hierro (Fe_3O_4) funcionalizadas al mismo tiempo con diescuaramidas y ácido meso 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) para la posterior inclusión de antifolatos. La síntesis para la introducción de ambas funcionalidades se realizará en un solo paso y la caracterización se llevará a cabo a través de las técnicas de FT-IR, TEM, DLS, EDX y Zeta potencial.
3. Evaluación de la capacidad de liberación de antifolatos unidos covalentemente a la superficie de las nanopartículas a través de la acción de proteasas. Para ello se llevará a cabo un ensayo *in vitro* simulando las condiciones lisosomales intracelulares a diferentes pH y períodos tiempos. La liberación de cada fármaco se cuantificará a través de Cromatografía Líquida a Alta Presión (HPLC).
4. Evaluación y cuantificación de la capacidad de retención de antifolatos que presentan las nanopartículas funcionalizadas con diescuaramidas y DMSA. Los ensayos se realizarán a un pH específico y la cuantificación se efectuará mediante HPLC.
5. Estudio y cuantificación de la liberación de antifolatos previamente retenidos en las nanopartículas funcionalizadas con diescuaramidas y DMSA. En este caso se evaluará la función del pH en la liberación de los fármacos y se cuantificará a través de HPLC.
6. Estudio de la potencial citotoxicidad *in vitro* de las diferentes nanopartículas transportadoras de antifolatos, comparando la eficacia de las dos estrategias implementadas: inclusión y covalente. Para los ensayos de viabilidad celular se utilizarán células humanas de adenocarcinoma de pulmón (A549) haciendo uso del ensayo de MTT para cuantificar la inhibición provocada por las nanopartículas.
7. Comparar la citotoxicidad de los antifolatos transportados a través de las estrategias covalente y de inclusión con los fármacos solubles. Para ello se

3. Nanopartículas de óxidos de hierro como transportadores de antifolatos

realizarán ensayos *in vitro* con las células A549 donde, tras la incubación con las nanopartículas correspondientes, se cuantificará la concentración de hierro intracelular para determinar la cantidad de nanopartículas en el interior celular.

3.5 ESTRATEGIA DE INCLUSIÓN VS UNIÓN COVALENTE EN EL TRANSPORTE DE ANTIFOLATOS A TRAVÉS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE HIERRO

Tal como se ha planteado anteriormente, en este trabajo se decidió comparar la inclusión frente a la unión covalente en el transporte de antifolatos mediado por nanopartículas de óxidos de hierro. Así, por una parte, se prepararon nanopartículas de Fe_3O_4 covalentemente unidas a RTX y PTX, dado que esta conjunción y su eficacia antitumoral no habían sido investigadas, y por otra parte, para establecer las interacciones no covalentes con RTX, PTX y MTX se sintetizaron nanopartículas funcionalizadas con escuaramidas similares a las descritas en el capítulo anterior. Finalmente, la eficacia antitumoral de las diferentes nanopartículas fue ensayada en células de adenocarcinoma de pulmón humano (A549), caracterizadas por su sobre-expresión de los receptores de FA en las membranas celulares.^{238,247}

El primer paso en este estudio fue la síntesis de nanopartículas de magnetita por el método de descomposición térmica desarrollado por Sun.^{33,34a} En este caso se prepararon nanopartículas de aproximadamente 4-6 nm. Para ello inicialmente se agitó en atmósfera inerte, durante 20 min una mezcla de acetilacetato de hierro (III), oleilamina, ácido oleico y 1,2-hexadecanodiol en difeniléter. Seguidamente, en una primera etapa la mezcla se calentó hasta los 200 °C durante 30 min y posteriormente se llevó a reflujo (265 °C) durante 30 min más, manteniendo en todo momento la agitación magnética vigorosa y la atmósfera inerte.

La unión covalente de los antifolatos RTX y PTX a las nanopartículas (esquematizada en la Figura 3.7) se realizó siguiendo una metodología previamente descrita con algunas modificaciones.^{242a} En un primer paso se llevó a cabo la funcionalización de las nanopartículas de Fe_3O_4 con APTES^{155,156} utilizando como disolvente tolueno y la mezcla se irradió con ultrasonidos durante 4 h a 60 °C. Posteriormente, el acoplamiento de los antifolatos se efectuó por formación de un enlace amidíco entre la amina terminal del linker y los ácidos carboxílicos activados de RTX y PTX. Esta reacción tuvo lugar utilizando DMSO/ H_2O como disolvente en presencia de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida y *N*-hidroxisuccinimida (DCC/NHS) e incubando la mezcla a 37 °C durante 48h. Aunque estas condiciones no son las óptimas para la activación de ácidos carboxílicos y la posterior reacción de amidación, su uso se ha extendido debido a la insolubilidad de muchos de los compuestos a acoplar.^{242a,d,248} Tras lavados reiterados con EtOH y H_2O se obtuvieron las nanopartículas con los fármacos RTX y PTX covalente unidos designadas como **NP-APTES-RTX** y **NP-APTES-PTX** respectivamente.

²⁴⁷ (a) J. Sudimack, R. J. Lee, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2000**, *41*, 147-162; (b) B. Stella, S. Arpicco, M. T. Peracchia, D. Desmaele, J. Hoebeke, M. Renoir, J. D'Angelo, L. Cattell, P. Couvreur, *J. Pharm. Sci.* **2000**, *89*, 1452-1464.

²⁴⁸ C. T. Hung, A. D. McLeod, P. K. Gupta, *Drug Dev. Ind. Pharma.* **1990**, *16*, 509-521.

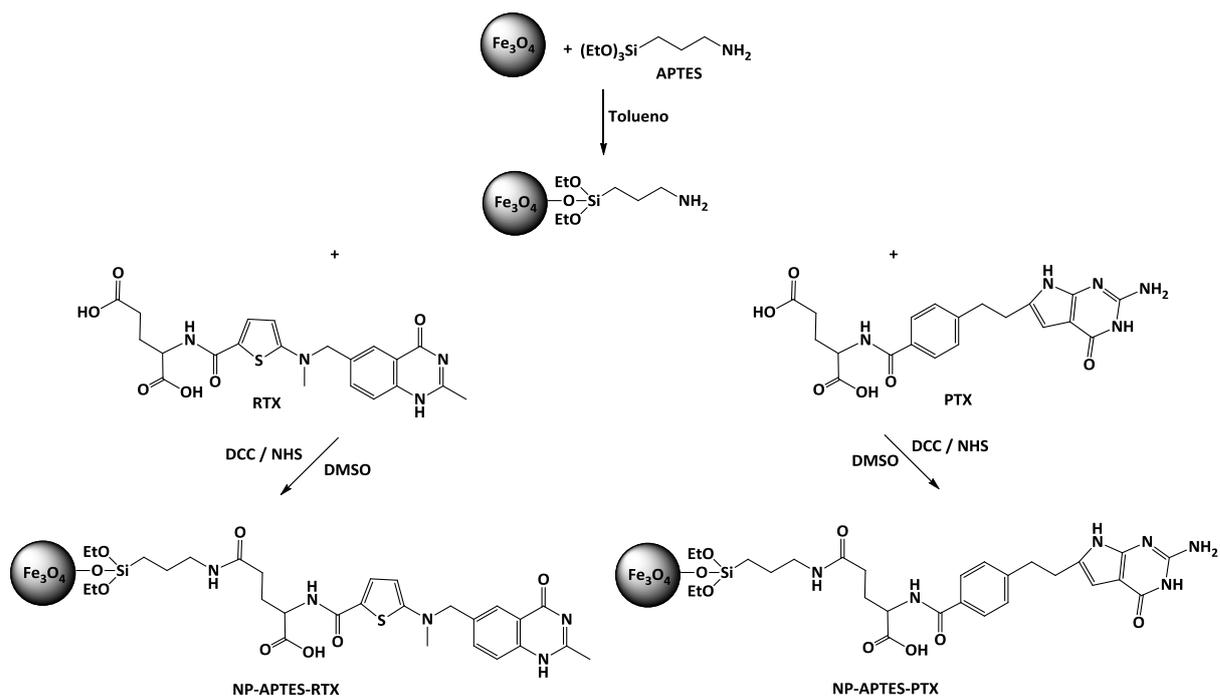


Fig. 3.7. Esquema de síntesis para obtención de **NP-APTES-RTX** y **NP-APTES-PTX**.

Para establecer las interacciones no covalentes se sintetizaron nanopartículas funcionalizadas con las escuaramidas **C2** y **C4**. En el capítulo anterior se mencionó que **NP-C2** y **NP-C4** eran las nanopartículas con diescuaramidas más solubles de todas las sintetizadas. Sin embargo, la solubilidad de ambas en disoluciones acuosas no era lo suficientemente elevada como para ser utilizadas en medios biológicos. Por este motivo se efectuó una doble funcionalización de las mencionadas nanopartículas, donde además de las escuaramidas correspondientes se adicionó el compuesto comercial ácido meso 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) para incrementar la solubilidad final de las nanopartículas.

La síntesis consistió en la modificación de la superficie de las nanopartículas en un solo paso tal como se esquematiza en la Figura 3.8. Para ello, las Fe_3O_4 se dispersaron inicialmente en tolueno mientras que las escuaramidas y el DMSA se disolvieron en DMSO. Ambas disoluciones se mezclaron y agitaron en un tubo falcon durante 24 h. Tras los lavados con EtOH, MeOH y acetona las **NP-DMSA-C2** y **NP-DMSA-C4** se trataron con NH_4OH 1%. El tratamiento básico permite que se formen puentes disulfuro entre moléculas de DMSA contiguas además de desprotonar los ácidos carboxílicos que quedan hacia el exterior, ofreciendo así una mayor estabilidad y solubilidad a las nanopartículas.²⁴⁹

²⁴⁹ (a) N. Fauconnier, J. N. Pons, J. Roger, A. Bee, *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *194*, 427-433; (b) J. Roger, J. N. Pons, R. Massart, A. Halbreich, J. C. Bacri, *Eur. Phys. J. Appl. Phys.* **1999**, *5*, 321-325.

3. Nanopartículas de óxidos de hierro como transportadores de antifolatos

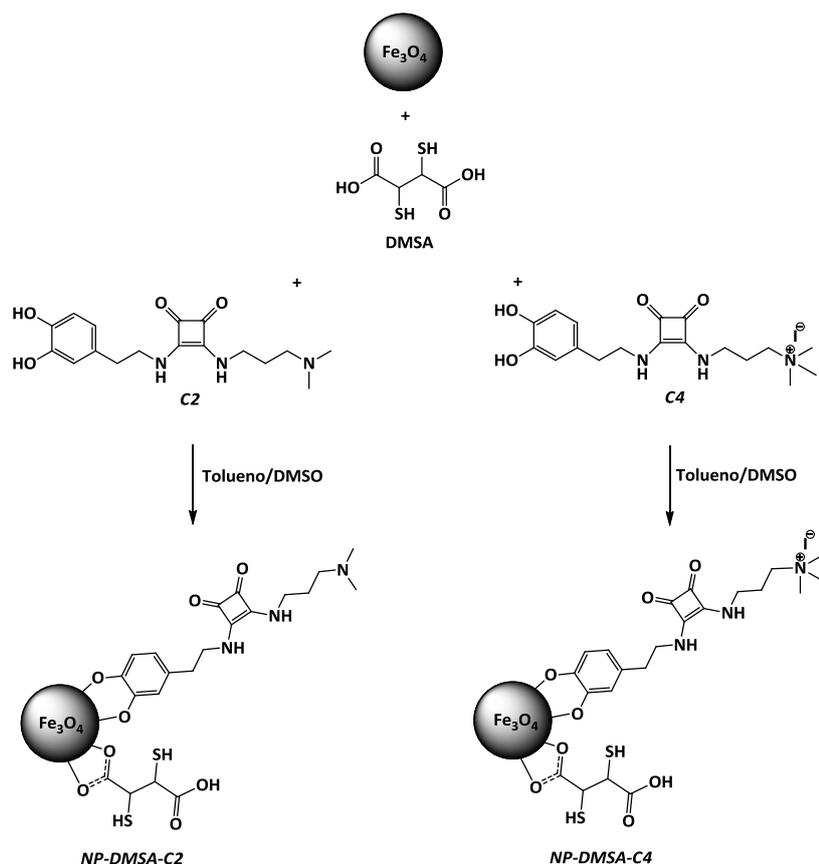


Fig. 3.8. Esquema de síntesis para obtención de **NP-DMSA-C2** y **NP-DMSA-C4**.

La correcta modificación de la superficie de las diversas nanopartículas fue determinada por FT-IR (Figura 3.9). La presencia de bandas de tensión de C=O a $1625\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$ y las bandas de vibraciones de deformación N-H de amida a $1555\text{-}1560\text{ cm}^{-1}$, así como las vibraciones de tensión del enlace Si-O a 1000 cm^{-1} en el espectro, demuestran la presencia de los antifolatos unidos a la superficie de **NP-APTES-RTX** y **NP-APTES-PTX** (Figura 3.9 A y B). Por otra parte, la funcionalización con escuaramidas en **NP-DMSA-C2** y **NP-DMSA-C4** se confirmó por las bandas típicas de escuaramidas a 1800 cm^{-1} , 1590 cm^{-1} . Finalmente, la banda 1370 cm^{-1} correspondiente a la tensión simétrica de carboxilatos (COO^-) fue atribuida a la presencia de DMSA (Figura 3.9 C y D). El ensayo de Espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDX) realizado para **NP-APTES-RTX** y **NP-DMSA-C2** mostró la presencia de Si y S en ambas muestras (Figura 3.9 A y C insertado).

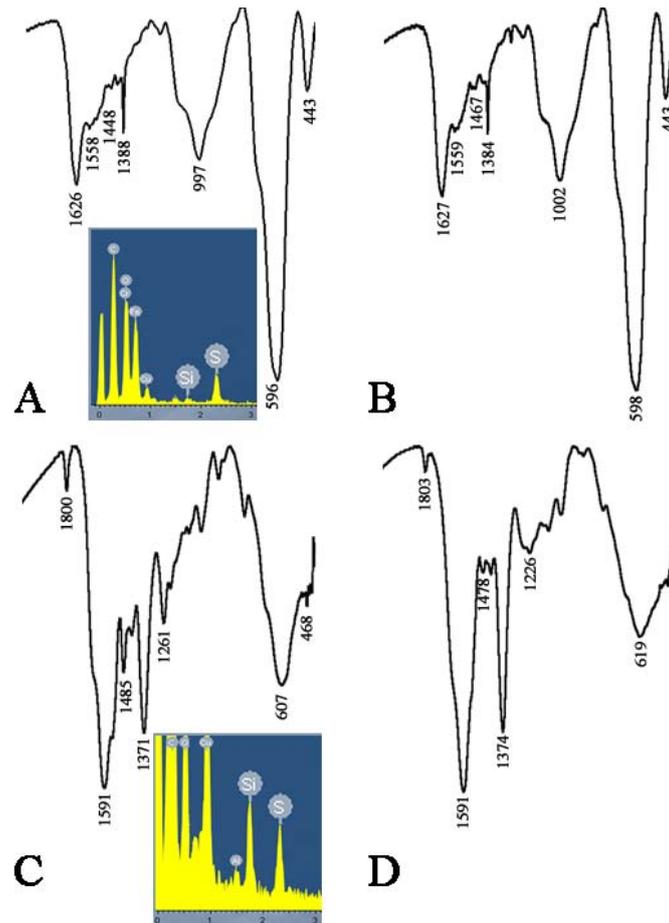


Fig. 3.9. Caracterización por FT-IR y EDX de A) **NP-APTES-RTX**, B) **NP-APTES-PTX**, C) **NP-DMSA-C2** y D) **NP-DMSA-C4**.

La caracterización por TEM (Figura 3.10) demostró la uniformidad de tamaños de los núcleos de óxido de hierro con un diámetro aproximado de 5 nm. Los estudios de DLS (insertados en la Figura 3.10) muestran que el radio hidrodinámico de las partículas es de 70 y 80 nm para **NP-APTES-RTX** y **NP-APTES-PTX** y de 90 y 120 nm para **NP-DMSA-C2** y **NP-DMSA-C4** respectivamente.

3. Nanopartículas de óxidos de hierro como transportadores de antifolatos

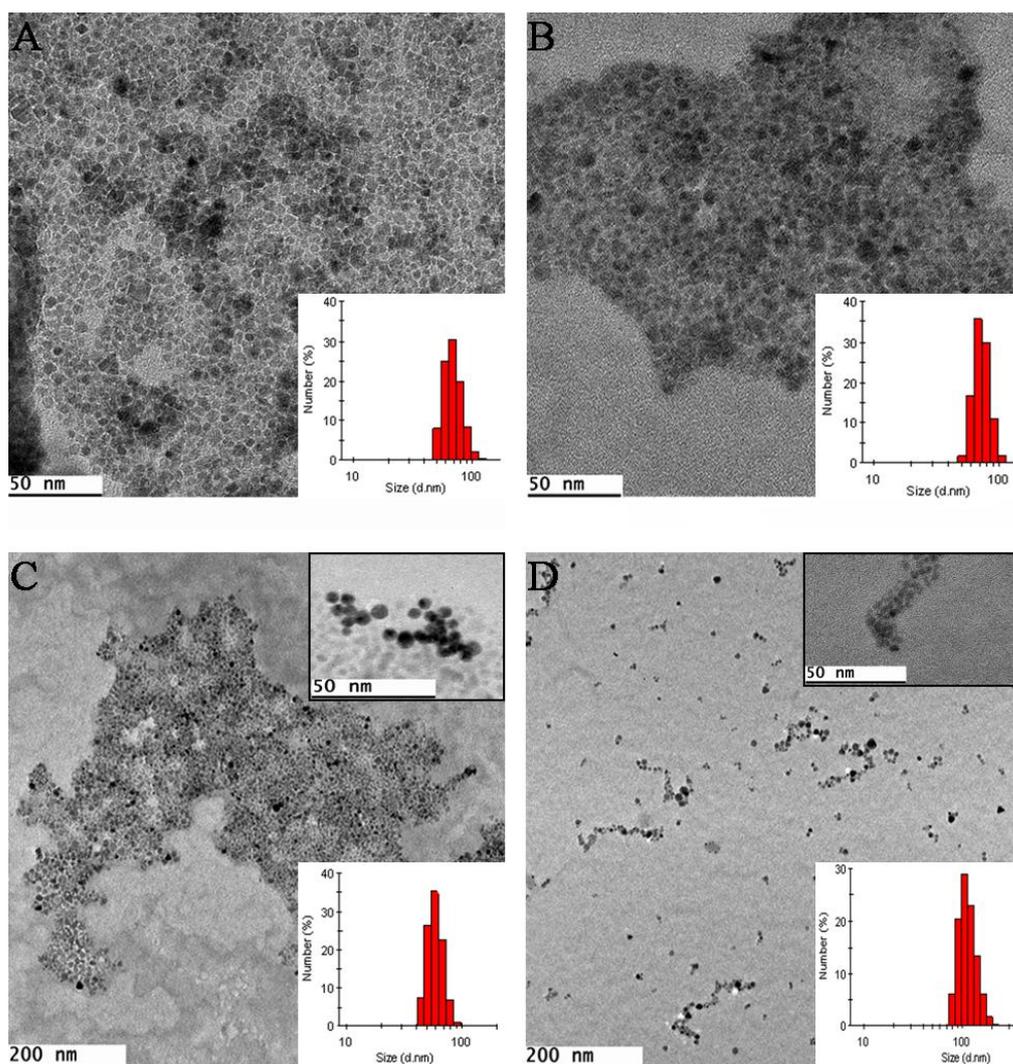


Fig. 3.10. Caracterización por TEM y DLS de A) *NP-APTES-RTX*, B) *NP-APTES-PTX*, C) *NP-DMSA-C2* y D) *NP-DMSA-C4*.

Finalmente, *NP-DMSA-C2* y *NP-DMSA-C4* fueron caracterizadas a través de los valores del zeta potencial. En la Figura 3.11 se muestran los valores de zeta potencial en función del pH. Los resultados revelan que las nanopartículas tienen una carga negativa significativa a pH 4 debido a la presencia de los carboxilatos del DMSA. En el caso de *NP-DMSA-C2* se observa una disminución gradual en el valor de zeta potencial entre pH 4 y 8,4 como resultado de la completa desprotonación de los grupos carbonilo del DMSA, y la parcial desprotonación de los grupos tioles del DMSA y de la amina de la escuaramida. En cambio, para *NP-DMSA-C4* se observa una disminución de dichos valores entre pH 4 y 7,4 debido únicamente a la desprotonación de los carbonilos y tioles del DMSA. A partir de este pH el valor de zeta potencial se mantiene constante hasta pH 8,4 debido a que en la escuaramida *C4* hay una sal de alquilamonio que no puede desprotonarse.

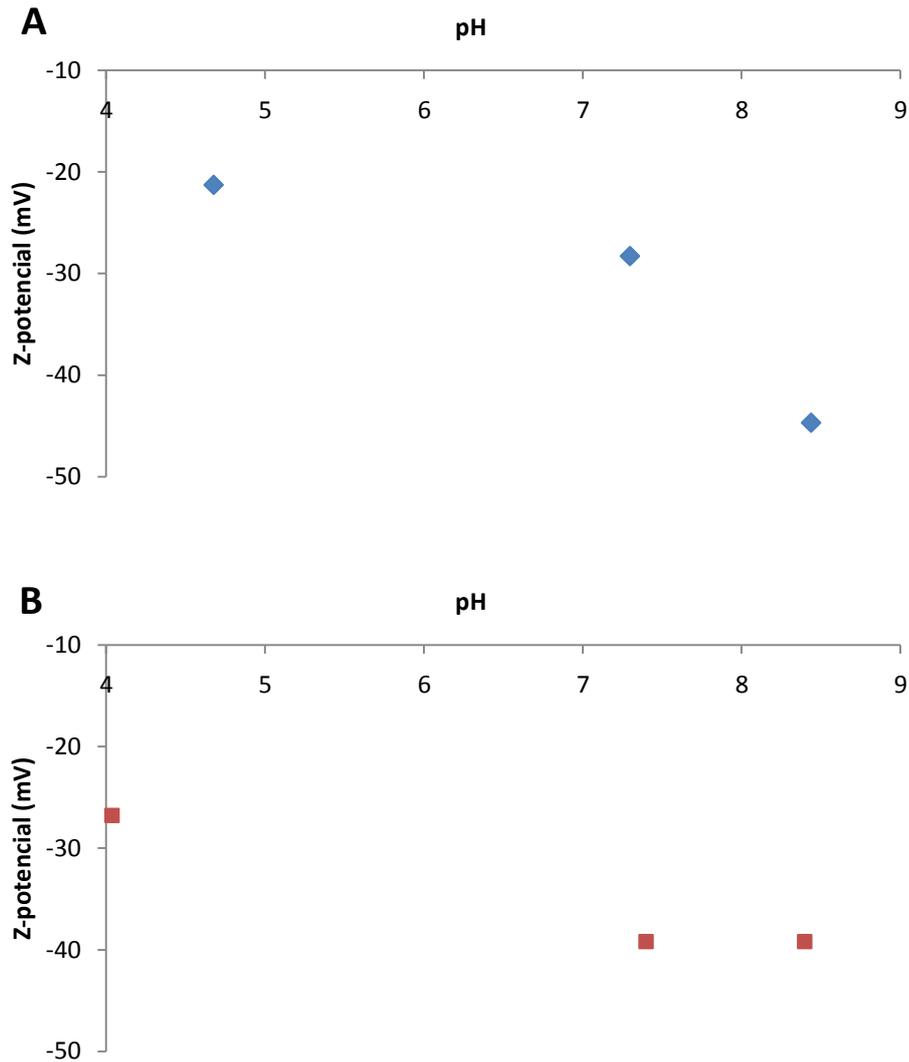


Fig. 3.11. Zeta Potencial de A) **NP-DMSA-C2** y B) **NP-DMSA-C4** en función del pH. Valores obtenidos a partir de una disolución 0,028 mg Fe/mL de cada nanopartícula en una disolución de NaCl 0,01M.

Se ha descrito en la bibliografía que una vez que las nanopartículas entran en las células, los mecanismos moleculares para la liberación los fármacos enlazados covalentemente a dichas nanopartículas implican la acción de proteasas lisosomales.²⁵⁰ Estas proteasas son capaces de hidrolizar enlaces amídicos tales como el enlace covalente que une los antifolatos a las nanopartículas, liberando así dicho fármaco en el citoplasma. A fin de comprobar la capacidad de liberación de los antifolatos unidos covalente a las nanopartículas por parte de las proteasas se simuló las condiciones lisosómicas intracelulares, *in vitro*, incubando a 37 °C **NP-APTES-RTX** y **NP-APTES-PTX** con un extracto de un crudo de proteasas a diferentes pH (4,0; 5,6 y 7.4) y períodos de tiempo (24 a 96 h). La liberación de RTX y PTX se cuantificó mediante HPLC. Los resultados obtenidos (Figura

²⁵⁰ S. Wang, P. S. Low, *J. Control. Release* **1998**, 53, 39-48.

3.12) mostraron que la disminución en el pH aumentaba la liberación de RTX y PTX de las nanopartículas, en concordancia con la mayor actividad de las proteasas lisosomales a valores de pH más bajos. Estos resultados también demostraron que la máxima cantidad posible de fármaco ya había sido liberada en las primeras 24 h y que la liberación de RTX era más elevada que la de PTX. Este hecho probablemente se debió en parte a que la cantidad inicial de PTX sobre la nanopartícula era inferior que la de RTX (ver escala de representación en Figura 3.12). La cantidad máxima de RTX y PTX liberados se obtuvo a pH 4,0 y fue de $0,445 \pm 0,001 \mu\text{mol}/\text{mg Fe}$ y $0,027 \pm 0,001 \mu\text{mol}/\text{mg Fe}$, respectivamente.

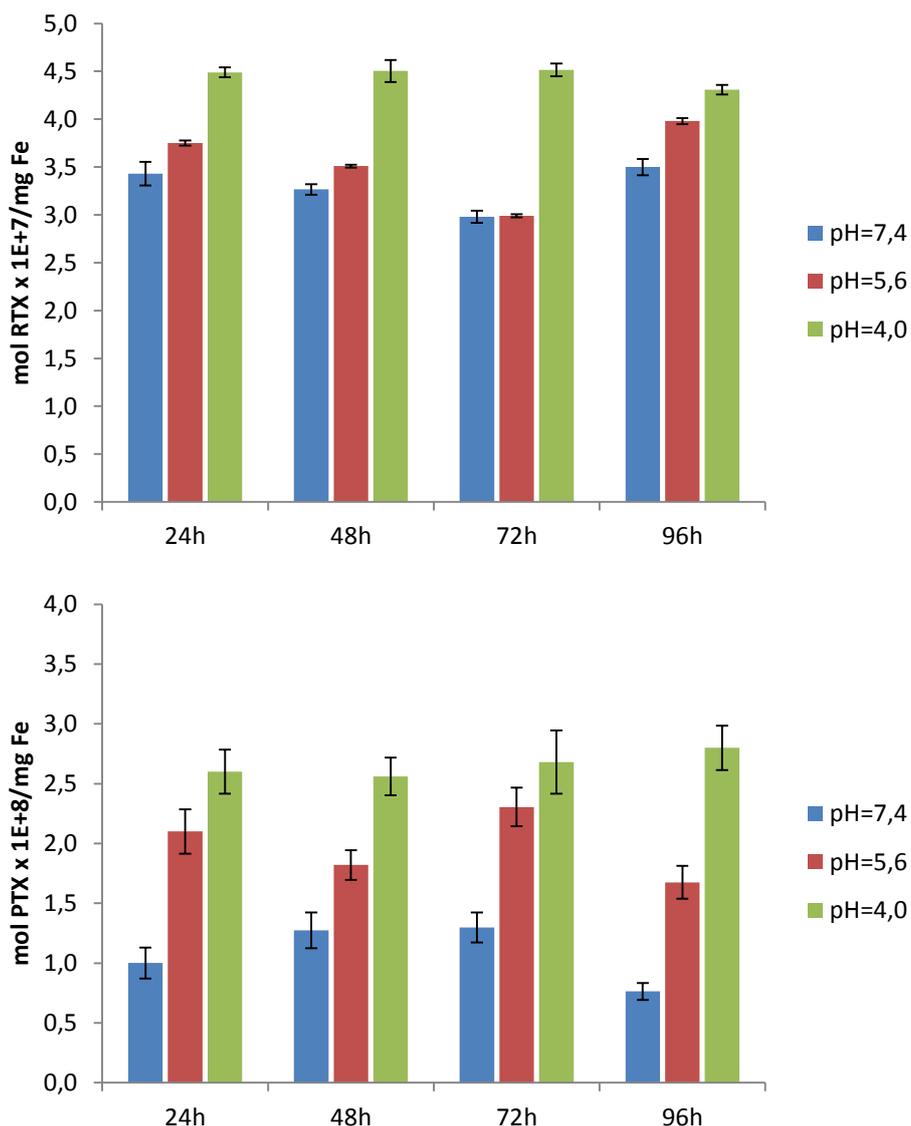


Fig. 3.12. Ensayo de liberación de RTX (superior) y PTX (inferior) unido covalentemente a *NP-APTES-RTX* y *NP-APTES-PTX* realizado a diferentes pH y tiempos. La cuantificación de los fármacos liberados se efectuó por HPLC. Condiciones del ensayo por HPLC: columna C18, modo isocrático PBS/CH₃CN 80:20, flujo del eluyente 0,8 mL/min, volumen de muestra inyectado 30 μL , detector λ_{RTX} : 264 nm, λ_{PTX} : 250 nm.

Además, se observó que a pH más elevados, específicamente 5,6 y 7,4, también se producía la liberación de fármacos. Este efecto fue debido a que a estos pH una pequeña cantidad de proteasas permanecían activas llevando a cabo la hidrólisis de los enlaces amídicos. Los resultados (Figura 3.12) demostraron que la liberación a estos dos pH era también significativa en comparación con la obtenida a pH 4, lo cual fue debido a que la concentración de proteasas utilizadas en el ensayo *in vitro* fue muy superior a la de las nanopartículas. Ensayos de liberación similares previamente descritos en la bibliografía,^{242a} efectuados para MTX unido covalentemente a la superficie de nanopartículas de Fe₃O₄, presentaron la misma tendencia.

La cantidad de RTX y PTX unida covalentemente a la superficie de las nanopartículas, a través del APTES, fue calculada previamente por ¹HRMN de forma similar a la descrita en el capítulo anterior. A partir de los lavados residuales de la reacción concentrados se obtuvo la cantidad de cada uno de estos antifolatos remanentes en disolución y por diferencia respecto a la cantidad inicial se dedujo cuánto RTX y PTX había reaccionado. De esta forma, se concluyó que la cantidad de RTX y PTX sobre la nanopartícula era aproximadamente de 0,5 µmol/mg Fe y 0,2 µmol/mg Fe respectivamente.

Se concluyó así que se liberaba un 90% y 14% de la cantidad inicial de RTX y PTX respectivamente. Estos resultados demostraron que la hidrólisis de los enlaces amídicos del RTX por parte del crudo de proteasas era más efectiva en las condiciones del ensayo.

En estudios previos realizados por Zhang,^{242d} se ensayó la liberación de MTX unido covalentemente a la superficie de nanopartículas de Fe₃O₄ utilizando PEG como linker. Sus resultados indicaron que la cantidad máxima de MTX liberado era aproximadamente 0,005 µmol/mg Fe. Resultados análogos fueron presentados por Gupta²⁴⁸ al realizar una cuantificación de MTX en condiciones similares a las seguidas en nuestro estudio. La liberación de antifolatos en nuestro ensayo mostró mejores resultados que los citados anteriormente incluso para PTX.

Por otra parte, la capacidad de retención de antifolatos de **NP-DMSA-C2** y **NP-DMSA-C4**, fue estudiada y cuantificada mediante HPLC. La coordinación con estos fármacos se esperaba que fuera a través de las unidades escuaramídicas por formación de enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas a través de los grupos amina terminales y las sales de amonio de **C2** y **C4** respectivamente (Figura 3.6). A pH 7,4 la amina terminal de **C2** se encuentra parcialmente protonada (pK_a=7,8) y dichas cargas positivas podrían facilitar la interacción con los grupos carboxílicos de los diferentes antifolatos que se encuentran desprotonados a este pH.

El proceso de retención se llevó a cabo en tampón PBS (pH=7,4) a diferentes tiempos (15, 30, 45 y 60 min). Los resultados (Figura 3.13) demostraron que los tres antifolatos se retenían en un grado similar, aproximadamente 0,2 µmol/mg Fe, no habiendo distinción entre ambas nanopartículas. Estos hechos indicaban que la carga parcial en las aminas terminales de **C2** al pH del ensayo no afectaba el proceso de retención. Además, se observó que aumentando el tiempo de contacto entre los fármacos y las nanopartículas no se incrementaba la retención de los mismos.

3. Nanopartículas de óxidos de hierro como transportadores de antifolatos

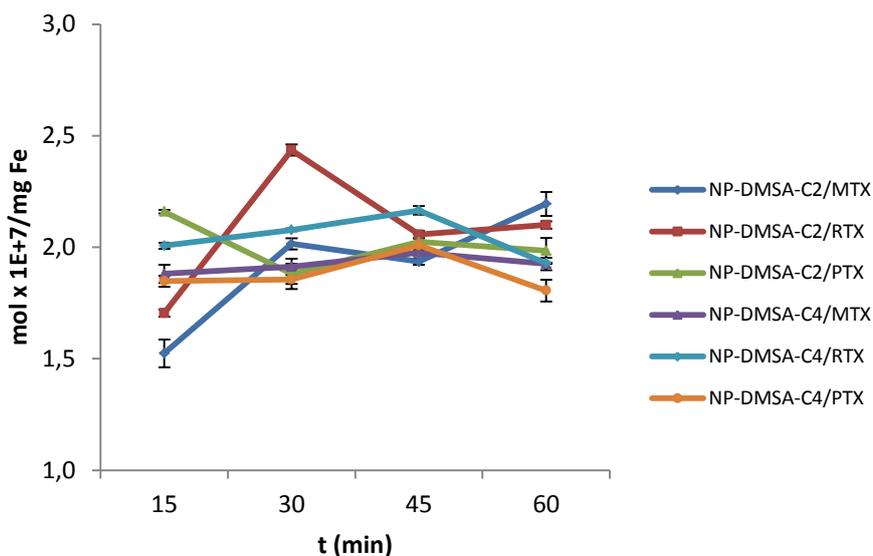


Fig. 3.13. Ensayo de retención de antifolatos por **NP-DMSA-C2** y **NP-DMSA-C4** efectuado en PBS (pH=7,4) a diferentes tiempos cuantificado por HPLC. Condiciones del ensayo por HPLC: columna C18, modo isocrático PBS/CH₃CN 80:20, flujo del eluyente 0,6 mL/min, volumen de muestra inyectado 20 μ L, detector λ_{RTX} : 264 nm, λ_{PTX} : 250 nm, λ_{MTX} : 303 nm.

La liberación de los antifolatos unidos a **NP-DMSA-C2** y **NP-DMSA-C4** a través de interacciones no covalentes no requería una acción enzimática como se detalló para **NP-APTES-RTX** y **NP-APTES-PTX**. Se ha descrito anteriormente que la entrada de nanopartículas funcionalizadas a las células, mediada por los receptores de fólculo, se produce por endocitosis (Figura 3.4). Tras la fusión de los endosomas con los lisosomas se provoca un cambio de pH en el interior de la vesícula que facilita la acción de las proteasas.²⁴² En un principio se planteó que esta variación en el pH podía favorecer la liberación de los antifolatos coordinados a las nanopartículas funcionalizadas con escuaramidas debido a la protonación parcial de los grupos carbonilo.

Para estudiar la liberación de estos antifolatos, **NP-DMSA-C2** y **NP-DMSA-C4** cargadas con los respectivos fármacos se incubaron con PBS a 37 °C durante 24, 48, 72 y 96 h respectivamente a dos pH diferentes: 7,4 y 4,0. La cantidad liberada de cada antifolato se analizó por HPLC. Los resultados demostraron que entre un 10-15% de la cantidad total de fármacos retenida se liberaba a pH=7,4 y que esta liberación se incrementaba hasta el 90% cuando el pH disminuía hasta 4,0 (Figura 3.14).

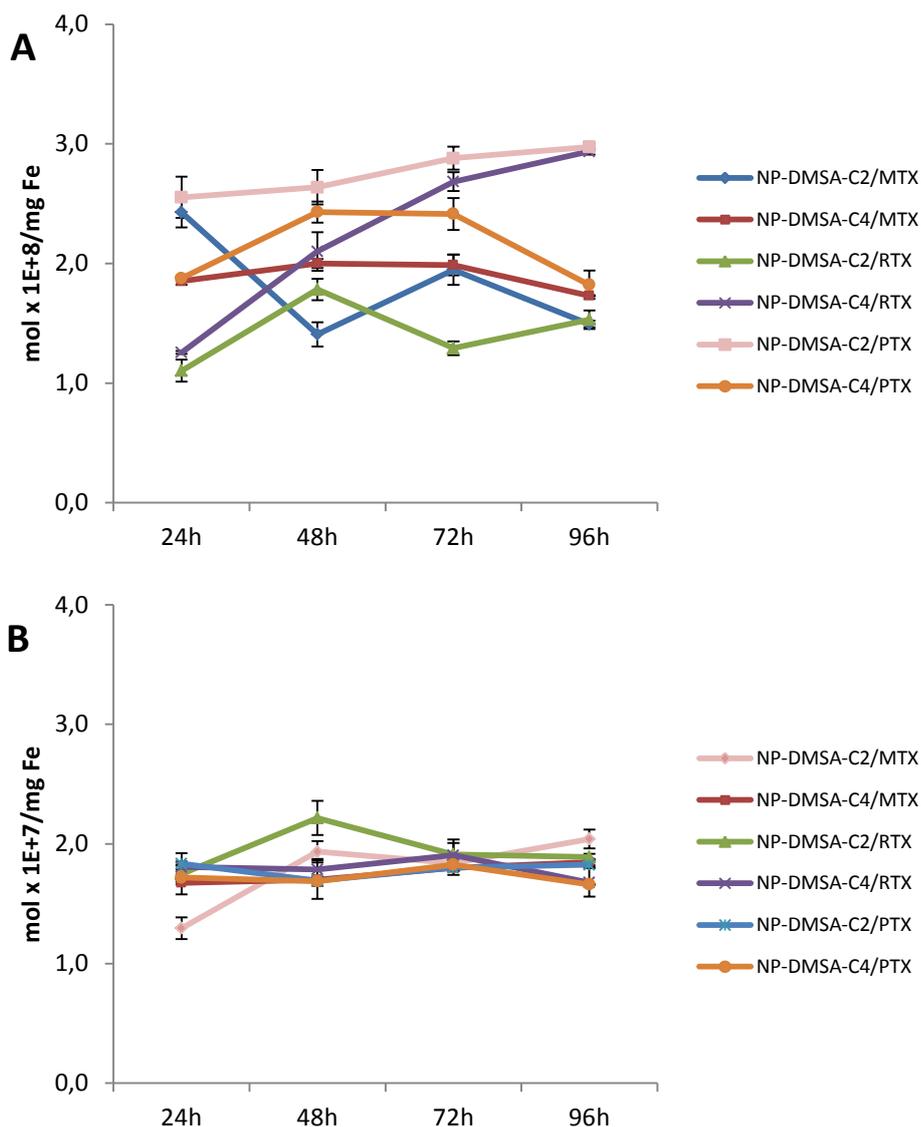


Fig. 3.14. Ensayo de liberación de antifolatos de *NP-DMSA-C2* y *NP-DMSA-C4* efectuado en PBS: A) pH=7,4; B) pH=4,0 a diferentes tiempos cuantificado por HPLC. Condiciones del ensayo por HPLC: columna C18, modo isocrático PBS/CH₃CN 80:20, flujo del eluyente 0,6 mL/min, volumen de muestra inyectado 20 μ L, detector λ_{RTX} : 264 nm, λ_{PTX} : 250 nm, λ_{MTX} : 303 nm.

Este ensayo de liberación también demostró que ambas nanopartículas se comportaban de forma análoga puesto que las cantidades de antifolatos liberados en cada caso fueron muy similares. Además se comprobó que la acidificación del pH del medio liberaba con efectividad un porcentaje elevado de los fármacos transportados de forma no covalente. Finalmente, también se pudo determinar que tras las primeras 24 h prácticamente todo el fármaco había sido liberado.

La cantidad máxima liberada de cada antifolato fue cuantificada en este ensayo y los resultados específicos para cada uno de ellos se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Cuantificación de la cantidad máxima de antifolatos liberada por **NP-DMSA-C2** y **NP-DMSA-C4**.

Antifolato	NP-DMSA-C2 ^[a]	NP-DMSA-C4 ^[a]
MTX	0,18 ± 0,03	0,18 ± 0,01
RTX	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,01
PTX	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,01

^[a]Las concentraciones están expresadas en $\mu\text{mol}/\text{mg Fe}$

Otros sistemas de transporte no covalente de antifolatos, específicamente para MTX, previamente descritos han mostrado que la liberación se encuentra en el mismo orden de magnitud que en nuestro sistema. Tal es el caso de las micelas poliméricas cargadas con MTX preparadas por Zhuo^{242c} donde la cantidad máxima liberada era del orden de 0,3 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ partícula.

A su vez, estos resultados son del mismo orden de magnitud que los obtenidos en la liberación de RTX unido covalentemente a las nanopartículas y ligeramente superiores a los del PTX siguiendo esta misma estrategia.

La potencial citotoxicidad de las diferentes nanopartículas se evaluó *in vitro* en células humanas de adenocarcinoma de pulmón A549, utilizando el ensayo de MTT²⁵¹ para comparar la eficacia entre los diferentes antifolatos unidos a las nanopartículas a través de uniones covalente o a través de interacciones no covalentes. Con el fin de comparar el efecto de los fármacos por sí solos con el producido una vez unidos a las nanopartículas, inicialmente se llevó a cabo un ensayo de viabilidad con los antifolatos solubles (no unidos a nanopartículas) en esta línea celular.

En las Figuras 3.15 y 3.16 se muestra la viabilidad celular de A549 en función del tiempo como porcentaje de supervivencia celular después del tratamiento con antifolatos solubles o unidos a nanopartículas.

Tanto RTX como PTX solubles mostraron una diferente citotoxicidad dependiente de la dosis después de 96 h de tratamiento (Figura 3.15). A una concentración de 25 nM RTX soluble inhibió la viabilidad celular en un $58 \pm 4\%$. La inhibición máxima del $84 \pm 2\%$ se alcanzó a una concentración de 0,1 μM y concentraciones superiores del fármaco soluble no produjeron un mayor efecto citotóxico. Por su parte, para PTX soluble comenzó a observarse una ligera inhibición en la viabilidad celular a una concentración de 0,1 μM . A la máxima concentración estudiada (1 μM) este fármaco sólo redujo la viabilidad celular en un $57 \pm 3\%$.

²⁵¹ T. Mossmann, *J. Immunol. Methods* **1983**, 65, 55-63.

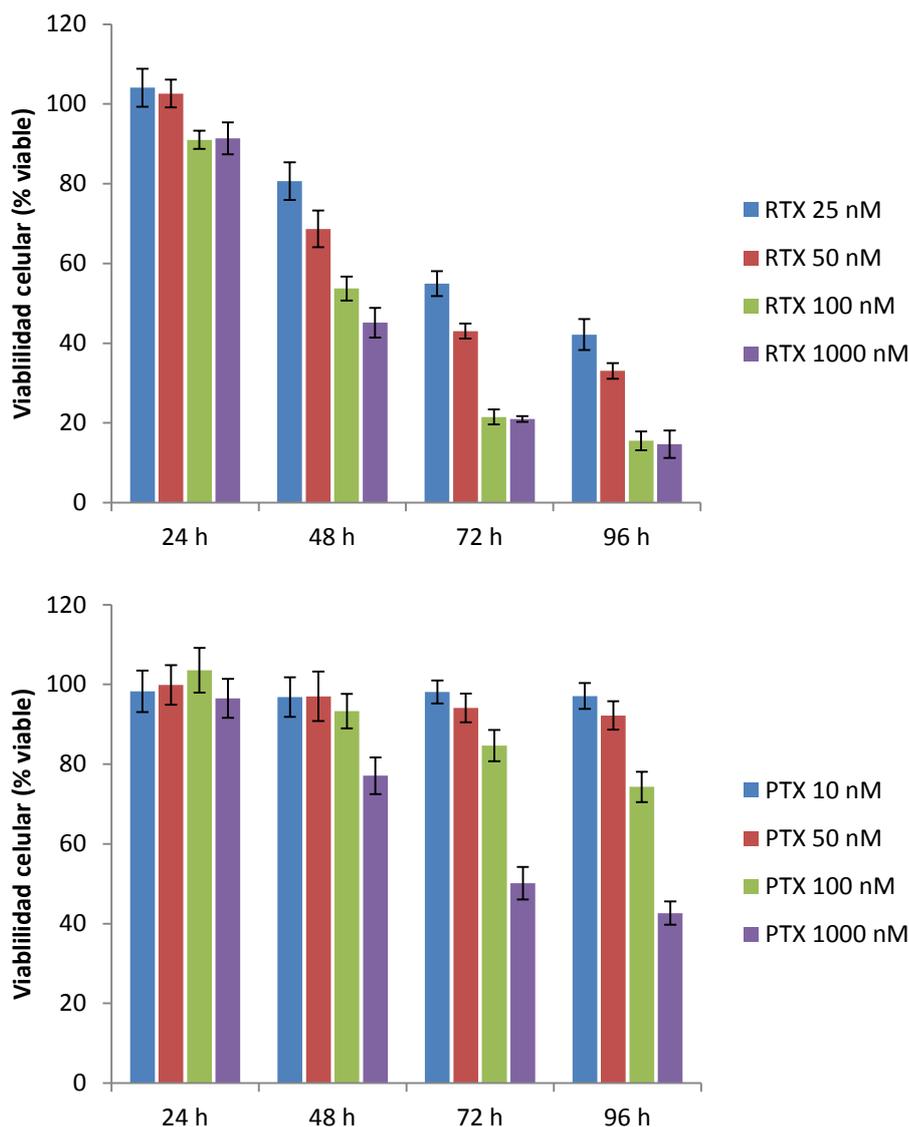


Fig. 3.15. Determinación de la viabilidad celular en las células A549 después del tratamiento con: RTX soluble (superior) y PTX soluble (inferior) a diferentes tiempos y concentraciones. Cada columna representa la media $\pm \sigma$ de tres experimentos independientes realizados por triplicado normalizados con las células no tratadas (tomadas como 100%).

A pesar de la similitud estructural entre ambos compuestos y de sus análogas constantes de inhibición del enzima timidilato sintasa²⁵² en este ensayo se demostró que concentraciones necesarias de cada antifolato para producir un efecto citotóxico significativo en esta línea celular fueron considerablemente diferentes. En estudios *in vitro* previos²⁵³ se ha comprobado que el IC₅₀ del RTX soluble en diversos tumores es una

²⁵² (a) A. L. Jackman, G. A. Taylor, W. Gibson, R. Kimbell, M. Brown, A. H. Calvert, I. R. Judson, L. R. Hughes, *Cancer Res.* **1991**, *51*, 5579-5586; (b) E. C. Taylor, D. Kuhnt, C. Shih, S. M. Rinzel, G. B. Grindey, J. Barredo, M. Jannatipour, R. C. Moran, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 4450-4454.

²⁵³ H. H. J. Backus, H. M. Pinedo, D. Wouters, J. M. Padrón, N. Molders, C. L. van der Wilt, C. J. Groeningen, G. Jansen, G. J. Peters, *Int. J. Cancer* **2000**, *87*, 771-778.

sexta parte del de PTX. Por ejemplo, en 2004 Goldman²⁵⁴ comprobó que la inhibición en la viabilidad celular conseguida a una concentración de PTX soluble cercana a 0,1 μ M, en ensayos *in vitro* con células humanas de cáncer cérvico-uterino (HeLa), se alcanzaba con concentraciones de RTX inferiores a 10 nM.

Resultados similares se obtuvieron después del tratamiento de las células tumorales con RTX y PTX unidos covalentemente a las nanopartículas (Figura 3.16).

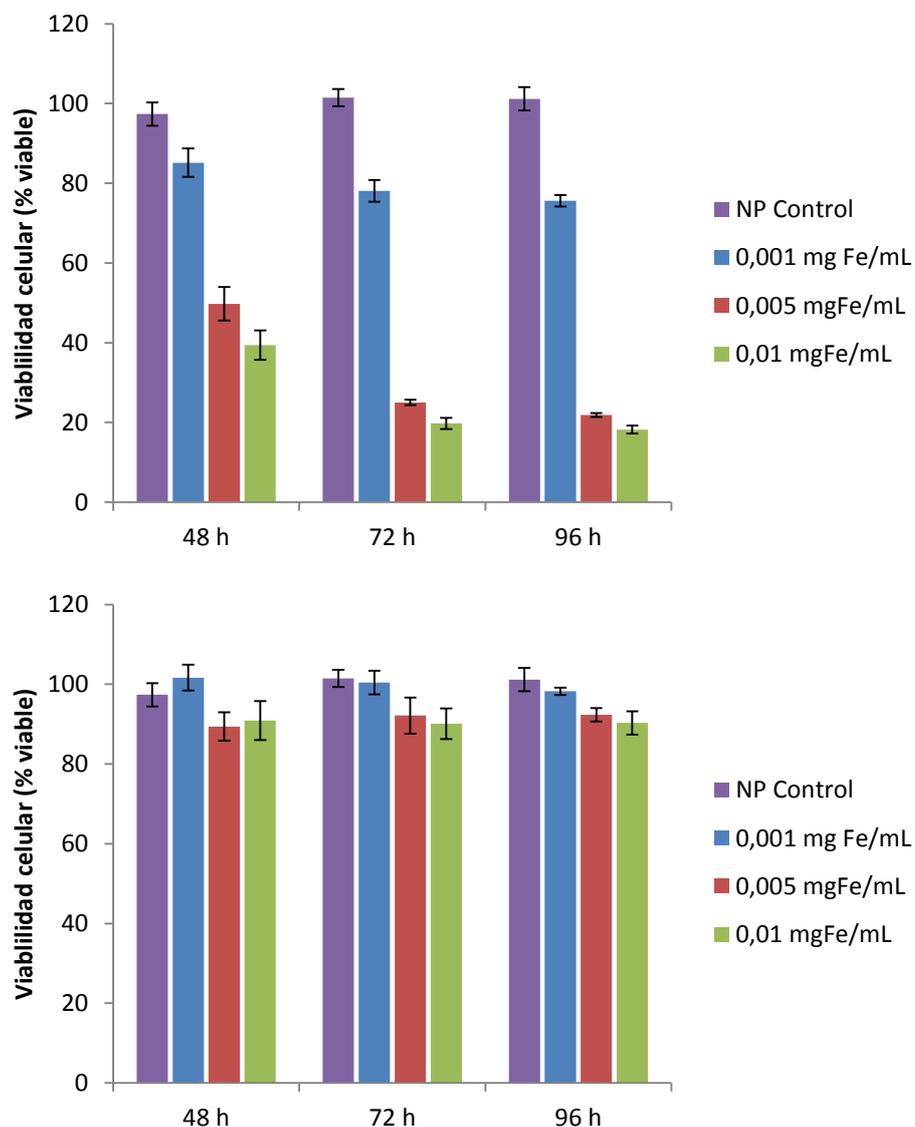


Fig. 3.16. Determinación de la viabilidad celular en las células A549 después del tratamiento con: **NP-APTES-RTX** (superior) y **NP-APTES-PTX** (inferior) a diferentes tiempos y concentraciones. Las concentraciones de nanopartículas se expresan como mg Fe/mL. NP Control hace referencia a nanopartículas de Fe₃O₄ sin funcionalizar. Cada columna representa la media $\pm \sigma$ de tres experimentos independientes realizados por triplicado normalizados con las células no tratadas (tomadas como 100%).

²⁵⁴ (a) R. Zhao, M. Hanscom, S. Chattopadhyay, I. D. Goldman, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 3313-3319; (b) S. Chattopadhyay, R. G. Moran, I. D. Goldman, *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 404-417.

NP-APTES-RTX mostró una inhibición en la viabilidad de A549 dependiente de la dosis, alcanzando una inhibición máxima de $78 \pm 1\%$ a una concentración de 0,05 mg Fe/mL después de 96 h de tratamiento. Concentraciones superiores de estas nanopartículas no condujeron a una mayor reducción en la viabilidad celular. Curiosamente, el tratamiento con las mismas concentraciones de **NP-APTES-PTX** no afectó la viabilidad celular de A549.

En la Tabla 3.3 se presenta un resumen de la concentración máxima de fármaco liberado para cada concentración de nanopartícula según los resultados del ensayo *in vitro* simulando las condiciones lisosómicas intracelulares.

Tabla 3.3. Relación entre [Fe] y [Antifolato liberado] para **NP-APTES-RTX** y **NP-APTES-PTX**.

	[Fe] (mg/mL)	[Fármaco liberado] (μ M)
NP-APTES-RTX	0,001	$0,45 \pm 0,01$
	0,005	$2,23 \pm 0,05$
	0,01	$4,5 \pm 0,1$
NP-APTES-PTX	0,001	$0,03 \pm 0,01$
	0,005	$0,13 \pm 0,05$
	0,01	$0,27 \pm 0,01$

La pobre eficacia antitumoral de **NP-APTES-PTX** pudo ser explicada analizando los datos expuestos en la Tabla 3.3. De acuerdo con esta observación, la liberación máxima de PTX que podría haberse alcanzado a la mayor concentración de **NP-APTES-PTX** estudiada (0,01 mg Fe/mL) era sólo $0,27 \mu$ M, concentración que sólo provocó una leve disminución en la viabilidad celular cuando se administró como fármaco soluble (Figura 3.15 inferior). Estos resultados sugirieron que sería necesaria una mayor concentración de PTX en la superficie de la nanopartícula para obtener una notable reducción en la viabilidad celular.

Por otra parte, la liberación máxima de RTX de **NP-APTES-RTX** a la concentración de 0,01 mg Fe/mL, *in vitro*, fue de $4,5 \mu$ M. Esta concentración disminuyó la viabilidad celular de A549 en la misma medida que RTX soluble 1μ M (Figura 3.15 superior), lo cual en principio podía haber sido interpretado como un resultado desfavorable.

Para estudiar más en detalle este resultado se llevó a cabo un ensayo donde se evaluó la cantidad de **NP-APTES-RTX** y **NP-APTES-PTX** que había entrado en las células tras 24 h de incubación con estas nanopartículas. Para ello, después de la incubación las células se contaron y posteriormente se trataron con HCl concentrado para determinar la concentración de hierro intracelular por ICP-OES. La concentración de Fe intracelular encontrada tras 24 h de incubación con **NP-APTES-RTX** y **NP-APTES-PTX** fue de 38 ± 2 pg Fe/célula y 25 ± 3 pg Fe/célula, respectivamente (Figura 3.17).

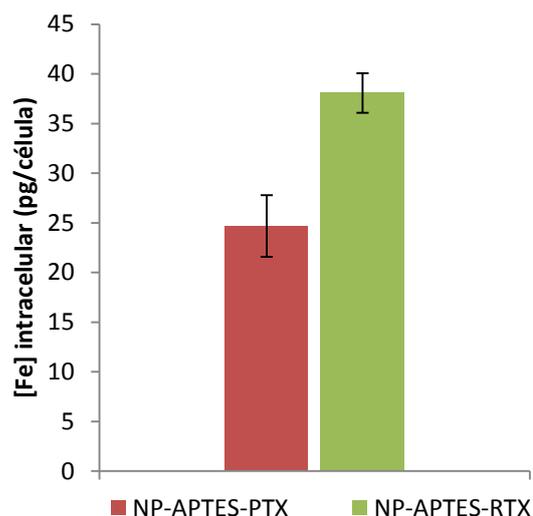


Fig. 3.17. Cuantificación de **NP-APTES-RTX** y **NP-APTES-PTX** en el interior de las células A549 después de 24 h de incubación. Cada columna representa la media $\pm \sigma$ de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Tomando en cuenta estos valores y los expuestos anteriormente en la Tabla 3.3 se pudo determinar que las cantidades intracelulares máximas de RTX y PTX liberado que se podrían alcanzar eran 2×10^{-8} y 7×10^{-10} $\mu\text{mol/célula}$ respectivamente, considerando que todo el fármaco unido a las nanopartículas fuera liberado. Estos datos sugirieron que la acción de RTX a través de **NP-APTES-RTX** alcanzaba el máximo efecto citotóxico a una concentración más baja que la observada con RTX soluble en las células A549. Estos resultados también demostraron la capacidad de los lisosomas para romper el enlace de RTX a las nanopartículas, permitiendo al RTX libre ejercer su efecto antitumoral. Cabe mencionar que las nanopartículas sin funcionalizar (NP control) a la máxima concentración ensayada (0,01 mg Fe/mL) no afectaron la viabilidad celular de A549 (Figura 3.16).

La reducción en la viabilidad celular de líneas tumorales a través de nanopartículas funcionalizadas con antifolatos se ha estudiado y descrito anteriormente. Por ejemplo, Zhang en 2005^{242a} preparó nanopartículas de óxidos de hierro funcionalizadas con MTX a través de uniones covalentes y evaluó su efecto antitumoral *in vitro* en las líneas HeLa y MCF-7 (células humanas de cáncer de mama). Ambas líneas, al igual que A549 se caracterizan por tener sobre-expresados los receptores de FA en la membrana. Después de 120 h de incubación con ambas líneas obtuvieron una inhibición en la viabilidad celular similar a la alcanzada con el MTX soluble. Posteriormente, en 2006 los autores^{242d} modificaron la síntesis de las nanopartículas funcionalizadas utilizando un linker diferente para la inmovilización covalente del MTX. En esta ocasión los ensayos *in vitro* fueron realizados con células de gliomas de ratas (9L) y lograron una citotoxicidad más elevada utilizando las nanopartículas que con el MTX soluble.

Por otra parte, también se estudió el efecto antitumoral de los antifolatos RTX, PTX y MTX transportados a las células tumorales a través de nanopartículas funcionalizadas con escuaramidas. Inicialmente, varias concentraciones (entre 0,001 y 0,01 mg Fe/mL) de **NP-DMSA-C2** y **NP-DMSA-C4** cargadas con los diferentes fármacos se ensayaron en las células A549 y después de 96 h de tratamiento no se vio alterada la viabilidad celular de las mismas (Figura 3.18 superior).

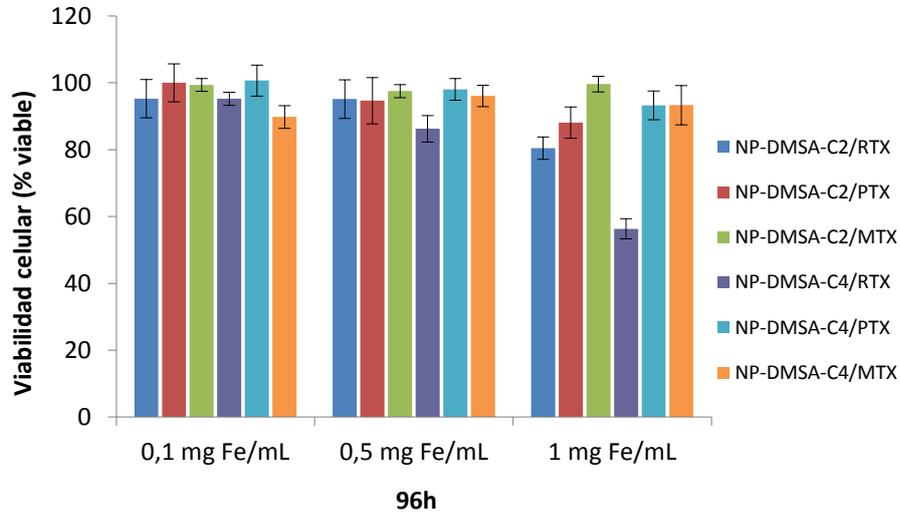
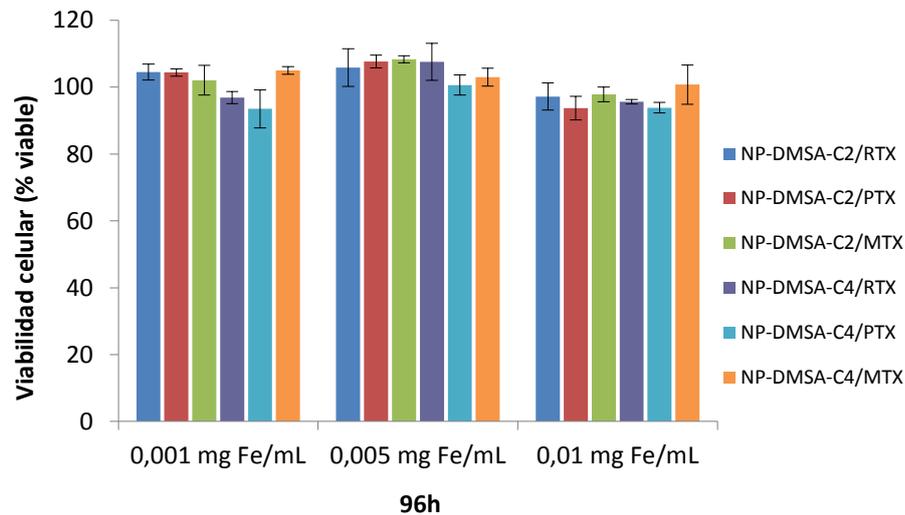


Fig. 3.18. Determinación de la viabilidad celular en las células A549 después del tratamiento con: **NP-DMSA-C2** y **NP-DMSA-C4** cargadas con los antifolatos RTX, PTX y MTX a diferentes concentraciones. Las concentraciones de nanopartículas se expresan como mg Fe/mL. Cada columna representa la media $\pm \sigma$ de tres experimentos independientes realizados por triplicado normalizados con las células no tratadas (tomadas como 100%).

Debido a esta baja eficacia se ensayaron concentraciones más elevadas (entre 0,1 y 1 mg Fe/mL). Los resultados (Figura 3.18 inferior) mostraron que sólo las concentraciones

máximas de ambas nanopartículas cargadas con RTX (1 mg Fe/mL) ejercieron un ligero efecto inhibitor sobre la viabilidad celular después de 96 h de tratamiento. Concretamente, 1 mg Fe/mL de **NP-DMSA-C2/RTX** redujo la viabilidad celular un $20 \pm 3\%$, mientras que **NP-DMSA-C4/RTX** indujo una disminución de $44 \pm 3\%$.

En la Tabla 3.4 se presenta un resumen de la concentración máxima de fármaco liberado para la concentración máxima de nanopartículas utilizada según los resultados del ensayo *in vitro* de liberación a pH = 4.

Tabla 3.4. Relación entre [Fe] y [Antifolato liberado] para **NP-DMSA-C2** y **NP-DMSA-C4**.

		[Fe] (mg/mL)	[Fármaco liberado] (μ M)
NP-DMSA-C2	RTX	1	190 ± 20
	PTX	1	180 ± 10
	MTX	1	180 ± 30
NP-DMSA-C4	RTX	1	180 ± 10
	PTX	1	170 ± 10
	MTX	1	180 ± 10

Analizando los valores presentados en la Tabla 3.4 se pudo determinar que a la mayor concentración de nanopartículas estudiada (1 mg Fe/mL), la liberación máxima de los antifolatos estaba en el rango de 160-210 μ M a pH ácido. Por tanto, el bajo efecto citotóxico exhibido por estas nanopartículas cargadas no debió estar relacionado con una menor liberación de fármaco unido a ellas, si no, con una inferior captación celular comparado con las nanopartículas donde los fármacos estaban unidos covalentemente.

Recientemente, Chen y Ke²⁵⁵ han determinado la estructura del cristal del complejo del receptor de fólico (FR α) y el ácido fólico con una resolución de 2,8 Å. El estudio confirma que el resto pterato del folato se posiciona hacia el interior del receptor mientras que el resto glutamato queda expuesto hacia el exterior de la cavidad del receptor. Esta disposición permite que los conjugados con ácido fólico a través del glutamato no afecten adversamente la unión al FR α . Este tipo de unión es la que se describe en la conjugación covalente de los antifolatos a las nanopartículas funcionalizadas con APTES. Sin embargo, en las interacciones no covalentes a través las nanopartículas funcionalizadas con escuaramidas, la localización exacta de los antifolatos no está fijada. Es decir, puede ser que en algunos de ellos el anillo pteridina se coloque hacia la disolución y que las interacciones con los derivados escuáricos sean puramente electrostáticas con las aminas y sales de amonio terminales. En este caso, sería factible la unión con los receptores de fólico y la posterior entrada en la célula. En cambio, si los restos pterato del folato se orientan hacia el interior de las cadenas escuaramídicas, tal

²⁵⁵ C. Chen, J. Ke, X. E. Zhou, W. Yi, J. S. Brunzelle, J. Li, E.-L. Yong, H. E. Xu, K. Melcher, *Nature* doi: 10.1038/nature12327.

como se propone en la Figura 3.6, la unión a los mencionados receptores no sería viable y la entrada de las nanopartículas a las células no estaría mediada por estos receptores.

La baja citotoxicidad de **NP-DMSA-C2** y **NP-DMSA-C4** cargadas con RTX, PTX y MTX podría estar relacionada con la dificultad de las mismas para entrar a las células, dado que los estudios previos realizados demostraron una adecuada retención y liberación de los antifolatos. Estos resultados permitieron sugerir que la disposición de los antifolatos más probable en presencia de las escuaramidas era con el anillo pteridina hacia el interior de estas cadenas con un entorno más hidrofóbico y donde se podían establecer interacciones por enlace de hidrógeno a través de los grupos donadores y aceptores de las escuaramidas. Consecuentemente, la reducción en la viabilidad celular con **NP-DMSA-C2/RTX** y **NP-DMSA-C4/RTX** a la concentración más alta ensayada podía estar relacionada con la liberación parcial de este antifolato en la disolución a pH=7,4 y a su marcado efecto citotóxico comparado con el resto.

Es importante destacar que tanto **NP-DMSA-C2** y **NP-DMSA-C4** sin cargar con los antifolatos, como las nanopartículas funcionalizadas únicamente con DMSA (**NP-DMSA**) fueron utilizadas como control negativo a diferentes concentraciones. En ningún caso se vio afectada la viabilidad celular, ni siquiera a la concentración más alta de hierro (1 mg Fe/mL) (Figura 3.19), lo que demostró que efecto antitumoral antes mencionado, aunque bajo, fue inducido por los antifolatos y no por las nanopartículas.

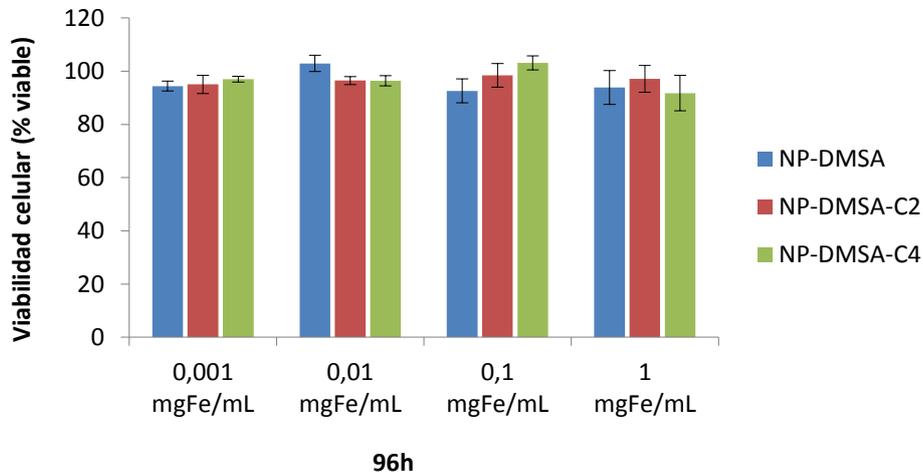


Fig. 3.19. Determinación de la viabilidad celular en las células A549 después del tratamiento con: **NP-DMSA**, **NP-DMSA-C2** y **NP-DMSA-C4** sin fármacos a diferentes concentraciones. Las concentraciones de nanopartículas se expresan como mg Fe/mL. Cada columna representa la media $\pm \sigma$ de tres experimentos independientes realizados por triplicado normalizados con las células no tratadas (tomadas como 100%).

Se han descrito previamente otros sistemas para el transporte de antifolatos, específicamente MTX, haciendo uso de interacciones no covalentes. Uno de ellos fue descrito por Nah^{242h} en 2009. Las nanopartículas poliméricas preparadas se utilizaron

3. Nanopartículas de óxidos de hierro como transportadores de antifolatos

para encapsular MTX con una eficacia del 60-90% (m/m) y su citotoxicidad fue ensayada *in vitro* frente a células de melanoma de ratas (B16F10). Las nanopartículas poliméricas mostraron una menor citotoxicidad que el fármaco soluble lo cual los autores lo atribuyeron a una liberación de MTX más lenta cuando se encontraba encapsulado. Otros ejemplos, donde en vez de utilizar nanopartículas poliméricas se han utilizado dendrímeros para encapsular MTX han mostrado mejores resultados. En esta línea Hildgen en 2008^{242f} comprobó que el IC₅₀ de los dendrímeros cargados con MTX era inferior al del antifolato soluble cuando se ensayaba *in vitro* con células humanas de glioblastoma (U87), sugiriendo así la potenciación de la citotoxicidad por parte de los dendrímeros.

3.6 CONCLUSIONES

A modo de resumen del trabajo presentado en este capítulo, se pueden extraer las siguientes conclusiones.

1. Se han sintetizado y caracterizado nanopartículas de óxidos de hierro funcionalizadas con los antifolatos RTX y PTX de forma covalente. Para llevar a cabo esta conjugación covalente fue necesario utilizar como linker el compuesto comercial APTES. La correcta funcionalización de las nanopartículas se ha comprobado a través de espectroscopía de infrarrojo (FT-IR) donde las bandas típicas de los antifolatos y del grupo sililamina han sido fácilmente identificadas. Además, a través de las técnicas de TEM y DLS se han determinado los tamaños de los núcleos de Fe_3O_4 y los radios hidrodinámicos de la conjunción nanopartícula-APTES-antifolato. Los resultados obtenidos de estos ensayos han demostrado que los núcleos de óxido de hierro presentaban diámetros aproximados de 5 nm y además apuntaban a que en disoluciones acuosas estas nanopartículas se agregaban parcialmente llegando a formar conglomerados de aproximadamente 100 nm.
2. Por otra parte, para la inclusión de los antifolatos RTX, PTX y MTX de forma no covalente se han sintetizado y caracterizado nanopartículas de óxido de hierro funcionalizadas con las diescuaramidas **C2** o **C4** y DMSA conjuntamente. La síntesis se ha realizado en un solo paso y las nanopartículas híbridas han sido caracterizadas por FT-IR donde se identificaron las bandas más significativas de las escuaramidas y del DMSA. Al igual que en caso anterior, los tamaños de los núcleos de Fe_3O_4 y los radios hidrodinámicos de la conjunción nanopartícula-DMSA-escuaramida han sido determinados a partir de las técnicas de TEM y DLS. Los diámetros aproximados de los núcleos de Fe_3O_4 son de 5 nm y nuevamente se han observado agregados en torno a 100 nm de las nanopartículas funcionalizadas en disoluciones acuosas. Cabe mencionar que la presencia de DMSA aumentó considerablemente la solubilidad en agua de estas nanopartículas.
3. Se ha evaluado la capacidad de liberación de los antifolatos RTX y PTX unidos covalentemente a la superficie de las nanopartículas a través de un ensayo *in vitro* con un crudo de proteasas, simulando las condiciones lisosomales intracelulares a diferentes pH (4; 5,6 y 7,4) y distintos períodos de tiempo (24-96 h). Los resultados obtenidos han demostrado que la disminución en el pH aumentaba la liberación de RTX y PTX de las nanopartículas, hecho que estaba en concordancia con la mayor actividad de las proteasas lisosomales a valores de pH más bajos. Además, se ha comprobado que en las primeras 24 h ya se había alcanzado la cantidad máxima de fármaco que podía ser liberado. Por otra parte,

se ha demostrado cuantitativamente que la liberación de RTX era superior a la de PTX, lo cual se relacionó, por una parte, con una menor cantidad de PTX sobre la nanopartícula en comparación con RTX y por otra parte, con una hidrólisis más efectiva de los enlaces amídicos del RTX en las condiciones del ensayo *in vitro* realizado.

4. La inclusión de antifolatos en las **NP-DMSA-C2** y **NP-DMSA-C4** también ha sido estudiada. El ensayo realizado a un pH=7,4 a diferentes tiempos (15-60 min) ha demostrado que los tres antifolatos eran retenidos en un grado similar por ambas nanopartículas. Este hecho sugirió que la carga parcial en las aminas terminales de **C2**, al pH del ensayo, no afectaba el proceso de retención. Además, se ha comprobado que un mayor tiempo de contacto entre las nanopartículas funcionalizadas y los correspondientes antifolatos no incrementaba la retención de los mismos.
5. Se ha estudiado la liberación de antifolatos previamente retenidos en las nanopartículas funcionalizadas **NP-DMSA-C2** y **NP-DMSA-C4** a través de un ensayo realizado a diferentes pH (4,0 y 7,4) y distintos períodos de tiempo (24-96 h). Los resultados han demostrado un comportamiento análogo entre ambas nanopartículas dada la similitud en las cantidades liberadas de cada antifolato. Por otra parte, se ha observado una liberación más eficaz de antifolatos en medio ácido, aspecto relacionado con la protonación parcial de los ácidos carboxílicos de dichos fármacos. Además, se ha comprobado que en las primeras 24 h ya se había alcanzado la cantidad máxima de fármaco que podía ser liberado.
6. Se ha estudiado la potencial citotoxicidad de las diferentes nanopartículas transportadoras de antifolatos, comparando la eficacia de las dos estrategias. Inicialmente se evaluó la citotoxicidad de los fármacos RTX y PTX solubles frente a las células A549. Ambos fármacos mostraron distinta citotoxicidad dependiente de la dosis tras 96 h de tratamiento. La inhibición máxima alcanzada por RTX a las diferentes concentraciones estudiadas fue muy superior a la de PTX. Por otra parte, al evaluar la disminución en la viabilidad celular de A549 frente a los fármacos unidos covalentemente a las nanopartículas se han obtenido resultados con la misma tendencia observada en los fármacos solubles. Con **NP-APTES-RTX** se ha alcanzado una inhibición máxima de $78 \pm 1\%$ a una concentración de 0,05 mg Fe/mL después de 96 h de tratamiento, mientras que la citotoxicidad alcanzada por **NP-APTES-PTX**, incluso a concentraciones superiores fue ínfima. Este último resultado se ha relacionado con una menor concentración de PTX sobre la superficie de la nanopartícula y una menor liberación del mismo respecto a RTX. Finalmente, la citotoxicidad de los antifolatos transportados de forma no covalente fue estudiada a las mismas concentraciones ensayadas en la estrategia covalente y a concentraciones superiores sin lograr una disminución significativa en la viabilidad de esta línea celular. Estos hechos sugirieron que el problema radicaba en la entrada de estas nanopartículas a las células.

7. Por último, se ha comparado la citotoxicidad alcanzada por los antifolatos solubles con la obtenida a través del uso de nanopartículas. Dado que los mejores resultados se obtuvieron con la estrategia covalente, sólo se utilizaron estas nanopartículas para llevar a cabo el ensayo. Los resultados obtenidos han demostrado que el contenido de hierro intracelular tras la incubación de A549 con **NP-APTES-RTX** y **NP-APTES-PTX** era del orden de pg Fe/célula. Este hecho indicaba que la liberación máxima de RTX que se podía alcanzar dentro de la célula era aproximadamente 2×10^{-8} $\mu\text{mol/célula}$, sugiriendo así que el máximo efecto citotóxico de **NP-APTES-RTX** se alcanzaba a una concentración más baja que la observada con RTX soluble.

3.7 PARTE EXPERIMENTAL

3.7.1 MÉTODOS GENERALES

Los disolventes usados fueron adquiridos de las casas comerciales Scharlau y Panreac. Los reactivos comerciales Raltitrexed (RTX) y Metotrexato (MTX) fueron suministrados por Sigma-Aldrich. El Pemetrexed (PTX) fue comprado en Sequoia Research Products.

Las células de adenocarcinoma de pulmón humano A549 fueron suministradas por American Type Culture Collection (Manassas, VA). Los medios de cultivo y los suplementos fueron adquiridos en LabClinics SA. El medio de cultivo sin ácido fólico fue suministrado por Invitrogen.

Los ensayos por HPLC fueron realizados en un instrumento *Gilson VALVEMATE II Valve Actuator* o *Shimadzu SPD-20A* con detectores UV-Vis. Las imágenes del TEM fueron realizadas en un *Philips JEOL JEM-2100F* o *HITACHI H-600 ABS*. Las medidas de DLS y Zeta potencial fueron determinadas directamente en un *Malvern Zetasizer Nano ZS* (Malvern Instruments) Los ensayos de ICP-OES se realizaron en un instrumento *PERKIN ELMER Optima 5300 DV* Los espectros de FT-IR se registraron con un espectrofotómetro *Bruker Tensor 27* mediante pastillas de KBr. Las medidas de absorbancia de los ensayos de viabilidad celular fueron registradas en un lector de placas *AsysHitech GmbH*.

3.7.2 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE Fe₃O₄

En un matraz de fondo redondo de 100 mL, se introducen 0,71 g de Fe(acac)₃ (2 mmol), 3 mL de oleilamina (cis-1-amino-9-octadeceno) (6 mmol), 2 mL de ácido oleico (6 mmol), 2,58 g de 1,2-hexadecanediol (10 mmol) y 20 mL de difeniléter. La disolución se calienta a 200 °C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se refluje a 265 °C durante 30 minutos más. Posteriormente, la disolución se deja enfriar a temperatura ambiente. A continuación se adicionan 25 mL de EtOH y el precipitado negro se aísla por centrifugación a 8000 rpm. Este sólido se lava EtOH (3 x 15 mL) centrifugando cada vez. Finalmente se re-suspende en 25 mL de una disolución 75 mM de oleilamina y 75 mM de ácido oleico en hexano.

FT-IR (KBr): 3385, 2921, 2851, 1627, 1512, 578 cm⁻¹.

3.7.3 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE Fe₃O₄ FUNCIONALIZADAS

3.7.3.1 SÍNTESIS DE NP-APTES

En un matraz de fondo redondo de 100 mL se introduce el volumen (mililitros) equivalente a 25 mg de nanopartículas dispersas en hexano. Las NP se precipitan, se lavan con EtOH (2 x 7 mL) y se secan para eliminar los restos de disolvente. A continuación, se dispersan en 50 mL de tolueno anhidro y se añaden 0,5 mL de APTES (2,1 mmol). La mezcla se irradia con ultrasonidos durante 4 h a 60 °C. Transcurrido este tiempo las NP ya

funcionalizadas se separan de la disolución con ayuda de un imán y a continuación se lavan con EtOH (3 x 15 mL) y H₂O (3 x 15 mL).

FT-IR (KBr): 3400, 2923, 2852, 1631, 1384, 1012, 628, 449 cm⁻¹.

3.7.3.2 SÍNTESIS DE *NP-APTES-RTX* Y *NP-APTES-PTX*

En un matraz de fondo redondo de 50 mL se introducen 5 mg de RTX o PTX (0,01 mmol) disueltos en 1 mL de DMSO. A continuación se adicionan 15,5 mg de DCC (0,075 mmol) y 1,7 mg de NHS (0,015 mmol) disueltos en 2 mL de H₂O. 10 mg de ***NP-APTES*** dispersas en 5 mL de H₂O se añaden a la disolución anterior. El pH final de la mezcla se ajusta a 8-9 añadiendo unas gotas de NaOH 1M. La suspensión final se agita a 37 °C durante 24 h. Finalmente, las NP funcionalizadas con RTX o PTX se separan de la disolución con ayuda de un imán, se decantan y se lavan repetidamente con H₂O.

FT-IR (KBr): 3326, 2927, 2850, 1626, 1558, 1448, 1388, 997, 596, 443 cm⁻¹. (***NP-APTES-RTX***)

FT-IR (KBr): 3380, 2922, 2850, 1627, 1559, 1467, 1384, 1002, 598, 443 cm⁻¹. (***NP-APTES-PTX***)

3.7.3.3 SÍNTESIS DE *NP-DMSA*

En un tubo Falcon de 15 mL se introducen los mililitros equivalentes a 10 mg de nanopartículas sin funcionalizar dispersas en hexano. Las NP se precipitan y se lavan con EtOH (2 x 7 mL) decantando cada vez la disolución. A continuación, las nanopartículas se dispersan en 1 mL de tolueno y se adicionan 40 mg de DMSA (0,22 mmol) disueltos en 0,2 mL de DMSO. La mezcla se irradia con ultrasonidos durante 5 minutos y se deja en agitación 12 h. Posteriormente, las NP funcionalizadas se separan de la disolución con ayuda de un imán y se decantan. Se lavan con EtOH (3 x 5 mL), MeOH (2 x 5 mL), acetona (1 x 5 mL) y finalmente se dispersan en 0,7 mL de una disolución NH₄OH al 0,1%.

FT-IR (KBr): 3138, 1587, 1378, 599, 450 cm⁻¹.

3.7.3.4 SÍNTESIS DE *NP-DMSA-C2* y *NP-DMSA-C4*

En un tubo Falcon de 15 mL se introducen los mililitros equivalentes a 10 mg de nanopartículas sin funcionalizar dispersas en hexano. Las NP se precipitan y se lavan con EtOH (2 x 7 mL) decantando cada vez la disolución. A continuación, las nanopartículas se dispersan en 1 mL de tolueno y se adicionan 40 mg de DMSA (0,22 mmol) y 77,3 mg de ***C2*** o 104,6 mg de ***C4*** (0,22 mmol) disueltos en 0,2 mL de DMSO. La mezcla se irradia con ultrasonidos durante 5 minutos y se deja en agitación 12 h. Posteriormente, las NP funcionalizadas se separan de la disolución con ayuda de un imán y se decantan. Se lavan con EtOH (3 x 5 mL), MeOH (2 x 5 mL), acetona (1 x 5 mL) y finalmente se dispersan en 1,2 mL de una disolución NH₄OH al 0,1%.

FT-IR (KBr): 3387, 1800, 1591, 1485, 1371, 1261, 607, 468 cm⁻¹. (***NP-DMSA-C2***)

FT-IR (KBr): 3423, 1803, 1591, 1487, 1374, 1226, 619 cm⁻¹. (***NP-DMSA-C4***)

3.7.4 ENSAYOS POR HPLC

3.7.4.1 ESTIMACIÓN DE LA CANTIDAD DE RTX Y PTX UNIDO COVALENTEMENTE A *NP-APTES-RTX* Y *NP-APTES-PTX*

Para la cuantificación aproximada de antifolatos unidos covalentemente a las nanopartículas a través del APTES se procedió de la siguiente forma. 10 mg exactos de nanopartículas de Fe₃O₄ previamente precipitadas, lavadas varias veces con EtOH y secadas se pusieron a reaccionar con el APTES tal como se describe en el apartado de síntesis 3.7.3.1. Las nanopartículas funcionalizadas con APTES se lavaron con EtOH y H₂O repetidamente centrifugando cada vez la disolución. Posteriormente, utilizando la totalidad de las *NP-APTES* obtenidas, se llevó a cabo la formación de la amida con RTX o PTX siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 3.7.3.2. Las *NP-APTES-RTX* y *NP-APTES-PTX* se decantaron del medio de reacción por centrifugación y se lavaron varias veces con H₂O, reservando tanto el medio de reacción como los lavados. La disolución proveniente de la reacción y los lavados se concentró en el rotavapor para eliminar el H₂O, quedando así el DMSO utilizado en la reacción. Se midió el volumen remanente y una alícuota de 500 µL se traspasó a un tubo de RMN y se le añadieron 50 µL adicionales de DMSO-d₆ y 2 µL de CH₂Cl₂ como patrón interno.

Por otra parte se prepararon disoluciones de concentración conocida de cada antifolato pesando entre 2 y 5 mg de cada uno de ellos respectivamente y disolviéndolos en 500 µL de DMSO-d₆ y 2 µL de CH₂Cl₂ como patrón interno también.

Se procedió a realizar los espectros de ¹H-RMN de la disolución de concentración desconocida y conocida de cada antifolato respectivamente. A cada espectro se le asignó un valor de 1H a la señal del CH₂Cl₂. Posteriormente para cada antifolato se eligió una señal significativa en cada uno de los espectros (concentración conocida y desconocida) y comparando los valores de sus integrales se dedujo la concentración de RTX y PTX en disolución. Recalculando este valor por las diluciones realizadas se obtuvo la cantidad de cada antifolato que no había reaccionado, y por diferencia con la cantidad inicial, los mg unidos covalentemente a la superficie de las nanopartículas a través del APTES.

A partir del peso total de nanopartículas utilizado inicialmente (10 mg) se dedujeron los mg de Fe a través de los resultados del ICP-OES realizado a dichas NP. Así, finalmente, al dividir los µmol de RTX o PTX entre los mg de Fe se obtuvo una estimación de la cantidad de cada antifolato sobre la superficie de la nanopartícula.

3.7.4.2 CUANTIFICACIÓN DE RTX Y PTX LIBERADO DE *NP-APTES-RTX* Y *NP-APTES-PTX*

Para determinar la cantidad de RTX y PTX liberado de *NP-APTES-RTX* y *NP-APTES-PTX* respectivamente, se realizó un ensayo donde se simularon las condiciones lisosomales intracelulares a diferentes pH. Para ello 0,5 mg de *NP-APTES-RTX* o *NP-APTES-PTX* se dispersaron en 5 mL de tampón PBS. El pH de la disolución se ajustó a 4,0; 5,6 y 7,4 utilizando HCl 1M. A continuación se añadió 1 mg de proteasas de páncreas bovino (Aldrich) a la dispersión anterior. Cada mezcla se incubó a 37 °C durante 24, 48, 72 y 96 h

respectivamente. A cada tiempo correspondiente se tomaron alícuotas de 0,5 mL de cada disolución y se analizaron por HPLC para determinar la cantidad de RTX y PTX liberado. Condiciones del ensayo: columna C18, modo isocrático PBS/CH₃CN (80:20), flujo 0,8 mL/min, volumen de muestra inyectado 30 µL, λ_{RTX} : 264 nm, λ_{PTX} : 250 nm.

3.7.4.3 CUANTIFICACIÓN RTX, PTX Y MTX RETENIDO POR *NP-DMSA-C2* Y *NP-DMSA-C4*

Para determinar la cantidad de cada antifolato que era retenido por las nanopartículas funcionalizadas con DMSA y escuaramidas se realizó un ensayo de retención seguido por HPLC a diferentes tiempos. Para ello 0,2 mg de *NP-DMSA-C2* o *NP-DMSA-C4* se dispersaron en 0,5 mL de una disolución 1×10^{-4} M de RTX en tampón PBS a pH=7,4 y se agitaron durante 15, 30, 45 y 60 minutos respectivamente. Posteriormente las nanopartículas se aislaron y se lavaron una vez con PBS. La disolución resultante se filtró y se analizó por HPLC para determinar la concentración remanente de RTX. Para el resto de antifolatos se siguió el mismo procedimiento experimental.

Condiciones del ensayo: columna C18, modo isocrático PBS/CH₃CN (80:20), flujo 0,6 mL/min, volumen de muestra inyectado 20 µL, λ_{RTX} : 264 nm, λ_{PTX} : 250 nm y λ_{MTX} : 303 nm.

3.7.4.4 CUANTIFICACIÓN RTX, PTX Y MTX LIBERADO POR *NP-DMSA-C2* Y *NP-DMSA-C4*

Para determinar la cantidad de cada antifolato liberado de las nanopartículas funcionalizadas con DMSA y escuaramidas se realizó un ensayo de retención a diferentes pH y tiempos seguido por HPLC. Para llevar a cabo este ensayo las *NP-DMSA-C2* y *NP-DMSA-C4* anteriormente cargadas con los antifolatos se dispersaron en 1 mL de PBS a pH=7,4 y se incubaron 37 °C durante 24, 48, 72 y 96 h respectivamente bajo agitación constante. El mismo procedimiento experimental se repitió ajustando el pH a 4. Posteriormente las nanopartículas se aislaron y se lavaron una vez con PBS. La disolución resultante se filtró y se analizó por HPLC para determinar la concentración de RTX, PTX o MTX liberado.

Condiciones del ensayo: columna C18, modo isocrático PBS/CH₃CN (80:20), flujo 0,6 mL/min, volumen de muestra inyectado 20 µL, λ_{RTX} : 264 nm, λ_{PTX} : 250 nm y λ_{MTX} : 303 nm.

3.7.5 CULTIVOS CELULARES Y VIABILIDAD

3.7.5.1 CULTIVOS CELULARES Y TRATAMIENTOS

Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 2 mM, suero fetal bovino 10% (v/v), penicilina 100 unidades/mL y estreptomycin 100 mg/mL. Cuando las células alcanzaron el 60-70% de confluencia, Raltitrexed (RTX), Pemetrexed (PTX), *NP-APTES-RTX*, *NP-APTES-PTX*, *NP-DMSA-C2*, *NP-DMSA-C2/RTX*, *NP-DMSA-C2/PTX*, *NP-DMSA-C2/MTX*, *NP-DMSA-C4*, *NP-DMSA-C4/RTX*, *NP-DMSA-C4/PTX* o *NP-DMSA-C4/MTX* se añadieron al medio a diferentes concentraciones y se incubaron entre 24-96 h. Las disoluciones madre de RTX y PTX se prepararon a concentración 1 mM en

PBS. Las disoluciones madre de todas las nanopartículas se prepararon a concentración 1 mg Fe/mL en PBS.

3.7.5.2 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

Las células A549 se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de $4,5 \times 10^3$ células por pocillo en 200 μ L de medio de crecimiento RPMI sin ácido fólico y se cultivaron durante 24 h. Para probar la eficacia de los compuestos sobre el crecimiento celular, las células fueron tratadas con RTX (25-1000 nM), PTX (10-1000 nM), **NP-APTES-RTX** y **NP-APTES-PTX** (0,001-0,01 mg Fe/mL), **NP-DMSA-C2**, **NP-DMSA-C2/RTX**, **NP-DMSA-C2/PTX**, **NP-DMSA-C2/MTX**, **NP-DMSA-C4**, **NP-DMSA-C4/RTX**, **NP-DMSA-C4/PTX** y **NP-DMSA-C4/MTX** (0,001 a 1 mg Fe / ml) durante 24, 48, 72 y 96 h. Después del tratamiento, se midió la viabilidad de las células usando el método metiltiazoltetrazolio (MTT), tal como fue descrito por Mosmann²⁵¹ y se midió la absorbancia a 590/650 nm en un lector de placas ELISA. El porcentaje medio de supervivencia en relación con las células tratadas con vehículo se calculó a partir de los datos de tres experimentos individuales realizados por triplicado.

3.7.5.3 CAPTACIÓN INTRACELULAR DE **NP-APTES-RTX** Y **NP-APTES-PTX**

Las células A549 se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de 75×10^3 células por pocillo en 1,5 mL de medio de crecimiento sin ácido fólico y se cultivaron durante 24 h. Para cuantificar la entrada de nanopartículas a las células, éstas se trataron con **NP-APTES-RTX** y **NP-APTES-PTX** (0,01 mg Fe/mL) durante 24 h. Después del tratamiento, las células se lavaron con disolución Versene (2 x 1 mL) y con PBS (3 x 1 mL). Las células fueron separadas con tripsina-EDTA 0,25%, centrifugadas y resuspendidas en 1 mL de PBS suplementado con un 10% de Suero Bovino Fetal (FBS). 10 μ L de esta suspensión se utilizó para contar el número de células en una cámara de Neubauer. La suspensión restante se trató con 100 μ L de HCl concentrado y se incubó a 70 °C durante 1 h. Finalmente, la concentración de hierro intracelular se determinó por ICP-OES. La concentración de Fe intracelular promedio de las células tratadas en relación con las células control se calculó a partir de tres experimentos individuales realizados por triplicado.

4. CONCLUSIONES GENERALES

4. CONCLUSIONES GENERALES

A modo de resumen del trabajo desarrollado a lo largo de esta tesis se presentan las siguientes conclusiones generales.

1. Se han sintetizado y caracterizado diversas nanopartículas de óxidos de hierro funcionalizadas. Por una parte, se han utilizado escuaramidas para la mencionada funcionalización a través del uso de linkers como dopamina o APTES. Además, a través de este último linker también se han conjugado covalentemente antifolatos a la superficie de estas nanopartículas.
2. Se ha evaluado el comportamiento supramolecular de varias nanopartículas de óxidos de hierro funcionalizadas con escuaramidas frente a carboxilatos e iones de metales pesados. En ambos casos se ha comprobado la utilidad de estas nanopartículas híbridas para actuar como sensores y/o receptores de estos analitos, estableciendo incluso cierta selectividad en ambos procesos.
3. Se ha estudiado la actividad biológica de varias de las nanopartículas funcionalizadas covalente y no covalentemente con antifolatos frente a la línea celular A549. Estos estudios han demostrado que en las condiciones ensayadas la estrategia covalente ofrecía un transporte hacia el interior celular más eficiente, traduciéndose, en un caso específico, en una mayor inhibición de la viabilidad celular.

5. RESUMEN BIBLIOGRAFÍA

5. RESUMEN BIBLIOGRAFÍA

- 1) V. R. Devadasu, V. Bhardwaj, M. N. V. R. Kumar, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 1686-1735.
- 2) M. Auffan, J. Rose, J.-Y. Bottero, G. V. Lowry, J.-P. Jolivet, M. R. Wiesner, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 634-641.
- 3) (a) A. Mogoutov, B. Kahane, *Res. Policy* **2007**, *36*, 893-903; (b) A. Porter, J. Youtie, P. Shapira, D. Schoeneck, *J. Nanopart. Res.* **2008**, *10*, 715-728; (c) C. Huang, A. Notten, N. Rasters, *J. Technol. Transfer* **2011**, *36*, 145-172.
- 4) A. D. Maynard, *Ann. Occup. Hyg.* **2007**, *51*, 1-12.
- 5) (a) P. Guo, O. Coban, N. M. Snead, J. Trebley, S. Hoepflich, S. Guo, Y. Shu, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 650-666; (b) E. L. Romero, M. J. Morilla, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 576-588; (c) K. R. Vega-Villa, J. K. Takemoto, J. A. Yáñez, C. M. Remsberg, M. L. Forrest, N. M. Davies, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 929-938; (d) A. Petri-Fink, M. Chastellain, L. Juillerat-Jeanneret, A. Ferrari, H. Hofmann, *Biomaterials* **2005**, *26*, 2685-2694.
- 6) M. Mahmoudi, A. S. Milani, P. Stroeve, *Int. J. Biomed. Nanosci. Nanotechnol.* **2010**, *1*, 164-201.
- 7) (a) C. Sun, J. S. H. Lee, M. Zhang, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1252-1265; (b) V. I. Shubayev, T. R. Pisanic, S. Jin, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 467-477; (c) A. K. Gupta, M. Gupta, *Biomaterials* **2005**, *26*, 3995-4021; (d) J. D. G. Durán, J. L. Arias, V. Gallardo, A. V. Delgado, *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 2948-2983.
- 8) M. P. Morales, S. Veintemillas-Verdaguer, M. Montero, C. J. Serna, A. Roig, L. Casas, B. Martínez, F. Sadiumenge, *Chem. Mater.* **1999**, *11*, 3058-3064.
- 9) (a) C. E. Sjogren, C. Johansson, A. Naevestad, P. C. Sontum, K. Briley-Saebo, A. K. Fahlvik, *Magn. Reson. Imaging* **1997**, *15*, 55-67; (b) A. C. Nunes, Z. C. Yu, *J. Magn. Magn. Mater.* **1987**, *65*, 265-268; (c) S. Thurm, S. Odenbach, *J. Magn. Magn. Mater.* **2002**, *252*, 247-249; (d) L. Babes, B. Denizot, G. Tanguy, J. J. Le Jeune, P. Jallet, *J. Colloid Interface Sci.* **1999**, *212*, 474-482.
- 10) (a) J. G. King, W. Williams, C. D. W. Wilkinson, S. McVitie, J. N. Chapman, *Geophys. Res. Lett.* **1996**, *23*, 2847-2850; (b) A. Rishton, Y. Lu, R. A. Altman, A. C. Marley, C. Bian, R. Viswanathan, G. Xiao, W. J. Gallagher, S. S. P. Parkin, *Microelectron. Eng.* **1997**, *35*, 249-252; (c) C. S. Lee, H. Lee, R. M. Westervelt, *Appl. Phys. Lett.* **2001**, *79*, 3308-3310; (d) S. Mathur, S. Barth, U. Werner, F. Hernández-Ramírez, A. Romano-Rodríguez, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 1550-1554.
- 11) (a) G. M. da Costa, E. de Grave, P. M. A. de Bakker, R. E. J. Vandenberghe, *Solid State Chem.* **1994**, *113*, 405-412; (b) H. Itoh, T. Sugimoto, *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *265*, 283-295.
- 12) (a) R. Massart, *IEEE Trans. Magn.* **1981**, *17*, 1247-1248; (b) J. H. Wu, S. P. Ko, H. L. Liu, S. Kim, J. S. Ju, Y. K. Kim, *Mater. Lett.* **2007**, *61*, 3124-3129.

- 13) (a) Y. B. Kholam, S. R. Dhage, H. S. Potdar, S. B. Deshpande, P. P. Bakare, S. D. Kulkarni, S. K. Date, *Mater. Lett.* **2002**, *56*, 571-577; (b) F. Chen, Q. Gao, G. Hong, J. Ni, *J. Magn. Magn. Mater.* **2008**, *320*, 1775-1780.
- 14) G. Salazar-Álvarez, M. Muhammed, A. A. Zagorodni, *Chem. Eng. Sci.* **2006**, *61*, 4625-4633.
- 15) (a) L. Cabrera, S. Gutiérrez, N. Menéndes, M. P. Morales, P. Herrasti, *Electrochem. Acta* **2008**, *53*, 3436-3441; (b) R. F. C. Marques, C. García, P. Lecante, J. L. Ribeiro, L. Noé, N. J. O. Silva, V. S. Amaral, A. Millan, M. Verelst, *J. Magn. Magn. Mater.* **2008**, *320*, 2311-2315.
- 16) R. Strobel, S. E. Pratsinis, *Adv. Powder Technol.* **2009**, *20*, 190-194.
- 17) (a) N. Enomoto, J. Akagi, Z. Nakagawa, *Ultrason. Sonochem.* **1996**, *3*, S97-S103; (b) F. Dang, N. Enomoto, J. Hojo, K. Enpuku, *Ultrason. Sonochem.* **2009**, *16*, 649-654.
- 18) (a) M. Breulmann, H. Colfen, H. P. Hentze, M. Antonietti, D. Walsh, S. Mann, *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 237-241; (b) M. A. Bakar, W. L. Tan, N. H. H. A. Bakar, *J. Magn. Magn. Mater.* **2007**, *314*, 1-6.
- 19) (a) J. W. Moon, Y. Roh, R. J. Lauf, H. Vali, L. W. Yeary, T. J. Phelps, *J. Microbiol. Methods* **2007**, *70*, 150-158; (b) J. W. Moon, C. J. Rawn, A. J. Rondinone, L. J. Love, Y. Roh, S. M. Everett, R. J. Lauf, T. J. Phelps, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *37*, 1023-1031.
- 20) (a) X. M. Liu, G. Yang, S. Y. Fu, *Mater. Sci. Eng. C* **2007**, *27*, 750-755; (b) J. L. Gunjekar, A. M. More, V. R. Shinde, C. D. Lokhande, *J. Alloys Compd.* **2008**, *465*, 468-473; (c) K. P. Naidek, F. Bianconi, T. C. R da Rocha, D. Zanchet, J. A. Bonacin, M. A. Novak, M. G. F. Vaz, H. Winnischofer, *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *358*, 39-46.
- 21) (a) M. T. López-López, J. D. G. Durán, A. V. Delgado, F. González- Caballero, *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *291*, 144-151; (b) J. L. Viota, J. D. G. Durán, F. González- Caballero, A. V. Delgado, *J. Magn. Magn. Mater.* **2007**, *314*, 80-86.
- 22) J. P. Jolivet, C. Chaneac, E. Tronc, *Chem. Commun.* **2004**, 481-483.
- 23) X. Q. Liu, S. W. Tao, Y. S. Shen, *Sens. Actuators A* **1997**, *40*, 161-165.
- 24) C. Cannas, D. Gatteschi, A. Musinu, G. Piccaluga, C. Sangregorio, *J. Phys. Chem.* **1998**, *102*, 7721-7726.
- 25) K. Byrappa, S. Ohara, T. Adschiri, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 299-327.
- 26) (a) C. Feldmann, H. O. Jungk, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 359-362; (b) J. Ding, K. Tao, J. Li, S. Song, K. Sun, *Colloids Surf. B* **2010**, *79*, 184-192; (c) C. Cheng, F. Xu, H. Gu, *New J. Chem.* **2011**, *35*, 1072-1079.
- 27) (a) P. Toneguzzo, G. Viau, O. Acher, F. Fiévet-Vincent, F. Fiévet, *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 1032-1035; (b) G. Viau, F. Fiévet-Vincent, F. Fiévet, *J. Mater. Chem.* **1996**, *6*, 1047-1056.
- 28) S. Ge, X. Shi, K. Sun, C. Li, J. R. Baker, M. M. B. Holl, B. G. Orr, *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 13593-13599.

- 29) C. Pascal, J. L. Pascal, F. Favier, M. L. Elidrissi, C. Payen, *Chem. Mater.* **1999**, *11*, 141-147.
- 30) T. González-Carreño, M. P. Morales, M. Gracia, C. J. Serna, *Mater. Lett.* **1993**, *18*, 151-155.
- 31) V. F. Puentes, K. M. Krisnan, A. P. Alivisatos, *Science* **2001**, *291*, 2115-2117.
- 32) R. Vijayakumar, Y. Koltypin, I. Felner, A. Gedanken, *Mater. Sci. Eng. A* **2000**, *286*, 101-105.
- 33) S. Sun, H. Zeng, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8204-8205.
- 34) (a) S. H. Sun, H. Zeng, D. R. Robinson, S. Raoux, P. M. Rice, S. X. Wang, G. X. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 273-279; (b) C. J. Xu, S. H. Sun, *Polym. Int.* **2007**, *56*, 821-826.
- 35) S. Santra, R. Tapeç, N. Theodoropoulou, J. Dobson, A. Hebard, W. Tan, *Langmuir* **2001**, *17*, 2900-2906.
- 36) Y. Hou, H. Kondoh, M. Shimojo, E. O. Sako, N. Ozaki, T. J. Kogure, T. Ohta, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 4845-4852.
- 37) E. Strable, J. W. M. Bulte, B. Moskowitz, K. Vivekanandan, M. Allen, T. Douglas, *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 2201-2209.
- 38) C. Sangregorio, J. K. Wiemann, C. J. O'Connor, Z. Rosenzweig, *J. Appl. Phys.* **1999**, *85*, 5699-5701.
- 39) (a) J. Rivas, R. D. Sánchez, A. Fondado, C. Izco, A. J. García-Bastida, J. García-Otero, J. Mira, D. Baldomir, A. González, I. Lado, M. A. López-Quintela, S. B. Oseroff, *J. Appl. Phys.* **1994**, *76*, 6564-6566; (b) J. A. López-Pérez, M. A. López-Quintana, J. Mira, J. Rivas, *IEEE Trans. Magn.* **1997**, *33*, 4359-4362; (c) E. E. Carpenter, *J. Magn. Mater.* **2001**, *225*, 17-20.
- 40) C. Lang, D. Schüler, *J. Phys. Condens. Matter.* **2006**, *18*, S2815-S2828.
- 41) O. V. Kharissova, H. V. R. Dias, B. I. Kharisov, B. Olvera, V. M. Jiménez, *Trends Biotechnol.* **2013**, *31*, 240-248.
- 42) K. B. Narayanan, N. Sakthivel, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2010**, *156*, 1-13.
- 43) R. S. Carma, *Curr. Opin. Chem. Eng.* **2012**, *1*, 123-128.
- 44) P. P. Gan, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **2012**, *11*, 169-206.
- 45) (a) J. Xie, J. Y. Lee, D. I. C. Wang, Y. P. Ting, *Small* **2007**, *3*, 672-682; (b) Y. Zhou, W. Lin, J. Huang, W. Wang, Y. Gao, L. Lin, Q. Li, L. Lin, M. Du, *Nanoscale Res. Lett.* **2010**, *5*, 1351-1359; (c) J. Huang, Guowu Zhan, B. Zheng, D. Sun, F. Lu, Y. Lin, H. Chen, Z. Zheng, Y. Zheng, Q. Li, *Eng. Chem. Res.* **2011**, *50*, 9095-9106; (d) N. C. Sharma, S. V. Sahi, S. Nath, J. G. Parsons, J. L. Gardea-Torresdey, T. Pal, *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 5137-5142; (e) A. R. Vilchis-Nestor, M. Avalos-Borja, S. A. Gómez, J. A. Hernández, A. Olivas, T. A. Zepeda, *Appl. Catal. B: Environ.* **2009**, *90*, 64-73; (f) M. Du, G. Zhan, X. Yang, H. Wang, W. Lin, Y. Zhou, J. Zhu, L. Lin, J. Huang, D. Sun, L. Jia, Q. Li, *J. Catal.* **2011**, *283*, 192-201; (g) G. Zhan, J. Huang, M. Du, D. Sun, I. Abdul-Rauf, W. Lin, Y. Hong, Q. Li, *Chem. Eng. J.* **2012**, *187*, 232-238.
- 46) S. Irvani, *Green Chem.* **2011**, *13*, 2638-2650.

- 47) R. Kalaiarasi, *Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol.* **2010**, *11*, 1-16.
- 48) Y. Cai, Y. Shen, A. Xie, S. Li, X. Wang, *J. Magn. Magn. Mater.* **2010**, *322*, 2938-2943.
- 49) G. S. Dhillon, S. K. Brar, S. Kaur, M. Verma, *Crit. Rev. Biotechnol.* **2012**, *32*, 49-73.
- 50) J. G. Parsons, J. R. Peralta-Videa, J. L. Gardea-Torresdey, *Dev. Environ. Sci.* **2007**, *5*, 463-485.
- 51) S. Chen, J. Feng, X. Guo, J. Hong, W. Ding, *Mater. Lett.* **2005**, *59*, 985-988.
- 52) (a) A. Shavel, L. M. Liz-Marzan, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 3762-3766; (b) H. Yang, T. Ogawa, D. Hasegawa, M. Takahashi, *J. Appl. Phys.* **2008**, *103*, 07D526; (c) N. Lee, Y. Choi, Y. Lee, M. Park, W. K. Moon, S. H. Choi, T. Hyeon, *Nano Lett.* **2012**, *12*, 3127-3131.
- 53) J. Cheon, N.-J. Kang, S.-M. Lee, J.-H. Lee, J.-H. Yoon, S. J. Oh, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1950-1951.
- 54) (a) S.-J. Park, S. Kim, S. Lee, Z. G. Khim, K. Char, T. Hyeon, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8581-8582; (b) I. Milosevic, H. Jouni, C. David, F. Warmont, D. Bonnin, L. Motte, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 18999-19004.
- 55) (a) M. R. Buck, R. E. Schaak, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6154-6178; (b) Q. He, T. Yuan, S. Wei, N. Haldolaarachchige, Z. Luo, D. P. Young, A. Khasanov, Z. Guo, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8842-8845.
- 56) C. de Montferrand, L. Hu, I. Milosevic, V. Russier, D. Bonnin, L. Motte, A. Brioude, Y. Lalatonne, *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 6150-6157.
- 57) (a) D. L. Ma, J. W. Guan, F. Normandin, S. Denommee, G. Enright, T. Veres, B. Simard, *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 1920-1927; (b) S. Chen, Y. Li, C. Guo, J. Wang, J. Ma, X. Liang, L. R. Yang, H. Z. Liu, *Langmuir* **2007**, *23*, 12669-12676; (c) H. Liu, J. Guo, L. Jin, W. Yang, C. J. Wang, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 3315-3321.
- 58) L. Harivardhan, J. L. Arias, J. Nicolas, P. Couvreur, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 5818-5878.
- 59) (a) J. W. Bulte, Y. Hoekstra, R. L. Kamman, R. L. Magin, A. G. Webb, R. W. Briggs, K. G. Go, C. E. Hulstaert, S. Miltenyi, T. H. The, L. D. Leij, *Magn. Reson. Med.* **1992**, *25*, 148-157; (b) C. C. Berry, S. Wells, S. Charles, A. S. G. Curtis, *Biomaterials* **2003**, *24*, 4551.
- 60) T. Y. Liu, S. H. Hu, K. H. Liu, D. M. Liu, S. Y. Chen, *J. Control. Release* **2008**, *126*, 228-236.
- 61) (a) M. D. Butterworth, L. Illum, S. S. Davis, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **2001**, *179*, 93-102; (b) J. F. Lutz, S. Stiller, A. Hoth, L. Kaufner, U. Pison, R. Cartier, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 3132-3138.
- 62) (a) J. Gallo, I. García, D. Dlanco, B. Arnaiz, S. Penadés, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 10010-10020; (b) J. Jeong, T. H. Ha, B. H. Chung, *Anal. Chim. Acta* **2006**, *569*, 203-209.
- 63) W. S. Seo, J. H. Lee, X. Sun, Y. Suzuki, D. Mann, Z. Liu, M. Terashima, P. C. Yang, M. V. McConnell, D. G. Nishimura, H. Dai, *Nat. Mater.* **2006**, *5*, 971-976.

- 64) M. Chastellain, A. Petri, A. Gupta, K. V. Rao, H. Hofmann, *Adv. Eng. Mater.* **2004**, *6*, 235-241.
- 65) (a) J. L. Arias, V. Gallardo, F. Linares-Molinero, A. V. Delgado, *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *299*, 599-607; (b) J. L. Arias, M. López-Viota, E. Sáez-Fernández, M. A. Ruiz, A. V. Delgado, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **2011**, *384*, 157-165.
- 66) S. Lecommandoux, O. Sandre, F. Chécot, R. Perzynski, *Prog. Solid State Chem.* **2006**, *34*, 171-179.
- 67) (a) E. Peira, P. Marzola, V. Podio, S. Aime, A. Sbarbati, M. R. Gasco, *J. Drug Target.* **2003**, *11*, 19-24; (b) M. Gonzales, K. M. Krishnan, *J. Magn. Magn. Mater.* **2005**, *293*, 265-270; (c) M. H. Hsu, Y. C. Su, *Biomed. Microdevices* **2008**, *10*, 785-793.
- 68) (a) P. A. Venter, A. Dirksen, D. Thomas, M. Manchester, P. E. Dawson, A. Schneemann, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2293-2301; (b) Z. Liu, X. Sun, N. Nakayama-Ratchford, H. Dai, *ACS Nano* **2007**, *1*, 50-56.
- 69) R. W. Saalfrank, H. Maid, A. Scheurer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8794-8824.
- 70) C. M. Drain, G. Smeureanu, S. Patel, X. Gong, J. Garnod, J. Arijeloye, *New J. Chem.* **2006**, *30*, 1834-1843.
- 71) C. Xu, S. Sun, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 732-743.
- 72) J. L. Sessler, P. A. Gale, W.-S. Cho, *Anion Receptor Chemistry*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2006**.
- 73) J. Zhang, X. Xuab, X. Yang, *Analyst* **2012**, *137*, 1556-1558.
- 74) K. Y. Lee, D. W. Kim, J. Heo, J. S. Kim, J.-K. Yang, G.-W. Cheong, S. W. Han, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2006**, *27*, 2081-2083.
- 75) (a) P. Sokkalingam, S.-J. Hong, A. Aydogan, J. L. Sessler, C.-H. Lee, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 5860-5867; (b) R. Velu, V.T. Ramakrishnan, P. Ramamurthy, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2011**, *217*, 313-320.
- 76) D. P. Cormode, J. J. Davis, P. D. Beer, *J. Inorg. Organomet. Polym.* **2008**, *18*, 32-40.
- 77) (a) D. Astruc, M.-C. Daniel, J. Ruiz, *Chem. Commun.* **2004**, 2637-2649; (b) W.L. Daniel, M.S. Han, J.S. Lee, C.A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6362-6363.
- 78) S. Watanabe, M. Sonobe, M. Arai, Y. Tazume, T. Matsuo, T. Nakamura, K. Yoshida, *Chem. Commun.* **2002**, 2866-2867.
- 79) (a) P. Calero, M. Hecht, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. Soto, J. L. Vivanco, K. Rurack, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 10599-10601; (b) I. Candel, P. Calero, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, M. D. Marcos, T. Pardo, J. Soto, *Inorg. Chim. Acta* **2012**, *381*, 188-194; (c) M. Becuwe, F. Cazier, P. Woisel, F. Delattre, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **2013**, *433*, 88-94; (d) E. Climent, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. Soto, K. Rurack, P. Amorós, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8519-8522.
- 80) J. Liu, J. Chen, Z. Fang, L. Zeng, *Analyst* **2012**, *137*, 5502-5505.
- 81) (a) J. Zhang, X. Xu, C. Yang, F. Yang, X. Yang, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 3911-3917; (b) J. Zhang, Y. Yuan, X. Xu, X. Wang, X. Yang, *Appl. Mater. Interfaces* **2011**, *3*, 4092-4100.

- 82) E. Delgado-Pinar, C. Rotger, A. Costa, M. N. Piña, H. R. Jiménez, J. Alarcón, E. García-España, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 2609-2611.
- 83) F. Ozcan, M. Ersoz, M. Yilmaz, *Mat. Sci. Eng. C* **2009**, 29, 2378-2383.
- 84) S. Sayin, F. Ozcan, M. Yilmaz, *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.* **2011**, 48, 365-372.
- 85) Y. Jin, F. Liu, M. Tong, Y. Hou, *J. Hazard. Mater.* **2012**, 227-228, 461-468.
- 86) H. Parham, B. Zargar, M. Rezazadeh, *Mat. Sci. Eng. C* **2012**, 32, 2109-2114.
- 87) A. Chatterjee, D. J. Oh, K. M. Kim, K.-S. Youk, K. H. Ahn, *Chem. Asian J.* **2008**, 3, 1962-1967.
- 88) K.-S. Youk, K. M. Kim, A. Chatterjee, K. H. Ahn, *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 3652-3655.
- 89) H. Wang, Y. Zhou, Y. Guo, W. Liu, C. Dong, Y. Wu, S. Li, S. Shuang, *Sens. Actuators B Chem.* **2012**, 173, 171-178.
- 90) J. L. Chen, A. F. Zheng, A. H. Chen, Y. C. Gao, C. Y. He, X. M. Kai, G. H. Wu, Y. C. Chen, *Anal. Chim. Acta* **2007**, 599, 134-142.
- 91) Y. Yao, Z. Sun, Z. Zou, H. Li, *Nanotechnology* **2011**, 22, 435502.
- 92) El término "química click" se refiere a la reacción de cicloadición entre una azida y un alquino para dar 1,2,3-triazoles.
- 93) S. Shin, J. Jang, *Chem. Commun.* **2007**, 4230-4232.
- 94) R. Navarro, J. Guzmán, I. Saucedo, J. Revilla, E. Guibal, *Macromol. Biosci.* **2003**, 3, 552-561.
- 95) W. Yantasee, C. L. Warner, T. Sangvanich, R. S. Addleman, T. G. Carter, R. J. Wiacek, G. E. Fryxell, C. Timchalk, M. G. Warner, *Environ. Sci. Technol.* **2007**, 41, 5114-5119.
- 96) J.-F. Liu, Z.-S. Zhao, G.-B. Jiang, *Environ. Sci. Technol.* **2008**, 42, 6949-6954.
- 97) (a) P. I. Girginova, A. L. Daniel-da-Silva, C.B. Lopes, P. Figueira, M. Otero, V. S. Amaral, E. Pereira, T. Trindade, *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, 345, 234-240; (b) M. Park, S. Seo, I. S. Lee, J. H. Jung, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 4478-4480; (c) L. Sun, Y. Li, M. Sun, H. Wang, S. Xu, C. Zhang, Q. Yang, *New J. Chem.* **2011**, 35, 2697-2704.
- 98) C. L. Warner, W. Chouyyok, K. E. Mackie, D. Neiner, L. V. Saraf, T. C. Droubay, M. G. Warner, R. S. Addleman, *Langmuir* **2012**, 28, 3931-3937.
- 99) S. Cohen, S. G. Cohen, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 1533-1536.
- 100) L. M. Schwartz, L. O. Howard, *J. Phys. Chem.* **1971**, 75, 1798-1803.
- 101) R. West, D. L. Powell, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2577-2579.
- 102) D. Quiñonero, A. Frontera, P. Ballester, P. M. Deyà, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 2001-2005.
- 103) G. Cerioni, R. Janoscheck, Z. Rappaport, T. T. Tidwell, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 6212-6217.
- 104) D. Quiñonero, R. Prohens, C. Garau, A. Frontera, P. Ballester, A. Costa, P. M. Deyà, *Chem. Phys. Lett.* **2002**, 351, 115-120.

- 105) D. Quiñonero, C. Garau, A. Frontera, P. Ballester, A. Costa, P. M. Deyà, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 433-438.
- 106) S. Tomas, R. Prohens, G. Deslongchamps, P. Ballester, A. Costa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2208-2211.
- 107) S. Tomas, R. Prohens, M. Vega, M. C. Rotger, P. M. Deyà, P. Ballester, A. Costa, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9394-9401.
- 108) R. Prohens, S. Tomas, J. Morey, P. M. Deyà, P. Ballester, A. Costa, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1063-1066.
- 109) C. Rotger, B. Soberats, D. Quiñonero, A. Frontera, P. Ballester, J. Benet-Buchholz, P. M. Deyà, A. Costa, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 1864-1868.
- 110) A. P. Davis, S. M. Draper, G. Dunne, P. Ashton, *Chem. Commun.* **1999**, 2265-2266.
- 111) M. C. Rotger, M. N. Piña, A. Frontera, G. Martorell, P. Ballester, P. M. Deyà, A. Costa, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2302-2308.
- 112) V. Amendola, G. Bergamaschi, M. Boiocchi, L. Fabbrizzi, M. Milani, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 4368-4380.
- 113) V. Amendola, L. Fabbrizzi, L. Mosca, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3889-3915.
- 114) (a) D. Quiñonero, A. Frontera, G. A. Suñer, J. Morey, A. Costa, P. Ballester, P. M. Deyà, *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *326*, 247-254; (b) J. Alemán, A. Parra, H. Jiang, K. A. Jorgensen, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 6890-6899; (c) V. Amendola, L. Fabbrizzi, L. Mosca, F.-P. Schmidtchen, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 5972-5981.
- 115) G. Ambrosi, M. Formica, V. Fusi, L. Giorgi, A. Guerri, M. Micheloni, P. Paoli, R. Pontellini, P. Rossi, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 702-712.
- 116) G. Ambrosi, M. Formica, V. Fusi, L. Giorgi, E. Macedi, M. Micheloni, P. Paoli, R. Pontellini, P. Rossi, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 1670-1682.
- 117) A. Frontera, M. Orell, C. Garau, D. Quiñonero, E. Molins, I. Mata, J. Morey, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1437-1440.
- 118) V. Ramalingam, M. E. Domaradzki, S. Jang, R. S. Muthyala, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3315-3318.
- 119) (a) M. N. Piña, B. Soberats, C. Rotger, P. Ballester, P. M. Deyà, A. Costa, *New J. Chem.* **2008**, *32*, 1919-1923; (b) M. N. Piña, C. Rotger, B. Soberats, P. Ballester, P. M. Deyà, A. Costa, *Chem. Commun.* **2007**, 963-965; (c) A. Rostami, A. Colin, X. Y. Li, M. G. Chudzinski, A. J. Lough, M. S. Taylor, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3983-3992; (d) A. Rostami, C. J. Wei, G. Guérin, M. S. Taylor, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 2107-2110; (e) A. Rostami, C. J. Wei, G. Guérin, M. S. Taylor, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2059-2062; (f) C. Jin, M. Zhang, L. Wu, Y. Guan, Y. Pan, J. Jiang, C. Lin, L. Wang, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2025-2027; (g) C. Jin, M. Zhang, C. Deng, Y. Guan, J. Gong, D. Zhu, Y. Pan, J. Jiang, L. Wang, *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 796-801; (h) R. Prohens, G. Martorell, P. Ballester, A. Costa, *Chem. Commun.* **2001**, 1456-1457.
- 120) (a) R. J. Fitzmaurice, G. M. Kyne, D. Douheret, J. D. Kilburn, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2002**, 841-864; (b) C. Seel, J. de Mendoza, *Comprehensive Supramolecular Chemistry*; F. Vogtle, Ed.; Elsevier Science: Amsterdam, **1996**; Vol. 2, pp. 519.

- 121) (a) M. D. Best, S. L. Tobey, E. V. Anslyn, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *240*, 3-15; (b) A. Terfort, G. von Kiedrowski, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 654-656.
- 122) C. R. Bondy, S. J. Loeb, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *240*, 77-99.
- 123) K. Choi, A. D. Hamilton, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *240*, 101-110.
- 124) J. L. Sessler, S. Camiolo, P. A. Gale, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *240*, 17-55.
- 125) (a) W. Guo, J. Wang, J. He, Z. Li, J.-P. Cheng, *Supramol. Chem.* **2004**, *16*, 171-174; (b) K. Tanaka, M. Shionoya, K. Shigemori, *Chem. Commun.* **1999**, 2475-2478.
- 126) R. Prohens, M. C. Rotger, M. N. Piña, P. M. Deyà, J. Morey, P. Ballester, A. Costa, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 4993-4936.
- 127) M. H. Al-Sayah, N. R. Branda, *Thermochimica Acta*, **2010**, *503-504*, 28-32.
- 128) A. Frontera, J. Morey, A. Oliver, M. N. Piña, D. Quiñonero, A. Costa, P. Ballester, P. M. Deyà, E. V. Anslyn, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7185-7195.
- 129) D. Quiñonero, K. A. López, P. M. Deyà, M. N. Piña, J. Morey, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 6187-6194.
- 130) R. West, H. Y. Niu, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2589-2590.
- 131) (a) M. Habenschuss, B. C. Gerstein, *J. Chem. Phys.* **1973**, *61*, 852-860; (b) A. Weiss, E. Riegler, C. Z. Robl, *Naturforsch. B: Chem. Sci.* **1986**, *41*, 1329-1332; (c) A. Weiss, E. Riegler, C. Z. Robl, *Naturforsch. B: Chem. Sci.* **1986**, *41*, 1332-1336; (d) X. Solans, M. Aguilo, A. Gleizes, J. Faus, M. Julve, M. Verdaguer, *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 775-784; (e) M. I. Khan, Y.-D. Chang, Q. Chen, J. Salta, Y.-S. Lee, C. J. O'Connor, J. Zubieta, *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 6340-6350; (f) M. Hilbers, M. Meiwald, R. Z. Mattes, *Naturforsch. B: Chem. Sci.* **1996**, *51*, 57-67.
- 132) R. C. Mehrota, *Comprehensive Coordination Chemistry*; G. Wilkinson, R. D. Gillard, J. A. McCleverty, Eds.; Pergamon Press: Oxford, 1987; Vol. 2, pp 505-514.
- 133) G. Zinner, J. Grünfeld, *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)* **1985**, *318*, 977-983.
- 134) N. C. Lim, M. D. Morton, H. A. Jenkins. C. Brückner, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9233-9241.
- 135) (a) M. B. Onaran, A. B. Comeau, C. T. Seto, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10792-10802; (b) S. Hanessian, V. Vinci, L. Auzzas, M. Marzic, G. Giannini, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4784-4787.
- 136) X. Zhang, Z. Zuo, J. Tang, K. Wang, C. Wang, W. Chen, C. Li, W. Xu, X. Xiong, K. Yuntai, J. Huang, X. Lan, H.-B. Zhou, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 3793-3797.
- 137) K. G. Thomas, K. J. Thomas, S. Das, M. V. George, *Chem. Commun.* **1997**, 597-598.
- 138) G. Dilek, E. U. Akkaya, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 3721-3724.
- 139) R. W. Bigelow, H. J. Freund, *Chem. Phys.* **1986**, *107*, 159-174.
- 140) H. S. Hewage, E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13099-13106.
- 141) (a) H.-C. Lu, W.-T. Whang, B.-M. Cheng, *Chem. Phys. Lett.* **2010**, *500*, 267-271; (b) H.-C. Lu, W.-T. Whang, B.-M. Cheng, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 2568-2576.
- 142) J. V. Ros-Lis, M. D. Marcos, R. Martínez-Mañez, K. Rurack, J. Soto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4405-4407.
- 143) C. Chen, R. Wang, L. Guo, N. Fu, H. Dong, Y. Yuan, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1162-1165.

- 144) J. Fan, C. Chen, Q. Lin, N. Fu, *Sens. Actuators B Chem.* **2012**, *173*, 874-881.
- 145) R. R. Avirah, K. Jyothish, D. Ramaiah, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 121-124.
- 146) (a) A. Kunze, R. Gleiter, F. Rominger, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, 621-627; (b) J.-H. Huang, W.-H. Wen, Y.-Y. Sun, P.-T. Chou, J.-M. Fang, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 5827-5832.
- 147) S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst, R. N. Muller, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2064-2110.
- 148) (a) Y. Sahoo, H. Pizem, T. Fried, D. Golodnitsky, L. Burstein, C. N. Sukenik, G. Markovich, *Langmuir* **2001**, *17*, 7907-7911; (b) L. Lartigue, K. Oumzil, Y. Guari, J. Larionova, C. Guérin, J. L. Montero, V. Barragan-Montero, C. Sangregorio, A. Caneschi, C. Innocenti, T. Kalaivani, P. Arosio, A. Lascialfari, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2992-2995; (c) J. Xie, K. Chen, H.-Y. Lee, C. Xu, A. R. Hsu, S. Peng, X. Chen, S. Sun, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7542-7543.
- 149) (a) A. K. Gupta, S. Wells; *IEEE Transc. Nanobioscience* **2004**, *3*, 66-73; (b) Y. Zhang, N. Kohler, M. Zhang, *Biomaterials* **2002**, *23*, 1553-1561.
- 150) (a) C. Xu, K. Xu, H. Gu, R. Zheng, H. Liu, X. Zhang, Z. Guo, B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9938-9939; (b) N. Kemikli, H. Kavas, S. Kazan, A. Baykal, R. Ozturk, *J. Alloys Compd.* **2010**, *502*, 439-444; (c) H. Qu, D. Caruntu, H. Liu, C. J. O'Connor, *Langmuir* **2011**, *27*, 2271-2278; (d) D. Losic, Y. Yu, M. S. Aw, S. Simovic, B. Thierry, J. Addai-Mensah, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6323-6325; (e) K. V. Korpany, F. Habib, M. Murugesu, A. S. Blum, *Mater. Chem. Phys.* **2013**, *138*, 29-37; (f) P. An, F. Zuo, Y. P. Wue, J. H. Zhang, Z. H. Zheng, X. B. Ding, Y. X. Peng, *Chin. Chem. Lett.* **2012**, *23*, 1099-1102.
- 151) (a) E. Amstad, T. Gillich, I. Bilecka, M. Textor, E. Reimhult, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 4042-4048; (b) E. Amstad, A. U. Gehring, H. Fischer, V. V. Nagaiyanallur, G. Hähner, M. Textor, E. Reimhult *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 683-691.
- 152) L. X. Chen, T. Liu, M. C. Thurnauer, R. Csencsits, T. Rajh, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 8539-8546.
- 153) A. K. L. Yuen, G. A. Hutton, A. F. Masters, T. Maschmeyer, *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 2545-2559.
- 154) A. S. de Dios, M. E. Díaz-García, *Anal. Chim. Acta* **2010**, *666*, 1-22.
- 155) (a) T. Rajh, L. X. Chen, K. Lukas, T. Liu, M. C. Thurnauer, D. M. Tiede, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 10543-10552; (b) T. Rajh, O. Poluektov, A. A. Dubinski, G. Wiederrecht, M. C. Thurnauer, A. D. Trifunac, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *344*, 31-39.
- 156) M. Ma, Y. Zhang, W. Yu, H. Y. Shen, H. Q. Zhang, N. Gu, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **2003**, *212*, 219-226.
- 157) (a) Z. Sun, V. Yathindranath, M. Worden, J. A. Thliveris, S. Chu, F. E. Parkinson, T. Hegmann, D. W. Miller, *Int. J. Nanomedicine* **2013**, *8*, 961-970; (b) Y. Cui, Y. Li, Y. Yang, X. Liu, L. Lei, L. Zhou, F. Pan, *J. Biotechnol.* **2010**, *150*, 171-174; (c) M. Zhu, M. Z. Lerum, W. Chen, *Langmuir* **2012**, *28*, 416-423.

- 158) F. Galeotti, F. Bertini, G. Scavia, A. Bolognesi *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *360*, 540-547.
- 159) A. H. Schmidt, *Synthesis* **1980**, *12*, 961-994.
- 160) (a) M. D. Hawley, S. V. Tatawawadi, S. Piekarski, R. N. Adams, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 447-450; (b) M. B. Smith, J. March, *March's Advanced Organic Chemistry. Reactions, Mechanisms, and Structure*, 5ta ed.; John Wiley & Sons Inc, **2001**, pp. 1517-1518.
- 161) J. Morey, J. M. Saá, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 105-112.
- 162) G. S. Caravajal, D. E. Leyden, G. R. Quinting, G. E. Maciel, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1776-1786.
- 163) R. T. Conley, *Espectroscopía Infrarroja*, Editorial Alhambra, Madrid, 1979.
- 164) L. H. Little, *Infrared Spectra of Adsorbed Species*; Academic Press: London, 1966.
- 165) M. N. Piña, M. C. Rotger, A. Costa, P. Ballester, P. M. Deyà, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 3749-3752.
- 166) (a) P. A. Gale, *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *213*, 79-128; (b) P. D. Beer, P. A. Gale, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 486-516; (c) P. A. Gale, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *199*, 181-233; (d) C. Caltagirone, P. A. Gale, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 520-563; (e) A. Bianchi, K. Bowman-James, E. García-España, *Supramolecular Chemistry of Anions*, Wiley-VCH, New York, **1997**; (f) J. L. Atwood, J. W. Steed, *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*, Marcel Dekker, New York, 2004; (g) E. A. Katayev, Y. A. Ustynyuk, J. L. Sessler, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3004-3037; (h) M. D. Best, S. L. Tobey, E. V. Anslyn, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *240*, 191-221.
- 167) (a) K. C. Nicolaou, C. N. C. Boddy, S. Bräse, N. Winssinger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2096-2152; (b) D. H. Williams, B. Bardsley, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1172-1193.
- 168) (a) H. I. Morrison, D. Schaubel, M. Desmeules, D. T. Wigle, *JAMA.* **1996**, *275*, 1893-1896; (b) O. Nygard, S. M. Vollset, H. Refsum, I. Stensvold, A. Tverdal, J. E. Nordrehaug, P. M. Ueland, G. Kvale, *JAMA.* **1995**, *274*, 1526-1533; (c) E. B. Rimm, W. C. Willet, F. B. Hu, L. Sampson, G. A. Colditz, J. E. Manson, C. Hennekens, M. J. Stampfer, *JAMA.* **1998**, *279*, 359-364.
- 169) (a) R. M. Comell, U. Schwertmann, *The Iron Oxide: Structures, Properties, Occurrences and Uses*, Wiley-VCH, Weinheim, **2003**; (b) A.-H. Lu, E. L. Salabas, F. Schüth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1222-1244.
- 170) (a) D. A. R. Williams, *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Chichester, **1986**, pp. 257; (b) L. Wang, J. Luo, Q. Fan, M. Suzuki, I. S. Suzuki, M. H. Engelhard, Y. Lin, N. Kim, J. Q. Wang, C.-J. Zhong, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 21593-21601; (c) Y. Pan, M. J. C. Long, X. Li, J. Shi, L. Hedstrom, B. Xu, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 945-948.
- 171) E. V. Anslyn, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 687-699.
- 172) S. Pirillo, L. Cornaglia, M. L. Ferreira, E. H. Rueda, *Spectrochimica Acta, part A* **2008**, *71*, 636-643.

- 173) (a) L. M. Campbell, D. G. Dixon, R. E. Hecky, *J. Toxicol. Environ. Health Part B*, **2003**, 6, 325-356; (b) J. O. Nriagu, J. M. Pacyna, *Nature* **1988**, 333, 134-139.
- 174) (a) N. Rifai, G. Cohen, M. Wolf, L. Cohen, C. Faser, J. Savory, L. DePalma, *Ther. Drug Monit.* **1993**, 15, 71-74; (b) J. S. Liu-Fu, *Lead Poisoning, A Century of Discovery and Rediscovery, in Human Lead Exposure*, ed. H. L. Needleman, Lewis Publishing, Boca Raton, FL, **1992**.
- 175) S. Dobson, *Cadmium: Environmental Aspects*; World Health Organization: Geneva, **1992**.
- 176) La cantidad máxima permitida de Hg^{2+} en agua potable según los estándares de la Agencia de Protección Ambiental es de 2 ppb.
- 177) (a) D. W. Boening, *Chemosphere* **2000**, 40, 1335-1341; (b) J. M. Benoit, W. F. Fitzgerald, A. W. Damman, *Environ. Res.* **1998**, 78, 118-133.
- 178) (a) A. R. Meier, U. S. Schubert, *Chem. Commun.* **2005**, 4610-4612; (b) R. Haag, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 278-282.
- 179) (a) M. Liu, K. Kono, J. M. J. Frechet, *J. Control. Release* **2000**, 65, 121-131; (b) M. S. Diallo, S. Christie, P. Swaminathan, J. H. Johnson Jr, W. A. Goddard III, *Environ. Sci. Technol.* **2005**, 39, 1366-1377.
- 180) X. Feng, G. E. Fryxell, L.-Q. Wang, A. Y. Kim, J. Liu, K. M. Kemner, *Science* **1997**, 276, 923-926.
- 181) U. Wingenfelder, C. Hansen, G. Furrer, R. Schulin, *Environ. Sci. Technol.* **2005**, 39, 4606-4613.
- 182) J. Kostal, A. Mulchandani, W. Chen, *Macromolecules* **2001**, 34, 2257-2261.
- 183) (a) N. Savage, M. S. Diallo, *J. Nanopart. Res.* **2005**, 7, 331-342; (b) S. M. Ponder, J. G. Darab, T. E. Mallouk, *Environ. Sci. Technol.* **2000**, 34, 2564-2569.
- 184) (a) J. Hu, M. C. Lo, G. H. Chen, *Water Sci. Technol.* **2004**, 50, 139-146; (b) J. Hu, G. Chen, M. C. Lo, *Water Res.* **2005**, 39, 4528-4536; (c) Y.-C. Chang, D.-H. Chen, *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, 283, 446-451; (d) A.-F. Ngomsik, A. Bee, M. Draye, G. Cote, V. Cabuil, *C. R. Chimie* **2005**, 8, 963-970; (e) C. T. Yavuz, J. T. Mayo, W. W. Yu, A. Prakash, J. C. Falkner, S. Yean, L. Cong, H. J. Shipley, A. Kan, M. Tomson, D. Natelson, V. L. Colvin, *Science* **2006**, 314, 964-967; (f) L.-S. Zhong, J.-S. Hu, H.-P. Liang, A.-M. Cao, W.-G. Sun, L.-J. Wan, *Adv. Mater.* **2006**, 18, 2426-2437.
- 185) A. M. Donia, A. A. Atia, K. Z. Elwakeel, *J. Hazard. Mat.* **2008**, 151, 372-379.
- 186) A. M. Serra, J.M. Estela, V. Cerdà, *Talanta* **2008**, 77, 556-560.
- 187) G. E. Fryxell, Y. Lin, S. Fiskum, J. C. Birnbaum, H. Wu, K. Kemner, S. Kelly, *Environ. Sci. Technol.* **2005**, 39, 1324-1331.
- 188) J. Zhang, V. Frankevich, R. Knochenmuss, S. D. Friess, R. Zenobi, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, 14, 42-50.
- 189) P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Talanta* **1996**, 43, 1739-1753.
- 190) Agradecemos la colaboración del Dr. Pablo Ballester del ICIQ en la resolución del cristal por RX.

- 191) Para la visualización de la estructura se ha utilizado el programa Mercury de The Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC).
- 192) Coordenadas del cristal depositadas en CCDC: 949852.
- 193) B. Gabalov, V. Nikolova, S. Ilieva, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 5149-5155.
- 194) Agradecemos al Dr. David Quiñero los cálculos teóricos realizados para confirmar la regioselectividad de la reacción de mercuriación.
- 195) La pureza de las escuaramidas obtenidas de esta forma es la adecuada y no se necesita ningún otro paso de purificación ulterior.
- 196) P. Couvreur, P. Tulkens, M. Roland, A. Trouet, P. Speiser, *FEBS Lett.* **1977**, *84*, 323-326.
- 197) G. Birrenbach, P.P. Speiser, *J. Pharm. Sci.* **1976**, *65*, 1763-1766.
- 198) S. Sultana, M. R. Khan, M. Kumar, S. Kumar, M. Ali, *J. Drug Target.* **2013**, *21*, 107-125.
- 199) P. Couvreur, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 21-23.
- 200) S. Sengupta, D. Eavarone, I. Capila, G. Zhao, N. Watson, T. Kiziltepe, R. Sasisekharan, *Nature* **2005**, *7050* 568-572.
- 201) (a) J. L. Arias, L. H. Reddy, M. Othman, B. Gillet, D. Desmaële, F. Zouhiri, F. Dosio, R. Gref, P. Couvreur, *ACS Nano* **2011**, *22*, 1513-1521; (b) F. Sonvico, S. Mornet, S. Vasseur, C. Dubernet, D. Jaillard, J. Degrouard, J. Hoebeke, E. Duguet, P. Colombo, P. Couvreur, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1181-1188; (c) O. Veiseh, C. Sun, J. Gunn, N. Kohler, P. Gabikian, D. Lee, N. Bhattarai, R. Ellenbogen, R. Sze, A. Hallahan, J. Olson, M. Zhang, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 1003-1008; (d) T. K. Jain, M. A. Morales, S. K. Sahoo, D. L. Leslie-Pelecky, V. Labhasetwar, *Mol. Pharm.* **2005**, *2*, 194-205; (e) N. Kohler, G. E. Fryxell, M. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7206-7211.
- 202) (a) S. Mitragotri, J. Lahann, *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 15-23; (b) M. C. Daniel, D. Astruc, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293-346; (c) F. X. Redl, C. T. Black, G. C. Papaefthymiou, R. L. Sandstrom, M. Yin, H. Zeng, C. B. Murray, S. P. O'Brien, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14583-14599.
- 203) S. Karve, M. E. Werner, R. Sukumar, N. D. Cummings, J. A. Copp, E. C. Wang, C. Li, M. Sethi, R. C. Chen, M. E. Pacold, A. Z. Wang, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 8230-8235.
- 204) A. Jemal, R. Siegel, E. Ward, T. Murray, J. Xu, C. Smigal, M. J. Thun, *CA Cancer J. Clin.* **2006**, *56*, 106-130.
- 205) T. Nomura, A. Saikawa, S. Morita, T. Sakaeda, F. Yamashita, K. Honda, Y. Takakura, M. Hashida, *J. Control. Release* **1998**, *52*, 239-252.
- 206) W. Junping, K. Takayama, T. Nagai, Y. Maitani, *Int. J. Pharm.* **2003**, *251*, 13-21.
- 207) S. E. McNei, *J. Leukoc. Biol.* **2005**, *78*, 585-594.
- 208) Imagen modificada de: Z. Li, J. C. Barnes, A. Bosoy, J. F. Stoddart, J. I. Zink, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2590-2605.
- 209) M. Elsabahy, K. L. Wooley, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2545-2561.

- 210) F. M. Veronese, O. Schiavon, G. Pasut, R. Mendichi, L. Andersson, A. Tsirk, J. Ford, G. Wu, S. Kneller, J. Davies, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 775-784.
- 211) R. Duncan, *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 688-701.
- 212) W. Scarano, H. T. T. Duong, H. Lu, P. L. De Souza, M. H. Stenzel, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 962-975.
- 213) (a) S. Acharya, S. K. Sahoo, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 170-183; (b) S. W. Jung, Y. L. Jeong, Y. H. Kim, K. C. Choi, S. H. Kim, *J. Microencapsul.* **2005**, *22*, 901-911.
- 214) W. Hyung, H. Ko, J. Park, E. Lim, S. B. Park, Y. Park, H. G. Yoon, J. S. Suh, S. Haam, Y. Huh, *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *99*, 442-454.
- 215) Y. Chung, J. C. Kim, Y. H. Kim, G. Tae, S. Lee, K. Kim, I. C. Kwon, *J. Control. Release* **2010**, *148*, 374-382.
- 216) E. Lim, Y. Huh, J. Yang, K. Lee, J. Suh, S. Haam, *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 2436-2442.
- 217) (a) D. D. Lasic, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 1685-1698; (b) P. Tanner, P. Baumann, R. Enea, O. Onaca, C. Palivan, W. Meier, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 1039-1049.
- 218) (a) F. Danhier, O. Feron, V. Préat, *J. Control. Release* **2010**, *148*, 135-146; (b) M. Davis, Z. Chen, D. Shin, *Nature Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 771-782.
- 219) S. Kim, K. Park, *Polymer micelles for drug delivery*, CRC Press (Taylor and Francis Group), Boca Ratón, FL, USA, Chapter 19, pp 513-543.
- 220) (a) Z. Symon, A. Peyser, D. Tzemach, O. Lyass, E. Sucher, E. Shezen and A. Gabizon, *Cancer* **1999**, *86*, 72-78; (b) J. Huwyler, J. Drewe, S. Krahénbuhl, *Int. J. Nanomedicine* **2008**, *3*, 21- 29; (c) P. Ma, R. J. Mumper, *Nano Today* **2013**, *8*, 313-331.
- 221) E. Curtit, P. Nouyrigat, N. Dohollou, E. Levy, A. Lortholary, J. Gligorov, T. Facchini, D. Jaubert, N. Maille, X. Pivot, V. Grangé, L. Cals, *Eur. J. Cancer* **2011**, *47*, 2396-2402.
- 222) P. Zarogoulidis, M. Mavroudi, K. Porpodis, K. Domvri, A. Sakkas, N. Machairiotis, A. Stylianaki, A. Tsiotsios, N. Courcoutsakis, K. Zarogoulidis, *OncoTargets and Therapy* **2012**, *5*, 231-236.
- 223) (a) M. Jawad, N. Yu, C. Seedhouse, K. Tandon, N. H. Russell, M. Pallis, *BMC Cancer* **2012**, *12*, 431-445; (b) K. Naito, A. Takeshita, K. Shigeno, S. Nakamura, S. Fujisawa, K. Shinjo, H. Yoshida, K. Ohnishi, M. Mori, S. Terakawa, R. Ohno, *Leukemia* **2000**, *14*, 1436-1443.
- 224) (a) B. L. Schlechter, S. M. Kim, R. M. Joyce, *Int. J. Hematol. Oncol.* **2013**, *2*, 163-178; (b) D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, *Nanotechnology* **2007**, *2*, 751-760.
- 225) I. Navarro-Teulon, C. Lozza, A. Pelegrin, E. Vives, J.-P. Pouget, *Immunotherapy* **2013**, *5*, 467-487.
- 226) M. Mahmoudi, H. Hofmann, B. Rothen-Rutishauser, A. Petri-Fink, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 2323-2338.

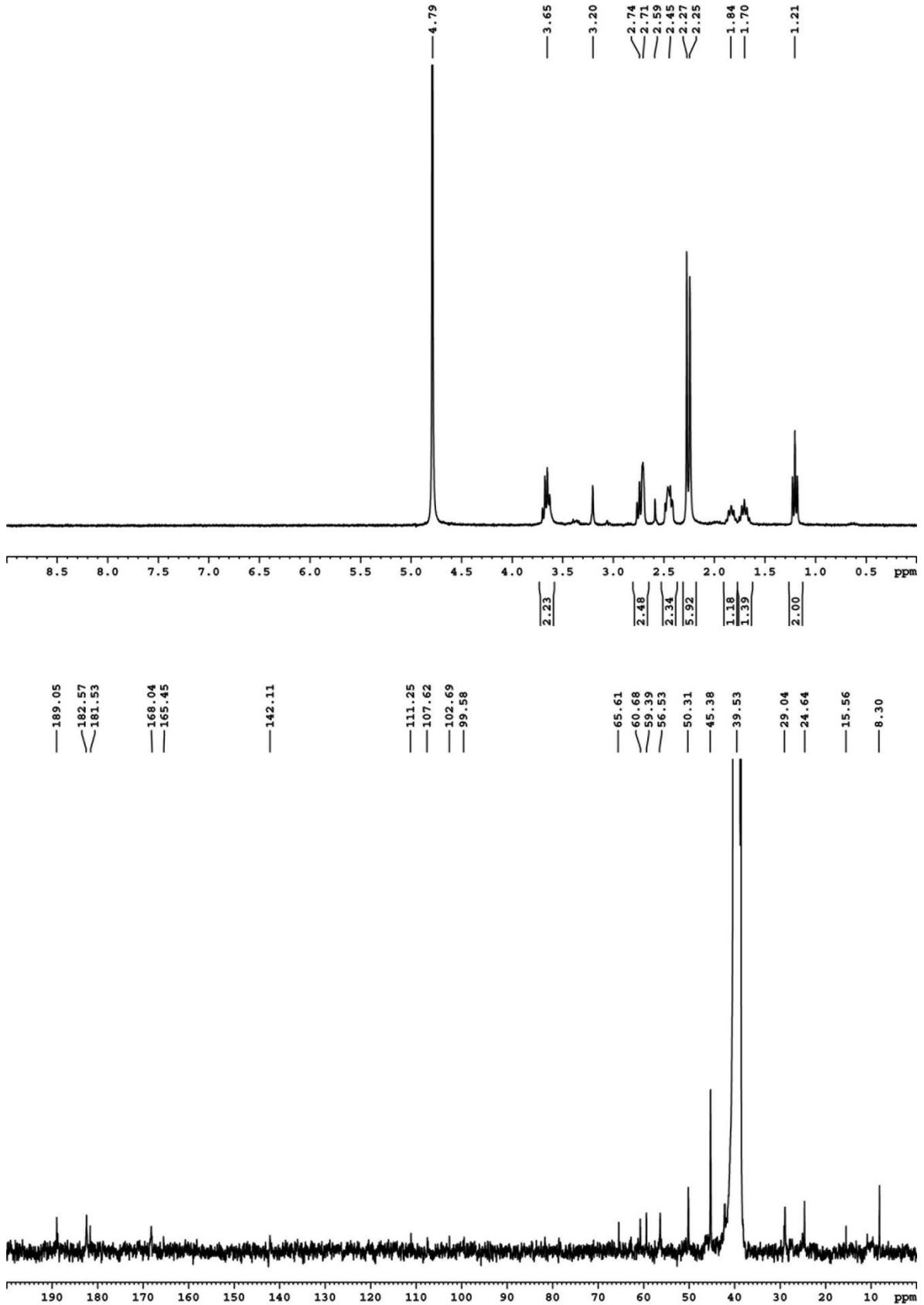
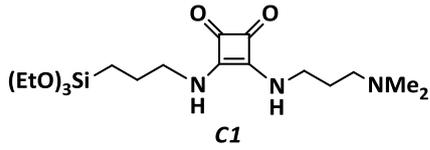
- 227) (a) E. C. Dreaden, A. M. Alkilany, X. Huang, C. J. Murphy, M. A. El-Sayed, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2740-2779; (b) L. Dykmana, N. Khlebtsov, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2256-2282; (c) A. Llevota, D. Astruc, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 242-257.
- 228) (a) J. H. Maeng, D.-H. Lee, K. H. Jung, Y.-H. Bae, I.-S. Park, S. Jeong, Y.-S. Jeon, C.-K. Shim, W. Kim, J. Kim, J. Lee, Y.-M. Lee, J.-H. Kim, W.-H. Kim, S.-S. Hong, *Biomaterials* **2010**, *31*, 4995-5006; (b) B.-Q. Lu, Y.-J. Zhu, G.-F. Cheng, Y.-J. Ruan, *Mat. Lett.* **2013**, *104*, 53-56.
- 229) K. E. Sapsford, W. R. Algar, L. Berti, K. B. Gemmill, B. J. Casey, E. Oh, M. H. Stewart, I. L. Medintz, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 1904-2074.
- 230) D. F. Moyano, V. M. Rotello, *Langmuir* **2011**, *27*, 10376-10385; (b) S. Rana, A. Bajaj, R. Mout, V. M. Rotello, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *64*, 200-216.
- 231) S. Santra, C. Kaittanis, J. Grimm, J. M. Pérez, *Small* **2009**, *5*, 1862-1868.
- 232) J. Wang, X. Wang, Y. Song, C. Zhu, J. Wang, K. W. Z. Guo, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2786-2788.
- 233) (a) H. He, A. David, B. Chertok, A. Cole, K. Lee, J. Zhang, J. Wang, Y. Huang, V. C. Yang, *Pharm. Res.* DOI 10.1007/s11095-013-0982-y; (b) M. I. Majeed, Q. Lu, W. Yan, Z. Li, I. Hussain, M. N. Tahir, W. Tremel, B. Tan, *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 2874-2884; (c) G. Y. Lee, W. P. Qian, L. Wang, Y. A. Wang, C. A. Staley, M. Satpathy, S. Nie, H. Mao, L. Yang, *ACS Nano* **2013**, *7*, 2078-2089; (d) B. Sahoo, K. S. P. Devi, R. Banerjee, T. K. Maiti, P. Pramanik, D. Dhara, *Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 3884-3893; (e) M. Howell, C. Wang, A. Mahmoud, G. Hellermann, S. S. Mohapatra, S. Mohapatra, *Drug Deliv. Transl. Res.* **2013**, *3*, 352-363.
- 234) (a) J.-O. You, P. Guo, D. T. Auguste, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4141-4146; (b) A. Marcu, S. Pop, F. Dumitrache, M. Mocanu, C. M. Niculite, M. Gherghiceanu, C. P. Lungu, C. Fleaca, R. Ianchis, A. Barbut, C. Grigoriu, I. Morjan, *App. Surf. Sci.* **2013**, *281*, 60-65.
- 235) (a) N. Y. Hernández-Pedro, E. Rangel-López, R. Magaña-Maldonado, V. Pérez de la Cruz, A. Santamaría del Angel, B. Pineda, J. Sotelo, *BioMed Res. Int.* <http://dx.doi.org/10.1155/2013/351031>; (b) D. Le Broc-Ryckewaert, R. Carpentier, E. Lipka, S. Daher, C. Vaccher, D. Betbeder, C. Furman, *Int. J. Pharmaceut.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.05.018>.
- 236) (a) J. R. McCarthy, R. Weissleder, *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2008**, *60*, 1241-1251; (b) O. Veisoh, J. W. Gunn, M. Zhang, *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2010**, *62*, 284-304; (c) D.-E. Lee, H. Koo, I.-C. Sun, J. H. Ryu, K. Kim, I. C. Kwon, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2656-2672; (d) C. I. Olariu, H. H. P. Yiu, L. Bouffier, T. Nedjadi, E. Costello, S. R. Williams, C. M. Halloran, M. J. Rosseinsky, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 12650-12659.
- 237) (a) F. Sonvico, S. Mornet, S. Vasseur, C. Dubernet, D. Jaillard, J. Degrouard, J. Hoebeke, E. Duguet, P. Colombo, P. Couvreur, *Bioconjug. Chem.* **2005**, *16*, 1181-1188; (b) B. Stella, V. Marsaud, S. Arpicco, G. Geraud, L. Cattel, P. Couvreur, J.-M. Renoir, *J. Drug Target.* **2007**, *15*, 146-153; (c) Y. Wang, Y. Wang, J. Xiang, K. Yao, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 3531-3538; (d) S. P. Chakraborty, S. K. Mahapatra, S.

- K. Sahu, P. Pramanik, S. Roy, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2011**, *1*, 29-38; (e) G. Zuber, L. Zammuto-Italiano, E. Dauty, J.-P. Behr, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2666-2669.
- 238) (a) X. Pan, R. Lee, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2004**, *1*, 7-17; (b) F. Sirotnak, B. Tolner, *Annu. Rev. Nutr.* **1999**, *19*, 91-122; (c) A. Gabizon, A. Horowitz, D. Goren, D. Tzemach, F. Mandelbaum-Shavit, M. Qazen, S. Zalipsky, *Bioconjug. Chem.* **1999**, *10*, 289-298; (d) S. D. Weitman, R. H. Lark, L. R. Coney, D. W. Fort, V. Frasca, V. R. Zurawski, *Cancer Res.* **1992**, *52*, 3396-3401.
- 239) X. Zhao, H. Li, R. J. Lee, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2008**, *5*, 309-319.
- 240) (a) R. Lee, P. Low, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 3198-3204; (b) C. J. Mathias, S. Wang, R. J. Lee, D. J. Waters, P. S. Low, M. A. Green, *J. Nucl. Med.* **1996**, *37*, 1003-1008; (c) W. Gao, B. Xiang, T.-T. Meng, F. Liu, X.-R. Qi, *Biomaterials* **2013**, *34*, 4137-4149.
- 241) Figura modificada de Endocyte Inc: www.endocyte.com
- 242) (a) N. Kohler, C. Sun, J. Wang, M. Zhang, *Langmuir* **2005**, *21*, 8858-8864; (b) K. Wosikowski, E. Biedermann, B. Rattel, N. Breiter, P. Jank, R. Löser, G. Jansen, G. Peters, *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 1917-1926; (c) Y. Zhang, T. Jin, R.-X. Zhuo, *Colloids Surf. B: Biointerf.* **2005**, *44*, 104-109; (d) N. Kohler, C. Sun, A. Fichtenholtz, J. Gunn, C. Fang, M. Zhang, *Small* **2006**, *2*, 785-792; (e) Y.-H. Chen, C.-Y. Tsai, P.-Y. Huang, M.-Y. Chang, P.-C. Cheng, C.-H. Chou, D.-H. Chen, C.-R. Wang, A.-L. Shiau, C.-L. Wu, *Mol. Pharm.* **2007**, *4*, 713-722; (f) R. Dhanikula, A. Argaw, J.-F. Bouchard, P. Hildgen, *Mol. Pharm.* **2008**, *5*, 105-116; (g) X. Yang, Q. Zhang, Y. Wang, H. Chen, H. Zhang, F. Gao, L. Liu, *Colloids Surf. B: Biointerf.* **2008**, *61*, 125-131; (h) D.-H. Seo, Y.-I. Jeong, D.-G. Kim, M.-J. Jang, M.-K. Jang, J.-W. Nah, *Colloids Surf. B: Biointerf.* **2009**, *69*, 157-163; (i) R. C. Huxford, K. K. E. de, W. S. Boyle, D. Liu, W. Lin, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 198-204.
- 243) (a) Y.-C. Chen, W.-F. Lee, H.-H. Tsai, W.-Y. Hsieh, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2012**, *100A*, 1279-1292; (b) J. Yang, J. Lee, J. Kang, S. J. Oh, H.-J. Ko, J.-H. Son, K. Lee, J.-S. Suh, Y.-M. Huh, S. Haan, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 1-4.
- 244) T. L. Doane, C. Burda, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2885-2911.
- 245) R. I. Storer, C. Aciro, L. H. Jones, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2330-2346.
- 246) K. A. López, M. N. Piña, J. Morey, *Sens. Actuators B Chem.* **2013**, *181*, 267-273.
- 247) (a) J. Sudimack, R. J. Lee, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2000**, *41*, 147-162; (b) B. Stella, S. Arpicco, M. T. Peracchia, D. Desmaele, J. Hoebeker, M. Renoir, J. D'Angelo, L. Cattel, P. Couvreur, *J. Pharm. Sci.* **2000**, *89*, 1452-1464.
- 248) C. T. Hung, A. D. McLeod, P. K. Gupta, *Drug Dev. Ind. Pharma.* **1990**, *16*, 509-521.
- 249) (a) N. Fauconnier, J. N. Pons, J. Roger, A. Bee, *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *194*, 427-433; (b) J. Roger, J. N. Pons, R. Massart, A. Halbreich, J. C. Bacri, *Eur. Phys. J. Appl. Phys.* **1999**, *5*, 321-325.
- 250) S. Wang, P. S. Low, *J. Control. Release* **1998**, *53*, 39-48.
- 251) T. Mossmann, *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55-63.

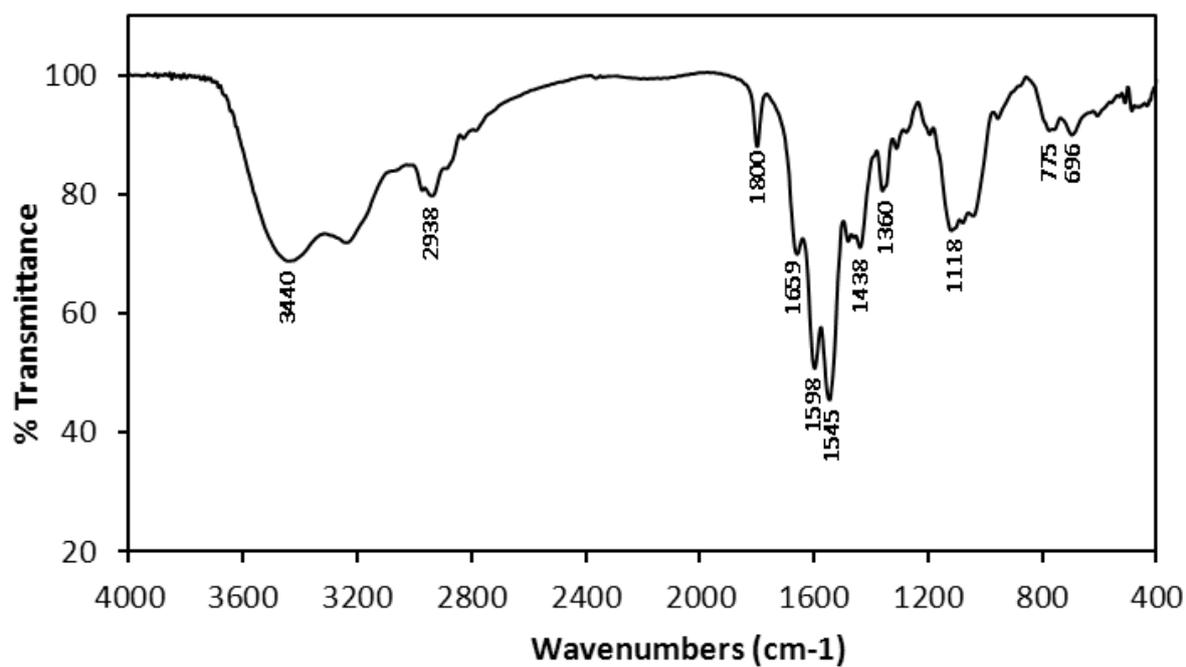
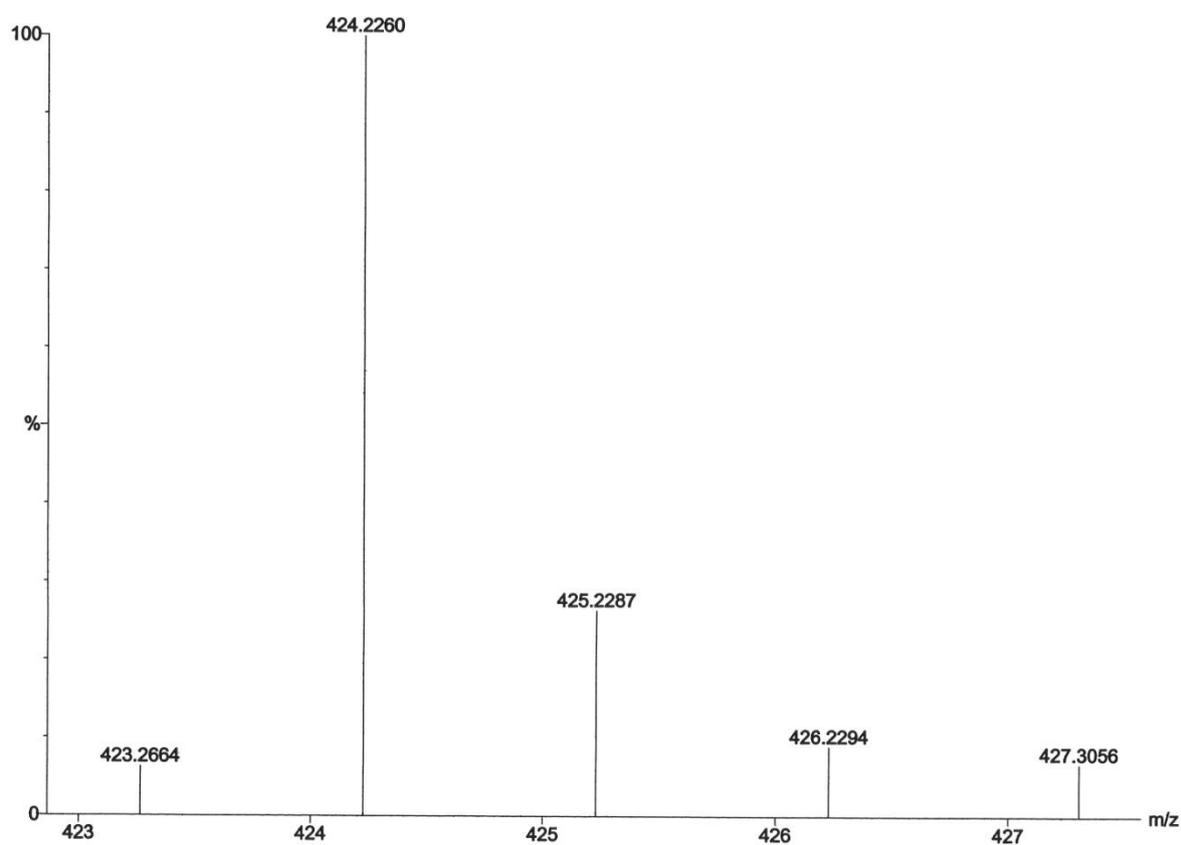
5. Resumen bibliografía

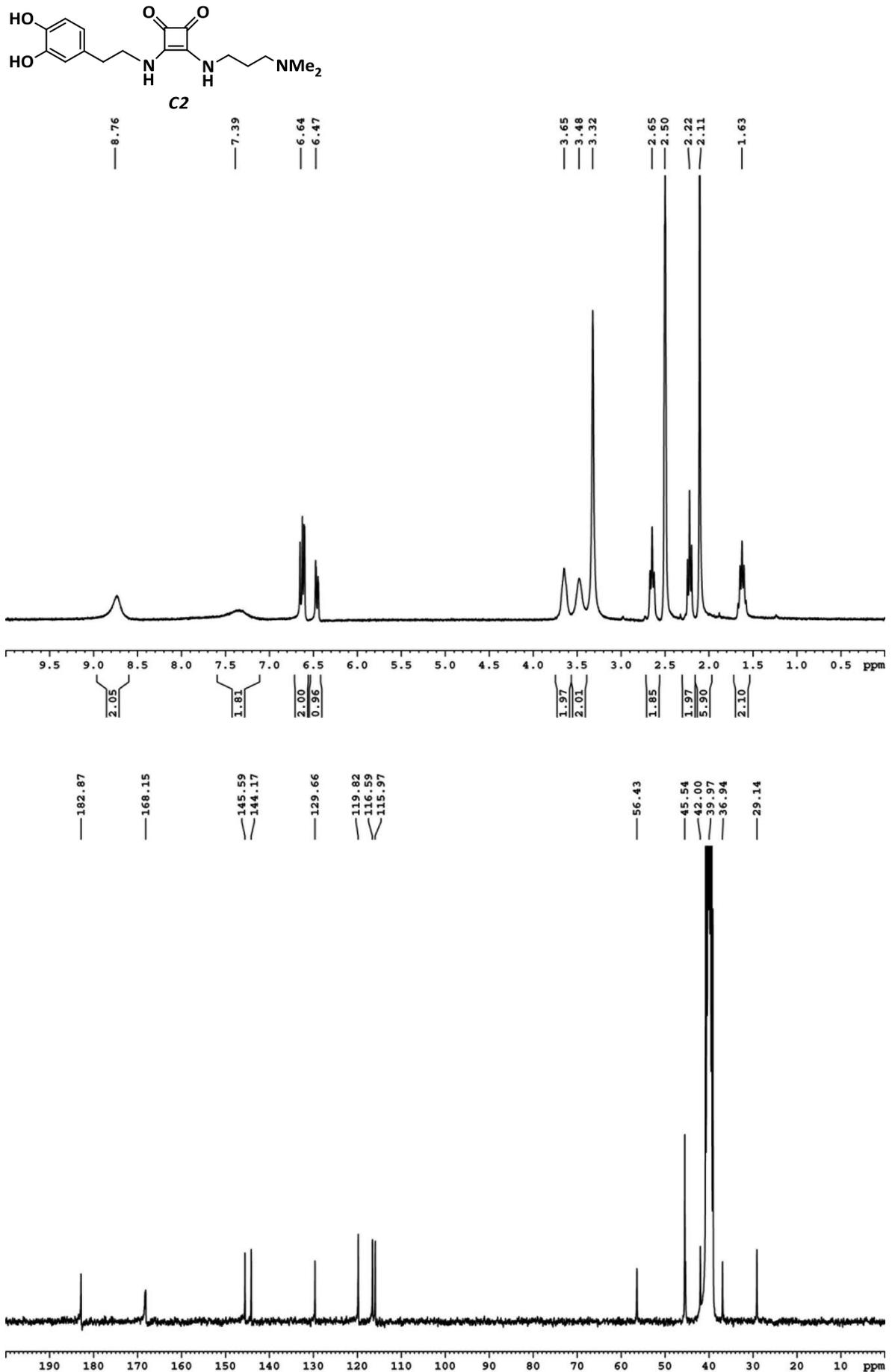
- 252) (a) A. L. Jackman, G. A. Taylor, W. Gibson, R. Kimbell, M. Brown, A. H. Calvert, I. R. Judson, L. R. Hughes, *Cancer Res.* **1991**, *51*, 5579-5586; (b) E. C. Taylor, D. Kuhnt, C. Shih, S. M. Rinzel, G. B. Grindey, J. Barredo, M. Jannatipour, R. C. Moran, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 4450-4454.
- 253) H. H. J. Backus, H. M. Pinedo, D. Wouters, J. M. Padrón, N. Molders, C. L. van der Wilt, C. J. Groeningen, G. Jansen, G. J. Peters, *Int. J. Cancer* **2000**, *87*, 771-778.
- 254) (a) R. Zhao, M. Hanscom, S. Chattopadhyay, I. D. Goldman, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 3313-3319; (b) S. Chattopadhyay, R. G. Moran, I. D. Goldman, *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 404-417.
- 255) C. Chen, J. Ke, X. E. Zhou, W. Yi, J. S. Brunzelle, J. Li, E.-L. Yong, H. E. Xu, K. Melcher, *Nature* doi: 10.1038/nature12327.

6. COLECCIÓN DE ESPECTROS

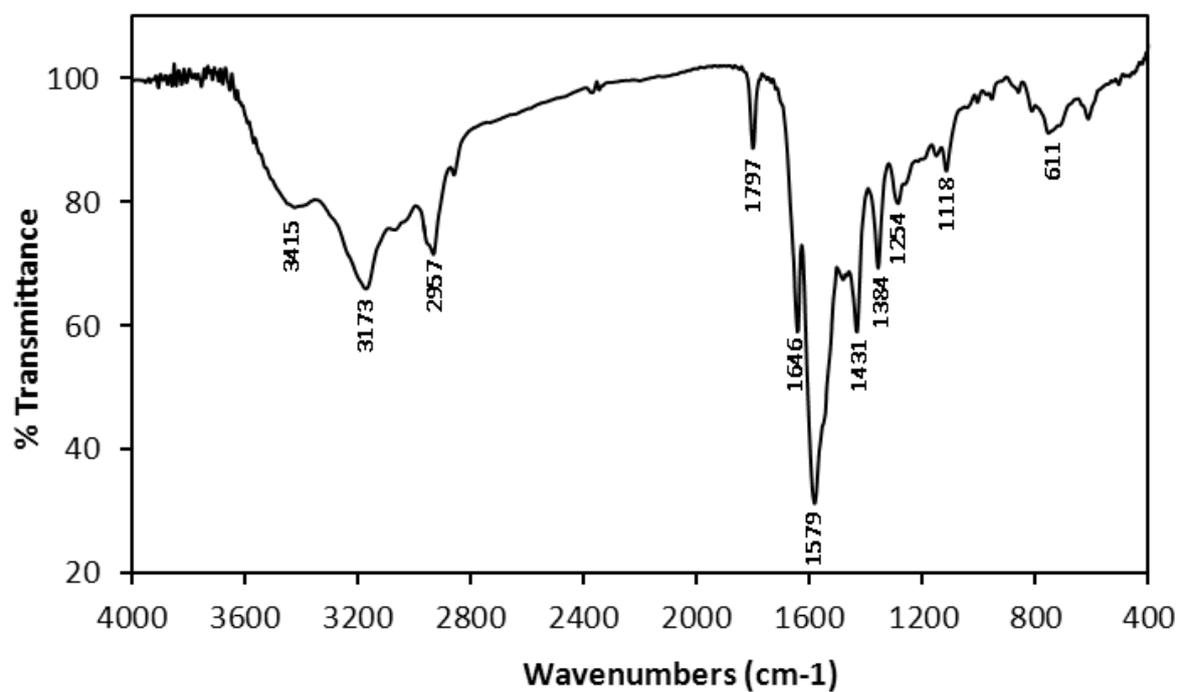
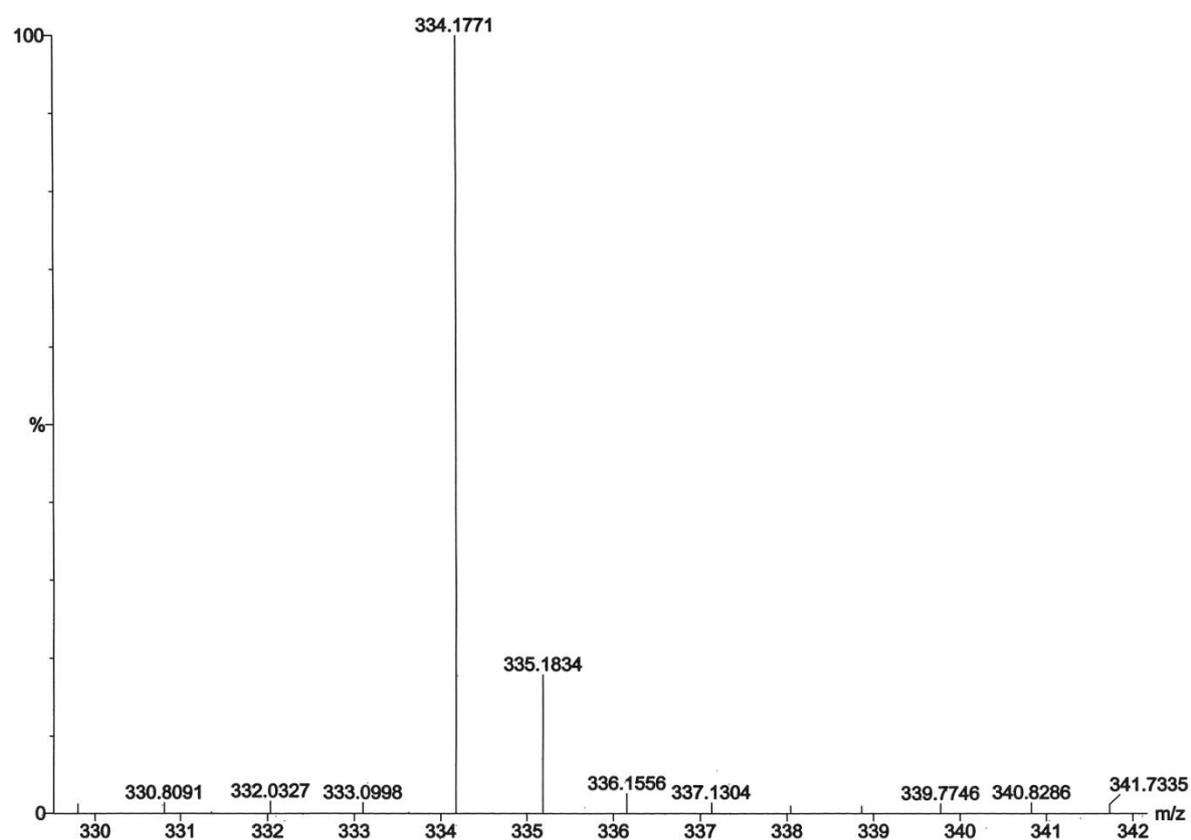


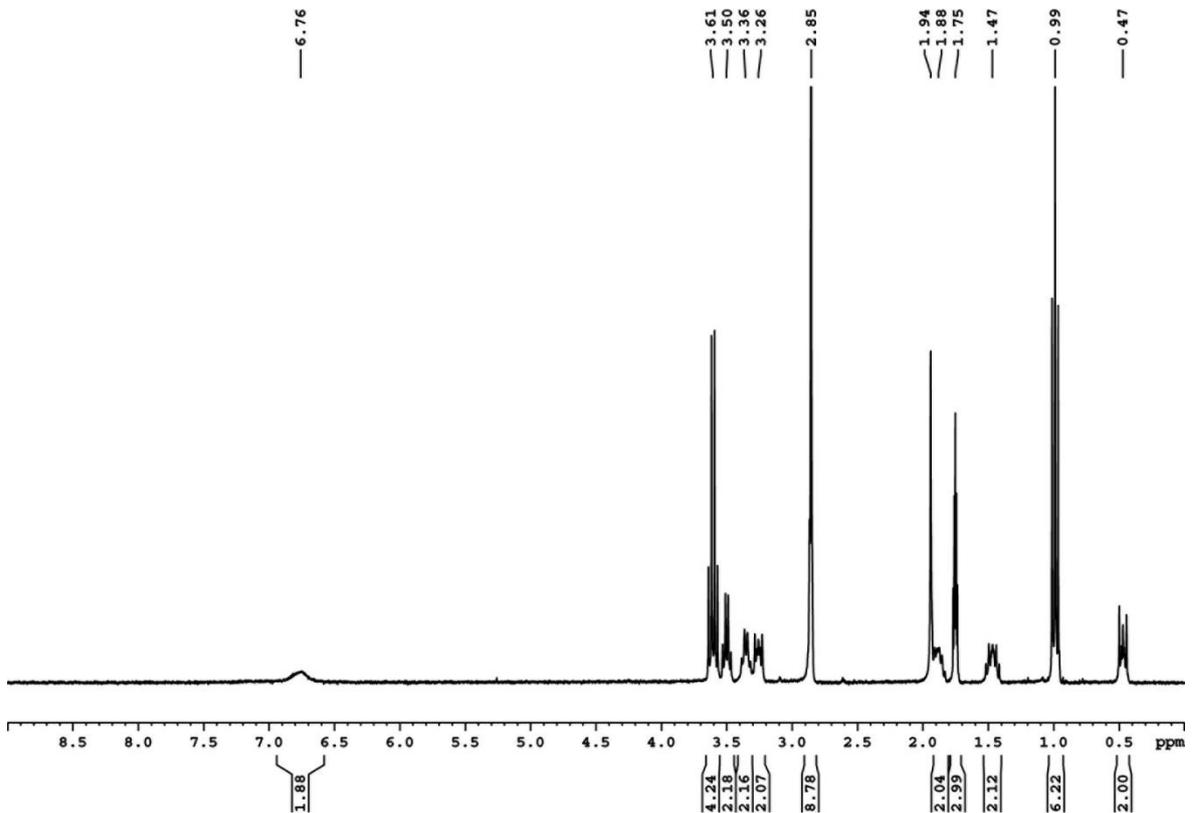
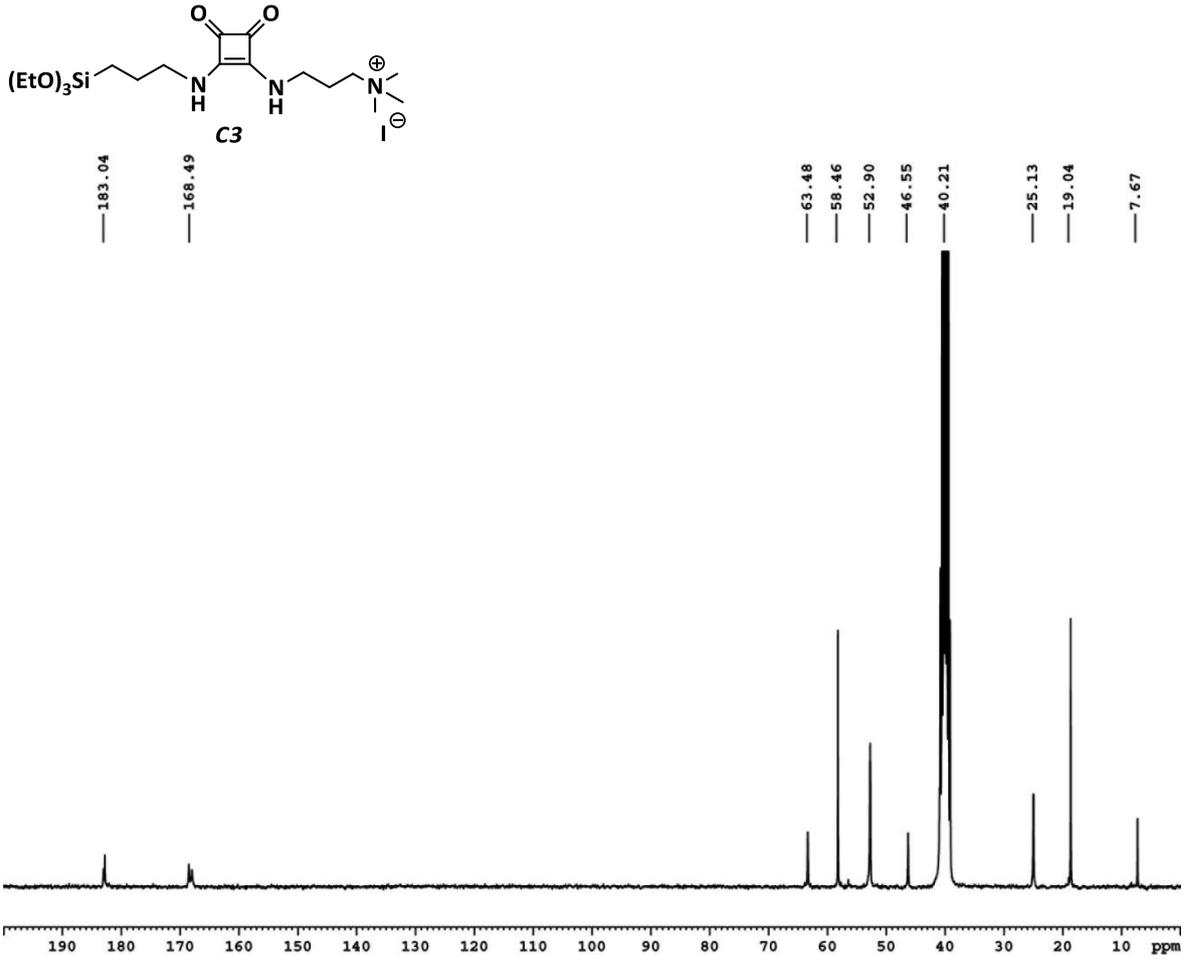
6. Colección de espectros



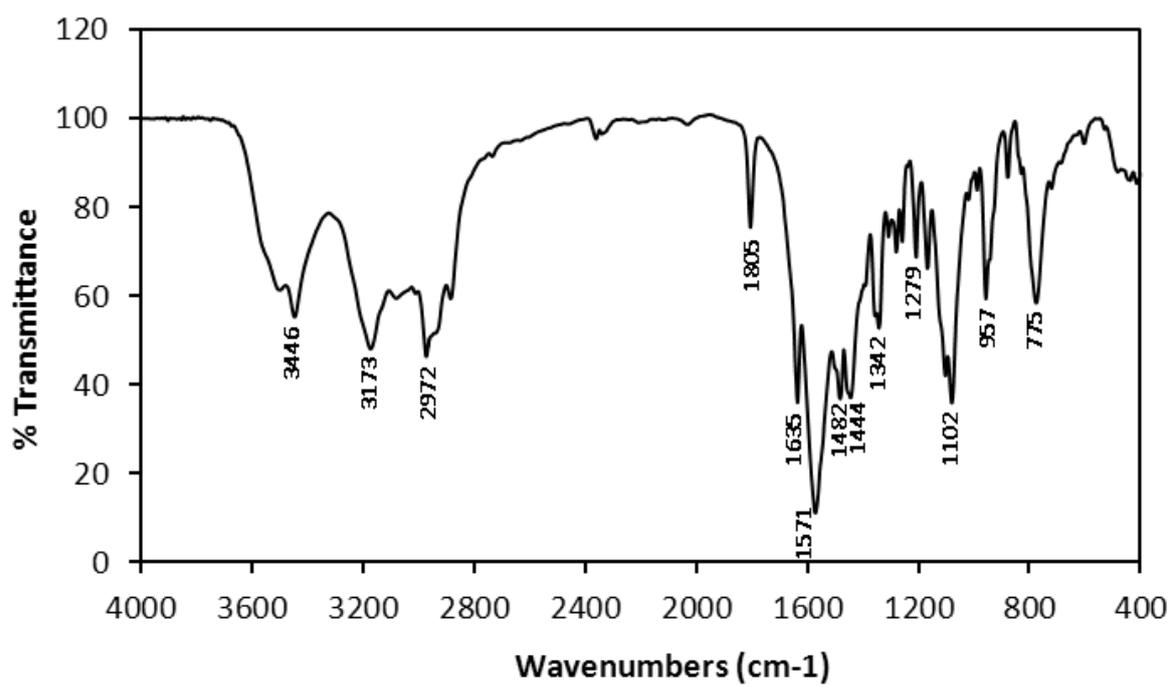
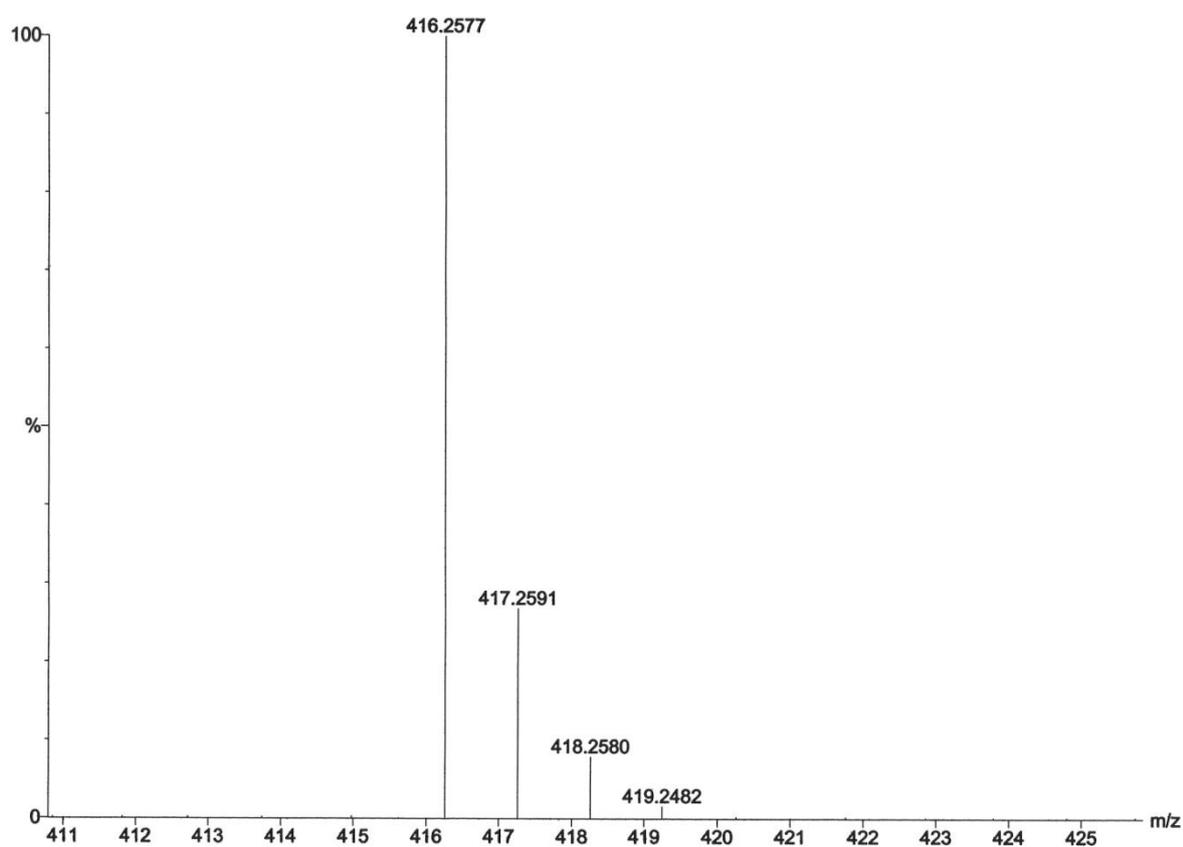


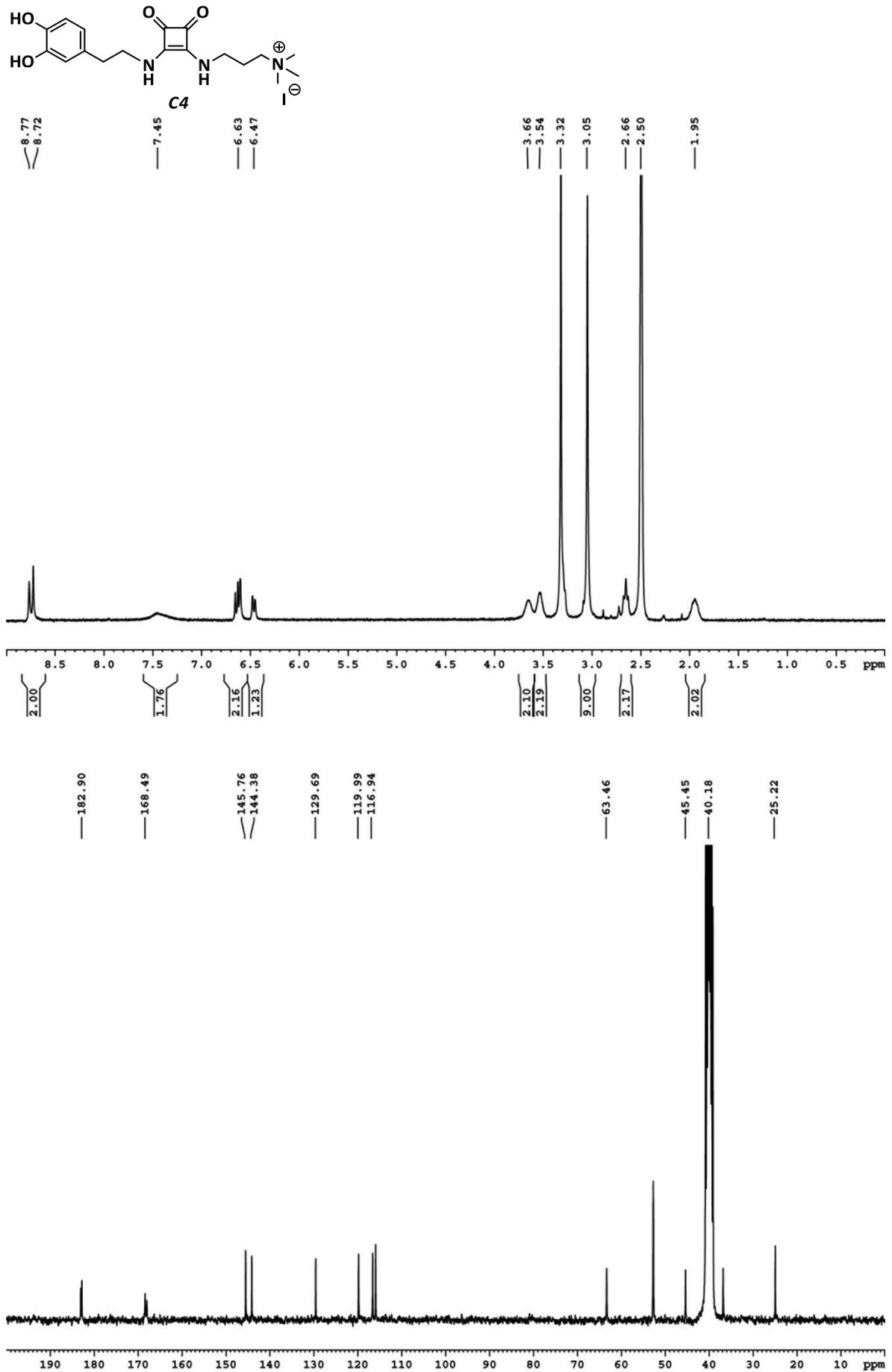
6. Colección de espectros



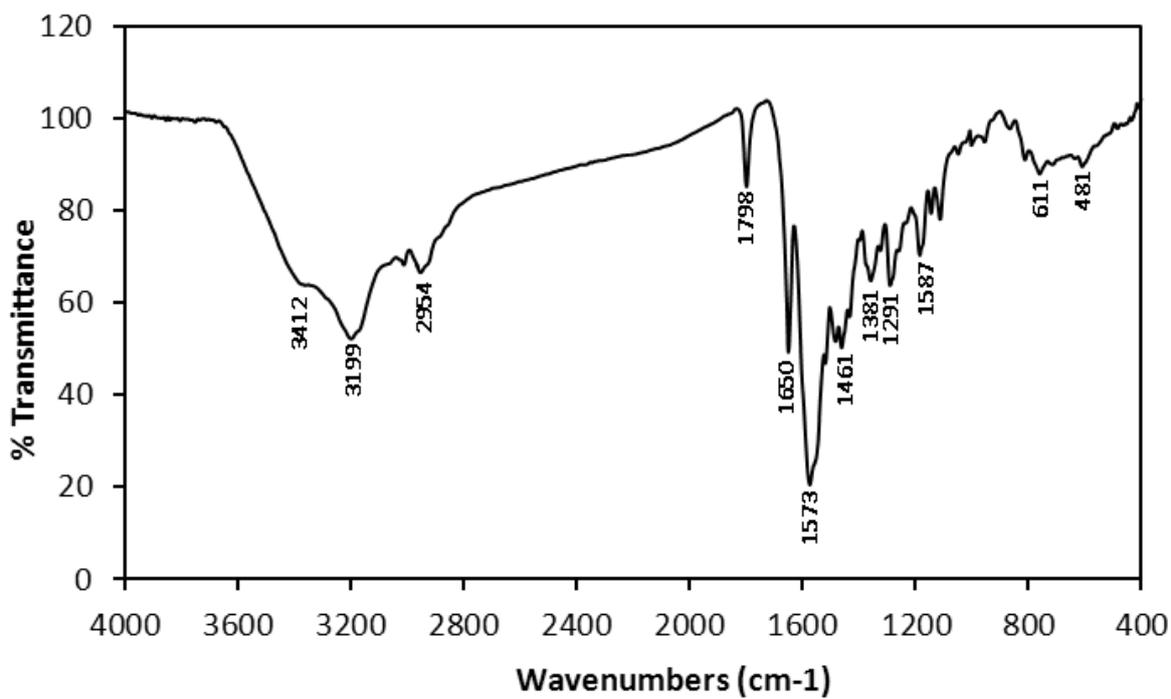
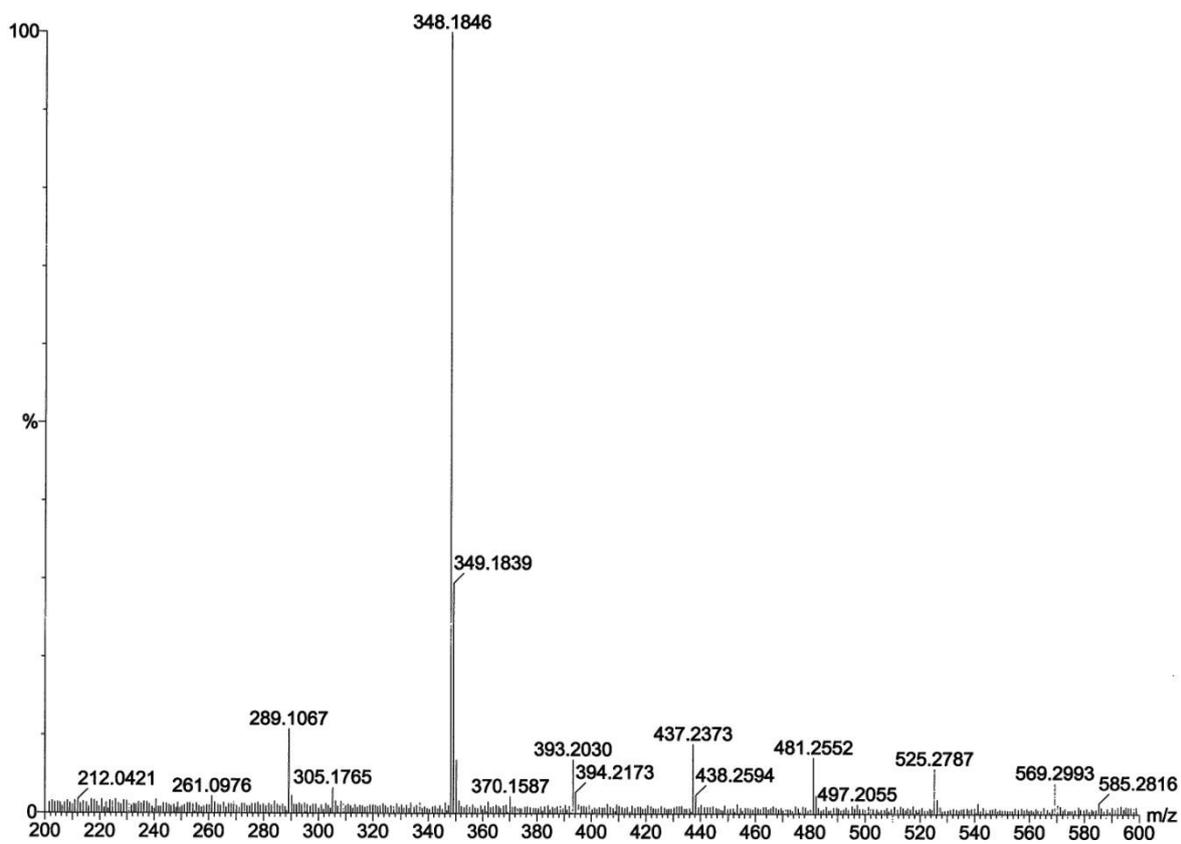


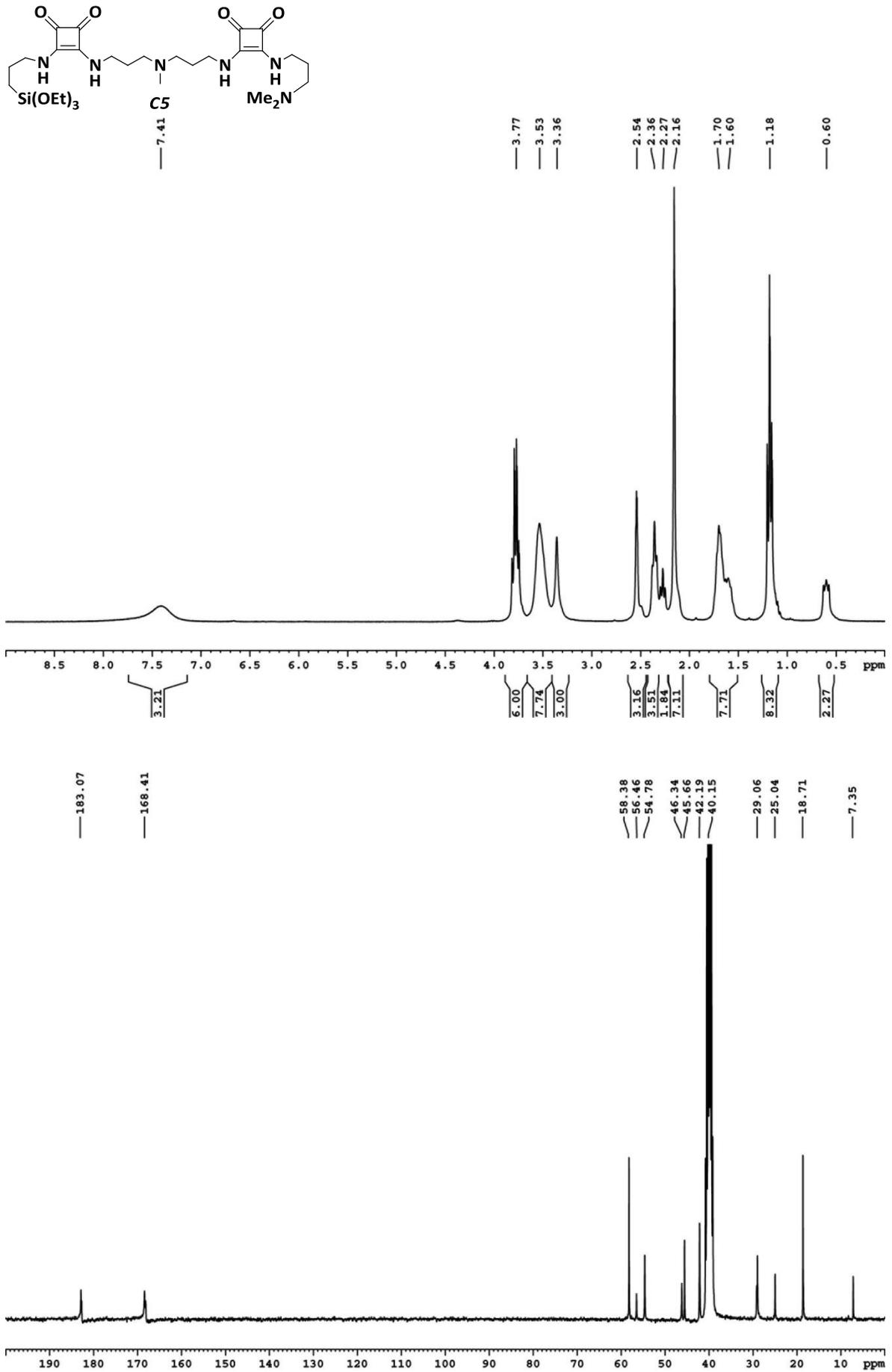
6. Colección de espectros



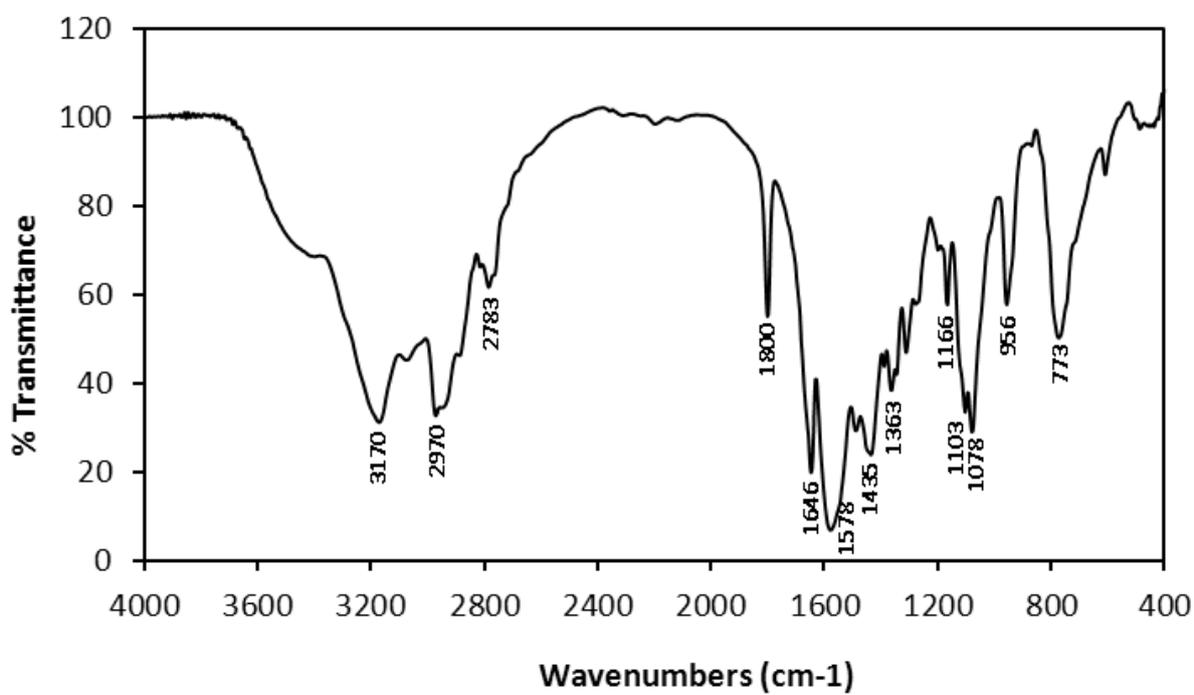
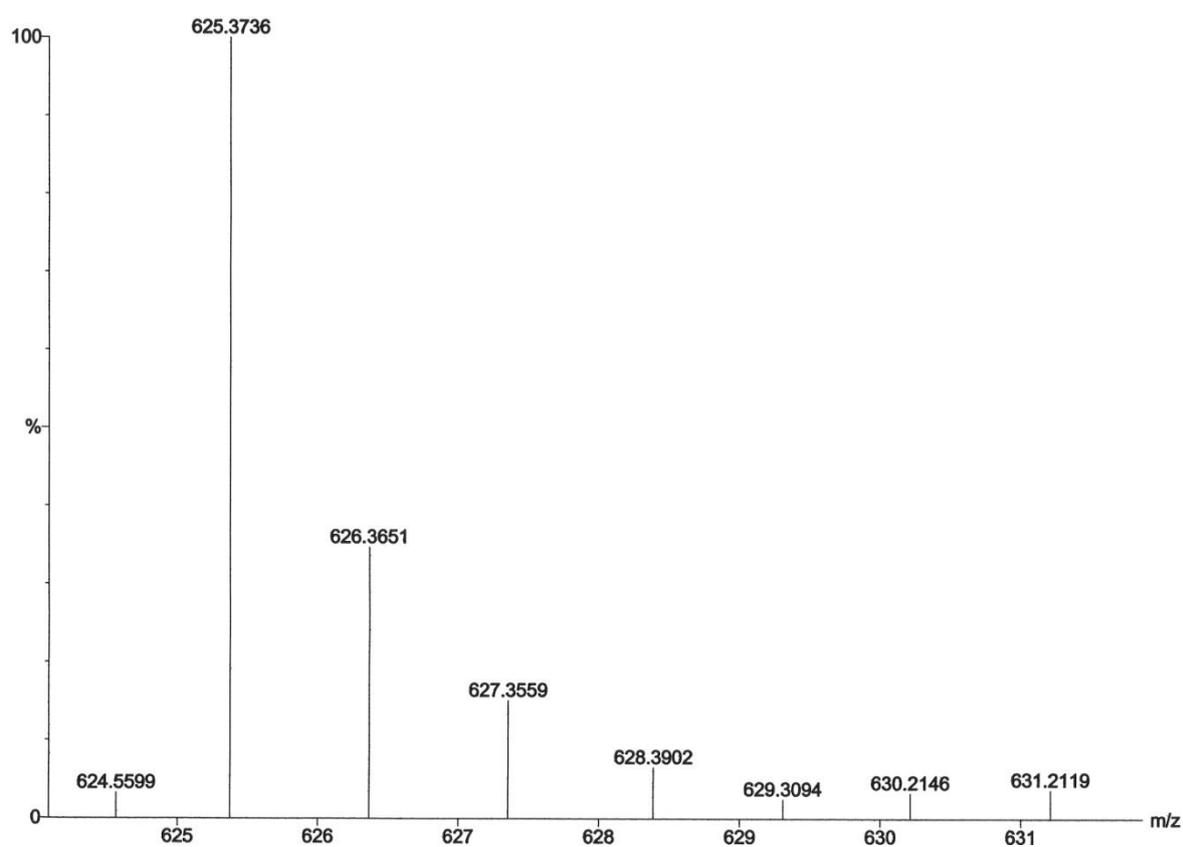


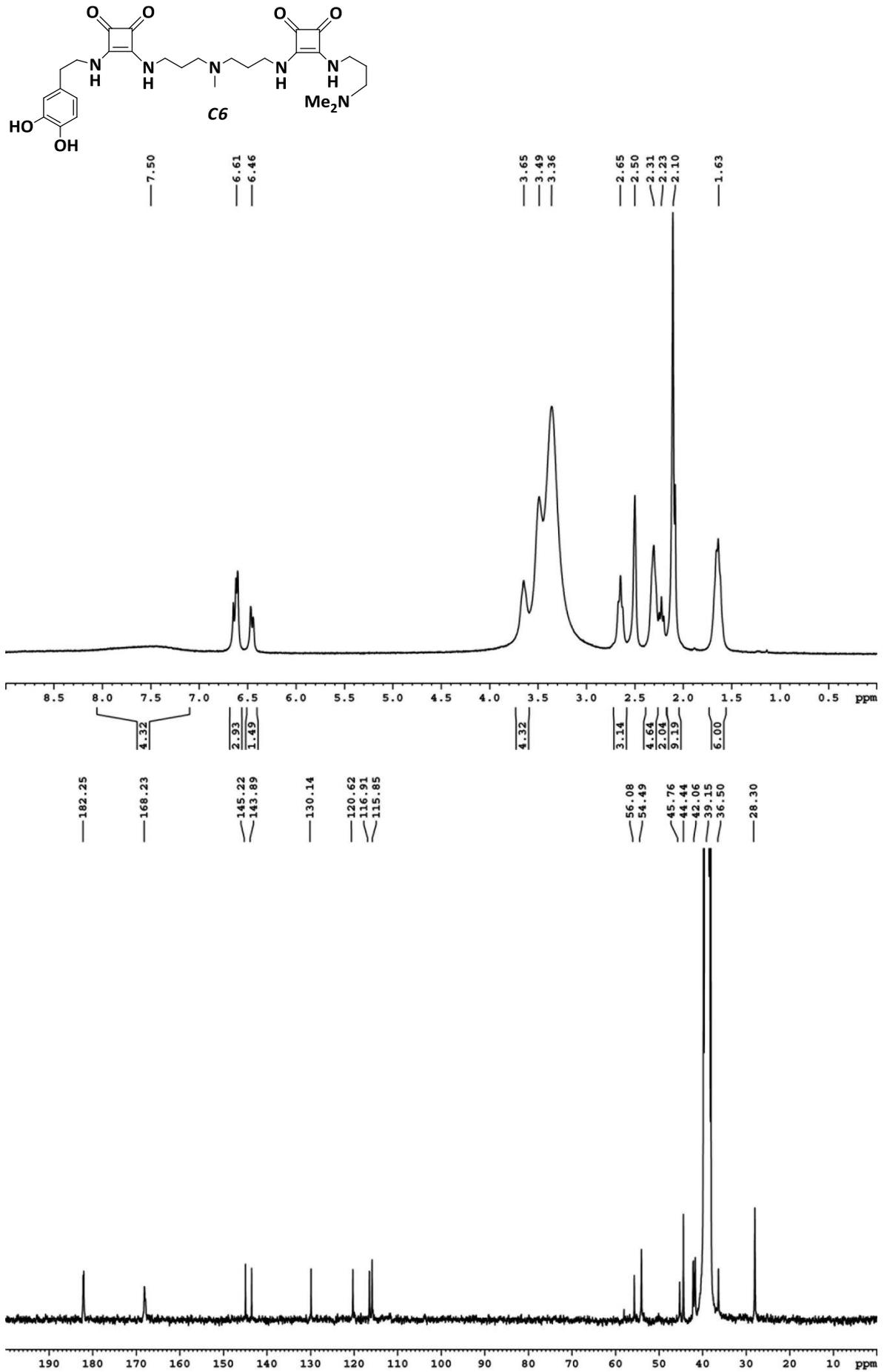
6. Colección de espectros



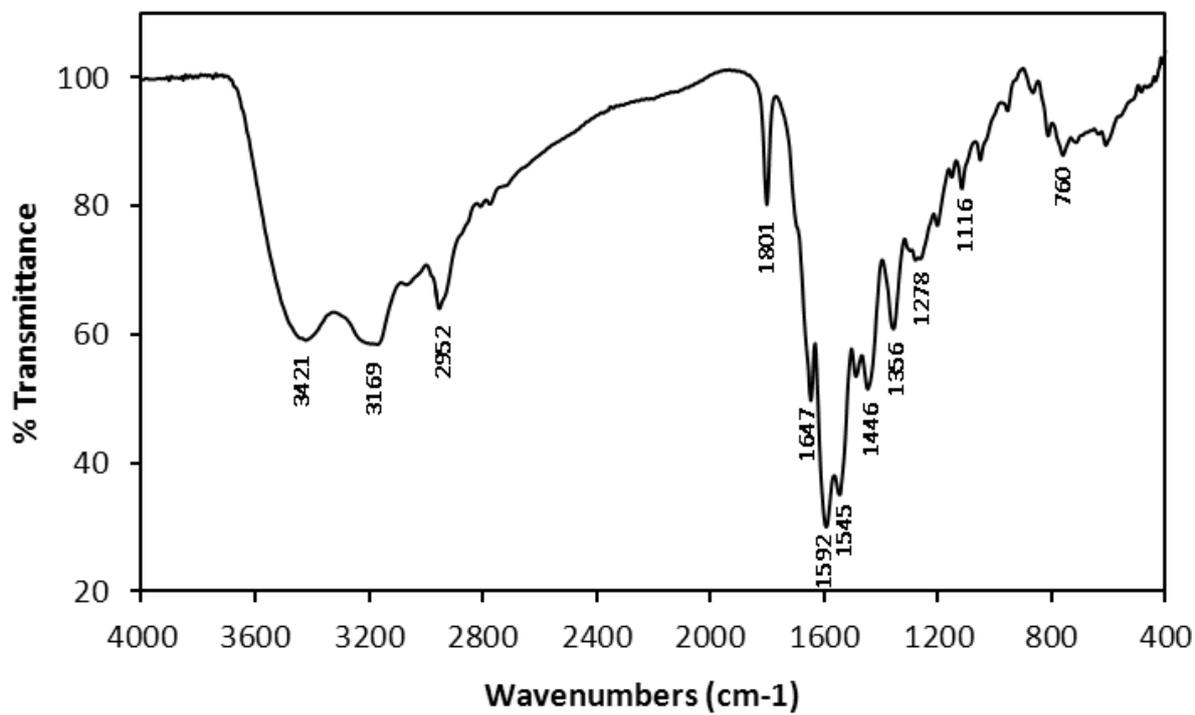
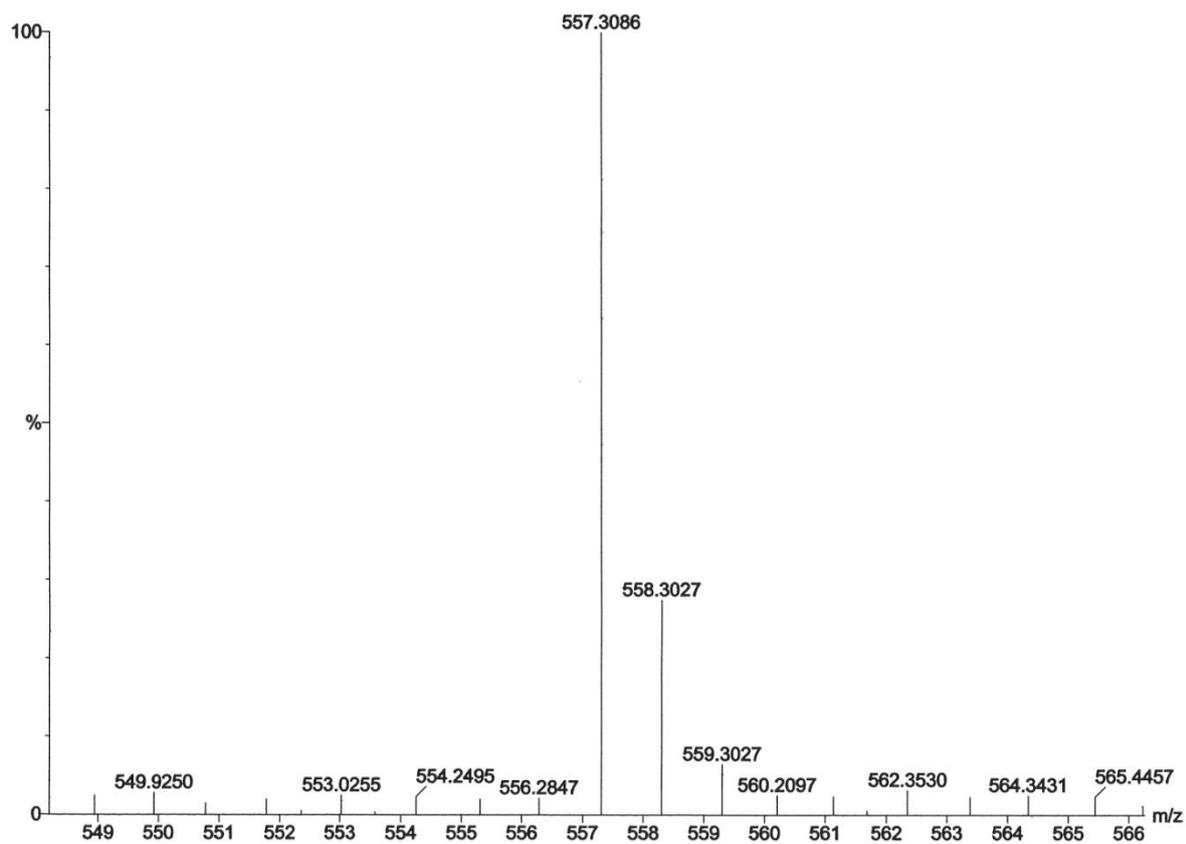


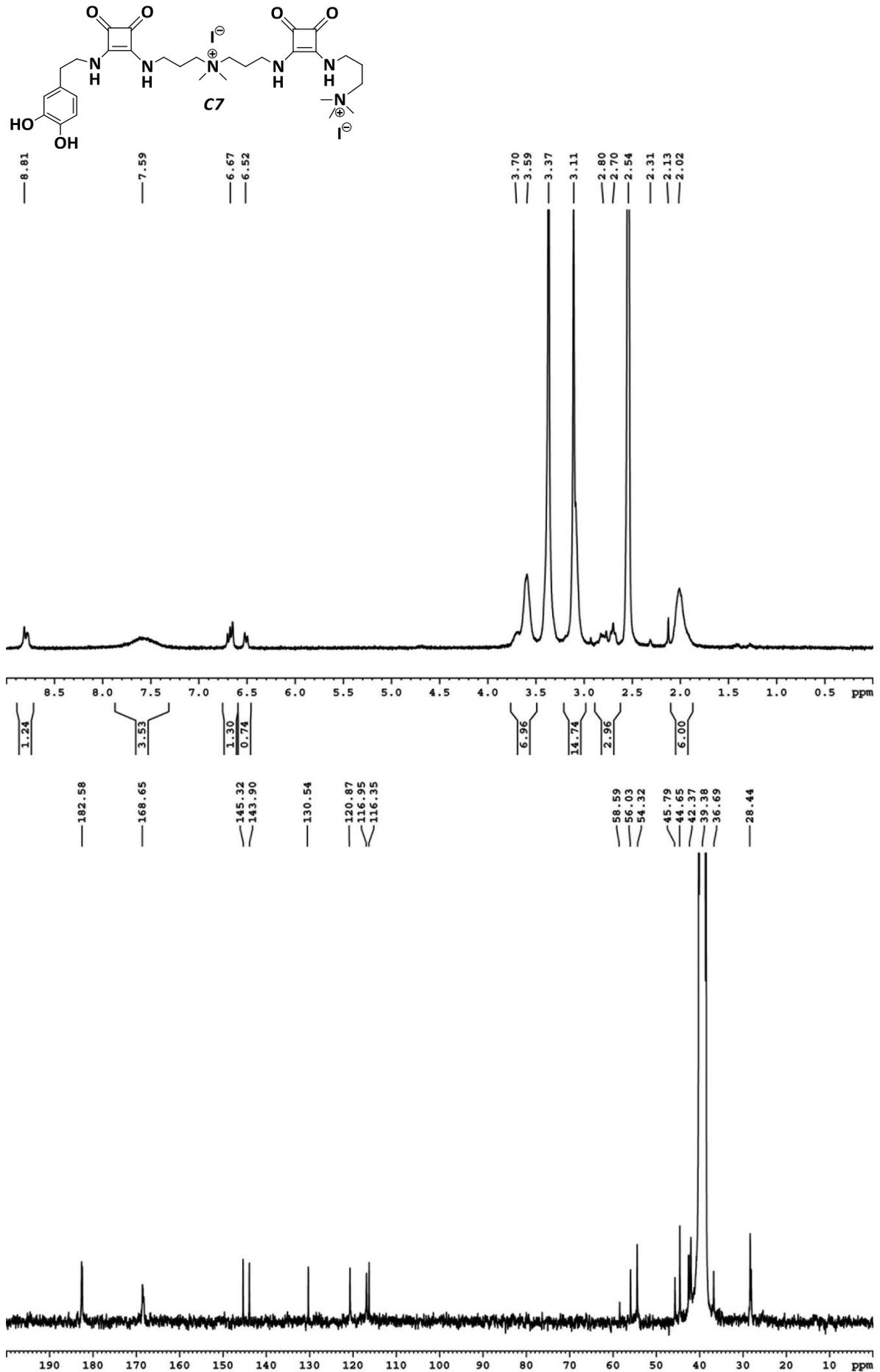
6. Colección de espectros



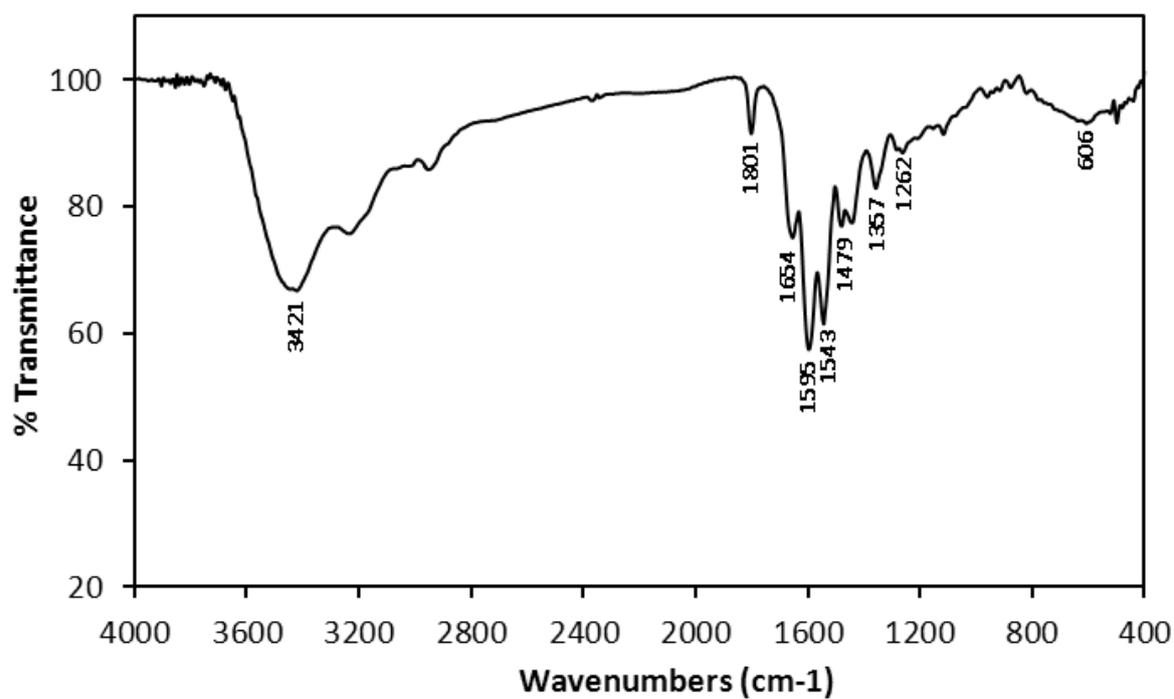
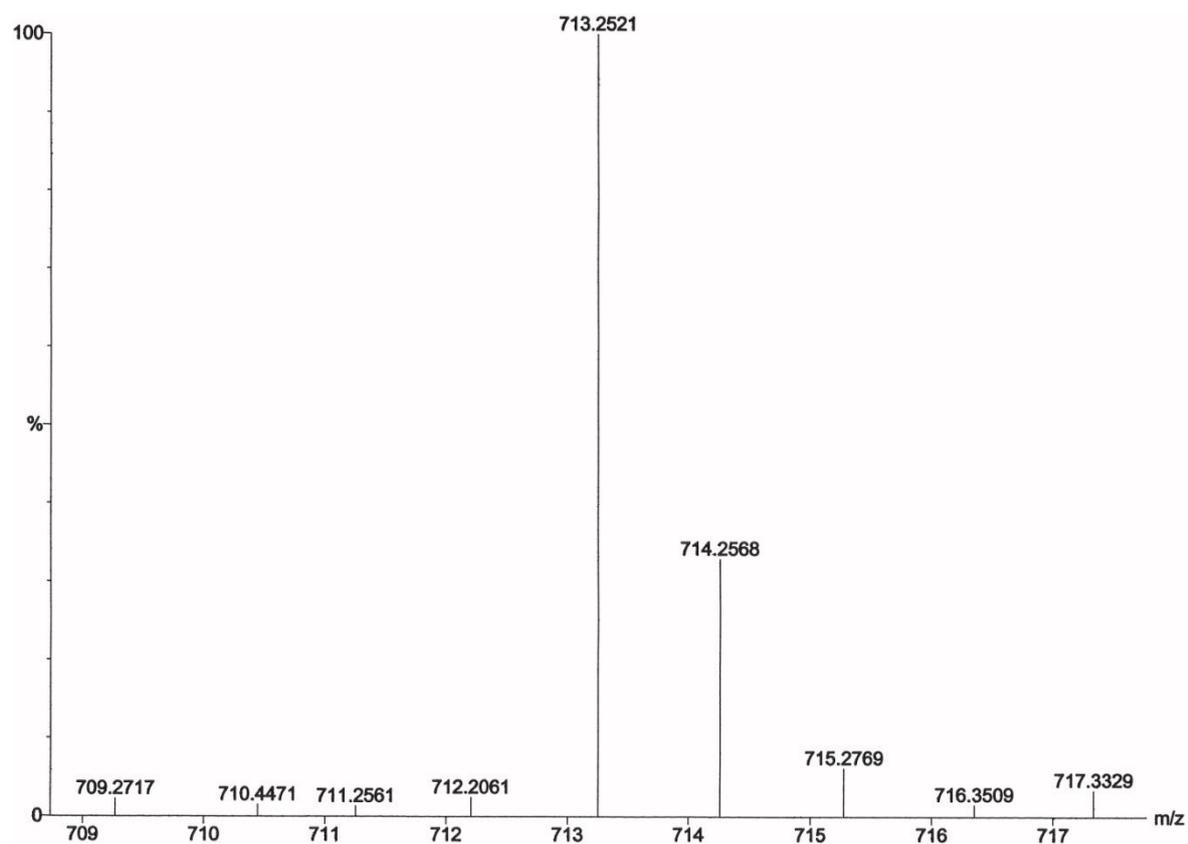


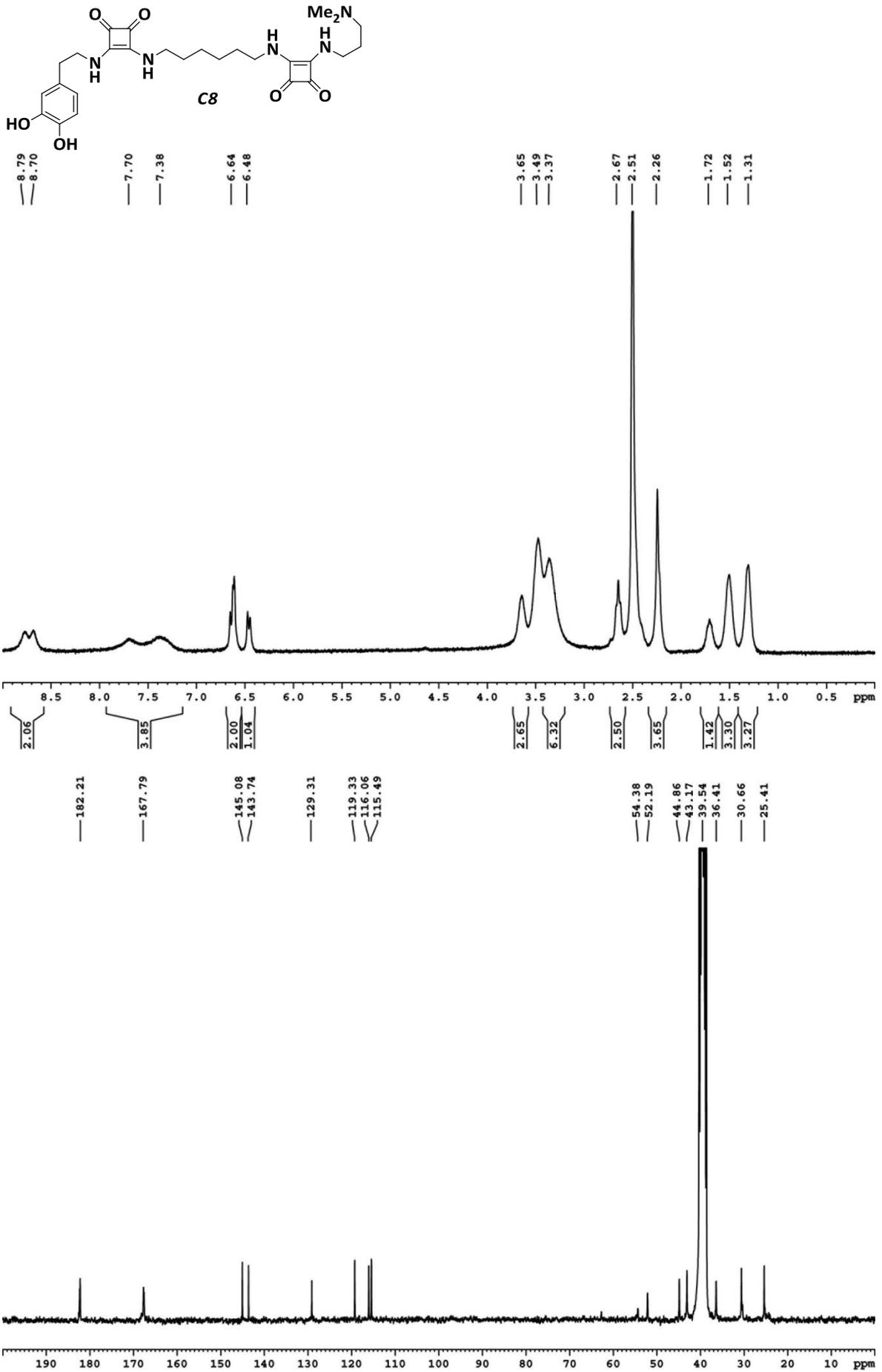
6. Colección de espectros



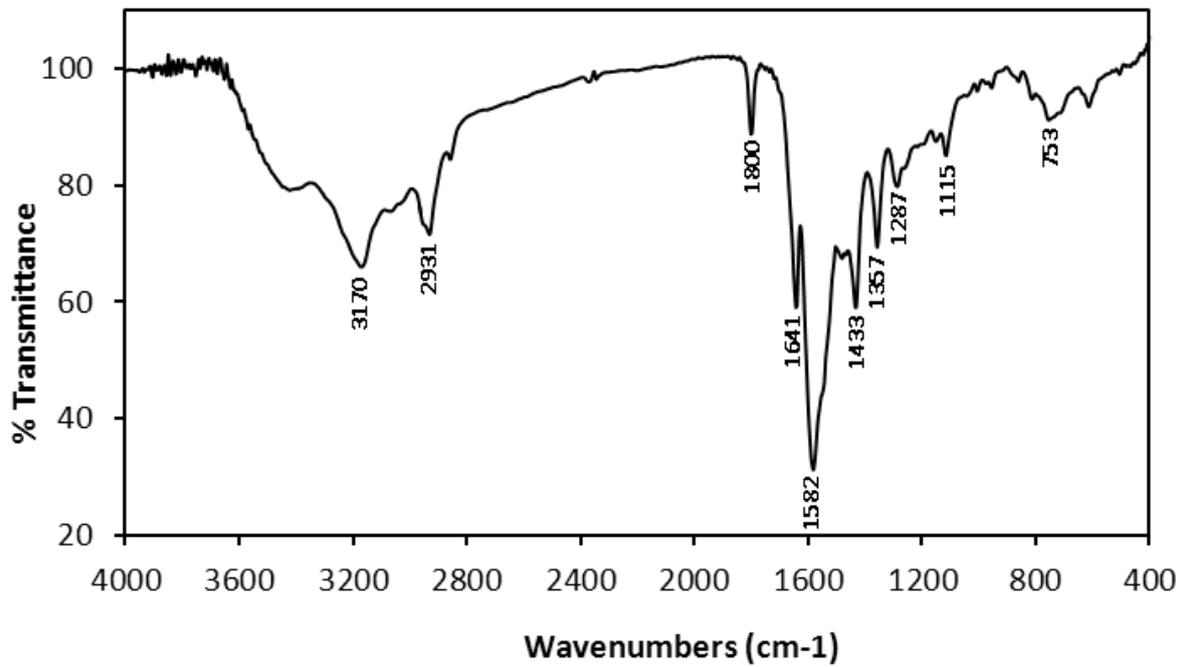
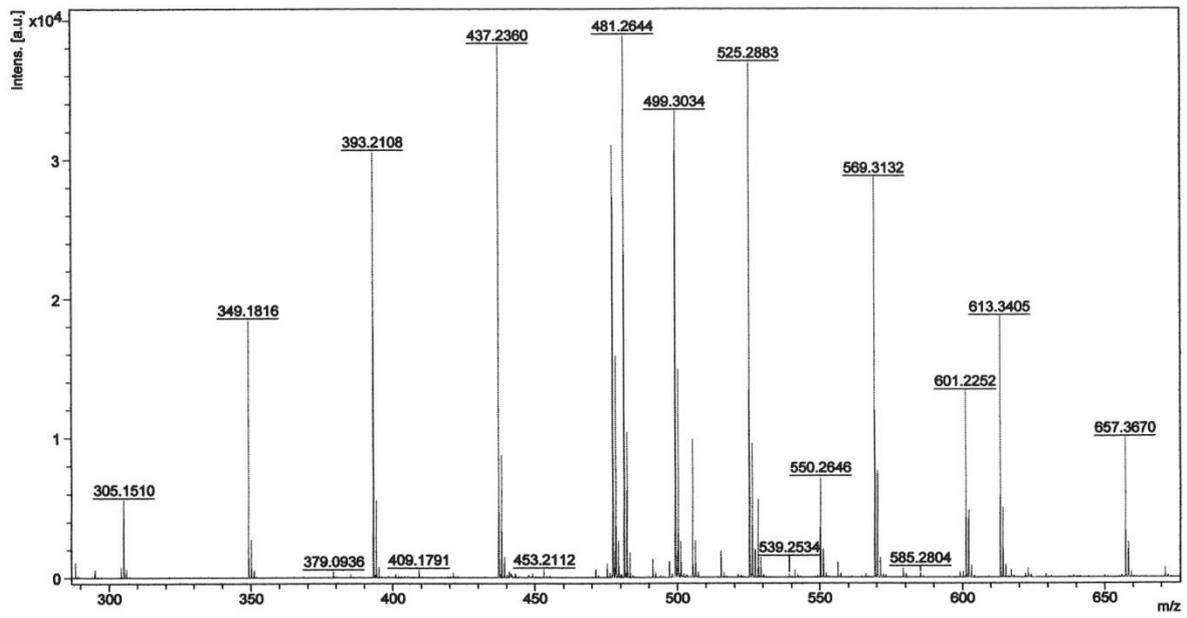


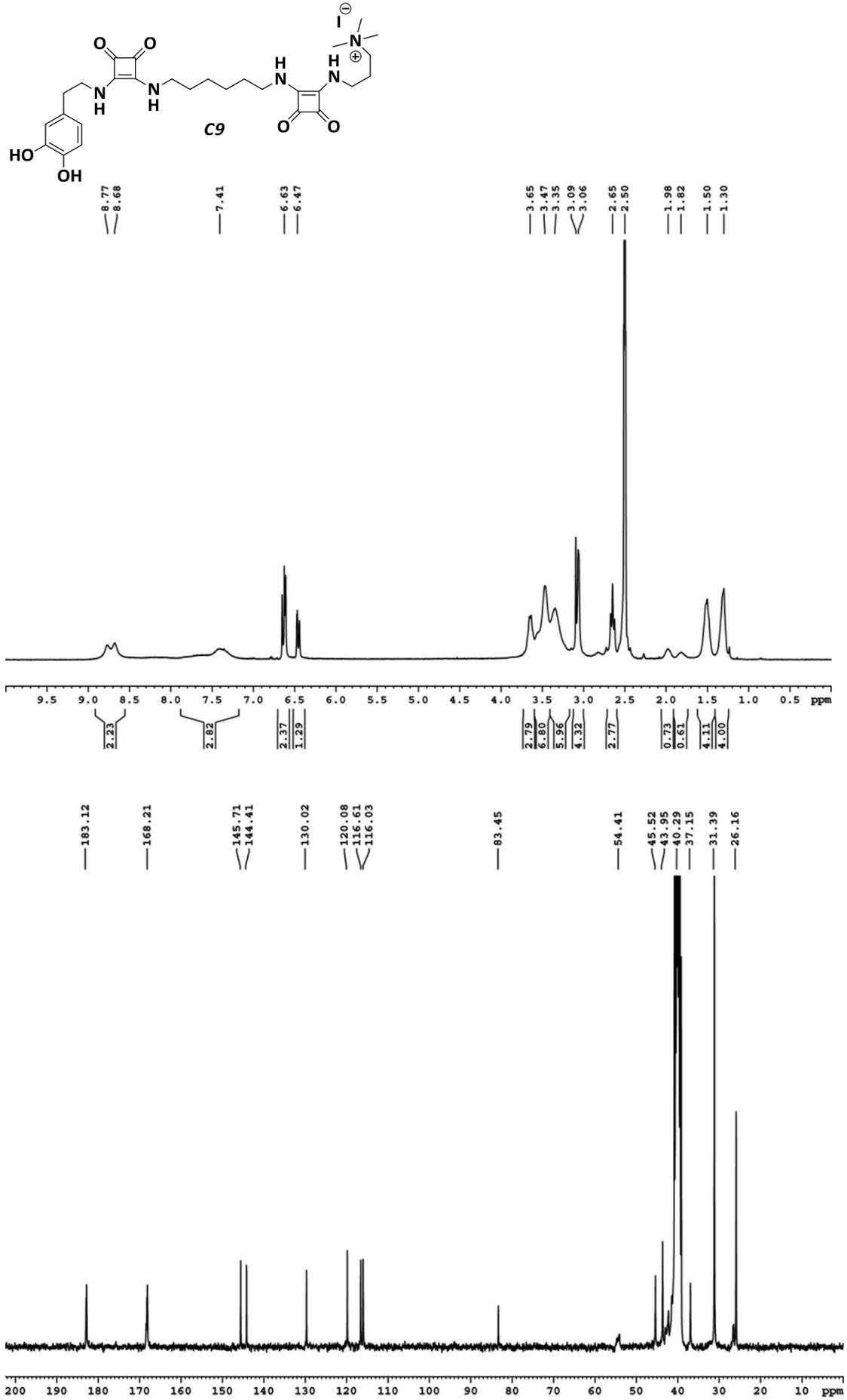
6. Colección de espectros



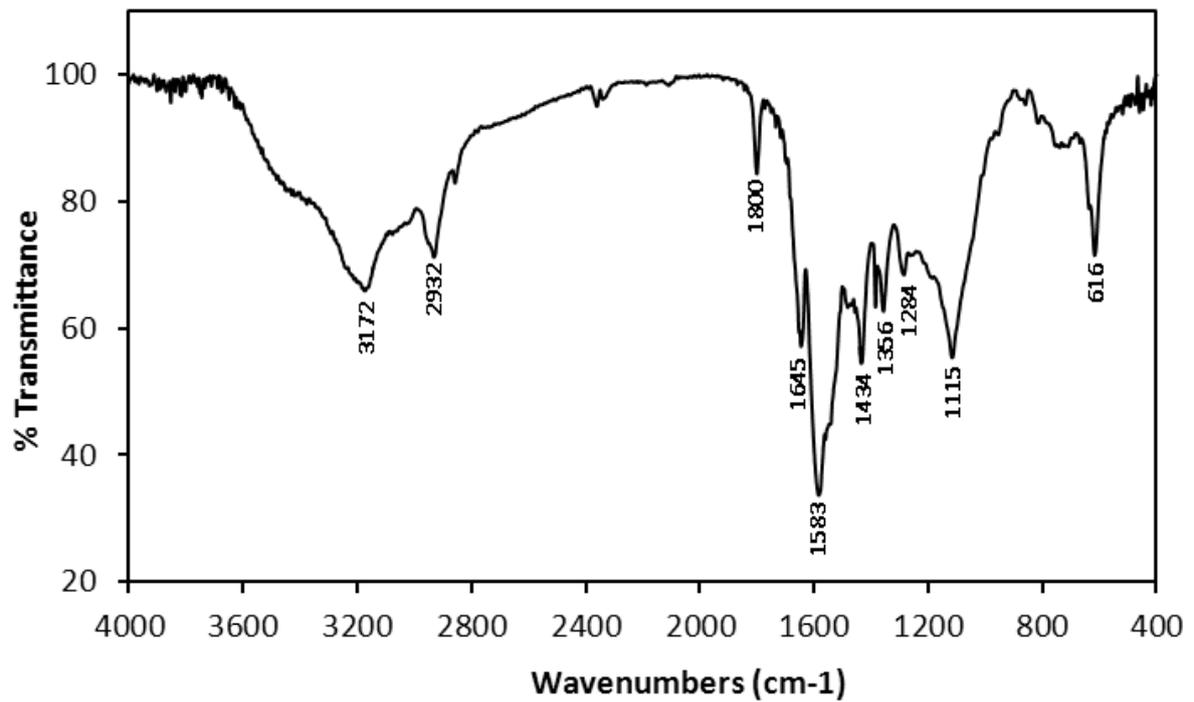
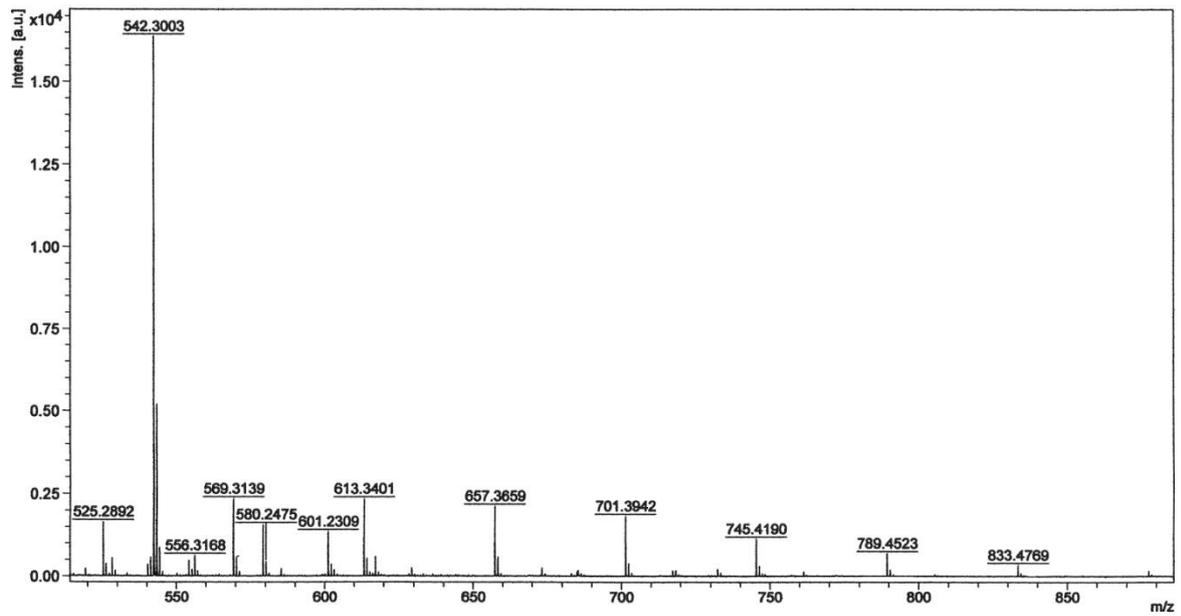


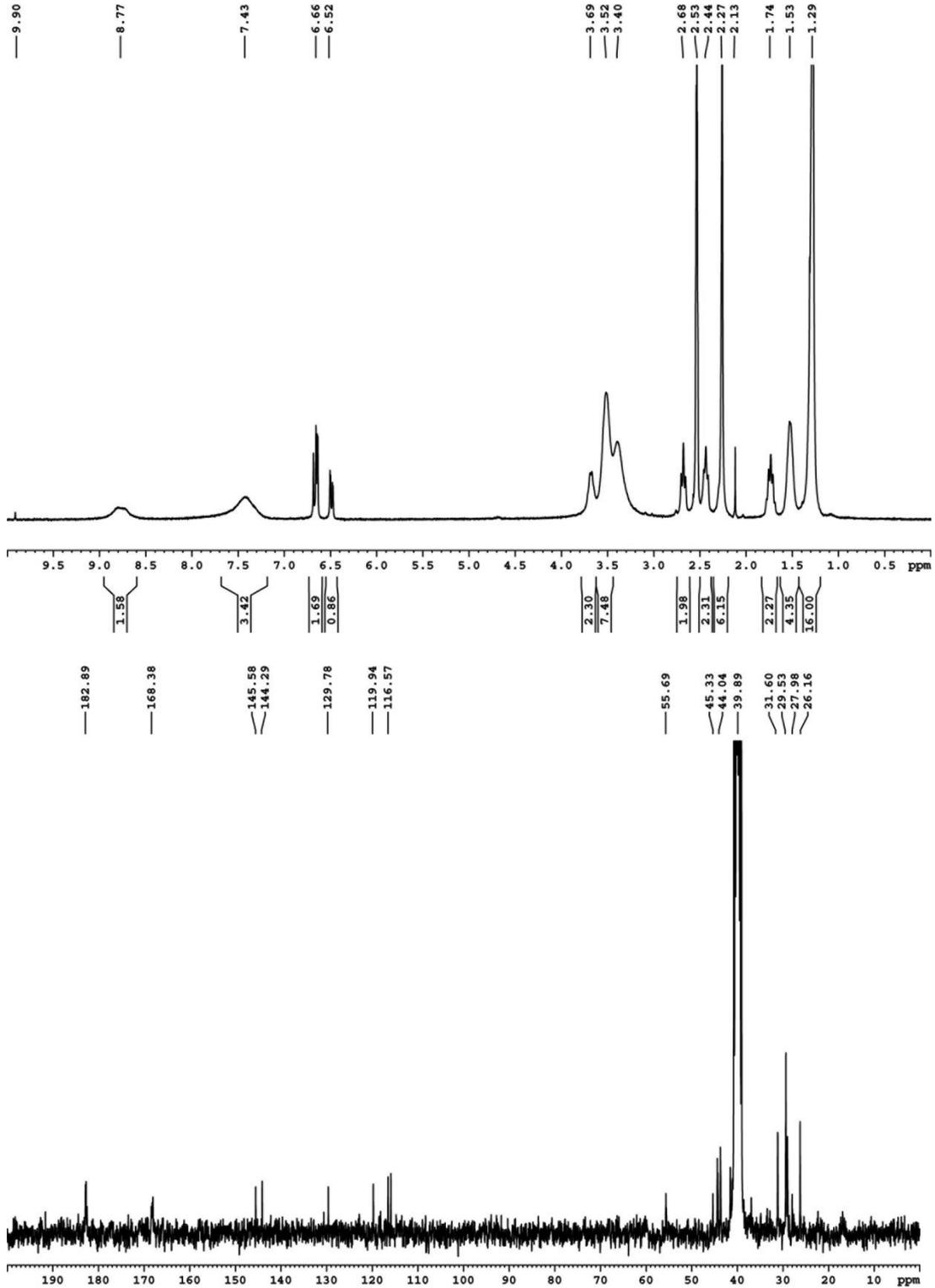
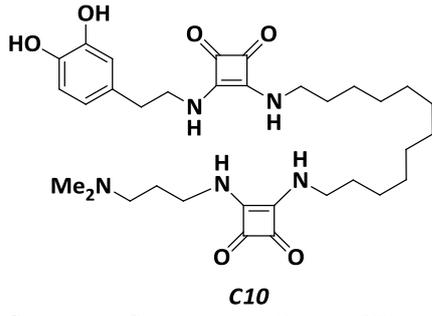
6. Colección de espectros



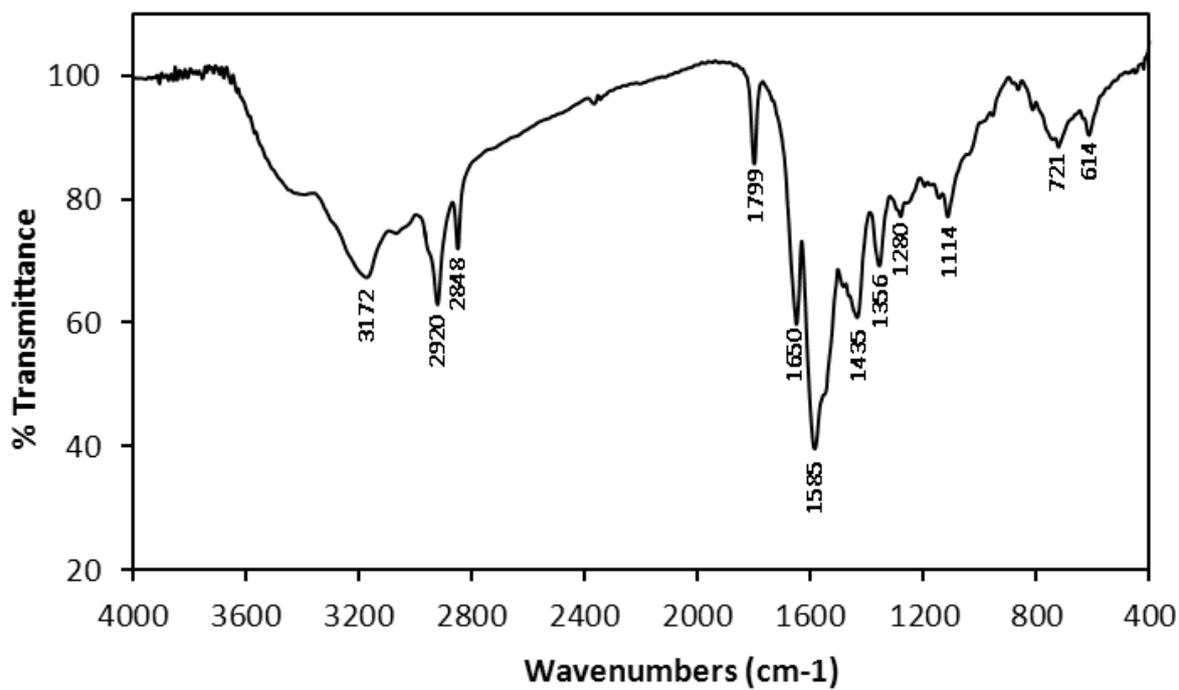
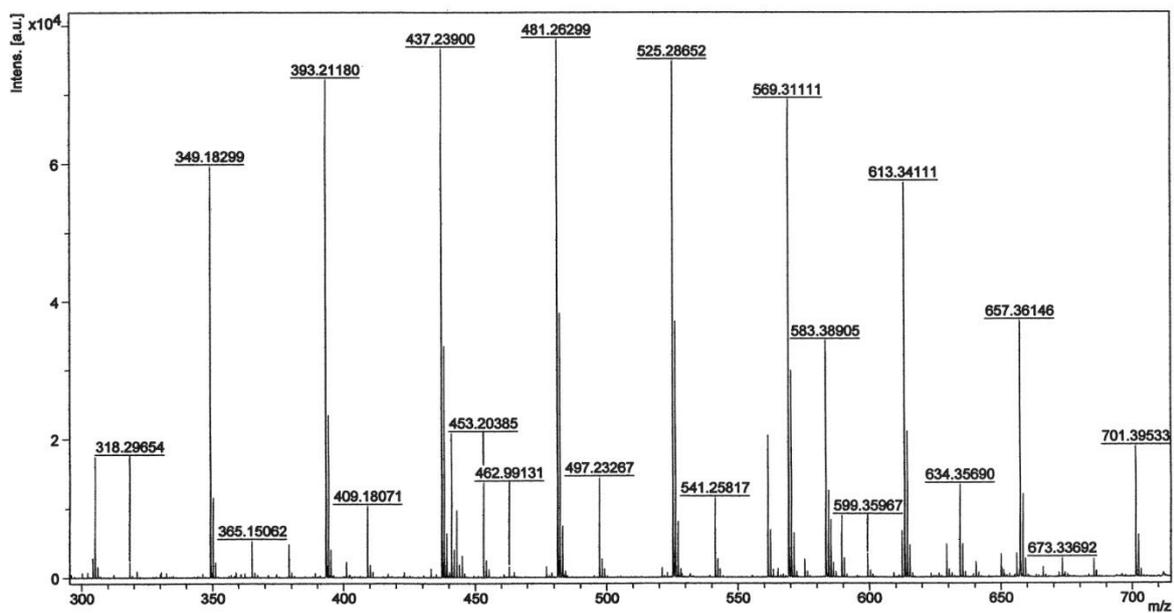


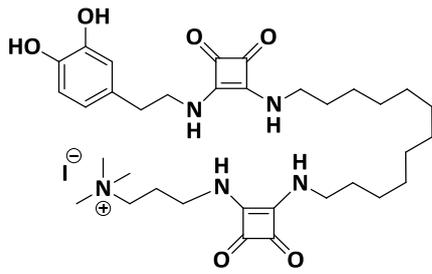
6. Colección de espectros



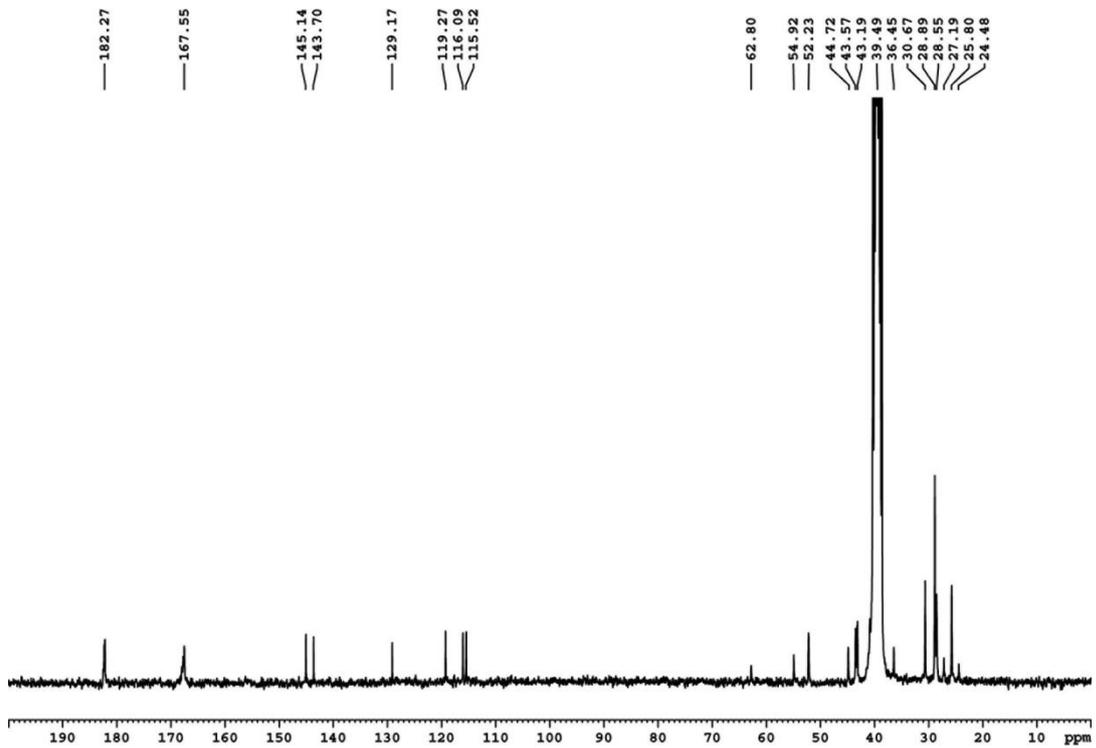
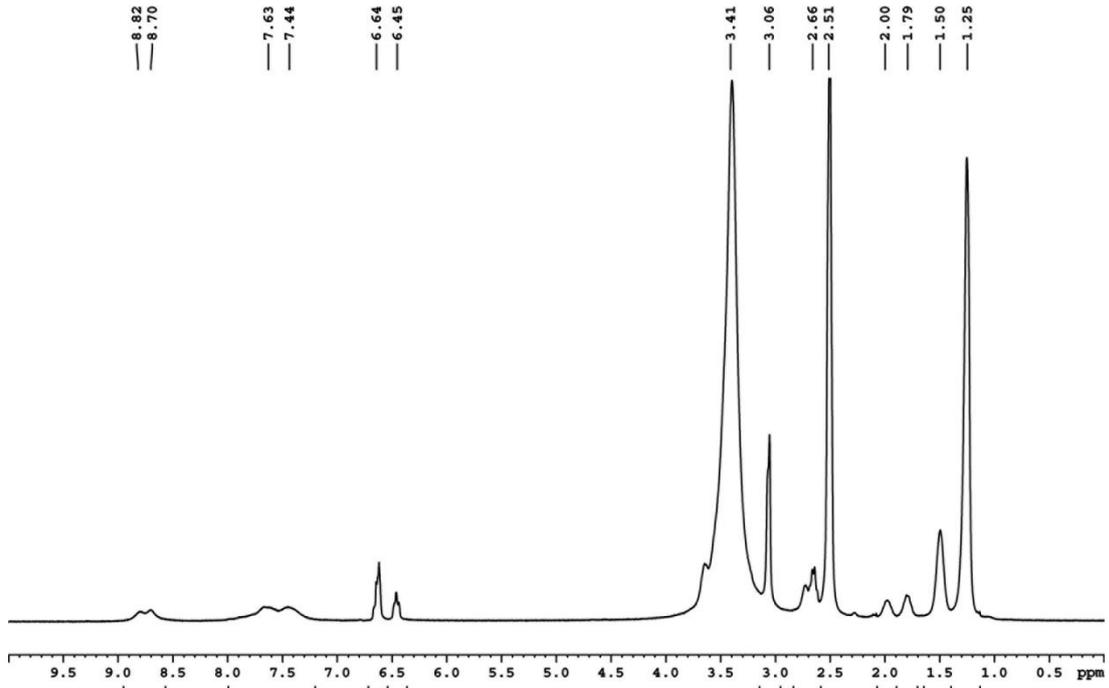


6. Colección de espectros

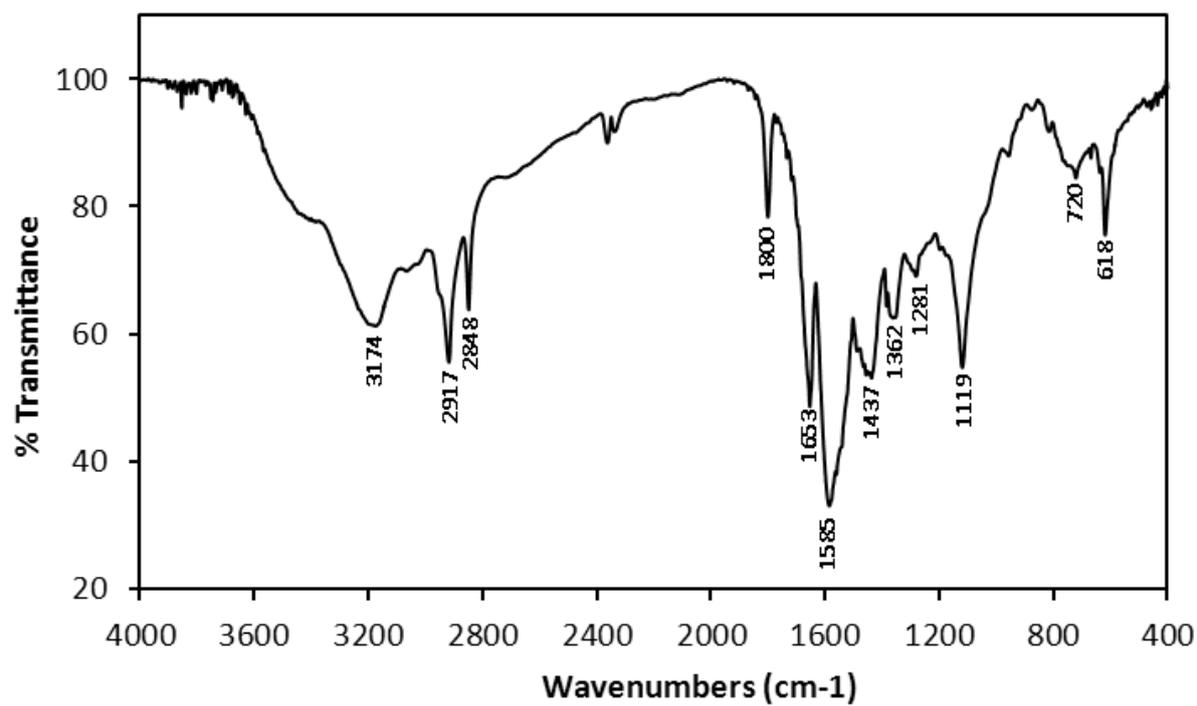
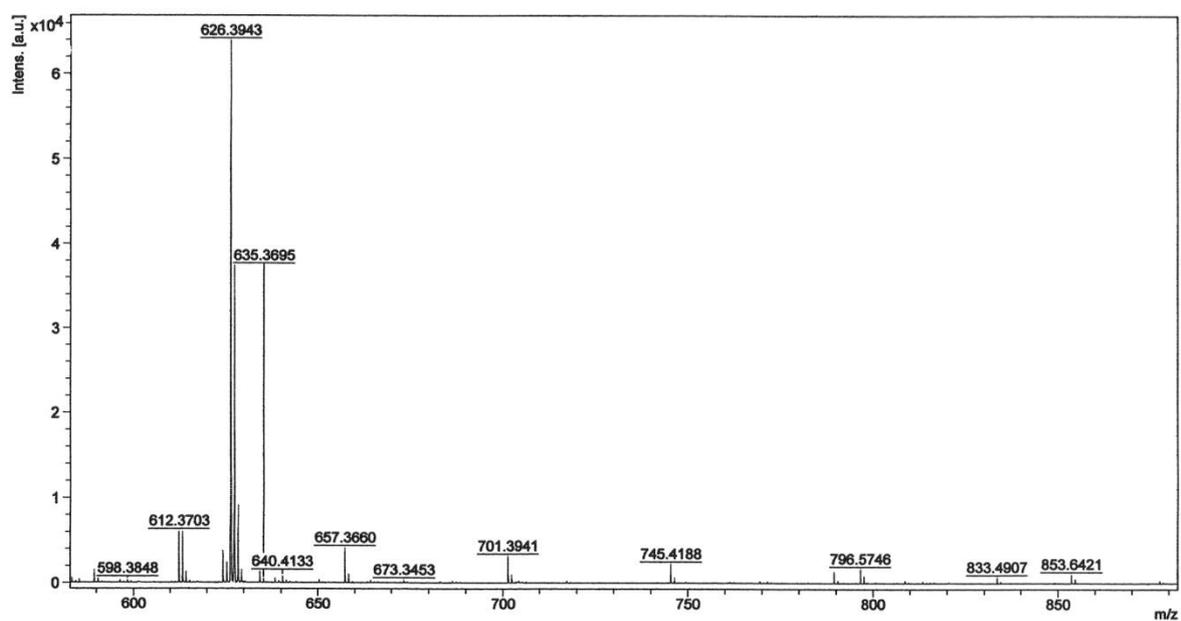


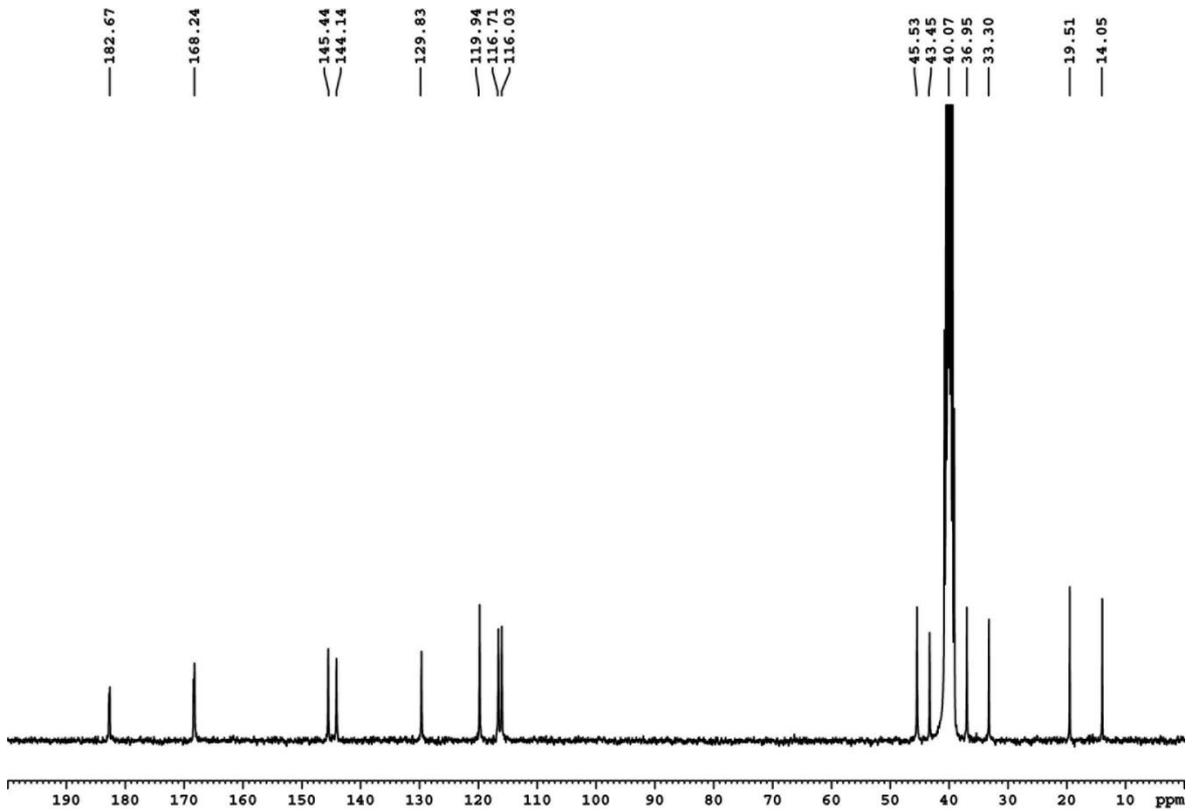
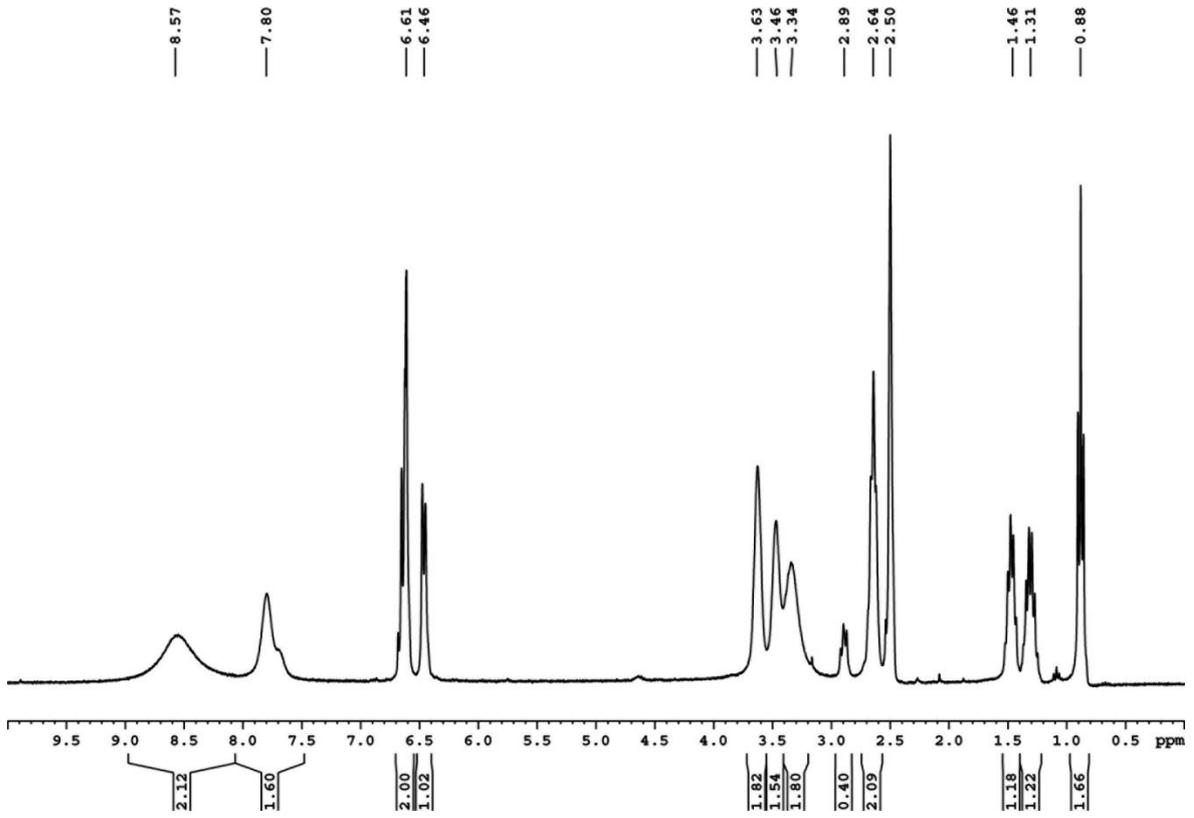
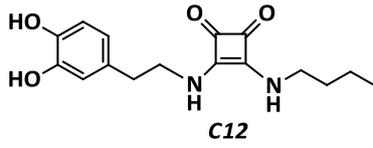


C11

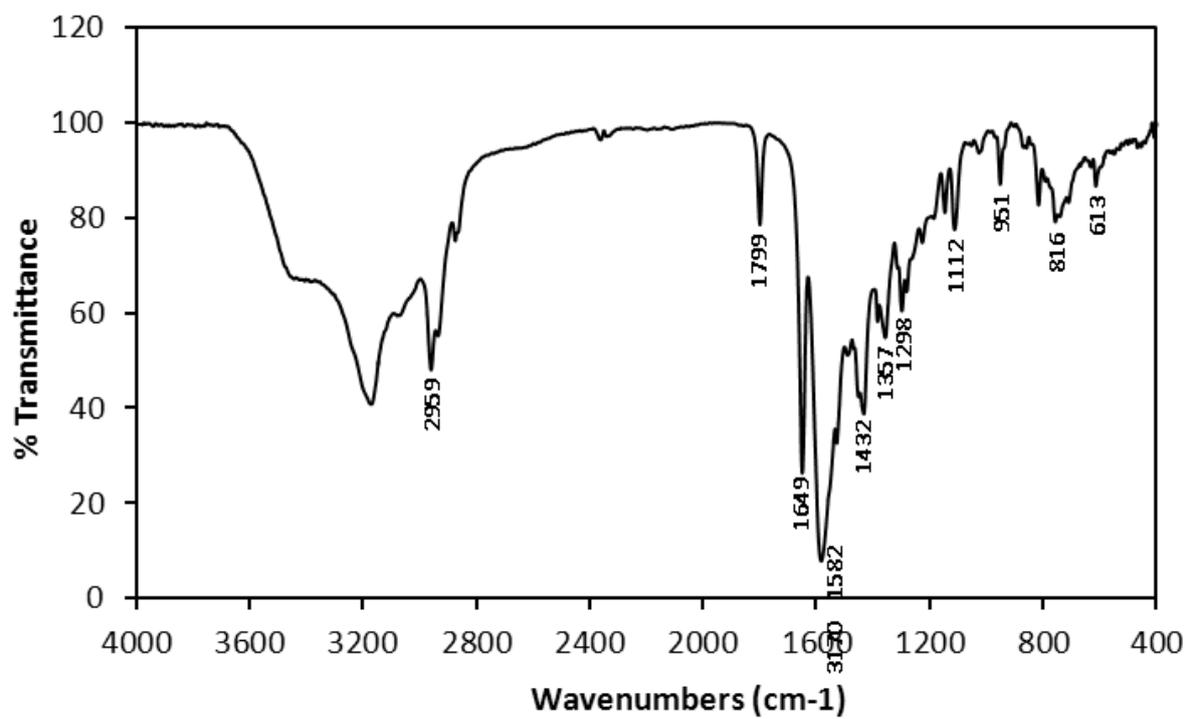
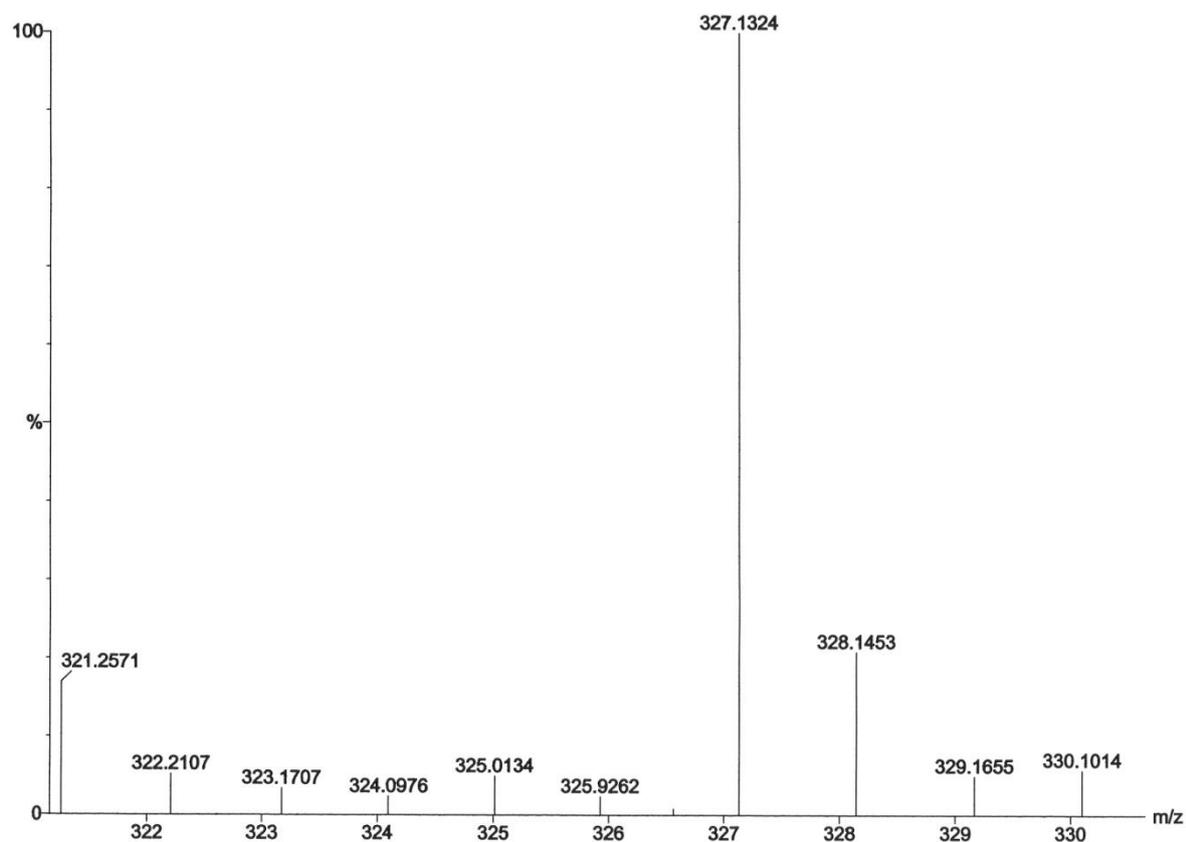


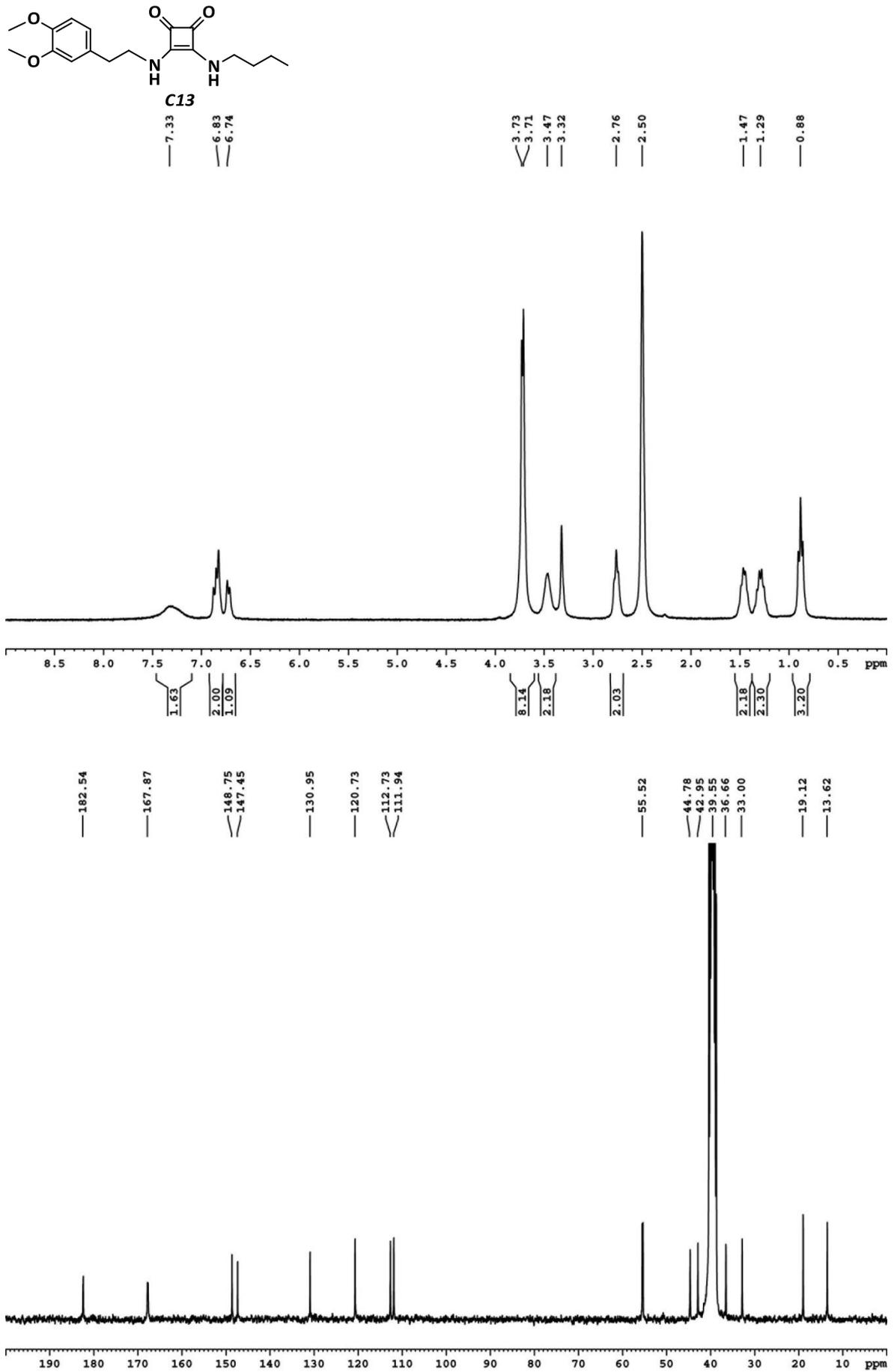
6. Colección de espectros





6. Colección de espectros





6. Colección de espectros

