

Trabajo Fin de Grado

Facultad de Ciencias Experimentales

Grado en Química

Síntesis de estructuras metal-orgánicas UiO-66 nanométricas y su modificación superficial con derivados de β -ciclodextrina.

Synthesis of nanoscale metal-organic frameworks UiO-66 and their surface modification with β -cyclodextrin derivatives.

Pablo Alonso González
(Curso académico 2020-2021)
Fecha 10/07/2021

Tutor/es
Prof. Antonio Vargas Berenguel
Departamento de Química y Física
Dr. Juan Manuel Casas Solvas
Departamento de Química y Física



Síntesis de estructuras metal-orgánicas UiO-66 nanométricas y su modificación superficial con derivados de β -ciclodextrina.

Memoria del Trabajo Fin de Grado en Química presentada por
Pablo Alonso González

Almería, 10 de julio de 2021

Fdo: Pablo Alonso González

Fdo: Antonio Vargas Berenguel

Fdo: Juan Manuel Casas Solvas

Life is a relationship between molecules

Linus Pauling

*Asegurémonos, pues, merced a una investigación bibliográfica cuidadosa,
de la originalidad del hecho o idea que deseamos exponer,
y guardémonos además de dar a luz prematuramente el fruto de la observación
Cuando nuestro pensamiento fluctúa todavía entre conclusiones diversas
y no tenemos plena conciencia de haber dado en el blanco,
ello es señal de haber abandonado harto temprano el laboratorio.
Conducta prudente será volver a él y esperar a que,
bajo el influjo de nuevas observaciones, acaben de cristalizar nuestras ideas.*

Santiago Ramón y Cajal “Reglas y consejos”

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a mis profesores Antonio Vargas Berenguel y Juan Manuel Casas Solvas por la ayuda que me han proporcionado para la realización de esta memoria. Ambos confiaron en mí desde el primer momento para llevar a cabo esta investigación e hicieron que me interesara por el increíble mundo de los nanomateriales.

Al equipo de investigación de la Universidad de Almería y la Universidad de la Coruña, por su colaboración a nivel analítico que ha sido crucial para poder finalizar este trabajo.

A mis amigas y amigos, porque siempre me han motivado para seguir adelante.

Y finalmente, quiero agradecer a mis padres y a mi hermana el apoyo y cariño constante que me han dado, no solo en esta última etapa de mi carrera, sino durante toda mi formación como químico.

MEMORIA

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	5
4. OBJETIVOS	10
5. MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES	11
5.1. INSTRUMENTACIÓN, MATERIALES Y REACTIVOS	11
5.2. SÍNTESIS	12
5.2.1. Síntesis de UiO-66:	12
5.2.2 Funcionalización de UiO-66:	12
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
7. CONCLUSIONES	33
9. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	33

1. RESUMEN

En el presente Trabajo Fin de Grado se ha estudiado la síntesis y purificación de nanoestructuras metal-orgánicas (nMOFs) UiO-66 de tamaño inferior a 100 nm, así como su funcionalización post-sintética utilizando derivados del ciclooligosacárido β -ciclodextrina decorados con grupos fosfato y sulfonato, y de su análogo γ -ciclodextrina funcionalizado con carboxilato. Los materiales obtenidos se han caracterizado mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM), difracción de rayos X de polvo (PXRD), análisis elemental, análisis de fisisorción de N₂, microanálisis por dispersión de energía de rayos X (EDS), resonancia magnética nuclear con rotación de ángulo mágico (HRMAS) y microscopía electrónica de barrido de alta resolución de emisión de campo (FESEM). Los resultados sugieren que, a diferencia del análogo fosforilado, los ciclooligosacáridos con grupos sulfonilo y carboxilo parecen anclarse con cierta extensión sobre la superficie del nMOFs.

Palabras clave: *nMOF, UiO-66, ciclodextrina, SBECD, sugammadex.*

2. ABSTRACT

In the present Degree Final Project, we have studied the synthesis and purification of nano structured UiO-66 metal-organic frameworks (nMOFs) of size less than 100 nm, as well as their post-synthetic functionalisation using derivatives of the cyclooligosaccharide β -cyclodextrin bearing phosphate and sulphonate groups, and its analogue γ -cyclodextrin functionalised with carboxylate groups. The obtained materials have been characterised by transmission electron microscopy (TEM), powder X-ray diffraction (PXRD), elemental analysis, N₂ physisorption analysis, energy dispersive X-ray microanalysis (EDS), magic angle spinning nuclear magnetic resonance (HRMAS) and high-resolution field emission scanning electron microscopy (FESEM). The results suggest that, unlike the phosphorylated analogue, cyclooligosaccharides with sulfonyl and carboxyl groups appear to anchor to a certain extent on the surface of the nMOFs.

Keywords: *nMOF, UiO-66, cyclodextrin, SBECD, sugammadex.*

3. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, la nanoquímica, la nanotecnología y en general, la nanociencia, son conceptos de los que la gran mayoría de personas interesadas en el mundo de la ciencia han oído hablar. Sin embargo, ¿realmente tenemos claro lo que significan estas palabras? Existen numerosas definiciones repartidas por todo Internet que tratan de explicar estos términos, pero no todas ellas son estrictamente correctas y algunas mezclan ideas provenientes de otras áreas de la ciencia como, por ejemplo, la física. Uno de los problemas que derivan de la errónea definición de estas palabras es considerar que la nanoquímica y la nanotecnología surgieron como áreas concretas de la ciencia, en vez de tratarlas como disciplinas que se han ido desarrollando a raíz de nuevos descubrimientos y avances en la humanidad y que, de hecho, están en plena evolución.¹

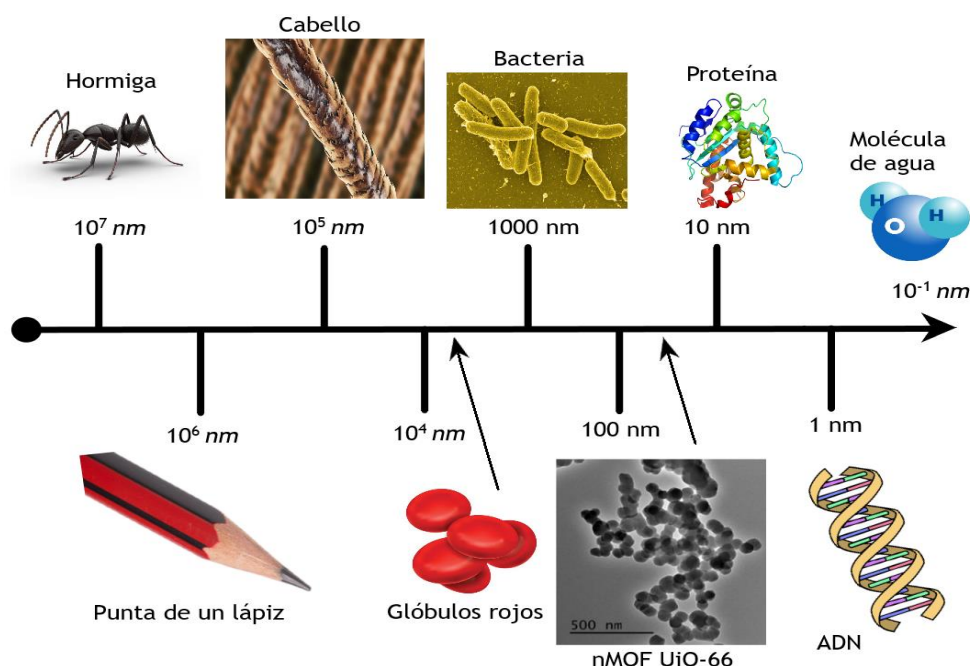


Figura 1. Representación de la escala nanométrica.

El Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano (NHGRI) define la nanotecnología como “un área de investigación, así como su aplicación en la fabricación de dispositivos y productos, que estudia las propiedades de los materiales que tienen entre 1 y 100 nanómetros de tamaño”.² La nanoquímica es la utilización de la química sintética para hacer bloques de construcción a nanoescala de diferentes tamaños y forma, composición y estructura superficial, carga y funcionalidad, mediante auto-ensamblaje supramolecular.³ Según la Unión Europea, se define nanomaterial como: “un material natural, accidental o manufacturado que contiene partículas, en un estado no unido o como un agregado o un aglomerado, y donde, para el 50% o más de las partículas en la distribución del tamaño del número, una o más

(1) Briones Llorente, C.; Casero Junquera, E.; Martín Gago, J.; Serena Domingo, P. *Nanociencia y nanotecnología*; Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología, Madrid, **2008**, pp 20-21.

(2) Schloss, J. *Nanotechnology*. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Nanotechnology> (acceso 14 de junio de 2021).

(3) Ozin, G.; Arsenault, A. *Nanochemistry*; Royal Society of Chemistry: Cambridge, **2006**.

dimensiones externas está en el rango de tamaño 1 nm - 100 nm”.⁴ Para hacernos una idea más clara de la escala de tamaños, podemos observar la Figura 1, en donde se representan los tamaños de ciertos objetos y seres vivos.

La investigación nanotecnológica es muy interesante para los científicos, ya que el estudio de los materiales desde un tamaño tan reducido resulta sorprendente. Es lógico pensar que un nanomaterial se comportará de manera similar a los átomos que lo componen o al material formado por el conjunto de unidades de menor tamaño. Sin embargo, las propiedades de estas partículas nanométricas suelen diferir en gran medida de las del material macroscópico. Por ejemplo, las nanopartículas de oro, que son nanomateriales muy utilizados en diversas aplicaciones nanotecnológicas debido a sus propiedades, presentan colores rojos o azules en función del tamaño que tengan, en contraposición al color dorado que todos conocemos. También existen variaciones entre las propiedades conductoras del oro que podemos comprar en una joyería con el que utilizan ciertos dispositivos electrónicos de última generación. Otro ejemplo podría ser la utilización de los nanotubos de carbono (cuyo diámetro ronda el nanómetro, aunque pueden llegar a tener longitudes de muchos millones de nanómetros más) en diferentes aplicaciones como electrónica, medicina, almacenamiento de hidrógeno, etc. Se fabrican con grafito, un mineral muy común utilizado por ejemplo para fabricar lápices, resultando extremadamente resistentes en lugar de frágiles.²

En los últimos años, la nanotecnología ha supuesto un gran avance en aplicaciones relacionadas con la administración de fármacos, y está revolucionando el punto de vista de la industria farmacéutica y biotecnológica al ofrecer un nuevo abanico de posibilidades para tratamientos más eficientes y personalizados.⁵ Dentro de la gran variedad de nanomateriales utilizados en el área de la biomedicina, las nanoestructuras metal-orgánicas (nMOFs) se encuentran actualmente entre los materiales más versátiles. Constituidos por estructuras porosas biodegradables construidas utilizando ligandos orgánicos y cationes metálicos, los nMOFs proporcionan una serie de ventajas gracias a su composición fácilmente modificable y su amplia gama de tamaños y formas de poros, permitiendo optimizar la carga de fármaco y resultando potencialmente útiles como nanotransportadores, entre sus otras múltiples aplicaciones.⁶

La aplicación de los nanomateriales en biomedicina ha generado una serie de nuevos desafíos que deben superarse, tales como: la administración de fármacos dirigida, eludir los factores biológicos que actúan como barrera, enviar fármacos a objetivos intracelulares, y obtener imágenes de los sitios donde se ha enviado el fármaco.⁵ La capacidad de estas estructuras para ser reconocidas por dianas biológicas específicas es un factor muy importante a la hora de diseñar un nMOF, ya que la célula a la que se dirige el fármaco debe identificar a este como un objetivo biológico para iniciar el proceso de internalización. Dado que los nanomateriales no son biorreconocibles por sí solos, para ello se han investigado diferentes maneras de recubrir su superficie con ligandos específicos que permitan solucionar este problema.

(4) Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial Text with EEA relevance OJ L 275, 20.10.2011, p. 38–40.

(5) Aykaç, A.; Noiray M.; Malanga, M.; Agostoni, V.; Casas-Solvas, J. M.; Fenyvesi, É.; Gref, R.; Vargas-Berenguel, A. *Biochim. Biophys. Acta – Gen. Subj.* **2017**, *1861*, 1606–1616.

(6) Cutrone, G.; Li, X.; Casas-Solvas, J. M.; Menendez-Miranda, M.; Qiu, J.; Benkovics, G.; Constantin, D.; Malanga, M.; Moreira-Alvarez, B.; Costa-Fernandez, J. M.; García-Fuentes, L.; Gref, R.; Vargas-Berenguel, A. *Nanomaterials.* **2019**, *9*, 1103.

Anteriormente, este equipo de investigación ha trabajado con otros nMOF como el MIL-100(Fe) (MIL son las siglas de Materials of Institut Lavoisier), un material con alta porosidad y lenta biodegradabilidad constituido por nanocristales compuestos de trímeros octaédricos de hierro(III) autoensamblados con ligandos trimesato, consiguiendo recubrir exitosamente su superficie con derivados de azúcares.⁶ Sin embargo, el factor tamaño no fue suficiente para lograr introducir satisfactoriamente este nanotransportador en macrófagos, con un diámetro ligeramente superior a los 200 nm. Es en este punto donde se decide estudiar otros nMOFs con tamaños más pequeños.

La hipótesis de la que se parte en esta investigación es que se necesita sintetizar un nanomaterial que, aparte de cumplir los requisitos fundamentales planteados para lograr el objetivo de suministrar un fármaco exitosamente,⁵ tenga un tamaño de partícula lo suficientemente pequeño para que, tras recubrir su superficie con ligandos con receptores específicos necesarios para el reconocimiento biológico, el macrófago lo internalice. La experiencia de este equipo de investigación sugiere que se debería conseguir un diámetro inferior a los 100 nm para lograr dicho objetivo.

Seleccionar un nMOF con el que trabajar es una elección difícil, puesto que hay que tener en cuenta diversos factores como la facilidad de síntesis, la estructura cristalina que presenta, el tamaño tanto de poro como de partícula, etc. No obstante, la débil estabilidad térmica, química y mecánica de la mayoría de los nMOF es probablemente la propiedad más importante que limita su uso en aplicaciones industriales a gran escala.⁷

Esta idea inicial conduce a poner el punto de mira sobre el UiO-66 (UiO son las iniciales de Universitet i Oslo), $(Zr_6O_4(OH)_4(bdc)_6$ donde $bdc^{2-} = 1,4$ -bencenodicarboxilato), un nanomaterial compuesto por clústers de circonio unidos entre sí por cadenas de ácido tereftálico (Figura 2), que presenta una estabilidad sin precedentes. La estabilidad del nanomaterial viene controlada principalmente por la estructura del marco metal-orgánico y por la fuerza de unión entre este y el ligando orgánico. La ventaja del UiO-66 es que el átomo de circonio está coordinado 12 veces, la coordinación más alta descrita para un nanomaterial y, además, los elementos metálicos del grupo 4, como el circonio, presentan una fuerte interacción con los átomos de oxígeno, por lo que resultan opciones muy válidas para combinar con ligandos orgánicos oxigenados como es el caso del ácido tereftálico ($C_6H_4(COOH)_2$).⁷

Decker y col.⁸ estudiaron la síntesis solvotermal libre de ácido de UiO-66. Este estudio demostró que el tamaño de partícula, la presencia de defectos y la fluorescencia inherente de UiO-66 se pueden ajustar con cierta precisión modificando la relación molar ligando (L) – metal (M), el contenido de agua y el tiempo de reacción de la síntesis. De esta forma, consiguen desarrollar un método reproducible de modulación del tamaño del UiO-66 en el que pueden variar los defectos entre un 0 y 12 % y el tamaño de partícula entre 20 y 120 nm, manteniendo una alta cristalinidad en todas las muestras sintetizadas.

Así, los autores sintetizan varias muestras de UiO-66 con una relación L-M de 1:1, 1.5:1 y 2:1, disolviendo $ZrCl_4$ y ácido tereftálico (H_2bdc) en *N,N*-dimetilformamida (DMF) junto con una cantidad de H_2O desionizada en relación con la cantidad de $ZrCl_4$

(7) Cavka, J. H.; Jakobsen, S.; Olsbye, U.; Guillou, N.; Lamberti, C.; Bordiga, S.; Lillerud, K. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13850–13851.

(8) Decker, G. E.; Stillman, Z.; Attia, L.; Fromen, C. A.; Bloch, E. D. *Chem. Mater.* **2019**, *31*, 4831–4839.

añadida en un vial de 20 mL y calentado a 110 °C durante 24 horas (Figura 2). Tras calentar, separan el producto cristalizado mediante una centrifugación y lavado con DMF tres veces, seguido de otras tres centrifugaciones y lavados con metanol. Las muestras se activaron con una corriente de N₂ y calentamiento a 100 °C durante una noche.

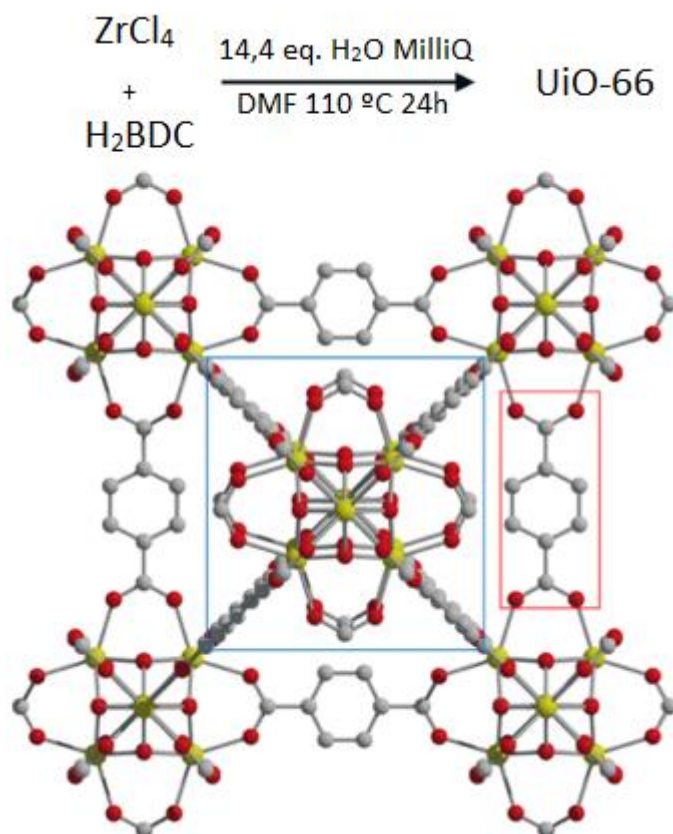


Figura 2. Representación de la reacción de síntesis del UiO-66 empleada en este trabajo, en la que se utiliza una relación L-M 2:1 y 14.4 eq. de agua MilliQ. En la estructura cristalina, el recuadro azul indica el clúster entre los seis átomos de circonio, mientras que el recuadro rojo indica el ligando de ácido tereftálico. La ausencia del primero se conoce como “defecto de clúster” y la del segundo “defecto de ligando”. (modificada a partir de la ref. Decker y col.⁸)

Dotar a un nanomaterial con capacidades de biorreconocimiento y focalización para alcanzar sus objetivos biológicos a través del reconocimiento por receptores específicos, es de suma importancia para poder utilizar los nanoMOF como nanoportadores en contextos terapéuticos. Este paso se conoce como funcionalización, y para ello, es necesario modificar las propiedades fisicoquímicas de la superficie del nMOF.⁹ Una práctica común en la funcionalización de nanomateriales es utilizar un recubrimiento covalente, sin embargo, es un procedimiento complejo que implica varias etapas de reacción que requieren mucho tiempo y generan productos

(9) Cutrone, G.; Qiu, J.; Menendez-Miranda, M.; Casas-Solvas, J. M.; Aykaç, A.; Li, X.; Foulkes, D.; Moreira-Alvarez, B.; Encinar, J. R.; Ladavière, C.; Desmaële, D.; Vargas-Berenguel, A.; Gref, R. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *223*, 115085.

secundarios difíciles de eliminar por completo. Además, tanto los subproductos como el disolvente pueden afectar al fármaco que se introduce en los poros del nMOF con posibles efectos tóxicos. Por tanto, se necesita una estrategia no covalente, que no penetre dentro de la estructura porosa, no interfiera con los fármacos, que confiera una estabilidad coloidal a la nanopartícula y que pueda realizarse en medio acuoso en un solo paso sin aditivos tóxicos.^{5,10}

Entre muchos de los compuestos biocompatibles utilizados para recubrir las superficies de las nanopartículas, las ciclodextrinas (CD) se consideran de los más versátiles, y protegen eficazmente los nanoMOF contra la agregación en medios acuosos.¹¹ Son oligosacáridos constituidos por 6, 7 u 8 unidades de glucosa unidas a través de enlaces α -1,4, denominadas α -, β - y γ -CD, respectivamente. Debido a su estructura única con un exterior hidrófilo y un interior hidrófobo, son inherentemente capaces de formar complejos de inclusión en una solución acuosa con una gran variedad de moléculas hidrófobas o cuasihidrófobas a través de la interacción anfitrión-huésped y son una buena plataforma sobre la que enlazar grupos funcionales gracias a los múltiples grupos hidroxilo (OH) libres (Figura 3).^{6,11}

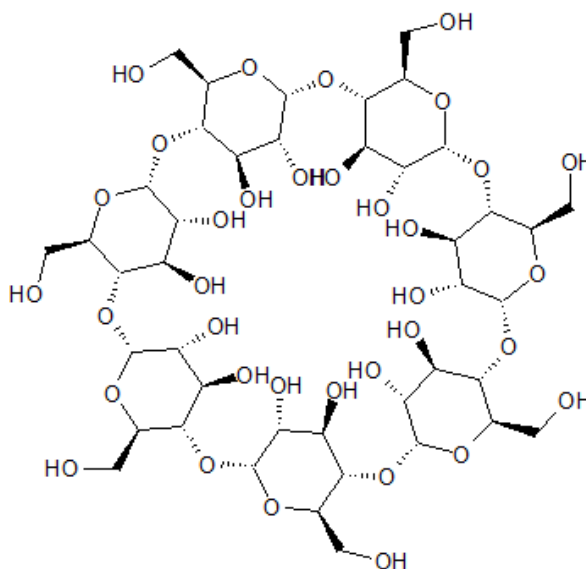


Figura 3. Estructura de β -ciclodextrina.

La experiencia de este equipo en anteriores investigaciones, ha demostrado la capacidad de la β -ciclodextrina para mejorar las propiedades (estabilidad, solubilidad, biodisponibilidad) en nanotransportadores basados en MIL-100(Fe) para la administración de fármacos.^{5,6,9,11} En concreto, se seleccionaron derivados de β -ciclodextrina fosforilados por dos motivos: i) la β -CD es más voluminosa (15.4×7.9 Å) que las ventanas del MIL-100(Fe) (~ 5 y ~ 9 Å),⁵ por lo que no penetrarán dentro de los poros del nanomaterial (Figura 4); y ii) los grupos fosfato interaccionan fuertemente con los núcleos metálicos del nMOF, por lo que se asegura la estabilidad del recubrimiento en medios biológicos.¹⁰

(10) Agostoni, V.; Horcajada, P.; Noiray, M.; Malanga, M.; Aykaç, A.; Jicsinszky, L.; Vargas-Berenguel, A.; Semiramo, N.; Daoud-Mahammed, S.; Nicolas, V.; Martineau, C.; Taulelle, F.; Vigneron, J.; Etcheberry, A.; Serre, C.; Gref, R. *Sci. Rep.*, **2015**, *5*, 1–7.

(11) Qiu, J.; Li, X.; Steeneste, K.; Barroca-Aubry, N.; Aymes-Chodur, C.; Roger, P.; Casas-Solvas, J. M.; Vargas-Berenguel, A.; Rihouey, C.; Picton, L.; Gref, R. *Int. J. Pharm.*, **2020**, *581*, 11921.

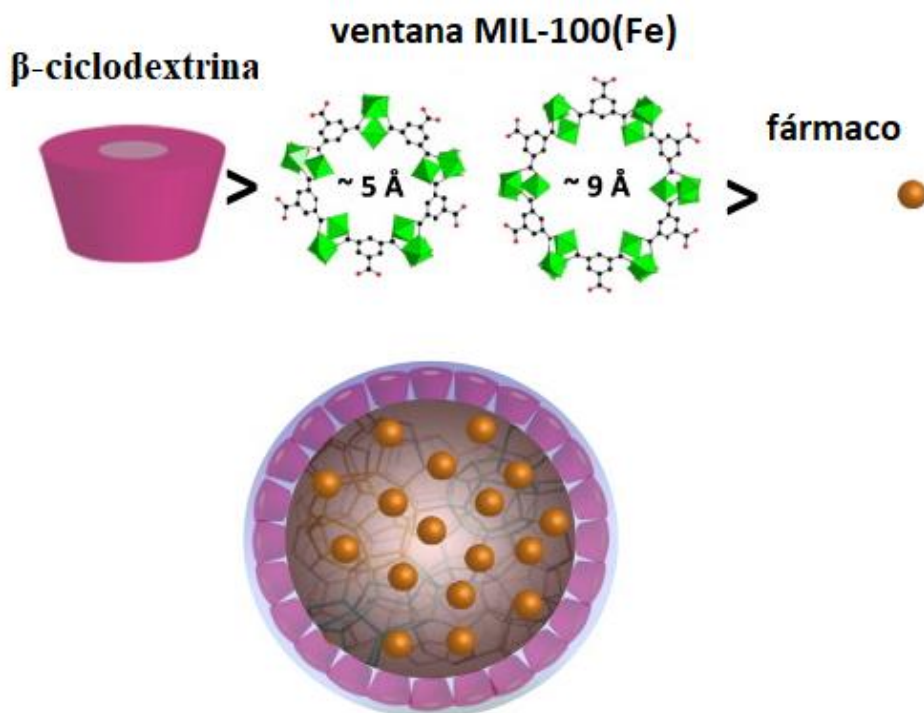


Figura 4. Representación esquemática de una partícula de nMOF que captura un fármaco y se recubre con β-ciclodextrina. El tamaño de las moléculas es mayor que el diámetro de las ventanas del MIL-100(Fe), por lo que no penetrará dentro de su estructura, mientras que el fármaco se adsorberá en el interior de los poros. (modificada a partir de la ref. Aykaç y col.⁵)

Pese a las características prometedoras que ofrecen las ciclodextrinas, su uso como agente funcionalizador en nMOFs no ha sido ampliamente explorado, y hasta donde sabemos, no hay precedentes de funcionalizaciones de UiO-66 con ciclodextrinas ni otros derivados de azúcares. Por ello, con este trabajo de fin de grado se pretende arrojar luz sobre este área y servir como base para futuras investigaciones.

4. OBJETIVOS

Sintetizar UiO-66 con un tamaño inferior a 100 nm y funcionalizar su superficie con derivados de ciclodextrina. Para la síntesis de estos nMOFs se plantea utilizar las condiciones descritas por Decker y col.⁸ con las que los autores afirman obtener el UiO-66 con un diámetro de 50 nm. Con respecto a la funcionalización, se elige utilizar en primer lugar un derivado comercial de ciclodextrina (CD-P) que presenta un grado de fosforilación de 2-6. La elección de este derivado se fundamenta en el hecho de que las dimensiones de este macrociclo ($15.4 \times 7.9 \text{ \AA}$) son superiores a las de las ventanas del UiO-66 (6 \AA),¹² evitando su entrada en el interior de los poros del nanomaterial. Así mismo, se espera que los grupos fosfato del CD-P interactúen fuertemente con los átomos de circonio presentes en la superficie de los nMOFs, que presentan un grado de coordinación inferior al que muestran en el seno del material. En el caso de que este derivado CD-P no permitiera la funcionalización del UiO-66, se plantean explorar la

(12) Luan, Y.; Qi, Y.; Gao, H.; Andriamitantsoa, R. S.; Zheng, N.; Wang, G. *J. Mater. Chem. A*, **2015**, *3*, 17320–17331.

posibilidad de utilizar como alternativas algunos derivados de β -CD que presenten grupos sulfonilo o carboxilato

5. MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

5.1. INSTRUMENTACIÓN, MATERIALES Y REACTIVOS

Todas las pesadas realizaron en una balanza analítica Mettler Toledo AB204. Las reacciones de síntesis de nMOFs se llevaron a cabo en una estufa Memmert VO200. Las muestras que lo requirieron se secaron en una estufa de vacío Heraeus Vacutherm Kelvitron-t alimentada por una bomba de vacío Edwards RVS. Para las reacciones de funcionalización superficial se utilizó un agitador excéntrico KS S01 digital IKA-WERKE. Las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga Ortoalresa Digicen 21R o en una centrífuga Eppendorf centrifuge 5804 R. En las dos primeras reacciones de síntesis se utilizó un agitador magnético IKA RCT basic para calentar. En los casos indicados se utilizó un sonicador Selecta Ultrasons.

Los volúmenes que requerían precisión fueron medidos con micropipetas Thermo Scientific Finnpiptette F1 (0.5 – 5 mL), Thermo Scientific Finnpiptette F1 (20 – 200 μ L) y Labsystems Finnpiptette Digital ACL (200 – 1000 μ L). Para las reacciones de síntesis se utilizaron viales transparentes de borosilicato resistentes a la temperatura Supelco de 22 mL con tapón sólido de rosca y revestimiento de PTFE. Para la purificación de DMF se utilizaron filtros de jeringa de teflón de 0.2 μ m.

Los siguientes compuestos se obtuvieron de las fuentes comerciales indicadas y se utilizaron tal y como se recibieron: ácido tereftálico (H_2bdc , anhidro para síntesis, Sigma-Aldrich, 8.00762.1000), cloruro de circonio(IV) ($ZrCl_4$, anhidro para síntesis, Sigma-Aldrich, 8.08913.0250), *N,N*-dimetilformamida extra seco (DMF, 99.8%, AcroSeal[®], Acros Organics, 348430010), y *N,N*-dimetilformamida (DMF, 99.8%, Panreac-Applichem, 131785.1611). El derivado parcialmente fosforilado de β -ciclodextrina (CD-P, Cyclolab L&D Ltd., Budapest, Hungría, DS 2–6), el derivado parcialmente sulfobutilado de β -ciclodextrina (SBECD, DS ~10, CycloLab LTD, CY-2041.3) y el derivado de γ -ciclodextrina sugammadex (SGM, 90% según HPLC, principal impureza: SGM mono hidroxilado) fueron amablemente cedidos por Cyclolab LTD. El disolvente metanol (MeOH, 99.5%, Panreac, 141091.0716) fue destilado antes de su uso.¹³ El compuesto (ManTEG)₇CD-P fue sintetizado por el grupo de investigación en anteriores estudios.⁶ El agua MilliQ (18.2 M Ω ·cm) se obtuvo mediante un equipo Millipore MilliQ Plus alimentado por un Millipore Milli-RX20.

Las imágenes de microscopía de transmisión electrónica (TEM, Transmission Electron Microscopy) se obtuvieron en un microscopio JEOL JEM 2100, equipado con un detector de microanálisis por dispersión de energía de rayos X (EDS, Energy dispersive X-ray spectroscopy) Oxford INCA X-Max 80. Los difractogramas de rayos X de polvo (PXRD, Powder X-Ray Diffraction) se midieron en un difractor Bruker-Nonius D4 Endeavor. Se utilizó el programa Mercury CCDC (The Cambridge Crystallographic Data Centre) para la simulación del difractograma de polvo teórico del nMOF UiO-66 a partir de la estructura de monocristal publicada por Valenzano *et*

(13) Perrin, D. D.; Armarego, W. F. L. *Purification of Laboratory Chemicals*, 3rd ed. Pergamon: Oxford, UK, 1989.

al.¹⁴ (estructura 733458 en CCDC). Las isotermas de adsorción de gases se obtuvieron mediante un analizador automático ASAP 2020 Micromeritics. Los espectros de resonancia magnética nuclear en estado sólido se midieron en un espectrómetro Bruker Avance III HD 500 equipado con una sonda de alta resolución con rotación en ángulo mágico (HRMAS, High-Resolution Magic Angle Spinning). Las imágenes de microscopía electrónica de barrido de alta resolución de emisión de campo (FESEM, Field Emission Scanning Electron Microscope) se obtuvieron on un microscopio Zeiss Sigma 300 VP

5.2. SÍNTESIS

5.2.1. Síntesis de UiO-66:

Procedimiento general para la síntesis de UiO-66: En un vial de borosilicato de 22 mL se disuelve $ZrCl_4$ y ácido tereftálico en DMF extra seco previamente filtrado con un filtro de jeringa de teflón de 0.2 μm . A continuación, se añade agua MilliQ y se agita vigorosamente hasta comprobar que todo el material sólido se ha disuelto, sonicando si es necesario. El vial se introduce en una estufa a presión atmosférica a 110 °C durante 24 horas aproximadamente.⁸ Pasado dicho tiempo, se retira el vial de la estufa, se enfría a temperatura ambiente, y su contenido se transfiere a un tubo Falcon que se centrifuga a 4500 rpm y 4 °C durante 10 min. Seguidamente se desecha el sobrenadante, y el residuo se resuspende en DMF (20 mL) y se centrifuga de nuevo a 4500 rpm y 4 °C durante 10 min. Este lavado con DMF se repite 2 veces más, y a continuación se lleva a cabo el mismo tratamiento 3 veces más con MeOH (20 mL) cada vez. Una vez finalizado el tercer lavado con MeOH, el residuo resultante se activa siguiendo el procedimiento especificado en cada método a continuación.

- **UiO-66 método A:**

A partir de $ZrCl_4$ (90 mg, 0.385 mmol) y ácido tereftálico (125 mg, 0.750 mmol) en DMF extra seco (15 mL) y agua MilliQ (100 μL) se obtiene UiO-66 (99 mg, 0.015 mmol) como un sólido blanco.

El sólido se activó en un matraz redondo de 100 mL calentando en placa a 50 °C con corriente de nitrógeno durante 24 horas.

- **UiO-66 método B:**

A partir de $ZrCl_4$ (540 mg, 2.317 mmol) y ácido tereftálico (752 mg, 4.526 mmol) en DMF extra seco (90 mL) y agua MilliQ (600 μL) se obtiene UiO-66 (581 mg, 0.086 mmol) como un sólido blanco.

El sólido se activa calentando a 100 °C a vacío.

5.2.2 Funcionalización de UiO-66:

Procedimiento general para la funcionalización de UiO-66: En un vial de vidrio se suspende UiO-66 en agua MilliQ (2 mg/mL). En otro vial de vidrio se prepara otra disolución con el agente de funcionalización en agua MilliQ (0.6 mg/mL) con el mismo volumen de agua MilliQ utilizado para la disolución de UiO-66. A continuación, se mezclan las dos disoluciones en un solo vial de vidrio, o en tubo

(14) Valenzano, L.; Civaleri, B.; Chavan, S.; Bordiga, S.; Nilsen, M. H.; Jakobsen, S.; Lillerud, K. P.; Lamberti, C. *Chem. Mater.* **2011**, *23*, 1700-1718.

Falcon, se cubre con papel de aluminio y se agita en un agitador excéntrico a 150 rpm durante 24 horas aproximadamente. Pasado dicho tiempo, la suspensión se centrifuga a 4500 rpm, y 4 °C durante 10 min, se descarta el sobrenadante, y el residuo se suspende en agua MilliQ (40 mL) antes de volver a centrifugar a 4500 rpm, y 4 °C durante 10 min. Esta acción de lavado con agua MilliQ se repite 2 veces más. El residuo se seca a vacío durante 24 horas aproximadamente.

- **Funcionalización de UiO-66 con sugammadex (UiO-66@SGM):**

A partir de UiO-66 (método B) (190 mg, 0.028 mmol) en agua MilliQ (95 mL) y SGM (57 mg, 0.026 mmol) en agua MilliQ (95 mL) se obtiene UiO-66@SGM (174 mg) como un sólido blanco.

Las centrifugaciones se han realizado a 5000 rpm, 4 °C durante 10 min. y se han utilizado 40 mL de agua MilliQ en cada lavado.

- **Funcionalización de UiO-66 con SBECD (UiO-66@SBECD):**

A partir de UiO-66 (método B) (190 mg, 0.028 mmol) en agua MilliQ (95 mL) y SBECD (57 mg, 0.021 mmol) en agua MilliQ (95 mL) se obtiene UiO-66@SBECD (189 mg) como un sólido blanco.

Las centrifugaciones se han realizado a 5000 rpm, 4 °C durante 10 min. y se han utilizado 40 mL de agua MilliQ en cada lavado.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los objetivos planeados en el presente Trabajo Fin de Grado obligan, en primer lugar, a establecer un protocolo eficaz y reproducible para la síntesis del nMOF UiO-66 en nuestro laboratorio. Basándonos en el estudio publicado por Decker y col.,⁸ se decidió seleccionar los parámetros experimentales para sintetizar dicho nMOF con los que los autores obtuvieron un tamaño promedio de partícula de unos 50 nm, lo que *a priori* parecía suficiente como para poder albergar un fármaco sin sobrepasar el diámetro planteado en este TFG y dejando un margen generoso para la posterior funcionalización de la superficie.

Con esta idea clara, se puso en marcha la primera reacción de síntesis de UiO-66 siguiendo el procedimiento experimental descrito en el método A (Figura 5). Para ello, se disolvió $ZrCl_4$ y ácido tereftálico en DMF seco en una proporción 1:2 y se añadió H_2O con el objetivo de modular el tamaño de las nanopartículas, ya que el agua es necesaria para formación del grupo $Zr_6O_4(OH)_4^{12+}$ (aunque un alto contenido de agua en el disolvente puede inhibir la cristalización).⁸ Tras agitar constantemente durante unos pocos minutos, ambos compuestos se disolvieron fácilmente obteniéndose una disolución transparente e incolora que se introdujo en la estufa a 110 °C. La muestra se retiró de la estufa tras 22 horas de calentamiento y se obtuvo un sólido fino de color blanco (Figura 6).

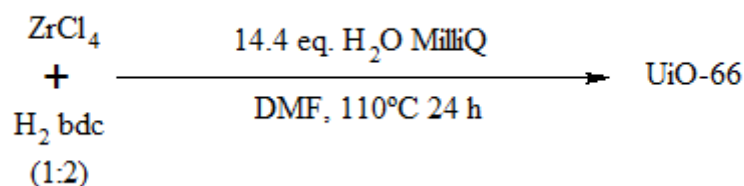


Figura 5. Reacción de síntesis de UiO-66 con una relación L-M 2:1 y 14.4 eq de H₂O MilliQ.

Para purificar el UiO-66 los autores describen 3 pasos de lavado con DMF (20 mL) y otros 3 con MeOH (20 mL) para eliminar el DMF retenido en los poros del nMOF, agitando vigorosamente la muestra en cada lavado y realizando centrifugaciones entre lavado y lavado a 4500 rpm, 4°C durante 10 minutos para decantar el sobrenadante y repetir el proceso.

Durante el primer intento de síntesis de este nMOF se produjo un incidente con la centrífuga, que obligó a suspender el proceso de lavado del sólido tras dos centrifugaciones con DMF. La muestra se conservó en el congelador a -20°C durante un día hasta disponer de otra centrífuga, tras lo cual se completó el proceso de lavado del sólido tal y como estaba previsto (**muestra 1**).

Dado que el inesperado suceso podría arrojar dudas razonables sobre la calidad estructural del material obtenido, se repitió la síntesis de UiO-66 siguiendo el mismo procedimiento (ZrCl₄:H₂bdc 1:2), solo que esta vez se pudo llevar a cabo sin ningún contratiempo (**muestra 2**) (Figura 6).

Ambas muestras se activaron de acuerdo con el procedimiento descrito en el método A, aunque se modificó la temperatura utilizada por Decker y col.⁸ (100 °C) por un calentamiento a 50 °C con corriente de N₂ durante una noche con el fin de favorecer una activación más suave que no dañase el nanomaterial.

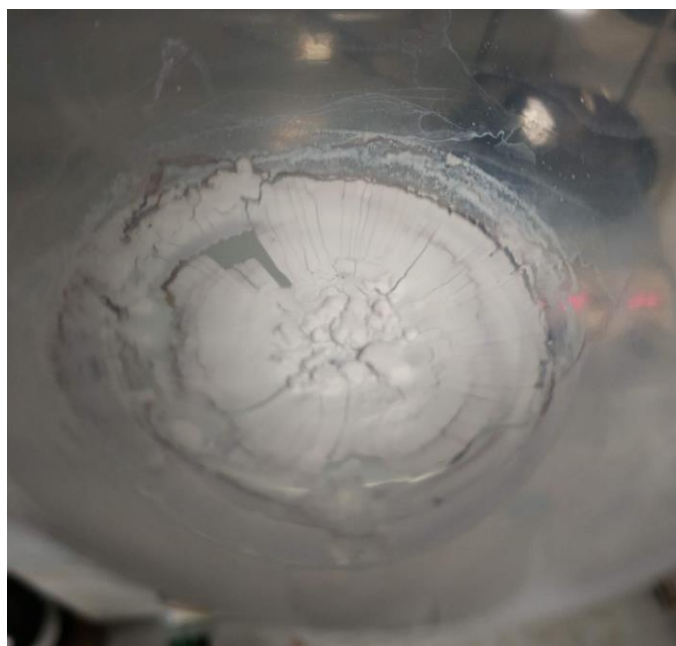


Figura 6. Muestra 2 de UiO-66. Presenta un color blanco y aspecto fino.

Tras obtener ambas muestras de UiO-66 se realizó en primer lugar un análisis mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM) para comparar el tamaño medio de partícula en cada caso (Figura 7). El TEM es una técnica que permite obtener imágenes de la ultraestructura de las muestras en base a los electrones transmitidos a través de las mismas utilizando un fino haz de electrones acelerados que, al impactar con la muestra, genera una serie de señales relacionadas con su estructura. También se realizó un microanálisis de dispersión de energía de rayos X (EDS), que permite identificar los elementos químicos constituyentes de la región donde esté incidiendo la sonda STEM, para determinar su composición. Las muestras fueron suspendidas en agua MilliQ y guardadas a 4 °C antes de su análisis.

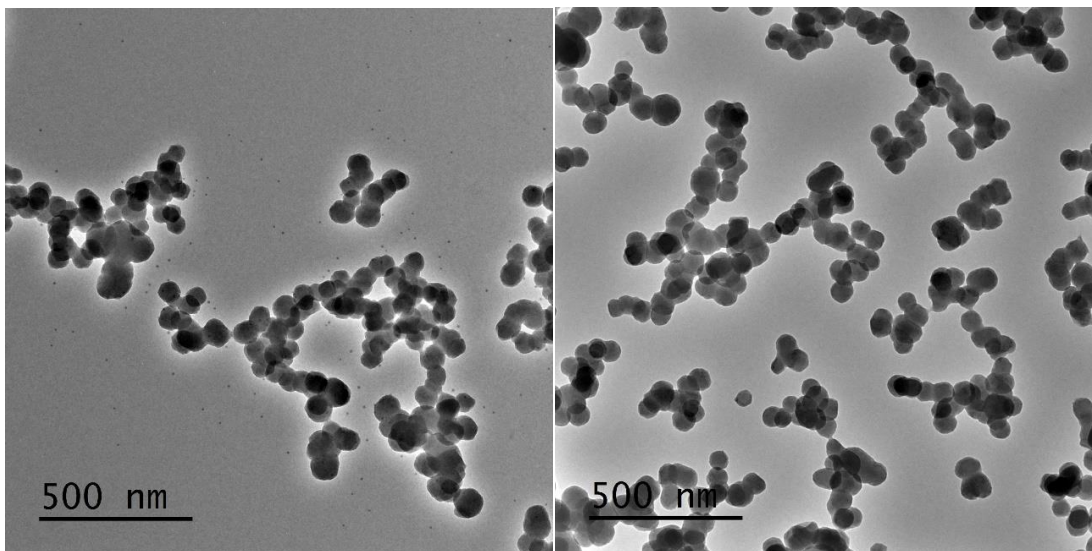


Figura 7. Imágenes seleccionadas de TEM de UiO-66. Izquierda: **muestra 1**, tamaño medio de partícula: 64.4 ± 6.1 nm; Izquierda: **muestra 2**, tamaño medio de partícula: 68.7 ± 6.7 nm.

Como se observa en la Figura 7, el resultado con TEM en ambos casos indicó unos diámetros de partícula de 64.4 y 68.7 nm para las **muestras 1** y **2**, respectivamente. Estos resultados se encuentran dentro de los objetivos previstos en el presente TFG, y sugieren que la suspensión del proceso de lavado en el caso de la **muestra 1** no tuvo un efecto significativo sobre el tamaño de partícula, cuyo factor más importante, por tanto, parece ser la concentración de los reactivos de partida en la mezcla de reacción. No obstante, si se comparan estos datos con los resultados descritos por Decker y col.⁸ (53 nm para el procedimiento seguido en nuestra síntesis) se observa una pequeña diferencia de tamaño que podría deberse al tiempo de reacción, ya que los autores mencionaban que algunas muestras continuaban creciendo tras el periodo de 24 h.

Cabe mencionar que en el caso de la **muestra 1**, sin embargo, se detectaron unas manchas blancas en el TEM al ampliar las imágenes (Figura 8), las cuales no se pudieron identificar.

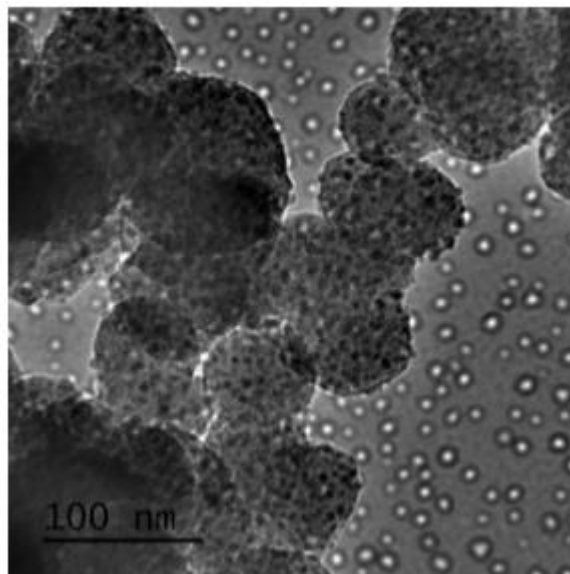


Figura 8. Imagen de TEM ampliada de la **muestra 1** de UiO-66. Pueden observarse unas manchas blancas de origen desconocido.¹⁵

A diferencia de la **muestra 1**, la **muestra 2** de UiO-66 no mostró ningún elemento visual extraño en sus imágenes de TEM (Figura 9).

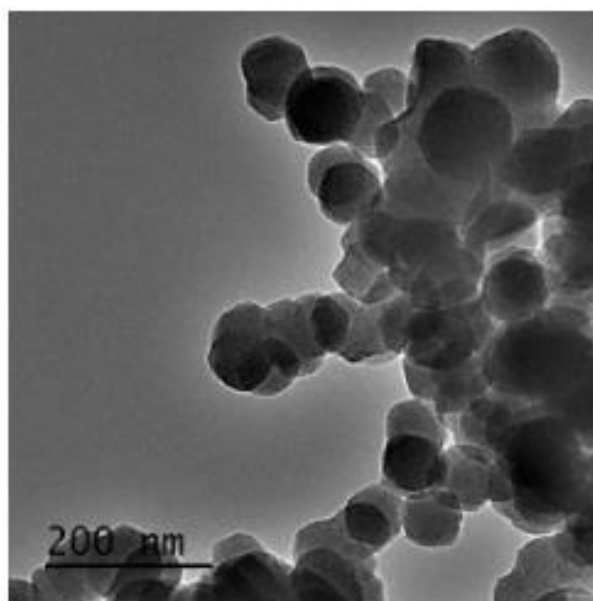


Figura 9. Imagen TEM ampliada de la **muestra 2** de UiO-66.

¹⁵ Las manchas blancas pueden tener su origen en un error en la preparación de la muestra para la obtención de la imagen TEM. Se decidió medir STEM y EDS con la misma muestra. Sin embargo, ambas pruebas no se llegaron a realizar debido a problemas con obras cercanas al laboratorio que provocaban vibraciones inasumibles por los equipos, haciendo imposible el enfoque de las muestras y la acumulación de un importante número de muestras en espera de medida.

Con objeto de establecer los elementos que contiene la **muestra 2** de UiO-66, así como su distribución espacial a lo largo de la estructura, se llevó a cabo un microanálisis EDS (Figura 10) y un mapeo preliminar con un campo de 50 μm en modo TEM (Figura 11).¹⁶

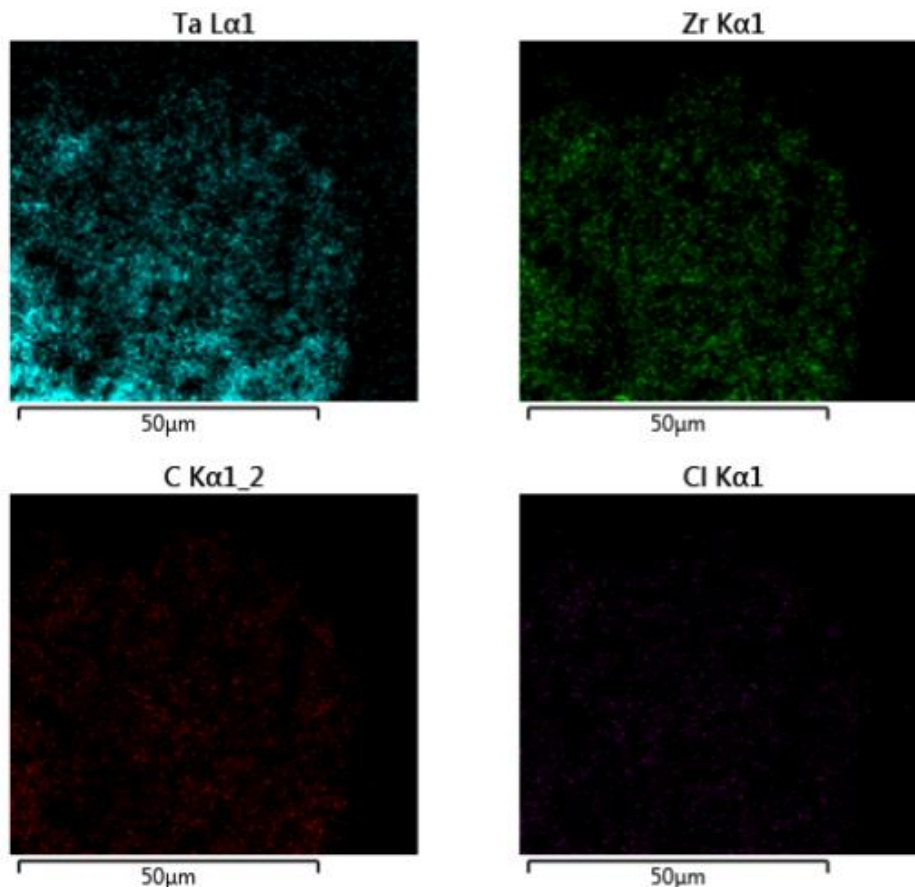


Figura 10. Elementos detectados en el microanálisis EDS de la **muestra 2** de UiO-66.

El análisis de EDS reveló la presencia de C, Cl, Zr y Ta (Figura 10), aunque se desconoce el porcentaje de cada elemento debido a que fue un análisis rápido. De estos elementos, tan sólo el C y el Zr deberían estar presentes. En el caso del Cl, podría deberse a una mala purificación del ZrCl_4 utilizado para la síntesis del UiO-66. Por su parte, carece de sentido encontrar Ta en la muestra, por lo que se hipotetizó que en realidad esta señal podría proceder de una identificación errónea de la señal producida por la rejilla de cobre utilizada para montar la muestra.

Se ha demostrado que ocasionalmente, en los sistemas automáticos de identificación de picos en microanálisis de dispersión de energía de rayos X (EDS), se producen errores de identificación incluso en espectros con una buena resolución e intensidad en sus señales, apareciendo picos falsos de elementos que no se encuentran en la muestra, entre ellos el tantalio.

¹⁶ Las imágenes están ligeramente desenfocadas debido a las vibraciones causadas por las obras.

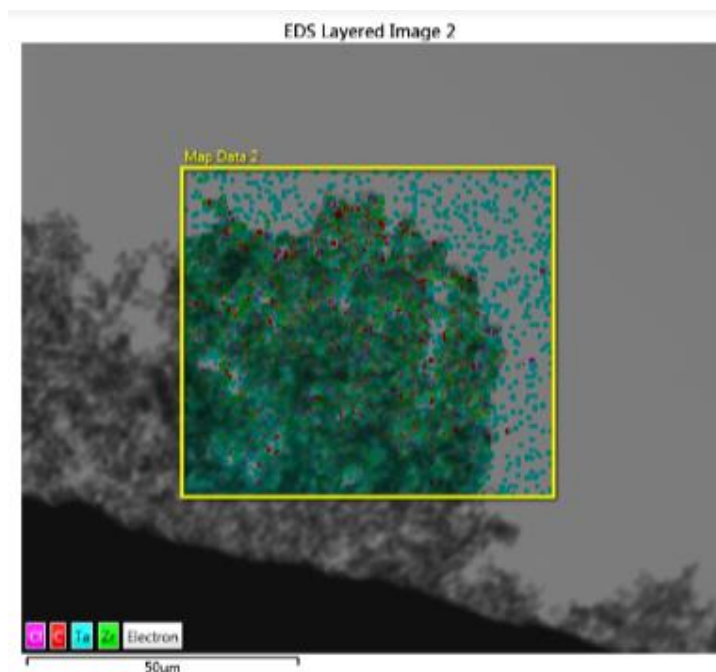


Figura 11. Mapping preliminar EDS de la **muestra 2** de UiO-66 en modo TEM.

El proceso de identificación automática de picos implica primero aplicar un algoritmo de búsqueda de picos al espectro. Este proceso es sensible al ruido en el continuo de rayos X que forma el fondo espectral, debido a que las agrupaciones aleatorias de recuentos de fondo pueden imitar un pico característico. Es una práctica común establecer un umbral estadístico definido por el usuario para determinar qué constituye un pico significativo por encima de esta variación aleatoria en el fondo. Si este umbral no se establece lo suficientemente bajo (es decir, sensible al ruido), entonces pueden aparecer picos falsos correspondientes a señales de elementos erróneos.^{17 18}

El análisis estructural de las **muestras 1 y 2** de UiO-66 se extendió también a sus estructuras cristalinas mediante un estudio de difracción de rayos X en polvo (PXRD) de ambas muestras (Figura 12), con el fin de caracterizar los compuestos obtenidos. Los análisis indicaron porcentajes de cristalinidad del 88.20 % y 88.30 % para las **muestras 1 y 2**, respectivamente. Como se puede observar, tanto los difractogramas como el porcentaje de cristalinidad de ambas muestras son prácticamente idénticos, lo que de nuevo sugiere que la estructura cristalina no se ve afectada por el proceso de lavado, que, como se ha indicado anteriormente, constituye la principal diferencia entre las **muestras 1 y 2** de UiO-66 preparadas en nuestro laboratorio. Además, ambos difractogramas son plenamente coherentes con el difractograma simulado con el programa Mercury (The Cambridge Crystallographic Data Centre) a partir de la estructura de monocristal publicada por Valenzano *et al.*¹⁴ (estructura 733458 en CCDC).

(17) Newbury, D. E. *Microsc. Microanal.*, **2005**, *11*, 545–561.

(18) Newbury, D. E. *Scanning*, **2009**, *31*, 91–101.

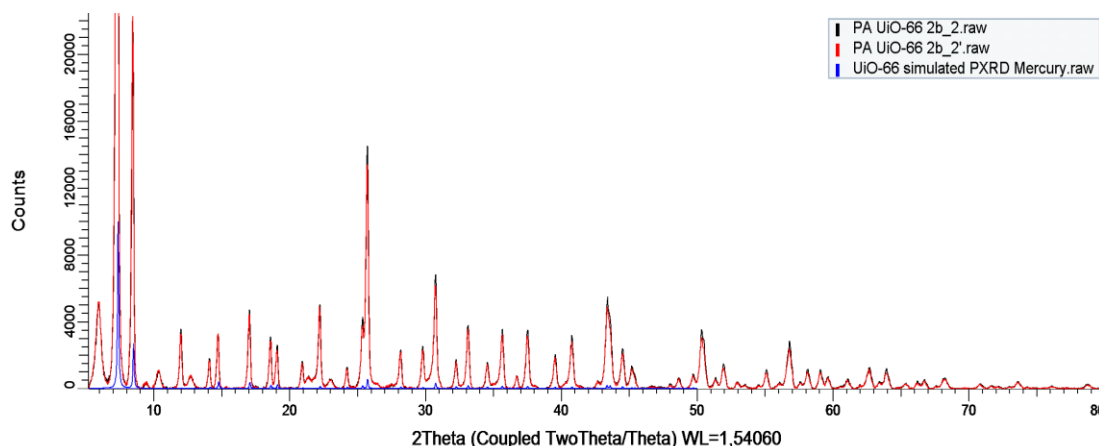


Figura 12. Difractogramas de rayos X en polvo (PXRd) de la **muestras 1** (línea negra, aquí identificada como 2b) y **muestra 2** (línea roja, aquí indicada como 2b') superpuestos, así como del difractograma simulado (línea azul) entre 5 y 50 θ con el programa Mercury a partir de la estructura de monocristal publicada por Valenzano *et al.*¹⁴ (estructura 733458 en CCDC).

Los difractogramas obtenidos para las **muestras 1** y **2** de UiO-66 también se compararon con los difractogramas publicados por Decker y col.,⁸ que se muestran en la Figura 13. Si se compara el difractograma correspondiente al material preparado por estos autores utilizando las mismas condiciones que las empleadas en la síntesis de las **muestras 1** y **2** preparadas en nuestro laboratorio, con los difractogramas indicados en la Figura 12, se observa que los picos coinciden, lo que sugiere que la estructura cristalina en ambos casos es muy similar.

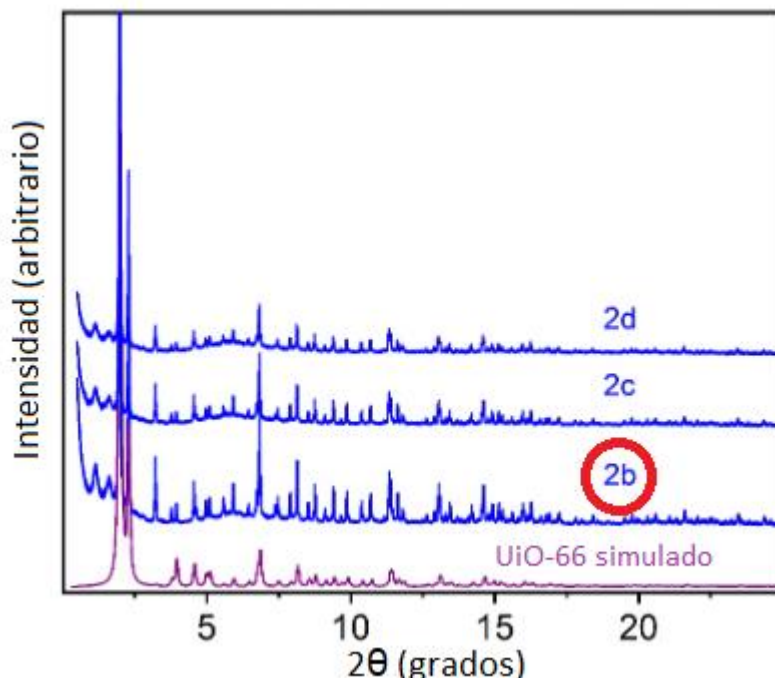


Figura 13. Difractogramas de rayos X en polvo (PXRd) de distintas muestras de UiO-66 publicados por Decker y col.⁸ El difractograma correspondiente al material preparado por estos autores utilizando las mismas condiciones que las empleadas en la síntesis de las **muestras 1** y **2** preparadas en nuestro laboratorio se ha indicado con un círculo. (modificada a partir de la ref.⁸)

La caracterización estructural de las **muestras 1 y 2** de UiO-66 se completó mediante un análisis de fisisorción de N₂. De acuerdo con los datos publicados por Decker y col.,⁸ el área superficial esperada para nuestras muestras era de 1109 m²/g (Tabla 1). En cambio, el análisis realizado arrojó áreas superficiales de Langmuir de 1.325 y 1.237 m²/g para las **muestras 1 y 2**, respectivamente. Como se observa, estos valores son un poco superiores con respecto al área esperada, lo que podría sugerir nuestras muestras contenían más defectos estructurales que las preparadas por Decker y col.⁸

Tabla 1. Áreas superficiales obtenidas por Decker y col. (Tabla S4)⁸. El recuadro rojo indica el área obtenida por los autores para una muestra de UiO-66 preparada bajo las mismas condiciones experimentales que las utilizadas para la síntesis de las **muestras 1 y 2** de UiO-66 en nuestro laboratorio.

L:M/ H ₂ O (equiv.)	7.2 ★	14.4 ■	28.7 ●	43.1 ▲	57.5 ▼	Row Median
1:1	1142 (1274)	1336 (1454)	1207 (1455)	1288 (1771)	1272 (1372)	1272 (1372)
1.5:1	1150 (1271)	1107 (1128)	1201 (1443)	860 (1243)	669 (1020)	1107 (1128)
2:1	1070 (1215)	1109 (1274)	972 (1184)	1218 (1516)	947 (1323)	1070 (1215)

Sin embargo, los valores de áreas superficiales obtenidos en nuestro caso no son incompatibles con los descritos en otras fuentes bibliográficas para el nMOF UiO-66, si bien es importante remarcar que dichos valores están íntimamente relacionados con los métodos de síntesis empleados. Por ejemplo, Garibay y col.¹⁹ describe una superficie de Langmuir de 1311 m²/g para sus muestras de UiO-66, valor mucho más próximo al obtenido para las nuestras en el laboratorio. Este hecho refuerza la correcta identificación de nuestras muestras como nMOF UiO-66.

Tras sintetizar exitosamente el nMOF UiO-66, se procedió a estudiar la posibilidad de llevar a cabo la funcionalización no covalente de su superficie. Como primer agente funcionalizador se eligió un derivado del ciclooligosacárido β-ciclodextrina (β-CD) modificado con grupos fosfato con un grado de funcionalización promedio (DS) de 2-6 unidades por molécula (CD-P). La elección de esta molécula se debió a que el tamaño que presenta la β-ciclodextrina (15.4 × 7.9 Å) es lo suficientemente grande para que no penetre en los poros de la estructura del UiO-66, ya que el diámetro de las ventanas del nanomaterial es de unos 6 Å.¹² La estrategia que se decidió plantear para la funcionalización se basó en la experiencia previa del grupo, y consistió en preparar dos disoluciones en agua MilliQ, una de UiO-66 (2 mg/mL) y otra de CD-P (0.6 mg/mL). A continuación, se mezclan ambas disoluciones, con ayuda de un sonicador (puede resultar costoso suspender completamente el nanomaterial), en un tubo Falcon, se cubre con papel de aluminio y se agita en un agitador excéntrico a 150 rpm durante 24 horas aproximadamente. Pasado dicho tiempo, se obtiene una disolución blanquecina, que se centrifuga a 4500 rpm, y 4 °C durante 10 min, se descarta el sobrenadante, y el residuo se suspende en agua MilliQ (20 mL) antes de volver a

(19) Garibay, S. J.; Cohen, S. M. *Chem. Commun.*, **2010**, 46, 7700–7702.

centrifugar a 4500 rpm, y 4 °C durante 10 min. Esta acción de lavado con agua MilliQ se repite 2 veces más. El residuo se seca a vacío durante 24 horas aproximadamente. Esta estrategia ha demostrado ser eficaz previamente en la funcionalización del nMOF MIL-100(Fe) y es similar a las descritas en diversas fuentes bibliográficas para el nMOF UiO-66.

El material obtenido tras el intento de funcionalización de UiO-66 con CD-P (UiO-66/CD-P, **muestra 1**). La notación hace referencia a la muestra que resulta del intento de funcionalización de UiO-66 (**muestra 1**) con CD-P) se analizó en primer lugar mediante TEM (Figura 14), comprobándose que el tratamiento seguido no había tenido ningún efecto significativo sobre el tamaño de partícula.

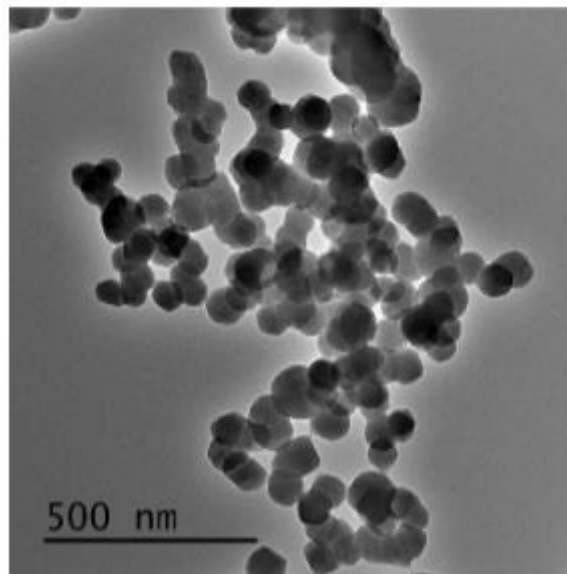


Figura 14. Imagen TEM de la **muestra 1** de UiO-66/CD-P.

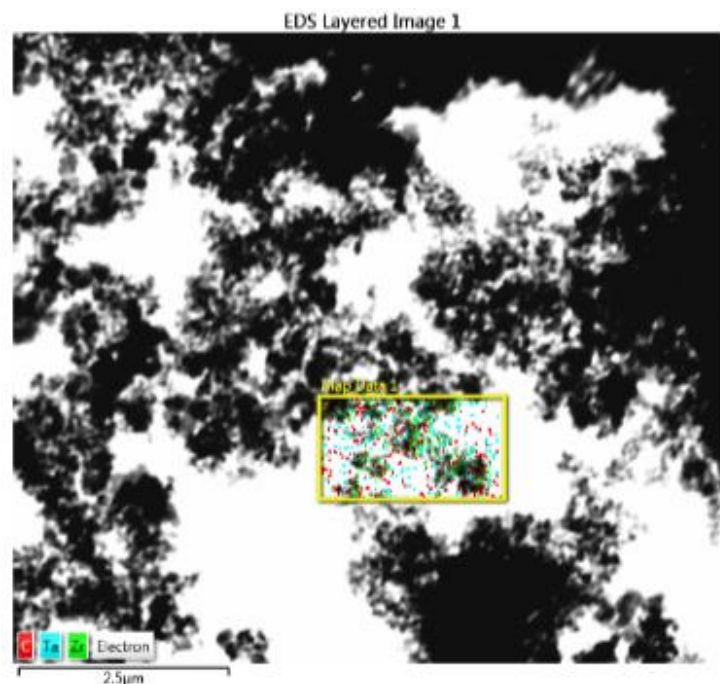


Figura 15. Mapeo preliminar con EDS de la **muestra 1** de UiO-66/CD-P.

Dado que en caso de haberse producido la funcionalización deseada se debería haber añadido un elemento nuevo (fósforo) a la composición de las nanopartículas, se llevó a cabo un microanálisis EDS con objeto de estimar si la funcionalización había tenido lugar (Figura 15).²⁰ En este caso se pudo medir el mapeo preliminar a una menor distancia (2.5 μm) que en el caso de la **muestra 2** de UiO-66 (Figura 11).

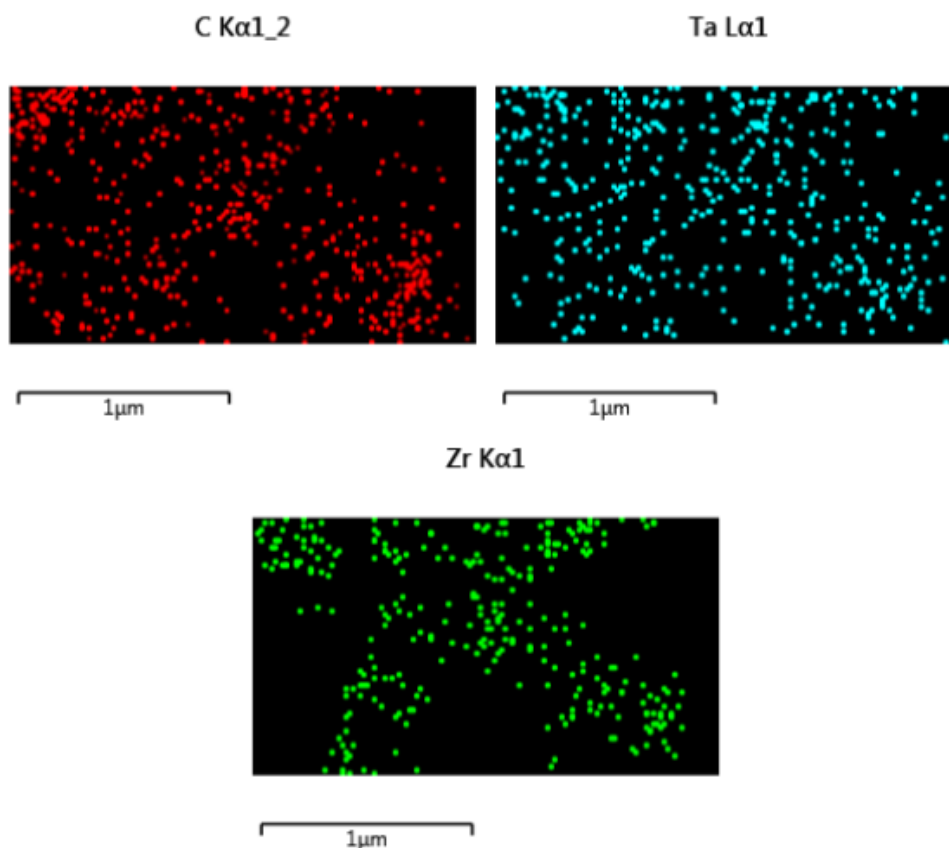


Figura 16. Elementos encontrados en el microanálisis EDS realizado sobre la **muestra 1** de UiO-66/CD-P.

Los elementos encontrados para la **muestra 1** de UiO-66/CD-P se pueden ver en la Figura 16. En modo TEM (200 k) aparecen C (68.74%), Zr (27.67%) y Ta (3.59%), mientras que en modo STEM (30 k) se obtiene C (50.3%), Zr (45.3%) y Ta (4.4%). Las diferencias de porcentaje entre el modo TEM y el modo STEM se pueden deber a las diferentes aperturas de campo en cada caso.

Nuevamente, el análisis reveló la presencia de Ta en un 4-4.5 %, aunque como se ha apuntado nuestra hipótesis es que se debe a un error de identificación de la señal de Cu procedente de la rejilla de muestra.^{17,18} Además, se encontró C y Zr como se esperaba. No obstante, el resultado más importante es que no se encontró fósforo, por lo que este resultado sugiere que no se produjo la funcionalización del UiO-66 de la **muestra 1** con el CD-P en las condiciones de síntesis y purificación utilizadas.

En vista del resultado obtenido en la primera funcionalización con CD-P se decide realizar una nueva reacción aumentando las cantidades de UiO-66 y de este derivado de ciclodextrina, manteniendo la misma relación entre ambas especies, con el fin de obtener mayor cantidad de UiO-66/CD-P para ampliar el rango de técnicas de análisis.

²⁰ De nuevo volvieron a producirse problemas de enfoque por la continuación de las obras.

Para ello se sigue el mismo procedimiento utilizado en la primera funcionalización con CD-P duplicando las cantidades de UiO-66, CD-P y el volumen de agua MilliQ. Se preparan dos disoluciones en agua MilliQ (10 mL), una suspensión coloidal de UiO-66 (2 mg/mL) y otra de CD-P (0.6 mg/mL). A continuación, se mezclan ambas disoluciones, con ayuda de un sonicador debido a la dificultad de completar la suspensión de la muestra de UiO-66, en un tubo Falcon, se cubre con papel de aluminio y se agita en un agitador excéntrico a 150 rpm durante 24 horas aproximadamente. Pasado dicho tiempo, se obtiene una suspensión blanquecina, que se centrifuga a 4500 rpm, y 4 °C durante 10 min, se descarta el sobrenadante, y el residuo se suspende en agua MilliQ (20 mL) antes de volver a centrifugar a 4500 rpm, y 4 °C durante 10 min. Esta acción de lavado con agua MilliQ se repite 2 veces más. El residuo se seca al vacío en presencia de P_2O_5 durante 24 horas aproximadamente.

Tras obtener la **muestra 2** de UiO-66/CD-P se realiza una medida de resonancia magnética nuclear (RMN) con sonda de alta resolución con rotación en ángulo mágico (HRMAS), una técnica que permite la identificación estructural de compuestos orgánicos y organo-metálicos de origen natural o sintético en suspensiones semisólidas, con el objetivo verificar si ha habido funcionalización. Este experimento permitió verificar de nuevo que no se produjo la funcionalización deseada, ya que no se encontró ninguna señal en el espectro de ^{31}P RMN, ni tampoco de los protones correspondientes al derivado de ciclodextrina en el espectro de 1H RMN. Sin embargo, aparecieron señales asignables a protones de la DMF, lo que sugiere que el proceso de purificación no fue del todo eficaz (Figura 17). Estos resultados nos hacen pensar que la funcionalización no se produjo por dos posibles causas: 1) que la fosforilación con CD-P no es suficiente ya que solo hay entre 2 y 6 grupos fosfato por molécula de ciclodextrina; o 2) que los restos de DMF sin eliminar puedan inhibir de alguna forma la funcionalización.

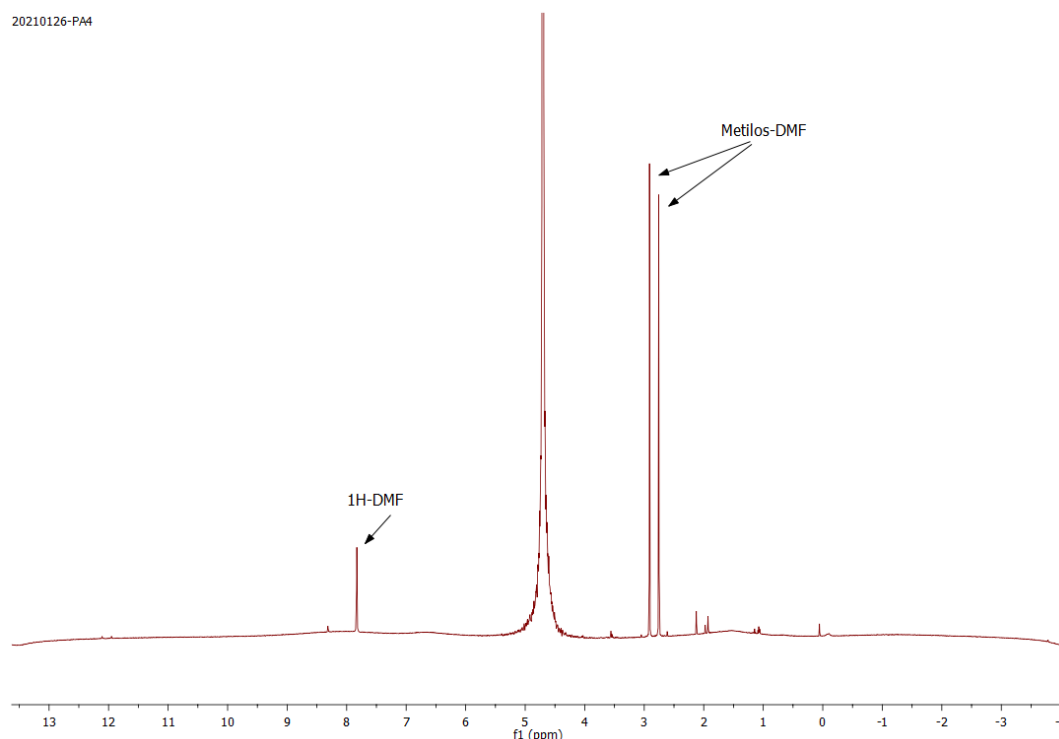


Figura 17. Espectro HRMAS RMN de la muestra 2 de UiO-66/CD-P. Aparecen señales asignables a los protones de DMF, lo que sugiere que la purificación no fue exitosa.

En este punto, se necesita buscar un enfoque diferente para lograr la funcionalización exitosa del UiO-66. Para ello se deja de lado la CD-P y se decide probar con otros derivados fosforilados de ciclodextrina con 14 grupos fosfato por molécula de CD. Así, en la siguiente reacción se utilizó (ManTEG)₇CD-P (Figura 18) como agente funcionalizador, un compuesto sintetizado en el laboratorio por el equipo de investigación en anteriores estudios.⁶ Este derivado de ciclodextrina presenta 14 grupos fosfatos agrupados en forma de clúster lo que podría favorecer una unión cooperativa sobre la superficie del MOF.

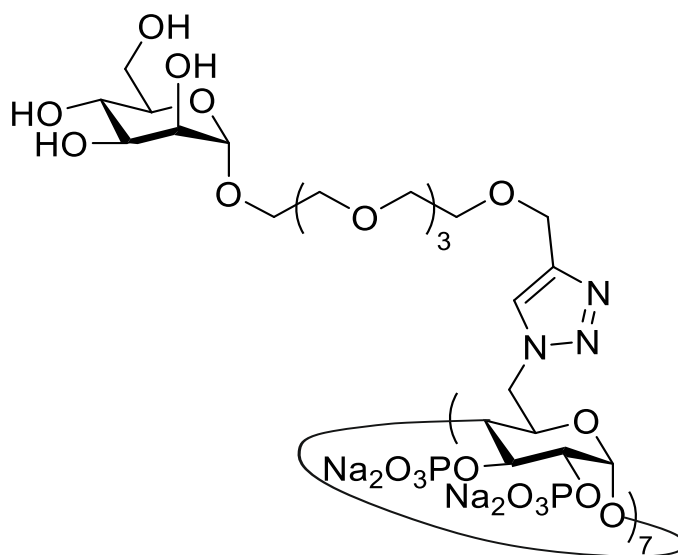


Figura 18. Estructura del derivado fosforilado de ciclodextrina (ManTEG)₇CD-P. Cuenta con 14 grupos fosfato en la cara secundaria.

La reacción se llevó a cabo siguiendo un procedimiento similar al de las anteriores funcionalizaciones con CD-P, solo que se aumentó la concentración de compuesto funcionalizador de 0.6 mg/mL a 2 mg/mL para intentar asegurar que se produjese el recubrimiento. Para ello se preparó una suspensión de UiO-66 (**muestra 2**) (2 mg/mL) en agua MilliQ (10 mL) y una disolución de (ManTEG)₇CD-P (2 mg/mL) en agua MilliQ (10 mL) en dos viales de vidrio, y se mezclaron en un tubo Falcon que se cubre con papel de aluminio y se agita en un agitador excéntrico a 150 rpm durante 24 horas aproximadamente. Pasado dicho tiempo, se obtiene una suspensión blanquecina, que se centrifuga a 4500 rpm, y 4 °C durante 10 min, se descarta el sobrenadante, y el residuo se suspende en agua MilliQ (20 mL) antes de volver a centrifugar a 4500 rpm, y 4 °C durante 10 min. Esta acción de lavado con agua MilliQ se repite 2 veces más. El residuo se seca al vacío en presencia de P₂O₅ durante 24 horas aproximadamente. Finalmente, esta reacción no fue exitosa y tampoco se produjo funcionalización, ya que tras realizar HRMAS RMN en la muestra no se detectaron señales en el espectro de ³¹P RMN, ni tampoco de los protones propios de la ciclodextrina en el espectro de ¹H RMN. Además, volvieron a encontrarse señales propias de la DMF como ocurrió en el espectro de la muestra 2 UiO-66/CD-P (Figura 19).

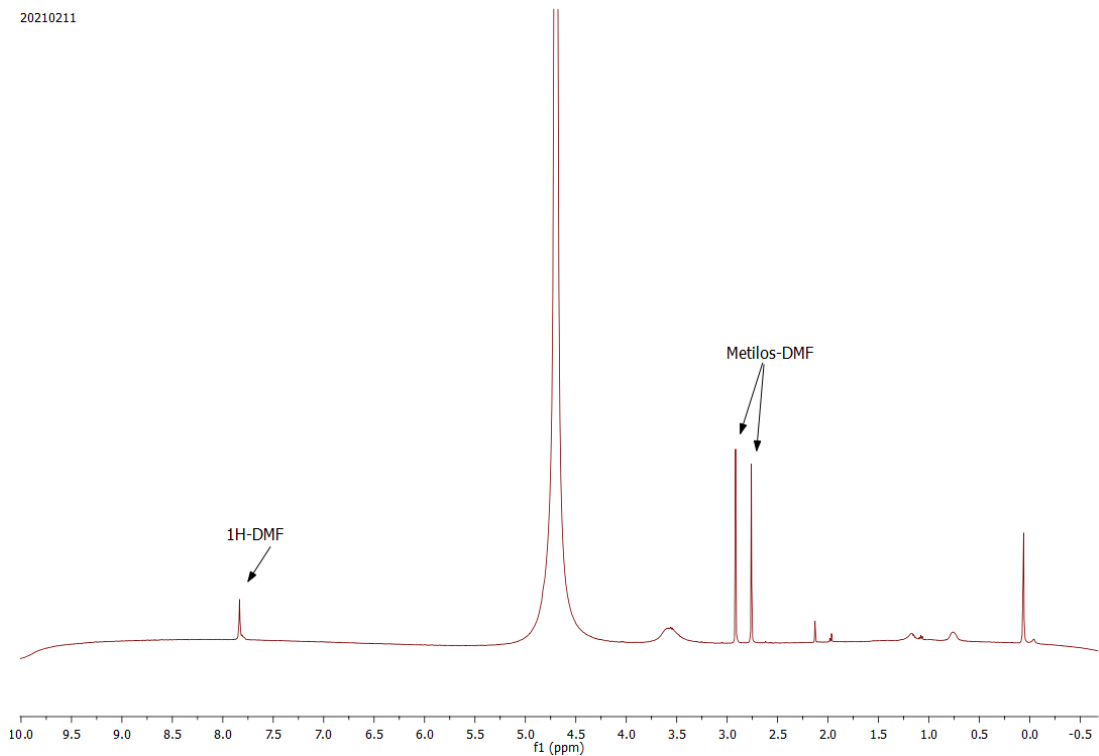


Figura 19. Espectro HRMAS RMN de la muestra UiO-66/(ManTEG)₇CD-P. Se pueden observar señales correspondientes a los protones y metilos de la DMF.

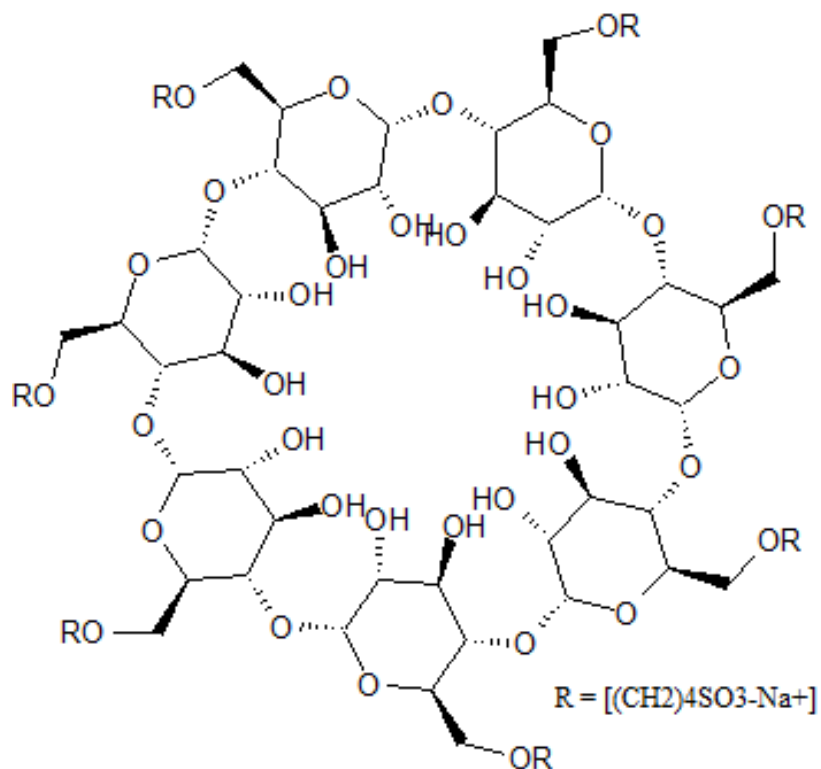


Figura 20. Estructura del sulfobutiléter β -ciclodextrina (SBECD) (DS \sim 10).

Este último resultado descarta nuestra primera hipótesis de utilizar un compuesto con un grado de fosforilación alto para lograr el recubrimiento de la nanopartícula y

arroja ciertas dudas sobre la eficacia de las ciclodextrinas fosforiladas para funcionalizar UiO-66. Por ello decidimos investigar otros derivados de ciclodextrina funcionalizadas con grupos que puedan coordinarse con Zr^{4+} , en concreto el SBECD y el SGM

El sulfobutiléter β -ciclodextrina (SBECD) (Figura 20) es un derivado de la β -ciclodextrina parcialmente sulfobutilado (grado de sustitución aprox. 10), utilizado en medicina como excipiente solubilizante en voriconazol intravenoso, un fármaco antifúngico perteneciente a la familia de los triazoles utilizado en infecciones sistemáticas por hongos y levaduras.²¹

El intento de recubrimiento de UiO-66 (Figura 21) se llevó a cabo preparando una suspensión de UiO-66 (muestra 2) (2 mg/mL) en agua MilliQ (10 mL) y una disolución de SBECD (0.6 mg/mL) en agua MilliQ (10 mL) en dos viales de vidrio, que se mezclan en un tubo Falcon que se cubre con papel de aluminio y se agita en un agitador excéntrico a 150 rpm durante 24 horas aproximadamente. Pasado dicho tiempo se obtiene una suspensión blanquecina, que se centrifuga a 4500 rpm y 4 °C durante 10 min, se descarta el sobrenadante, y el residuo se resuspende en agua MilliQ (20 mL) antes de volver a centrifugar. Tras la primera centrifugación, el sólido quedó ligeramente suspendido en la disolución, por lo que las dos centrifugaciones restantes se realizaron a 5000 rpm y 4 °C durante 10 minutos. El residuo, de color blanco y aspecto fino, se seca al vacío en presencia de P_2O_5 durante 24 horas aproximadamente.

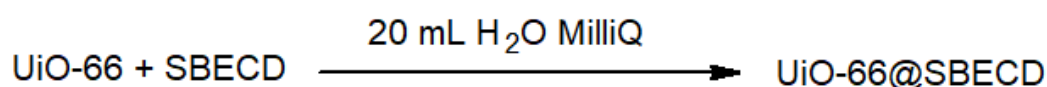


Figura 21. Reacción de funcionalización de UiO-66 con SBECD.

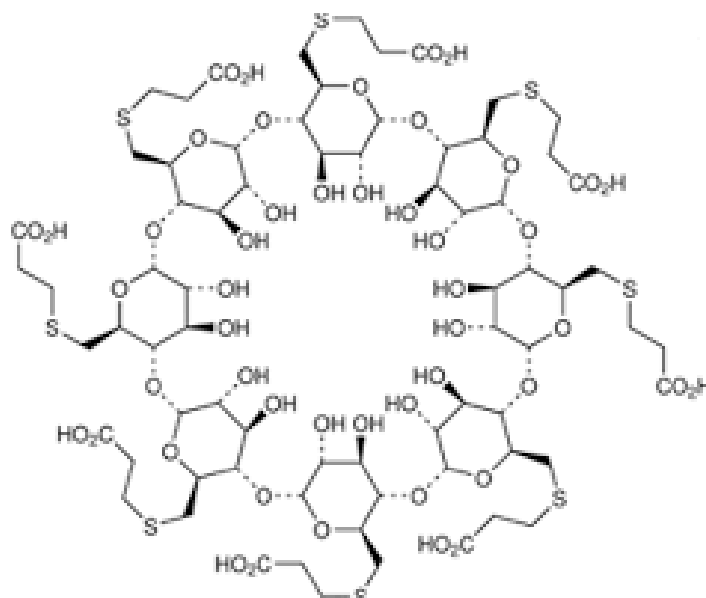


Figura 22. Estructura sugammadex (sugar gamma cyclodextrins) (SGM) (3).

(21) Luke, D. R.; Wood, N. D.; Tomaszewski, K. E.; Damle, B. *Nephrol. Dial. Transplant.*, **2012**, *27*, 1207–1212.

Por su parte, el sugammadex (SGM) es un oligosacárido derivado de la γ -ciclodextrina modificado mediante la adición de 8 grupos 2-carboxietiltilio cargados negativamente (Figura 22).²² Es utilizado en medicina por su capacidad para revertir el bloqueo neuromuscular inducido por fármacos bloqueadores neuromusculares aminoesteroides, produciendo menos efectos secundarios que otros fármacos parasimpaticomiméticos como la neostigmina y dando resultados más rápidos y predecibles.²³

Para la reacción de funcionalización con SGM (Figura 23) se siguió el mismo procedimiento descrito para las anteriores funcionalizaciones. Se preparó una suspensión de UiO-66 (**muestra 2**) (2 mg/mL) en agua MilliQ (10 mL) y una disolución de SGM (0.6 mg/mL) en agua MilliQ (10 mL) en dos viales de vidrio y se mezclan las dos disoluciones en un tubo Falcon que se cubre con papel de aluminio y se agita en un agitador excéntrico a 150 rpm durante 24 horas aproximadamente. Pasado dicho tiempo, se obtiene una suspensión blanquecina, que se centrifuga a 5000 rpm y 4 °C durante 10 min (para asegurar que el sólido quede fijado en el fondo del tubo), se descarta el sobrenadante, y el residuo se suspende en agua MilliQ (20 mL) antes de volver a centrifugar. El residuo, de color blanco y aspecto fino, se seca al vacío en presencia de P₂O₅ durante 24 horas aproximadamente.

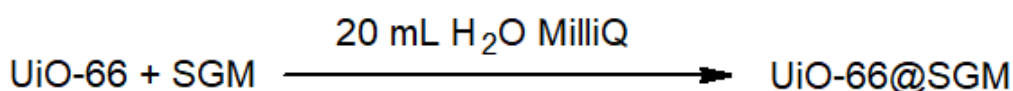


Figura 23. Reacción de funcionalización de UiO-66 con SGM.

Tras obtener las muestras de UiO-66@SBECD y UiO-66@SGM se realizó un microanálisis elemental EDS y se midió resonancia magnética nuclear HRMAS para comprobar si produjo funcionalización. Ambos análisis no fueron claros con respecto a la presencia de azufre, por lo que se decidió realizar un Análisis Elemental de Alta Resolución. Finalmente, el análisis reveló la presencia de azufre en ambos productos, lo que es indicativo de que la funcionalización resultó satisfactoria (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis elemental de alta resolución de UiO-66@SBECD y UiO-66@SGM obtenidos a partir de la **muestra 2** de UiO-66.

Muestra	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)
UiO-66@SBECD muestra 1	26.34	4.19	1.03	0.47
UiO-66@SGM muestra 1	30.38	3.87	0.87	0.98

El análisis indicó la presencia de nitrógeno en ambas muestras, lo que sugiere la presencia de DMF como impureza. Por su parte, los espectros de HRMAS RMN también presentaban señales compatibles con la presencia de DMF, lo que refuerza la hipótesis de que la purificación no fue lo suficientemente eficiente. También aparecieron señales de ¹H asignables a los protones de la ciclodextrina (Figura 24 y Figura 25).

(22) Jones, R. K.; Caldwell, J. E.; Brull, S. J.; Soto, R. G. *Anesthesiology*, **2008**, *109*, 816–824.

(23) Honing, G. H. M.; Martini, C. H.; Bom, A.; van Velzen, M.; Niesters, M.; Aarts, L. P. H. J.; Dahan, A.; Boon, M. *Expert Opin. Drug Saf.*, **2019**, *18*, 883–891.

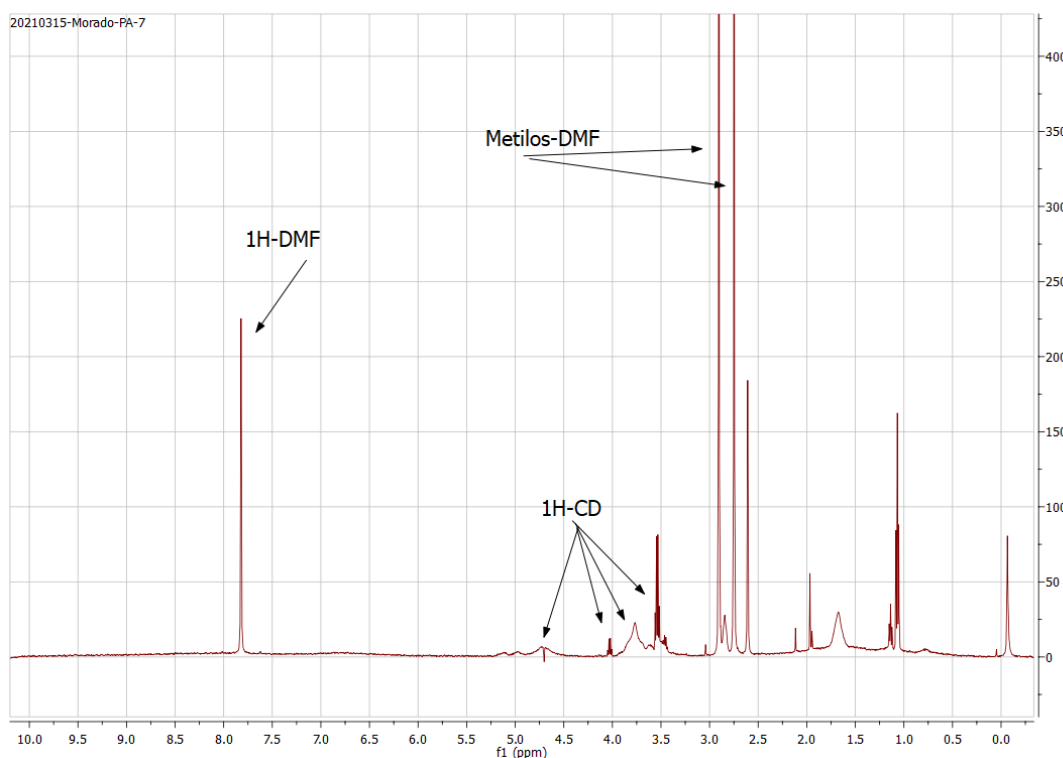


Figura 24. Espectro HRMAS RMN de la muestra UiO-66@SBECD (**muestra 2** UiO-66). Pueden observarse señales de protones correspondientes a la β -ciclodextrina.

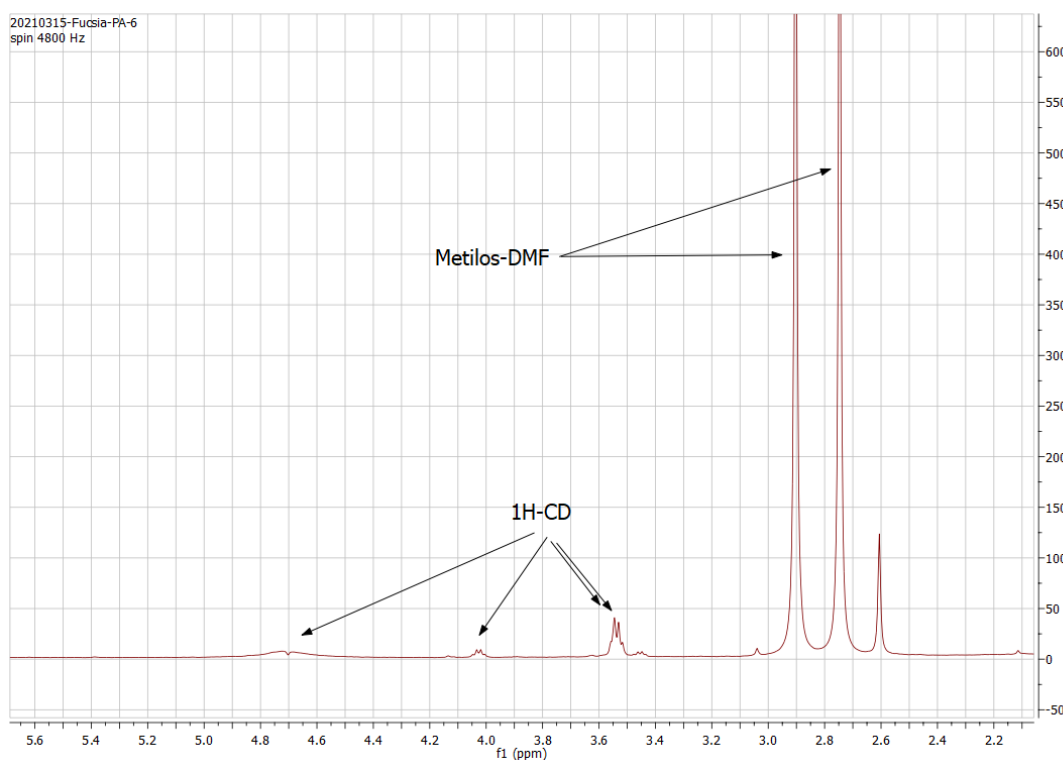


Figura 25. Espectro HRMAS RMN de la muestra UiO-66@SGM (**muestra 2** UiO-66). Pueden observarse señales de protones correspondientes a la β -ciclodextrina.

Este resultado fue esperanzador, por lo que se decidió poner en marcha otras dos reacciones de funcionalización con estos dos derivados de ciclodextrina, SBECD y SGM. Debido a que las **muestras 1 y 2** de UiO-66 contenían restos de DMF y no fue

posible una mejor purificación de las mismas, se decidió preparar una **muestra 3** de UiO-66, según el método B, aunque se modificó el proceso de lavado con objeto de tratar de reducir la presencia de DMF. Para ello, tras realizar los correspondientes lavados con DMF, se procede con un triple lavado con una mezcla de MeOH:H₂O MilliQ 95:5 (20 mL) en agitación excéntrica durante 10 minutos, seguido cada uno de ellos por centrifugación a 4500 rpm y 4°C durante 10 minutos. Una vez completados los lavados, la muestra se conecta primero a una bomba de vacío y a continuación se introduce en una estufa a 100 °C para eliminar el MeOH.

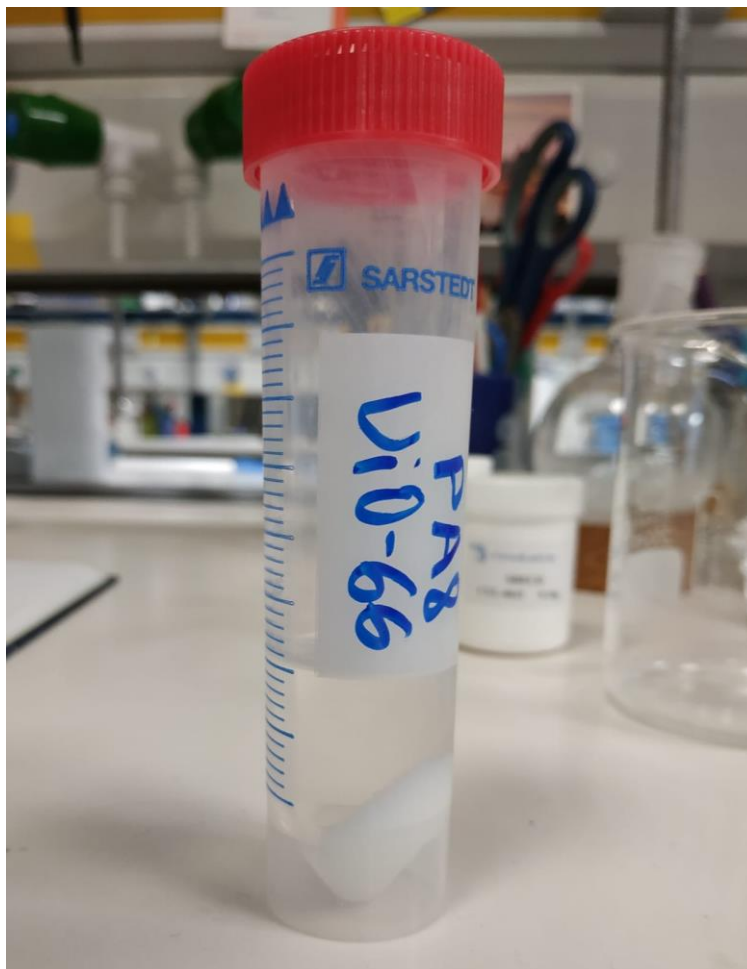


Figura 26. Imagen de la **muestra 3** de UiO-66 contenida en un tubo Falcon antes de realizar el proceso de purificación.

Las dos nuevas reacciones de funcionalización con SBECD y SGM se realizaron utilizando la **muestra 3** de UiO-66. Se preparan dos suspensiones de UiO-66 (muestra 3) (2 mg/mL) en agua MilliQ (95 mL) y sendas disoluciones de SBECD y SGM (0.6 mg/mL) en agua MilliQ (95 mL). Cada una de las suspensiones de UiO-66 (muestra 3) se mezcló con la disolución de uno de los dos derivados de ciclodextrina, SBECD o SGM, en sendos tubos Falcon que se recubren con papel de aluminio y se mantienen en agitación excéntrica a 150 rpm durante una noche para promover la funcionalización del nanomaterial. El proceso de purificación se hizo repartiendo cada muestra en 6 tubos Falcon y centrifugando a 5000 rpm y 4°C durante 10 minutos para asegurar que los sólidos quedasen fijados en el fondo del tubo. Seguidamente, se reúnen los precipitados de color blanco en dos tubos Falcon (uno por muestra) y se

añade agua MilliQ (40 mL) resuspendiendo los sólidos durante 10 min. en agitación excéntrica a 150 rpm para repetir el proceso dos veces más. Una vez terminados los lavados, las muestras se introdujeron en la estufa de vacío a temperatura ambiente para eliminar el agua restante.

Tras obtener UiO-66@SGM y UiO-66@SBECD a partir de la **muestra 3**, se realiza un análisis elemental de alta resolución junto a la **muestra 3** de UiO-66 para determinar el contenido de las tres muestras (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis elemental de alta resolución de UiO-66@SBECD, UiO-66@SGM y UiO-66 (**muestra 3**).

Muestra	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)
UiO-66 (muestra 3)	26.70	4.31	0.91	<0.05
UiO-66@SBECD muestra 2	27.61	3.95	0.10	0.18
UiO-66@SGM muestra 2	27.91	3.52	0.06	0.52

Tras obtener los resultados, se observó que el nuevo procedimiento de purificación empleado en la **muestra 3** de UiO-66 aún dejaba un 1 % de N. Sin embargo, para las muestras funcionalizadas con SBECD y SGM a partir de esta **muestra 3** de UiO-66 se obtuvieron valores de 0.10 y 0.06 % de N, respectivamente. Al comparar estos valores con los obtenidos para las muestras UiO-66@SBECD **muestra 1** y UiO-66@SGM **muestra 1** generadas a partir de la **muestra 2** de UiO-66 (Tabla 2), se puede ver un descenso de alrededor del 90% de la cantidad de N presente en cada caso. Este hecho sugiere que el proceso de lavado de la **muestra 3** de UiO-66 tiene un fuerte impacto en el contenido de DMF de los materiales que se obtienen posteriormente de él. Se baraja la idea de que del incremento en el tiempo de lavado o del contenido de agua en la mezcla de lavado permitiría reducir aún más el contenido de N, tanto del UiO-66 sin funcionalizar como de los materiales obtenidos a partir de él

Por otra parte, tanto UiO-66@SBECD **muestra 2** como UiO-66@SGM **muestra 2** presentan valores de % de azufre por encima del límite de detección del equipo, indicando que la funcionalización había sido exitosa. No obstante, en la muestra UiO-66@SBECD **muestra 2** se consiguió un 0.18 % de S, por lo que la funcionalización no fue tan eficaz como en la muestra UiO-66@SGM **muestra 2**, en la que se obtuvo un 0.52 % de S. Este hecho podría deberse a que el derivado SGM se fija más fuertemente a la superficie de la ciclodextrina que el derivado SBECD. Así mismo, los valores de % de S de estas muestras son inferiores a los obtenidos en las muestras UiO-66@SBECD **muestra 1** y UiO-66@SGM **muestra 1** preparadas a partir de la **muestra 2** de UiO-66, lo que sugiere que al someter el compuesto a un intenso proceso de purificación con el fin de eliminar la DMF, podría modificarse su superficie y hacerla menos reactiva a los agentes de funcionalización.

Posteriormente se realizó un análisis de la **muestra 3** de UiO-66 (Figura 27) y de UiO-66@SGM **muestra 2** sintetizada a partir de la **muestra 3** de UiO-66 con Microscopio Electrónico de Barrido de Alta Resolución de Emisión de Campo (FESEM), una técnica que proporciona imágenes tridimensionales de la morfología externa de una muestra similares a las que ofrece un SEM (Scanning Electron Microscope) pero de una mayor resolución espacial, con un aumento entre 10× y 1.000.000× y, mayor profundidad de campo, que da apariencia aún más tridimensional a las imágenes.

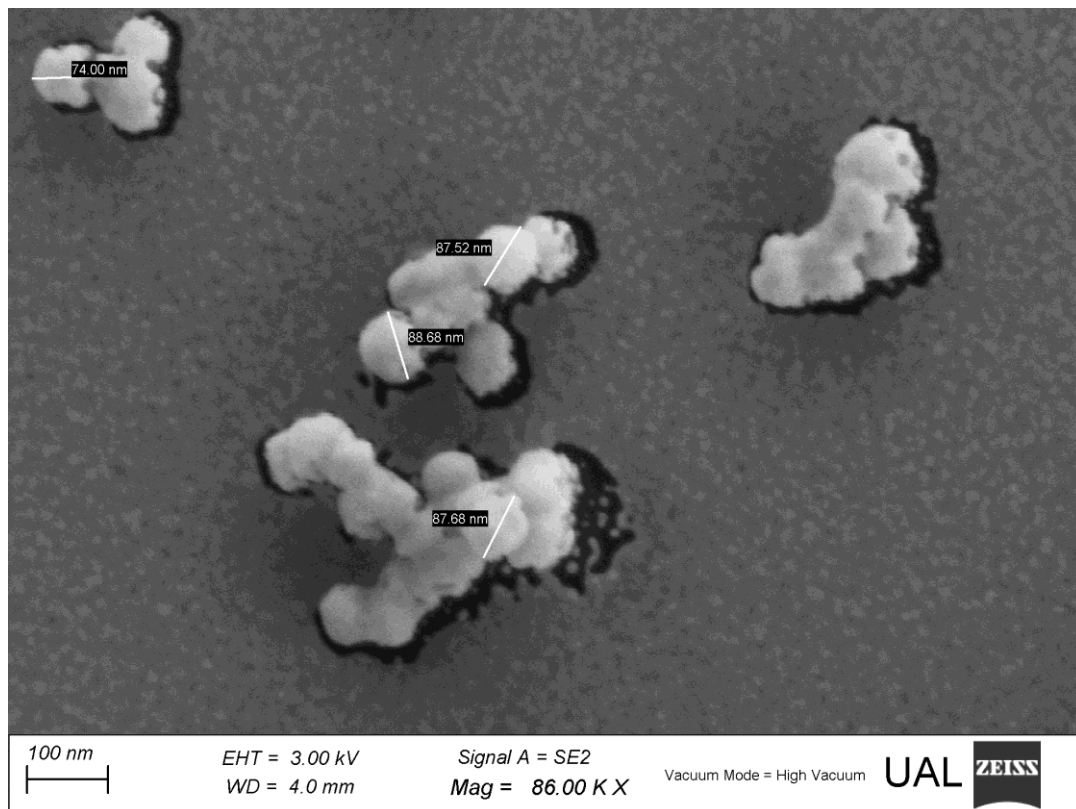


Figura 27. Imagen FESEM de la **muestra 3** de UiO-66.

El resultado fue interesante, en la **muestra 3** de UiO-66, se observaron ángulos marcados en la superficie de las esferas que correspondían con poros de distinto tamaño, mientras que en UiO-66@SGM **muestra 2**, esos ángulos aparecían mucho menos marcados (Figura 28). Este hecho implicaría que ha habido algún tipo de recubrimiento, lo cual parece corroborar las observaciones realizadas por análisis elemental.

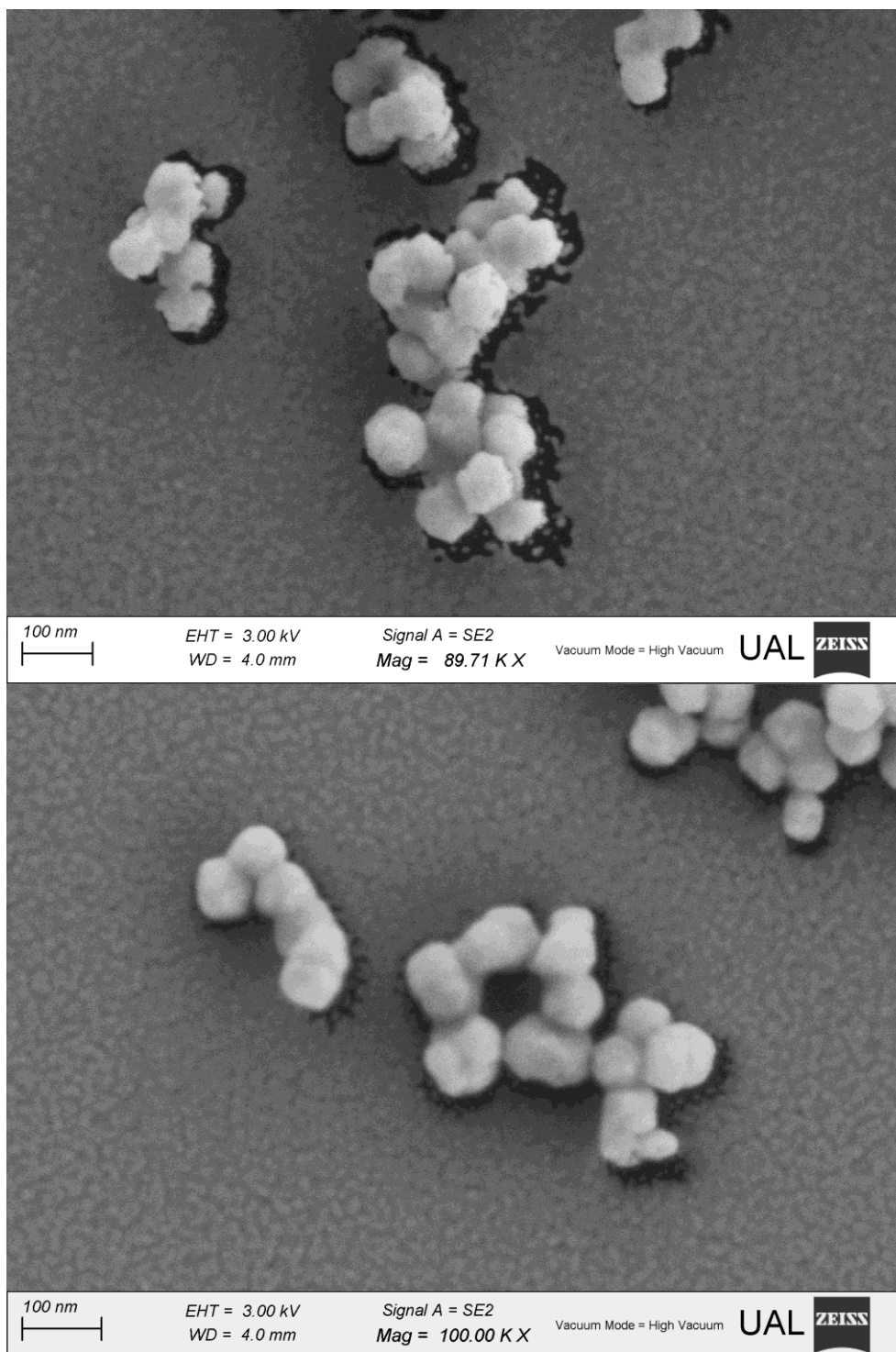


Figura 28. Imágenes FESEM seleccionadas. Arriba: **muestra 3** de UiO-66. Abajo: UiO-66@SGM **muestra 2** obtenida a partir de la **muestra 3** de UiO-66. En la **muestra 3** pueden apreciarse ángulos marcados en la superficie de las nanopartículas, mientras que en UiO-66@SGM **muestra 2**, la superficie de las esferas se ve más redondeada.

7. CONCLUSIONES

En el presente Trabajo de Fin de Grado se ha conseguido sintetizar las nanoestructuras metal-orgánicas (nMOFs) UiO-66 de forma reproducible con un tamaño medio de partícula alrededor de 65 nm, siguiendo un procedimiento descrito en literatura. El análisis del material obtenido mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM), difracción de rayos X de polvo (PXRD), análisis elemental, análisis de fisisorción de N_2 y microanálisis por dispersión de energía de rayos X (EDS) indicaron buena correlación entre las propiedades encontradas para los nMOFs sintetizados y las descritas en literatura. Sin embargo, también se ha observado que este material se obtiene impurificado con un porcentaje indeterminado de *N,N*-dimetilformamida (DMF), el disolvente en el que se lleva a cabo la síntesis. Se ha desarrollado una metodología de purificación que aparentemente consigue reducir la cantidad de DMF ocluida en el material, si bien no en toda su extensión. Son necesarias nuevas modificaciones de esta estrategia que aseguren una mejor activación de los nMOFs obtenidos.

Los nMOFs UiO-66 preparados se han intentado funcionalizar superficialmente utilizando derivados del ciclooligosacárido β -ciclodextrina decorados con grupos fosfato y sulfonato, y de su análogo γ -ciclodextrina funcionalizado con carboxilato. El uso de estos ciclooligosacáridos se justifica dado que su tamaño molecular es superior al de las ventanas de acceso a los poros de estos nMOFs, asegurando por tanto que no penetran en el interior de los mismos. La funcionalización se ha intentado por siempre contacto de los nMOFs con los agentes de funcionalización en agua y posterior purificación por centrifugación. Los materiales obtenidos se han caracterizado mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM), análisis elemental, resonancia magnética nuclear con rotación de ángulo mágico (HRMAS) y microscopía electrónica de barrido de alta resolución de emisión de campo (FESEM). El derivado fosforilado de β -ciclodextrina no ha mostrado ningún indicio de su anclaje sobre la superficie de las nanopartículas, ya que no aparecen señales de la presencia de fósforo ni en los espectros de ^{31}P HRMAS ni en el análisis elemental. En cambio, los resultados de análisis elemental sí sugieren que tanto el derivado de β -ciclodextrina decorado con ~10 grupos sulfonilo sobre su estructura, como el derivado de γ -ciclodextrina sugammadex que presenta ~8 grupos carboxilato, son capaces de funcionalizar la superficie de los nMOFs UiO-66, en una extensión que parece depender del tratamiento de purificación previo de estos últimos.

Los resultados de este trabajo constituyen, por tanto, una prometedora aproximación a la preparación de nMOFs UiO-66 de tamaño inferior a 100 nm funcionalizados con derivados sencillos de β - y γ -ciclodextrina, si bien son necesarias nuevas optimizaciones de los procedimientos aquí presentados para mejorar la eficiencia de esta estrategia.

9. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

CCDC: The Cambridge Crystallographic Data Centre.

CD: ciclodextrina.

CD-P: β -ciclodextrina fosforilada.

DMF: *N,N*-dimetilformamida.

EDS: Energy dispersive X-ray spectroscopy.

FESEM: Field Emission Scanning Electron Microscope.

HRMAS: High-Resolution Magic Angle Spinning.

(ManTEG)₇CD-P: Sal sódica de fosfato heptakis{6-desoxi-6-{4'-[14''-O-(α -D-manopiranosil)-2'',5'',8'',11'',14''-pentaoxatetradecil]-1*H*-1,2,3-triazol-1'-il}} ciclomaltoheptaosa.

MIL-100: Materials of Institut Lavoisier – 100.

nMOF: nano Metal-Organic Framework.

PXRD: Powder X-Ray Diffraction.

SBECD: sulfobutiléter β -ciclodextrina.

SGM: sugammadex.

STEM: Scanning Transmission Electron Microscopy.

TEM: Transmission Electron Microscopy.

UiO-66: Universitetet i Oslo – 66.

