

DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA

“Síntesis, caracterización y aplicación de redes metal orgánicas con ácido trimésico o ácido tereftálico para inhibir la agregación de una proteína modelo de amiloidogénesis”

Idónea comunicación de resultados para obtener el grado de Maestro en Ciencias Naturales e Ingeniería.

PRESENTA

Biólogo Molecular, Rubén Felipe Martínez Fuentes

Directores

Dr. Hiram Isaac Beltrán Conde, UAM-A

Dr. Hugo Nájera Peña, UAM-C

Asesora

Dra. Roxana López Simeon, UAM-C

Esta idónea comunicación de resultados se realizó dentro del Programa de Maestría del Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa. El trabajo Experimental se realizó de Marzo de 2016 a Octubre de 2018 en los laboratorios de biofísicoquímica y de farmaquímica del Departamento de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa. Parte de este trabajo se presentó en el 6º y 7º Congreso de la Rama de Físicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, en Durango, noviembre del 2017, y en Ciudad de México, octubre del 2019.

Durante el transcurso de la Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería, en la UAM-Cuajimalpa, recibí una beca otorgada por el CONACyT, con número de becario 798764, en el periodo 2016-2018.

DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS.

En la Ciudad de México, el día 12 del mes enero del año 2020, el que suscribe Rubén Felipe Martínez Fuentes, alumno del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa, manifiesta que es autor intelectual de la presente Idónea Comunicación de Resultados titulada; "Síntesis, caracterización y aplicación de redes metal orgánicas con ácido trimésico o ácido tereftálico para inhibir la agregación de una proteína modelo de amiloidogénesis" realizada bajo la dirección del Dr. Hiram Isaac Beltrán Conde, el Dr. Hugo Nájera Peña y la Dra. Roxana López Simeon, cede los derechos de este trabajo a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) para su difusión con fines académicos y de investigación. Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráfico o de datos del trabajo, sin el permiso expreso de los directores del trabajo como representantes de la UAM. Este puede ser obtenido escribiendo a alguna de las siguientes direcciones: hibc@azc.uam.mx, hnajera@correo.cua.uam.mx o r.lopez@dcniuamc.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'R.F.M.F.', is centered on the page. The signature is fluid and cursive, with a long horizontal stroke extending to the right.

FIRMA

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD.

“El que suscribe, Rubén Felipe Martínez Fuentes, alumno del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería, declara que los resultados reportados en esta idónea comunicación de resultados, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Así mismo, declaro que hasta donde es de mi conocimiento no contiene material previamente publicado o escrito por otra(s) persona(s) excepto donde se reconoce como tal a través de citas y que éste fue usado con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de este trabajo es producto de mi propia labor con la dirección y apoyo de mis directores y de mi comité tutorial, en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación y a la expresión escrita”.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'R.F.M.F.' with a large, stylized initial 'R'.

FIRMA

DECLARACIÓN DE NO LUCRO:

El que suscribe, Rubén Felipe Martínez Fuentes, alumno del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería, manifiesta su compromiso de no utilizar con fines de difusión, publicación, protección legal por cualquier medio, licenciamiento, venta, cesión de derechos parcial o total o de proporcionar ventajas comerciales o lucrativas a terceros, con respecto a los materiales, datos analíticos o información de toda índole, relacionada con las actividades e intercambios de información derivados de la relación de investigación académica y tecnológica desarrollada entre la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) y Rubén Felipe Martínez Fuentes.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'R.F.M.F.', written in a cursive style.

FIRMA

Agradecimientos

A mis directores, los doctores Hiram I. Beltrán Conde y Hugo Nájera Peña por la paciencia y siempre excelente disponibilidad para enseñarme y guiarme durante mi aprendizaje, no tengo nada más que respeto y admiración por ellos.

A la Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa por darme todas las herramientas necesarias para seguir expandiendo mis conocimientos y permitirme seguir involucrándome en el mundo de la investigación. Al CONACyT por el brindarme apoyo económico para poder realizar mis estudios de maestría.

A todos los miembros de los Laboratorios de Biofísicoquímica y Farmaquímica de la UAM-C que me resolvieron alguna duda o me ayudaron a realizar actividades de mi desconocimiento. En especial a la Dra. Roxana López Simeon por enseñarme a utilizar de manera correcta los equipos de laboratorio, también al Mtro. Ricardo Cerón por motivarme y aconsejarme en momentos de duda y enseñarme de manera indirecta en confiar y creer en mí mismo.

Al Departamento de Ciencias Naturales y miembros del Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería por permitir y coordinar los elementos necesarios para seguir nuestra formación como profesionales. A la Dra. Mariana Peimbert Torres por la compra de equipo de laboratorio que permitió facilitar y mejorar los estudios realizados en este trabajo.

A mis amigos del Posgrado por hacer más ameno y menos estresante este proyecto.

A mis padres y familia por escribir esta tesis a mi lado.

Quien nada pregunta, nada aprende - Fuller

Índice

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Estructura de las fibras amiloides	4
1.2. Desarrollo de fibras amiloides <i>in vitro</i>	6
1.3. La HEWL y la capacidad de formar fibras amiloides	9
1.4. Fluorescencia de la tioflavina-T.....	10
1.5. Fluorescencia intrínseca.....	12
1.6. Redes metal orgánicas	12
1.7. Interacción de MOF con proteínas	16
1.8. BioMOFs: MOFs biológicas	18
II. JUSTIFICACIÓN.....	21
III. HIPÓTESIS	22
IV. OBJETIVOS.....	22
4.1. Objetivo general.....	22
4.2. Objetivos particulares.....	22
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
5.1. Materiales	23
5.1.1. Disolventes	23
5.1.2. Reactivos	23
5.2. Metodología	24
5.2.1. Síntesis de redes metal orgánicas (MOF)	24
5.2.2. Dispersión de las redes metal orgánicas.....	27
5.2.3. Formación de fibras amiloides con la proteína HEWL en presencia de etanol	27
5.2.4. Evaluación de la inhibición de las fibras amiloides de HEWL con las redes metal orgánicas a diferentes concentraciones	28
5.2.5. Prueba de estabilidad de las redes metal orgánicas.....	29
5.2.6. Caracterización de las redes metal orgánicas recién sintetizadas y después de la prueba de estabilidad	29

VI.	RESULTADOS y DISCUSIÓN	35
6.1.	Obtención y caracterización de materiales MOF	35
6.1.1.	Obtención y caracterización de MOF HKUST-1(Cu)	36
6.1.2.	Obtención y caracterización de MOF MIL-53(Cu)	44
6.1.3.	Obtención y caracterización de MOF MIL-100(Fe)	49
6.1.4.	Obtención y caracterización de MOF MIL-53(Fe)	56
6.1.5.	Obtención y caracterización de MOF MIL-96(Al)	66
6.1.6.	Obtención y caracterización de MOF MIL-53(Al)	74
6.1.7.	Obtención y caracterización de MOF NICS-6(Mg)	81
6.2.	Características y modelo de formación de fibras de HEWL	90
6.2.1.	Estudio en agua inyectable	90
6.2.2.	Estudio en EtOH	92
6.3.	Estudios de interacción entre MOFs y HEWL	99
6.2.3.	Inhibición de fibras amiloides de HEWL por de los componentes simples de las MOFs	101
6.1.1.	MOF HKUST-1(Cu) y HEWL	102
6.1.2.	MOF MIL-53(Cu) y HEWL	111
6.1.3.	MOF MIL-100(Fe) y HEWL	113
6.1.4.	MOF MIL-53(Fe) y HEWL	120
6.1.5.	MOF MIL-96(Al) y HEWL	125
6.1.6.	MOF MIL-53(Al) y HEWL	132
6.1.7.	MOF NICS-6(Mg) y HEWL	134
6.4.	Estudios comparativos de interacción entre MOFs y HEWL	138
VII.	CONCLUSIONES	140
	APÉNDICE A	144
	APÉNDICE B	148
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	150

Índice de figuras

Figura 1. Estructura de las fibras amiloides	5
Figura 2. Cinética de formación de fibras amiloides a partir de oligómeros..8	
Figura 3. Estructura tridimensional de la proteína HEWL.....	9
Figura 4. Tioflavina-T y mecanismo de unión a fibras amiloides	11
Figura 5. Componentes y estructura de una MOF	13
Figura 6. Caracterización de la MOF HKUST-1(Cu) por FTIR (A) , TGA (B) y DRX (C) recién sintetizada.....	39
Figura 7. Caracterización de la MOF HKUST-1(Cu)-tratada por FTIR (A) , TGA (B) y DRX (C) después del tratamiento.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 8. Caracterización de la MOF MIL-53(Cu) por FTIR (A) , TGA (B) y DRX (C) recién sintetizada.....	46
Figura 9. Caracterización de la MOF MIL-53(Cu)-tratada por FTIR (A) , TGA (B) y DRX (C) después del tratamiento	48
Figura 10. Caracterización de la MOF MIL-100(Fe) por FTIR (A) , TGA (B) y DRX (C) recién sintetizada.....	52
Figura 11. Caracterización de la MOF MIL-100(Fe)-tratada por FTIR (A) , TGA (B) y DRX (C) después del tratamiento.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 12. Caracterización de la MOF MIL-53(Fe) por FTIR (A) , TGA (B) y DRX (C) recién sintetizada.....	62
Figura 13. Caracterización de la MOF MIL-53(Fe)-tratada por FTIR (A) , TGA (B) y DRX (C) después del tratamiento	65
Figura 14. Caracterización de la MOF MIL-96(Al) por FTIR (A) , TGA (B) y DRX (C) recién sintetizada.....	69

Figura 15. Caracterización de la MOF MIL-96(Al)-tratada por FTIR (A), TGA (B) y DRX (C) después del tratamiento	73
Figura 16. Caracterización de la MOF MIL-53(Al) por FTIR (A), TGA (B) y DRX (C) recién sintetizada.....	78
Figura 17. Caracterización de la MOF MIL-53(Al)-tratada por FTIR (A), TGA (B) y DRX (C) después del tratamiento	¡Error! Marcador no definido.
Figura 18. Caracterización de la MOF NICS-6(Mg) por FTIR (A), TGA (B) y DRX (C) recién sintetizada.....	84
Figura 19. Caracterización de la MOF NICS-6(Mg)-tratada (NICS-4(Mg)) por FTIR (A), TGA (B) y DRX (C) después del tratamiento;	¡Error! Marcador no definido.
Figura 20. Inhibición de la fibrilogénesis en condiciones alcalinas y con alta concentración de fosfatos (20 mM)	91
Figura 21. Cinética de formación de fibras amiloides utilizando la proteína HEWL en solución	100
Figura 22. Cinéticas de formación de fibras amiloides de HEWL en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de [HKUST-1(Cu)]	103
Figura 23. Esquema del mecanismo tentativo de la translocación de una proteína (citocromo C) a las cavidades de una MOF (Tb-mesoMOF).....	104
Figura 24. Cinéticas de formación de fibras amiloides de HEWL en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de [MIL-53(Cu)]	111
Figura 25. Cinéticas de formación de fibras amiloides de HEWL en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de [MIL-100(Fe)]	114
Figura 26. Cinéticas de formación de fibras amiloides de HEWL en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de [MIL-53(Fe)]	121

Figura 27. Cinéticas de formación de fibras amiloides de HEWL en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de **[MIL-96(Al)]**. 126

Figura 28. Cinéticas de formación de fibras amiloides de HEWL en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de **[MIL-53(Al)]**. 132

Figura 29. Cinéticas de formación de fibras amiloides de HEWL en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de **[NICS-6(Mg)]**..... 135

Índice de tablas

Tabla 1. Volumen, concentración inicial y concentración final de red metal orgánica utilizada por pozo para inhibir.....	28
Tabla 2. Parámetros de duración (t) e intensidad de fluorescencia máxima del control positivo de las fibras amiloides.	101
Tabla 3. Datos de concentraciones cuando se comienza a inhibir ($[]_{Ci}$) y cuando se consigue la inhibición total ($[]_{TOT}$) empleando los componentes simples de MOFs.	102
Tabla 4. Parámetros de duración (t) e intensidad de fluorescencia de formación de fibras en presencia de la MOF HKUST-1 (Cu)	103
Tabla 5. Parámetros de duración (t) e intensidad de fluorescencia de formación de fibras en presencia de la MOF MIL-53 (Cu).....	111
Tabla 6. Parámetros de duración (t) e intensidad de fluorescencia de formación de fibras en presencia de la MOF MIL-100(Fe)	115
Tabla 7. Parámetros de duración (t) e intensidad de fluorescencia de formación de fibras en presencia de la MOF MIL-53(Fe)	121
Tabla 8. Parámetros de duración (t) e intensidad de fluorescencia de formación de fibras en presencia de la MOF MIL-96(Al)	127
Tabla 9. Parámetros de duración (t) e intensidad de fluorescencia de formación de fibras en presencia de la MOF NICS-6(Mg)	135
Tabla 10. Concentraciones de inhibición, estabilidad en el medio de reacción y relaciones molares con la HEWL.	139

Apéndice A

Figura A1. Cinéticas de inhibición de fibras amiloides utilizando (BTC) (panel A) y (BDC) (panel B)	144
Figura A2. Cinéticas de inhibición de fibras amiloides utilizando sales metálicas: (Cu^{+2} , Fe^{+3} , Al^{+3} , Mg^{+2})	145
Figura A3. Interacción de las MOF con ThT en diferentes condiciones.....	146
Figura A4. Controles negativos y cinéticas de inhibición en ausencia y presencia de ThT midiendo la fluorescencia intrínseca.....	147
Tabla 1. Valores de pH después del tratamiento para la prueba de estabilidad.....	148

Lista de abreviaturas

Lisozima de clara de huevo de gallina (HEWL por sus siglas en inglés -*Hen Egg White Lysozyme*-)

Red metal orgánica (MOF por sus siglas en inglés -*Metal-organic framework*-)

Instituto de Materiales Lavoisier (MIL-n por sus siglas en inglés -*Materials Institute Lavoisier*-)

Universidad de Ciencia y Tecnología de Hong Kong (HKUST-n por sus siglas en inglés -*Hong Kong University of Science and Technology*-)

Ácido 1,3,5-bencentricarboxílico (BTC por sus siglas en inglés -*benze-1,3,5-tricarboxylic acid*-)

Ácido 1,4-bencendicarboxílico (BDC por sus siglas en inglés -*benzene-1,4-dioic acid*-)

Tioflavina-T (ThT por sus siglas en inglés -*Thioflavin T*-)

Sitios metálicos de coordinación no saturados ("cus" por sus siglas en inglés -*coordinatively unsaturated metal site*-)

Sitios de coordinación abiertos (OCSs por sus siglas en inglés -*open coordination sites*-)

Espectroscopía infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés -*Fourier-transform infrared spectroscopy*-)

Difracción de rayos X de polvos (XRD por sus siglas en inglés -*X-ray powder diffraction*-)

Análisis termogravimétrico (TGA por sus siglas en inglés -*thermogravimetric analysis*-)

RESUMEN

Las enfermedades conocidas como amiloidosis se asocian al estado amiloide, causado por el plegamiento no convencional de las proteínas, dando lugar a la aparición de agregados fibrilares insolubles ordenados. La lisozima de clara de huevo de gallina (HEWL) es una proteína ampliamente utilizada para modelos *in vitro* de la formación e inhibición de fibras amiloides. Mientras que las redes metal orgánicas (MOF) son materiales cristalinos porosos con características fisicoquímicas atractivas (estabilidad química, térmica, hidrotérmica, adsorbentes, catalíticas) para múltiples fines y en particular para aplicaciones biológicas potenciales. En este estudio se implementó un modelo *in vitro* para la formación de fibras amiloides en 18 h usando etanol al 65 % en *buffer* y detección por fluorescencia intrínseca, sin agitación y a temperatura ambiente. También se sintetizaron y caracterizaron siete MOFs utilizando los iones metálicos: Cu^{+2} , Fe^{+3} , Al^{+3} , Mg^{+2} con ácido 1,3,5-bencentricarboxílico (BTC) o ácido 1,4-bencendicarboxílico (BDC), para su uso como potenciales inhibidores en la formación de fibras amiloides. Los materiales se caracterizaron después del tratamiento en el medio de reacción (*buffer* de fosfatos/etanol) para determinar su estabilidad. Los MOFs **MIL-53(Cu)** y **MIL-53(Al)** tuvieron gran estabilidad pero no presentaron actividad inhibitoria. Los MOFs **MIL-53(Fe)** y **NICS-6(Mg)** lograron una inhibición parcial, sin embargo perdieron su estructura tridimensional cristalina, transformándose en materiales amorfos, siendo poco estables para estos fines. Para **HKUST-1(Cu)** y **MIL-100(Fe)** se observó una inhibición considerable con una ventana de estabilidad confiable para este proceso. La mayor estabilidad la tuvo **MIL-96(Al)** y mostró una inhibición total a la menor relación molar. Se propone que la inhibición de las MOFs depende del tamaño de poro y del tipo de interacciones que sean capaces de formar al momento de adsorber a la HEWL parcialmente plegada.

ABSTRACT

The diseases known as amyloidosis are associated with the amyloid state, caused by unconventional folding of the proteins, resulting in the appearance of insoluble fibrillar aggregates. Chicken egg white lysozyme (HEWL) is a protein widely used for *in vitro* models of amyloid fiber formation and inhibition. While metal organic-frameworks (MOF's) are porous crystalline materials with attractive physicochemical characteristics (chemical, thermal, hydrothermal, adsorbent, catalytic stability) for multiple purposes and in particular for potential biological applications. In this study, an *in vitro* model was implemented for the formation of amyloid fibers in 18 h using 65% ethanol in buffer and detection by intrinsic fluorescence, without stirring and at room temperature. Seven **MOF's** were also synthesized and characterized using the metal ions: Cu^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} , Mg^{2+} with 1,3,5-benzenetricarboxylic acid (BTC) or 1,4-benzenedicarboxylic acid (BDC), for use as potential inhibitors in the formation of amyloid fibers. The materials were characterized after treatment in the reaction medium (phosphate buffer/ethanol) to determine their stability. The MOFs **MIL-53(Cu)** and **MIL-53(Al)** had great stability but no inhibitory activity. The MOFs **MIL-53(Fe)** and **NICS-6(Mg)** achieved a partial inhibition, however they lost their three-dimensional crystalline structure, transforming into amorphous materials, being unstable for these purposes. For **HKUST-1(Cu)** and **MIL-100(Fe)** a considerable inhibition was observed with a reliable stability window for this process. **MIL-96(Al)** had the greatest stability and showed a total inhibition at the lowest molar ratio. It is proposed that the inhibition of MOFs depends on the pore size and the type of interactions that are capable of forming at the time of adsorbing the partially folded HEWL.

I. INTRODUCCIÓN

Las proteínas son biomoléculas que realizan funciones esenciales en todos los procesos biológicos, como el control del crecimiento y diferenciación celular, el generar movimiento y soporte mecánico, la transmisión de impulsos nerviosos así como la protección inmune, entre muchas otras. El desempeño adecuado de las proteínas es directamente dependiente de la estructura tridimensional que adquieren al momento de plegarse en su forma nativa [1]. Algunas proteínas y péptidos además de la conformación funcional, pueden alcanzar otros arreglos estructurales; abarcando desde conformaciones desordenadas, parcialmente ordenadas y distintos conjuntos de agregados proteínicos en condiciones fisiológicas normales [2].

Una gran variedad de enfermedades pueden ser provocadas por la deficiencia de una proteína o péptido, que parcialmente o en su totalidad, no mantiene la estructura globular funcional. Estos padecimientos son conocidos como amiloidosis o enfermedades del plegamiento anómalo, se caracterizan por la presencia de agregados fibrilares insolubles altamente ordenados [3]. Existen una gran variedad de agregados proteínicos, las fibras y placas amiloides son un tipo de agregados fibrilares con estructura definida que se forman extracelularmente, dentro de la célula son llamados “inclusiones intracelulares” [2], [3].

Las enfermedades asociadas con agregados fibrilares del tipo amiloide se agrupan en neurodegenerativas, la agregación sucede en el cerebro (esclerosis lateral amiotrófica, Alzheimer), amiloidosis sistemática no neuropática donde la agregación se da en varios tejidos (amiloidosis de lisozima, fiebre mediterránea familiar), y amiloidosis localizada no neuropática aquí la agregación ocurre en un solo tejido (amiloidosis medial aórtica, diabetes tipo II). Un 85 % de estos padecimientos tienen un carácter esporádico como lo son el Alzheimer, Parkinson, demencia con cuerpos de

Lewy, amiloidosis sistemática senil y diabetes tipo II; mientras que un 10% son causados por mutaciones específicas y son de naturaleza hereditaria como la enfermedad de Huntington, amiloidosis de lisozima, ataxias espinocerebelosas y amiloidosis de fibrinógeno [3].

1.1. Estructura de las fibras amiloides

En la actualidad existen más de 50 proteínas humanas con propiedades amiloides, éstas adquieren un plegamiento no convencional o una conformación no funcional y en consecuencia entran al estado amiloide. El estado amiloide se caracteriza por la presencia de fibras alargadas rectas de longitud intermedia, sin ramificaciones y con diámetros de 70 a 120 Å (**Figura 1A**). Al teñirse con rojo Congo, un colorante de unión específica, presentan birrefringencia patognomónica de color verde, amarilla o naranja cuando se observan por microscopía de luz polarizada [4], [5].

Cada fibra está compuesta de 2 a 6 subunidades individuales llamadas protofilamentos, que se enrollan sobre un núcleo central para formar la fibra amiloide madura, a su vez cada protofilamento tiene una estructura central de lámina β seriada, que pueden estar en conformación paralela o antiparalela [6].

Dado que las fibras amiloides son insolubles y heterogéneas se utilizaron técnicas biofísicas como difracción de rayos X, resonancia magnética del estado sólido y resonancia paramagnética del electrón, para dilucidar la estructura molecular.

Las fibras amiloides tienen un patrón de difracción de rayos X de conformación de hoja cruzada β , la unidad estructural estable es la conformación de lámina β que se une por medio de puentes de hidrógeno alineados de manera paralela a la fibra amiloide (**Figura 1B**), formados con el grupo amino (N-H) y el grupo carbonilo (C=O) de las amidas de la cadena

polipeptídica. Permitiendo así la unión de una hebra particular con hebras que se encuentran tanto abajo como arriba, las cuales se apilan hasta formar una hebra β que se extiende de manera perpendicular a lo largo del eje de la fibra, esto corresponde a una estructura estándar de lámina β intramolecular de Pauling-Corey [7].

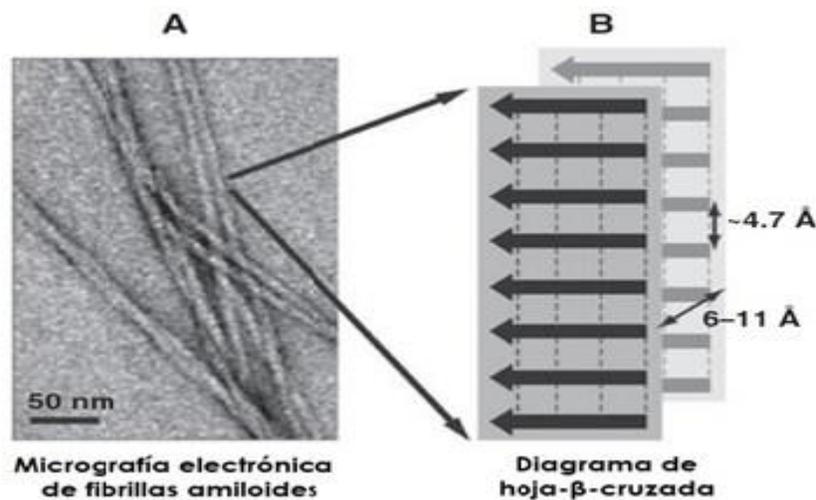


Figura 1. Estructura de las fibras amiloides. (A) La unión de largos filamentos forman fibrillas amiloides visibles por medio de microscopía electrónica de transmisión. (B) Esquema representativo de la organización espacial de hojas cruzadas β que conforman una fibrilla amiloide, las líneas discontinuas representan los hidrógenos del esqueleto. Modificado de [8].

Los puentes de hidrógeno que unen a la hebra β tienen una longitud de $\sim 4.7 \text{ \AA}$, esta alineación permite que residuos iguales queden juntos sobre el eje de la fibra adquiriendo conformaciones tipo asas, proporcionando estabilidad a la fibra amiloide por medio de interacciones estéricas. El espacio que existe entre cada lámina β intermolecular es de ~ 6 a 11 \AA de longitud, es conocido como superficie de interacción “seca” o hidrófoba y es en donde la complementación entre cadenas laterales maximiza los puentes de hidrógeno, las fuerzas de van der Waals y el efecto hidrofóbico propiciado por los residuos de aminoácidos; permite la unión de las láminas

β de manera intermolecular y promueven la estabilidad del estado amiloide [8].

Para impulsar el proceso de armado de las fibras amiloides una de las fuerzas más significativas proviene de los aminoácidos aromáticos, que tienen la capacidad de formar interacciones atractivas no covalentes, conocidas como interacciones π - π o apilamiento π , entre los anillos aromáticos planos de los residuos. Existen dos contribuciones claves por parte del apilamiento π para la formación de fibras amiloides:

- i. Proceso de autoensamblaje: el ordenamiento de los anillos aromáticos provocado por las interacciones π - π innatas, permite la liberación de moléculas de agua ordenadas ligadas a los anillos aromáticos, incrementando la entropía general de todo el sistema termodinámico.
- ii. Ordenamiento estructural: los anillos aromáticos se apilan en un patrón específico, conocido como apilamiento π de desplazamiento paralelo, dando una orientación y dirección específica que permite la obtención de estructuras supramoleculares ordenadas y definidas (fibras amiloides) y no agregados amorfos [9], [10].

1.2. Desarrollo de fibras amiloides *in vitro*

La agregación amiloide en protofilamentos y fibras de estructura ordenada, es una propiedad intrínseca de todas las cadenas polipeptídicas si se dan las condiciones apropiadas, por lo que la capacidad de formación de fibras amiloides no es particular a proteínas asociadas a enfermedades [11]. Para poder convertir una proteína a fibras amiloides *in vitro* es necesario desestabilizar parcialmente a la proteína, dado que el desarrollo de las fibras amiloides se da a partir de precursores parcialmente plegados y no de la conformación nativa de la proteína. Variaciones de temperatura, agitación, exposición a solventes orgánicos, cambios drásticos en el pH y potencial

iónico son algunas de las condiciones que permiten la formación de estados parcialmente plegados [12].

Los estados parcialmente plegados son altamente propensos a formar agregados amiloides debido a que los aceptores y donadores de puentes de hidrógeno de la cadena principal y los residuos hidrofóbicos se encuentran parcialmente expuestos así como más accesibles al solvente permitiendo uniones intermoleculares [11], [12].

El modelo de polimerización dependiente de nucleación es el modelo más aceptado para describir la formación de fibras amiloides, el cual como todas las reacciones nucleadas de autoensamblaje produce una cinética de crecimiento de función sigmoide [13]. La fibrillogénesis amiloide sigue un proceso cinético de dos pasos: nucleación y elongación, compuesto por tres fases:

- i. Fase *lag* o de retraso: también conocida como fase de nucleación es donde empieza el autoensamblaje de monómeros solubles de proteína, que sufren cambios conformacionales generando precursores desplegados, nativos o parcialmente plegados. La unión entre los primeros monómeros conocida como nucleación primaria, da paso a la aparición de fibrillas. La fase *lag* es el paso limitante de la velocidad de la reacción, siendo termodinámicamente desfavorable, por lo que ocurre lentamente, superándose cuando la concentración de fibrillas aumenta hasta el punto crítico de formación de núcleos oligoméricos [14], [15].
- ii. Fase de elongación o de crecimiento: en esta fase el mecanismo de nucleación secundaria continuará uniendo monómeros a las fibrillas formadas en la fase *lag*, que tienen sitios de unión para reaccionar en la superficie, hasta lograr la elongación de fibras amiloides ricas en lámina β . El proceso es más favorable por lo que transcurre

rápida y de manera exponencial, aunque en menor medida mecanismos secundarios como fragmentación fibrilar y nucleación primaria de monómeros contribuirán en su totalidad a la fase de crecimiento.

Fase estable o de meseta: es una fase de saturación donde la concentración de monómeros ha alcanzado el valor de equilibrio en la reacción, también ocurre la maduración de fibras para formar depósitos amiloides (**Figura 2**) [13], [15], [16].

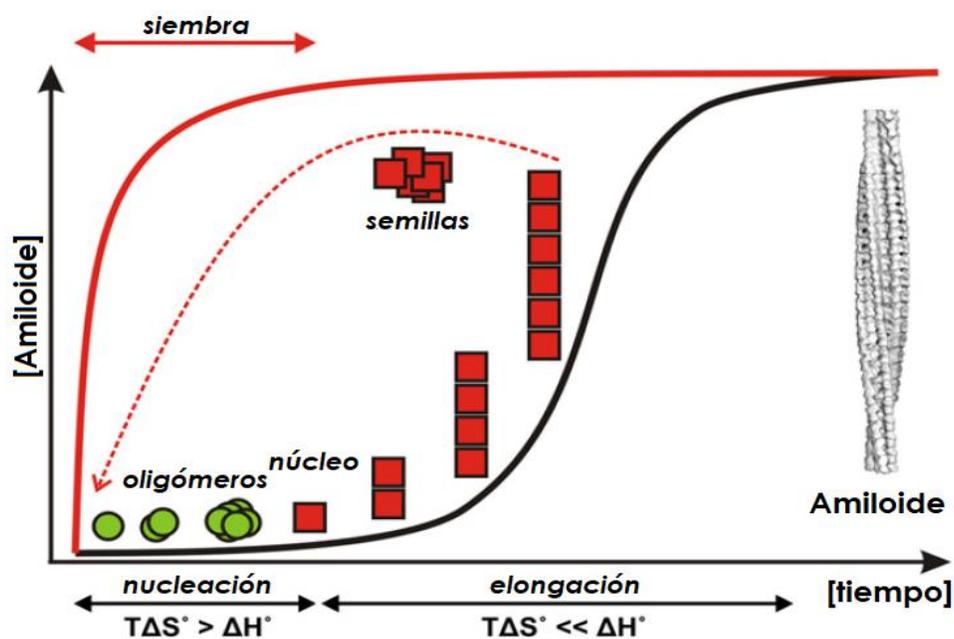


Figura 2. Cinética de formación de fibras amiloides a partir de oligómeros. La fase lag corresponde a eventos de nucleación termodinámicamente desfavorables y la fase de elongación a la termodinámicamente favorable, rápida creación de fibrillas amiloides (**línea negra**). Utilizando "semillas" (fibrillas preformadas) como base, la fase lag se acorta drásticamente (**línea roja**). Modificado de [17].

Cabe señalar que todos los procesos microscópicos descritos en el modelo se realizan en todas las fases del proceso, lo que varía son las constantes de velocidad y la actividad de las especies reactivas durante el tiempo que dure la cinética de formación de fibras amiloides [16].

Las cinéticas de crecimiento de función sigmoide permiten conocer el tiempo de duración de las fases de nucleación (*lag*) y elongación por medio de un ajuste de los datos experimentales. Existen diferentes funciones para realizar ajustes, entre ellas se encuentra la ecuación de Boltzmann que permite obtener los valores conocidos como t_{lag} y $t_{1/2}$. El punto en el tiempo de la cinética donde termina la fase *lag* y ha empezado a desarrollarse un 10 % de la fase de elongación es el valor t_{lag} y el punto en el tiempo donde se ha formado el 50 % de los agregados fibrilares es $t_{1/2}$ [16].

1.3. La HEWL y la capacidad de formar fibras amiloides

La lisozima de clara de huevo de gallina (HEWL por su siglas en inglés -*Hen Egg White Lysozyme*-) es sumamente utilizada como proteína modelo para investigar la agregación proteínica y la formación de fibras amiloides de manera *in vitro* gracias a su pequeño tamaño, excelente solubilidad en ambientes acuosos y fácil obtención [18].

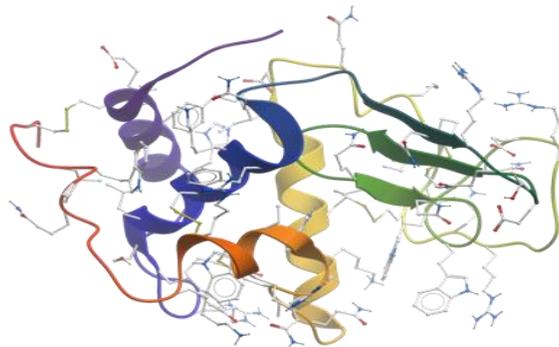


Figura 3. Estructura tridimensional de la proteína HEWL. La lisozima de clara de huevo de gallina es una proteína de una cadena polipeptídica simple compuesta de 129 residuos de aminoácidos, como enzima cataliza la hidrólisis del enlace glucosídico β -1,4 entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina del peptidoglicano, carbohidrato presente en la estructura de las paredes celulares de bacterias. Tiene un peso de 14.3 kDa cuenta con cuatro puentes disulfuro intramoleculares y un punto isoeléctrico de \sim 11.3 [18]. Tomado del PDB (2VB1).

La estructura secundaria de la HEWL tiene un dominio hélice α compuesto por cuatro hélices α (A-D), un dominio β integrado por tres hebras β (S1-S3) y tres elementos helicoidales (**Figura 3**). Los fragmentos de los dominios que formarán intermediarios parcialmente desplegados, precursores de fibras maduras altamente ordenadas, serán la hélice α C, la hélice menos propensa a conservar su estructura α , y dos de las hebras β (S2, S3) que se encuentran unidos por dos puentes de disulfuro intramoleculares (Cys64-Cys68, Cys76-Cys94). Las hélices α A, B y D con el resto de los fragmentos de la proteína se mantendrán periféricos al núcleo fibrilar, menos organizados y solubles en la solución pero con su conformación nativa.

Los residuos de aminoácidos en la región 49-101, que componen al dominio β y hélice α C, son los más propensos a entrar al estado amiloide; siendo los responsables de activar el mecanismo de formación de fibras amiloides de la HEWL [19].

1.4. Fluorescencia de la tioflavina-T

La detección de la formación de fibras amiloides y análisis de las propiedades estructurales se puede realizar utilizando diferentes sondas moleculares. Los dos colorantes más ampliamente utilizados para la tinción selectiva de conglomerados amiloides *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro* son la tioflavina-T (ThT) y el Rojo Congo[20].

La tinción utilizando Rojo Congo es un proceso laborioso, requiere de varios lavados que disminuyen la reproducibilidad y dificultan la interpretación de la birrefringencia verde-manzana característica del colorante; para su detección histológica se necesita utilizar microscopía de luz polarizada y puede unirse a materiales no fibrilares [21].

El colorante tioflavina-T tiene una estructura de benzotiazol catiónico anfipático y es un potente compuesto fluorogénico (**Figura 4a**, arriba),

aumenta su fluorescencia al unirse de manera selectiva a fibras amiloides. Su detección se da por medio de espectroscopia de fluorescencia con una emisión incrementada a 482 nm.

Se cree que el aumento intenso de la fluorescencia del ThT resulta de la inmovilización rotacional del enlace central C-C que conecta los anillos de benzotiazol y anilina que rotan libres en disolución (**Figura 4a**, abajo), cuando se restringe la rotación se originan rotámeros ThT fluorescentes. La unión del ThT es de manera paralela al eje largo de las fibras amiloides y de forma perpendicular a las láminas β , específicamente en los “canales” formados por las cadenas laterales de residuos aromáticos (**Figura 4b**) [21], [22].

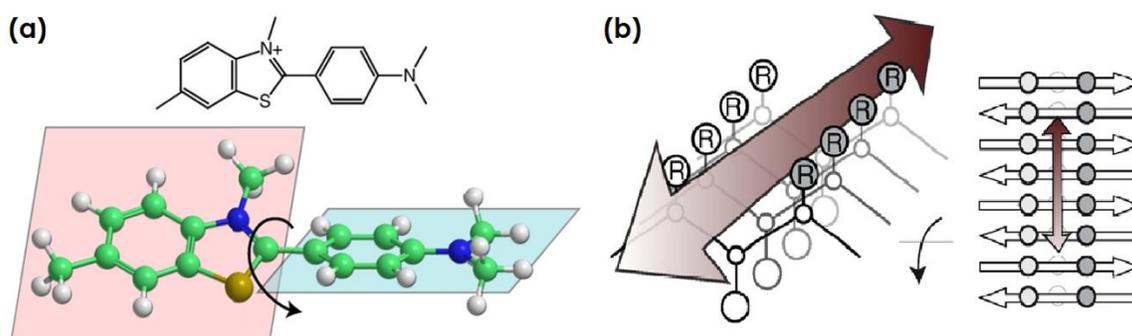


Figura 4. Tioflavina-T y mecanismo de unión a fibras amiloides. **(a)** La molécula de ThT posee una longitud de ~ 15 Å, tiene un grupo dimetilamino unido a un grupo fenilo con átomos de nitrógeno y azufre que lo hacen más polar (arriba), la estructura del compuesto permite la rotación alterna de los segmentos planos del ThT (abajo). **(b)** El modelo de unión del ThT a láminas β , plantea la unión del ThT (flecha bidireccional) a los “canales” formados por residuos de aminoácidos. Modificado de [21].

No obstante la gran utilidad del ThT como sonda detectora de fibras en cinéticas *in vitro*, su potencial reactividad cruzada hace indispensable caracterizar la formación de fibras amiloides por otras técnicas complementarias y contar con al menos otra evidencia experimental o teórica [23].

1.5. Fluorescencia intrínseca

Una técnica recientemente desarrollada para la detección del crecimiento de fibras amiloides sin la necesidad de utilizar sondas moleculares extrínsecas, es la cuantificación de la fluorescencia intrínseca. Durante el crecimiento de las estructuras de tipo amiloide se presenta un incremento de la fluorescencia con un comportamiento sigmoide idéntico al presentado en presencia del ThT [24].

El fenómeno de la fluorescencia intrínseca es una propiedad genérica del arreglo de hoja cruzada β de las fibras amiloides. El mecanismo de la emisión de fluorescencia intrínseca es desconocido, pero se ha asociado con la red de puentes de hidrógeno que se forma paralela al eje de la fibra [25].

La hipótesis general es que la fluorescencia intrínseca se origina de los estados energéticos de las hebras β , donde los electrones pertenecientes a los extensos arreglos de puentes de hidrógeno, formados por los grupos amidas de la proteína y las cadenas laterales, sufren una deslocalización parcial o la suficiente deslocalización para dar lugar a electrones “sueltos” con estados energéticos ópticamente excitables e inducir transiciones electrónicas. Las moléculas de agua en las estructuras amiloides contribuyen a la formación de la red de puentes de hidrógeno entre las láminas β y contribuyen intensamente en la deslocalización electrónica [25]–[27].

Por lo tanto, las estructuras amiloides pueden aceptar energía en forma de luz y emitir fluorescencia, siendo detectable la formación de fibras amiloides en ambientes libres de colorantes [24].

1.6. Redes metal orgánicas

Las redes metal orgánicas (del inglés *Metal-organic Frameworks*, MOFs), también conocidas como polímeros de coordinación, son una clase de material híbrido cristalino sólido poroso; se componen de la interconexión

alterna entre nodos inorgánicos (vértices) y moléculas orgánicas, unidos por enlaces de coordinación, obteniéndose estructuras periódicas tridimensionales (**Figura 5**). La extensa variedad de moléculas orgánicas empleables son denominadas ligantes, usualmente son moléculas orgánicas rígidas con anillos aromáticos y cuentan con grupos funcionales como: carboxilatos, fosfonatos, piridilos, imidazolotas, azolatos [28], [29].

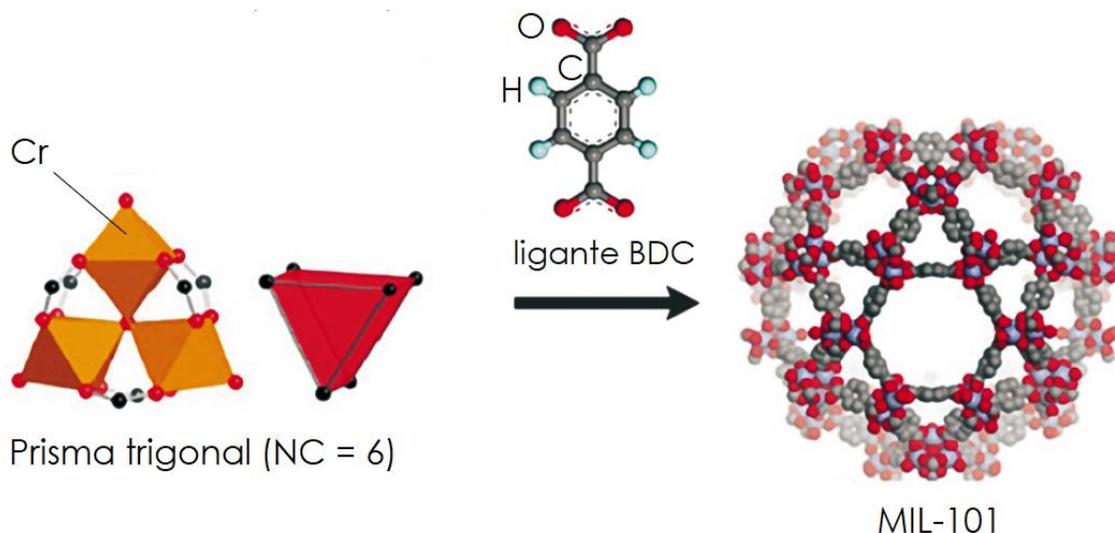


Figura 5. Componentes y estructura de una MOF. El acoplamiento entre unidades de construcción secundaria, ya sean iones metálicos o grupos metálicos coordinados por medio de átomos de oxígeno (poliedro de cromo) o nitrógeno, con un ligante orgánico (ácido tereftálico, BDC) producen materiales cristalinos (MIL-101) con (meso, micro, ultramicro) -porosidad. El número de coordinación (NC) indica la cantidad de ligantes enlazados al núcleo del aglomerado metálico, determinado por el acomodo de los átomos de carbono. Modificado de [28].

Las diferentes combinaciones posibles de ensamblaje entre bloques estructurales (nodos inorgánicos y ligantes), permite en principio, un número “infinito” de estructuras particulares, que abarcan docenas de topologías con distintas aplicaciones potenciales; las redes metal orgánicas tienen la facultad de ser diseñadas, debido a que se pueden personalizar sistemáticamente en términos de sus funcionalidades químicas y arreglos geométricos precisos, resultando en una gran diversidad de

comportamientos químicos característicos (baja densidad, gran porosidad y extensas superficies) [28], [30], [31].

Algunas de las propiedades únicas distintivas de las MOFs, que pueden ser planeadas a partir de los elementos estructurales elegidos, son áreas superficiales específicas altas (entre 1000 a 10,000 $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$), porosidad elevada (volumen de poro con 90 % de volumen libre), bajas densidades (debajo de $0.13 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$) y tamaños de poro expandibles (apertura del diámetro de poro hasta 98 Å) [28], [30].

Gracias a lo diverso y vasto de sus propiedades, las MOFs poseen un amplio rango de aplicaciones, tanto industriales como fundamentales, en distintos campos científicos abarcando, pero no limitado a: purificación, almacenamiento y separación de gases o fases líquidas (H_2 , O_2 , CH_4 , CO_2), catálisis heterogénea, detección química, conducción de protones, almacenamiento y conversión de energía, encapsulación de fármacos y degradación de sustancias tóxicas; también se han desarrollado materiales con propiedades ópticas, luminiscentes, magnéticas, semiconductoras y de activación por fotones [28], [30], [31].

Una atributo peculiar de algunas redes metal orgánicas es su capacidad para expandir o contraer el tamaño de la apertura del poro , un fenómeno conocido como “respiración” o *breathing*, que permite acomodar moléculas huésped en los poros. Propiciándole a la MOF diferentes ordenamientos flexibles, sin existir rompimiento de enlaces o pérdida de cristalinidad pero si modificando las propiedades de confinamiento y espacio disponible en el material (incremento o disminución radical del volumen de celda) [32].

Las redes metal orgánicas son materiales que cuentan con sitios químicamente reactivos conocidos como sitios metálicos de coordinación no saturados (del inglés *coordinatively unsaturated metal site*, “cus”) o sitios de

coordinación abiertos (del inglés *open coordination sites*, OCSs), se encuentran en los nodos metálicos y se desempeñan como ácidos de Lewis, teniendo la habilidad de interactuar con moléculas con propiedades de bases de Lewis por medio de enlaces débiles o fuertes de coordinación en una disociación reversible; la activación de los (cus) se da por medio de calcinación o intercambio de solvente. Esta característica particular de las MOFs es de gran importancia para aplicaciones catalíticas, y es más eficiente sobre las propiedades catalíticas de otros materiales porosos [29], [33].

La síntesis de las redes metal orgánicas es un proceso de cristalización en solución (solventes orgánicos, agua), que depende de un equilibrio entre la formación y disolución de cristales, se pueden emplear distintos métodos para su obtención: solvotérmico, electroquímica, mecanoquímica, sonoquímica, microondas); la purificación y activación del material después de la síntesis, son fundamentales para la obtención de una alta cristalinidad [28], [34].

Al emplear una red metal orgánica para cierta aplicación específica, se deben contemplar los factores que pueden perjudicar su estabilidad (ambientes acuosos, pH, aniones, iones metálicos), con el fin de dirigir la síntesis del material a la obtención de estabilidad química, térmica, hidrotérmica, mecánica o inclusive biológica, dependiendo del potencial uso. Redes metal orgánicas que sean químicamente estables en agua, así como resistentes a procesos de hidrólisis y humedad, poseen estructuras con fuertes enlaces de coordinación (estabilidad termodinámica) y un impedimento estérico relevante (estabilidad cinética) [31], [34].

1.7. Interacción de MOF con proteínas

Las redes metal orgánicas con mayor capacidad de adsorción y estabilidad en sistemas acuosos son los materiales tipo MIL-*n*, debido a la gran diversidad de estructuras y tamaños de poros; usualmente son considerados compuestos altamente hidrofílicos mesoporosos. Las MOFs del género MIL-*n* pueden adsorber o inmovilizar proteínas sobre la superficie de las redes metal orgánicas, a través de la formación de interacciones covalentes y no covalentes [31].

Existen cuatro métodos de síntesis para obtener la inmovilización de una enzima en una red metal orgánica, formando compuestos tipo MOF-enzima:

- i. Fijación superficial: las enzimas se inmovilizan en la superficie de las redes metal orgánicas, la fijación se da por interacciones débiles no específicas. No es necesario la existencia de grupos funcionales específicos o un tamaño de poro específico por lo que una gran variedad de redes metal orgánicas se pueden utilizar por este método. Es el método más directo donde solo es necesario mezclar la enzima en una solución que contenga la red metal orgánica.
- ii. Unión covalente: las enzimas se pueden anclar de manera covalente a la superficie de la red metal orgánica por medio grupos aminos libres que se unen con grupos carboxílicos libres para formar un enlace peptídico, los dos tipos de grupos funcionales se pueden encontrar en la superficie de la enzima o de la MOF.
- iii. Encapsulación en poros: en este método redes metal orgánicas con cavidades mesoporosas son mejores que los materiales de cavidades microporosas gracias a las ventajas intrínsecas de los materiales mesoporosos, algunos de ellas son la encapsulación de enzimas debido a un mayor volumen de poro, las enzimas se adsorben en la cavidad en lugar de permanecer solo en la superficie mejorando la

estabilidad, hay selectividad del sustrato debido al tamaño de poro específico de cada MOF.

- iv. Coprecipitación: las enzimas se inmovilizan *in situ* durante el proceso de síntesis de la MOF, las enzimas son recubiertas por la red metal orgánica mientras se realiza la síntesis; este método no permite usar métodos de síntesis de redes metal orgánicas a grandes temperaturas.

Con excepción del método por unión covalente donde nuevos enlaces químicos se forman, la unión entre enzima y MOF de los otros tres métodos se da por interacciones de van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones π - π [35].

Un potencial nuevo inhibidor debe retardar la velocidad de formación fibrilar de una cinética de formación de fibras amiloides, una molécula exógena (inhibidor) puede alterar el desarrollo tradicional de una cinética de formación de fibras amiloides por dos razones:

- i. Efecto cinético: se perturban las constantes de velocidad de las fases de nucleación o elongación por el efecto de algún compuesto, causado por la afinidad entre el inhibidor y la proteína, si un compuesto se une a la proteína causando inhibición se denomina inhibidor “verdadero”.
- ii. Efecto termodinámico: se alteran las fuerzas termodinámicas necesarias para la fibrillogénesis, es causado por factores externos (fuerza iónica, pH, amontonamiento molecular, equilibrio electrostático) o compuestos (inhibidores, surfactantes, sales de iones) que no requieren de afinidad química con la proteína, solamente modifican el medio de reacción, estos compuestos se denominan inhibidores “aparentes”.

Es necesario analizar los efectos de los factores externos y las interacciones entre potenciales inhibidores y la proteína o fibrillas, para poder discernir entre inhibidores "aparentes" y "verdaderos" [36].

1.8. BioMOFs: MOFs biológicas

La utilidad de las redes metal orgánicas se ha enfocado principalmente a fines industriales, en medios inorgánicos, pero en los últimos años el estudio de las MOFs, con potenciales aplicaciones biológicas y médicas, se ha ampliado. Los campos explorados hasta el momento son: como vehículos de entrega de fármacos terapéuticos (ibuprofeno, cidofovir) o agentes cosméticos, captura y liberación de gases biológicos (NO, CO) con fines antibacterianos, antitrombóticos o de cicatrización y en imagenología (como agentes de contraste) con desempeños teranósticos.

Una MOF puede poseer una probable función biológica, cuando la estructura y características fisicoquímicas de la red metal orgánica permita obtener toxicidades aceptables y degradaciones fisiológicas adecuadas, en el momento de su interacción con medios biológicos.

Se han realizado estudios toxicológicos tanto *in vitro* como *in vivo*, para determinar la biocompatibilidad de las redes metal orgánicas, un estudio demostró que la administración vía intravenosa a ratas en grandes cantidades ($220 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) de MOF (de hierro y ligandos con carboxilatos), no presentó efectos toxicológicos o perjudiciales después de la exposición. Por otra parte, experimentos *in vivo* indicaron que MOFs de carboxilato de hierro, son degradadas por el bazo e hígado siendo posteriormente eliminadas por medio de orina y heces; indicando la naturaleza biodegradable del material.

La aplicación más prometedora hasta el momento es la de encapsulación y liberación controlada de fármacos, debido a la alta porosidad, las MOFs

pueden encapsular hasta un 42 %w de fármaco, excediendo por mucho la capacidad de cualquier liposoma, polímero o vehículo de reparto existente.

Ciertas redes metal orgánicas bajo condiciones fisiológicas *in vitro* exhiben una degradación paulatina, y aunque algunas MOFs presenten cierta inestabilidad química en fluidos corporales, no representa un obstáculo para desempeñar su función adecuadamente; por el contrario, permite una liberación controlada del fármaco durante largos periodos de tiempo, con la posterior eliminación del vehículo, evitando aglomeración y acumulación endógena. Cabe mencionar que algunas MOFs cuentan ya con aprobación médica para desempeñarse como fármacos de línea [37], [38].

Algunas de las cualidades de las MOFs que posibilitan su desarrollo, para eventuales ocupaciones biológicas son:

- i. Uso de metales no tóxicos y biocompatibles (Fe, Mg, Ca, Zn, Mn, Cu) con ligantes de toxicidad baja (ácidos fosfónicos o carboxílicos), para la síntesis de materiales altamente porosos.
- ii. La mayoría de la MOFs son biodegradables en medios acuosos. Hasta cierto punto, pueden resistir en amortiguadores salinos (PBS, BSA) desde unos días hasta varias semanas; dependiendo de la estructura cristalina, tamaño de partícula, estructura y composición de la MOF.
- iii. El microambiente interno dual (hidrofóbico/hidrofílico), permite hospedar una alta diversidad de moléculas, con distintas propiedades químicas.
- iv. Las interacciones entre huésped y hospedero se pueden modular, mediante la funcionalización del ligante con moléculas polares o apolares, modificando el tamaño de poro, la flexibilidad de la MOF, así como la interconectividad de la estructura tridimensional, o una combinación de dichas modificaciones.

Las BioMOFs o MOFs bioactivas son redes metal orgánicas constituidas por elementos endógenos al cuerpo humano, donde los nodos inorgánicos son metales con actividad biológica y los ligantes orgánicos son biomoléculas (aminoácidos, péptidos, bases nitrogenadas, proteínas), con o sin modificaciones; también la misma molécula terapéutica (fármaco) puede fungir como ligante siendo parte de la estructura del material, eliminando así el proceso de encapsulación [37], [38].

Dada la gran cantidad de redes metal orgánicas existentes, y su extensa lista de propiedades biofísicoquímicas, el espectro de potenciales aplicaciones biológicas es sumamente amplio todavía. En la actualidad no existe ningún estudio o experimento, concerniente al uso de redes metal orgánicas para la inhibición de fibras amiloides.

II. JUSTIFICACIÓN

El plegamiento no convencional de ciertas proteínas en estado fisiológico puede resultar en la formación del estado amiloide, asociado actualmente con alrededor de 50 padecimientos de distinta índole. En la actualidad no existe ningún tratamiento que pueda evitar o revertir el estado amiloide, aunque se han probado diferentes moléculas y técnicas, todavía no hay alguna que haya mostrado una eficiencia aceptable. Las redes metal orgánicas son compuestos porosos nanométricos estructurados a partir de iones metálicos y ligantes orgánicos, poseen estructuras tridimensionales y propiedades fisicoquímicas únicas y diferentes a cualquier otro tipo de molécula o material. Las MOFs debido a sus componentes orgánicos, inorgánicos y topología, podrían debilitar o interferir con las interacciones entre proteínas, necesarias para la formación del estado amiloide. Adquiriendo la potencial habilidad de funcionar como intercaladores e inhibidores de fibras amiloides. Algunas características de las MOFs, como alta estabilidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad, permiten pensar en una plausible función como fármaco inhibitorio.

III. HIPÓTESIS

Si las estructuras y las características fisicoquímicas de materiales de tipo red metal orgánica (MOF) son adecuadas para interactuar con proteínas como la HEWL en un modelo de formación de fibras amiloides, entonces estos materiales pueden funcionar como inhibidores potenciales del proceso de formación del estado amiloide.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Sintetizar y caracterizar redes metal orgánicas conteniendo ácido trimésico o ácido tereftálico en combinación con los metales Cu^{+2} , Al^{+3} , Fe^{+3} o Mg^{+2} para su posterior evaluación como inhibidores potenciales en la agregación amiloide de la HEWL como modelo *in vitro*.

4.2. Objetivos particulares

- Sintetizar redes metal orgánicas por diferentes técnicas de calentamiento (solvotermal, microondas y convencional) utilizando como ligantes orgánicos ácido trimésico y ácido tereftálico en combinación con los metales: Cu^{+2} , Al^{+3} , Fe^{+3} y Mg^{+2} .
- Purificar y caracterizar los compuestos sintetizados por medio de difracción de rayos X en polvo (DRX), espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR), análisis termogravimétrico (TGA).
- Generar un modelo biológico *in vitro* de amiloidogénesis, utilizando la HEWL en un solvente orgánico polar (etanol), donde las redes metal orgánicas sean dispersables y estables.
- Llevar a cabo cinéticas de formación de fibras amiloides y observar si existe inhibición utilizando las redes metal orgánicas sintetizadas a

diferentes concentraciones por medio de la fluorescencia del THT y la fluorescencia intrínseca.

- Caracterizar las redes metal orgánicas después de concluir la cinética de formación de fibras amiloides por medio de difracción de rayos X en polvo (DRX), espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) y análisis termogravimétrico (TGA).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

5.1.1. Disolventes

N,N-dimetilformamida (DMF) (99%), agua Milli-Q (H₂O), agua inyectable (Pisa), etanol absoluto (EtOH), alcohol etílico grado biología molecular (100%), trietilamina (Et₃N), ácido nítrico, metanol, la mayoría de los solventes fueron marca Sigma-Aldrich.

5.1.2. Reactivos

Los reactivos ácido benceno-1,3,5-tricarboxílico (BTC), ácido benceno-1,4-dicarboxílico (BDC) [98%], cloruro de hierro (III) hexahidratado (FeCl₃·6H₂O) [98-102%], nitrato de cobre (II) trihidratado (Cu(NO₃)₂·3H₂O) [98.0-102.0%], nitrato férrico (III) nonahidratado (Fe(NO₃)₃·9H₂O) ..[98.0-101.0%], nitrato de aluminio (III) nonahidratado (Al(NO₃)₃·9H₂O) [98.0-102.0%], nitrato de magnesio (II) hexahidratado (Mg(NO₃)₂·6H₂O) [99%], lisozima liofilizada de clara de huevo de gallina (HEWL), tioflavina-T, fosfato de sodio monobásico (NaH₂PO₄), fueron marca Sigma-Aldrich.

5.2. Metodología

5.2.1. Síntesis de redes metal orgánicas (MOF)

MOF HKUST-1(Cu)

La red metal orgánica **HKUST-1(Cu)** se sintetizó siguiendo una metodología modificada previamente descrita por Loera-Serna *et al* [39]. Se pesó 0.5 g (2.37 mmol) de ácido benceno-1,3,5-tricarboxílico (BTC) y se disolvió en 100 mL de DMF/EtOH/H₂O (1:1:1 v/v) a su vez se pesó 1.05 g (4.34 mmol) de nitrato de cobre (II) trihidratado (Cu(NO₃)₂•3H₂O) disolviéndose en 100 mL de la misma mezcla de solventes, se juntaron las dos soluciones y se agregó 0.5 mL de trietilamina dejándose en agitación por 7 h, se centrifugó la solución a 14,000 rpm hasta recolectar todo el precipitado azul. El precipitado con 20 mL de la mezcla de solventes se puso en un reactor de acero inoxidable y celda de teflón (45 mL) a 120 °C por 24 h. La reacción se recolectó en tubos cónicos (25 mL) y se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min, se decantó el sobrenadante, posteriormente se filtró al vacío y se lavó con 2 × 20 mL de DMF/EtOH/H₂O (1:1:1 v/v), el precipitado azul se secó a 60 °C por 5 h.

MOF MIL-53(Cu)

Para la síntesis de la red metal orgánica **MIL-53(Cu)** se siguió la metodología de Tannenbaum *et al.* [40] ligeramente modificada. Se colocaron en un mortero 0.23 g (0.95 mmol) de nitrato de cobre(II) trihidratado (Cu(NO₃)₂•3H₂O) y 0.16 g (0.96 mmol) de ácido benceno-1,4-dicarboxílico (BDC), los reactivos se molieron durante 10 min. Posteriormente se pasaron a un vaso de precipitados (25 mL) con 13 mL de agua Milli-Q y se dejaron en agitación por otros 10 min, se agregaron 4 µL de ácido nítrico (1 mol). La mezcla se vació en un reactor de acero inoxidable y celda de teflón (45 mL) junto con otros 5 mL de agua Milli-Q y se dejó en una estufa a 220 °C por 72 h. La reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, se centrifugó la mezcla de reacción en un tubo cónico (25 mL) a 14,000 rpm por 20 min y el

precipitado se resuspendió en un solución compuesta por 15 mL de DMF y 15 mL de agua Milli-Q durante 18 h, se volvió a centrifugar varias veces en DMF solamente hasta que la solución no mostrara impurezas visibles. Se filtró al vacío y se lavó con 2 × 25 mL de etanol absoluto, se dejó secar a 80 °C por 2 h.

MOF MIL-100(Fe)

La síntesis de la red metal orgánica **MIL-100(Fe)** se realizó por medio del método de microondas, usando una metodología modificada descrita anteriormente por Horcajada *et al* [41]. En un vial de vidrio con tapa hermética se colocaron 0.60 g (8.97 mmol) de nitrato de hierro(III) nonahidratado ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) y 0.84 g (3.99 mmol) de ácido benceno-1,3,5-tricarboxílico y se agregaron 15 mL de agua Milli-Q, la mezcla se introdujo a un reactor de microondas modelo Monowave 200, marca Anton Paar a 130 °C por 6 min (800 watts, 2,450 MHz) con agitación. El precipitado rojizo se filtró al vacío y se lavó con 2 × 25 mL de etanol absoluto, finalmente el sólido se secó en una estufa a 80 °C por 16 h.

MOF MIL-53(Fe)

La red metal orgánica **MIL-53(Fe)** se sintetizó utilizando una metodología modificada acorde con la descrita por Kazemian *et al* [42]. En un matraz de bola de fondo plano (250 mL) se colocaron 15 mL de DMF, en este volumen se disolvieron 0.16 g (0.96 mmol) de ácido benceno-1,4-dicarboxílico (BDC) y 0.27 g (0.99 mmol) de cloruro de hierro(III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). La mezcla se mantuvo en agitación durante 15 min, y se elevó la temperatura hasta ~130 °C por 18 h en una parrilla de calentamiento con agitación. La reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, el precipitado anaranjado se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min luego se filtró al vacío y se lavó con 2 × 25 mL de DMF, posteriormente la muestra se dejó secar durante una noche a 80 °C.

MOF MIL-96(Al)

Se utilizó la metodología descrita por Kong *et al.* [43] para la síntesis de la **MIL-96(Al)**. Se disolvieron en 15 mL de agua Milli-Q 0.32 g (0.85 mmol) de nitrato de aluminio(III) nonahidratado ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) y 0.28 g (1.33 mmol) de ácido benceno-1,3,5-tricarboxílico por 10 min con agitación, la solución se colocó en un reactor de acero inoxidable y celda de teflón (45 mL) a 150 °C por 72 h. La reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, el precipitado blanco se centrifugó a 14,000 rpm por 20 min, posteriormente se filtró al vacío y se lavó con 3 × 20 mL de DMF. El compuesto blanco se dejó en un matraz de bola de fondo plano (50 mL) con 30 mL de DMF en agitación a ~150 °C por 12 h. Se volvió a filtrar al vacío y se lavó con (2 × 20 mL) de etanol absoluto, se secó a 80 °C por 18 h.

MOF MIL-53(Al)

La **MIL-53(Al)** se sintetizó utilizando variantes de diversas metodologías [44], [45]. En un reactor de acero inoxidable y celda de teflón (45 mL) se pusieron 0.28 g (1.73 mmol) de ácido benceno-1,4-dicarboxílico (BDC) y 1.3 g (3.46 mmol) de nitrato de aluminio(III) nonahidratado ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) a reaccionar en presencia de 20 mL de agua Milli-Q a 220 °C por 72 h. Se dejó enfriar a temperatura ambiente la celda y se filtró al vacío, el precipitado blanco se lavó con etanol absoluto hasta que el pH de la solución filtrada fue de ~ 7.0, el pH se verificó con tiras reactivas, se secó a 100 °C por 45 h. Se puso durante 17 h en 15 mL de DMF, se filtró al vacío y se lavó con DMF caliente (2 × 15 mL), después se lavó con metanol 2 × 20 mL. Se dejó en 25 mL de metanol por 4 h, posteriormente se centrifugó y se secó a 100 °C por 5 h. El material se activó calcinándolo en una mufla marca Yamato modelo FO210CR a 329 °C por 72 h [46].

MOF NICS-6(Mg)

La red metal orgánica **NICS-6(Mg)** se sintetizó siguiendo una metodología modificada previamente descrita por Mazaj *et al* [47]. Se solubilizaron 0.77 g (3 mmol) de nitrato de magnesio(II) hexahidratado ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y 0.42 g (1.99 mmol) de ácido benceno-1,3,5-tricarboxílico en un matraz de bola (250 mL) con 50 mL de etanol absoluto, la reacción se puso en agitación a ~ 120 °C por 4 h. Se redujo el volumen de la reacción en un rotavapor a ~ 20 mL y se vertió en un reactor de acero inoxidable y celda de teflón (45 mL). Se colocó en la estufa a 190 °C por 24 h. La reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, se filtró al vacío y se lavó con 4×15 mL de etanol absoluto, posteriormente se dejó secar a 100 °C por 14 h [47].

5.2.2. *Dispersión de las redes metal orgánicas*

Previo a la evaluación de las redes metal orgánicas, éstas se dispersaron hasta conseguir la mayor estabilidad coloidal. Se pesó la red metal orgánica y se solvató con 1 mL de alcohol etílico absoluto, de la muestra de 1 g. Se realizaron diluciones seriadas hasta la concentración de 0.01 g. Todas las muestras se sonicaron entre 15-20 min o hasta que la dispersión estuviera totalmente estabilizada.

5.2.3. *Formación de fibras amiloides con la proteína HEWL en presencia de etanol*

Las fibras amiloides se formaron a una concentración final de 65 % de alcohol etílico grado biología molecular (absoluto), se preparó una solución madre de lisozima ($25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) en *buffer* de fosfatos de sodio a pH 7.25, (5 mM). El control positivo de formación de fibras amiloides en etanol se llevó a cabo por triplicado en una placa de 96 pozos (Costar) con tapa translúcida, la concentración final de alcohol etílico fue (2.12 mM), de lisozima ($69.44 \mu\text{M}$) en *buffer* de fosfatos pH 7.25, (1.55 mM). Por último se pusieron 2 μL de ThT (10 mM), con una concentración final de (0.67 mM) en un pozo con volumen

final de 300 μL . Para los experimentos de fluorescencia intrínseca, el procedimiento anterior se repitió pero se omitió el ThT y se sustituyó por *buffer* de fosfatos pH 7.25, (5 mM). Todos los *buffers* se realizaron usando agua inyectable.

La placa con la tapa traslúcida se selló con parafilm, la incubación duró 18 h a 25 ± 1 °C sin agitación y se midió la fluorescencia en un lector de placas híbrido multi-modal (BioTek Synergy H1). Se usaron dos lecturas diferentes cada 5 min; la primera para la detección de la fluorescencia del ThT a 450 nm para la excitación y a 490 nm para la emisión, la segunda a 295 y 335 nm, excitación y emisión respectivamente, para la fluorescencia intrínseca.

5.2.4. Evaluación de la inhibición de las fibras amiloides de HEWL con las redes metal orgánicas a diferentes concentraciones

Se evaluaron las siete redes metal orgánicas en las mismas condiciones, siguiendo el proceso anteriormente descrito. Las diferentes concentraciones de red metal orgánica se añadieron al final del proceso y se agitó en un vortex antes de agregarse (**Tabla 1**). Se realizaron controles positivos de buffer de fosfatos, HEWL y ThT, ThT y *buffer* de fosfatos y etanol. Los controles negativos consistieron de la red metal orgánica y ThT, la red metal orgánica en ausencia de ThT y HEWL. Todos los experimentos se realizaron por triplicado posteriormente se promediaron, se calculó su desviación estándar y se graficaron ajustando la función sigmoidea con la ecuación de Boltzmann (**apéndice B**) en el programa OriginPro 2016, para obtener los valores $t_{1/2}$ y t_{lag} .

Tabla 1. Volumen, concentración inicial y concentración final de red metal orgánica utilizada por pozo para inhibir.		
Concentración ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Volumen (μL)	Concentración final ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
2	150	1
1	43	0.1
0.1	43	0.01
0.01	43	0.001

5.2.5. Prueba de estabilidad de las redes metal orgánicas

Se pesaron 30 mg de cada red metal orgánica y se colocaron en un tubo cónico (15 mL) se agregó 9.75 mL de etanol absoluto y 5.25 mL de *buffer* de fosfatos de sodio pH: 7.25 (5 mM), posteriormente se sonicó de 15-20 min hasta dispersión y se dejó la solución a temperatura ambiente (25 °C) por 18 h. Pasadas las 18 h se centrifugaron los tubos a 14,000 rpm durante 10 min y se decantó el sobrenadante, se secó el precipitado en una estufa a 80 °C por 24 h; previo a la decantación se realizaron lecturas del pH, los valores se resumen en la **tabla 1, apéndice A**. Finalmente, los materiales se caracterizaron nuevamente por las técnicas de: DRX, FTIR y TGA.

5.2.6. Caracterización de las redes metal orgánicas recién sintetizadas y después de la prueba de estabilidad

Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros de FTIR se realizaron en un espectrofotómetro Bruker Tensor-27. Se usó la técnica de transmisión en pastilla con el intervalo de 4000 a 450 cm^{-1} . Se utilizó bromuro de potasio (KBr) para la caracterización de las muestras.

Difracción de rayos X (DRX) de polvos

Los difractogramas de rayos X (DRX) se obtuvieron utilizando un difractómetro marca Bruker, modelo D2 Phaser, acoplado a un ánodo de cobre, empleando radiación de rayos X Cu $\text{K}\alpha_1$ $\lambda=1.5406 \text{ \AA}$, con un monocromador de haz difractado; la velocidad de barrido empleada fue de $0.0075 \text{ }^\circ\cdot\text{s}^{-1}$, en un intervalo 2θ de 5 a 50 ° .

Análisis Termogravimétrico (TGA)

La estabilidad térmica de cada muestra se analizó en un equipo termogravimétrico marca Perkin Elmer, modelo TGA-4000 usando una velocidad de calentamiento de $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ en un intervalo de 20 a $995 \text{ }^\circ\text{C}$ en atmósfera de N_2 con un flujo $20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Se llevó a cabo un análisis de la

primera derivada del termograma para precisar los intervalos de temperatura para cada proceso encontrado.

Caracterización de las redes metal orgánicas

HKUST-1(Cu): sólido azul, rendimiento 88.7 % base seca de acuerdo a TGA.

FTIR (ν , cm^{-1} , KBr): 3340 (OH), 1643 ($\text{COO}_{\text{aniso}}$)_{asim}, 1583 (COO_{iso})_{asim}, 1446 ($\text{COO}_{\text{aniso}}$)_{sim}, 1374 (COO_{iso})_{sim}, 1113, 759, 730 (Cu-O), 490. **DRX** (2θ , °, (intensidad)_[h k l] fase cristalina): 6.7 (113)_[2 0 0], 9.5 (495)_[2 2 0], 11.6 (1371)_[2 2 2], 13.4 (496)_[4 0 0], 14.7 (102)_[3 3 1], 15 (141)_[4 2 0], 16.5 (119)_[4 2 2], 17.5 (285)_[5 1 1], 19 (527)_[4 4 0], 20.2 (139)_[6 0 0], 21.3 (42)_[6 2 0], 23.4 (72)_[4 4 4], 24.1 (142)_[5 5 1], 26 (177)_[7 3 1], 27.7 (35)_[7 3 3], 28 (54)_[6 6 0], 29.4 (151)_[7 5 1], 35.2 (112)_[7 7 3], Cu_2O 36.4 (243), 37.9 (39)_[1 1 1], 39.2 (110)_[8 8 2], 41.5 (45)_[7 7 7], Cu_2O 46 (47), 47.2 (55). **TGA** ($T_{\text{intervalo}}$ [°C] (% pérdida de peso)): 25-100 (5.5), 100-200 (8), 200-327 (20), 327-390 (27), 390-604 (7), 604-687 (-1), 687-800 (1).

HKUST-1(Cu)-tratada: sólido azul. **FTIR** (ν , cm^{-1} , KBr): 3421 (OH), 1709 (COOH), 1643 ($\text{COO}_{\text{aniso}}$)_{asim}, 1569 (COO_{iso})_{asim}, 1446 ($\text{COO}_{\text{aniso}}$)_{sim}, 1374 (COO_{iso})_{sim}, 1109, 761, 730 (Cu-O), 488. **DRX** (2θ , °, (intensidad)_[h k l]): 9.4 (321)_[2 2 0], 11.6 (724)_[2 2 2], 13.9 (204)_[4 0 0], 14.8 (58)_[3 3 1], 15.1 (62)_[4 2 0], 16.4 (58)_[4 2 2], 17.4 (102)_[5 1 1], 18.9 (182)_[4 4 0], 19.1 (182)_[4 4 0], 20.3 (38)_[6 0 0], 21.2 (38)_[6 2 0], 23.3 (22)_[4 4 4], 24.1 (58)_[5 5 1], 25.9 (114)_[7 3 1], 28.7 (78)_[6 6 0], 29.4 (78)_[7 5 1], 35.1 (43)_[7 7 3], 38.3 (31)_[1 1 1], 39.0 (54)_[8 8 2], 41.6 (34)_[1 1 5 1], 44.3 (49)_[10 8 2]. **TGA** ($T_{\text{intervalo}}$ [°C] (% pérdida de peso)): 25-180 (30), 180-292 (2), 292-396 (33), 396-516 (5), 516-574 (-1), 574-798 (0.5).

MIL-53(Cu): sólido turquesa, rendimiento 30.6 % base seca de acuerdo a TGA. **FTIR** (ν , cm^{-1} , KBr): 3608 (OH), 1565 ($\text{COO}_{\text{aniso}}$)_{asim}, 1503 (COO_{iso})_{asim}, 1427 ($\text{COO}_{\text{aniso}}$)_{sim}, 1382 (COO_{iso})_{sim}, 1100 (H-C=C), 1015 (H-C=C), 918, 827, 739 (Cu-O), 558, 469. **DRX** (2θ , °, (intensidad)_[h k l] fase cristalina): 8.9 (5239)_[0 1 1], 14.4 (356)_[1 0 1], 15.5 (617)_[0 0 2], 17.9 (1400)_[0 3 1], 26.9 (181)_[1 2 3], 28.8 (424)_[0 2 4], 29.3 (304)_[0 2 4], 31.4 (124)_[2 2 2], 31.8 (190)_[0 6 0], 33.7 (131)_[0 5 3], 36.2 (197)_[2 4 2], 45.6 (183)_[0 8 2].

TGA ($T_{\text{intervalo}}$ [°C] (% pérdida de peso)): 25-308 (0.5), 308-410 (21.5), 410-475 (35), 475-578 (-6.5), 578-925 (-1.5), 925-998 (4.5).

MIL-53(Cu)-tratada: sólido turquesa. **FTIR** (ν , cm^{-1} , KBr): 3608 (OH), 1565 ($\text{COO}_{\text{aniso}}$)_{asim}, 1503 (COO_{iso})_{asim}, 1427 ($\text{COO}_{\text{aniso}}$)_{sim}, 1382 (COO_{iso})_{sim}, 1100 (H-C=C), 1015 (H-C=C), 918, 827, 739 (Cu-O), 558, 469. **DRX** (2θ , °, (intensidad)_[h k l]): 8.9 (2691)_[0 1 1], 14.4 (215)_[1 0 1], 15.5 (357)_[0 0 2], 17.9 (819)_[0 3 1], 26.9 (117)_[1 2 3], 28.8 (286)_[0 2 4], 29.3 (362)_[0 2 4], 31.4 (93)_[2 2 2], 31.8 (175)_[0 6 0], 33.7 (131)_[0 5 3], 36.2 (166)_[2 4 2], 45.6 (141)_[0 8 2]. **TGA** ($T_{\text{intervalo}}$ [°C] (% pérdida de peso)): 25-308 (0.5), 308-410 (21.5), 410-475 (35), 475-578 (-6.5), 578-925 (-1.5), 925-998 (4.5).

MIL-100(Fe): sólido rojizo, rendimiento 34.3 %, base seca de acuerdo a TGA. **FTIR** (ν , cm^{-1} , KBr): 3670-3100 (OH), 3085 (C-H), 1715 (COOH), 1628 ($\text{COO}_{\text{aniso}}$)_{asim}, 1573 (COO_{iso})_{asim}, 1448 ($\text{COO}_{\text{aniso}}$)_{sim}, 1381 (COO_{iso})_{sim}, 1120 (H-C=C), 947 (H-C=C), 759 (C-H), 712 (C-H), 624, 484 (Fe-O), 464 (Fe-O). **DRX** (2θ , °, (intensidad)_[h k l] fase cristalina): 10.2 (76)_[8 2 2], 10.4 (56)_[7 5 1], 10.7 (90)_[8 4 0], 11 (137)_[9 1 1], 13.8 (16)_[11 3 1], 14.9 (14)_[12 2 2], 17.9 (20)_[13 7 1], 18.5 (20)_[14 6 2], 20 (23)_[15 5 5], 24 (16)_[17 9 5], 27.7 (13)_[18 14 0], 28 (14)_[23 1 1]. **TGA** ($T_{\text{intervalo}}$ [°C] (% pérdida de peso)): 25-122 (5), 122-300 (5), 300-429 (25), 429-541 (21), 541-767 (4.5).

MIL-100(Fe)-tratada: sólido rojizo. **FTIR** (ν , cm^{-1} , KBr): 3692-3100 (OH), 3085 (C-H), 1710 (COOH), 1628 ($\text{COO}_{\text{aniso}}$)_{asim}, 1573 (COO_{iso})_{asim}, 1448 ($\text{COO}_{\text{aniso}}$)_{sim}, 1381 (COO_{iso})_{sim}, 1106 (H-C=C), 1034 (H-C=C), 759 (C-H), 712 (C-H), 623, 484 (Fe-O), 464(Fe-O). **DRX** (2θ , °, (intensidad)_[h k l]): 10.2 (68)_[8 2 2], 10.4 (55)_[7 5 1], 10.7 (86)_[8 4 0], 11 (112)_[9 1 1], 13.6 (13)_[11 3 1], 14.9 (12)_[12 2 2], 17.9 (16)_[13 7 1], 18.8 (19)_[14 6 2], 20 (18)_[15 5 5], 24 (13)_[17 9 5], 27.8 (10)_[18 14 0], 28 (16)_[23 1 1]. **TGA** ($T_{\text{intervalo}}$ [°C] (% pérdida de peso)): 25-120 (22), 120-300 (5), 300-429 (26), 429-541 (15), 541-767 (4.5).

MIL-53(Fe): sólido anaranjado opaco, rendimiento 50.9 %. **FTIR** (ν , cm^{-1} , KBr): 3360-3105 (OH), 1660 ($\text{COO}_{\text{aniso}}$)_{asim}, 1598 (COO_{iso})_{asim}, 1503 (C=O_{DMF}→Fe), 1436 ($\text{COO}_{\text{aniso}}$)_{sim}, 1392 (COO_{iso})_{sim}, 1015 (OH), 887 (Fe-O(H)-Fe), 822 (Fe-O(H)-

Fe), 749 (H-C=C), 555 (Fe-O). **DRX** (2θ , °, (intensidad)_[h k l] fase cristalina): 9.3 (521)_[0 1 1], 9.6 (101)_[0 0 2], 12.5 (124), 13.9 (51), 16.1 (56), 16.5 (69)_[0 1 3], 17 (36), 18.7 (270)_[0 2 2], 19.3 (58)_[0 0 4], 20.9 (22)_[1 2 -1], 21.3 (31)_[1 2 1], 21.8 (134), 25.8 (41), 26.1 (41), 28.3 (41)_[0 0 3]. **TGA** (T_{intervalo} [°C] (% pérdida de peso)): 25-109 (3), 109-162 (0), 162-299 (7), 299-398 (24), 398-530 (30), 530-793 (9).

MIL-53(Fe)-tratada: sólido anaranjado opaco. **FTIR** (ν , cm⁻¹, KBr): 3306 (OH), 1662 (COO_{aniso})_{asim}, 1598 (COO_{iso})_{asim}, 1504 (C=O_{DMF}→Fe), 1436 (COO_{aniso})_{sim}, 1393 (COO_{iso})_{sim}, 1017, 822, 750 (H-C=C), 553 (Fe-O). **DRX** (2θ , °, (intensidad)_[h k l]): 9.4 (205)_[0 1 1], 10.5 (31), 12.5 (45), 16.2 (20), 16.5 (22)_[0 1 3], 17.3 (17), 18.9 (71)_[0 2 2], 19.2 (28)_[0 0 4], 22.0 (30), 24.4 (42), 27.8 (17), 29.6 (35), 31.7 (73). **TGA** (T_{intervalo} [°C] (% pérdida de peso)): 25-100 (7), 100-204 (3), 204-310 (12), 310-397 (16), 397-532 (26), 532-794 (1).

MIL-96(Al): sólido blanco, rendimiento 73.22 %, base seca de acuerdo a TGA. **FTIR** (ν , cm⁻¹, KBr): 3467 (OH), 2372 (Al⁺³←OCO), 1718 (COOH), 1661 (COO_{aniso})_{asim}, 1623, 1579 (COO_{iso})_{asim}, 1457 (COO_{aniso})_{sim}, 1401 (COO_{iso})_{sim}, 1079 (Al-OH), 768 (H-C=C), 735 (H-C=C), 634, 540, 430. **DRX** (2θ , °, (intensidad)_[h k l] fase cristalina): 7.1 (102)_[1 0 0], 7.6 (228)_[1 0 1], 9 (2492)_[1 0 2], 11 (228)_[1 0 3], 12.3 (58)_[2 -1 0], 13.3 (140)_[1 0 4], 13.5 (190)_[2 -1 2], 14.2 (272)_[2 0 0], 14.5 (241)_[2 0 1], 15.3 (134)_[2 0 2], 16.6 (493)_[2 0 3], 16.9 (190)_[0 0 6], 18.2 (367)_[2 0 4], 18.9 (115)_[3 -1 0], 19.0 (147)_[3 -1 1], 20.7 (153)_[3 -1 3], 22.2 (165)_[2 0 6], 23.6 (86)_[3 -1 5], 25.7 (130)_[3 0 5], 28.3 (85)_[4 -1 4]. **TGA** (T_{intervalo} [°C] (% pérdida de peso)): 25-150 (14), 150-231 (3), 231-344 (2), 344-453 (6), 453-710 (46), 710-799 (0.5).

MIL-96(Al)-tratada: sólido blanco. **FTIR** (ν , cm⁻¹, KBr): 3483 (OH), 1718 (COOH), 1661 (COO_{aniso})_{asim}, 1623, 1579 (COO_{iso})_{asim}, 1457 (COO_{aniso})_{sim}, 1401 (COO_{iso})_{sim}, 1079 (Al-OH), 992, 768 (H-C=C), 735 (H-C=C), 636, 540, 477, 430. **DRX** (2θ , °, (intensidad)_[h k l]): 7.1 (20)_[1 0 1], 7.6 (98)_[1 0 1], 9 (1344)_[1 0 2], 11 (208)_[1 0 3], 12.3 (26)_[2 -1 0], 13.3 (188)_[1 0 4], 13.5 (120)_[2 -1 2], 14.2 (224)_[2 0 0], 14.5 (182)_[2 0 1], 15.3 (117)_[2 0 2], 16.6 (321)_[2 0 3], 16.9 (127)_[0 0 6], 18.2 (289)_[2 0 4], 18.9 (98)_[3 -1 0], 19.0

(136)_[3 -1 1], 20.7 (114)_[3 -1 3], 22.2 (130)_[2 0 6], 23.6 (81)_[3 -1 5], 25.7 (107)_[3 0 5], 28.3 (68)_[4 -1 4]. **TGA** (T_{intervalo} [°C] (% pérdida de peso)): 25-150 (13), 150-231 (2), 231-344 (2), 344-437 (5), 437-710 (47), 710-799 (1).

MIL-53(AI): sólido blanco, rendimiento 64.7 %, base seca de acuerdo a TGA. **FTIR** (v, cm⁻¹, pastilla KBr): 3610 (OH), 3471 (Al-O(H)-Al), 1632 (COO_{aniso})_{asim}, 1578 (COO_{iso})_{asim}, 1506, 1443 (COO_{aniso})_{sim}, 1413 (COO_{iso})_{sim}, 1293 (C-O), 1122 (Al-OH), 1016 (H-C=C), 985, 838, 763 (H-C=C), 697, 626, 468, 425. **DRX** (2θ, °, (intensidad) _[h k l] fase cristalina): 9.3 (640)_[2 0 2], 12.4 (2493)_[1 1 0], 17.7 (831)_[1 1 -1], 18.2 (83)_[3 1 0], 18.8 (133)_[4 0 0], 19.5 (46)_[1 1 1], 20.7 (50)_[3 1 -1], 23.2 (173)_[0 2 0], 25 (465)_[2 2 0], 27.1 (181)_[0 2 1], 30.0 (52)_[4 2 0], 30.4 (36)_[3 1 -2], 31.7 (30)_[1 1 2], 32.5 (68)_[5 1 1], 35.5 (114)_[1 3 0], 36.9 (60)_[6 2 -1], 37.8 (58)_[8 0 0], 41.1 (55)_[7 1 1], 45.0 (54)_[6 0 2]_[6 0 -3]. **TGA** (T_{intervalo} [°C] (% pérdida de peso)): 25-110 (8), 108-502 (2), 502-692 (58), 692-994 (-0.5).

MIL-53(AI)-tratada: sólido blanco. **FTIR** (v, cm⁻¹, pastilla KBr): 3607 (OH), 3471 (Al-O(H)-Al), 1632 (COO_{aniso})_{asim}, 1578 (COO_{iso})_{asim}, 1506, 1443 (COO_{aniso})_{sim}, 1413 (COO_{iso})_{sim}, 1293 (C-O), 1122 (Al-OH), 1016(H-C=C), 985, 838, 763 (H-C=C), 697, 626, 468, 425. **DRX** (2θ, °, (intensidad) _[h k l]): 9.3 (342)_[2 0 2], 12.4 (785)_[1 1 0], 17.7 (300)_[1 1 -1], 18.8 (67)_[4 0 0], 19.5 (15)_[1 1 1], 20.7 (14)_[3 1 -1], 23.2 (50)_[0 2 0], 25.0 (173)_[2 2 0], 27.1 (60)_[0 2 1], 30.0 (21)_[4 2 0], 31.7 (9)_[1 1 2], 32.5 (24)_[5 1 1], 35.3 (36)_[1 3 0], 36.8 (17)_[6 2 -1], 37.6 (13)_[8 0 0], 41.1 (21)_[7 1 1], 45.0 (17)_[6 0 2]_[6 0 -3]. **TGA** (T_{intervalo} [°C] (% pérdida de peso)): 25-108 (8), 108-502 (3), 502-692 (52), 692-764 (3), 764-995 (-0.5).

NICS-6(Mg): sólido blanco opaco, rendimiento 48.6 %, base seca de acuerdo a TGA. **FTIR** (v, cm⁻¹, pastilla KBr): 3700-2931 (OH), 1681 (COOH), 1625 (COO_{aniso})_{asim}, 1585 (COO_{iso})_{asim}, 1443 (COO_{aniso})_{sim}, 1372 (COO_{iso})_{sim}, 1118 (H-C=C), 956(H-C=C), 815, 774 (H-C), 710 (H-C), 563 (Mg-O), 463. **DRX** (2θ, °, (intensidad) _[h k l] fase cristalina): 13 (52)_[0 0 1], 14.7 (13)_[1 1 1], 15.5 (16)_[1 0 1], 20.8 (51)_[0 1 -1], 23 (20)_[2 1 1], 25.6 (169)_[1 0 2], 27.3 (65)_[1 2 2], 29.6 (90)_[2 2 2], 32.5 (19)_[0 1 -2]. **TGA**

(T_{intervalo} [°C] (% pérdida de peso)): 25-101 (4), 101-226 (4), 226-494(4), 494-686 (50), 686-794 (6).

NICS-6(Mg)-tratada: sólido blanco opaco, coincide con las bandas y los picos de difracción mostradas para **NICS-4(Mg)**. **FTIR** (ν , cm^{-1} , pastilla KBr): 3705-2959 (OH), 1684 (COOH), 1657 (COOMg), 1610, 1563 (COO_{iso})_{asim}, 1525, 1475, 1434 (COO_{iso})_{sim}, 1380, 1168 (H-C=C), 1069 (H-C=C), 822, 757 (H-C), 720 (H-C), 563 (Mg-O), 470. **DRX** (2θ , °, (intensidad)_[h k l]): 8.7 (42)_[1 1 0], 13.6 (52)_[0 2 0], 14.4 (28)_[0 0 1], 15 (47)_[1 1 -1], 16.6 (33), 17.6 (164)_[2 2 0], 17.9 (83)_[3 1 0], 18.5 (434)_[1 1 1], 18.9 (439)_[3 1 -1], 19.9 (26)_[0 2 1], 21.3 (46)_[1 3 0], 22.2 (37)_[4 0 0], 25.3 (20)_[2 2 1], 25.7 (47), 26.5 (82)_[3 3 0], 27 (184)_[5 1 -1], 28.5 (247)_[3 1 -2], 29 (36)_[6 2 0], 29.4 (136)_[4 0 -2]. **TGA** (T_{intervalo} [°C] (% pérdida de peso)): 25-82 (2), 82-212 (27), 212-506 (4), 506-698 (45), 698-797 (-1).

VI. RESULTADOS y DISCUSIÓN

6.1. Obtención y caracterización de materiales MOF

Para desarrollar los estudios de interacción entre materiales tipo MOF y la HEWL se seleccionaron algunos sistemas representativos. Dichos sistemas fueron: **HKUST-1(Cu)**, **MIL-53(Cu)**, **MIL-100(Fe)**, **MIL-53(Fe)**, **MIL-96(Al)**, **MIL-53(Al)** y **NICS-6 (Mg)**.

Los compuestos **HKUST-1(Cu)**, **MIL-100(Fe)**, **MIL-96(Al)** y **NICS-6(Mg)** tienen como ligante orgánico al ácido trimésico en su forma aniónica (ácido 1,3,5-benzentricarboxílico, $\text{BTCH}_n^{(3-n)-}$), que es una molécula rígida y plana capaz de formar redes metal orgánicas de muchas dimensionalidades. Para los compuestos **MIL-53(Cu)**, **MIL-53(Fe)** y **MIL-53(Al)** se utilizó ácido tereftálico (ácido benceno-1,4-dicarboxílico, bdc^{2-}) como ligante que permite la unión simultánea a cuatro iones metálicos para así formar aristas pequeñas ("puentes") con ángulos de 180° . Todas las redes metal orgánicas obtenidas, con excepción de **HKUST-1(Cu)** y **NICS-6(Mg)**, pertenecen a compuestos provenientes del Instituto de Materiales Lavoisier designados como tipo MIL-*n*. Los cuales se caracterizan por estar compuestos por metales trivalentes catiónicos ($M = \text{Cr(III)}$, Fe(III) , V(III)) así como metales del bloque p ($M = \text{Ga(III)}$, In(III) , Al(III)) y ligantes aniónicos bencénicos con múltiples carboxilatos [48].

Estos materiales tienen una estabilidad química óptima en soluciones acuosas y solventes orgánicos, con un rango ácido-base en agua entre 6.9 y 7.4, aunque pueden verse afectados por la presencia de iones de coordinación fuerte (aniones de fosfato, PO_4^{-3}). No existe un método exacto para confirmar la estabilidad química de una MOF cuando se encuentra en una solución básica, ácida o neutra. Una posible aproximación que se utiliza es comparar los patrones que se obtienen de DRX en polvos, y si estos patrones son los suficientemente parecidos se considera que es estable en

la disolución. Sin embargo, aunque los patrones sean muy parecidos puede existir colapso parcial de poros y amorfización, lo cual deriva en una disminución de las intensidades de ciertos planos o en general para todo el material dependiendo del tipo de daño [30].

6.1.1. Obtención y caracterización de MOF **HKUST-1(Cu)**

La MOF **HKUST-1(Cu)** se obtuvo a partir del ácido trimésico haciéndose reaccionar con la sal de nitrato de cobre(II) trihidratado en proporción 2:3 en presencia de una mezcla de solventes de DMF/EtOH/H₂O (1:1:1 v/v) y 0.5 mL de trietilamina dejándose en agitación por 7 h; esta mezcla se colocó posteriormente en un reactor de acero inoxidable y celda de teflón (45 mL) a 120 °C por 24 h. El crudo de reacción se lavó con DMF/EtOH/H₂O (1:1:1 v/v) y el precipitado azul resultante se secó a 60 °C por 5 h [39].

La MOF **HKUST-1(Cu)** se caracterizó mediante DRX, FTIR y TGA recién sintetizada (**Figura 6**) y después de estar en solución [*buffer* de fosfatos/EtOH] durante 18 h (**Figura 7**, rojo). Por medio de difractogramas se ha especificado la estructura de la **HKUST-1(Cu)**, la cual tiene forma de cubos octaédricos con bordes afilados y diámetros entre 15-20 µm. Su topología es del tipo *tbo* con un grupo espacial cúbico (*Fm-3m*), caracterizada por formar la estructura conocida como “ruedas de paletas” o *paddlewheel* [49].

Los átomos de cobre forman cúmulos dinucleares, con una distancia de 2.63 Å por enlace Cu-Cu, cada átomo de cobre se encuentra coordinado por cuatro oxígenos provenientes del ligando (ácido trimésico) y una molécula de agua. Este tipo de arreglo le confiere una distribución de tamaños de poro de conformación bimodal con poros de diámetros de 9 y 3.5 Å [50]. La red metal orgánica **HKUST-1(Cu)** cuenta con microporos y mesoporos simultáneamente, tiene una área superficial específica de 600-1600 m²·g⁻¹ y

volumen de poro de $0.70 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, con tamaño de mesoporo promedio de 34 nm [51], [52].

En el difractograma (**Figura 6, panel C**) aparece el patrón de difracción con los picos característicos en valores de 2θ ($^\circ$): 6.7, 9.5, 11.6, 13.4, 14.7 y 15, que son ángulos pequeños, asociados a materiales microporosos que poseen numerosos poros pequeños; los picos restantes tienen correspondencia con las datos cristalográficos publicados para la estructura cristalina cúbica de la **HKUST-1(Cu)**. Los picos 36.4 , 42.3 y 42.8° corresponden al subproducto óxido de cobre (Cu_2O), su aparición como fase de impureza es la más común, la cual está condicionada por el tipo de síntesis empleada (solvotérmica) y la temperatura utilizada ($120 \text{ }^\circ\text{C}$) [39], [53].

En el espectro infrarrojo (**Figura 6, panel A**) la banda ancha de $3600\text{-}3100 \text{ cm}^{-1}$ se localizan los puentes de hidrógeno formados por el agua de bulto o de hidratación, además de las moléculas de agua coordinadas a los átomos de cobre de la red en la **HKUST-1(Cu)**. La banda en 1663 cm^{-1} es la vibración tensional del éster metálico COO-Cu indicándonos la desprotonación del grupo carboxílico y su unión con cobre. La ausencia de la banda en 1718 cm^{-1} , característica del grupo COOH del ácido trimésico, demuestra que todos los iones carboxilatos participaron en la formación de la **HKUST-1(Cu)** y hay BTC libre como impureza ocluido en los poros. Los modos vibracionales 1643 y 1446 cm^{-1} son característicos de una unión anisobidentada del grupo (COO), en su contribución asimétrica y simétrica, hacia los dos cobres de la rueda de paletas (*paddle wheel*) [54]. La bandas en 1583 y 1374 cm^{-1} corresponde a la contribución asimétrica y simétrica, de la coordinación del carboxilato al cobre en su forma isobidentada. La banda en 1643 cm^{-1} traslapa la banda característica de **DMF coordinada** (ca. 1631 cm^{-1}) a los iones de cobre en la **HKUST-1(Cu)** proveniente del solvente de síntesis, tal cual se determinó por TGA, lo cual se discute más

adelante. La banda en 730 cm^{-1} corresponde a la vibración tensional Cu-O, donde un átomo de oxígeno del ligante se coordina con Cu [55], [56].

Para analizar la estabilidad térmica de la **HKUST-1(Cu)** y en general de los materiales preparados, se llevó a cabo un estudio por TGA, en particular para este material el TGA se muestra en la **Figura 6, panel B**. En el termograma se observa que pierde el 5.5 % de masa entre 25 y 100 °C, que corresponde a las moléculas de agua ocluidas físicamente en los poros. Mientras que de 100 a 200 °C se pierde el 8 %, correspondiente a moléculas de agua coordinadas a los átomos de Cu de la **HKUST-1(Cu)** y a moléculas de DMF ocluidas en los poros del material. De 200 a 327 °C se observa una pérdida de 20 %, debido principalmente a moléculas de DMF→Cu, lo cual no se observa claramente por FTIR, sin embargo se comentó que dicha banda puede estar traslapada con la banda característica del fragmento COOCu_2 , por eso el análisis de TGA resulta fundamental para descartar o aseverar la presencia de dichos adsorbatos en materiales. El colapso total del material se da cuando el ácido trimésico se descompone entre una temperatura de 327 a 390 °C, en la cual se tuvo una pérdida de 27 %. De 390 a 604 °C se observa una pérdida de 7 % debida a remanentes orgánicos para finalmente dar lugar a óxidos de cobre. Mientras que de 604 a 687 °C se observa una ganancia del ~ 1 % debida a un proceso adicional de oxidación entre las fases de Cu_2O y CuO [49], [56]. Finalmente, de 687 a 800 °C se observa una pérdida de ~ 1.5 % para llegar al punto asintótico de los óxidos de cobre.

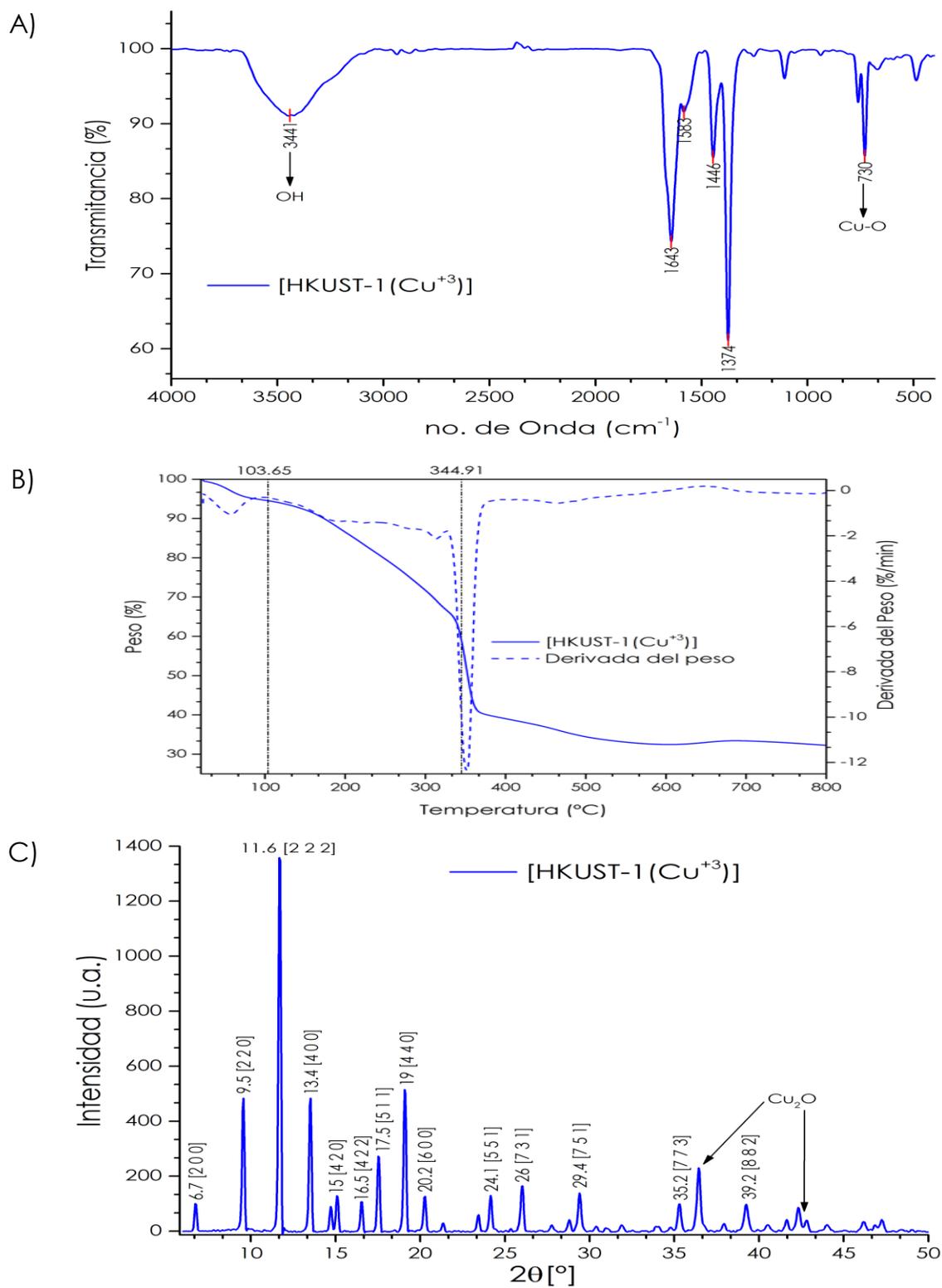


Figura 6. Caracterización de la MOF **HKUST-1(Cu)** por FTIR (A), TGA (B) y DRX (C) recién sintetizada.

Después de que la MOF estuvo durante 8 h en solución [buffer de fosfatos/EtOH] se volvieron a realizar todas las pruebas de caracterización, las cuales están en la (Figura 7, rojo), nombradas como **HKUST-1(Cu)** tratada. El difractograma (Figura 7, panel C, rojo) muestra la pérdida de los picos 36.4, 42.2 y 42.8 ° asociados con la presencia del óxido de cobre (Cu₂O), que es medianamente soluble en solventes orgánicos (EtOH) y muy soluble en soluciones acuosas que contengan sales del ácido fosfórico (H₃PO₄). Estos compuestos pueden reaccionar formando fases sólidas de cobre-fosfato [57]. No se registró difracción de otras fases del cobre con otras moléculas (Cu(OH₂)).

Todos los picos restantes presentan una disminución de la intensidad del ~ 49 % así como un ensanchamiento considerable, pero se conservan todos los asociados a la estructura tridimensional de la **HKUST-1(Cu)**. El pico 44.6° con una intensidad de 43 unidades arbitrarias fue el único nuevo registrado, pero en una muy pequeña proporción. La pérdida de intensidad en los picos se debe a la reducción en la cristalinidad de la red metal orgánica confiriéndole conformaciones más amorfas. Esto no implica el colapso completo de la red metal orgánica, la estructura tridimensional de la **HKUST-1(Cu)** se mantiene en presencia de etanol debido a que la energía de interacción entre las moléculas de etanol y los sitios no coordinados del Cu(II) es baja. Pérez-Ramírez *et al.* [58] determinaron que en etanol puro la **HKUST-1(Cu)** puede volver a su forma exclusivamente cristalina proveniente de un estado hidratado. También evidenciaron que en mezclas [agua/EtOH], la degradación cristalina de la **HKUST-1(Cu)** disminuye significativamente, en comparación con sistemas puramente acuosos, donde la degradación se da en unas pocas horas [58], [59].

En la fase de **HKUST-1(Cu)** totalmente hidratada, las moléculas de agua representan hasta un 40 % total de su peso. En el espectro infrarrojo después del tratamiento (Figura 7, panel A, rojo) se muestra un gran ensanchamiento

de la banda 3600-3100 cm^{-1} debido a la saturación de los poros primarios (9 Å de diámetro) por moléculas de agua que forman un enrejado de puentes de hidrógeno alrededor de las moléculas de agua coordinadas a los átomos de cobre por los cuales tienen una gran afinidad debido a su vacancia de coordinación en la rueda de paletas y al amplio momento dipolar de este disolvente [51].

Se observa una banda de muy baja intensidad en 1709 cm^{-1} asociada a la liberación de ácido trimésico en su forma protonada COOH o también debido a grupos COOH en la superficie de los cristales de **HKUST-1(Cu)** que quedan expuestos o demetalados debido al tratamiento. El secuestro del metal se lleva a cabo debido a la presencia de especies moleculares de fosfatos o a moléculas de agua del medio [30]. Esto también puede ser un indicativo de que las cavidades de la **HKUST-1(Cu)** se conservaron después del tratamiento y que tienen la capacidad de encapsular a moléculas del tamaño del BTC, o interactuar con la superficie (interna y externa) del material. Ningún otro cambio significativo se registró en el espectro infrarrojo.

Dada la hidratación de la **HKUST-1(Cu)** después de 18 h, el agua ocluida en los poros representó un 17 % del peso, 12.5 % más que su contraparte no solvatada. Mientras que el agua coordinada al cobre tuvo un 13 % de pérdida de peso, un 5 % más que la **HKUST-1(Cu)** no tratada. La deshidratación total de la **HKUST-1(Cu)** se da hasta 180 °C siendo un 30 % del peso, correspondiente a cada una de las moléculas de H_2O coordinadas a cada átomo de cobre en la MOF [51]. Del intervalo de 180-292 °C se observó una pérdida de peso del ~ 2 % que corresponde a moléculas de DMF coordinadas a los sitios metálicos del material, la liberación de DMF al medio por parte de la MOF durante el tratamiento fue del 18 %.

La descomposición de la **HKUST-1(Cu)** se dio entre una temperatura de 284 a 369 °C con una pérdida del 33 % de peso, correspondiente al ácido trimésico. Comparando las pérdidas de peso en los mismos intervalos de temperatura entre los materiales antes y después del tratamiento, se determinó que la liberación de BTC al medio fue del 5 %. Donde un 11 % se componen de ligantes orgánicos (BTC) superficiales del material, que se unieron a los centros metálicos de cobre nuevamente después de su liberación y DMF ocluida en los poros y coordinada a los sitios metálicos, el 22 % restante pertenece al BTC estructural de la **HKUST-1(Cu)**. De 369 hasta 516 °C se registró una pérdida de peso del 5 % que se consideran remanentes orgánicos. De La formación de las fases de Cu₂O y CuO se observó entre las temperaturas 516 a 574 °C, con la misma ganancia de ~ 1 % registrada anteriormente para la **HKUST-1(Cu)** recién sintetizada. De 574 a 798 °C hubo una pérdida de ~ 0.5 % de peso que corresponde a los óxidos de cobre más reducidos (**Figura 7, panel B, rojo**). No se observó una liberación de especies de cobre al medio significativa (~ 1 %).

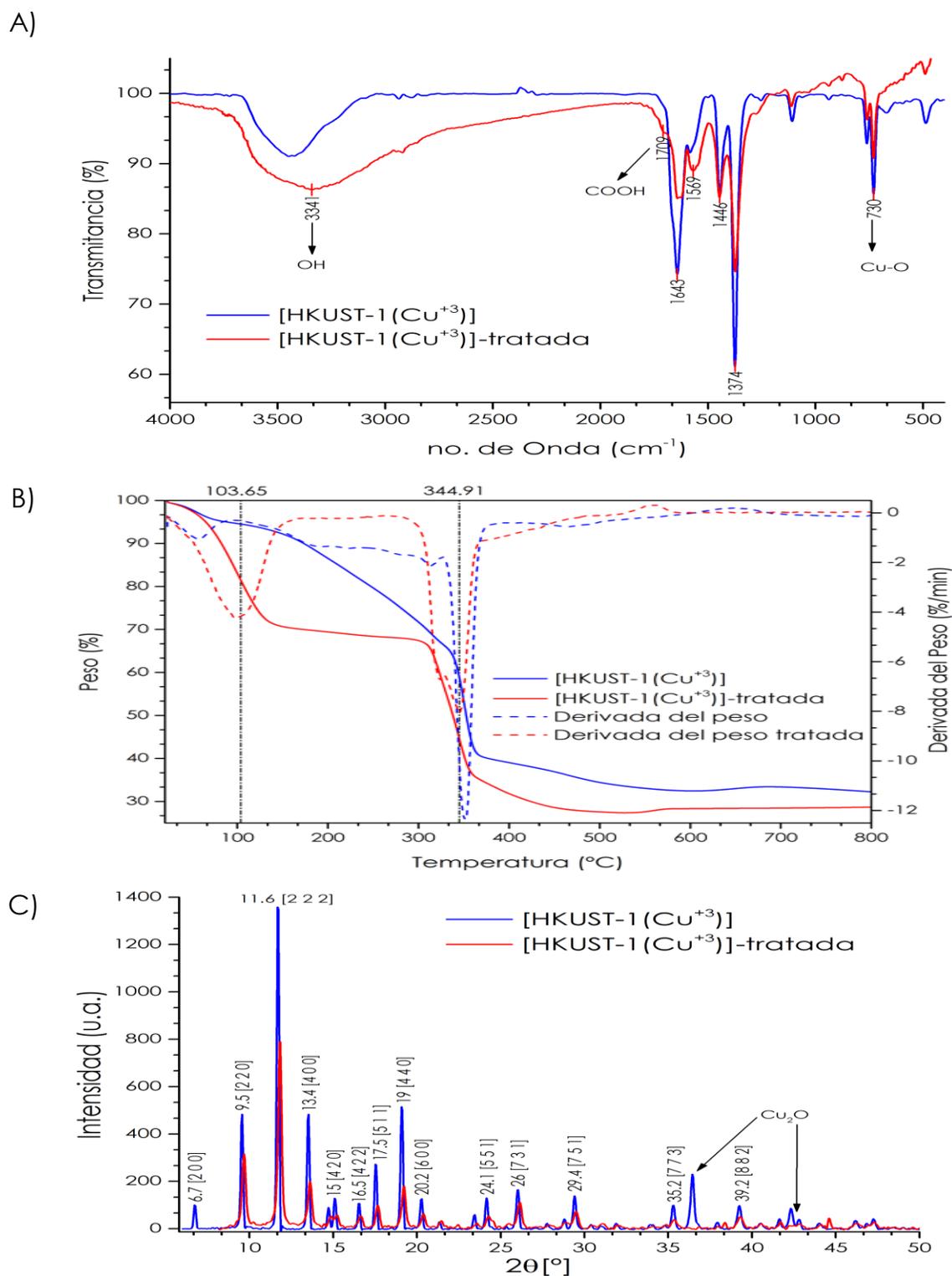


Figura 7. Caracterización de la MOF **HKUST-1(Cu)-tratada** por FTIR (A), TGA (B) y DRX (C) después del tratamiento. Recién sintetizada (azul) y después (rojo) de estar en solución [buffer de fosfatos/etanol] 1.55 mM/2.12 mM (65 %) por 18 h.

La **HKUST-1(Cu)** perdió cristalinidad, ya que se hidrató después de estar en la solución [*buffer* de fosfatos/EtOH] por 18 h, pero su estructura tridimensional específica y porosidad se conservó.

6.1.2. Obtención y caracterización de MOF **MIL-53(Cu)**

La red metal orgánica **MIL-53(Cu)**, también conocida como Cu(BDC), se sintetizó a partir de nitrato de cobre (II) trihidratado y ácido benceno-1,4-dicarboxílico (BDC) en proporción 1:1. Estos precursores se vaciaron en un reactor de acero inoxidable y celda de teflón, dejando la mezcla de reacción en una estufa a 220 °C por 72 h. El crudo de reacción se filtró al vacío y el sólido se lavó dos veces con etanol absoluto, el precipitado se dejó secar a 80 °C por 2 h dando lugar a la **MIL-53(Cu)** [40].

La estructura cristalina de la MOF **MIL-53(Cu)**, también conocida como Cu(BDC), tiene un grupo espacial ortorrómbico de tipo Imma o Imcm. Consiste en dos átomos de Cu(II) con ordenamiento de “rueda de paleta”, con una separación de 2.63 Å, y conectados por medio de enlaces de coordinación bidentados de tipo puente, empleando los dos átomos de oxígeno pertenecientes a los grupos carboxílicos en forma de anión del ácido tereftálico. Esto provee una geometría cuadrada plana que forma capas de dos dimensiones paralelas al plano de Miller (-2 0 1). La **MIL-53(Cu)** es un material poroso con un arreglo de microcristales casi cúbicos de entre 300-500 nm, que a su vez está constituido por partículas del tipo “hoja” apiladas entre ellas con espesores de 150 nm [60], [61]. La **MIL-53(Cu)** es un material poroso con un área superficial específica de 1150 m²·g⁻¹ y un volumen de poro de 0.48 cm³·g⁻¹ [62].

El difractograma de la **MIL-53(Cu)** (**Figura 8, panel C**) muestra picos finos en el rango de 5-35 °, particulares de las redes metal orgánicas tipo MIL-n, siendo los característicos 2θ (°): 8.9, 14.4, 15.5, 17.9, 26.9, 28.8, esto para la estructura libre de moléculas de DMF coordinadas con el cobre.

Adicionalmente, no se observaron los picos que indican la presencia de H₂BDC residual en los poros del material, aseverando su integridad estructural y pureza [62], [63]. A partir de este análisis se determinó que se obtuvo la estructura de poro abierto, sin huéspedes.

Además, la ausencia de DMF se puede corroborar por el espectro infrarrojo (**Figura 8, panel A**) ya que la banda en 2926 cm⁻¹ atribuida a la vibración (estiramiento asimétrico) del enlace alifático (C-H) de moléculas de DMF no se visualiza, tampoco se observan bandas en 1650 cm⁻¹, características de C=O de DMF. La coordinación de los grupos carboxílicos del ácido tereftálico con los iones de cobre se relaciona con las bandas 1565 cm⁻¹ (estiramiento asimétrico) y 1427 cm⁻¹ (estiramiento simétrico), las cuales son específicas cuando no hay coordinación con moléculas de DMF y son para uniones del tipo anisobidentada del grupo (COO_{aniso}). Las bandas en 1503 y 1382 cm⁻¹ corresponden a la contribución asimétrica y simétrica, respectivamente, para la unión del tipo isobidentada.

La ausencia de la banda en 1699 cm⁻¹ indica que no hay impurezas de BDC en los poros del material, como se determinó también por DRX y por TGA. Las vibraciones del anillo fenólico se le atribuyen a las bandas 1100 y 1015 cm⁻¹. La banda ancha entre 3600-3400 cm⁻¹ se puede considerar como los OH del grupo carboxílico o moléculas de agua en la estructura [64]. La banda en 739 cm⁻¹ se le podría atribuir a la vibración tensional para la coordinación Cu-O.

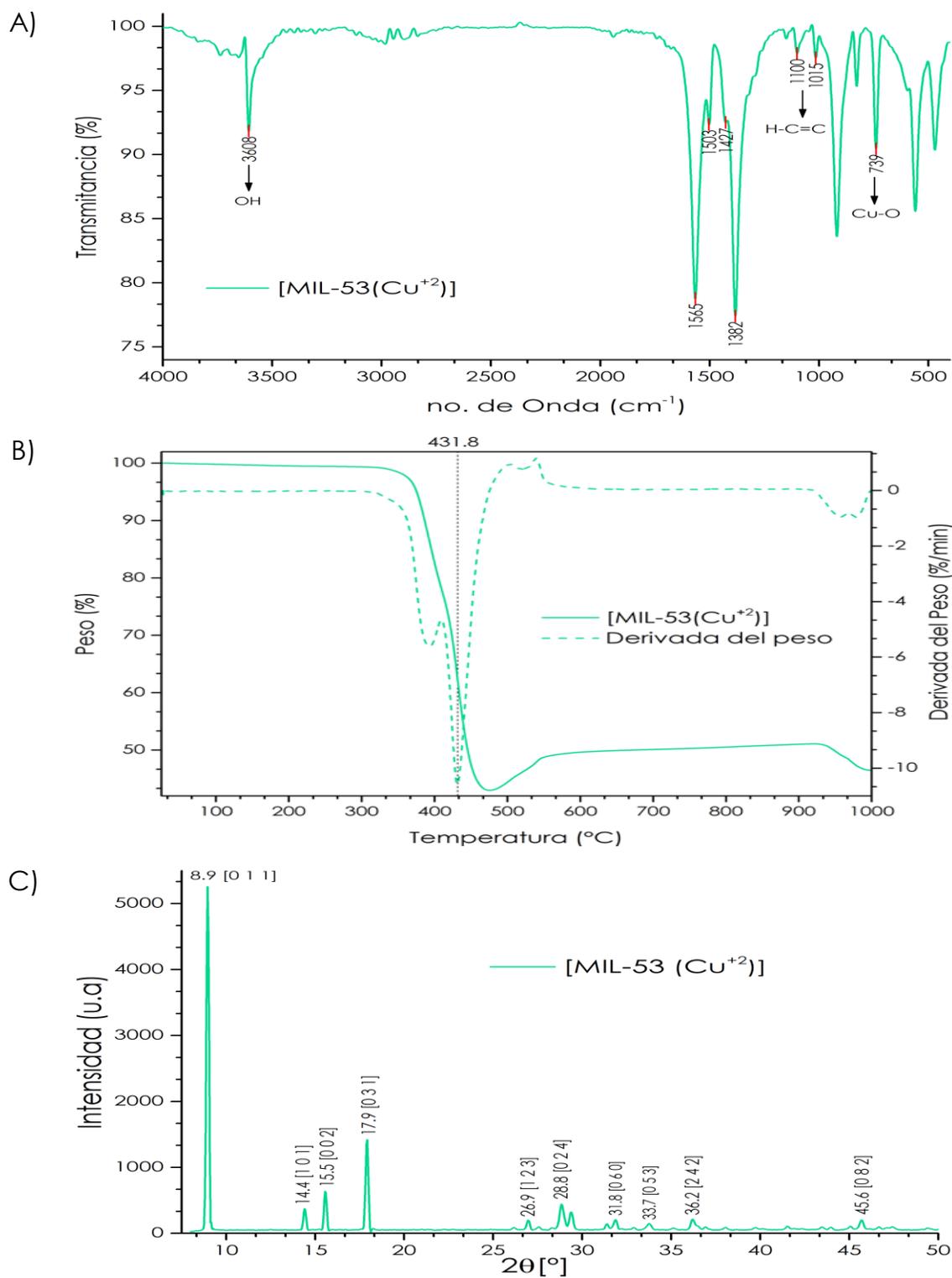


Figura 8. Caracterización de la MOF **MIL-53(Cu)** por FTIR (A), TGA (B) y DRX (C) recién sintetizada.

La prueba de TGA de la **MIL-53(Cu)** (**Figura 8, panel B**) indica que existe una pérdida mínima de solventes ocluidos en los poros, únicamente del 0.5 % de temperatura ambiente hasta 180 °C y continúa hasta los 308 °C. La descomposición del ligante orgánico en el material se dio entre 308-475 °C, en un proceso de dos etapas (el ácido tereftálico tiene un punto de sublimación en 373 °C) [65]. La primera pérdida de peso de 21.5 % observada en el intervalo 308-410 °C, con un mínimo en 390 °C, el cual es diferente del punto de sublimación del ácido libre. Esta descomposición corresponde entonces al ligante (BDC) que se encuentra en la superficie o en los bordes de las láminas del material y que está unido únicamente por un carboxilato a los sitios metálicos del material. Representando aproximadamente 20 °C más para su descomposición en comparación con el ligante libre. La segunda pérdida de peso de 35 % observada en 410-475 °C (mínimo en 432 °C) corresponde al ligante estructural interno de la MOF, y en este caso representa aproximadamente 59 °C más para su descomposición en comparación con el ligante libre. Que globalmente representa un proceso rápido, continuo y resultando en el colapso de la estructura cristalina de la red metal orgánica. Se observa una ganancia de peso de 475 a 578 °C de 6.5 %, generando óxidos de cobre en alto estado de oxidación ($\text{Cu}_2\text{O} \rightarrow \text{CuO}$), este incremento se extiende de 578 a 925 °C ganando otro ~ 1.5 % [60], [66]. Finalmente, de 925 a 998 °C pierde ~ 4.5 % de peso que corresponde a los óxidos de cobre más reducidos, en un caso análogo a lo que ocurre en la **HKUST-1(Cu)**.

En el difractograma de la **MIL-53(Cu)-tratada** se observó una disminución de la intensidad del 46 % en todos los picos de referencia para este material (**Figura 9, panel C, rojo**), los picos restantes conservaron su intensidad. Dado que el etanol no se coordina de la misma manera con los átomos de cobre como lo hacen moléculas que cuentan con grupos carbonilo como la DMF.

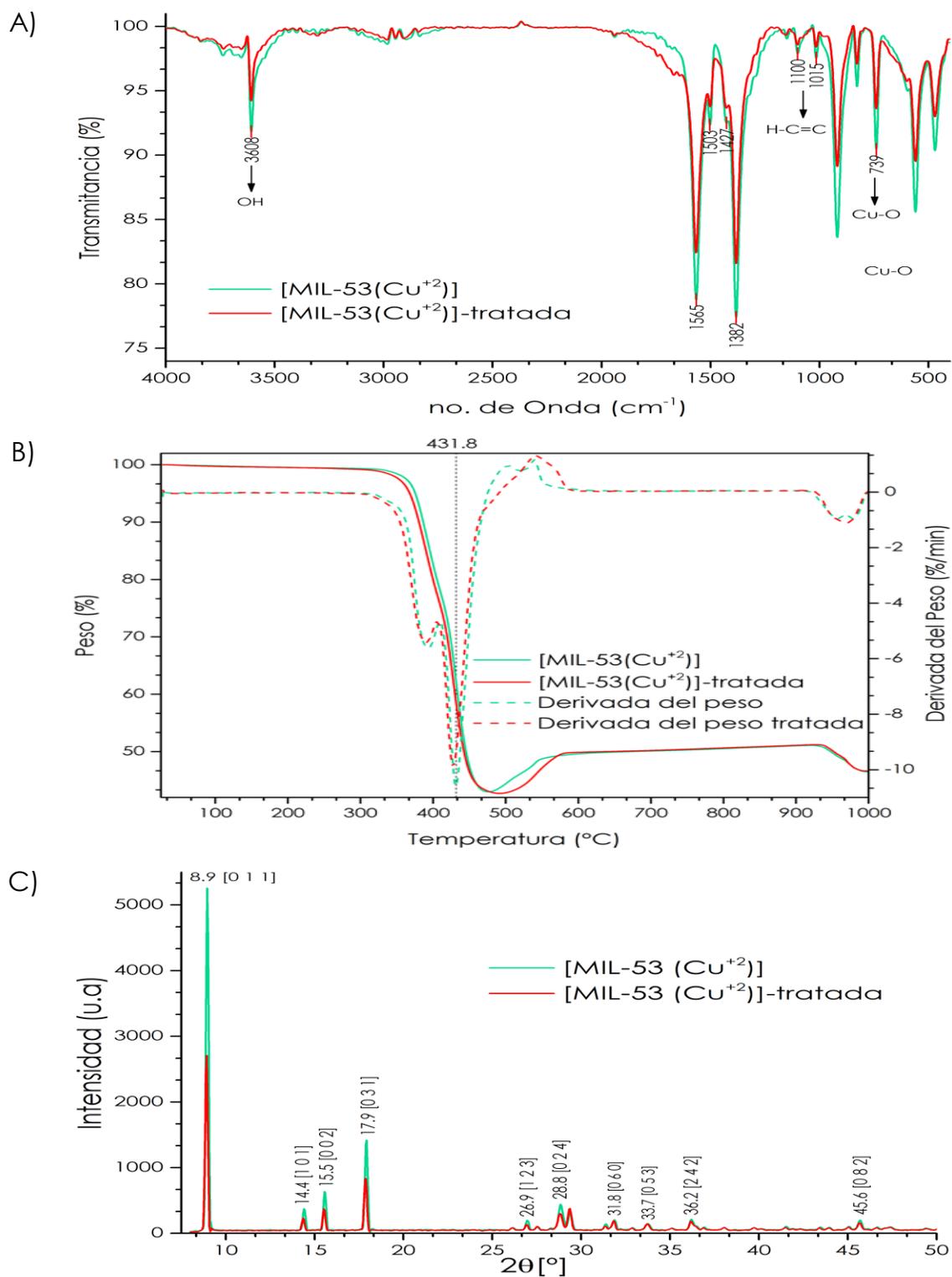


Figura 9. Caracterización de la MOF **MIL-53(Cu)-tratada** por FTIR (**A**), TGA (**B**) y DRX (**C**) después del tratamiento. Recién sintetizada (**verde**) y después (**rojo**) de estar en solución [*buffer* de fosfatos/etanol] 1.55 mM/2.12 mM (65 %) por 18 h.

La MOF tratada presenta una versión ligeramente más amorfa de la estructura original sin solvatación con DMF [40]. En el espectro infrarrojo (**Figura 9, panel A, rojo**) no se observaron bandas asociadas con la liberación de ácido tereftálico de la estructura primaria y todas las bandas características se conservaron. Mientras que en el análisis por TGA (**Figura 9, panel B, rojo**) no hay cambios significativos visibles, por lo tanto podemos inferir, aunque la MOF es porosa, no se hidrató (H₂O) de la misma manera que la **HKUST-1(Cu)**.

La MOF **MIL-53(Cu)** después del tratamiento conserva en su totalidad su estructura, pero pierde cristalinidad a causa del etanol, tal cual se ha observado en otras ocasiones [40].

6.1.3. Obtención y caracterización de MOF **MIL-100(Fe)**

Para la obtención de la **MIL-100(Fe)** se usó nitrato de hierro(III) nohidratado junto con ácido benceno-1,3,5-tricarboxílico en una proporción 2.2:1 en agua Milli-Q. La mezcla de reacción se introdujo en una celda de vidrio y se colocó en un reactor de microondas a 130 °C por 6 min. El precipitado se lavó dos veces con etanol absoluto y se secó en una estufa [41].

La **MIL-100(Fe)** es un material altamente poroso, con un grupo espacial cúbico *Fd-3m* que consiste en unidades híbridas tetraédricas, formadas entre la coordinación de un trímero de tipo μ_3 -oxo-Fe(III) octaédrico en cada uno de los vértices del tetraedro con cuatro trimesatos los cuales ocupan cada una de las cuatro caras del tetraedro. Estas unidades híbridas se acoplan en una estructura rígida microporosa cristalina del tipo MTN con dos tipos de "jaulas" mesoporosas interconectadas, una "jaula" de 2.5 nm con aperturas pentagonales microporosas de 5.6 Å de diámetro y una "jaula" con mayor tamaño, de 2.9 nm, donde la apertura es hexagonal de 8.6 Å de diámetro [41], [67]. La **MIL-100(Fe)** tiene un área superficial específica de

2800 m²·g⁻¹ y un volumen de poro de 2.3 cm³·g⁻¹, con un tamaño de partícula de 200 nm y poros de 6 nm [68].

La fase característica de la **MIL-100(Fe)** aparece en el difractograma en dos rangos de valores de 2θ, ángulos bajos de 1 a 6 ° y ángulos altos entre 6-30 °, característicos de los materiales tipo MIL-n. En el difractómetro Bruker D2 Phaser utilizado en este estudio no fue posible realizar lecturas por debajo del ángulo 2θ: ~ 5 ° [69]. A pesar de esto el patrón de difracción (**Figura 10, panel C**) concuerda con el patrón de difracción de polvos teórico, obtenido a partir del archivo .cif de monocristal [70] perteneciente a la **MIL-100(Fe)**. Así como con el patrón de difracción reportado por Yong *et al.* en donde los principales picos 2θ (°): 10.3, 10.9 y 20.1 son los considerados para evidenciar la formación de la estructura tridimensional cristalina [71].

El espectro de infrarrojo de la **MIL-100(Fe)** se muestra en la **Figura 10 (panel A)** allí se observa la presencia de moléculas de agua coordinadas a los átomos de Fe⁺³ y ubicadas en las cavidades del material, unidas por puentes de hidrógeno entre sí y con las moléculas coordinadas al metal. Esto da lugar a vibraciones de estiramiento del grupo -OH generando una banda ancha en el intervalo 3670-3100 cm⁻¹. La banda en 3085 cm⁻¹ corresponde a los enlaces C-H del anillo aromático del BTC. La banda en 1715 cm⁻¹ asociada a la vibración de estiramiento del BTC en su forma libre se observa en muy pequeña proporción, pero esto también puede ser debido a grupos -COOH en los bordes de los cristales del material, tal cual se analizó más adelante por TGA. La banda en 1628 cm⁻¹ corresponde a un carboxilato anisobidentado (asim.) coordinado a dos átomos de Fe⁺³, mientras que la banda en 1573 corresponde al modo de coordinación isobidentado (asim.) a los mismos dos átomos de Fe⁺³ del material. Las proporciones de estas bandas dan cuenta de que existe una mayor proporción de coordinaciones anisobidentadas en comparación con isobidentadas en la estructura cristalina [70]. De forma complementaria, se observan las bandas en 1448 y

1381 cm^{-1} a estos mismos modos de coordinación aniso e iso-bidentados pero en la contribución simétrica [72]. Las bandas en 1120 y 947 cm^{-1} pertenecen a las vibraciones del anillo de benceno y las bandas en 759 y 712 cm^{-1} corresponden a las vibraciones de flexión del grupo C-H del anillo aromático, mostrando que el BTC forma parte de la estructura de la MOF. La vibración de estiramiento del enlace entre Fe-O se le atribuye a las bandas en 484 y 464 cm^{-1} [73], [74].

La **MIL-100(Fe)** mostró, en el análisis por TGA (**Figura 10, panel B**), una pérdida del 5 % de peso entre 25-122 °C, correspondiente a la remoción de moléculas de agua no coordinadas y etanol ocluidas en los poros, entre 122 a 300 °C se perdió el 5 % de peso en moléculas de agua coordinadas a los trímeros de Fe(III). El desprendimiento y combustión del ligante orgánico (BTC) se dio en un proceso de dos etapas, de 300 a 429 °C (con dos mínimos, en 355 y en 394 °C) estos corresponden a la primera etapa con una pérdida de peso del 25 % y el primer mínimo se trata del BTC que se encuentra ocluido dentro de los poros. Esto ocurre a 355 °C, que son 44 °C menos que la temperatura de descomposición del BTC libre (399 °C) 6 % de BTC libre. Mientras que el BTC superficial del material se pierde a 394 °C, 19 % de BTC superficial, esto en concordancia con el análisis por FTIR. La asignación de los picos de pérdida de peso se llevó a cabo en función del tratamiento de la **MIL-100(Fe)**, tal cual se discutirá en la sección siguiente, ya que el pico que disminuye por el tratamiento es el que se encuentra a 355 °C. La segunda etapa es del intervalo 429-541 °C (con mínimo en 466 °C) registrándose una pérdida de peso del 21 %, que corresponde a la calcinación del BTC estructural de la **MIL-100(Fe)** y remanentes orgánicos.

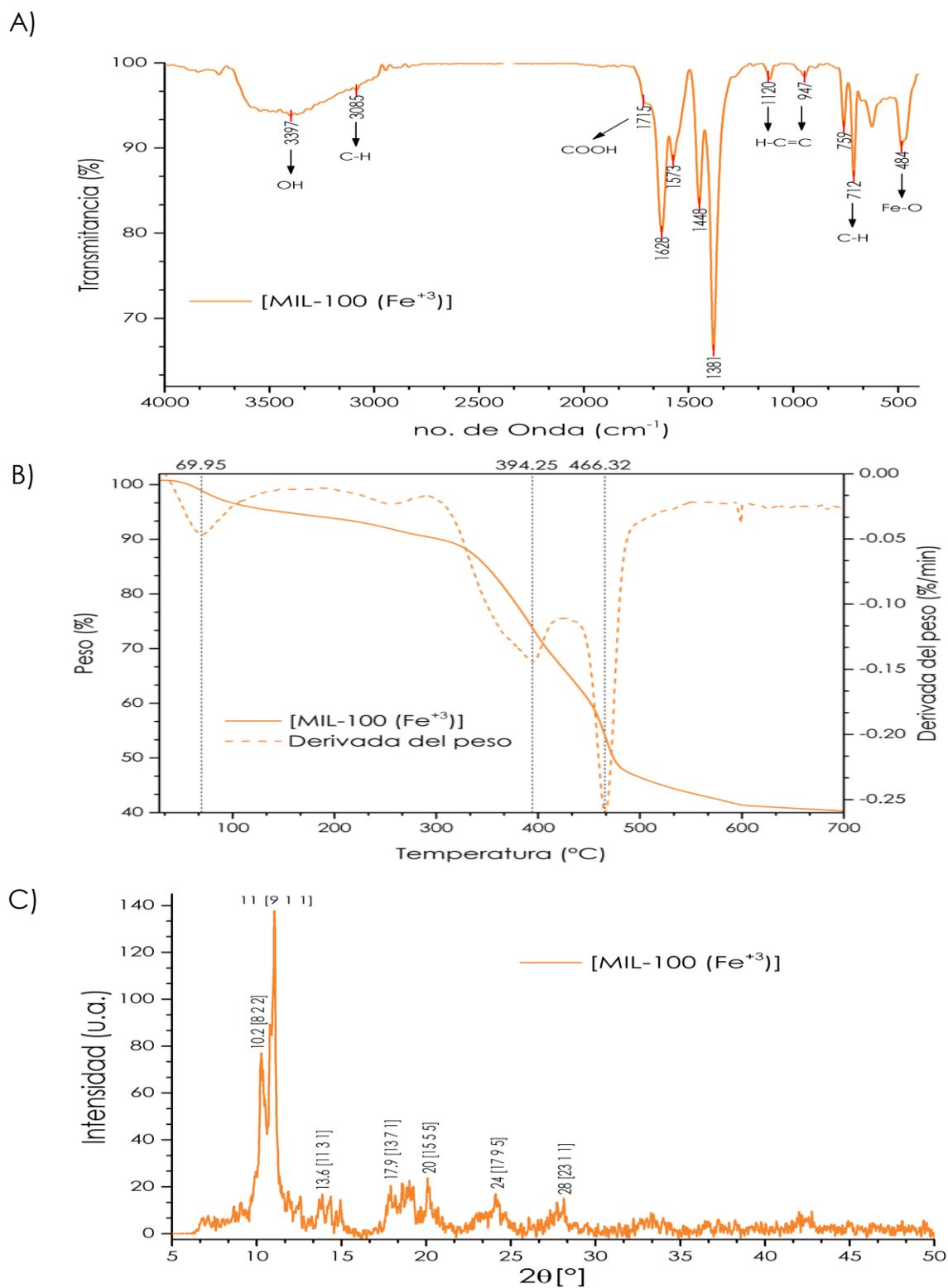


Figura 10. Caracterización de la MOF **MIL-100(Fe)** por FTIR (A), TGA (B) y DRX (C) recién sintetizada.

Propiciando entonces el colapso de la estructura tridimensional de la MOF. Mientras que de 541 a 767 °C se observó una pérdida de peso del ~ 4.5 % correspondiente a los óxidos de hierro [74].

La red metal orgánica **MIL-100(Fe)** después del tratamiento dio lugar a **MIL-100(Fe)-tratada**, y el pico de 11° pasó de una intensidad de 137 a 112 unidades arbitrarias, esta disminución de 20 % fue el único cambio significativo en los picos de referencia, indicativo de un material menos cristalino (**Figura 11, panel C, rojo**). Aunque la **MIL-100(Fe)** es estable en agua desionizada a 37 °C en pH ~ 7-7.35, en amortiguador de fosfatos salino se degrada, y se observa que entre más alta sea la concentración de fosfatos y más pequeño el tamaño de los cristales de la MOF, la pérdida de cristalinidad es más rápida. La **MIL-100(Fe)** de tamaño nanométrico en seis días se degrada en presencia de buffer de fosfatos (1.19 mM), mientras que de tamaño micrométrico se necesitan al menos 8 días con buffer de fosfatos a una concentración 10 veces mayor (11.9 mM), para un proceso de degradación [75].

En el espectro infrarrojo para **MIL-100(Fe)-tratada (figura 11, panel A, rojo)** existe un ensanchamiento pronunciado en la banda 3670-3100 cm⁻¹, correspondiente con las vibraciones del grupo -OH del agua. Mientras que el análisis por TGA (**figura 11, panel B, rojo**) indica que se perdió un 22 % de peso en agua y etanol ocluidos en los poros del material entre 25-120 °C. Esta pérdida representa un 17 % más con respecto al material sin tratamiento; el aumento puede atribuirse a que en general la **MIL-100(Fe)** tiene una capacidad de adsorción de 0.75 g agua/g MOF a 25 °C. Este dato sobrepasa al de la mayoría de las redes metal orgánicas, gracias a su gran área superficial específica y a la fuerte coordinación entre las moléculas de agua con los sitios metálicos del Fe(III) que aún tienen vacancias y que propician que el material sea más higroscópico [76]. La pérdida de peso de

agua coordinada entre 120-300 °C se mantuvo con un valor del 5 %, este proceso no se ve afectado por el tratamiento.

El material **MIL-100(Fe)** después del tratamiento en *buffer* dio lugar a **MIL-100(Fe)-tratada** y presenta en su espectro infrarrojo (**figura 11, panel A** rojo) una banda en 1710 cm⁻¹, que corresponde al grupo COOH del ácido trimésico superficial en una proporción más pronunciada en comparación con el material **MIL-100(Fe)** prístino, indicando su degradación. También se observan dos bandas en 1106 y 1034 cm⁻¹ pertenecientes al benceno, características del BTC cuando se encuentra en su forma superficial en **MIL-100(Fe)-tratada**, el cual no está totalmente coordinado con el Fe(III) o que solo se coordina de un lado [77]. Todas las demás bandas se conservaron.

La pérdida de cristalinidad debido a la liberación progresiva del ligando (BTC) de la estructura tridimensional provoca un material más amorfo [75]. El análisis de TGA de **MIL-100(Fe)-tratada** (**figura 11, panel C**, rojo) nuevamente mostró que la combustión del ligante orgánico (BTC) se llevó a cabo en un proceso de dos etapas. La primera etapa de 300-448 °C con una pérdida de peso del 26 %, 4 % de BTC ocluido dentro de los poros y 22 % de BTC superficial. Esto implica que el tratamiento lavó y removió parte del BTC ocluido y expuso más BTC superficial en la **MIL-100(Fe)-tratada** en comparación con el material no tratado y de esta manera se dedujo cual de los picos corresponde al BTC ocluido. La segunda etapa es del intervalo 448-541 °C observándose una pérdida de peso del 15 %, perteneciente al BTC estructural de la **MIL-100(Fe)-tratada**.

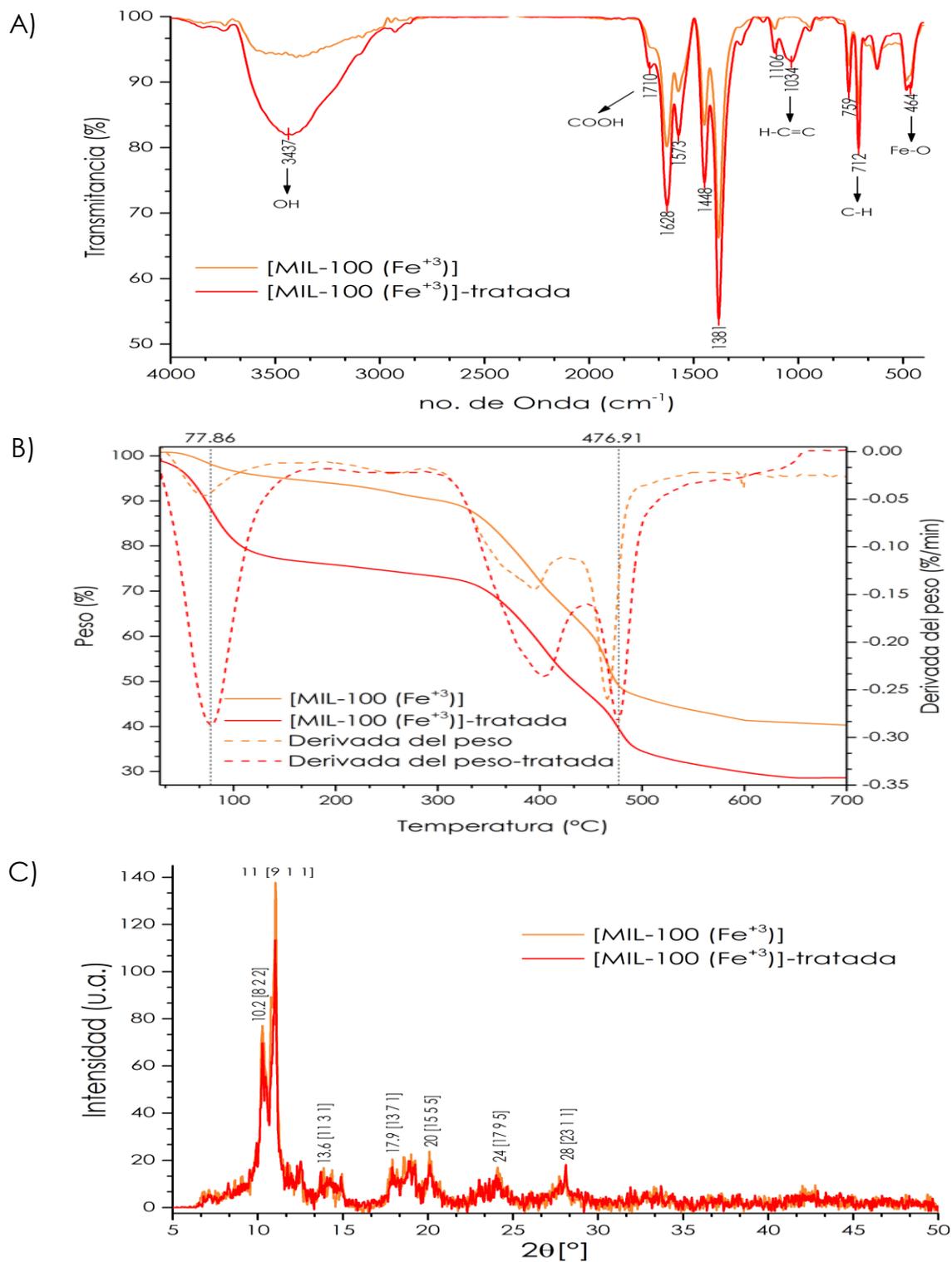


Figura 11. Caracterización de la MOF **MIL-100(Fe)-tratada** por FTIR **(A)**, TGA **(B)** y DRX **(C)** después del tratamiento. Recién sintetizada (**café**) y después (**rojo**) de estar en solución [*buffer* de fosfatos/etanol] 1.55 mM/2.12 mM (65 %) por 18 h.

La liberación de ácido trimésico (BTC) al medio debido a la presencia de iones fosfatos fue del 6 %, que resulta de la suma de BTC ocluido y BTC estructural (interno+superficial), comparando el termograma de ambos materiales [74]. La pérdida de peso de ~ 4.5 % entre 541-768 °C se mantuvo con respecto a su contraparte sin solvatar. No se observó liberación de especies iónicas de hierro al medio.

Cabe mencionar que aunque la MOF **MIL-100(Fe)** contenga moléculas de BTC ocluidas en sus poros, esto no modifica el patrón de difracción de rayos X, a diferencia de otras MOFs; debido a que **MIL-100(Fe)** es un material mesoporoso que puede adsorber y ocluir fármacos, como aspirina e ibuprofeno, sin que este proceso altere la estructura cristalina del material poroso ni se cambie el patrón de difracción [78].

La **MIL-100(Fe)** en solución de *buffer* de fosfatos/etanol se volvió un 20 % más amorfa pero conservó su estructura porosa primaria, aunque se registró una liberación del 6 % de BTC en su forma protonada libre al medio.

6.1.4. Obtención y caracterización de MOF **MIL-53(Fe)**

La síntesis de la red metal orgánica **MIL-53(Fe)** se obtuvo a partir de ácido benceno-1,4-dicarboxílico (BDC) y cloruro de hierro(III) hexahidratado en proporción 1:1 en DMF. La mezcla se mantuvo en agitación y calentamiento a ~ 130 °C por 18 h en una parrilla, una vez transcurrido el tiempo de reacción, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente. El sólido se separó por filtración y se lavó 2 x 25 mL de DMF, el material resultante se dejó secar durante una noche a 80 °C en el horno, dando lugar a la **MIL-53(Fe)** de esta manera [42].

Analizando este material, se puede evidenciar que la **MIL-53(Fe)** se forma por cadenas "infinitas" de unidades octaédricas de $[\text{FeO}_4(\text{OH})_2]$, donde cuatro átomos de oxígeno provenientes de un grupo carboxílico de diferentes ácidos tereftálicos se unen a un átomo de hierro. De esta manera

se genera una estructura tridimensional ordenada con un poro unidimensional de forma rómbica a lo largo del eje c. Este material pertenece a las MOFs que tienen la propiedad de adaptar el tamaño de la apertura del poro, por lo que su estructura es altamente flexible, y tiene diferentes fases cristalinas en función de las interacciones de los huéspedes con los sitios del material.

Cuando esta MOF se encuentra en su estado hidratado los poros de la **MIL-53(Fe)** disminuyen la apertura promedio y se cierran parcialmente generando una forma monoclinica I2/a de poro estrecho. Esto ocurre debido a la interacción por puentes de hidrógeno entre los átomos de hidrógeno del agua y su unión con los átomos de oxígeno vecinos al Fe. Los poros de la **MIL-53(Fe)** llevan a cabo un proceso de apertura cuando se encuentran en presencia de moléculas orgánicas, la expansión de los poros permite el confinamiento de las moléculas huésped en un mayor volumen, dándole una forma ortorrómbica de grupo espacial P 21/n de poro largo. La cantidad de volumen ocupado en los poros por las moléculas huésped así como la distancia que se expandirá el poro, depende directamente de las interacciones entre la **MIL-53(Fe)** con las moléculas adsorbidas, y las formadas entre moléculas huésped. La **MIL-53(Fe)** tanto en su fase desolvatada o en ausencia de otros huéspedes orgánicos, como en su fase deshidratada, también conocida como fase "activada", cuando los poros se encuentran en ausencia de moléculas huésped, tiene un grupo espacial monoclinico de tipo C 2/c [79].

En su estado hidratado los poros se encuentran en la geometría que se considera más cerrada de todas sus fases, impidiendo el acceso de otras moléculas huésped. Teniendo como resultado una área superficial específica de $23 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ y un volumen de poro de $0.0215 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ (valores pequeños en comparación con otras MOFs), presentando tamaños de partícula entre $30\text{-}40 \mu\text{m}$ y poros con diámetros de $\sim 10 \text{ \AA}$ [80]. La apertura

de los poros por la presencia de moléculas orgánicas incrementa el área superficial específica, dándole un valor de hasta $1300 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, aprox. 57 veces mayor en comparación con la fase cerrada.

El patrón de difracción (**figura 12, panel C**) obtenido para la MIL-53(Fe) corresponde a una mezcla de fases donde los poros tienen ocluidos dos tipos de moléculas: DMF y H_2O , la fase que se encuentra en mayor proporción para esta metodología de síntesis es la que tiene moléculas de DMF atrapadas ya que fue el disolvente de reacción. Los picos distintivos de la fase con DMF son 2θ ($^\circ$): 9.3, 9.6, 16.5, 18.7, 19.3, 20.9, 21.3, 28.3 mientras que los picos para la fase con H_2O son 2θ ($^\circ$): 12.5 y 13.9; los cuales están en concordancia con lo reportado previamente por Kazemian *et al.* [42]. Este patrón de difracción también se asocia con un estado semiactivado de la **MIL-53(Fe)**, donde existe una concentración intermedia de sitios de coordinación no saturados de Fe(II) y Fe(III). La obtención de distintas fases o mezcla de fases con poros abiertos, semiabiertos o cerrados de la **MIL-53(Fe)** es causada directamente por el tipo de síntesis empleado y el posterior tratamiento del material [80]–[82].

La DMF de síntesis se encuentra interaccionando de dos formas con el material y ambas se describirán a continuación. La DMF es una molécula huésped que puede o no encontrarse unida covalentemente a la red metal orgánica. En el caso particular, una parte está formando puentes de hidrógeno entre el C=O de la DMF y los grupos OH de los fragmentos octaédricos de Fe, con una distancia de 2.68 \AA por cada unión $\text{C}=\text{O} \cdots \text{H}-\text{O}$ (equivalente al caso de formar puentes de hidrógeno con piridina); por otro lado, cierta cantidad de DMF se une directamente por medio del átomo de oxígeno de la DMF con los átomos de Fe por enlace covalente coordinado en las cadenas octaédricas; la molécula de DMF es plana y se encuentra perpendicular a las cadenas octaédricas y el resto de sus átomos forman interacciones de van der Waals o interacciones extremadamente débiles

de puente de hidrógeno del tipo C-H...O con la red metal orgánica. La **MIL-53(Fe)** obtenida en este estudio tiene una fase mayoritaria donde las moléculas de DMF se encuentran unidas por medio de puentes de hidrógeno [83].

Para la **MIL-53(Fe)** el espectro infrarrojo (**figura 12, panel A**) muestra una vibración de estiramiento ancha en el intervalo entre 3360-3105 cm^{-1} correspondiente a la presencia de grupos -OH, pertenecientes tanto a moléculas de H_2O adsorbidas en la superficie del material como de aquellas ocluidas en los poros, así como grupos OH puente entre octaedros de Fe. La banda en 1660 cm^{-1} es del estiramiento asimétrico del carboxilato en modo anisobidentado, que se encuentra coordinado al Fe. Y la banda en 1598 cm^{-1} es para la coordinación isobidentada asimétrica del carboxilato con los átomos de Fe. Al parecer, no se encuentran bandas en 1692, ni en 1683 cm^{-1} indicando que aparentemente no se encuentran grupos de ácido carboxílico libres, ni ésteres metálicos, sin embargo al analizar la muestra por TGA se determina que si hay BDC ocluido en el material. Las bandas en 1436 y 1392 cm^{-1} son los estiramientos simétricos del -COO en su coordinación aniso e iso-bidentada respectivamente, una vez más asegurando la presencia de ligandos dicarboxilados unidos a metal. Las proporciones de las bandas en sus modos aniso e isobidentada indican una mayor contribución de coordinaciones isobidentadas en la estructura cristalina. La banda estrecha presente en 749 cm^{-1} corresponde a las vibraciones de flexión de los anillos aromáticos de los carboxilatos [82]. La banda en 1503 cm^{-1} es típica cuando el átomo de oxígeno de la DMF se encuentra coordinado con el átomo metálico, confirmando la presencia de cierta parte de moléculas de DMF en su forma coordinada [83].

El análisis por DRX indicó que se cuenta con una fase cristalina con moléculas orgánicas ocluidas en los poros, aparte de DMF ocluida también se cuenta con ligante orgánico BDC en los poros. En 1295 cm^{-1} se observa

una banda tenue característica de BDC en su forma protonada, mientras que la banda en 1692 cm^{-1} típica de los ácidos carboxílicos del BDC en su forma protonada cuando se encuentran intercalados en los poros se encuentra sobrelapada por la banda en 1660 cm^{-1} . Las bandas para el BDC en su forma libre soluble disperso y para el BDC protonado ocluido en los poros del material **MIL-53(Fe)** son distintas [77], [84].

La banda estrecha simétrica en 1015 cm^{-1} es la flexión que señala la formación de puentes de hidrógeno entre grupos -OH pertenecientes a moléculas de H_2O adsorbidas en los poros. Las bandas en 887 y 822 cm^{-1} son asociadas a los modos vibracionales del grupo -OH pertenecientes al grupo puente hidroxilo (Fe-O(H)-Fe). La ausencia de bandas asociadas a vibraciones características para DMF en su forma libre indica que se encuentra ocluida en los poros mayormente formando puentes de hidrógeno y también coordinada. La banda en 1625 cm^{-1} relacionada con una muestra totalmente hidratada no se observa, corroborando la semihidratación de nuestro material por agua adsorbida. El enlace de coordinación característico entre el catión Fe^{+2} y los dos aniones de carboxilato (COO^-) corresponden a la banda en 555 cm^{-1} , mostrando la existencia de los enlaces tipo Fe-O_μ que son inherentes en la estructura de la **MIL-53(Fe)** [42], [82], [85].

En el termograma de la **MIL-53(Fe)** que se aprecia en la **figura 12, panel B** se puede observar una pérdida del $\sim 3\%$ en el intervalo $25\text{-}109\text{ }^\circ\text{C}$ perteneciente a la evaporación de H_2O en la superficie del material. En el intervalo $109\text{-}162\text{ }^\circ\text{C}$ no se registró ningún cambio en el peso por lo que podemos descartar DMF fisisorbida (punto de ebullición: $153\text{ }^\circ\text{C}$) en la MOF; de 162 a $299\text{ }^\circ\text{C}$ hubo una pérdida del 7% correspondientes a moléculas de DMF tanto formando puentes de hidrógeno, como coordinadas con los centros metálicos Fe, también contribuyen a la pérdida ciertas moléculas de agua atmosférica coordinadas. La descomposición de la MOF **MIL-53(Fe)** es

un proceso de múltiples pasos, el primero es entre 299-398 °C con una pérdida del 24 % y el segundo es entre 398 a 530 °C con una pérdida del 30 %. Como se mencionó antes, el análisis por DRX y FTIR señaló que hay moléculas de ligante orgánico ocluido en los poros, la pérdida de peso del 24 % corresponde al BDC protonado intercalado en los canales del material. Mientras que la pérdida del 30 % corresponde a la descomposición del BDC estructural de la MOF, dándose el colapso de la misma [65]. Por último existe una pérdida del 9 % en el intervalo 530-793 °C. La descomposición a una velocidad lenta y en pasos puede atribuirse a la formación de partículas de Fe₂O₃ que rodean al material creando una obstrucción para la transferencia del calor por convección [80], [86].

La MOF **MIL-53(Fe)** posterior al tratamiento (**MIL-53(Fe)-tratada**) presentó en su patrón de difracción (**figura 13, panel C, rojo**), una disminución promedio del ~ 70 % de intensidad para los picos de referencia en 2θ (°): 9.3, 12.5, 18.7, 21.3, y la desaparición de los picos correspondientes a 2θ (°): 9.6, 13.9, 16.1, 16.5, 17, 19.3, 20.9, 21.8, 25.8, 26.1, 28.3; también se registró la aparición de nuevos picos en 2θ (°): 10.4, 24.4, 29.5 con una intensidad promedio de ~ 35.6 unidades arbitrarias, indicando la formación de una nueva fase poco cristalina.

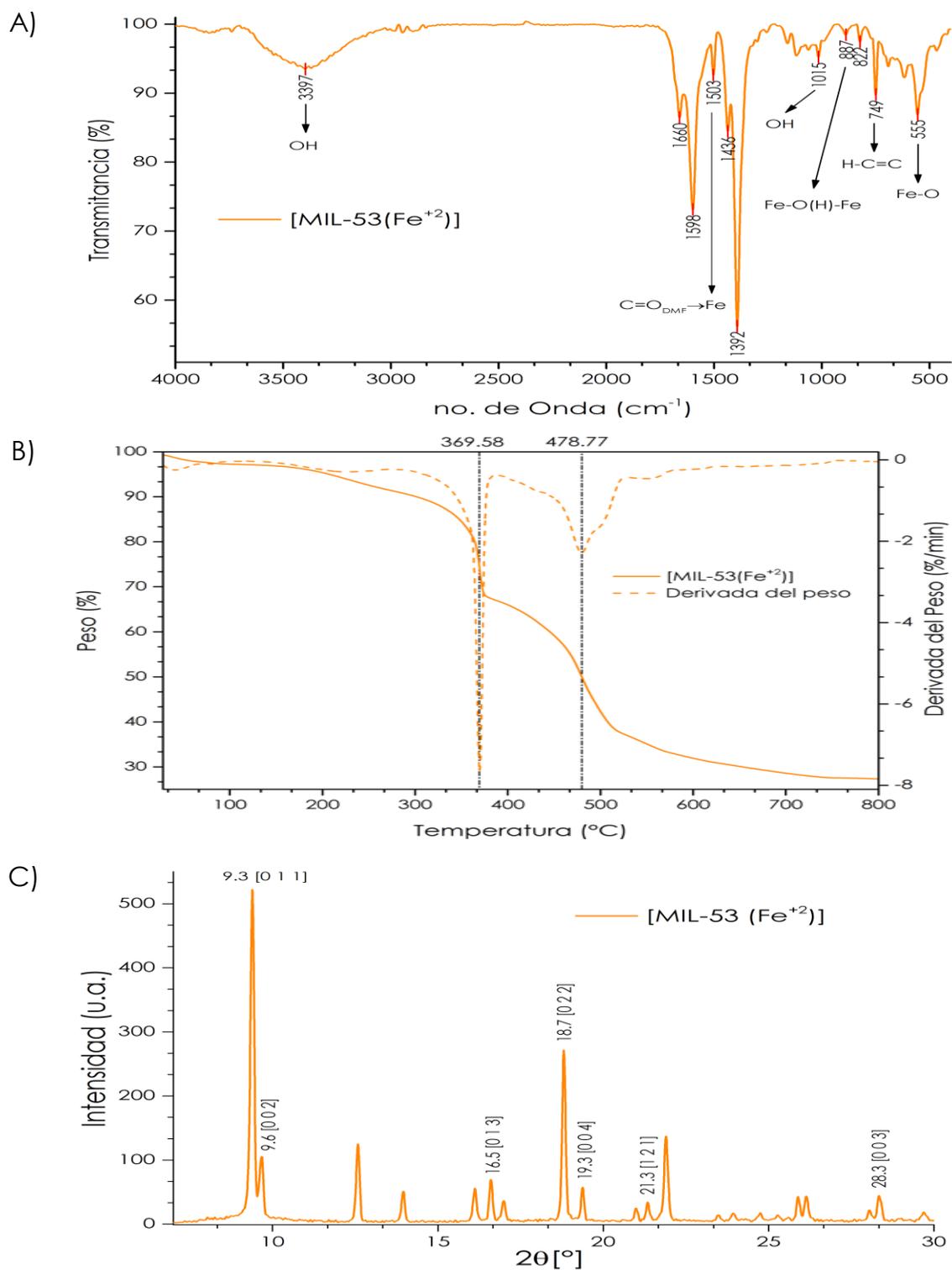


Figura 12. Caracterización de la MOF **MIL-53(Fe)** por FTIR **(A)**, TGA **(B)** y DRX **(C)** recién sintetizada.

Tanto la disminución como la desaparición de los picos de referencia son indicativos de un colapso parcial de la red metal orgánica, resultando en una destrucción de los poros del material. La gran pérdida de cristalinidad de la **MIL-53(Fe)** es propiciada por una interacción tipo ácido-base de Lewis.

Donde los aniones del $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ y HPO_4^{-2} del *buffer*, tienen la habilidad de donar un par de electrones (base de Lewis) a los centros catiónicos $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$ (ácido de Lewis) de la MOF, propiciando una fuerte interacción. La reacción entre los aniones de fosfato y los átomos de hierro generalmente se presenta en soluciones de sales de fosfatos a pH neutro [84], [87]. También las moléculas de agua contribuyen a la degradación del material por medio de un mecanismo de hidrólisis, pero en menor medida dado que no se encuentra en un sistema totalmente acuoso [33], [84].

Los picos emergentes en el difractograma (**figura 13, panel C, rojo**) después del tratamiento pueden estar asociados a la formación del compuesto ferrihidrita, dado que, en condiciones de oxidación y bajas temperaturas las redes metal orgánicas que contengan nodos de hierro exhiben degradación, generando usualmente especies de oxihidróxidos de hierro [84].

La descomposición del material y cierre de los poros también se puede corroborar por el espectro infrarrojo (**figura 13, panel A, rojo**), donde la banda ancha representativa de moléculas de H_2O adsorbidas por el material en los poros desaparece. La aparición de bandas en 1318 y 1296 cm^{-1} después del tratamiento, características del BDC en su forma protonada [88], ratifican que existe hidrólisis parcial de la **MIL-53(Fe)**, obteniéndose liberación de ligante orgánico (BDC) al medio. La banda en 1692 cm^{-1} representativa de los ácidos carboxílicos del BDC en su forma protonada cuando se encuentran intercalados en los poros no se observa, indicando su ausencia y esto se corrobora por TGA. La banda en 1436 cm^{-1}

disminuye considerablemente indicando un colapso parcial de la MOF, las bandas restantes se conservan sin presentar mayor cambio [84]. La MOF **MIL-53(Fe)** tiene un proceso de descomposición lento en bajas concentraciones de fosfatos por lo que después de la reacción sobrará cierta cantidad de material en su forma original.

El análisis del termograma (**figura 13, panel B, rojo**) indica que la degradación característica para la **MIL-53(Fe)**, en su forma porosa y con BDC ocluido, dada en dos pasos, se pierde. Existe un proceso entre 25-100 °C con una pérdida del 7 % en peso correspondiente a moléculas del solvente (H₂O, EtOH) adsorbidas en la superficie del material. De 100 hasta 204 °C se registró una pérdida de peso del ~ 3 % que se le puede atribuir a H₂O quimisorbida y DMF fisorbida en la superficie del material. Las moléculas de DMF todavía coordinadas a los centros metálicos representaron una pérdida de peso del 12 % en el intervalo de 204-310 °C.

La degradación del ligante orgánico (BDC) que constituye al material se llevó a cabo en dos pasos, en el intervalo de 310-532 °C con una pérdida del 42 % en total. Pero aunque las dos etapas observadas para el material prístino no están tan bien definidas, todavía podemos discernir, hasta cierto punto, entre dos eventos. El primero para el intervalo 310-397 °C con una pérdida de peso del 16 % que corresponde a las moléculas de BDC superficiales del material amorfo que pudo provenir del BDC ocluido y que posteriormente se coordinó con los nuevos centros metálicos superficiales de Fe expuestos. Y en el segundo intervalo de 397-532 °C se registró una pérdida de peso del 26 % siendo del BDC más estructural de la MOF amorfa. Al comparar los termogramas del material **MIL-53(Fe)** antes y después del tratamiento se determinó que hubo una liberación del 12 % de BDC en su forma protonada al medio.

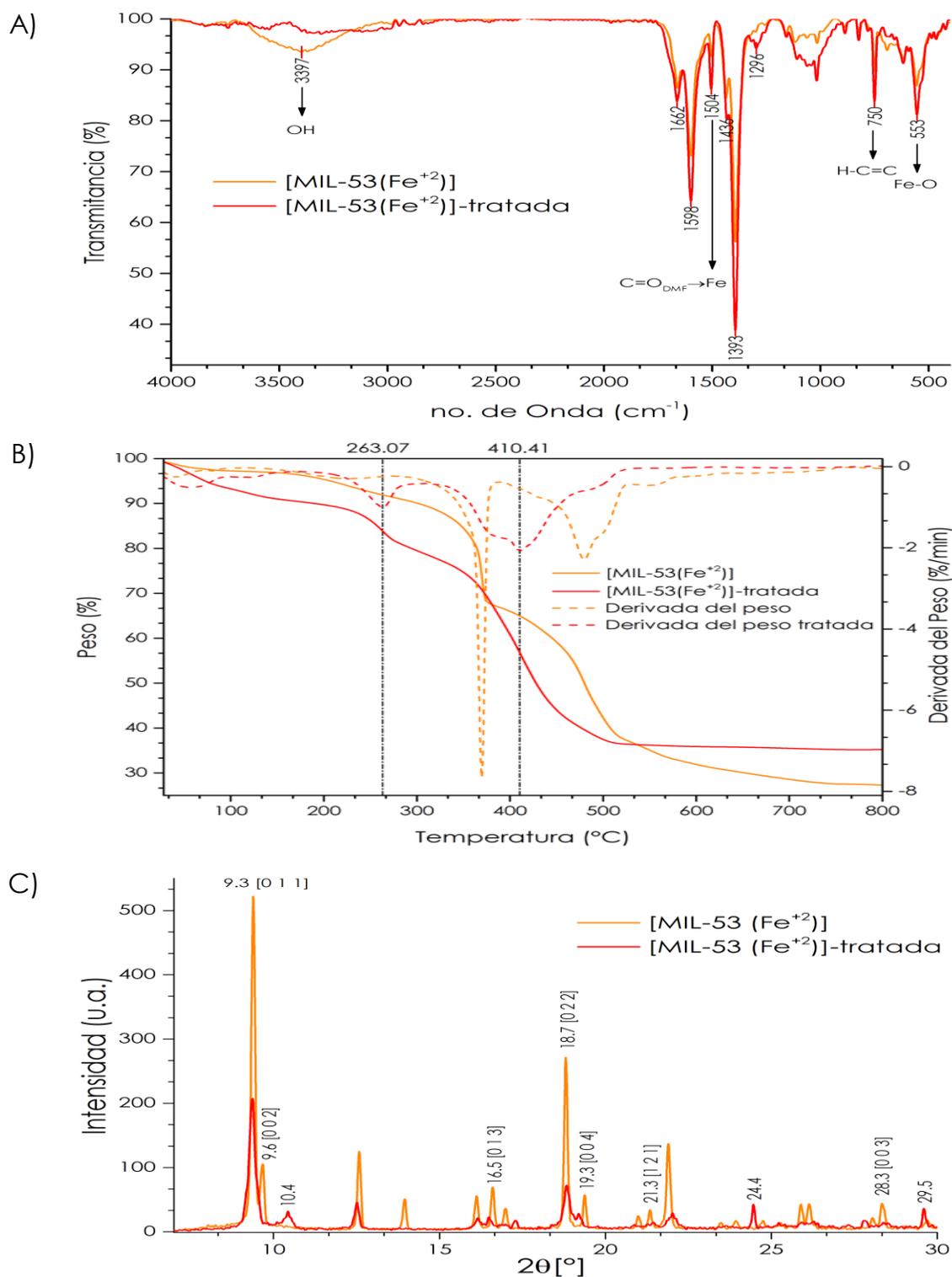


Figura 13. Caracterización de la MOF **MIL-53(Fe)-tratada** por FTIR **(A)**, TGA **(B)** y DRX **(C)** después del tratamiento. Recién sintetizada (**naranja**) y después (**rojo**) de estar en solución [buffer de fosfatos/etanol] 1.55 mM/2.12 mM (65 %) por 18 h.

Y 8 % proveniente del BDC ocluido en los poros y ~ 4 % del BDC estructural de la MOF, debido al efecto de los iones fosfato y las moléculas de agua. De 532 a 794 °C no se registraron pérdidas considerables, se calculó que la cantidad liberada al medio de especies de hierro (oxihidróxidos) fue del 8 % [84].

La MOF **MIL-53(Fe)** no mostró estabilidad química en el tratamiento en *buffer* de fosfatos, obteniéndose una estructura colapsada y con disminución considerable de porosidad y de la cristalinidad.

6.1.5. Obtención y caracterización de MOF **MIL-96(Al)**

En la síntesis de la **MIL-96(Al)** se disolvió ácido bencen-1,3,5-tricarboxílico y nitrato de aluminio(III) nonahidratado ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) en proporción 1.5:1 en agua Milli-Q. La solución se colocó en un reactor de acero inoxidable y celda de teflón a 150 °C por 72 h. El compuesto blanco resultante se dejó en un matraz con DMF en agitación a ~ 150 °C por 12 h, el sólido blanco se filtró al vacío y se lavó 2 veces con etanol absoluto, posteriormente se secó a 80 °C por 18 h en un horno dando como resultado a la MOF **MIL-96(Al)** [43].

El material **MIL-96(Al)** es una red metal orgánica formada por aluminios hexacoordinados con geometría octaédrica, conectados por ligandos trimesatos [BTC]⁻³, y cuenta con dos bloques inorgánicos particulares. El primer ordenamiento “*moiety*” o fragmento consiste en una subunidad de un trímero de aluminio octaédrico [$\text{AlO}_5(\text{H}_2\text{O})$] μ_3 -oxo centrado que se coordina por medio de ligandos de trimesatos esquinados μ_3 -O. La segunda subunidad inorgánica se conforma por una red de dos dimensiones compuesta de cadenas sinusoidales de octaedros de aluminio $\text{AlO}_2(\text{OH})_4$ y $\text{AlO}_4(\text{OH})_2$. Las cuales se encuentran interconectadas entre ellas mismas para formar un enrejado de panal de anillos hexagonales de 18 miembros en el plano (*a*, *b*). Los dos tipos de grupos de aluminio no equivalentes, se coordinan entre ellos mediante uniones del tipo μ_2 -hidroxo con cuatro

[AlO₂(OH)₄] y dos [AlO₄(OH)₂] átomos de oxígeno provenientes del ligante [BTC]⁻³, teniendo la secuencia específica *-cis-cis-trans* para los grupos hidroxilo. La MOF **MIL-96(Al)** cuenta con tres tipos de "jaulas", dos de ellas están localizadas en las posiciones espaciales (0 0 0) y (2/3 1/3 1/4), cuentan con volúmenes de poro de ~ 420 y 635 Å³, respectivamente, y tienen la capacidad de encapsular moléculas de agua atmosféricas o del medio. La tercera tiene un volumen de poro más pequeño y contiene especies de aluminio octaédrico desordenadas [Al(OH)₆] [89], [90].

La MOF **MIL-96(Al)** es altamente cristalina, las partículas tienen una superficie suave y una morfología en forma de prisma hexagonal puntiagudo en los extremos (tipo lápiz), con diámetros de 1.5 μm y 1-2 μm de longitud. Es un material microporoso que cristaliza en un grupo espacial hexagonal de tipo *P6₃/mmc*, cuenta con un área superficial específica de 272 m²·g⁻¹ y un diámetro de poro de 8.8 Å [91].

La posición y las intensidades relativas de los picos de difracción observados en el difractograma (**figura 14, panel C**) son consistentes con el patrón simulado del archivo .cif de monocristal [89] para la **MIL-96(Al)**. Los picos en 2θ (°): 7.1, 7.6, 9, 14.2, 14.5 son los característicos para aseverar la obtención del material; dada su elevada cristalinidad se obtuvieron intensidades de unidades arbitrarias altas [92].

La red metal orgánica **MIL-96(Al)** ha demostrado tener una gran capacidad de adsorción de CO₂, proceso que se puede llevar a cabo en condiciones de baja presión, a temperatura ambiente y en presencia de humedad (hasta un 40 %); en comparación a otras MOFs de poros pequeños su capacidad de adsorción de CO₂ es desproporcionadamente alta. El CO₂ se adsorbe en las cavidades menos hidrofílicas del material con presencia de los grupos μ₂-OH, de baja acidez, en algunos casos la adsorción puede ser irreversible [93].

En el espectro infrarrojo para la **MIL-96(Al)** (figura 14, panel A) se puede observar una banda ancha en el rango 2394-2331 cm^{-1} , donde se sobrelapan dos señales. La primera en 2372 cm^{-1} se asocia a la formación de complejos $\text{Al}^{+3}\leftarrow\text{OCO}$, debido a la unión del CO_2 con los sitios metálicos de coordinación no saturados (*cus*) de Al^{+3} por medio de enlaces de coordinación. La segunda banda se encuentra en 2338 cm^{-1} siendo representativa de la creación de aductos de la forma $\text{OH}\cdots\text{OCO}$, asociación característica entre CO_2 y los grupos $\mu_2\text{-OH}$ de las cavidades del material, por medio de puentes de hidrogeno. Una banda sumamente pequeña se observa en 2326 cm^{-1} , que corresponde a quimisorción de CO_2 en los sitios metálicos del material [93], [94].

Las bandas observadas en 1661 y 1579 cm^{-1} , corresponden a estiramientos asimétricos del grupo carbonilo en sus formas *aniso-* e *iso-*bidentadas, respectivamente. Las bandas en 1457 y 1402 cm^{-1} señalan los estiramientos simétricos del grupo carbonilo tanto en sus formas *aniso-* e *iso-*bidentadas, igualmente, confirmando la coordinación entre grupos carbonilos de las especies de los ligantes BTC y los átomos de aluminio. Las bandas en 768 y 735 cm^{-1} son las vibraciones de flexión de los grupos C-H en los anillos aromáticos del ligante (BTC), la banda en 1079 cm^{-1} se asocia a las vibraciones de estiramiento para la unión Al-OH. Una banda muy pequeña se observa en 1718 cm^{-1} y corresponde a ligante orgánico (BTC) protonado, dado que la región de 1740-1710 cm^{-1} es particular para las bandas del grupo COOH del ácido trimésico en su forma soluble libre. Debido al pequeño tamaño de los poros se descarta la oclusión del ligando en su forma protonada dentro de los poros [95].

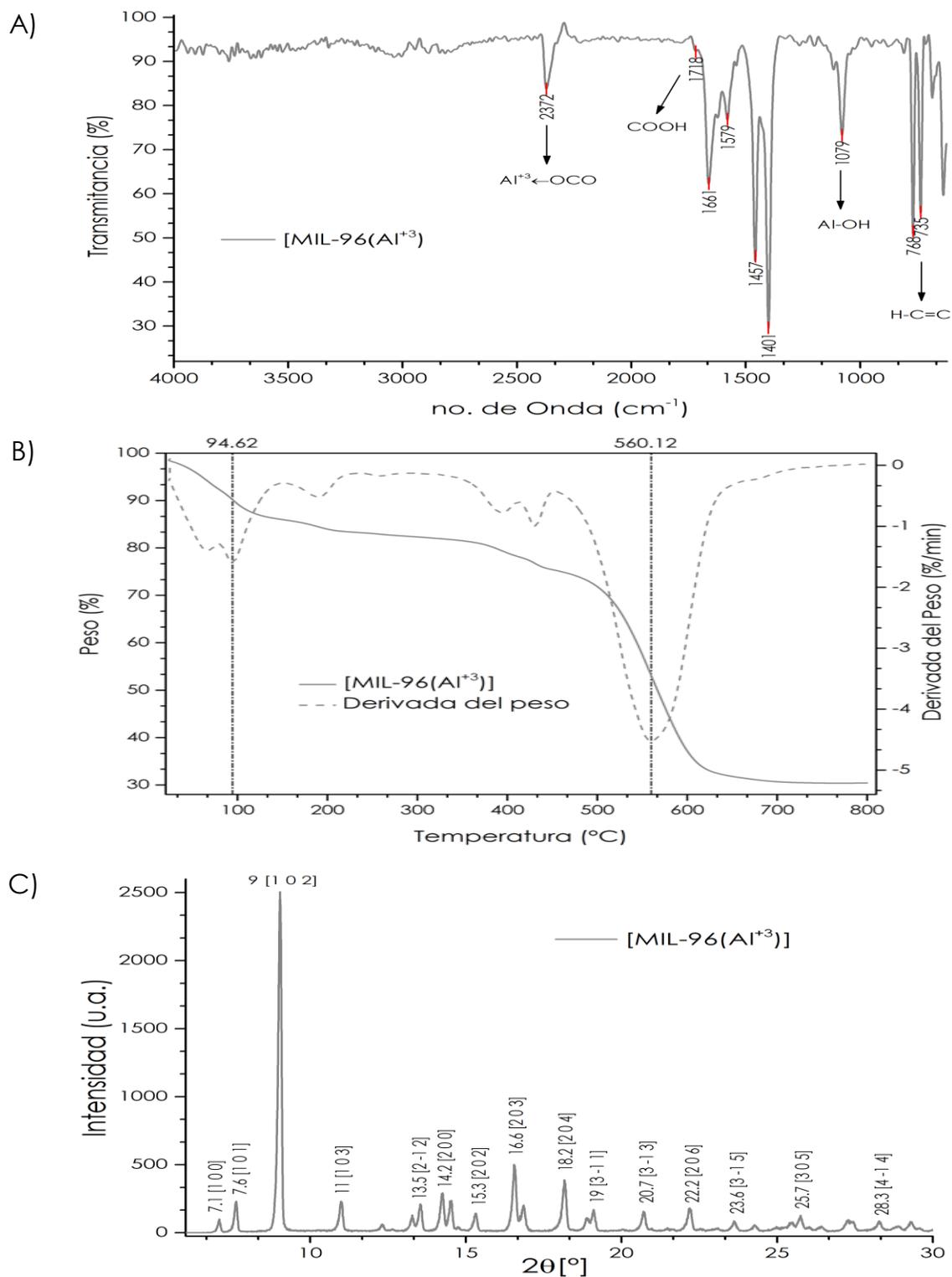


Figura 14. Caracterización de la MOF **MIL-96(Al)** por FTIR **(A)**, TGA **(B)** y DRX **(C)** recién sintetizada.

El termograma muestra (**figura 14, panel B**) que la **MIL-96(Al)** pierde un 14 % de peso en el intervalo de 25-150 °C, correspondiente a la remoción de moléculas de agua fisi- y quimi-sorbidas, las cuales se encuentran atrapadas en las cavidades porosas del material y una parte de esta pérdida también representa la eliminación del agua que se encuentra coordinada con los átomos de aluminio. En el intervalo de 150-231 °C se observa una pérdida del ~ 3 % debida a la eliminación de moléculas de DMF fisisorbidas, mientras que la pérdida del ~ 2 % entre 231-344 °C es DMF quimisorbida. El análisis por FTIR indicó la presencia de BTC en su forma protonada soluble, la pérdida de peso del 6 % en el intervalo de 344-453 °C, corresponde a ligante orgánico (BTC) que se encuentra adsorbido en la superficie del material, no ocluido. La descomposición de la MOF se da en un solo proceso, de 453-710 °C donde se registra una pérdida de peso del 46 %, que indica el desprendimiento y degradación del ligante orgánico (BTC) estructural de la red. En el último paso del procedimiento de degradación que va de 710 a 799 °C no hubo cambios significativos en el peso (~ 0.5), generando especies de Al₂O₃ [43], [92].

El material después del tratamiento mostró una disminución en la intensidad de los picos de difracción (**figura 15, panel C, rojo**) del 40 % para los valores de referencia. No se observó la aparición de picos nuevos pero el pico en 2θ (°): 7.08 desapareció casi por completo, aunque este plano cristalográfico de baja intensidad (~ 98 u.a.) no está considerado entre los tres principales asociados a modificaciones de la morfología de la **MIL-96(Al)** [92].

El material conservó casi en su totalidad su morfología y alta cristalinidad en presencia de los iones fosfatos y etanol. Aunque en el espectro infrarrojo (**figura 15, panel A, rojo**) la banda en 1718 cm⁻¹ asociada con el ligante orgánico en su forma protonada aumentó ligeramente, indicando la liberación de BTC al medio [95]. Los ligantes orgánicos BTC liberados al

medio están localizados en la superficie de los cristales del material y se desprenden debido a un proceso de demetalación superficial del BTC estructural, ya que estos aniones fosfatos han mostrado un fuerte efecto secuestrante hacia el Al [94]. Y el ligante BTC ocluido en los poros no se observa, muy probablemente debido a que los mismos fosfatos generan la forma aniónica del BTC, la cual es muy soluble en el medio [96].

Otro cambio observado en el espectro infrarrojo (**figura 15, panel A, rojo**) del material **MIL-96(Al)** después del tratamiento en la solución de fosfatos y etanol, es la desaparición de la banda en $2394\text{-}2331\text{ cm}^{-1}$, que corresponde a las diferentes interacciones entre la MOF y el CO_2 , y la aparición de una banda en el rango $3722\text{-}3108\text{ cm}^{-1}$. La MOF **MIL-96(Al)** es de naturaleza hidrofílica, y aunque es de las pocas MOFs donde las moléculas de CO_2 y H_2O no compiten por los mismos sitios de adsorción, en condiciones de humedad alta o en sistemas totalmente acuosos la capacidad de adsorción de CO_2 del material disminuye considerablemente, dado que las moléculas de H_2O también son adsorbidas en los poros que contienen grupos $\mu_2\text{-OH}$. Las moléculas de H_2O son adsorbidas preferencialmente en las cavidades que contienen grupos más hidrofílicos como: $\text{H}_2\text{O-Al}(1)\text{H}_2\text{O}_{\text{terminal}}$, $\text{Al}(3')\text{H}_2\text{O}_{\text{terminal}}$, $\text{Al}(3)\text{H}_2\text{O}_{\text{terminal}}$, formando clatratos de H_2O por medio de una red de puentes de hidrógeno muy fuertes, saturando los poros [93].

En la banda del rango $3722\text{-}3108\text{ cm}^{-1}$ se encuentran sobrelapadas varias bandas, una en 3388 cm^{-1} que corresponde a las vibraciones de estiramiento de los grupos -OH en los puentes de hidrógeno del H_2O adsorbida, donde los dos protones del agua interactúan con sitios básicos, presumiblemente el oxígeno de los carboxilatos del material. También en este rango se encuentran las bandas de estiramiento de los grupos libres de -OH de los carbonilos del BTC superficial del material y de acuerdo a los autores [94], éstos no participan en la formación de puentes de hidrógeno con el H_2O adsorbida. Mientras que existe una banda débil en 3415 cm^{-1} característica

para los grupos -OH de las moléculas de H_2O que se encuentran coordinadas al Al^{+3} del material ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Al}$). Las bandas en 3685 y 3681 cm^{-1} corresponden a las vibraciones de estiramiento para los -OH terminales de la estructura Al-OH , mientras que las bandas en 991 y 952 cm^{-1} son las vibraciones de flexión de la misma estructura. Mientras que las bandas en 3650 , 3639 y 3623 cm^{-1} se le pueden atribuir a los grupos puente tipo $\mu_2\text{-OH}$, los modos vibracionales de flexión para el mismo grupo se observan en las bandas sobrelapadas en 1087 y 1076 cm^{-1} [94].

La **MIL-96(Al)** tiene un ancho de poro medio de 5.6 \AA , por lo que se le considera un material microporoso con la habilidad de discriminar por tamaño entre aniones. El tamaño de los cúmulos de aniones PO_4^{-3} (por ejemplo el dímero puenteado $(\text{HO})_2\text{P}(\text{O})\text{-O-P}(\text{O})(\text{OH})_2$) es de 7.95 \AA , esto dificultará la entrada de los aniones más grandes a los poros para su posterior interacción con los sitios (*cus*) del material y darse una degradación del mismo. Cabe mencionar que los poros de la **MIL-96(Al)** se pueden expandir de $4\text{-}5 \text{ \AA}$ por lo que el diámetro del poro mayor será de 11 \AA , dándose la posibilidad de una degradación/demetalación por iones fosfatos. Aunque ésta será muy lenta debido al tamaño pequeño de los poros de la **MIL-96(Al)** y estará condicionada por la concentración de iones y tiempo de exposición a estos, así como de la activación del efecto de "respiración" por parte del medio en que se encuentre el material [92].

El termograma (**figura 15, panel B, rojo**) mostró cambios mínimos con respecto al material antes del tratamiento, tanto en los intervalos de temperatura como en las pérdidas de peso se mantuvieron tendencias prácticamente iguales, solo se observó una pequeña redistribución de la cantidad de moléculas de agua fisi- y quimi-sorbidas.

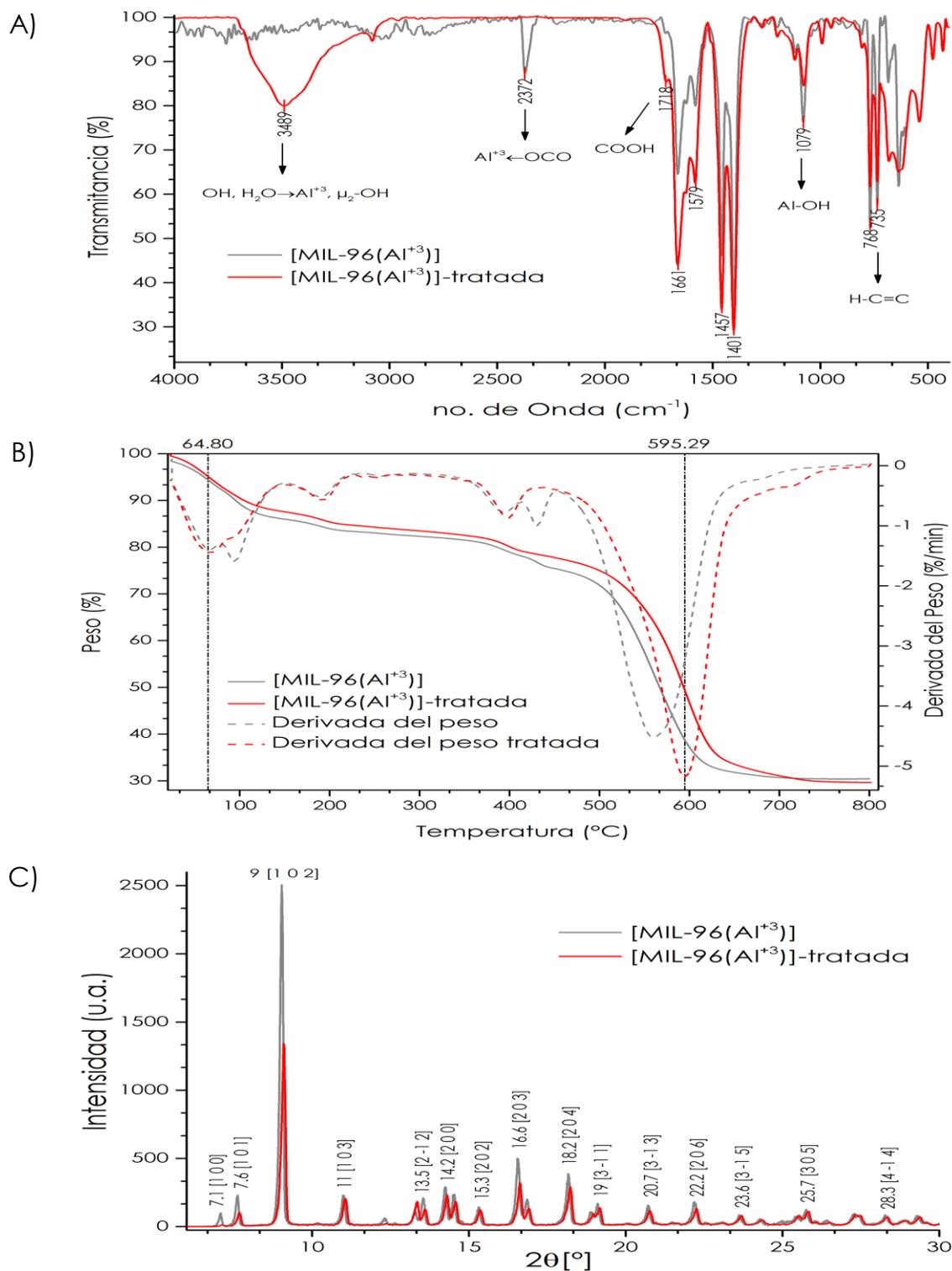


Figura 15. Caracterización de la MOF **MIL-96(Al)-tratada** por FTIR (**A**), TGA (**B**) y DRX (**C**) después del tratamiento. Recién sintetizada (**gris**) y después (**rojo**) de estar en solución [*buffer* de fosfatos/etanol] 1.55 mM/2.12 mM (65 %) por 18 h.

También se determinó que hubo una liberación del ~ 2 % de BTC al medio, nuevamente debido a la interacción del material con los fosfatos. Aunque este ligante orgánico liberado al medio pudo provenir del BTC adsorbido en la superficie y no del BTC estructural de la MOF, según el termograma, además de una degradación del BTC quimisorbido de forma superficial en el material. La **MIL-96(Al)** es un material con una gran estabilidad termal e hidrotermal y cuenta con una baja capacidad de adsorción acuosa atmosférica, solo estando en solución se hidrata, pero es muy resistente a la hidrólisis [92]. No se registró liberación de especies de aluminio significativa (~ 0.5 %).

La MOF **MIL-96(Al)** presentó una gran estabilidad química e hidrotermal, aunque el tratamiento en la solución de fosfatos y etanol disminuyeron la cristalinidad del material, se conservó prácticamente en su totalidad la estructura tridimensional y solo se presentó una liberación del ~ 2 % de BTC superficial al medio.

6.1.6. Obtención y caracterización de MOF **MIL-53(Al)**

Este material se obtuvo en un reactor de acero inoxidable y celda de teflón en el cual se colocó ácido benceno-1,4-dicarboxílico (BDC) y nitrato de aluminio(III) nohidratado en una proporción 1:2, a la mezcla de reacción se adicionó agua Milli-Q y se calentó a 220 °C por 72 h. El sólido resultante se filtró al vacío y se secó a 100 °C por 45 h. El compuesto se puso durante 17 h en DMF, se filtró al vacío y se lavó 2 veces con metanol. El sólido se colocó en metanol por 4 h, posteriormente se centrifugó y se secó a 100 °C por 5 h. El compuesto fue calcinado a 329 °C por 72 h, dando lugar al material **MIL-53(Al)** [46].

La estructura tridimensional de la red metal orgánica **MIL-53(Al)** se construye a partir de la interconexión entre cadenas infinitas tipo *-trans* de $AlO_4(OH)_2$ con forma octaédrica y ligantes orgánicos de ácido tereftálico, por medio

de los grupos OH de los carboxilatos, obteniéndose canales rómbicos de una dimensión. La MOF **MIL-53(Al)** cuenta con tres formas cristalinas, la primera forma cristalina se presenta en un sistema ortorrómbico con un grupo espacial *Pnma*, los autores la denominan “as” (as-synthesised) y se caracteriza por tener las cavidades expandidas con una cara de área de $7.3 \times 7.7 \text{ \AA}^2$. Albergadas en sus canales se encuentran moléculas de ácido tereftálico en su forma protonada las cuales presentan desorden. La segunda forma cristalina se obtiene al evacuar las moléculas de ácido tereftálico de las cavidades, por medio de solvatación o calcinación entre 275 y 420 °C. De esta forma se obtiene un material con poros vacíos y expandidos con una cara de área de $8.5 \times 8.5 \text{ \AA}^2$; los autores la denominaron “ht” (high-temperature) y se cristaliza en un sistema ortorrómbico de grupo espacial *Imma*, cuenta con una superficie de Langmuir de $1590 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. La última forma cristalina es la “lt” (low-temperature) que cristaliza en un sistema monoclinico con grupo espacial *Cc*. En esta fase los canales del material se contraen y alargan debido a los puentes de hidrógeno que se forman entre la parte hidrófila del material (O-M) y las moléculas de agua ocluidas en las cavidades, dando lugar a una cara de área contraída a $2.6 \times 13.6 \text{ \AA}^2$ [97].

El material **MIL-53(Al)** forma aglomerados de partículas nanométricas alargadas con formas irregulares, pueden tener más de 100 nm de largo y entre 40-60 nm de ancho. Se ha determinado que el tamaño de los poros en este material es de alrededor de 0.65 nm; tiene un área superficial específica de $1140 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ y un volumen de microporo de $0.65 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ [45], [98]. La **MIL-53(Al)** es una MOF con una gran estabilidad química y térmica, su habilidad de contracción (o como le mencionan los autores “respiración” o “breathing”) se encuentra entre las más altas para este tipo de materiales, también cuenta con sitios de coordinación no saturados de ácidos de Lewis (Al^{+3}) distribuidos uniformemente [44].

El patrón de difracción de rayos X de polvos para la MOF **MIL-53(Al)** (**figura 16, panel C**) indica que se obtuvo la fase cristalina “*II*” del material (MIL-53(Al)_{*II*}), a pesar de haber calcinado el material hasta 329 °C, denotando un grado de hidratación y rapidez para llevar a cabo este proceso durante el enfriamiento del horno. El patrón simulado señala que los valores de los ángulos 2θ en: 9.3, 12.4, 17.7, 18.8, 23.2, 25 y 27.1 ° son los representativos de la fase hidratada o de poro contraído y alargado [44], [46].

En el espectro infrarrojo del material (**figura 16, panel A**) se observa una banda en 3610 cm⁻¹ correspondiente a los modos vibracionales de estiramiento de moléculas de H₂O, debido a la capacidad del material de absorber humedad del aire. La banda en 3471 cm⁻¹ corresponde a las vibraciones de estiramiento del grupo -OH perteneciente al grupo puente hidroxilo en el octaedro de aluminio (Al-O(H)-Al) [97]. Las bandas en 1632 y 1578 cm⁻¹ corresponden a estiramientos asimétricos del grupo carbonilo en su forma *aniso*- e *iso*-bidentada, respectivamente. Los estiramientos simétricos del grupo carbonilo corresponden a las bandas en 1443, en su forma *aniso*, y 1413 cm⁻¹, para la forma *iso*; estos valores son característicos para la presencia de grupos carboxilato (CO₂Al) coordinados con átomos de aluminio a través de ambos átomos de oxígeno [44]. La intensidad de las bandas 1578 y 1413 cm⁻¹, indican que el material tiene una mayor coordinación en el modo *iso*-bidentado.

La banda característica de la vibración de estiramiento del ácido carboxílico (-CO₂H) del BDC libre o superficial en el material aparece en 1700 cm⁻¹, pero para este caso particular no se observa, confirmando la ausencia de moléculas de BDC encapsuladas en los poros del material. Además de no contar con grupos COOH superficiales y que el proceso de calcinación removió todo el BDC que no reaccionó durante la síntesis y pasivó la superficie de los cristales [97]. De igual manera la banda en 1679 cm⁻¹ correspondiente a la frecuencia de estiramiento del grupo -CO de la DMF

no se aprecia, reafirmando que los poros del material se encuentran en su forma contraída, alargada y libre de moléculas huésped de tipo DMF pero si de agua [46]. En 1293 se observa la banda C-O de carácter pseudodoble, característica del grupo COOAl en este tipo de materiales. La banda en 1122 cm^{-1} se relaciona con las vibraciones de estiramiento de la unión (Al-OH) [95], las bandas en 1016 y 739 cm^{-1} corresponden a las flexiones de los grupos C-H en el arillo aromático [64].

La **MIL-53(Al)** en su análisis termogravimétrico (**figura 16, panel B**) mostró una pérdida del 8 % entre $25-108\text{ }^{\circ}\text{C}$, correspondiente a la deshidratación/desolvatación del material donde las moléculas de agua fisisorbidas de la humedad del aire son removidas. Entre 108 y $502\text{ }^{\circ}\text{C}$ se observa una gran meseta con una mínima pérdida del $\sim 2\%$. En el termograma no se observa pérdida de peso entre $275-420\text{ }^{\circ}\text{C}$, característica de moléculas de BDC libres protonadas removidas de los poros, comprobándose de nuevo la ausencia de BDC en los poros del material sintetizado. La red metal orgánica **MIL-53(Al)** es térmicamente inestable arriba de $\sim 520\text{ }^{\circ}\text{C}$, la elevada temperatura de descomposición es inusual para la gran variedad de MOFs existentes y es un indicio de que MIL-53(Al) es una red metal orgánica robusta [98]. La pérdida del 58 % que se da en el intervalo de $502-692\text{ }^{\circ}\text{C}$, indica el colapso de la estructura del material debido a la degradación del ligante orgánico (BDC) estructural de la red metal orgánica transformándose en un material amorfo tipo Al_2O_3 . De 692 hasta $994\text{ }^{\circ}\text{C}$ no se observaron pérdidas, sugiriendo que el residuo de estructura amorfa Al_2O_3 se mantuvo estable en este periodo [46], [97].

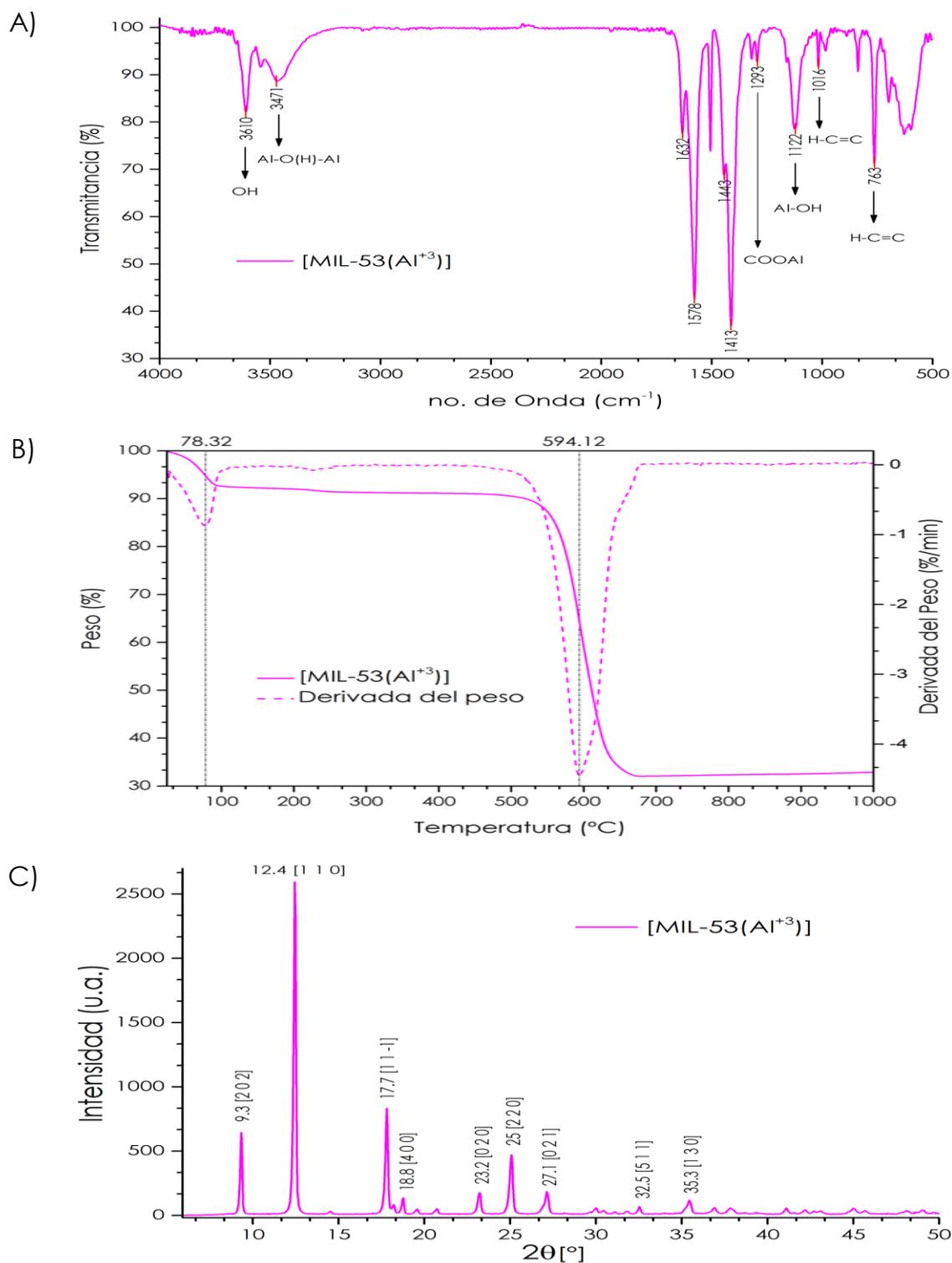


Figura 16. Caracterización de la MOF **MIL-53(Al)** por FTIR (A), TGA (B) y DRX (C) recién sintetizada.

Después del tratamiento en la solución de fosfatos y etanol, la MOF **MIL-53(Al)** presentó (**figura 17, panel C, rojo**) una disminución del 64 % en la intensidad de los picos de difracción de referencia del material, no se apreciaron picos nuevos u otros cambios significativos. Tanto para el espectro infrarrojo como para el termograma no se observaron cambios significativos después del tratamiento. Las bandas características para el BDC en su forma protonada $-\text{COOH}$ libre u ocluido en los poros del material no se aprecian en el espectro infrarrojo (**figura 17, panel A, rojo**), mientras que en el termograma (**figura 17, panel B, rojo**) no hubo cambios significativos en las pérdidas de peso asociados con la liberación de ligante (BDC) al medio u especies de Al_2O_3 .

Los resultados anteriores están en concordancia con lo reportado anteriormente para el material **MIL-53(Al)** [98], que en soluciones acuosas ácidas y neutras es estable, manteniendo su cristalinidad y porosidad, siendo altamente resistente al proceso de hidrólisis. La gran estabilidad del material en agua a temperatura ambiente y en diferentes valores de pH, no es condicionada por el tiempo de exposición al medio, permitiendo la conservación de la integridad estructural de la MOF. La propiedad de que la estructura tridimensional de la **MIL-53(Al)** no colapse en sistemas acuosos es inusual entre las MOFs, pero se le puede atribuir al fuerte enlace químico entre los átomos de aluminio (Al^{+3}) y los átomos de oxígeno del ligante BDC ($-\text{COO}^-$)₃, de acuerdo a la teoría ABDB (ácido-base duro-blando). También la naturaleza hidrofóbica de los anillos aromáticos que componen las paredes de los túneles del material, tienen la potencial capacidad de repeler moléculas de H_2O al prevenir una hidrólisis en las unidades $\text{AlO}_4(\text{OH})_2$, evitando la fragmentación de la MOF [34], [98].

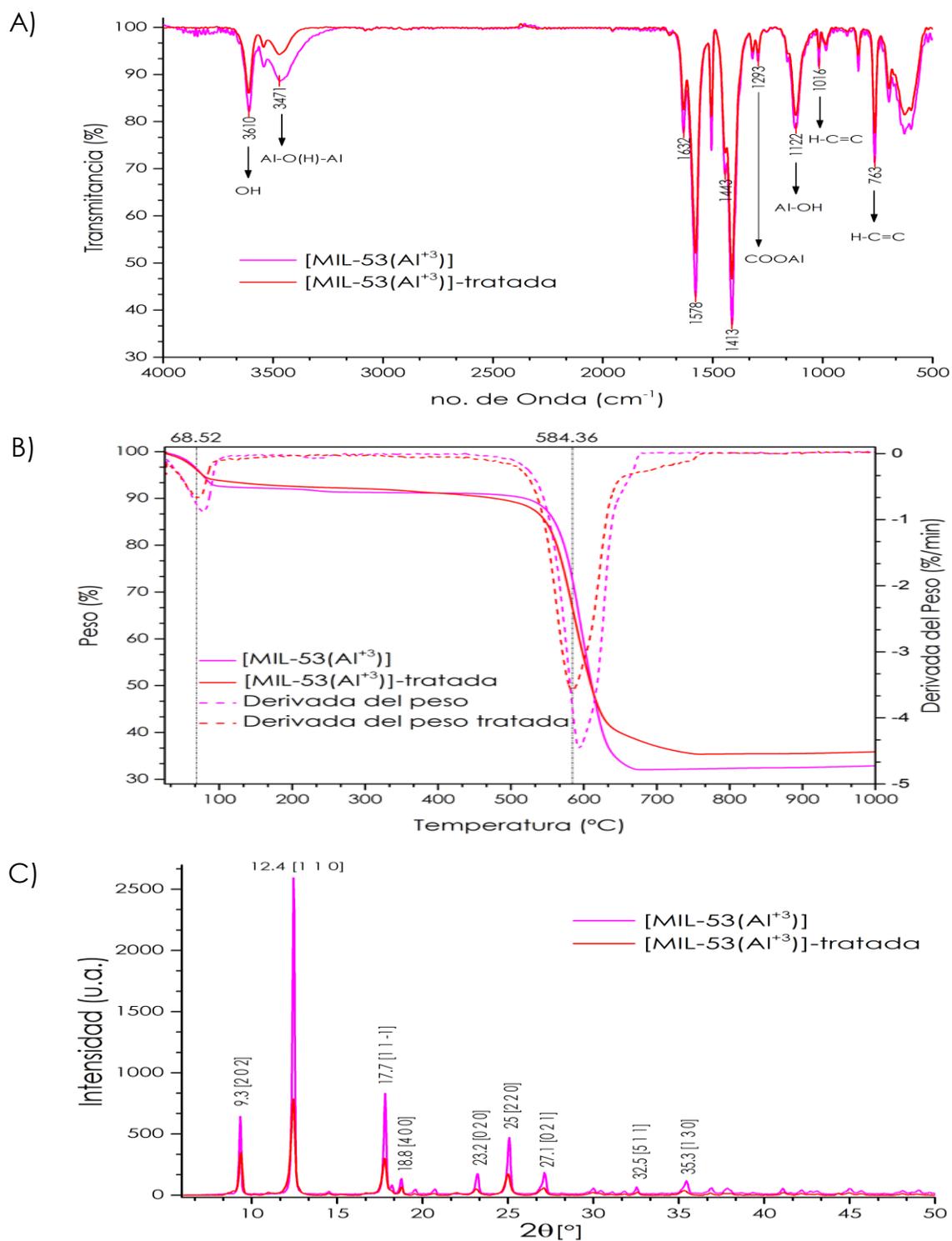


Figura 17. Caracterización de la MOF **MIL-53(Al)-tratada** por FTIR **(A)**, TGA **(B)** y DRX **(C)** después del tratamiento. Recién sintetizada (**magenta**) y después (**rojo**) de estar en solución [buffer de fosfatos/etanol] 1.55 mM/2.12 mM (65 %) por 18 h.

Especies aniónicas con potencial función de coordinación también pueden afectar y desintegrar la estructura de las MOFs tipo MIL-*n*, Yang *et al.* [99] indicaron previamente que **MIL-53(Al)** posee estabilidad química en medios con especies de fosfatos del tipo HPO_4^{-1} y $\text{H}_2\text{PO}_4^{-2}$, hasta concentraciones de 10 mM [99].

Aunque la red metal orgánica **MIL-53(Al)** disminuyó su cristalinidad después del tratamiento en la solución de fosfatos y etanol, las caracterizaciones posteriores del material no mostraron liberación de BDC o iones metálicos al medio, indicando una gran estabilidad química y termal por parte de la MOF en las condiciones del sistema experimental.

6.1.7. Obtención y caracterización de MOF **NICS-6(Mg)**

Se solubilizaron nitrato de magnesio (II) hexahidratado ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) y ácido benceno-1,3,5-tricarboxílico en etanol absoluto en una proporción 1: 1.5. La mezcla de reacción se agitó a ~ 120 °C por 4 h. Posteriormente se vertió la solución en un reactor de acero inoxidable que contiene una celda de teflón y se colocó en una estufa a 190 °C por 24 h. El sólido resultante se separó por filtración a vacío, se lavó 4 veces con etanol absoluto y se dejó secar a 100 °C por 14 h, dando lugar a la MOF **NICS-6(Mg)** [47].

La red metal orgánica compuesta por el ligante ácido trimésico y el ion metálico de Magnesio cuenta con un proceso de cristalización altamente dependiente de la polaridad de la mezcla del solvente (agua/etanol). La modificación en las proporciones de la solución de reacción permite calibrar las dimensiones de los cristales del compuesto. Cuando el solvente se compone solamente de agua se obtiene la MOF NICS-3(Mg), cuyo complejo estructural es cero dimensional (0D) ya que no cuenta con poros. El material está compuesto de $\text{MgO}_2(\text{H}_2\text{O})_4$ mononucleares en donde se forma un octaedro, al unirse un átomo de Mg con dos ligantes de H_2BTC cristalográficamente idénticos de forma monodentada en posiciones *-trans*

y a cuatro moléculas de agua. La MOF **NICS-4(Mg)** se obtiene a partir de 25 mol de etanol en el medio de reacción, su fórmula estructural es $Mg_2(BTC)(OH)(H_2O)_4 \cdot 2H_2O$, la estructura de poros cristalina es unidimensional (1D) y consiste de cadenas de trimesatos aniónicos unidos a octaedros aislados con centros metálicos de magnesio, que cuentan con cuatro moléculas de H_2O coordinadas. Cuando existen 45 mol de etanol en la solución se obtiene la MOF **NICS-5(Mg)**, siendo su estructura de poros cristalina en capas de dos dimensiones (2D), con fórmula estructural $Mg_2(BTC)(OH)(H_2O)_4 \cdot 2H_2O$. Su principal característica es tener tetrámeros (cúmulo cuádruple) de los octaedros de Mg que comparten las esquinas o bordes, conectándose por medio de un ligando de BTC [47].

En este trabajo se utilizó un medio de reacción compuesto solo de etanol, para la obtención de la MOF **NICS-6(Mg)**, siendo la única MOF compuesta de BTC(ligante) y Mg(ion metálico) de estructura de poros tridimensional (3D), su fórmula estructural es $Mg_3(BTC)_2$. La **NICS-6(Mg)** se compone de un trímero (cumulo triple) de octaedros ordenados de forma lineal, centrados con Mg, que comparten una cara de uno de los tetraedros y conectados con otro trímero a través de ligantes de BTC. Cada átomo de oxígeno en el trímero de Mg_3 pertenece al grupo carbonilo del ligante (BTC), por lo que cada ligante de BTC se une a seis unidades de trímeros de Mg_3 y cada unidad de trímero de Mg_3 se compone de 12 ligantes de BTC. La morfología particular del material **NICS-6(Mg)** da como resultado una MOF con alta densidad, estructuralmente no porosa, con área superficial específica de $5.0 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, sistema de cristal triclinico y grupo espacial tipo P-1 [47].

La posición de los picos de difracción observados en el difractograma (**figura 18, panel C**) indican que la MOF obtenida es la **NICS-6(Mg)**, debido a que están en buena concordancia con el patrón simulado a partir del archivo .cif de monocristal reportado originalmente por Mazaj *et al.* [47] para **NICS-6(Mg)**. Los picos corresponden al material con estructura

tridimensional (3D) formado a partir de BTC y Mg en un medio de reacción puramente de etanol, aunque se obtuvieron intensidades bajas indicando una cristalinidad reducida.

De manera análoga las bandas observadas en el espectro infrarrojo (**figura 18, panel A**) corresponden en su totalidad a las reportadas para el material **NICS-6(Mg)** por Mazaj *et al.* [47]. Donde la banda para el rango 3700-2931 cm^{-1} corresponde a los modos vibracionales de estiramiento de moléculas de H_2O fisisorbidas en la superficie del material. La banda en 1625 cm^{-1} corresponde al estiramiento asimétrico anisobidentado del grupo carbonilo, mientras que la banda en 1585 cm^{-1} también pertenece al grupo carbonilo pero para el estiramiento asimétrico isobidentado. Los estiramientos simétricos del grupo carbonilo en su forma *aniso-* e *iso-* bidentada corresponden a las bandas en 1443 y 1372 cm^{-1} , respectivamente. Estas bandas son particulares para la unión de forma bidentada entre grupos carboxílicos desprotonados del ligante (BTC) que interaccionan con los iones metálicos de magnesio divalentes (COOMg_2) [47]. A las bandas en 1118 y 956 cm^{-1} se les relacionó con las vibraciones del anillo de benceno del ligante (BTC) dentro y fuera del plano, mientras que las bandas 774 y 710 cm^{-1} fueron asignadas a vibraciones de flexión del grupo C-H del anillo aromático [47], [73]. Se ha reportado que para otras nanopartículas (MgO), el enlace Mg-O se encuentra en el espectro infrarrojo en el rango de 580-500 cm^{-1} , por lo tanto se puede asociar la banda en 563 cm^{-1} de la **NICS-6(Mg)** al enlace Mg-O [100].

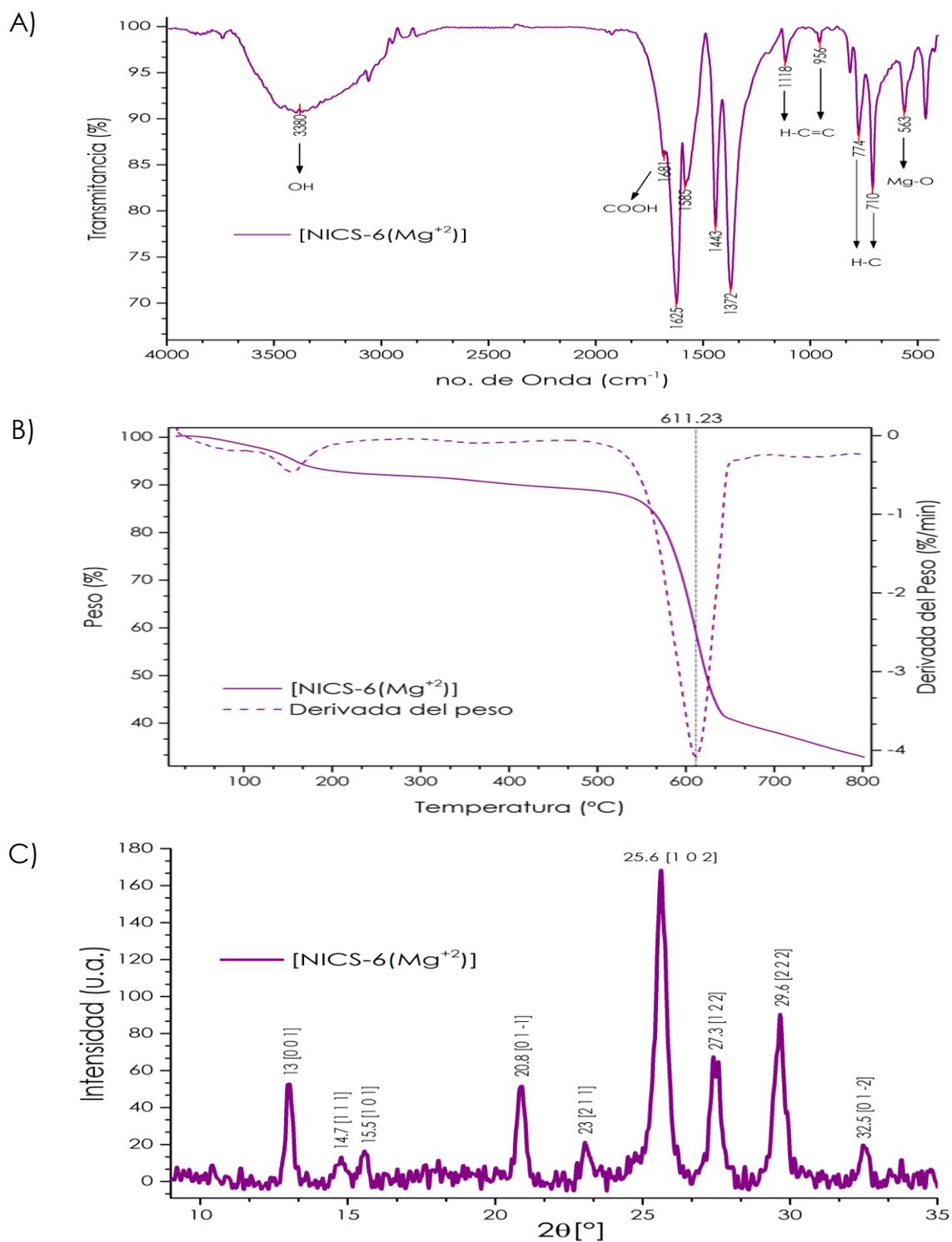


Figura 18. Caracterización de la MOF **NICS-6(Mg)** por FTIR (A), TGA (B) y DRX (C) recién sintetizada

En el análisis termogravimétrico (**figura 18, panel B**) de la MOF **NICS-6(Mg)** se observa una pérdida de peso del ~ 4 % entre 25-101 °C, correspondiente a moléculas de agua fisisorbidas en la superficie del material, para el intervalo de 226-494 °C también se registró una pérdida de peso del ~ 4 %, que se puede relacionar con moléculas de agua ocluidas en los poros o quimisorbidas (coordinadas). Hubo una pérdida de peso del 50 % desde 494 hasta 686 °C, atribuida a la remoción de fragmentos del ligante (ácido trimésico) de la MOF y su posterior descomposición. Por último se dio la formación de especies de óxidos de magnesio en el intervalo de 686-794 °C, registrándose una pérdida de peso del 6 % [47].

La MOF **NICS-6(Mg)** después de estar en la solución de [buffer de fosfatos/etanol] 1.55 mM/2.12 mM (65 %) por 18 h presentó cambios evidentes en todas las técnicas de caracterización. En el difractograma (**figura 19, panel C, rojo**) se aprecia que los picos de difracción de referencia para el material **NICS-6(Mg)** desaparecieron y en su lugar se observan picos de difracción en nuevas posiciones, con mayor intensidad (**NICS-6(Mg)-tratada**). La posición de los picos del nuevo patrón de difracción corresponden al material **NICS-4(Mg)**, cuyo patrón simulado a partir del archivo .cif de monocristal [47] perteneciente a **NICS-4(Mg)** concuerda con el patrón de difracción experimental obtenido. Las bandas en el espectro infrarrojo (**figura 19, panel A, rojo**) registradas para el material después del tratamiento reafirman la obtención de la MOF **NICS-4(Mg)**, dado que coinciden con los reportados previamente por Mazaj *et al.* [47].

La banda para el rango 3705-2959 cm^{-1} representa los diferentes modos vibracionales de estiramiento de moléculas de H_2O y grupos $-\text{OH}$, donde se encuentran múltiples bandas:

- i) las asociadas al agua fisisorbida,
- ii) los grupos -OH de los carboxilatos del ligante estructural (BTC) sin desprotonar,
- iii) las moléculas de H_2O coordinadas de manera terminal al octaedro de magnesio (SBU) y
- iv) los puentes de hidrógeno que se forman entre las aguas coordinadas y los átomos de oxígeno de los carbonilos de los ligantes estructurales (BTC) [47].

A las bandas ubicadas en el rango entre 1684 hasta 1380 cm^{-1} se les puede atribuir los diferentes modos vibracionales de estiramiento del grupo carbonilo del ligante BTC, coordinados con átomos de magnesio y con moléculas de H_2O terminales. La banda en 1684 cm^{-1} corresponde al BTC en su forma protonada (COOH), la banda en 1657 cm^{-1} se puede atribuir a un éster del tipo (COOMg). La banda en 1563 cm^{-1} es el estiramiento asimétrico mientras que la banda 1434 cm^{-1} es el estiramiento simétrico de la forma isobidentada del grupo carbonilo. Las bandas en 1168 y 1069 cm^{-1} pueden pertenecer a las vibraciones del anillo de benceno del BTC, dentro y fuera del plano, las vibraciones de flexión del grupo C-H del anillo aromático se pueden relacionar con las bandas en 757 y 720 cm^{-1} . Mientras que la banda en 563 cm^{-1} puede asociarse con el enlace Mg-O [47].

El análisis termogravimétrico para el material **NICS-6(Mg)** después del tratamiento (**figura 19, panel B**, rojo) también sugiere que la MOF resultante es la **NICS-4(Mg)**; la pérdida de peso del $\sim 4\%$ observada entre $25\text{-}82\text{ }^\circ\text{C}$ se asocia con moléculas de agua fisisorbidas en la superficie del material, del intervalo $82\text{-}212\text{ }^\circ\text{C}$ se registró una pérdida de peso del 27% correspondiente a la remoción de moléculas de H_2O coordinadas al Mg, así como agua adsorbida. La pérdida de peso del $\sim 4\%$ para el intervalo $212\text{-}506\text{ }^\circ\text{C}$ podría atribuirse a moléculas de agua quimisorbidas y ocluidas en los pseudoporos del material. La pérdida de peso del 45% entre $506\text{-}698\text{ }^\circ\text{C}$ indica el

desprendimiento del ligante BTC de la MOF y su posterior descomposición. En el intervalo de 698-797 °C no se registraron cambios significativos, dándose solamente la formación de especies de óxidos de magnesio [47].

El mayor cambio en la prueba por TGA con respecto al material **NICS-6(Mg)**, es la pérdida de peso asociada a las moléculas de agua estructurales coordinadas de manera terminal. El aumento de ~ 4 a 27 % está en concordancia con la estructura cristalográfica y lo reportado anteriormente para la MOF **NICS-4(Mg)** [47]. Las tres pruebas de caracterización (FTIR, TGA y DRX) indican que la MOF **NICS-6(Mg)** después del tratamiento en solución *buffer* de fosfatos y etanol se transformó en la MOF **NICS-4(Mg)**.

El cambio de **NICS-6(Mg)** a **NICS-4(Mg)** puede atribuirse a la presencia de moléculas de agua en el medio [*buffer* de fosfatos/etanol] (35%/65%), dado que la cristalización de la MOF (magnesio y BTC) depende fuertemente en la polaridad de la mezcla etanol/agua. Por lo tanto, la cantidad de agua y etanol en la mezcla de reacción determinarán el nivel de cristalización de la MOF. A mayor concentración de etanol el ligante BTC se hace más soluble, por lo que la coordinación entre los grupos carboxílicos del BTC y el Mg se favorecen; desfavoreciéndose y disminuyendo la cantidad de moléculas de agua que actúan como ligandos terminales con las SBUs de Mg, promoviendo así la cristalización de las estructuras con mayor dimensionalidad [47].

El pasar de la MOF con la máxima dimensión **NICS-6(Mg)**, sintetizada en un medio de reacción totalmente en etanol, a una MOF de menor dimensión **NICS-4(Mg)**, es causado por la presencia tanto de moléculas de agua como especies aniónicas (fosfatos), entendiendo que la cantidad de H₂O en el medio dirige la estructura del material resultante. Los dos principales mecanismos de degradación cuando una MOF se expone a moléculas de H₂O, son hidrólisis, entendida como hidratación del ion metálico, y

desplazamiento de ligante. En nuestro caso particular se llevó a cabo una degradación por desplazamiento de ligante, en donde una molécula de agua se inserta en la unión magnesio-oxígeno (M-O) de la MOF 3D **NICS-6(Mg)**, dándose de este modo la formación de cationes (Mg^{+2}) hidratados así como la liberación de ligantes (BTC) en su forma aniónica (COO^-)₃.

En el análisis termogravimétrico para el material **NICS-6(Mg)** después del tratamiento (**figura 19, panel B, rojo**) se observó un aumento del 23 % de peso de moléculas de agua coordinadas a los centros metálicos de magnesio, con respecto a su contraparte solvatada totalmente en etanol, de igual manera existió un desplazamiento del 5 % del ligante BTC al medio. En el espectro infrarrojo (**figura 19, panel A, rojo**) no se observaron bandas asociadas al ligante BTC en su forma protonada libre ($COOH$)₃. Corroborándose de esta manera el mecanismo de desplazamiento de ligante debido al aumento en el porcentaje de moléculas de agua [33].

Los iones fosfatos del *buffer* podrían contribuir a la demetalación de la **NICS-6(Mg)**, ya que de acuerdo a la teoría ABDB la unión entre bases de Lewis duras (carboxilatos del ligante BTC) y ácidos de Lewis blandos (iones metálicos divalentes Mg^{+2}) es débil. Por lo que los aniones de fosfatos que son también bases de Lewis duras tienen la capacidad de reemplazar al ligante BTC en los sitios metálicos de magnesio; aunque es un proceso lento y resulta de la misma forma en una unión débil. Por lo que se puede asumir que el principal mecanismo en la disminución de dimensionalidad de la **NICS-6(Mg)** es el desplazamiento de ligante propiciado por el aumento de la concentración de moléculas de agua [34].

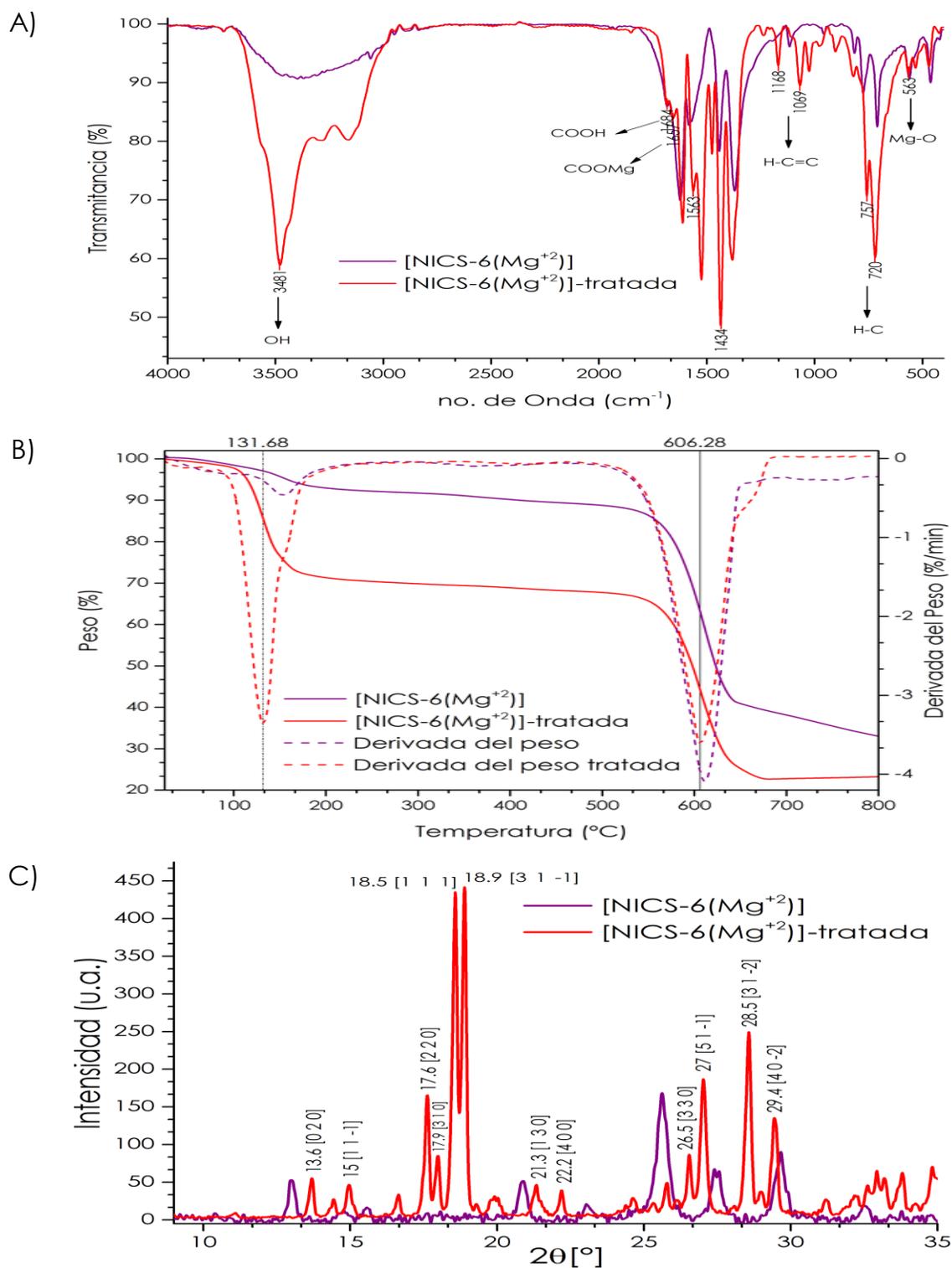


Figura 19. Caracterización de la MOF **NICS-6(Mg)-tratada (NICS-4(Mg))** por FTIR **(A)**, TGA **(B)** y DRX **(C)** después del tratamiento. Recién sintetizada (**magenta**) y después (**rojo**) de estar en solución [*buffer* de fosfatos/etanol] 1.55 mM/2.12 mM (65 %) por 18 h.

El comportamiento de disminución de la dimensionalidad de **NICS-6(Mg)**3D →**NICS-4(Mg)**1D debido a la presencia de agua, ya se ha reportado previamente para MOFs isoreticulares (IRMOF); un ejemplo son las MOFs que se componen de cúmulos (Zn₄O) cuya sensibilidad a la humedad es alta, convirtiéndose rápidamente en materiales tipo MOF-69, resultando en una disminución abrupta en área superficial [101].

La MOF **NICS-6(Mg)** después del tratamiento redujo la dimensionalidad de sus poros pasado de 3D a 1D, y transformándose a la MOF **NICS-4(Mg)**, debido a la presencia de moléculas de agua en el medio y al mismo tratamiento en fosfatos. La MOF demostró una baja estabilidad química en *buffer* de fosfatos (35 %), con liberación de ligante BTC.

6.2. Características y modelo de formación de fibras de HEWL

En este trabajo se utilizaron dos modelos de formación de fibras amiloides para los estudios de inhibición en presencia de redes metal orgánicas.

6.2.1. Estudio en agua inyectable

El primer modelo utilizado en este trabajo fue con la proteína HEWL a pH 11.8 amortiguador de fosfatos (20 mM), a una temperatura de 37 °C por 72 h; previamente desarrollado para la formación de fibras amiloides por Cerón *et al.* [102]. Algunos de los resultados obtenidos en estas condiciones se muestran en la **Figura 20**, en donde la MOF **HKUST-1(Cu)** tuvo una inhibición del 17 %, **MIL-53(Fe)** y **NICS-6(Mg)** del 50 %, mientras que la **MIL-96(Al)** no mostró inhibición.

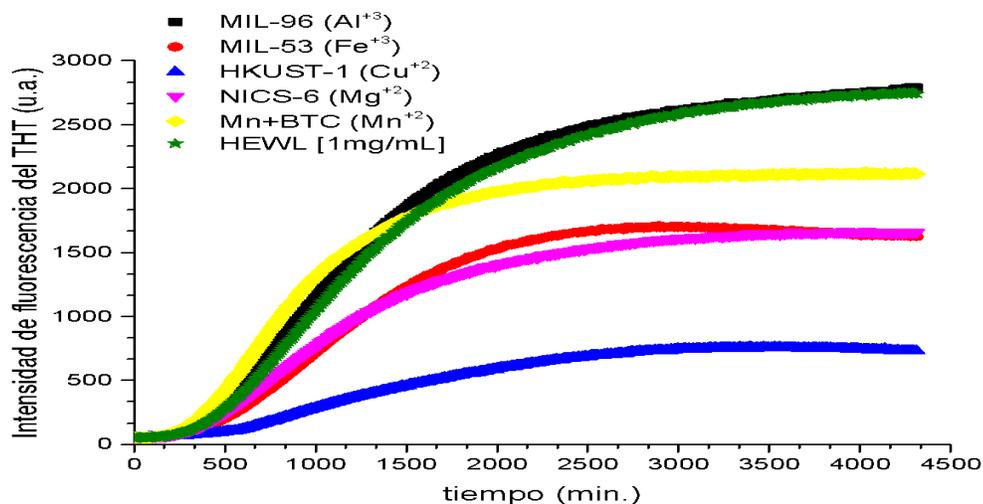


Figura 20. Inhibición de la fibrillogénesis en condiciones alcalinas y con alta concentración de fosfatos (20 mM). Todas las redes metal orgánicas se encuentran en una concentración de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, detección por ThT sin registro de falsos positivos.

A partir de datos de la literatura y de acuerdo a lo realizado en este trabajo se evidenció que la estructura cristalina de la **HKUST-1(Cu)** se vuelve inestable solvatada en agua y su degradación total se da en unas cuantas horas (5 h). También se ha descrito en la literatura y se evidencia en este trabajo que los materiales tipo MIL-*n* en ambientes que se encuentren fuera del intervalo ácido-base en agua de entre 6.9 a 7.4 son químicamente inestables. Mientras que en presencia de iones de coordinación capaces de desplazar al BTC o BDC (aniones de fosfato, PO_4^{-3}) y que además se encuentren en concentraciones altas, el material se vuelve amorfo. La degradación paulatina que sufren los materiales en estas condiciones tiene como consecuencia la liberación de los iones metálicos (Fe^{+3} , Cu^{+2} , Al^{+3} , Mg^{+2}), propiciando la aparición de especies como nanopartículas de ferrihidrita (Fe_2O_3) en el caso de la **MIL-53 (Fe)**, así como liberación de ligante al medio; resultando en la pérdida de cristalinidad obteniéndose así un material más amorfo o el colapso total de la MOF [30], [59], [84].

Dado que las condiciones para la formación de fibras de HEWL en agua en condiciones básicas propicia el colapso parcial o total de las redes metal

orgánicas, la inhibición observada en la **figura 20**, podría ser causada por liberación del ligando (**Apéndice A, figura A1**), formación de especies metálicas hidratadas (**Apéndice A, figura A2**), presencia de la MOF amorfa o cambios generados por todos los componentes. La inhibición causada por los ligantes orgánicos (BTC, BDC) o por los iones metálicos hidratados, se discutirá más adelante para los casos particulares de **MIL-53(Fe)** y **NICS-6(Mg)**.

Por lo tanto, se buscaron condiciones donde las redes metal orgánicas fueran estables químicamente, donde la inhibición fuera dependiente de interacciones entre la proteína con la estructura de los materiales y no por cambios generados en las condiciones de la formación de fibras amiloides.

6.2.2. Estudio en EtOH

En el segundo modelo para la formación de fibras amiloides de HEWL, se empleó una mezcla de solventes como medio modificado, utilizando 65 % (v/v) de etanol para aumentar la dispersión y estabilidad coloidal de las redes metal orgánicas y conseguir reducir la hidrólisis de los nodos metálicos. También se disminuyó la concentración de iones fosfatos a 1.55 mM y se mantuvo un pH de 7.25, para conservar la estabilidad química de los materiales tipo MIL-*n* [30].

La obtención de agregados fibrilares en un cosolvente orgánico es resultado del cambio de la conformación nativa de la proteína a un estado intermediario, en el cual se reconstruye la capa de solvatación con moléculas de etanol en la superficie de la proteína. Aumentando su volumen debido al cambio de constante dieléctrica y a la exposición de regiones hidrófobas debido a la naturaleza del etanol, proceso que no es posible con agua como único solvente. Esto induce a generar estados parcialmente desplegados que tienden a la formación de filamentos fibrosos [103].

Todas las MOFs, en este caso la **HKUST-1(Cu)**, **MIL-53(Cu)**, **MIL-53(Fe)**, **MIL-100(Fe)**, **MIL-53(Al)**, **MIL-96(Al)** y **NICS-6(Mg)**, se probaron como potenciales inhibidores de la formación de fibras amiloides de HEWL en este medio modificado de etanol al 65% (v/v), usando la técnica de detección por medio de ThT.

En los resultados obtenidos de las cinéticas utilizando detección por ThT, se generaron dos tipos de falsos positivos. En el primero se observa que **HKUST-1(Cu)**, **MIL-53(Cu)** y **NICS-6(Mg)** a una concentración de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y **MIL-96(Al)** a concentraciones de 1 y $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, presentan un aumento de la fluorescencia, rebasando de manera considerable la fluorescencia del control positivo (HEWL, $69.44 \text{ }\mu\text{M}$) (**Apéndice A, figura A3, panel A**). Con excepción de la concentración $0.001 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ la red metal orgánica **MIL-53(Al)** saturó la señal de fluorescencia. Las MOFs **MIL-53(Fe)** y **MIL-100(Fe)** no mostraron aumento de la fluorescencia en ninguna de las concentraciones probadas y se observó un patrón de inhibición dependiente de concentración (datos no mostrados).

El segundo falso positivo muestra que los controles negativos, red metal orgánica en presencia de ThT y ausencia de proteína, la fluorescencia alcanza niveles de intensidad de entre 4000 a 8000 unidades arbitrarias para **HKUST-1(Cu)**, **MIL-53(Cu)**, y **NICS-6(Mg)** a concentraciones de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, en comparación con el control positivo (ThT, $\sim 3,500$ unidades arbitrarias) (**Apéndice A, figura A3, panel B**). Tanto para **MIL-53(Al)** y **MIL-96(Al)** a una concentración de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ la fluorescencia del ThT alcanzó el nivel más alto de detección que permite el espectrofotómetro, saturando así la señal de fluorescencia. La **MIL-53(Al)** presentó grandes incrementos de fluorescencia entre 10,000 a 70,000 unidades arbitrarias, inclusive a concentraciones de 0.1 , 0.01 , $0.001 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (**Apéndice A, figura A3, panel C**), siendo la MOF que más aumento de fluorescencia mostró. Los materiales **MIL-53(Fe)** y **MIL-100(Fe)** mostraron un aumento de la fluorescencia muy

tenue, solamente a la concentración $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en comparación con el control positivo ThT.

Todas las redes metal orgánicas utilizadas en este estudio no emiten fluorescencia intrínseca en la misma longitud de onda a la cual emite el ThT (490 nm), a ninguna concentración (1, 0.1, 0.01, $0.001 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). El control negativo del ThT tiene una intensidad de fluorescencia de $\sim 3,500$ unidades arbitrarias promedio a lo largo de las 18 h del experimento (**Apéndice A, figura A3, panel D**). Por lo que los aumentos drásticos en la intensidad de fluorescencia podrían ser consecuencia de la interacción entre el ThT y las redes metal orgánicas.

Cada MOF presentó un patrón de fluorescencia distinto en su interacción con la molécula tioflavina-T, pero se puede determinar que las MOFs con poros pequeños (**HKUST-1(Cu)**, **MIL-53(Cu)**, **MIL-96(Al)**, **MIL-53(Al)**, **NICS-6(Mg)**) tienen la capacidad de activar el mecanismo de fluorescencia del ThT.

La activación podría ocurrir cuando la molécula de ThT introduce su anillo terminal hidrófobo a los poros de la red metal orgánica, de forma parecida a su introducción en los “canales” de las estructuras de hoja cruzada β en las fibras amiloides; mientras que el anillo del benzotiazol (**figura 4**), mira al solvente [20].

El principal sitio de unión del ThT es en los “canales” que contengan en su estructura una gran cantidad de residuos aromáticos, que presentan una gran superficie hidrofóbica y capacidad de realizar “apilamiento” tipo π . Las interacciones tipo π - π , entre el anillo fenólico del ThT y los anillos aromáticos de los residuos de la HEWL, son las interacciones predominantes asociadas a la restricción del giro del enlace C-C de los anillos de la molécula tioflavina-T que dan la fluorescencia. Cabe mencionar que la tioflavina-T puede interactuar con los huecos hidrofóbicos de proteínas en su estado globular

en grandes concentraciones y presentar fluorescencia en intensidades proporcionales al número de interacciones π - π presentes y que tiene que ver con el número de sitios hidrófobos expuestos [21].

Con un proceso similar, el anillo fenólico del ThT podría interactuar con los grupos benceno (BDC, BTC) de las redes metal orgánicas, fungiendo ahora estos como los residuos aromáticos, que tienen la propiedad de interactuar con compuestos que contengan anillos bencénicos –de la MOF– a través de interacciones tipo π - π . La interacción podría ser parecida a la descrita por Lin *et al.* [55] entre el anillo de benceno del ligante BTC de la **HKUST-1(Cu)** y el anillo fenólico perteneciente al 4-nitrofenol [55]. Adicionalmente la molécula de ThT cuenta con bases de Lewis (S o N) que se pueden coordinar con los sitios metálicos de los materiales formando enlaces $S \rightarrow M$ o $N \rightarrow M$ [104].

Los materiales **MIL-53(Al)** y **MIL-96(Al)** en presencia de ThT aumentan su fluorescencia hasta llegar a niveles de saturación del detector del equipo. Este cambio tan drástico en comparación con los otros materiales puede deberse a que la intensidad de la emisión total del ThT depende de la disponibilidad que exista de los sitios de unión. De manera que el rendimiento cuántico también diferirá ya que depende de la naturaleza química exacta que presenten los sitios de unión, tanto π - π como Metal-ligante.

Se ha observado que la intensidad de fluorescencia del ThT difiere de forma sustancial cuando se une a los “canales” de las fibras formados por dos isoformas bastante similares del péptido β -amiloide, de manera similar. Aunque el mecanismo de activación de fluorescencia del ThT propuesto por parte de las MOFs sea parecido, la intensidad de fluorescencia varía dependiendo de las características químicas particulares de los sitios de

unión, de las cavidades y en general de cómo se lleva a cabo la interacción del ThT en cada MOF particular [105].

Por otro lado, la ausencia de fluorescencia para el ThT cuando interacciona con la **MIL-53(Fe)** y con **MIL-100(Fe)**, indica que esta interacción no se está realizando (**apéndice A, figura A3, panel B**); en el caso de la **MIL-53(Fe)** podría deberse a que en las condiciones de solvatación se observó el colapso parcial de la MOF (**figura 13, panel C**); ya que no hay poros ni anillos aromáticos rígidos del ligante (BDC) en la superficie del material, donde se puedan presentar las interacciones tipo π - π para la restricción del giro del ThT. Un mecanismo similar al descrito se reportó previamente por Guo *et al.* en el cual demostraron que la **MIL-53(Fe)** pierde capacidad de adsorción del colorante naranja ácido 7, después de lavar el material en repetidas ocasiones con agua desionizada y etanol. Como consecuencia observaron la liberación de iones metálicos de Fe^{+3} , evento asociado con la pérdida de cristalinidad del material [106].

Para la **MIL-100(Fe)**, la ausencia de interacción fluorescente puede ser causada por la rápida difusión del ThT entre los poros del material, el gran diámetro de los mesoporos permite que la resistencia a la difusión fuera de los poros sea muy débil y no exista gran adsorción de ThT [107].

Se ha registrado la interacción por medio de adsorción entre la MIL-100(Fe) y las moléculas: progesterona, doxorubicina, ibuprofeno, cafeína, aspirina, Rojo Congo y estaaduvina, que son moléculas de tamaño parecido al ThT. Siendo muy posible que la **MIL-100(Fe)** adsorba en su totalidad al ThT, no proporcionando el mismo tipo de “anclaje” del anillo fenólico del ThT en los poros pequeños de MOFs microporosas, permitiendo así el giro libre del enlace C-C de los anillos del ThT [108]. Aunque podrían existir interacciones entre los sitios (*cus*) de Fe^{+3} de la **MIL-100(Fe)** y los grupos polares del anillo benzotiazol del ThT, estas serían débiles y no son consideradas decisivas en

el mecanismo de fluorescencia del ThT como las interacciones de “apilamiento” tipo π - π [21].

Estos posibles mecanismos de interacción entre el ThT y las MOFs deben ser analizadas a profundidad para cada caso particular, y ser considerados solo como aproximaciones. Pero podría emplearse como una prueba cualitativa indirecta de la conservación de la estructura tridimensional en las MOFs en distintos ambientes de solvatación o de ser necesario llevar a cabo una curva patrón para poder analizar el efecto de manera cuantitativa.

Por lo anterior, se decidió no emplear los resultados obtenidos utilizando ThT, ya que no es fiable en todos los casos para determinar si existe inhibición por esta técnica.

La obtención de falsos positivos en la detección por ThT hizo que se optara por determinar la formación de fibras amiloides midiendo la fluorescencia intrínseca de la proteína. Debido a esto se volvieron a realizar las pruebas de inhibición en 65% (v/v) de etanol utilizando la **HKUST-1(Cu)**, **MIL-53(Cu)**, **MIL-53(Fe)**, **MIL-100(Fe)**, **MIL-53(Al)**, **MIL-96(Al)** y **NICS-6(Mg)**; midiendo la emisión a 335 nm, donde se realizaron dos tipos de experimentos, en presencia y ausencia de ThT.

Se realizaron experimentos control detectados con fluorescencia intrínseca en presencia de ThT, en éstos, no se observó aumento de fluorescencia en el control negativo de las redes metal orgánicas a ninguna concentración (**apéndice A, figura A4, panel A**). Mientras que en ausencia de ThT todas las MOFs utilizadas no emitieron fluorescencia intrínseca (em 335 nm) a ninguna concentración utilizada (**apéndice A, figura A4, panel B**).

Las cinéticas de inhibición en presencia de **HKUST-1(Cu)**, **MIL-53(Cu)**, **MIL-53(Fe)**, **MIL-100(Fe)**, **MIL-96(Al)**, **MIL-53(Al)** y **NICS-6(Mg)** tanto en presencia como en ausencia de ThT tienen el mismo patrón de inhibición a todas las

concentraciones utilizadas (1, 0.1, 0.01, 0.001, mg·mL⁻¹); diferenciándose únicamente en una disminución del 33 % de la intensidad de fluorescencia intrínseca en presencia del ThT, incluyendo el control positivo de HEWL (69.44 μM) (**apéndice A, figura A4, panel C**). Por lo que en presencia del ThT la fluorescencia intrínseca de la proteína se ve afectada.

Dado que la cantidad de fibras amiloides formadas no se ve afectada por la presencia de la tioflavina-T, la disminución de la fluorescencia en presencia de ThT puede estar relacionada con un fenómeno de apagamiento y no con cambios estructurales inducidos por el ThT.

Esbjörner *et al.* [105] han reportado que la molécula de ThT tiene la capacidad de autoapagarse gradualmente a altas concentraciones. Los autores describen el mecanismo de autoapagamiento del ThT como de apagamiento dinámico del estado excitado, siendo un proceso de relajación no radiativo que disminuye el tiempo de vida de la fluorescencia en un 30 %. Al mismo tiempo el rendimiento cuántico o la luminiscencia disminuye en relación con el aumento de la concentración del colorante [105].

La disminución de fluorescencia intrínseca en presencia del ThT observada en estos resultados, puede obedecer a un proceso de apagamiento de colisión o dinámico donde el estado excitado del fluoróforo (fibras amiloides) es desactivado cuando entra en contacto con el apagador (ThT). Se ha descrito que las aminas aromáticas (anillo hidrófobo, con grupo dimetilamino) son eficientes apagadores de grupos aromáticos no sustituidos (residuos aromáticos) [109].

Debido a que el apagamiento requiere contacto molecular entre el fluoróforo y el apagador por medio de encuentros difusivos, las interacciones electrostáticas e impedimentos estéricos deben ser mínimos entre ellos. El fenómeno de apagamiento solo se da a distancias cortas por

lo que el medio debe permitir una gran difusión, para que la interacción de apagamiento se vuelva significativa y debe existir contacto entre las moléculas interactuantes, eso en una magnitud menor a la suma de los radios de van der Waals de los átomos interactuantes (intermolecular). La distancia mínima para que el apagamiento tenga una eficiencia del 100 % es de 7 Å para los radios de van der Waals, de esta manera la distancia entre la nube electrónica de las moléculas es de menos de 2 Å, distancia molecular necesaria para el apagamiento de colisión [109].

La distancia entre la tioflavina-T y los residuos de aminoácidos que conforman los "canales" de unión en las fibras amiloides de HEWL es de 4 Å, por lo que es posible suponer que el apagamiento es de tipo dinámico o de colisión y podemos descartar un proceso de transferencia de energía por resonancia [21], [105], [109].

Se decidió solo mostrar las cinéticas de inhibición detectadas por fluorescencia intrínseca en ausencia de ThT, ya que el patrón de inhibición se conserva. Pero como señalan Hudson *et al.* [23] la cuantificación por ThT de fibras amiloides debe usarse con precaución en presencia de compuestos exógenos que contengan estructuras aromáticas. Ya que puede existir interacción directa entre el ThT y el compuesto inhibitorio exógeno o competencia de unión a las fibras amiloides con el ThT [23]. También se ha observado que pese a que el ThT tiene la reputación de ser un fluoróforo que no afecta la estructura final de las fibras amiloides puede inducir la compactación de los agregados amiloides [105].

6.3. Estudios de interacción entre MOFs y HEWL

Para determinar la capacidad inhibitoria de las redes metal orgánicas, **HKUST-1(Cu)**, **MIL-53(Cu)**, **MIL-53(Fe)**, **MIL-100(Fe)**, **MIL-53(Al)**, **MIL-96(Al)** y **NICS-6(Mg)** a concentraciones de (1, 0.1, 0.01, 0.001, mg·mL⁻¹) en la

formación de fibras amiloides de HEWL, se realizaron cinéticas de 18 h en 65% (v/v) de etanol midiendo la fluorescencia intrínseca a 335 nm.

El efecto de inhibición durante la formación de fibras amiloides, se relaciona con cambios en la intensidad de fluorescencia y con modificaciones en el tiempo que duran las fases de nucleación, elongación y estacionaria del modelo de polimerización, con respecto a los valores de intensidad y tiempo de las fases del control positivo (HEWL).

En el control positivo (HEWL) se observa que la fase de nucleación dura 2.5 h (**figura 21**), este valor corresponde al parámetro t_{lag} . Mientras que se llega a la mitad de la fase de elongación en 11.7 h, siendo el parámetro $t_{1/2}$. La máxima formación de fibras amiloides utilizando la proteína HEWL se alcanzó en 18 h, con una intensidad de fluorescencia de 1210 unidades arbitrarias.

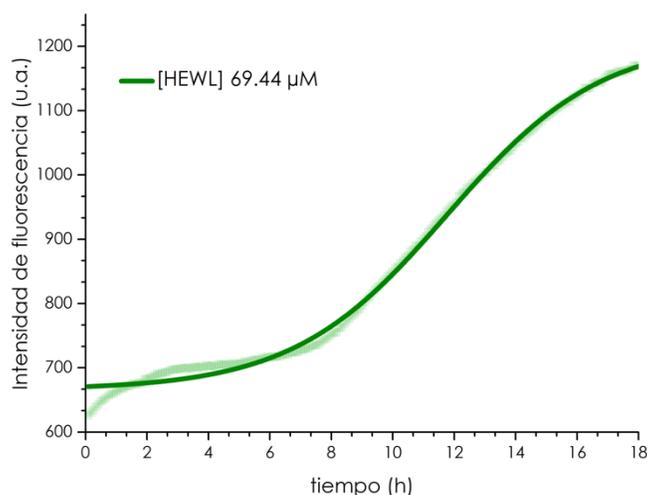


Figura 21. Cinética de formación de fibras amiloides utilizando la proteína HEWL en solución [buffer de fosfatos/etanol] 1.55 mM/2.12 mM (65 %) por 18 h, detección por fluorescencia intrínseca (emisión a 335 nm).

Las modificaciones, aumentos o disminuciones de los valores de t_{lag} y $t_{1/2}$ con respecto a los del control positivo (**Tabla 2**), así como los cambios en la intensidad de fluorescencia son los parámetros que se tomaron como indicativos del potencial efecto inhibitorio por parte de las MOFs.

Tabla 2. Parámetros de duración (t) de las fases de nucleación y elongación, así como de la intensidad de fluorescencia del control positivo de las fibras amiloides usando HEWL.			
[HEWL] μM	t_{lag} (h)	$t_{1/2}$ (h)	Intensidad máxima de fluorescencia (u.a.)
69.44	2.5	11.7	1210

Los parámetros de t_{lag} y $t_{1/2}$ se obtuvieron a partir de un ajuste de puntos para una función sigmoide usando la ecuación de Boltzmann, donde los valores dx y x_0 son los parámetros de tiempo de las fases de nucleación y elongación, respectivamente (**apéndice B**).

6.2.3. Inhibición de fibras amiloides de HEWL por de los componentes simples de las MOFs

La presencia de los materiales tipo MOF en la formación de fibras amiloides modifica el crecimiento de la función sigmoide con respecto a los parámetros de las fases de nucleación y elongación (intensidad de fluorescencia y tiempo) del control positivo [HEWL] (**Tabla 2**). Y antes de analizar los materiales es necesario estudiar los componentes inorgánicos y orgánicos de los mismos por separado para diferenciar las características de una posible inhibición y determinar los umbrales en los que estos componentes simples causarían un posible efecto inhibitorio. Estos resultados fueron tomados de las **figuras A1 y A2** del **apéndice A** y el resumen de dichos valores se muestra en la **Tabla 3**. Estos resultados claramente indican que la inhibición de formación de fibras de la HEWL comienza en valores de $247 \mu\text{M}$ para $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, con excepción del $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, que no mostró inhibición. Mientras que la inhibición total se comienza a alcanzar en concentraciones 10 veces mayores. Vale la pena recalcar que también los ligantes orgánicos BTC y BDC causan inhibición pero en concentraciones mayores, un $\sim 53 \%$ más en comparación a las sales metálicas.

Tabla 3. Datos de concentraciones cuando se comienza a inhibir ($[]_{CI}$) y cuando se consigue la inhibición total ($[]_{TOT}$) del proceso de nucleación de HEWL empleando los componentes simples de MOFs.

Componente de MOF	$[Componente]_{CI}$ (μM)	$[Componente]_{TOT}$ (mM)
$Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$	413.9	4.13
$Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$	247.0	2.47
$Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	390.0	3.90
$Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$	---	---
BTC	475.9	4.76
BDC	601.9	6.02

(---) no presenta inhibición.

6.1.1. MOF **HKUST-1(Cu)** y HEWL

La presencia de **HKUST-1(Cu)** en la formación de fibras amiloides modifica el crecimiento de la función sigmoide con respecto a los parámetros de las fases de nucleación y elongación (intensidad de fluorescencia y tiempo) del control positivo [HEWL] (**Tabla 2**).

La **HKUST-1(Cu)** a una concentración de 1.65 mM logró modificar de manera considerable tanto la fase *lag* como la fase de crecimiento, causando una disminución significativa de la intensidad de fluorescencia (**figura 22**). Las alteraciones en ambas fases están relacionadas con cambios en las constantes de velocidad, primordialmente para las reacciones de nucleación secundaria pero también para las asociadas al proceso de elongación. Para la concentración de 165.32 μM igualmente se vio modificado el proceso de nucleación secundaria y elongación [16], [36]. Las concentraciones de 1.65 y 16.52 μM de **HKUST-1(Cu)** no presentaron inhibición significativa en la formación de fibras amiloides (**figura 22**).

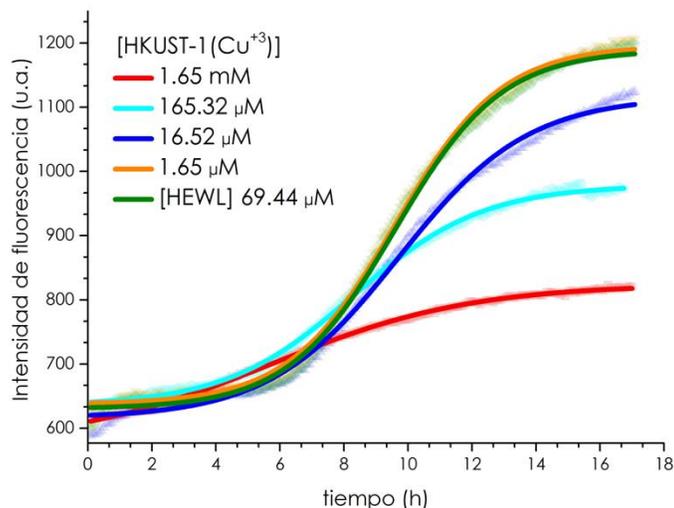


Figura 22. Cinéticas de formación de fibras amiloides de HEWL en ausencia (**verde**) y en presencia de diferentes concentraciones de **[HKUST-1(Cu)]**.

La **Tabla 4** indica que la fase *lag* se prolongó 36 min más y se llegó 6 h antes al valor $t_{1/2}$ para la concentración de 1650 μM de **HKUST-1(Cu)**, la intensidad de fluorescencia disminuyó un 54 %. Para la concentración de 165.32 μM de **HKUST-1(Cu)** la intensidad de fluorescencia decayó un 37 % y la fase *lag* se redujo 30 min, mientras que se llegó al valor de $t_{1/2}$, 3.4 h antes con respecto al control positivo (HEWL).

Tabla 4. Parámetros de duración (t) de las fases de nucleación y elongación promedio e intensidad de fluorescencia de formación de fibras en presencia de la MOF HKUST-1 (Cu) .			
[HKUST-1(Cu)] μM	t_{lag} (h)	$t_{1/2}$ (h)	Intensidad máxima de fluorescencia (u.a.)
1650	3.1	5.7	824
165.32	2	8.3	978
[HEWL]			
69.44	2.5	11.7	1210

El mecanismo de interacción entre la HEWL y la **HKUST-1(Cu)** podría ser parecido al reportado por el grupo de Liu *et al.* [52] que inmovilizaron una proteína de 210 aminoácidos en su forma nativa (lipasa de *Bacillus subtilis*) en **HKUST-1(Cu)** que mantiene la funcionalidad biológica después de la unión. Describiendo el proceso como de adsorción de la proteína en la

superficie de los cristales de MOF, facilitando la estabilización del complejo proteína-MOF por interacciones de van der Waals [52].

Otro posible mecanismo de interacción entre la **HKUST-1(Cu)** y una enzima (citocromo C) es el descrito por Ming *et al.* [110], donde el citocromo C de 104 aminoácidos se encapsuló en la MOF mesoporosa Tb-mesoMOF; el citocromo C es más grande que las aperturas de las cavidades mesoporosas pero más pequeña que el diámetro de las cavidades de la Tb-mesoMOF. El citocromo C tuvo que adoptar un cambio conformacional parcial, distinto al estado nativo y desplegado (parcialmente desplegado), para realizar el proceso de entrada a las cavidades porosas; este mecanismo es parecido al realizado en células conocido como translocación proteínica, donde éstas, atraviesan ciertos organelos por medio de complejos de nanoporos (figura 23) [35].

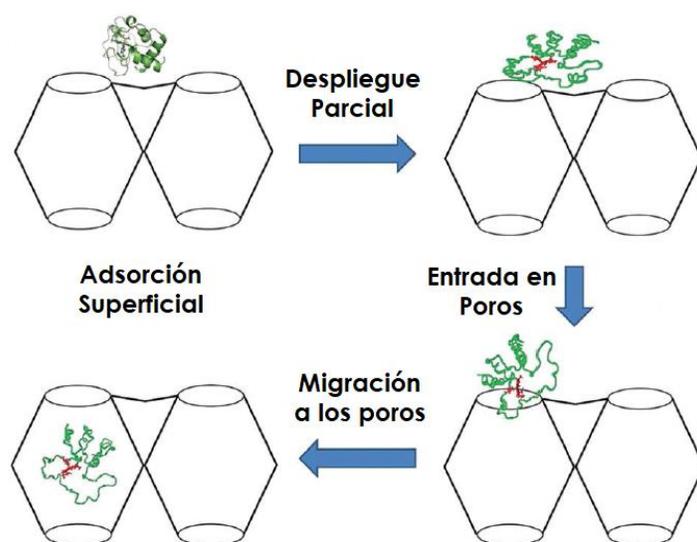


Figura 23. Esquema del mecanismo tentativo de la translocación de una proteína (citocromo C) a las cavidades de una MOF (Tb-mesoMOF). El primer paso del mecanismo involucra adsorción superficial (arriba, izquierda) seguido por un desplegamiento parcial de la proteína (arriba, derecha), posteriormente la proteína parcialmente desplegada se divide entre la superficie y los poros exteriores (abajo, derecha), para finalmente migrar al interior de las cavidades porosas interiores (abajo, izquierda). Modificado de [35].

El mecanismo para la lipasa de *Bacillus subtilis*, se describe como de fijación superficial, pero es para una proteína que se encuentra en su estado nativo. En el sistema de formación de fibras amiloides en presencia de etanol, se inducen dominios específicos de la proteína HEWL para generar especies parcialmente desplegadas. Debido a esto se sugiere un doble mecanismo de interacción, donde la región menos amiloidogénica de la HEWL interacciona con la superficie de la **HKUST-1(Cu)** por medio de interacciones de van der Waals. Y la región con mayor tendencia al estado amiloide sufrirá un proceso de encapsulación en los poros de la **HKUST-1(Cu)**, parecido al descrito para el citocromo C (**figura 23**) [35].

Si el mecanismo de encapsulación por poros sucede, los aminoácidos en los dominios parcialmente desplegados de la HEWL (dominio β y hélice α C) se difundirán dentro de las cavidades de la **HUSKT-1(Cu)**, y podrán tener interacciones tanto débiles no covalentes (puentes de hidrógeno, hidrófobas, electrostáticas, interacciones π - π) como covalentes (enlaces de coordinación) con los metales del material (**figura 23**). Este tipo de interacciones se han descrito anteriormente en otros estudios, como el mecanismo de adsorción entre **HKUST-1(Cu)** y moléculas tóxicas como el azul de metileno y el 4-nitrofenol [55], [111].

La **HKUST-1(Cu)** pertenece al tipo de redes metal orgánicas que contiene una alta concentración de sitios (*cus*), recordando que se tratan de sitios metálicos de coordinación no saturados, lo cual es característico de los sistemas dinucleares metálicos con ordenamiento de “rueda de paletas” [33].

En la **HKUST-1(Cu)** la presencia de moléculas de agua en la primera esfera de coordinación de los iones de cobre se ha sugerido como el detonante para la aparición de un sitio de coordinación no saturado en el ion Cu(II) [50]. Las moléculas de agua tienen una fuerte afinidad por los centros iónicos

metálicos debido al gran momento dipolar de las especies dinucleares de cobre (Cu-Cu) [51].

La **HKUST-1(Cu)** en sistemas totalmente acuosos coordina gradualmente más moléculas de agua en los (*cus*) debilitando estructuralmente a la MOF. Esto ocurre hasta el punto del colapso de la red metal orgánica teniendo como consecuencia la liberación del ligante BTC en su forma protonada, así como del hidróxido de metal $\text{Cu}(\text{OH})_2$ [58] o el metal solvatado. La **HKUST-1(Cu)** en presencia del tratamiento [*buffer* de fosfatos/EtOH] conservó la estructura tridimensional (**figura 7, panel C, rojo**). Por lo que es posible asumir que los sitios de coordinación no saturados siguen disponibles para interactuar. Los sitios (*cus*) se activan cuando las moléculas de agua son desplazadas del centro metálico, la activación se puede dar por medio de temperatura, simplemente por la selectividad ácido-base o por cambios en el disolvente [112].

Los sitios (*cus*) pueden interactuar con moléculas polares, teniendo la habilidad de sustituir las moléculas de solvatación (H_2O , EtOH) previamente coordinadas, siempre que exista una gran concentración de moléculas polares que puedan actuar como bases de Lewis o que exista alta afinidad por dichos sitios [29]. Los (*cus*) son parcialmente positivos, por lo que pueden interactuar con moléculas aniónicas polares o parcialmente negativas por medio de interacciones electrostáticas, como son los cuatro ácidos aspárticos (D48, D66, D88, D101) de la zona amiloidogénica que a pH fisiológico tienen carga negativa [1]. Los aminoácidos como la asparagina (5), glutamina (1), serina (9) y treonina (3) pueden ser considerados bases de Lewis por tener varios pares de electrones no apareados en su estructura molecular. Teniendo una probable habilidad de formar enlaces de coordinación con los sitios (*cus*) de Cu, además de ser aminoácidos más blandos por el principio ABDB y que deberían interactuar más fuertemente con dicho metal [113]. Se ha propuesto un mecanismo redox para las

especies iónicas de Cu(II) y Cu(I) a pH neutro, con capacidad de formar enlaces de coordinación entre cadenas laterales de aminoácidos y los orbitales vacíos del ion cobre (*cus*) [113].

La MOF **HKUST-1(Cu)** es capaz de quimisorber diferentes compuestos orgánicos con grupos funcionales donadores de electrones, como aminas, alcoholes, carbonilos y carboxilatos. Los grupos amino y carbonilo de la cadena principal, perteneciente a los dominios amiloidogénicos en el centro hidrofóbico de la proteína (HEWL), expuestos al solvente por el efecto del etanol, podrían contar con la potencial capacidad para formar coordinaciones $C=O \rightarrow Cu$ (*cus*) o en el material hidratado se forman puentes de hidrógeno entre los N-H de los enlaces peptídicos y las moléculas de agua coordinadas a Cu (*cus*) de las maneras siguientes $O=C-NH \cdots H_2O \rightarrow Cu$ / $HN-C=O \cdots H_2O \rightarrow Cu$ [112]. De hecho este tipo de interacciones predominarían en casi todos los sistemas MOF... Proteína.

Otra probable interacción entre los sitios (*cus*) y la sección amiloidogénica de la HEWL, es con los dos puentes disulfuro intramoleculares (Cys64-Cys68, Cys76-Cys94), que podría suceder de manera análoga por lo descrito por Qiu *et al.* [104]. Estos investigadores describieron la funcionalización selectiva de la **HKUST-1(Cu)** por grupos sulfhidrilos, siendo un proceso postsintético simple. La unión entre los centros metálicos con propiedades de ácidos de Lewis (sitios de coordinación no saturados) y la molécula con características de base de Lewis (grupo tiol), se da por medio de enlaces $R-HS \rightarrow Cu$ [104].

Otra forma de relación que podría suceder con redes metal orgánicas que contengan ligantes con grupos funcionales bencenocarboxílicos, son interacciones de "apilamiento" $\pi-\pi$. Este tipo de ligantes tienen afinidad por atraer compuestos que contengan anillos de benceno en su estructura. Los aminoácidos aromáticos tirosina (Y53) y los triptófanos (W62, W63), poseen anillos de benceno, por lo que podrían unirse a la superficie del anillo

aromático del BTC, tanto por interacciones π - π como por interacciones hidrófobas [55].

Cabe señalar que para el material **HKUST-1(Cu)**, el mecanismo de adsorción predominante se realiza mediante la interacción de las moléculas con el material por medio de un proceso de difusión en los poros solvatados y posteriormente una adsorción en la superficie interna de la MOF. La MOF **HKUST-1(Cu)** tiene muchos sitios (*cus*) de tipo ácido de Lewis y por lo tanto gran reactividad. El proceso de difusión en los poros es determinante (limitante) para que las interacciones anteriormente mencionadas se pueden llevar a cabo. Esto debido a que la mayoría de los sitios (*cus*) con potencial capacidad de formar interacciones (que no estén formando enlaces con el ligante orgánico) con moléculas orgánicas se localizan en el interior de las cavidades del material poroso [93], [101]. A este mecanismo de adsorción de la **HKUST-1(Cu)** se le podría atribuir no observar una inhibición total en 18 h (**figura 22**) a la mayor concentración de la MOF (1.65 mM), así como al tamaño de poro del material. Por lo tanto el mecanismo de inhibición de la HEWL en la **HKUST-1(Cu)** deberá ocurrir en su mayoría sobre la superficie externa del material, sin interaccionar fuertemente con los poros internos.

Previamente Bocharova *et al.* [114] reportaron que concentraciones micromolares de Cu^{+2} a pH 7.2 inhibe la formación de fibras amiloides de una proteína recombinante tipo prion. Aunque la capacidad de unión del Cu^{+2} disminuyó a pH 6, y también observaron ciertos procesos de coordinación interfibrilar. En condiciones fisiológicas los iones de cobre se unen a las placas amiloides del péptido $\text{A}\beta$ induciendo la formación de especies de oxígeno reactivas tóxicas, aunque a la fecha no se sabe con certeza el papel que juegan los iones de cobre en la formación de las fibras amiloides [113], [114].

El análisis termogravimétrico indicó que la liberación de las especies de cobre al medio de reacción fue casi insignificante (~ 1 %) (**figura 7, panel B, rojo**) al comparar los termogramas. Se determinó que es necesaria una concentración de 4.14 mM de sal de nitrato de cobre(II) trihidratado ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) para obtener una inhibición casi total y una concentración de 413.9 μM para una inhibición parcial en la formación de fibras amiloides de HEWL (**Tabla 3**), para las condiciones de nuestro sistema de reacción. Dado que la cantidad de especies de cobre liberadas fueron muy bajas, se puede descartar casi totalmente la participación de estas especies en el mecanismo de inhibición observado para la **HKUST-1(Cu)** (**figura 22**). El pH después del tratamiento disminuyó ligeramente (**apéndice A, tabla 1**), y podría afectar la reactividad de los iones de cobre y por ende su habilidad inhibitoria. Alteraciones del pH también pueden afectar el equilibrio general de la formación de fibras amiloides, aunque el cambio fue muy tenue para considerarse un factor relevante para modificar el proceso inhibitorio [18].

Todas las sales utilizadas para observar su efecto inhibitorio son nitratos de metales (Cu, Fe, Al y Mg) con diferentes grados de hidratación (H_2O), las distintas sales tuvieron cinéticas de inhibición particulares y con comportamientos distintos (**Tabla 3**). Dado que lo constante en todas las sales es el nitrato y lo variable el ion metálico podemos asumir que el causante de la inhibición es el componente metálico, aunado a lo previamente reportado [114]–[116]. La **HKUST-1(Cu)** tiene en una concentración total de 1.65 mM iones de cobre en su estructura para la mayor concentración, ésta última propicia una inhibición casi total (**figura 22**).

La liberación de BTC al medio en su forma protonada fue del 5 % (**figura 7, panel B, rojo**) que es ca. 82.5 μM en el medio, que sería lo disponible en solución en la mayor concentración (1.65 mM de **HKUST-1(Cu)**). En comparación, son necesarias concentraciones de BTC de 4759 y 475.87 μM

para obtener una inhibición total y parcial, respectivamente, en nuestro sistema (**Tabla 3**). Por lo tanto es posible descartar que la concentración liberada de BTC influyó en el proceso de inhibición general.

La MOF **HKUST-1(Cu)** para la concentración (1.65 mM) donde se observó una inhibición casi total (**figura 22**), cuenta con una concentración de 1650 μM para BTC y para iones de cobre, en comparación con la cantidad necesaria para lograr una inhibición parecida usando los compuestos por separado que son $[\text{BTC}]_{\text{TOT}}=4.76$ y $[\text{Cu}]_{\text{TOT}}=4.13$ mM, (**Tabla 3**). Se puede indicar que es ca. 2.5 veces más efectivo el uso de la **HKUST-1(Cu)** a una concentración de 1.65 mM que el uso de los componentes BTC y Cu^{+2} por separado.

De acuerdo al análisis de TGA se liberó un 18 % de DMF después del tratamiento del material **HKUST-1(Cu)**, ya que se encontraba ocluida en los poros desde la síntesis. Es conocido que la presencia de diversos solventes orgánicos como son etanol, metanol, terbutanol y DMF a pH 7 y 24 °C, inducen la formación de fibras amiloides. De esta manera, la DMF es un factor que promueve la formación de fibras, sin embargo el papel de la **HKUST-1(Cu)**, es significativo ya que aunque la inhibición este ligeramente (para formar fibras se requieren sistemas al 60-70 % de DMF) arrestada por la presencia de DMF si se consigue la inhibición [117].

La **HKUST-1(Cu)** como potencial inhibidor, pudo retardar parcialmente la adición de monómeros proteínicos a agregados fibrilares ya existentes e impedir la reacción de adición de monómeros sobre la superficie de las fibras, por medio de una adsorción parcial de la HEWL en su estado desplegado en la superficie externa de los cristales de **HKUST-1(Cu)**, además con posibilidad de que una pequeña fracción de la biomolécula se acomode dentro de los poros. Esto en conjunto con las distintas interacciones fisicoquímicas posibles entre ambos sistemas. Solamente a la

mayor concentración de MOF (1.65 mM) se observó una inhibición considerable, y no fue una inhibición total o prolongada.

6.1.2. MOF **MIL-53(Cu)** y HEWL

La **MIL-53(Cu)** exclusivamente mostró inhibición de la formación de fibras amiloides a una concentración de 4.39 mM, pero los tiempos de modificación de las fases *lag* y de elongación son muy cortos, para considerarla un inhibidor eficiente a esta concentración (**figura 24**).

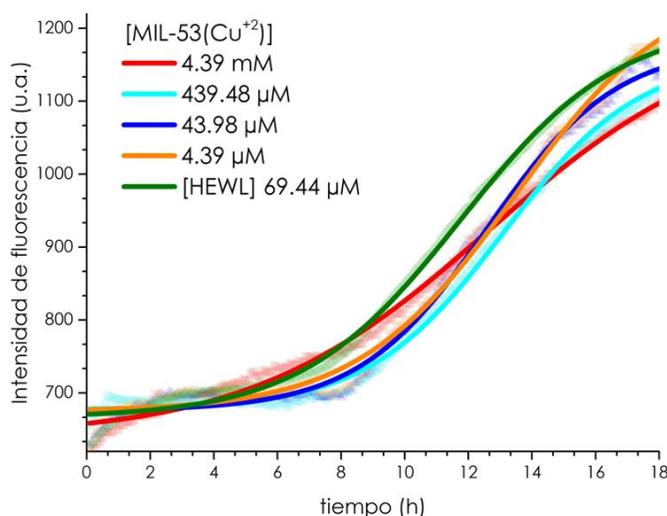


Figura 24. Cinéticas de formación de fibras amiloides de HEWL en ausencia (**verde**) y en presencia de diferentes concentraciones de **[MIL-53(Cu)]**.

El material **MIL-53(Cu)** mostró una alteración muy tenue de la fase *lag* y de la fase de crecimiento, a su vez la intensidad de fluorescencia disminuyó un porcentaje bajo (**Tabla 5**) en comparación al control positivo, y esto solamente ocurrió para la concentración más alta de **MIL-53(Cu)**.

Tabla 5. Parámetros de duración (t) de las fases de nucleación y elongación promedio e intensidad de fluorescencia de formación de fibras en presencia de la MOF MIL-53 (Cu).

[MIL53(Cu)] mM	t _{lag} (h)	t _{1/2} (h)	Intensidad máxima de fluorescencia (u.a.)
4.39	3.7	12.6	1205
[HEWL]			
69.44	2.5	11.7	1210

En la **Tabla 5** se muestra que a la concentración de 4.39 mM la fase *lag* duró 1.2 h más y el valor $t_{1/2}$ se alargó 1 h, con respecto a los valores del control positivo (HEWL), la intensidad de fluorescencia solamente disminuyó un ~ 1 %.

La incapacidad de inhibir la formación de fibras amiloides por parte de la MOF **MIL-53(Cu)**, podría deberse a la inhabilidad de adsorber las zonas parcialmente desplegadas de la HEWL ya que el material no tiene poros del tamaño adecuado para que la interacción con la proteína sea desestabilizante o que existan las interacciones necesarias con ella. En esta estructura aunque los poros se encuentran abiertos teniendo un diámetro de poro de 5.2 Å, comparado con el de la proteína (32 Å) son insuficientes para que la interacción sea eficiente. Por lo que se dificultaría la entrada de los aminoácidos para interaccionar con los sitios (*cus*). Usualmente la **MIL-53(Cu)** adsorbe moléculas pequeñas como dióxido de carbono (CO₂) y metano (CH₄) [61], [63], [66].

Aunque la **MIL-53(Cu)** es un material que cuenta con (*cus*) de cobre, donde posiblemente podrían llevarse a cabo interacciones entre los aminoácidos y los (*cus*) superficiales del material, **MIL-53(Cu)** necesita estar en solventes altamente polares (DMF) y en presencia de altas concentraciones de hidróxido de sodio (NaOH) para poder potenciar e incrementar las interacciones (*cus*) entre moléculas huésped y hospedero [60], [118]. Una de las interacciones débiles principales que permite el autoensamblaje de las fibras amiloides son las de “apilamiento” tipo π entre aminoácidos aromáticos, por lo que su inhibición es fundamental para el impedimento de la fibrillogénesis. La MOF **MIL-53(Cu)** tiene un ligante orgánico con grupos bencenocarboxílicos capaz de interactuar con los anillos de benceno de los residuos aromáticos por medio de interacciones π - π , pero la forma cristalina del material se encuentra en capas mantenidas por medio de interacciones

cohesivas del tipo π - π y puentes de hidrógeno, por lo que son difíciles de superar por otras interacciones intermoleculares [61], [9].

Para este material no se observó liberación al medio de BDC en su forma protonada o especies de cobre (**figura 8, panel A y B, rojo**), y no se alteró el valor del pH (**apéndice A, tabla 1**).

La **MIL-53(Fe)** no se “activó” por calcinación, sin embargo sus sitios (*cus*) pueden encontrarse parcialmente disponibles por los lavados con etanol, de cualquier manera la inhibición observada por la MOF es prácticamente nula.

6.1.3. MOF **MIL-100(Fe)** y HEWL

El material **MIL-100(Fe)** presentó una inhibición casi del 100 % para el proceso de formación de fibras amiloides, con excepción de la concentración menor de MOF (1.53 μ M). Las demás concentraciones presentaron alteraciones en los tiempos de duración de las fases *lag* y de elongación, y también disminuyeron la intensidad de fluorescencia (**Tabla 6**).

Se registró que la fase de elongación duró más tiempo con respecto al control positivo (HEWL) y hubo una disminución en la intensidad de fluorescencia para la concentración de 15.37 μ M de la MOF **MIL-100(Fe)**. Sin embargo, no son cambios suficientemente significativos para considerar que a esta concentración la **MIL-100(Fe)** sea un inhibidor eficaz. A la concentración de 153.71 μ M de **MIL-100(Fe)**, en la **figura 25**, se observa un alargamiento tanto de la fase *lag*, como de la fase de elongación. Donde el punto de inflexión entre las dos fases es poco distinguible, indicando que el evento de ramificación por nucleación secundaria de la fibra amiloide es el principal proceso inhibido, aunque también se ve afectado el proceso de elongación. En la concentración mayor, 1.53 mM, observamos en la **figura 25**, principalmente a la fase *lag* e indicios del inicio de la fase de elongación. Mientras que la fase estacionaria no se detectó en el tiempo que duró la

cinética (18 h), por lo que el principal proceso inhibido es el asociado con la nucleación primaria y al final de la cinética también se observa en cierta medida el proceso de inhibición de elongación de las fibras amiloides [16], [36].

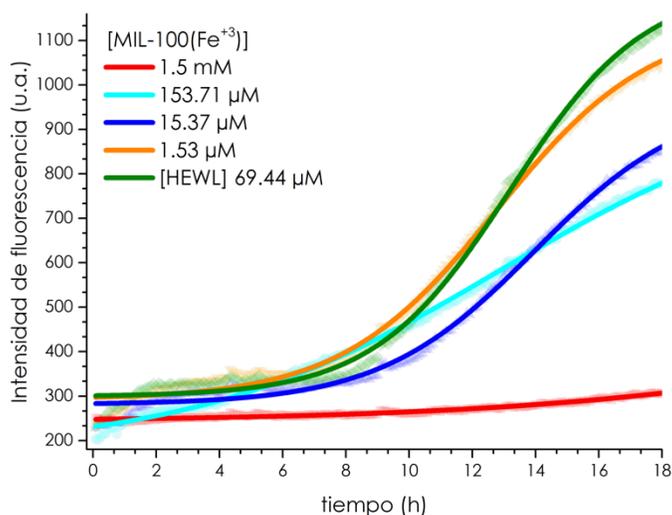


Figura 25. Cinéticas de formación de fibras amiloides de HEWL en ausencia (**verde**) y en presencia de diferentes concentraciones de **[MIL-100(Fe)]**.

El tiempo de la fase *lag* se acortó por 6 min y el valor de $t_{1/2}$ se alargó por 2.2 h, para la concentración de 15.37 μM. Para la concentración de 153.71 μM, la fase *lag* duró 2.3 h más y el de $t_{1/2}$ duró 1.1 h más. Por último, a la concentración de 1537.10 μM no se observó un aumento de la fluorescencia, manteniéndose la mayor parte del tiempo en la fase *lag*. Las concentraciones 15.37 μM y 153.71 μM disminuyeron la fluorescencia en 19 % en promedio, y a la mayor concentración, 1537.1 μM, la intensidad de fluorescencia se mantuvo en valores alrededor de 250 unidades arbitrarias. No hubo formación del patrón cinético sigmoide indicativo del proceso de formación de fibras amiloides. Dado que no se observaron las fases de elongación y estacionaria, no es posible determinar los tiempos de las fases por el modelo (ecuación de Boltzmann) de ajuste, de forma confiable (**Tabla 6**).

Tabla 6. Parámetros de duración (t) de las fases de nucleación y elongación promedio e intensidad de fluorescencia de formación de fibras en presencia de la MOF **MIL-100(Fe)**.

[MIL100(Fe)] μM	t_{lag} (h)	$t_{1/2}$ (h)	Intensidad máxima de fluorescencia (u.a.)
1537.1	ND	ND	250
153.71	4.8	12.8	989
15.37	2.4	13.9	973
[HEWL]			
69.44	2.5	11.7	1210

La inhibición de la formación de fibras amiloides a una concentración de 1.53 mM por parte de la MOF **MIL-100(Fe)**, podría darse a través del mecanismo de encapsulación por poros. Los materiales mesoporosos que poseen canales de cavidades largas tienen la capacidad de usarse como plataformas de inmovilización de proteínas debido a esta posibilidad de oclusión parcial o total de la biomolécula en función del tamaño del poro de la MOF. La introducción de la HEWL a las cavidades de la MOF podría suceder de manera análoga al mecanismo por encapsulación por poros (**figura 23**) descrito para la Tb-mesoMOF [35].

Se ha descrito anteriormente que la **MIL-100(Fe)** puede encapsular de manera eficiente a una gran cantidad de fármacos y moléculas (monohidrato de doxiciclina, clorhidrato de tetraciclina, trifosfato de azidotimidina, ibuprofeno, doxorubicina, Rojo Congo, azul de metileno, progesterona) que cuentan con tamaños mayores a los que tienen los 20 aminoácidos proteínicos en promedio. La HEWL debido al etanol se encuentra en un estado parcialmente plegado, por lo que se puede asumir que los aminoácidos pueden entrar por las aperturas de las cavidades de la **MIL-100(Fe)**, siendo adsorbidos por el material. La HEWL podría introducirse casi por completo en las dos cavidades de la **MIL-100(Fe)** en su forma nativa, que cuentan con diámetros de 29 y 25 Å, mientras que la HEWL tiene un diámetro de 32 Å para su estado nativo. Por lo que en su estado parcialmente plegado es posible que pueda albergarse en su totalidad en cualquiera de las cavidades mencionadas con ligeros cambios

conformacionales en la biomolécula. También debemos considerar que los poros del material se pueden expandir un $\sim 5\%$, debido al efecto de "respiración" con el que cuentan las MOFs [67], [72], [101], [119]. A diferencia de la **HKUST-1(Cu)**, donde el tamaño de las cavidades no permitiría alojar en su totalidad a la HEWL, de manera que solamente la parte amiloidogénica podría incluirse [50].

La liberación de los fármacos por parte de la **MIL-100(Fe)** es sumamente rápida debido a su alta afinidad en medios acuosos, la gran apertura del diámetro largo de los mesoporos hace que cualquier resistencia a la difusión fuera de los poros sea muy débil. Si observamos la **figura 25** para la concentración de 1.53 mM, se aprecia casi en su totalidad la fase *lag* durante las 18 h. Este comportamiento podría ser indicativo que no solamente se encapsuló la parte amiloidogénica de la proteína en la cavidad porosa, sino que probablemente la **MIL-100(Fe)** adsorbió casi en su totalidad a la HEWL y el cúmulo de aminoácidos adsorbidos impide una difusión rápida fuera del poro debido a impedimentos estéricos y a las mismas interacciones entre ambos fragmentos [78]. Dándose de esta manera una inhibición de tipo de barrera física, donde la proteína se encuentra casi totalmente adsorbida dentro de las cavidades de la MOF [101], [112].

La MOF de hierro **MIL-100(Fe)** cuenta con sitios de coordinación no saturados que pueden formar enlaces covalentes o de coordinación fuertes. Específicamente, cada trímero de hierro posee 2 (*cus*) accesibles, capaces de coordinar una gran variedad de especies polares o di/cuadrupolares. Las cavidades largas de la red **MIL-100(Fe)** y su ambiente interno anfífilo, le brindan habilidad de adsorber moléculas huésped, de diferentes polaridades (hidrofóbicas, anfífilas e hidrofílicas) y permitir tanto interacciones del tipo hidrófobo (apolares) con el ligante, como

interacciones del tipo hidrófilo (polares o iónicas) con los trímeros metálicos o las dos simultáneamente [67], [78].

Si establecemos que una gran parte de la HEWL en su estado parcialmente plegado se encuentra dentro de las cavidades de la MOF, los grupos funcionales de los aminoácidos podrán formar diferentes interacciones débiles (puentes de hidrógeno, van der Waals) con la estructura anfifílica del material, principalmente los residuos de la zona amiloidogénica de la HEWL. De manera mimética a las interacciones descritas entre los (cus) de cobre de la **HKUST-1(Cu)** y los aminoácidos, de manera que los sitios (cus) de hierro de la **MIL-100(Fe)** podrán formar las mismas interacciones o análogas [78]. Los sitios (cus) de Fe en la MOF **MIL-100(Fe)** tienen una reactividad alta, gracias a su habilidad inherente de oscilar entre los estados oxidativos +2 y +3, por lo que su activación previa no es necesaria [112].

Los aminoácidos que puedan actuar como bases de Lewis (Asn, Gln, Ser, Thr, Asp) podrán competir con las dos moléculas de H₂O o EtOH por sitios (cus) de Fe(II/III) (ácidos de Lewis). De manera que al desplazar las moléculas del solvente se formarán enlaces covalentes coordinados con los sitios ácidos. La **MIL-100(Fe)** al tener una superficie interna y externa cargada negativamente en condiciones acuosas podrá formar fuertes interacciones electrostáticas con moléculas huésped catiónicas (Lys, His, Arg). La distancia entre los anillos aromáticos del BTC en la **MIL-100(Fe)** es cerca de 5.76 Å, por lo que podría formar interacciones de "apilamiento" π-π con los aminoácidos aromáticos (Tyr, Trp), dado que una interacción π-π se da en el rango de 3.5 Å, que es la distancia de equilibrio promedio para este tipo de sistemas [67], [73], [108].

El mecanismo de adsorción de la **MIL-100(Fe)** sigue los mismos principios al descrito anteriormente para la **HKUST-1(Cu)**, en donde es necesaria la adsorción de las moléculas (proteína) al interior de las cavidades porosas

solvatadas para que se pueda realizar la interacción con los sitios (*cus*) de Fe localizados en la superficie interna de la MOF [93]. De esta manera se maximizan las interacciones y no solo se tomarían en cuenta aquellos sitios (*cus*) de la superficie externa.

Interacciones parecidas entre grupos funcionales (ésteres, ácidos carboxílicos, anillos aromáticos, cadenas laterales alquilo) de fármacos y MOFs del tipo MIL-*n* se han descrito anteriormente. Se registró liberación de BTC al medio en un 6 % (**figura 11, panel A y B**) debido a la presencia de iones fosfato, que representan ca. 90 μM de BTC para la mayor concentración (1.5 mM de **MIL-100(Fe)**), lo cual no es suficiente para lograr un efecto inhibitorio en este sistema. Donde es necesario llegar a concentraciones de 4759 y 475.87 μM de ácido benceno-1,3,5-tricarboxílico en su forma protonada (**apéndice A, figura A1, panel A**) para generar una inhibición total y parcial, respectivamente, haciendo su participación nula en el proceso de inhibición [78].

A partir del análisis termogravimétrico (**figura 11, panel B**) de la **MIL-100(Fe)** se determinó que no existió liberación de especies de oxihidróxidos de hierro(III) ($\text{FeO}(\text{OH})$) o hidróxidos de hierro(III) $\text{Fe}(\text{OH})_3$ al medio de reacción. Nuestro sistema en etanol necesita de concentraciones entre 2470 y 247 μM de sal nitrato de hierro(III) nonahidratado ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) (**apéndice A, figura A2, panel B**) para conseguir una inhibición eficiente de fibras amiloides, para una inhibición total y parcial, respectivamente, ver **Tabla 3**.

La MOF **MIL-100(Fe)** para la concentración (1.53 mM) alcanzó una inhibición total (**figura 25**), contando con concentraciones de 1.53 mM de BTC y de iones de hierro, cuando se encuentra seco el material. Siendo ca. 1.6 veces más efectivo usar el material **MIL-100(Fe)** a una concentración de 1.53 mM, que los compuestos por separado, de los cuales se necesitan $[\text{BTC}]_{\text{TOT}}=4.76$ y $[\text{Cu}]_{\text{TOT}}=2.47$ mM, (**Tabla 3**).

El pH del medio después de las 18 h se modificó (**apéndice A, tabla 1**), aunque este puede ser un factor que afecte el proceso de formación de fibras amiloides en general. Se ha reportado anteriormente que $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ **MIL-100(Fe)** en agua desionizada disminuye el pH a 2.9, esta disminución del pH se asocia a la degradación del material y posterior liberación de BTC en su forma libre y especies de óxidos de hierro, pero también es debido al material *per se*, que es de naturaleza ácida. Dado que no se registró liberación de especies de hierro al medio y la liberación de BTC fue mínima (ca. $90 \mu\text{M}$, para $4075 \mu\text{M}$), la disminución del pH pudo haberse debido a la formación especies de fosfato-hierro o como se dijo al material *per se* [18], [84].

Podemos descartar el cambio de pH causado por **MIL-100(Fe)** como el causante de la inhibición observada (**figura 25**), debido a que previamente se ha reportado la formación de fibras amiloides en pH ácidos (2 y 4), siendo el proceso más veloz a pH 2, por lo que la disminución de pH registrada después de 18 h seguirá promoviendo la fibrillogénesis [18]. Por otro lado, los parámetros cinéticos (**Tabla 6**) de la **MIL-100(Fe)** difirieron con respecto a los del control positivo (HEWL). Martins [36] señala que los inhibidores potenciales alteran las constantes cinéticas debido a una interacción en la que se intercala el agente exógeno con las fibras de la proteína y este efecto es el responsable directo de la inhibición. Mientras que los inhibidores aparentes son aquellos que alteran las fuerzas termodinámicas y las condiciones del medio para ya no propiciar la formación del estado amiloide, pero sería de forma indirecta, por ejemplo halofilia, dilución o apiñamiento molecular (mayor concentración). Teniendo esto en cuenta, la **MIL-100(Fe)** podría funcionar como un inhibidor potencial, descartando que el resultado de la inhibición se deba a alteraciones del pH [36].

El material **MIL-100(Fe)** presentó una inhibición casi completa de la formación de fibras amiloides a su máxima concentración (1.53 mM),

existiendo un cierto grado de degradación del material. Resultando en liberación de especies de hierro y BTC libre, así como alteración en el pH. La degradación no fue la suficiente para cambiar la estructura cristalina tridimensional del material o para que los componentes por separado participaran en el proceso de inhibición.

6.1.4. MOF **MIL-53(Fe)** y HEWL

El material **MIL-53(Fe)** a concentraciones 435.54 y 43.55 μM tuvo el mismo efecto inhibitorio, aumentando la fase *lag* y disminuyendo la fase de elongación, en diferentes proporciones. En la **figura 26** podemos apreciar que el punto de unión entre las dos fases es poco distinguible. Como se mencionó anteriormente este tipo de cinética es representativa, principalmente, de una inhibición del proceso de formación de fibras amiloides por nucleación secundaria y el proceso de elongación. La mayor concentración (4.35 mM) logró la reducción tanto de la fase *lag* como de la fase de elongación (**figura 26**), siendo primordialmente el proceso de elongación el que sufrió inhibición (37 %). Y llegando a la fase estacionaria mucho antes con respecto al control positivo (HEWL), obteniéndose una disminución en la formación de fibras amiloides [16], [36].

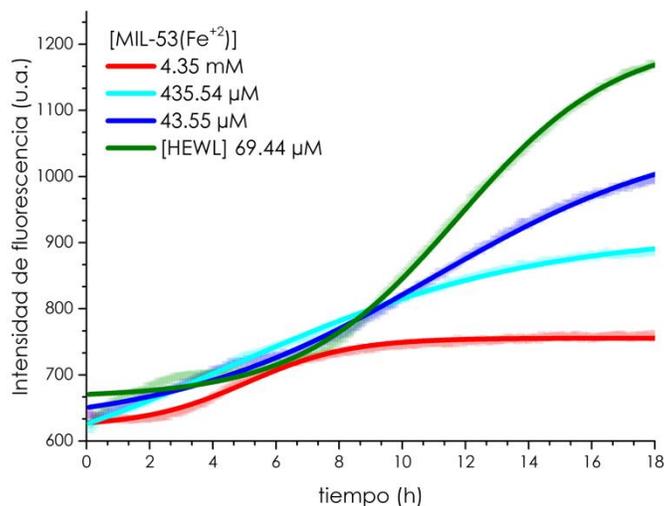


Figura 26. Cinéticas de formación de fibras amiloides de HEWL en ausencia (**verde**) y en presencia de diferentes concentraciones de **[MIL-53(Fe)]**.

La red metal orgánica **MIL-53(Fe)** inhibió la formación de fibras amiloides, modificando los tiempos e intensidades de las fases *lag* y de elongación para las concentraciones 435.54 y 43.55 μM . Mientras que a la mayor concentración, 4350 μM , la duración de la fase estacionaria también se afectó, así como la intensidad de fluorescencia, con respecto al control positivo (HEWL). A la menor concentración, 4.35 μM , no se observó inhibición de fibras (datos no mostrados, **figura 26**) (**Tabla 7**).

Tabla 7. Parámetros de duración (t) de las fases de nucleación y elongación promedio e intensidad de fluorescencia de formación de fibras en presencia de la MOF **MIL-53(Fe)**.

[MIL-53(Fe)] μM	t_{lag} (h)	$t_{1/2}$ (h)	Intensidad máxima de fluorescencia (u.a.)
4350	1.6	5.1	755
435.54	4.8	4.5	914
43.55	4.1	10.9	1073
[HEWL]			
69.44	2.5	11.7	1210

Para la concentración 43.55 μM de **MIL-53 (Fe)** la fase *lag* duro 1.6 h más que el control positivo (HEWL), mientras que el valor $t_{1/2}$ se acortó por 48 min y la intensidad de fluorescencia disminuyó 12 % en promedio. La concentración 435.54 μM disminuyó 7.2 h el valor de $t_{1/2}$ y prolongó la fase *lag* durante 2.3

h más, disminuyendo la intensidad de fluorescencia un 24 %. La mayor concentración, 4350 μM , presentó una disminución de 54 min y 6.7 h para la fase *lag* y el valor $t_{1/2}$, respectivamente. La intensidad de fluorescencia se vio afectada con una disminución del 37 %, siendo la mayor disminución observada de todas las concentraciones de **MIL-53(Fe)** empleadas (**Tabla 7**).

La caracterización del material **MIL-53(Fe)** después del tratamiento demostró la obtención de una estructura colapsada y con disminución considerable de porosidad y cristalinidad (**figura 13**, rojo). Por lo que se puede descartar un proceso de inhibición por el método de encapsulación de poros o cualquier interacción entre la estructura tridimensional del material y la proteína.

Low *et al.* [33] propusieron dos mecanismos de degradación principales para MOFs en presencia de agua, i) por desplazamiento de ligando e ii) hidrólisis. En la reacción por hidrólisis el enlace metal-ligando se rompe, gracias a la disociación de una molécula de agua para formar un ligando protonado (H^+) libre y un anión oxhidrilo (HO^-) [33]. Este mecanismo de degradación por hidrólisis fue el experimentado por la **MIL-53(Fe)**, debido a las especies que liberó al medio.

La revisión de TGA indicó la liberación de un 12 % de BDC en su forma protonada al medio (**figura 13, panel B**, rojo), en este sistema es necesario llegar a concentraciones entre 6019.3 y 601.93 μM de ácido benceno-1,4-dicarboxílico, ver **Tabla 3 (apéndice A, figura A1, panel A)** para la obtención de una inhibición casi total y parcial, respectivamente. La MOF **MIL-53(Fe)** desprendió ca. 522 μM (12 %) de BDC para la concentración de 4.35 mM al medio, por lo que no podría considerarse el factor principal responsable de la alta inhibición observada (**figura 26**). El BDC liberado podría contribuir

hasta cierta medida como molécula inhibitoria, pero no lograría el nivel de inhibición alcanzado por la **MIL-53(Fe)** a una concentración de 4.35 mM.

La prueba de TGA también determinó que la liberación de especies de hierro al medio fue de un ~ 1 % (**figura 13, panel B, rojo**), cantidad insuficiente para generar un proceso de inhibición de fibras amiloides por iones de hierro en nuestro sistema (**apéndice A, figura A2, panel B**). La baja liberación de oxihidróxidos de hierro u óxidos de hierro indica que el material amorfo sigue contando con sitios (*cus*) de hierro capaces de interaccionar con la proteína.

El pH de la solución después de las 18 h descendió hasta 4.63 (**apéndice A, tabla 1**), como consecuencia de la liberación del BDC, la degradación de 1 mg·mL⁻¹ de **MIL-53(Fe)** en agua desionizada resulta en una reducción del pH a 4.5. Yilmaz *et al.* [80] encontraron que en solución de etanol el pH óptimo de sorción superficial del rojo de metileno con la **MIL-53(Fe)** es de 3, por lo que la disminución natural del pH del material aumenta las posibilidades de interacciones entre la MOF y la proteína [80], [84].

Aunque el pH se modificó haciéndose más ácido dicho cambio se puede descartar como el causante de la inhibición observada (**figura 26**) para **MIL-53(Fe)**, por las mismas razones anteriormente proporcionadas para el caso de la MOF **MIL-100(Fe)** y su disminución de pH. Excluyendo que la inhibición sea debida a un efecto que modifique las condiciones de formación del estado amiloide y se debe más bien a un efecto cinético (**Tabla 7**), cuyo mecanismo necesita de interacciones inhibidor-proteína [36].

Para el caso particular de **MIL-53(Fe)** no es posible determinar si es más eficiente usar los componentes por separado (BDC y Fe) o juntos formando el compuesto de coordinación **MIL-53(Fe)**, debido a que el material se volvió amorfo y perdió su estado cristalino. Tampoco se puede determinar el

porcentaje en que influyó cada componente (material amorfo, **MIL-53(Fe)**, BDC protonado liberado al medio) en el proceso de inhibición.

El mecanismo propuesto para la inhibición de fibras amiloides por parte de la MOF **MIL-53(Fe)-tratada** es de fijación superficial. Aunque el material ya no es poroso la superficie amorfa de la **MIL-53(Fe)** podría tener la capacidad de interactuar con la proteína. Nguyen *et al.* [82] propusieron un mecanismo por quimisorción de comportamiento de monocapa superficial entre **MIL-53(Fe)** e ibuprofeno. También se describió por Yilmaz *et al.* [80] un mecanismo inicial de sorción superficial por efecto de capa límite entre el rojo de metileno y la MOF **MIL-53(Fe)**. Las interacciones entre las moléculas adsorbidas, ibuprofeno y rojo de metileno, y el material **MIL-53(Fe)** se da a través de los sitios activos metálicos de hierro (*cus*) y los anillos aromáticos del material [80], [82]. Teniendo un mecanismo de adsorción de tipo superficial principalmente externo uniendo moléculas exógenas de manera física o química [93].

Por medio de la prueba de TGA se determinó que después del tratamiento el material seguía conteniendo moléculas de DMF coordinadas a los centros metálicos de hierro (**figura 13, panel B, rojo**), indicando que los (*cus*) siguen estando activos y funcionales, a pesar de la nula porosidad del material. Existe un porcentaje mínimo (~ 3 %) de DMF ligado al material, que liberado al medio de reacción no intervendrá en el proceso de inhibición, como se explicó anteriormente para el caso de la **HKUST-1(Cu)**.

Los centros catiónicos de $Fe^{2+/3}$ (*cus*) podrían interactuar fuertemente con residuos de aminoácidos aniónicos o aminoácidos con la habilidad de donar pares de electrones libres, por medio de una interacción ácido-base de Lewis (ADAB). Otra relación que podría darse, es entre la superficie cargada positivamente del material amorfo, debido a los centros de $Fe^{2+/3}$, y los residuos de aminoácidos con carga negativa en la zona

amiloidogénica de la HEWL, a través de una interacción altamente electrostática [80], [87]. Recordemos que los sitios (*cus*) de hierro no necesitan ser activados previamente debido a su capacidad de oscilar entre estados de oxidación [112].

También podrían interactuar los anillos aromáticos del BDC, que se encuentren por toda la superficie del material amorfo, con aminoácidos aromáticos de la HEWL por medio de interacciones tipo π - π . Bloqueando así el proceso de “apilamiento” entre ellos, el cual es determinante para la formación de fibras amiloides [10], [80].

El material **MIL-53(Fe)** presentó una inhibición considerable en la formación de fibras amiloides a la mayor concentración, 4.35 mM, pero el amortiguador de fosfatos degradó la MOF convirtiéndola en un material amorfo sin porosidad, existiendo liberación del ligante al medio. Haciendo que las posibles interacciones inhibitorias no fueran con la estructura cristalina del material. Este resultado es un indicio de la importancia de la porosidad del material para mantener durante todo el tiempo de la cinética la formación de fibras en la fase *lag*, y que las interacciones se dan con los centros metálicos y los anillos de benceno disponibles en la superficie, y que ahora están expuestos después del tratamiento.

6.1.5. MOF **MIL-96(Al)** y HEWL

La red metal orgánica **MIL-96(Al)** presentó una alta inhibición del proceso de formación de fibras amiloides. Para las concentraciones 397.63 y 39.76 μ M no se observó el desarrollo de las fases de elongación y estacionaria, manteniéndose las cinéticas principalmente en la fase *lag*. La intensidad de fluorescencia se mantuvo casi asintótica para la concentración 397.63 μ M, mientras que para 39.76 μ M solo incrementó un 15 % (**figura 27**). Para el caso de 397.63 μ M la proporción molar de inhibición resultó de 1:5.7 (HEWL:**MIL-**

96(Al)), mientras que para 39.76 μM resultó de 1:0.57, la cual es la más baja de toda la serie, ver **Tabla 10**.

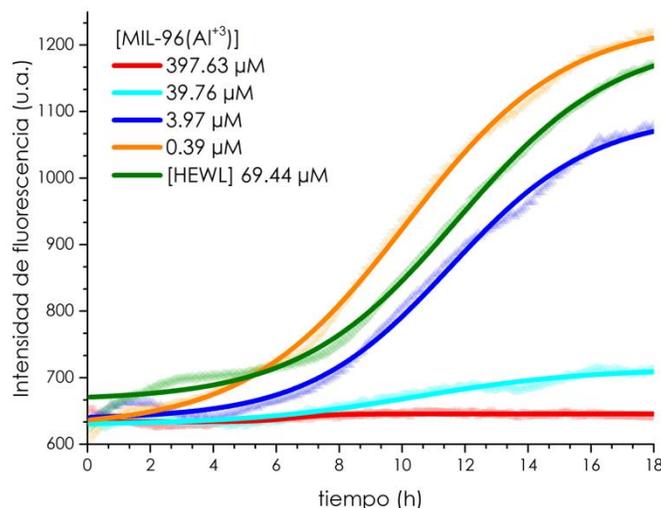


Figura 27. Cinéticas de formación de fibras amiloides de HEWL en ausencia (**verde**) y en presencia de diferentes concentraciones de **[MIL-96(Al)]**.

La MOF **MIL-96(Al)** mostró inhibición en tres concentraciones, para la concentración 3.97 μM se modificaron los tiempos de t_{lag} y $t_{1/2}$, indicando una alteración en los eventos de nucleación primaria y elongación para la formación de fibras amiloides. Resultando en una disminución en la intensidad de fluorescencia (16 %), siendo un cambio muy pequeño para considerarse como determinante. La concentración de 39.76 μM inhibió el proceso de nucleación primaria en la mayor parte del tiempo, aunque al final de la cinética se comienza a apreciar el “inicio” de la fase de elongación, pero no cuenta con el comportamiento exponencial o rápido característico. Por lo que el mecanismo de elongación también se inhibe en cierto grado. La concentración mayor, 397.63 μM , de **MIL-96(Al)** impidió la aparición de ambas fases, de elongación y estacionaria. Durante las 18 h de la cinética solo se observó la fase *lag*, indicando la inhibición del mecanismo de nucleación primaria. Suprimiendo de esta manera la formación de fibrillas y obstruyendo la llegada al punto crítico de formación

de núcleos oligoméricos, derivando en una nula formación de fibras amiloides (**figura 27**) [16].

La concentración 3.97 μM no modificó significativamente las fases *lag* o de elongación y solo se disminuyó la intensidad de fluorescencia levemente (**Tabla 8**). A la concentración menor, 0.39 μM , no se observaron cambios en la cinética de formación de fibras amiloides.

Tabla 8. Parámetros de duración (t) de las fases de nucleación y elongación promedio e intensidad de fluorescencia de formación de fibras en presencia de la MOF **MIL-96(Al)**.

[MIL-96(Al)] (μM)	t_{lag} (h)	$t_{1/2}$ (h)	Intensidad máxima de fluorescencia (u.a.)
397.63	ND	ND	645
39.73	ND	ND	713
3.97	2.2	11.5	1095
[HEWL]			
69.44	2.5	11.7	1210

Debido a que el patrón característico cinético sigmoide de formación de fibras amiloides no se obtuvo para las concentraciones 397.63 y 39.76 μM , no es posible emplear el ajuste de datos utilizando la función de Boltzmann para obtener los valores t_{lag} y $t_{1/2}$, con coeficientes de determinación fiables. A estas concentraciones, la intensidad de fluorescencia disminuyó un 97.8 y 84.5 %, respectivamente, con respecto al control positivo (HEWL). La concentración 3.97 μM acortó ca. 20 min tanto t_{lag} como $t_{1/2}$, y disminuyó la intensidad de fluorescencia un 16 % (**Tabla 8**).

La red metal orgánica **MIL-96(Al)** presentó un nivel total de inhibición en la formación de fibras amiloides para las concentraciones 397.63 y 39.76 μM (**figura 27**). Dado que la MOF **MIL-96(Al)** es un material que cuenta con microporos que solo permiten la entrada de moléculas con tamaños entre ~ 6 y 10 Å, dependiendo de la apertura del poro por el efecto de "respiración", siendo las moléculas H_2O , CO_2 , N_2 , EtOH, MeOH de más fácil adsorción. Por lo tanto, se puede descartar un mecanismo de

encapsulación por poros de la proteína (HEWL), aunque la proteína se encuentre en un estado parcialmente plegado. La zona amiloidogénica de la HEWL o aminoácidos particulares no podrán introducirse en los microporos de la **MIL-96(Al)** debido al gran tamaño de la biomolécula [35], [95].

Para el efecto inhibitorio de la **MIL-96(Al)** se propone un mecanismo de fijación superficial, el sitio de adsorción de la proteína (HEWL) será en la superficie externa del material y el tipo de interacción o la energía de unión dependerá del proceso de atracción (quimisorción, fisorción) [95]. Zhang *et al.* [93] han señalado que los sitios de adsorción con mayor disponibilidad, de fácil y rápido acceso para la **MIL-96(Al)** se encuentran en la superficie del material. También señalan que la capacidad de adsorción se maximiza debido a la superficie uniforme del material y que no se altera en el rango de pH 3 a 10 [93].

La capacidad de adsorción superficial externa puede atribuirse al tipo de topología del material y su estructura tridimensional que permite que se ubiquen una gran cantidad de trímeros de aluminio en la superficie uniforme, además de grupos hidroxilos y en menor medida anillos aromáticos polares expuestos hacia el solvente [93]. Como se mencionó anteriormente, la **MIL-96(Al)** se compone de trímeros octaédricos de aluminio y de una amplia cantidad de grupos hidroxilos puente (μ_2 -hidroxo), en comparación a otras MOF de aluminio. En esta estructura, el arreglo de puentes de tipo μ_2 -OH es el responsable de conferirle al material una superficie altamente hidrofílica [95].

La MOF **MIL-96(Al)** cuenta con un gran número de sitios (*cus*) de aluminio (Al^{+3}), siendo de tres tipos $Al\leftarrow OH$, $Al\leftarrow OH_2$, $Al\leftarrow O$, a diferencia de **HKUST-1(Cu)** y **MIL-100(Fe)** que solo cuentan con sitios del tipo $M\leftarrow H_2O$. Benzaqui *et al.* [94] han reportado que parte de la gran capacidad de la **MIL-96(Al)** de adsorber CO_2 es debido a la formación de complejos tipo $Al^{+3}\leftarrow O=C=O$ por

medio de enlaces de coordinación. También se ha descrito previamente que la adsorción de fluoruro (base de Lewis) por parte del material se da por medio de un desplazamiento del grupo –OH en los sitios (*cus*) del tipo Al-OH de la **MIL-96(Al)**, obteniéndose un enlace de coordinación $Al^{+3} \leftarrow F$ y puentes de tipo Al-F-Al [93], [94].

Por lo tanto, una de las posibles interacciones entre la HEWL y la **MIL-96(Al)** podría ser entre los tres distintos sitios (*cus*) de Al^{+3} localizados en la superficie uniforme del material y aminoácidos con carácter de base de Lewis que se sitúen en la zona amiloidogénica de la HEWL. También podrían darse interacciones electrostáticas y de puente de hidrógeno entre aminoácidos y (*cus*) Al^{+3} con un mecanismo similar al descrito anteriormente para **HKUST-1(Cu)** y **MIL-100(Fe)**. Existen reportes de los efectos de complejos moleculares de carboxilatos de aluminio en sistemas biológicos, de manera que en nuestro sistema podríamos obtener estos complejos a partir de ácidos aspárticos y glutámicos en coordinación con (*cus*) Al^{+3} [89], [94].

Dado que **MIL-96(Al)** es una red metal orgánica que se forma con ligantes con grupos funcionales bencencarboxílicos (BTC), las interacciones de tipo “apilamiento” π - π entre los anillos de benceno de los aminoácidos aromáticos de la HEWL y el anillo aromático del BTC podrían contribuir en la adsorción de la proteína por parte del material [55]. Esta interacción se podría ver potenciada debido al arreglo de enrejado de panal de anillos hexagonales de 18 miembros de BTC ubicado en la segunda subunidad inorgánica particular para el material **MIL-96(Al)** [89]. Este mecanismo sería similar al descrito por Patil *et al.* [120] que describen que la adsorción de nitrobenceno por parte de una MOF a base de aluminio **MIL-53(Al)** es debido a interacciones tipo “apilamiento” π - π entre el nitrobenceno y el ligante orgánico (BDC) [120].

El material **MIL-96(AI)** al ser una MOF a base de aluminio cuenta con alta cantidad de grupos hidroxilos (-OH), pero a diferencia de otras redes metal orgánicas de aluminio ciertos grupos -OH no participan en la formación de puentes de hidrógeno con el agua adsorbida. Encontrándose -OH "libres" para interactuar con otras moléculas, no necesitando un proceso de activación previo. Benzaqui *et al.* demostraron que la mayor contribución para la adsorción de CO₂ por parte de la **MIL-96(AI)** se da por medio de los arreglos tipo μ_2 -OH "libres" presentes, mediante la formación de aductos de la forma O-H...O=C=O, creando una red de puentes de hidrógeno de gran afinidad que da una fuerte interacción huésped/anfitrión [94], [95].

El mecanismo de inhibición por parte de los anillos de benceno BTC estructural y los grupos hidroxilo (-OH) en la MOF **MIL-96(AI)** podría ser similar al reportado previamente para los polifenoles, moléculas relativamente pequeñas compuestas de anillos aromáticos fenólicos. Porat *et al.* [10] han señalado que un polifenol es un inhibidor eficiente cuando se compone de al menos dos anillos fenólicos y un mínimo de tres grupos hidroxilos (-OH) en los anillos. La inhibición por parte de los anillos fenólicos se da por medio de interacciones de tipo "apilamiento" π - π con los residuos aromáticos, mientras que los grupos -OH crean puentes de hidrógeno que potencia la estabilidad del complejo inhibidor-proteína [10].

Akaishi *et al.* [121] mencionan que el aumento en el número de grupos hidroxilo (-OH) en los anillos aromáticos de compuestos fenólicos aumenta el efecto inhibitorio. Cerón *et al.* [102] encontraron que de distintos compuestos fenólicos en estados oxidados o reducidos, los de mayor efecto de inhibición fueron aquellos con más número de grupos -OH [102], [121]. Por lo que podríamos indicar que el mecanismo más probable de inhibición de fibras amiloides por parte de la **MIL-96(AI)**, se debe a una adsorción superficial de la proteína que se estabiliza y mantiene por medio de una red de puentes de hidrógeno formada entre los arreglos tipo μ_2 -OH del material

y la zona amiloidogénica de la HEWL, contribuyendo también al complejo inhibidor-proteína, las interacciones con los sitios (cus) de Al^{+3} y las de tipo "apilamiento" π - π .

EL material **MIL-96(Al)** no presentó una liberación significativa de iones de aluminio al medio de reacción (~ 0.5 %) después del tratamiento en *buffer* de fosfatos/etanol (**figura 15, panel B**). De todos los iones metálicos utilizados en este estudio (Cu, Fe, Al, Mg), únicamente la sal de nitrato de aluminio(III) nonahidratado ($Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$) no presentó inhibición en la formación de fibras amiloides a ninguna concentración (**apéndice A, figura A2, panel C**). De manera contrastante, en la literatura existen estudios que indican que el aluminio solvatado promueve la formación de fibras amiloides en ciertas condiciones [116].

Para nuestro sistema en etanol es necesario llegar a concentraciones de 4758.7 y 475.87 μM de ácido benceno-1,3,5-tricarboxílico en su forma protonada, ver **tabla 3 (apéndice A, figura A1, panel A)** para generar una inhibición total y parcial, respectivamente. El material **MIL-96(Al)** después del tratamiento liberó al medio ~ 2 % de BTC, que representa ca. 7.95 μM para la mayor concentración (397.63 μM), descartando así que el BTC liberado participe en el proceso de inhibición fibrilar. El pH no se modificó después del tratamiento (**apéndice A, tabla 1**).

La red metal orgánica **MIL-96(Al)** presentó una inhibición total y casi total para las concentraciones 397.63 y 39.76 μM , respectivamente. Entendiéndose que se cuenta con 397.63 y 39.76 μM de BTC para dichas concentraciones de **MIL-96(Al)**, y que para obtener una inhibición total de fibras amiloides necesitamos alrededor de 4759 μM de ligante orgánico libre (BTC). Se puede decir que **MIL-96(Al)** es ca. 12 veces más eficiente para la concentración 397.63 μM y 119.69 veces más eficiente para la concentración 39.76 μM . Siendo la MOF **MIL-96(Al)** un mejor inhibidor que el

BTC o los compuestos de manera separada (BTC y Al^{+3}), dado que los iones de aluminio (Al^{+3}) no tienen efecto inhibitorio.

La red metal orgánica **MIL-96(Al)** a concentraciones de 397.63 y 39.76 μM logró inhibir el proceso de formación de fibras amiloides, sin sufrir cambios considerables en su estructura cristalina después del tratamiento.

6.1.6. MOF **MIL-53(Al)** y HEWL

La red metal orgánica **MIL-53(Al)** no mostró inhibición para el proceso de formación de fibras amiloides. Se observó que los valores para t_{lag} para todas las concentraciones permanecieron prácticamente indistintos. Mientras que para el parámetro de $t_{1/2}$ hubo ligeros cambios en los tiempos para llegar a la formación del 50 % de las fibras amiloides. Pero al final la intensidad de fluorescencia en la etapa estacionaria permaneció alrededor del valor del control positivo (HEWL) para todas las concentraciones (**figura 28**).

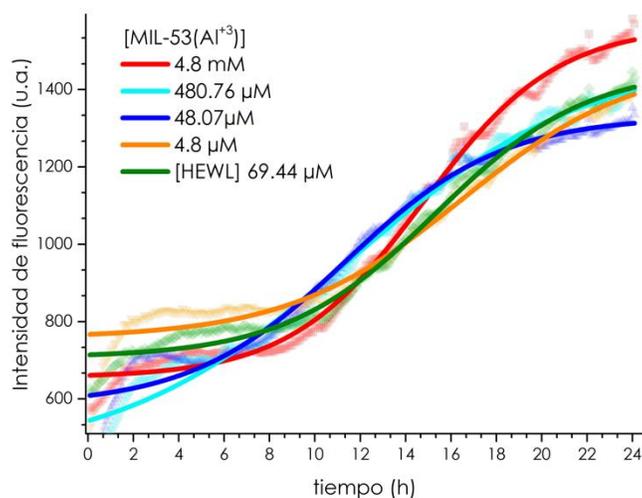


Figura 28. Cinéticas de formación de fibras amiloides de HEWL en ausencia (**verde**) y en presencia de diferentes concentraciones de [**MIL-53(Al)**].

El material no perturbó ninguno de los procesos de nucleación primaria o secundaria, el proceso de elongación se vió afectado en cierta medida, pero la fase estacionaria demostró que todas las concentraciones permitieron la misma formación de fibras con respecto al control positivo (HEWL).

La nula inhibición por parte de la MOF **MIL-53(AI)** se podría atribuir a su pequeño tamaño de poro. **MIL-53(AI)** como todas las MOFs a base de aluminio cuenta con grupos hidroxilo (-OH) inherentes a la estructura del material y sitios (*cus*) de Al^{+3} . Sin embargo, estos contactos se encuentran distribuidos uniformemente dentro de los túneles con forma rómbica en (1D) formados por los poros del material [97].

De manera que el tipo de adsorción del material **MIL-53(AI)** es primordialmente de encapsulación en los canales (1D) y no superficial, se ha reportado anteriormente que **MIL-53(AI)** encapsula nitrobenzeno dentro de los poros y se adsorbe mediante interacciones tipo “apilamiento” π - π . También puede encapsular moléculas de H_2O , CO_2 , $EtOH$ y N_2 las cuales se mantienen dentro de los poros mediante la formación de puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo (-OH) del material [97], [120].

Aunque **MIL-53(AI)** cuenta con sitios (*cus*) de Al^{+3} periféricos en el borde del material que pueden llevar a cabo reacciones catalizadas. La superficie de la MOF **MIL-53(AI)**, a diferencia de **MIL-96(AI)**, es de naturaleza hidrofóbica debido a que no cuenta con los suficientes grupos -OH superficiales [44], [120]. Para moléculas polares es necesaria una difusión en los poros, para que dentro de los túneles puedan interactuar con los grupos hidroxilo y los (*cus*) de Al^{+3} de la superficie interna del material, así como para formar interacciones tipo “apilamiento” π - π con el ligante orgánico (BDC), resultando en una adsorción eficiente.

Los poros del material **MIL-53(Al)** tienen un diámetro de 8.5 Å cuando se encuentran vacíos, con una capacidad de expandirse ~ 5 Å debido al efecto de "respiración", pero en presencia de solventes como el agua, los poros se contraen disminuyendo el área de cara ($2.6 \times 13.6 \text{ Å}^2$) [97]. Por lo que se sugiere que la proteína HEWL o partes de ella no podrán ser encapsuladas, o solo una muy pequeña fracción, dentro de los poros de la **MIL-53(Al)**. Por lo tanto, no se podrán formar interacciones con sus sitios de contacto del material (sitios (cus) de Al^{+3} , grupos hidroxilo, anillos aromáticos (BDC)) que se localizan en los túneles. Una conclusión importante después de observar estos resultados es que la densidad de grupos -OH superficiales no es suficiente en la **MIL-53(Al)** como para tener el efecto de la **MIL-96(Al)**. Aunque el material es persistente debido a que es altamente hidrotermal y resistente a la hidrólisis, **MIL-53(Al)** no afectó el proceso de formación de fibras amiloides también debido a que su pequeño tamaño de poro no permitió la entrada de la HEWL. Impidiendo la generación de más interacciones para conseguir la adsorbencia necesaria que causa la inhibición, como en el caso de la **MIL-96(Al)**.

6.1.7. MOF **NICS-6(Mg)** y HEWL

La MOF **NICS-6(Mg)** presentó inhibición en la formación de fibras amiloides, modificando los tiempos de los valores t_{lag} y $t_{1/2}$ así como reduciendo la intensidad de fluorescencia, con excepción de la concentración menor ($20.53 \mu\text{M}$) donde no se presentaron cambios considerables (**Tabla 9**).

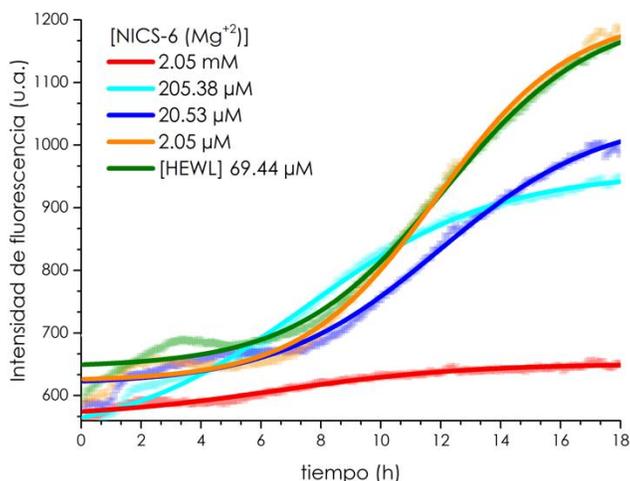


Figura 29. Cinéticas de formación de fibras amiloides de HEWL en ausencia (**verde**) y en presencia de diferentes concentraciones de **[NICS-6(Mg)]**.

El material **NICS-6(Mg)** mostró inhibición en tres de sus concentraciones, para 20.53 μM la fase *lag* se amplió más tiempo con respecto al control positivo (HEWL). Mientras que la fase de elongación no sufrió cambios, indicando que el principal proceso inhibido fue el de nucleación primaria, siendo una alteración poco notable en la formación de fibras. Las dos concentraciones 2054 y 205.38 μM aumentaron la duración de la fase de nucleación y redujeron la fase de elongación, en diferentes proporciones. Estas modificaciones en las constantes de velocidades cinéticas de formación de fibras están asociadas a la inhibición de los mecanismos de nucleación secundaria y de elongación. No obstante, solo a la mayor concentración (2.5 mM) se observó una disminución considerable (84.2 %) de la fluorescencia (**figura 29**) [16].

Tabla 9. Parámetros de duración (t) de las fases de nucleación y elongación promedio e intensidad de fluorescencia de formación de fibras en presencia de la MOF **NICS-6(Mg)**.

[NICS-6(Mg)] μM	t_{lag} (h)	$t_{1/2}$ (h)	Intensidad máxima de fluorescencia (u.a.)
2050	3.7	6.5	550
205.38	3.1	7.5	956
20.53	2.7	11.9	1047
[HEWL]			
69.44	2.5	11.7	1210

La concentración 20.53 μM de **NICS-6(Mg)** alargó el tiempo de duración del valor t_{lag} por 12 min, el valor $t_{1/2}$ no se modificó y la intensidad de fluorescencia decayó un 21 % con respecto al control positivo (HEWL). Para la concentración 205.38 μM el parámetro t_{lag} se prolongó 36 min más y $t_{1/2}$ descendió 4.2 h, la intensidad de fluorescencia también disminuyó un 21.5 %. A la mayor concentración (2.5 mM) fue donde se observó un alto grado de inhibición, el valor t_{lag} se extendió 1.2 h más, mientras que $t_{1/2}$ se acortó 5.2 h, la intensidad de fluorescencia registró la mayor caída de todas las concentraciones con un 84.2 % (**Tabla 9**).

El material **NICS-6(Mg)** después del tratamiento se transformó en la MOF **NICS-4(Mg)**, el cambio de MOFs se dio durante el transcurso de las 18 h. Debido a lo anterior no se puede determinar con exactitud, cuál es el porcentaje de influencia de cada material en el proceso de inhibición, o si el proceso de transformación en sí mismo afectó la formación de fibras.

Se determinó que después del tratamiento existió una liberación del 5 % de BTC al medio de reacción (**figura 19, panel B, rojo**). Para que el BTC en su forma protonada logre una inhibición total y parcial en nuestro sistema son necesarias alcanzar concentraciones de 4758.7 y 475.87 μM , respectivamente, (**apéndice A, figura A1, panel A**). El BTC liberado para la concentración de mayor inhibición (2.05 mM) fue de ca. 102.69 μM , descartándose así su participación en el proceso inhibitorio.

El pH de la disolución no sufrió alteraciones después del tratamiento (**apéndice A, tabla 1**), siendo que estos factores (pH, BTC liberado) no alteraron el proceso de formación de fibras amiloides y que los parámetros de tiempo en las cinéticas se modificaron. Todo lo anterior orienta a que la inhibición se consiga a través de interacciones MOF-proteína.

Nuestra metodología no permite conocer en cuánto tiempo se dio la transformación de **NICS-6(Mg)** a **NICS-4(Mg)**, lo mas probable es que al

principio de la cinética únicamente intervino **NICS-6(Mg)** en la inhibición. Mientras que al final de la cinética **NICS-4(Mg)** mantuvo la inhibición. Para **NICS-6(Mg)** el posible mecanismo de inhibición podría ser de encapsulación por poros, dado que de todas las NICS-n(Mg) es la única que tiene una estructura de poros tridimensional (3D). El mecanismo propuesto para el efecto inhibitorio de **NICS-4(Mg)** sería de fijación superficial, ya que en esta forma no se cuenta con una estructura porosa bien definida, siendo parecido al descrito para el material **MIL-53(Fe)-tratada** [35], [47].

Las interacciones que predominaran entre la **NICS-6(Mg)** y la proteína son similares a las ya descritas anteriormente para el resto de las MOFs con actividad inhibitoria. Estas son interacciones de tipo “apilamiento” π - π entre los anillos aromáticos de los aminoácidos y el anillo de benceno del BTC, además de interacciones entre los sitios (*cus*) de Mg y residuos con carácter de base de Lewis, de forma electrostático o coordinada. El material **NICS-4(Mg)** también tiene la habilidad potencial de realizar las mismas interacciones mencionadas para **NICS-6(Mg)**. Esto debido a un mayor número de moléculas de agua coordinadas al Mg, con la posibilidad de formar una red de puentes de hidrógeno, tanto con las aminas, carbonilos y residuos de la cadena principal de la zona amiloidogénica de la HEWL [47], [55], [95].

La **NICS-6(Mg)** logró un efecto inhibitorio sobre el proceso de amiloidogénesis, pero cambió su estructura tridimensional debido a una baja estabilidad en el medio de *buffer*/etanol, obteniéndose el material **NICS-4(Mg)** sin conocer con exactitud que nivel de participación tuvo cada material en la inhibición conseguida.

6.4. Estudios comparativos de interacción entre MOFs y

HEWL

Todas las redes metal orgánicas que evitaron la formación de fibras amiloides presentaron una inhibición dependiente de concentración. La **Tabla 10** indica que las MOFs que tuvieron inhibición fueron: **HKUST-1(Cu)**, **MIL-100(Fe)**, **MIL-53(Fe)**, **MIL-96(Al)**, **NICS-6(Mg)**. De éstas **HKUST-1(Cu)**, **MIL-53(Fe)** y **NICS-6(Mg)** tuvieron una inhibición casi total o parcial, dependiente de la concentración, siendo los tres materiales semiestables en el medio de reacción. La MOF **MIL-100(Fe)** presentó una inhibición total y parcial para las dos concentraciones, respectivamente, contando con una estabilidad media. El material **MIL-96(Al)** tuvo una inhibición casi total y total para 397.63 y 39.76 μM , respectivamente, siendo el único material persistente, altamente estable, que mostró inhibición. Mientras que en el extremo opuesto se encuentran las MOFs **MIL-53(Cu)** y **MIL-53(Cu)** las cuales tuvieron gran estabilidad en el medio de reacción, pero no presentaron inhibición.

Aparte de gran estabilidad, la MOF **MIL-96(Al)** tuvo la mejor relación molar inhibitoria con respecto a la proteína, de todos los materiales probados.

Tabla 10. Concentraciones a las cuales las redes metal orgánicas presentaron inhibición, estabilidad de los materiales en el medio de reacción después de 18 h y relaciones molares con la HEWL.

Red Metal Orgánica	Inhibición [μM]	Estabilidad (<i>buffer</i> /etanol)	Relación molar
HKUST-1(Cu)	1650, 165.32	Semiestable	1:23, 1:2.3
MIL-53(Cu)	---	Persistente*	---
MIL-100(Fe)	1500, 153.71	Semiestable	1:21, 1:2.2
MIL-53(Fe)	4350, 435.54	Inestable	1:62, 1:6.2
MIL-96(Al)	397.63, 39.76	Persistente*	1:5.7, 1:0.57
MIL-53(Al)	---	Persistente*	---
NICS-6(Mg)	2050, 205.38	Semiestable	1:29, 1:2.9

(---) denota que no hubo inhibición en las condiciones experimentales. (*) denota alta estabilidad en las condiciones experimentales.

VII. CONCLUSIONES

La formación de fibras amiloides por medio del uso de solventes orgánicos para probar compuestos no solubles en agua con potencial efecto inhibitorio es un campo de investigación relativamente nuevo. En este estudio logramos establecer una metodología para la formación de fibras amiloides usando la proteína de clara de huevo de gallina (HEWL) utilizando etanol absoluto como solvente orgánico.

Las condiciones para el desarrollo de la amiloidogénesis fueron en un medio de reacción de [buffer de fosfatos/etanol] 1.55 mM/2.12 mM (65 %) por 18 h. En esta nueva metodología de formación de fibras no se necesitó del uso de agitación o temperatura, también se acortó el tiempo de formación de manera significativa, esto en comparación con otras metodologías utilizando HEWL.

También es novedoso indicar que en este trabajo se diseñó un experimento para obtener un sistema formador de fibras en etanol. Llevando a cabo experimentos de detección de fibras amiloides por medio de lecturas de fluorescencia intrínseca, evitando el uso de Tioflavina-T (ThT) como molécula reportera o sonda. De esta manera se evita la observación de falsos positivos, sea por i) la fluorescencia o apagamiento de la sonda debido a la presencia de moléculas inhibitorias (fluorescentes o no); o ii) por la interacción de la sonda con el compuesto inhibitorio y que de esta manera se modifique la intensidad de fluorescencia de la sonda independientemente del proceso inhibitorio mismo. A partir de estas pruebas de detección también encontramos que ciertas redes metal orgánicas probadas en este estudio interactúan con la molécula de ThT, lo cual es de potencial interés para contribuir al entendimiento del mecanismo de fluorescencia del ThT.

También se sintetizaron y caracterizaron fisicoquímicamente siete redes metal orgánicas con ácido trimésico o ácido tereftálico como ligantes orgánicos, y los iones Cu^{+2} , Fe^{+3} , Al^{+3} o Mg^{+2} , dando lugar a **HKUST-1(Cu)**, **MIL-53(Cu)**, **MIL-100(Fe)**, **MIL-53(Fe)**, **MIL-96(Al)**, **MIL-53(Al)** y **NICS-6(Mg)**.

Las pruebas de estabilidad realizadas a las MOFs después de encontrarse en *buffer* de fosfatos, indicaron que los materiales a base de aluminio **MIL-96(Al)** y **MIL-53(Al)** tienen una alta termo- e hidro- estabilidad, así como resistencia a la presencia fosfatos a una concentración de 1.55 mM. Los materiales **HKUST-1(Cu)**, **MIL-100(Fe)** y **NICS-6(Mg)**, no presentaron una estabilidad total debido a que existió liberación de ligante (BDC o BTC) o de iones metálicos (Cu^{+2} , Fe^{+3} , Mg^{+2}), pero conservaron su estructura cristalina durante las 18 h de ventana experimental. Teniendo un mecanismo de degradación en *buffer* de fosfatos dependiente del tiempo y la concentración de especies aniónicas fuertes, en concordancia con lo observado con la transformación de **NICS-6(Mg)** → **NICS-4(Mg)**. La MOF **MIL-53(Cu)** presentó una estabilidad total en el medio de reacción, mientras que su contraparte de hierro **MIL-53(Fe)** perdió por completo su estructura porosa tridimensional y se convirtió en un material amorfo.

Podemos decir que las MOFs de tipo MIL-*n* con átomos de aluminio fueron las más persistentes, mostrando gran estabilidad independientemente del ligante orgánico (BDC o BTC). Para las MOFs con iones de Cu^{+2} , Fe^{+3} y Mg^{+2} , utilizando BTC como ligante, el material de hierro es más estable que los de cobre y magnesio, mientras que los compuestos de magnesio y cobre mostraron una estabilidad parecida. Usando BDC como ligante orgánico, el material de cobre fue más estable que el de hierro. Las pruebas de estabilidad en presencia de fosfatos y a pH fisiológico (7.25) tienen relevancia para posteriores aplicaciones biológicas empleando redes metal orgánicas tipo MIL-*n*.

Respecto a las redes metal orgánicas como potenciales inhibidores de la formación de fibras amiloides, todas las MOFs que presentaron inhibición lo hicieron de manera dependiente a la concentración. Encontramos que **MIL-53(Cu)** y **MIL-53(Al)**, aunque son altamente persistentes en el medio de prueba, no presentaron inhibición de fibras amiloides. Los materiales **NICS-6(Mg)** y **MIL-53(Fe)**, si presentaron inhibición pero el tratamiento modificó su estructura y nivel de cristalinidad. Y aunque estos materiales semiamorfos presentaron adsorción de la HEWL por medio de un posible mecanismo superficial, esta inhibición no es resultado de la interacción con la estructura totalmente cristalina o inicial del material.

Los materiales **HKUST-1(Cu)** y **MIL-100(Fe)** presentaron inhibición de la formación de fibras amiloides en relaciones molares parecidas (1:23, 1:2.3 y 1:21, 1:2.2), respectivamente, pero **MIL-100(Fe)** a su mayor concentración (1.5 mM) presentó una inhibición total. Estas MOFs construidas con el mismo ligante orgánico pero diferente ion metálico (Cu y Fe) podrían tener un sistema de adsorción equivalente (encapsulación por poros).

La red metal orgánica **MIL-96(Al)** logró inhibir la formación de fibras amiloides sin sufrir alteraciones en su estructura ni en su cristalinidad, cuando menos de manera notable. De todos los materiales probados fue el de mejor desempeño, logrando una inhibición total en dos concentraciones relativamente bajas, de 397.63 y 39.76 μM , en comparación con las demás MOFs. Resultando en la mejor relación molar inhibitoria con la proteína (1:0.57) consiguiendo inhibición total. A diferencia de **HKUST-1(Cu)** y **MIL-100(Fe)**, cuyo mecanismo es por adsorción de poros, en la **MIL-96(Al)** se determinó que su efecto inhibitorio puede ocurrir a través de un mecanismo de adsorción superficial.

Al comparar las estructuras cristalinas de los materiales con su poder de inhibición, se observa que las MOFs que tiene como ligante DBC no inhiben.

Lo anterior puede deberse: i) al pequeño tamaño de poro que forman, independientemente del ion metálico que se utilice en la síntesis; o ii) a que tienen una baja densidad de grupos funcionales superficiales, incluyendo -OH, sitios cus metálicos y anillos aromáticos, y por lo tanto carecerían de sitios de interacción suficientes para unirse fuertemente con la proteína. Se descartó en esta tendencia a **MIL-53(Fe)** debido a que perdió su estructura y porosidad volviéndose amorfa.

Todas las MOFs con ligante BTC presentaron inhibición, con excepción de **NICS-6(Mg)** que perdió su estructura tridimensional y cristalinidad, las demás MOFs pudieron afectar el proceso de formación de fibras amiloides, independientemente del ion metálico coordinado. El tamaño de poro para las MOFs con ligante BTC influyó en el nivel de inhibición pero al parecer lo más importante es el mecanismo de adsorción determinado por la cantidades y diversidad de interacciones químicas que pueden generarse entre la MOF y la proteína.

En este estudio se comprobó que las MOFs son candidatos a ser inhibidores "reales", con estabilidad en ambientes fisiológicos y potencial aplicación para tratar enfermedades asociadas al estado amiloide.

APÉNDICE A

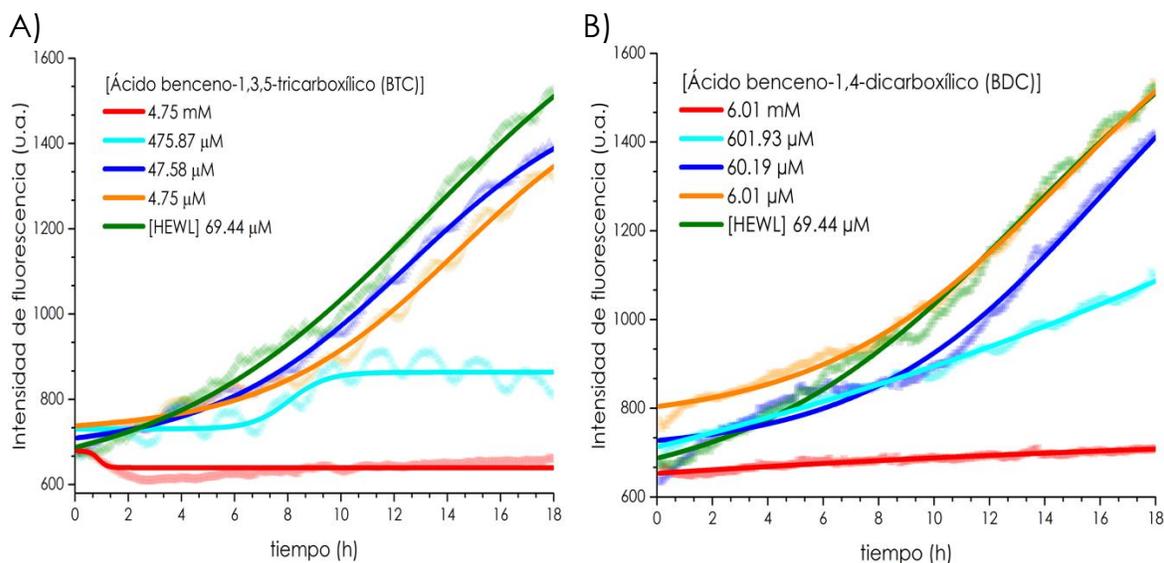


Figura A1. Cinéticas de inhibición de fibras amiloides utilizando ácido benceno-1,3,5-tricarboxílico (BTC) (**panel A**) y ácido benceno-1,4-dicarboxílico (BDC) (**panel B**), las concentraciones empleadas fueron: 1, 0.1, 0.01, 0.001 mg·mL⁻¹. Se observa inhibición para los dos compuestos a las mismas concentraciones de 1 y 0.1 mg·mL⁻¹.

Los dos compuestos (BTC y BDC) no presentaron fluorescencia intrínseca a una longitud de onda de 335 nm o de 490 nm (datos no mostrados), y mantuvieron el mismo patrón de inhibición en presencia y ausencia de ThT (datos no mostrados).

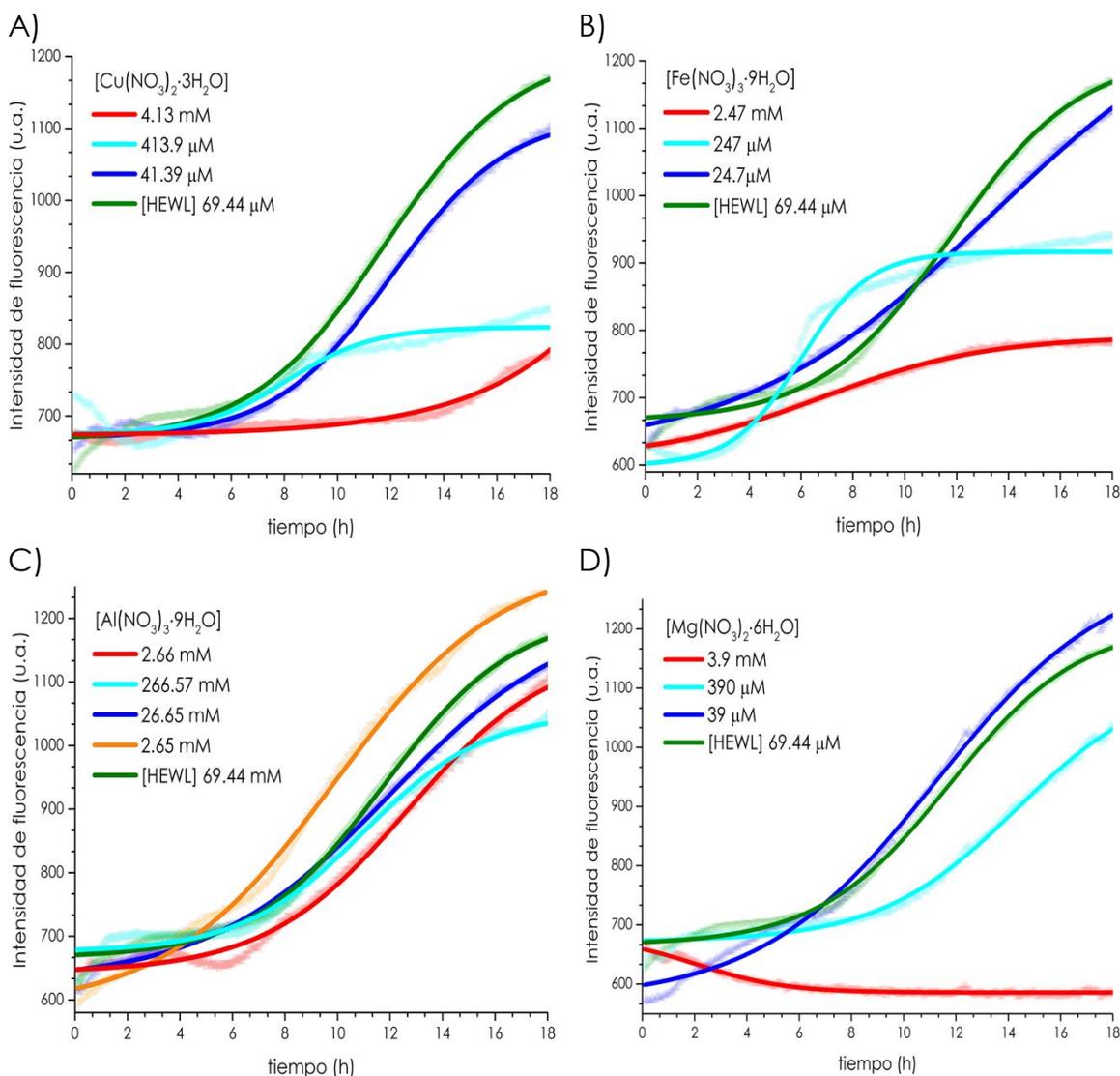


Figura A2. Cinéticas de inhibición de fibras amiloides por las sales metálicas: $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ (**panel A**), $[\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}]$ (**panel B**), $[\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}]$ (**panel C**) y $[\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ (**panel D**). Las concentraciones para todos los metales fueron: 1, 0.1, 0.01, 0.001 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Cobre, Hierro y Magnesio solamente presentan una inhibición significativa a concentraciones de 1 y 0.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Para Cobre, Hierro y Magnesio la concentración 0.001 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ no mostró efecto inhibitorio (datos no mostrados).

En la cinética de inhibición utilizando aluminio (**figura A2, panel C**) no se observó inhibición relevante. Ninguno de los metales presentó fluorescencia intrínseca a la longitud de onda de 335 nm o de 490 nm (datos no mostrados). En presencia y ausencia de ThT el comportamiento inhibitorio es constante (datos no mostrados).

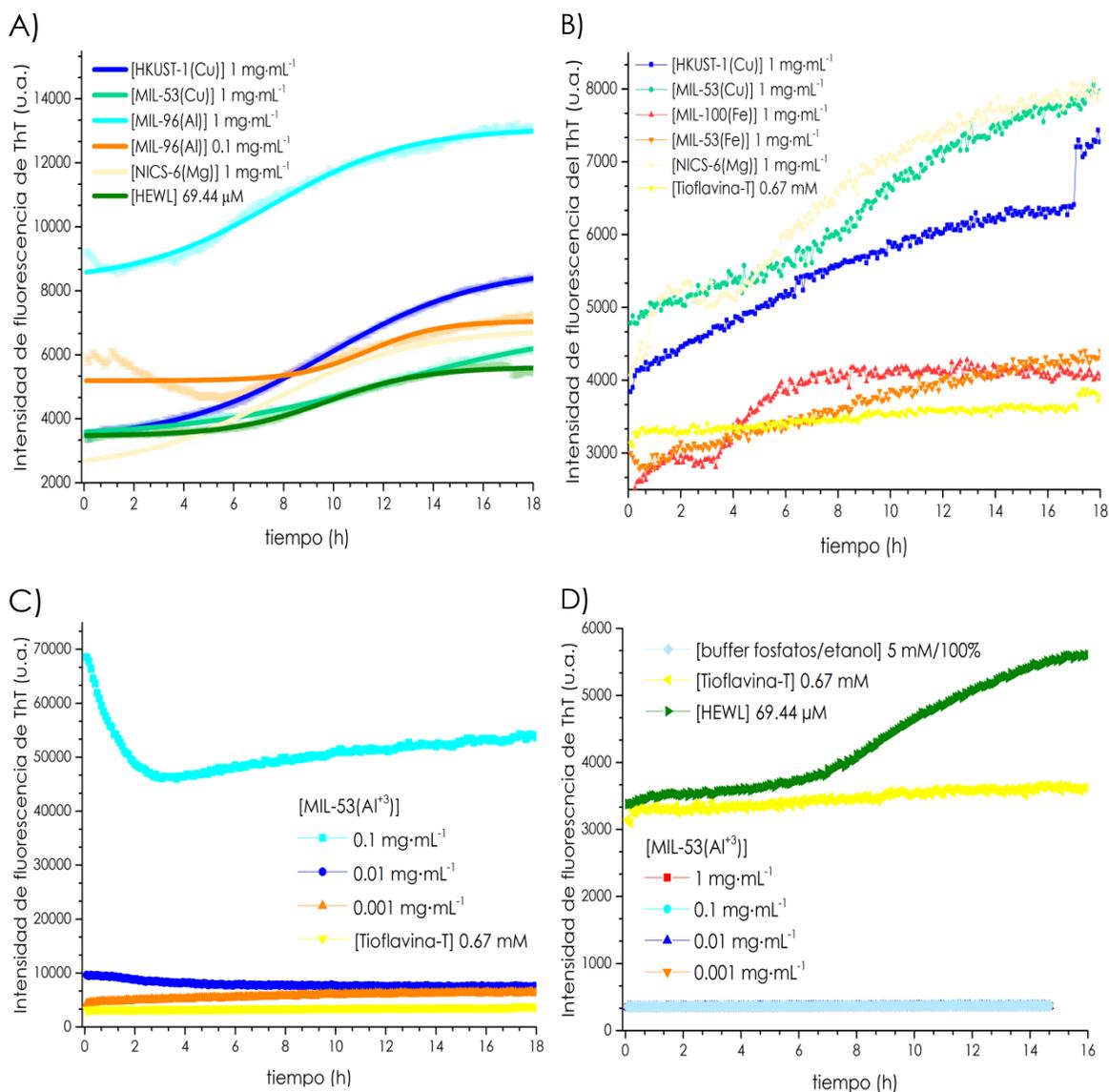


Figura A3. Interacción de las MOF con ThT en diferentes condiciones. Cinéticas de inhibición de fibras amiloides donde se observa un aumento de la fluorescencia a la concentración más alta de MOF (**panel A**). Redes metal orgánicas que presentaron aumento de fluorescencia en presencia de ThT, a una concentración de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, sin llegar a la saturación del equipo pero por arriba del control negativo del ThT. **MIL-53(Fe)** y **MIL-100(Fe)** no presentan aumento de fluorescencia en presencia del ThT, las variaciones observadas pueden atribuirse a que los controles negativos no se realizaron por triplicado y a la evaporación del ThT (**panel B**). Aumentos de fluorescencia de la MOF **MIL-53(Al)** en presencia de ThT, en todas las concentraciones sobrepasó la fluorescencia del control negativo del ThT y a $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ llegó a la saturación de 100,000 unidades arbitrarias (**panel C**). **MIL-53(Al)** no presentó fluorescencia intrínseca a la longitud de onda de 490 nm en ninguna concentración, al igual que todos las demás MOFs utilizadas en este trabajo (datos no mostrados). La fluorescencia es constante durante las 18 h e igual a la registrada para la mezcla [buffer de fosfatos/EtOH], condiciones de formación de fibras amiloides (**panel D**).

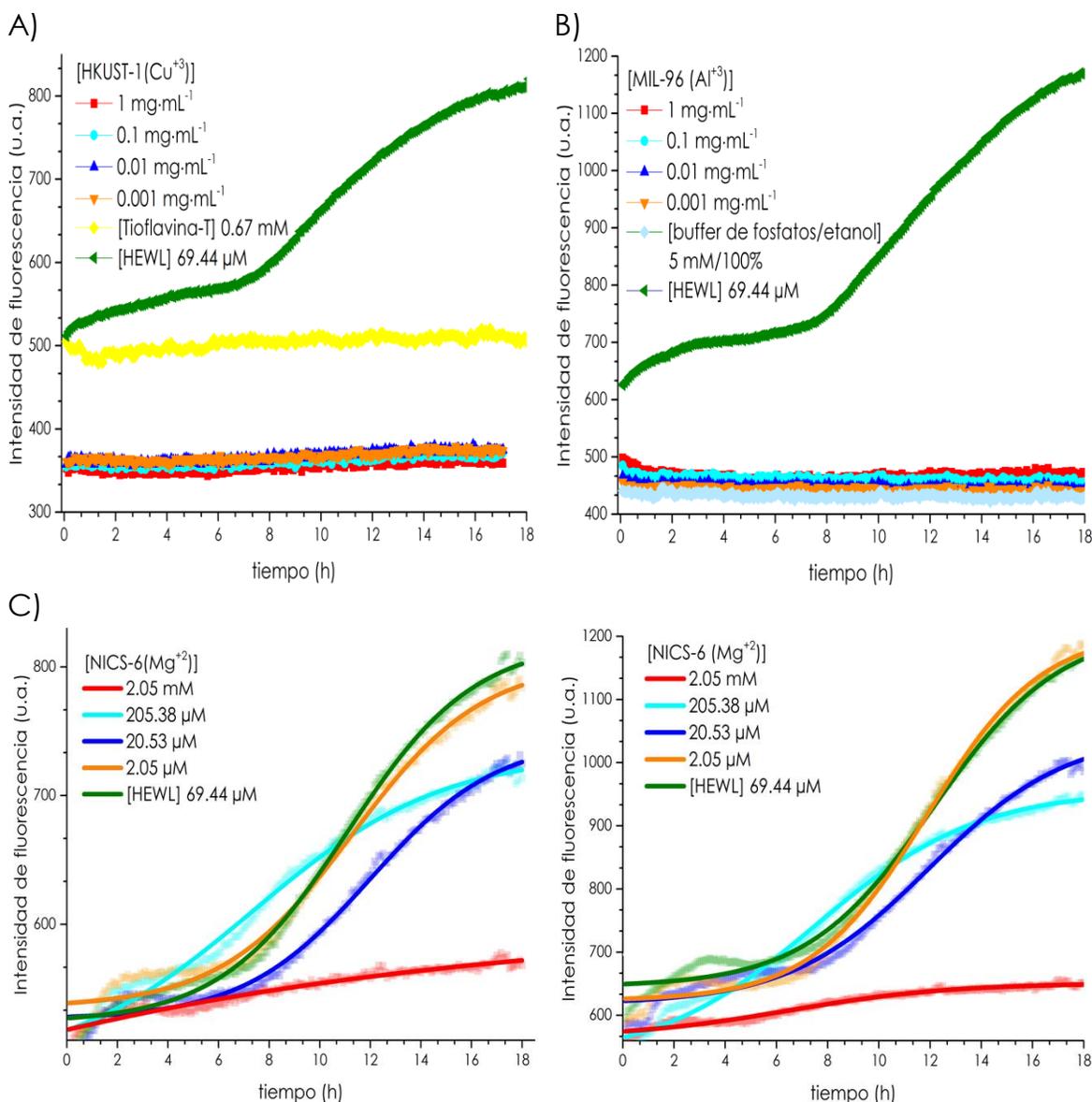


Figura A4. Controles negativos de la **HKUST-1(Cu)** en presencia de ThT midiendo la fluorescencia a 335 nm, no se observó ningún incremento de fluorescencia por parte de **HKUST-1(Cu)** a ninguna concentración, los demás materiales se comportaron de forma similar (datos no mostrados) (**panel A**). Controles negativos de la **MIL-96(Al)** en ausencia de ThT midiendo la fluorescencia a 335 nm, tampoco se observa incremento de fluorescencia intrínseca por parte de los otros materiales a ninguna concentración (datos no mostrados) (**panel B**). Cinéticas de formación de fibras amiloides en presencia de diferentes concentraciones de **NICS-6(Mg)**, con detección por la molécula de ThT (izquierda), y detección por fluorescencia intrínseca en ausencia de ThT (derecha), el patrón de inhibición se conserva para los dos tipos de detección (**panel C**).

Los valores de pH para cada MOF después de pasar 18 h en [buffer de fosfatos/etanol] 1.55 mM/2.12 mM (65 %) se muestran en la **tabla 1**.

Tabla 1. Valores de pH después del tratamiento para la prueba de estabilidad.	
Red metal orgánica	pH
HKUST-1 (Cu)	7.13
MIL-53 (Cu)	7.21
MIL-100 (Fe)	4.63
MIL-53 (Fe)	4.94
MIL-96 (Al)	7.35
MIL-53 (Al)	7.32
NICS-6 (Mg)	7.24

APÉNDICE B

Para determinar los parámetros t_{lag} y $t_{1/2}$ de las cinéticas de formación de fibras amiloides se utilizó la ecuación de Boltzmann.

$$y = \frac{A1 - A2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A2$$

La ecuación se resolvió empleando el programa OriginPro 2016, donde se obtuvieron los siguientes datos:

Model	Boltzmann				
Equation	$y = A2 + (A1-A2)/(1 + \exp((x-x_0)/dx))$				
Plot	G	H	I	J	K
A1	576.81629	634.98966	615.95313	637.36165	630.36165
A2	824.38286	978.68835	1116.80386	1196.16484	1189.16484
x0	5.755 ± 0.0	8.30055 ±	9.71262 ± 0	9.59758 ± 0	9.59758 ± 0
dx	3.1117 ± 0.	2.00773 ±	2.01715 ± 0	1.66292 ± 0	1.66292 ± 0
Reduced	10.08084	30.69524	139.48998	131.59165	131.59165
R-Square	0.9979	0.9981	0.99588	0.99726	0.99726
Adj. R-Sq	0.99787	0.99807	0.99582	0.99722	0.99722

Donde:

A1: valor inicial-fluorescencia basal

A2: valor final-fluorescencia final o total

x_0 : punto de inflexión de la función sigmoide, donde la pendiente de la función exponencial es 0. Se tomó como el valor $t_{1/2}$ debido a que representa el 50 % de la sigmoidea.

dx : derivada de la fluorescencia con respecto al tiempo, el factor de cambio de la fluorescencia a través del tiempo (pendiente de la función exponencial). Se tomó como el valor t_{lag} dado que es el tiempo donde empieza la función exponencial.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Berg, J. (2019). *Biochemistry*. New York: Macmillan International Higher Education.
- [2] T. P. J. Knowles, M. Vendruscolo, y C. M. Dobson, "The amyloid state and its association with protein misfolding diseases", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, núm. 6, pp. 384–396, jun. 2014, doi: 10.1038/nrm3810.
- [3] F. Chiti y C. M. Dobson, "Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease", *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 75, núm. 1, pp. 333–366, jun. 2006, doi: 10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901.
- [4] J. D. Sipe *et al.*, "Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines", *Amyloid*, vol. 23, núm. 4, pp. 209–213, oct. 2016, doi: 10.1080/13506129.2016.1257986.
- [5] M. Sunde, L. C. Serpell, M. Bartlam, P. E. Fraser, M. B. Pepys, y C. C. F. Blake, "Common Core Structure of Amyloid Fibrils by Synchrotron X-ray Diffraction", p. 11.
- [6] D. Eisenberg y M. Jucker, "The Amyloid State of Proteins in Human Diseases", *Cell*, vol. 148, núm. 6, pp. 1188–1203, mar. 2012, doi: 10.1016/j.cell.2012.02.022.
- [7] R. N. Rambaran y L. C. Serpell, "Amyloid fibrils: Abnormal protein assembly", *Prion*, vol. 2, núm. 3, pp. 112–117, jul. 2008, doi: 10.4161/pri.2.3.7488.
- [8] R. Riek, "The Three-Dimensional Structures of Amyloids", *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 9, núm. 2, p. a023572, feb. 2017, doi: 10.1101/cshperspect.a023572.
- [9] E. Gazit, "A possible role for π -stacking in the self-assembly of amyloid fibrils", *FASEB J.*, p. 7.
- [10] Y. Porat, A. Abramowitz, y E. Gazit, "Inhibition of Amyloid Fibril Formation by Polyphenols: Structural Similarity and Aromatic Interactions as a Common Inhibition Mechanism", *Chem. Biol. Htmlent Glyphamp Asciiamp Drug Des.*, vol. 67, núm. 1, pp. 27–37, ene. 2006, doi: 10.1111/j.1747-0285.2005.00318.x.
- [11] F. Chiti *et al.*, "Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 96, núm. 7, pp. 3590–3594, mar. 1999, doi: 10.1073/pnas.96.7.3590.

- [12] A. Cao, "Formation of amyloid fibrils from fully reduced hen egg white lysozyme", *Protein Sci.*, vol. 13, núm. 2, pp. 319–324, feb. 2004, doi: 10.1110/ps.03183404.
- [13] Xi, W., & Wei, G. (2016). Amyloid- β peptide aggregation and the influence of carbon nanoparticles. *Chinese Physics B*, 25(1), 018704. doi: 10.1088/1674-1056/25/1/018704
- [14] T. K. Karamanos, A. P. Kalverda, G. S. Thompson, y S. E. Radford, "Mechanisms of amyloid formation revealed by solution NMR", *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, vol. 88–89, pp. 86–104, ago. 2015, doi: 10.1016/j.pnmrs.2015.05.002.
- [15] Kumar, S., & Walter, J. (2011). Phosphorylation of amyloid beta (A β) peptides – A trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease. *Aging*, 3(8), 803-812. doi: 10.18632/aging.100362
- [16] P. Arosio, T. P. J. Knowles, y S. Linse, "On the lag phase in amyloid fibril formation", *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 17, núm. 12, pp. 7606–7618, 2015, doi: 10.1039/C4CP05563B.
- [17] T. Eichner y S. E. Radford, "A Diversity of Assembly Mechanisms of a Generic Amyloid Fold", *Mol. Cell*, vol. 43, núm. 1, pp. 8–18, jul. 2011, doi: 10.1016/j.molcel.2011.05.012.
- [18] R. Swaminathan, V. K. Ravi, S. Kumar, M. V. S. Kumar, y N. Chandra, "Lysozyme", en *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, vol. 84, Elsevier, 2011, pp. 63–111.
- [19] E. Frare, P. Polverino de Laureto, J. Zurdo, C. M. Dobson, y A. Fontana, "A Highly Amyloidogenic Region of Hen Lysozyme", *J. Mol. Biol.*, vol. 340, núm. 5, pp. 1153–1165, jul. 2004, doi: 10.1016/j.jmb.2004.05.056.
- [20] Khurana, R., Coleman, C., Ionescu-Zanetti, C., Carter, S., Krishna, V., & Grover, R. et al. (2005). Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *Journal Of Structural Biology*, 151(3), 229-238. doi: 10.1016/j.jsb.2005.06.006
- [21] M. Biancalana y S. Koide, "Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils", *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics*, vol. 1804, núm. 7, pp. 1405–1412, jul. 2010, doi: 10.1016/j.bbapap.2010.04.001.
- [22] C. Xue, T. Y. Lin, D. Chang, y Z. Guo, "Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation", *R. Soc. Open Sci.*, vol. 4, núm. 1, p. 160696, ene. 2017, doi: 10.1098/rsos.160696.
- [23] S. A. Hudson, H. Ecroyd, T. W. Kee, y J. A. Carver, "The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the

- presence of exogenous compounds: Exogenous compounds can bias thioflavin T assays", *FEBS J.*, vol. 276, núm. 20, pp. 5960–5972, oct. 2009, doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07307.x.
- [24] D. Pinotsi, A. K. Buell, C. M. Dobson, G. S. Kaminski Schierle, y C. F. Kaminski, "A Label-Free, Quantitative Assay of Amyloid Fibril Growth Based on Intrinsic Fluorescence", *ChemBioChem*, vol. 14, núm. 7, pp. 846–850, may 2013, doi: 10.1002/cbic.201300103.
- [25] L. L. del Mercato *et al.*, "Charge transport and intrinsic fluorescence in amyloid-like fibrils", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, núm. 46, pp. 18019–18024, nov. 2007, doi: 10.1073/pnas.0702843104.
- [26] P. Guptasarma, "Solution-state characteristics of the ultraviolet A-induced visible fluorescence from proteins", *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 478, núm. 2, pp. 127–129, oct. 2008, doi: 10.1016/j.abb.2008.08.002.
- [27] F. T. S. Chan, G. S. Kaminski Schierle, J. R. Kumita, C. W. Bertocini, C. M. Dobson, y C. F. Kaminski, "Protein amyloids develop an intrinsic fluorescence signature during aggregation", *The Analyst*, vol. 138, núm. 7, p. 2156, 2013, doi: 10.1039/c3an36798c.
- [28] V. V. Butova, M. A. Soldatov, A. A. Guda, K. A. Lomachenko, y C. Lamberti, "Metal-organic frameworks: structure, properties, methods of synthesis and characterization", *Russ. Chem. Rev.*, vol. 85, núm. 3, pp. 280–307, mar. 2016, doi: 10.1070/RCR4554.
- [29] Kim, H., Yun, W., Kim, M., Kim, J., Bae, Y., Lee, J., & Jeong, N. (2015). A Chemical Route to Activation of Open Metal Sites in the Copper-Based Metal–Organic Framework Materials HKUST-1 and Cu-MOF-2. *Journal Of The American Chemical Society*, 137(31), 10009-10015. doi: 10.1021/jacs.5b06637
- [30] A. J. Howarth *et al.*, "Chemical, thermal and mechanical stabilities of metal–organic frameworks", *Nat. Rev. Mater.*, vol. 1, núm. 3, mar. 2016, doi: 10.1038/natrevmats.2015.18.
- [31] C. Wang, X. Liu, N. Keser Demir, J. P. Chen, y K. Li, "Applications of water stable metal–organic frameworks", *Chem. Soc. Rev.*, vol. 45, núm. 18, pp. 5107–5134, 2016, doi: 10.1039/C6CS00362A.
- [32] P. L. Llewellyn *et al.*, "Complex Adsorption of Short Linear Alkanes in the Flexible Metal-Organic-Framework MIL-53(Fe)", *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, núm. 36, pp. 13002–13008, sep. 2009, doi: 10.1021/ja902740r.
- [33] J. Canivet, A. Fateeva, Y. Guo, B. Coasne, y D. Farrusseng, "Water adsorption in MOFs: fundamentals and applications", *Chem Soc Rev*, vol. 43, núm. 16, pp. 5594–5617, 2014, doi: 10.1039/C4CS00078A.

- [34] S. Yuan *et al.*, "Stable Metal-Organic Frameworks: Design, Synthesis, and Applications", *Adv. Mater.*, vol. 30, núm. 37, p. 1704303, sep. 2018, doi: 10.1002/adma.201704303.
- [35] X. Lian *et al.*, "Enzyme–MOF (metal–organic framework) composites", *Chem. Soc. Rev.*, vol. 46, núm. 11, pp. 3386–3401, 2017, doi: 10.1039/C7CS00058H.
- [36] P. M. Martins, "True and apparent inhibition of amyloid fibril formation", *Prion*, vol. 7, núm. 2, pp. 136–139, mar. 2013, doi: 10.4161/pri.23111.
- [37] A. C. McKinlay *et al.*, "BioMOFs: Metal-Organic Frameworks for Biological and Medical Applications", *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 49, núm. 36, pp. 6260–6266, ago. 2010, doi: 10.1002/anie.201000048.
- [38] J. Wang *et al.*, "Fe-MIL-101 exhibits selective cytotoxicity and inhibition of angiogenesis in ovarian cancer cells via downregulation of MMP", *Sci. Rep.*, vol. 6, núm. 1, may 2016, doi: 10.1038/srep26126.
- [39] S. Loera-Serna *et al.*, "Electrochemical behavior of [Cu₃(BTC)₂] metal–organic framework: The effect of the method of synthesis", *J. Alloys Compd.*, vol. 540, pp. 113–120, nov. 2012, doi: 10.1016/j.jallcom.2012.06.030.
- [40] C. G. Carson *et al.*, "Synthesis and Structure Characterization of Copper Terephthalate Metal-Organic Frameworks", *Eur. J. Inorg. Chem.*, vol. 2009, núm. 16, pp. 2338–2343, jun. 2009, doi: 10.1002/ejic.200801224.
- [41] A. García Márquez *et al.*, "Green Microwave Synthesis of MIL-100(Al, Cr, Fe) Nanoparticles for Thin-Film Elaboration", *Eur. J. Inorg. Chem.*, vol. 2012, núm. 32, pp. 5165–5174, nov. 2012, doi: 10.1002/ejic.201200710.
- [42] J. Gordon, H. Kazemian, y S. Rohani, "Rapid and efficient crystallization of MIL-53(Fe) by ultrasound and microwave irradiation", *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 162, pp. 36–43, nov. 2012, doi: 10.1016/j.micromeso.2012.06.009.
- [43] Lin, Y., Kong, C., & Chen, L. (2013). Facile Synthesis of Aluminum-Based Metal-Organic Frameworks with Different Morphologies and Structures through an OH–-Assisted Method. *Chemistry - An Asian Journal*, 8(8), 1873-1878. doi: 10.1002/asia.201300135
- [44] J. Yan, S. Jiang, S. Ji, D. Shi, y H. Cheng, "Metal-organic framework MIL-53(Al): synthesis, catalytic performance for the Friedel-Crafts acylation, and reaction mechanism", *Sci. China Chem.*, vol. 58, núm. 10, pp. 1544–1552, oct. 2015, doi: 10.1007/s11426-015-5359-0.
- [45] M. Sánchez-Sánchez, N. Getachew, K. Díaz, M. Díaz-García, Y. Chebude, y I. Díaz, "Synthesis of metal–organic frameworks in water at

- room temperature: salts as linker sources", *Green Chem.*, vol. 17, núm. 3, pp. 1500–1509, 2015, doi: 10.1039/C4GC01861C.
- [46] P. Rallapalli, D. Patil, K. P. Prasanth, R. S. Somani, R. V. Jasra, y H. C. Bajaj, "An alternative activation method for the enhancement of methane storage capacity of nanoporous aluminium terephthalate, MIL-53(Al)", *J. Porous Mater.*, vol. 17, núm. 5, pp. 523–528, oct. 2010, doi: 10.1007/s10934-009-9320-5.
- [47] M. Mazaj, T. Birsa Čelič, G. Mali, M. Rangus, V. Kaučič, y N. Zabukovec Logar, "Control of the Crystallization Process and Structure Dimensionality of Mg–Benzene–1,3,5-Tricarboxylates by Tuning Solvent Composition", *Cryst. Growth Des.*, vol. 13, núm. 8, pp. 3825–3834, ago. 2013, doi: 10.1021/cg400929z.
- [48] C. Janiak y J. K. Vieth, "MOFs, MILs and more: concepts, properties and applications for porous coordination networks (PCNs)", *New J. Chem.*, vol. 34, núm. 11, p. 2366, 2010, doi: 10.1039/c0nj00275e.
- [49] C. H. Hendon y A. Walsh, "Chemical principles underpinning the performance of the metal–organic framework HKUST-1", *Chem. Sci.*, vol. 6, núm. 7, pp. 3674–3683, 2015, doi: 10.1039/C5SC01489A.
- [50] K.-S. Lin, A. K. Adhikari, C.-N. Ku, C.-L. Chiang, y H. Kuo, "Synthesis and characterization of porous HKUST-1 metal organic frameworks for hydrogen storage", *Int. J. Hydrog. Energy*, vol. 37, núm. 18, pp. 13865–13871, sep. 2012, doi: 10.1016/j.ijhydene.2012.04.105.
- [51] N. Al-Janabi *et al.*, "Mapping the Cu-BTC metal–organic framework (HKUST-1) stability envelope in the presence of water vapour for CO₂ adsorption from flue gases", *Chem. Eng. J.*, vol. 281, pp. 669–677, dic. 2015, doi: 10.1016/j.cej.2015.07.020.
- [52] Y. Cao, Z. Wu, T. Wang, Y. Xiao, Q. Huo, y Y. Liu, "Immobilization of bacillus subtilis lipase on a Cu-BTC based hierarchically porous metal-organic framework material: biocatalyst for esterification", p. 8.
- [53] E. Biemmi, S. Christian, N. Stock, y T. Bein, "High-throughput screening of synthesis parameters in the formation of the metal-organic frameworks MOF-5 and HKUST-1", *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 117, núm. 1–2, pp. 111–117, ene. 2009, doi: 10.1016/j.micromeso.2008.06.040.
- [54] S. L. Campello, G. Gentil, S. A. Júnior, y W. M. de Azevedo, "Laser ablation: A new technique for the preparation of metal-organic frameworks Cu₃(BTC)₂(H₂O)₃", *Mater. Lett.*, vol. 148, pp. 200–203, jun. 2015, doi: 10.1016/j.matlet.2015.01.159.

- [55] K.-Y. Andrew Lin y Y.-T. Hsieh, "Copper-based metal organic framework (MOF), HKUST-1, as an efficient adsorbent to remove p-nitrophenol from water", *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, vol. 50, pp. 223–228, may 2015, doi: 10.1016/j.jtice.2014.12.008.
- [56] W. W. Lestari, M. Adreane, C. Purnawan, H. Fansuri, N. Widiastuti, y S. B. Rahardjo, "Solvothermal and electrochemical synthetic method of HKUST-1 and its methane storage capacity", *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, vol. 107, p. 012030, feb. 2016, doi: 10.1088/1757-899X/107/1/012030.
- [57] S. Aksu, "Electrochemical Equilibria of Copper in Aqueous Phosphoric Acid Solutions", *J. Electrochem. Soc.*, vol. 156, núm. 11, p. C387, 2009, doi: 10.1149/1.3215996.
- [58] G. Majano, O. Martin, M. Hammes, S. Smeets, C. Baerlocher, y J. Pérez-Ramírez, "Solvent-Mediated Reconstruction of the Metal-Organic Framework HKUST-1 ($\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$)", *Adv. Funct. Mater.*, vol. 24, núm. 25, pp. 3855–3865, jul. 2014, doi: 10.1002/adfm.201303678.
- [59] J. R. Álvarez *et al.*, "Structure stability of HKUST-1 towards water and ethanol and their effect on its CO_2 capture properties", *Dalton Trans.*, vol. 46, núm. 28, pp. 9192–9200, 2017, doi: 10.1039/C7DT01845B.
- [60] H. Alamgholiloo *et al.*, "Stepwise post-modification immobilization of palladium Schiff-base complex on to the OMS-Cu (BDC) metal-organic framework for Mizoroki-Heck cross-coupling reaction: Postsynthetic modification (PSM) of OMS-Cu(BDC) for Heck reaction", *Appl. Organomet. Chem.*, vol. 32, núm. 11, p. e4539, nov. 2018, doi: 10.1002/aoc.4539.
- [61] G. A. Bhat, R. Maqbool, A. A. Dar, M. Ul Hussain, y R. Murugavel, "Selective formation of discrete versus polymeric copper organophosphates: DNA cleavage and cytotoxic activity", *Dalton Trans.*, vol. 46, núm. 39, pp. 13409–13420, 2017, doi: 10.1039/C7DT02763J.
- [62] M. Anbia y S. Sheykhi, "Preparation of multi-walled carbon nanotube incorporated MIL-53-Cu composite metal-organic framework with enhanced methane sorption", *J. Ind. Eng. Chem.*, vol. 19, núm. 5, pp. 1583–1586, sep. 2013, doi: 10.1016/j.jiec.2013.01.026.
- [63] M. Anbia y S. Sheykhi, "Synthesis of nanoporous copper terephthalate [MIL-53(Cu)] as a novel methane-storage adsorbent", *J. Nat. Gas Chem.*, vol. 21, núm. 6, pp. 680–684, nov. 2012, doi: 10.1016/S1003-9953(11)60419-2.
- [64] R. S. Salama, S. A. El-Hakam, S. E. Samra, y S. M. El-Dafrawy, "Adsorption, Equilibrium and Kinetic Studies on the Removal of Methyl Orange Dye

- from Aqueous Solution by Using of Copper Metal Organic Framework (Cu-BDC)", p. 14, 2018.
- [65] A. B. Elmas Kimyonok y M. Ulutürk, "Determination of the Thermal Decomposition Products of Terephthalic Acid by Using Curie-Point Pyrolyzer", *J. Energ. Mater.*, vol. 34, núm. 2, pp. 113–122, abr. 2016, doi: 10.1080/07370652.2015.1005773.
- [66] N. E. Tari, A. Tadjarodi, J. Tamnanloo, y S. Fatemi, "Synthesis and property modification of MCM-41 composited with Cu(BDC) MOF for improvement of CO₂ adsorption Selectivity", *J. CO₂ Util.*, vol. 14, pp. 126–134, jun. 2016, doi: 10.1016/j.jcou.2016.04.008.
- [67] V. Agostoni *et al.*, "Towards an Improved anti-HIV Activity of NRTI via Metal-Organic Frameworks Nanoparticles", *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 2, núm. 12, pp. 1630–1637, dic. 2013, doi: 10.1002/adhm.201200454.
- [68] J. Shi *et al.*, "Synthesis of MIL-100(Fe) at Low Temperature and Atmospheric Pressure", *J. Chem.*, vol. 2013, pp. 1–4, 2013, doi: 10.1155/2013/792827.
- [69] K. Guesh, C. A. D. Caiuby, Á. Mayoral, M. Díaz-García, I. Díaz, y M. Sanchez-Sanchez, "Sustainable Preparation of MIL-100(Fe) and Its Photocatalytic Behavior in the Degradation of Methyl Orange in Water", *Cryst. Growth Des.*, vol. 17, núm. 4, pp. 1806–1813, abr. 2017, doi: 10.1021/acs.cgd.6b01776.
- [70] P. Horcajada *et al.*, "Synthesis and catalytic properties of MIL-100(Fe), an iron(III) carboxylate with large pores", *Chem Commun*, núm. 27, pp. 2820–2822, 2007, doi: 10.1039/B704325B.
- [71] S. Yong *et al.*, "Synthesis and characterization of Cu⁺ / MIL-100(Fe) with enhanced catalytic performance for NH₃-SCR", *Ferroelectrics*, vol. 522, núm. 1, pp. 20–28, ene. 2018, doi: 10.1080/00150193.2017.1391602.
- [72] S. E. Moradi, S. Dadfarnia, A. M. Haji Shabani, y S. Emami, "Removal of congo red from aqueous solution by its sorption onto the metal organic framework MIL-100(Fe): equilibrium, kinetic and thermodynamic studies", *Desalination Water Treat.*, vol. 56, núm. 3, pp. 709–721, oct. 2015, doi: 10.1080/19443994.2014.947328.
- [73] H. Lv, H. Zhao, T. Cao, L. Qian, Y. Wang, y G. Zhao, "Efficient degradation of high concentration azo-dye wastewater by heterogeneous Fenton process with iron-based metal-organic framework", *J. Mol. Catal. Chem.*, vol. 400, pp. 81–89, may 2015, doi: 10.1016/j.molcata.2015.02.007.
- [74] W. W. Lestari, J. Hartono, M. Adreane, K. D. Nugrahaningtyas, C. Purnawan, y S. B. Rahardjo, "Electro-Synthetic Optimization of Host

- Material Based on MIL-100(Fe)", *Molekul*, vol. 11, núm. 1, p. 61, may 2016, doi: 10.20884/1.jm.2016.11.1.195.
- [75] X. Li *et al.*, "New insights into the degradation mechanism of metal-organic frameworks drug carriers", *Sci. Rep.*, vol. 7, núm. 1, dic. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-13323-1.
- [76] Y.-R. Chen, K.-H. Liou, D.-Y. Kang, J.-J. Chen, y L.-C. Lin, "Investigation of the Water Adsorption Properties and Structural Stability of MIL-100(Fe) with Different Anions", *Langmuir*, vol. 34, núm. 14, pp. 4180–4187, abr. 2018, doi: 10.1021/acs.langmuir.7b04399.
- [77] AIST:Spectral Database for Organic Compounds,SDBS. (2020). Recuerdo 8 Octubre 2019, from https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi
- [78] S. Rojas *et al.*, "Toward Understanding Drug Incorporation and Delivery from Biocompatible Metal–Organic Frameworks in View of Cutaneous Administration", *ACS Omega*, vol. 3, núm. 3, pp. 2994–3003, mar. 2018, doi: 10.1021/acsomega.8b00185.
- [79] A. S. Munn, A. J. Ramirez-Cuesta, F. Millange, y R. I. Walton, "Interaction of methanol with the flexible metal-organic framework MIL-53(Fe) observed by inelastic neutron scattering", *Chem. Phys.*, vol. 427, pp. 30–37, dic. 2013, doi: 10.1016/j.chemphys.2013.05.017.
- [80] E. Yilmaz, E. Sert, y F. S. Atalay, "Synthesis, characterization of a metal organic framework: MIL-53 (Fe) and adsorption mechanisms of methyl red onto MIL-53 (Fe)", *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, vol. 65, pp. 323–330, ago. 2016, doi: 10.1016/j.jtice.2016.05.028.
- [81] M. Pu, Y. Ma, J. Wan, Y. Wang, J. Wang, y M. L. Brusseau, "Activation performance and mechanism of a novel heterogeneous persulfate catalyst: metal–organic framework MIL-53(Fe) with Fe^{II}/Fe^{III} mixed-valence coordinatively unsaturated iron center", *Catal. Sci. Technol.*, vol. 7, núm. 5, pp. 1129–1140, 2017, doi: 10.1039/C6CY02355J.
- [82] D. T. C. Nguyen *et al.*, "Metal-Organic Framework MIL-53(Fe) as an Adsorbent for Ibuprofen Drug Removal from Aqueous Solutions: Response Surface Modeling and Optimization", *J. Chem.*, vol. 2019, pp. 1–11, mar. 2019, doi: 10.1155/2019/5602957.
- [83] T. R. Whitfield, X. Wang, L. Liu, y A. J. Jacobson, "Metal-organic frameworks based on iron oxide octahedral chains connected by benzenedicarboxylate dianions", *Solid State Sci.*, vol. 7, núm. 9, pp. 1096–1103, sep. 2005, doi: 10.1016/j.solidstatesciences.2005.03.007.

- [84] I. Bezverkhy, G. Weber, y J.-P. Bellat, "Degradation of fluoride-free MIL-100(Fe) and MIL-53(Fe) in water: Effect of temperature and pH", *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 219, pp. 117–124, ene. 2016, doi: 10.1016/j.micromeso.2015.07.037.
- [85] George, P., Chaudhari, K., & Chowdhury, P. (2018). Influence of cation doping (Li+, Na+, K+) on photocatalytic activity of MIL-53(Fe). *Journal Of Materials Science*, 53(16), 11694-11714. doi: 10.1007/s10853-018-2443-9
- [86] R. Panda, S. Rahut, y J. K. Basu, "Preparation of a Fe₂O₃/MIL-53(Fe) composite by partial thermal decomposition of MIL-53(Fe) nanorods and their photocatalytic activity", *RSC Adv.*, vol. 6, núm. 84, pp. 80981–80985, 2016, doi: 10.1039/C6RA15792K.
- [87] Tuan. A. Vu *et al.*, "Arsenic removal from aqueous solutions by adsorption using novel MIL-53(Fe) as a highly efficient adsorbent", *RSC Adv.*, vol. 5, núm. 7, pp. 5261–5268, 2015, doi: 10.1039/C4RA12326C.
- [88] AIST:Spectral Database for Organic Compounds,SDBS. (2020). Recuperado 5 Noviembre 2019, from https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi
- [89] Loiseau, T., Lecroq, L., Volklinger, C., Marrot, J., Férey, G., & Haouas, M. et al. (2006). MIL-96, a Porous Aluminum Trimesate 3D Structure Constructed from a Hexagonal Network of 18-Membered Rings and μ_3 -Oxo-Centered Trinuclear Units. *Journal Of The American Chemical Society*, 128(31), 10223-10230. doi: 10.1021/ja0621086
- [90] Benoit, V., Chanut, N., Pillai, R., Benzaqui, M., Beurroies, I., & Devautour-Vinot, S. et al. (2018). A promising metal–organic framework (MOF), MIL-96(Al), for CO₂ separation under humid conditions. *Journal Of Materials Chemistry A*, 6(5), 2081-2090. doi: 10.1039/c7ta09696h
- [91] Zhang, N., Yang, X., Yu, X., Jia, Y., Wang, J., & Kong, L. et al. (2014). Al-1,3,5-benzenetricarboxylic metal–organic frameworks: A promising adsorbent for defluoridation of water with pH insensitivity and low aluminum residual. *Chemical Engineering Journal*, 252, 220-229. doi: 10.1016/j.cej.2014.04.090
- [92] D. Liu, Y. Liu, F. Dai, J. Zhao, K. Yang, y C. Liu, "Size- and morphology-controllable synthesis of MIL-96 (Al) by hydrolysis and coordination modulation of dual aluminium source and ligand", p. 9.
- [93] N. Zhang *et al.*, "Al-1,3,5-benzenetricarboxylic metal–organic frameworks: A promising adsorbent for defluoridation of water with pH insensitivity and low aluminum residual", *Chem. Eng. J.*, vol. 252, pp. 220–229, sep. 2014, doi: 10.1016/j.cej.2014.04.090.

- [94] M. Benzaqui *et al.*, "Revisiting the Aluminum Trimesate-Based MOF (MIL-96): From Structure Determination to the Processing of Mixed Matrix Membranes for CO₂ Capture", *Chem. Mater.*, vol. 29, núm. 24, pp. 10326–10338, dic. 2017, doi: 10.1021/acs.chemmater.7b03203.
- [95] X. Zuo *et al.*, "Bubble-template-assisted synthesis of hollow fullerene-like MoS₂ nanocages as a lithium ion battery anode material", *J. Mater. Chem. A*, vol. 4, núm. 1, pp. 51–58, 2016, doi: 10.1039/C5TA06869J.
- [96] D. Zhang y Q. Xu, "Solubility of 1,3,5-Benzenetricarboxylic Acid in Different Solvents", *J. Chem. Eng. Data*, vol. 61, núm. 2, pp. 1003–1006, feb. 2016, doi: 10.1021/acs.jced.5b00870.
- [97] T. Loiseau *et al.*, "A Rationale for the Large Breathing of the Porous Aluminum Terephthalate (MIL-53) Upon Hydration", *Chem. - Eur. J.*, vol. 10, núm. 6, pp. 1373–1382, mar. 2004, doi: 10.1002/chem.200305413.
- [98] X. Qian *et al.*, "Structure stability of metal-organic framework MIL-53 (Al) in aqueous solutions", *Int. J. Hydrog. Energy*, vol. 38, núm. 36, pp. 16710–16715, dic. 2013, doi: 10.1016/j.ijhydene.2013.07.054.
- [99] C.-X. Yang, H.-B. Ren, y X.-P. Yan, "Fluorescent Metal–Organic Framework MIL-53(Al) for Highly Selective and Sensitive Detection of Fe³⁺ in Aqueous Solution", *Anal. Chem.*, vol. 85, núm. 15, pp. 7441–7446, ago. 2013, doi: 10.1021/ac401387z.
- [100] M. Kandiban, P. Vigneshwaran, y I. V. Potheher, "Synthesis and Characterization of MGO Nanoparticles for Photocatalytic Applications", p. 5.
- [101] D. Farrusseng, S. Aguado, y C. Pinel, "Metal-Organic Frameworks: Opportunities for Catalysis", *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 48, núm. 41, pp. 7502–7513, sep. 2009, doi: 10.1002/anie.200806063.
- [102] Cerón Cardelas, R. (2016). *Inhibición de amiloides de lisozima* (Maestría). Universidad Autónoma Metropolitana.
- [103] A. Szymańska, T. Hornowski, y G. Ślósarek, "Denaturation and aggregation of lysozyme in water-ethanol solution.", *Acta Biochim. Pol.*, vol. 59, núm. 2, jun. 2012, doi: 10.18388/abp.2012_2158.
- [104] F. Ke *et al.*, "Thiol-functionalization of metal-organic framework by a facile coordination-based postsynthetic strategy and enhanced removal of Hg²⁺ from water", *J. Hazard. Mater.*, vol. 196, pp. 36–43, nov. 2011, doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.08.069.
- [105] D. J. Lindberg, A. Wenger, E. Sundin, E. Wesén, F. Westerlund, y E. K. Esbjörner, "Binding of Thioflavin-T to Amyloid Fibrils Leads to Fluorescence

- Self-Quenching and Fibril Compaction", *Biochemistry*, vol. 56, núm. 16, pp. 2170–2174, abr. 2017, doi: 10.1021/acs.biochem.7b00035.
- [106] X. Li, W. Guo, Z. Liu, R. Wang, y H. Liu, "Fe-based MOFs for efficient adsorption and degradation of acid orange 7 in aqueous solution via persulfate activation", *Appl. Surf. Sci.*, vol. 369, pp. 130–136, abr. 2016, doi: 10.1016/j.apsusc.2016.02.037.
- [107] J. Gordon, H. Kazemian, y S. Rohani, "MIL-53(Fe), MIL-101, and SBA-15 porous materials: Potential platforms for drug delivery", *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 47, pp. 172–179, feb. 2015, doi: 10.1016/j.msec.2014.11.046.
- [108] S. Taherzade, J. Soleimannejad, y A. Tarlani, "Application of Metal-Organic Framework Nano-MIL-100(Fe) for Sustainable Release of Doxycycline and Tetracycline", *Nanomaterials*, vol. 7, núm. 8, p. 215, ago. 2017, doi: 10.3390/nano7080215.
- [109] J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd ed. New York: Springer, 2006.
- [110] V. Lykourinou *et al.*, "Immobilization of MP-11 into a Mesoporous Metal–Organic Framework, MP-11@mesoMOF: A New Platform for Enzymatic Catalysis", *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, núm. 27, pp. 10382–10385, jul. 2011, doi: 10.1021/ja2038003.
- [111] S. Lin *et al.*, "Adsorption behavior of metal–organic frameworks for methylene blue from aqueous solution", *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 193, pp. 27–34, jul. 2014, doi: 10.1016/j.micromeso.2014.03.004.
- [112] A. Corma, H. García, y F. X. Llabrés i Xamena, "Engineering Metal Organic Frameworks for Heterogeneous Catalysis", *Chem. Rev.*, vol. 110, núm. 8, pp. 4606–4655, ago. 2010, doi: 10.1021/cr9003924.
- [113] P. Faller y C. Hureau, "A Bioinorganic View of Alzheimer's Disease: When Misplaced Metal Ions (Re)direct the Electrons to the Wrong Target", *Chem. - Eur. J.*, vol. 18, núm. 50, pp. 15910–15920, dic. 2012, doi: 10.1002/chem.201202697.
- [114] O. V. Bocharova, L. Breydo, V. V. Salnikov, y I. V. Baskakov, "Copper(II) Inhibits in Vitro Conversion of Prion Protein into Amyloid Fibrils †", *Biochemistry*, vol. 44, núm. 18, pp. 6776–6787, may 2005, doi: 10.1021/bi050251q.
- [115] J. H. Viles, "Metal ions and amyloid fiber formation in neurodegenerative diseases. Copper, zinc and iron in Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases", *Coord. Chem. Rev.*, vol. 256, núm. 19–20, pp. 2271–2284, oct. 2012, doi: 10.1016/j.ccr.2012.05.003.

- [116] Kawahara, M., Muramoto, K., Kobayashi, K., Mori, H., & Kuroda, Y. (1994). Aluminum Promotes the Aggregation of Alzheimer's Amyloid β -Protein in Vitro. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 198(2), 531-535. doi: 10.1006/bbrc.1994.1078
- [117] L. M. Simon, I. Laczkó, A. Demcsák, D. Tóth, M. Kotormán, y L. Fülöp, "The Formation of Amyloid-Like Fibrils of α -Chymotrypsin in Different Aqueous Organic Solvents", p. 7.
- [118] N. T. S. Phan, T. T. Nguyen, K. D. Nguyen, y A. X. T. Vo, "An open metal site metal-organic framework Cu(BDC) as a promising heterogeneous catalyst for the modified Friedländer reaction", *Appl. Catal. Gen.*, vol. 464-465, pp. 128-135, ago. 2013, doi: 10.1016/j.apcata.2013.05.034.
- [119] A. Loquet *et al.*, "3D structure determination of amyloid fibrils using solid-state NMR spectroscopy", *Methods*, vol. 138-139, pp. 26-38, abr. 2018, doi: 10.1016/j.ymeth.2018.03.014.
- [120] D. V. Patil, P. B. S. Rallapalli, G. P. Dangi, R. J. Tayade, R. S. Somani, y H. C. Bajaj, "MIL-53(Al): An Efficient Adsorbent for the Removal of Nitrobenzene from Aqueous Solutions", *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 50, núm. 18, pp. 10516-10524, sep. 2011, doi: 10.1021/ie200429f.
- [121] T. Akaishi *et al.*, "Structural requirements for the flavonoid fisetin in inhibiting fibril formation of amyloid β protein", *Neurosci. Lett.*, vol. 444, núm. 3, pp. 280-285, oct. 2008, doi: 10.1016/j.neulet.2008.08.052.