

Trabajo Fin de Grado

# **Evaluación de ensayos de citotoxicidad frente a Redes Metal-Orgánicas**

**Alumna:** Sandra Cerro Muñoz.

**Tutor:** Dr. Jacob Lorenzo Morales

**Cotutora:** Dr. Verónica Pino Estévez

CURSO 2018-2019



## **ABSTRACT**

Metal-organic frameworks (MOFs) are novel crystalline materials that are gaining a lot of attention in the environmental monitoring field. However, very little is known about the possible health or environmental risks that they may provoke. In the present study, six MOFs, specifically UiO-64, UiO-66, CIM-80, CIM-81, CIM-82 and CIM-84, were synthesized and characterized. Two of them, UiO-64 and UiO-66 are MOFs widely used; the other MOFs, with the abbreviations CIM (Canary Islands Materials), have been characterized in the University of La Laguna, and CIM-82 and CIM-84 are still in the phase of solving their crystalline structure. The cytotoxicity of these molecules was evaluated *in vitro* with murine macrophages J774.A1 cell line, using the alamarBlue<sup>®</sup> method to obtain the lethal concentration that reduces 50% of these cells (CC<sub>50</sub>). Furthermore, it was evaluated their cytotoxicity *in vivo* using amphipod (*Gammaropsis atlantica*). CIM-81 and CIM-82 were toxic in macrophages (CC<sub>50</sub> of  $0,98 \pm 0,08$  mg/mL and  $0,88 \pm 0,01$  mg/mL, respectively) and in amphipods (all the individuals were dead). Therefore, there is a strong correlation between their *in vivo* and *in vitro* toxicity results. Two MOFs (UiO-64 and UiO-66) were more toxic to amphipods than to macrophages. CIM-80 and CIM-84 were not toxic.

**Keywords:** MOFs, cytotoxicity, alamarBlue<sup>®</sup>, macrophages, amphipods, green chemistry.

## **RESUMEN**

Las redes metal-orgánicas (MOFs) son nuevos materiales cristalinos que están ganando mucha atención en el campo del monitoreo ambiental. Sin embargo, se sabe muy poco acerca de los posibles riesgos para la salud o el medio ambiente que pueden provocar. En el presente estudio, se sintetizaron y caracterizaron seis MOFs, específicamente UiO-64, UiO-66, CIM-80, CIM-81, CIM-82 y CIM-84. Dos de ellos, UiO-64 y UiO-66 son MOFs ampliamente utilizados; los otros MOFs, con las abreviaturas CIM (del inglés: *Canary Islands Materials*), se han caracterizado en la Universidad de La Laguna, y CIM-82 y CIM-84 aún se encuentran en la fase de resolución de su estructura cristalina. La citotoxicidad de estas moléculas se evaluó *in vitro* con la línea celular J774.A1 de macrófagos murinos, utilizando el método alamarBlue® para obtener la concentración letal que reduce el 50% de estas células (CC<sub>50</sub>). Además, se evaluó su citotoxicidad *in vivo* utilizando anfípodos (*Gammaropsis atlantica*). CIM-81 y CIM-82 fueron tóxicos en macrófagos (CC<sub>50</sub> de  $0,98 \pm 0,08$  mg/mL y  $0,88 \pm 0,01$  mg/mL, respectivamente) y en anfípodos (todos los individuos murieron). Por lo tanto, existe una fuerte correlación entre los resultados de toxicidad *in vivo* e *in vitro*. Dos MOFs (UiO-64 y UiO-66) fueron más tóxicos para los anfípodos que para los macrófagos. CIM-80 y CIM-84 no fueron tóxicos.

**Palabras clave:** MOFs, citotoxicidad, alamarBlue®, macrófagos, anfípodos, química verde.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1.Redes metal-orgánicas .....	1
1.2.Ensayos de citotoxicidad de MOFs .....	3
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	5
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
3.1.Reactivos y disoluciones .....	7
3.2.Materiales .....	7
3.3.Equipos e instrumentación .....	8
3.4.Procedimientos experimentales .....	8
3.4.1. <i>Síntesis de los MOFs</i> .....	8
3.4.1.1. <i>UiO-66</i> .....	10
3.4.1.2. <i>UiO-64</i> .....	10
3.4.1.3. <i>CIM-80</i> .....	11
3.4.1.4. <i>CIM-81</i> .....	11
3.4.1.5. <i>CIM-82</i> .....	11
3.4.1.6. <i>CIM-84</i> .....	12
3.4.2. <i>Ensayo de citotoxicidad de los MOFs</i> .....	14
3.4.2.1. <i>Ensayo con macrófagos</i> .....	14
3.4.2.2. <i>Ensayo con anfípodos</i> .....	14
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
4.1.Caracterización de los MOFs .....	17
4.2.Ensayo de citotoxicidad en macrófagos .....	18
4.3.Ensayo de citotoxicidad con anfípodos .....	21
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	23
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	25



## 1. INTRODUCCIÓN

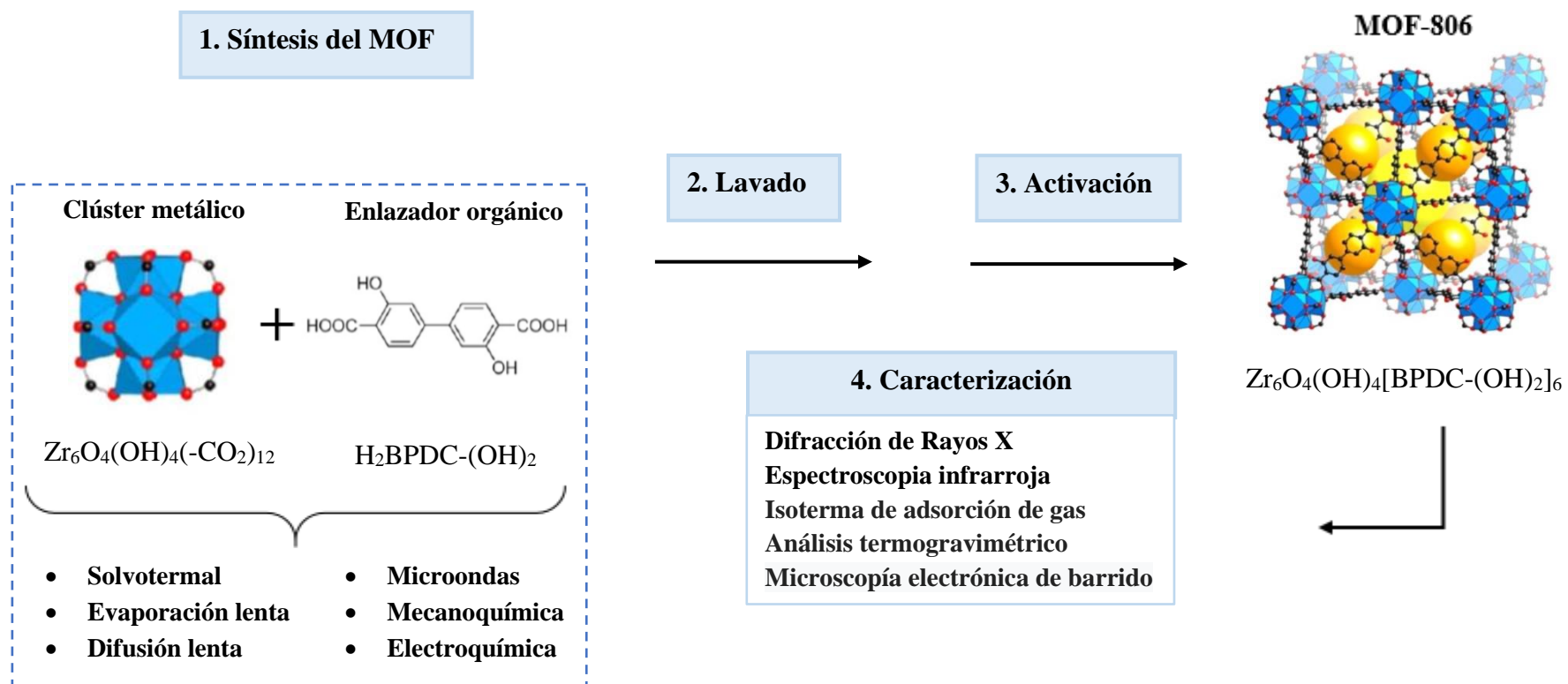
### 1.1. Redes metal-orgánicas (MOFs, del inglés *metal-organic frameworks*)

Las redes metal-orgánicas son estructuras cristalinas tridimensionales formadas por la unión de iones metálicos (o clústeres metálicos) y ligandos orgánicos mediante enlaces fuertes de coordinación para dar lugar a redes altamente ordenadas y porosas [1]. La posibilidad de variar la combinación de metales y ligandos ofrece un número ilimitado de estructuras posibles. De hecho, hay más de 20.000 MOFs caracterizados hasta la fecha [2].

Las características propias de estos materiales son: alta estabilidad térmica y mecánica, alta porosidad, elevada afinidad de absorción de gases, capacidad de ajuste estructural, así como el área superficial más alta conocida, permitiendo una amplia variedad de aplicaciones. Algunas de ellas son: almacenamiento de gases [3], catálisis [4], administración de fármacos [5] y como sensores [6]. Más recientemente, se proponen como materiales capaces de llevar a cabo la extracción de contaminantes del agua de manera respetuosa con el medio ambiente [7, 8], gracias a que se integran en estrategias miniaturizadas y de microextracción, minimizando así la cantidad necesaria de estos materiales en el análisis.

A pesar del enorme interés que tienen estos MOFs desde el punto de vista del análisis químico, son muchos aún los estudios necesarios para asegurar su implantación, entre ellos, la necesidad de asegurar una baja citotoxicidad, si realmente quieren incorporarse en la filosofía actual de la denominada Química Verde [9].

La síntesis más utilizada para producir MOFs es la solvotermal debido a su rapidez y versatilidad. Otros procedimientos usados para la preparación de estos materiales cristalinos son la síntesis por evaporación lenta, difusión lenta, microondas, electroquímica y mecanoquímica [10]. Una vez sintetizada, la red metal-orgánica debe activarse, para asegurar que el poro de la red quede libre de disolventes. Los MOFs se caracterizan mediante diferentes técnicas, tal y como se señala en la Figura 1.1.



**Figura 1.1.** Esquema general de la ruta sintética y caracterización de un MOF, usando MOF-806 como ejemplo. Fuente: adaptado de la referencia [11].



## 1.2. Ensayo de citotoxicidad de MOFs

Actualmente, son pocos los estudios llevados a cabo para evaluar la citotoxicidad de las redes metal-orgánicas y, la mayoría de estos se realizan *in vitro* para comparar la toxicidad de MOF con aplicaciones biomédicas. Los ensayos de viabilidad celular *in vitro* más utilizados en estos materiales son: MTT [12], alamarBlue<sup>®</sup> [13] y CCK-8 [14].

El alamarBlue<sup>®</sup> es un reactivo de viabilidad celular formado por resazurina, un compuesto azul no fluorescente. Cuando penetra en células viables, la resazurina se reduce a resorufina, que es un compuesto de color rojo y altamente fluorescente. La toxicidad celular se puede detectar fácilmente utilizando un lector de placas que mida la absorbancia y la fluorescencia [15].

La gran versatilidad química y estructural de los MOFs hace que exista un número elevado de factores asociados a sus estructuras y que pueden provocar citotoxicidad. Se ha observado que la naturaleza del metal afecta en gran medida, siendo menos tóxicos los MOFs que incluyen hierro o zirconio en sus estructuras [12], aunque este aspecto también viene influenciado por la estabilidad del entorno de coordinación. Otros factores relacionados con la toxicidad son: la naturaleza del ligando orgánico, la generación de especies reactivas de oxígeno, la internalización celular del MOF, y parámetros del cristal como, por ejemplo, el tamaño, carga, etc. [16].



## 2. **OBJETIVOS**

El objetivo principal del presente trabajo es evaluar y comparar varios métodos estandarizados de evaluación de toxicidad de estos materiales cristalinos y validar nuevas alternativas.

Para alcanzar dicho objetivo general, se establecieron los siguientes objetivos parciales:

- ❖ Síntesis de 6 MOFs siguiendo protocolos normalizados de preparación.
- ❖ Caracterización de los mismos mediante difracción de Rayos X en polvo.
- ❖ Llevar a cabo ensayos de citotoxicidad de las redes metal-orgánicas *in vitro* en macrófagos murinos J774A.1 para establecer la concentración citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>).
- ❖ Llevar a cabo ensayos de toxicidad de las redes metal-orgánicas *in vivo* con *Amphipodia*.



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1. Reactivos y disoluciones**

Los reactivos utilizados para sintetizar los MOFs fueron: nitrato de aluminio no hidratado ( $\geq 98\%$ ), tetracloruro de zirconio ( $\geq 99,5\%$ ), nitrato de zinc (98%), 1,2,4-triazol (98%), urea (99,5%), ácido tereftálico (98%), ácido fumárico (98%) y ácido mesacónico (99%). Todos estos reactivos sólidos fueron suministrados por Sigma-Aldrich. Los disolventes de síntesis N,N-dimetilformamida (99,5%) y N,N-dimetilacetamida ( $\geq 99\%$ ) fueron proporcionados por Merck KGaA; el ácido acético ( $\geq 99,8\%$ ) y el ácido clorhídrico (37%, v/v) fueron proporcionados por Honeywell y Scharlau, respectivamente. Los disolventes de lavado fueron acetona y metanol, ambos con purezas superiores al 99%, siendo suministrados por PanReac AppliChem.

En los ensayos de citotoxicidad se utilizaron dos reactivos de viabilidad celular alamarBlue<sup>®</sup> y Trypan Blue, ambos suministrados por ThermoFisher scientific; utilizando como medio de cultivo celular RPMI 1640 sin rojo fenol con 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de gentamicina proporcionado por Gibco Life Technologies, macrófagos murinos J774A.1 (ATCC TIB-67) - mantenidos en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de gentamicina (Gibco Life Technologies) y *Gammaropsis atlantica* obtenida en Tenerife.

#### **3.2. Materiales**

Para las síntesis de los MOFs se utilizaron reactores solvotermales con revestimiento de teflón, que se introdujeron en el interior de autoclaves de acero inoxidable. Ambos materiales fueron suministrados por Parr Instrument Company.

Para realizar las suspensiones acuosas de los MOFs se usaron placas Deep-well. El ensayo de citotoxicidad de anfípodos y macrófagos se llevó a cabo en placas 24 y 96 pocillos, respectivamente. Todas las placas fueron adquiridas a NUNC<sup>™</sup> de ThermoFisher.

### **3.3. Equipos e instrumentación**

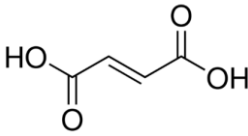
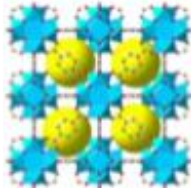
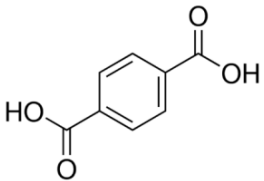
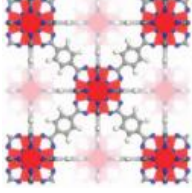
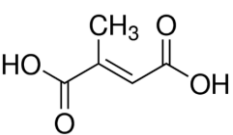

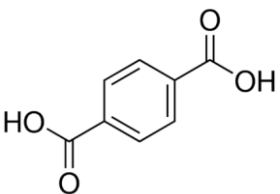
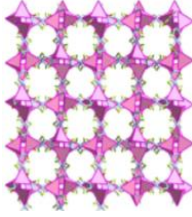
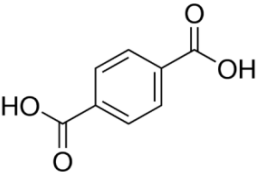
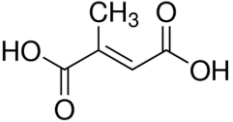
En la preparación de los MOFs se utilizó un horno hermético Heraeus. Su caracterización se realizó a través del Servicio Integrado de Difracción de Rayos X del Servicio General de Apoyo a la Investigación (SEGAI) de la Universidad de La Laguna, mediante el uso de un difractor X'Pert PRO de Panalytical.

Para el ensayo de citotoxicidad se utilizó una cámara de flujo laminar horizontal, una estufa de 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>, un citómetro de imagen Countess (Invitrogen™) y un lector de microplacas para fluorescencia Enspire®.

### **3.4. Procedimientos experimentales**

#### ***3.4.1. Síntesis de los MOFs***

Se sintetizaron seis redes metal-orgánicas; haciendo uso de los metales y ligandos que se muestran en la Tabla 3.1., incluyendo la simulación de las estructuras (modelización) en los casos que se conozca perfectamente el tipo de estructura cristalina.

Nombre	Metal	Ligando	Estructura
<b>UiO-64</b>	Zr (IV)	Ácido fumárico 	
<b>UiO-66</b>	Zr (IV)	Ácido tereftálico 	
<b>CIM-80</b>	Al (III)	Ácido mesacónico 	
<b>CIM-81</b>	Zn (II)	Ácido tereftálico 	
<b>CIM-82</b>	Zn (II)	Ácido tereftálico 	
<b>CIM-84</b>	Zr (IV)	Ácido mesacónico 	

**Tabla 3.1.** MOFs utilizados en este estudio, señalando sus constituyentes principales y el esquema de la disposición cristalina tridimensional en los casos conocidos.

La síntesis de estos materiales consta de cuatro pasos principales:

- ❖ Síntesis: En un reactor solvotermal se mezcla la sal metálica y el ligando orgánico correspondiente y, si es necesario se añade un modulador. A continuación, se adiciona el disolvente y se introduce en un autoclave de acero inoxidable, el cual se introduce a su vez en un horno; a temperatura y presión superiores al punto de ebullición del disolvente hasta formar cristales finos insolubles.
- ❖ Recuperación: Se saca el autoclave del horno y se deja enfriar a temperatura ambiente. Seguidamente, el contenido se filtra por gravedad.
- ❖ Lavado: El sólido obtenido en la filtración se lava con disolventes orgánicos para eliminar las posibles impurezas y se introduce en la estufa para su secado.
- ❖ Activación: Para que el poro de la red metal orgánica quede libre de cualquier resto de disolventes, es necesario aplicarle temperatura para que el disolvente que aun pueda encontrarse ocluido se evapore completamente.

#### 3.4.1.1. UiO-66

Este material fue sintetizado siguiendo el procedimiento detallado por Taima-Mancera *et al.* [7]. En un reactor solvotermal se mezcló la sal metálica ( $ZrCl_4$ ) con el ligando orgánico correspondiente (ácido tereftálico), en una proporción molar 1:1,5 hasta su completa disolución en dimetilformamida (DMF). A la mezcla anterior se le adicionó ácido clorhídrico concentrado que actuó como modulador. El reactor se introdujo en un horno a 150 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo se enfrió a temperatura ambiente, el sólido resultante se filtró por gravedad, se lavó con DMF y metanol, dejándolo secar en estufa a 50 °C. Finalmente, se activó en la estufa a 150 °C durante 24 horas.

#### 3.4.1.2. UiO-64

La síntesis de este MOF es una adaptación de la síntesis de UiO-66 en la que se cambia el ligando orgánico [11]. En un reactor solvotermal se mezcló la sal metálica ( $ZrCl_4$ ) con el ligando orgánico correspondiente (ácido fumárico), en una proporción molar 1:1,5 hasta su completa disolución en dimetilformamida. A la mezcla anterior se le adicionó ácido clorhídrico concentrado que actuó como modulador. El reactor se introdujo en un horno a 150 °C durante 24 horas. Se enfrió a temperatura ambiente, el sólido resultante se filtró por gravedad, se lavó con DMF y metanol, dejándolo secar en estufa a 50 °C. Finalmente, se activó en la estufa a 150 °C durante 24 horas.



#### 3.4.1.3. CIM-80

Para la síntesis de este material se siguió el procedimiento detallado por Rocío-Bautista *et al.* [9]. Se mezcló  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  y ácido mesacónico (proporción molar 1:1) y se disolvieron en 15 mL de agua desionizada que contenía urea (0,5 mmol), bajo agitación constante durante 20 minutos. Seguidamente, la disolución se transfirió a un reactor solvotermal y se introdujo en el horno donde se mantuvo a 150 °C durante 3 horas. Posteriormente, el autoclave se enfrió a temperatura ambiente y el sólido resultante se aisló mediante filtración por gravedad, se lavó con agua y se secó en una estufa a 50 °C. Para su activación se introdujo en una estufa a 150 °C durante 8 horas.

#### 3.4.1.4. CIM-81

Para la síntesis de este material se siguió el procedimiento detallado por González-Hernández *et al.* [8]. En un reactor solvotermal se mezcló  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1,2,4-triazol y ácido tereftálico, respectivamente, en una proporción molar 2:2:1 hasta su completa disolución en dimetilacetamida (DMA). Seguidamente se introdujo en un horno a 120 °C durante 72 horas. Completada la síntesis, el sólido obtenido se filtró por gravedad, se lavó con DMA y acetona y, se secó en estufa a 50 °C. Para activar los cristales, estos se sumergieron en acetona durante 24 horas (este proceso se repitió dos veces), secándose finalmente en la estufa a 100 °C.

#### 3.4.1.5. CIM-82

Este material se sintetizó siguiendo el protocolo establecido en el grupo de investigación MATMOL de la ULL. En un reactor solvotermal se mezcló nitrato de zinc, 1,2,4-triazol y ácido tereftálico, respectivamente, en una proporción molar 2:2:1 hasta su completa disolución en dimetilformamida. Seguidamente se introdujo en un horno a 120 °C durante 72 horas. Completada la síntesis, se filtró por gravedad, se lavó con DMF y acetona y, se dejó secar en estufa a 50 °C. Finalmente, se activó sumergiendo en acetona los cristales durante 24 horas (este proceso se repitió dos veces) y se secaron en la estufa a 100 °C.

#### 3.4.1.6. CIM-84

Este material se sintetizó siguiendo el protocolo establecido en el grupo de investigación MATMOL de la ULL. En un reactor solvotermal se mezcló tetracloruro de zirconio y ácido mesacónico en una proporción 1:1 molar, hasta su completa disolución en dimetilformamida. Se adicionó ácido acético como modulador y se introdujo en un horno a 120 °C durante 48 horas. Completada la síntesis, el sólido se filtró por gravedad, se lavó con DMF y acetona y, se dejó secar en estufa a 50 °C. Finalmente, se activó sumergiendo en acetona los cristales durante 24 horas (este proceso se repitió dos veces) y se secaron en la estufa a 100 °C.

En la Tabla 3.2. se muestran las cantidades de reactivos, disolventes y temperaturas específicas empleadas en la preparación de cada MOF.

MOF	Síntesis				Temperatura (°C)/ tiempo (h)	Lavado y secado	Activación
	Sal metálica (mg)	Ligando (mg)	Modulador (mL)	Disolvente (mL)		Disolventes (mL)/ Temperatura (°C)	Temperatura (°C)/ tiempo (h)
<b>UiO64</b>	ZrCl <sub>4</sub> (233)	ác. fumárico (175)	HCl concentrado (1)	DMF (15)	150°C/24h	DMF (15), metanol (30) / (50 °C)	150 °C /24 h
<b>UiO66</b>	ZrCl <sub>4</sub> (233)	ác. tereftálico (246)	HCl concentrado (1)	DMF (15)	150°C/24h	DMF (15), metanol (30) / (50 °C)	150 °C /24 h
<b>CIM80</b>	Al (NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O (375)	ác. mesacónico (130)	Urea (30)	Agua MiliQ (15)	150°C/3h	Agua MiliQ (15) / (50 °C)	150 °C /24 h
<b>CIM81</b>	Zn (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (592)	ác. tereftálico (170); 1,2,4- triazol (140)	-	DMA (15)	120 °C/ 72 h	DMA (15), acetona (30) / (50 °C)	2 x acetona 24 h 100 °C/24h
<b>CIM82</b>	Zn (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (592)	ác. tereftálico (170); 1,2,4- triazol (140)	-	DMF (15)	120 °C/ 72 h	DMF (15), acetona (30) / (50 °C)	2 x acetona 24 h 100 °C/24h
<b>CIM84</b>	ZrCl <sub>4</sub> (233)	ác. mesacónico (130)	ác. acético (2)	DMF (4)	120 °C/ 48 h	DMF (15), acetona (30) / (50 °C)	2 x acetona 24 h 100 °C/24h

**Tabla 3.2.** Condiciones de síntesis de los MOFs utilizados.

### 3.4.2. Ensayo de citotoxicidad de los MOFs

#### 3.4.2.1 Ensayo con macrófagos

Los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo en condiciones de esterilidad bajo la cámara de flujo laminar. En estas condiciones se sustituyó el medio DMEM (medio de mantenimiento de los macrófagos) por RPMI sin rojo fenol. Como los macrófagos se adhieren a la placa de cultivo fue necesario despegarlos con un raspador. A continuación, en un Eppendorf se adicionaron 10  $\mu$ L de cultivo de macrófagos y 10  $\mu$ L de Trypan Blue (colorante que permite diferenciar la viabilidad de las células); 10  $\mu$ L de la mezcla anterior se introdujeron en una placa de recuento y con ayuda del citómetro de imagen Countess se determinó el número de macrófagos vivos presentes en el cultivo. Con este recuento se preparó una suspensión de  $2 \cdot 10^5$  macrófagos/mL.

En segundo lugar, se preparó la placa 96 pocillos. En los pocillos de los bordes se adicionó 100  $\mu$ L de agua MiliQ (proporciona humedad y evita que el medio se evapore), al resto de pocillos se les adicionó 50  $\mu$ L de la suspensión obtenida en el punto anterior, exceptuando los pocillos que se usaron como control negativo donde se adicionó 50  $\mu$ L de la suspensión de macrófagos y 50  $\mu$ L de medio RPMI sin fenol. Se introdujo la placa en la estufa a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> mientras se preparaban las suspensiones acuosas de los MOFs.

En tercer lugar, se utilizó la placa Deep-well para realizar suspensiones seriadas de cada MOF. Se adicionaron 50  $\mu$ L de cada pocillo de la *Deep-well* al pocillo correspondiente de la placa 96 pocillos. Finalizada la placa se introdujo en la estufa a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas.

#### 3.4.2.2 Ensayo con anfípodos

Ensayo de toxicidad en el que se determinó la inhibición de la movilidad de anfípodos. Adaptado a la Norma Europea EN ISO 6341:2012 que determina la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna*.

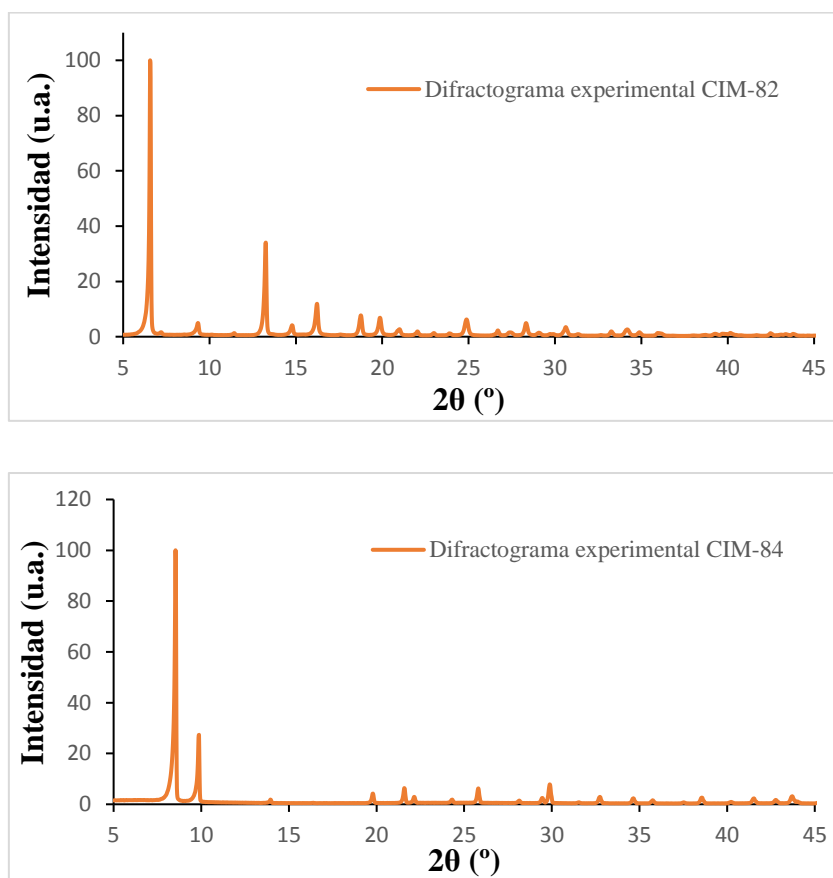
Para llevar a cabo este ensayo, en 1 mL de agua de mar filtrada se añadieron de 4 a 6 individuos de anfípodos y, seguidamente, se adicionaron los MOFs a dos concentraciones diferentes de suspensión (2,5 y 5 mg/mL). Se observaron visualmente a las 24 y a las 48 horas, realizándose el recuento de los individuos vivos y muertos pasadas 48 horas.



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

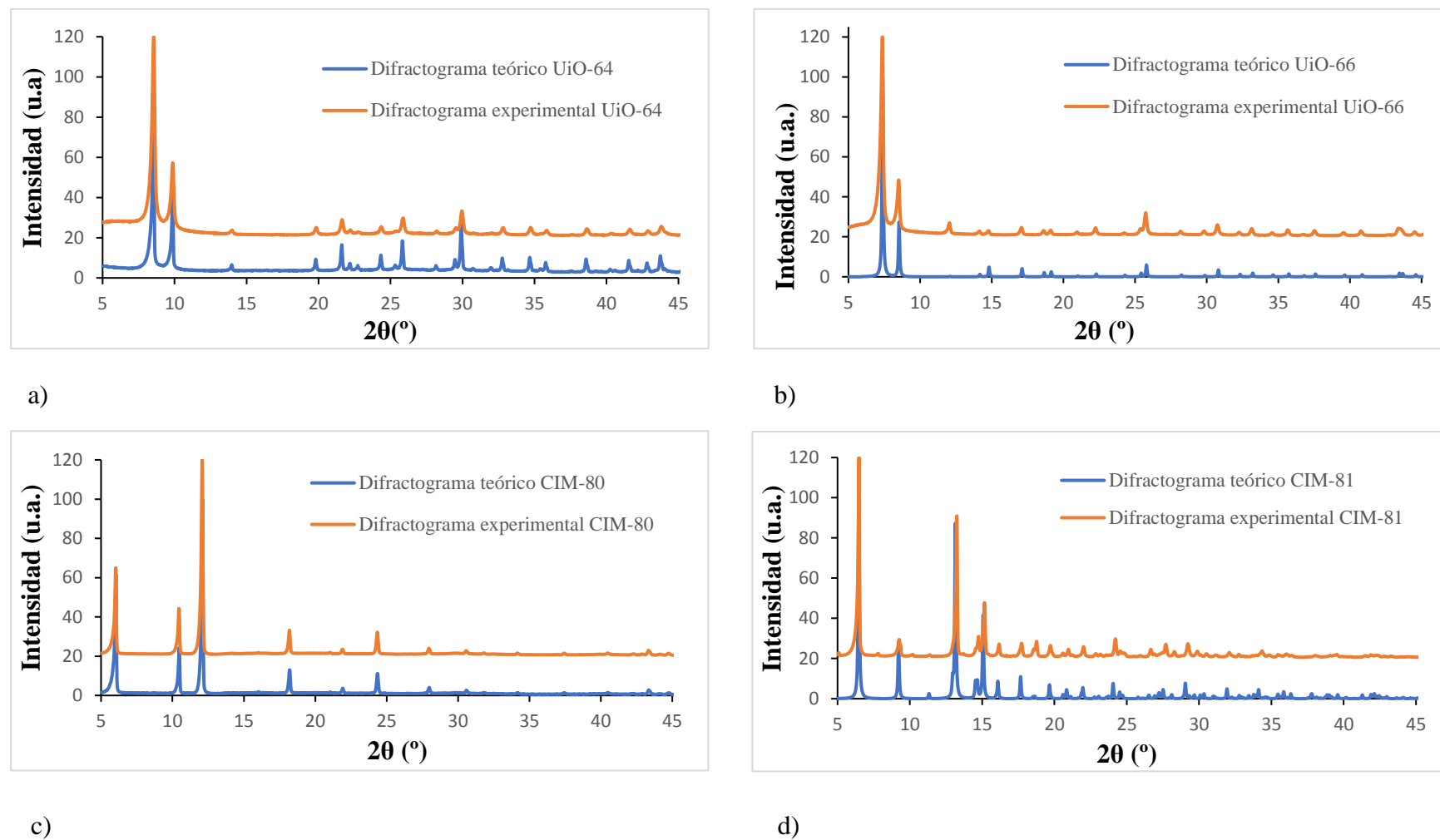
### 4.1. Caracterización de los MOFs

Se obtuvieron los difractogramas en polvo de los MOFs sintetizados. Los difractogramas de las redes metal-orgánicas CIM-82 y CIM-84 (cuyas estructuras aún están en fase de resolución) se usaron para verificar que se trataba de materiales cristalinos. En la Figura 4.1. se muestran los difractogramas de polvo experimentales para CIM-82 y CIM-84.



**Figura 4.1.** Difractogramas de polvo experimental de CIM-82 y CIM-84, respectivamente.

Los difractogramas obtenidos de los MOFs restantes se compararon con los difractogramas teóricos para verificar que la estructura cristalina obtenida fue la correcta. En la Figura 4.2. se muestran las comparaciones entre los difractogramas de polvo teóricos y los experimentales de UiO-64, UiO-66, CIM-80 y CIM-81.

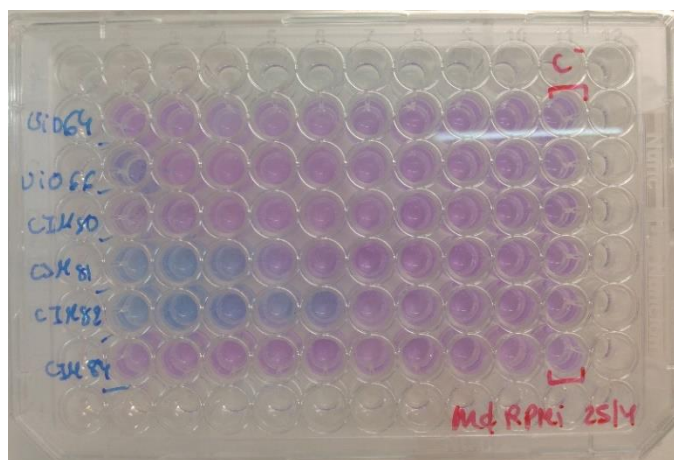


**Figura 4.2.** Comparación de los difractogramas de polvo teórico (azul) y experimental (naranja) de: a) UiO-64, b) UiO-66, c) CIM-80 y d) CIM-81.



## 4.2. Ensayo de citotoxicidad en macrófagos

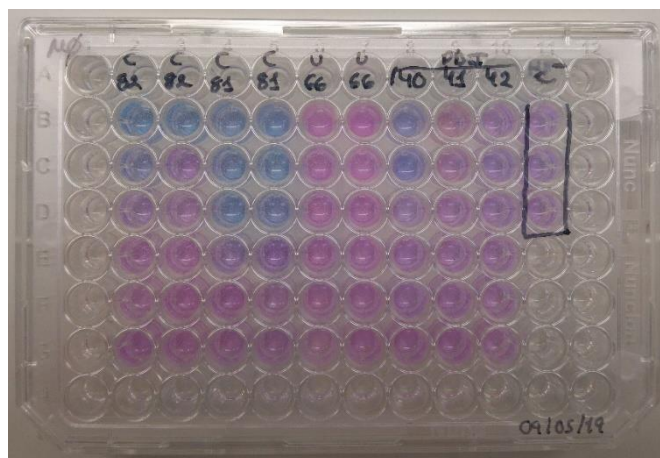
Se preparó una placa 96 pocillos con nueve suspensiones seriadas de cada MOF (de 5 mg/mL hasta 0,0195 mg/mL) y se incubó a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas como aparece descrito en la sección 3.4.2.1. Una vez transcurrido este tiempo, se sacaron las placas y los resultados obtenidos se observaron a simple vista debido al viraje del alamarBlue®. Los pocillos rosas indicaron que los macrófagos estaban vivos mientras que los pocillos azules mostraron que los macrófagos estaban muertos. En la Figura 4.3. se muestra la placa del ensayo de citotoxicidad.



**Figura 4.3.** Fotografía de la placa de 96 pocillos.

La placa anterior se introdujo en un lector Enspire para medir la fluorescencia a 585 nm. Los datos obtenidos se analizaron con el programa informático SigmaPlot para determinar la viabilidad de los macrófagos utilizando curvas de dosis-respuesta para obtener el CC<sub>50</sub>. Los materiales UiO-64, CIM-80 y CIM-84 no resultaron tóxicos a la máxima concentración ensayada para la suspensión (CC<sub>50</sub> > 5 mg/mL). CIM-81 y CIM-82 si resultaron tóxicos por lo que se repitió el ensayo de citotoxicidad; a pesar de que UiO-66 presentó una CC<sub>50</sub> > 5 mg/mL se repitió el ensayo debido al color del primer pocillo de la placa.

En la Figura 4.4. se muestra la placa resultante de la repetición del ensayo de citotoxicidad para UiO-66, CIM-81 y CIM-82.



**Figura 4.4.** Fotografía de la placa 96 pocillos obtenida de la repetición por duplicado de UiO-66, CIM-81 y CIM-82.

Nuevamente, se observó la placa a simple vista, se midió la fluorescencia a 585 nm y los datos obtenidos se analizaron con SigmaPlot. El material UiO-66 no resultó tóxico a la máxima concentración ensayada para la suspensión (5 mg/mL). CIM-81 y CIM-82 volvieron a resultar tóxicos, obteniéndose una  $CC_{50}$  de  $0,98 \pm 0,08$  mg/mL y  $0,88 \pm 0,01$  mg/mL respectivamente.

### 4.3. Ensayo de citotoxicidad en anfípodos

En el primer ensayo se adicionaron 5 mg/mL de la suspensión de cada MOF a pocillos que contenían entre 4-6 individuos y se observó la citotoxicidad a las 48 horas, tal y como se describe en la sección 3.4.2.2. El recuento se lleva a cabo de manera visual por la diferencia entre los individuos vivos y muertos: los primeros presentan movimiento y son de color marrón mientras que los segundos adquieren un color naranja. En la Tabla 4.1 se recoge el recuento de individuos vivos y muertos transcurridas las 48 horas.

<b>MOF</b>	<b>Recuento</b>
<b>UiO-64</b>	Uno vivo
<b>UiO-66</b>	Todos vivos, pero poco movimiento
<b>CIM-80</b>	Todos vivos
<b>CIM-81</b>	Todos muertos
<b>CIM-82</b>	Todos muertos
<b>CIM-84</b>	Todos vivos
<b>Control 1</b>	Todos vivos
<b>Control 2</b>	Todos vivos
<b>Control 3</b>	Todos vivos

**Tabla 4.1.** Recuento obtenido del primer ensayo de citotoxicidad con anfípodos.

En el segundo ensayo se adicionaron suspensiones de MOFs a 2,5 mg/mL y 5 mg/mL en pocillos que contenían entre 4-6 individuos, observándose la citotoxicidad a las 48 horas tal y como se describe en la sección 3.4.2.2. En la Tabla 4.2. se recoge el recuento de individuos vivos y muertos transcurridas las 48 horas.

<b>MOF</b>	<b>Recuento</b>
<b>UiO-64 (2.5 mg/mL)</b>	Uno vivo
<b>UiO-64 (5 mg/mL)</b>	Uno vivo
<b>UiO-66 (2.5 mg/mL)</b>	Todos vivos pero poco movimiento
<b>UiO-66 (5 mg/mL)</b>	Todos vivos pero poco movimiento
<b>CIM-80 (2.5 mg/mL)</b>	Todos vivos
<b>CIM-80 (5 mg/mL)</b>	Todos vivos
<b>CIM-81 (2.5 mg/mL)</b>	Todos muertos
<b>CIM-81 (5 mg/mL)</b>	Todos muertos
<b>CIM-82 (2.5 mg/mL)</b>	Todos muertos
<b>CIM-82 (5 mg/mL)</b>	Todos muertos
<b>CIM-84 (2.5 mg/mL)</b>	Todos vivos
<b>CIM-84 (5 mg/mL)</b>	Todos vivos
<b>Control 1</b>	Todos vivos
<b>Control 2</b>	Todos vivos
<b>Control 3</b>	Todos vivos

**Tabla 4.2.** Recuento obtenido del segundo ensayo de citotoxicidad con anfípodos.

## **5. CONCLUSIONES**

Se han sintetizado adecuadamente los seis MOFs utilizados en este trabajo, demostrándose la cristalinidad de los materiales sintetizados mediante los patrones de difracción en polvo de Rayos X.

El ensayo de toxicidad en macrófagos indica resultados de toxicidad para dos MOFs (CIM-81 y CIM-82). Sin embargo, al ser suspensiones en agua no permiten un cálculo matemático de  $CC_{50}$  fiables.

Se valida por primera vez un ensayo con anfípodos *in vivo*, que indica toxicidad para dos MOFs (CIM-81 y CIM-82) y es válido para compuestos solubles y en suspensión.



## 6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Yaghi OM. Reticular chemistry-construction, properties, and precision reactions of frameworks. *J. Am. Chem. Soc.* 2016; 138(48):15507–15509.
- [2] Furukawa H, Cordova KE, O’Keeffe M, Yaghi OM. The chemistry and applications of metal-organic framework. *Science* 2013; 341:1230444.
- [3] Yang X, Xu Q. Bimetallic metal-organic frameworks for gas storage and separation. *Cryst. Growth Des.* 2017; 17(4):1450–1455.
- [4] Zhu L, Liu XQ, Jiang HL, Sun LB. Metal–organic frameworks for heterogeneous basic catalysis. *Chem. Rev.* 2017; 117(12):8129–8176.
- [5] Sun L, Li Y, Shi H. A ketone functionalized Gd (III)- MOF with low cytotoxicity for anti-cancer drug delivery and inhibiting human liver cancer cells. *J. Clust. Sci.* 2019; 30(1): 251-258.
- [6] Kumar P, Deep A, Kim KH. Metal organic frameworks for sensing applications. *Trends Anal. Chem.* 2015; 73:39–53.
- [7] Taima-Mancera I, Rocío-Bautista P, Pasán J, Ayala JH, Ruíz-Pérez C, Afonso AM et al. Influence of ligand functionalization of UiO-66-based metal-organic frameworks when used as sorbents in dispersive solid-phase analytical microextraction for different aqueous organic pollutants. *Molecules.* 2018; 23(11): 2869.
- [8] González-Hernández P, Lago AB, Pasán J, Ruíz-Pérez C, Ayala JH, Afonso AM et al. Application of a pillared-layer Zn-triazolate metal-organic framework in the dispersive miniaturized solid-phase extraction of personal care products from wastewater samples. *Molecules.* 2019; 24(4):690.
- [9] Rocío-Bautista P, Pino V, Ayala JH, Ruiz-Pérez C, Vallcorba O, Afonso AM et al. A green metal–organic framework to monitor water contaminants. *RSC Adv.* 2018; 8(55):31304-31310.
- [10] Rubio-Martinez M, Avci-Camur C, Thornton AW, Imaz I, MasPOCH D, Hill MR. New synthetic routes towards MOF production at scale. *Chem. Soc. Rev.* 2017; 46(11):3453–3480.
- [11] Furukawa H, Gándara F, Zhang Y, Jiang J, Queen WL, Hudson M.R et al. Water adsorption in porous metal-organic framework and related materials. *J. Am. Chem. Soc.* 2014; 136(11):4369-4381

- [12] Tamames-Tabar C, Cunha D, Imbuluzqueta E, Ragon F, Serre C, Blanco-Prieto MJ et al. Cytotoxicity of nanoscaled metal–organic frameworks. *J. Mater. Chem.* 2014; 2(3):262.
- [13] Mocniak K, Kubajewska I, Spillane D, Williams G, Morris R. Incorporation of cisplatin into the metal-organic frameworks UiO66-NH<sub>2</sub> and UiO66 – encapsulation vs. conjugation. *RSC Adv.* 2015; 5(102):83648-83656.
- [14] Qian L, Lei D, Duan X, Zhang S, Song W, Hou C et al. Design and preparation of metal-organic frameworks papers with enhanced mechanical properties and good antibacterial capacity. *Carbohydr. Polym.* 2018; 192:44-51.
- [15] Bonnier F, Keating ME, Wróbel TP, Majzner K, Baranska M, García-Muñoz A et al. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: A comparison of 2D and 3D cell culture models. *Toxicol. In vitro.* 2015; 29 (1):124-131.
- [16] Ruyra A, Yazdi A, Espín J, Carné-Sánchez A, Roher N, Lorenzo J et al. Synthesis, culture medium stability, and in vitro and in vivo zebrafish embryo toxicity of metal–organic framework nanoparticles. *European Journal.* 2015; 21 (6): 2508



