



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

Tesis presentada como parte de los requisitos de la UNL, para la
obtención del Grado Académico de

DOCTOR EN ENERGÍA Y MATERIALES AVANZADOS

En el campo de Química Medicinal

**“Nuevos materiales iónicos basados en polioxometalatos con
actividad frente a microorganismos patógenos”**

Realizada en: LADAQ-UNL

Autor: Ing. Ana Gabriela Enderle

Director de la Tesis argentino: Dra. María Julia Culzoni

Director de la Tesis alemán: Dr. Carsten Streb

Miembros del Jurado de la Tesis: Dr. Darío Falcone – Dr. Héctor
Goicoechea – Dr. Sven Rau.

2020

Resumen

La síntesis de nuevos materiales híbridos, combinando las propiedades de los componentes orgánicos e inorgánicos, da como resultados compuestos con propiedades físicas y químicas únicas. Actualmente, en el campo de la química medicinal, se buscan nuevos materiales que tengan alta bioactividad y especificidad, y presenten seguridad y bajos riesgos para la salud.

Los polioxometalatos (POMs) son oxo-clusters metálicos inorgánicos e importantes candidatos para ser usados como fármacos con actividad antiviral, antibacterial y antitumoral. Una ventaja para la formación de compuestos multifuncionales es que los POMs al tener carácter aniónico, se pueden combinar con cationes funcionales y así poseer un segundo componente reactivo en su estructura. Esta unión iónica entre los cationes orgánicos y los polioxometalatos aniónicos conduce a la formación de compuestos multivalentes bien definidos. Se espera que la derivación de los POM con socios orgánicos, incluidas las moléculas sintéticas y las bases biológicas naturales, dé lugar a un efecto sinérgico y concluya en nuevas funciones y/o propiedades biológicamente activas. Comprender el mecanismo de interacción de los materiales orgánico-POMs con múltiples biomoléculas en un solo paso o diferentes procesos en simultáneo que suceden en sistemas biológicos, proporcionará una base para el desarrollo de un campo novedoso en el descubrimiento de fármacos.

Esta tesis doctoral se basa en el diseño y la síntesis de nuevos materiales iónicos a base de POMs con aplicaciones antibacterianas, antifúngicas y antivirales. Se presentará la caracterización, el análisis de algunas de sus propiedades farmacocinéticas, el comportamiento en un sistema biológico y mecanismo de acción potencial terapéutico y se plantean futuras direcciones clínicas. Los capítulos explican el modo de acción de estos compuestos a partir de los resultados del análisis in vitro. Este mecanismo podría no explicarse de un solo modo, sino más bien por múltiples interacciones POM-proteínas que afectan a varias vías biológicas al mismo tiempo y la suma de estas alteraciones conduce en última instancia a la bioactividad.

El capítulo I contiene una amplia introducción a los POMs y sus derivados orgánicos que presentan bioactividad contra microorganismos patógenos. En el capítulo II se describen los procedimientos sintéticos para un nuevo POM-IL y la preparación de los films soportando el nuevo compuesto en una matriz polimérica, y sus potenciales

aplicaciones como barreras antibacterianas y antifúngicas. El capítulo III comprende la actividad antiviral de los POMs divididos en dos secciones. La primera sección trata de un material híbrido basado en un catión de cafeína y un POM que contiene Tungsteno y Cerio. Este compuesto presenta actividad anti-VIH y se demuestra que debido a la presencia de este catión se logra mejorar la especificidad celular y reducir la toxicidad en células. La segunda sección presenta la actividad anti-ZIKV y el modo de interacción de los POM y biomoléculas mediante cálculos computacionales y experimentos in-vitro. Estos resultados contribuyen tanto al diseño de terapias antivirales alternativas como al conocimiento del mecanismo de acción de los polioxometalatos como agentes antivirales. El capítulo IV presenta la conclusión.

El acceso a materiales híbridos con una base biológica y los POMs es atractivo, ya que permite obtener compuestos con propiedades únicas e interesantes desde el punto de vista biológico. Se espera que la síntesis y las posibles aplicaciones de estos compuestos como antivirales, antimicrobianos y antifúngicos resalten el impacto de la ciencia de materiales orgánicos-POM y enriquezcan el campo de la química medicinal.

Tabla de Contenidos

Resumen	2
Tabla de Contenidos	4
Lista de abreviaciones	6
Capítulo 1: Introducción	9
1.1 Polioxometalatos	9
1.1.1 Formación de polioxometalatos (proceso de condensación y autoensamblaje).....	10
1.1.2 Clasificación y clasificación estructural.....	12
1.1.3 Familia Keggin	14
1.1.4 Familia Wells- Dawson	16
1.2 Materiales híbridos con POMs	17
1.2.1 Funcionalización orgánica.....	17
1.2.1.1 Xantinas	20
1.2.1.2 Guanidinas	21
1.2.2 POM-líquidos iónicos	22
Referencias	23
Objetivos	26
Capítulo 2: Actividad antibacteriana y antifúngica de films que contienen un IL de guanidinium-POM	27
2.1 Introducción	27
2.1.1 Actividad antibacteriana y antifúngica de los POM	29
2.1.2 Actividad antibacteriana de POM-IL.....	31
2.2 Films multifuncionales basadas en un guanidinium POM-IL	32
2.2.1 Sección experimental.....	37
2.2.1.1 Materiales y métodos.	37
2.2.1.2 Síntesis de la POM-IL	41
2.2.1.3 Preparación de films.....	42
2.2.1.4 Ensayo antibacterial	43
2.2.1.5 Ensayo antifúngico	45
2.2.2 Resultados y discusión.....	47
2.2.2.1 Caracterización de los compuestos.	47
2.2.2.2 Caracterización de los films.	54
2.2.2.3 Actividad antibacteriana y antifúngica de la POM-IL	63
2.2.3 Actividad antibacteriana de los films.	68

2.3 Conclusión	71
Referencias.....	72
Capítulo 3: Actividad anti-ZIKV y anti-VIH de POMs y sus derivados	74
3.1 Introducción	74
3.1.1 Virus de inmunodeficiencia humana - VIH	75
3.1.2 Virus ZIKA – ZIKV	78
3.1.3 Actividad antiviral de los POM.....	79
3.2. Caf-POM como agentes anti-VIH	83
3.2.1 Sección experimental.....	84
3.2.1.1 Materiales y métodos.	84
3.2.1.2 Síntesis	85
3.2.1.3 Estabilidad de los compuestos.....	87
3.2.1.4 Ensayos <i>in vitro</i>	87
3.2.2 Resultados y discusión.....	89
3.2.2.1 Caracterización	89
3.2.2.2 Resultados de estabilidad	96
3.2.2.3 Resultados <i>in vitro</i>	98
3.2.3 Conclusión	102
3.3 Actividad anti-ZIKV de Dawson POMs	102
3.3.1 Sección experimental.....	106
3.3.1.1 Materiales y métodos	106
3.3.1.2 Síntesis	107
3.3.1.3 Ensayos <i>in vitro</i>	111
3.3.1.4 Estudios de acoplamiento molecular.....	112
3.3.2 Resultados y discusión	113
3.3.2.1 Caracterización	113
3.3.2.2 Resultados de estabilidad	114
3.3.2.3 Resultados de los ensayos <i>in vitro</i>	116
3.3.2.4 Resultados de acoplamiento molecular.....	121
3.3.2.3 Resultados del ensayo de competencia de anticuerpos (cont.)	125
3.3.3 Conclusión	127
Referencias.....	128
Capítulo 4. Resumen y Perspectivas	133

Lista de abreviaciones

ACN	Acetonitrilo
AFM	Microscopío de Fuerza Atómica
AIDS	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
ATP	Adenosina trifosfato
Caf	Caffeinium
CC50	Concentración citotóxica 50
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CFU	Unidad formadora de colonia
Chol	Colesterol
CAGR	Tasa de crecimiento anual compuesta
CRH	Holder de reducción de carga
DFT	Teoría del funcional de la densidad
DFV	Virus del dengue
DMEM	Medio Dulbecco's Modified Eagle
DMSO	Dimetil sulfóxido
DOTMG	<i>N, N, N', N'</i> -tetrametil- <i>N''</i> , <i>N''</i> -di octylo guanidinum
EA	Análisis elemental
E-protein	Proteína de envoltura
ESEM	Microscopía electrónica de Barrido Ambiental
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FFA	Ensayo de reducción de formación de foco
FT-IR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
GA	Algoritmo Genético
GSED	Detector gaseoso de electrones secundarios
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

HIV-1P	Proteasa HIV-1
ICP-AES	espectroscopia de emisión con plasma de acoplamiento inductivo
ILs	Líquidos iónicos
K-POMs	Keggin Polioxometalatos
LB	Luria-Bertani
LGA	Algorimo Genético Larmarckiano
MBC	Concentración bactericidad mínima
MEP	Malta Dextrina Peptona agar
MIC	Concentración mínima inhibitoria
MOFs	Marcos metal-orgánicos
MOI	Multiplicidad de infección
NB	Caldo de nutrientes
NMR	Resonancia Magnética Nuclear
NTA	Análisis de seguimiento de nanopartículas
OD	Densidad óptica
PBS	Buffer fosfato salino
PDA	Papa- Dextrose Agar
PfluV	Virus de Parainfluenza
PMCs	Matriy polimérica compuesta
PMMA	Polimetilmetacrilato
POM-ILs	Liíquidos iónicos con polioxometalatos
POMs	Polioxometalatos
RMS	raíz cuadrada del valor medio
RP	Fase reversa
RSV	Virus respiratorio sincial
SDA	Sabouraud Dextrosa Agar
SEM	Microscopía electrónica de barrido

SH	Holder standard
SI	Índice de selectividad
SN	Solución salina
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TGA	Análisis termogravimétrico
TSA	Agar de soja- triptona
UHPLC	Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
VTEC	<i>E. coli</i> verotoxigénica
WD-POMs	Wells-Dawson Polioxometalatos
XRD	Difracción de rayosX
YMA	Agar de malta- levadura
YMB	Caldo de malta-levadura
ZIKV	Zika Virus

Capítulo 1: Introducción

1.1 Polioxometalatos

Los polioxometalatos (POMs) son una clase de compuestos inorgánicos con propiedades físicas y químicas únicas y muy útiles para la formación de nuevos materiales con diferentes aplicaciones. Los primeros trabajos en el campo de los POMs son de los años 1800, sin embargo, para poder dilucidar completamente sus estructuras se requirió del descubrimiento de la difracción de rayos X y técnicas relacionadas.¹ Esto, posteriormente, provocó un aumento en la popularidad de los POMs. Desde la década de 1990, hubo muchos informes sobre aplicaciones en diferentes campos de nuevos compuestos que contienen POMs en su estructura. Los avances en química computacional también contribuyeron a profundizar explicaciones sobre las estructuras de estos clústeres inorgánicos, sus propiedades electrónicas y su reactividad. Durante los últimos años, el mundo científico ha logrado un gran progreso en la química de POMs y se han publicado muchas revisiones y documentos que tratan diferentes aspectos como propiedades, procedimientos sintéticos y aplicaciones (Fig. 1).

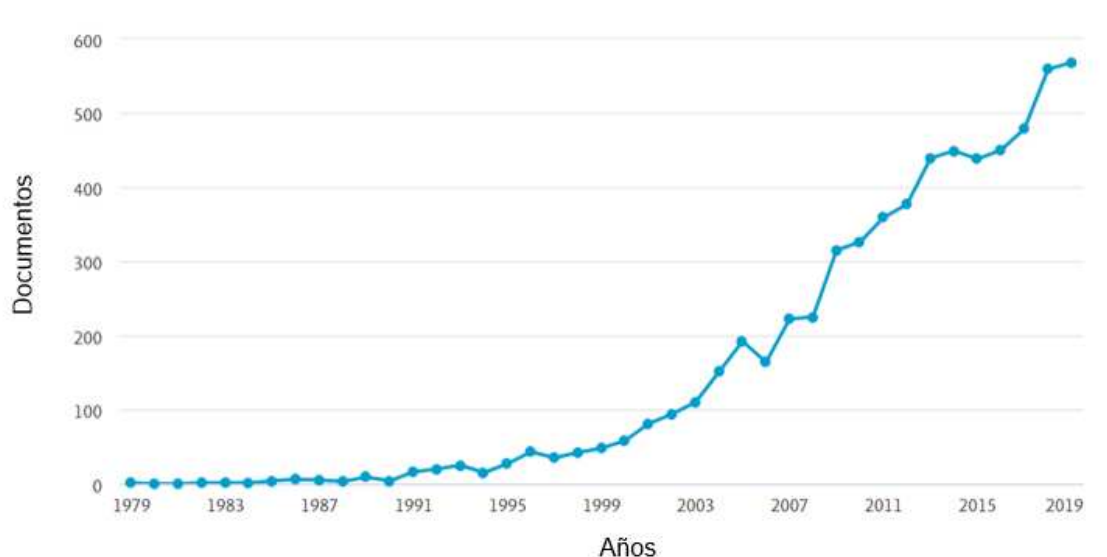


Figura 1. Publicaciones de investigaciones de POMs (1979-2019). Base de datos Scopus (marzo de 2020)

Los POM son oxo-aniones metálicos inorgánicos de fórmula general $[M_xO_y]^{n-}$ donde M es un metal de transición (p. ej. Mo, W, V) unido a oxígenos (O). Los metales de transición se encuentran en sus estados de alta oxidación, es decir, d^0 , d^1 (p. ej. Mo^{6+} , W^{6+}) y se denominan además átomos. Junto con los oxo-ligandos, forman una coordinación poliédrica del tipo (MO_y) ($y=4,6$). Los oxo-ligandos estabilizan los

estados de alta oxidación de los adenda átomos y pueden formar dobles enlaces M=O terminales mediante interacciones $p\pi-d\pi$.²

Las aplicaciones de los POM se encuentran en diversas áreas, como la conversión y el almacenamiento de energía, la fotocatalisis y los materiales bioactivos. El impacto de los POMs en bioquímica y en campos de investigación relacionados, ha aumentado en los últimos años, ya que los POMs pueden desempeñar diferentes funciones en la interacción con biomoléculas como aminoácidos, péptidos y proteínas.³ El rango de propiedades que exhiben estas sustancias abre nuevas posibilidades para aplicaciones en áreas que no han sido completamente exploradas como proyectos de química medicinal.

1.1.1 Formación de polioxometalatos (proceso de condensación y autoensamblaje)

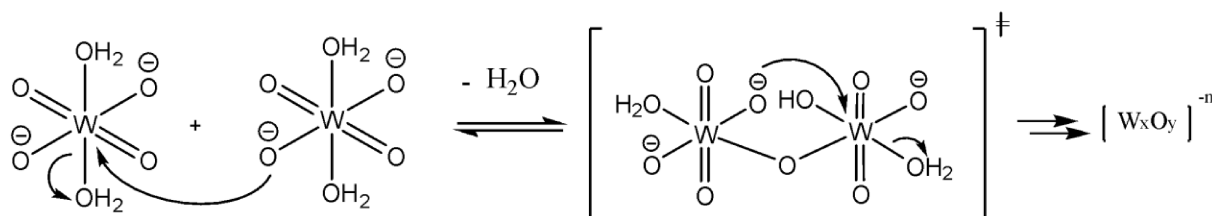
Las rutas sintéticas para la preparación de POM son muy simples y requieren una pequeña cantidad de pasos o incluso un solo paso. Los factores importantes a tener en cuenta al sintetizar un POM son el tipo de anión de óxido metálico y su concentración, el pH, la fuerza iónica, el tipo de heteroátomo y su concentración, la presencia de ligandos adicionales y/o agentes reductores, y la temperatura de la reacción.⁴

Los POMs son compuestos altamente ordenados, formados espontáneamente a partir de bloques de construcción más pequeños por autoensamblaje. Los compuestos finales difieren en propiedades físicas y químicas de los materiales de partida. La formación de estructuras POM obedece generalmente a dos principios:

- 1) cada átomo debe ocupar solo un poliedro compartido de borde (MO_x) en el que el metal se desplaza hacia el borde, como resultado de la unión π entre el M y el O;
- 2) la restricción de Lipscomb: no se observa la estructura con tres y más grupos oxo terminales.⁵

La formación de POM sigue un proceso de autoensamblaje único en el que los grupos aniónicos de metal de transición-oxígeno están dominados por la formación de enlaces coordinados entre el centro correspondiente al metal deficiente en electrones y los átomos de oxígeno, que actúan como ligandos nucleófilos.⁶ La disminución del

pH da como resultado una expansión del número de coordinación metálico de los precursores, de coordinación tetraédrica a octaédrica y que conduce a una mayor polarización de los enlaces dobles M=O (Esquema 1).²



Esquema 1. Reacción de condensación de $[WO_6]^{n-}$ octaedro a bloques de construcción polinucleares $[W_xO_y]^m$ mayores.

Posteriormente, los átomos de oxígeno terminales pueden protonarse más fácilmente, iniciando la aparición de reacciones de condensación consecutivas entre las unidades $[MO_6]$. Estos bloques de construcción se pueden vincular compartiendo esquinas, bordes y más inusualmente, caras (Fig.2).² Los dos modos de enlace más comunes son el modo de compartir esquina con un ligando μ -oxo y el modo de compartir borde con dos ligandos μ -oxo puentes.

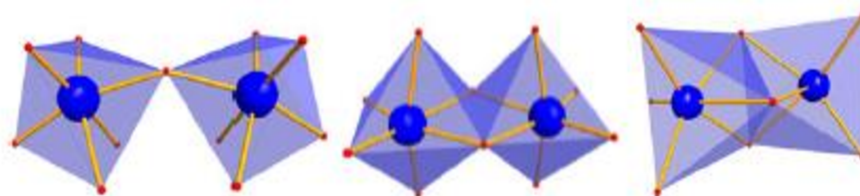


Figura 2. Los diferentes modos de uso compartido: uso compartido de esquinas (izquierda), uso compartido de bordes (centro) y uso compartido de caras (derecha). Esquema de colores: M (azul), dorado (poliedros); O rojo. Reimpreso con permiso de Springer Spektrum, ref. 2.

Algunos intermedios inestables pueden reaccionar nuevamente de manera inmediata y agregarse a tríadas de borde compartido altamente simétricas $[W_3O_{13}]$. La estructura final se obtiene mediante la condensación adicional de los intermediarios de óxido de metal polinuclear hidratados e inestables: el crecimiento del clúster está esencialmente influenciado por los orbitales d vacíos de los metales de alto estado de oxidación que permiten la formación de enlaces π fuertes, disminuyendo la basicidad y la nucleofilicidad de los enlaces dobles terminales M=O.² El aislamiento de los POM en el estado sólido cristalino es muy importante para su identificación y caracterización estructural. La adición de una sal, generalmente de metales alcalinos o de amonio

(cloruro, bromuro, nitrato), conduce a la precipitación del POM. La recristalización de la sal de POM se puede lograr con agua, solventes orgánicos u otras combinaciones.⁷

En este mismo proceso, los heteropolioxometalatos se ensamblan alrededor de un template tetraédrico central. Una estructura muy conocida que ayuda a ejemplificar esta metodología es la estructura Keggin. El borato, el silicato o el fosfato pueden actuar como templates y la estructura se forma mediante la agregación de tríadas alrededor de este anión tetraédrico XO_4^{n-} (Fig. 3).²

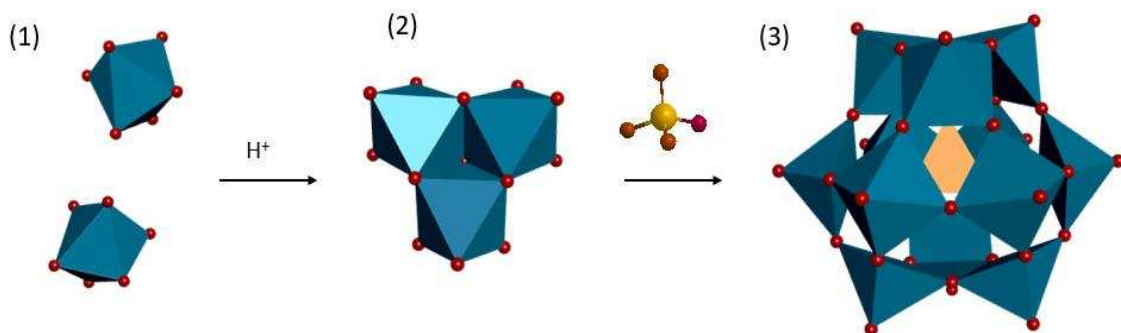
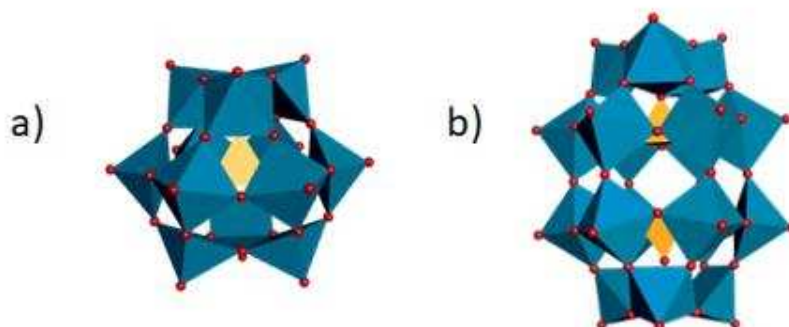


Figura 3. Autoensamblaje del anión Keggin. (1) El bloque de construcción de oxometalato (MO_6), (2) (M_3O_{13}) se forman espontáneamente en solución por acidificación, (3) en presencia de la plantilla tetraédrica (SiO_4)⁴⁻, el bloque de construcción se ensambla para formar la estructura Keggin.

1.1.2 Clasificación y clasificación estructural.

Los POM se clasifican por su disposición estructural y los nombres a menudo se basan en el científico que dilucidó su estructura. En la Fig. 4, las ilustraciones poliédricas muestran la diversidad estructural de las familias más comunes. Las familias más conocidas, debido a su amplia gama de aplicaciones y la consecuente gran área de investigación, son las familias Keggin y Wells-Dawson.³



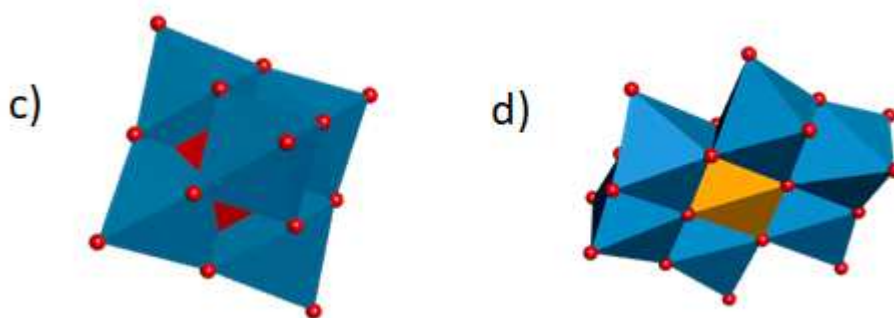


Figura 4. Ilustraciones poliédricas de algunos polioxometalatos que muestran su diversidad estructural. a) Estructura Keggin $[XM_{12}O_{40}]^{n-}$, b) Estructura Dawson $[X_2M_{18}O_{62}]^{n-}$, c) Lindqvist hexamolibdato $[Mo_6O_{19}]^{n-}$, d) Estructura Anderson $[XM_6O_{24}]^{n-}$. Color: átomos de adenda en azul, heteroátomo en naranja y átomos de oxígeno en rojo.

Los POMs son bien conocidos por su diversidad estructural, pero tienen ciertas propiedades en común:

a) alta carga, tamaño, simetría y estabilidad térmica;

b) los equilibrios que implican la formación de POMs se modifican en gran medida por varias variables como la concentración de los reactivos, el pH, la presencia de ligandos adicionales, contraiones, temperatura o presión. En la sección anterior, se describen los detalles sintéticos de los POMs;

c) las especies que contienen contraiones inorgánicos (a menudo alcalinos o alcalinotérreos) son a menudo solubles en agua, mientras que los contraiones o contraiones orgánicos voluminosos les confieren mayor solubilidad en disolventes orgánicos;²

d) pueden actuar como ligandos a través de los átomos de oxígeno ubicados en la superficie del grupo.

Los POMs se pueden clasificar en tres grupos, en función de la presencia de diferentes elementos en su estructura: isopolioxometalatos, heteropolioxometalatos y los POMs azul de molibdeno (grupos basados en molibdeno reducido). Para esta tesis, el segundo grupo es de interés para la investigación de sus propiedades y sinergia con los cationes orgánicos.

- Isopolioxometalatos

Los isopolianiones son POMs sin heteroátomos internos con la fórmula general $[M_xO_y]^{n-}$. Por lo general, son más inestables que su contraparte como heteropolianiones. Estos compuestos son ampliamente utilizados como bloques de

construcción debido a sus altas cargas y propiedades fuertemente básicas de sus oxígenos superficiales.^{8,9}

- Heteropolioxometalatos

Estos grupos incluyen uno o más heteroátomos en su estructura. La fórmula molecular general es $[X\text{M}_x\text{O}_y]^{n-}$ donde X generalmente es B, P, Si, y actúa como estructura interna. Este tipo de POMs son los más investigados y la presencia del heteroátomo mejora la estabilidad del clúster. El elemento generalmente está ubicado en el centro de la estructura, pero a veces también se puede ubicar en la superficie de esta. Dependiendo del tipo de heteroátomos en el marco, las propiedades de los POMs, por ejemplo, carga o reactividad, pueden modificarse. La variación de heteroátomo es, por lo tanto, una buena herramienta para el diseño de clústeres y manejo de sus reactividades, útiles para una determinada aplicación.¹

La mayoría de las publicaciones y patentes sobre polioxometalatos y sus aplicaciones biológicas involucran polioxometalatos Keggin con adenda átomos de tungstato (K-POM) y/o polioxometalatos Well-Dawson (WD-POM) y sus respectivos derivados.³

1.1.3 Familia Keggin

En 1933, J. Keggin determinó la estructura del anión α -Keggin $[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]^{3-}$ mediante el uso de difracción de rayos X.¹⁰ La fórmula general del Keggin POM es $[X\text{M}_{12}\text{O}_{40}]^{n-}$ donde X es el heteroátomo, comúnmente Si, P y M es el *addenda* átomo, típicamente Mo o W. Este POM posee una simetría tetraédrica, basada en el heteroátomo central rodeado por cuatro átomos de oxígeno. Las unidades octaédricas MO_6 comparten bordes para formar las tríadas M_3O_{13} . El heteroátomo se encuentra en el centro de la jaula formada por las cuatro tríadas que están unidas por enlaces M-O-M que comparten esquinas.

En 1970, Baker y Figgis estudiaron la isomerización de la estructura tipo Keggin. Cinco posibles isómeros, α , β , γ , δ y ϵ , son el resultado de la rotación de 60° alrededor del eje de uno, dos, tres de los cuatro trímeros, respectivamente.¹¹ De todos ellos, α es el más estable porque las estructuras solo comparten esquinas y la repulsión es menor. Mientras que con cada giro de 60° , el número de bordes compartidos aumenta y disminuye la estabilidad del grupo (Fig. 5).¹²

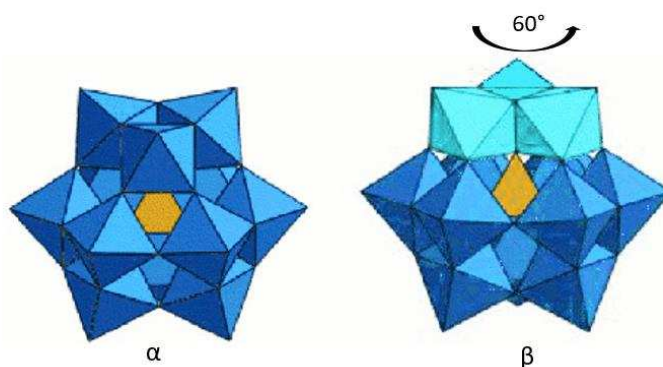


Figura 5. Isómeros de Baker-Figgis del anión Keggin. Color: octaedro azul: $[MO_6]^{n-}$, centro naranja: X heteroátomo. La tríada rotada era de color azul claro para aclaración. Reimpreso con permiso de la Ref. 12.

La arquitectura Keggin puede modificarse mediante hidrólisis controlada, que permite la eliminación selectiva de uno o varios trímeros, o mediante un estricto control de pH con una solución de sales de metales y/o de heteroaniones. Las estructuras resultantes son las llamadas especies lacunarias tales como $[XM_{11}O_{39}]^{n-}$ (Fig. 6).⁹ El sitio vacante lacunario puede incorporar metales funcionales, conocidos como heteroátomos secundarios, a través de puentes de hidrogeno con los oxígenos superficiales y/o a través de los átomos de oxígeno terminales ubicados en el sitio vacante. Esta característica es muy útil para una mayor funcionalización del clúster.²

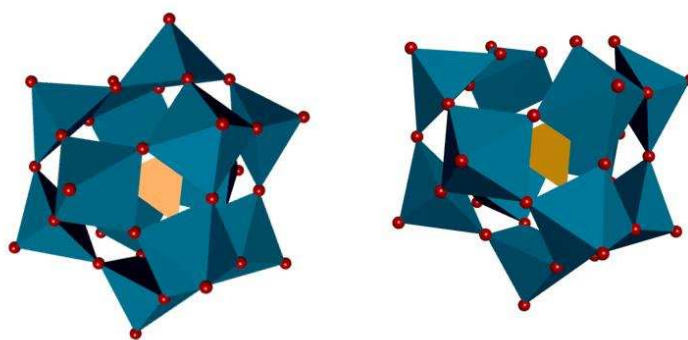


Figura 6. Representación poliédrica de $[SiW_{12}O_{40}]^{4-}$ (izquierda) y $[SiW_{11}O_{39}]^{9-}$ (derecha).

El Keggin POM lacunario de tungstato y con heteroátomo de Silicio, $[SiW_{11}O_{39}]^{9-}$, posee una densidad de carga negativa mayor que el Keggin saturado $[SiW_{12}O_{40}]^{4-}$. Esta mayor densidad de electrones facilita el enlace a una gran cantidad de iones metálicos que dan como resultado estructuras complejas y novedosas.²

1.1.4 Familia Wells- Dawson

La estructura elipsoidal del complejo $[P_2W_{18}O_{62}]^{6-}$ fue sugerida por A. Wells en 1945 y, después de eso, B. Dawson determinó la posición del heteroátomo por difracción de rayos X monocristal.¹³ Por lo tanto, la estructura $[X_2M_{18}O_{62}]^{n-}$ se conoce como estructura de Wells-Dawson. Se puede obtener como resultado del ensamblaje de dos estructuras tri-lacunarias del anion Keggin (Fig. 7).

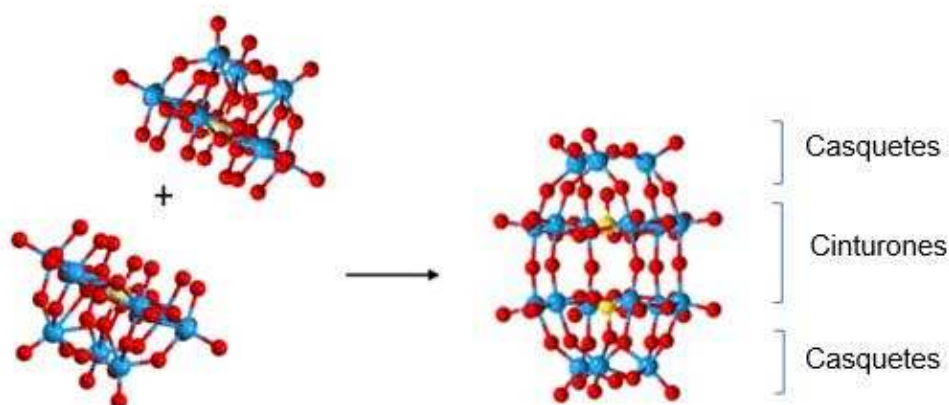


Figura 7. Representación poliédrica de la estructura WD-POM $\{X_2M_{18}\}$ formada al sumar dos unidades $\{XM_9\}$.

El α -WD-POM convencional está construido a partir de dos unidades tri-lacunarias de α -Keggin, el isómero γ está formado por dos unidades tri-lacunarias de β -Keggin y la combinación de POMs tri-lacunarios α y β -Keggin conduce al isómero β de este POM.¹⁴

La estructura WD-POM está estrechamente relacionada con la estructura K-POM debido a que contienen heteroátomos en su estructura, tetraédricamente coordinados (tales como P y Si). Aunque todos los metales son equivalentes en el anión Keggin, se puede hacer una distinción clara entre los octaedros polares (casquetes) y los octaedros ecuatoriales (cinturones) en la estructura WD. En la Fig. 6, se observa que la matriz ecuatorial M_{12} se forma a través del intercambio alternativo de esquinas y bordes de las unidades MO_6 . También están vinculados al octaedro polar por una sola esquina por grupo MO_6 . Esto hace que las moléculas WD sean diferentes de los aniones Keggin, en los que cada octaedro comparte dos bordes con las unidades vecinas de MO_6 .¹⁵

Algunas especies lacunares pueden formarse y aislarse en solución acuosa dependiendo del pH y los contra-cationes presentes durante su síntesis. El anión

monovacante $\{P_2W_{17}\}$ se aísla como isómeros α - $[P_2W_{17}O_{61}]^{10-}$ por hidrólisis del grupo Dawson a pH 6-7. El anión $\{\alpha_1-P_2W_{17}\}$ es inestable y cambia fácilmente al isómero $\{\alpha_2-P_2W_{17}\}$ (Fig. 8).

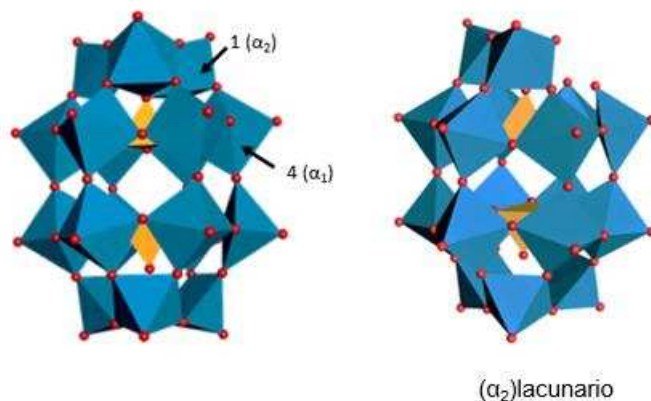


Figura 8. Estructura de los WD-POM (izquierda) y el isómero α_1 -mono lacunario (derecha).

1.2 Materiales híbridos con POMs

1.2.1 Funcionalización orgánica

La funcionalización de los POM con especies orgánicas con enlaces covalente o no covalentes es una manera de introducir nuevas propiedades en los POMs. Estas nuevas combinaciones abren un amplio espectro de posibilidades y desafíos en la investigación. Las estructuras híbridas POM-orgánicas a menudo se dividen en dos clases.

- La primera clase (clase I) involucra especies orgánicas unidas de forma no covalente, generalmente a través de interacciones electrostáticas, es decir, iónicas. Como los POM son grupos aniónicos, la estrategia para obtener estos materiales es intercambiando sus contraiones.¹⁶
- El segundo (clase II) se basa en estructuras que contienen un componente orgánico unido covalentemente al POM, por ejemplo, mediante enlaces M-O-C, M-O-P-C o MO-Si-C. El enfoque covalente requiere funcionalización y, a veces, post funcionalización de los POM.¹⁶ Las plataformas de materiales híbridos de POMs generalmente se refieren a estos materiales ya que contienen grupos reactivos o sitios de ligandos que pueden funcionalizarse adicionalmente, mediante enlaces

covalentes a otras moléculas orgánicas y/o pueden coordinarse con cationes metálicos o grupos que contienen metales.¹⁷

Los materiales híbridos de clase I se profundizarán ya que la interacción electrostática es la interacción catión-POM más común y es el foco de la presente tesis. Las funciones clásicas de los cationes son controlar la disolución, precipitación y purificación de POM, pero también incluye la construcción de la estructura, el ensamblaje supramolecular, la estabilización y la promoción de la reactividad del clúster. Si el catión es un derivado orgánico, se pueden modificar algunas propiedades químicas del POM original.¹⁸ Por ejemplo, la solubilidad, ya que los materiales híbridos podrían ser solubles en disolventes orgánicos si son funcionalizados con cationes voluminosos de alquil-amonio o alquil-fosfonio.¹⁹ Estos cambios en las propiedades resultan del componente inorgánico, los cationes orgánicos y/o la combinación de ambos componentes, y su elección determina las características finales de los materiales híbridos.^{20,21} La comprensión fundamental detrás de la interacción POM-catión está creciendo debido a la nueva instrumentación, métodos computacionales y el descubrimiento de nuevos materiales híbridos.

Las siguientes publicaciones incluyen el desarrollo de compuestos iónicos híbridos de POM funcionalizados y sus aplicaciones relacionadas con el campo de la química medicinal. En 2000, se presentó el estudio de un POM encapsulado con un surfactante. Por primera vez, un POM $[\text{H}_3\text{Mo}_5\text{V}_6(\text{NO})_6\text{O}_{183}(\text{H}_2\text{O})_{18}]^{21-}$ fue encapsulado con éxito con una cubierta de moléculas del compuesto tensioactivo dimetildioctadecilamonio (DODA). La micela resultante abre nuevas perspectivas para mejorar la compatibilidad de POMs con materiales orgánicos y tejidos biológicos mediante la incorporación de las estructuras inorgánicas en materiales blandos orgánicos.²² Este trabajo ha sido pionero en la investigación adicional de grupos encapsulados en tensioactivos no solo en el campo de la química medicinal, sino también en el desarrollo de materiales avanzados con aplicaciones versátiles que incluyen catálisis, magnetismo y luminiscencia.²³ En 2014, una investigación inspirada en hidrogeles biológicos, informó el desarrollo de un nuevo hidrogel híbrido supramolecular basado en el ensamblaje de un Dy-POM y un copolímero tribloque ABA catiónico. El polímero -poli (N, N-dimetilaminoetilacrilato de etileno)₃₅-b-Poli (óxido de etileno)₂₃₀-b-(N, N-dimetilaminoetil metacrilato)₃₅- por interacción electrostática con la sal $(\text{Na})_9[\text{DyW}_{10}\text{O}_{36}] \times \text{H}_2\text{O}$, forma un hidrogel sensible al estímulo

de pH. Esta es una característica interesante para el desarrollo de sistemas de delivery de drogas y sensores ²⁴. En 2015, se describió el desarrollo de un material orgánico-inorgánico flexible y monocapa con aplicaciones relacionadas con el transporte selectivo, la separación molecular y el sistema de diálisis. La interacción electrostática entre los enlaces de puente catiónicos a base de α -ciclodextrina (grupos de azobenceno catiónicos que se conectan con un tri/tetraetilenglicol) y el POM $[\text{PW}_{11}\text{O}_{40}]^{4-}$ fue la fuerza impulsora para la formación del híbrido supramolecular. ²⁵ En 2017, se informó un adhesivo funcional del autoensamblaje de aminoácidos naturales y POM. El uso de POM para impulsar la reticulación no covalente de aminoácidos básicos en solución acuosa da como resultado la formación de estructuras supramoleculares con capacidad de adhesión y características electrocrómicas, como las proteínas adhesivas de los organismos sésiles. Estos adhesivos tienen aplicaciones potenciales en dispositivos biomédicos para tratamientos hemostáticos e implantes para reparar tejidos y huesos. ²⁶ En 2019, se publicó un estudio de una matriz híbrida POM-polímero para la inmovilización de ureasa. El polímero de diureasil estabilizado con un ácido fosfotúngstico por interacciones electrostáticas, fue precursor para formar películas de Langmuir que incorporan la enzima en la monocapa. El objetivo del trabajo fue la prueba de concepto de que la actividad enzimática de la ureasa podría detectarse mostrando el uso potencial de esta metodología para biosensores. ²⁷ Otros ejemplos importantes de materiales híbridos con bioactividad son los llamados POM-IL (líquidos iónicos a base de polioxometalato). Más detalles sobre ellos se dan a continuación en la Sección 1.2.2.

Esta tesis doctoral estudia los derivados híbridos que implican la interacción entre POMs y sustratos orgánicos seleccionados, derivados de xantina y de guanidina, para formar sales iónicas. Se espera que los compuestos híbridos hechos de derivados de xantina muestren actividad antiviral ya que se ha informado que el catión cafeína tiene propiedades anti-VIH (Capítulo 3, sección 3.1). Se espera que los compuestos de derivados de guanidina tengan efectos antibacterianos y antifúngicos, ya que estas bioactividades se han informado para este grupo orgánico de compuestos (Capítulo 2). A continuación, se presenta una introducción de las principales características de las xantinas y las guanidinas.

1.2.1.1 Xantinas

Los alcaloides son una clase de compuestos naturales muy importantes para el desarrollo de fármacos. Durante el siglo XIX, los científicos han aislado y caracterizado familias de alcaloides tales como las xantinas, quinina, atropina, etc. Estos alcaloides son conocidos por sus diversos papeles en la química medicinal incluyendo inhibidores de diversas enzimas de la señalización celular, actividad antibacteriana, actividades metabólicas, etc. Entre estos alcaloides, los derivados naturales de la xantina como la cafeína, la teofilina y la teobromina son compuestos nitrogenados a base de purina que poseen ciertas propiedades medicinales. Algunas aplicaciones terapéuticas se basan en su papel como antagonistas del receptor de adenosina, fármacos antitumorales, fármacos antiasmáticos y fármacos psicoestimulantes.²⁸

Las xantinas son purinas que transportan grupos carbonilo en las posiciones 2 y 6. Su comportamiento de coordinación con los cationes metálicos es de gran interés, ya que son parte del ADN y el ARN. En la Fig. 9, se presentan algunas estructuras de miembros importantes de la familia.²⁹

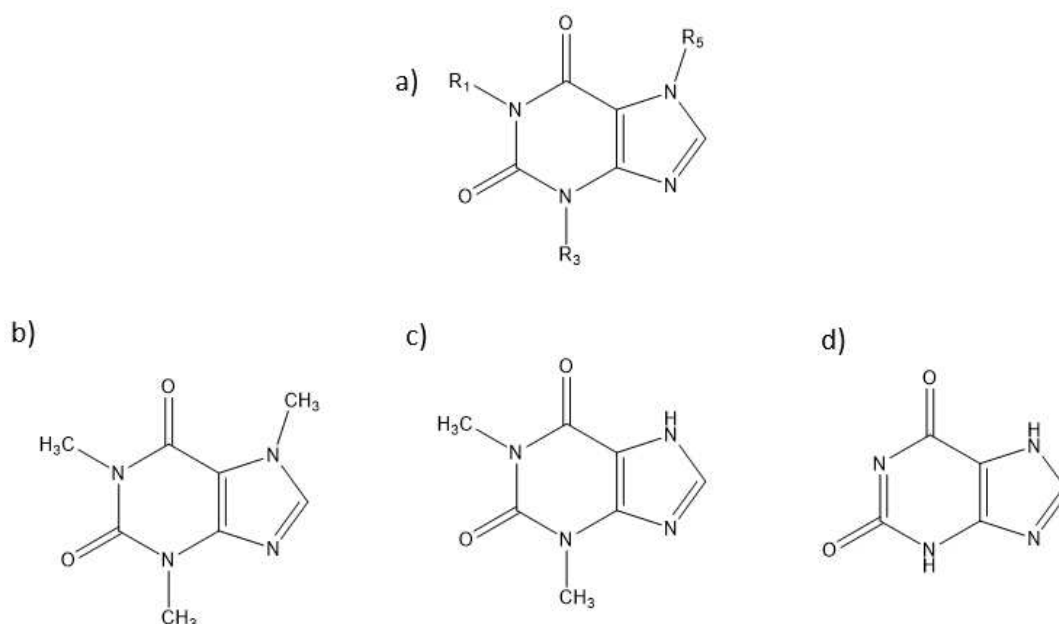


Figura 9. Estructura de los derivados de xantina. (a) La estructura básica de las xantinas. (b) La cafeína tiene R1 = metilo, R3 = metilo, R5 = metilo. (c) Teofilina (R1 = metilo, R3 = metilo, R5 = hidrógeno). (d) Hipoxantina (R1 = hidrógeno, R3 = hidrógeno, R5 = hidrógeno).³⁰

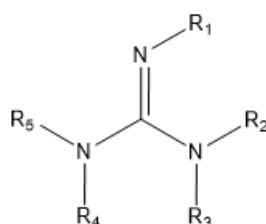
La cafeína, 1,3,7-trimetilxantina, es uno de los derivados de la xantina que generalmente se usa en medicina como estimulante del sistema nervioso central, y su principal modo de acción es la antagonización del receptor de adenosina y la inhibición

de la fosfodiesterasa.³¹ La presencia de cafeína en bebidas como café, té, chocolate, refrescos y bebidas energéticas, le otorgan un reconocimiento popular como la sustancia psicoactiva más consumida del mundo.³²

La cafeína es un compuesto biológicamente activo y un buen candidato para la funcionalización orgánica de los POM con el fin de mejorar la bioactividad de estos grupos. En el capítulo 3, se presentará un nuevo material híbrido de un derivado de cafeína y K-POM con actividad antiviral.

1.2.1.2 Guanidinas

Los derivados de guanidina son una familia de compuestos orgánicos bioactivos. El esquema 2 muestra la estructura general de esta familia de compuestos, que comparten un grupo funcional CN_3 en forma de Y.³³



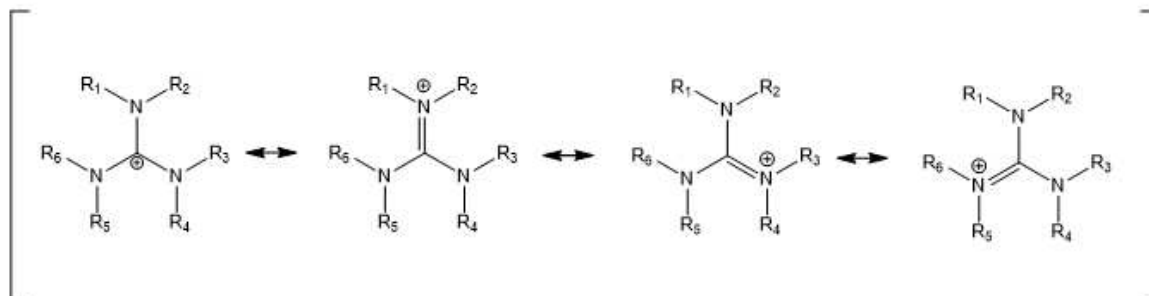
Esquema 2. Fórmula general para guanidinas sustituidas

Los compuestos con el grupo funcional guanidina han encontrado muchas aplicaciones prácticas en diversas áreas de la química, como la catálisis y la química de coordinación. Además, los compuestos con este grupo funcional son adecuados para el desarrollo potencial de fármacos que actúan en el sistema nervioso central, agentes antiinflamatorios, agentes antidiabéticos y quimioterapéuticos, así como cosméticos.³⁴

En su forma protonada o alquilada, el grupo guanidinio (Esquema 3) puede unir aniones tales como carboxilatos, fosfatos, sulfatos y nitratos a través de enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas.³⁴ La longitud de las cadenas laterales y la incorporación de grupos funcionales pueden sintonizar la actividad química de los compuestos.

Los cationes de guanidina (guanidinio) tienen una estructura de resonancia con presencia de electrones deslocalizados en los tres enlaces C-N, y todos los enlaces

C-N tienen longitudes de enlace entre un enlace simple y uno doble (Esquema 3). Esta resonancia proporciona una buena estabilización química de la estructura de guanidinio.



Esquema 3. Estructuras de resonancia del catión hexaalquil guanidinio.

Los derivados de guanidina son compuestos bioactivos y, por la combinación de cationes orgánicos de esta familia y POMs, se espera obtener líquidos iónicos a base de polioxometalato (POM-IL). Los nuevos materiales tendrían propiedades sinérgicas para aplicaciones en el campo de la química médica. Un POM-IL basado en guanidinio con actividad antibacteriana y antifúngica se presenta en Capítulo 2.

1.2.2 POM-líquidos iónicos

Los líquidos iónicos (IL) son sales con un punto de fusión por debajo de 100°C y están formados típicamente por un catión voluminoso orgánico y un anión inorgánico.² Las interacciones coulombicas son las interacciones dominantes entre iones y algunas interacciones intermoleculares ayudan a la organización supramolecular de los ILs. Entre estos, las interacciones de coulomb son responsables de la formación de pares de iones y de los grupos de iones de orden superior y la presencia de enlaces de hidrógeno, induce la direccionalidad estructural, una de las características más interesantes de los ILs.³⁵ Para la mayoría de las aplicaciones, los ILs a temperatura ambiente son los más deseables. Se sabe que los compuestos son posibles de diseñar para una aplicación específica porque la variación del catión y/o anión modifica las propiedades físicas como la viscosidad y la solubilidad.

El campo de los ILs y sus aplicaciones está creciendo en número y diversidad tanto en la investigación académica como en el desarrollo industrial.³⁶ Se han desarrollado una variedad de materiales relacionados con ILs, ya que los ILs se pueden incorporar

fácilmente en diferentes soportes, tales como sílice, carbonos activados, estructuras metálicas orgánicas (MOF) o en una matriz polimérica.³⁷ La elección del soporte depende generalmente de que la actividad deseada del material compuesto sea solo como portador o parte activa del material.

Los cationes más comunes para IL son los cationes de imidazolio, amonio y guanidinio. Una ventaja del catión de guanidinio sobre los otros es la posibilidad de introducir en su estructura seis sustituyentes diferentes y, de esta manera, influir en las propiedades físicas, electroquímicas y químicas del IL. Además, muchos de ellos tienen una alta estabilidad térmica debido a la disipación de la carga positiva que vista en la sección 1.2.2. Los aniones más comunes para IL son aniones orgánicos o inorgánicos como Cl^- , BF_4^- o PF_6^- o $\text{CF}_3\text{SO}_3^{2-}$. Recientemente, se informó la síntesis de POM-ILs donde el POM es el componente aniónico.² La incorporación de POMs en el campo de líquido iónico avanza las fronteras de los materiales compuestos.

Referencias

1. D. Long, R. Tsunashima, L. Cronin, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2010**, *49*, 1736–1758.
2. S. Herrmann, *New Synthetic Routes to Polyoxometalate Containing Ionic Liquids*, Springer Spektrum, Ulm, Germany, **2015**.
3. M. Arefian, M. Mirzaei, H. Eshtiagh-Hosseinia, A. Frontera, *Dalt. Trans.* **2017**, *46*, 9812–6829.
4. D. Long, E. Burkholder, L. Cronin, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 105–121.
5. S. Ivanova, *Rev. Artic. Hindawi* **2014**, *2014*, 1–13.
6. A. Müller, S. Roy, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *245*, 153–166.
7. G. Hervé, A. Tezé, R. Contant in *Polyoxometalate Molecular Science*, (Eds.: J. Borrás-Almenar, E. Coronado, A. Müller, M. Pope), Springer Science, Dordrecht, **2003**, pp. 33-54
8. D. Long, L. Cronin, *Chem. - A Eur. J.* **2006**, *12*, 3698–3706.
9. J. McAllister, H. Miras, in *Polyoxometalate- Based Assemblies and Functional Materials*, (Ed. Y. Song), Springer, Oxford, **2018**, pp. 1-31.
10. J. Keggin, *Nat. Commun.* **1933**, 351.
11. L. Baker, J. Figgis, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 3794–3797.

12. X. López, J. Carbó, C. B. Bo, J. Poblet, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 7537–7571.
13. L. Vilà-Nadal, R. Susanna, X. López, J., in: *Complexity in Chemistry and Beyond: Interplay Theory and Experiment*, NATO Science for Peace and Security Series B: Physics and Biophysics, Springer, Dordrecht, **2012**, 171-183.
14. S. Matsunaga, E. Miyamae, Y. Inoue, K. Nomiya, *Inorganics*, **2016**, *4*, 1–10.
15. X. López, C. Bo, J. M. Poblet, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12574–12582.
16. A. Proust, B. Matt, R. Villanneau, G. Guillemot, P. Gouzerha, G. Izzeta, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 7605–7622.
17. A. Anyushin, A. Kondinski, T. Parac-Vogt, *Chem. Soc. Rev.* **2019**, 27–29.
18. M. Hutin, M. Rosnes, D. Long, L. Cronin, in *Comprehensive Inorganic Chemistry II*, (Eds. J. Reedijk, K. Poeppelmeier), Elsevier Ltd., Oxford, UK, **2013**, pp. 241–269.
19. A. Misra, K. Kozma, C. Streb, M. Nyman, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2020**, 596–612.
20. Y. Martinetto, B. Pégot, C. Roch-Marchal, B. Cottyn-Boitte, S. Floquet, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2019**, 228–247.
21. A. Dolbecq, E. Dumas, R. Mayer, P. Mialane, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 6009–6048.
22. D. G. Kurth, P. Lehmann, D. Volkmer, H. Cölfen, M. J. Koop, A. Müller, A. Du Chesne, *Chem. - A Eur. J.* **2000**, *6*, 385–393.
23. Y. Yan, L. Wu, *Isr. J. Chem.* **2011**, *51*, 181–190.
24. H. Wei, N. Shi, J. Zhang, Y. Guan, J. Zhang, X. Wan, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 9333–9335.
25. L. Yue, S. Wang, D. Zhou, B. Li, H. Zhang, L. Wu, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 1–10.
26. J. Xu, X. Li, J. Li, X. Li, B. Li, Y. Wang, L. Wu, W. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 8731.
27. C. Vinícius, T. Rossini, C. Molina, L. Caseli, *Thin Solid Films* **2019**, *670*, 17–23.
28. N. Singh, A. Kumar, M. S. Thakur, S. Patra, *Heliyon*, **2018**, *4*, e00829.
29. O. Külh, *Functionalised N-Heterocyclic Carbene Complexes*, John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex, **2010**.
30. T. Motegi, M. Katayama, Y. Uzuka, Y. Okamura, *Res. Vet. Sci.* **2013**, *95*, 600–605.
31. A. Kascatan-Nebioglu, M. J. Panzner, J. C. Garrison, C. A. Tessier, W. J. Youngs, *Organometallics* **2004**, *23*, 1928–1931.

32. S. Cappelletti, P. Daria, G. Sani, M. Aromatario, *Curr. Neuropharmacol.* **2015**, *13*, 71–88.
33. C. Alonso-Moreno, A. Antiñolo, F. Carrillo-Hermosilla, A. Otero, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 3406–3425.
34. F. Saczewski, Ł. Balewski, *Expert Opin Ther Pat.*, **2013**, *23*:8, 965-995.
35. J. Dupont, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 1223–1231.
36. N. V Plechkova, K. R. Seddon, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 123–150.
37. D. MacFarlane, M. Kar, J. Pringle, *Fundamentals of Ionic Liquids Ionic Liquids: from chemistry to applications*, Wiley VCH, Weinheim, Germany, **2017**.

Objetivos

Los objetivos de este trabajo se centran en el desarrollo de nuevos materiales iónicos basados en polioxometalatos con actividad contra microorganismos patógenos. Se pretende diseñar, sintetizar, caracterizar y analizar su comportamiento en sistema biológico – mecanismo de acción, potencial terapéutico y futuras direcciones clínicas.

- Objetivo específico I: Diseñar, sintetizar y caracterizar compuestos con polioxometalatos funcionalizados, con derivados orgánicos cuya bioactividad es conocida, y que posean actividad contra diferentes microorganismos.
- Objetivo específico II: Estudiar las propiedades fisicoquímicas como la estabilidad y la lipofilidad de los materiales híbridos.
- Objetivo específico III: Evaluar el mecanismo de acción y el potencial terapéutico mediante estudios de acoplamiento in vitro y molecular.

Se espera que los resultados contribuyan al diseño de terapias antivirales alternativas y al conocimiento del mecanismo de acción de los polioxometalatos como agentes antivirales, antibacterianos y antifúngicos.

Esta tesis presenta perspectivas interesantes para la farmacología inorgánica en el desarrollo de agentes terapéuticos altamente eficientes y de baja toxicidad.

Capítulo 2: Actividad antibacteriana y antifúngica de films que contienen un IL de guanidinium-POM

2.1 Introducción

El desarrollo de resistencia antimicrobiana es un problema a escala mundial. Se requieren nuevos medicamentos y materiales para prevenir la propagación de infecciones causadas por organismos resistentes a los tratamientos antimicrobianos disponibles actualmente. Esto crea el desafío de obtener nuevos antibióticos y alternativas terapéuticas.¹ La resistencia antimicrobiana desarrollada por patógenos humanos se muestra en la figura 1.

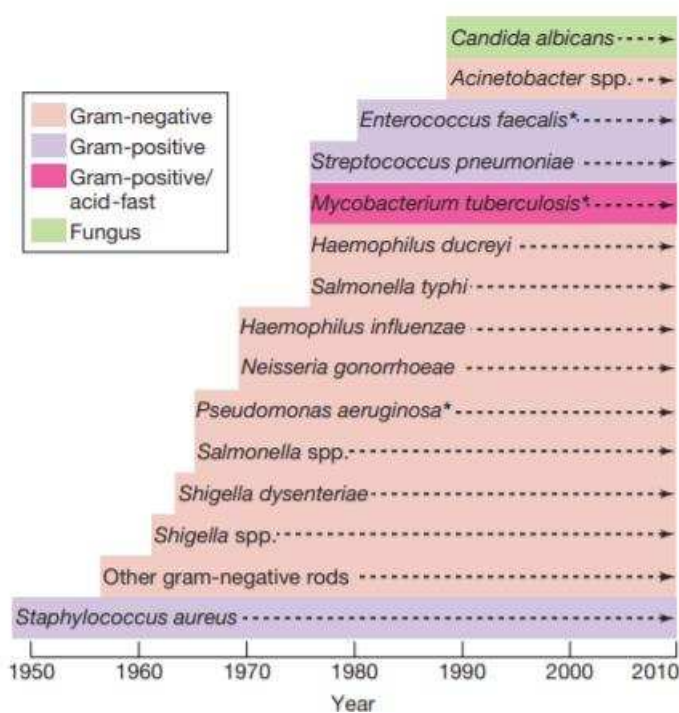


Figura 1. Patógenos humanos que han mostrado resistencia a los medicamentos antimicrobianos. Los asteriscos indican que algunas cepas de estos patógenos, hoy en día, no se pueden tratar con medicamentos antimicrobianos conocidos. Reimpreso en su idioma original con permiso de la ref. 2 Copyright © 2012, Pearson Education, Inc.

Una de las razones de la resistencia a los antimicrobianos es la capacidad de algunos patógenos de formar un biofilm. Este proceso microbiológico ocurre cuando los microorganismos se unen irreversiblemente a las superficies y crecen allí produciendo polímeros extracelulares (principalmente polisacáridos) que facilitan la unión y la formación de la matriz. Las bacterias *E. coli* y *Staphylococcus aureus* son ejemplos que pueden formar microcolonias y hacer crecer el biofilm.³

Para probar nuevos compuestos que pueden exhibir un amplio espectro de actividad antimicrobiana, se usan bacterias *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) como modelo Gram (+) y *Escherichia coli* (*E. coli*) como modelo Gram (-). Ambos grupos de bacterias tienen una estructura rodeada de membranas protectoras. Las bacterias Gram (+) poseen una sola capa de membrana citoplasmática además de una pared celular gruesa y rígida (peptidoglicano). Las bacterias Gram (-) tienen una capa más delgada de peptidoglicano intercalada entre dos membranas: la membrana citoplasmática y una membrana externa (Fig. 2). Estas diferencias en la estructura celular protectora son uno de los desafíos en el descubrimiento de medicamentos contra las bacterias Gram(-).¹

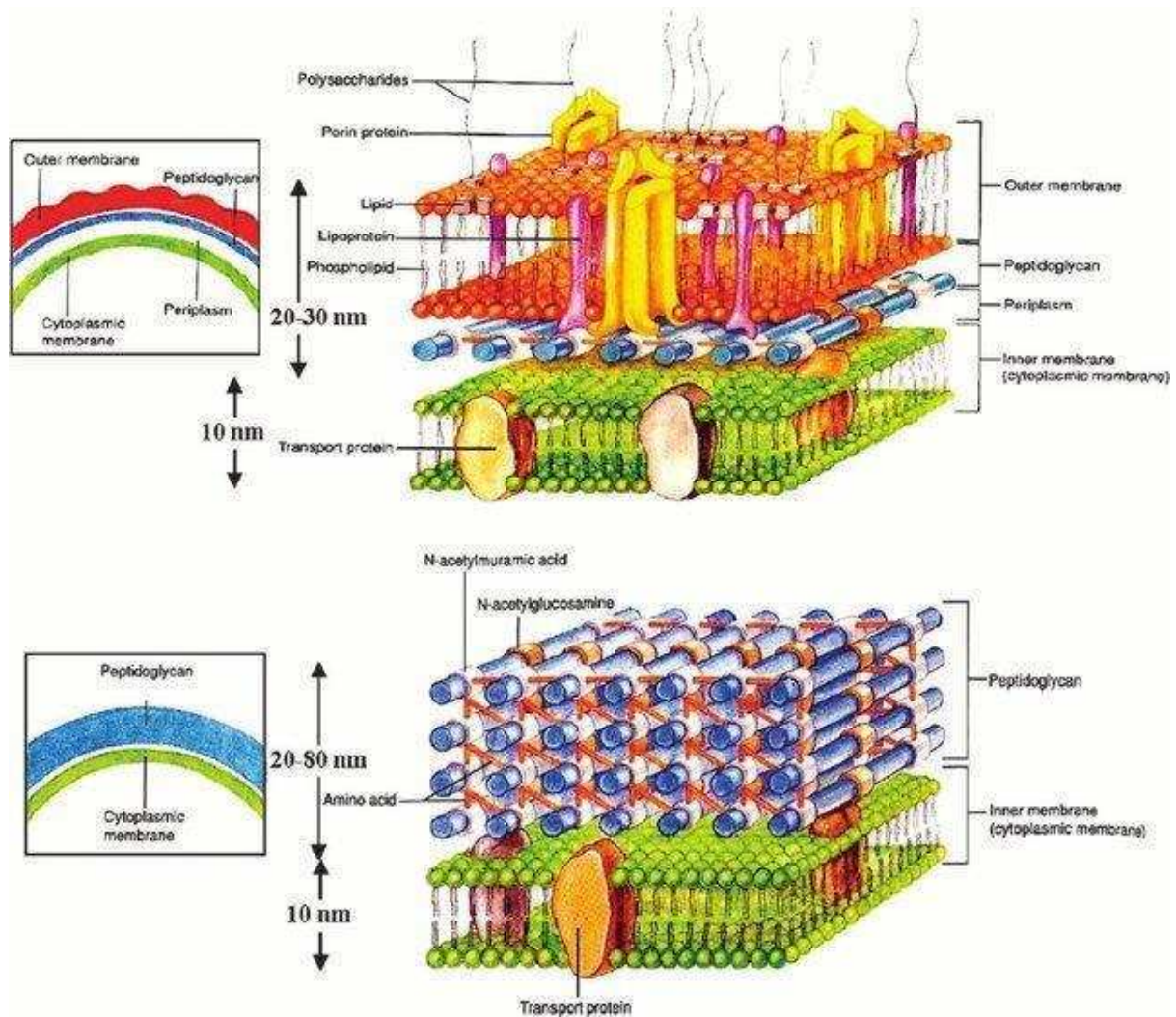


Figura 2. Vistas esquemáticas de las paredes celulares de bacterias Gram-negativa (arriba) y Gram-positiva (abajo), que muestran el ensamblaje complejo de compuestos de alto peso molecular.⁴ Reproducido de la Ref. 4 en su idioma original y con permiso de la Royal Society of Chemistry.

B. subtilis pertenece a la familia *Bacillaceae* mientras que *E. coli* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Ambos organismos tienen forma de bacilo.

Algunas especies de *E. coli* están asociadas con enfermedades gastrointestinales humanas y su presencia se vuelve relevante para la seguridad alimentaria y sanitaria. Se consideran patógenos transmitidos por el agua y su exposición es un riesgo para la salud pública.⁵

Algunos patógenos fúngicos también constituyen un problema de salud pública, ya que pueden desarrollar resistencia a los antimicóticos, en parte debido a su modo de crecimiento de biofilms. El desarrollo de un fármaco antifúngico, en comparación con los antibacterianos, es más difícil debido a la naturaleza eucariota de las células. Los agentes antifúngicos que actúan sobre las vías metabólicas en los hongos a menudo actúan de manera similar en las células huésped, aumentando la citotoxicidad de estos compuestos. Por lo tanto, el desarrollo de agentes antifúngicos más efectivos y seguros es una prioridad en el campo de la química médica.⁶

2.1.1 Actividad antibacteriana y antifúngica de los POM

Se ha informado que varios POMs poseen actividad antibacteriana y unos pocos poseen actividad antifúngica. Es importante destacar que el área de investigación de la actividad antifúngica de los POMs no ha sido del todo explorado.

El mecanismo de acción de los POM como agentes antibacterianos aún no ha sido suficientemente dilucidado. En general, la bioactividad de los POM se debe a interacciones con aminoácidos de proteínas que conducen a respuestas biológicas que afectan la viabilidad de la célula bacteriana.⁷

En las últimas décadas, se llevaron a cabo estudios sobre la actividad antibacteriana de los POMs, y los más relevantes se mencionan a continuación. La búsqueda de esta información se basó en sus actividades antibacterianas y antifúngicas y en su capacidad para combinarse con compuestos orgánicos, y de formar parte de un material nanocompuesto.

Las siguientes publicaciones están relacionadas con la actividad antibacteriana de los POM y su efecto sinérgico con antibióticos conocidos y compuestos bioactivos orgánicos. En 2006, se informó la actividad de varios POM en combinación con oxacilina contra *S. aureus* resistente a meticilina y vancomicina.^{8,9} La presencia de $K_6 [P_2W_{18}O_{62}] \times 14H_2O$, $K_4 [SiMo_{12}O_{40}] \times 3H_2O$, $K_7 [PTi_2W_{10}O_{40}] \times 6H_2O$, y $K_9H_5[\alpha-Ge_2Ti_6W_{18}O_{77}] \times 16 H_2O$ dio como resultado la inhibición de la proliferación celular de

las cepas, debido a un efecto sinérgico de los POMs y el antibiótico mencionado. La duración en el tiempo de la inhibición celular aumentó al incrementar la concentración de POMs, dependiendo de la cantidad de inóculo de cepa inicial.⁸ En 2017, se informó sobre la síntesis y caracterización de compuestos de feniletinida de plata (I) basados en POM con actividades antibacterianas y antifúngicas. Estas actividades fueron evaluadas por el método de difusión en disco de las cepas de bacterias *B. pumilus*, *B. subtilis*, *S. aureus* y *E. coli*, y los hongos *Aspergillus niger* y *Candida albicans*. Los resultados biológicos de prueba de toxicidad mostraron que estos compuestos tienen baja toxicidad en líneas celulares humanas y de animales, y que sus propiedades antibacterianas y antifúngicas son comparables a los de los fármacos antibióticos gentamicina y anfotericina B.¹⁰

Los polioxometalatos y péptidos poseen una capacidad intrínseca de auto ensamblarse en arquitecturas biológicas versátiles. En 2007, por primera vez, se informó la combinación de aminoácidos y un fosfomolibdato que forma un material antimicrobiano insoluble en agua y biocompatible. Los aminoácidos utilizados fueron glicina, lisina e histidina y el material resultó con actividad antibacteriana contra *E. coli*.¹¹ En 2017, se informó la construcción de una estructura supramolecular de polímero-polioxometalato basada en péptidos. Debido a la sinergia de ambos compuestos, el polímero y el POM, los nanocompuestos resultaron con mayor actividad antimicrobiana y actúan por un mecanismo diferente que sus precursores. El péptido catiónico actúa a través del mecanismo de disrupción de la membrana, mientras que el mecanismo de los nanocompuestos se debe principalmente al daño celular mediado por radicales libres.¹²

Con respecto a los nanomateriales, vale la pena mencionar las publicaciones relacionadas con la mejora de la actividad antibacteriana de las nanopartículas y los POMs. En 2013, se demostró la funcionalización secuencial de la superficie de nanopartículas de oro reducidas en tirosina (AuNPsTyr) con POMs. Además, la lisina se usó para explorar la actividad antimicrobiana impulsada por la funcionalidad química de manera controlada. La investigación reveló que las nanopartículas de oro altamente biocompatibles pueden funcionalizarse superficialmente con aminoácidos y POMs para el diseño de un fuerte agente antibacteriano contra *E. coli*.¹³ En 2014, se presentó una nueva estrategia para mejorar el potencial antibacteriano de las nanopartículas de plata (AgNP) mediante su modificación de la superficie con POMs. La investigación, basada en *E. coli* y *Albus staphylococcus*, demostró que la

combinación de los POM y AgNPs con tirosina, resultó en un efecto sinérgico que mejora el daño físico a las células bacterianas. Los nanomateriales evidenciaron ser biocompatibles y se sugirió su potencial aplicación como antimicrobiano específico para la cicatrización de heridas tópicas.¹⁴ En 2014, se publicó un estudio sobre cápsulas antimicrobianas supramoleculares ensambladas a partir de POMs y quitosano. Se describió una estrategia basada en tensioactivos para formar estructuras nano híbridas organometálicas esféricas con propiedades antimicrobianas. Se demostró que el crecimiento de *E. coli* se vio afectada por la presencia del nanomaterial y el tamaño de los materiales compuestos.¹⁵ En 2018, se publicó una revisión de la actividad antibacteriana de los POM, que incluye avances recientes en la síntesis, propiedades y desarrollo de estructuras híbridas y nano compuestas biológicamente activas con POM.⁷ Es importante destacar la relevancia del desarrollo de estrategias nanotecnológicas en el campo de los materiales avanzados relacionados con los POM.

2.1.2 Actividad antibacteriana de POM-IL

La actividad antibacteriana de los líquidos iónicos POM (POM-IL) como una nueva clase de antimicrobianos está actualmente en investigación. Las POM-ILs basados en aniones de tipo Keggin ($\alpha\text{-SiW}_{11}\text{O}_{39}$)⁸⁻ con iones tetraalquilamonio como especies catiónicas activas, evidenciaron poseer actividad contra importantes patógenos humanos: *E. coli*, *P. aeruginosa* y especialmente contra la Gram (+), *S. aureus*. En la misma publicación, se mencionó que los K- POM lacunarios son más efectivos que los completamente saturados, lo que sugiere que el sitio lacunario podría desempeñar un papel interesante en la actividad antibacteriana y también a la capacidad de combinarse con mayor cantidad de contra cationes que son bioactivos. Estos ILs tienen cadenas de alquilo (C7 y C8) en su estructura para interactuar con las membranas lipídicas de la célula bacteriana. También se informó que la actividad antibacteriana de estas IL permanece después de ser soportada en diferentes superficies como partículas de sílice y piedras que se encuentran en monumentos.^{16,17}

2.2 Films multifuncionales basadas en un líquido iónico guanidinium-POM

Es una preocupación mundial descubrir nuevos compuestos antibacterianos, basándose en estudios de la resistencia a los antibióticos adquirida por las bacterias. Recientemente, ha habido un aumento en el número de guanidinas reportadas como nuevos biocidas.¹⁸ Por ejemplo, los antibióticos estreptomycin y gluconato de clorhexidina tienen un núcleo de guanidinio en sus estructuras químicas y algunos desinfectantes comerciales contienen sales de dodecil guanidinio.¹⁹ Los compuestos de guanidina pueden protonarse para formar cationes de guanidinio que pueden combinarse con diferentes aniones. Los polímeros catiónicos biocidas como las poliguanidinas y las polibiguanidas exhiben una alta actividad antibacteriana y baja toxicidad. Una serie de derivados de fenil guanidinio también exhiben actividad antifúngica. Desde esta perspectiva, una combinación de un catión voluminoso de guanidinio con un POM podría conducir a la formación de un material antimicrobiano.

En este capítulo, se presenta el desarrollo de un film multifuncional antibacteriano y antifúngico basada en un nuevo líquido iónico de guanidinio-POM. Se estudia la caracterización y la actividad de los precursores y de los films contra microorganismos. Los films podrían estar destinados para ser utilizados como recubrimientos de superficie antimicrobianos en entornos clínicos.

En este trabajo, se presentan la combinación de un catión de guanidinium estéricamente exigente con un Keggin POM lacunario, lo que resulta en un nuevo líquido iónico. Este líquido iónico (DOTMG-1) se preparó por intercambio iónico empleando la *N, N, N', N'*-tetrametil-*N'', N'''*-dioctylguanidinium bromuro de sal (DOTMG⁺ Br⁻) con la sal de potasio de polioxometalato -K₈ α[SiW₁₁O₃₉]. En la Figura 3, se presentan las estructuras químicas de estos compuestos.

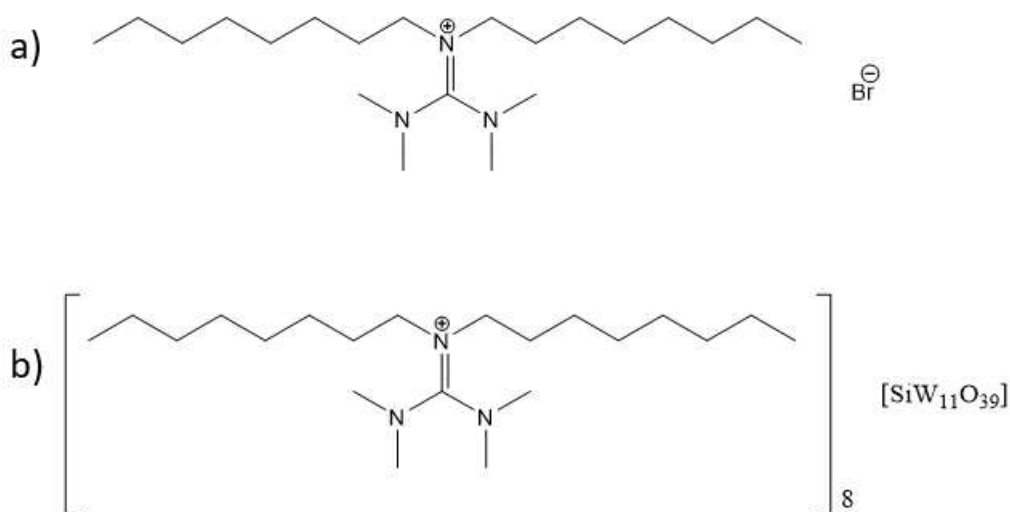


Figura 3. Representación esquemática de las estructuras químicas de a) DOTMG-Br y b) DOTMG-1.

Para el nuevo POM-IL y el precursor, se determinó la lipofilicidad utilizando parámetros cromatográficos para estudiar su perfil fisicoquímico. Para evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica y la toxicidad contra las células de mamíferos, se realizaron estudios *in vitro*.

Se sabe que los líquidos iónicos, en general, requieren una matriz portadora para formar films delgados. Se demuestra que al disolver el polímero de polimetilmetacrilato (PMMA) y DOTMG-1 en el mismo disolvente orgánico y usar la técnica de recubrimiento por rotación (spin-coating), es posible preparar un film multifuncional en el que el líquido iónico se impregna en la matriz polimérica.²⁰ En las siguientes secciones, se presenta la preparación de los films y los estudios para analizar su capacidad de inhibición y el impacto de la presencia de POM-IL en la topografía de la superficie y la efectividad para la inhibición bacteriana. Se espera que el recubrimiento sea biocompatible, fácil de manipular y con actividad antimicrobiana.

En la siguiente sección, se presentan los fundamentos de las diferentes técnicas microscópicas que participan en los estudios antimicrobianos y en la caracterización microestructural de los materiales.

Técnicas microscópicas

La caracterización de los materiales implica la determinación del tamaño, la forma y la distribución de fases. La microscopía electrónica de barrido (SEM), la microscopía electrónica de transmisión (TEM) y el microscopio de fuerza atómica (AFM) se utilizaron para estudiar estas características.

Los microscopios electrónicos usan un haz de electrones en lugar de luz, y una bobina deflectora en lugar de lente, lo que permite tener una resolución muy alta.

- SEM

Es una microscopía capaz de producir imágenes de gran aumento y muy alta resolución. El principio de funcionamiento de SEM se basa en el uso de un haz de electrones de pequeño diámetro que interactúa con la superficie de la muestra y se emiten varias señales, lo que permite explorar la superficie de la muestra punto por punto.

Los electrones primarios son emitidos por un cañón de electrones y típicamente son acelerados y enfocados espacialmente a un punto por una o dos lentes condensadoras. El diámetro del haz incidente en el SEM debe ser lo más pequeño posible ya que determina la resolución espacial del instrumento. Los haces de electrones pasan a través de bobinas de escaneo conectadas en la columna, ubicadas justo arriba de la lente del objetivo, para lograr la desviación en las direcciones x e y para escanear y cubrir un área cuadrada de la muestra. Cuando los electrones primarios entran en contacto con la muestra, pierden energía debido a la dispersión aleatoria repetida y absorción en la muestra. El volumen que contiene la mayoría de los electrones dispersos se llama volumen de interacción. Desde la parte superior de la superficie de la muestra se emiten varias señales, como electrones secundarios, electrones retrodispersados y rayos X característicos de la muestra, que son detectados por detectores especiales. Estas señales se amplifican y se muestran en el tubo de rayos catódicos (CRT) o en una pantalla de plana. El haz de electrones en la exploración CRT o los voltajes generados por computadora se sincronizan perfectamente con el haz incidente y el resultado es una imagen que mapea de intensidad de las señales emitidas.²¹

Por lo general, el escaneo se realiza a una velocidad de video (aproximadamente 60 pixel/segundo) para enfocar el espécimen a estudiar, y luego a mayor aumento y bajo

escaneo para grabar una imagen de buena calidad. Si el modo de imagen SEM es la imagen secundaria de electrones (la más común), la señal detectada son los electrones secundarios. Estos electrones son electrones de baja energía (<50 eV) expulsados por la dispersión inelástica y son muy útiles para examinar la topografía de la superficie con alta resolución espacial. El brillo de la señal depende del número de electrones secundarios que llegan al detector y es sensible a la topografía de la superficie de la muestra. El rendimiento es más bajo para la incidencia normal (perpendicular) y aumenta mientras que el ángulo entre el haz primario y la incidencia normal en la superficie aumenta.

La microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) funciona de manera similar a la SEM, pero es útil para estudiar muestras biológicas en su estado natural como hidratadas y con una superficie no conductora. El sistema de bombeo del ESEM permite la transferencia del haz de electrones desde el alto vacío a la región de alta presión donde se coloca la muestra. El detector utilizado habitualmente es un dispositivo de detección de gases diseñado para detectar señales del entorno gaseoso del ESEM.²²

- TEM

Esta técnica es útil para obtener una morfología completa, que incluye el tamaño de grano, los límites de grano y la interfaz, defectos en su naturaleza y estructuras cristalográficas y atómicas. Los electrones pasan a través de la muestra y se transmiten para formar una imagen.

El sistema óptico-electrónico contiene la pistola de electrones, que produce el haz de electrones, y varias lentes magnéticas, colocadas verticalmente en la columna. Las lentes del condensador enfocan el electrón en la muestra y, junto con la pistola, forman parte del sistema de iluminación. La etapa de muestra está diseñada para mantener la muestra lo más estacionaria posible para evitar los ruidos o las vibraciones que podrían traducirse en la imagen. El otro sistema del microscopio es el sistema de imágenes y está compuesto por las lentes que juntas producen una imagen ampliada de la muestra en la pantalla. El diseño de las lentes determina la resolución espacial de las imágenes obtenidas.

En el modo de imagen de campo brillante, el área formada por electrones que permanece sin dispersar (transmitida) aparece brillante en relación con la muestra. Estos electrones se seleccionan con la apertura del objetivo insertada y centrada alrededor del eje óptico de la lente del objetivo. Las regiones de mayor número atómico o regiones más gruesas aparecen oscuras en este modo, ya que muchos de los electrones incidentes son absorbidos por el diafragma objetivo, y debido al aumento en la cantidad de dispersión elástica, respectivamente. Estos efectos se denominan contraste de grosor de masa (mass-thickness contrast). Este modo se usa comúnmente para estudiar muestras biológicas ya que los agentes de tinción (con un número atómico promedio más alto) aparecerán más oscuros para que la muestra biológica se vea más clara.²¹

- AFM

Esta técnica permite la visualización y manipulación de estructuras a escala nanométrica o atómica. La muestra se escanea por un micro – cantiléver flexible con una punta afilada que se dobla bajo la influencia de fuerzas. La punta generalmente tiene un diámetro del orden de nanómetros y está hecha de silicio. Cuando la punta está cerca de la superficie de la muestra, la fuerza entre la punta y la muestra conduce a una desviación del cantiléver de acuerdo con la ley de Hooke. La desviación se mide usando un láser reflejado desde la superficie superior del cantiléver sobre un sistema de fotodiodos (Fig. 4).²³

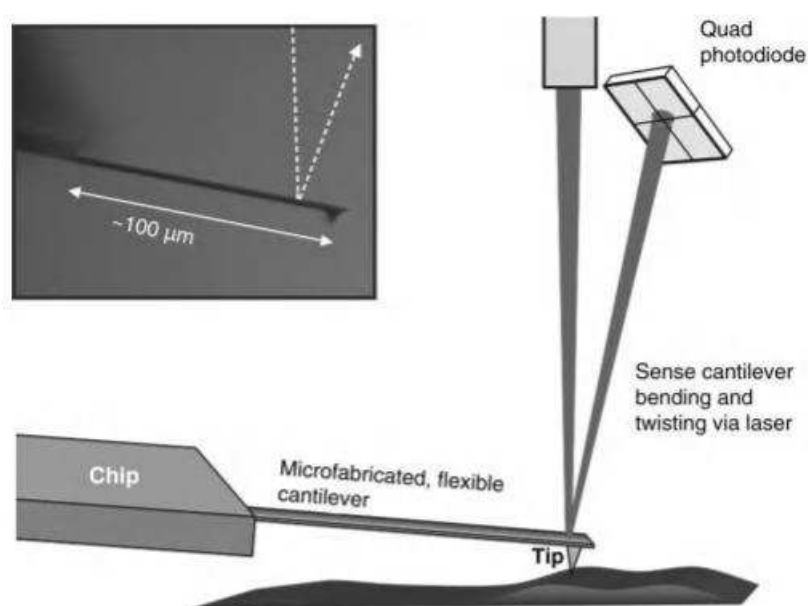


Figura 4. Los componentes centrales de la AFM. Reproducido con permiso de la Ref. 23. Copyright © 2012 por John Wiley & Sons, Inc

Hay tres modos comunes de AFM: modo de contacto, modo sin contacto y modo intermitente. En el primero, la punta escanea la muestra por contacto directo y con una fuerza muy baja y la desviación se debe a las fuerzas repulsivas entre la punta y los átomos de la superficie de la muestra. Este modo no es adecuado para materiales blandos, ya que puede dañar la muestra. En el modo sin contacto, la punta oscila a una frecuencia ligeramente superior a su frecuencia de resonancia y la amplitud de la oscilación es de pocos nanómetros. Las fuerzas que se extienden sobre las superficies, como las fuerzas de Van der Waals, disminuyen la frecuencia de resonancia del voladizo y, combinado con un sistema de bucle de retroalimentación, mantienen una frecuencia constante ajustando la distancia promedio de punta a muestra. Este modo no se usa en materiales hidrofílicos debido a que la presencia de la capa de menisco líquido en condiciones ambientales da como resultado imágenes de baja resolución. El último modo, también llamado tapping mode, se usa ampliamente para biomateriales o materiales blandos porque hay un contacto intermitente de la punta con la muestra directamente, pero no se aplica fuerza de fricción lateral a la muestra y la información topográfica proporcionada por la microscopía. Es con una muy buena resolución. En este modo, el cantiléver oscila hacia arriba y hacia abajo cerca de su frecuencia de resonancia, pero la amplitud de la oscilación es típicamente de 100-200 nm. Las fuerzas, como la electrostática y Van der Waals, actúan sobre el cantiléver y la amplitud de la oscilación disminuye cuando la punta se cierra a la superficie. Mientras se realiza la exploración sobre la muestra, el sistema de control ajusta la altura del cantilever para mantener constante la amplitud de oscilación o la frecuencia.²²

El AFM tiene muchas ventajas en comparación con otros microscopios, ya que requiere una preparación de muestra simple y no es necesario tener una superficie conductora, proporciona imágenes 3D simultáneamente y además de las imágenes de altura, también se pueden obtener imágenes de fase. Además, durante el análisis, no se requiere vacío, y es adecuado para estudiar muestras biológicas.

2.2.1 Sección experimental

2.2.1.1 Materiales y métodos.

Observaciones generales: todos los reactivos y productos químicos fueron suministrados por SIGMA ALDRICH, FISHER CHEMICALS, ABCR CHEMICALS y ACROS ORGANICS. Los materiales se usaron sin purificación adicional. A menos que se describa lo contrario, las reacciones se llevaron a cabo bajo presión atmosférica. La sal de resazurina de sodio, fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico, trihidrato de cacodilato de sodio, glutaraldehído al 25%, DMSO, NaCl, solución salina tamponada con fosfato (PBS), usados en los ensayos *in vitro*, también fueron de Sigma-Aldrich. Todos los medios de cultivo fueron de Scharlab, SL (España).

Para los ensayos bacterianos, se utilizaron los siguientes medios de cultivo: agar triptona de soja (TSA), agar Mueller Hinton suplementado con cloranfenicol (MHA) y agar de infusión de cerebro-corazón (BHIA) como medio sólido; Luria-Bertani (LB) y caldo de nutrientes (NB) como medios líquidos.

Para los ensayos fúngicos, se utilizaron los siguientes medios de cultivo: Agar Sabouraud Dextrosa suplementado (SDA) con cloranfenicol, Agar de malta de levadura (YMA) y Agar papa dextrosa (PDA) como medio sólido; RPMI 1640, caldo de malta de levadura (YMB) y peptona de dextrina de malta (MEP) como medio líquido.

Análisis elemental (EA): el análisis elemental se realizó en un equipo de análisis elemental Carlo Erba 1108.

Espectroscopía de emisión atómica plasmática acoplada inductivamente (ICP-AES): se realizó en un espectrómetro Perkin Elmer Plasma 400.

Resonancia Magnética Nuclear (RMN): ^1H y ^{13}C espectros de RMN se registraron en Bruker Avance 600 (1H: 600,13 MHz; 13C: 151,87 MHz) y Bruker Avance 500 espectrómetros (1H: 500,14 MHz, 13C: 125,76 MHz).

Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR): para el POM, la espectroscopía FT-IR se realizó en un espectrofotómetro Bruker Vector 22 FTIR. Las muestras se prepararon como gránulos KBr. Para los films, se utilizó espectrómetro Jasco 4700 con un soporte magnético. Las señales se dan como números de onda en cm^{-1} usando las siguientes abreviaturas: vs = muy fuerte, s = fuerte, m = medio, w = débil y b = amplio.

Análisis de termogravimetría (TGA): TGA se realizó en un instrumento Shimadzu TGA-51; Se calentaron muestras de aproximadamente 10 mg a una velocidad de $10^\circ\text{C} / \text{min}$ en atmósfera de aire (30 ml / min), en el intervalo de 30 a 800°C .

Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC): los experimentos se realizaron en un sistema UHPLC Agilent 1260 Infinity (Waldbronn, Alemania) equipado con una bomba binaria, membrana desgasificadora, muestra automática, compartimento de columna del horno, UV-Vis (Ultra Violet -Visible) detector de matriz de diodos, y el paquete de software OpenLab CDS Chemstation (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) para controlar el instrumento, la adquisición de datos y el análisis. La separación se realizó inyectando 15 µL de soluciones estándar de trabajo en una columna analítica ZORBAX XDB-C18 (75 mm × 4.6 mm, 3.5 µm). Todas las mediciones de pH se llevaron a cabo con un potenciómetro 410A Orion (Massachusetts, Estados Unidos) equipado con un Boeco BA 17 (Hamburgo, Alemania). Para **la medición de la lipofilicidad:** las soluciones estándar se prepararon pesando y disolviendo exactamente en acetonitrilo (ACN) cantidades apropiadas de DOTMG-Br o DOTMG-1 para alcanzar concentraciones de 30 mg/L. La fase móvil binaria consistió en una solución acuosa de 10 mmol/L de sal de sodio de ácido heptano-1 sulfónico (A) (pH 7.0) y ACN (B), administrada a 0.300 mL/min. La temperatura de la columna se ajustó a 25 °C. Durante la secuencia del experimento, se inyectaron volúmenes de muestra de 5 µL y se analizaron usando diferentes fases móviles de la siguiente manera: la composición estaba cambiando en un 1% en cada medición [10 mediciones, comenzando en 20 (A): 80 (B) y terminando con 10 (A): 90 (B)]. Los cromatogramas UV se registraron a 230 nm.^{24, 25, 26, 27}

Ensayo de citotoxicidad: se realizó utilizando el ensayo de viabilidad de células luminiscentes Cell Titer Glo (Promega, EE. UU.), la incubadora de CO₂ Steri-Cult 3311 (Thermo Scientific, EE. UU.) y el luminómetro de microplacas Orion II (Titertek-Herthold, Alemania). Se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las líneas celulares utilizadas fueron HEK293T (línea celular de riñón embrionario humano, utilizada para la transfección transitoria) obtenida a través de ATCC® (CRL-3216TM), y TZM-bl (derivado de células HeLa utilizado como línea celular indicadora para la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana por VIH) obtenido a través del NIH (Instituto Nacional de Salud) - Programa de reactivos para el SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida) (número de catálogo 8129). Para evaluar la actividad citotóxica potencial, se disolvieron inicialmente 100 mg de DOTMG-1 y DOTMG-Br en 1 ml de dimetil sulfóxido (DMSO) y la solución de concentración inicial se diluyó adicionalmente 1: 200 en PBS, para evitar cualquier efecto citotóxico relacionado con DMSO. Las células HEK293T y TZM-bl se sembraron en una placa

de 96 pocillos en 100 μ l de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) para tener una confluencia celular del 30-40% en el momento de la siembra. Al día siguiente, las células se incubaron con una dilución serial de DOTMG-1 y DOTMG-Br, con DMSO como solo control negativo y Tritón-X 100 como control positivo para la muerte celular. Las células se incubaron durante 2 días a 37 °C y se evaluó la viabilidad celular con el ensayo Cell Titer Glo midiendo la cantidad total de trifosfato de adenosina (ATP). La determinación de la concentración citotóxica 50 (CC50) se realizó utilizando el log (inhibidor) *frente a la* respuesta: opción de regresión no lineal de pendiente variable (cuatro parámetros) disponible en el software Graph Pad Prism 8.

Ensayos de proliferación microbiana: se registró el crecimiento bacteriano y fúngico midiendo la densidad óptica (DO) de las muestras a 620 nm durante un período de 24 horas utilizando un lector de microplacas (Thermo Scientific MULTISKAN GO). Los resultados se compararon con la variación de DO de un cultivo de control que contiene solo bacterias u hongos. Todos los controles y ensayos antibacterianos se replicaron seis veces para verificar la reproducibilidad de los resultados y calcular los valores medios y las desviaciones estándar.

Microscopía electrónica de barrido (SEM): las imágenes SEM se obtuvieron utilizando un microscopio electrónico de barrido Phenom Pro (SEM). Para todas las imágenes, la distancia de trabajo fue de 2.5 ± 0.5 mm. Los films se apoyaban en obleas de Si y no fueron recubiertas con pulverización catódica. Para el film A, el estudio se realizó utilizando un voltaje de aceleración de 5 kV y un soporte de reducción de carga (CRH). Estos parámetros se establecieron para obtener imágenes de buena calidad de la muestra ya que el film solo consistía en PMMA. Para los films B, C y D, el estudio se realizó utilizando un voltaje de aceleración de 5 kV y un soporte estándar (SH).

Microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM): los datos se recolectaron en un SEM de emisión de campo Quanta FEG-250 (FEI Company) para imágenes de alta resolución que funcionan en modo ESEM usando un detector de electrones secundario gaseoso (GSED) en condiciones de alta humedad relativa.

Microscopía de fuerza atómica (AFM): las imágenes de AFM se obtuvieron utilizando un Bruker Multimode 8 SPM (Santa Bárbara, CA, EE. UU.) Con un controlador NanoScope V (Santa Bárbara, CA, EE. UU.). Las imágenes AFM se adquirieron en modo intermitente utilizando puntas de silicio dopadas con antimonio,

con una constante de resorte de 42 N/m y una frecuencia de resonancia de 320 kHz. Se exploraron áreas de típicamente $15\ \mu\text{m} \times 15\ \mu\text{m}$. El análisis de la imagen se realizó con Gwyddion versión 2.46 (Brno, República Checa). La rugosidad superficial promedio (R_a) se determinó a partir de imágenes de altura AFM.²⁸ Para cada imagen de altura, se definió un plano de referencia (plano medio) y se consideró un eje Z, perpendicular a ese plano, donde $Z = 0$ estaba en el plano. Los valores Z se calcularon a partir de las imágenes de manera discreta, donde Z_j se definió como la altura del j -píxel desde el plano medio. Los valores Z positivos están asociados con protuberancias por encima del plano medio, mientras que los valores Z negativos están asociados con depresiones debajo del plano. La R_a de cada imagen AFM se determinó como la desviación promedio de los valores de altura del plano medio, al considerar M píxeles en cada imagen ($M = 262,144$).

Microscopía electrónica de transmisión (TEM): las bacterias fijas se depositaron en una cuadrícula TEM y se visualizaron mediante imágenes de campo brillante en un microscopio FEI Tecnai T20 que funciona a 200 kV.

2.2.1.2 Síntesis de la POM-IL

Síntesis de $\text{K}_8[\alpha\text{-SiW}_{11}\text{O}_{39}] \times 13\text{H}_2\text{O}$: la síntesis es una modificación del procedimiento de la literatura.²⁹ El metasilicato de sodio (0,50 g, 4,09 mmol) se disolvió a temperatura ambiente en 10 ml de agua destilada y se filtró (solución A). En un vaso de precipitados de 100 ml, se disolvió tungstato de sodio (8,26 g, 25,18 mmol) en 3 ml de agua destilada hirviendo (solución B). A la solución B, en caliente, se añadió gota a gota una solución acuosa de HCl $4\ \text{mol L}^{-1}$ (8,25 ml) durante 5 minutos con agitación vigorosa para disolver el precipitado local de ácido tungstico. Se añadió la solución A, seguido rápidamente por la adición de 2,50 ml de ácido clorhídrico acuoso $4\ \text{mol L}^{-1}$ (pH 5-6). La solución se mantuvo a 100°C durante 1 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, la solución debería filtrarse si no está completamente transparente. Se añadió cloruro de potasio (6,80 g) a la solución con agitación magnética. El producto sólido blanco se filtró (porosidad media), se lavó con dos porciones de 20 mL de una solución de cloruro de potasio ($1\ \text{mol L}^{-1}$), luego se lavó con 50 mL de agua fría y finalmente se secó al aire.

Síntesis de (C₂₁H₄₆N₃) Br (DOTMG-Br): la síntesis es una modificación del procedimiento de la literatura.³⁰ La mezcla de tetrametilguanidina (1,15 g, 10 mmol), bromuro de n-octilo (3,86g, 20 mmol), carbonato de potasio (1,38 g, 10 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (0,06g, 0,20 mmol-catalizador) se calentó a reflujo en ACN durante 36 h y luego se enfrió a temperatura ambiente. Luego, se recogió el filtrado. Se añadieron *N*-hexano y agua, y la mezcla se agitó vigorosamente. La capa orgánica se separó y el disolvente se evaporó. Después de eliminar las trazas de disolvente con alto vacío, se obtuvo DOTMG-Br como un líquido viscoso ligeramente amarillo (rendimiento: 0,70 g, 1,66 mmol, 17%).

Síntesis de (C₂₁ H₄₆ N₃)₈ [α-SiW₁₁O₃₉] (DOTMG-1): la síntesis se basa en un procedimiento de literatura modificado.³¹ En un balón de fondo redondo, mezclaron las disoluciones de K₈ [α-SiW₁₁ O₃₉] × 13H₂O (0.16 g, 0.05 mmol, 1.00 eq) en agua (50 mL) y DOTMG-Br (0.4 mmol, 8.00 eq) en diclorometano (80 ml). Las soluciones se agitaron vigorosamente durante 15 minutos. La capa orgánica se separó, el disolvente se eliminó a presión reducida y se obtuvo un líquido amarillo altamente viscoso (rendimiento: cuantitativo). MW = 5399 gr/mol.

2.2.1.3 Preparación de films.

Las obleas de silicio (University Wafers) se limpiaron con agua, etanol y plasma de aire (Zepto, Diener GmbH) antes de su uso como soporte.

Tres films diferentes de las concentraciones de POM-IL/PMMA se prepararon: 20/80 (film **B**), 35/65 (film **C**), 50/50 (film **D**). El film A está hecho 100% de poli (metacrilato de metilo) (PMMA).

El PMMA (Mw~350,000) se disolvió en tolueno (50 mg en 0.5 mL) y se agitó y calentó (60-70 °C) durante 3 horas para obtener una solución homogénea del 10% m/v. La solución de PMMA se mezcló con diferentes cantidades de DOTMG-1 para preparar soluciones 2% m/v, 3.5% m/v y 5% m/v para los films B, C y D, respectivamente. Después de agitarse durante 1 hora con un agitador orbital (270 rpm), con una micropipeta, se depositaron 20 µl de cada solución mediante recubrimiento por rotación (spin-coating) en el centro de una oblea de silicio cuadrada (15 mm x 15 mm). Para el film A (film de PMMA), la velocidad de velocidad fue de 250

rpm/s durante 5 s y 3200 rpm/s durante 15 s. Para los films con DOTMG-1, se ajustó a 300 rpm/s durante 5 s con una velocidad de aceleración de 120 rpm/s, y se aumentó en 30 rpm siempre que aumentara la cantidad de compuesto en la composición. El segundo paso consistió en 1200 rpm con una velocidad de aceleración de 500 rpm/s durante 15 s. Las tasas se establecieron para permitir la sequedad de los films.

2.2.1.4 Ensayo antibacterial

Este proyecto se realizó en colaboración con M. Sc. I. Franco Castillo quién realizó los ensayos antibacteriales en el Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón (ICMA-CSIC) y CIBER-BBN, CISC-Universidad de Zaragoza, España.

Microorganismo y condiciones de crecimiento: se analizaron cuatro cepas bacterianas en los ensayos antibacterianos: *Escherichia coli* DH5 α , VTEC (verotoxigénico *E. coli*) como modelo Gram (-), *Bacillus subtilis* (1904-E) y *Listeria monocytogenes* como Gram (+). Las condiciones de crecimiento bacteriano se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Bacterias y condiciones de crecimiento.

Microorganismos		Medio sólido	Medio líquido	Temperatura de incubación	Incubación previa al inóculo
<i>Bacterias</i>	<i>E. coli</i> DH5 α	TSA	LB	37 °C	24 horas
	VTEC	MHA	LB	37 °C	24 horas
	<i>B. subtilis</i>	TSA	NB	37 °C	24 horas
	<i>L. monocytogenes</i>	BHIA	NB	37 °C	24 horas

Ensayo de inhibición de crecimiento bacteriano: se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) de DOTMG-1 de las cuatro cepas bacterianas (*E. coli* DH5 α , VTEC, *B. subtilis* y *L. monocytogenes*). Las bacterias se descongelaron e incubaron en los medios de cultivo sólidos apropiados por 24 h a 37°C. Se preparó un inóculo de 10⁷ UFC/ml en el medio líquido apropiado y se añadieron 100 μ L a una placa de 96 pocillos que contenía 98 μ L del medio líquido apropiado y 2 μ L del POM-IL disuelto en DMSO a la concentración deseada. El control positivo contenía bacterias y medios líquidos, mientras que el control negativo solo contenía DOTMG-1 disuelto en medios líquidos. Las curvas de crecimiento bacteriano se registraron durante un período de 24 h midiendo la DO de las muestras a 620 nm.

Para los films: se incubaron 50 μL de *E. coli* o *B. Subtilis* 10^6 CFU/mL sobre las muestras A, B, C y D durante 4 h a 37 °C en la cámara de humedad. Después del tiempo de incubación, las muestras se enjuagaron con solución salina estéril y agua estéril destilada y estas soluciones se diluyeron y se colocaron en placas sobre placas de agar TSA. Las muestras enjuagadas se visualizaron en el ESEM.

Ensayo de viabilidad de células bacterianas: se analizó la viabilidad de células bacterianas después del tratamiento con DOTMG-1 usando un ensayo de Resazurina (10-Óxido de 7-sodiooxi-3H-fenoxazin-3-ona). Se incubó el inóculo bacteriano de 10^7 UFC/ml con diferentes concentraciones de DOTMG-1 (al igual que en el ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano) en una placa de 96 pocillos. También se incluyeron controles positivos (bacterias y medios líquidos) y negativos (DOTMG-1 y medios líquidos). Después de la incubación de las placas durante 24 h a 37 °C, se añadieron 0,1 mg/ml de Resazurina (disuelta en LB para *E. coli* DH5 α y VTEC, y en NB para *B. subtilis* y *L. monocytogenes*) cada pocillo y se incubó a 37°C en la oscuridad durante 1 h bajo agitación. El compuesto de resazurina (azul) se vuelve rosa en presencia de microorganismos viables; por lo tanto, los pozos rosados después del tiempo de incubación indicarán que las bacterias están vivas, y los pozos azules bacterias muertas.

Actividad antimicrobiana superficial: se estudió la actividad antimicrobiana superficial de DOTMG-1 utilizando un estándar JIS Z 2801 modificado (Número de referencia: JIS Z 2801: 2000 (E); ICS 07.100.10; 11.100). Los portaobjetos de vidrio esterilizados (2 x 2 cm) se cubrieron con DOTMG 1 disuelto en acetona a diferentes concentraciones para obtener concentraciones en la superficie (de 1 a 16 $\mu\text{g}/\text{cm}$). Los portaobjetos recubiertos se secaron bajo luz UV durante 20 minutos para evitar cualquier contaminación externa y luego se añadieron 50 μl de una suspensión bacteriana 10^7 CFU/ml sobre los portaobjetos recubiertos y un portaobjetos de control sin recubrimiento. Se colocó un cubreobjetos sobre cada muestra para mejorar la superficie de contacto. Las muestras se incubaron durante 24 h a 37 °C en una cámara de humedad y, después del tiempo de incubación, las bacterias se extrajeron agitando las muestras dentro de un tubo de halcón de 50 ml con 20 ml de medio líquido durante 1 minuto. Los medios líquidos que contienen las bacterias extraídas se diluyeron y sembraron en los medios sólidos apropiados para cada microorganismo. Las colonias cultivadas en las placas se contaron después de la incubación de las placas durante 24 h a 37 °C. Se obtuvo un porcentaje de reducción bacteriana comparando el número

de colonias presentes en las placas de las muestras recubiertas y las colonias presentes en las placas de la muestra de control.

Análisis TEM de las bacterias incubadas con DOTMG-1: con TEM se estudió la morfología de las bacterias después del tratamiento con DOTMG-1. Una suspensión bacteriana de 10^7 UFC/ml de cada bacteria (*E. coli* DH5 α , *E. coli* VTEC, *B. subtilis*, *L. monocytogenes*) se incubó con el compuesto en la MIC y $\frac{1}{2}$ MIC. El ensayo se realizó en una placa de 12 pocillos, donde cada pocillo contiene 1 ml de la suspensión de bacterias, 980 μ L de medio líquido y 20 μ L del compuesto a la concentración correspondiente. Luego, la placa se incubó durante 24 h a 37°C bajo agitación. Para visualizar las muestras con TEM, se fijaron las bacterias. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos y luego el sedimento se re-suspendió en 1,5 ml de PBS estéril. Se llevó a cabo otra centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos y el sedimento que contenía la bacteria se re-suspendió en 1,5 ml de glutaraldehído al 2,5% en PBS 10 mmol L⁻¹, pH 7,2 para la fijación celular. Las muestras se incubaron 2 h y luego se lavaron una vez con 1 ml de PBS estéril y tres veces con agua destilada estéril (centrifugada a 3000 rpm durante 15 min entre un lavado y otro) para eliminar el glutaraldehído. Los gránulos se re-suspendieron en 1 ml de agua MilliQ estéril y se guardaron para su posterior análisis. Se depositaron 2 μ l de cada muestra en una rejilla de cobre recubierta de carbono (malla Cu200) y se dejaron secar a temperatura ambiente durante la noche. Las imágenes TEM se obtuvieron en un microscopio electrónico TECNAI T20 (FEI) que funciona a 80 kV.

2.2.1.5 Ensayo antifúngico

Este proyecto se realizó en colaboración con M. Sc. I. Franco Castillo quién realizó los ensayos antifúngicos en el Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón (ICMA-CSIC) y CIBER-BBN, CISC-Universidad de Zaragoza, España.

Microorganismo y condiciones de crecimiento: se utilizaron cuatro hongos de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) en los ensayos antifúngicos, es decir, *Aspergillus niger* (CECT 2088), *Cladosporium cladosporioides* (CECT 2111), *Aspergillus ochraceus* (CECT 2093) y *Penicillium expansum* (CECT 2278). Se almacenaron suspensiones de esporas fúngicas en Tween al 0,1%, glicerol al 20% a -80 ° C antes de su uso. Todas las condiciones de crecimiento fúngico se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Hongos y condiciones de crecimiento

Microorganismos		Medio sólido	Medio líquido	Temperatura de incubación	Incubación previa al inóculo
Hongos	<i>A. niger</i>	SDA	RPMI	35 °C	4 días
	<i>A. ochraceus</i>	YMA	MEP	25 °C	4 días
	<i>C. cladosporioides</i>	SDA	RPMI	25 °C	4 days
	<i>P. expansum</i>	PDA	YMB	25 °C	4 days

Ensayo de inhibición del crecimiento fúngico: la determinación MIC de DOTMG-1 contra las cuatro cepas fúngicas (*A. niger*, *A. ochraceus*, *C. cladosporioides* y *P. expansum*) se realizó mediante un método de microdilución en medio de cultivo según el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana EUCAST) directrices (E.DEF 9.3.1). Las esporas de hongos se incubaron durante cinco días en medio sólido a la temperatura correspondiente para cada molde. La parte aérea de los hongos se tomó con un hisopo y se re-suspendió en agua estéril destilada con Tween al 0,1% para obtener una suspensión de 10^6 conidios/ml. Esta suspensión se diluyó luego a 10^5 conidios/ml en agua estéril destilada. Para determinar el MIC, DOTMG-1 se disolvió en DMSO a las concentraciones deseadas y se añadieron 2 μ L de cada solución a cada pocillo de una placa de 96 pocillos que contenía 98 μ L de medio de cultivo y 100 μ L de los 10^5 conidios. / ml de suspensión. El control positivo contenía solo esporas de hongos y medios de cultivo, mientras que el control negativo contenía solo DOTMG-1 disuelto en medios de cultivo. Después de un período de incubación de 48 h a 35 °C para *A. niger* y 25 °C para *A. ochraceus*, *C. cladosporioides* y *P. expansum*, de acuerdo con las recomendaciones de CECT, los valores de MIC se determinaron como la concentración más baja de DOTMG-1 para inhibir el crecimiento de hongos detectable a simple vista. Los resultados se confirmaron midiendo la DO de las muestras a 620 nm y comparándola con la DO del control positivo.

Visualización ESEM de hongos incubados con DOTMG 1: ESEM también estudió el efecto de la POM-IL sobre los hongos. Primero, se preparó una suspensión de 10^5 conidios/ml como se mencionó anteriormente en el ensayo de inhibición del crecimiento fúngico. Luego se incubó 1 mL de esta suspensión con el compuesto en el MIC y $\frac{1}{2}$ MIC para cada hongo mediante la adición de 20 μ L de DOTMG-1 disuelto en DMSO (100 veces concentrado) y 980 μ L de medio líquido. La solución se incubó en un vial de vidrio durante 48 h la temperatura correspondiente para cada

hongo. Después del tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se desechó. El sedimento, que contiene el hongo, se re-suspendió en 1 mL de solución salina -NaCl 0.9% - (SN) y se filtró a través de una membrana de policarbonato (13 mm de diámetro, tamaño de poro 0.22 μm). Posteriormente, las membranas que contienen el hongo se colocaron en una placa de 12 pocillos y se fijaron. El protocolo de fijación se realizó de la siguiente manera: las membranas se lavaron una vez con 2 mL de SN y luego se fijaron con 2 mL de tampón de cacodilato 0,1 M durante 1 hora y 30 minutos a 37 °C. Para deshidratar el hongo, se utilizaron concentraciones crecientes de metanol (5 minutos con metanol al 30%, 5 minutos con metanol al 50%, 5 minutos con metanol al 70%, 10 minutos con metanol al 100% y 5 minutos con metanol al 100%). Las muestras fijas se visualizaron en un SEM de emisión de campo Quanta FEG-250 (FEI Company) para imágenes de alta resolución que funcionan en modo ESEM utilizando un detector GSED.

2.2.2 Resultados y discusión

2.2.2.1 Caracterización de los compuestos.

Los líquidos iónicos, DOTMG-Br y DOTMG-1, fueron totalmente caracterizados por FT-IR, espectroscopía RMN, EA y TGA.

• POM-1

FT-IR (cm^{-1}): 3420 (b), 2364 (w), 2037 (m), 1624 (m), 995 (s), 917 (s), 888 (vs), 793 (vs), 512 (s), 480 (s).

ICP-AES (valores calculados entre paréntesis): Si 0.86 (0.87), W 64.31 (62.78).

• DOTMG-Br

FT-IR (cm^{-1}): 3420 (b), 2931 (s), 2848 (m), 2360 (m), 2314 (m), 1600 (s), 1558 (vs), 1458 (m), 1401 (vs), 1375 (m), 1152 (w), 1068 (w), 895 (m), 832 (s), 723 (m).

^1H RMN (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 3,16, 3,07 (m, 4H, CH_2N), 2,89, 2,86 (m, 12H, CH_3N), 1,55 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1,39 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1,26 (m, 20H, CH_2), 0,86 (t, $J = 7,2$, CH_3). El espectro se muestra en la figura 5.

^{13}C RMN (151 MHz, DMSO - d_6) δ 162,4, 48,7, 39,6 (solapamiento con DMSO), 31,2; 28,6; 28,5; 27,0; 26,1; 22,0; 13,9. El espectro se muestra en la figura 6.



Figura 5. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ de DOTMG-Br en d_6 -DMSO.

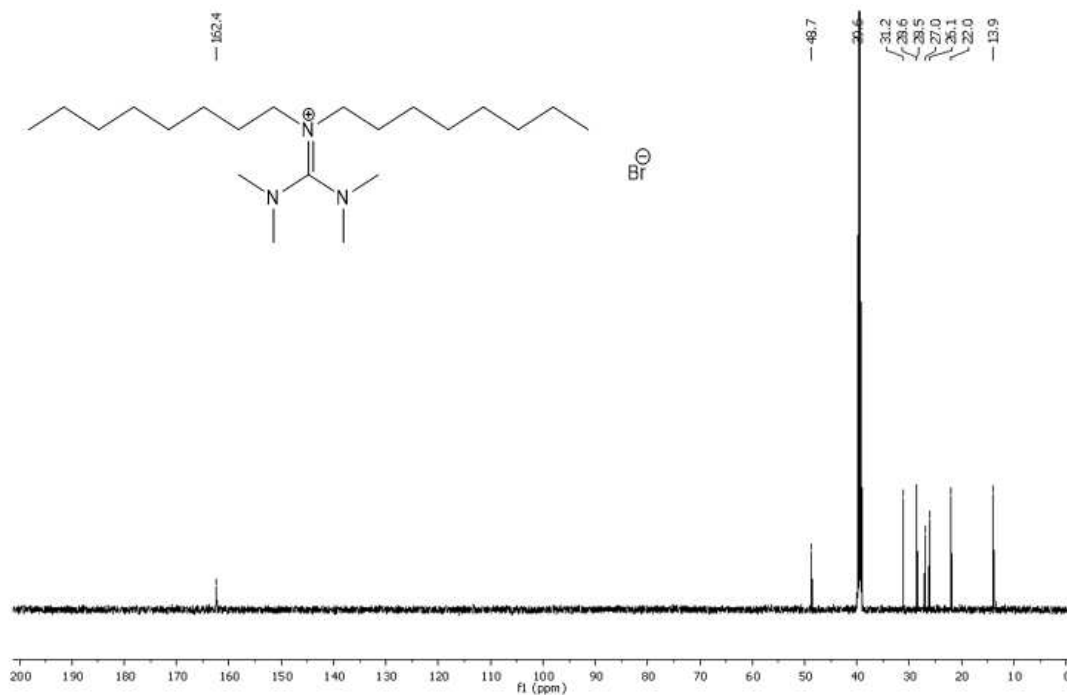


Figura 6. Espectro $^{13}\text{C-NMR}$ de DOTMG-Br en d_6 -DMSO.

La ^1H NMR y la ^{13}C NMR son consistentes con la estructura molecular de DOTMG-Br. El análisis FT-IR es consistente con los grupos funcionales presentes en la molécula del catión.

• **DOTMG-1**

FT-IR (cm^{-1}) : 3450 (b), 2962 (s), 2925 (s), 2853 (m), 2361 (w), 1739 (w), 1595 (s), 1562 (s), 1463 (m), 1407 (m), 1375 (m), 1262 (s), 1097 (s), 1018 (s), 970 (m), 920 (m), 881 (w), 801 (s), 660 (w), 530 (m).

EA: % (valores calculados entre paréntesis): C 36.6 (37.37), H 7.1 (6.86), N 6.0 (6.22)

^1H RMN (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 3,14, 3,09 (m, 4H, CH_2N), 2,90, 2,87 (m, 12H, CH_3N), 1,55 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1,38 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1,24 (m, 20H, CH_2), 0,85 (t, $J = 7,2$, CH_3). Los espectros se muestran en la figura 7.

^{13}C RMN (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 162,3; 48,8; 39,6; 39,5; 31,2; 28,6; 28,5; 27,0; 26,1; 22,0; 13,9. Los espectros se muestran en la figura 8.

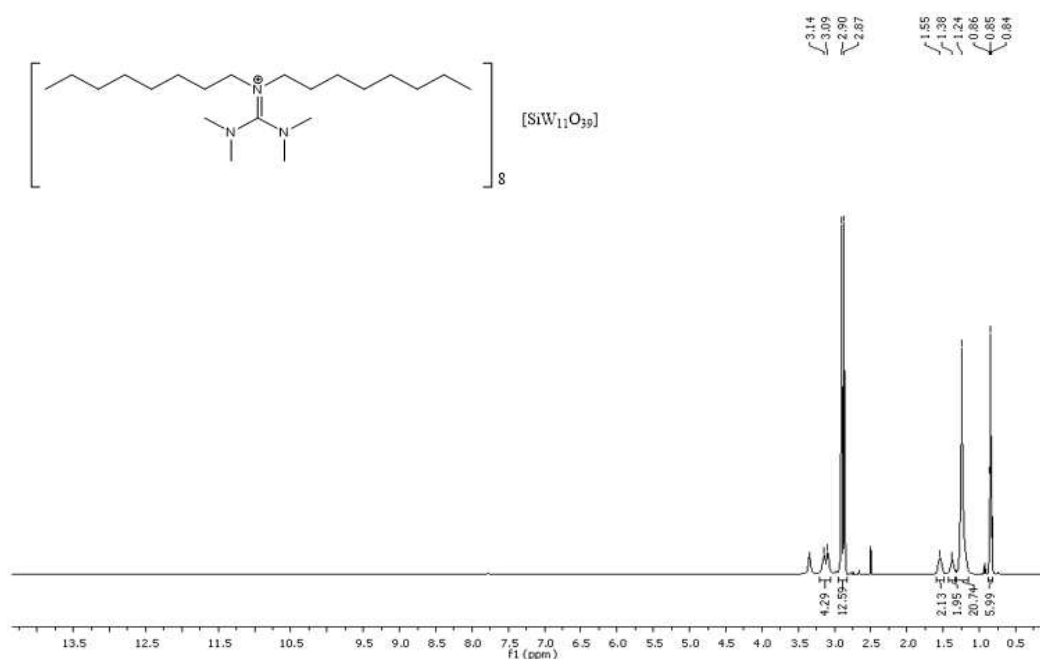


Figura 7. Espectro de ^1H -NMR de DOTMG-1 en d_6 -DMSO.

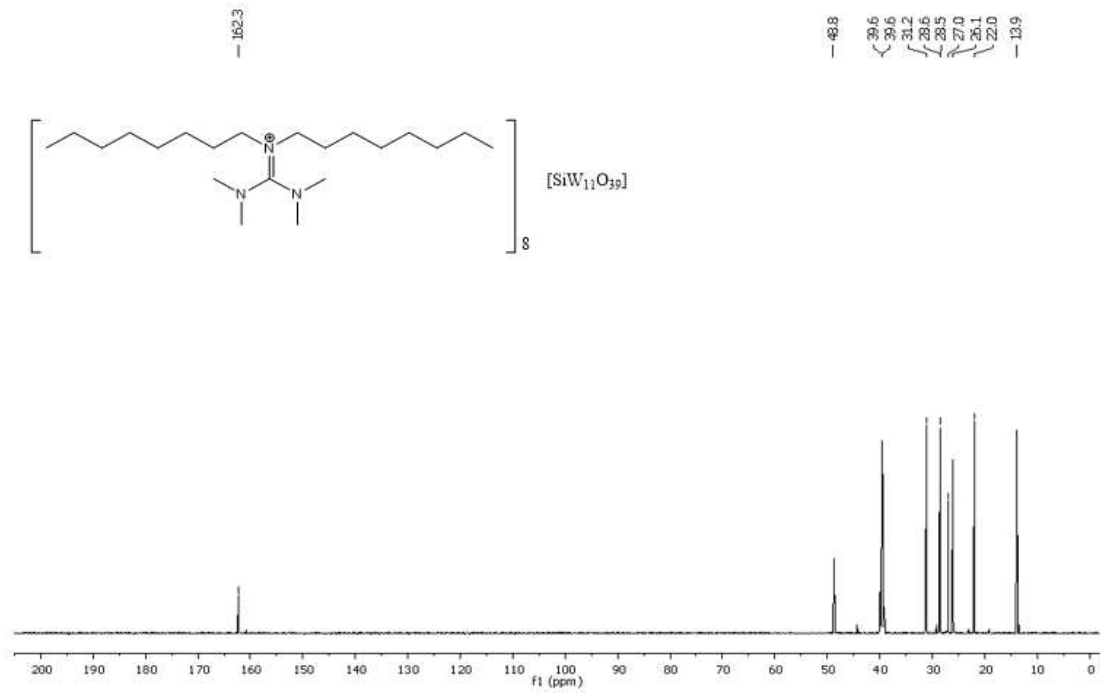


Figura 8. Espectro ^{13}C -NMR de DOTMG-1 en d_6 -DMSO.

Análisis TGA

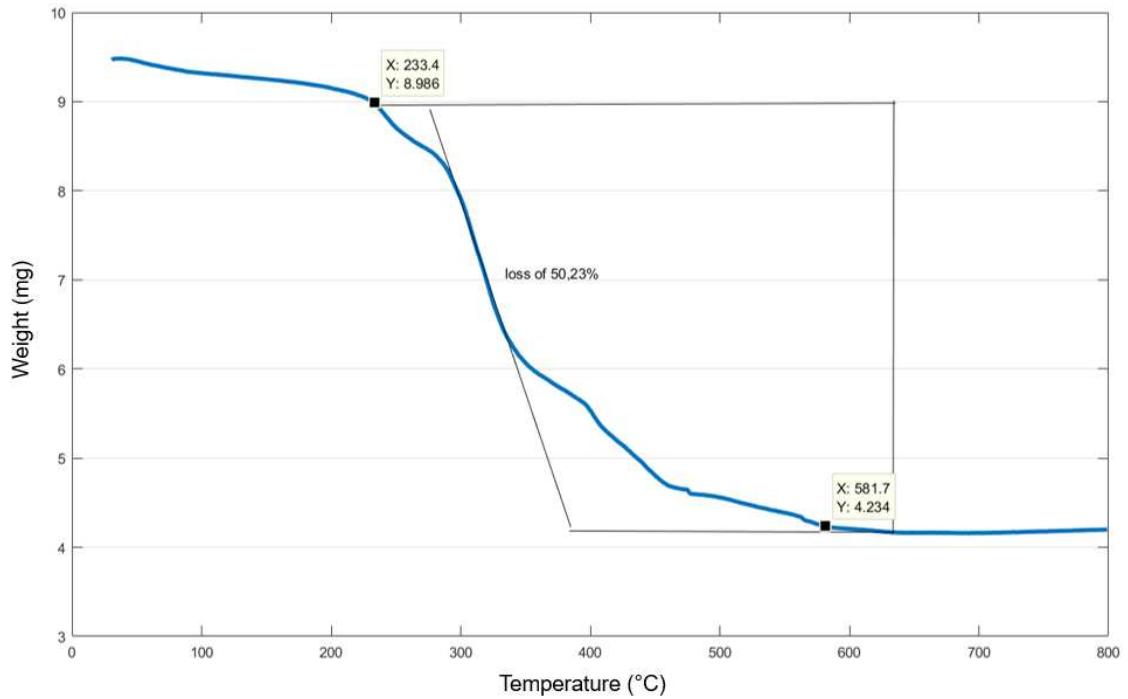


Figura 9. Análisis TGA de DOTMG-1.

La masa inicial fue de 9,46 mg y la pérdida del 50,2% coincide con la fórmula esperada de la EA (pérdida de catión% 50,5). El análisis TGA se muestra en la Figura 9.

La ^1H NMR y la ^{13}C NMR son consistentes con la estructura molecular del catión. El análisis FT-IR es consistente con los grupos funcionales presentes en la molécula del catión y el POM.

• **Medición de lipofilicidad**

El comportamiento de DOTMG-Br y DOTMG-1 entre la fase polar y no polar se midió por RP (fase inversa)-UHPLC. Esta metodología se utilizó por primera vez en POM-IL y el objetivo era descubrir una relación entre la lipofilicidad y la respuesta biológica de los compuestos.

El grado de división en porciones se mide por la retención de analito, y cuanto mayor es la afinidad por la fase no polar (fase estacionaria), más largos son los tiempos de retención, lo que indica una mayor lipofilicidad. La capacidad de retención se calculó en base a la ecuación 1

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (1)$$

mientras que t_r es el tiempo de retención y t_0 es el tiempo del compuesto no retenido.²⁴ El $\log K_w$ se obtiene extrapolando los valores de $\log K$ contra la composición de la fase móvil (ecuación 2)

$$\text{Log}K = S\gamma + \log K_w \quad (2)$$

Para DOTMG-Br, una regresión lineal simple se aproxima con el fin de predecir $\log K$ basado en % de ACN (Fig. 10).

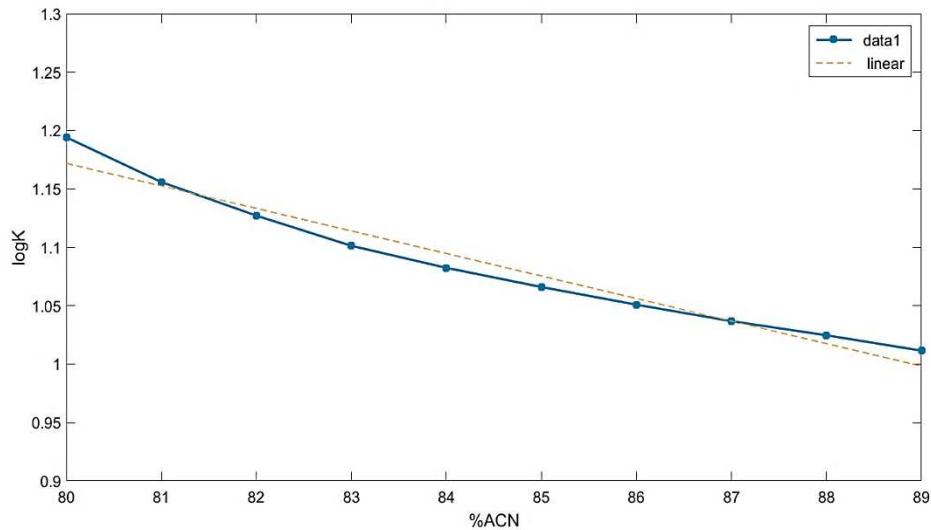


Figura 10. Curva Log K de DOTMG-Br

Log K predicho es igual a $-1.92 \times 10^{-2} + 2.72$ (% ACN). El valor de $\log K_w$ para DOTMG-Br es 2.72. Para DOTMG-1, la regresión lineal se muestra en la figura 11.

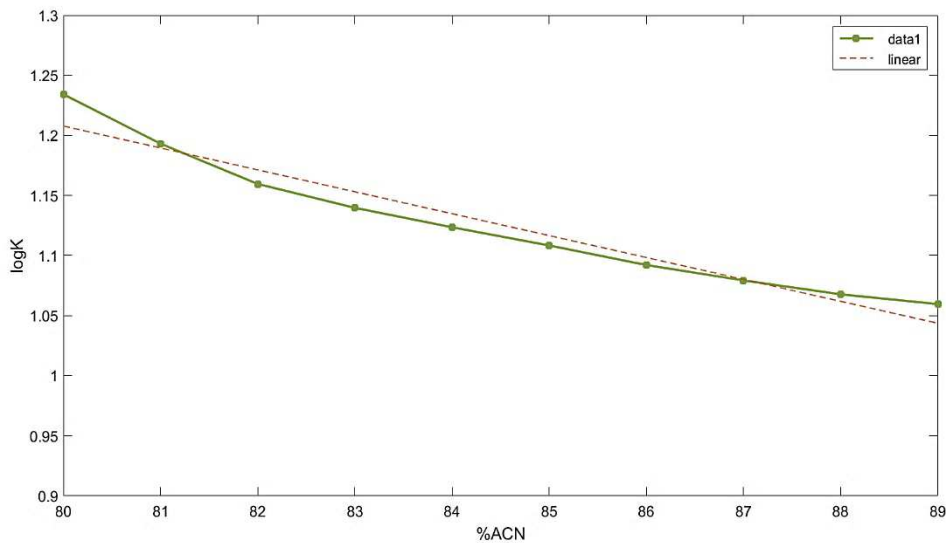


Figura 11. Curva Log K de DOTMG-1

Log K predicho es igual a $-1.82 \times 10^{-2} + 2.66$ (% ACN). El valor de $\log K_w$ para DOTMG-1 es 2.66.

Estos valores indican que los compuestos no son completamente hidrófobos y que también son insolubles en agua. La similitud en los valores indica que la presencia de POM como contra anión apenas afecta esta propiedad fisicoquímica.

● Ensayo de citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad y viabilidad celular se realizaron para estudiar el efecto tóxico de los compuestos en las células. El efecto citotóxico dependiente de la concentración de DOTMG-1 y DOTMG-Br, junto con un control positivo y negativo, en células HEK293T y células TZM-bl se puede observar en las Figuras 12 y 13, respectivamente.

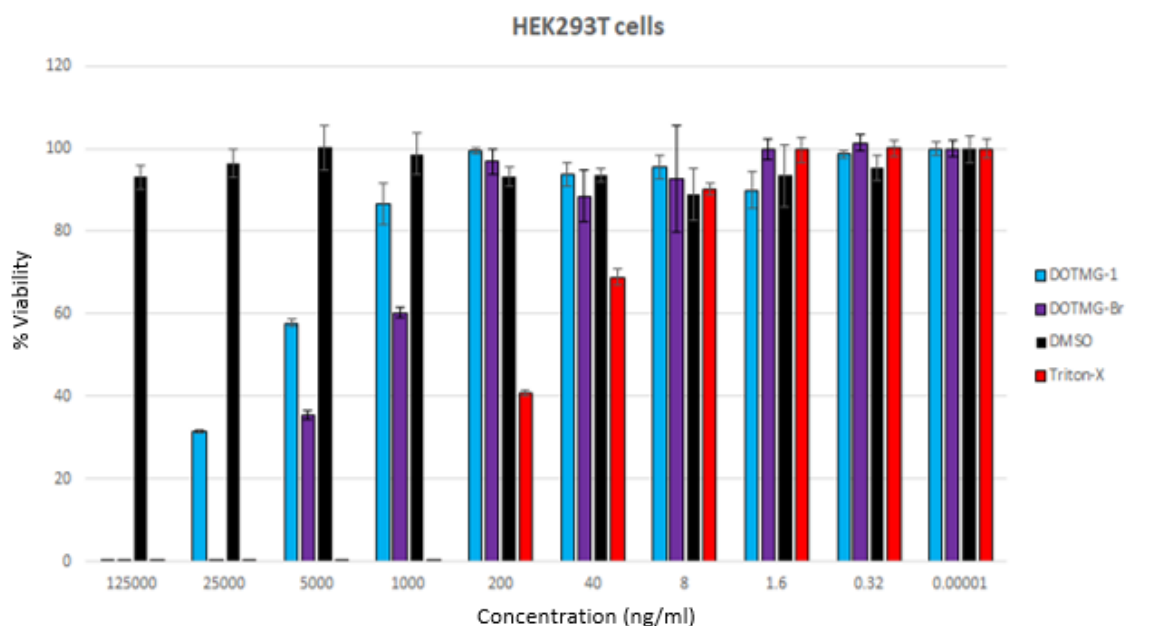


Figura 12. Efecto citotóxico *in vitro* dependiente de la concentración de DOTMG-1 y DOTMG-Br sobre la viabilidad de las células HEK293T.

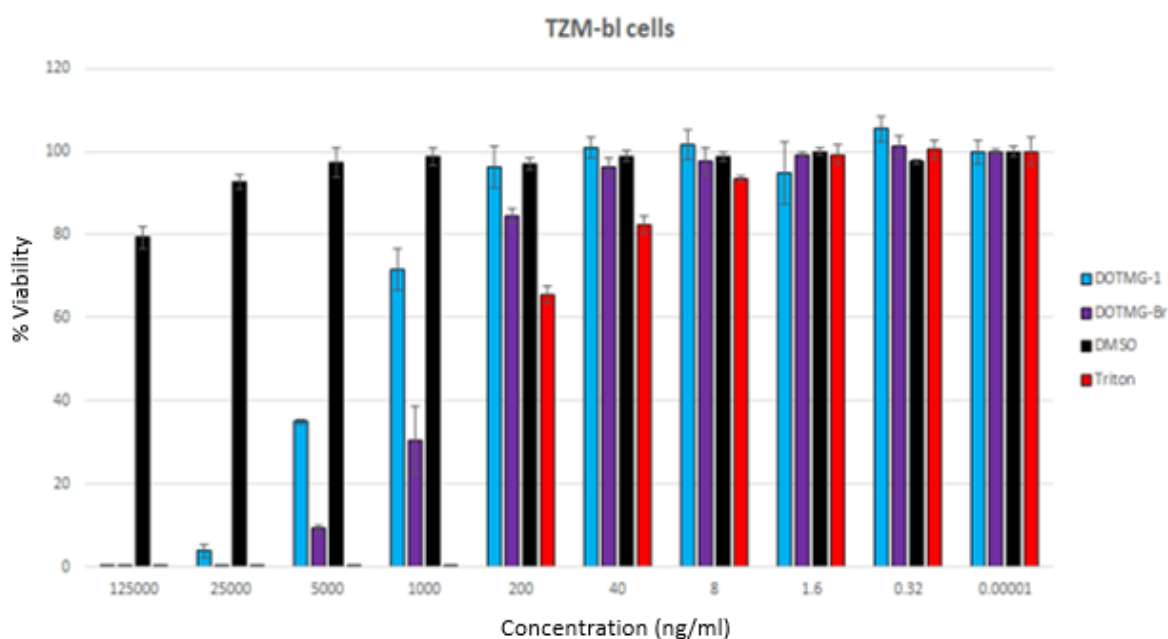


Figura 13. Efecto citotóxico *in vitro* dependiente de la concentración de DOTMG-1 y DOTMG-Br sobre la viabilidad de las células TZM-bl.

La viabilidad celular disminuye si aumenta la concentración de las IL. Hay un importante efecto citotóxico de DOTMG-Br en comparación con DOTMG-1. Para obtener un valor numérico, se calculó la CC_{50} para las IL en ambas líneas celulares.

Tabla 3. Valores CC_{50} de DOTMG-1 y DOTMG-Br

Compuestos	CC_{50} (ng/ml)	
	Células HEK293T	Células TZM-bl
DOTMG-Br	2458	587
DOTMG-1	14203	2717

Los resultados en la Tabla 3 muestran que DOTMG-1 es menos tóxico que DOTMG-Br para ambas líneas celulares.

2.2.2.2 Caracterización de los films.

Para los films, FT-IR ATR se ha utilizado para realizar el análisis de composición y los estudios de microscopía -SEM y AFM- para realizar el análisis superficial y topográfico. Las composiciones de los films son:

- Film A, PMMA (como control)
- Film B, DOTMG-1 / PMMA 20/80
- Film C, DOTMG-1 / PMMA 35/65
- Film D, DOTMG-1 / PMMA 50/50

• FT-IR

A partir de los espectros FT-IR, es posible visualizar los cambios en las señales correspondientes a PMMA y DOTMG-1 al aumentar el contenido de POM-IL en las películas de B a C. En la Fig. 14, los espectros de las películas son mostrados. Los picos en 610 cm^{-1} y 1115 cm^{-1} corresponden a los fonones reticulares de Si y a los

complejos Si-O2, respectivamente.³² Los picos principales de PMMA están en 1713 cm^{-1} , 1425 cm^{-1} , 1125 cm^{-1} y una región entre 1000 a 750 cm^{-1} .³³ Se puede observar que la región correspondiente a 750-1000 cm^{-1} es una zona superpuesta de señales POM y PMMA. Dos picos correspondientes al catión en 1603 cm^{-1} y 1562 cm^{-1} se visualizan más en los espectros correspondientes a las películas C y D.

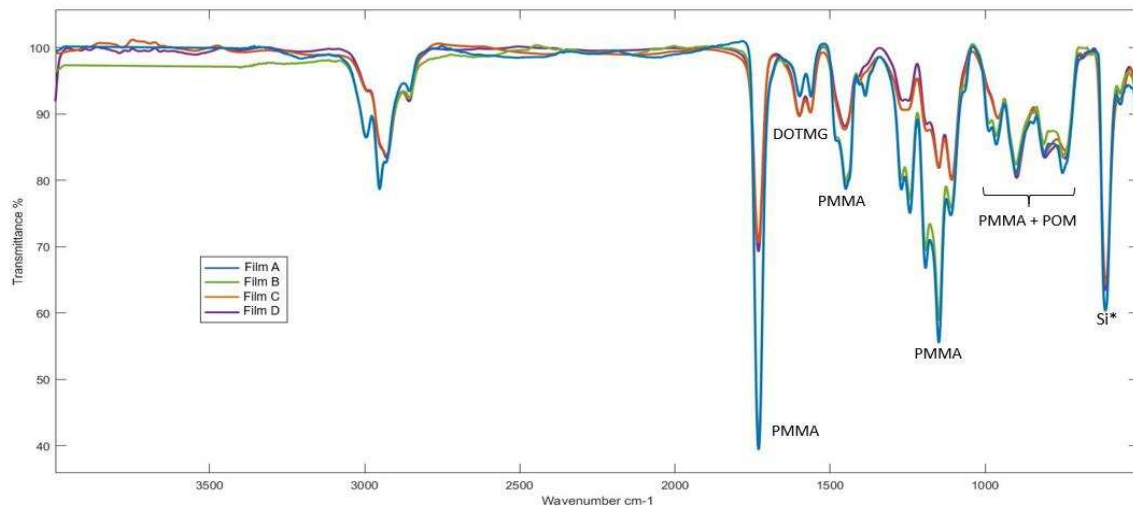


Figura 14. Espectros FT-IR de los films A, B, C y D.

● Análisis SEM

El film A, sólo de PMMA, tiene una superficie lisa y consta de una fase (Fig. 15). De la Fig. 16, 17, 18 y 19, se observa que los films tienen una interfaz distinta entre dos fases. Por definición, un material compuesto consiste en más de un grupo atómico con una interfase distinta que los separa.³⁴ Como las fases en las imágenes SEM se identifican físicamente y se basan en el material de la matriz, las films podrían clasificarse como compuestos de matriz polimérica (PMC) con una fase de polímero primario y una fase secundaria de POM-IL.³⁵ El tolueno actúa como un compatibilizador durante el proceso de solución y cuando el disolvente se evapora mediante la técnica de recubrimiento por rotación, los compuestos se segregan en diferentes fases. La distribución de fases en la matriz compuesta es aleatoria y, por lo tanto, se espera que las propiedades sean isotrópicas. El PPMA se utilizó debido a su biocompatibilidad, transparencia y porque es fácil de manejar y procesar.

○ Film A:

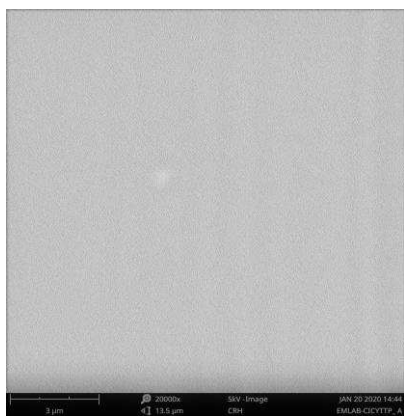


Figura 15. Micrografías SEM de la film A (5kV). Escala de barra de 3 μm.

o Film B:

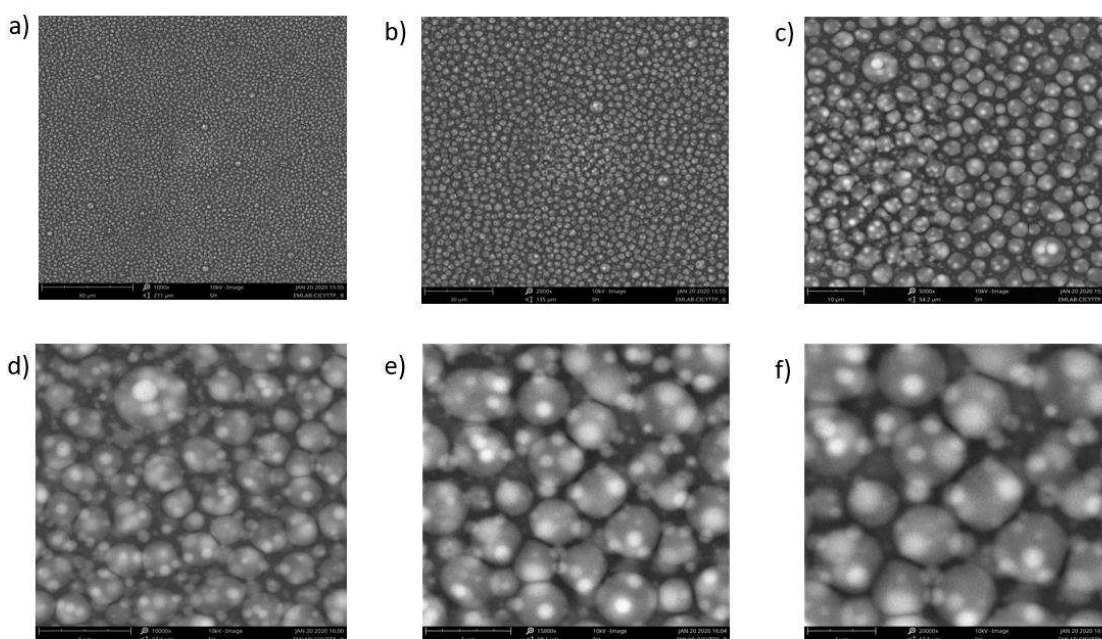


Figura 16. Micrografías SEM de film B (10kV). Ampliaciones: a) 1000x; b) 2000x; c) 5000x; d) 10000; e) 15000x; f) 20000x

Film C (imágenes de dos posiciones diferentes):

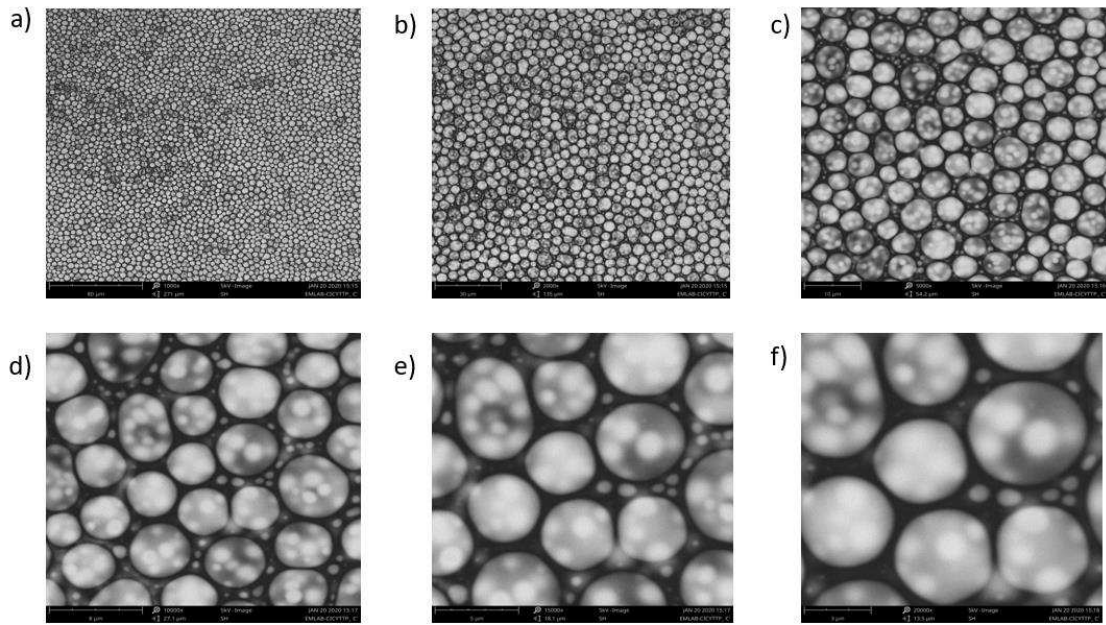


Figura 17. Micrografías SEM de film C (5kV) Ampliaciones: a) 1000x; b) 2000x; c) 5000x; d) 10000; e) 15000x; f) 20000x.

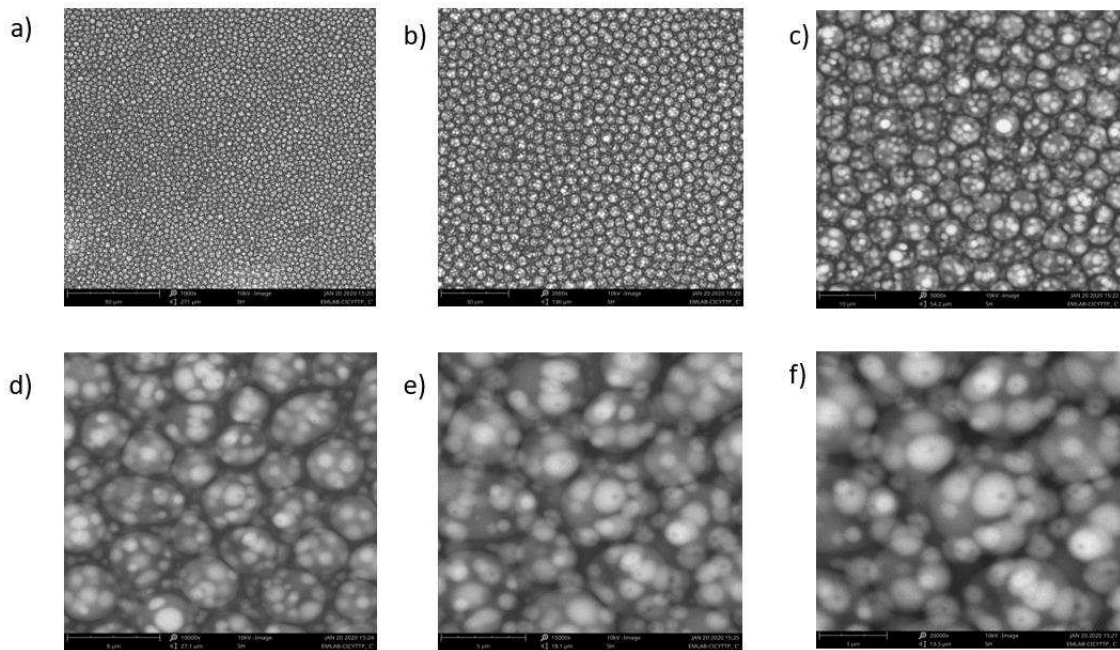


Figura 18. Micrografías SEM de la film C (10kV). Ampliaciones: a) 1000x; b) 2000x; c) 5000x; d) 10000; e) 15000x; f) 20000x.

o Film D

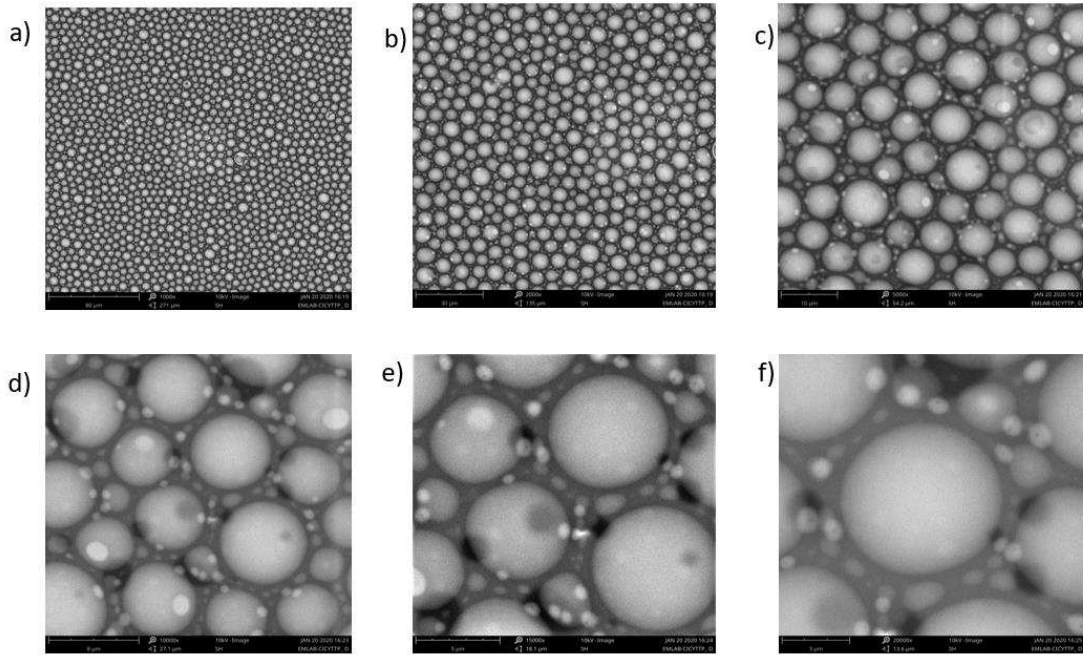


Figura 19. Micrografías SEM de film D (10kV). Ampliaciones: a) 1000x; b) 2000x; c) 5000x; d) 10000; e) 15000x; f) 20000x.

A partir de los gráficos SEM, se observa que el aumento del contenido de IL en los films también aumenta el tamaño de las gotas en xy (Fig. 20). Además, en la Film B hay pocas vesículas más grandes, distribuidas al azar.

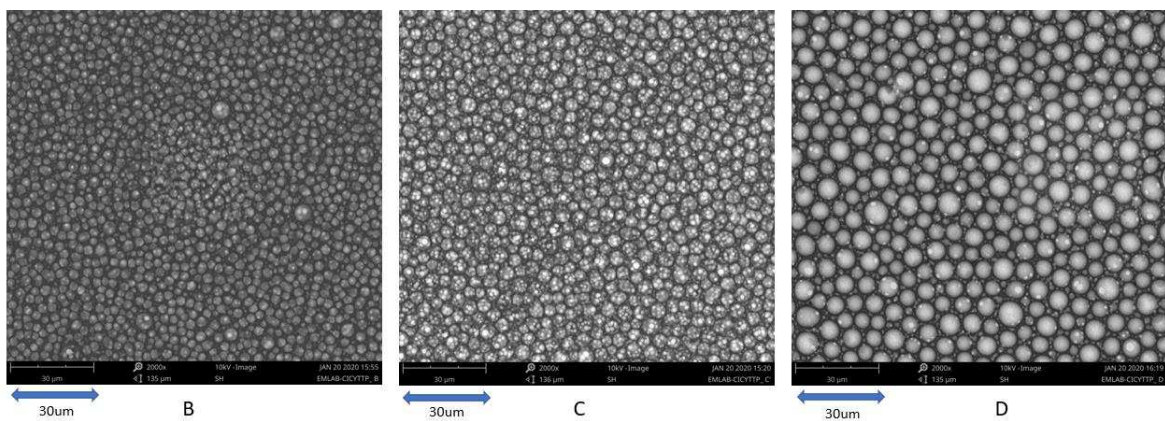


Figura 20. Micrografías SEM de films B, C y D. Escala de barra de 30 µm.

Además, se pudo observar que los límites de las gotas no están completamente definidos, pero ambas fases aún se pueden visualizar (Fig. 21).

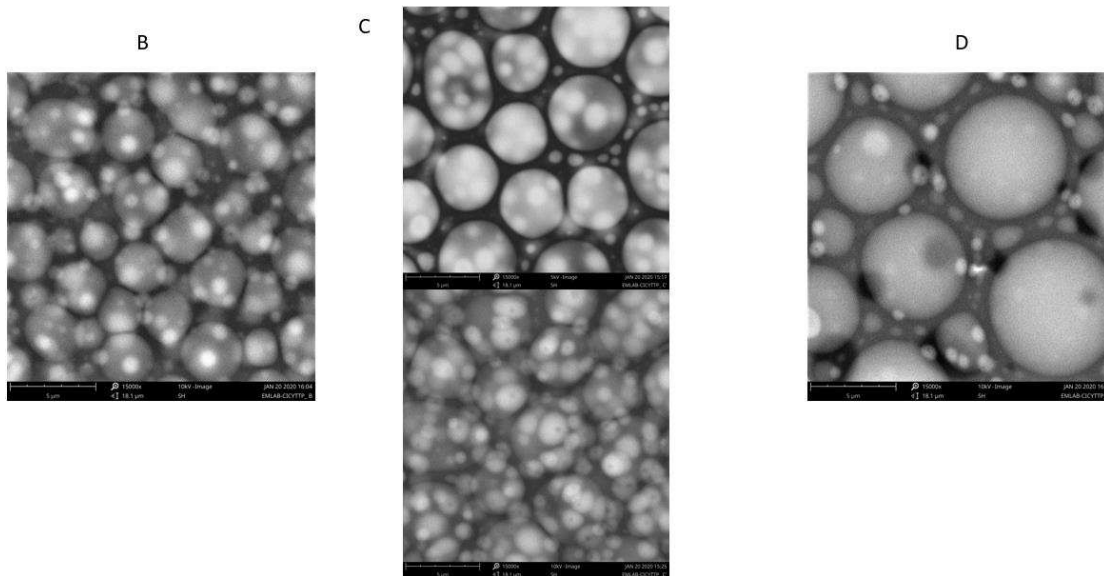


Figura 21. Micrografías SEM de gotitas en films B, C y D. Escala de barra 5 µm

● **Imágenes AFM**

El perfil de altura de los films se analizó con la técnica AFM. La figura 22 muestra la imagen altura, la imagen de fase y la imagen 3D del film A. Las figuras 23, 24 y 25 muestran la imagen de altura y la imagen de altura 3D del film B, C y D. No fue posible obtener imágenes de fase de buena calidad. de los films que contienen POM-IL debido a sus propiedades de superficie y morfología.

○ Film A:

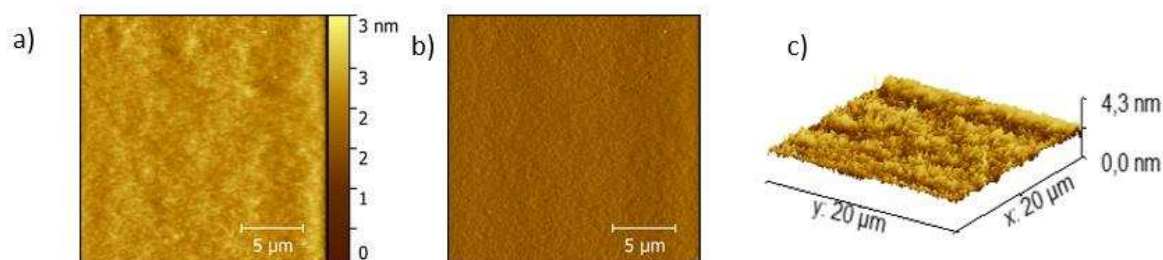


Figura 22. a) Imagen de Altura, b) imagen de fase, y c) imagen de Altura 3D.

○ Film B:

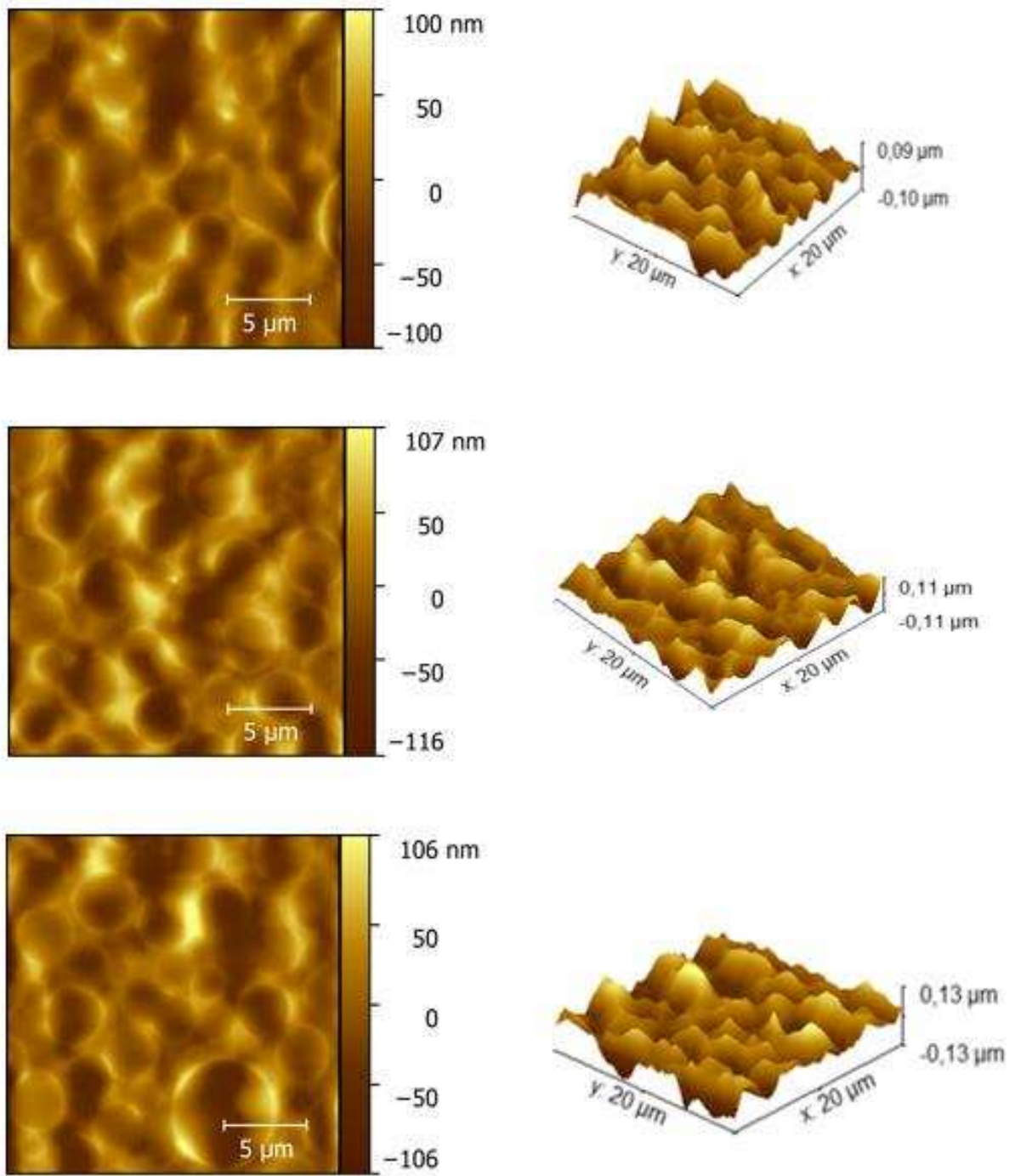


Figura 23. Izquierda: imágenes de altura; derecha: imágenes en 3D de altura (diferentes posiciones).

o Film C:

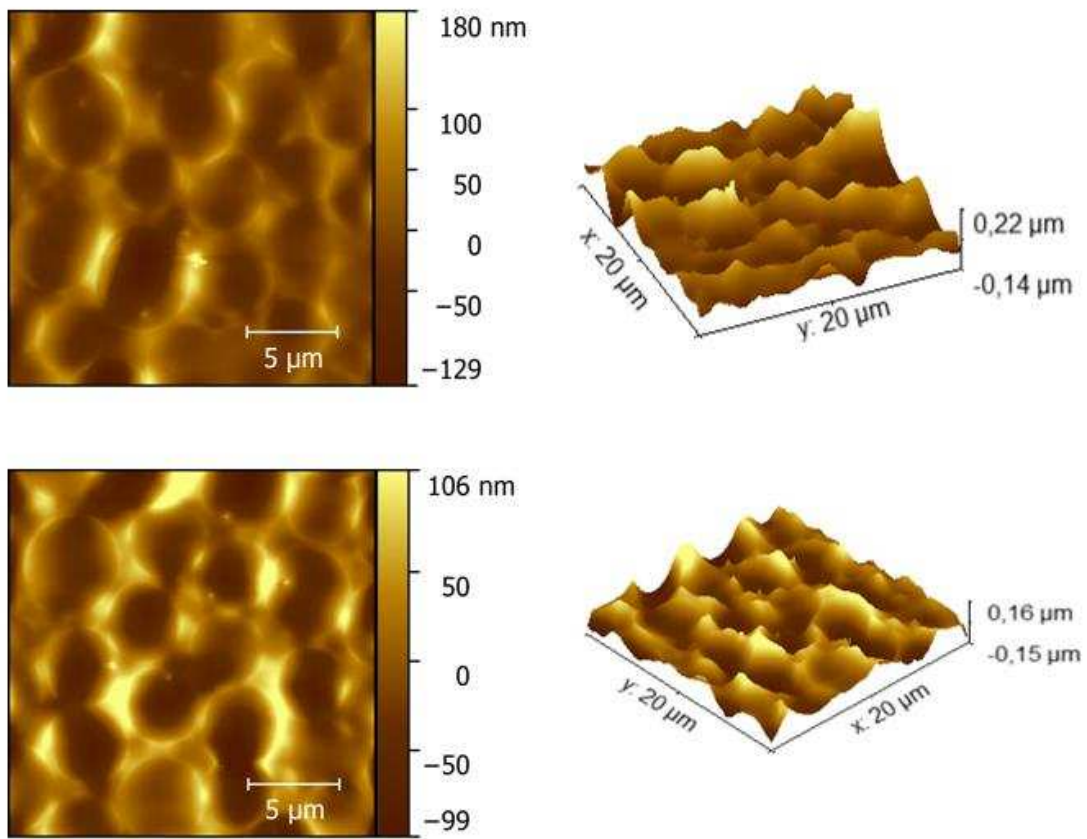


Figura 24. Izquierda: imágenes de altura; derecha: imágenes en 3D de altura (diferentes posiciones).

o Film D:

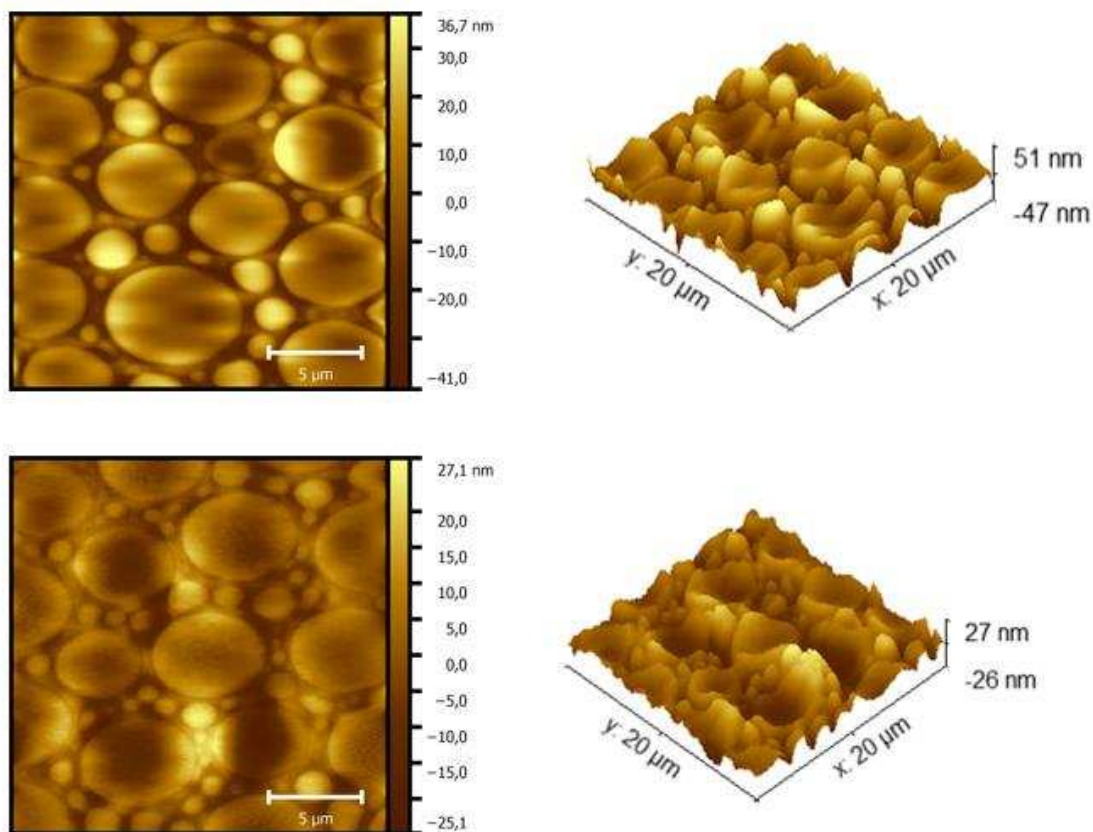


Figura 25. Izquierda: imágenes de altura; derecha: imágenes en 3D de altura (diferentes posiciones).

A partir del perfil de altura de las muestras, es posible calcular la rugosidad. En el film D, las gotas son más grandes, pero la superficie es más plana y la rugosidad disminuye en comparación con los films C y B. A partir de la comparación de la rugosidad de B y C, se observa que este valor aumenta cuando aumenta el contenido de IL (Tabla 4).

Tabla 4. Valor cuadrático medio de la rugosidad de la superficie (Sq)

Film	Sq (nm)
A	0.4
B	33.8 +/- 0.1
C	36.7 +/- 0.2
D	9.4 +/- 0.1

Este efecto podría explicarse por el hecho de que las gotas de DOTMG-1 están incrustadas en la matriz de PMMA en los films B y C, y cuando el compuesto está al

50% de concentración (film D), las gotas están más "relajadas" y cubren más superficie de los films.

2.2.2.3 Actividad antibacteriana y antifúngica de la POM-IL

• Ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano.

Con el fin de estudiar las propiedades antibacterianas de la DOTMG-1, el crecimiento de bacterias de *E. coli* DH5a, VTEC, *B. subtilis* y *L. monocytogenes*, en presencia del compuesto. Las curvas en la Figura 26 representan el número de células bacterianas viables (turbidez) a lo largo del tiempo.

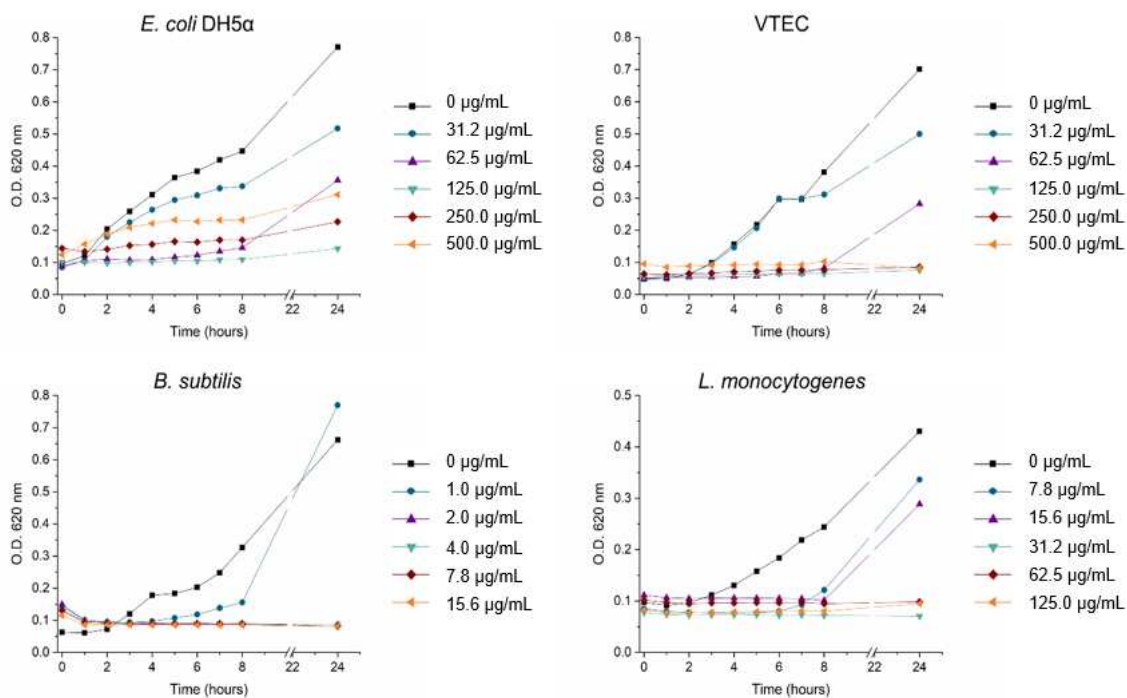


Figura 26. Curvas de crecimiento de *E. coli* DH5α, VTEC, *B. subtilis* y *L. monocytogenes*, comenzando con un inóculo de 10^7 UFC/ml a diferentes concentraciones de DOTMG 1 (que varían de 0,98 a 500 µg / ml)

Se observa que DOTMG-1 posee mayor actividad antibacteriana contra bacterias Gram (+) en comparación con Gram (-) y que la actividad es mayor contra la cepa de *B. Subtilis*. El aparente aumento de la turbidez en el gráfico de *E. coli* DH5α a las concentraciones más altas se debe a la precipitación del compuesto en los medios de cultivo. Estos resultados se confirmaron con el ensayo de resaruzina descrito a continuación.

El MIC es la concentración de compuesto más baja que previene el crecimiento visible de microorganismos. Los compuestos con puntuaciones MIC más bajas son agentes antimicrobianos más efectivos. En la Tabla 5, se muestran los valores MIC de DOTMG-1 contra las cepas bacterianas analizadas.

Tabla 5. Concentración inhibitoria mínima (MIC) de DOTMG-1 contra los diferentes microorganismos

Microorganismo		MIC ($\mu\text{g} / \text{ml}$)
Bacterias Gram (-)	<i>E. coli</i> DH5 α	125,00
	VTEC	125,00
Bacterias Gram (+)	<i>B. subtilis</i>	1,95
	<i>L. monocytogenes</i>	31,35

El valor MIC de *B. subtilis* es el más bajo (1,95 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mientras que el valor MIC de las cepas negativas de dos gramos es el más alto (125,00 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

• Ensayo de viabilidad de células bacterianas.

El ensayo de viabilidad de células bacterianas se realizó para conocer la concentración bactericida mínima (MBC). Esto se define como la concentración más baja de agente antimicrobiano que mata las células bacterianas. Para la determinación de la viabilidad celular, se realizó el ensayo con un indicador redox colorimétrico. El colorante de resazurina se reduce a resorción por la respiración aeróbica de las células metabólicamente activas y su forma reducida es rosa y altamente fluorescente. La forma oxidada es azul no fluorescente e indica células no viables.



Figura 27. Ensayo de viabilidad de células de resazurina para *E. coli* DH5 α , VETC, *B. subtilis* y *L. monocytogenes*, incubados con diferentes concentraciones de DOTMG 1 (en $\mu\text{g} / \text{ml}$). Los pozos azules contienen bacterias muertas y los pozos rosados, células bacterianas vivas.

Como se puede ver en la Fig. 27, el MBC tanto para *E. coli* (*E. Coli* DH5 α como para VTEC) es 125,00 $\mu\text{g/ml}$ y 1,95 y 31,35 $\mu\text{g/ml}$ para *B. subtilis* y *L. monocytogenes*, respectivamente. Estos valores concuerdan con los ensayos de densidad óptica que se muestran en la Tabla 4.

● Ensayo de inhibición del crecimiento fúngico

Para conocer la concentración más baja de DOTMG-1 que es suficiente para inhibir el crecimiento fúngico (MIC), se realizó un ensayo de inhibición del crecimiento fúngico. Los hongos en estudio fueron *A. Níger*, *A. ochraceus*, *C. cladosporioides* y *P. expansum*.

Tabla 6. Concentración inhibitoria mínima (MIC) de DOTMG-1 contra los diferentes hongos.

Microorganismo		MIC ($\mu\text{g} / \text{ml}$)
Hongos	<i>A. niger</i>	250,00
	<i>A. ochraceus</i>	125,00
	<i>C. cladosporioides</i>	31,30
	<i>P. expansum</i>	31,30

Se observa en la Tabla 6 que DOTMG-1 posee una actividad antifúngica similar contra *C. cladosporioides* y *P. expansum*. Con respecto a la actividad entre las cepas de *Aspergillus*, la actividad es mayor contra *A. Ochraceus* que *A. Niger*.

● Actividad antimicrobiana superficial

Para estudiar si el DOTMG-1 puede prevenir la formación de biofilms, se realizó un ensayo de actividad antimicrobiana de superficie. En la Figura 28, se presenta un diagrama esquemático que muestra los pasos del método.

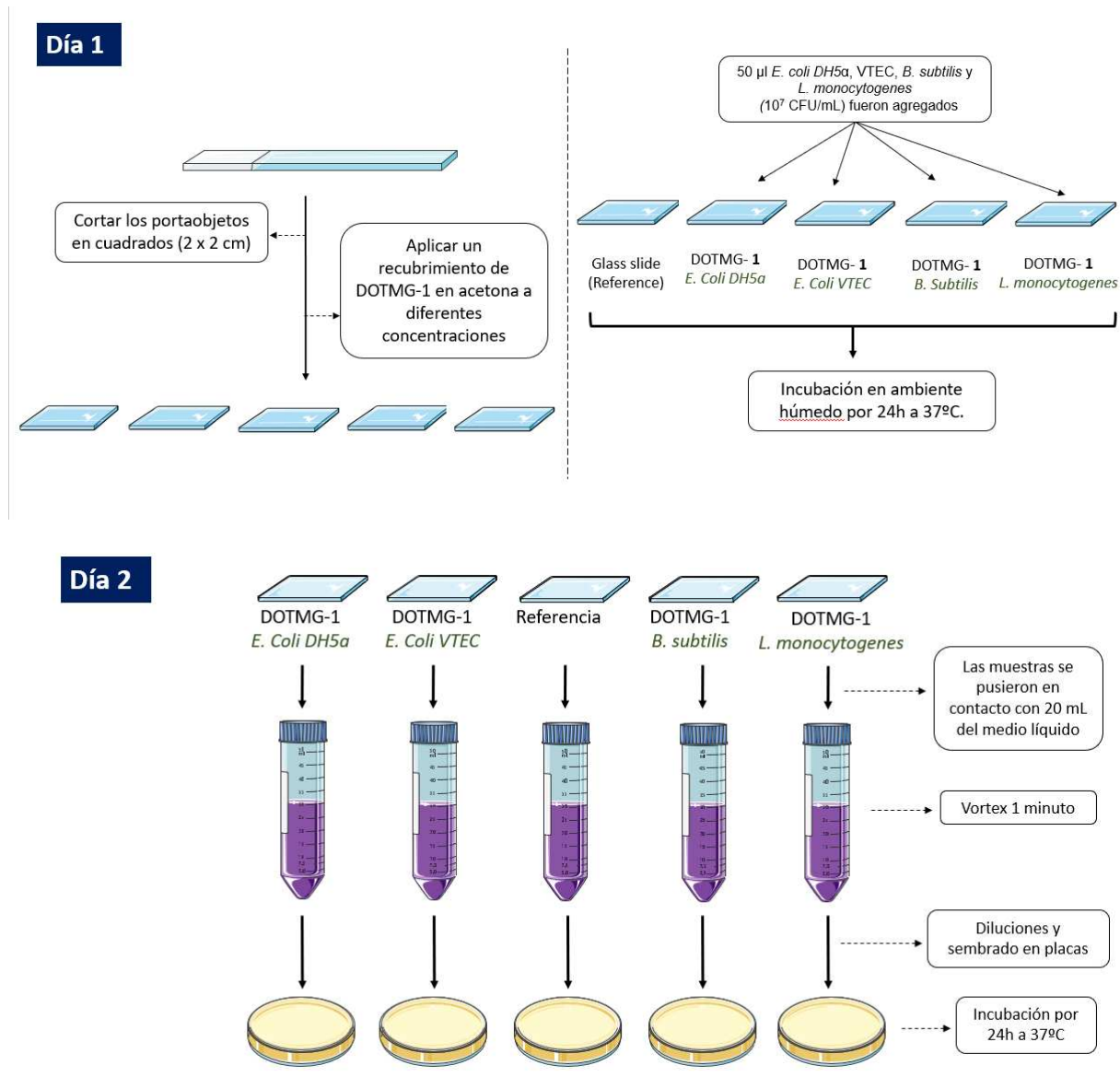


Figura 28. Ilustración del método JIS para medir la actividad antimicrobiana de superficie

La concentración por área del compuesto para valores medidos de reducción bacteriana al 100% se encuentra en la Tabla 7.

Tabla 7. Concentración de DOTMG-1 utilizado para obtener una reducción bacteriana del 100% en la superficie tratada.

Microorganismo	DOTMG 1 (100% de reducción bacteriana) µg cm ⁻²
<i>E. coli</i> DH5α	8,00
<i>E. coli</i> VTEC	4,00
<i>B. subtilis</i>	2,00
<i>L. monocytogenes</i>	2,00

Se observa que la concentración que redujo el 100% del crecimiento bacteriano es menor para las dos cepas de Gram (+). Estos resultados son consistentes con los resultados de MIC y muestran que el DOTMG-1 puede inhibir el crecimiento bacteriano en una superficie recubierta.

- **Microscopía:**

Se utilizaron técnicas microscópicas de alta resolución (TEM y ESEM) para examinar los cambios estructurales en bacterias y hongos, respectivamente, inducidos por DOTMG-1.

- Análisis TEM de las bacterias incubadas con DOTMG-1.

Las imágenes TEM se utilizaron para analizar los cambios en la forma, el tamaño y la estructura de *E. coli* DH5 α , VTEC, *B. subtilis* y *L. monocytogenes* después de incubarse a concentraciones de MIC y $\frac{1}{2}$ MIC.

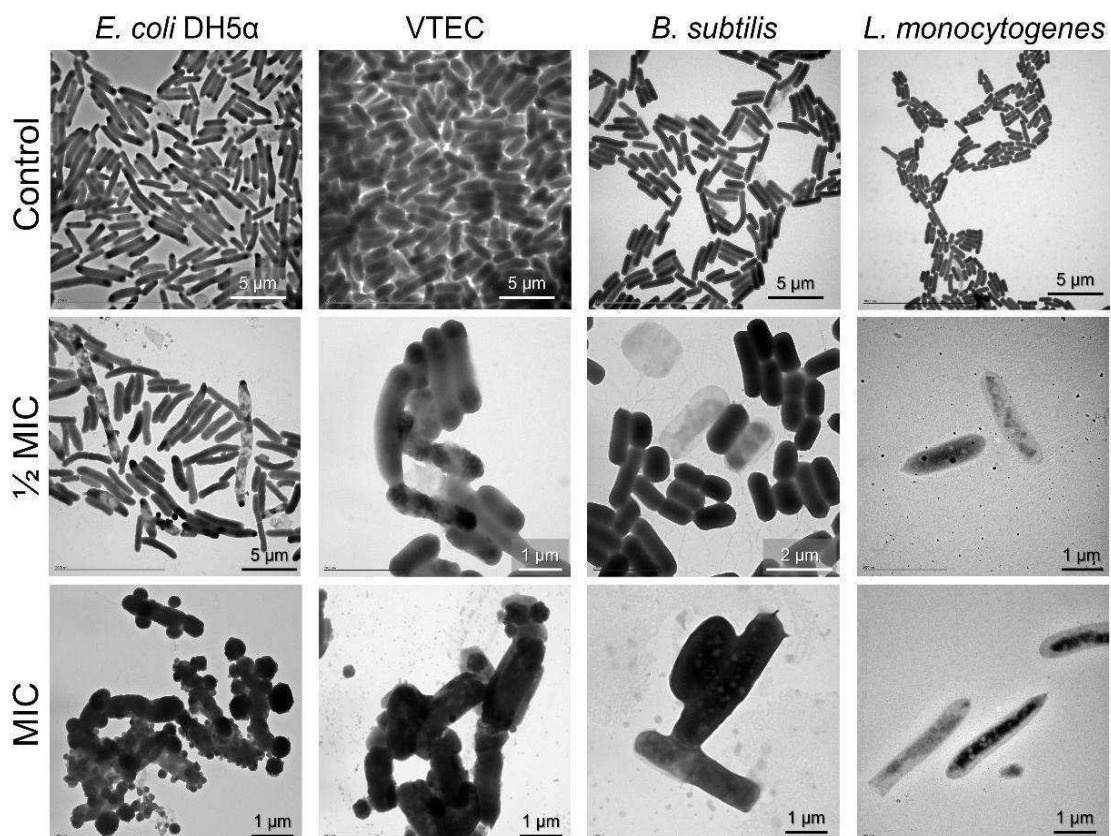


Figura 29. Imágenes TEM de las diferentes bacterias (*E. coli* DH5 α , VTEC, *B. subtilis* y *L. monocytogenes*) en ausencia de antimicrobianos (control) e incubadas con el DOTMG-1 a la concentración de $\frac{1}{2}$ MIC y MIC para cada bacteria.

En la Figura 29, se observa que a $\frac{1}{2}$ concentración de MIC, las bacterias comienzan a verse afectadas por el compuesto, y a la concentración de MIC el crecimiento se detiene por completo, y las células bacterianas pierden su integridad estructural. En el caso de la bacteria Gram (-) (*E. coli* DH5 α y VTEC) las células están completamente cubiertas por agregados POM-IL, probablemente debido a las características de su pared celular.

○ Visualización ESEM del hongo incubado con DOTMG-1.

Para visualizar los cambios en la morfología de la estructura fúngica, los hongos *A. Níger*, *A. ochraceus*, *C. cladosporioides* y *P. expansum* se incubaron con DOTMG-1 y los resultados se analizaron utilizando la metodología ESEM.

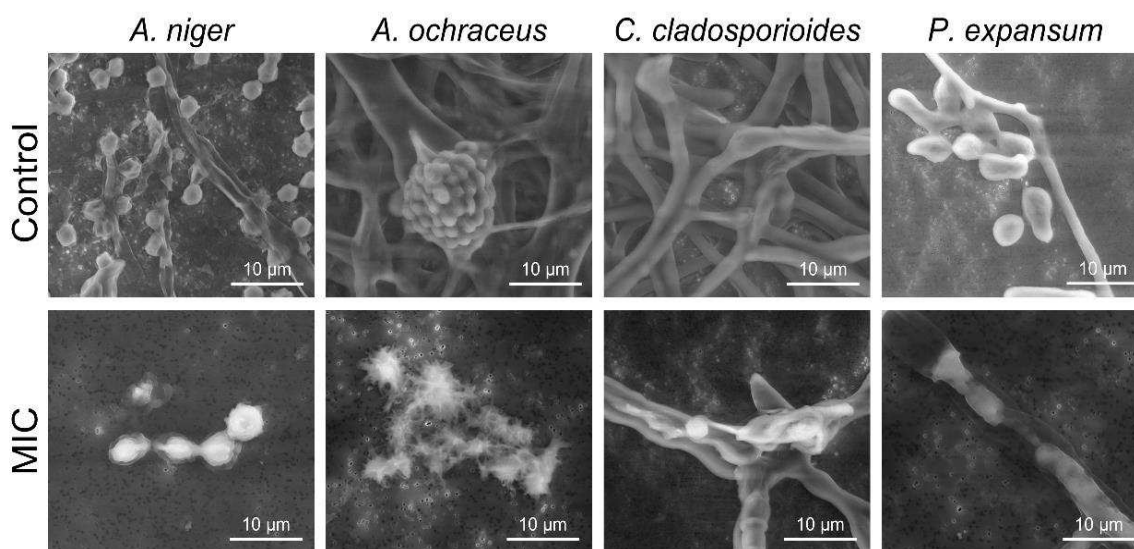


Figura 30. Imágenes ESEM de los cuatro hongos (*A. niger*, *A. ochraceus*, *C. cladosporioides* y *P. expansum*) en ausencia de antimicrobianos (control) e incubados con el DOTMG-1 a concentración MIC para cada cepa de hongos.

En las imágenes ESEM presentadas en la Figura 30, se puede observar que a la concentración MIC todos los hongos estudiados pierden su integridad estructural con un efecto importante en *C. Cladosporioides* y *P. expansum*.

2.2.3 Actividad antibacteriana de los films.

Para estudiar si la actividad antibacteriana del DOTMG-1 permanece mientras está incrustado en la matriz polimérica, se realizó un análisis *in vitro* sobre los films.

○ Resultados del conteo de placas TSA

Con el fin de analizar la actividad antibacteriana de los films, el recuento de colonias de *E. coli* y *B. subtilis* se realizó en placas de TSA.

Film A

Los valores CFU/mL del inóculo inicial se calcularon con la fórmula de la ecuación 3

$$CFU/ml = \frac{\text{number of colonies} \times \text{dilution factor}}{0.005 \text{ ml}} \quad (3)$$

Los factores de dilución son las diluciones totales de la muestra original a la placa contable. En la Tabla 8, se muestran los factores de dilución, el recuento de colonias y la concentración del medio inicial.

Tabla 8. Conteo de colonias

<i>E. coli</i>				<i>B. subtilis</i>	
dil 10 ³	UFC / ml	dil 10 ²	UFC / ml	dil 10 ³	UFC / ml
12	2.4 x 10 ⁶	90	1.8 x 10 ⁶	6 6	1.2 x 10 ⁶
12	2.4 x 10 ⁶	86	1.7 x 10 ⁶	5 5	1.0 x 10 ⁶
8	1.6 x 10 ⁶	74	1.4 x 10 ⁶	6 6	1.2 x 10 ⁶

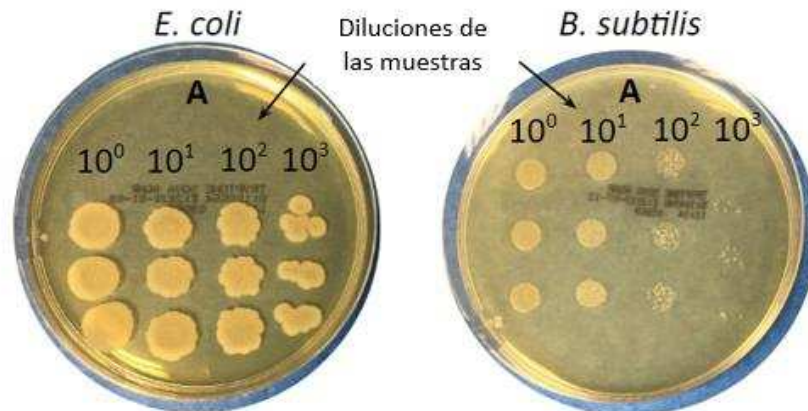


Figura 31. Placas de recuento de TSA para el film A.

En la Figura 31, los resultados para *E. coli* y *B. subtilis* se muestran incubadas sobre el film de A (muestra de control). El recuento final de UFC concuerda con el inóculo inicial (~ 10⁶ UFC / ml), lo que significa que la Film A no mata las bacterias.

Films B, C y D

Se realizó el mismo procedimiento para evaluar la actividad antibacteriana de los films que contienen DOTMG-1. Los resultados de las placas TSA se muestran en la Figura 32.



Figura 32. Placas TSA que cuentan los resultados de los films B, C y D (de izquierda a derecha).

Se observa que en las placas que contienen los films B, C y D, ni *E. coli* ni *B. subtilis*, pudieron crecer en los medios sólidos después del tiempo de incubación. Es posible concluir que incluso el film B (concentración más baja de DOTMG-1 incrustada en PMMA) puede matar ambas cepas bacterianas.

o Microscopía: resultados de ESEM

Para estudiar la inhibición de la formación de film y validar los resultados del estudio anterior, se utilizó la metodología ESEM. En la Figura 33, se muestran las imágenes ESEM de *E. coli* y *B. subtilis* en la superficie de los diferentes films.

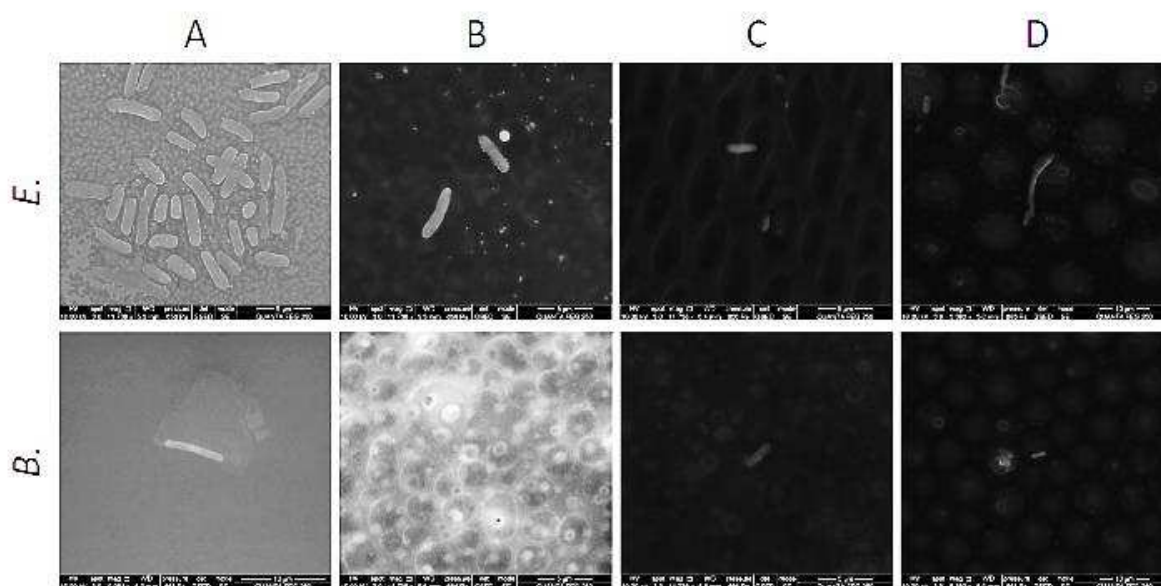


Figura 33. Imágenes ESEM de films A, B, C y D.

Se observa que *B. subtilis* no se adhiere a las superficies del film. Las imágenes ESEM de los films inoculadas con *B. subtilis* presentan pocas bacterias, incluso en la muestra de control (A). Esto podría explicarse porque la adhesión bacteria de *B. subtilis* comparada con *E. coli*. Para esta última, se confirmó que la viabilidad de las bacterias de los resultados placas de TSA, ya que se observaron menos células de las bacterias, mientras la concentración de DOTMG-1 se incrementa entre los films (de B a D).

2.3 Conclusión

El catión estéricamente exigente de la familia de cationes de alquil-guanidinio - DOTMG-, combinado con el Keggin POM lacunario - α -[SiW₁₁O₃₉]⁸⁻, resultó en un nuevo líquido iónico, DOTMG-1, que no es citotóxico y tiene propiedades antimicrobianas. El efecto de DOTMG-1 sobre *B. subtilis*, *L. monocytogenes* y *E. coli*, en términos de actividad antibacteriana, se examinó mediante la realización de diferentes pruebas. El compuesto posee una mayor actividad antibacteriana contra *B. subtilis* y *L. monocytogenes* en comparación con las cepas de *E. coli*. Es importante resaltar que el compuesto también podría prevenir la formación de biofilms. En términos de actividad antifúngica, se estudió el efecto sobre *A. Níger*, *A. Ochraceus*, *C. Cladosporiooides* y *P. E expansum*. El nuevo POM-

IL posee una actividad antifúngica similar contra *C. cladosporioides* y *P. expansum*, y su actividad es mayor contra estas cepas comparada con las de *Aspergillus*.

El POM-IL de guanidinium ha demostrado ser útil para preparar nuevos tipos de films multifuncionales que pueden usarse como recubrimientos para diferentes superficies. Los compuestos DOTMG-1 se incluyeron en una matriz polimérica de PMMA. Las PMC resultaron ser biocompatibles y su morfología superficial cambia al aumentar la cantidad de DOTMG-1. A partir de los resultados antibacterianos de los films, se concluye que el recubrimiento polimérico inhibe el crecimiento bacteriano y la formación de biofilms, incluso en la composición más baja de DOTMG-1/PMMA 20/80. Las películas podrían ser candidatos potenciales para su uso en entornos de atención médica, ya que cumplen con los requisitos de baja toxicidad y de seguridad, un aspecto importante en entornos clínicos.

Los resultados de este capítulo respaldan el gran potencial y las perspectivas de estos materiales avanzados en el desarrollo e implementación de superficies antimicrobianas.

Referencias

1. S. B. Singh, K. Young, L. L. Silver, *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *133*, 63–73.
2. M. Madigan, J. Martinko, D. Stahl, D. Clark, *Brock Biology of Microorganism*, Pearson, San Francisco, **2012**.
3. R. M. Donlan, *Clin. Infect. Dis.* **2001**, *33*, 1387–1392.
4. S. Josset, N. Keller, M. C. Lett, M. J. Ledoux, V. Keller, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 744–755.
5. S. Percival, R. Chalmers, M. Embrey, P. Hunter, J. Sellwood, P. Wyn-Jones, *Microbiology of Waterborne Diseases*, Elsevier Ltd, San Diego, **2004**.
6. C. J. Seneviratne, E. A. R. Rosa, *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1–3.
7. A. Bijelic, M. Aureliano, A. Rompel, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 1153–1169.
8. M. Inoue, T. Suzuki, Y. Fujita, M. Oda, N. Matsumoto, J. Iijima, T. Yamase, *Biomed. Pharmacother.* **2006**, *60*, 220–226.
9. M. Inoue, T. Suzuki, Y. Fujita, M. Oda, N. Matsumoto, T. Yamase, *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 1225–1233.
10. T. Hu, Y. H. Li, X. F. Kuang, C. Z. Lu, *CrystEngComm* **2017**, *19*, 3445–3454.
11. Y. Kong, L. Pan, J. Peng, B. Xue, J. Lu, B. Dong, *Mater. Lett.* **2007**, *61*, 2393–2397.
12. L. P. Datta, R. Mukherjee, S. Biswas, T. K. Das, *Langmuir* **2017**, *33*, 14195–14208.

13. H. K. Daima, P. R. Selvakannan, R. Shukla, S. K. Bhargava, V. Bansal, *PLoS One* **2013**, *8*, 1–14.
14. H. K. Daima, P. Selvakannan, A. Kandjani, S. Ravi, S. K. Bhargava, B. Vipul, *NanoScale* **2014**, *6*, 758–766.
15. L. De Matteis, S. G. Mitchell, J. M. De La Fuente, *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 7114–7117.
16. S. Herrmann, L. De Matteis, J. M. de la Fuente, S. G. Mitchell, C. Streb, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2017**, *56*, 1667–1670.
17. A. Misra, I. Franco Castillo, D. P. Müller, C. González, S. Eyssautier-Chuine, A. Ziegler, J. M. de la Fuente, S. G. Mitchell, C. Streb, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2018**, *57*, 14926–14931.
18. N. A. Sivov, *Biocide Guanidine Containing Polymers*, Taylor & Francis Group, Leiden, **2006**.
19. Z. Zhou, D. Wei, Y. Guan, A. Zheng, J. J. Zhong, *Mater. Sci. Eng. C* **2011**, *31*, 1836–1843.
20. S. Liu, Z. Tang, *Nano Today* **2010**, *5*, 267–281. 66
21. R. F. Egerton, *Physical Principles of Electron Microscopy*, Springer, Boston, **2005**.
22. M. Omid, A. Fatehinya, M. Farahani, Z. Akbari, S. Shahmoradi, F. Yazdian, M. Tahriri, K. Moharamzadeh, L. Tayebi, D. Vashae, *Characterization of Biomaterials*, Elsevier Ltd, Oxford, **2013**.
23. M. Duman, I. Neundlinger, R. Zhu, J. Preiner, C. Lamprecht, L. A. Chtcheglova, C. Rankl, T. Puntheeranurak, A. Ebner, P. Hinterdorfer, *Atomic Force Microscopy*, John Wiley & Sons, Ltd, New Jersey, **2012**.
24. E. H. Kerns, *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90*, 1838–1858.
25. L. M. Magalhães, C. Nunes, M. Lúcio, M. A. Segundo, S. Reis, J. L. F. C. Lima, *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 1823–1830.
26. A. Azevedo, S. Costa, D. Ana, A. Marques, P. Pinto, K. Bica, A. Ressmann, M. Passos, A. Araújo, S. Reis, et al., *J. Mol. Liq.* **2017**, *232*, 20–26.
27. H. van de Waterbeemd, M. Kansy, B. Wagner, H. Fischer, in *Lipophilicity Drug Action Toxicol.* (Eds. V. Pliska, B. Testa, H. van de Waterbeemd), VCH, **1996**, 73–87.
28. J. N. Cabrera, M. M. Ruiz, M. Fascio, N. D'Accorso, R. Minchev, P. Dubois, L. Lizarraga, R. M. Negri, *Polymers*, **2017**, *9*, 331.
29. A. Ginsberg (Ed), *Inorganic Syntheses*, John Wiley & Sons, Ltd, New York, **1990**.
30. L. Qiao, K. Lu, M. Qi, R. Fu, *J. Chromatogr. A* **2013**, *1276*, 112–119.
31. S. Herrmann, *New Synthetic Routes to Polyoxometalate Containing Ionic Liquids*, Springer Spektrum, Ulm, Germany, **2015**.
32. S. Hava, J. Ivri, M. Auslender, *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.*, **2001**, *3* S190.
33. E. Ghorbel, I. Hadriche, G. Casalino, N. Masmoudi, *Materials*, **2014**, *7*, 375–398
34. H. Alexander in *An Introduction to Materials in Medicine*, (Eds. B. Ratner, A. Hoffman, F. Schoen, J. Lemons), Academic Press, **1996**, pp. 94–105.
35. K. Aruna, B. Sudheer Reddy, B. Nayak, B. Haritha Bai, in *Advanced Polymeric Materials for Sustainability and Innovations*, (Eds. S. Thottathill, S. Thomas, N. Kalarikkal, D. Rouxel), Taylor & Francis Group, Waretown, **2019**, pp. 228–240.

Capítulo 3: Actividad anti-ZIKV y anti-VIH de POMs y sus derivados

3.1 Introducción

Los virus son parásitos intracelulares obligados. Se conoce una gran cantidad de virus y, dado que puede ocurrir un entrecruzamiento entre especies, las infecciones humanas de origen animal suceden con mayor frecuencia.¹

Las partículas del virus infecciosas se llaman viriones. Los viriones más simples consisten en ácido nucleico (ARN o ADN monocatenario o bicatenario) y una cápside. Su función es proteger el genoma viral y, durante la infección, unir el virión a receptores específicos de la célula huésped. Algunos virus son virus envueltos y tienen en su estructura una bicapa lipídica que contiene proteínas transmembrana y actúan como recubrimiento protector adicional.² En 1971, D. Baltimore desarrolló un sistema de clasificación para los virus que permite relacionar los genomas virales y el camino hacia el ARNm (Fig .1).³

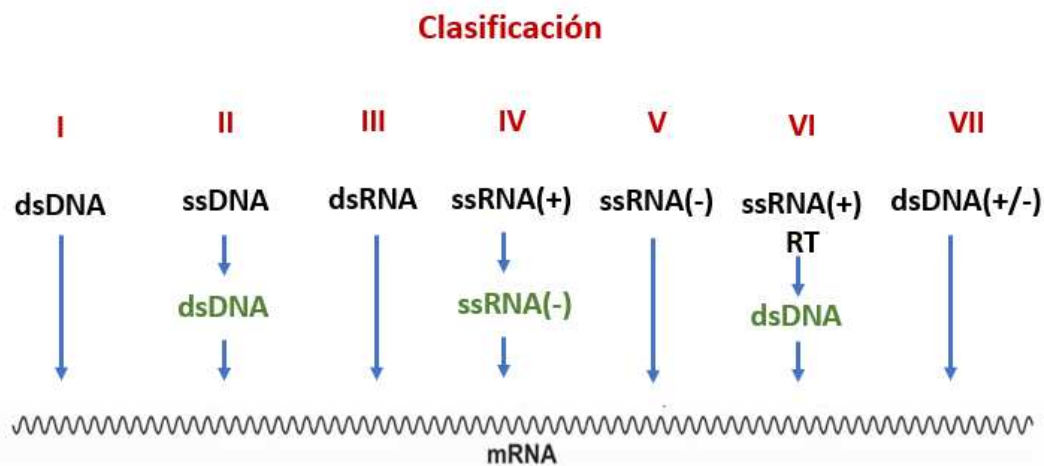


Figura 1. Clasificación de virus de Baltimore

El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) se clasifica como clase VI, mientras que el virus Zika (ZIKV) es clase V. Estos dos virus fueron seleccionados para su investigación en esta tesis doctoral ya que se desea extrapolar sobre el estado del arte en relación con el VIH y los POMs y aplicar esta información al ZIKV. Las enfermedades relacionadas con estos virus siguen siendo una amenaza, y la falta de una cura eficiente empuja a la comunidad científica a encontrar nuevos

tratamientos y vacunas preventivas. Los polioxometalatos podrían ser candidatos potenciales para ser utilizados como agentes antivirales.

Primero, este capítulo presenta los virus VIH y ZIKV. Se describe su estructura, mecanismo de infección y enfermedades relacionadas. Además, se introduce la actividad antiviral de los POM observada en los últimos años.

En segundo lugar, se presenta la posible conjugación entre el catión caffeinium y los K-POM para la síntesis de agentes anti-VIH, como una combinación potencial de fármacos antivirales. La funcionalización de los POM con cationes orgánicos es una forma de mejorar su potencial aplicación en el campo de la química medicinal. La cafeína es un compuesto biológicamente activo, utilizado para diferentes aplicaciones en bioquímica. El caffeinium se eligió como catión principal y los cambios se basaron en los aniones Keggin para explorar el papel de los POMs en la actividad antiviral de los compuestos. A continuación, se describe un nuevo enfoque que combina datos experimentales y estudios de acoplamiento molecular para investigar el mecanismo de acción de los POM en ZIKV. El desarrollo de POM como fármacos antivirales inorgánicos se ve obstaculizado en parte por nuestro conocimiento limitado del mecanismo de interacción entre el virus y el fármaco a nivel molecular. El objetivo de esta tesis se basa en evaluar la actividad anti-ZIKV de los WD-POM y obtener una visión mecanicista de la actividad antiviral, de modo de evaluar sus posibles aplicaciones en la prevención de la infección por ZIKV y ayudar al desarrollo de derivados. Se muestran una serie de WD-POM y su citotoxicidad y actividad antiviral. Para obtener información sobre el mecanismo de acción, se realizaron estudios computacionales y un ensayo de competencia de anticuerpos.

3.1.1 Virus de inmunodeficiencia humana – VIH

El VIH infecta los glóbulos blancos (células CD4⁺), debilita progresivamente el sistema inmunitario del huésped y hace que la persona infectada sea vulnerable a las infecciones oportunistas. A fines de 2018, había 37.9 millones de personas viviendo con VIH en el mundo y 1.7 millones eran nuevos infectados.⁴ El VIH causa el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y actualmente sigue siendo un problema de salud relevante debido a la capacidad del virus para establecer una infección latente,

lo que le permite evadir la terapia antiviral y el sistema inmunitario del huésped.⁵ Existen varias iniciativas propuestas para controlar la propagación del VIH y crear conciencia entre las personas sobre la prevención y el tratamiento del VIH. Uno de los objetivos del desarrollo sostenible es comprometerse a poner fin a la epidemia del VIH para 2030.⁴ Esto alienta a la comunidad científica a proporcionar herramientas que inhiban la entrada y propagación del virus de forma innovadora, segura y efectiva.

El VIH es un lentivirus perteneciente a la familia *Retroviridae*. Su forma es aproximadamente esférica con un diámetro de ca. 100 nm y está rodeado por una doble membrana lipídica (cubre la mayor parte de la superficie del VIH-1 en contacto con el medio externo).⁶ Dentro de la envoltura lipídica, se encuentran las glicoproteínas de la envoltura viral, gp120 y gp41 (Fig. 2). El virus usa estas proteínas para ingresar a una nueva célula al unirse al receptor CD4 presente en los linfocitos T. La proteína matriz p17 está anclada en el lado interno de la envoltura lipídica viral. Las dos copias del ARN del VIH están protegidas por múltiples copias (aproximadamente 2.000) de la proteína p24 que forma una cápside cónica. El genoma es parte de un complejo proteína-ácido nucleico, compuesto por la nucleoproteína p7 y la transcriptasa inversa p66 (RT).⁷

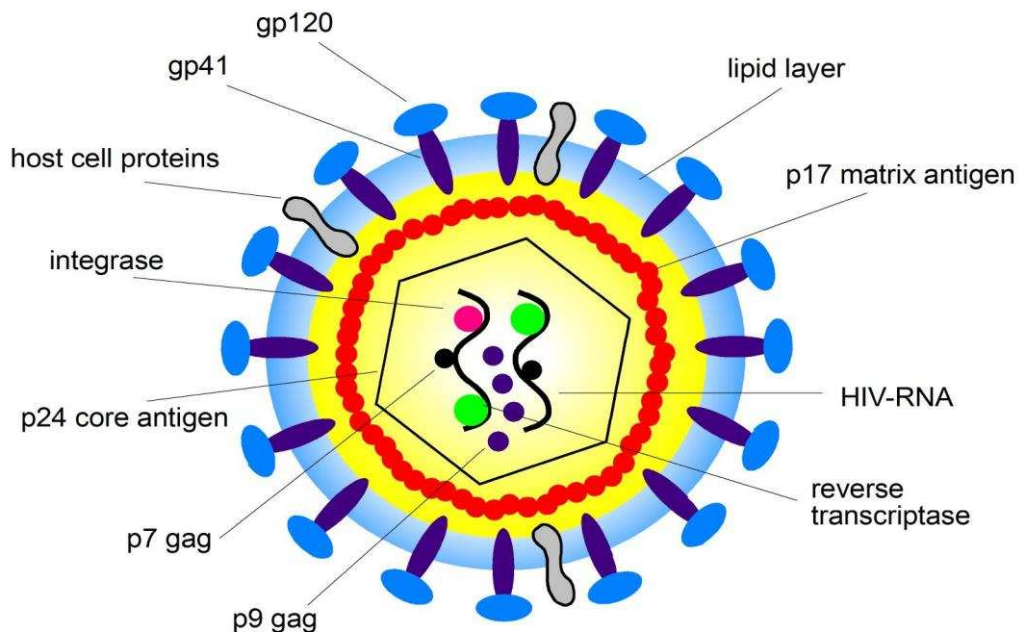


Figura 2. Ilustración de la estructura del VIH (reimpreso en el idioma original con permiso de la Ref. 7)

En la Figura 3, se puede observar la estructura de la membrana y la posición del sitio de unión a CD4. Gp120 interactúa con gp41 principalmente a través de interacciones que involucran el dominio interno y las extensiones N- / C- terminales.

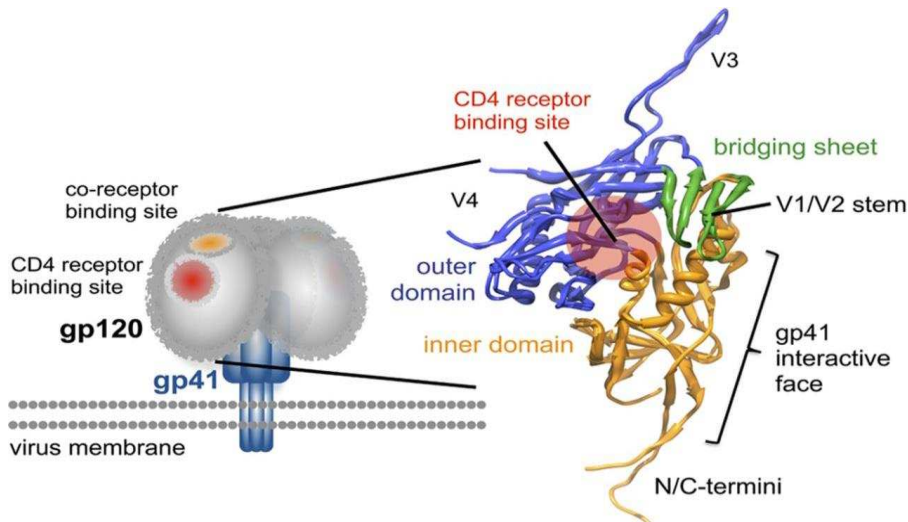


Figura 3. Estructura de las proteínas y el receptor celular. Reimpreso en el idioma original con el permiso de la referencia 8. (Copyright © 2020, American Society for Microbiology)

El ciclo de replicación del VIH comienza cuando la gp120 del virión se une al CD4, desencadenando un cambio conformacional que permite su anclaje a un correceptor celular, ya sea CCR5 o CXCR4. La interacción entre gp120 y los correceptores estimula un cambio conformacional adicional que permite la exposición de la gp41. Al ser una proteína transmembrana, la gp41 promueve la fusión de la membrana viral con la del huésped, permitiendo la liberación de la cápside en la célula.⁸

El mercado mundial de medicamentos contra el VIH tiene el potencial de crecer en 2.440 millones de USD entre 2019 y 2023 y se acelerará con una tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR) de aproximadamente el 2%.⁹ Los principales factores que impulsan el crecimiento del mercado de medicamentos contra el VIH incluyen el aumento tanto de la prevalencia del VIH como de la tasa de tratamiento y diagnóstico. Existen varias iniciativas de la mayoría de los gobiernos destinadas a crear conciencia entre las personas sobre las causas del SIDA, sus síntomas, las opciones de tratamiento disponibles y el papel crucial de estos tratamientos en el control del crecimiento del virus. Por lo tanto, esto impulsará el mercado de medicamentos para la prevención del VIH. Sin embargo, se espera que las estrictas regulaciones gubernamentales para la aprobación y comercialización de medicamentos contra el VIH limiten el crecimiento de la industria. La combinación de medicamentos contra el VIH ya conocidos tiene el mercado más grande debido a sus buenos resultados en el control del VIH y e infecciones relacionadas, así como a su facilidad de uso. La prevención eficaz del VIH reducirá la transmisión. Por lo tanto, es

necesario realizar esfuerzos con alianzas y un sistema de salud integrado que brinde prevención, diagnóstico y tratamiento del VIH.⁵

3.1.2 Virus ZIKA – ZIKV

En 2019, un total de 87 países y territorios tenían evidencia de transmisión autóctona de ZIKV por el mosquito *Aedes aegypti*. En 2016, hubo un pico de infecciones por ZIKV en el continente americano que comenzó a disminuir en 2017 y 2018. El virus del Zika ha estado recibiendo atención mundial porque investigadores han encontrado evidencia de que el ZIKV puede estar relacionado con defectos congénitos y afecciones neurológicas como la microcefalia y el Síndrome de Guillain-Barré en adultos. La nueva evidencia científica continúa acumulándose y mejorando nuestra comprensión de la transmisión global del ZIKV y sus complicaciones asociadas. Estudios recientes han proporcionado nueva información sobre la incidencia, prevalencia y patrones de transmisión del ZIKV en todo el mundo.¹⁰

En la Figura 4, se observa que la estructura del virión es esférica, de aproximadamente 50 nm de diámetro y cubierta por la proteína de la envoltura (proteína E). Las proteínas de la superficie están dispuestas en una simetría de tipo icosaédrico.¹¹

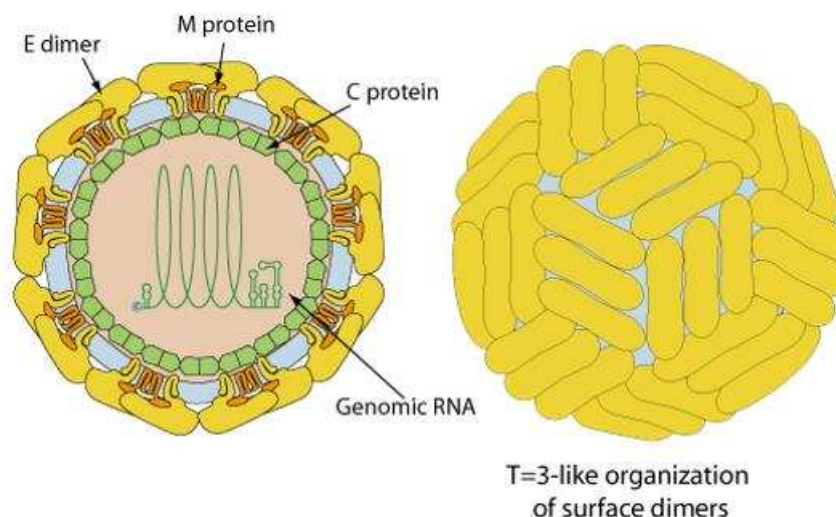


Figura 4. Estructura del ZIKV. Reimpreso en el idioma original con el formulario de permiso de la Ref. 11.

El ZIKV ingresa a la célula por endocitosis, dependiente del pH y mediada por clatrina. Luego, se libera y se replica dentro del citoplasma.¹² La entrada de células

está mediada principalmente por la proteína E, aunque la maduración de partículas incompleta permite la mediación por la proteína M y otros lípidos aniónicos presentes en la membrana viral.¹³

No hay vacuna o tratamiento para la infección por ZIKV. Los científicos y el sector de la salud están buscando diferentes terapias, como medicamentos antivirales y vacunas, para combatir la propagación de la infección. El aumento de la conciencia entre las personas sobre el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades debido a diversas iniciativas aumenta la tasa de tratamiento y, por lo tanto, este factor actúa como un motor importante para el crecimiento del mercado. Se informa que el mercado terapéutico global de ZIKV está creciendo en 33 millones USD, con un CAGR del 4% de 2019-2023.¹⁴ Las iniciativas de agencias estatales e internacionales tienen como objetivo la prevención y el tratamiento con inhibidores de virus, por lo que se pueden esperar escenarios favorables para continuar el desarrollo de la investigación.

3.1.3 Actividad antiviral de los POM

Se han reportado a varios polioxometalatos como inhibidores de las replicaciones de muchos virus de ADN y ARN envueltos como el virus del herpes, y retrovirus como el VIH-1, VIH-2. Dentro de ellas, también se ha publicado que los polioxometalatos podrían inhibir la unión del virus en su receptor celular, dando como resultado, agentes antivirales que actúan en las primeras etapas del ciclo viral.¹⁵

En base a la historia del VIH y el SIDA, se sugiere que la epidemia comenzó a mediados y finales de la década de 1970 y, para 1980, el VIH se había extendido a América del Norte, América del Sur, Europa, África y Australia.¹⁶ En 1987, la FDA aprobó el primer medicamento antirretroviral contra el VIH, la azidotimidina (AZT). En 1996, se creó el "Programa de las Naciones Unidas sobre el VIH / SIDA (ONUSIDA)" con el objetivo de innovar y colaborar internacionalmente para encontrar nuevas alternativas terapéuticas para combatir el SIDA. Se observa que durante 1990 y 1996, el período en el que se invirtió mayor esfuerzo para encontrar un tratamiento eficaz para combatir la enfermedad, se desarrolló un interés sustancial en comprender la actividad antiviral de los POMs. Después de eso, el interés se mantiene en el tiempo hasta nuestros días.¹⁷

En el libro "Approved Drug Products with Therapeutic Equivalence Evaluations" (también llamado libro naranja) de la FDA, no se encontraron resultados de medicamentos con POMs que hayan sido aprobados como agentes antivirales en fases clínicas basadas en lineamientos de seguridad y de eficacia.¹⁸

En 2000, se otorgó a Raymond F. Schinazi y Craig L. Hill una patente para el desarrollo de un aerosol que administra una sal de polioxometalato a los pulmones para prevenir o tratar infecciones virales respiratorias.¹⁹ Esta invención se relacionó con una gran combinación de POMs para el tratamiento de la Influenza A, B y las infecciones del virus sincitial respiratorio (VSR). En 2003, se concedió a Shiro Shigeta y Toshihiro Yamase una patente llamada "Antiviral drugs containing heteropolyanions" y la invención se relacionó con nuevos medicamentos antivirales que contienen heteropolianiones. Estos consisten en POMs representados por la fórmula $[(XW_9O_{33})_2V_3O_3]^{p-}$, donde como p es un número positivo entre 9 y 12 y X es Sb, P, As o Bi y especialmente Sb, como ingredientes activos para formular medicamentos antivirales. En la patente, se afirma que estos POMs poseen un amplio espectro de actividad antiviral contra el DFV (virus de la fiebre del dengue), el PfluV (virus de la parainfluenza), el VIH y el virus del herpes simple, mostrando una alta eficacia y baja toxicidad.²⁰ En 2005, otra patente relacionada con los compuestos de POMs como agentes antivirales fue otorgada a Raymond F. Schinazi y Craig L. Hill. Esta invención estaba relacionada con los POM con las siguientes fórmulas moleculares generales: $(M)_7[PW_{11}O_{39}]$, $(M)_8[SiW_{11}O_{39}]$, $(M)_9[HSiW_9O_{34}]$, $(M)_8[HPW_9O_{34}]$, $(M)_{10}[(TM)_4(PW_9O_{34})_2]$, $(M)_{16}[(TM)_4(P_2W_{15}O_{56})_2]$, $(M)_{14}[NaP_5W_{30}O_{11}]$, $(M)_{12}[(TM)_3(PW_9O_{34})_2]$, y $(M)_6[P_2W_{18}O_{62}]$ en la que M es un catión de metal alcalino, NH_4^+ o un aminoácido catiónico, y TM es un ión de metal de transición divalente, como Mn, Fe, Co, Ni, Cu y Zn. Estos compuestos fueron reivindicados como agentes antivirales para el VIH.²¹ Todas estas patentes (reclamadas en Estados Unidos y Japón), aunque fueron otorgadas, caducaron debido a razones relacionadas con el pago de las cuotas (búsqueda realizada en Espacenet y patentes de Google en febrero de 2020).

Con respecto a las publicaciones de investigación, a modo de mencionar las más relevantes, se realizó una búsqueda en la base de datos Scopus (febrero de 2020).

En la década de 1980, un grupo de científicos del Instituto Pasteur de París, Francia, informó que el compuesto HPA-23 - $(NH_4)_{17}[NaW_{21}Sb_9O_{86}] \times 14 H_2O$ - podría inhibir la

reproducción del VIH (fecha de patente: 1988).²² Este descubrimiento generó interés en investigadores de todo el mundo, ya que había muchas personas que padecían SIDA y tenían la esperanza de un tratamiento.²³ El medicamento se había administrado a pacientes infectados con VIH que tenían síntomas de SIDA en París. Como el prometedor medicamento antiviral no estaba disponible en los Estados Unidos, muchas personas infectadas con el VIH viajaron a Francia para comenzar con el tratamiento.²⁴ Poco después, se realizaron ensayos clínicos para el compuesto en los EE. UU. Esto ocurrió antes de la creación de la red de Grupos de Ensayos Clínicos del SIDA (ACTG) que luego estableció (y continúa estableciendo) estándares para la evaluación de las terapias contra el SIDA.²⁵ Desafortunadamente, los resultados de los ensayos clínicos mostraron que la administración del compuesto se asociaba con efectos secundarios significativamente adversos y relacionados con el sistema central nervioso como amnesia, mareos, toxicidad renal y aumento de enzimas hepáticas, entre otros.²⁶ Todos estos ensayos se realizaron poco después de la identificación de la estructura del VIH y cuando no había mucho conocimiento sobre el mecanismo de acción. Además, el diseño del protocolo y las herramientas biológicas disponibles en ese momento no eran las mismas que ofrece la tecnología actualmente. En 1994, se informó que un ARN de flavivirus, de forma replicativa bicatenaria, se inhibió de forma dependiente de la dosis del mismo fármaco, HPA-23 y derivados. Se destacó el uso potencial de estos POMs para el tratamiento de la infección por dengue.²⁷ En 1998, una revisión mostró que la densidad de carga de POMs era una consideración importante en la eficacia de la inhibición, y que su actividad antiviral es amplia con respecto a los virus, pero específica en determinados sitios de unión y con alta eficacia. Los datos concluyeron que los POM son efectivos contra el VIH-1, y se identificaron tres modos de acción, inhibición de la unión del gp120 con CD4, interferencia con el paso de adsorción viral y la fusión de los linfocitos infectados con los no infectados, y la prevención en la formación de sincitios. Otros inhiben la transcriptasa inversa del VIH-1 y la proteasa del VIH-1.²⁸ El objetivo en ese momento era obtener relaciones estructura-actividad y usar esta información para diseñar medicamentos terapéuticos y menos tóxicos de POM y/o en combinación con otros agentes antivirales. En 2001, una publicación mostró que los POMs que contienen Nb de la clase Wells-Dawson podrían inhibir la proteasa del VIH-1 (VIH-1P) y el estudio del mecanismo de acción se basó en estudios de cinética, unión y modelos moleculares. Los estudios computacionales sugieren que la inhibición

de los POMs se lleva a cabo en el patch catiónico que contiene los residuos de lisina y ubicados en la región "bisagra" que cubre los sitios activos comunes de los inhibidores de la proteasa del VIH-1P.²⁹ En 2002, se publicó una revisión sobre los nuevos desarrollos en la terapia del VIH con compuestos químicos, que indica que los polioxometalatos actúan sobre la absorción viral al unirse a la glicoproteína gp120 de la envoltura viral.³⁰ En 2003, un informe acerca de las actividades anti-ARN de POMs sustituidos con titanio y vanadio fue publicado. El mecanismo de acción anti-VIH de PM-1001, $K_{10}Na[(VO)_3(SbW_9O_{33})_2] \times 26 H_2O$, muestra actividad con una EC_{50} de menos de $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ y concentraciones de toxicidad entre 41 y $47 \mu\text{mol L}^{-1}$. Los resultados sugirieron que este POM afecta la unión del VIH a la membrana celular y la formación de sincitios entre las células infectadas y no infectadas por el VIH.³¹ En 2006, se publicó una revisión sobre la actividad de virus anti-ARN de los polioxometalatos. Se hizo hincapié en las actividades antirretrovirales de diferentes compuestos de la familia Keggin. Estos fueron probados contra FluV A, RSV, virus de parainfluenza (PfluV) tipo 2, DFV, VIH-1 y coronavirus SARS *in vitro*. El compuesto con la estructura $K_{10}Na[(VO)_3(SbW_9O_{33})_2] \times 26 H_2O$, el mismo de la publicación anterior (PM-1001), posee actividades de virus anti-ARN de amplio espectro que incluyen actividad contra estos virus.³² En 2018, la actividad anti-VIH y el mecanismo de acción de un polioxometalato de Keggin que contiene titanio, $K_6HPTi_2W_{10}O_{40}$, se evidenció contra un grupo diverso de cepas de VIH tipo 1, que resultaron en compuestos con baja citotoxicidad y genotoxicidad. El ensayo de adición de tiempo reveló que este POM actúa en una etapa temprana de infección porque inhibe más el virus Env-pseudotipo que el pseudotipo del virus de la estomatitis vesicular (VSVG). Además, se demostró que el Ti-POM bloqueó el sitio de unión de gp120 en el receptor CD4 y se une directamente al péptido N36, mediante el bloqueo de la formación del núcleo de gp4.³³ Recientemente, se informó que el POM tipo Keggin de la publicación anterior, $[Ti_2PW_{10}O_{40}]^{7-}$, actúa sobre proceso de entrada de la infección viral del ZIKV, y puede reducir significativamente la producción de progenie de este virus.³⁴

En varias publicaciones se atribuyó la actividad antiviral de los POM a la interacción con proteínas. Las interacciones POM-proteína varían desde una interacción fuerte hasta una moderada a débil y las POMs se ubican principalmente en la periferia de la estructura y cerca de una región cargada positivamente. Se ha informado que los residuos básicos están presentes principalmente en cada sitio de unión de los POMs,

y también están involucradas cadenas laterales polares pero sin carga (alta contribución de enlaces de hidrógeno en el complejo proteína-POM), mientras que los residuos no polares y cargados negativamente juegan un papel menor.³⁵ El enfoque en este capítulo es identificar nuevos compuestos antivirales basados en POMs que interaccionen con una proteína y bloquean algún paso del ciclo viral para detener su reproducción.

3.2. Caf-POM como agentes anti-VIH

La familia de las xantinas son compuestos versátiles con alta diversidad molecular, lo que los convierte en candidatos potenciales para crear nuevos compuestos con bioactividad para la prevención y el tratamiento de infecciones. Existe evidencia previa de la actividad anti-VIH de los derivados de xantina, especialmente la cafeína. En algunas publicaciones, se informa una relación entre la ingesta de cafeína y los marcadores inmunológicos y virológicos de la progresión de la enfermedad del VIH. Además, el aumento del número de recuentos de células CD4 y la disminución de las cargas virales se asociaron con un mayor consumo de cafeína.³⁶ Otros resultados sugieren que la cafeína inhibe la vía de ATR (serina / treonina proteína específica quinasa) y que afectan a la transducción de HIV-1 y otros estudios se basan en la inhibición del VIH-1 de replicación por cafeína y relacionados con la cafeína, metilxantinas, debido a un efecto en la etapa de integración del ciclo de vida del virus.^{37, 38} Como se mencionó anteriormente (sección Introducción), varias investigaciones han informado sobre la actividad anti-VIH de los POM y uno de los compuestos más potentes reportados fue el $K_{13}[Ce(SiW_{11}O_{39})_2 \cdot 26H_2O]$, un sándwich Keggin POM sustituido con cerio.³⁹ Se demostró que el compuesto inhibe el VIH-1 a concentraciones por debajo de desde 0,008 hasta 0,8 μM .⁴⁰ Basándose en estos estudios, fueron diseñados una serie de materiales híbridos basados en la interacción electrostática entre un catión caffeinium y POM, para estudiar su papel potencial como agentes anti-VIH.

En el presente capítulo, el objetivo es sintetizar y explorar la posible conjugación entre el catión cafeína y los Keggin POMs sustituido con cerio y el lacunario como posibles agentes anti-VIH. Por esta razón, se eligió el caffeinium como un catión

principal y los cambios se basaron en los aniones para comprender el papel de los POM en la actividad antiviral de los compuestos híbridos. En la Figura 5, se presenta la representación de los aniones Keggin sintetizados para este estudio.

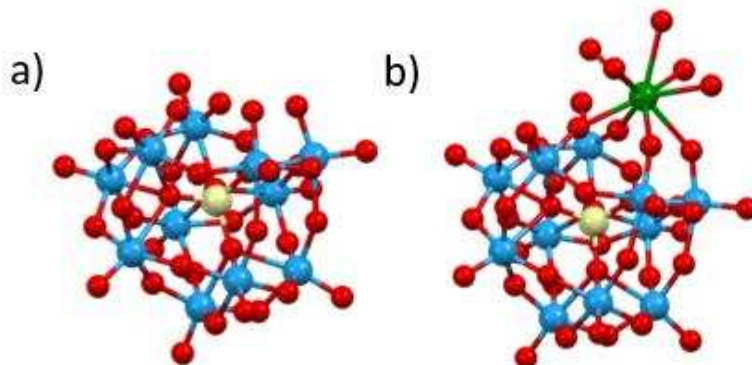


Figura 5. Representación de bola y palo de los clusters: a) Keggin mono-lacunario [SiW₁₁O₃₉]⁸⁻; b) mono-sustituido cerio Keggin [CeSiW₁₁O₃₉]⁴⁻; colores: silicio (beige), tungsteno (azul), oxígeno (rojo), cerio (verde)

Para obtener información sobre el mecanismo de acción, se realizó un ensayo de tiempo de adición y un ensayo de filtración con colorantes en liposomas que imitan las partículas virales. El análisis de los resultados se basó en la interacción de los Caf-POM y la membrana lipídica para estudiar si la actividad antiviral se debe a la perturbación de la organización funcional del virión.

3.2.1 Sección experimental

3.2.1.1 Materiales y métodos.

- **Espectroscopía UV-VIS:** la espectroscopía UV-VIS se realizó en un espectrofotómetro SHIMADZU UV-Vis-NIR UV-3600.
- **Análisis elemental:** EA se realizó en un Analizador Elemental Carlo Erba 1108.
- **Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN):** ¹H y ¹³C espectros de RMN se registraron en Bruker Avance 600 (1H: 600,13 MHz; 13C: 151,16 MHz) y Bruker Avance 500 espectrómetros (1H: 500,14 MHz, 13C: 125,76 MHz);
- **Espectroscopía de emisión con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES):** ICP-AES se realizó en un espectrómetro Perkin Elmer Plasma 400.
- **Difracción de monocristal de rayos X (XRD):** se realizó en un difractómetro de cristal único de Bruker D8 de Quest con un detector de fotones II utilizando radiación Mo Ka ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$).
- **Espectroscopía FT-IR:** para el polioxometalato, la espectroscopía FT-IR se realizó en un espectrofotómetro Bruker Vector 22 FTIR. Las muestras se prepararon como

pastillas con KBr. Las señales se dan como números de onda en cm^{-1} utilizando las siguientes abreviaturas: vs = muy fuerte, s = fuerte, m = medio, w = débil y b = amplio.

- **Ensayo de infección de virus y dependiente en el tiempo:** El VIH-1 infectividad en las células se midió con un luminómetro Orion II de microplaca (Titertek-Berthold).
- **Ensayo de viabilidad celular:** la viabilidad celular se cuantificó usando el kit CellTiter Glo-luciferase (Promega, # G7571) usando un luminómetro de microplaca Orion II (Titertek-Berthold).
- **Ensayo de liposomas:** los liposomas se cuantificaron mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) utilizando un ZetaView (ParticleMetrix, Inning, Alemania). La intensidad de fluorescencia de los colorantes se leyó en un lector de placas Cytation 3 (Biotek, Winooski, EE. UU.).

3.2.1.2 Síntesis

Observaciones generales: Todos los productos químicos se compraron a Sigma Aldrich, ABCR o ACROS y eran de grado reactivo. Los productos químicos se usaron sin purificación adicional a menos que se indique lo contrario. Las reacciones se llevaron a cabo a presión atmosférica a menos que se indique lo contrario.

- **Síntesis de P7: $\text{K}_8\beta_2[\text{SiW}_{11}\text{O}_{39}] \times 13\text{H}_2\text{O}$:**

La síntesis es una modificación del procedimiento de la literatura.⁴¹ El metasilicato de sodio (0,5 g, 4,09 mmol) se disolvió a temperatura ambiente en 10 ml de agua destilada y se filtró (solución A). En un vaso de precipitados de 100 ml, se disolvió tungstato de sodio (8,26 g, 25,18 mmol) en 3 ml de agua destilada hirviendo (solución B). A la solución de ebullición B, se añadió gota a gota una solución de 4 mol L^{-1} de HCl acuoso (8,25 ml) durante 10 minutos con agitación vigorosa para disolver el precipitado local de ácido tungstico. Se añadió la solución A, seguido rápidamente por la adición de 2,5 ml de HCl acuoso 4 M (pH 5-6). La solución se mantuvo hirviendo durante 1,5 h. El cloruro de potasio (6,8 g) se añadió a la solución, que se agitó magnéticamente durante 15 minutos. Después de esto, la solución se filtró, y el producto sólido blanco se filtró (filtro de porosidad media). La purificación del producto se logró disolviendo el producto en agua, se filtró y se volvió a precipitar la

sal añadiendo KCl sólido (6 gr). El precipitado, después de la filtración, se lavó con dos porciones de 20 ml de una solución de KCl (1 mol L⁻¹) y finalmente se secó al aire.

• **Síntesis de P3: K₄H [β₂ CeSiW₁₁O₃₉] × 12 H₂O:**

La síntesis es una modificación del procedimiento de la literatura.⁴² A 100 ml de una solución acuosa de KCl 1 mol L⁻¹ se añadieron 0,16 g (0,65 mmol) de CeCl₃ × 7H₂O y 2,5 g (0,84 mmol) de compuesto **P7**. El pH de la solución se ajustó a 5,0 mediante la adición gota a gota de 0,1 mol L⁻¹ de HCl acuoso. Luego, la solución se agitó a 50°C durante 30 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La filtración y la evaporación lenta en un recipiente abierto a temperatura ambiente dieron como resultado cristales individuales incoloros adecuados para la difracción de rayos X de un solo cristal de K₄H [β₂ - CeSiW₁₁O₃₉] × 12 H₂O después de aproximadamente 1 semana. En el estado sólido, el grupo forma una especie dimérica, mientras que proponemos que el dímero se desagregue en los respectivos monómeros en solución. Se usó MeOH/ agua para el proceso de recristalización para obtener el complejo Ce:POM 1: 1. Rendimiento: cuantitativo. MW = 3188 gr / mol.

• **Síntesis de Caf⁺: 1,3,7,9-Tetramethylxanthinium Methyl Sulfate (C₉H₁₃ N₄O₂) (OSO₃CH₃)**

La síntesis es una modificación del procedimiento de la literatura.⁴³ La cafeína (5,0 g, 25,7 mmol) se disolvió en nitrobenzono (75 ml) a 100 ° C durante 1 h. Se añadió sulfato de dimetilo (5,2 ml) a la solución y la mezcla se calentó a reflujo a 100°C durante 24 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se añadió un exceso de éter dietílico y el disolvente se decantó. El residuo se lavó con éter dietílico varias veces y un sólido blanco. Rendimiento: (1.2 g, 3.7 mmol, 72%)

• **Síntesis de CP-7 (C₉H₁₃N₄O₂)₈ [β-SiW₁₁O₃₉] × 5H₂O**

Se disolvieron 1,10 gr (0,18 mmol) de P7 en agua y se añadieron 0,85 gr (2,65 mmol) de cafeína en agua. La solución se agitó durante dos horas a temperatura ambiente y durante la noche, se formó un precipitado. Después de filtrar y lavar varias veces, el compuesto se secó al vacío. Rendimiento: cuantitativo. MW = 4348 gr / mol.

● Síntesis de CP-3 ($C_9H_{13}N_4O_2$)₄ K [CeSiW₁₁O₃₉] × 20H₂O

Se disolvieron 0,12 gr (0,03 mmol) de **P3** en agua y se añadieron 0,15 gr (0,47 mmol) de cafeína en agua. La solución se agitó durante dos horas a temperatura ambiente y durante la noche, se formó un precipitado. Después de filtrar y lavar varias veces, el compuesto se secó al vacío. Rendimiento: cuantitativo. MW = 4050 gr / mol.

3.2.1.3 Estabilidad de los compuestos

Para estudiar la estabilidad de los compuestos en condiciones experimentales, se realizó un ensayo de estabilidad. Los experimentos se prepararon en 10 mM de fosfato PBS (pH 7,4). La concentración de las muestras fue de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. La estabilidad se caracterizó por espectroscopía UV-visible a los 0, 4 y 7 días. ⁴⁴

3.2.1.4 Ensayos *in vitro*

M. Sc. Matteo Bosso realizó los estudios *in vitro* en el Departamento de Virología Molecular de la Universidad de Ulm, Alemania.

- Ensayo de infección viral: VIH-1 libre se generó por transfección de células HEK293T con de una construcción proviral que carecen de expresión de la *env* gen (pNLenv1_ *env* _deficient_NL4-3) (5 μg) en combinación con vectores de expresión que codifican ya sea la canónica VIH 1 gen *env* (pCAGGS_HIV-1 M NL4-3 *env*) o la glucoproteína del virus de la estomatitis vesicular no relacionada (VSV-G) (1 μg). La transfección se realizó utilizando el método del fosfato de calcio. A las 48 horas después de la transfección, se recogieron los sobrenadantes, se purificaron por centrifugación a 1.500 rpm durante 5 minutos y se congelaron a -80 °C. La infectividad total de ambas reservas de virus se evaluó mediante la realización de diluciones seriadas en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco 1x (DPBS) [-]CaCl₂ [-]MgCl₂ (Gibco / Life Technologies). Los sobrenadantes resultantes se usaron para infectar 10.000 células TZM-bl (1) por triplicado y la infectividad del VIH-1 se midió a las 48 h. después de la infección lisando las células en 40 μl de Gal-Screen (Applied Biosystem o Life Biotechnology) y después 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se transfirieron 35 μl de lisados celulares a placas blancas de micropocillos de 96 pocillos (Nunc) y se cuantificó la luminiscencia derivada de β -galactosidasa, de acuerdo con las instrucciones del

fabricante, con un luminómetro de microplacas Orion II (Titertek- Berthold) como unidades de luz relativas por segundo (RLU/s). La dilución más baja que no mostró signos de superinfección se usó para otros experimentos. Posteriormente, los POMs y primera ronda de infección por VIH-1 se preincubaron durante 10 minutos a 37 °C antes de infectar 10.000 células informadoras TZM-bl y medir la infectividad del VIH-1 a las 48 h después de la infección.

- Ensayo de citotoxicidad: 10.000 células TZM-bl se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos (Sarstedt AG & Co. KG) y las células a tratar se incubaron con las dosis indicadas (expresada en pmol L^{-1}) de POMs. Dos días después del tratamiento, se eliminaron los sobrenadantes del cultivo celular y se cuantificó la viabilidad celular total usando el ensayo CellTiter Glo-luciferase (Promega, # G7571) usando un luminómetro de microplacas Orion II (Titertek-Berthold). Se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante en las condiciones correspondientes a los ensayos de infección respectivos. DMSO (Merk, # 1029521000) y Triton X-100 (Sigma-Aldrich, # T9284) se usaron como control negativo y positivo para la citotoxicidad celular respectivamente.
- Ensayo de tiempo de infección: el VIH-1 se incubó previamente con POM a temperatura ambiente durante 360, 180, 60, 30, 15 minutos antes de la infección o se agregó directamente a las células TZM-bl. Después de la infección, se realiza el ensayo de infección viral.
- Ensayo de liposomas: los liposomas para el ensayo de filtración de tinte se prepararon mediante extrusión e hidratación de película delgada. DOPC (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina), esfingomiélna (Egg SM) y colesterol de lana de ovino (Chol), disueltos en cloroformo (Avanti Polar Lipids, Alabaster, EE. UU.) Se mezclaron al 45/25/30% molar en un balón de vidrio. El disolvente se evaporó luego aplicando lentamente un vacío en una línea de Schlenk. El vacío se mantuvo durante 2 h y luego se purgó con argón. La película lipídica se hidrata luego mediante la adición de 50 mmoles L^{-1} de 5(6)-carboxifluoresceína preparada en PBS al 50% (que resulta en una solución iso-osmolar a PBS) y se ajusta a pH 7,4 con NaOH, produciendo una concentración de lípidos de 5 mmol L^{-1} . Los matraces se agitaron a 60 °C, 180 rpm, durante 1 h. Luego se prepararon pequeñas vesículas unilamelares por extrusión de 25x a través de membranas de policarbonato 0,2 μm (Membrana grabada en pista Nuclepore, Whatman,

Maidstone, EE. UU.) En un Mini Extrusor (Avanti Polar Lipids) en una plataforma de calentamiento a 60 °C. El tinte libre se eliminó mediante filtración de exclusión por tamaño 2x usando columnas PD midiTrap Sephadex G-25 (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) y luego se cuantificaron los liposomas mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) usando un ZetaView (ParticleMetrix, Inning, Alemania). Para el ensayo en formato de 96 pocillos, las preparaciones de liposomas se diluyeron en PBS y se añadieron 2,25 x 10⁹/pocillo en placas (volumen de 90 µL). La intensidad de fluorescencia se leyó en un lector de placas Cytation 3 (Biotek, Winooski, EE. UU.). La línea de base se estableció midiendo la fluorescencia durante 5 minutos, luego se agregaron 10 µl de compuestos y las placas se incubaron durante 30 minutos más con mediciones cada 1 minuto. La intensidad máxima (100% de liberación de colorante) se midió luego agregando Triton X-100 a una concentración final de 1% y nuevamente midiendo durante 5 minutos.

3.2.2 Resultados y discusión

3.2.2.1 Caracterización

• P7

FT-IR: 3447 (b), 2361 (w), 1616 (m), 991 (s), 948 (s), 878 (vs), 808 (vs), 729 (vs), 535 (s).

ICP-AES (valores calculados entre paréntesis): Si 0.78 (0.83), W 58.01 (59.76).

• P3

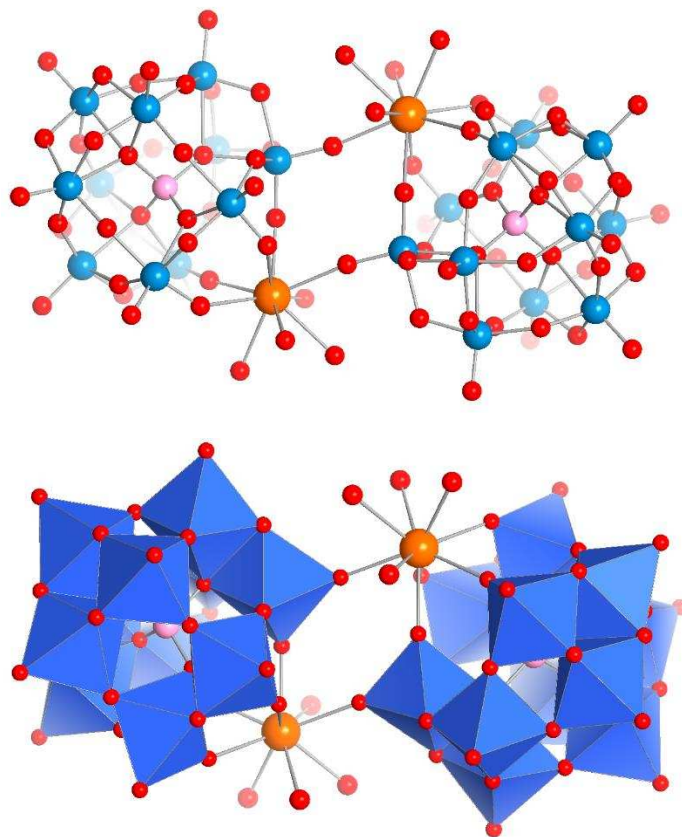
FT-IR: 3447 (b), 2361 (w), 1623 (m), 1000 (s), 950 (s), 904 (s), 887 (s), 869 (s), 804, 707 (s), 511 (m)

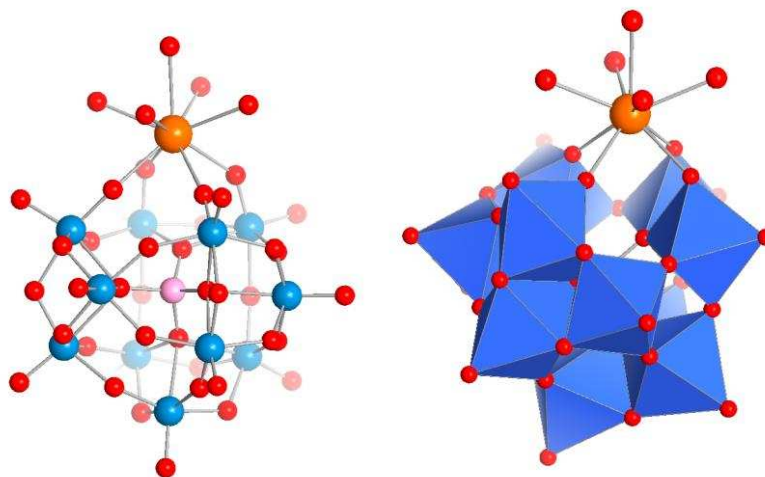
DRX (Fig. 6)

Tabla 1. Datos de cristal y refinamiento de estructura para P3.

Código de identificación	MH19092_0m
Formula empírica	CeK ₄ O _{52.5} SiW ₁₁
Peso de la fórmula	3186.96
Temperatura / K	150 (2)
Sistema de cristal	Triclínico
Grupo espacial	P-1
a/Å	13.3194 (8)
b/Å	13.4752 (8)
c/Å	13,7136 (9)

$\alpha / ^\circ$	100,131 (3)
$\beta / ^\circ$	92.596 (3)
$\gamma / ^\circ$	92.223 (3)
Volumen / \AA^3	2417,7 (3)
Z	2
$\rho_{\text{calc}} / \text{g/cm}^3$	4.378
μ / mm^{-1}	27,457
F (000)	2764,0
Tamaño de cristal / mm^3	$0.15 \times 0.12 \times 0.1$
Radiación	Mo ($\lambda = 0.71073$)
2Θ rango para la recopilación de datos / $^\circ$	6.908 a 49.598
Rangos de índice	$-15 \leq h \leq 15, -15 \leq k \leq 15, -16 \leq l \leq 16$
Reflexiones recogidas	34903
Reflexiones independientes	7770 [$R_{\text{int}} = 0.1080, R_{\text{sigma}} = 0.0766$]
Datos / restricciones / parámetros	7770/18/654
Bondad de ajuste en F^2	1.030
Índices finales de R [$I > 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.0556, wR_2 = 0.1415$
Índices R finales [todos los datos]	$R_1 = 0.0727, wR_2 = 0.1550$
Dif. Más grande pico / agujero / $e \text{\AA}^{-3}$	3.83 / -2.92





La Figura 6. Representación de Keggin POM sustituido con cerio $[\text{CeSiW}_{11}\text{O}_{39}]^{4-}$ en forma de dímeros (arriba) y monómeros (abajo). Esquema de color: silicio (rosa), tungsteno (azul), oxígeno (rojo), cerio (naranja)

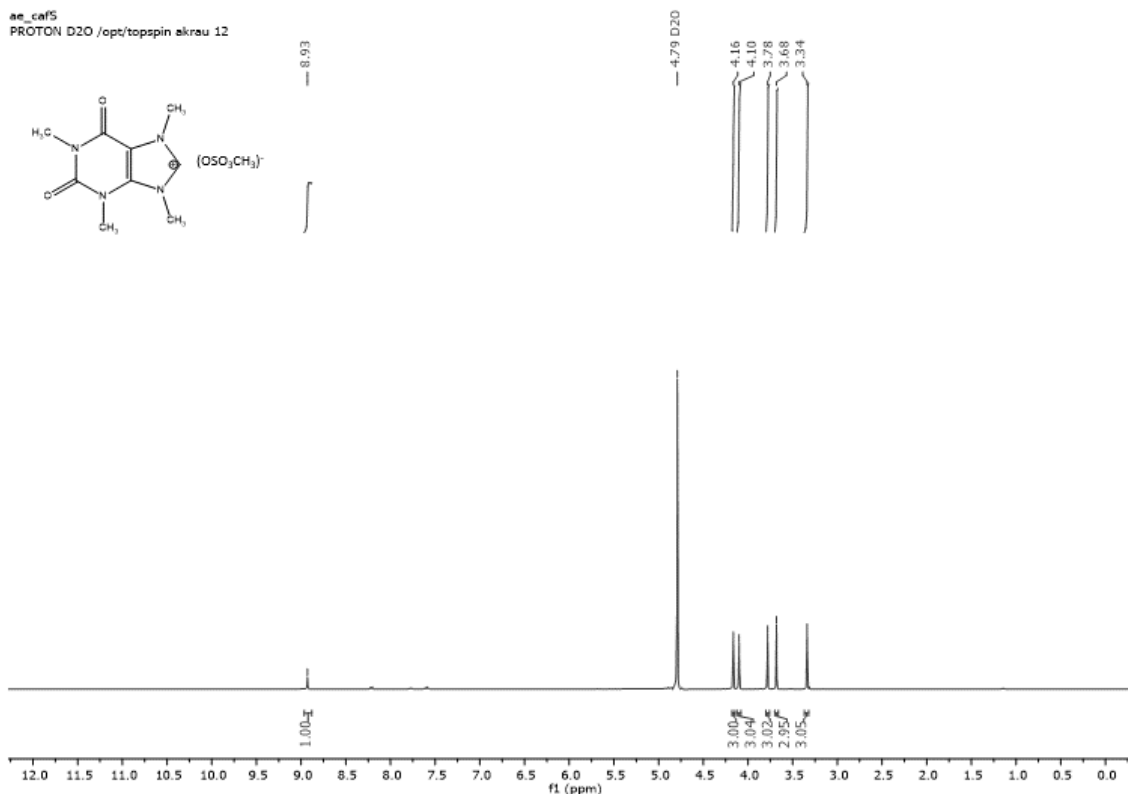
ICP-AES (valores calculados entre paréntesis): Si 0.89 (0.79), W 55.29 (56.9).

• **Caf⁺**

FT-IR (cm^{-1}): 3445 (b), 3075 (b), 2959 (w), 1720 (s), 1676 (vs), 1587 (m), 1551 (s), 1464 (m), 1349 (m), 1310 (m), 1253 (s), 1220 (s), 1095 (w), 1056 (m), 1007 (s), 883 (m), 746 (s), 651 (w), 609 (m), 580 (s),

RMN

^1H RMN (400 MHz, óxido de deuterio) δ 8,93 (s, 1H), 4,16 (s, 3H), 4,10 (s, 3H), 3,78 (s, 3H), 3,68 (s, 3H), 3,34 (s, 3H) (Fig. 7).



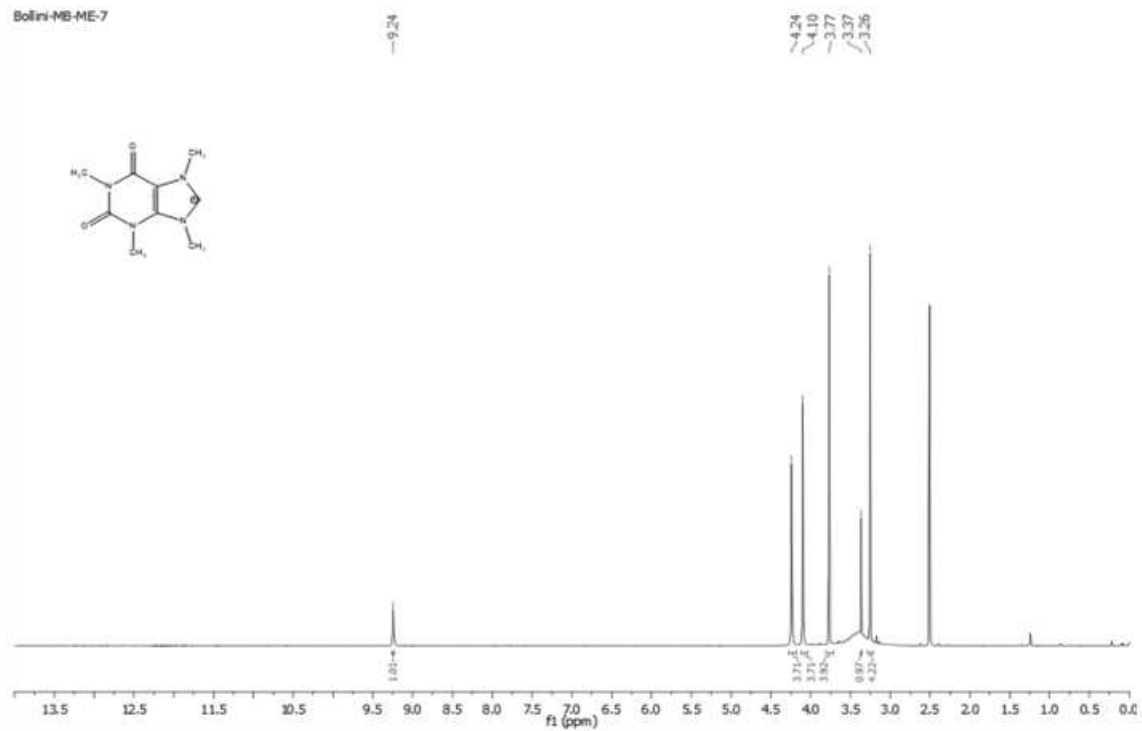
La Figura 7. Espectro de ¹H-NMR de Caf en D₂O.

• CP7

FT IR (cm⁻¹): 3440 (b), 3172 (m), 3089 (m), 2960 (m), 2361 (w), 1720 (vs), 1675 (vs), 1585 (m), 1549 (m), 1463 (m), 1346 (m), 1306 (m), 1259 (m), 1184 (w), 1116 (w), 1055 (m), 1005 (m), 964 (s), 903 (vs), 818 (vs), 777 (vs), 742 (vs), 652 (m), 602 (s), 507 (m).

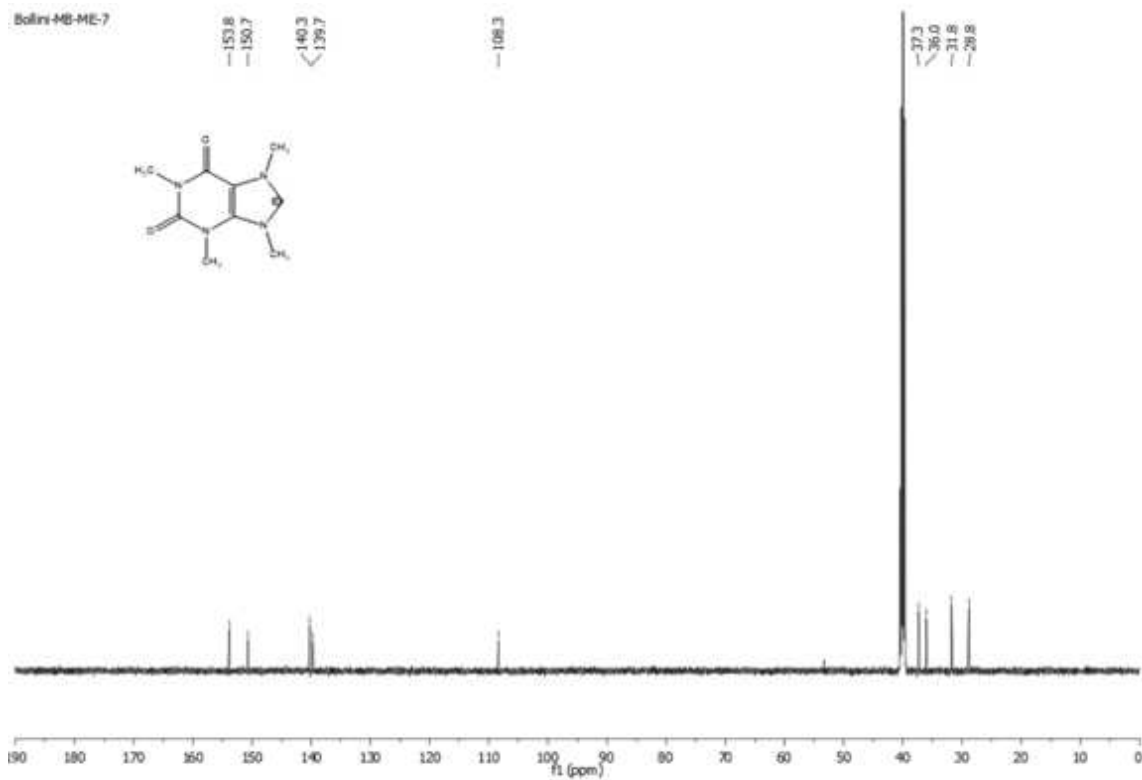
RMN

¹H RMN (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,24 (s, 1H), 4,24 (s, 3H), 4,10 (s, 3H), 3,77 (s, 3H), 3,37 (HDO), 3,26 (s, 3H) (Fig. 8).



La Figura 8. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ de CP7 en $\text{d}_6\text{-DMSO}$.

$^{13}\text{C RMN}$ (151 MHz, $\text{DMSO} - d_6$) δ 153,8, 150,7, 140,43, 139,7, 108,3, 37,3, 35,9, 31,7, 28,8 8 (Fig. 9)



La Figura 9. Espectro de $^{13}\text{C-NMR}$ de CP7 en $\text{d}_6\text{-DMSO}$.

EA: % (valores calculados entre paréntesis): N 10.7 (10.38); C 20,17 (19,88);

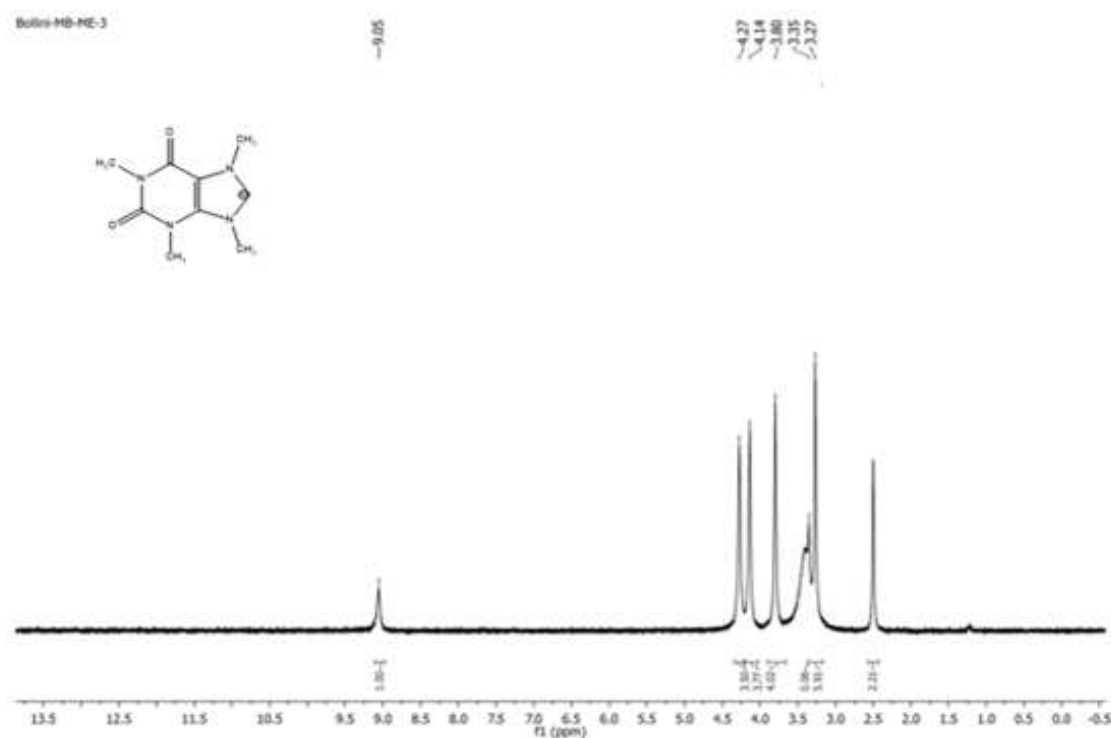
ICP-AES: % (valores calculados entre paréntesis): Si 0.63 (0.64), W 48.89 (46.5).

• **CP3** -

FT-IR 3439 (b), 3089 (m), 2962 (m), 2361 (w), 1719 (vs), 1670 (vs), 1584 (s), 1549 (vs), 1464 (s), 1346 (), 1306 (m), 1261 (m), 1185 (m), 1117 (w), 1094 (w), 1005 (m), 958 (s), 890 (vs), 855 (vs), 770 (vs), 720 (s), 602 (m), 509 (m)

RMN

¹H RMN (600 MHz, DMSO- *d*₆) δ 9.05 (s, 1H), 4.27 (s, 3H), 4.14 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.35 (HDO), 3.27 (s, 3H) (Fig. 10)



La Figura 10. Espectro de ¹H-NMR de CP-3 en d₆-DMSO.

¹³C RMN (151 MHz, DMSO - *d*₆) δ 153,3, 150,3, 139,9, 139,1, 107,8, 36,8, 35,4, 31,2, 28,3 (Fig. 1 1)

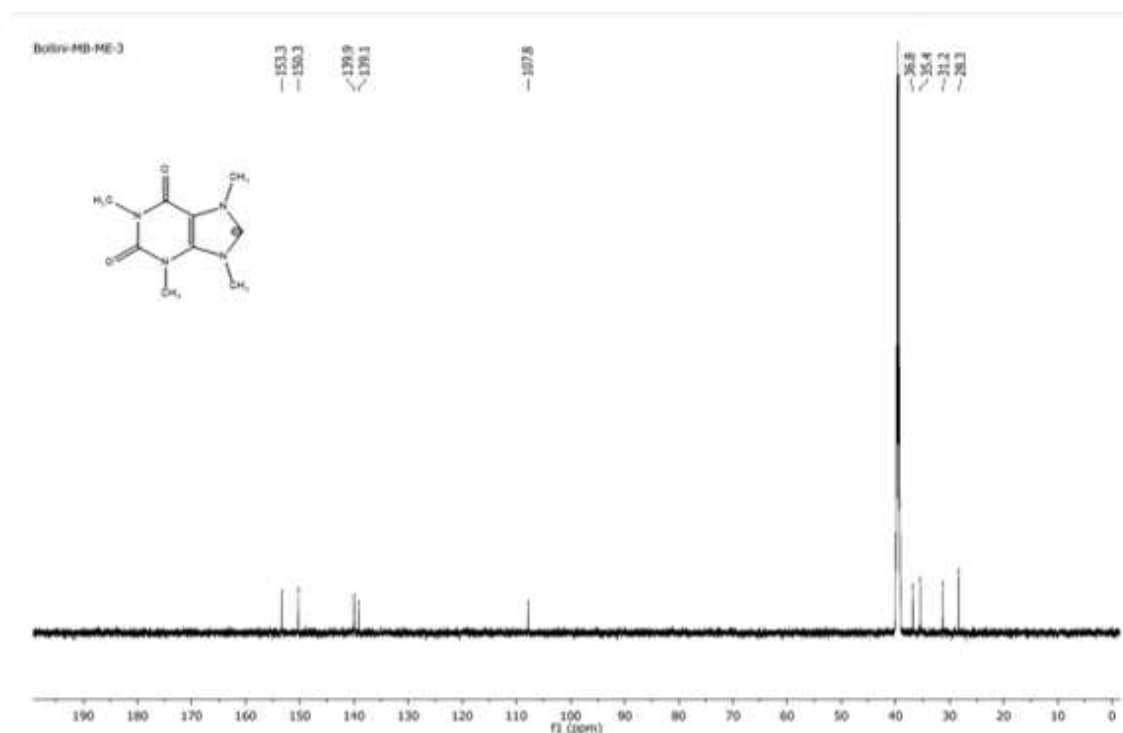


Figura 11. Espectro de ¹³C-NMR de CP-3 en d₆-DMSO.

EA: % (valores calculados entre paréntesis): N 5.56 (5.5 3); C 10.63 (10. 6 7)

ICP: % (valores calculados entre paréntesis): W 48.85 (49.92); Si 0.58 (0. 69)

Se demostró que todos los resultados del análisis de los compuestos para caracterizarlos son consistentes con sus estructuras moleculares. En CP3, más allá de la interacción electrostática de los componentes, hay un apilamiento cara a cara adicional (interacción par- π) entre la base de purina y el Ce-POM. Se informó que estas interacciones ocurren en las caras más grandes del anión.⁴⁵ En esta estructura, se propone que esta pudiese ser la razón de la presencia de un K⁺ y 4Ca²⁺ para equilibrar las cargas, ya que el POM tiene cuatro caras más grandes (dejando las caras grandes cerca del Cerio discriminadas por el efecto de impedimento estérico) (Fig. 12).

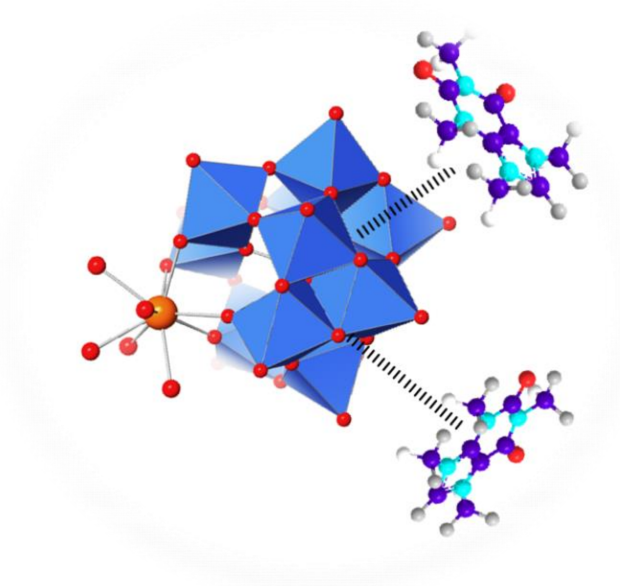


Figura 1 2. Ilustración del acoplamiento de catión cafeína al Ce-POM. Solo se muestran dos orientaciones para mayor claridad.

Como se mencionó anteriormente en el Capítulo 1, los POM pueden interactuar con diferentes aminoácidos de las proteínas virales principalmente mediante interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno. Además, con el compuesto de cafeína, podría haber efectos cooperativos a través de la inclusión de una segunda interacción no covalente (es decir, interacciones π -apilamiento o catión- π) para formar tríadas de anión- π - π y anión- π -catión con los aminoácidos situado en la superficie de la proteína.³⁵ Todas estas interacciones podrían desempeñar un papel importante en el mecanismo de acción de CP3 contra la infección por VIH.

3.2.2.2 Resultados de estabilidad

Todos los POM evaluados exhiben estabilidad durante los 7 días en el tampón PBS a pH 7,4. La forma de las curvas y la no aparición de nuevos picos muestra que los compuestos son estables a las condiciones de los ensayos *in vitro* (Fig. 13, 14, 15 y 16).

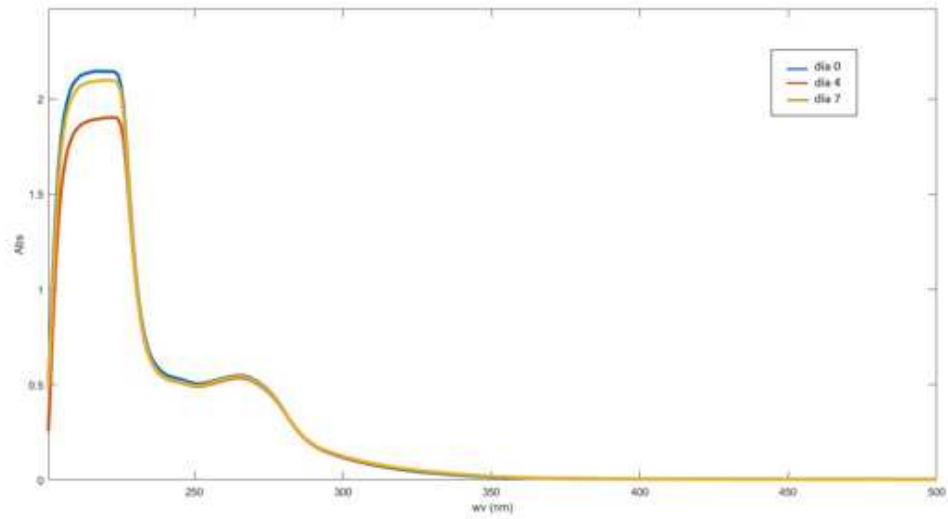


Figura 13. Estabilidad de CP3

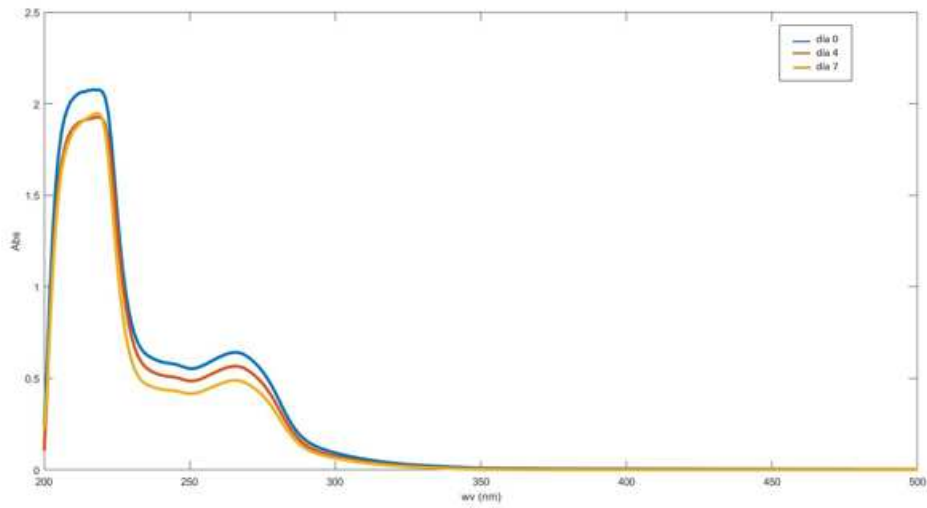


Figura 14. Estabilidad de CP7

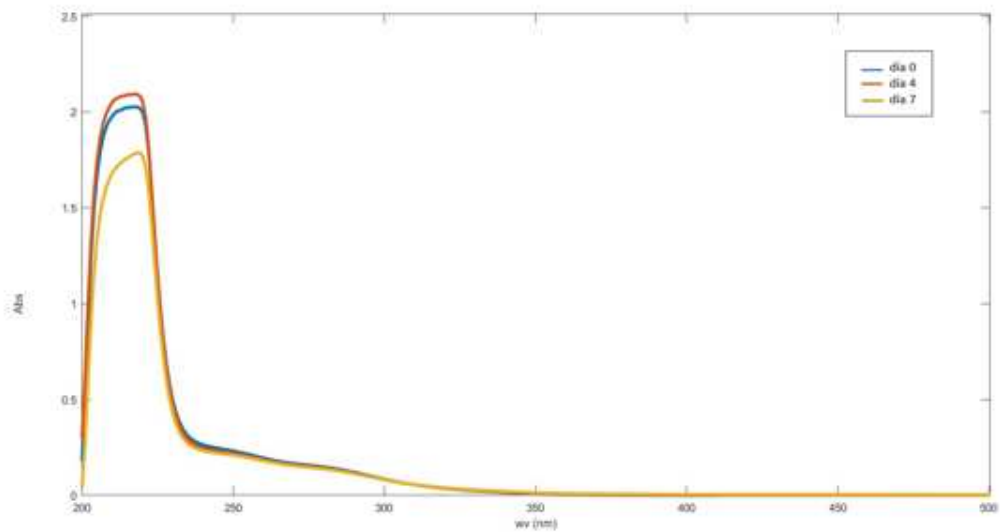


Figura 15. Estabilidad de P3

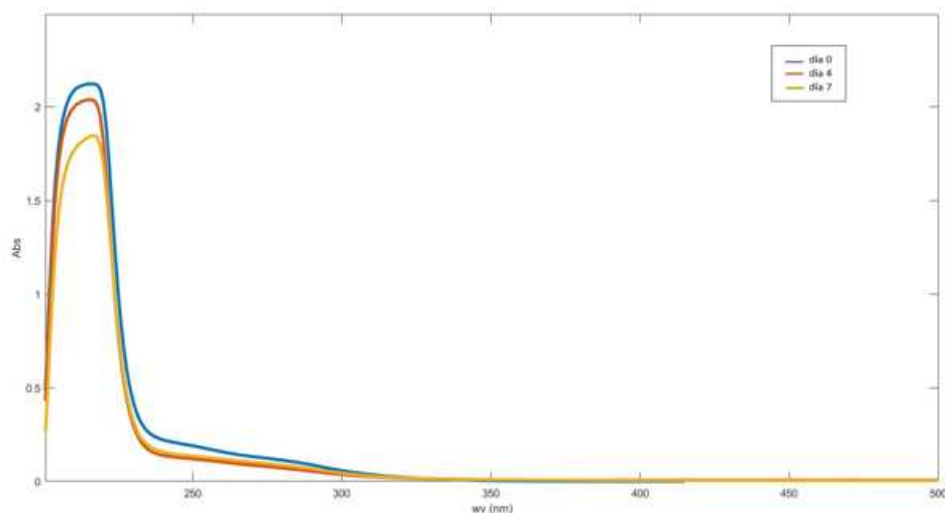


Figura. 16. Estabilidad de P7

3.2.2.3 Resultados *in vitro*

Para investigar la posible actividad antiviral de los compuestos, se realizó un ensayo de virus de infección de una sola ronda. La concentración inhibitoria media máxima (IC₅₀) se calculó como la concentración inhibitoria del 50% usando el software Graph Pad Prism 8. Los valores se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. IC₅₀ expresado en pM y pg/ml de los compuestos indicados contra la ronda única de infección VIH-1 pseudotipo con la glicoproteína de la envoltura de VIH-1 o VSV-G. Los valores se derivan de 3 experimentos independientes, calculados por triplicado. Esquema de color: verde (alta actividad antiviral) a amarillo (baja actividad antiviral)

		HIV-1		VSV(g)	
Nombre	MW (g/mol)	IC ₅₀ (pM)	IC ₅₀ (pg/ml)	IC ₅₀ (pM)	IC ₅₀ (pg/ml)
AE-AV-CP7	4348	8674.0	37714.5	257714.0	1120540.5
AE-AV-P7	2987	2545.0	7601.9	~ 399626	
AE-AV-CP3	4050	611.7	2477.4	269031.0	1089575.6
AE-AV-P3	3188	8776.7	27980.0	38739.3	123500.8

La comparación de los IC₅₀ valores de CP7 y P7 (8674 pM y 2545pM, respectivamente), permite observar que el catión caffeinium disminuye la actividad antiviral de P7. Sin embargo, en CP3, la adición de cafeína mejora la actividad antiviral. En la Tabla 1, en verde, se destaca la mayor inhibición de CP3 contra VIH-1

(IC₅₀ más bajo = 612 pM). La cafeína y el caffeineum también se analizaron y no mostraron actividad antiviral.

Para asegurarse de que la actividad antiviral observada no se debiera a un posible efecto citopático o citotóxico en las células TZM-bl, se realizó un ensayo de viabilidad celular.

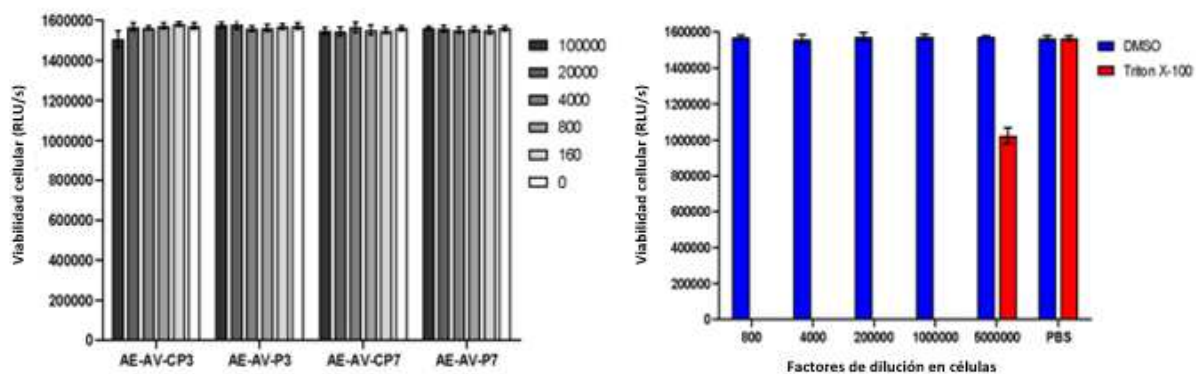


Figura 17. Evaluación del efecto citopático CP-3, P3, CP7 y P7 sobre las células informadoras TZM-bl. El factor de dilución aplicado en las células indica el doble de dilución aplicado en el volumen total del medio (200 μ l) en el que se incubaron las células (concentración en nM). N = 1 en triplicados técnicos \pm DE

En la Fig. 17, se observa que los compuestos seleccionados no muestran ningún efecto citopático en las células. Por esta razón, como CP3 muestra la mayor inhibición y no es citotóxico, se eligió para estudios adicionales.

Al comienzo de este capítulo, se mencionaron varios estudios relacionados con la amplia actividad antiviral de los POM. Para estudiar si los compuestos recién sintetizados podrían actuar sobre el virión o sobre las células, se preincubaron POM y el stock de VIH-1 y posteriormente se infectaron células TZM-bl, o las células TZM-bl se pretrataron con POM durante 24 horas. Posteriormente, se eliminaron los sobrenadantes de cultivo celular con POM, las células se lavaron una vez con 1 x DPBS y se infectaron con VIH-1. La infectividad viral se midió a las 48 horas después de la infección.

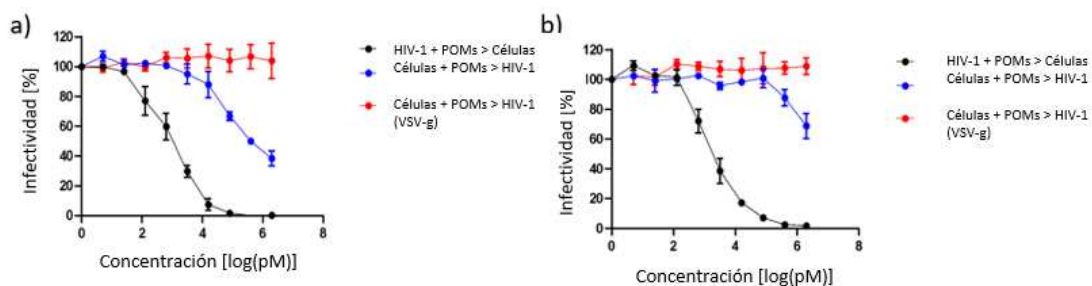


Figura 18. Determinación de la inhibición del VIH-1 mediada por POM de a) CP3 y b) P3. Los POM se incubaron previamente con células informadoras TZM-bl (línea azul) durante un día antes de la infección o se mezclaron con el stock de VIH-1 y luego se agregaron a las células TZM-bl. n = SEM

En la figura 18, se observa que la inhibición fue mucho más pronunciada cuando los conjugados POM se preincubaron con el VIH-1, lo que sugiere que actúan contra el virión. Como los POM, en general, podrían definirse como inhibidores amplios de la entrada viral, para investigar si los compuestos pudiesen ejercer sus funciones a través de un mecanismo adicional, se realizó un ensayo de tiempo de infección.

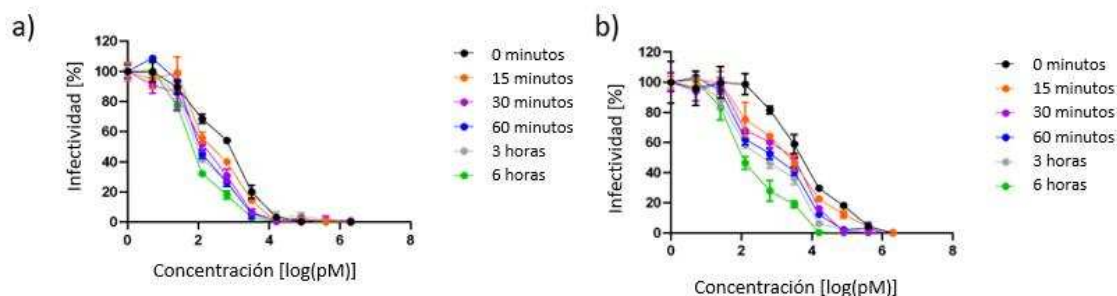


Figura 19. Ensayo de inhibición dependiente de la dosis del virus de Ce-POM CP3 (izquierda) y P3 (derecha). Se incubaron cantidades constantes de existencias infecciosas de VIH-1 durante los puntos de tiempo indicados a temperatura ambiente, antes de infectar células informadoras TZM-bl. n = 2 ± DE

Los resultados (Fig. 19) muestran que la cuantificación del rendimiento infeccioso del VIH-1 indica una inhibición ligeramente más potente a las 6 horas después de la incubación en ambos casos, lo que sugiere que los POM pueden afectar los parámetros asociados al virión (como integridad y/o conformación de glicoproteínas de la envoltura) de una manera dependiente del tiempo.

Para obtener más información sobre el mecanismo de acción, se realizó un ensayo de filtración de tinte de liposomas. La preservación de la organización funcional de la envoltura lipídica del VIH es necesaria para una infección eficiente. Este estudio utiliza

vesículas lipídicas que imitan el virión para evaluar si el compuesto puede destruir la membrana del virión. Los liposomas que contienen el colorante de carboxifluoresceína se tratan con el Caf-POM y su respectivo POM. Si la fluorescencia aumenta debido a la filtración del colorante y la posterior dilución en el tampón, se demuestra que los compuestos pueden alterar las membranas.

Para este ensayo, los liposomas consistieron en DOPC / SM / Chol a una relación de 45/25/30% molar para imitar aproximadamente la membrana viral del VIH. Los resultados se muestran en la Fig. 21 y se observa un mayor efecto de CP3 que de P3.

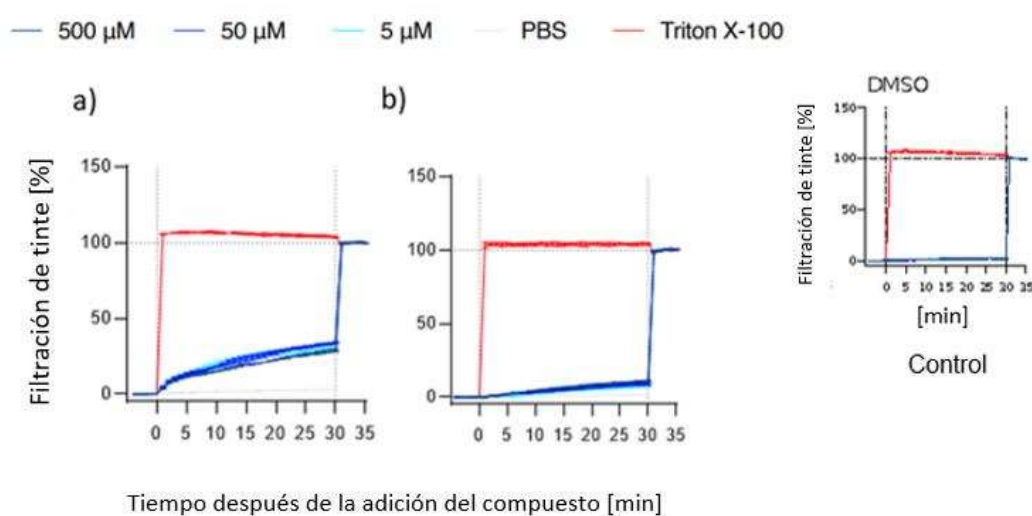


Figura 21. Alternativa: ensayo de disrupción de liposomas usando vesículas lipídicas que imitan viriones. a) CP3 y b) P3. 1ra línea de puntos: adición de compuesto (5 min previos registrados como línea de base); Segunda línea de puntos: adición de Triton X-100 al 1% (señal máxima, establecida al 100%)

Este resultado sugiere que el compuesto CP3 está destruyendo la membrana viral y esta podría ser la razón de su alta actividad antiviral. Para explicar la ruptura de la membrana de lípidos, se propone un mecanismo hidrolítico asistido el Cerio de la estructura del POM. Se ha reportado que el Ce (III) podría actuar como proteasas artificiales hidrolizando proteínas grandes y complejas.⁴⁶ En nuestro caso, adicionalmente, la selectividad de la escisión podría atribuirse a las interacciones electrostáticas entre los residuos positivos de la proteína y la carga negativa de la POM. Por otra parte, la atracción estructural para facilitar el sitio de interacción de CP3 y los residuos de proteínas, podría atribuirse a las mismas interacciones entre otras, lo que fue explicado anteriormente (Secciones 3. 2. 2. 1).

3.2.3 Conclusión

En conclusión, hemos desarrollado una nueva serie de compuestos de Caf-Keggin, basada en una interacción no covalente entre ambos componentes, y nos caracterizamos bien por FT-IR, EA, ICP, XRD y RMN. Los compuestos no mostraron ningún efecto citopático en las células TZM-bl. La conjugación de caffeinium con Keggin POM parece perjudicial para su actividad antiviral, con la excepción de CP3 y P3 ($IC_{50} = 612 \text{ pM}$ e $IC_{50} = 8776 \text{ pM}$, respectivamente). De acuerdo con estudios previos del virus POM, los K-y Caf-POM parecen actuar en un virión en lugar de a nivel celular. Además, CP3 parece ganar actividad antiviral de una manera dependiente del tiempo. Esto podría deberse a una posible destrucción de la partícula viral o una posible escisión de la glucoproteína viral. Para obtener una idea de esta hipótesis, se realizó un ensayo de fuga de liposomas y los resultados muestran que no hay un efecto importante, pero hay una fuga para CP3, lo que significa que este conjugado podría destruir la membrana del virión. El mejor compuesto, al actuar en etapas del ciclo viral temprano y alterar las propiedades de la membrana lipídica viral, tiene un gran potencial para prevenir la infección por VIH.

En el futuro, el desarrollo de una matriz polimérica para unir el compuesto tiene como objetivo diseñar un dispositivo de liberación de fármacos. Hay muchas iniciativas destinadas a la prevención y el tratamiento con nuevos inhibidores de virus, por lo que se podrían esperar escenarios favorables para continuar el desarrollo de esta investigación.

3.3 Actividad anti-ZIKV de Dawson POMs

El objetivo de esta sección es evaluar la actividad anti-ZIKV de los WD-POM y profundiza el conocimiento sobre su mecanismo de acción antiviral para evaluar sus posibles aplicaciones en la prevención de la infección por ZIKV y ayudar al desarrollo de derivados mejorados. Se sintetizaron una serie de WD-POM: $(NH_4)_6 [P_2Mo_{18}O_{62}]$, $K_6 [P_2W_{18}O_{62}]$, grupos funcionalizados de metales de transición como $K_8 [Co(H_2O)P_2W_{17}O_{61}]$ y $K_8 [Mn(H_2O)P_2W_{17}O_{61}]$, y un grupo trisustituido $K_8 [HP_2V_3W_{15}O_{62}]$ (Fig. 2.2). Se estudió su estructura y relación de actividad antiviral. Para obtener información sobre el mecanismo de acción, se realizaron estudios de acoplamiento

molecular para encontrar la conformación de energía más baja del complejo E-proteína- $[P_2W_{18}O_{62}]^{6-}$ y los datos se validaron mediante un ensayo de competencia de anticuerpos. Como los POM son aniones grandes, podrían unirse a los residuos de la proteína E a través de interacciones electrostáticas y este hecho podría explicar su actividad y acción anti-ZIKV en la estructura del virus ZIKA.



Figura 22. WD-POM seleccionados para este estudio. Esquema de color: átomos de addenda M = Mo ^{VI}, W ^{VI}: azul, metal del template X = P: naranja; O rojo y Transition Metal TM = Co, Mn; verde

Detalles computacionales

Los estudios de acoplamiento molecular se utilizan para simular la interacción entre una proteína y un ligando. El algoritmo de búsqueda de acoplamiento genera la pose de acoplamiento colocando el ligando en diferentes orientaciones y conformaciones en un sitio o en varios sitios de la proteína. La función de puntuación de acoplamiento estima la energía libre de unión para una pose. ⁴⁷

Antes de los estudios de acoplamiento, los ligandos y la proteína deben optimizarse. En nuestro caso, para optimizar la geometría de los POM y las cargas parciales, los cálculos cuánticos se realizaron utilizando la teoría funcional de densidad (DFT). Los cálculos se realizaron utilizando funcional B3YLP.

Para preparar la estructura de la proteína (archivo PDB) es necesario eliminar los residuos de agua, agregar los átomos de hidrógenos polares y calcular las cargas de Gasteiger para calcular las cargas parciales de los residuos de la proteína.

Después de estos pasos, en caso de utilizar Autodock, ya que el software requiere precalcular mapas de cuadrícula, es necesario especificar el tamaño de

cuadrícula. Para los estudios de acoplamiento ciego, el cuadro contiene toda la estructura de la proteína y esta metodología podría usarse para predecir los sitios activos. Cuando se conoce el sitio activo o hay algunos supuestos de una potencial región activa, la caja contiene los residuos de esta región en un tamaño extendido razonable. Para calcular los potenciales de afinidad atómica, la energía de interacción de cada tipo de átomo en el ligando con los átomos de los residuos incrustados en la caja se asigna a cada punto de la cuadrícula.⁴⁸

Al ejecutar Autodock, los algoritmos de búsqueda exploran los estados conformacionales del ligando y, al usar la función empírica de puntuación de energía libre y la información del mapa de cuadrícula, la interacción de la proteína del ligando se analiza y califica dependiendo de la fuerza de unión. Se utilizaron el algoritmo genético lamarckiano (LGA) y el campo de fuerza AutoDock4.2, respectivamente.

El algoritmo genético (GA) desarrolla una población de genes que representa conformaciones. Los genes compiten para ingresar a un grupo de reproducción en función de su estado físico, que corresponde a la energía de las conformaciones que representan. Durante un período de muchas generaciones, los individuos sucesivamente más adecuados (que corresponde a las conformaciones de menor energía) evolucionan a través de las operaciones genéticas. Si se alcanzan las evaluaciones de energía total o el número máximo de generaciones, el proceso se detiene. El LGA primero encuentra la conformación más baja, analiza su fenotipo (coordenadas atómicas) y luego asigna estos valores a sus respectivos genotipos y descendencia. Este algoritmo presenta un mejor rendimiento ya que combina la GA y la optimización de búsqueda local. El resultado al final del proceso de evolución es un conjunto de conformaciones que pueden analizarse.⁴⁹

El campo de fuerza utilizado en Autodock4.2 y Autogrid, incluye seis evaluaciones por pares (V) relacionadas con el estado unido y no unido, y una estimación de la entropía conformacional perdida al unirse (ΔS_{conf}). En la ecuación 1, L se refiere al ligando y P a la proteína.

$$\Delta G = (V_{bound}^{L-L} - V_{unbound}^{L-L}) + (V_{bound}^{P-P} - V_{unbound}^{P-P}) + (V_{bound}^{L-L} - V_{unbound}^{L-L} + \Delta S_{conf}) \quad (1)$$

Cada término energético (V), incluye evolución para dispersión / repulsión, enlaces de hidrógeno, electrostática y desolvatación. Las constantes de ponderación W y los parámetros se han optimizado para calibrar la energía libre empírica en función de un conjunto de constantes de unión determinadas experimentalmente.

$$V = W_{vdw} \sum_{i,j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + W_{hbond} \sum_{i,j} E(t) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) + W_{elec} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{e(r_{ij})r_{ij}} + W_{sol} \sum_{i,j} (S_i V_j + S_j V_i) e^{\left(\frac{-r_{ij}^2}{2\sigma^2} \right)} \quad (2)$$

En la ecuación 2, el primer término representa el potencial de interacciones de dispersión/repulsión y los parámetros A y B se calculan utilizando el campo de fuerza ámbur. El segundo término representa un término direccional de enlace H y los parámetros C y D se asignan para dar una profundidad máxima de pozo de energía de 5 kcal / mol a 1.9Å para H-O y H-N y de 1 kcal/mol a 2.5Å para enlaces H-S. La función E(t) representa la direccionalidad basada en el ángulo t de la geometría de unión puente de hidrógeno ideal. El tercer término representa la electrostática forzada por los potenciales de Coulomb y el término final representa el potencial de desolvatación: V es el volumen de átomos que rodea a un átomo dado (estos átomos están protegiendo el átomo de las moléculas de disolvente) y S es el parámetro de solvatación, los términos exponenciales están relacionados con un factor de ponderación de distancia.⁵⁰

En la Figura 23, se presentan ejemplos de la relación entre la distancia interatómica y la energía de las cuatro contribuciones del campo de fuerza de Autodock. La dispersión / repulsión es para la interacción entre dos átomos de carbono, el potencial de enlace de hidrógeno se muestra para una interacción oxígeno-hidrógeno (extendido a un mínimo de -2 kcal/mol), el potencial electrostático es para átomos con cargas opuestas con carga atómica completa y el potencial de desolvatación es para un átomo de carbono con aproximadamente 10 átomos que desplazan el agua a cada distancia.

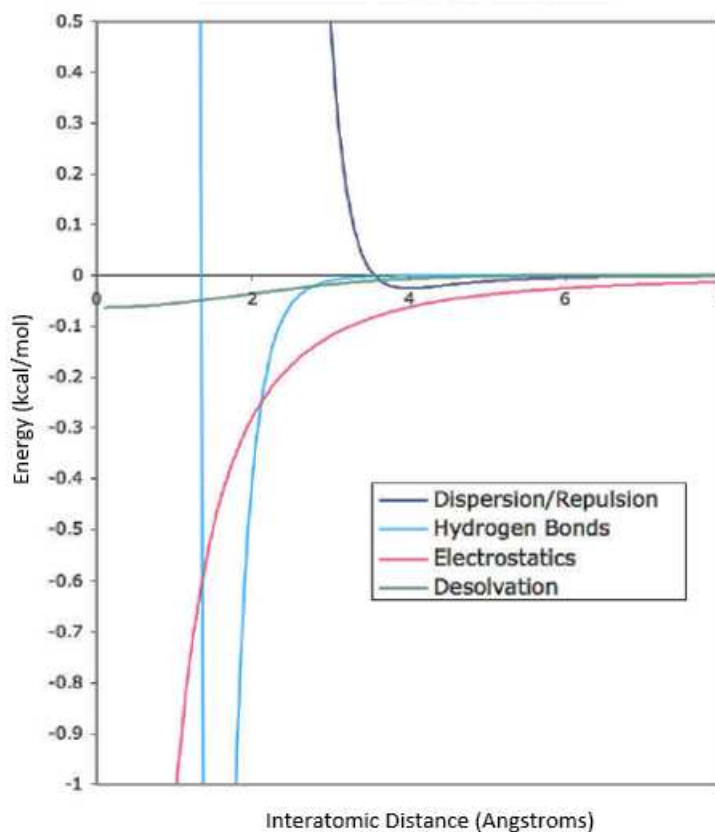


Figura 23. Ejemplos de contribuciones del campo de fuerza Autodock Autodock, AutoGrid, AutoDockTools, (Ref. 50. Copyright © 1991-2009, reimpresso en su idioma original)

3.3.1 Sección experimental

3. 3.1.1 Materiales y métodos

- **Espectroscopía FT-IR:** se realizó en un espectrofotómetro Bruker Vector 22 FTIR. Las muestras se prepararon en pastillas de KBr. Las señales se dan como números de onda en cm^{-1} utilizando las siguientes abreviaturas: vs = muy fuerte, s = fuerte, m = medio, w = débil y b = amplio.
- **Espectroscopía UV-VIS:** la espectroscopía UV-VIS se realizó en un espectrofotómetro UV-Vis-NIR SHIMADZU UV-3600.
- **Estudios de acoplamiento molecular:** los estudios de acoplamiento molecular se realizaron con el software AutoDock 4.2.⁴⁸ La estructura cristalina de la proteína de envoltura del ZIKV se descargó del Protein Data Bank (PDB: 5HJM).⁵¹ Se usó el software Autodock MGLTools para preparar el archivo de entrada Autodock 4.2 (pdbqt), se agregaron hidrógenos polares y se eliminó el

agua de la estructura. Para calcular la superficie molecular potencial electrostática, se usó el complemento APBS (Adaptive Poisson- Boltzmann Solver) para Pymol. Los modelos cristalográficos de un Dawson-POM se obtuvieron de la base de datos CCDC de cristalografía (ICSD 56, número de depósito 1590683 y CUYVOL, número de depósito 761260, respectivamente) y luego se modificaron para eliminar los grupos orgánicos, conservando la estructura de Wells-Dawson $[P_2W_{18}O_{62}]^{-6}$ y $[P_2Mo_{18}O_{62}]^{-6}$ usando la herramienta de modelado Mercury CSD 4.0.0. Las cargas parciales de cada átomo del POM se calcularon con la teoría funcional de densidad (DFT) funcional B3LYP⁵² con conjuntos básicos lanl2dz⁵³ y 6-31G*⁵⁴ implementados en el programa Gaussian 09.⁵⁵ La carga total del ligando se estableció en -6 y la estructura se mantuvo rígida durante todo el cálculo del acoplamiento. Los cargos parciales calculados se aplicaron para otros cálculos.

- **Ensayo de estabilidad:** para estudiar la estabilidad de los compuestos en condiciones experimentales, se realizó un ensayo de estabilidad. Los experimentos se prepararon en 10 mM de PBS (pH 7,4). La concentración de las muestras fue de 1 μ M. La estabilidad se caracterizó por espectroscopía UV-visible a los 0, 4 y 7 días.⁴⁴

3.3.1.2 Síntesis

Observaciones generales: Todos los productos químicos se compraron a Sigma Aldrich, ABCR o ACROS y eran de grado reactivo. Los productos químicos se usaron sin purificación adicional a menos que se indique lo contrario. Las reacciones se llevaron a cabo a presión atmosférica salvo que se indique lo contrario.

- **Síntesis de los compuestos.**

- **Síntesis de POM PW: $K_6 \alpha, \beta [P_2W_{18}O_{62}] \times 19H_2O$**

La síntesis es una modificación del procedimiento de la literatura. Se disolvió⁴¹ $Na_2WO_4 \times 2H_2O$ (12 g, 36,5 mmol) en 40 ml de agua y se añadieron 10 ml (147 mmol) de ácido orto fosfórico (85%). La solución se calentó a reflujo durante 4 h. Después de enfriar, 4,8 g de NH_4Cl se añadió, y la solución se agitó durante 10 min. Luego, la sal de amonio cruda obtenida de la solución a reflujo, se lavó agitando

en una solución de 5 g de NH_4Cl en 25 ml de agua durante 10 minutos y luego se re-disolvió en 25 ml de agua tibia ($45\text{ }^\circ\text{C}$). Se añadió cloruro de potasio (1,9 g) a la solución fría. La sal de potasio se eliminó por filtración y luego se disolvió en 50 ml de agua caliente ($80\text{ }^\circ\text{C}$). Las agujas blancas de triacontatungstopotafosfato que aparecieron al enfriar a $15\text{ }^\circ\text{C}$ se eliminaron por filtración. El filtrado se trató directamente con 2 g de KCl para obtener una mezcla de los dos isómeros de octadecatungstodifosfato de potasio. El precipitado se filtró y se secó al vacío. Rendimiento: 8 g (1,62 mmol).

- Síntesis de V-PW: $\text{K}_8 [\text{HP}_2\text{V}_3\text{W}_{15}\text{O}_{62}] \times 9\text{H}_2\text{O}$

La síntesis es una modificación del procedimiento de la literatura.⁵⁶ Se disolvió el meta vanadato de sodio, 0.2 g (1.6 mmol), en 50 ml de agua caliente y se enfrió la solución a temperatura ambiente seguido de la adición de HCl (6 mol L^{-1} , 1 mL). A esta solución de color amarillo pálido, agitada rápidamente, se añadieron lentamente 3 g (0,7 mmol) de **SI-1** sólido ($\text{Na}_{12} [\text{P}_2\text{W}_{15}\text{O}_{56}] \times 24\text{H}_2\text{O}$). La solución se vuelve homogénea en pocos minutos y se vuelve de color rojo anaranjado. La agitación continuó durante 10 minutos adicionales después de que la solución se volvió homogénea, seguido de la adición de 6 g de KCl sólido. El precipitado resultante se aisló por filtración y se cristalizó en agua caliente durante la noche (pH 1,5). El precipitado se aisló por filtración y se secó al aire a 60°C para obtener un sólido cristalino naranja. Rendimiento: 2,4 g (0,54 mmol)

- Síntesis de SI-1: $\text{Na}_{12} [\text{P}_2\text{W}_{15}\text{O}_{56}] \times 24\text{H}_2\text{O}$

La síntesis es una modificación del procedimiento de la literatura.⁴¹ El compuesto **PW** $\text{K}_6 [\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}] \times 14\text{H}_2\text{O}$ (6,2 g, 1,2 mmol) se disolvieron en 21 ml de agua, y 5,7 g (40 mmol) de $\text{NaClO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ se añadieron. Después de agitar vigorosamente durante 20 minutos, la mezcla se enfrió en un baño de hielo y el perclorato de potasio se eliminó por filtración después de 3 h. Una solución de 1,7 g (16 mmol) de Na_2CO_3 se añadió, en 10 mL de agua al filtrado, que después se filtró bajo presión reducida para obtener un sólido blanco. El sólido se lavó con NaCl acuoso. ($2,7\text{ mol L}^{-1}$) (1 \times 12,5 ml) y etanol (2 \times 12,5 ml), luego se secó al vacío. Rendimiento: 3.8 g (0.8mmol)

- **Síntesis de Mn-PW: $K_8 [Mn (H_2O) P_2 W_{17} O_{61}] \times 16H_2O$:**

La síntesis es una modificación del procedimiento de la literatura.⁵⁷ $Mn(NO_3)_2 \times 4H_2O$ (0,3 g, 1,3 mmol) se disolvieron en 40 ml de agua y 5 g (1 mmol) de **SI-3** se añadieron bajo agitación vigorosa en pequeñas porciones. La suspensión marrón obtenida se agitó durante 15 min. La suspensión se centrifugó y la solución restante se precipitó mediante la adición de pequeños volúmenes (pasos de aproximadamente 1 mL) de solución saturada de KCl hasta que el grupo comience a precipitar. Los últimos dos pasos se repitieron hasta que la solución restante es casi incolora. Para la purificación, el sólido obtenido se disolvió en 20 mL de agua y se cristalizó por difusión de etanol en la mezcla de reacción. Rendimiento: 4.1 g (0.8 mmol)

- **Síntesis de SI-2: $K_{12}H_2P_2W_{12}O_{48} \times 17H_2O$**

La síntesis es una modificación del procedimiento de la literatura.⁵⁷ Se disolvieron 20,75 g (4,25 mmol) del compuesto **PW** en 75 ml de agua, y se añadió una solución de 12,1 g (0,1 mol) de Tris(hidroximetil)amino metano en 50 mL de agua. La solución se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se añadieron 20 g de cloruro de potasio. Después de la disolución completa, se añadió una solución de 13,8 g (0,1 mol) de carbonato de potasio en 50 mL de agua. La solución se agitó vigorosamente durante 15 minutos, y el precipitado blanco que apareció después de unos minutos se filtró y se secó bajo succión. Luego, se lavó con etanol (2 x 12,5 mL) y se secó al vacío. Rendimiento: 15 g (3,93 mmol).

- **Síntesis de SI-3: $(K_9 [\alpha_1-LiP_2W_{17}O_{61}] \times 20H_2O)^{57}$**

Se disolvió LiCl (10,6 g, 250 mmol) en 250 ml de agua acidificada con 5 ml de 1 mol L^{-1} HCl acuoso. Después de enfriar a temperatura ambiente (calentar a través de la disolución de cloruro de litio anhidro), se añadieron 20 g (5 mmol) de **SI-2** $K_{12} [H_2P_2W_{12}O_{48}] \times 24 H_2O$ con agitación vigorosa. Se obtuvo una solución transparente después de 5 min. Después de ello se agregó, 25mL de solución tungstato de litio acuoso 1 mol L^{-1} . Tan pronto como se completó la adición de tungstato de litio, se añadió HCl (aq) (1 mol L^{-1} , 5 mL) gota a gota durante un período de tiempo de 2 a 3 min. El pH de la solución permaneció entre 4 y 5. Esta adición fue seguida inmediatamente por la adición de 100 mL de solución acuosa saturada de KCl. El producto sólido apareció instantáneamente como un precipitado blanco, que

se filtró y se secó bajo succión. Posteriormente, el producto se suspendió en 125 ml de etanol durante 15 minutos y se filtró y se secó al vacío y se secó al aire. Rendimiento: 17,7 g (3,6 mmol).

- Síntesis de Co-PW: $K_8 [\alpha_1Co(H_2O)P_2W_{17}O_{61}] \times 16H_2O$

La síntesis es una modificación del procedimiento de la literatura.⁵⁷ $Co(NO_3)_2 \times 6H_2O$ (0,3 g, 1,3 mmol) se disolvió en 40 mL de agua. Después de la disolución completa, se añadieron 5,1 g (1,1 mmol) de **SI-3** bajo agitación vigorosa en pequeñas porciones. La suspensión naranja-rojo oscuro obtenida se agitó durante al menos 15 min. La suspensión se centrifugó y la solución restante se precipitó mediante la adición de pequeños volúmenes (pasos de aproximadamente 1 mL) de solución saturada de KCl hasta que el grupo comience a precipitar. Los últimos dos pasos se repitieron hasta que la solución restante fue casi incolora. Para la purificación, el sólido obtenido se disolvió en 20 mL de agua y se cristalizó por difusión de etanol en la mezcla de reacción. Rendimiento: 4,5 g (0,9 mmol)

- Síntesis de PMo: $(NH_4)_6 [\alpha-P_2Mo_{18}O_{62}] \times 12H_2O$.

La síntesis es una modificación del procedimiento de la literatura.⁵⁸ Una mezcla de 20 g de $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$ (97.2 mmol), H_3PO_4 (15.2 mol L⁻¹, 3 mL) y HCl (11.6 mol L⁻¹, 16.5 mL) en 50 mL de agua destilada se mantuvo a 100 °C durante 8 h. Luego, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron 10 g de NH_4Cl sólido. La precipitación de un sólido verde se observó inmediatamente después de la adición de cloruro de amonio. Este precursor y la solución sobrenadante se mantuvieron a 5 °C durante la noche para mejorar la precipitación. El sólido se filtró y se re-disolvió en la cantidad mínima de agua destilada. Esta solución se filtró para separar las impurezas no disueltas, y se añadieron 10 g de NH_4Cl sólido para volver a precipitar la sal. Nuevamente, el precursor y la solución sobrenadante se mantuvieron a 5 °C durante la noche. Finalmente, la sal se filtró, se lavó con etanol, éter dietílico anhidro y se secó a temperatura ambiente al vacío. Rendimiento: 1 g (0,32 mmol).

• Estudios de estabilidad

Los experimentos se prepararon en 10 mM de solución tampón de fosfato (PBS) (pH 7,4). La concentración de las muestras fue de 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$.⁴⁴

3.3.1.3 Ensayos *in vitro*

El estudiante de doctorado M. Sc. Rüdiger Gross realizó los estudios *in vitro* en el Departamento de Virología Molecular de la Universidad de Ulm, Alemania.

- Los stocks virales de ZIKV se prepararon como se describió anteriormente en Vero E6. Los títulos de virus se determinaron mediante el método de Reed-Münch y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.⁵⁹ Para investigar el efecto de POM, se incubó ZIKV equivalente a un MOI final de 0.3 durante 15 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con la solución tampón o los compuestos en estudio. Luego, estas mezclas se agregaron a 6×10^3 células Vero E6 sembradas el día anterior en placas de 96 pocillos. Después de 2 días, se realizó un ensayo de inmunodetección de ZIKV basado en células como se describe en la literatura.^{60, 61}
- Ensayo recombinante E-proteína: la proteína E-recombinante de ZIKV y la HAS (control) se incubaron con $50\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de la POM indicada, tanto a $0,32\text{ mg / ml}$ de proteína, durante 30 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Luego se realizó la SDS-PAGE reductora (Bis-TRIS 4-12% Novex, TCEP como agente reductor) y se tiñeron los geles para la proteína total con Gel Code Blue (Coloidal Coomassie).
- Ensayo de viabilidad celular: 10.000 células Vero se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos (Sarstedt AG & Co. KG) y las células después del tratamiento de un día se incubaron. Dos días después del tratamiento, se eliminaron los sobrenadantes del cultivo celular y se cuantificó la viabilidad celular total usando el ensayo CellTiter Glo-luciferase (Promega, # G7571) usando un luminómetro de microplacas Orion II (Titertek-Berthold). Se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante en las condiciones correspondientes a los ensayos de infección respectivos.
- Ensayo de competencia de anticuerpo: Para evaluar los sitios de unión de POMs, se realizó un ensayo de competición de anticuerpos. Los anticuerpos utilizados fueron: 4G2, del bucle de fusión (Absolute Antibody, Reino Unido); ZKA64, unión en el DIII (Absolute Antibody, Reino Unido), ZV-67, unión en DIII en la región LR (Absolute Antibody, Reino Unido) y B4, proteína NS1 de unión

(control sin unión en proteína E (Abcam, Reino Unido)). Para este ensayo, las células se sembraron VeroE6 al formato de 96 pocillos (6.000 células / pocillo) y al día siguiente, se infectaron con ZIKV-MR766 a MOI 0,15. Dos días después, las células se fijaron y se permeabilizaron con PFA/MeOH como se describe. Luego se agregaron POM a las células fijas después de la dilución en PBS con POM de hasta 500 μM en las células y las placas se incubaron 37 °C durante 15 minutos.⁶² Luego se eliminaron los POM y se agregaron anticuerpos primarios en tampón de anticuerpos (PBS + Tween 20 al 0,3% = PBS-T, + 10% de FCS) y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Los anticuerpos se evaluaron primero en células VeroE6 infectadas con MOI 0,15 fijas y las concentraciones utilizadas en la configuración del ensayo de competición se ajustaron a su EC_{50} . Después de la incubación con el anticuerpo primario, las células se lavaron 3 veces con 100 μl de PBS-T y luego se añadió anticuerpo secundario acoplado a HRP. Después de otra incubación de 1 hora a 37 °C, las células se lavaron nuevamente con 100 μl de PBS-T 4 veces antes de que la detección se llevara a cabo con el sustrato KPL SureBlue™ TMB. La reacción se detuvo mediante la adición de un volumen 1: 1 de H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} después de 5 minutos y los resultados se leyeron midiendo la absorbancia a 450 nm con corrección de referencia a 650 nm.

3.3.1.4 Estudios de acoplamiento molecular

Se realizaron dos búsquedas utilizando el software Autodock con configuraciones similares (Sección 3.2.2.1). La primera búsqueda de acoplamiento permitió al POM explorar toda la superficie de la proteína E. Una grilla cúbica grande (127 × 80 × 80, con espacio de 1 Å). El segundo acoplamiento implicó una búsqueda del sitio 1, una cuadrícula cúbica (62 × 62 × 68, con un espacio de 0.414Å) centrada alrededor del grupo de residuos (ARG138, ARG164 y LYS166), y el sitio 2, una cuadrícula cúbica (78 × 72 × 80, con un espacio de 0.375 Å) centrado alrededor del bucle de fusión (99-110). La configuración de AutoDock se parametrizó para que la orientación de la molécula de ligando y su posición inicial se establecieran al azar. La estrategia de búsqueda local de LGA se empleó con el experimento de acoplamiento derivado de 100 ejecuciones programadas para finalizar después de 2500000 evaluaciones de

energía. La molécula Dawson POM se parametrizó para un acoplamiento rígido de modo que los enlaces no tengan torsión libre durante el cálculo del acoplamiento.

3.3.2 Resultados y discusión

3.3.2.1 Caracterización

● POM PW

FT -IR (cm^{-1}): 3581 (b), 1613 (m), 1092 (s), 1021 (w), 961 (s), 912 (s), 781 (vs)

● POM V-PW

FT -IR (cm^{-1}): 3448 (b), 1616 (m), 1085 (s), 1055 (m), 1015 (w), 990 (s), 943 (s), 917 (s), 887 (w), 773 (vs, b)

SI-1

FT-IR (cm^{-1}): 1630 (m), 1130 (m), 1080 (s), 1006 (m), 980 (m), 950 (s), 910 (s), 870 (vs), 805 (vs), 730 (vs).

● POM Mn-PW

FT -IR (cm^{-1}): 3448 (b), 1616 (m), 1094 (m), 1092 (s), 1012 (w), 941 (s), 898 (s), 766 (s, b), 712 (vs).

SI-2

FT -IR (cm^{-1}): 3448 (b), 1634 (w), 1077 (m), 1013 (m), 968 (w), 956 (s), 906 (s), 860 (s), 809 (s), 737 (s), 665 (vs)

SI-3

FT -IR (cm^{-1}): 3448 (b), 1632 (m), 1083 (m), 1014 (m), 939 (m), 910 (m), 829 (s), 779 (vs), 612 (vs).

● POM Co-PW

FT -IR (cm^{-1}): 3448 (b), 1613 (m), 1106 (m), 1080 (s), 1016 (w), 943 (s), 900 (s), 777 (vs, b), 710 (s).

● POM PMo

FT -IR (cm^{-1}): 3448 (b), 3141 (m, b), 1631 (w), 1605 (m), 1403 (s), 1077 (s), 1004 (m), 939 (s), 905 (s), 869 (s), 770 (vs), 600 (m).

La síntesis de estos POM es bien conocida. Los espectros FT-IR de cada POM y precursor coinciden con su estructura.

3.3.2.2 Resultados de estabilidad

Todos los POM evaluados exhiben estabilidad durante los 7 días en el tampón PBS a pH 7,4. La forma de las curvas y la no aparición de nuevos picos muestra que los compuestos son estables a las condiciones de los ensayos *in vitro* (Fig. 24, 25, 26, 27 y 28).

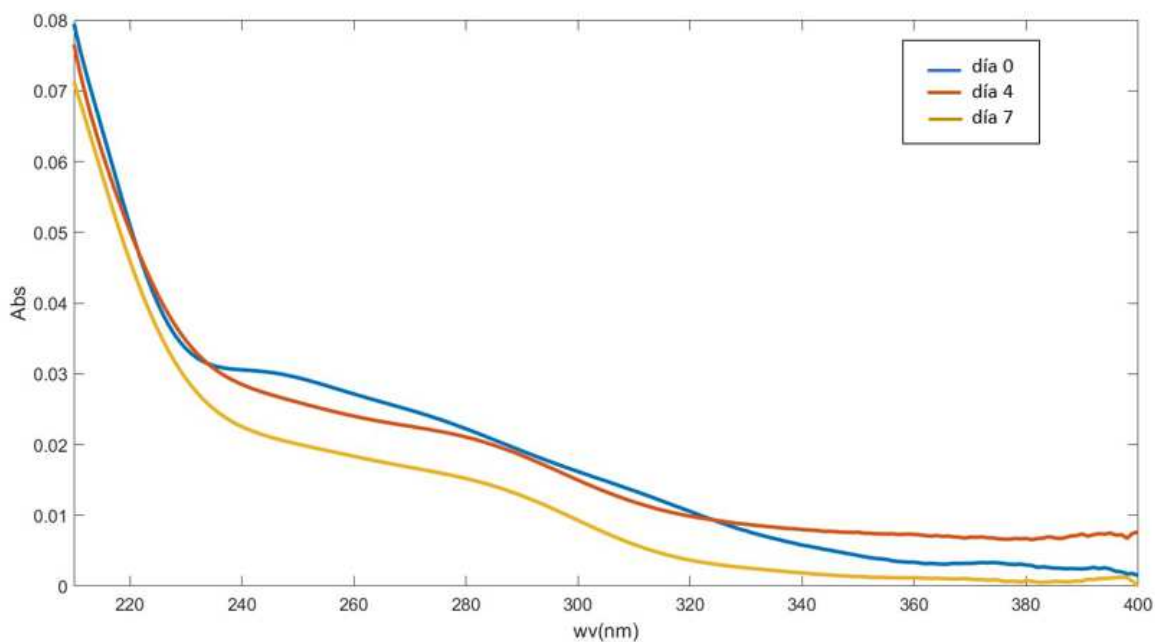


Figura 24. Estabilidad de PW

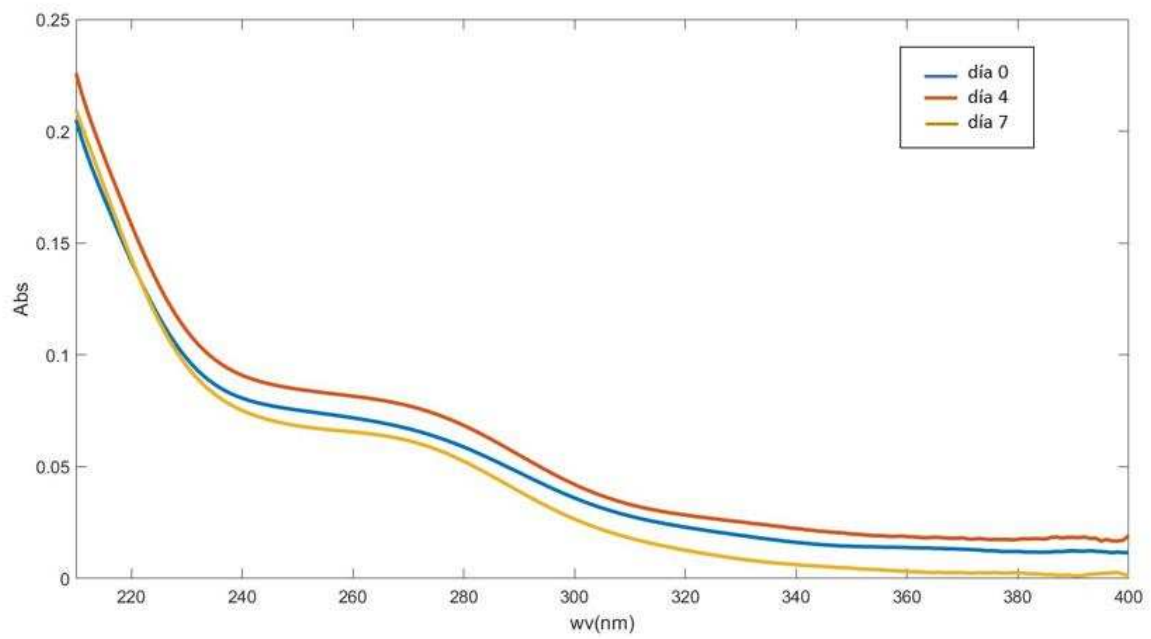


Figura 25. Estabilidad de V-PW

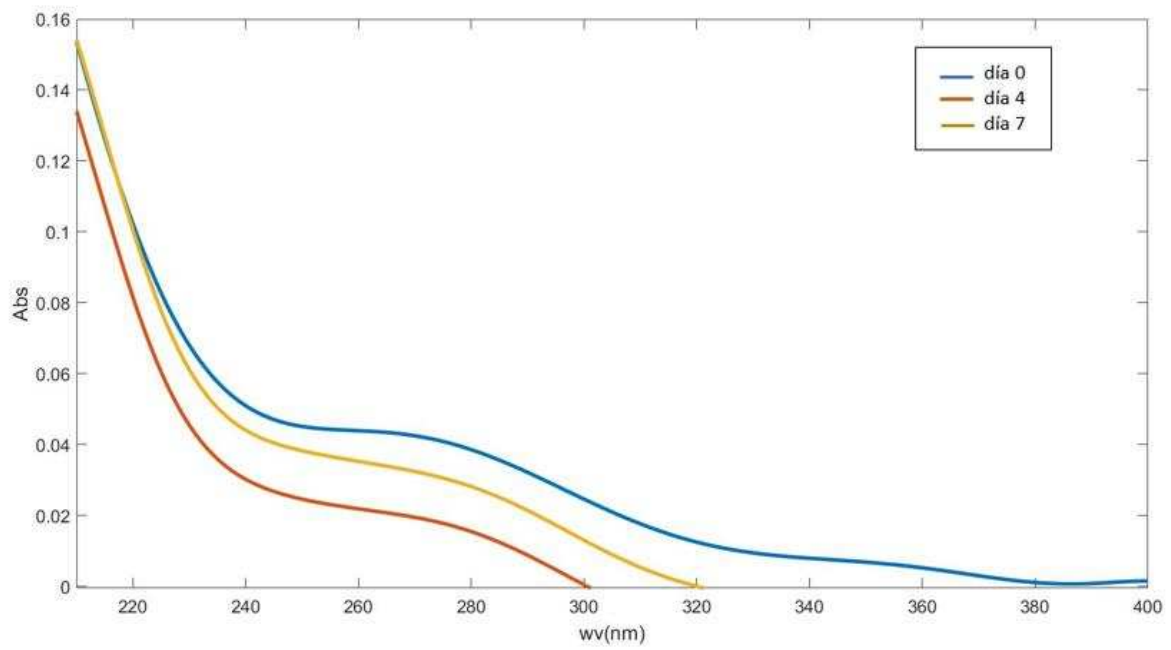


Figura 26. Estabilidad de Mn-PW

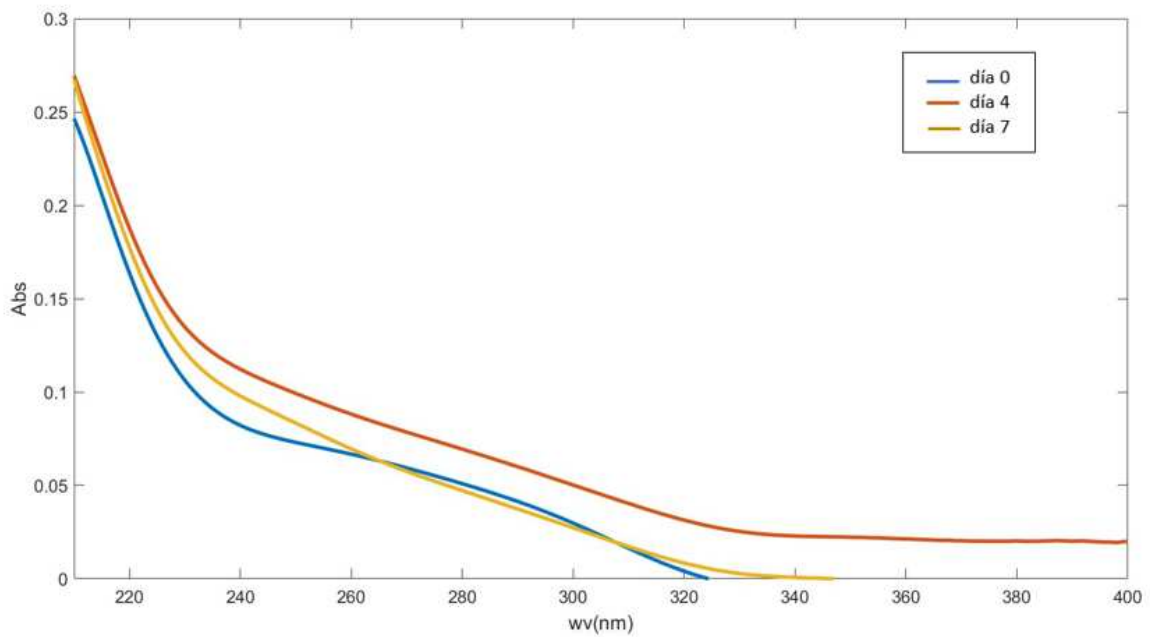


Figura 27. Estabilidad de Co-PW

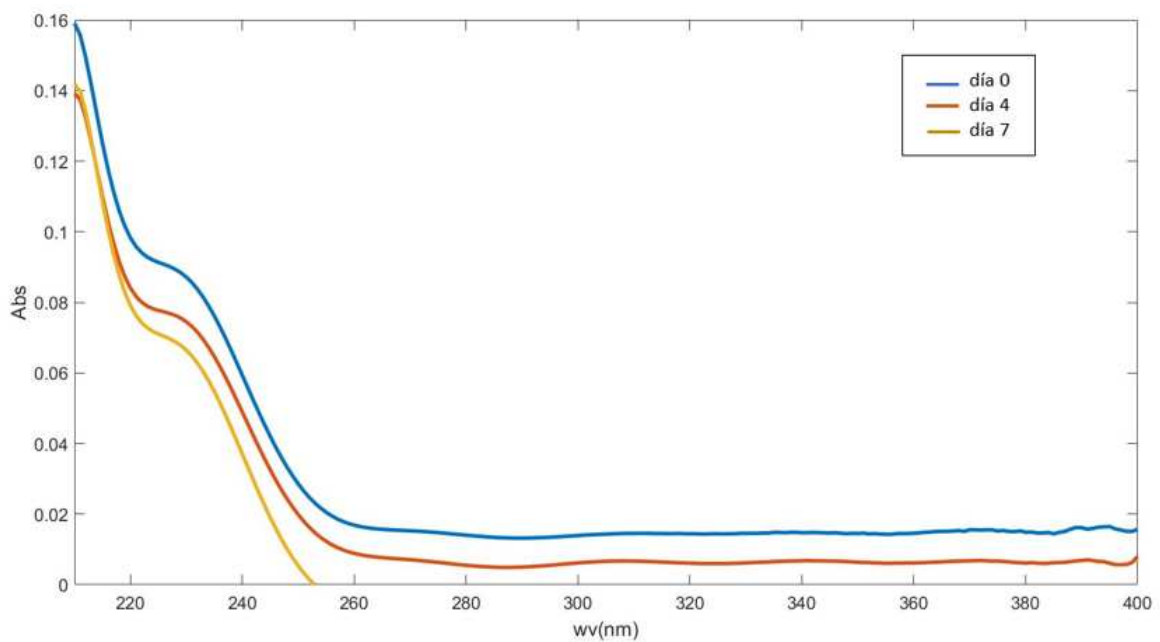


Figura 28. Estabilidad de PMo

3.3.2.3 Resultados de los ensayos *in vitro*

● Polioxometalatos Dawson de tungsteno: los más activos

Para investigar la posible actividad antiviral de los compuestos, se realizó una ronda de infección y un ensayo de citotoxicidad. La concentración citotóxica media máxima y la concentración inhibitoria media máxima (IC₅₀) se calcularon como la concentración

inhibitoria del 50% utilizando el software Graph Pad Prism 8. Los valores se indican en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores de IC_{50} y CC_{50} expresados en diferentes concentraciones. Los valores se derivan de 3 experimentos independientes, calculados por triplicado técnico. Multiplicidad de infección (MOI) 0.3

Code	MW (g/mol)	ZIKV-FB GWUH 2016 MOI 0.3				Vero Cells	
		IC_{50} [nM]	IC_{90} [nM]	IC_{50} [μ g/mL]	IC_{90} [μ g/mL]	CC_{50} [μ M]	SI [CC_{50}/IC_{50}]
PW	4939.9	133.1	165.1	0.7	0.8	>320	>2404
V-PW	4440.3	128.3	165.1	0.6	0.7	>320	>2490
Mn-PW	4837.1	148.4	370.4	0.7	1.8	>320	>2156
Co-PW	4841.1	134.0	166.0	0.6	0.8	225.5	1684.0
PMo	3105.2	No anti-ZIKV activity observed				>320	n/s

Entre los WD-POM, los POM de tungsteno fueron activos contra ZIKV y no se observó actividad anti-ZIKV para Mo-POM. Los WD-POM muestran la mayor inhibición (IC_{50} más baja), sin citotoxicidad (valores CC_{50} de más de 300 μ M para la mayoría de los casos) y el mejor índice de selectividad. Los POM, V-PW y Co-PW fueron elegidos para estudios mecanicistas, ya que muestran la mayor inhibición y V-PW también el mejor índice de selectividad (SI). En la Figura 29, se presentan las curvas de inhibición anti-ZIKV de los POM activos.

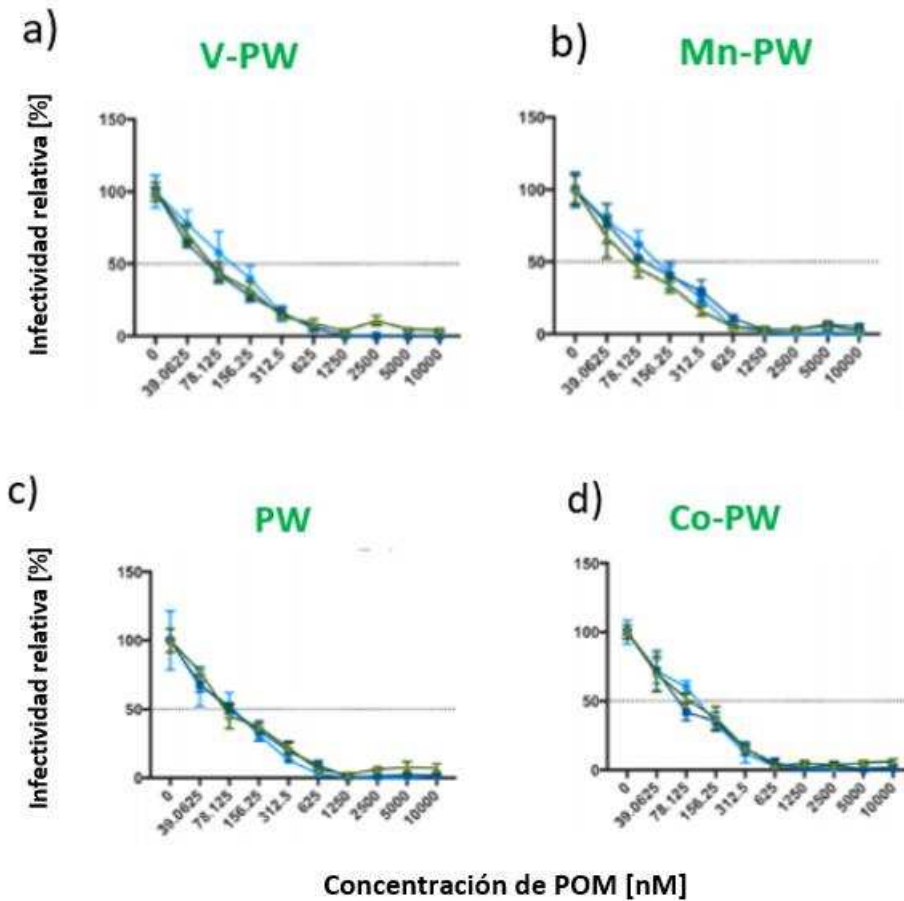
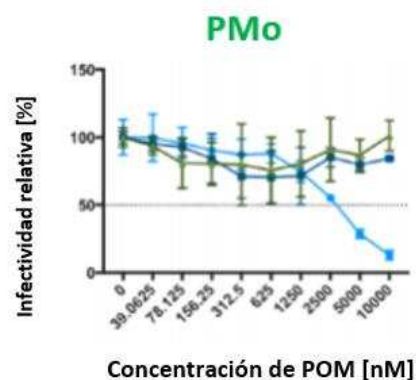


Figura 29. Curvas de inhibición anti-ZIKV de los compuestos activos n = 3 (MOI 0.3) a) V-PW; b) Mn-PW; c) PW y d) Co-PW

En la Figura 30, se observa que PMo no muestra actividad anti-ZIKV en ninguna concentración probada.



La Figura 30. Curva de inhibición de PMo anti-ZIKV n = 3 (MOI 0.3)

El ensayo de reducción de formación de foco (FFA) utiliza anticuerpos marcados con fluorescencia específicos para un antígeno ZIKV con el fin de detectar células huésped

infectadas y partículas de virus infecciosos. Se observa que las imágenes son consistentes con los resultados anteriores (Fig. 31).

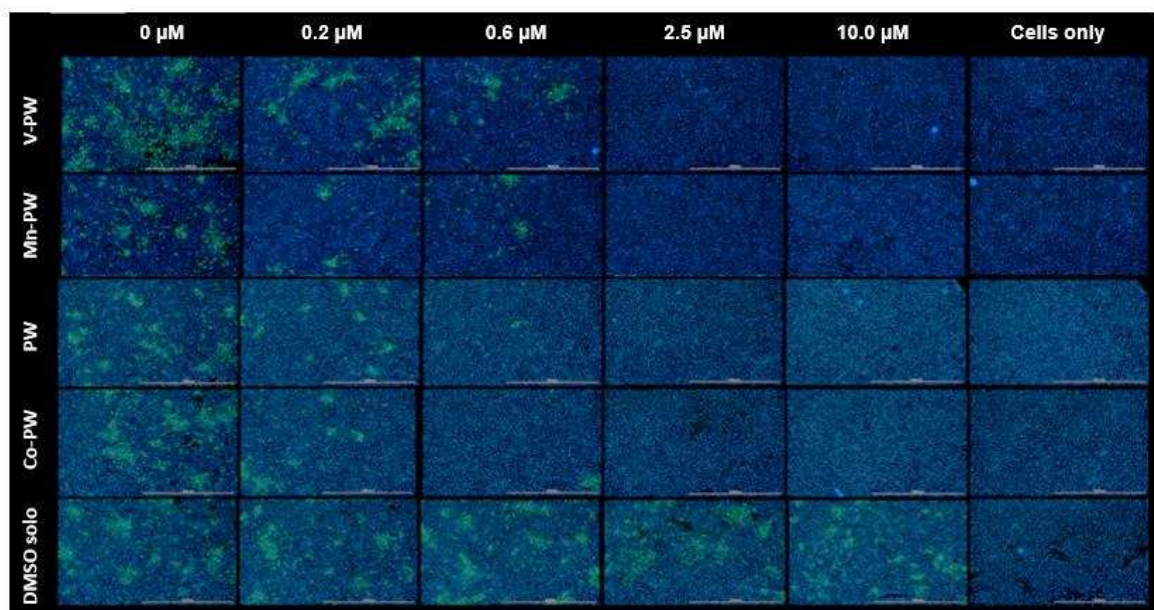


Figura 31. FFA Hoechst 33342 emplea muestra los núcleos (azul) y 4G2-Alexa 488 es el antígeno viral (verde)

Con el fin de comparar la diversidad estructural de los POM activos, se estudia la estructura y la relación de actividad de los POM que forman una estructura cristalina (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis de los WD-POMs en estudio

Código	Atomo Addenda	Hetero Atomo	Funcionalización	Cristal	MSMS Package	
					Area A ²	Volumen A ³
V-PW	W	P	V	Si	598.5	934.7
Mn-PW	W	P	Mn	No		
PW	W	P		Si	602.7	932.9
PMo	Mo	P		Si	604.3	941.3
Co-PW	W	P	Co	No		

Se observa que los más activos tenían átomos de P como heteroátomos, átomos de W como el átomo de adición del marco y una carga negativa de -6 y -8. Los WD-POM tienen un MW de alrededor de 4000 g / mol y el volumen y el área de superficie son alrededor de 935 A³ y 600 A² respectivamente (sin depender de la naturaleza del segundo heteroátomo en la estructura).⁶³

Para estudiar si los POM están actuando sobre la célula o el virión, se realizó un ensayo de tiempo de adición. En azul, primero se infectaron las células, se lavaron y luego se trataron con una solución POM correspondiente. En rojo, el virus se incubó

con la solución de POM y luego con se realizó la infección celular (tratamiento del virus). En verde, las células se trataron con solución de POM, se lavaron y luego se infectaron con el ZIKV (tratamiento celular). En la Fig. 32, se observa que el cambio en las curvas de inhibición a valores más altos durante el tratamiento celular (la dosis durante la exposición al virus determina la potencia), significa que el compuesto actúa sobre el virus. Este resultado, combinado con los datos de tiempo de adición, concluye que estos POM interfieren con los procesos de entrada / unión temprana en el lado del virión.

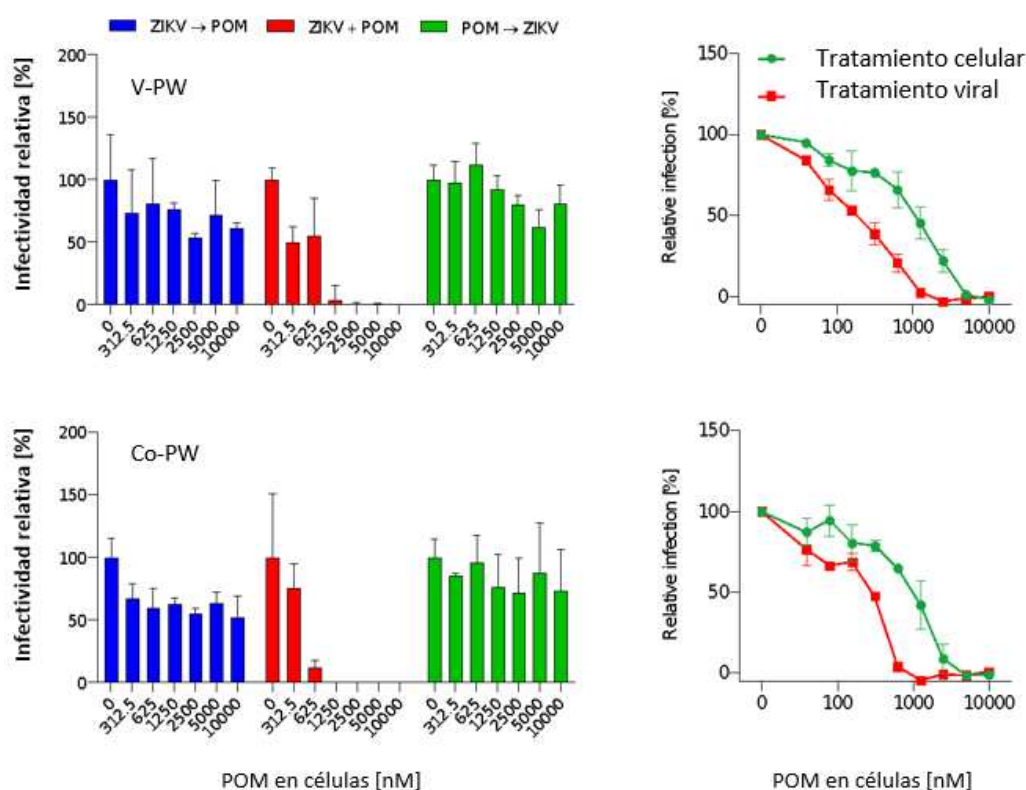


Figura 32. Tiempo de adición: 1 experimento por triplicado (TOA, n = 1, SD). Curvas de tratamiento de células / virus: 2 experimentos independientes por triplicado cada uno (n = 2, SEM)

En la introducción de este capítulo, se presentó la estructura del ZIKV (Fig. 4). La estructura del virión está cubierta por la proteína de la envoltura. Para ver si estos POM pueden escindir o destruir la proteína E, se realizó un ensayo de escisión de proteína E. La proteína E recombinante se incubó con 50 μM de la solución de POM indicada.

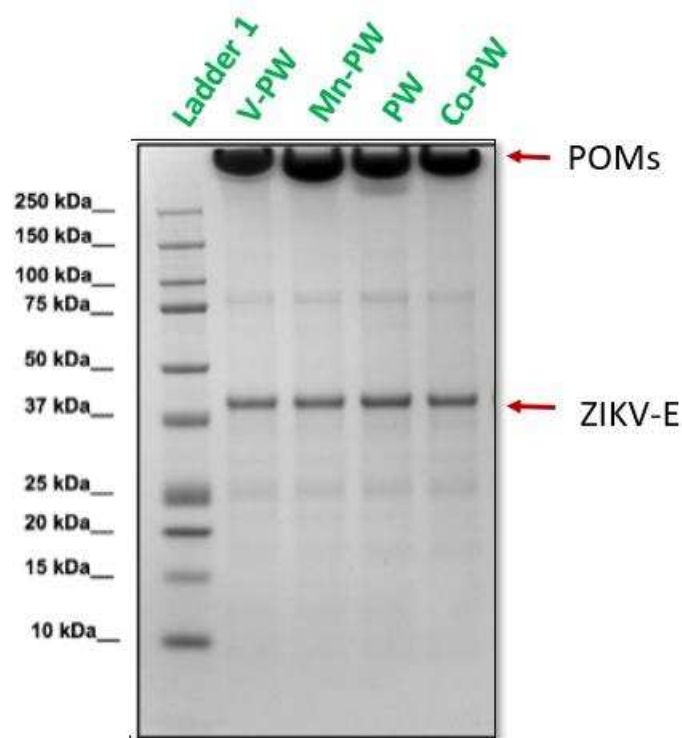


Figura 33. Ensayo recombinante de proteína E

Al no haber cambio en el tamaño de la banda de la proteína E después de la incubación con los POM (Fig.33), se concluye que los compuestos activos no escinden ni destruyen la proteína E del virión.

3.3.2.4 Resultados de acoplamiento molecular

En base a la información de que los POM activos están actuando sobre el virión, se realizó un análisis de posibles sitios de interacción entre los POM de Dawson y la proteína E. La estructura de la proteína E tiene dos cadenas similares de residuos de aminoácidos (cadenas A y B) y se presenta previamente en la Figura 4. Al observar la cadena llamada A (blanco), en la Figura 34, el dominio I es de interés porque el parche positivo ZIKV se encuentra en esa región y entre el dominio II y III, se encuentra el bucle de fusión. ⁵¹

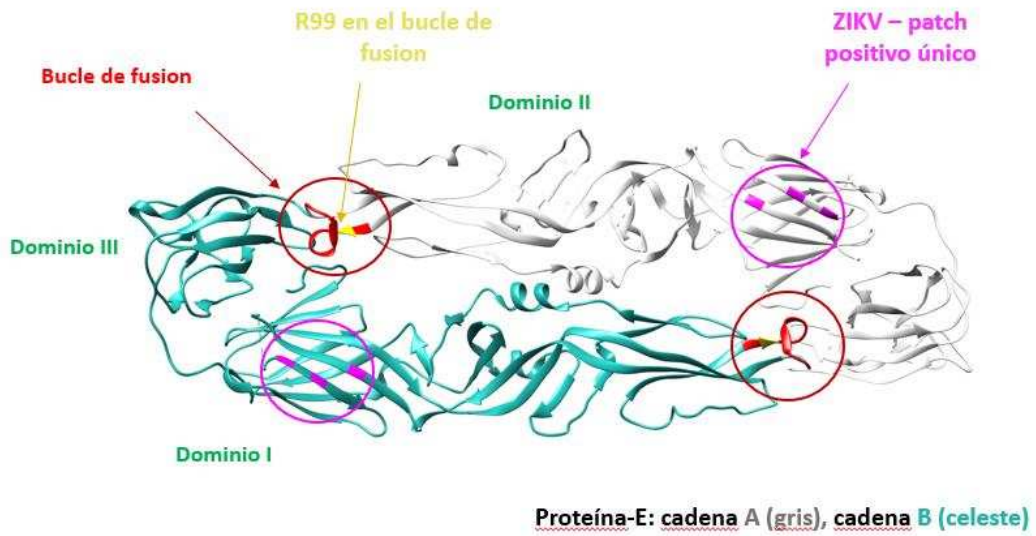


Figura 34. Dominios de la proteína E ZIKV

Al calcular la superficie molecular potencial electrostática, se observa que las regiones positivas están cerca del parche positivo único ZIKV y por el bucle de fusión (Fig. 35). Debido al carácter aniónico de los POM, estas regiones son posibles sitios de interacción.

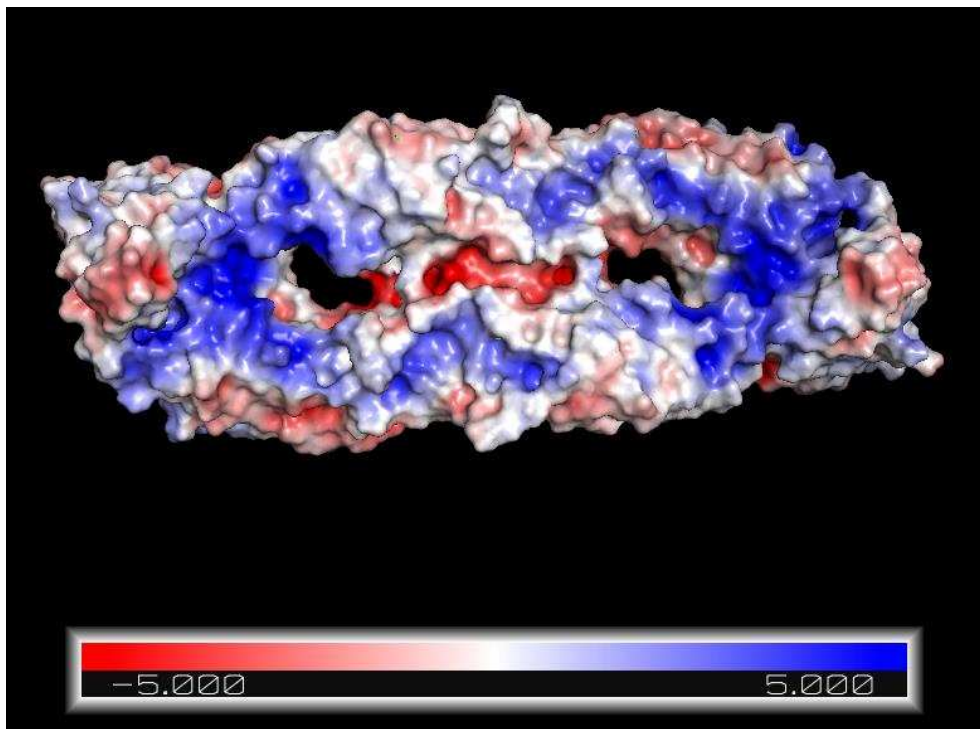


Figura 35. Superficie molecular potencial electrostática de la proteína E ZIKV

Se llevaron a cabo estudios de acoplamiento para encontrar la conformación de energía más baja del complejo E-Protein-POM. Primero, se realizó un estudio de acoplamiento ciego para explorar los posibles sitios de unión del grupo PW en toda la proteína E. Los resultados mostraron dos sitios de unión principales correspondientes al parche de residuos ARG138, ARG164 y LYS166 (sitio 1- Fig. 36) y el área alrededor del bucle de fusión (Residuos 99-110) (sitio 2- Fig.37). Estas son las regiones positivas observadas en el mapa de potencial electrostático de la proteína. El primer sitio de unión parece ser más favorable que el sitio 2 (70% de preferencia).

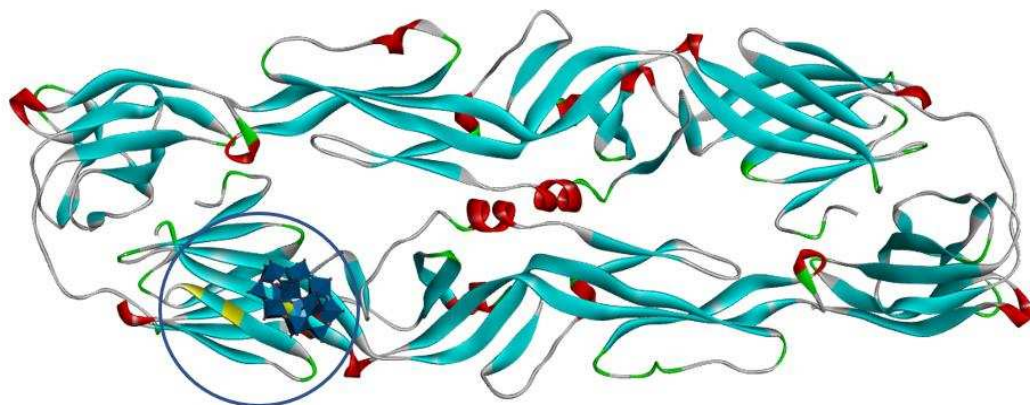


Figura 36. Resultados de blind docking - Sitio 1

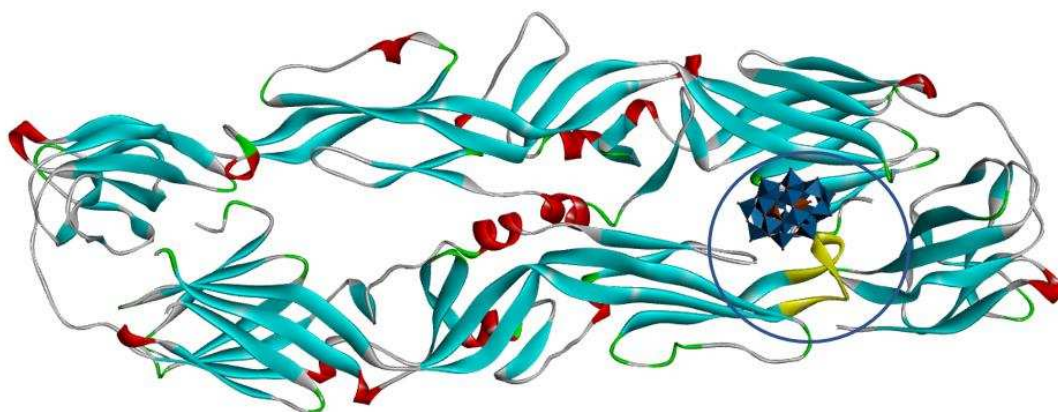


Figura 37. Resultados del blind docking- Sitio 2

Se realizó un estudio de acoplamiento ciego para el PMo. Los resultados indicaron que $\{P_2 Mo_{18}\}$ no tiene preferencia por ningún sitio específico, lo que sugiere que existe una interacción diferente entre los Mo-POM y los aminoácidos. Dado que los molibdatos son oxidantes más fuertes que los tungstatos, proponemos que exista un

sitio de preferencia diferente para estos ligandos y la cadena lateral de aminoácidos que son bloques de construcción de la proteína E.⁶⁴ Además, se han publicado resultados sobre la coordinación de un ligando de lisina a los POM de molibdato.⁶⁵

La segunda búsqueda de PW se realizó para estudiar las interacciones de 1:1 con dos sitios de escisión de la proteína E restringida al área definida por los dos sitios de unión. Las energías libres de unión predichas calculadas son valores bajos: -10.68 kcal/mol para el sitio 1 y -9.18 kcal/mol para el sitio 2. El WD-POM puede formar muchas interacciones favorables dentro de ambas cavidades de unión de la proteína E en el resultante complejo acoplado. Las cadenas laterales cargadas positivamente de los residuos de ambos lados pueden formar enlaces de hidrógeno y/o interacciones electrostáticas con los oxígenos cargados negativamente de POM. Estas interacciones pueden observarse en la Fig. 38 para el sitio 1 y en la Fig. 39 para el Sitio 2. Como las energías de unión son similares, no es posible concluir en qué sitio tiene lugar la inhibición.

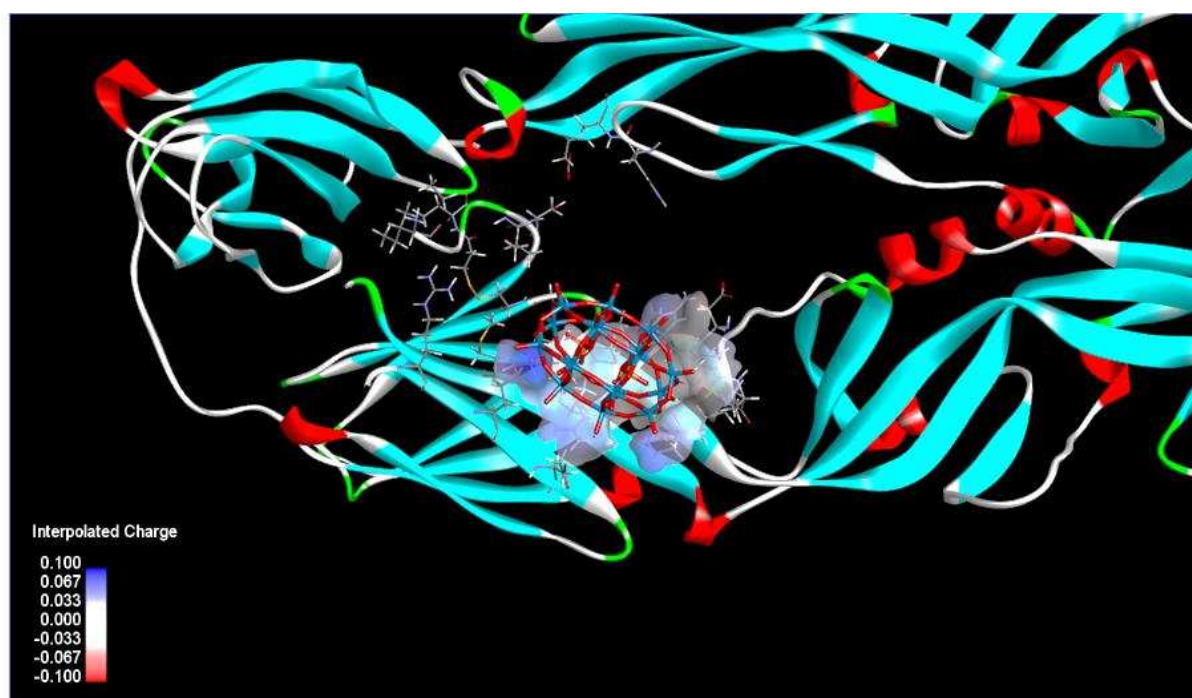


Figura 38. Interacción con el sitio 1

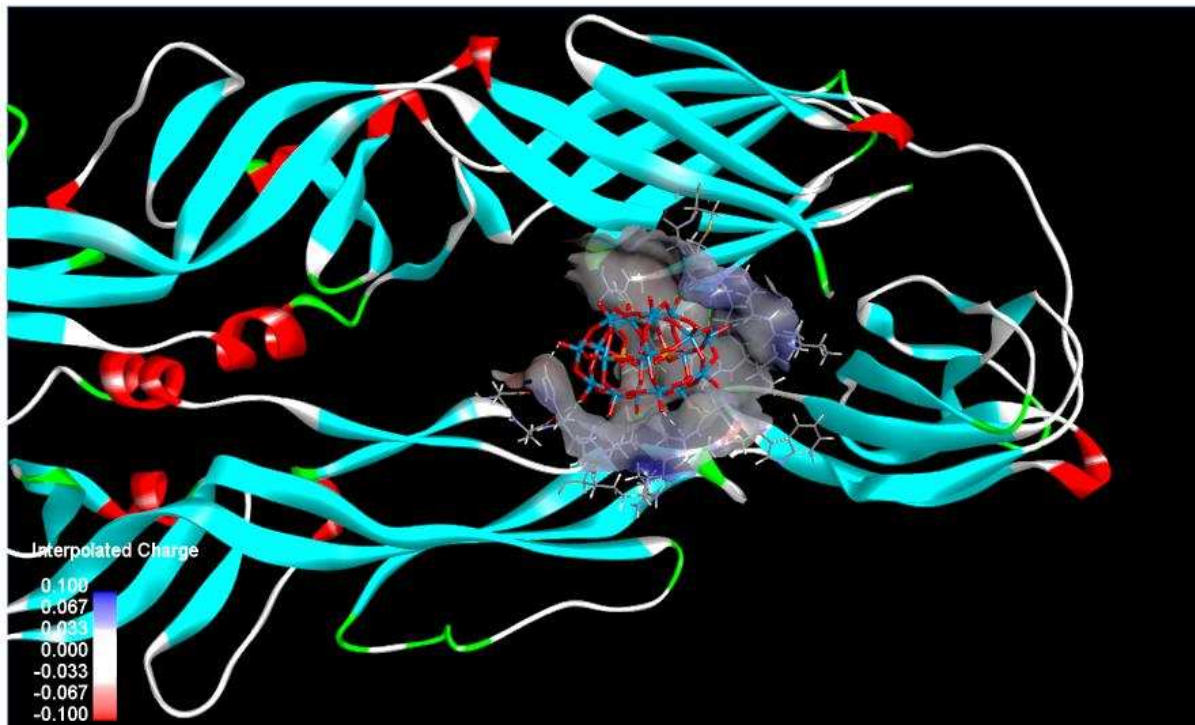
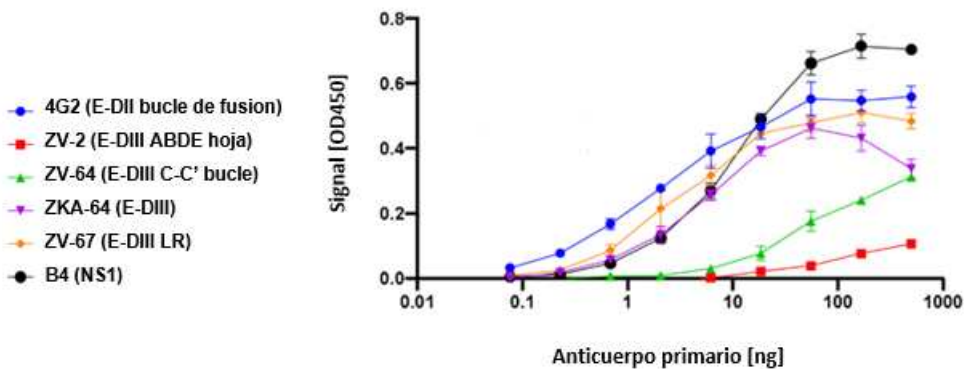


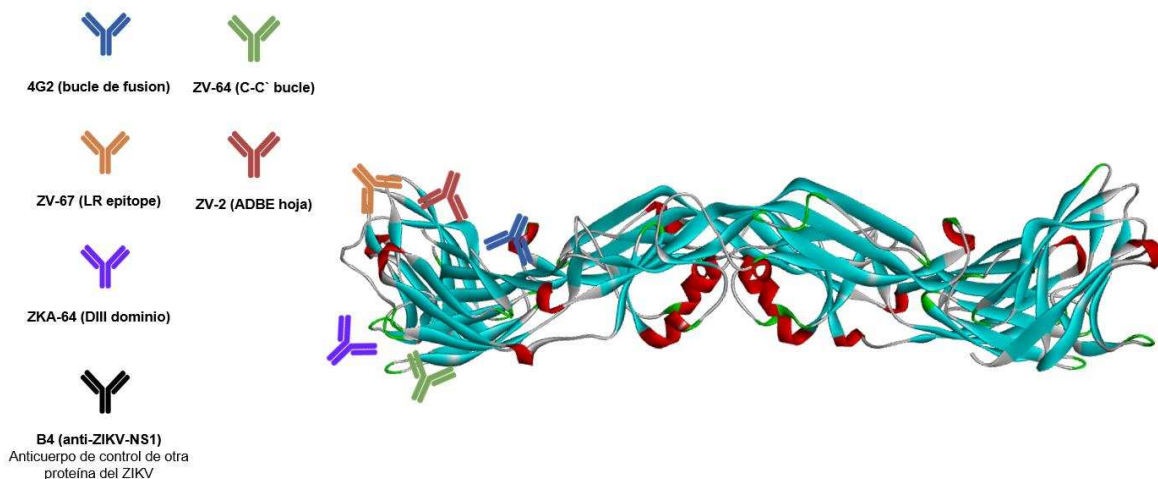
Figura 39. Interacción con el sitio 2

3.3.2.3 Resultados del ensayo de competencia de anticuerpos (continuación)

Para obtener más conocimiento y comprensión de los sitios de interacción, se realizó un ensayo de competencia de anticuerpos. Tres anticuerpos que unen a la proteína E se seleccionaron: 4G2, ZKA 64 Y ZV67. El anticuerpo 4G2 se une al bucle de fusión y ZKA 64 se une al dominio III. Los otros, presentados en la figura 40, son más accesibles en el virus maduro que en las células infectadas. Se seleccionaron los anticuerpos 4G2, ZKA-64, ZV-67 para mapear el sitio 1 y el sitio 2.



Antibody	kD (ng)	Fact. Dil para 50 μ L
4G2	2.0	24631
B4	11.8	4248
ZKA-64	5.8	8562
ZV-67	3.3	14881



La Figura 40. Anticuerpos disponibles para ZIKV. B4 es un anticuerpo de control que une una proteína ZIKV no relacionada

En la Figura 41, se presentan los resultados de un ensayo de competencia de anticuerpos. Especialmente ZV-67, se une más lejos del bucle de fusión en el dominio III, en la cresta lateral, se ve sustancialmente menos afectado por la unión de POM. Estos resultados muestran que el sitio de interacción de los POM está cerca de los epítopes de unión 4G2 y ZKA-64, validando los resultados de acoplamiento acerca de la unión del POM en el bucle de fusión.

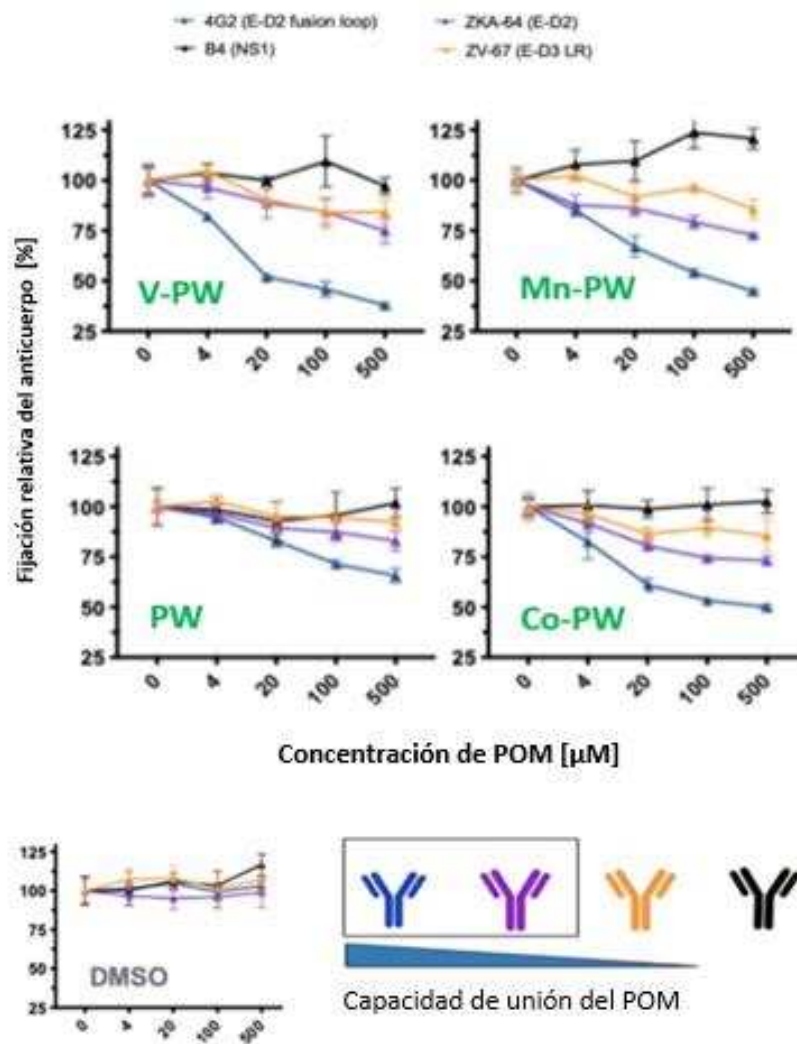


Figura 41. Ensayo de competencia con W-POM (DMSO como control)

3.3.3 Conclusión

El Dawson POM de Tungsteno son ampliamente activos contra el ZIKV con curvas de inhibición similares y no tienen efectos tóxicos en las células: los índices de selectividad de W-Dawson POM están en el rango de 1500-2500. Los experimentos de tiempo de adición y el tratamiento con células / virus muestran que los POM actúan en la entrada temprana y en el virión. En base a estos resultados, se realizaron estudios de acoplamiento ciego para encontrar sitios de interacciones entre $[P_2W_{18}O_{62}]^{6-}$ y la proteína E del ZIKV: bucle de fusión y el parche positivo. Los resultados muestran dos sitios de interacción y para obtener una idea del mecanismo

de acción, se realizaron estudios de acoplamiento en el sitio para encontrar la conformación de energía más baja del complejo de proteína-E y $[P_2W_{18}O_{62}]^{6-}$ restringido a esa área de estudio. En estos dos sitios de unión diferentes (bucle de fusión y regiones de parche positivas) este POM está interactuando con energías de unión similares. Las energías libres de unión predichas calculadas son bajas y la superficie cargada negativamente de POM puede formar muchas interacciones electrostáticas favorables dentro de ambas cavidades de unión de la proteína E en la geometría compleja acoplada. Para validar este resultado, se realizó una competencia de anticuerpos mediante un ensayo de 3 anticuerpos diferentes que se unen a la proteína E en diferentes epítopos para mapear los sitios de interacción POM. El resultado mostró que se espera que los POM de W-Dawson se unan cerca del bucle de fusión, en una región que afecta la unión de ZV-64 y 4G2 (dominio III y II-bucle de fusión) y el anticuerpo, ZV-67, que se une más lejos del bucle de fusión, están sustancialmente menos afectados por la unión de POM a la proteína E. Las energías de unión son similares, pero los resultados muestran que probablemente el sitio de interacción está en la zona del bucle de fusión.

Para concluir, se realizó con éxito un proceso racional de diseño de fármacos para la evaluación y el desarrollo de Dawson-POM como agentes anti-ZIKV. Se espera que estos resultados resalten el impacto de los POM como compuestos antivirales y su interacción con las biomoléculas.

References

1. J. Flint, V. Racaniello, G. Rall, A. M. Skalka, L. Enquist, *Principles of Virology*, ASM Press, Washington, **2015**.
2. H. Gelderblom, *Structure and Classification of Viruses. Medical Microbiology*, University of Texas Medical Branch, Galveston, **1996**.
3. D. Baltimore, *Bacteriol. Rev.* **1971**, *35*, 235–241.
4. *HIV / AIDS - WHO*, **2019**.
5. J. Bhattacharya, *Indian J. Med. Res.* **2018**, *148*, 671–674.
6. N. Huarte, P. Carravilla, A. Cruz, M. Lorizate, J. A. Nieto-Garai, H. G. Kräusslich, J. Pérez-Gil, J. Requejo-Isidro, J. L. Nieva, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–14.

7. C. Hoffmann, J. Rockstroh, *HIV Book*, Medizin Fokus Verlag, Hamburg, **2016**.
8. M. Guttman, M. Kahn, N. K. Garcia, S.-L. Hu, K. K. Lee, *J. Virol.* **2012**, *86*, 8750–8764.
9. “HIV Therapeutics Market by Type, Product, and Geography - Forecast and Analysis 2019-2023”, Technavio Report, **2019**, can be found under <https://www.technavio.com/report/hiv-human-immunodeficiency-virus-therapeutics-market-industry-analysis>.
10. *ZIKA Epidemiology Update*, WHO, July **2019**.
11. *ZIKA Virus Structure*, ViralZone, SIB Swiss Institute of Bioinformatics, can be found under <https://viralzone.expasy.org/6756>
12. K. Owczarek, Y. Chykunova, C. Jassoy, B. Maksym, Z. Rajfur, K. Pyrc, *Cell Commun. Signal.* **2019**, *17*, 1–19.
13. A. Agrelli, R. R. de Moura, S. Crovella, L. A. C. Brandão, *Infect. Genet. Evol.* **2019**, *69*, 22–29.
14. “Global Zika Virus Therapeutics Market 2019-2023”, Technavio Report, 2019, can be found under <https://www.technavio.com/report/global-zika-virus-therapeutics-market-industry-analysis>
15. T. Yamase in *Biomedical Inorganic Polymers* (Eds. W. Muller, X. Wang, H. Schroder), Springer, Heidelberg, Germany, **2013**, pp. 65-116.
16. History of HIV and AIDS overview, Avert Organization, **2019**, can be found under <https://www.avert.org/professionals/history-hiv-aids/overview>.
17. A Timeline of HIV/AIDS, AIDS.gov, **2016**, can be found under <https://www.hiv.gov/hiv-basics/overview/history/hiv-and-aids-timeline>
18. Center for Drug Evaluation and Research (U.S.)., & Center for Drug Evaluation and Research (U.S.). Orange book: Approved drug products with therapeutic equivalence evaluations. Rockville, Md.: U.S. Dept. of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Office of Pharmaceutical Science, Office of Generic Drugs. It can be found under <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/ob/index.cfm>
19. R. Schinazi, C. Hill, US19950399700, **2000**.
20. T. Yamase, S. Shigeta, US20030039702 A1, **2003**.
21. R. Schinazi, C. Hill, US 6911470 B1, **2005**.
22. J.-C. Chermann, D. Dormont, E. Vilmer, F. Barre-Sinoussi, B. Spire, L. Montagnier, W. Rozembaum (Cabinet Harle & Phelip); 4,759,929, **1988**.

23. B. W. Sullivan, "New Drugs appears to curb AIDS virus", **1985**, can be found under <https://www.nytimes.com/1985/02/09/us/new-drug-appears-to-curb-aids-virus.html>
24. B. J. Jarvis, "Desperate American AIDS Victims Journey to Paris, Hoping That a New Drug Can Stave Off Death", **1985**, can be found under <https://people.com/archive/desperate-american-aids-victims-journey-to-paris-hoping-that-a-new-drug-can-stave-off-death-vol-24-no-7/>
25. D. Abrams, M. Conant, A. Moss in *The AIDS Epidemic in San Francisco: The Medical Response, 1981- 1984 (Vol II)*, The Regents of the University of California, San Francisco, US, **1996**.
26. P. Clayette, D. Dormont in *Polyoxometalates: From Platonic Solids to Anti-Retroviral Activity* (Eds. M. Pope, A. Muller), Springer Science, Luxembourg, **1994**, pp. 387-400.
27. A. Bartholomeusz, E. Tomlinson, P. Wright, C. Birch, S. Locarnini, H. Weigold, S. Marcuccio, G. Holan, *Antiviral Res.* **1994**, 24, 341–350.
28. J. T. Rhule, C. L. Hill, D. A. Judd, R. F. Schinazi, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 327–357.
29. D. A. Judd, J. H. Nettles, N. Nevins, J. P. Snyder, D. C. Liotta, J. Tang, J. Ermolieff, R. F. Schinazi, C. L. Hill, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 886–897.
30. E. De Clercq, *Med. Res. Rev.* **2002**, 22, 531–565.
31. S. Shigeta, S. Mori, E. Kodama, J. Kodama, K. Takahashi, T. Yamase, *Antiviral Res.* **2003**, 58, 265–271.
32. S. Shigeta, S. Mori, T. Yamase, N. Yamamoto, N. Yamamoto, *Biomed. Pharmacother.* **2006**, 60, 211–219.
33. X. Wang, J. Wang, W. Zhang, B. Li, Y. Zhu, Q. Hu, Y. Yang, X. Zhang, H. Yan, Y. Zeng, *Viruses* **2018**, 10, 265.
34. R. Francese, A. Civra, M. Rittà, M. Donalisio, M. Argenziano, R. Cavalli, A. S. Mougharbel, U. Kortz, D. Lembo, *Antiviral Res.* **2019**, 163, 29–33.
35. A. Bijelic, A. Rompel, *Coord. Chem. Rev.* **2015**, 299, 22–38.
36. V. Ramamoorthy, A. Campa, M. Rubens, S. S. Martinez, C. Fleetwood, T. Stewart, J. P. Liuzzi, F. George, H. Khan, Y. Li, et al., *Viral Immunol.* **2017**, 30, 271–277.
37. R. Daniel, E. Marusich, E. Argyris, R. Y. Zhao, A. M. Skalka, R. J. Pomerantz, *J. Virol.* **2005**, 79, 2058–2065.

38. G. Nunnari, E. Argyris, J. Fang, K. E. Mehlman, R. J. Pomerantz, R. Daniel, *Virology* **2005**, *335*, 177–184.
39. E. De Clercq, *Met. Based. Drugs* **1997**, *4*, 173–192.
40. N. Yamamoto, D. Schols, E. De Clercq, Z. Debyser, R. Pauwels, J. Balzarini, H. Nakashima, M. Baba, M. Hosoya, R. Snoeck, et al., *Mol. Pharmacol.* **1992**, *42*, 1109–1117.
41. A. Ginsberg (Ed), *Inorganic Syntheses*, Vol 27, John Wiley & Sons, Ltd, New York, **1990**.
42. B. S. Bassil, M. H. Dickman, B. Von Der Kammer, U. Kortz, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 2452–2458.
43. A. Kascatan-Nebioglu, M. J. Panzner, J. C. Garrison, C. A. Tessier, W. J. Youngs, *Organometallics* **2004**, *23*, 1928–1931.
44. J. Geng, M. Li, J. Ren, E. Wang, X. Qu, *Angew. Chem. Int.*, **2011**, 4184–4188.
45. O. S. Panteleieva, A. V. Shtemenko, K. V. Domasevitch, *Inorg. Chem. Commun.* **2018**, *94*, 119–122.
46. M. Ghose, S. Banerjee, S. Patra, K. Mukherjee, *Journal of Luminescence*, **2016**, *180*, 224–233
47. D. C. Young, *Computational Drug Design*, John Wiley & Sons, Ltd, New Jersey, **2009**.
48. G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791.
49. R. S. Judson, E. P. Jaeger, A. M. Treasurywala, *J. Mol. Struct.(Teochem)*, **1994**, *308*, 191–206.
50. G. Morris, D. Goodsell, M. Pique, W. Lindstrom, R. Huey, S. Forli, W. Hart, S. Halliday, R. Belew, A. Olson, *Autodock Version 4.2 (Userguide)*, **2012**.
51. L. Dai, J. Song, X. Lu, Y. Q. Deng, A. M. Musyoki, H. Cheng, Y. Zhang, Y. Yuan, H. Song, J. Haywood, et al., *Cell Host Microbe* **2016**, *19*, 696–704.
52. A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652.
53. P. J. Hay, W. R. Wadt, *J. Chem. Phys.* **1985**, *82*, 270–283.
54. V. A. Rassolov, M. A. Ratner, J. A. Pople, P. C. Redfern, L. A. Curtiss, *J. Comput. Chem.* **2001**, *22*, 976–984.
55. Gaussian 03, Revision C.02; M. Frisch, G. Trucks, H. Schlegel, G. Scuseria, M. Robb, J. Cheeseman, J. Montgomery, T. Vreven, K. Kudin, J. Burant, J. Millam, S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, J. Scalmani, N. Rega,

- G. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. Knox, H. Hratchian, J. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. Stratmann, O. Yazyev, A. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. Ochterski, P. Ayala, K. Morokuma, G. Voth, P. Salvador, J. Dannenberg, V. Zakrzewski, S. Dapprich, A. Daniels, M. Strain, O. Farkas, D. Malick, A. Rabuck, K. Raghavachari, J. Foresman, J. Ortiz, Q. Cui, A. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Martin, D. Fox, T. Keith, M. Al-Laham, C. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. Wong, C. Gonzalez, J. Pople.; Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2004**.
56. R. G. Finke, B. Rapko, R. J. Saxton, P. J. Domaille, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2947–2960.
57. H. Simmons Booth (Ed.), *Inorganic Syntheses*, McGraw-Hill Book Company INC, New York, **1939**.
58. L. E. Briand, G. M. Valle, H. J. Thomas, *J. Mater. Chem.* **2002**, *12*, 299–304.
59. L. Reed, H. Münch, *Am. J. Hyg.* **1938**, *27*, 493–497.
60. F. Schandock, C. F. Riber, A. Röcker, J. A. Müller, M. Harms, P. Gajda, K. Zuwala, A. H. F. Andersen, K. B. Løvschall, M. Tolstrup, et al., *Adv. Healthc. Mater.* **2017**, *6*, 1–14.
61. A. E. Röcker, J. A. Müller, E. Dietzel, M. Harms, F. Krüger, C. Heid, A. Sowislok, C. F. Riber, A. Kupke, S. Lippold, et al., *Antiviral Res.* **2018**, *152*, 26–35.
62. J. A. Müller, M. Harms, F. Krüger, R. Groß, S. Joas, M. Hayn, A. N. Dietz, S. Lippold, J. Von Einem, A. Schubert, et al., *Nat. Commun.* **2018**, *9*, DOI 10.1038/s41467-018-04442-y.
63. M. F. Sanner, A. J. Olson, J. C. Spehner, *Biopolymers* **1996**, *38*, 305–320.
64. M. Arefian, M. Mirzaei, H. Eshtiagh-Hosseinia, A. Frontera, *Dalt. Trans.* **2017**, *46*, 9812–6829.
65. M. Inoue, T. Yamase, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1995**, *68*, 3055-3063.

Capítulo 4. Resumen y Perspectivas

El objetivo de este trabajo fue desarrollar e investigar el papel de los POM y derivados como agentes antivirales, antibacterianos y antimicóticos y sus futuras direcciones clínicas futuras. Se ha alcanzado el objetivo principal y el trabajo realizado en la elaboración de esta tesis documenta varias contribuciones realizadas en el campo de la química medicinal inorgánica.

La primera contribución principal realizada está relacionada con la nueva síntesis de un POM-IL basado en la sinergia de POM y restos bioactivos, en este caso, un derivado de guanidina. El líquido iónico obtenido se ha caracterizado completamente y sus propiedades específicas, como la no toxicidad, la actividad antibacteriana y antifúngica se han utilizado para el diseño y la formación de una película bioactiva multifuncional. El procedimiento desarrollado consistió en la inmovilización de DOTMG-1 en una matriz polimérica utilizando la técnica de recubrimiento por rotación. El material resultante es estable, fácil de manipular y tiene una amplia aplicabilidad debido a las propiedades antifúngicas y antibacterianas que se mantienen del precursor. Los estudios futuros podrían investigar la asociación entre POM-IL y otros polímeros para obtener compuestos con propiedades personalizadas y explorar nuevos campos de aplicación para estos materiales.

La segunda contribución principal está relacionada con la actividad antiviral de los POM y derivados. Se han desarrollado dos proyectos con diferentes enfoques, uno relacionado con la infección por ZIKV y otro relacionado con la infección por VIH. El uso de técnicas computacionales en combinación con ensayos *in vitro* permitió proponer un mecanismo de acción del tungstato Dawson POM en la proteína E de la ZIKV. Esto ofrece una ventaja significativa para el desarrollo del descubrimiento de fármacos antivirales que implican POM como compuestos activos, un tema interesante para futuras investigaciones. Con respecto a la actividad anti-VIH, se desarrolló un compuesto con una actividad antiviral muy alta mediante la combinación de un catión cafeína y Ce-POM. Los estudios también muestran que el compuesto actúa en las primeras etapas del círculo viral. Para la aplicación clínica de este compuesto, es necesario el diseño de un dispositivo de liberación controlada ya que tiene problemas de solubilidad y biodisponibilidad. Como el compuesto actúa sobre el virión antes de las infecciones celulares, podría tener una aplicación potencial relacionada con la prevención de la infección por VIH. El desarrollo de un anillo vaginal para la liberación controlada del nuevo compuesto anti-VIH, utilizando la tecnología de impresión 3D, constituye el objetivo de futuros estudios.

Se espera que los resultados de este proyecto respalden el gran potencial y las direcciones futuras de estos materiales avanzados en el desarrollo e implementación de dispositivos médicos antivirales.

La resistencia a los medicamentos y las nuevas amenazas, como la pandemia de coronavirus 2019-2020, son un gran riesgo para la salud pública y la economía mundial. Es necesario enfrentar estas nuevas y potenciales emergencias expandiendo la perspectiva de nuevos medicamentos con múltiples objetivos y combinaciones terapéuticas. El autor sugiere que el desarrollo y la evaluación de POM y derivados para combatir las enfermedades infecciosas debe continuar en investigación ya que estos materiales han demostrado ser de gran importancia en proyectos de química medicinal.

