

UCH-FC
Doc-Q
S. 586
C. 1



**NANOPARTÍCULAS METÁLICAS UNIDAS A
COMPUESTOS DE INCLUSIÓN DE
CICLODEXTRINA PARA POTENCIALES
APLICACIONES EN SISTEMAS INTELIGENTES
DE ENTREGA DE FÁRMACOS**

Tesis

**Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De
Doctora en Química**

Facultad De Ciencias

Por

NATALY ROXANA SILVA GONZÁLEZ

Octubre, 2014

Directores de Tesis Dr:

Paul Jara Vergara

Marcelo Kogan Bocian

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

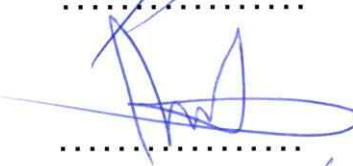
NATALY ROXANA SILVA GONZÁLEZ

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctora en Química, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 20 de Octubre de 2014.

Director de Tesis:
Dr. Paul Jara Vergara

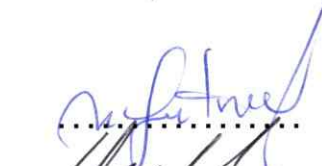


Director de Tesis
Dr. Marcelo Kogan Bocian

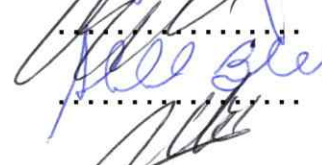


Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Nicolás Yutronic (presidente)



Dr. Angel Leiva



Dr. Soledad Bollo



Dr. Ernesto Clavijo



Con cariño a mis padres.



Nataly Silva González nació en Santiago de Chile en el año 1986.

Su enseñanza básica fue desarrollada en el Liceo Mater Purissima y su enseñanza media en el Liceo Pedro Poveda.

En el año 2005 ingresó a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile a estudiar Licenciatura en Ciencias con mención en Química y en el año 2009 obtuvo el grado académico con distinción. La unidad de investigación titulada “Formación de nanopartículas metálicas, soportadas sobre compuestos de inclusión de α -ciclodextrina”, la realizó en el Laboratorio de Síntesis Inorgánica y Electroquímica a cargo del Dr. Paul Jara Vergara.

El año 2008 fue aceptada en el programa de Doctorado en Química de la Universidad de Chile e ingreso al programa en el 2009, adjudicándose una beca de doctorado otorgada por la Comisión Científica y Tecnológica (CONICYT). Su tesis de Doctorado se enmarcó en las áreas de química supramolecular y nanociencia y se desarrolló en los laboratorios de Síntesis Inorgánica y Electroquímica en la Facultad de Ciencias y en el laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, a cargo de los doctores Paul Jara y Marcelo Kogan.

En el año 2011 desarrolló una Pasantía titulada “Caracterización de complejos supramoleculares que mejoran la selectividad de acción antitumoral por medio del uso de nanopartículas metálicas” en el Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC) en Barcelona, a cargo de Dr. Josep Samitier.

AGRADECIMIENTOS

Hasta que llego el momento de terminar esta etapa de formación académica y personal, llamada doctorado. Me siento inmensamente feliz con lo que he logrado hasta esta etapa de mi vida. Ya que todo lo que he conseguido ha sido con gran esfuerzo, dejando muchas cosas de lado para sacar adelante este proyecto. Claro que nada de lo que soy ahora lo habría logrado si no estuviera rodeada de gente tan especial que me apoya constantemente y me hacen sentir que no estoy sola en ningún proyecto de mi vida.

Es por ello que debo agradecer infinitamente a mi familia porque gracias a su esfuerzo me pudieron brindar educación para poder ser la doctora que soy ahora. Gracias Mamá y Papá por su cariño, contención, preocupación y apoyo en cada uno de los nuevos desafíos que me he embaucado. Y a mis hermanos Cristian y Melisa, decirles que espero ser un buen ejemplo de que con esfuerzo se puede alcanzar cualquier desafío.

Gracias a mi Noni por ser tan preocupada y por prenderle velitas a todos tus santos en cada una de las pruebas que he superado.

También debo agradecer a mis tías, tíos y primos que siempre han confiado en mí y me han acompañado y brindado apoyo durante toda mi vida.

Por otro lado tengo que agradecer enormemente a mi complemento, el hombre que me ha acompañado durante casi 11 años, Alexis Ramírez, quien ha sido mi pareja, mejor amigo y compañero durante todo este tiempo, te amo inmensamente y gracias por aguantar todo mi estrés, apoyarme y darme fuerza cuando a veces quería mandar todo a la punta del cerro. También agradezco a su familia por hacerme parte de ella y siempre preocuparse por mí.

Luego hay que agradecer a las personas que le dan sabor a mi vida, mis amigas, aquí debo separar entre las del alma y las de la vida.

Agradezco a mis cabras locas del liceo la Feña, Pame, Javi, Mary y Ale con quienes tenemos un lazo indestructible y pese al tiempo y distancia seguimos disfrutando de la vida y apoyándonos en todas las locuras que se nos ocurren.

A mis amigas de la vida y Pancho, la Yanin, Prisci, Paty, Feña, Karen, Paula con quienes sacamos adelante la Licenciatura y hemos mantenido la amistad aun que a veces nos cueste juntarnos. En especial a la Vivi, quien siempre está disponible para todo lo que la he necesitado.

Ahora agradezco a mis amigos y compañeros de laboratorio quienes con excelente disposición me han ayudado a sacar adelante la tesis.

A la familia del laboratorio de Síntesis Inorgánica y Electroquímica, Maxi, Ñatin, Martin, Cami y en especial a mi amiga Silvana, compañera de carrera, compañera de congresos y mi agenda personal.

También a los primos de sólidos y al profe Antonio que siempre me ha dado excelentes consejos académicos y de la vida.

A los del laboratorio de toxicología, Magda, Claudio, Simón, Edy porque fueron unos excelentes anfitriones cuando llegue a trabajar allá, por su disposición a enseñarme y ayudarme y sobre todo por ser tan lindas personas. Mención honrosa a la paciencia de Anita por ayudarme en todo el trabajo con las células, que tanto me hicieron rabiar.

Agradezco a los profesores Boris Chornik y Erika Lang por su cálida y desinteresada ayuda con las técnicas de caracterización XPS y RMN, respectivamente.

Al profesor Josep Samitier por darme la oportunidad de realizar una pasantía doctoral en el Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC), donde desarrollé gran parte de los objetivos de esta tesis.

Ahora debo agradecer a mis directores de tesis, el Dr. Paul Jara quien más que mi director se convirtió en mi amigo, infinitas gracias por todas las horas de trabajo, por la paciencia, por la ayuda incondicional y por sus consejos.

Al Dr. Marcelo Kogan quien me ayudo inmensamente en sacar adelante la tesis, por dedicarme tiempo y confiar en mí, para formar parte del team Kogan.

Agradezco a la comisión la Dr. Soledad Bollo, Dr. Angel Leiva y al Dr. Ernesto Clavijo, ya que gracias a sus opiniones constructivas logré terminar satisfactoriamente esta tesis. Quiero agradecer la disposición y ayuda incondicional del presidente de mi comisión el Dr. Nicolás Yutronic y en especial agradecer su alegría, ya que sin lugar a duda personas como usted son las que no nos hacen perder el sentido de la vida, *el ser feliz*.

Por último y no menos importante agradezco al financiamiento económico otorgado por las becas adquiridas durante este proceso: a CONICYT por la beca de doctorado, la beca de asistencia a congresos y la beca de apoyo de tesis. También a becas Chile, por permitirme realizar la pasantía en el IBEC en Barcelona. A los proyectos FONDECYT 1130425, 1130147 y al FONDAP 15130011.

.....MUCHAS GRACIAS A TODOS LOS QUE FORMAN PARTE DE MI VIDA.

INDICE

RESUMEN	xx
ABSTRACT	xxiii
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
I.1 Nanotecnología y Nanociencia	2
I.2 Efecto plasmónico, absorción y disipación de la energía y aplicaciones en biomedicina	3
I.3 Nanopartículas metálicas y aplicaciones en tratamiento de cáncer.	7
I.4 Agente antitumoral metotrexato	8
I.5 Compuestos de inclusión de ciclodextrinas como agentes para entrega de fármacos	11
I.6 Métodos de preparación de nanopartículas metálicas	13
I.7 Uso de compuestos de inclusión para la obtención de nanopartículas	15
HIPÓTESIS DE TRABAJO	18
OBJETIVOS	19
Objetivo general	19
Objetivos específicos	19
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	20
II.1 Materiales	21
II.1.1 Reactivos y solventes	21
II.2 Síntesis	21
II.2.1 Síntesis de compuestos de inclusión	21
II.2.2 Síntesis de NEsAu mediante método químico	23
II.2.3 Obtención de NEsAu mediante método físico	23
II.2.4 Síntesis de NbsAu mediante método químico	24
II.3 Conjugación de nanopartículas a los compuestos de inclusión	25
II.3.1 Conjugación de las NEsAu y NbsAu al Cl de octilamina	25
II.3.2 Conjugación del Cl de Metotrexato a NEsAu y NbsAu	25
II.4 Caracterización de los compuestos de inclusión, nanopartículas y compuestos de inclusión conjugados a las nanopartículas.	26
II.4.1. Resonancia magnética nuclear en solución	26
II.4.2 Difracción de rayos X de polvo	27
II.4.3 Análisis térmico	27
II.4.4 Espectrofotometría de absorción	28

II.4.5	Dispersión dinámica de la luz	28
II.4.6	Microscopía electrónica de transmisión	28
II.4.7	Microscopía electrónica de barrido y espectrometría de energía dispersiva	29
II.4.8	Análisis de activación neutrónica	29
II.4.9	Microscopía fotoelectrónica de rayos X	32
II.4.10	Electroforesis	32
II.5	Funcionalización de vidrios para estudio de irradiación	33
II.5.1	Funcionalización de vidrios con NEsAu	33
II.5.2	Conjugación de los vidrios funcionalizados con los CIs	33
II.5.3	Caracterización de vidrios funcionalizados	34
II.5.4	Irradiación de los vidrios funcionalizados	36
II.6	Evaluación del efecto del MTX y sus derivados sobre la viabilidad celular	37
II.6.1	Evaluación del efecto citotóxico frente a la irradiación del CI conjugado a NEsAu	39
CAPÍTULO III:	COMPUESTOS DE INCLUSIÓN	40
III.1	Caracterización de los compuestos de inclusión con moléculas control	41
III.1.1	Análisis Térmicos	41
III.1.2	Resonancia Magnética Nuclear de protones	46
III.1.3	Espectroscopía Overhauser de marco rotatorio	48
III.1.4	Difracción de rayos-X de muestras policristalinas	50
III.1.5	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	50
III.2	Caracterización del metotrexato purificado	51
III.3	Caracterización del compuesto de inclusión con el fármaco	53
III.3.1	¹ H-RMN	53
III.3.2	2D-ROESY	55
III.3.3	DRX	57
III.3.4	Análisis térmicos	58
CAPÍTULO IV:	NANOMATERIALES	61
IV.1	Obtención y caracterización de NEsAu mediante método químico	62
IV.1.1	Espectrofotometría UV-Vis	62
IV.1.2	TEM y DLS	63
IV.1.3	Análisis de activación neutrónica	64
IV.2	Conjugación de las NEsAu con el compuesto de inclusión de octilamina	65
IV.2.1	Conjugación de las NEsAu con el CI de octilamina	65
IV.2.2	MTX conjugado a NEsAu	76
IV.2.3	CI de MTX conjugado a NEsAu	77
IV.3	Obtención de NEsAu por método físico	86
IV.3.1	Espectrofotometría de reflectancia difusa UV-Vis	86

IV.3.2 TEM	87
IV.4 Síntesis y caracterización de Nanobarras de oro	88
IV.4.1 Espectrofotometría de absorción	88
IV.4.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	89
IV.5 Conjugación de las NbsAu al CI	90
IV.5.1 NbsAu conjugadas al CI de octilamina	90
IV.5.2 NbsAu conjugadas al CI de MTX	98
CAPÍTULO V: IRRADIACIÓN DEL COMPUESTO DE INCLUSIÓN CON OCTILAMINA	101
V.1 Estudio de ¹ H-RMN a temperatura variable	102
V.2 Estudio por AFM del efecto de la irradiación láser sobre CI conjugados a NPs	109
V.2.1 Caracterización de las etapas de funcionalización del vidrio	110
CAPÍTULO VI: CITOTOXICIDAD	125
CAPÍTULO VI:I CONCLUSIONES	133
BIBIOGRAFÍA	136
ANEXOS	142
Anexo1	143
Anexo 2	145
Anexo 3	147
A 3.1 ¹ H-RMN	147
A 3.2 DRXP	148
A.3.3 Análisis Térmicos	148
Anexo 4	149
Anexo 5	150
A.5.1 Primera prueba de irradiación al CI unido a NEsAu	150
A.5.2. Estudio de la temperatura que alcanza las muestras luego de ser irradiadas.	152

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Figura I. 1. Representación de la oscilación en fase de los electrones de la banda de conducción debido a su interacción con un campo electromagnético.....	3
Figura I. 2. Espectros de absorción UV-visible de soluciones de NEsAu de distintos diámetros.....	4
Figura I. 3. Micrografías TEM y espectro de absorción de nanopartículas de oro con distintas geometrías.....	5
Figura I. 4. Detección de células tumorales usando imágenes de dispersión de luz de campo oscuro.....	6
Figura I. 5. Imagen representativa de la vectorización pasiva y activa.....	8
Figura I. 6. Estructura química de ácido fólico y metotrexato.....	9
Figura I. 7. Diagrama del mecanismo de acción de MTX.....	10
Figura I. 8. Estructura y dimensiones geométricas aproximadas de la α , β , y γ -CDs.....	12
Figura I. 9. Esquemas de las distintas estructuras cristalinas en los complejos de inclusión con ciclodextrina.....	13
Figura I. 10. Representación esquemática del proceso de obtención de NEsAu vía reducción química de sales de metales de transición en presencia de agentes estabilizadores.....	14
Figura I. 11. Representación esquemática de; a) equipo de desintegración catódica, b) proceso de pulverización catódica en alto vacío.....	15
Figura I. 12. Representación esquemática de a) un compuesto de inclusión de α -ciclodextrina con decanotiol (α -CD/DT), b) de NEsM soportadas sobre el plano (001) de un cristal de Cl. c) Micrografía SEM, mostrando el depósito selectivo de las NEsAu sobre el plano (001) del Cl de CD.....	16
Figura I. 13. Espectro Raman de los compuestos; a) α -CD/DDT/NEsAu y b) α -CD/DDT.....	16
Figura I. 14. Micrografías TEM de NPs de; a) Au, b) Cu y c) Micrografía SEM de NEsAu.....	17

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

Figura II. 1. Esquema representativo del sistema utilizado en el proceso de irradiación de vidrios.....	36
Figura II. 2. Reducción de MTS a Formazán por acción del metabolismo mitocondrial.....	37

CAPÍTULO III: COMPUESTOS DE INCLUSIÓN

Figura III. 1. DSC de la α -CD.	42
Figura III. 2. DSC y TGA de los CIs de α -CD/alquilaminas.	43
Figura III. 3. DSC y TGA de los CIs de α -CD/alquiltioles.	44
Figura III. 4. Representación esquemática y numeración de los protones de la matriz de α -CD y de la molécula de OA.	47
Figura III. 5. Espectros ROESY del CI de α -CD/OA y una representación de la forma de inclusión de octilamina dentro de la matriz de α -CD.	49
Figura III. 6. Micrografías SEM de a) α -CD nativa, b), c) y d) compuesto de inclusión de OA a distintos aumentos.	51
Figura III. 7. Comparación de los espectros ^1H -RMN del MTX con Manitol, reportado y purificado.	52
Figura III. 8. Comparación de los espectros ^1H -RMN de los precursores β -CD, MTX, CI y mezcla física de estos.	53
Figura III. 9. Asignación de los protones de la molécula de MTX.	55
Figura III. 10. Espectro ROESY segmentado del CI de β -CD/MTX.	56
Figura III. 11. Ordenamiento propuesto en la literatura para la inclusión del fármaco realizado por modelamiento molecular.	57
Figura III. 12. Comparación de los difractogramas de los precursores, del CI y de la mezcla física.	58
Figura III. 13. Termogramas de MTX, β -CD y CI de β -CD/MTX.	59
Figura III. 14. DSC del MTX, β -CD y del CI de β -CD/MTX.	60

CAPÍTULO IV: NANOMATERIALES

Figura IV. 1. Espectro UV-Vis de NEsAu estabilizadas con citrato.	63
Figura IV. 2. Micrografías TEM e histograma de tamaño de NEsAu estabilizadas en citrato.	64
Figura IV. 3. Espectros UV-Vis de a) CI con NEsAu, b) sobrenadante de la centrifugación.	66
Figura IV. 4. Espectro ^1H -RMN del CI y del CI conjugado a NEsAu.	67
Figura IV. 5. a) Difractograma del CI y de las CI conjugadas a las NEsAu, b) Región 2θ de los planos cristalográficos del oro.	68
Figura IV. 6. TGA y DSC de las NEsAu conjugadas al CI.	70
Figura IV. 7. Micrografías TEM e histograma de las NEsAu conjugadas al CI de α -CD/OA.	71
Figura IV. 8. Micrografías SEM a distintos aumentos de NEsAu conjugadas al CI de α -CD/OA.	71

Figura IV. 9. Espectro EDS de NEsAu conjugadas al cristal del CI de α -CD/OA.	72
Figura IV. 10. Espectro general XPS del CI de α -CD/OA.....	73
Figura IV. 11. Espectro general XPS de CI conjugado a las NEsAu.....	73
Figura IV. 12. Espectro XPS de alta resolución para las energías de unión de los electrones 1s del nitrógeno de la OA en el CI de α -CD/OA+NEsAu. Se muestra el espectro original y las curvas de ajuste.	74
Figura IV. 13. Espectros XPS de alta resolución para las energías de unión de los electrones 1s del oxígeno. a) α -CD/OA y b) α -CD/OA+NEsAu. Se muestra el espectro original junto con las curvas de ajuste.....	75
Figura IV. 14. Espectro UV-Vis de las NEsAu estabilizadas con citrato y de las NEsAu estabilizadas por MTX.	76
Figura IV. 15. Micrografías TEM e histograma de tamaño de MTX conjugado a NEsAu.	77
Figura IV. 16. Espectro UV-Vis del CI de MTX conjugado a las NEsAu.....	78
Figura IV. 17. TGA y DSC del CI conjugado a las NEsAu.	79
Figura IV. 18. Micrografías TEM e histograma de tamaño de NEsAu cubiertas por el CI de MTX.	79
Figura IV. 19. Micrografías SEM a) del cristal del CI conjugado a las NEsAu y de los precursores b) β -CD, c) MTX.....	80
Figura IV. 20. Espectro general XPS del CI de β -CD/MTX.	81
Figura IV. 21. Espectro general XPS de CI de β -CD/MTX conjugado a las NEsAu.....	82
Figura IV. 22. Espectros XPS de alta resolución para las energías de unión de los electrones 1s del nitrógeno. a) β -CD/MTX y b) β -CD/MTX+NEsAu. Se observa el espectro original junto con las curvas de ajuste.....	83
Figura IV. 23. Espectros XPS de alta resolución para las energías de unión de los electrones 1s del oxígeno. a) β -CD/MTX y b) β -CD/MTX+NEsAu. Se observa el espectro original junto con las curvas de ajuste.....	84
Figura IV. 24. Imagen de electroforesis en gel en 1D de agarosa al 1%, cargado con 20 μ g de muestra. a) NEsAu+CI, b) NEsAu+MTX, c) NEsAu.....	85
Figura IV. 25. Espectros de absorbancia de NEsAu obtenidas sobre los cristales del CI, registrados a diferentes tiempos de exposición al sputtering.	86

Figura IV. 26. Micrografía TEM e histograma del CI con NEsAu obtenidas luego de 30 s de exposición al sputtering.....	87
Figura IV. 27. Espectro de absorbancia de las NbsAu.....	89
Figura IV. 28. Micrografías TEM e histograma de relación de aspecto de NbsAu.....	89
Figura IV. 29. Espectro de absorbancia de NbsAu estabilizadas en CTAB y de NbsAu conjugadas al CI.	90
Figura IV. 30. Espectro RMN del CI y del CI conjugado a NbsAu en DMSO _{d6}	91
Figura IV. 31. a) Difractograma del CI y el CI conjugado a las NbsAu, b) región 2θ de los planos cristalográficos del oro.	93
Figura IV. 32. DSC y TGA del CI conjugado a las NbsAu.....	95
Figura IV. 33. Micrografías TEM e histograma de las NbsAu conjugadas al CI.	95
Figura IV. 34. Micrografías SEM de las NbsAu unidas al CI de α-CD/OA a distintos aumentos.....	96
Figura IV. 35. Espectro EDS del fragmento seleccionado de la micrografía SEM de NbsAu unidas al CI de α-CD/OA.	97
Figura IV. 36. Espectro de absorción de las NbsAu y de las NbsAu conjugadas al CI de β-CD/MTX.....	98
Figura IV. 37. Micrografías TEM e histograma de las NbsAu conjugadas al CI de β-CD/MTX.	99
Figura IV. 38. Micrografías SEM de NbsAu conjugadas al CI de β-CD/MTX a diferentes aumentos.....	100

CAPÍTULO V: IRRADIACIÓN DEL COMPUESTO DE INCLUSIÓN CON OCTILAMINA

Figura V. 1. Espectros ¹ H-RMN del CI con NEsAu a medida que se aumenta la temperatura.	102
Figura V. 2. Espectros ¹ H-RMN del CI conjugado a NbsAu a medida que se aumenta la temperatura.	106
Figura V. 3. Esquema general de la activación de la superficie de un vidrio.	109
Figura V. 4. Representación esquemática de las etapas de funcionalización del vidrio.	110
Figura V. 5. Micrografías del vidrio derivatizado con (3-aminopropyl)-trimetoxysilano, por; a) AFM en modo altura y b) AFM modo fuerza y error.	110
Figura V. 6. Micrografía AFM a) en modo altura y b) en modo fuerza y error del vidrio funcionalizado con NEsAu. c) Histograma de altura de las partículas en la micrografía.	111

Figura V. 7. a) Micrografía AFM en modo altura de las NEsAu, b) detalle de altura y diámetro de dos NEsAu analizadas.....	112
Figura V. 8. Ilustración del efecto de convolución de la punta de AFM y de la imagen que aparece en la micrografía (rojo).	113
Figura V. 9. Micrografía AFM a) en modo altura y b) en modo fuerza y error del vidrio funcionalizado con NEsAu. c) Histograma de altura de las partículas en la micrografía.	114
Figura V. 10. Representación esquemática del monitoreo por AFM del vidrio funcionalizado y conjugado al Cl, mientras es irradiado con el láser verde.....	115
Figura V. 11. a) Micrografías AFM de altura, b) micrografías AFM modo fuerza y error y c) histogramas de altura del vidrio funcionalizado con NEsAu conjugadas al Cl, inicialmente (izquierda) y luego de 6 h de irradiación (derecha).....	116
Figura V. 12. a) Micrografías AFM de altura, b) micrografías AFM modo fuerza y error y c) histogramas de altura del vidrio funcionalizado con NEsAu conjugadas al Cl y con una gota de agua en la superficie, inicialmente (izquierda) y luego de 6 h (derecha).	118
Figura V. 13. Espectro de absorción del vidrio en cada etapa de la funcionalización.	120
Figura V. 14. Espectro Raman y asignación de señales características del vidrio funcionalizado con NEsAu cubiertas por el Cl, luego de ser irradiado durante del vidrio funcionalizado con NEsAu cubiertas por el Cl, luego de ser irradiado durante 6 h.	121
Figura V. 15. Espectros de masa intervalo m/z 0-200 (matriz DHB). La muestra 1 corresponde a α -CD, la muestra 2 al Cl de α -CD/OA y la muestra 3 al conjunto de gotas recolectadas de la superficie del vidrio irradiado.	122
Figura V. 16. Espectros de masa intervalo m/z 700-2500 (matriz DHB). La muestra 1 corresponde a α -CD, la muestra 2 al Cl de α -CD/OA y la muestra 3 al conjunto de gotas recolectadas de la superficie del vidrio irradiado.	122
Figura V. 17. Representación esquemática de la separación del Cl de la superficie de las NEsAu producido por irradiación.	124

CAPÍTULO VI: CITOTÓXICIDAD

Figura VI. 1. Espectros de absorción de a) MTX, b) Cl, c) MTX+NP, d) Cl+NP y e) NEsAu, en PBS a tiempo cero, 2, 5, 24, 48 y 72 h.	127
Figura VI. 2. Ensayo de viabilidad MTS en células HeLa tratadas con MTX a distintas concentraciones.	128

Figura VI. 3. Ensayo de viabilidad en células HeLa tratadas con el CI a distintas concentraciones.....	129
Figura VI. 4. Comparación de los porcentajes de viabilidad de células HeLa a distintas concentraciones de MTX y de CI (n = 3).....	130
Figura VI. 5. Ensayo de viabilidad en células HeLa tratadas con NEsAu+CI y NEsAu+CI irradiadas durante 15 min, en concentraciones 1nM.....	132

ANEXOS

Figura A. 1. Comparación de los difractogramas de la α -CD, nativa y del CI α -CD/OA.....	143
Figura A. 2. Espectro COSY y asignación de los protones de la molécula.	146
Figura A. 3. Espectro RMN del CI y del CI conjugado a NEsAu.	147
Figura A. 4. a) Difractograma del CI y el CI conjugado a las NEsAu, b) región 2θ de los planos del oro.....	148
Figura A. 5. TGA y DSC de las NEsAu unidas al CI.	148
Figura A. 6. Espectros ^1H -RMN del CI conjugado a NEsAu obtenidas por el método de Turkevich a 27°C , inicialmente y posterior al calentamiento.....	149
Figura A. 7. Espectros ^1H -RMN de CI conjugado a NEsAu sin irradiar y luego de irradiar con tres condiciones distintas de potencia y tiempo.....	151

LISTA DE TABLAS

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla II. 1. Cantidades de cada reactivo para la preparación de CI con los rendimientos correspondientes.....	22
Tabla II. 2. Cantidad de reactivo utilizado en la preparación del CI con su rendimiento respectivo.	23
Tabla II. 3. Longitud de onda y absorbancia de plasmón obtenidos por espectrofotometría UV-Vis y masa entregada por AAN para NEsAu.....	30

CAPÍTULO III: COMPUESTOS DE INCLUSIÓN

Tabla III. 1. Valores de masa inicial y cantidad de agua perdida calculadas a partir de los termogramas.	45
Tabla III. 2. Temperatura de pérdida de agua y descomposición de los CIs.....	46
Tabla III. 3. Comparación de los desplazamientos químicos de los protones de la matriz en el CI respecto a la α -CD pura, ambos disueltos en DMSO- d_6	47
Tabla III. 4. Comparación de los desplazamientos químicos de los protones de la molécula de OA en el CI respecto de la molécula huésped pura, ambos disueltos en DMSO d_6	48
Tabla III. 5. Parámetros cristalográficos para la matriz de α -CD y para el CI.	50
Tabla III. 6. Comparación de los desplazamientos químicos de la β -CD en el CI y en la mezcla física.	54
Tabla III. 7. Masa inicial, cantidad y temperatura de pérdida de masa de agua durante el proceso térmico.....	59

CAPÍTULO IV: NANOMATERIALES

Tabla IV. 1. Longitud de onda del plasmón, absorbancia, masa, concentración de Au y coeficiente de extinción para tres síntesis de NEsAu.....	65
Tabla IV. 2. Desplazamientos químicos de los protones de la matriz en el CI y en el CI conjugado a NEsAu.	67
Tabla IV. 3. Desplazamientos químicos de los protones de la OA en el CI y en el CI con NEsAu.....	67
Tabla IV. 4. Parámetros cristalográficos para el CI y el CI conjugado a NEsAu.	69
Tabla IV. 5. Desplazamientos químicos de los protones de la matriz en el CI y en el CI conjugado a NbsAu.	92

Tabla IV. 6. Desplazamientos químicos de los protones de la OA en el CI y en el CI conjugado a NbsAu.	92
Tabla IV. 7. Desplazamientos químicos de los protones del CTAB, extraídos de la base de datos ¹	92
Tabla IV. 8. Tipo de sistema cristalino para el CI y el CI con NbsAu, grupo espacial y parámetros de red.....	94

CAPÍTULO V: IRRADIACIÓN DEL COMPUESTO DE INCLUSIÓN CON OCTILAMINA

Tabla V. 1. Desplazamientos químicos de α -CD en el CI conjugado con NEsAu a medida que se aumenta la temperatura.	103
Tabla V. 2. Desplazamientos químicos de OA pura y OA en el CI conjugado con NEsAu a diferentes temperaturas, ambas disueltas en DMSO-d ₆	104
Tabla V. 3. Desplazamientos químicos de α -CD en el CI conjugado con NEsAu a 27 °C de la muestra inicial y posterior a la secuencia de calentamiento a la misma temperatura.	105
Tabla V. 4. Desplazamientos químicos de OA en el CI conjugado con NEsAu a 27°C de la muestra inicial y posterior a la secuencia de calentamiento a la misma temperatura.	105
Tabla V. 5. Desplazamientos químicos de α -CD en el CI conjugado a las NbsAu a medida que se aumenta la temperatura.....	107
Tabla V. 6. Desplazamientos químicos de OA en el CI conjugado a las NbsAu a medida que se aumenta la temperatura.	107

CAPÍTULO VI: CITOTÓXICIDAD

Tabla VI. 1. Valores de IC ₅₀ de MTX y del CI, en la línea celular HeLa.	131
---	-----

ANEXOS

Tabla A. 1. Datos cristalográficos e indexaciones	143
Tabla A. 2. Comparación de los desplazamientos químicos del MTX liofilizado con Manitol, el purificado y el reportado. Integración de las señales.	145
Tabla A. 3. Comparación de los desplazamientos químicos del MTX en el CI y en la mezcla física.....	146
Tabla A. 4. Desplazamientos químicos de los protones de la matriz en el CI conjugado a las NEsAu.....	147
Tabla A. 5. Desplazamientos químicos de los protones de la OA en el CI conjugado a las NEsAu.	147

Tabla A. 6. Tipo de sistema cristalino para el CI y el CI con NEsAu, grupo espacial y parámetros de red.	148
Tabla A. 7. Condiciones de potencia y tiempo de irradiación de la muestra.	150
Tabla A. 8. Desplazamientos químicos de a) OA y b) de la matriz de CD en el CI conjugado a las NEsAu.	151
Tabla A. 9. Datos del tiempo de irradiación y temperatura que alcanza la solución a) concentración inicial y b) luego de concentrar al doble la muestra.	152

LISTA DE ABREVIATURAS O NOMENCLATURA

CI	Compuesto de inclusión
CD	Ciclodextrina
α -CD	α -ciclodextrina
β -CD	β -ciclodextrina
OA	Octilamina
DA	Decilamina
DDA	Dodecilamina
OT	Octanotiol
DT	Decanotiol
DDT	Dodecanotiol
MTX	Metrotrexato
NPs	Nanopartículas
NPsM	Nanopartículas metálicas
NEsM	Nanoesferas metálicas
NEsAu	Nanoesferas de oro
Nbs	Nanobarras
NbsAu	Nanobarras de oro
Au	Oro
HAuCl ₄	Ácido tetracloroaúrico
Qco	Químico
Fis	Físico
¹ H-RMN	Resonancia magnética nuclear
ROESY	Espectroscopía Overhauser de marco rotatorio
COSY	Espectroscopía de Correlación
DRXP	Difracción de rayos X de polvo
TGA	Análisis Termogravimétrico
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
TEM	Microscopía electrónica de transmisión

SEM	Microscopía electrónica de barrido
DLS	Dispersión dinámica de la luz
AAN	Análisis de activación neutrónica
AFM	Microscopía de fuerza atómica
XPS	Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X
MALDI-TOF	Espectrometría de Masas de desorción/ionización láser
EDS	Microanálisis por energía dispersiva de rayosX
TMS	Tetrametilsilano
DMSO-d ₆	Dimetilsulfoxido deuterado
BaSO ₄	Sulfato de bario
RPS	Resonancia de plasmón superficial
TMSO	Tetrametilsilano
nm	nanómetro
PBS	Buffer fosfato salino
TAE	tris-acetate-EDTA
APTMS	(3-aminopropyl)-trimetoxysilano
DHFR	Dihidrofolato reductasa
Ar	Argón
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
T°	Temperartura
IPD	Índice de polidispersidad
min	minutos
s	segundos
CGTasa	ciclodextrin glicosil transferasa

RESUMEN

Esta tesis doctoral consistió en el estudio de sistemas supramoleculares formados por compuestos de inclusión (CI) de ciclodextrina (CD) con diferentes tipos de moléculas huésped y con nanopartículas de oro (NPsAu). En una primera etapa se obtuvieron CI con alquiltioles y alquilaminas como sistemas modelo para la liberación controlada de fármacos. En una segunda etapa se trabajó específicamente con el fármaco antitumoral metotrexato (MTX) como molécula huésped, con el objetivo de aumentar su solubilidad y disminuir sus efectos tóxicos inherentes a su inespecificidad a células tumorales. La molécula de MTX al ser el antimetabolito del ácido fólico es reconocida por los receptores de folato que se encuentran sobre-expresados en diversas células. Se realizó también la conjugación de estos CI con NPsAu (esferas y barras) obtenidas por métodos físicos y químicos con el objetivo de obtener sistemas inteligentes de entrega de moléculas huésped, basándose en las propiedades ópticas que poseen las NPsAu. Específicamente, se estudió el efecto fototérmico de las nanoesferas de oro (NEsAu) sobre los CI. La irradiación de una muestra de CI, conjugada a NEsAu con un láser de longitud de onda sintonizable con el plasmón de superficie correspondiente, genera la disipación local de energía, que conlleva a la ruptura del CI y a la liberación controlada de la molécula huésped por efecto de la temperatura. Para estudiar este efecto, se ideó una estrategia de funcionalización de vidrios para soportar las muestras y detectar,

in situ, mediante un monitoreo por AFM, la separación del CI de la NEsAu por efecto de la temperatura. Por medio de la espectrometría de masas MALDI-TOF se confirmó el abandono de la molécula huésped de la cavidad de ciclodextrina. Finalmente, se evaluó la viabilidad celular mediante ensayos MTS de muestras de CI/MTX y de CI/MTX/NEsAu con y sin irradiación sobre células tumorales HeLa. De esta manera se concluyó que la inclusión del fármaco en la cavidad de ciclodextrina disminuye el efecto citotóxico en comparación de MTX libre, y que, la irradiación de las muestras genera la disminución de la viabilidad celular con respecto al control no irradiado. Esto se debe a que el calor plasmónico alcanza temperaturas suficientes para generar la ruptura del CI, liberando el MTX de las cavidades de la ciclodextrina. Estos resultados son relevantes de cara al desarrollo de una estrategia de liberación controlada espacial y temporalmente.

ABSTRACT

This doctoral thesis consisted in the study of supramolecular systems formed by inclusion compounds (IC) of cyclodextrin (CD) with different types of guest molecules and gold nanoparticles (NPsAu). In a first stage were obtained IC with alkylthiols and alkylamines as model systems for the controlled release of drugs. In a second stage were studied specifically IC with the methotrexate antitumor drug (MTX) as a guest molecule, with the aim of increasing its solubility and decreasing their inherent toxic effects in its unspecific for tumor cells. The MTX molecule, by being folic acid's anti metabolite, is recognized by folate receptors found over-expressed in different cells. There was also the conjugation of these IC with AuNPs (spheres and bars) obtained by chemical and physical methods in order to obtain intelligent delivery systems of the guest molecules, based on the optical properties of AuNPs. The gold's nanospheres photothermal effect over the IC was specifically studied. An IC's irradiation sample, conjugated to NEsAu, with a wavelength laser tunable to the corresponding surface plasmon, generates a local dissipation of energy, which leads to the rupture of the IC and the controlled release of the guest molecule by the temperature's effect. To study this effect, a glasses functionalization strategy was devised to support samples and to detect in situ, by an AFM monitoring, the separation of the IC from the NEsAu by an effect of temperature. Through MALDI-TOF mass spectrometry it's confirmed the abandonment of the guest molecule from Cyclodextrin's cavity. Finally, cell viability was evaluated by MTS tests of

IC/MTX and IC/MTX/NEsAu samples, with and without radiation, on HeLa tumor cells. Thus, it was concluded that the inclusion of the drug into Cyclodextrin's cavity decreases the cytotoxic effect compared to free MTX, and, that the irradiation of samples generates the decrease in cell viability relative to the non-irradiated control. This is due to that plasmonic heat reaches enough temperature to generate the rupture of the IC, liberating the MTX from Cyclodextrin's cavities. These results are relevant towards the development of a spatially and temporally controlled liberation strategy.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

I.1 Nanotecnología y Nanociencia

La nanotecnología se puede definir como el estudio y desarrollo tecnológico a niveles atómicos, moleculares y macromoleculares, en la escala de 1 a 100 nm. Las propiedades de los materiales a estos niveles de tamaño pueden variar radicalmente respecto a las del mismo material a escala macroscópica. Dos factores influyen principalmente en las propiedades químicas y físicas de los nanomateriales: a) El incremento de la razón entre el área superficial y el volumen y b) El predominio de los efectos cuánticos, debido al tamaño de las partículas.

Mediante el control de tamaño, es posible controlar algunas de las características fundamentales de los materiales como, la temperatura de fundido, las propiedades magnéticas, su capacidad de carga eléctrica y su color [1]. Debido a sus características especiales y a su tamaño los nanomateriales son ideales para ser empleados en la preparación de materiales catalíticos, portadores de fármacos y para el almacenamiento de energía. Un ejemplo de ello son las nanopartículas metálicas (NPsM) que exhiben especiales propiedades físicas, químicas y biológicas [1]. Especial interés han presentado las nanopartículas de oro (NPsAu) que poseen un extraordinario potencial como agentes fototérmicos en el tratamiento del cáncer, así como para la elaboración de nanoestructuras útiles para el transporte y la vectorización selectiva de fármacos y moléculas terapéuticas [2]. Destacan además, sus aplicaciones en la elaboración de "sistemas transportadores inteligentes" que permiten controlar en el espacio y en el tiempo, la liberación del compuesto terapéutico asociado, desencadenado por un estímulo interno como, variaciones de pH o por estímulo externo, como la luz [3], [4].

I.2 Efecto plasmónico, absorción y disipación de la energía y aplicaciones en biomedicina

La capacidad de las NPsAu de absorber y disipar la energía de manera local proviene de las oscilaciones resonantes de sus electrones libres que se encuentran dentro de la banda de conducción (Figura I.1), produciéndose una oscilación en fase, cuando el tamaño de las NPsAu es inferior a la longitud de onda de la radiación incidente ($2R \ll \lambda$, donde R es el radio de la partícula y λ es la longitud de onda de la luz), este fenómeno es conocido como resonancia del plasmón superficial (RPS), y es el responsable del color de las suspensiones coloidales [5], [6].

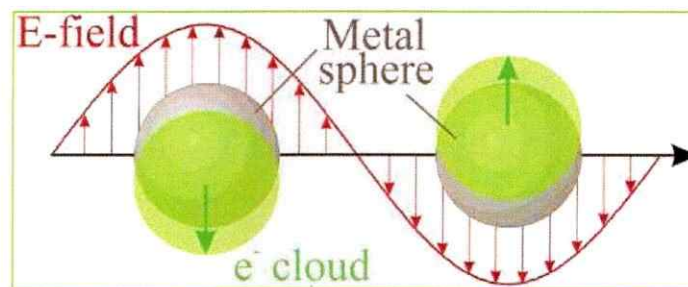


Figura I. 1. Representación de la oscilación en fase de los electrones de la banda de conducción debido a su interacción con un campo electromagnético [5].

En 1908, el físico alemán Gustav Mie explicó, por primera vez, el color de los coloides de oro, mediante la resolución analítica de las ecuaciones de Maxwell para una onda electromagnética que interactúa con una esfera metálica pequeña. De esta manera, se crea una oscilación dipolar de electrones con una cierta frecuencia, lo que resulta en una longitud de onda específica de resonancia. La sección transversal de absorción puede ser expresada como:

$$C_{ext} = \frac{24\pi^2 R^3 \epsilon_m^{3/2}}{\lambda} \frac{\epsilon''}{(\epsilon' + 2\epsilon_m)^2 + \epsilon''^2}$$

Donde ϵ_m y $\epsilon = \epsilon'(\lambda) + i\epsilon''(\lambda)$ son las constantes dieléctricas del medio circundante y de la nanopartícula, respectivamente. De la ecuación se predice un máximo de absorción cuando $\epsilon = -2\epsilon_m$ debido al dipolo de plasma de resonancia de las esferas [6].

De esta manera se tiene una estrecha relación entre la longitud de onda de máxima absorción y el tamaño de la nanopartícula [7], figura 1.2. Para NEsAu de alrededor de 10 nm, se obtiene un máximo de absorción característico de 520 nm, banda que varía a mayores longitudes de onda, al aumentar el diámetro de la nanoesfera [8].

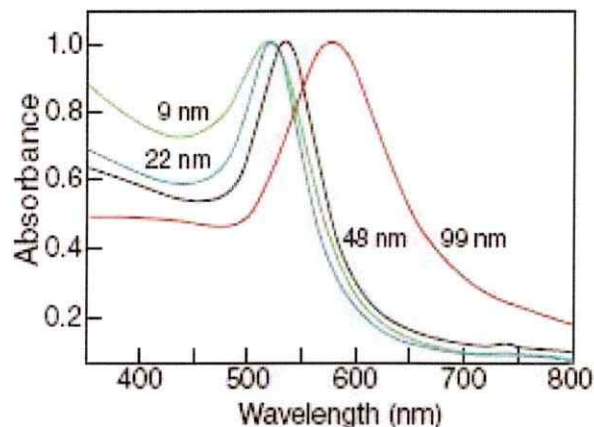


Figura 1. 2. Espectros de absorción UV-visible de soluciones de NEsAu de distintos diámetros [8].

Los nanomateriales absorben a una determinada y específica longitud de onda según el metal utilizado, el tamaño, la forma y el medio en el que se

encuentran, generando desplazamientos del máximo de absorción debido a cambios en el efecto RPS, figura I.3 [6], [9].

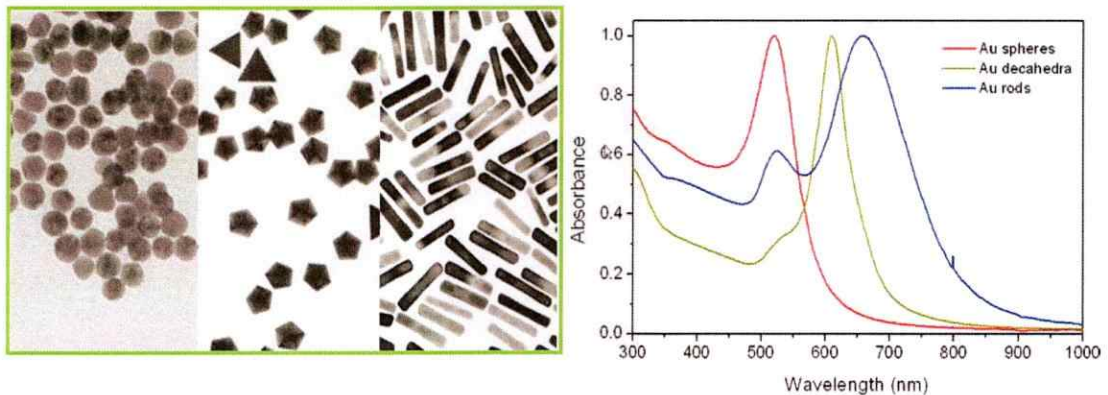


Figura I. 3. Micrografías TEM y espectro de absorción de nanopartículas de oro con distintas geometrías [10].

Las NEsAu poseen una banda plasmónica en la región visible, región en la cual también absorben los tejidos del organismo, por lo que no prestan gran utilidad cuando se requiere transferir energía a zonas profundas. La modificación de la forma y el tamaño desplaza los máximos de absorción a zonas cercanas al infrarrojo (IR) [11], zonas en la cual los tejidos son transparentes. Para conseguir esto, se utilizan nanopartículas que presenten una absorción a mayor longitud de onda, como por ejemplo nanobarras de oro (NbsAu). Las NbsAu se caracterizan por su relación de aspecto, determinado por la razón entre el largo y el ancho de la partícula [12].

Debido a las propiedades anteriormente mencionadas es que las NEsAu y las NbsAu han sido propuestas para su uso en terapia fototérmica y de imagen de células cancerígenas debido a los efectos de dispersión de la luz, figura I.4. Las NPs al ser irradiadas a una cierta longitud de onda cercana al RPS provocan la disipación local de energía que se puede utilizar para destruir células

cancerígenas sin dañar tejidos aledaños sanos [13]–[16]. Para dirigir selectivamente las NPsAu al sitio de acción, estas pueden ser funcionalizadas con biomoléculas. En este sentido diversas investigaciones se han realizado con NPsAu funcionalizadas, por ejemplo, ablación de agregados proteicos, y ablación fototérmica de tumores [16]. Asimismo, las NPsM han sido utilizadas para la entrega de fármacos mediante la aplicación de energía [3], [17].

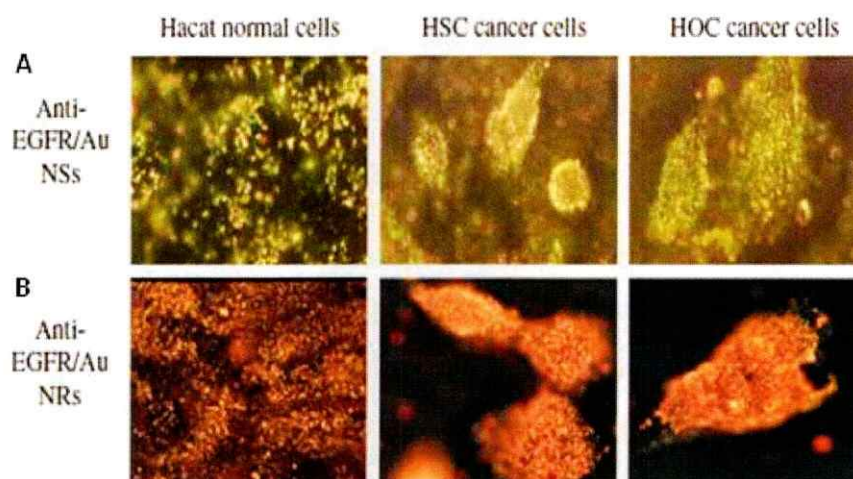


Figura I. 4. Detección de células tumorales usando imágenes de dispersión de luz de campo oscuro de (A) NEsAu. (B) NbsAu [16].

En la figura I.4 se observan las NPsAu conjugadas con el anticuerpo anti-EGFR (Epithelial growth factor), reunidas de forma organizada a las células cancerosas y distribuidas al azar alrededor de las células normales, lo que permite la diferenciación óptica y detección de las células cancerosas. Las NEsAu exhiben un color en verde debido a la RPS en la región visible y las NbsAu de color rojo debido a la RPS en la región cercana al IR [16].

La combinación de nanopartículas metálicas y biomoléculas es un tópico de atención en la actualidad, debido a las dimensiones comparables que poseen (escalas de longitud de 1 a 100 nm), lo que permite la interacción de las especies combinadas con estructuras biológicas pudiendo producir efectos a nivel local (nanométrico) en sistemas vivos [18], [19]. Las NPsM, pueden ser fácilmente funcionalizadas con una amplia gama de ligandos como, anticuerpos, polímeros, fármacos, entre otros, lo cual es de gran interés en el campo de la biomedicina especialmente en la entrega de fármacos

Para utilizar las NPsM en alguna aplicación biológica, es necesario que presenten un bajo nivel de toxicidad [20], [21]. En este sentido, es importante mencionar que la toxicidad depende del tamaño y de la forma de la NPsM, así como de los distintos agentes empleados para la estabilización y funcionalización, que le otorgan distintas características superficiales.

1.3 Nanopartículas metálicas y aplicaciones en tratamiento de cáncer.

Los tratamientos tradicionales empleados en la terapia del cáncer presentan grandes limitaciones principalmente relacionadas con la reducida especificidad de los agentes quimioterapéuticos por las células tumorales.

El uso de las nanopartículas permite orientar selectivamente y en principio, liberar de manera eficaz la dosis adecuada del fármaco citotóxico en el tumor o en la célula cancerígena. Esto se consigue a través de dos vías de vectorización, figura 1.5.

1. Vectorización pasiva: consiste en la acumulación de nanopartículas en el tejido tumoral debido a un fenómeno de mayor permeabilidad y retención a través de los poros de los vasos sanguíneos [22], [23].

2. Vectorización activa: consiste en conjugar a la nanopartícula una molécula capaz de reconocer específicamente y unirse a su diana terapéutica [24].

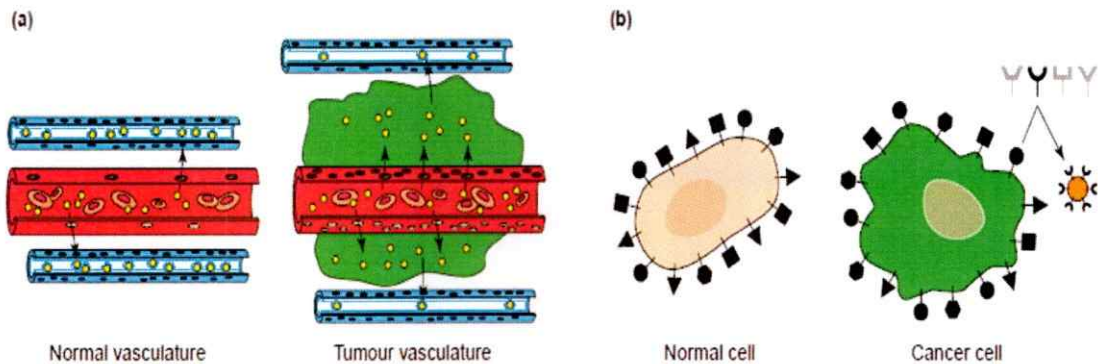


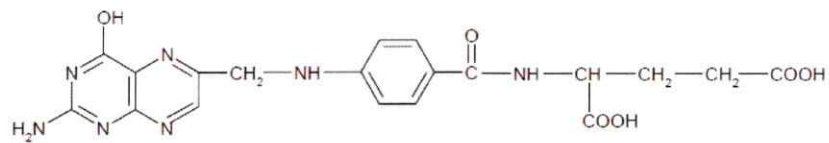
Figura I. 5. Imagen representativa de la vectorización pasiva y activa [4].

El desarrollo de un nanotransportador basado en NPsM que combine ambos mecanismos de vectorización se consideran como un transportador ideal.

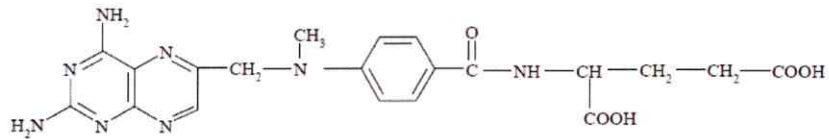
Por otra parte, las propiedades ópticas de las NPsAu ofrecen la posibilidad de ser activadas desde el exterior por una fuente electromagnética apropiada (laser de longitud de onda sintonizable con el plasmón), ofreciendo ventajas en el tratamiento del cáncer por dos posibles mecanismos: (a) efecto hipertérmico localizado de las NPsAu y; (b) liberación de un posible fármaco antitumoral conjugado a las NPsAu, como consecuencia de la irradiación [2], [24].

I.4 Agente antitumoral metotrexato

El antitumoral MTX es un compuesto formado por un anillo de pteridina, un residuo de p-aminobenzoico, unido a la pteridina por un puente metileno mediante enlace C9-N10 y por un residuo de ácido glutámico. La sustitución del 4-amino hidroxil por un grupo amino, resulta en un análogo al ácido fólico, considerado como antimetabolito [25], figura I.6.



Ácido fólico



Metotrexato

Figura I. 6. Estructura química de ácido fólico y metotrexato.

El fármaco MTX inhibe competitivamente la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) impidiendo, de esta manera, la formación de tetrahidrofolato, necesario para la síntesis de purinas y pirimidinas esenciales para la obtención de ADN y ARN, figura I.7. Por lo tanto, MTX se considera como un antifolato que es reconocido a través del anillo de pteridina por los receptores de folato que se encuentran sobreexpresados en las superficies de diversas células [26].

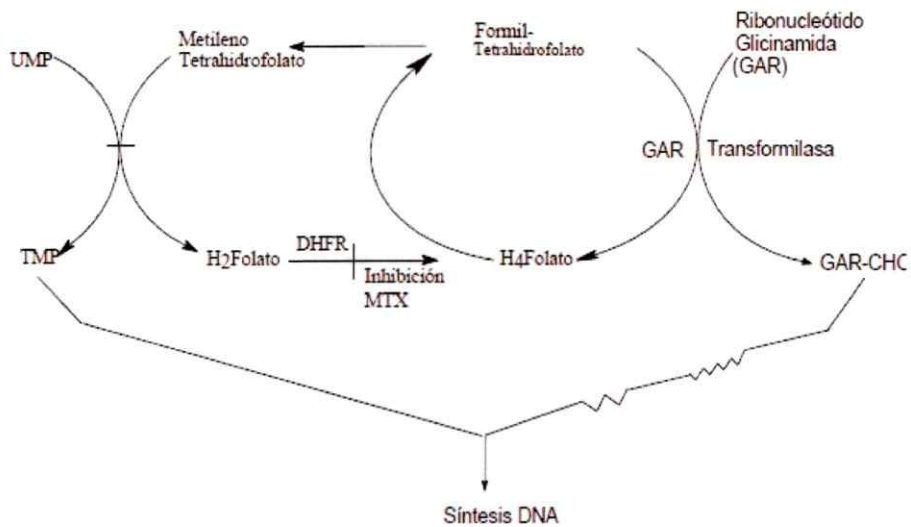


Figura I. 7. Diagrama del mecanismo de acción de MTX.

Se ha demostrado actividad antineoplásica efectiva en el tratamiento de proliferación de desórdenes celulares tales como leucemia linfocítica, carcinoma de mama, lengua, faringe, tumores de vejiga, tumores de cerebro y neoplasmas cutáneos, entre otros.

Sin embargo MTX presenta varios efectos colaterales no deseados como irritación estomacal, náuseas, mareos, etc. Algunos de estos efectos son generados por las elevadas dosis necesarias para lograr efectividad lo que conlleva a riesgo de toxicidad. Tales efectos se relacionan con una poca selectividad en la distribución de MTX. Por lo cual desarrollar sistemas inteligentes para la entrega de fármacos es de gran relevancia para disminuir los efectos no deseados. Una de las estrategias es recubrir el MTX incluyéndolo dentro de una matriz, como por ejemplo de ciclodextrina, formando compuestos de inclusión, con el objetivo de aumentar la solubilidad del fármaco y evitar la interacción con los receptores de folato que se encuentran en células no

tumorales [26], [27]. De esta manera si se pudiese lograr la liberación de MTX en el tumor se podría obtener una mayor selectividad de la acción.

I.5 Compuestos de inclusión de ciclodextrinas como agentes para entrega de fármacos

En 1891 Villiers reportó por primera vez el aislamiento de una sustancia conocida como ciclodextrina (CD). Este compuesto se obtuvo a partir de la degradación enzimática de almidón con la enzima ciclodextrin glicosil transferasa (CGTasa) del *Bacillus macerans*. Las CDs pertenecen a la familia de los oligosacáridos cíclicos constituidos por n unidades de D-glucopiranosas unidas por enlaces (1-4) glucosídicos. Las más conocidas son las α , β y γ -CDs que presentan 6, 7 y 8 unidades de D-glucopiranosas, respectivamente (Figura I.8), que dan lugar a una estructura molecular toroidal, rígida y con una cavidad interior de volumen específico. Su estructura es estable debido a la existencia de interacciones por puentes de hidrógeno entre unidades adyacentes. La cavidad de las CDs posee un carácter hidrofóbico y además una alta densidad electrónica, proporcionándole características de base de Lewis [28].

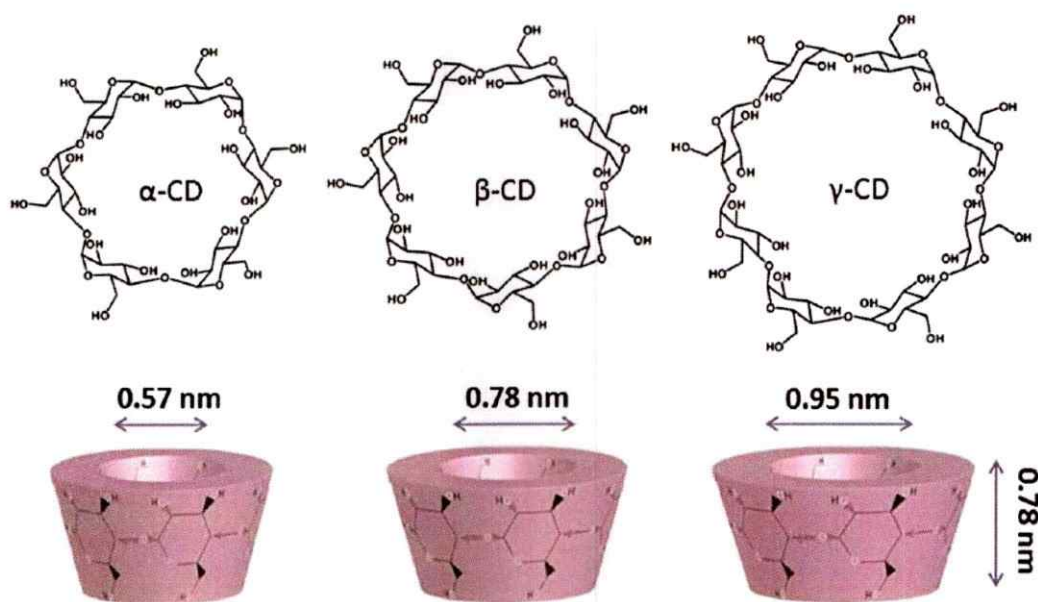


Figura I. 8. Estructura y dimensiones geométricas aproximadas de la α , β , y γ -CDs [29].

Las ciclodextrinas al poseer una cavidad intramolecular corresponden a matrices endoreceptoras, pudiendo formar compuestos de inclusión (CI) con diferentes moléculas huéspedes hidrofóbicas, como alquiltioles [30], [31], alquilaminas [32] y ácidos carboxílicos alifáticos monofuncionales [33], entre otras [34]. Según la estructura cristalina del complejo de inclusión formado con la CD, se describen como; *tipo canal*, donde las moléculas CDs se ordenan de manera alineada generando un canal en donde se incluyen las moléculas huésped, generalmente moléculas de cadena larga adoptan este tipo estructura. Estructuras *tipo jaula*, donde la cavidad de cada molécula de CD está bloqueada en ambos lados por CD adyacentes. En la estructuras *tipo capa* las capas adyacentes de CDs están corridas la mitad de una molécula. Como resultado de ello, ambos extremos de la cavidad están abiertos a espacios intramoleculares de las capas adyacente, figura I.9.

Las CDs son compuestos que presentan una relativa baja toxicidad siendo apropiadas para usos farmacéuticos [35].

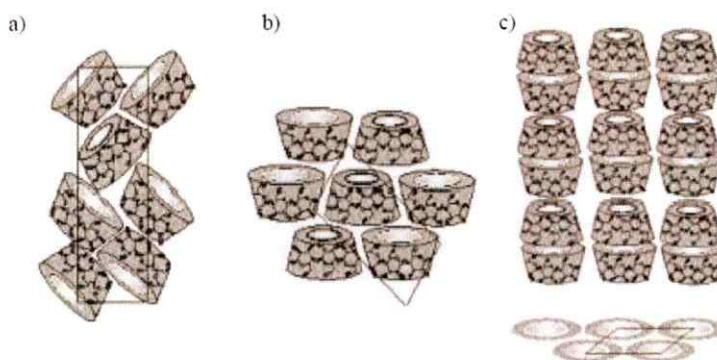


Figura I. 9. Esquemas de las distintas estructuras cristalinas en los complejos de inclusión con ciclodextrina: a) jaula; b) capa; c) canal [34].

I.6 Métodos de preparación de nanopartículas metálicas

Existen variados métodos de fabricación de nanopartículas los cuales se dividen en dos grupos, los “métodos químicos” y los “métodos físicos”. Entre los métodos químicos destaca la técnica de reducción química de sales metálicas en presencia de agentes estabilizadores. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada debido a la disponibilidad de los reactantes y el bajo costo comercial a escala de laboratorio. Por ejemplo, para la obtención de NEsAu se realiza la reducción de ácido tetracloroáurico $[\text{AuCl}_4]^-$ con citrato sódico, produciéndose una nucleación, crecimiento y aglomeración de los átomos metálicos. Un exceso de citrato de sodio produce una estabilización por carga del agregado formado obteniéndose el tamaño deseado de NEsAu [36].

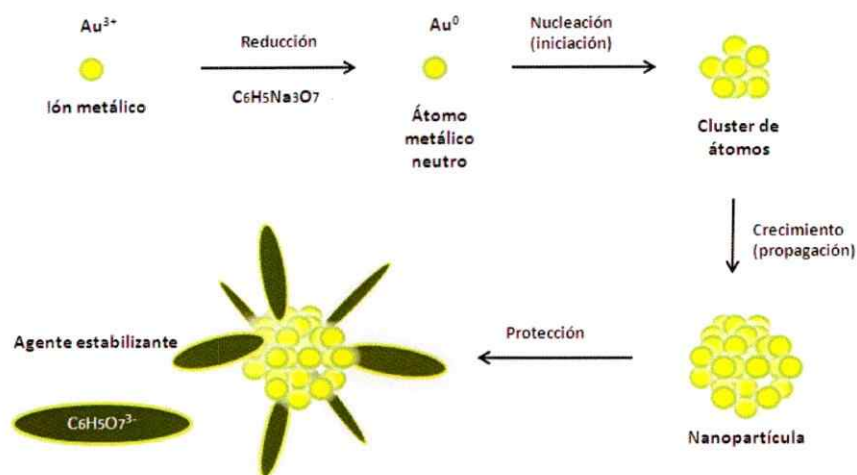


Figura I. 10. Representación esquemática del proceso de obtención de NEsAu vía reducción química de sales de metales de transición en presencia de agentes estabilizadores.

En cuanto a los métodos físicos destaca la técnica de deposición mediante pulverización catódica en alto vacío denominada *sputtering*, figura I.11 [37]. Esta técnica consiste en un diodo formado por dos electrodos inmersos en un gas inerte argón (Ar) a baja presión, al cual se le aplica un alto potencial, generando así una descarga eléctrica. Debido a la gran diferencia de potencial entre los dos electrodos, se produce la ionización del gas. Estos iones transfieren parte de su energía a los átomos de la superficie del material produciéndose una colisión en cascada. De esta manera, las múltiples colisiones provocan el desprendimiento de algunos átomos que adquieren la energía necesaria para abandonar la superficie y depositarse sobre el sustrato [31]. Esta técnica posee varias ventajas frente a otras, debido a la sencillez de su proceso, su versatilidad y economía, no existiendo contaminación por solventes o por moléculas precursoras.

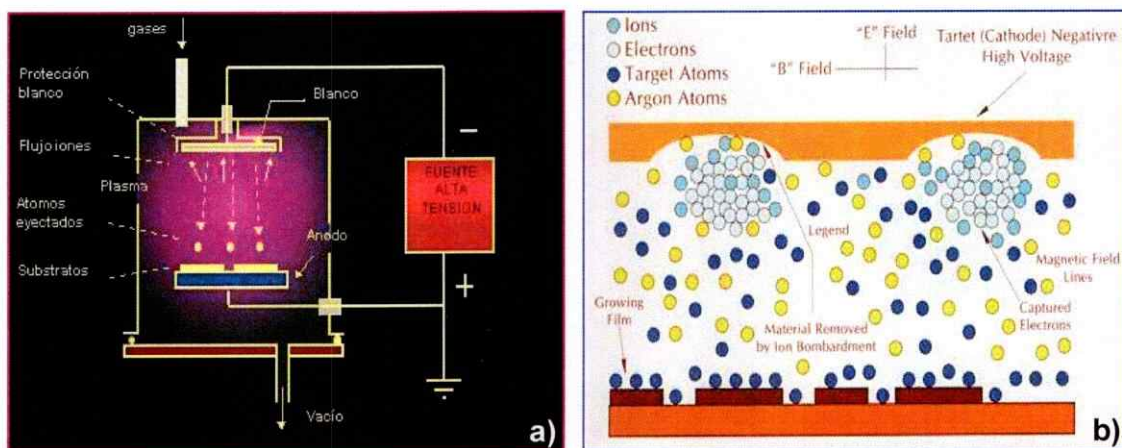


Figura I. 11. Representación esquemática de; a) equipo de desintegración catódica, b) proceso de pulverización catódica en alto vacío.

Otras técnicas para la síntesis de nanopartículas son, síntesis electroquímica, reducción del ligando y desplazamiento de compuestos organometálicos, descomposición térmica, fotoquímica o sonoquímica, depósito del metal en fase vapor [38].

1.7 Uso de compuestos de inclusión para la obtención de nanopartículas

En la última década se han reportado trabajos dirigidos a la utilización de CI de CD en estado cristalino como soporte e inmovilización de nanoesferas metálicas (NEsM), utilizando como moléculas huésped alquiltoles, alquilaminas y ácidos carboxílicos de cadena larga. En estos compuestos las moléculas huéspedes quedan incluidas en la CD exponiendo el grupo funcional hacia el exterior de las cavidades [30]–[32], otorgando un ambiente adecuado para la formación y crecimiento hetero-epitaxial de las NEsM, en la superficie de los cristales del CI, figura I.12.

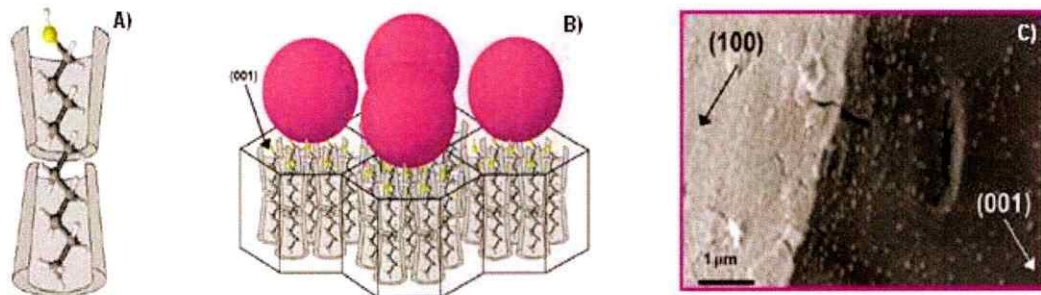


Figura I. 12. Representación esquemática de **A)** un compuesto de inclusión de α -ciclodextrina con decanotiol (α -CD/DT), **B)** de NEsM soportadas sobre el plano (001) de un cristal de CI. **C)** Micrografía SEM, mostrando el depósito selectivo de las NEsAu sobre el plano (001) del CI de CD [31].

Se ha informado que la interacción de las NEsAu y el grupo funcional $-SH$ del CI de α -CD con dodecanotiol (DDT) es de tipo covalente, lo cual ha sido demostrado mediante espectroscopía Raman, donde el modo vibracional de estiramiento de grupo S-H aparece a 2575 cm^{-1} , señal que prácticamente desaparece cuando interactúa con la NEsAu, figura I.13.

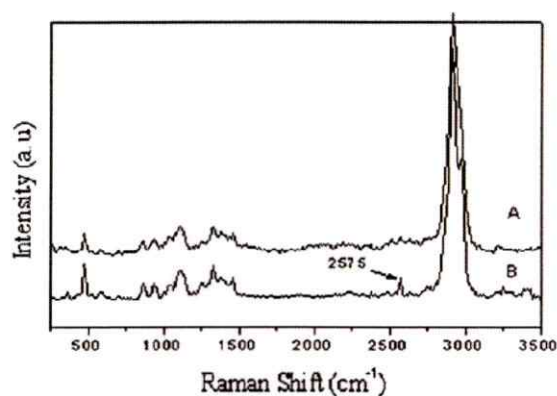


Figura I. 13. Espectro Raman de los compuestos; a) α -CD/DDT/NEsAu y b) α -CD/DDT [31].

Se ha reportado además, la obtención de nanoesferas de diversos metales, tales como Au, Cu, Ni, Ag, mediante la técnica de *sputtering*, figura I.14 A-B, técnica que permite obtener NEs con diámetros que van de los 10 a los 50 nm. El tamaño obtenido mediante esta técnica está en función del tiempo de exposición al proceso de pulverización catódica en alto vacío [31], [32].

Por otro lado, se ha reportado la adhesión selectiva de NEsAu, obtenidas por métodos químicos, a cristales de Cl [30], figura 14 C.

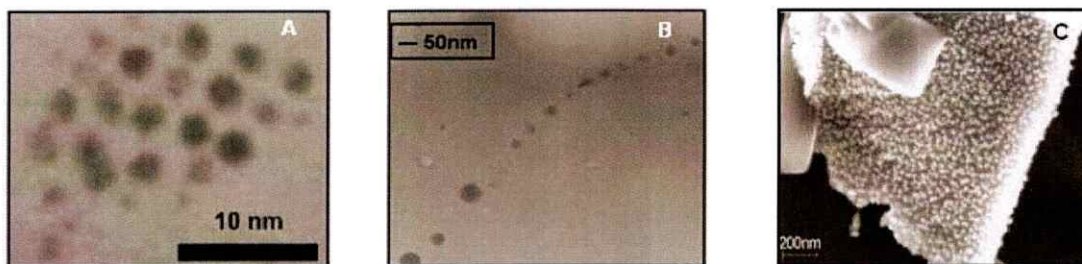


Figura I. 14. Micrografías TEM de NPs de; A) Au, B) Cu y C) Micrografía SEM de NEsAu [30]–[32].

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Dado que MTX forma compuestos de inclusión con las CD y que MTX es capaz de estabilizar NEsAu a través de sus grupos carboxilatos se plantea la siguiente hipótesis:

- Los grupos funcionales de la molécula MTX se ubicarán hacia el exterior de la CD matriz, permitiendo la conjugación con las nanopartículas.

Dado que el calentamiento del CI genera cambios en su estructura que puede conducir a la liberación del huésped, se plantea la siguiente hipótesis:

- Los CI CD-MTX unidos a nanopartículas absorberán radiación electromagnética que se disipará localmente produciendo cambios estructurales con posible salida de la molécula huésped.

Dado que el calentamiento local es dependiente del efecto plasmónico de la nanopartícula:

- La elección de la naturaleza, tamaño y geometría de la nanopartícula permitirán la obtención de un máximo de absorción plasmónico específico deseado, para la generación del efecto fototérmico.

OBJETIVOS

Objetivo general

En esta tesis se propone preparar y caracterizar complejos de inclusión de CD con MTX unidos a NEsAu y NbsAu. Se propone además, estudiar el efecto de la radiación visible (NEsAu) sobre las estructuras supramoleculares para determinar si existe liberación del huésped (NP-MTX).

Objetivos específicos

1. Sintetizar y caracterizar CIs de CDs con MTX y con alquiltioles y alquilaminas que serán utilizados como control.
2. Obtener y caracterizar NEsAu unidas a los sustratos supramoleculares.
3. Sintetizar y caracterizar NbsAu unidas a los sustratos supramoleculares.
4. Evaluar el efecto de la irradiación visible sobre las NEsAu unidas a los CIs.
5. Evaluar el efecto de la irradiación IR cercana sobre las NbsAu unidas a los CIs.
6. Evaluar los efecto sobre la viabilidad celular de los nanomateriales (NEsAu y NbsAu) unidos al CI de CD-MTX frente a células tumorales previo y posterior a la irradiación.

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 Materiales

II.1.1 Reactivos y solventes

Todos los reactivos y solventes están disponibles comercialmente y se utilizaron tal cual fueron recibidos. Excepto MTX, que fue donado por el laboratorio oncológico Kampar en su presentación terapéutica. Se dispuso así de una ampolla de 500 mg de MTX liofilizado con Manitol y NaOH, por lo que fue necesario realizar una separación de los excipientes antes de su utilización.

El liofilizado fue disuelto en 20 mL de agua Milli-Q, teniendo como antecedente que a pH básico (8) tanto Manitol como MTX son solubles. La solución se llevó a pH ácido, con HCl 0.1 M generando la precipitación del fármaco, debido a que a pH 4 éste es insoluble. Luego se procedió a separar por centrifugación a 4000 rpm lavándose 3 veces con agua Milli-Q, cerciorándose de la completa eliminación de Manitol en el precipitado [39].

II.2 Síntesis

II.2.1 Síntesis de compuestos de inclusión

II.2.1.1 Síntesis de compuestos de inclusión con alquilaminas y alquiltioles

Los compuestos fueron preparados utilizando métodos ya reportados [33]. A una solución acuosa saturada de α -ciclodextrina, se le agregó gota a gota la cantidad requerida de alquiltiol o alquilamina (en proporción 1:3), tabla II.1. Se dejó cristalizando hasta que se observó abundante precipitado. Por último se procedió a filtrar y secar al vacío.

Se estudiaron tres alquilaminas y tres alquiltioles preparando seis compuestos de inclusión:

1. α -ciclodextrina/octilamina (α -CD/OA)
2. α -ciclodextrina/decilamina (α -CD/DA)
3. α -ciclodextrina/dodecilamina (α -CD/DDA)
4. α -ciclodextrina/octanotiol (α -CD/OT)
5. α -ciclodextrina /decanotiol (α -CD/DT)
6. α -ciclodextrina/dodecanotiol (α -CD/DDT)

Tabla II. 1. Cantidades de cada reactivo para la preparación de CI con los rendimientos correspondientes.

CI	α -CD (mol)	Derivado alquilo (mol)	Derivado alquilo (μ L)	Rendimiento (%)
α -CD/OA	$5.140 \cdot 10^{-4}$	$1.542 \cdot 10^{-3}$	254.6	76.25
α -CD/DA	$5.140 \cdot 10^{-4}$	$1.542 \cdot 10^{-3}$	308.1	61.42
α -CD/DDA	$5.140 \cdot 10^{-4}$	$1.542 \cdot 10^{-3}$	230.4	60.18
α -CD/OT	$5.140 \cdot 10^{-4}$	$1.542 \cdot 10^{-3}$	267.0	93.03
α -CD/DT	$5.140 \cdot 10^{-4}$	$1.542 \cdot 10^{-3}$	319.6	57.88
α -CD/DDT	$5.140 \cdot 10^{-4}$	$1.542 \cdot 10^{-3}$	362.3	55.35

II.2.1.2 Síntesis del compuesto de inclusión de metotrexato

El CI β -CD/MTX se obtuvo siguiendo protocolos reportados, con algunas modificaciones [26], [27], . Específicamente se mezclaron cantidades equimolares de cristales de MTX y β -CD en agua con agitación continua y vigorosa durante 48 h. Se dejó cristalizar por 7 días. El sólido obtenido fue lavado con abundante agua y secado a 60 °C.

Tabla II. 2. Cantidad de reactivo utilizado en la preparación del CI con su rendimiento respectivo.

CI	β -CD (mol)	MTX (mol)	MTX (g)	Rendimiento (%)
β -CD/MTX	$4.405 \cdot 10^{-4}$	$4.405 \cdot 10^{-4}$	0.200	64.25

II.2.2 Síntesis de NEsAu mediante método químico

Todo el material utilizado fue lavado previamente con agua regia (3HCl:1HNO₃) durante 30 min y posteriormente enjuagado con abundante agua Milli-Q.

Para la obtención de las NEsAu se utilizó el método de Turkevich [36]. Para esto, 100 mL de una solución 1 mM de ácido tetracloroáurico (HAuCl₄) fueron calentados bajo agitación constante hasta reflujo, adicionando rápidamente 10 mL de una solución de citrato trisódico dihidratado (Na₃C₆H₅O₇) 38.8 mM mantenida previamente a 60°C. La solución se tornó de color negro la que transcurridos 3 min viró a color rojo intenso, lo que es indicativo de la formación de las NEsAu. Finalmente se procedió a ajustar el pH de la solución en el rango de 8 a 9, mediante la adición de NaOH, para luego ser almacenada a 4 °C.

II.2.3 Obtención de NEsAu mediante método físico

Se realizó el depósito de las NEsAu en la superficie del sustrato supramolecular mediante la técnica de pulverización catódica en alto vacío, denominada *sputtering*.

El equipo de *sputtering* consiste en una cámara que contiene dos electrodos en ambiente inerte, generalmente Ar, a una presión de 1×10^{-5} atm. Una corriente eléctrica de 20 mA y una diferencia de potencial generada entre los dos electrodos, produce la ionización del gas. Los iones generados transfieren parte

de su energía a los átomos de la superficie de la lámina metálica (cátodo) y las múltiples colisiones provocan el desprendimiento de algunos átomos que adquieren la energía necesaria para abandonar la superficie de la lámina metálica y depositarse finalmente sobre el sustrato [37].

Para la preparación de la NEsAu, 25 mg de polvo de Cl fueron esparcidos uniformemente sobre un portaobjeto de vidrio que fue ubicado en el ánodo de la cámara, y expuestos al *sputtering* equipado con una lámina de oro. Así las NEsAu fueron formadas mediante el depósito sucesivo de átomos de oro en la superficie de los cristales de los Cl, los cuales otorgan un ambiente adecuado para la formación y crecimiento hetero-epitaxial de las NEsAu.

II.2.4 Síntesis de NbsAu mediante método químico

Se realizó una síntesis mediada por núcleos descrita por Nikoobakht y colaboradores [40]. El primer paso consiste en la obtención de núcleos de oro de 5 nm de diámetro. En un vial se mezclaron 9.5 mL del surfactante bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) 0,1 M y 250 μ L de una solución de H_{AuCl}₄ 10 mM y se mantuvo en agitación constante. Luego se adicionó una solución fría del agente reductor borohidruro de sodio (NaBH₄) 0.01 M, observándose inmediatamente un cambio en la coloración de la solución de amarillo a pardo, y se mantuvo en agitación durante 30 min. Finalmente la solución de núcleos se dejó reposar durante 2 h.

La segunda etapa consiste en la preparación de la solución de crecimiento. En un vial bajo agitación magnética se adicionaron los reactivos en la siguiente secuencia; 75 μ L de AgNO₃ 0.01 M, 9.5 mL de CTAB 0.1 M, 500 μ L de H_{AuCl}₄ 0.01 M y 55 μ L del agente reductor ácido ascórbico 0.1 M. Un cambio en la coloración de la solución de amarillo a incoloro es indicativo de la reducción de la sal de oro en la solución.

Por último se adicionaron 250 μL de HCl 0.1 M y 12 μL de la solución de núcleos obtenida en la primera etapa de la síntesis. La solución resultante se dejó reaccionar por 10 min a 27 $^{\circ}\text{C}$, para posteriormente ser centrifugada a 13000 rpm durante 15 min. Finalmente el precipitado se separó del sobrenadante y se resuspendió en 4 mL de H_2O Milli-Q.

II.3 Conjugación de nanopartículas a los compuestos de inclusión

II.3.1 Conjugación de las NEsAu y NbsAu al CI de octilamina

Tanto las NEsAu como las NbsAu fueron conjugadas al compuesto de inclusión de octilamina usando el protocolo reportado para la unión de NEsAu a un compuesto de inclusión de octanotiol [30].

En un eppendorf se adicionaron 500 μL de la suspensión del nanomaterial, posteriormente 0.1 g del CI fueron inmersos en la solución coloidal y mantenidos bajo agitación durante 10 min. Luego la solución fue centrifugada a 5000 rpm durante 5 min separando el precipitado del sobrenadante. Para el caso de la solución NEsAu ésta fue lavada con 500 μL citrato trisódico 38.8 mM con el objetivo de eliminar el posible exceso de NEs no adheridas al CI. Finalmente los cristales de CI unidos a las NEsAu fueron secados al vacío.

II.3.2 Conjugación del CI de Metotrexato a NEsAu y NbsAu

Tanto las NEsAu como las NbsAu fueron unidas al compuesto de inclusión de MTX utilizando el mismo el protocolo de unión de NEsAu a MTX [41].

500 μL de NPsAu y 5 μL del CI/MTX 25 mM fueron adicionados a 500 μL de buffer fosfato salino (PBS) 20 mM, la solución fue agitada durante 24 h a

temperatura ambiente. Posteriormente la solución fue centrifugada a 12000 rpm por 20 min, el precipitado fue separado del sobrenadante y enjuagado con 1 mL de PBS 10 mM con el objetivo de eliminar el exceso de NPsAu o CI no enlazado. Finalmente el precipitado fue resuspendido en 1 mL de PBS 20 mM.

II.4 Caracterización de los compuestos de inclusión, nanopartículas y compuestos de inclusión conjugados a las nanopartículas.

II.4.1. Resonancia magnética nuclear en solución

II.4.1.1 Resonancia magnética nuclear de protones unidimensional

Las mediciones de resonancia magnética nuclear de protones unidimensional (^1H -RMN) se llevaron a cabo en un equipo Bruker Avance 400 MHz, utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y dimetil sulfóxido deuterado (DMSO-d_6) como solvente para todos los casos.

II.4.1.2 Resonancia magnética nuclear en solución bidimensional

II.4.1.2.1 Espectroscopía de correlación

Las mediciones de espectroscopía de correlación (2D-COSY) se llevaron a cabo en un equipo Varian Inova-500 (500 MHz) utilizando TMS como referencia interna y DMSO-d_6 como solvente.

II.4.1.2.2 Espectroscopía Overhauser de marco rotatorio

Las mediciones de espectroscopía Overhauser de marco rotatorio (2D-ROESY) se llevaron a cabo en un equipo Bruker Avance 400 MHz y Bruker DMX 500 MHz, utilizando TMS como referencia interna y DMSO-d_6 como solvente para todos experimentos. Las condiciones de las mediciones para estos espectros

fueron: ancho espectral 3000 Hz, tamaño de datos 16K/8K, retardo de relajación de 2 s y 32 s escaneos con un tiempo de mezcla de 400 ms.

II.4.2 Difracción de rayos X de polvo

Las mediciones de difracción de rayos X de muestras policristalinas (DRXP) fueron registradas en un difractómetro Siemens-Bruker modelo D 5000, equipado con ánodo de cobre ($\text{CuK}\alpha$, $\lambda = 1.54098 \text{ \AA}$) y un filtro de níquel. El equipo opera a 40 kV y 40 mA con un paso de $0.05^\circ/\text{s}$.

El rango de medida fue entre $2^\circ < 2\theta < 30^\circ$ para los compuestos de inclusión y entre $2^\circ < 2\theta < 50^\circ$ para CI con nanopartículas.

Para el refinamiento de datos experimentales se utilizó el programa SHELXS-97 (Sheldrick, 1997).

II.4.3 Análisis térmico

II.4.3.1 Análisis termogravimétrico

Los análisis termogravimétricos (TGA) fueron medidos en una termobalanza TGA-SDTA 851e/SF/1100 (Mettler Toledo).

Se pesaron entre 1.2 a 6.7 mg de cada muestra utilizando cápsulas de aluminio como portamuestras. Las mediciones se realizaron a una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, en un rango de temperatura de 25 a 400°C para los CI y de 25 y 250°C para los precursores. La masa de las muestras fue registrada de manera continua como función de la temperatura en atmósfera de nitrógeno.

II.4.3.2 Calorimetría diferencial de barrido

Los análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC) fueron medidos en un calorímetro diferencial de barrido: DSC-822e/400 y DSC-30 (Mettler Toledo).

Se pesaron entre 2.5 y 5 mg de cada muestra utilizando cápsulas de aluminio como portamuestras. Las mediciones se realizaron a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min en el rango de 25 a 200 °C con similar velocidad para el enfriamiento en el rango de 200 a 25 °C. Se midió el flujo de calor en función de la temperatura de la muestra en atmósfera de nitrógeno, utilizando como referencia una cápsula de aluminio vacía.

II.4.4 Espectrofotometría de absorción

Los espectros de muestras en solución fueron registrados en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo Lambda 25UV, empleándose cubetas plásticas de 1 cm de longitud.

Para las muestras sólidas los espectros se obtuvieron en un espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-3101 PC, utilizando portamuestras con sulfato de bario (BaSO₄) como línea base. Los resultados de reflectancia fueron transformados a absorbancia por medio de la ecuación de Kubelka-Munk.

II.4.5 Dispersión dinámica de la luz

Los espectros de las mediciones de dispersión dinámica de la luz (DLS) fueron medidos por triplicado para muestras 0.1 mM en un equipo Malvern Instrument Zetasizer Nano S90 utilizando cubetas plásticas de 1 cm como portamuestra.

II.4.6 Microscopía electrónica de transmisión

Las mediciones se llevaron a cabo en dos microscopios electrónicos de transmisión (TEM); JEOL JEM-1010 (utilizando una aceleración de electrones de 120 keV) y un TEM Zeis modelo EM-109 (50 keV).

Para muestras sólidas se prepararon suspensiones en etanol al 30 % depositando 20 μL sobre grillas de carbón con rejillas de cobre recubiertas de polímero *formvar*, dejándose secar por una hora. Las muestras líquidas fueron depositadas directamente sobre la grilla.

II.4.7 Microscopía electrónica de barrido y espectrometría de energía dispersiva

Las medidas en el microscopio electrónico de barrido (SEM) fueron realizadas en un HR-SEM (Strata DB235, FEI Company).

Para mediciones en bajo vacío las muestras fueron preparadas espolvoreando los sólidos sobre películas de carbono. Para mediciones en alto vacío las muestras fueron suspendidas en agua Milli-Q. Una gota de esta suspensión se depositó sobre una lámina de silicio dejando evaporar al aire.

Los análisis de espectrometría de energía dispersiva (EDS) fueron realizados en las mediciones a bajo vacío en una región limitada de mayor densidad de material.

II.4.8 Análisis de activación neutrónica

El análisis activación neutrónica (AAN) se utilizó para determinar la concentración de oro en las soluciones de NEsAu (obtenidas por el método de Turkevich) para posteriormente determinar su concentración y coeficiente de extinción.

El análisis se realizó por triplicado utilizando muestras provenientes de diferentes síntesis. Alícuotas de 200 μL de NEsAu liofilizadas en un papel aluminio se introdujeron en un reactor nuclear RECH-1 con un flujo de electrones de $2\text{-}4 \times 10^{13}$ neutrones $\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ por un tiempo de alrededor de 15-25 h, iniciando así la conversión de ^{197}Au a ^{198}Au . Luego de un tiempo de

decaimiento (6 a 9 días), los rayos γ emitidos por la muestra fueron contados y seleccionados por energías usando un detector de germanio acoplado a un espectrómetro de rayos γ multicanal. Los espectros γ fueron analizados con el *software* SAMPO90 Canberra en la Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN).

Los coeficientes de extinción son obtenidos a partir de la ley de Lambert - Beer, para lo cual es necesario conocer la concentración de NEsAu. Un ejemplo de cálculo de concentración es mostrado a continuación para la muestra N° 1 de NEsAu:

Tabla II. 3. Longitud de onda y absorbancia de plasmón obtenidos por espectrofotometría UV-Vis y masa entregada por AAN para NEsAu.

N° muestra	λ (nm)	Absorbancia (u.a.)	Mg de Au (200 μ L solución)
1	519	2.61	35.5

El número de átomos para NEsAu de 12 nm se calculará considerando que, según lo reportado, una NEsAu de 5 nm de diámetro posee alrededor de 3800 átomos de oro [42]. El volumen de una NEs se calcula utilizando la fórmula:

$$Volumen (nm^3) = \frac{4}{3} \pi r^3$$

Obteniéndose un volumen de 65.45 nm³ para NEsAu de 5 nm y 904.8 nm³ para las NEsAu de 12 nm (diámetro obtenido por TEM). El número de átomos de oro para NEsAu de 12 nm se calculó con la siguiente relación:

$$\frac{3800 \text{ átomos de oro}}{65.45 nm^3} = \frac{X}{904.8 nm^3}$$

Obteniendo un valor de 5.253×10^4 átomos de oro en una NEsAu de 12nm.

Luego se calculó el número de moles y átomos de oro para la masa obtenida por AAN, para una alícuota de 200.0 μL de solución coloidal de Au.

$$n(\mu\text{mol}) = \frac{\text{Masa } (\mu\text{g})}{\text{Peso molecular } \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)} = \frac{35.50}{197.9} = 0.1802\mu\text{mol}$$

$$\begin{aligned} \text{átomos de oro en la muestra} &= \frac{0.1802\mu\text{mol}}{1\mu\text{mol}} \times 1 \times 10^{-6} \times 6.022 \times 10^{23} \text{ átomos} = \\ &1.085 \times 10^{17} \text{ átomos de oro} \end{aligned}$$

En la muestra habían 1.085×10^{17} átomos de oro, y al dividir por el número de átomos de oro presentes en una NEsAu de 12 nm, se obtiene un valor de 2.066×10^{12} NEsAu en la muestra.

$$n \text{ de NEsAu } (\mu\text{mol}) = \frac{2.066 \times 10^{12} \text{ NEsAu}}{6.022 \times 10^{23} \times 1 \times 10^{-6}} = 3.430 \times 10^{-6} \mu\text{mol}$$

Por lo tanto habían 3.430×10^{-6} μmol de NEsAu en 200.0 μL de muestra liofilizada. La concentración de la muestra fue de 1.720×10^{-8} M (molNEs/L).

$$\text{Concentración } (\mu\text{M}) = \frac{3.430 \times 10^{-6} \mu\text{mol}}{200.0 \mu\text{L}} = 1.720 \times 10^{-8} \text{ M}$$

Por último se calculó el coeficiente de extinción utilizando la ley de Lambert.-Beer.

$$\begin{aligned} \text{Absorbancia} &= c \times l \times \epsilon \\ 2.61 &= 1.720 \times 10^{-8} \text{ M} \times 1 \text{ cm} \times \epsilon \end{aligned}$$

Obteniéndose un valor de $1.520 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

II.4.9 Microscopía fotoelectrónica de rayos X

Los espectros obtenidos de la microscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) fueron registrados en un espectrómetro fotoelectrónico Perkin Elmer Modelo 1257 equipado con una cámara de alto vacío. El espectrómetro se compone de un analizador de electrones hemisférico y una fuente de rayos X Al K α ($h\nu = 1486.6$ eV) no filtrada. Los espectros XPS fueron calibrados utilizando como referencia la energía de enlace de C 1s en 284.8 eV.

II.4.10 Electroforesis

Esta técnica se utilizó para determinar cualitativamente la carga de los compuestos, comparando la movilidad de cada muestra en presencia de un campo eléctrico.

Protocolo de electroforesis

Una solución *tampón de corrida* tris-acetato-EDTA (TAE) fue diluida (1X) a partir de una solución stock 50 X. Este tampón proporciona los iones necesarios para la migración de las NEsAu.

En paralelo se preparó el gel de agarosa al 1 %. Para ello, se pesó 1 g de agarosa y se disolvió en 100 mL de tampón TAE 1X. Posteriormente la solución fue vertida sobre un molde de sistema de electroforesis horizontal dejando reposar hasta su solidificación. Finalmente el gel fue depositado en la cámara de electroforesis y posteriormente cubierto con solución tampón TAE 1X.

Preparación de la muestra

Una alícuota de 1 mL de la muestra fue centrifugada a 10000 rpm por 20 min y el precipitado fue resuspendido en 40 μ L de sobrenadante.

En paralelo se preparó 1mL del *tampón de carga*, mezclando 700 μ L de glicerol con 300 μ L de TAE 1X.

Por último se mezclaron 20 μ L de la muestra con 10 μ L de *tampón de carga* y se procedió a cargar los bolsillos del gel de agarosa con la solución preparada.

Las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1 % por 10 min a 130 V.

II.5 Funcionalización de vidrios para estudio de irradiación

II.5.1 Funcionalización de vidrios con NEsAu

La funcionalización se realizó utilizando portamuestras de vidrio de 1 mm de grosor los que fueron cortados en dimensiones aproximadas de 1 x 1 cm. El proceso de funcionalización constó de tres pasos:

- 1) Activación: Los vidrios fueron sumergidos por 10 min en una cápsula de Petri que contenía la solución pirafña ($4\text{H}_2\text{SO}_4 : 1\text{H}_2\text{O}_2$). Posteriormente fueron lavados con metanol de grado espectrofotométrico y almacenados en el mismo solvente.
- 2) Derivatización: Los vidrios fueron sumergidos durante 24 h en una capsula de Petri que contenía (3-aminopropyl)-trimetoxysilano (APTMS) (1APTMS:4Metanol). Posteriormente los vidrios fueron lavados con abundante metanol para eliminar el monómero no unido a la superficie y fueron almacenados en el mismo solvente.
- 3) Incubación con las NEsAu: Los vidrios fueron lavados con abundante agua y posteriormente sumergidos en una cápsula de Petri que contenía la solución de NEsAu durante 24 h y almacenados en agua.

II.5.2 Conjugación de los vidrios funcionalizados con los Cls

Los vidrios funcionalizados con NEsAu fueron sumergidos por 24 h en una cápsula de Petri que contenía solución de Cls (Cl disuelto en DMSO),

cristalizando el Cl sobre las NEsAu. Finalmente se lavó con abundante agua para eliminar el exceso de Cl no adherido a las NEsAu.

II.5.3 Caracterización de vidrios funcionalizados

2.5.3.1 Espectrofotometría de reflectancia difusa UV-Vis

Por esta técnica se determinó el plasmón de las NEsAu funcionalizadas en el vidrio. El vidrio fue dispuesto directamente sobre el portamuestra que contenía BaSO₄ como referencia, utilizando como blanco un vidrio derivatizado con silano.

II.5.3.2 Microscopía electrónica de barrido

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido de alta resolución, HR-SEM (Strata DB235, FEI Company). Las imágenes fueron registradas en alto vacío, adhiriendo el vidrio a un film de carbono.

II.5.3.3 Microscopía de fuerza atómica

Las imágenes se tomaron en un Microscopio de fuerza atómica (AFM) Multimode con electrónica de control Nanoscope V (Bruker). Modo: Peak Force Tapping. Tip: NL (Bruker), de constante 0.35 N/m y radio de 8-10 nm.

La velocidad de la línea de escaneo fue optimizada entre 0.5 y 1 Hz con un número de pixeles de 512x512.

Preparación de la muestra: Una gota de agua fue depositada sobre el vidrio funcionalizado de tal manera que la superficie a escanear quedara completamente cubierta.

Las micrografías fueron registradas usando una celda de fluido, de manera continua durante 6 h, tiempo que tardó en evaporarse completamente la gota de

agua, obteniendo imágenes cada 15 min, tiempo que demoraba el equipo en llevar a cabo el escaneo de la muestra.

II.5.3.4 Espectroscopía Raman

Se utilizó un equipo micro-Raman Renishaw RM1000 con detectores CCD (Charge-Coupled Device) refrigerado por aire y equipado con un microscopio Leica LM/PM, usando una red de 1800 líneas/mm. La línea láser de excitación fue de 633 nm con una potencia aproximada de 2 mW. La señal fue calibrada teniendo como patrón la línea espectral a 520 cm^{-1} del silicio y un lente óptico con aumento de 50X. La resolución espectral fue de 4 cm^{-1} . Los espectros fueron registrados entre $200\text{ y }1800\text{ cm}^{-1}$.

II.5.3.5 Espectrometría de Masas de desorción/ionización láser

Las muestras fueron disueltas en agua a una concentración de 3 mg/mL. La adquisición de espectros de masas se realizó en un equipo de Espectrometría de Masas de desorción/ionización láser (MALDI-TOF) Microflex (Bruker Daltonics Inc., MA-USA) en modo ion positivo mediante detección por reflexión. Previo a la obtención de los espectros se realizó una calibración del equipo con un estándar externo correspondiente a una mezcla de péptidos de masas 1000-3000 Da (Bruker Daltonics Inc., MAUSA).

Para el control del espectrómetro se utilizó el programa flexControl 3.0 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania). Los espectros finales corresponden a la suma de 10 barridos de 30 impactos de láser (300 impactos de láser en total) aplicados en diferentes puntos tomados al azar para cada preparación depositada en la placa porta muestra.

Los espectros fueron obtenidos mezclando las muestras con la matriz ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB preparada a una concentración de 10 mg/mL en acetonitrilo/ácido fórmico 0.1 % v/v 1:2) en razón 1:1 depositando 2 μL de cada

mezcla en una placa porta muestra micro scout (Bruker Daltonics Inc., MA-USA).

Los análisis de los espectros de masas se realizaron por medio del programa flexAnalysis versión 2.2 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania). Para la detección de la señales m/z monoisotópicas se utilizó el algoritmo SNAP (sophisticated numerical annotation procedure) considerando una razón señal/ruido de 6. El análisis de aductos se realizó por medio de la herramienta MS Adduct Calculator (<http://fiehnlab.ucdavis.edu/staff/kind/Metabolomics/MSAdduct-Calculator>).

II.5.4 Irradiación de los vidrios funcionalizados

Para la irradiación se utilizó un láser verde de 532 nm y una potencia de 450 mW disponiendo de un sistema como se muestra en la figura II.1.

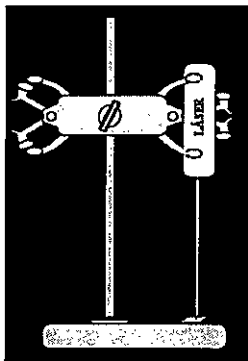


Figura II. 1. Esquema representativo del sistema utilizado en el proceso de irradiación de vidrios.

II.6 Evaluación del efecto del MTX y sus derivados sobre la viabilidad celular

La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTS, el cual se basa en la utilización de la sal de tetrazolium 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolium, que mide la actividad mitocondrial. Este metabolito amarillo es reducido una vez que ingresa a la célula viable, formando una especie denominada formazán (Figura II.2). La mayor cantidad de formazán, se produce en células que tienen mayor metabolismo mitocondrial, es decir, se puede relacionar la concentración de formazán con el número de células viables en el cultivo ensayado.

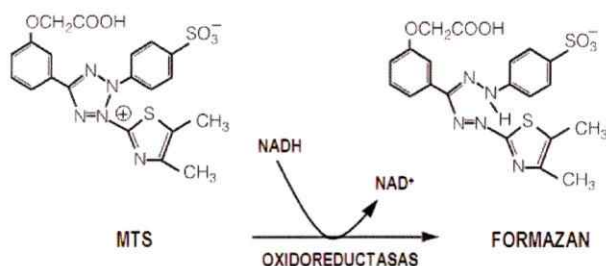


Figura II. 2. Reducción de MTS a Formazán por acción del metabolismo mitocondrial.

La citotoxicidad de los compuestos se evaluó en la línea celular HeLa (línea celular inmortalizada proveniente de células de cáncer cérvico-uterino). Se cultivó una población de 1×10^3 células por pocillo (placa de 96 pocillos) durante 24h.

Debido a la baja solubilidad que presenta MTX fue necesario disolver la muestra en una pequeña cantidad de DMSO procurando que la concentración final en la célula fuera del 1 %. Se adicionó PBS para diluir las muestras a la concentración deseada. El resto de las muestras fueron preparadas en PBS.

Una alícuota 20 μL de los compuestos a evaluar (MTX, CI y NEsAu+CI) fue añadida a las concentraciones deseadas, las soluciones se incubaron con las células a 37 °C durante 1 h. Luego se retiró el medio para ser sustituido por un medio fresco. Las células se dejaron incubando a 37 °C durante 72 h adicionales.

Finalmente, a cada pocillo se le retiró el medio y se sustituyó por 90 μL de medio fresco y 10 μL de MTS. Las placas se incubaron a 37 °C durante 2 h.

Transcurridas las 2 h, utilizando un espectrofluorímetro de placas, se determinó la concentración del producto colorimétrico formazán, el cual fue detectado a una longitud de onda (λ) de 490 nm, utilizando la λ 655 nm como referencia. El resultado corregido se entrega por la diferencia de la absorbancia medidas, $Abs_{\lambda 490\text{nm}} - Abs_{\lambda 655\text{nm}}$.

El ensayo de viabilidad de las muestras MTX y CI se realizó por triplicado en una placa y un triplicado de placa, obteniéndose un $n = 3$.

El ensayo de viabilidad de las muestras irradiadas (CI+NEsAu) se realizó por triplicado en una placa y un duplicado de placa, obteniéndose un $n = 2$.

Los datos obtenidos se ajustaron al control positivo referido como 100 % de viabilidad y se entregan según la desviación estándar, realizando un análisis estadístico de varianza vía ANOVA, con una corrección de Tukey y un nivel de significancia, $\alpha = 0.05$ (95 % intervalo de confianza). (ns, $p > 0.05$; $*p \leq 0.05$; $**P < 0.001$ y $p^{***} < 0.0001$).

Para la determinación de la concentración inhibitoria requerida, esto es, reducir a la mitad la viabilidad celular (IC50), se buscó la curva de mejor ajuste a las gráficas de MTX y de CI. Posteriormente se resolvió la ecuación para $y = 50$, (Donde x corresponde a la concentración nM e y al % de viabilidad)

Ecuaciones:

$$\text{MTX} \quad y = -55,111x + 105,38$$

$$\text{CI} \quad y = -6,4815x^2 - 10,079x + 106,4$$

II.6.1 Evaluación del efecto citotóxico frente a la irradiación del Cl conjugado a NEsAu

Para evaluar el efecto de las NEsAu+Cl irradiadas sobre la viabilidad celular se trabajó en condiciones similares a las descritas en el apartado anterior, realizando una pequeña modificación. Previo a la a la adición de la muestra a los pocillos, estas fueron irradiadas bajo campana en un sistema como el que se muestra en la figura II.1. Alícuotas de 30 μ L de cada muestra contenida en cubetas de plástico fueron irradiadas durante 15 min. En paralelo, alícuotas de 30 μ L de muestra contenidas en cubetas de plástico sin irradiar, fueron utilizadas como control. Posteriormente se siguió el protocolo descrito.

CAPÍTULO III: COMPUESTOS DE INCLUSIÓN

Para confirmar la formación de los CIs se utilizaron diferentes técnicas de caracterización y los resultados obtenidos fueron comparados con los reportados [43], [44]. Adicionalmente se realizó un estudio térmico de los CI con el objetivo de determinar cambios estructurales atribuidos a reordenamiento del sistema supramolecular dependientes de la temperatura.

III.1 Caracterización de los compuestos de inclusión con moléculas control

III.1.1 Análisis Térmicos

La calorimetría diferencial de barrido permitió identificar eventos térmicos asociados a fenómenos de migración del huésped, transiciones de fase y puntos de fusión. La ausencia de eventos térmicos es indicativa de una baja probabilidad de que el calor generado por la irradiación láser de las NEsAu o NbsAu (descrito posteriormente) provoque migración de la molécula huésped en el CI. En paralelo se realizó un análisis termogravimétrico identificando los intervalos en donde no existe descomposición ni pérdida de masa significativa de la muestra. Estos estudios permitieron seleccionar los CIs que poseen potencial efecto de migración de huésped por efecto de la irradiación.

La figura III.1 muestra el DSC de la α -CD. Se observan tres picos endotérmicos a 70.4, 103.7 y 166.2 °C asociados a pérdida de agua adsorbida en el cristal, a la pérdida de agua cristalina y a la salida de moléculas de agua presentes en la cavidad de la ciclodextrina. Estos picos endotérmicos no fueron observados en los CI de α -CD, figura III.2 y III.3.

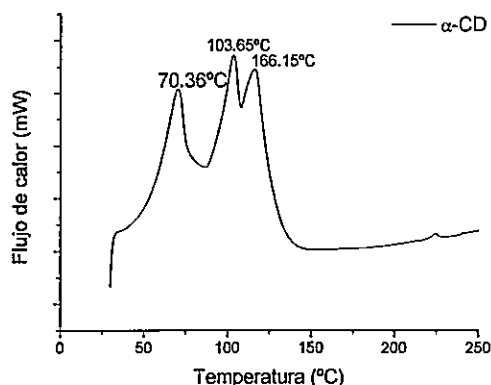


Figura III. 1. DSC de la α -CD.

Las figuras III.2 y III.3 muestran los DSC y TGA de los CIs de α -CD/alquilaminas y α -CD/alquiltioles respectivamente. Se observa ausencia de eventos térmicos entre 25 y 200 °C para todos los CIs a excepción del compuesto con OA que presenta un par de picos endotérmicos en 114 y 124 °C y exotérmicos en 119 y 130 °C. El TGA muestra ausencia de pérdida de masa asociada a los eventos térmicos, siendo atribuidos a cambios estructurales y/o conformacionales reversibles del CI.

Entre 25 y 115 °C, aproximadamente, los TGA muestran pérdida de masa entre un 4 y un 20 % correspondiente a la pérdida de humedad natural de los CIs, tabla III.1.

Se observa además que, a medida que aumenta el largo de la cadena alquílica de la molécula huésped, los CI presentan mayor cantidad de moléculas de agua en su estructura. Esto se explica considerando que existe una mayor distancia entre las moléculas de ciclodextrina que forman el dímero permitiendo albergar una mayor cantidad de moléculas de agua entre los canales.

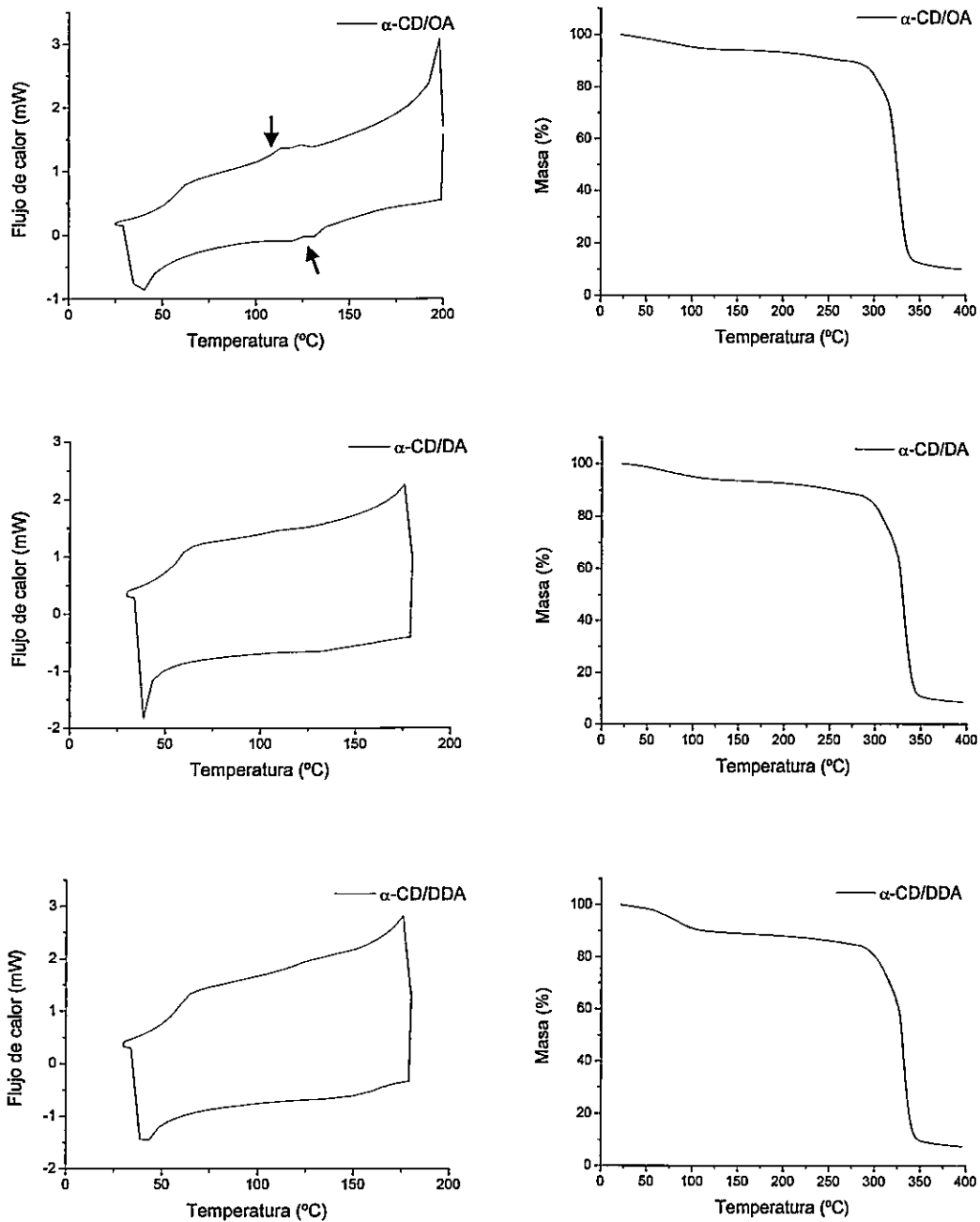


Figura III. 2. DSC y TGA de los CIs de α -CD/alquilaminas. Para el DSC del compuesto α -CD/OA los eventos térmicos son destacados con flechas.

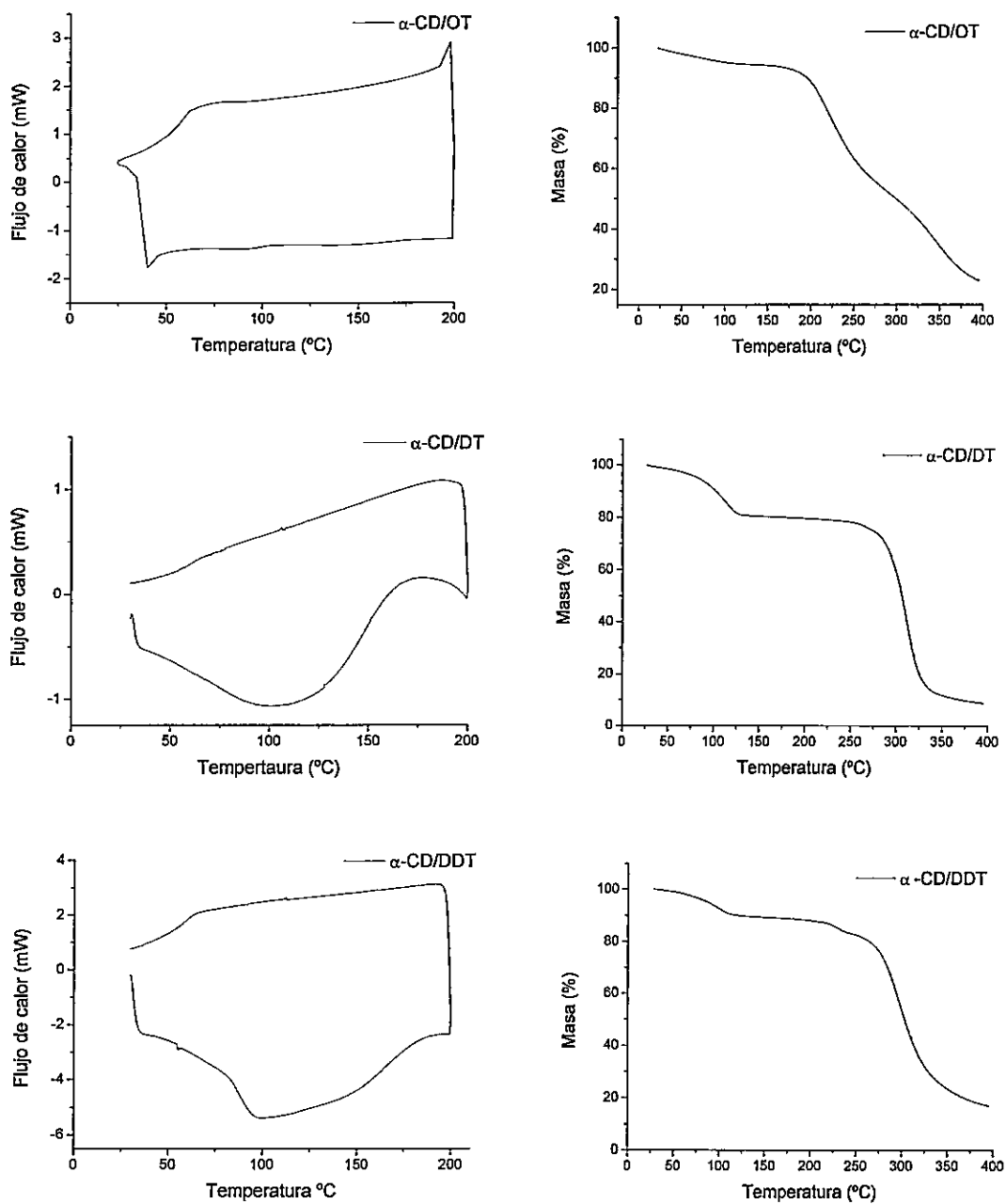


Figura III. 3. DSC y TGA de los CIs de α -CD/alquiltoles.

Tabla III. 1. Valores de masa inicial y cantidad de agua perdida calculadas a partir de los termogramas.

Muestra	Masa Inicial (mg)	Agua perdida (%)	Agua perdida (mg)	Nº moléculas de agua perdidas	Razón $\frac{\text{n}^\circ \text{moléculas de agua}}{\text{masa inicial}}$
α -CD	4.92	9.55	0.47	$1.55 \cdot 10^{19}$	$3.15 \cdot 10^{18}$
α -CD/OA	4.51	5.36	0.24	$8.09 \cdot 10^{18}$	$1.79 \cdot 10^{18}$
α -CD/DA	4.42	5.71	0.30	$8.44 \cdot 10^{18}$	$1.91 \cdot 10^{18}$
α -CD/DDA	4.13	10.1	0.40	$1.40 \cdot 10^{19}$	$3.39 \cdot 10^{18}$
α -CD/OT	4.51	4.99	0.23	$7.52 \cdot 10^{18}$	$1.67 \cdot 10^{18}$
α -CD/DT	4.05	19.2	0.80	$2.60 \cdot 10^{19}$	$6.42 \cdot 10^{18}$
α -CD/DDT	5.15	9.88	0.50	$1.70 \cdot 10^{19}$	$3.30 \cdot 10^{18}$

El análisis comparativo de los valores de temperaturas de descomposición presentados en la tabla III.2, revela que los CIs con alquilaminas descomponen a mayor temperatura que la α -CD pura y que los CI con alquiltioles son los sólidos que descomponen a menor temperatura de toda la serie. Esto puede ser explicado en función de la fortaleza de las interacciones intermoleculares presentes entre la matriz y el grupo funcional del huésped. La formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de la matriz y el grupo amino de la alquilamina huésped, se encuentra favorecida respecto de la interacción con los alquiltioles.

Tabla III. 2. Temperatura de pérdida de agua y descomposición de los CIs.

Muestra	Rango de T° de pérdida de agua (°C)	T° de descomposición (°C)
α -CD	25 - 126.9	278 ¹
α -CD/OA	25 - 113.2	289.8
α -CD/DA	25 - 114.2	293.4
α -CD/DDA	25 - 115.0	286.6
α -CD/OT	25 - 105.6	188.5
α -CD/DT	25 - 132.5	271.8
α -CD/DDT	25 - 117.4	261.6

De estos estudios se puede concluir que el CI de α -CD/OA es el único candidato que presenta variaciones estructurales dependientes de la temperatura, descartando los demás CIs. Se pudo determinar, además, la temperatura necesaria para generar potencialmente cambios estructurales mediante fototermia de nanopartículas.

III.1.2 Resonancia Magnética nuclear de protones

Para confirmar la formación del CI se compararon los desplazamientos químicos del CI de α -CD/OA con los del huésped y de la matriz aisladamente. Posteriormente se determinó la estequiometría del complejo.

¹ <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c4642?lang=es®ion=CL>

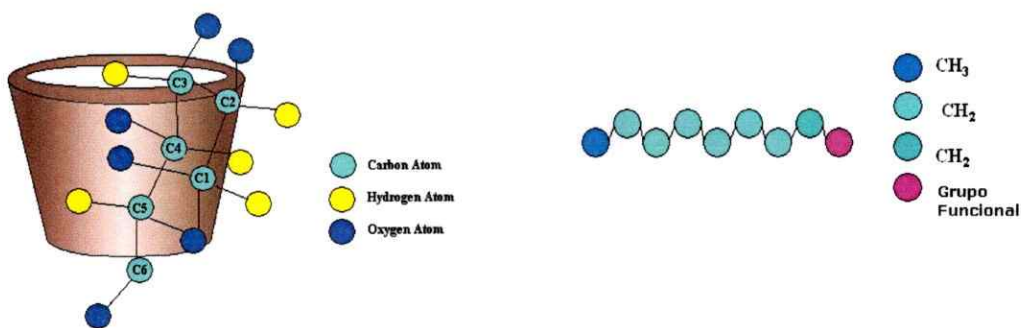


Figura III. 4. Representación esquemática y numeración de los protones de la matriz de α -CD y de la molécula de OA.

Tabla III. 3. Comparación de los desplazamientos químicos de los protones de la matriz en el CI respecto a la α -CD pura, ambos disueltos en DMSO- d_6 .

Matriz	H1 (ppm)	H2 (ppm)	H3 (ppm)	H4 (ppm)	H5 (ppm)	-OH(2) (ppm)	-OH(3) (ppm)	-OH(6) (ppm)
α -CD	4.80	3.28	3.79	3.37	3.61	5.47	5.41	4.44
α -CD/OA	4.78	3.28	3.77	3.38	3.59	5.49	5.49	4.47
$\Delta\delta$	0.02	0.00	0.02	-0.01	0.02	-0.02	-0.08	-0.03

La tabla III.3 muestra los desplazamientos químicos de la α -CD en el CI con OA, observándose desplazamientos de los protones internos H3 y H5 de la cavidad hacia campos mayores, respecto a la α -CD nativa. Esto se debe a un aumento en la densidad electrónica, generada por la presencia de la molécula huésped. Se observan además desplazamientos a campos menores de los grupos -OH2, -OH3 y OH6 los cuales pierden densidad electrónica al formar puentes de hidrogeno con la ciclodextrina adyacente que forma el dímero en el CI.

Tabla III. 4. Comparación de los desplazamientos químicos de los protones de la molécula de OA en el CI respecto de la molécula huésped pura, ambos disueltos en DMSO_{d6}.

Huésped	-CH ₃ (ppm)	-(CH ₂) _n - (ppm)	-CH ₂ - (ppm)
OA	0.89	1.30	1.37
α-CD/OA	0.85	1.24	1.33
Δδ	0.04	0.06	0.05

En la tabla III.4 se muestran comparativamente los desplazamientos químicos de los protones de la molécula huésped en el CI respecto a la molécula huésped sin incluir. Se observa un significativo desplazamiento hacia campos mayores en todos los protones, debido a la inclusión total de la molécula dentro de la cavidad de la matriz de ciclodextrina.

Además se logró determinar la estequiometría del CI. Para ello se tomó como referencia la integral de los protones -CH₃ terminales de la molécula huésped, que corresponden a la primera señal que aparece a campo alto, asignándole un valor de integral igual a tres, comparándola con los protones de la matriz que aparecen a campo bajo, considerando que por cada molécula de α-CD deben haber seis moléculas de glucopiranososa. El protón H1 de la matriz, (tomado como referencia) integra a 12, entregando una estequiometría de dos moléculas de α-CD por una de huésped.

III.1.3 Espectroscopía Overhauser de marco rotatorio

Por 2D-ROESY se determinó la geometría de la inclusión por medio de las interacciones que existen entre protones espacialmente vecinos.

En el espectro de la figura III.5 se muestra principalmente las interacciones del *bulk* y de los -CH₂ de la cadena alquílica del huésped con los protones H3 y

H5 de la α -CD que se encuentran hacia el interior de la cavidad, lo que confirma la inclusión dentro de la matriz. Además se observa la interacción del metilo terminal con el H6 que se encuentra hacia el exterior del lado más angosto del balde.

Estos resultados junto con los datos estequiométricos obtenidos mediante ^1H -RMN, permiten proponer la representación del CI mostrada en la figura III.5. Donde se otorga un ordenamiento de tipo cabeza-cabeza a los baldes de α -CD en el dímero.

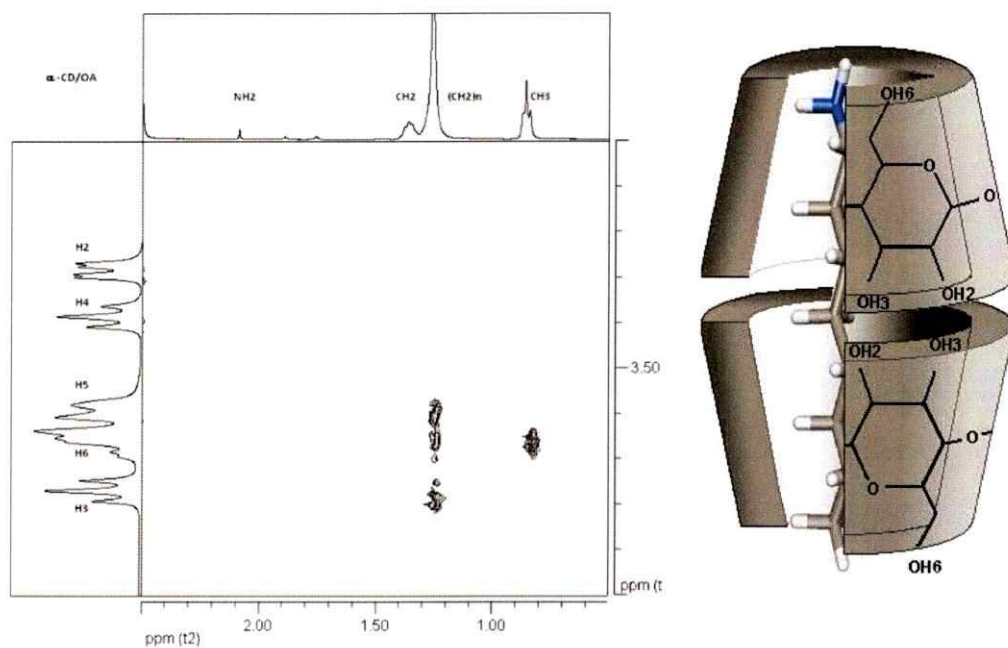


Figura III. 5. Espectros ROESY del CI de α -CD/OA y una representación de la forma de inclusión de octilamina dentro de la matriz de α -CD.

III.1.4 Difracción de rayos-X de muestras policristalinas

Los análisis de los difractogramas de polvo confirman el proceso de inclusión de la octilamina dentro de la matriz de α -CD, anexo 1. El sistema cristalino del CI fue indexado sobre la base de una red teórica hexagonal, con los parámetros de red; $a = b = 23.7 \text{ \AA}$, $c = 15.9 \text{ \AA}$ y $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$ [45], tabla III.5. En contraste, la α -CD nativa cristaliza en un sistema de tipo ortogonal.

Tabla III. 5. Parámetros cristalográficos para la matriz de α -CD y para el CI.

Muestra	Sistema cristalino	Grupo espacial	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)	Volumen Å ³
α -CD	Ortogonal	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	14.89	34.00	6.531	90	90	90	4826.2
α -CD/OA	Hexagonal	P6	23.63	23.63	15.79	90	90	120	7636.2

Los valores del eje c para la α -CD y el CI coinciden con las dimensiones de la unidad α -CD y el dímero de α -CD, respectivamente, comprobando la estequiometría de dos baldes de ciclodextrina por una molécula huésped [43].

III.1.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La figura III.6 muestra las micrografías SEM de α -CD pura y del CI. La α -CD nativa sólida presenta un aspecto amorfo, en contraste con los microcristales del CI que presentan estructuras hexagonales, con bordes bien definidos aunque heterogéneos en tamaño, lo que dificulta una definición de sus dimensiones.

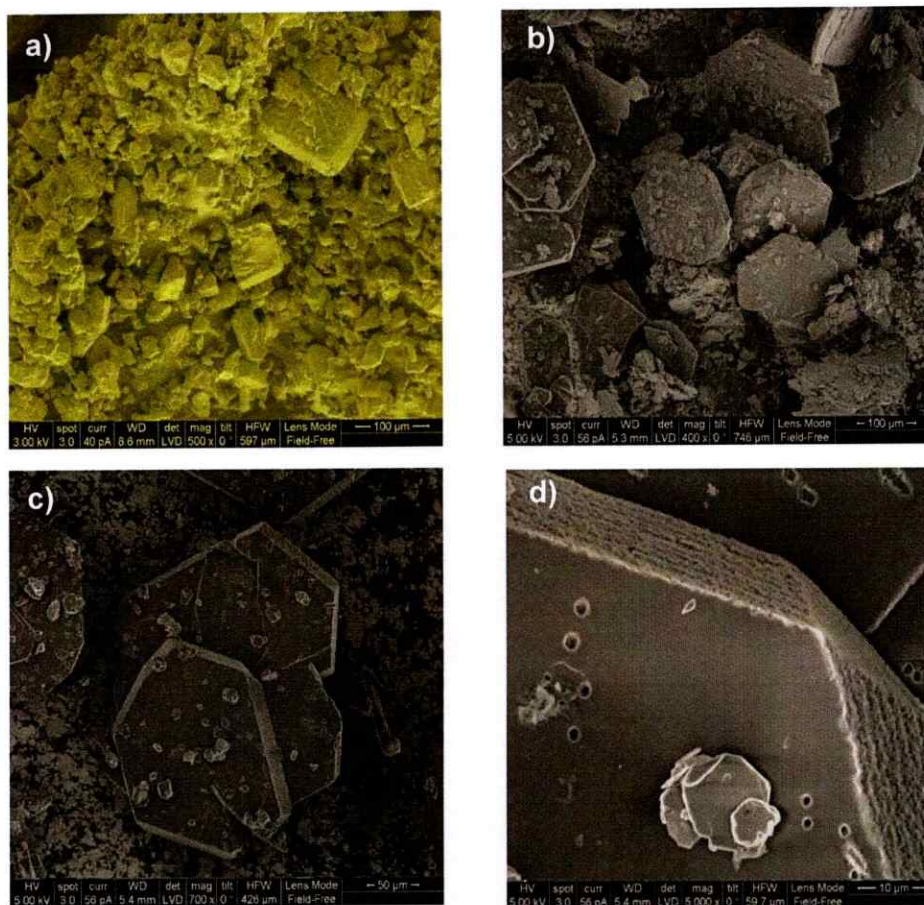


Figura III. 6. Micrografías SEM de a) α -CD nativa, b), c) y d) compuesto de inclusión de OA a distintos aumentos.

III.2 Caracterización del metotrexato purificado

Para comprobar la ausencia de los excipientes en la muestra y caracterizar la estructura de MTX se utilizó la técnica de resonancia magnética nuclear de protones uni y bidimensional.

Mediante ^1H -RMN se determinó que luego de la purificación de MTX, desaparecen las señales entre 3.38 y 4.42 ppm, correspondientes al manitol, figura III.7.

Al comparar los desplazamientos químicos del MTX purificado con los entregados por la base de datos², se corroboró que el fármaco no sufrió modificaciones, encontrándose las señales correspondientes a los protones de MTX a los mismos desplazamientos químicos reportados (Anexo 2).

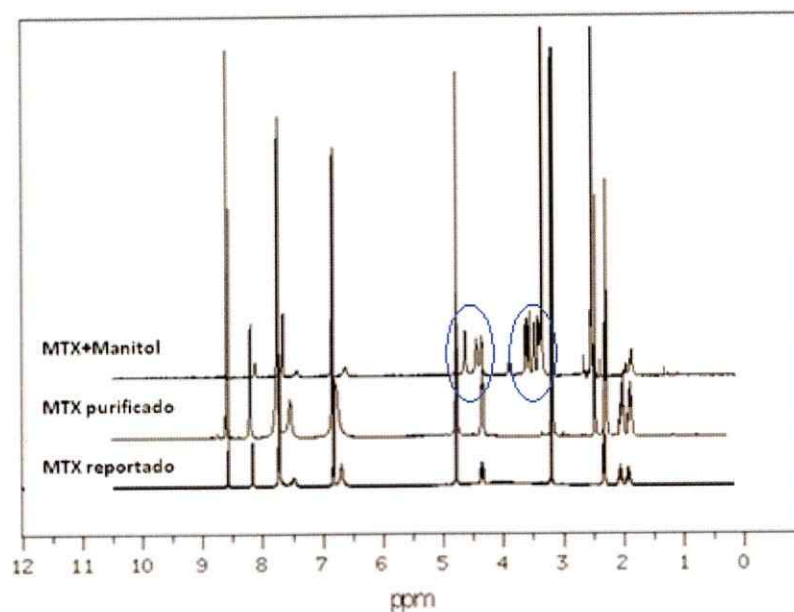


Figura III. 7. Comparación de los espectros ^1H -RMN del MTX con manitol, reportado² y purificado.

Otra forma de verificar la integridad de la molécula de MTX fue a través de 2D-COSY, confirmando las interacciones entre protones adyacentes (Anexo 2).

² Spectral Database for Organic CompoundsSDBS. http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi

III.3 Caracterización del compuesto de inclusión con el fármaco

III.3.1 ^1H -RMN

Para determinar la formación de CI se utilizó como control una mezcla física equimolar de β -CD y MTX como referente para su caracterización.

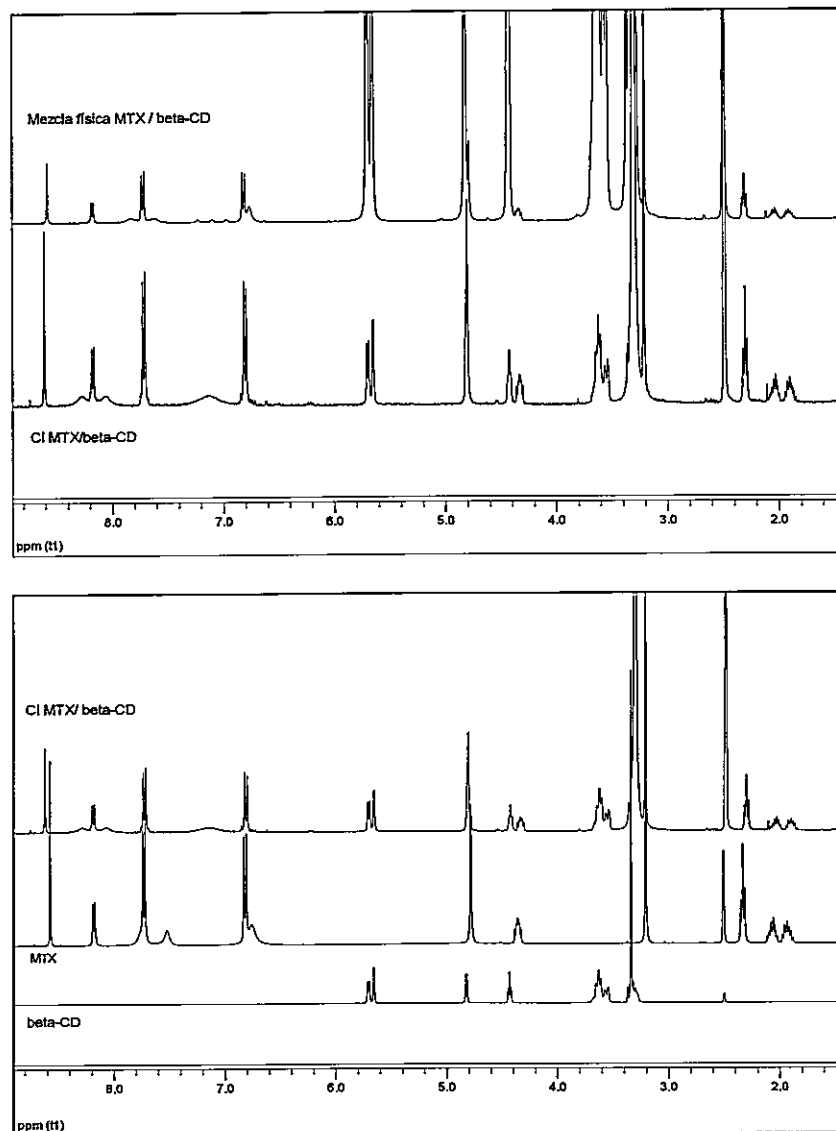


Figura III. 8. Comparación de los espectros ^1H -RMN de los precursores β -CD, MTX, CI y mezcla física de estos.

Tabla III. 6. Comparación de los desplazamientos químicos de la β -CD en el CI y en la mezcla física.

Matriz β -CD	H1 (ppm)	H2 H4 (ppm)	H3 y H6 (ppm)	H5 (ppm)	-OH(2) (ppm)	-OH(3) (ppm)	-OH(6) (ppm)
β -CD	4.83	3.34	3.63	3.56	5.71	5.66	4.44
CI β -CD/MTX	4.82	-	3.62	3.55	5.72	5.67	4.42
Mezcla física β -CD/MTX	4.83	-	3.63	3.56	5.71	5.66	4.43

La figura III.8 muestra los espectros del CI, de los precursores y de la mezcla física de MTX y β -CD. Los espectros del CI y los precursores presentan diferencias significativas en los desplazamientos químicos debido a la inclusión de MTX en la cavidad de β -CD. Estas diferencias son observadas también al comparar el CI con la mezcla física.

Al comparar los desplazamientos químicos de MTX en el CI y en la mezcla física se observan desplazamientos de HD y HE del MTX en el CI hacia campos altos, los cuales según lo reportado, se encuentran incluidos dentro del balde de β -CD [46], anexo 2. La tabla III.6 muestra la comparación de los desplazamientos químicos de β -CD en el CI y en la mezcla física. Se encontró que los desplazamientos químicos de los protones de la matriz son equivalentes a los de la β -CD pura. De manera contraria los protones en el CI que se encuentran hacia el interior de la cavidad se desplazan hacia campos altos, debido a la presencia de MTX en su interior. Los protones que se encuentran hacia el exterior del balde H3 y H6 se desplazan hacia campos bajos. Similares corrimientos se obtuvieron en los desplazamientos químicos del CI con OA.

III.3.2 2D-ROESY

Mediante esta técnica se logró determinar las interacciones existentes entre el fármaco y la matriz en el proceso de inclusión. La figura III.10 muestra el espectro ROESY del CI. Se observan las interacciones de los -OH2 y -OH3 externos de la β -CD con el HL del fármaco, así como también los protones internos H3 y H5 de la cavidad de la matriz con los HD y HE de MTX. Estos resultados indican que el anillo de pteridina de MTX se encuentra dentro del balde de la β -CD. Se observa además, la interacción del protón HG de MTX con el protón del grupo OH6 de la ciclodextrina que se encuentra en el borde de la apertura menor del cono, lo que confirma que el grupo funcional amino se encuentra expuesto fuera de la cavidad.

La ausencia de interacciones entre la β -CD y el resto de la molécula de MTX permiten aseverar que los residuos p-aminobenzoico y ácido glutámico se encuentran fuera de la cavidad de la β -CD con una estequiometría 1:1 matriz: huésped.

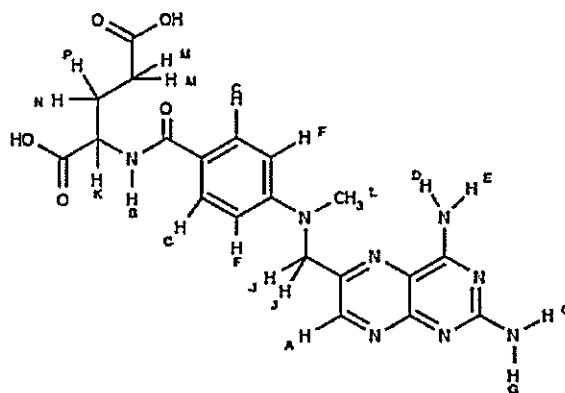


Figura III. 9. Asignación de los protones de la molécula de MTX.

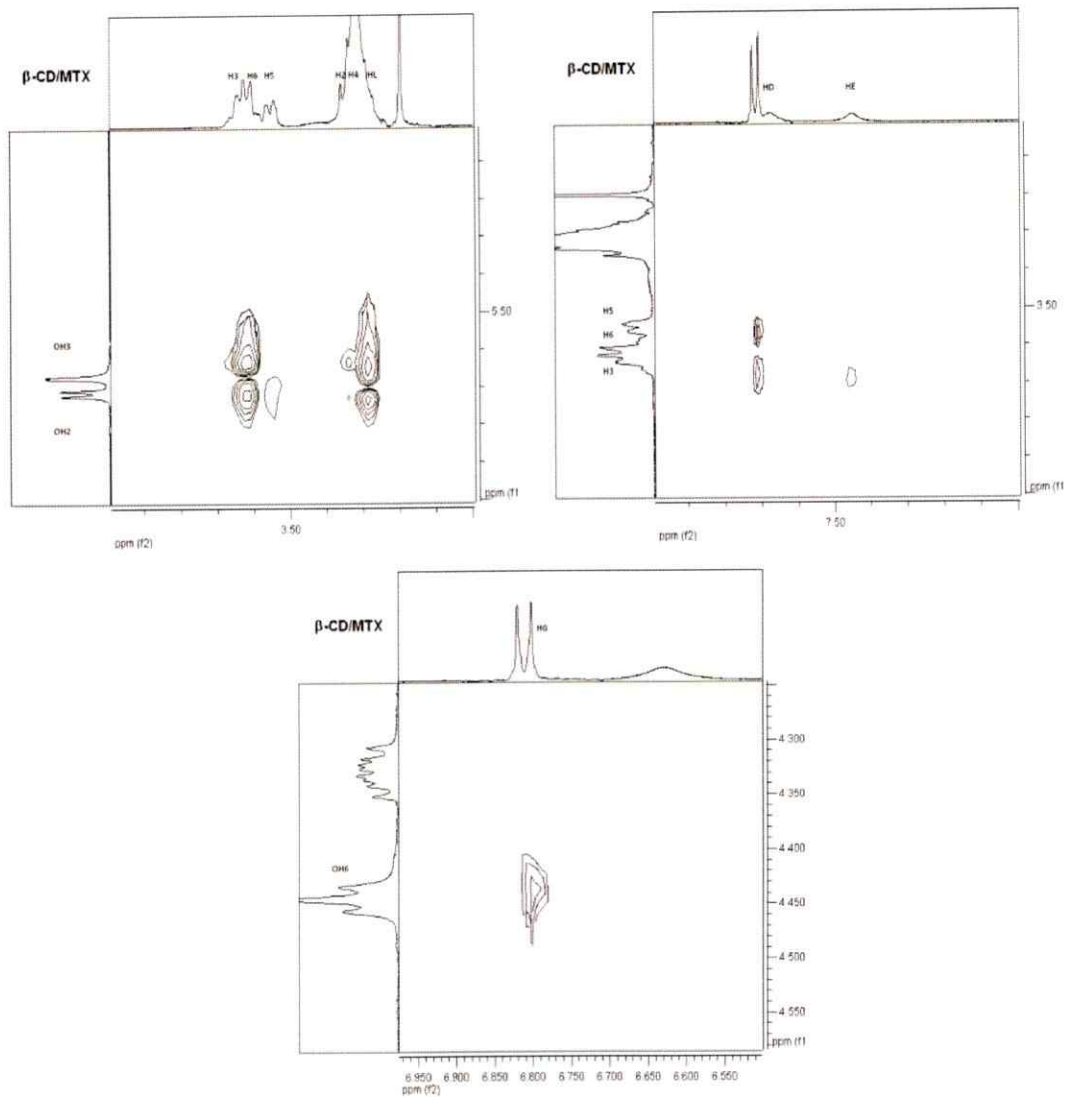


Figura III. 10. Espectro ROESY segmentado del CI de β -CD/MTX.

Los datos obtenidos mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear son consistentes con un estudio previo de modelado molecular de la inclusión de MTX en la cavidad de β -CD, figura III.11 [46].

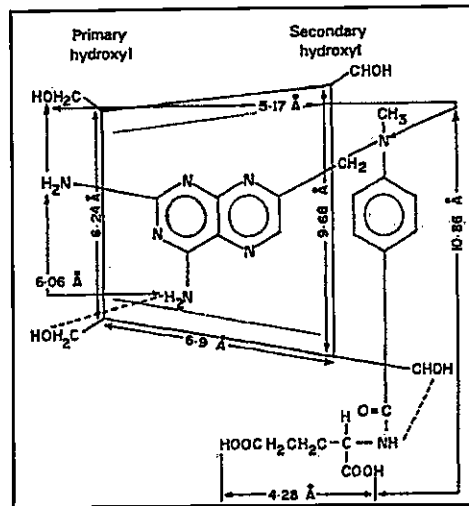


Figura III. 11. Ordenamiento propuesto en la literatura para la inclusión del fármaco realizado por modelamiento molecular [46].

III.3.3 DRX

La figura III.12 muestra el difractograma de MTX, β -CD, mezcla física y del CI. El difractograma de MTX evidencia una baja cristalinidad. Similar característica presenta el CI. En el difractograma de la mezcla física predominan los picos de la β -CD, debido a su mayor cristalinidad y densidad de planos [47]. El CI presenta un patrón de difracción distinto a los encontrados en otros CI que se diferencia de las fases de los precursores por separado y de la mezcla física de estas.

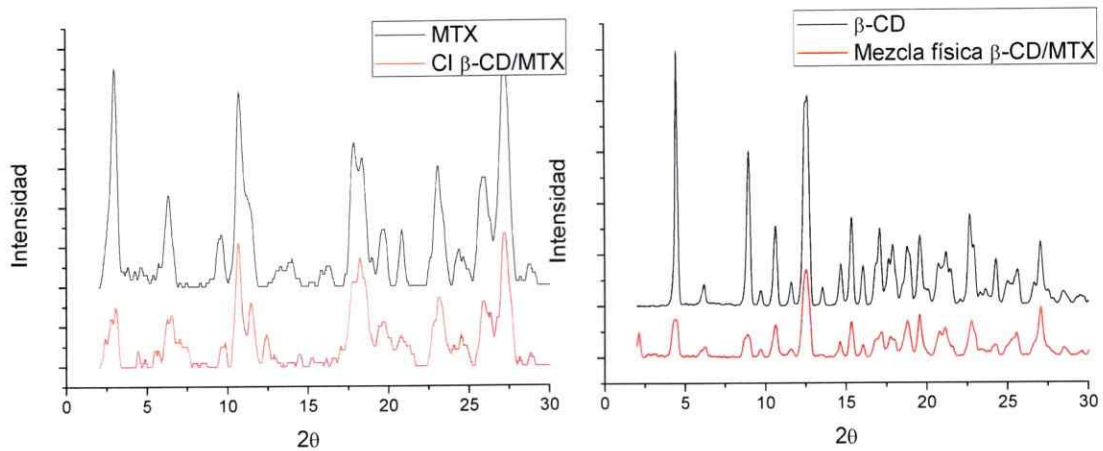


Figura III. 12. Comparación de los difractogramas de los precursores, del CI y de la mezcla física.

III.3.4 Análisis térmicos

La figura III.13 muestra los termogramas del CI y de los precursores por separado. Para todos los casos se observa una pérdida de masa atribuible a moléculas de agua de humedad natural. Sin embargo, para la β -CD se observa una pérdida de masa mayor atribuible a la presencia de moléculas de agua albergadas en su cavidad. Se observa que, entre 25 y 250 °C, no existe descomposición ni pérdida significativa de masa en ninguna de las tres muestras.

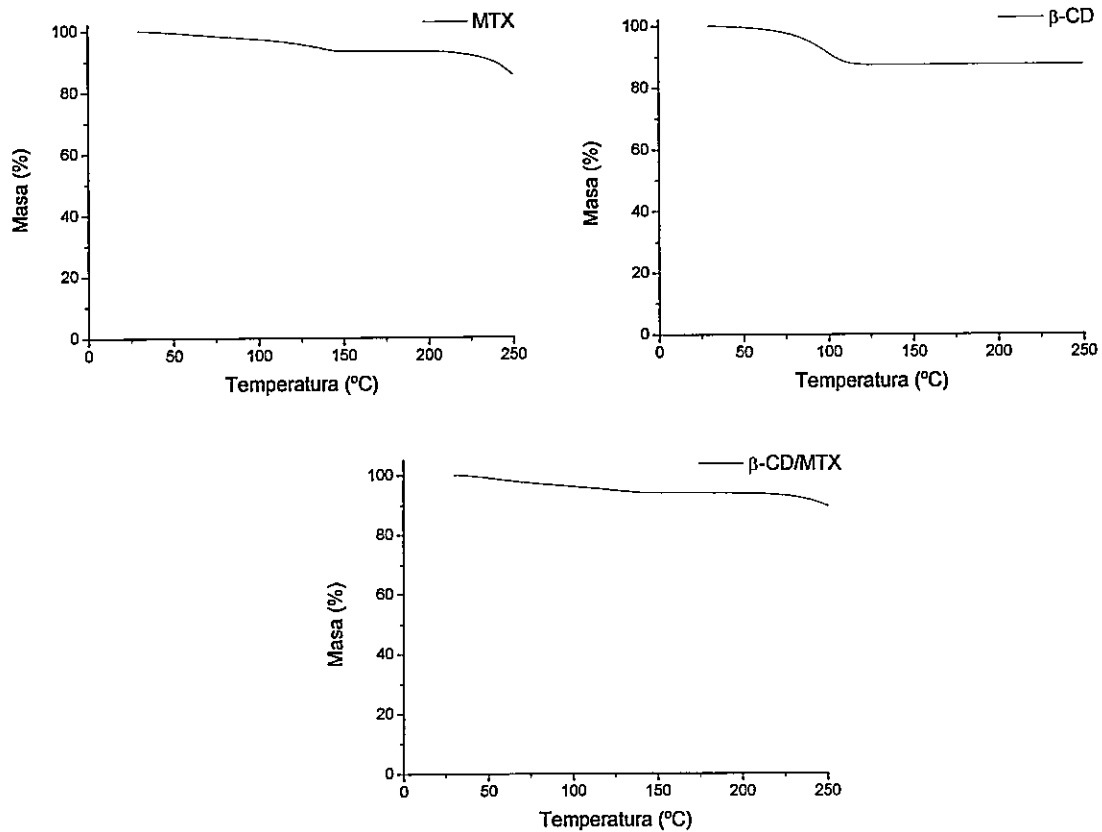


Figura III. 13. Termogramas de MTX, β -CD y CI de β -CD/MTX.

Tabla III. 7. Masa inicial, cantidad y temperatura de pérdida de masa de agua durante el proceso térmico.

Muestra	Masa Inicial (mg)	Agua perdida (%)	Agua perdida (mg)	Nº moléculas de agua perdidas	Rango de Tº de pérdida de agua (°C)	Razón nº moléculas de agua / masa inicial
MTX	3.54	6.70	0.24	$7.95 \cdot 10^{21}$	30-148.0	$2.25 \cdot 10^{21}$
β -CD	6.75	12.6	0.85	$2.85 \cdot 10^{22}$	30-119.1	$4.22 \cdot 10^{21}$
β -CD/MTX	1.21	6.15	0.08	$2.49 \cdot 10^{21}$	30-129.6	$2.06 \cdot 10^{21}$

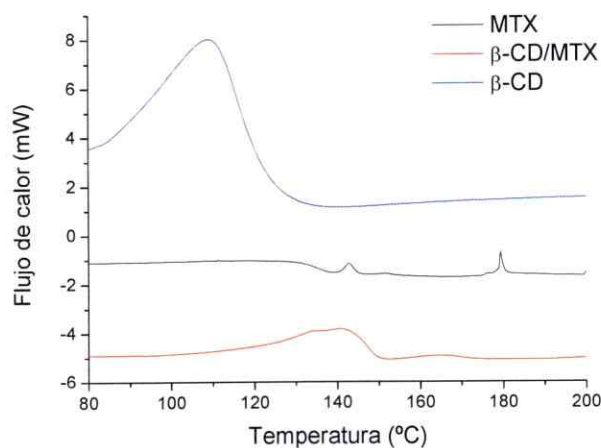


Figura III. 14. DSC del MTX, β -CD y del CI de β -CD/MTX.

La figura III.14 muestra el análisis a través de calorimetría diferencial de barrido del CI y de los precursores. Se observa un pico endotérmico de la matriz que aparece a 110 °C, asociado a la cantidad de moléculas de agua perdidas a esa temperatura. El MTX presenta dos picos endotérmicos característicos en 142 y 189 °C [27].

El CI presenta un único pico endotérmico no reversible en 139 °C sin pérdida de masa asociada a esa temperatura. Este hecho es considerado farmacológicamente ventajoso, respecto de los resultados encontrados en el CI de α -CD/OA. De esta manera el calor plasmónico generado al irradiar con láser producirá una fuga irreversible de la molécula huésped de MTX de la cavidad de la β -CD matriz.

CAPÍTULO IV: NANOMATERIALES

IV.1 Obtención y caracterización de NEsAu mediante método químico

Las NEsAu fueron obtenidas mediante el método de reducción de una sal de oro (HAuCl_4) utilizando citrato que actúa como agente reductor y estabilizante. Esta síntesis fue propuesta por Turkevich en el año 1951 y ha sido ampliamente utilizada debido a que es un método sencillo que genera NEsAu con homogeneidad en tamaño y forma [36].

IV.1.1 Espectrofotometría UV-Vis

La espectrofotometría es una herramienta de gran utilidad para la caracterización de nanopartículas en virtud de las propiedades ópticas especiales que presenta la materia nanoestructurada respecto de la escala macroscópica. Las nanopartículas metálicas, presentan un plasmón de resonancia superficial con un máximo de absorción a una longitud de onda específica que las caracteriza, propiedad que es dependiente tanto de la naturaleza del metal como del tamaño, forma e interacciones entre las partículas [48].

La figura IV.1 muestra el espectro de absorción de las NEsAu las que presentan un máximo de absorción en 520 nm, correspondiente a la banda de plasmón de resonancia característico para NEsAu de entre 10 y 20 nm de diámetro.



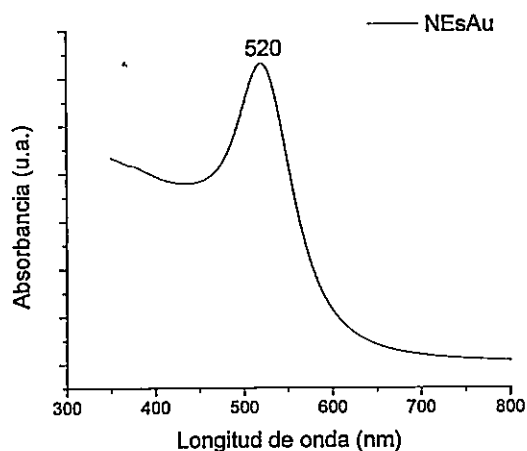


Figura IV. 1. Espectro UV-Vis de NEsAu estabilizadas con citrato.

IV.1.2 TEM y DLS

La microscopía electrónica de transmisión entrega información sobre la morfología y tamaño de las NEsAu pudiéndose determinar estadísticamente el tamaño de su población en distintas zonas de observación.

La figura IV.2 muestra la micrografía TEM e histograma de NEsAu preparadas en nuestro laboratorio, observándose una distribución homogénea tanto en tamaño como forma. El histograma obtenido de una población de 100 partículas muestra un diámetro promedio de 12 ± 2 nm, resultado que es consistente con el plasmón en 520 nm.

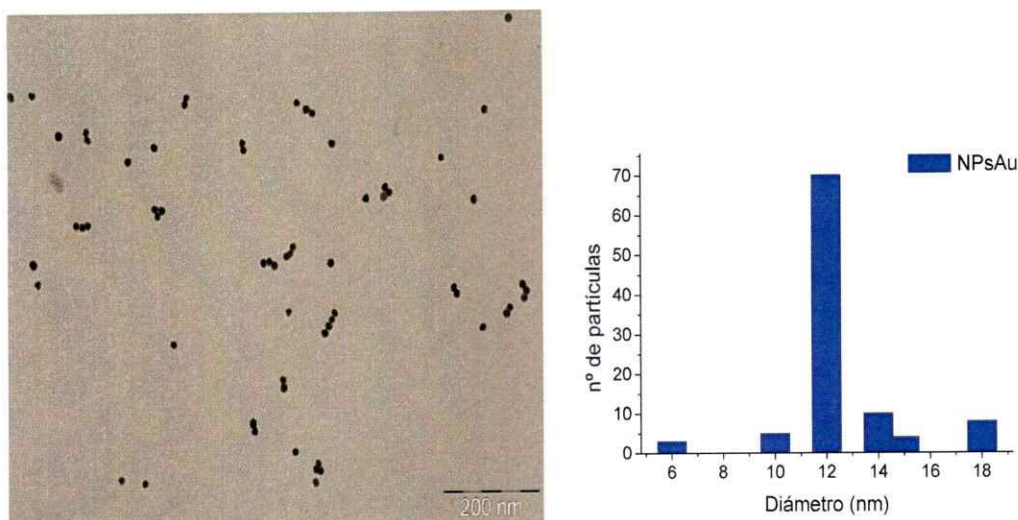


Figura IV. 2. Micrografías TEM e histograma de tamaño de NEsAu estabilizadas en citrato.

Otra técnica que se utilizó para caracterizar las NEsAu es DLS. Obteniéndose un diámetro hidrodinámico de 18.8 nm con índice de polidispersidad (IPD) de 0,2. El valor obtenido mediante esta técnica comparado con los obtenidos por TEM presenta diferencias que pueden ser explicados considerando que DLS entrega información sobre el tamaño de las partículas en dispersión con su correspondiente esfera de hidratación, es decir la partícula metálica y lo que la rodea, como el citrato y iones asociados.

IV.1.3 Análisis de activación neutrónica

Esta técnica se utilizó para determinar la concentración de oro que resulta en la síntesis de NEsAu. Utilizando este valor y el tamaño de la partícula (determinado por TEM) es posible calcular el coeficiente de extinción de acuerdo a las ecuaciones presentadas en la sección metodológica.

El valor de este coeficiente de extinción calculado de manera semi-empírica permite determinar la concentración de NEsAu en diferentes muestras, haciendo uso de los datos de absorbancia y utilizando la ley de Lambert Beer.

Tabla IV. 1. Longitud de onda del plasmón, absorbancia, masa, concentración de Au y coeficiente de extinción para tres síntesis de NEsAu.

Nº muestra	λ (nm) (síntesis)	Absorbancia (u.a.)	mg total de Au	Concentración (nM)	Coefficiente de extinción ($M^{-1}\cdot cm^{-1}$)
1	519	2.61	35.5	17.2	$1.52\cdot 10^8$
2	517	2.63	35.0	16.9	$1.56\cdot 10^8$
3	520	2.59	27.6	13.3	$1.94\cdot 10^8$

La tabla IV.1 muestra los resultados de 3 síntesis de NEsAu, obteniéndose una concentración promedio de oro de 15.8nM y un coeficiente de extinción de $1.67\cdot 10^8 M^{-1}\cdot cm^{-1}$.

IV.2 Conjugación de las NEsAu con el compuesto de inclusión de octilamina

IV.2.1 Conjugación de las NEsAu con el CI de octilamina

IV.2.1.1 Espectrofotometría UV-Vis

En la figura IV.3 a) se muestra el espectro UV-Vis de las NEsAu unidas al CI observándose un desplazamiento batocrómico de la banda plasmónica desde 520 a 564 nm que puede ser atribuible al cambio en el entorno de la NEsAu donde el ion citrato es reemplazado por el compuesto de inclusión y a cierto grado de agregación.

La Figura IV.3 b) muestra el espectro de absorción del sobrenadante. Una banda débil de absorbancia en 520 nm es indicativo de que sólo una pequeña cantidad de NEsAu no fueron adheridas al CI.

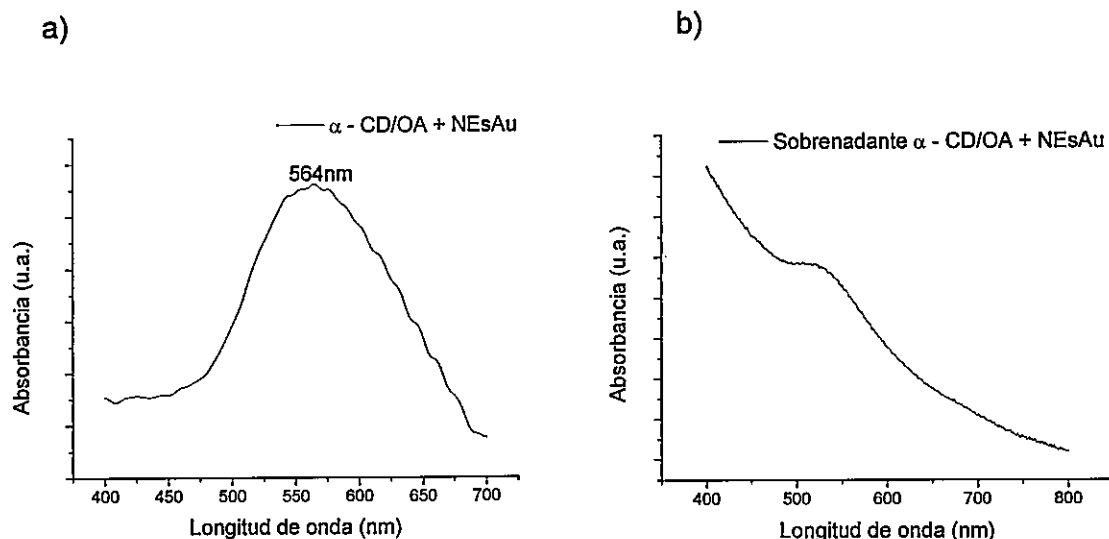


Figura IV. 3. Espectros UV-Vis de a) CI con NEsAu, b) sobrenadante de la centrifugación.

IV.2.1.2 ^1H -RMN

En el proceso de conjugación es necesario corroborar la integridad del sustrato supramolecular como también identificar reordenamientos del huésped debido a la presencia de las NEsAu.

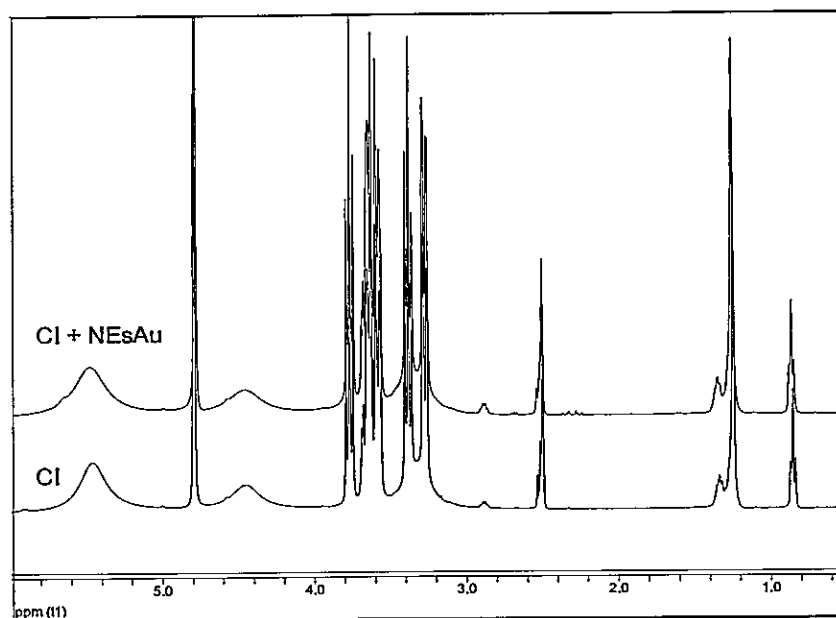


Figura IV. 4. Espectro ^1H -RMN del CI y del CI conjugado a NEsAu.

Tabla IV. 2. Desplazamientos químicos de los protones de la matriz en el CI y en el CI conjugado a NEsAu.

α -CD	H1 (ppm)	H2 (ppm)	H3 (ppm)	H4 (ppm)	H5 (ppm)	H6 (ppm)	OH(2) (ppm)	OH(3) (ppm)	OH(6) (ppm)
α -CD/OA	4.78	3.28	3.77	3.38	3.59	3.67	5.49	5.49	4.50
α -CD/OA+NEsAu	4.79	3.27	3.77	3.38	3.59	3.65	5.49	5.49	4.47
$\Delta\delta$	-0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.02	0.00	0.00	0.03

Tabla IV. 3. Desplazamientos químicos de los protones de la OA en el CI y en el CI con NEsAu.

OA	$-\text{CH}_3$ (ppm)	$-(\text{CH}_2)_n-$ (ppm)	$-\text{CH}_2-$ (ppm)
α -CD/OA	0.85	1.24	1.33
α -CD/OA+NEsAu	0.85	1.23	1.31
$\Delta\delta$	0.00	0.01	0.02

La figura IV.4 muestra los espectros ^1H -RMN del CI y del CI conjugado a NEsAu. La ausencia de cambios en los desplazamientos químicos de los protones de la cavidad de la matriz y de la cadena alquílica de la OA huésped corrobora que la unión de las NEsAu al CI no afecta la integridad del CI. Sin embargo, los protones externos de la ciclodextrina sufren corrimientos en los desplazamientos químicos en el proceso de conjugación de NEsAu

IV.2.1.3 DRXP

En la figura IV.5 a) se muestran los difractogramas del CI puro y del CI conjugado a NEsAu, los que no presentan diferencias significativas. Estos resultados corroboran la integridad y cristalinidad del CI ante la conjugación con NEsAu.

La figura IV.5 b) muestra el difractograma en la zona entre $38 < 2\theta < 45$ que corresponde a la región de los planos cristalográficos del oro. La ausencia de estos planos [(111), (200), (220), (331)] se debe probablemente, a la falta de periodicidad de las NEsAu y a su menor proporción en la muestra.

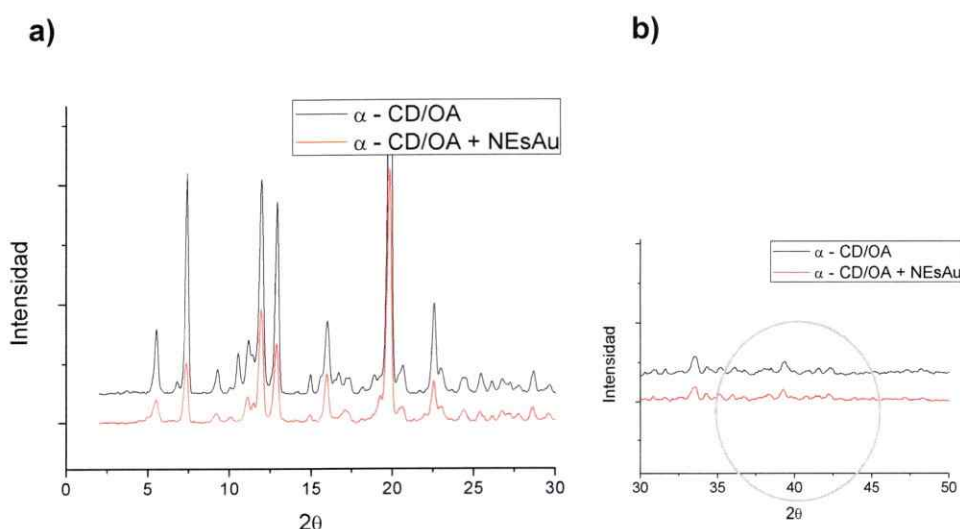


Figura IV. 5. a) Difractograma del CI y de las CI conjugadas a las NEsAu, b) Región 2θ de los planos cristalográficos del oro.

La tabla IV.4 muestra los parámetros cristalográficos obtenidos mediante la indexación de todas las líneas de difracción del CI y del CI conjugado a las NEsAu sobre la base de una red teórica hexagonal, con los parámetros de red de; $a = b = 23.7\text{Å}$, $c = 15.9\text{Å}$ y $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120\text{Å}$. Interesantemente, se observa un aumento en el volumen de la celda unitaria en la muestra de NEsAu adheridas al CI.

Tabla IV. 4. Parámetros cristalográficos para el CI y el CI conjugado a NEsAu.

Muestra	Sistema cristalino	Grupo espacial	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)	Volumen Å ³
α -CD/OA	Hexagonal	P6	23.634	23.634	15.786	90	90	120	7636.2
α -CD/OA+NEsAu	Hexagonal	P6	23.718	23.718	15.921	90	90	120	7756.8

IV.2.1.4 Análisis Térmicos

La figura IV.6 muestra el DSC con su correspondiente TGA del CI conjugado a las NEsAu. El DSC muestra un pico endotérmico a 124.3 °C y un pico exotérmico a 131.1 °C . Este resultado difiere al obtenido en el CI sin NEs, donde se apreciaban dos picos endotérmicos y dos picos exotérmicos. Esto se debe probablemente a que la presencia de las NEsAu otorga cierta rigidez al CI restringiendo los cambios conformacionales. El análisis TGA muestra ausencia de pérdida de masa asociado a estos eventos térmicos. El termograma muestra, sin embargo una pérdida de masa de 4.31% entre 25 y 113.2 °C , atribuibles a la pérdida de moléculas de agua de humedad del CI.

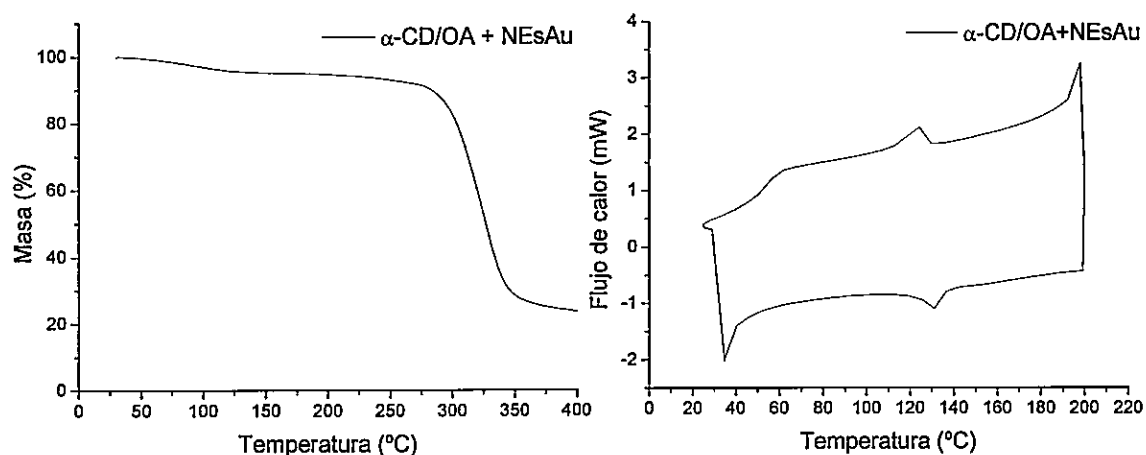


Figura IV. 6. TGA y DSC de las NEsAu conjugadas al Cl.

El conjunto de picos endo y exotérmico puede ser atribuido a cambios estructurales reversibles, correspondientes a diferentes conformaciones del sistema matriz huésped, y probablemente, a movimientos migratorios de la molécula huésped al interior de la cavidad de ciclodextrina, conservándose la integridad del sistema huésped matriz.

IV.2.1.5 TEM

La figura IV.7 muestra la micrografía TEM e histograma de las NEsAu unidas al Cl con una distribución homogénea en tamaño y forma aunque con algún grado de agregación. El histograma obtenido de una población de 100 partículas muestra un diámetro promedio de 12 ± 1.3 nm.

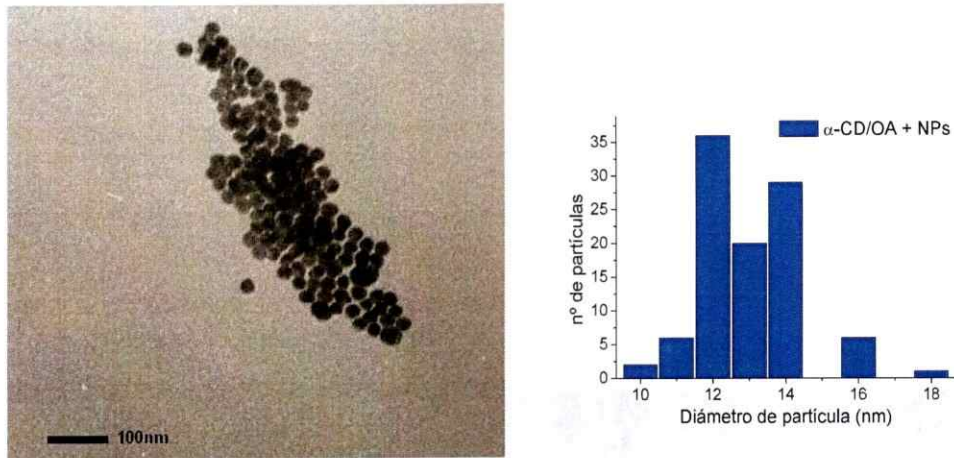


Figura IV. 7. Micrografías TEM e histograma de las NEsAu conjugadas al CI de α -CD/OA.

IV.2.1.6 SEM y EDS

La figura IV.8 muestra las micrografías SEM de las NEsAu conjugado al CI. Se observan las NEsAu distribuidas homogéneamente sobre los CI, manteniendo su tamaño y forma luego de la conjugación.

Los cristales del CI presentan pérdida de su morfología hexagonal debido probablemente a la disolución parcial en la suspensión provocando además, agregación de las NEs.

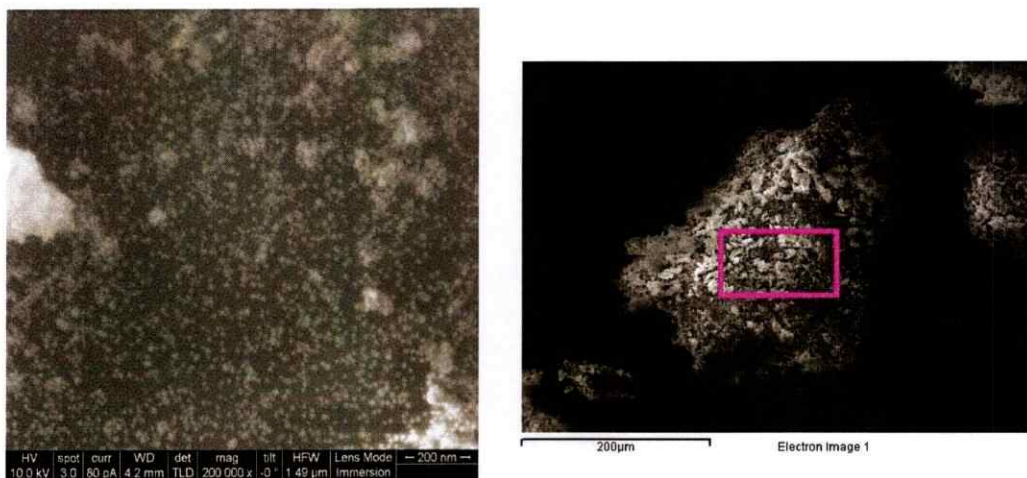


Figura IV. 8. Micrografías SEM a distintos aumentos de NEsAu conjugadas al CI de α -CD/OA.

La figura IV.9 muestra el espectro EDS de las NEsAu unidas al CI, observándose abundancia de C y O perteneciente a los componentes orgánicos del CI y Au, corroborando la adhesión de las NEsAu.

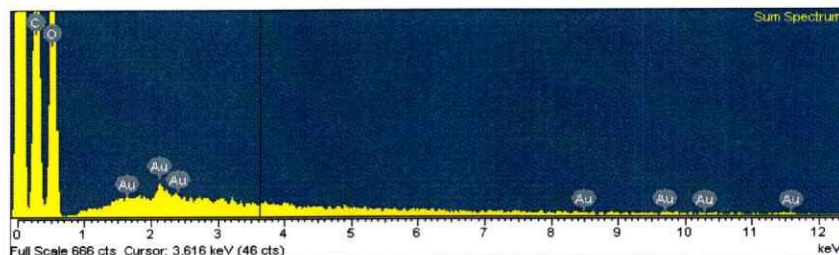


Figura IV. 9. Espectro EDS de NEsAu conjugadas al cristal del CI de α -CD/OA.

IV.2.1.7 XPS

La técnica de XPS permite realizar un análisis elemental cualitativo de la superficie determinando las energías de unión de los electrones de cada átomo permitiendo evaluar cambios posteriores a la conjugación de las nanopartículas. En una primera etapa se realizó un registro de espectro general, barridos desde 0 a 1200 eV para determinar los diferentes tipos de átomos presentes en las muestras. Las figuras IV.10 y IV.11 muestran los espectros generales del CI y del CI conjugado a las NEsAu. Para el CI puro se observó, principalmente las señales de los electrones 1s del C, 1s del O y 1s del N. En la muestra del CI unido a las NEsAu aparecen además, las señales correspondientes a los electrones 4p, 4d y 4f del Au.

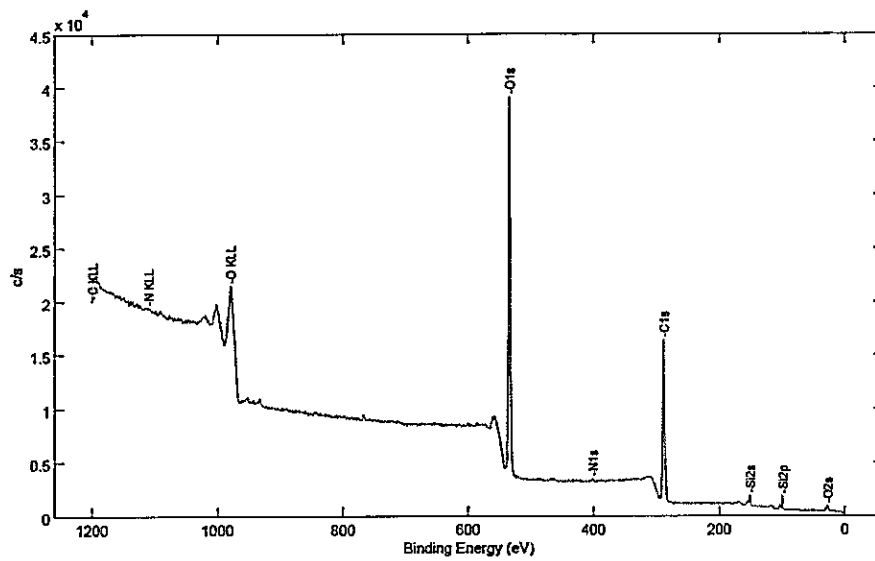


Figura IV. 10. Espectro general XPS del CI de α -CD/OA.

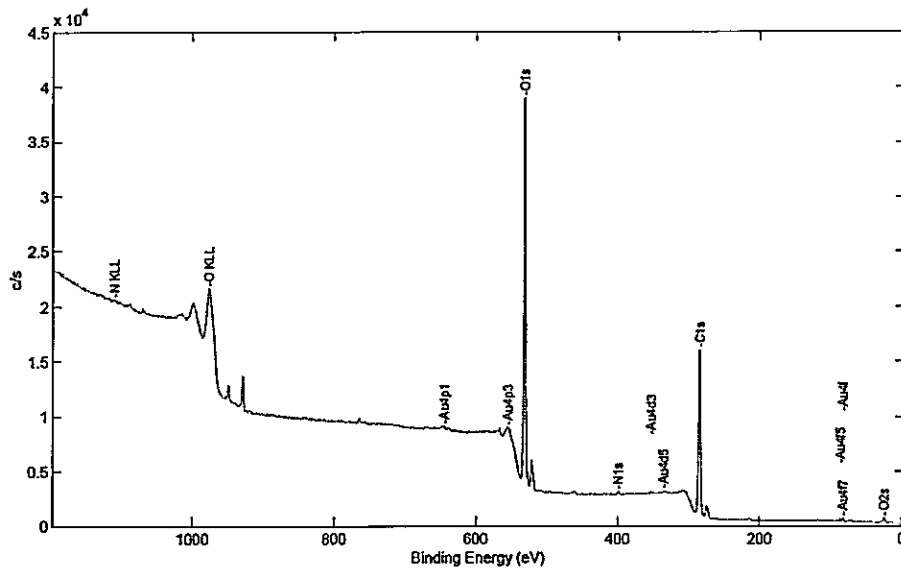


Figura IV. 11. Espectro general XPS de CI conjugado a las NEsAu.

En una segunda etapa se registraron espectros de alta resolución, analizando en detalle cada señal. Las energías de unión de las señales se obtuvieron usando como referencia el ajuste del C 1s en 284.8 eV.

La figura IV.12 muestra el espectro de alta resolución en la zona del orbital 1s del N para la muestra de CI unido a las NEsAu. Se observa un espectro definido el cual presenta dos bandas en 399.9 y 402.4 eV. La banda de menor intensidad en 402.4 eV corresponde al nitrógeno del N-H del ión amonio ($-\text{NH}_3^+$). El grupo funcional de la molécula de OA se encuentra protonado bajo las condiciones de trabajo de pH 7, debido a que posee un pK_a de 10.75 [49].

La banda de mayor intensidad y menor energía en 399.9 eV, indica la presencia de Au adsorbido sobre la amina cargada positivamente. El Au dona electrones y disminuye la densidad de carga sobre el átomo de N, dejándolo parcialmente neutro. Similares desplazamientos de energía de unión del N 1S han sido reportados para ADN quimisorbido en superficies de oro [50]–[53].

El espectro de alta resolución del orbital 1s del N del CI puro no fue posible de analizar debido a la poca intensidad y definición de la señal. Esto se debe probablemente a que los grupos aminos se encuentran incluidos en las cavidades de las ciclodextrinas limitando la resolución de la señal debido a la poca cantidad de aminos expuestos en la superficie.

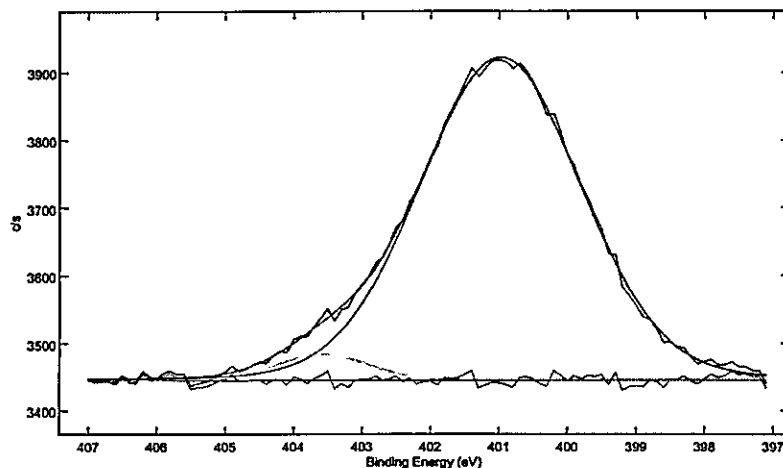


Figura IV. 12. Espectro XPS de alta resolución para las energías de unión de los electrones 1s del nitrógeno de la OA en el CI de α -CD/OA+NEsAu. Se muestra el espectro original y las curvas de ajuste.

Se analizaron además las señales de los electrones del orbital 1s del oxígeno. La figura IV.13 a) muestra el espectro de alta resolución del O en el CI de α -CD/OA. Se observan dos bandas en 532.20eV y 534.21eV. La primera banda en 532.20eV corresponde a los puentes glucosídicos de oxígeno y la banda de mayor intensidad en 534.21eV corresponde a los grupos $-\text{OH}(2)$ $-\text{OH}(3)$ y $-\text{OH}(6)$ que se encuentran en los extremos del cono de las ciclodextrinas [54].

La figura IV. b) muestra el espectro de alta resolución del CI conjugado a las NEsAu. Se observan nuevamente dos bandas en 531.38eV y 534.03eV. La banda de mayor intensidad corresponde a los grupos $-\text{OH}$ de las ciclodextrinas y la de menor intensidad a los O de los puentes glucosídicos. Al comparar la energía de unión de los electrones del orbital 1s de los oxígenos del CI puro con el del CI conjugado se aprecia que existe una disminución en la energía de ambas bandas debido probablemente a que el electrón se encuentra más apantallado al existir una mayor densidad electrónica en el entorno de las ciclodextrinas por la presencia de las NEsAu.

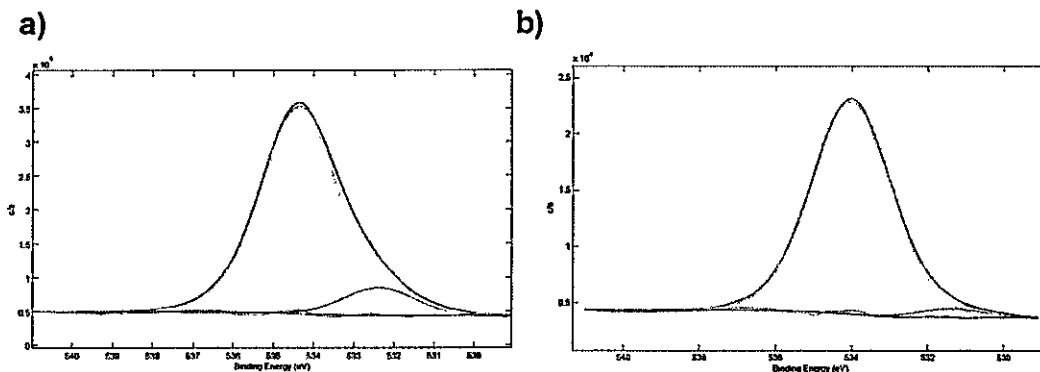


Figura IV. 13. Espectros XPS de alta resolución para las energías de unión de los electrones 1s del oxígeno. a) α -CD/OA y b) α -CD/OA+NEsAu. Se muestra el espectro original junto con las curvas de ajuste.

IV.2.2 MTX conjugado a NEsAu

IV.2.2.1 Espectrofotometría UV-Vis

La figura IV.14 muestra el espectro UV-Vis de las NEsAu y NEsAu cubiertas por MTX, observándose un desplazamiento batocrómico de la banda plasmónica desde 520 nm a en 525 nm, debido al cambio en el entorno de las NEs estabilizada en citrato con respecto a la que se encuentra cubierta con MTX [41].

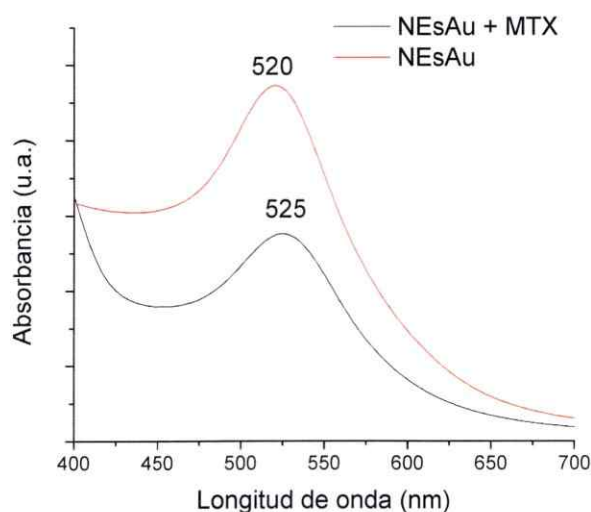


Figura IV. 14. Espectro UV-Vis de las NEsAu estabilizadas con citrato y de las NEsAu estabilizadas por MTX.

IV.2.2.2 TEM y DLS

La figura IV.15 muestra la micrografía TEM e histograma de NEsAu estabilizadas con MTX, observándose una distribución homogénea de las NEsAu. La ausencia de agregados es indicativa de que MTX actúa como un buen estabilizante. El histograma obtenido de una población de 100 partículas

muestra un diámetro promedio de 12 ± 2 nm. A través de DLS se obtuvo un diámetro hidrodinámico de 17.2 nm (IDP 0,1). Valor consistente con el diámetro obtenido mediante TEM.

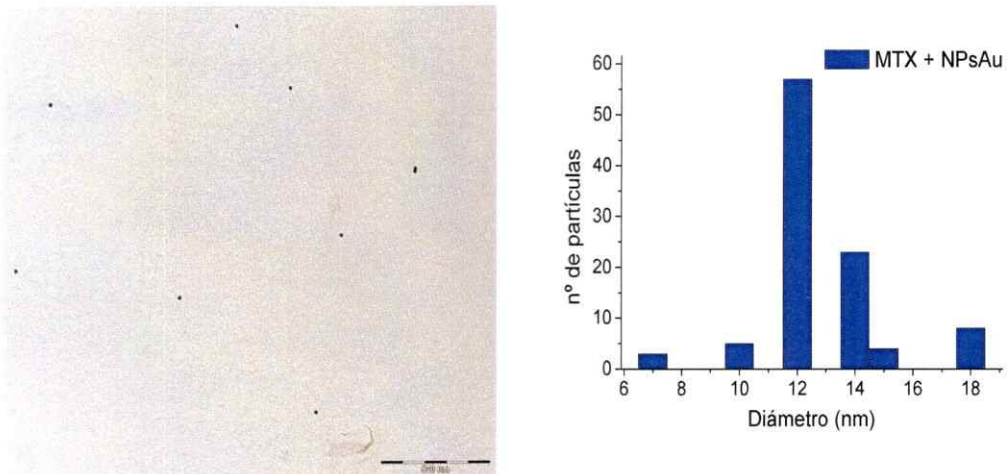


Figura IV. 15. Micrografías TEM e histograma de tamaño de MTX conjugado a NEsAu.

IV.2.3 CI de MTX conjugado a NEsAu

IV.2.3.1 Espectrofotometría UV-Vis

La figura IV.16 muestra el espectro UV-Vis de las NEsAu y de las NEsAu estabilizadas con el CI de MTX. Se observa un desplazamiento batocrómico de la banda plasmónica desde 520 nm a 525 nm debido al cambio en el entorno reemplazando el ion citrato por el CI.

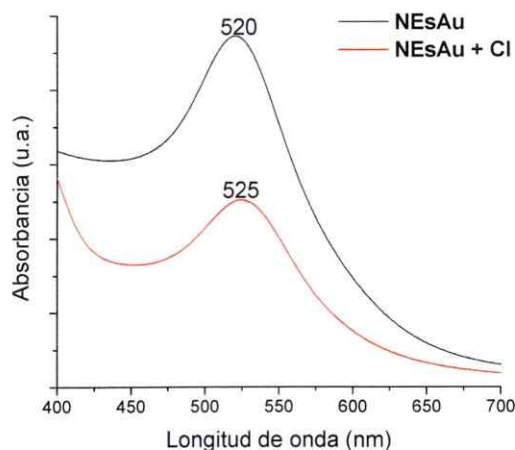


Figura IV. 16. Espectro UV-Vis del CI de MTX conjugado a las NEsAu.

IV.2.3.2 Análisis Térmicos

La figura IV.17 muestra el DSC y TGA de las del CI de MTX unido a NEsAu. El DSC muestra un pico endotérmico a 163 °C sin pérdida de masa asociada, que difiere significativamente de lo encontrado para el CI puro donde se observó un único pico en 139 °C. Esta diferencia puede ser explicada en base a la geometría de la inclusión. Estudios de $^1\text{H-RMN}$ demostraron que sólo el anillo de pteridina se encuentra incluido en el balde de la molécula, manteniendo fuera el resto de la estructura del huésped que interacciona con la NEsAu. Al producirse la conjugación con la NE, la molécula huésped pierde densidad electrónica lo que favorece la inclusión del anillo pteridino confiriéndole una mayor estabilidad al CI cuando está conjugado con la NEsAu. El termograma muestra además una pérdida de masa de 8,9 % entre 30 °C y 158.2 °C por pérdida humedad del CI característica de los CI de ciclodextrina.

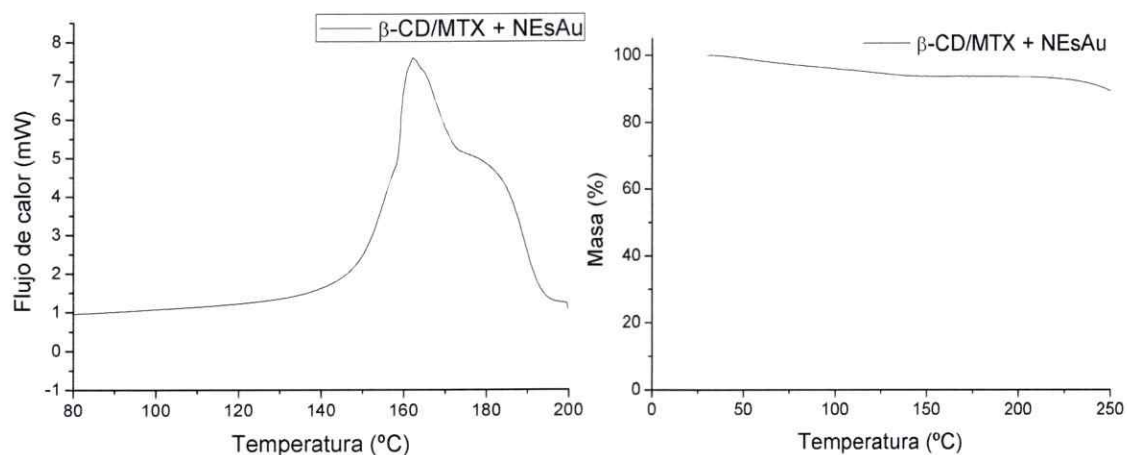


Figura IV. 17. TGA y DSC del CI conjugado a las NEsAu.

IV.2.3.3 TEM y DLS

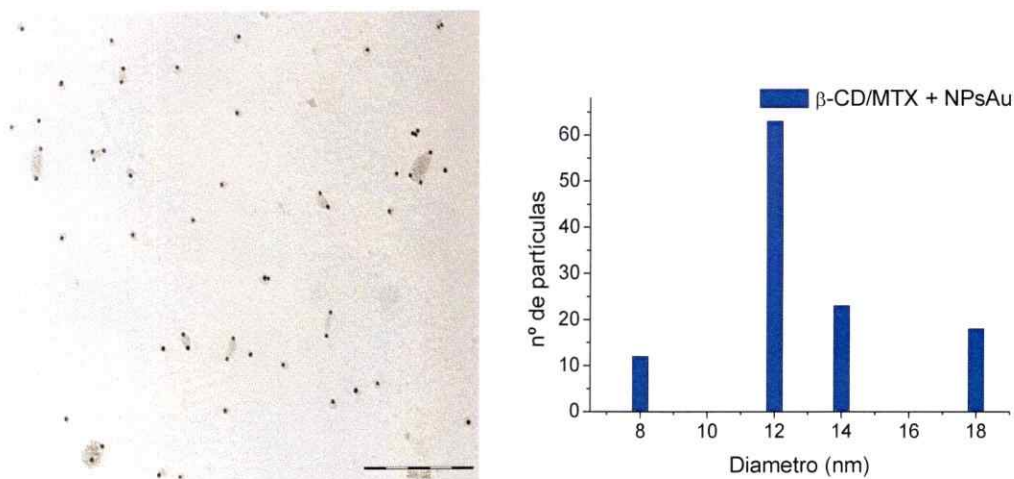


Figura IV. 18. Micrografías TEM e histograma de tamaño de NEsAu cubiertas por el CI de MTX.

La figura IV.18 muestra la micrografía TEM de las NEsAu cubiertas por el CI de MTX. Se observa que alrededor de cada partícula esférica de oro existe un entorno con una menor densidad electrónica atribuido al medio, de naturaleza orgánica correspondiente al CI. El histograma muestra un diámetro promedio de

12 ± 3 nm para una población de 100 partículas. El diámetro hidrodinámico obtenido por DLS entrega un valor de 17.2 nm (IDP 0.2), valor consistente con el diámetro obtenido mediante TEM.

IV.2.3.4 SEM

La figura IV.19 muestra las micrografías SEM del CI de β-CD/MTX conjugado a las NEsAu y de los precursores del CI por separado. Los cristales del CI presentan morfología poco definida debido, probablemente, a una disolución parcial en la suspensión, previa a la medición en el SEM en alto vacío. Además se observan las NEsAu adheridas a la superficie de los cristales del CI. La muestra de un polvo fino de β-CD exhibe una estructura tipo bloques, de bordes definidos, mientras que el polvo de MTX presenta estructuras esféricas.

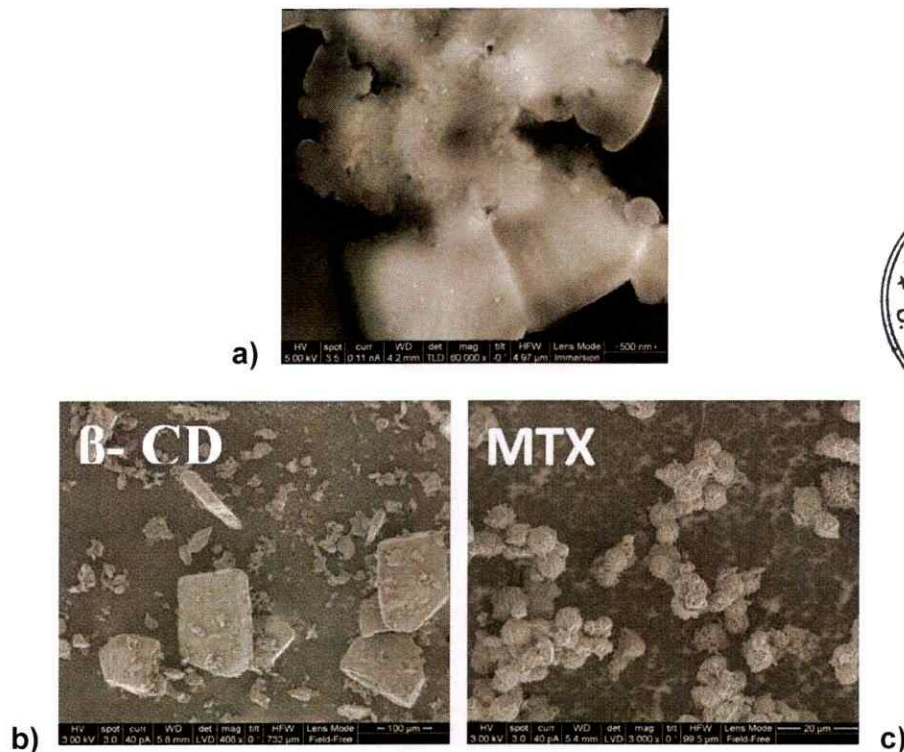


Figura IV. 19. Micrografías SEM a) del cristal del CI conjugado a las NEsAu y de los precursores b) β-CD, c) MTX.

IV.2.3.5 XPS

Se registraron espectros XPS de barrido general desde 0 a 1200 eV para determinar los átomos presentes en las muestras.

Las figuras IV.20 y IV.21 muestran los espectros generales del CI y del CI conjugado a las NEsAu respectivamente. Se observa un conjunto de señales correspondientes a los electrones 1s del C, 1s del O y 1s del N. En la muestra del CI conjugado a las NEsAu fue posible, además, obtener las señales de los electrones 4p, 4d y 4f del Au.

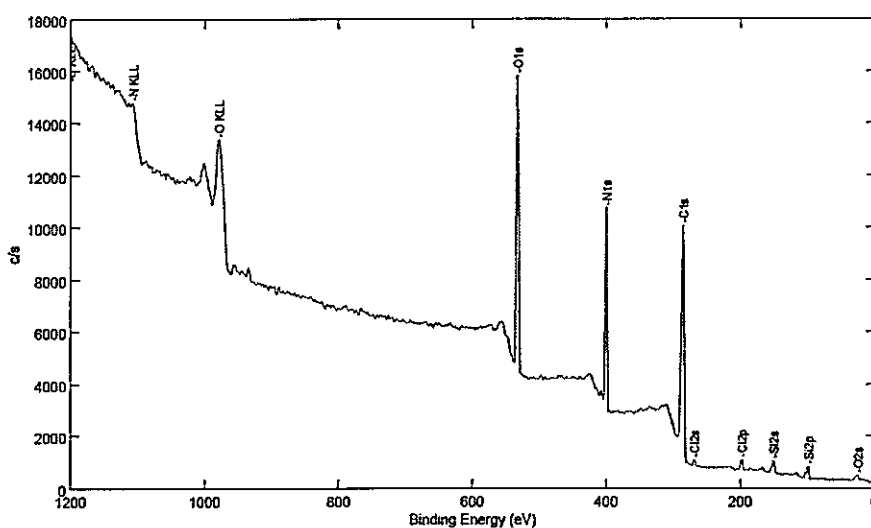


Figura IV. 20. Espectro general XPS del CI de β -CD/MTX.

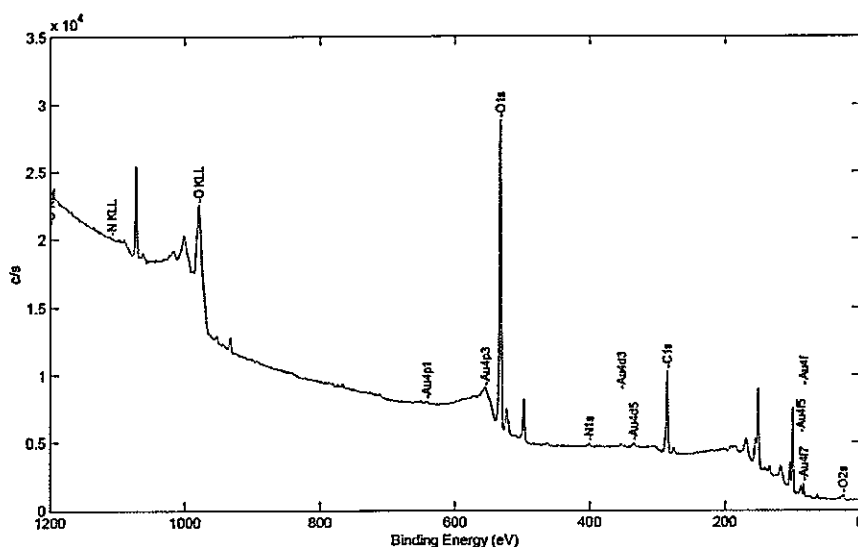


Figura IV. 21. Espectro general XPS de Cl de β -CD/MTX conjugado a las NEsAu.

Posteriormente se realizaron espectros de alta resolución para el electrón 1s del N y el 1s del O con el objetivo de analizar en detalle cada señal y determinar el tipo de interacción del Cl con las nanopartículas. Las energías de unión de las señales se obtuvieron usando como referencia el ajuste del C 1s en 284.8 eV.

La figura IV.22 a) muestra el espectro de alta resolución del N 1s del Cl de β -CD/MTX. Se observa una señal en 399.62 eV correspondiente a las dos aminas primarias del anillo de pteridina de la molécula de MTX, los que se encuentran desprotonados al pH de trabajo 7.4 (pK_a de 5.71) [49]. La ausencia de las señales correspondientes a los N del anillo de pteridina se debe, probablemente, a que éstos no se encuentran expuestos a la superficie, producto de la inclusión en la cavidad de la matriz de ciclodextrina.

La figura IV.45 b) muestra el espectro de alta resolución del orbital 1s del N en el Cl unido a las NEsAu. Se observa una señal de baja intensidad y poco definida en 399.69 eV correspondiente a las aminas primarias del anillo de

pteridina. La disminución de la intensidad y resolución de la señal se debe probablemente, a la presencia de las NEsAu, que cubren la superficie de la muestra limitando el área de análisis.

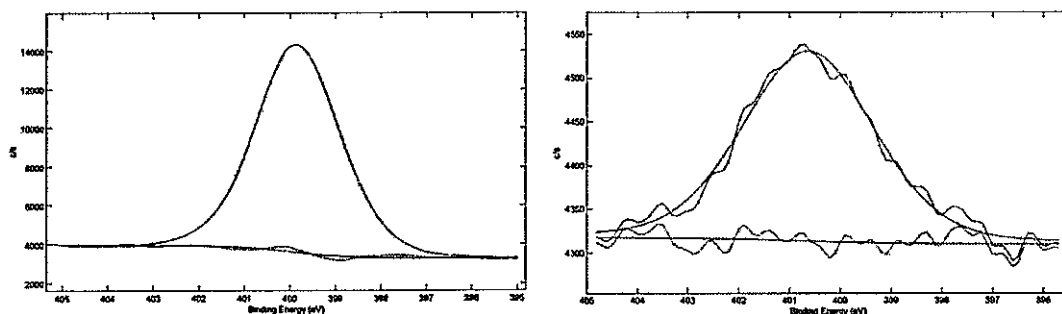


Figura IV. 22. Espectros XPS de alta resolución para las energías de unión de los electrones 1s del nitrógeno. a) β -CD/MTX y b) β -CD/MTX+NEsAu. Se observa el espectro original junto con las curvas de ajuste.

Por otra parte se analizaron las señales de los electrones del orbital 1s del oxígeno. La figura IV.23 a) muestra el espectro de alta resolución del O en el CI de β -CD/MTX observándose dos bandas en 531.43 eV y 532.50 eV.

La molécula de MTX posee dos ácidos carboxílicos con valores de pK_a 4.8 y 5.5. Bajo las condiciones de trabajo de pH 7.4, ambos ácidos se encuentran desprotonados. La banda de mayor intensidad en 532.50 eV corresponde así a los oxígenos de los grupos carboxilatos ($-\text{COO}^-$). La banda en 531.43 eV corresponde al oxígeno del grupo carbonilo ($>\text{C}=\text{O}$) [41].

La figura IV.23 b) muestra el espectro de alta resolución del CI unido a las NEsAu. Se observan nuevamente dos bandas en 532.15 eV y 532.77 eV. La banda en 532.15 eV corresponde a la del átomo de oxígeno de los grupos carboxilatos que interacciona con las NEsAu. La disminución en la energía de unión del electrón 1s del O desde 532.5 a 532.15 eV se debe al mayor apantallamiento, producido por la las NEsAu que entregan densidad electrónica

al oxígeno. Finalmente, la banda en 532.77 eV corresponde al grupo carbonilo. Con estos antecedentes, podemos concluir que la interacción entre la NEsAu y los grupos carboxilatos del MTX, son de tipo covalente coordinado [23].

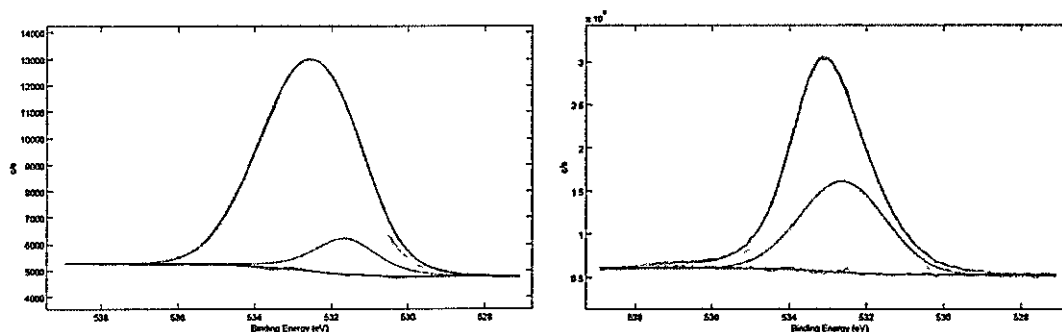


Figura IV. 23. Espectros XPS de alta resolución para las energías de unión de los electrones 1s del oxígeno. a) β -CD/MTX y b) β -CD/MTX+NEsAu. Se observa el espectro original junto con las curvas de ajuste.

IV.2.3.6 Electroforesis

Se realizó la evaluación de la movilidad de las especies supramoleculares en presencia de un campo eléctrico utilizando electroforesis en gel de agarosa. La migración de las especies está determinada por la carga y tamaño de las partículas. La figura IV.24 muestra la imagen del gel de agarosa y las respectivas migraciones de las especies NEsAu+ β -CD/MTX, NEsAu+MTX y NEsAu.

Se observa que tanto las NEsAu cubiertas por el CI de β -CD/MTX (muestra A) y las NEsAu cubiertas por MTX (muestra B) presentan movilidad electroforética, migrando hacia el ánodo, sin observarse inestabilidad de las especies (agregación observable a través de la formación de un color azulado). Esto se debe a que tanto el CI como MTX actúan como estabilizantes eficientes bajo las condiciones de trabajo, impidiendo la agregación de las nanopartículas.

Además al comparar las muestras A y B se observa que existe una menor movilidad hacia el ánodo de las NEsAu cubiertas con el CI de β -CD/MTX. Esto se debe probablemente, a que las dos cargas negativas que aportan los iones carboxilatos de MTX se encuentran enmascaradas, en parte, por la presencia de las ciclodextrinas.

En el pocillo C donde fueron depositadas las NEsAu, se observa una coloración azulina, característica de la agregación del coloide. Esto se debe probablemente a que el ión citrato no logra estabilizarlas frente a las condiciones de trabajo (pH 9 - 10 dado por el buffer TAE). Esta inestabilidad frente al buffer genera ausencia de migración, contrariamente a lo esperado para el tamaño de la NEs y la triple carga negativa otorgada por el ión citrato.

De los resultados anteriores se confirma que tanto las NEsAu cubiertas con el CI como las NEsAu cubiertas con MTX presentan carga negativa produciendo su migración hacia el ánodo. Por otra parte, se pudo confirmar la estabilidad e integridad de las NEsAu cuando están conjugadas al CI y cuando están cubiertas por el MTX en esas condiciones de trabajo.

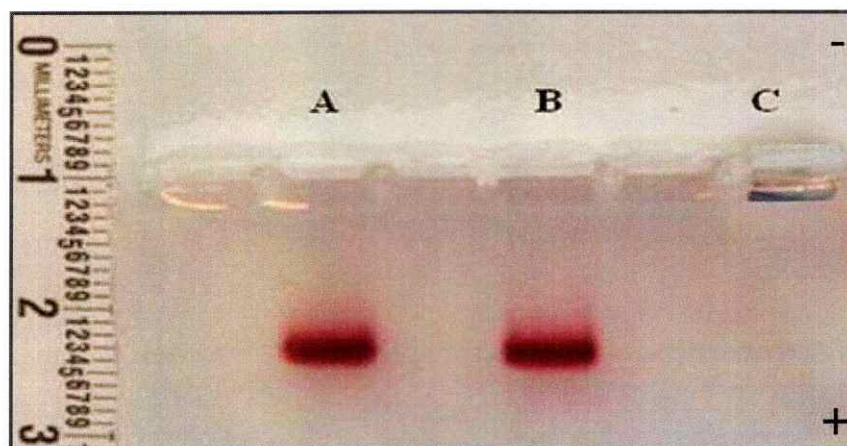


Figura IV. 24. Imagen de electroforesis en gel en 1D de agarosa al 1%, cargado con 20 μ g de muestra. A) NEsAu+CI, B) NEsAu+MTX, C) NEsAu.

IV.3 Obtención de NEsAu por método físico

Las NEsAu se obtuvieron mediante la técnica física de *sputtering*, a través del depósito sucesivo de átomos de oro sobre la superficie de los sustratos supramolecular [31]. La técnica de *sputtering* posee ventajas frente a métodos de obtención químicos de NEs debido, principalmente, a que no existe contaminación por solventes o moléculas de los precursores en la superficie.

IV.3.1 Espectrofotometría de reflectancia difusa UV-Vis

Los CI de α -CD/OA fueron expuestos al proceso de desintegración catódica durante 10 s. Posteriormente se registró el plasmón mediante espectrofotometría de reflectancia difusa UV-Vis, con el fin de evaluar la dependencia entre el tiempo de exposición y el tamaño de NEsAu.

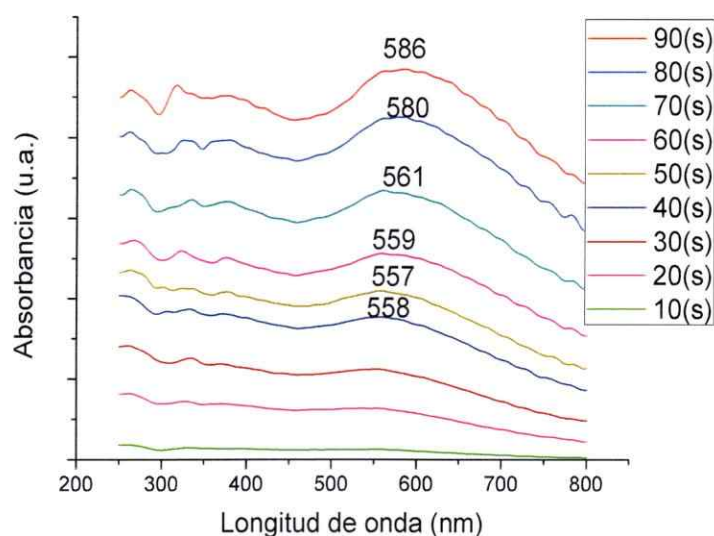


Figura IV. 25. Espectros de absorción de NEsAu obtenidas sobre los cristales del CI, registrados a diferentes tiempos de exposición al *sputtering*.

La figura IV.25 muestra los espectros de absorción del plasmón de las NEsAu registrados a diferentes tiempos de exposición al *sputtering*. Todos los espectros presentan un máximo de absorción entre 558 y 586 nm propiedad característica de las NEsAu, que aumenta en intensidad con el tiempo de exposición a la desintegración catódica. Los espectros presentan además, un desplazamiento del máximo de absorción hacia mayores longitudes de onda a medida que aumenta el tiempo de *sputtering*. Esto se debe al aumento de tamaño de la NEs. Los resultados confirman que, en esas condiciones de trabajo, la NEs se forman en la superficie del sustrato supramolecular y no en el plasma de la cámara de *sputtering*.

IV.3.2 TEM

Muestras con 10, 30, 60 y 90 s de exposición al *sputtering* fueron examinadas en el microscopio con el objetivo de obtener una relación entre el tiempo de exposición al *sputtering* y el tamaño de las NEsAu formadas por este método.

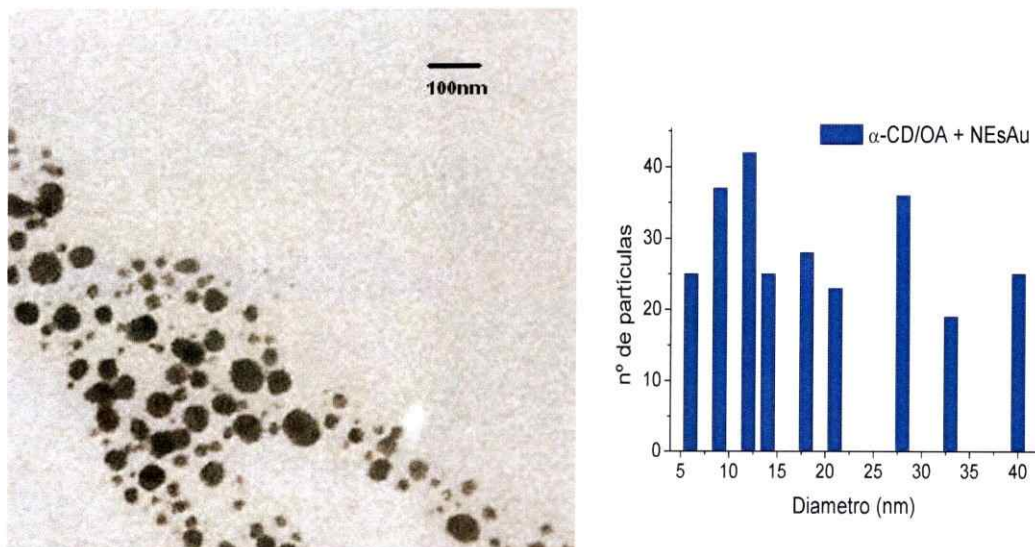


Figura IV. 26. Micrografía TEM e histograma del CI con NEsAu obtenidas luego de 30 s de exposición al *sputtering*.

La figura IV.26 muestra la micrografía TEM del CI con NEsAu. Se observan nanopartículas con gran polidispersión de tamaño y forma. El histograma muestra diámetros entre 6 y 40 nm para una población de 200 partículas.

Las micrografías TEM de CI expuestos a 10, 60 y 90 s de *sputtering* muestran resultados que no difieren significativamente a la que se presenta en la Figura IV.26 con polidispersión en tamaño y forma.

Debido a que los resultados no son reproducibles y no existe una dependencia entre el tiempo de *sputtering* y el tamaño de las NEsAu, el método físico de obtención de NEsAu fue descartado para los estudios de irradiación y con el CI de β CD/MTX. La caracterización completa del sistema es presentada en el anexo 3.

IV.4 Síntesis y caracterización de Nanobarras de oro

Las NbsAu fueron obtenidas por un método de síntesis mediada por núcleos el que consta de dos etapas, descrito por Nikoobakht y cols en el año 2003 [40]. En la primera etapa se sintetizaron los núcleos y posteriormente se preparó una solución de crecimiento. Esta síntesis tiene ventajas frente a otras debido a la reproducibilidad, control de tamaño y forma de las NbsAu obtenidas.

IV.4.1 Espectrofotometría de absorción

La figura IV.27 muestra el espectro de absorción de las NbsAu. Se observa la presencia de dos bandas, una en 512 nm correspondiente al plasmón transversal y en 800 nm el plasmón longitudinal lo que es característico de NbsAu que poseen una relación de aspecto de 4:1.

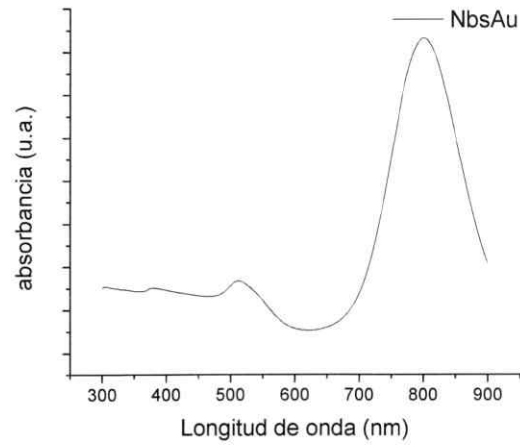


Figura IV. 27. Espectro de absorbancia de las NbsAu.

IV.4.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

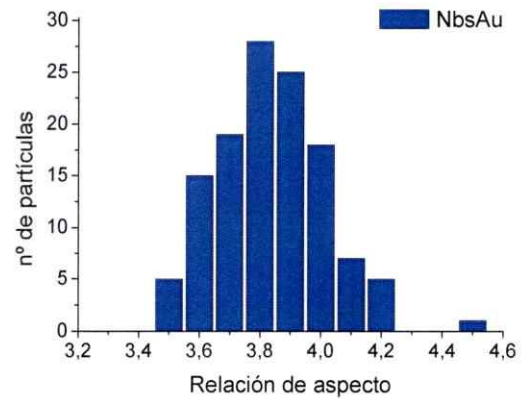
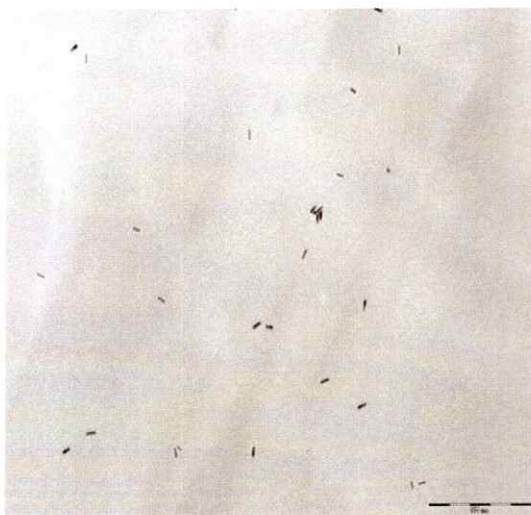


Figura IV. 28. Micrografías TEM e histograma de relación de aspecto de NbsAu.

La figura IV.28 muestra la micrografía TEM y su correspondiente histograma de las NbsAu estabilizadas en CTAB. Se observa una distribución homogénea en tamaño y forma. El histograma obtenido de una población de 120 partículas muestra una relación de aspecto de 3.8 ± 0.1 , con un largo de 38 nm y un ancho de 10 nm.

IV.5 Conjugación de las NbsAu al CI

IV.5.1 NbsAu conjugadas al CI de octilamina

IV.5.1.1 Espectrofotometría de absorción

En figura IV.29 se presenta el espectro de absorción de NbsAu y NbsAu conjugadas al CI. Se observa un desplazamiento batocrómico de ambas bandas de absorción, desde 510 a 515 nm (banda transversal) y desde 771 a 794 nm (banda longitudinal). Esto se debe al cambio en el entorno de la NbsAu producto de la unión al CI [55].

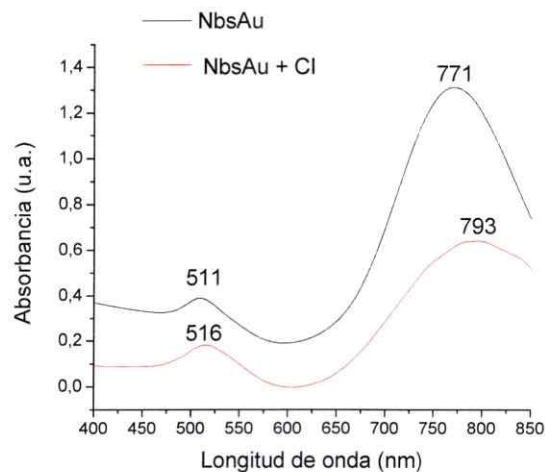


Figura IV. 29. Espectro de absorbancia de NbsAu estabilizadas en CTAB y de NbsAu conjugadas al CI.

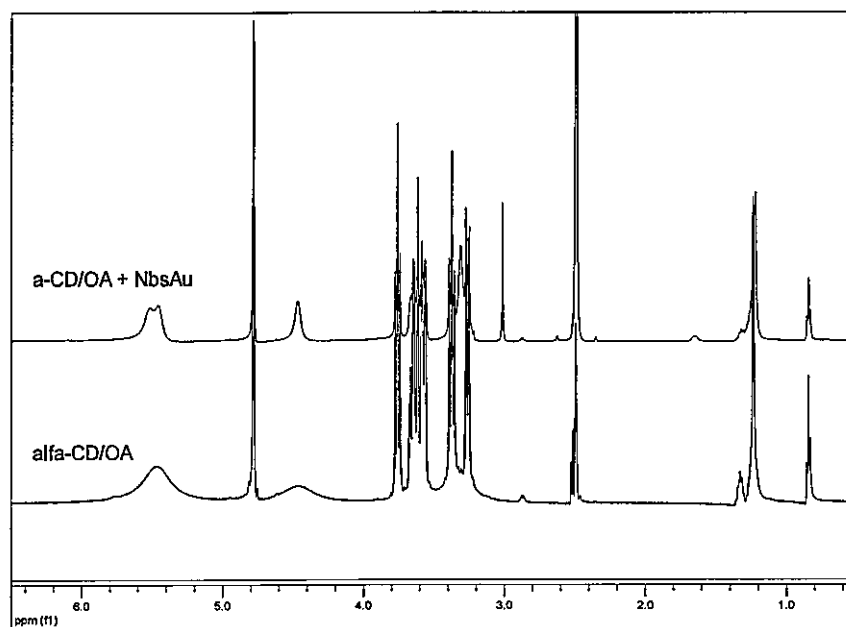
IV.5.1.2 ^1H -RMN

Figura IV. 30. Espectro RMN del CI y del CI conjugado a NbsAu en DMSO_d_6 .

La figura IV.30 muestran los espectros ^1H -RMN del CI y del CI conjugado a NbsAu complementados con las tablas IV.5 y IV.6 que muestran los desplazamientos químicos de los protones de la matriz de ciclodextrina y de la OA respectivamente. Se observa que la OA mantiene los desplazamientos químicos luego de la conjugación con las NbsAu, sin embargo existen variaciones en los desplazamientos químicos de la mayoría de los de los protones de la CD, además de una variación en los valores de las integrales. Esto puede ser explicado por la presencia de CTAB remanente (tabla IV.7), que interfiere en el análisis, debido a que sus protones coinciden con desplazamientos químicos de la OA.

Todos los protones externos de la ciclodextrina sufren corrimientos en los desplazamientos químicos producidos por la presencia de las NbsAu y del surfactante CTAB.

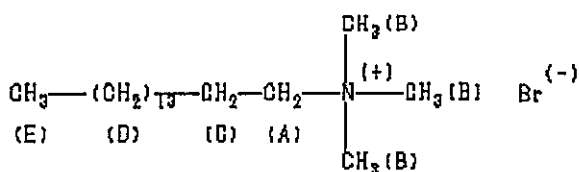
Tabla IV. 5. Desplazamientos químicos de los protones de la matriz en el CI y en el CI conjugado a NbsAu.

α-CD	H1 (ppm)	H2 (ppm)	H3 (ppm)	H4 (ppm)	H5 (ppm)	H6 (ppm)	OH(2) (ppm)	OH(3) (ppm)	OH(6) (ppm)
α-CD/OA	4.78	3.28	3.77	3.38	3.59	3.67	5.49	5.49	4.50
Integral	9.19	11.6	10.2	12.1	13.9	16.4	10.4	10.4	7.06
α-CD/OA+NbsAu	4.80	3.28	3.76	3.38	3.63	3.69	5.52	5.46	4.47
Integral	7.93	18.2	8.24	9.51	9.15	12.6	-	-	6.44

Tabla IV. 6. Desplazamientos químicos de los protones de la OA en el CI y en el CI conjugado a NbsAu.

OA	-CH ₃ (ppm)	-(CH ₂) _n - (ppm)	-CH ₂ - (ppm)
α-CD/OA	0.85	1.24	1.33
Integral	3.00	9.27	1.50
α-CD/OA+NbsAu	0,85	1,22	1,32
Integral	3.00	13.4	1.14

Tabla IV. 7. Desplazamientos químicos de los protones del CTAB, extraídos de la base de datos¹.



Protón	Corrimiento químico (ppm)
A	3.64
B	3.48
C	1.77
D	1.26
E	0.88

IV.5.1.3 DRXP

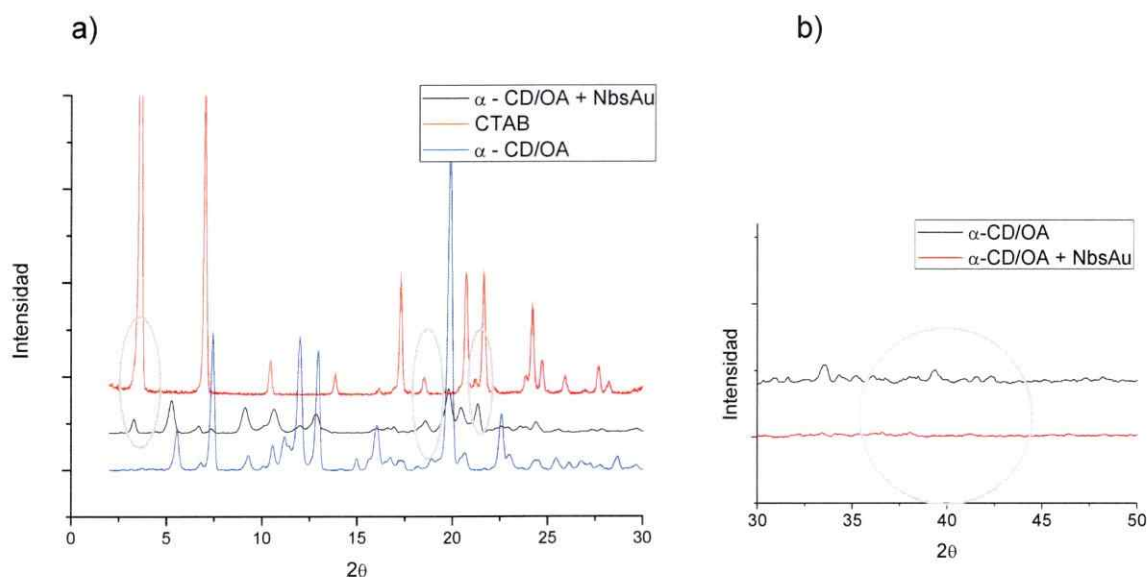


Figura IV. 31. a) Difractograma del CI y el CI conjugado a las NbsAu, b) región 2θ de los planos cristalográficos del oro.

La figura IV.31 a) muestra el difractograma del CI conjugado a las NbsAu el que presenta un patrón de difracción equivalente al del CI sin NPs. Sin embargo, existen algunos picos de baja intensidad que no indexaron para un patrón hexagonal. Estos picos pertenecen a planos de difracción de la estructura del CTAB remanente que cristaliza parcialmente sobre la superficie del cristal.

La figura IV.31 b) muestra el difractograma en la zona entre $38 < 2\theta < 45$ que corresponde a la región de los planos cristalográficos del oro. La ausencia de estos planos [(111), (200), (220), (331)] se debe probablemente, a la falta de periodicidad de las NEsAu y a su menor proporción en la muestra.

Tabla IV. 8. Tipo de sistema cristalino para el CI y el CI con NbsAu, grupo espacial y parámetros de red.

Muestra	Sistema cristalino	Grupo espacial	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)	Volumen Å ³
α -CD/OA	hexagonal	P6	23.634	23.634	15.786	90	90	120	7636.2
α -CD/OA+NbAu	Hexagonal	P6	23.801	23.801	15.734	90	90	120	7719.1

La tabla IV.8 muestra los resultados de la indexación de las líneas de difracción sobre la base de una red teórica hexagonal, con los parámetros de red; $a = b = 23.7 \text{ \AA}$, $c = 15.9 \text{ \AA}$ y $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120 \text{ \AA}$. Para la muestra de NbsAu conjugadas al CI. Se observa un aumento en el volumen de la celda unitaria.

IV.5.1.4 Análisis Térmicos

La figura IV.32 muestra el DSC y su TGA asociado de las NbsAu unidas al CI. El DSC muestra un pico endotérmico a 121.1°C y un pico exotérmico en 114.1°C . Este resultado difiere del obtenido en el CI sin nanomaterial, donde se apreciaban dos picos endo y exotérmicos. Esto se debe probablemente, a que la presencia de las NbsAu otorga rigidez al CI restringiendo variaciones conformacionales, producto del aumento en la temperatura.

El TGA muestra ausencia de pérdida de masa asociado a estos eventos térmicos. Una pérdida de masa de 6.13 % entre 25 y 112.2°C fue atribuida a la pérdida de moléculas de agua de humedad del CI.

Al comparar las temperaturas de descomposición del CI y del CI conjugado a NbsAu se encontró una disminución en la temperatura de descomposición en la muestra de CI conjugado NbsAu debido, probablemente, a la fusión del CTAB en 247°C .

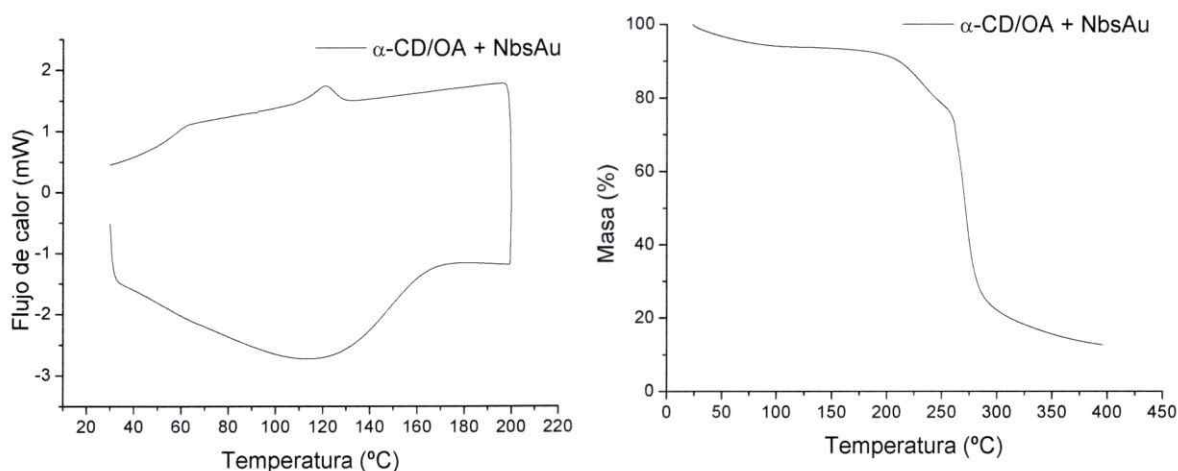


Figura IV. 32. DSC y TGA del CI conjugado a las NbsAu.

IV.5.1.5 TEM

La figura IV.33 muestra la micrografía TEM e histograma de las NbsAu unidas al CI. Se observa una distribución homogénea tanto en tamaño como forma de las NbsAu, con bajo grado de agregación. El histograma obtenido de una población de 40 partículas muestra una relación de aspecto de 3.8 ± 0.1 .

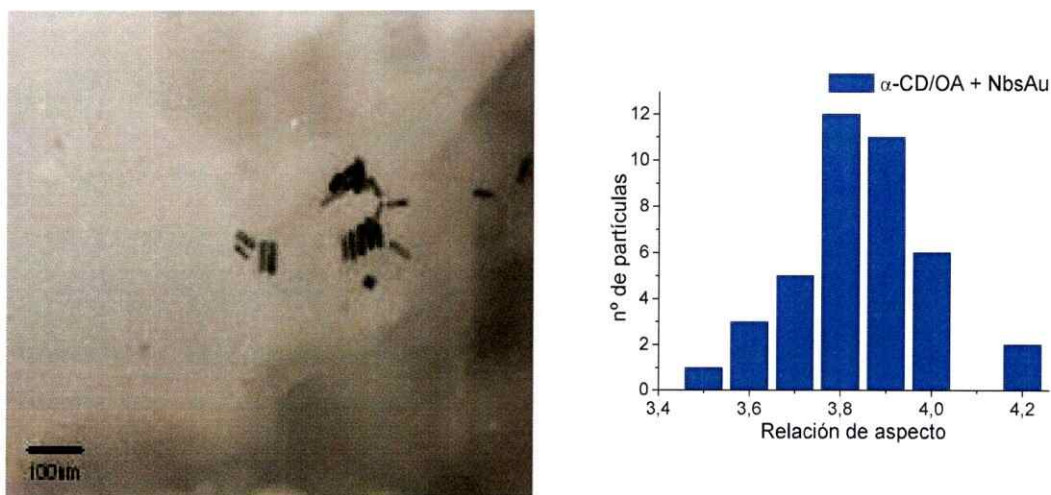


Figura IV. 33. Micrografías TEM e histograma de las NbsAu conjugadas al CI.

IV.4.4.6 SEM y EDS

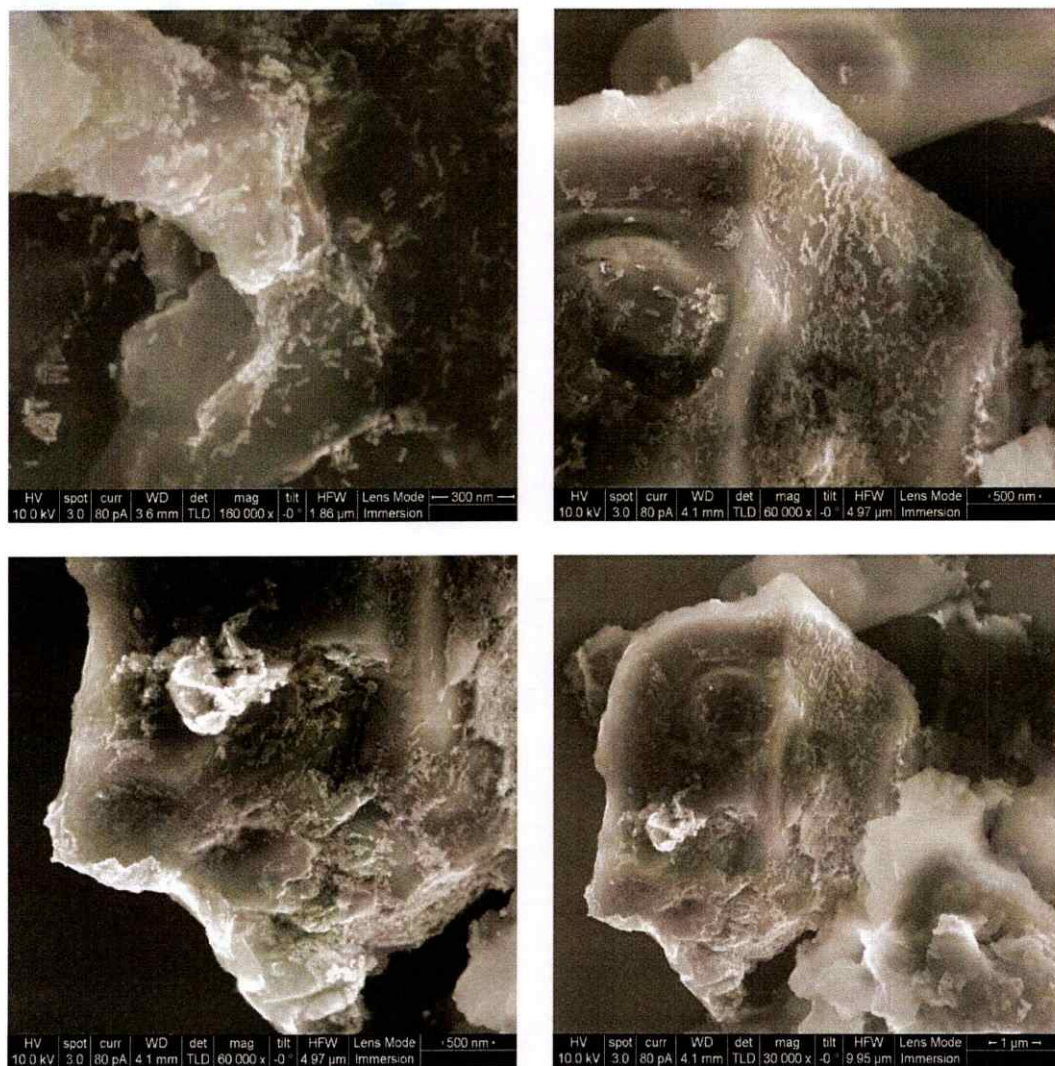


Figura IV. 34. Micrografías SEM de las NbsAu unidas al CI de α -CD/OA a distintos aumentos.

La figura IV.34 muestra las micrografías SEM de las NbsAu conjugadas al CI. Se observa una distribución homogénea de las NbsAu que mantienen su tamaño y forma luego de unirse al CI. Los cristales del CI muestran su morfología hexagonal original, sin embargo los bordes se encuentran poco

definidos, debido a una disolución parcial del CI al realizar la suspensión previa a la medición en alto vacío.

La figura IV.35 muestra el espectro EDS y su correspondiente SEM de una muestra de NbsAu conjugadas al CI, observándose abundancia de C y O provenientes de los componentes orgánicos del CI, y Au, proveniente de las NbsAu unidas al CI. La presencia de bromo corrobora nuevamente el CTAB remanente.

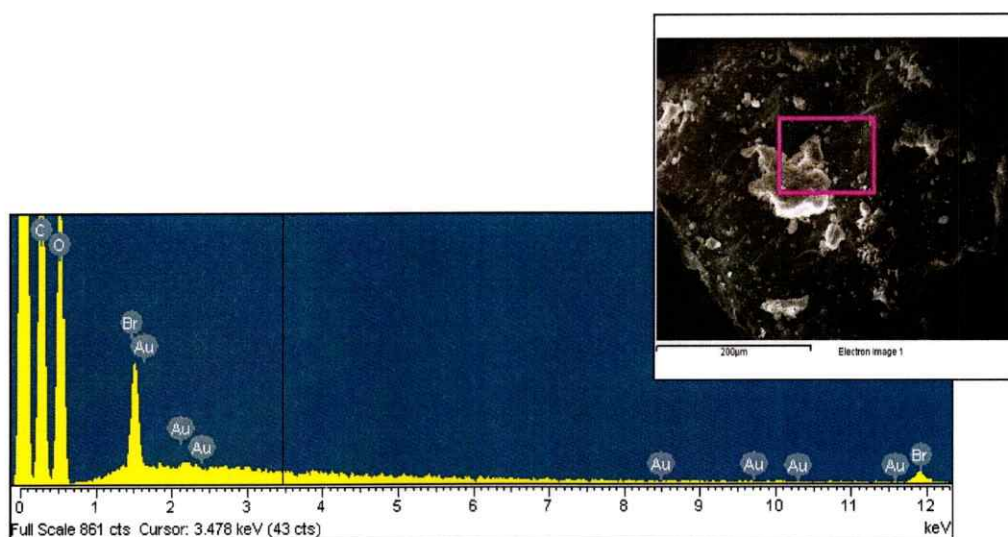


Figura IV. 35. Espectro EDS del fragmento seleccionado de la micrografía SEM de NbsAu unidas al CI de α -CD/OA.

IV.5.2 NbsAu conjugadas al CI de MTX

IV.5.2.1 Espectrofotometría de absorción

La figura IV.36 corresponde al espectro de absorción de las NbsAu conjugadas al CI de β -CD/MTX. Se observa un desplazamiento batocrómico del máximo de absorción de ambas bandas. La banda transversal es desplazada desde 512 a 519 nm y la longitudinal desde 752 a 764 nm. Esto se debe al cambio en el entorno de la NbsAu producto de la conjugación al CI.

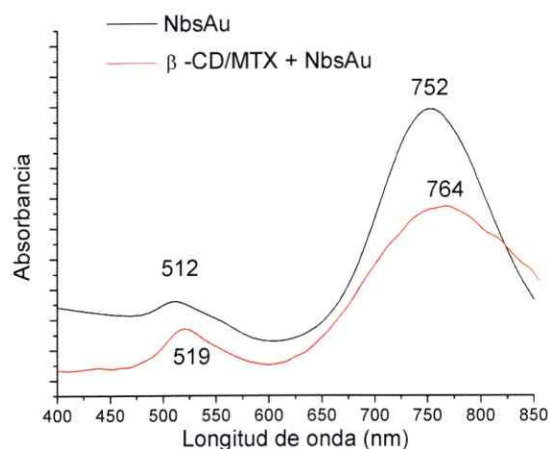


Figura IV. 36. Espectro de absorción de las NbsAu y de las NbsAu conjugadas al CI de β -CD/MTX.

IV.5.2.2 TEM

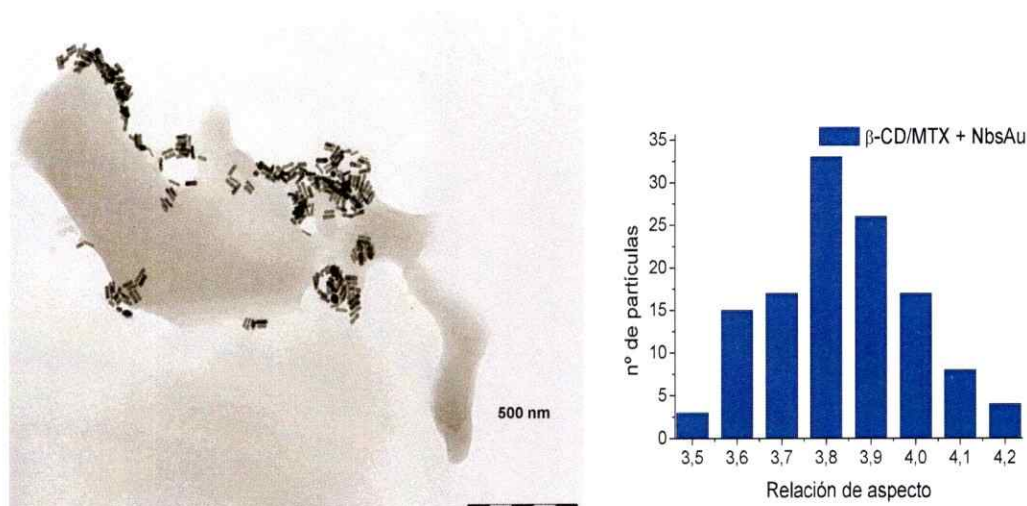


Figura IV. 37. Micrografías TEM e histograma de las NbsAu conjugadas al CI de β -CD/MTX.

La figura IV.37 muestra una micrografía TEM y su correspondiente histograma de las NbsAu conjugadas al CI de β -CD/MTX, donde se observa que las NbsAu se mantienen unidas al CI conservando la forma y tamaño original. El histograma obtenido de una población de 200 partículas muestra una relación de aspecto de 3.8 ± 0.1 .

IV.5.2.3 SEM

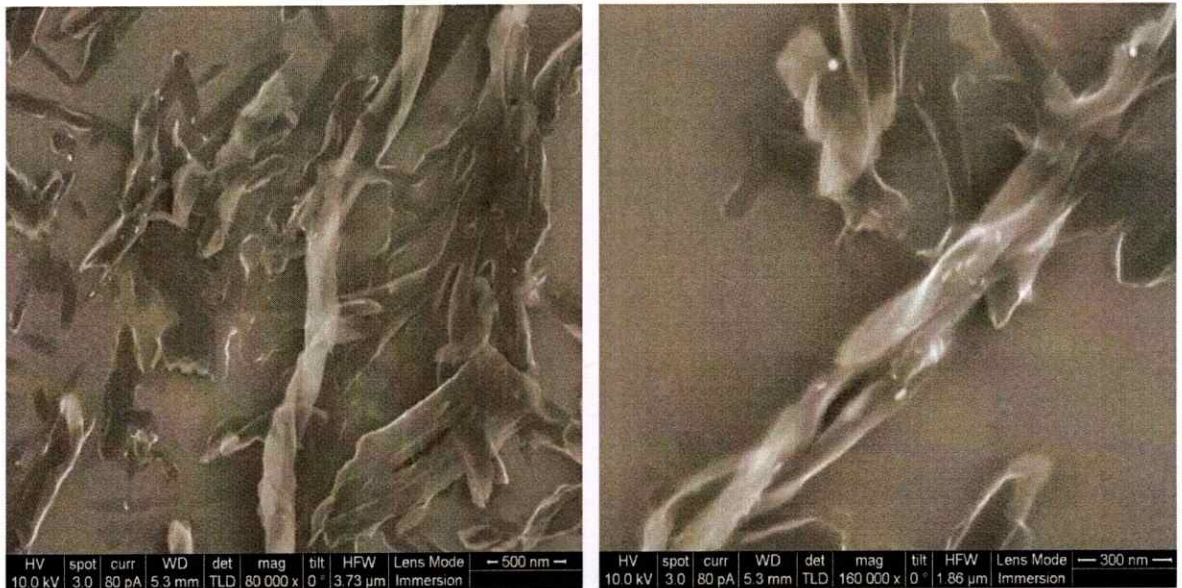


Figura IV. 38. Micrografías SEM de NbsAu conjugadas al CI de β -CD/MTX a diferentes aumentos.

La figura IV.38 muestra las micrografías SEM de las NbsAu conjugadas al CI. Se observa además una pérdida de morfología de los cristales del CI debido a su disolución parcial en la preparación de la muestra.

**CAPÍTULO V: IRRADIACIÓN DEL COMPUESTO DE
INCLUSIÓN CON OCTILAMINA**

V.1 Estudio de ^1H -RMN a temperatura variable

El cambio de fase reversible observado por calorimetría diferencial de barrido puede ser atribuido al desensamble del compuesto de inclusión de octilamina. Para corroborar estos reordenamientos supramoleculares se realizó un monitoreo mediante ^1H -RMN a temperatura variable, registrando espectros cada 10 °C de 27 a 127 °C

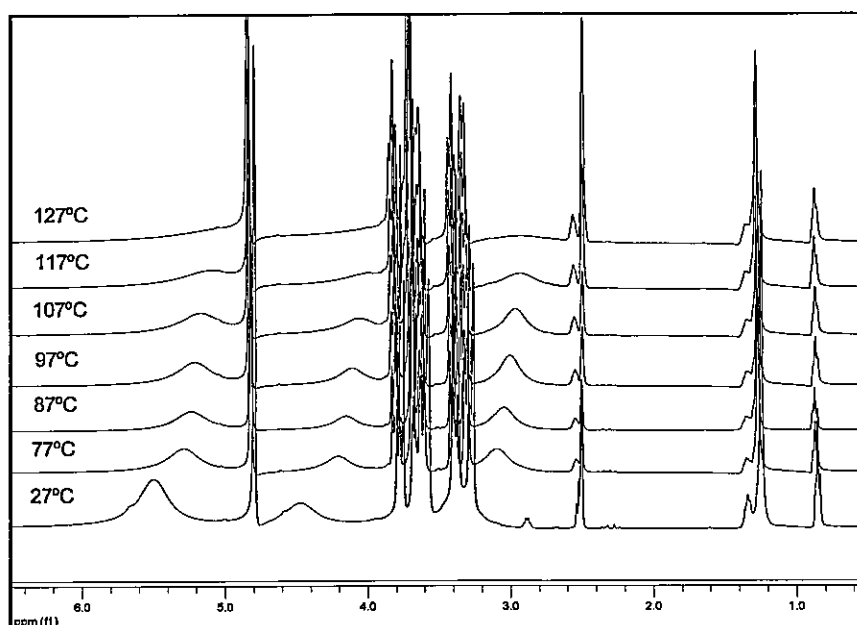


Figura V. 1. Espectros ^1H -RMN del CI con NEsAu a medida que se aumenta la temperatura.

En los espectros de la figura V.1 se observa que las señales de los protones de la matriz como y del huésped sufren modificaciones en los desplazamientos químicos a medida que aumenta la temperatura. La tabla V.1, muestra los desplazamientos químicos de los protones de la matriz. Los corrimientos químicos de los protones H4, H3, H5 y H6 son desplazados hacia campos menores, provocado por una disminución de la densidad electrónica que

experimenta la cavidad como efecto de la salida del huésped al aumentar la temperatura. Los protones de los grupos hidroxilos, -OH6, H1, -OH2 y -OH3, que se encuentran hacia el exterior de la cavidad, se desplazan a campos mayores provocado por un aumento de la densidad electrónica debido, probablemente, a la ruptura de los puentes de hidrógeno que forman los grupos -OH de moléculas de ciclodextrinas adyacentes.

Tabla V. 1 Desplazamientos químicos de α -CD en el CI conjugado con NEsAu a medida que se aumenta la temperatura.

Temperatura (°C)	H1 (ppm)	H2 (ppm)	H3 (ppm)	H4 (ppm)	H5 (ppm)	H6 (ppm)	OH(2) (ppm)	OH(3) (ppm)	OH(6) (ppm)
27	4.79	3.27	3.77	3.38	3.59	3.65	5.49	5.49	4.47
77	4.82	3.31	3.81	3.40	3.62	3.61	5.28	5.28	4.20
87	4.82	3.32	3.81	3.41	3.63	3.70	5.24	5.24	4.15
97	4.83	3.34	3.82	3.41	3.64	3.70	5.20	5.20	4.11
107	4.83	3.33	3.82	3.41	3.64	3.71	5.15	5.15	4.06
117	4.84	3.34	3.83	3.42	3.65	3.72	5.05	5.05	4.01
127	4.84	3.35	3.83	3.42	3.66	3.73	-	-	-

Por otra parte se observa que todos los protones de la OA experimentan desplazamientos en los corrimientos químicos hacia campos menores con el aumento de la temperatura, tabla V.2.

Los corrimientos químicos de la OA en el CI en presencia de NEsAu a la temperatura 117 °C son equivalentes a los de la OA libre disuelta en DMSO_{d6}. Este resultado permite afirmar que la molécula OA huésped migra fuera de la cavidad de la CD matriz a esa temperatura.

Tabla V. 2. Desplazamientos químicos de OA pura y OA en el CI conjugado con NEsAu a diferentes temperaturas, ambas disueltas en DMSO-d₆.

Muestra	Temperatura (°C)	CH ₃ (ppm)	-(CH ₂) _n - (ppm)	-CH ₂ - (ppm)
α-CD/OA+NEsAu	27	0.85	1.23	1.31
	77	0.89	1.28	1.36
	87	0.88	1.28	1.36
	97	0.88	1.29	1.36
	107	0.89	1.29	1.37
	117	0.89	1.30	1.37
	127	0.89	1.30	1.37
OA	27	0.89	1.30	1.37

Una nueva señal que aparece con el aumento de la temperatura en aproximadamente 3.1 ppm puede ser atribuida a los átomos de hidrógeno de las moléculas de agua presentes en la CD. Las moléculas de agua que se encuentran próximas a una macromolécula se ubican en sitios y orientaciones preferenciales, experimentando movimientos anisótropos que las diferencian de aquellas que se encuentran más alejadas. Las moléculas de CD poseen una gran capacidad de ligar moléculas de agua, formando puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilos de los bordes de su estructura. El aumento de la temperatura produce la liberación de moléculas de agua debido, probablemente, a la ruptura de los puentes de hidrógeno provocando un aumento de la densidad electrónica, desplazando su señal a campos mayores. La ausencia de señal a 27 °C se puede explicar por el solapamiento con las señales de los hidrógenos de CD.

Posterior a la secuencia de calentamiento la muestra se dejó enfriar hasta los 27 °C y se procedió a registrar nuevamente el espectro ¹H-RMN (anexo 5).

Todos los desplazamientos químicos encontrados, tanto de la molécula huésped como la matriz fueron equivalentes a los encontrados en la muestra, antes del proceso de calentamiento, tabla V.3 y V.4.

Tabla V. 3. Desplazamientos químicos de α -CD en el CI conjugado con NEsAu a 27 °C de la muestra inicial y posterior a la secuencia de calentamiento a la misma temperatura.

Temperatura (°C)	H1 (ppm)	H2 (ppm)	H3 (ppm)	H4 (ppm)	H5 (ppm)	H6 (ppm)	-OH(2) (ppm)	-OH(3) (ppm)	-OH(6) (ppm)
27	4.79	3.27	3.77	3.38	3.59	3.65	5.49	5.49	4.47
27 luego de calentar	4.79	3.27	3.77	3.38	3.59	3.65	5.49	5.49	4.47

Tabla V. 4. Desplazamientos químicos de OA en el CI conjugado con NEsAu a 27°C de la muestra inicial y posterior a la secuencia de calentamiento a la misma temperatura.

Temperatura (°C)	CH ₃ (ppm)	-(CH ₂) _n - (ppm)	-CH ₂ - (ppm)
27	0.85	1.23	1.31
27 luego de calentar	0.85	1.23	1.31

Los resultados obtenidos concuerdan con un cambio estructural reversible, comparable al observado mediante estudios de calorimetría diferencial de barrido. Dicho cambio es atribuible a la salida de la molécula de octilamina de la cavidad de la matriz de α -CD producido por aumento de la temperatura.

Un estudio equivalente de ¹H-RMN a temperatura variable fue realizado para el CI unido a NbsAu, obteniéndose resultados similares a los encontrados en los experimentos con las AuNEs.

La figura V.2 muestra los espectros ¹H-RMN a diferentes temperaturas de muestras de CI conjugado a NbsAu. Todos los protones de la matriz y de la OA huésped experimentaron corrimientos en los desplazamientos químicos con el aumento de la temperatura. En la tabla V.5 se muestran los desplazamientos a

campo bajo que sufren los protones H2, H4, H3, H5 y H6 de la α -CD, producto de la salida de la OA de la matriz. El desplazamiento hacia campos altos de los protones OH6, H1, OH2 y OH3 se debe a un aumento de la densidad electrónica provocado por la ruptura de los puentes de hidrógeno, entre los grupos -OH de moléculas de ciclodextrinas adyacentes. Los hidrógenos de la OA sufren desplazamientos químicos hacia campos bajos debido a la migración de la OA de la cavidad matricial al aumentar la temperatura.

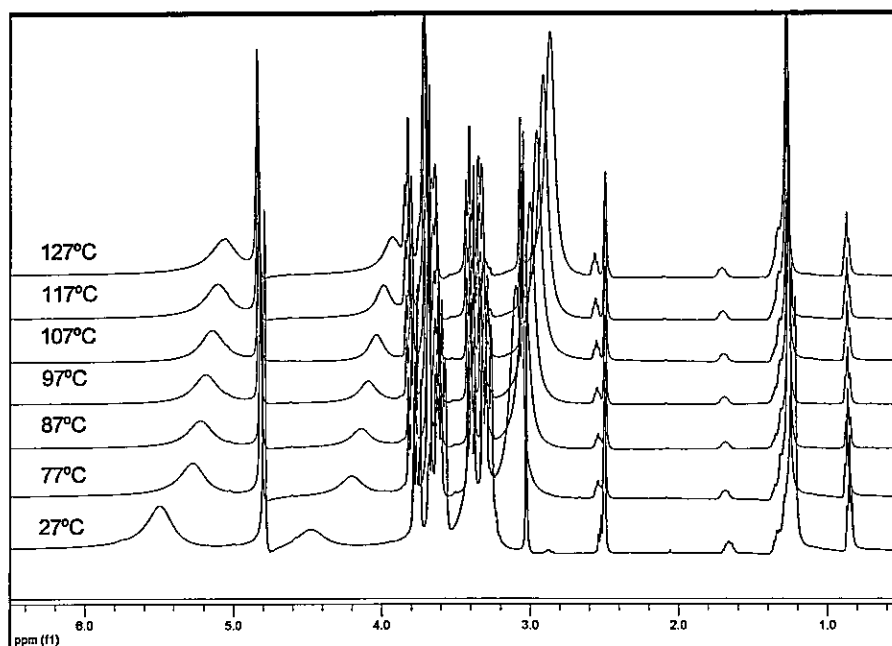


Figura V. 2. Espectros ¹H-RMN del CI conjugado a NbsAu a medida que se aumenta la temperatura.

Tabla V. 5. Desplazamientos químicos de α -CD en el CI conjugado a las NbsAu a medida que se aumenta la temperatura.

Temperatura (°C)	H1 (ppm)	H2 (ppm)	H3 (ppm)	H4 (ppm)	H5 (ppm)	H6 (ppm)	-OH(2) (ppm)	-OH(3) (ppm)
27	4.80	3.28	3.76	3.38	3.63	5.52	5.46	4.47
77	4.82	3.31	3.80	3.40	3.63	5.26	5.26	4.20
87	4.82	3.31	3.80	3.40	3.47	5.22	5.22	4.14
97	4.82	3.32	3.81	3.40	3.63	5.18	5.18	4.09
107	4.83	3.33	3.81	3.41	3.64	5.15	5.15	4.04
117	4.83	3.34	3.82	3.41	3.65	5.10	5.10	3.99
127	4.84	3.34	3.83	3.41	3.65	5.05	5.05	3.93
27 luego de calentar	4.80	3.30	3.77	3.39	3.59	5.47	5.47	4.46

Tabla V. 6. Desplazamientos químicos de OA en el CI conjugado a las NbsAu a medida que se aumenta la temperatura.

Temperatura (°C)	CH ₃ (ppm)	-(CH ₂) _n - (ppm)	-CH ₂ - (ppm)
27	0.85	1.22	1.32
77	0.87	1.26	1.32
87	0.87	1.27	1.32
97	0.87	1.27	1.32
107	0.88	1.28	1.33
117	0.88	1.28	1.33
127	0.88	1.29	1.34
27 luego de calentar	0.85	1.22	1.32

Posterior al proceso de calentamiento y enfriamiento del CI con NbsAu se procedió a registrar nuevamente el espectro ¹H-RMN a los 27 °C y se comparó con el de la muestra inicial, observándose pequeñas diferencias, principalmente en los protones externos de la ciclodextrina. Estas diferencias pueden ser atribuidas a la presencia de CTAB libre desprendido irreversiblemente de la

superficie de las NbsAu que interactúan con los protones de la α -CD a esa temperatura.

Se confirma de esta manera que el cambio de fase reversible observado por calorimetría diferencial de barrido, corresponde a un cambio estructural en el CI, producto de la salida de la octilamina de la cavidad de la matriz de α -CD con el aumento de la temperatura de tipo reversible.

Con la información obtenida mediante los estudios de ^1H -RMN a temperatura variable se ideó una serie de experimentos esperando encontrar resultados semejantes provocados por la fototermia de NPsAu cuando son irradiadas con láser. Se procedió así, a realizar el estudio de los cambios en la estructura del CI producidos por irradiación en función del tiempo y potencia del láser. Sin embargo, los resultados obtenidos no resultaron concluyentes debido a que los tiempos de detección de las técnicas utilizadas, no permitieron registrar los cambios estructurales reversibles en el CI por el efecto de irradiación (anexo 5). Por otra parte se realizaron experimentos con el fin de determinar el calor generado por las NbsAu presentes en la solución. Mediante la utilización de un termómetro láser se registró la temperatura de la solución, sin embargo, los valores obtenidos no fueron representativos de la temperatura local real presente en el entorno de la NbsAu.

En base a los resultados poco concluyentes, se ideó una nueva estrategia para estudiar los efectos producidos en el CI por fototermia. Para ello, se realizó la funcionalización de vidrios como sustratos para la realización de estudios *in situ* y posterior caracterización mediante SEM y Microscopía de fuerza atómica (AFM).

V.2 Estudio por AFM del efecto de la irradiación láser sobre CI conjugados a NPs

La figura V.3 esquematiza las diferentes etapas que componen el proceso de funcionalización de vidrios con NEsAu [56]–[58]. En una primera etapa se activó el vidrio con solución pirafña, produciendo la hidrólisis de los grupos silano de la superficie, dejando expuestos los grupos –OH.

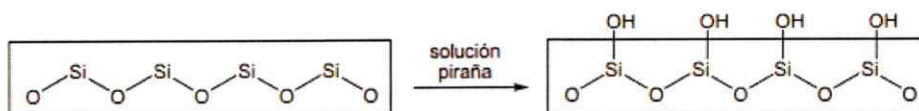


Figura V. 3. Esquema general de la activación de la superficie de un vidrio.

Luego se procedió a derivatizar la superficie con el organosilano APTMS, el cual se une al grupo hidroxilo mediante una quimisorción con el metoxisilano. Posteriormente se funcionalizaron los vidrios con NEsAu, las cuales fueron estabilizadas por los grupos aminos del silano que quedan expuestos hacia el exterior del vidrio. Finalmente se dejó cristalizar el CI de α -CD/OA (disuelto DMSO) sobre los vidrios funcionalizados con NEsAu.

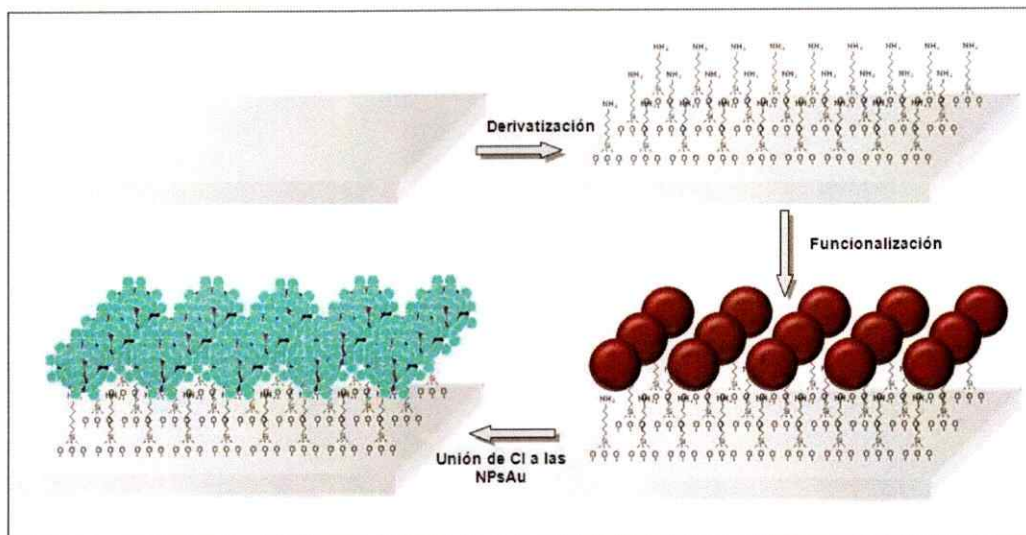
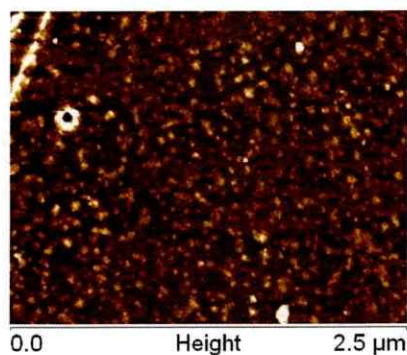


Figura V. 4. Representación esquemática de las etapas de funcionalización del vidrio.

V.2.1 Caracterización de las etapas de funcionalización del vidrio

V.2.1.1 Derivatización con APTMS

a)



b)

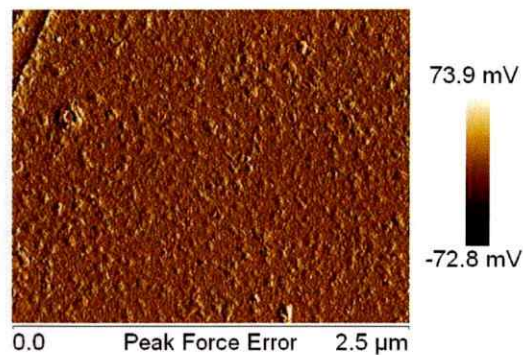


Figura V. 5. Micrografías del vidrio derivatizado con (3-aminopropyl)-trimetoxisilano, por; a) AFM en modo altura y b) AFM modo fuerza y error.

La figura V.5 muestra la micrografía AFM del vidrio derivatizado. Se observa una superficie rugosa debido a la derivatización irregular de las moléculas de (3-aminopropyl)-trimetoxisilano sobre el vidrio.

La figura V.6 muestra una micrografía AFM del vidrio funcionalizado con las NEsAu, en donde se observa mayoritariamente partículas esféricas depositadas homogéneamente sobre el vidrio derivatizado. El histograma de altura, calculado para una población de 60 partículas entrega valores de altura entre 10 y 15 nm.

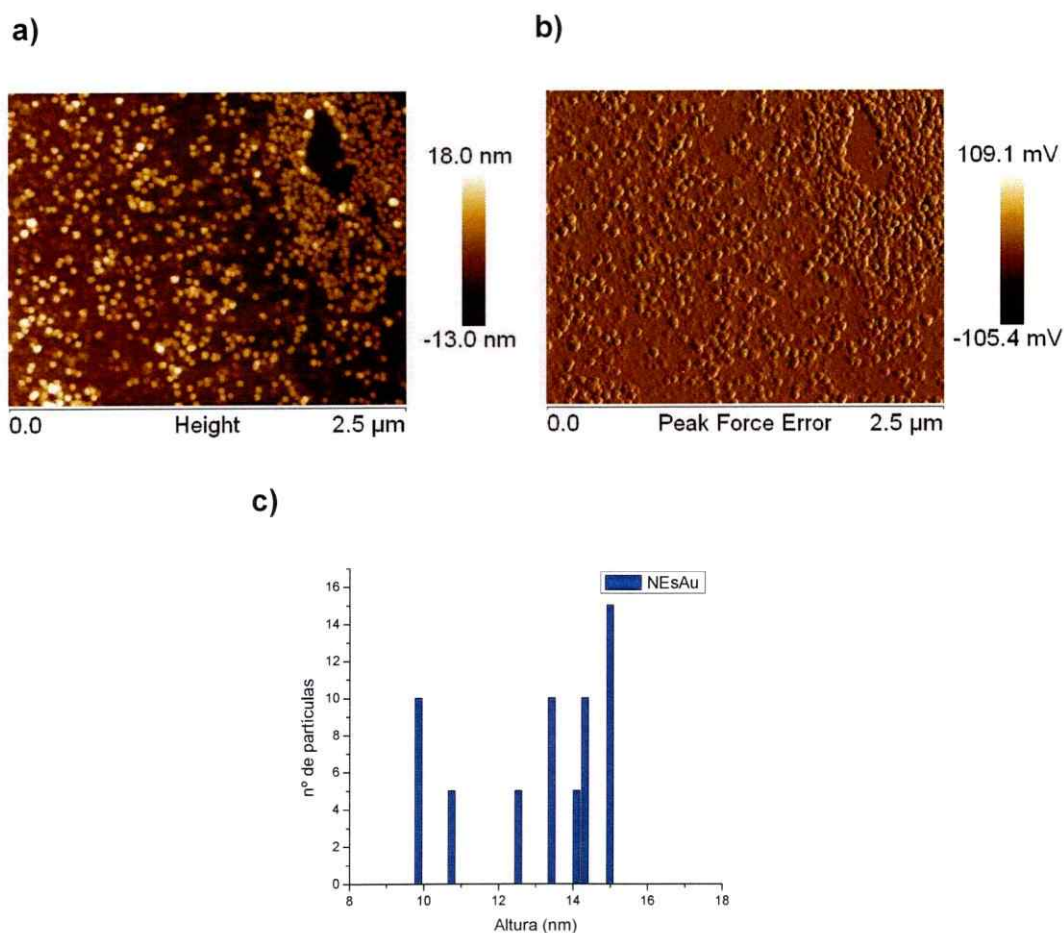


Figura V. 6. Micrografía AFM a) en modo altura y b) en modo fuerza y error del vidrio funcionalizado con NEsAu. c) Histograma de altura de las partículas en la micrografía.

La figura V.7 muestra una micrografía AFM del vidrio funcionalizado con NEsAu y su grafico correspondiente que detalla la altura y diámetro de dos NEs seleccionadas. Estas presentan alturas próximas a 13 nm y un diámetro cercano a 70 nm. Los resultados son inconsistentes, para el caso de partículas esféricas debido al llamado “efecto de convolución” que afecta a la punta de AFM. Este efecto es característico e inherente a la microscopía de fuerza atómica y no puede ser eliminado completamente. Cualquier imagen AFM es una convolución de la forma de la punta y la forma de la muestra. Esto provoca que las partículas que sobresalen aparezcan más anchas, y que los agujeros se vean más pequeños, figura V.8.

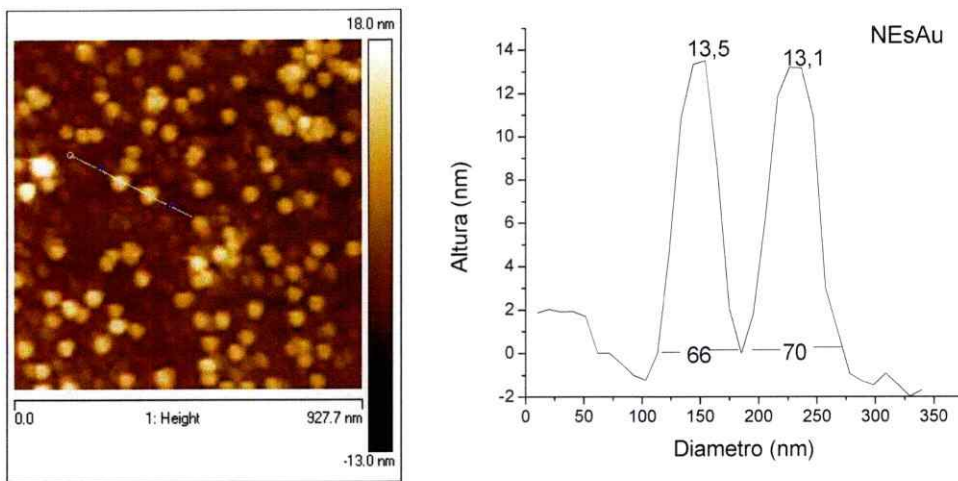


Figura V. 7. a) Micrografía AFM en modo altura de las NEsAu, b) detalle de altura y diámetro de dos NEsAu analizadas.

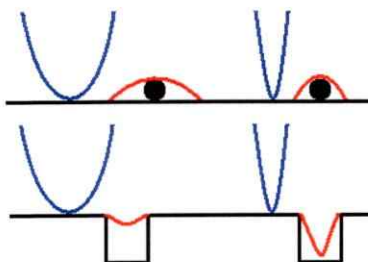


Figura V. 8. Ilustración del efecto de convolución de la punta de AFM y de la imagen que aparece en la micrografía (rojo).

V.2.1.3 Conjugación del Cl a las NEsAu

Por medio de AFM fue posible evidenciar la presencia del Cl depositado sobre las NEsAu, observando en la figura V.9 a) un aumento considerable en el diámetro y altura de las NEsAu. En el histograma de la figura V.9 a), se observa una población de partículas que mantiene la altura entre 10 y 15 nm, que corresponde a NEsAu que no se les depositó Cl apareciendo, sin embargo, una nueva población de partículas entre los 15 hasta 34 nm, correspondientes a NEsAu cubiertas por el Cl.

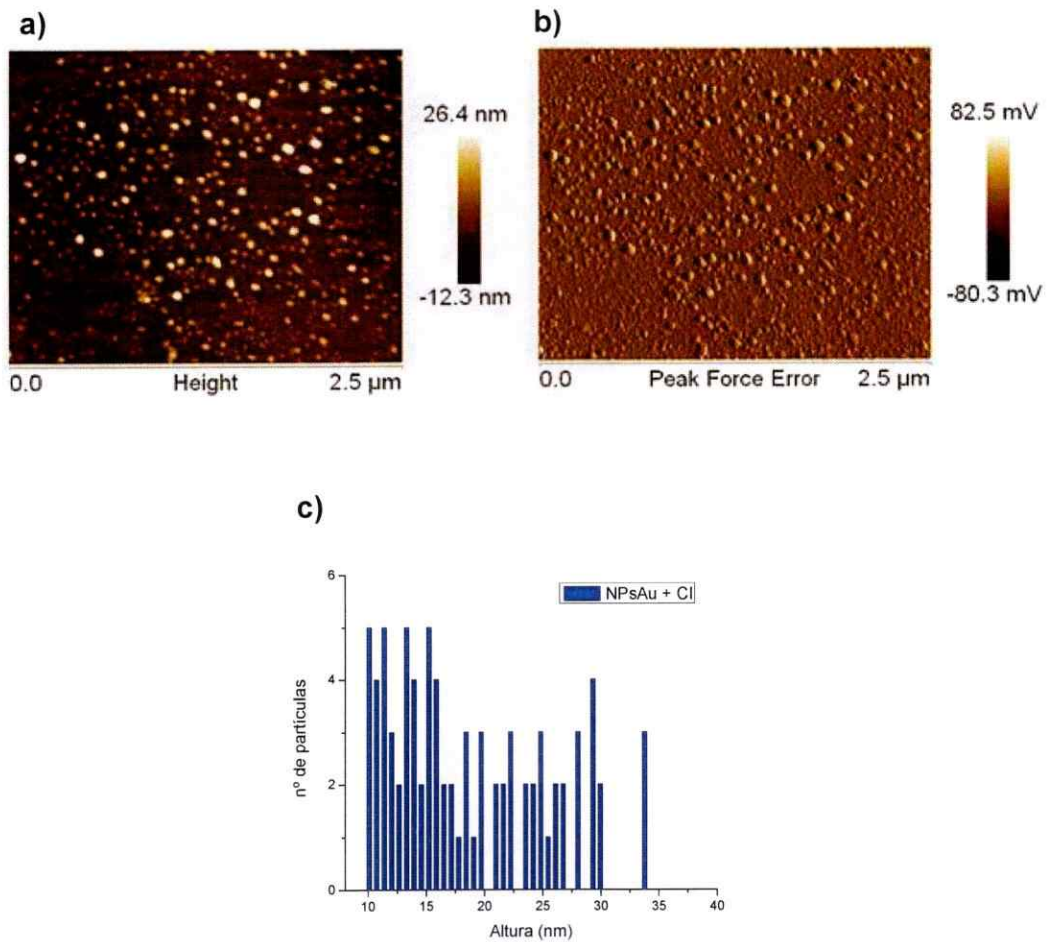


Figura V. 9. Micrografía AFM a) en modo altura y b) en modo fuerza y error del vidrio funcionalizado con NEsAu. c) Histograma de altura de las partículas en la micrografía.

V.2.1.4 Irradiación de los vidrios funcionalizados

Para estudiar el efecto de la irradiación sobre los vidrios funcionalizados con NEsAu cubiertas por el Cl se agregó una gota de agua sobre la muestra y se realizó el control previo a la irradiación, figura V.10. Posteriormente se registraron imágenes de manera continua cada 15 min por un periodo de 6 h de irradiación (momento en que la gota se evaporó completamente).

Las micrografías de la figura V.11 muestran que posterior al proceso de irradiación se produce una disminución drástica de la altura de las NEsAu cubiertas por el CI. Los histogramas muestran además una disminución de la población de partículas con altura sobre los 15 nm, y ausencia de partículas de altura entre los 22 a 34 nm. A la vez se observa un aumento en la población de partículas con altura entre 10 a 15 nm, valores semejantes a los obtenidos en el vidrio funcionalizado solo con NEsAu. Esto es una evidencia de que gran parte de la población de Nps perdieron parcial y/o totalmente el CI que cubría su superficie, como consecuencia del calor plasmónico generado por la irradiación.

El experimento se realizó registrando micrografías durante 6 h de irradiación, observándose una disminución en la altura de las partículas durante los primeros 15 min de registro.

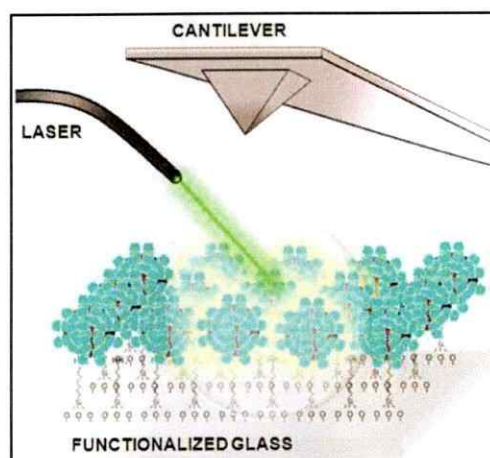
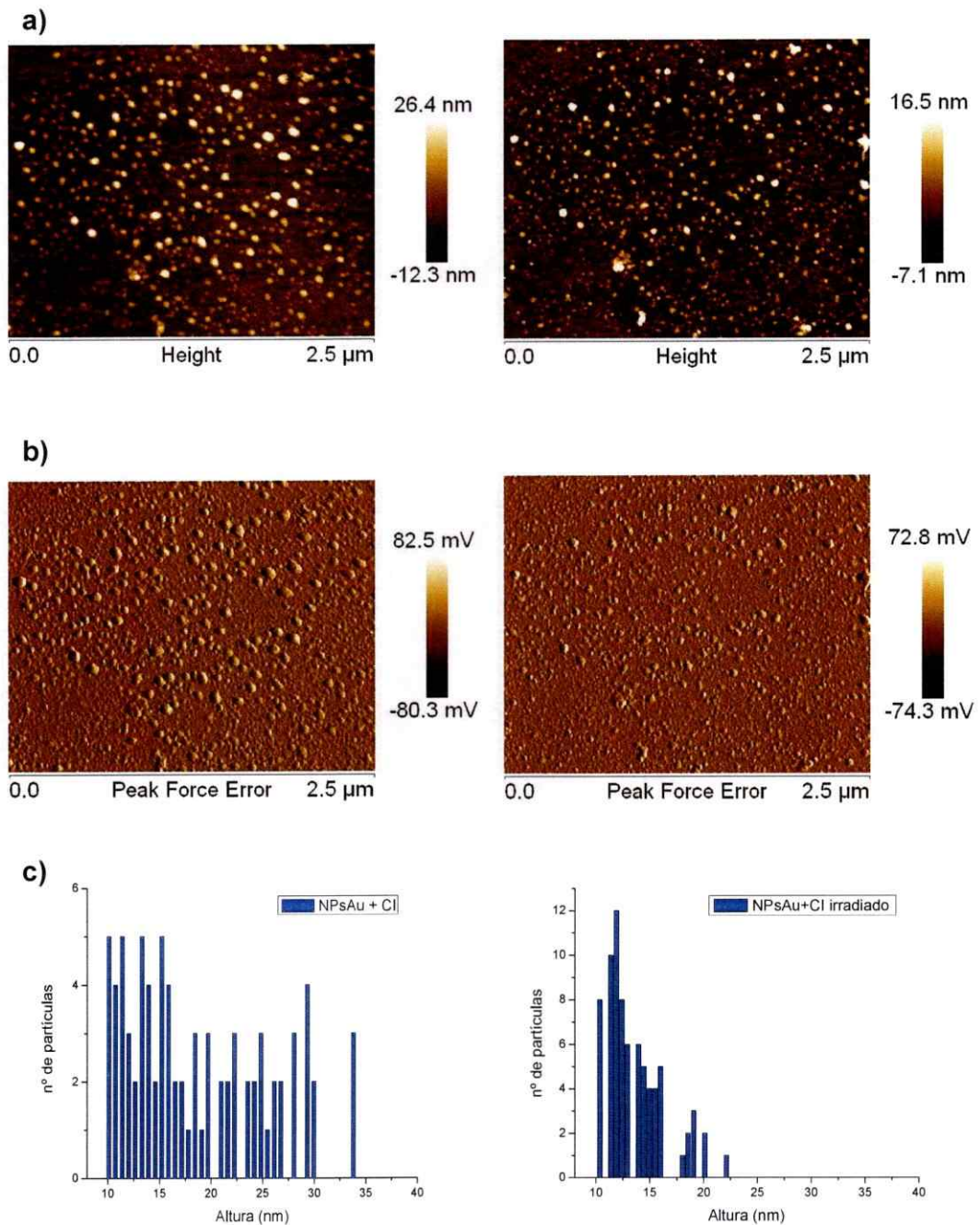


Figura V. 10. Representación esquemática del monitoreo por AFM del vidrio funcionalizado y conjugado al CI, mientras es irradiado con el láser verde.



A modo de control se registraron micrografías del vidrio funcionalizado con las NEsAu cubiertas con Cl en presencia de agua de manera continua durante 6 h sin irradiación láser.

La figura V.12 muestra las micrografías AFM y sus correspondientes histogramas, del vidrio funcionalizado con NEsAu cubiertas por el Cl de manera comparativa, a las que se les agregó una gota de agua, mostrando la micrografía a tiempo cero y luego de 6 horas. Tanto las micrografías como los histogramas muestran que no existen diferencias considerables al transcurrir el tiempo. De acuerdo a estos antecedentes podemos aseverar que las variaciones en la altura de las partículas al irradiar la muestra, se producen solamente por el efecto de calentamiento plasmónico, descartando degradación en el tiempo producto de una disolución.

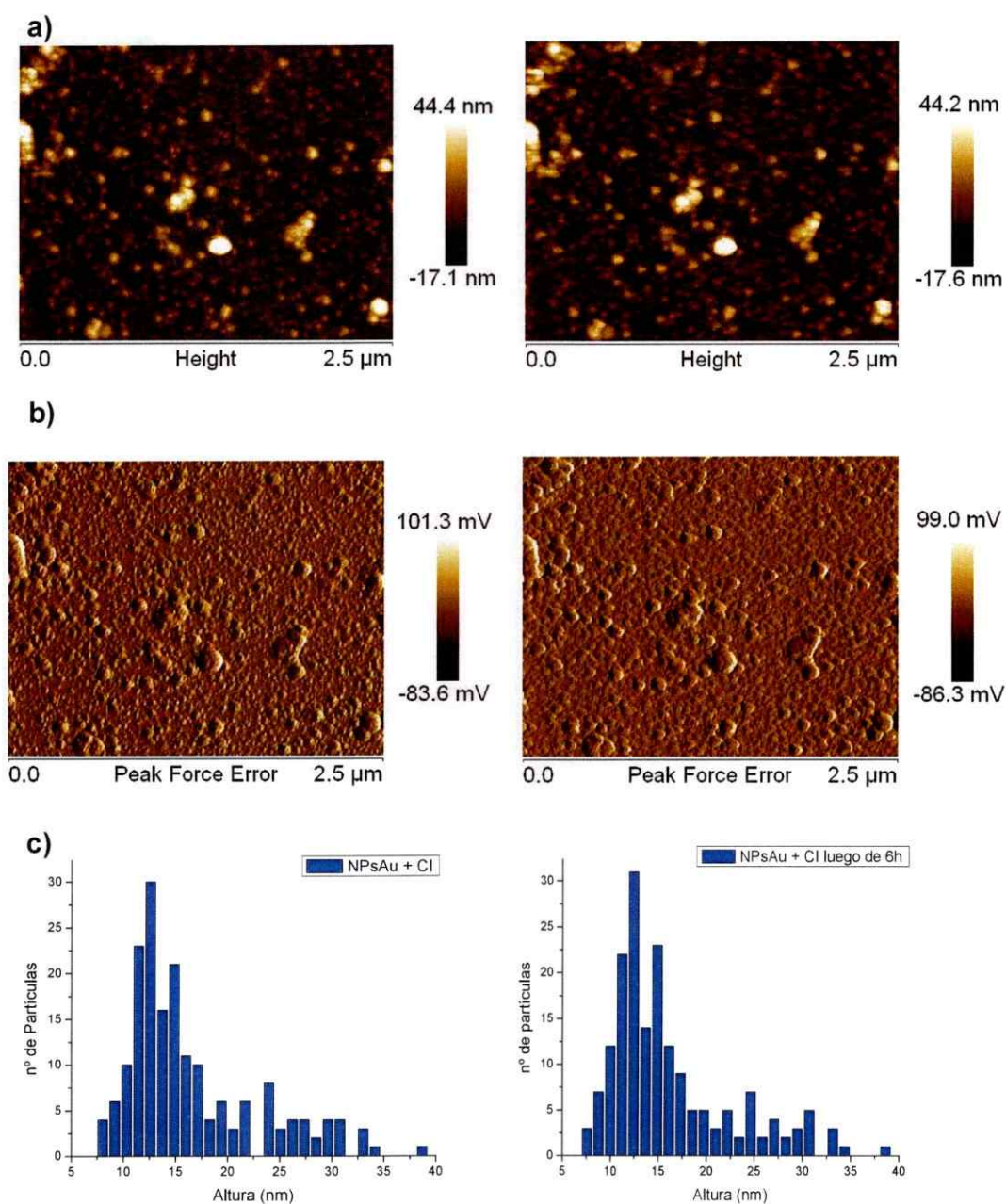


Figura V. 12. a) Micrografías AFM de altura, b) micrografías AFM modo fuerza y error y c) histogramas de altura del vidrio funcionalizado con NEsAu conjugadas al CI y con una gota de agua en la superficie, inicialmente (izquierda) y luego de 6 h (derecha).

De manera complementaria a los estudios de AFM se procedió a caracterizar cada etapa de la funcionalización del vidrio mediante espectrofotometría de reflectancia difusa.

En la figura V.13 se muestran los espectros de absorbancia del vidrio en cada etapa de funcionalización. Se observa que el espectro del vidrio derivatizado con silano presenta una línea base con ausencia de absorbancia. El espectro del vidrio funcionalizado con las NEsAu muestra una banda plasmónica a 530 nm. El desplazamiento batocrómico que sufre el plasmón de 520 nm, plasmón característico de partículas coloidales estabilizadas por citrato, a 530 nm, plasmón de NEsAu funcionalizadas en el vidrio, se debe principalmente a un efecto por cambio del medio dieléctrico y del entorno de las nanopartículas.

El máximo de absorción en el espectro correspondiente al vidrio funcionalizado con NEsAu y cubiertas por el CI, presenta nuevamente un desplazamiento batocrómico del máximo de absorción de 530 a 542 nm, generado por el cambio en el entorno superficial de las NEsAu con el CI. Además se observa un ensanchamiento asimétrico de la banda plasmónica, indicativo de partículas con mayor polidispersidad de tamaño, generado por el depósito irregular del CI sobre la superficie de las NEsAu.

Finalmente se agregó una gota de agua al vidrio funcionalizado con las NEsAu cubierto con el CI. Se irradió durante 6 h y se registró el espectro de absorción, observándose un desplazamiento hipsocrómico desde 542 a 536 nm, el cual es atribuido al desprendimiento parcial del CI en la superficie de las NEsAu.

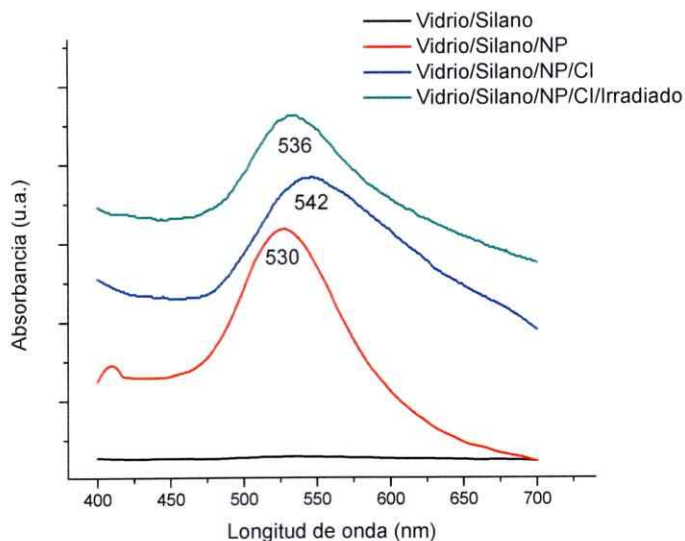


Figura V. 13. Espectro de absorción del vidrio en cada etapa de la funcionalización.

Los estudios de AFM y espectrofotometría UV-Vis ponen en evidencia, el desprendimiento del CI de la superficie de la NEsAu al ser irradiada con láser verde. Sin embargo, estos estudios no entregan información acerca de la integridad de CI frente a la irradiación. Para lo cual se procedió a caracterizar el vidrio funcionalizado con NEsAu cubiertas por el CI después de ser irradiado, mediante espectroscopía Raman.

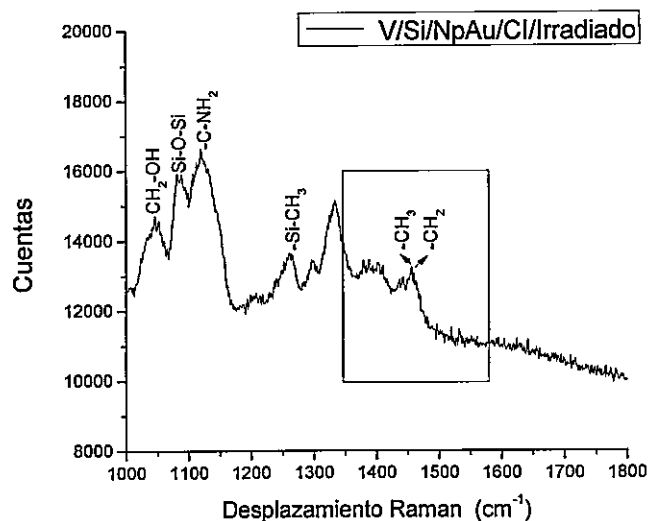


Figura V. 14. Espectro Raman y asignación de señales características del vidrio funcionalizado con NEsAu cubiertas por el CI, luego de ser irradiado durante 6h.

En la figura V.14 se muestra el espectro Raman de la muestra irradiada. La ausencia de las bandas de frecuencias de 1355 y 1580 cm^{-1} características del carbono grafito, son indicativas de la no calcinación de la fase orgánica del CI, producto de la irradiación.

Se realizó un análisis mediante espectrometría de masa MALDI-TOF a una muestra que contenía una colección de gotas de la superficie de distintos vidrios funcionalizados, que fueron irradiados durante 20 min cada uno, para dilucidar si el CI experimentó desintegración producto de la irradiación.

Esta técnica de ionización suave es utilizada en análisis de biomoléculas como azúcares, que tienden a fragmentarse cuando son ionizadas por métodos convencionales.

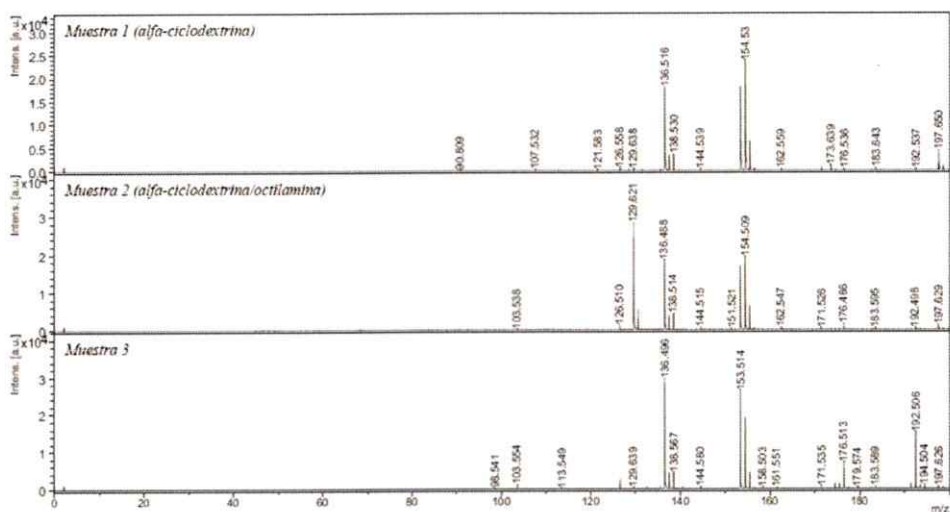


Figura V. 15. Espectros de masa intervalo m/z 0-200 (matriz DHB). La muestra 1 corresponde a α -CD, la muestra 2 al CI de α -CD/OA y la muestra 3 al conjunto de gotas recolectadas de la superficie del vidrio irradiado.

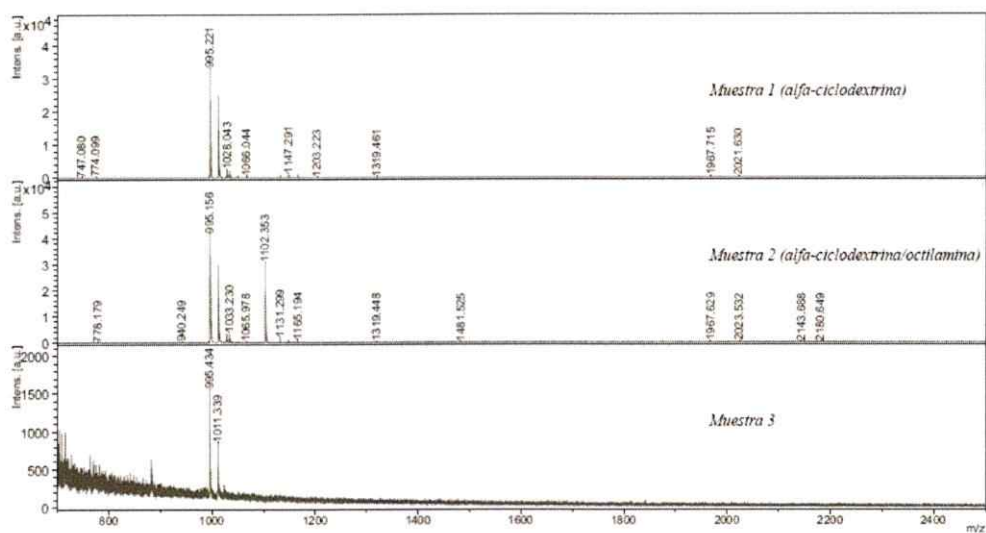


Figura V. 16. Espectros de masa intervalo m/z 700-2500 (matriz DHB). La muestra 1 corresponde a α -CD, la muestra 2 al CI de α -CD/OA y la muestra 3 al conjunto de gotas recolectadas de la superficie del vidrio irradiado.

Para la muestra 1 correspondiente a α -CD (fórmula, $C_{36}H_{60}O_{30}$; masa nominal, 972 g/mol) se esperaba la señal m/z 973 correspondiente a la forma protonada (especie $[M+H]^+$) la que no fue observada. Sin embargo aparecen las señales m/z 995 y m/z 1011 que corresponden a las formas sódica y potásica, especies $[M+Na]^+$ y $[M+K]^+$, respectivamente.

Para la muestra 2 que contiene el CI constituido por dos moléculas de α -CD (fórmula, $C_{36}H_{60}O_{30}$; masa nominal, 972g/mol) y una molécula de octilamina (OA; fórmula, $C_8H_{19}N$; masa nominal, 129 g/mol) se esperaba la presencia de las señales m/z 973 para α -CD, m/z 130 para OA y m/z 2074 para la especie 2α -CD+OA (fórmula, $C_{80}H_{139}O_{60}N$; masa nominal, 2073 g/mol). Para los espectros adquiridos en presencia de DHB se observó la presencia de α -CD y OA pero no se observó la presencia de 2α -CD+OA (ausencia de forma protonada o de aductos). Sin embargo, se observó la señal m/z 1102 que correspondería a la presencia de α -CD+OA (fórmula, $C_{44}H_{79}O_{30}N$; masa nominal, 1101 g/mol).

La diferencia en la estequiometría obtenida mediante la técnica MALDI-TOF respecto a los estudios de 1H -RMN, que entregan la estequiometría matriz-huésped 2:1 (2α -CD+OA), se debe probablemente a la fragmentación del CI 2:1, generado por la asimetría de la inclusión. La molécula OA al tener una cadena alquílica corta queda incluida asimétricamente en la cavidad de la ciclodextrina (figura III.5.). La ionización suave provoca entonces el desprendimiento sólo de una molécula de ciclodextrina.

Para la muestra 3, se presentan los espectro de masas de una colección de gotas de experimentos de irradiación paralelos, observándose en el intervalo m/z 700-2500 sólo la presencia de α -CD (m/z 995 y 1011), figura V.15.

Para el intervalo m/z 0-200 (Figura V.16, muestra 3) se observa una pequeña señal m/z 129 indicativa de una presencia residual de OA, corroborando así, que la OA abandona la cavidad de la α -CD.

La Figura V.17 muestra una representación esquemática del proceso de irradiación del vidrio funcionalizado con las NPs cubiertas por el CI y por una gota de agua.

La irradiación del vidrio produce la desintegración del CI. La ciclodextrina se disuelve en la fase acuosa y la mayoría de las moléculas de octilamina quedan adheridas a la superficie de la NEsAu.

Aunque no fue posible realizar un registro del aumento de temperatura local producida por el fenómeno plasmónico, se postula que la temperatura alcanzada es de al menos 117 °C, temperatura a la cual, de acuerdo a los estudios de ^1H -RMN realizados anteriormente, la octilamina abandona la cavidad de la ciclodextrina.

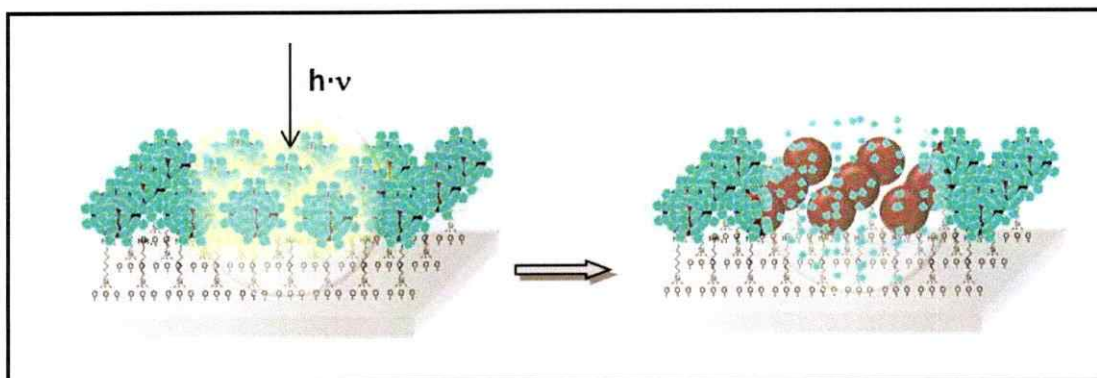


Figura V. 17. Representación esquemática de la separación del CI de la superficie de las NEsAu producido por irradiación.

CAPÍTULO VI: CITOTOXICIDAD

En una primera etapa se realizó un estudio mediante espectrofotometría UV-Vis de la estabilidad de las muestras en buffer fosfato salino (PBS) 20mM, con la finalidad de determinar si las muestras pueden ser utilizadas en ensayos de viabilidad celular.

La figura VI.1 muestra los espectros de absorción de MTX, CI, MTX+NP, CI+NP y NEsAu, en distintos tiempos de permanencia en PBS. Se observa que todas las muestras en sus espectros UV-Vis no experimentan cambios en el tiempo, a excepción de las NEsAu, las que, al encontrarse en una suspensión coloidal se agregan y precipitan en presencia de sales (PBS). Sin embargo para las NEsAu conjugadas a MTX o al CI se mantienen estables durante el tiempo de evaluación. Conforme a estos resultados se realizó un estudio de viabilidad celular MTS 72h después de haber realizado el tratamiento a las células.

Primeramente se realizó el ensayo de viabilidad celular de MTS a células HeLa tratadas con MTX y CI a cinco concentraciones distintas, con el objetivo de evaluar una disminución la citotoxicidad inherente del fármaco MTX cuando es incluido dentro de la cavidad de ciclodextrina.

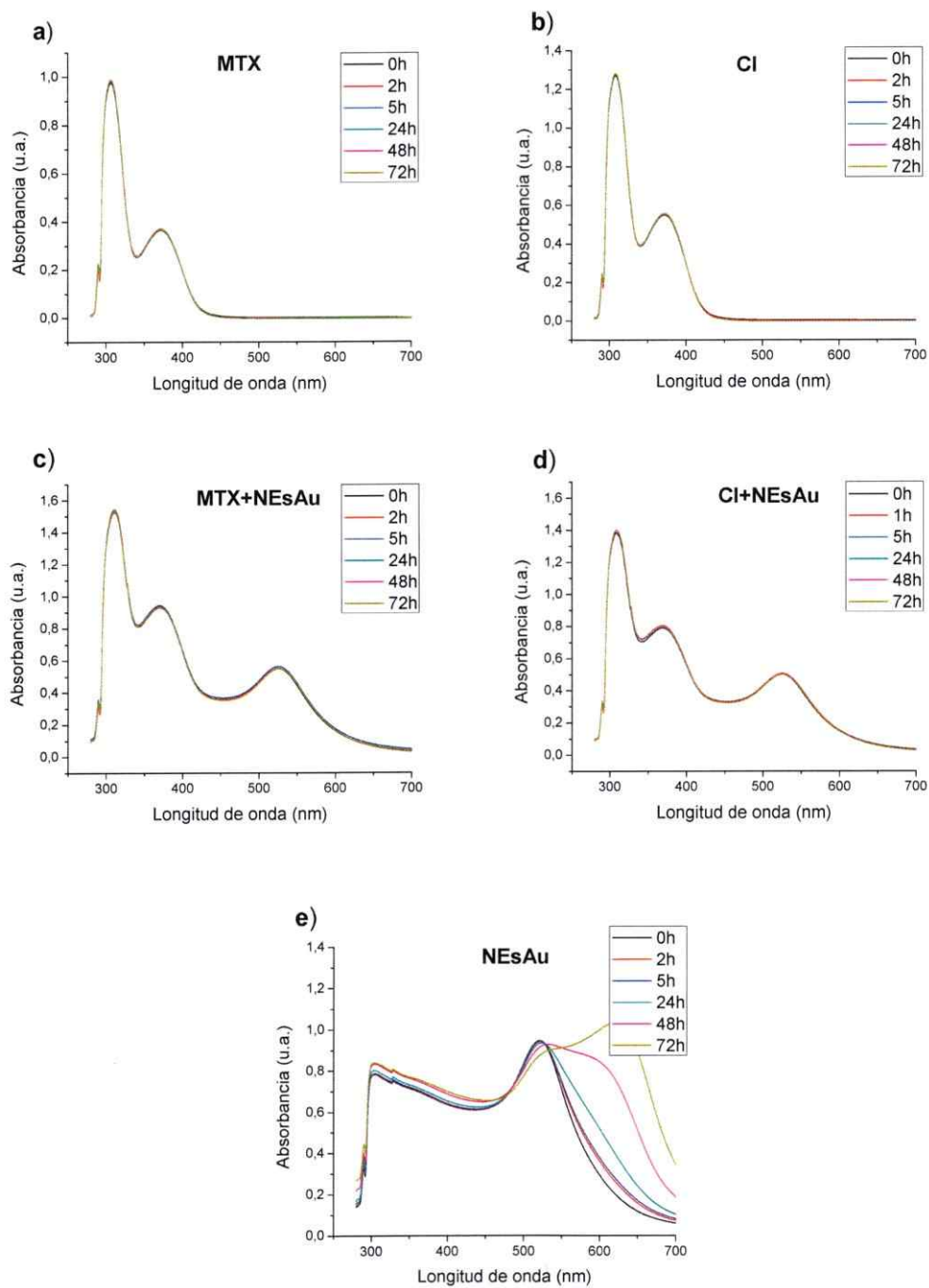


Figura VI. 1. Espectros de absorción de a) MTX, b) CI, c) MTX+NP, d) CI+NP y e) NEsAu, en PBS a tiempo cero, 2, 5, 24, 48 y 72 h.

La figura VI.2 muestra el ensayo de viabilidad MTS en células HeLa tratadas con MTX. Se observa que a altas concentraciones de MTX existe una disminución significativa de la viabilidad celular debido a la menor proliferación celular generada por el fármaco. El MTX al ser un antimetabolito del ácido fólico se une a los receptores de folato por medio del anillo de pteridina inhibiendo la acción de la enzima dihidrofolato reductasa, impidiendo así la reproducción celular.

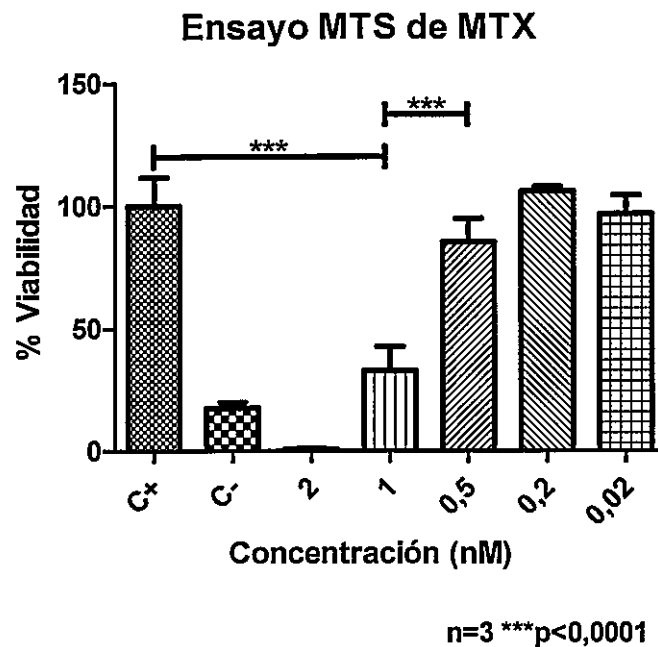


Figura VI. 2. Ensayo de viabilidad MTS en células HeLa tratadas con MTX a distintas concentraciones. Se realizó un análisis de varianza ANOVA-Tukey (***) $p < 0,001$). Los resultados fueron expresados en porcentaje de viabilidad respecto al control, representados como el promedio junto a su desviación estándar de 3 experimentos independientes de 3 repeticiones (n=3). SDS 1% se empleó como C- y DMEM con DMSO como C+.

La figura VI.3 muestra el ensayo de viabilidad MTS en células HeLa tratadas con el CI de β -CD/MTX. Se observó que a mayores concentraciones existe una disminución en la viabilidad celular, la cual no es significativa respecto al control.

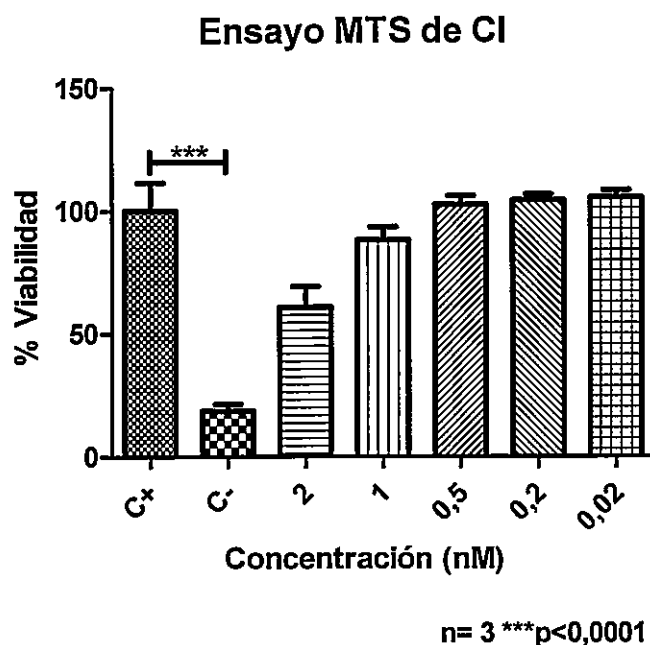


Figura VI. 3. Ensayo de viabilidad en células HeLa tratadas con el CI a distintas concentraciones. Se realizó un análisis de varianza ANOVA-Tukey (**p<0,001). Los resultados fueron expresados en porcentaje de viabilidad respecto al control, representados como el promedio junto a su desviación estándar de 3 experimentos independientes de 3 repeticiones (n=3). SDS 1% se empleó como C- y DMEM como C+.

La figura V.4 muestra la gráfica de comparación de los efectos de MTX y del CI sobre la viabilidad celular a cinco concentraciones distintas. Se observa que a concentraciones equivalentes de MTX (MTX libre/MTX incluido en β -CD) el MTX libre disminuye la viabilidad celular respecto de la de MTX incluido en

β -CD. Esto se debe probablemente a que la inclusión del anillo de pteridina del MTX dentro de la cavidad de la ciclodextrina, impide su interacción con los receptores de folato, disminuyendo su efecto sobre la viabilidad celular.

Comparación de la viabilidad celular generada por MTX y CI

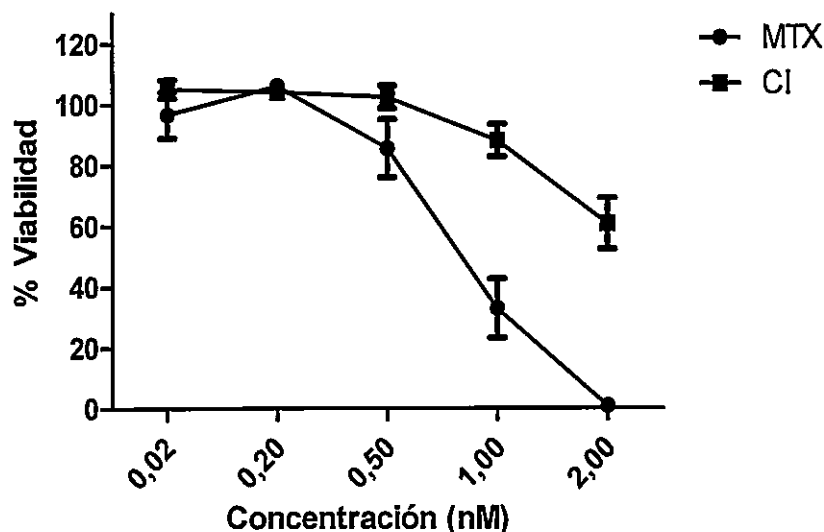


Figura VI. 4. Comparación de los porcentajes de viabilidad de células HeLa a distintas concentraciones de MTX y de CI (n = 3).

La tabla VI.1 muestra los valores de IC_{50} de ambas muestras. Se observa que para disminuir la viabilidad celular a la mitad se requiere una concentración de CI aproximadamente cinco veces mayor a la requerida con MTX.

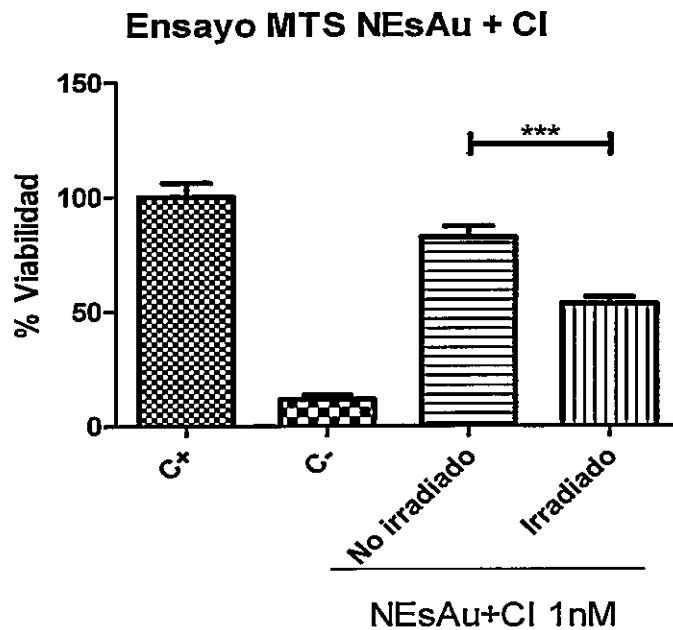
Con estos resultados se demostró que la inclusión del fármaco genera disminución de la citotoxicidad en comparación a la de MTX libre.

Tabla VI. 1. Valores de IC₅₀ de MTX y del CI, en la línea celular HeLa.

Muestra	IC ₅₀ (nM)
MTX	1.00
CI	2.27

Uno de los objetivos de esta tesis es la creación de un sistema nanotransportador de MTX que libere de manera controlada el fármaco mediante la fototermia de las NEsAu. Para esto, se irradió con el láser de 532nm una muestra de CI conjugado a NEsAu durante 15 min y se evaluó el efecto en la viabilidad celular sobre células HeLa.

La figura VI.5 muestra el ensayo de viabilidad celular de células HeLa tratadas con NEsAu conjugadas al CI con una muestra irradiada y una libre de irradiación utilizada como blanco. Se observa una disminución significativa de la viabilidad celular con respecto al control no irradiado. Este resultado evidencia que el calor generado por el efecto plasmónico alcanza una temperatura suficiente para generar la ruptura del CI liberando la molécula de MTX. El fármaco libre interacciona con los receptores de folato sobrepresados en las células generando la inhibición de la proliferación celular disminuyendo como consecuencia la viabilidad celular.



n=2 ***p<0,0001

Figura VI. 5. Ensayo de viabilidad en células HeLa tratadas con NEsAu+Cl y NEsAu+Cl irradiadas durante 15 min, en concentraciones 1nM. Se realizó un análisis de varianza ANOVA-Tukey (**p<0,001). Los resultados fueron expresados en porcentaje de viabilidad respecto al control, representados como el promedio junto a su desviación estándar de 2 experimentos independientes de 3 repeticiones (n=2). SDS 1% se empleó como C- y DMEM como C+.

CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis:

- Se logró obtener y caracterizar los compuestos de inclusión de α -CD con alquilaminas y alquiltioles determinándose una estequiometría 2:1 para todas las moléculas huésped propuestas.
- Se logró purificar el fármaco de MTX e incluirlo en la cavidad de β -CD, formando un compuesto de inclusión de estequiometría 1:1.
- Se logró adherir NEsAu a cristales de CI de α -CD/OA. Mediante XPS se determinó que la interacción de la NE con la superficie cristalina del CI ocurre a través del grupo amino de la molécula de OA huésped.
- Se logró obtener NEsAu inmovilizadas sobre cristales de CI de α -CD/OA mediante la técnica física de *sputtering*. Sin embargo, los experimentos resultaron ser poco reproducibles en cuanto al control de tamaño y forma de las NEs. Por este motivo, se decidió realizar el trabajo de irradiación con NEs obtenidas por método químico de mejor reproducibilidad.
- Fue posible unir satisfactoriamente las NbsAu a los CIs de α -CD/OA y β -CD/MTX. Las Nbs conjugadas a los CI presentaron cantidades remanentes de CTAB, por lo que los estudios de viabilidad celular fueron descartados debido a la conocida citotoxicidad de este surfactante. Sin embargo, estos resultados son prometedores debido a las propiedades fototérmicas especiales que poseen las NbsAu.
- El estudio de AFM *in situ* de los vidrios funcionalizados permitió evidenciar la separación del CI de las NEsAu por efecto de la irradiación láser. Así también la técnica MALDI-TOF permitió confirmar el abandono de la molécula de OA de la cavidad de ciclodextrina.
- El ensayo de viabilidad MTS sobre la línea celular HeLa tratada con MTX y el CI de β -CD/MTX permitió concluir que la inclusión del fármaco en la ciclodextrina disminuye el efecto citotóxico en comparación a MTX libre.
- Se logró diseñar y obtener un sistema nanotransportador de MTX para la liberación controlada del fármaco mediante la fototermia de Nps. De esta

manera, muestras de β -CD/MTX conjugadas a NEsAu irradiadas con láser verde de 532nm generaron la disminución de la viabilidad celular con respecto al control no irradiado como consecuencia de la liberación de MTX de la cavidad de β -CD.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. J. Ramsden, *Applied Nanotechnology*. Elsevier, 2014, 1-12.
- [2] S. Al-Qadi, C. Remuñán-lópez, *Nanopartículas metálicas: oro*. 2010, 223-248.
- [3] A. G. Skirtach, C. Dejugnat, D. Braun, A. S. Susha, A. L. Rogach, W. J. Parak, H. Möhwald, and G. B. Sukhorukov, "The role of metal nanoparticles in remote release of encapsulated materials.," *Nano Lett.*, 5, 7, 1371–1377, **2005**.
- [4] D. Pissuwan, S. M. Valenzuela, and M. B. Cortie, "Therapeutic possibilities of plasmonically heated gold nanoparticles.," *Trends Biotechnol.*, 24, 2, 62–67, **2006**.
- [5] M. A. E.-S. Prashant k. Jain, Ivan H. E-Sayed, "Au nanoparticles target cancer," *Nanotoday*, 2, 1, 18–29, **2007**.
- [6] L. M. Liz-marz, "Nanometals," *Materialstoday*, 7, 2, 26–31, **2004**.
- [7] I. O. Sosa, C. Noguez, and R. G. Barrera, "Optical Properties of Metal Nanoparticles with Arbitrary Shapes," *J. Phys. Chem. B*, 107, 26, 6269–6275, **2003**.
- [8] S. Link and M. a. El-Sayed, "Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles," *J. Phys. Chem. B*, 103, 21, 4212–4217, **1999**.
- [9] T. Okamoto and I. Yamaguchi, "Optical Absorption Study of the Surface Plasmon Resonance in Gold Nanoparticles Immobilized onto a Gold Substrate by Self-Assembly Technique," *J. Phys. Chem. B*, 107, 38, 10321–10324, **2003**.
- [10] L. Liz-Marzan, "Tuning nanorod surface plasmon resonances," *SPIE Newsroom*, 3–5, **2007**.
- [11] P. K. Jain, K. S. Lee, I. H. El-Sayed, and M. a El-Sayed, "Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine.," *J. Phys. Chem. B*, 110, 14, 7238–7248, **2006**.

- [12] S. Link, M. B. Mohamed, and M. A. El-Sayed, "Simulation of the Optical Absorption Spectra of Gold Nanorods as a Function of Their Aspect Ratio and the Effect of the Medium Dielectric Constant," *J. Phys. Chem. B*, 103, 16, 3073–3077, 1999.
- [13] C.-H. Chou, C.-D. Chen, and C. R. C. Wang, "Highly efficient, wavelength-tunable, gold nanoparticle based photothermal nanoconvertors.," *J. Phys. Chem. B*, 109, 22, 11135–8, 2005.
- [14] H. Huang, K. Rege, and J. J. Heys, "Spatiotemporal Temperature Distribution and Cancer Cell Death in Response to Extracellular Hyperthermia," *ACS Nano*, 4, 2892–2901, 2010.
- [15] X. Huang, I. H. El-Sayed, W. Qian, and M. A. El-Sayed, "Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods.," *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 6, 2115–2120, 2006.
- [16] X. Huang and M. A. El-Sayed, "Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy," *J. Adv. Res.*, 1, 1, 13–28, 2010.
- [17] B. Radt, T. A. Smith, and F. Caruso, "Optically Addressable Nanostructured Capsules," *Adv. Mater.*, 16, 23–24, 2184–2189, Dec. 2004.
- [18] J. C. Bretschneider, M. Reismann, G. von Plessen, and U. Simon, "Photothermal control of the activity of HRP-functionalized gold nanoparticles.," *Small*, 5, 22, 2549–2553, 2009.
- [19] M. Reismann, J. C. Bretschneider, G. von Plessen, and U. Simon, "Reversible photothermal melting of DNA in DNA-gold-nanoparticle networks.," *Small*, 4, 5, 607–610, 2008.
- [20] Y. Pan, S. Neuss, A. Leifert, M. Fischler, F. Wen, U. Simon, G. Schmid, W. Brandau, and W. Jahnen-Dechent, "Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles.," *Small*, 3, 11, 1941–9, 2007.
- [21] E. E. Connor, J. Mwamuka, A. Gole, C. J. Murphy, and M. D. Wyatt, "Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity.," *Small*, 1, 3, 325–7, 2005.
- [22] C. Lasagna-Reeves, D. Gonzalez-Romero, M. A. Barria, I. Olmedo, A. Clos, V. M. Sadagopa Ramanujam, A. Urayama, L. Vergara, M. J. Kogan, and C. Soto, "Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after

- repeated administration in mice.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 393, 4, 649–55, 2010.
- [23] L. Hosta, M. Pla-Roca, J. Arbiol, C. López-Iglesias, J. Samitier, L. J. Cruz, M. J. Kogan, and F. Albericio, "Conjugation of Kahalalide F with gold nanoparticles to enhance in vitro antitumoral activity.," *Bioconjug. Chem.*, 20, 1, 138–46, 2009.
- [24] A. Llevot and D. Astruc, "Applications of vectorized gold nanoparticles to the diagnosis and therapy of cancer," *Chem. Soc. Rev.*, 41, 242–247, 2012.
- [25] E. S. L. Chan and B. N. Cronstein, "Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases.," *Arthritis Res.*, 4, 4, 266–273, 2002.
- [26] B. Diaz and O. Bejarano, "Estudio por espectroscopia de absorción en la región infrarroja del complejo de inclusión de un compuesto antineoplásico (metotrexato) en un cargador de fármacos magnéticamente dirigido," *Rev. la Fac. Ciencias Básicas*, 4, 002, 20–29, 2006.
- [27] M. T. F. pattarino, L. Giovannelli, G.B. Giovenzana, M. Rinaldi, "Inclusion of methotrexate in alkyl-cyclodextrins: effects of host substituents on the stability of complexes," *J. Drug DEL. SCI. TECH*, 15, 6, 465–468, 2005.
- [28] H. J. Contreas Quiñones, *Ciclodextrinas naturaleza, propiedades y aplicaciones*, 1.0 ed. Guadalajara, México, 2001, 1–97.
- [29] F. Kayaci, H. S. Sen, E. Durgun, and T. Uyar, "Functional electrospun polymeric nano fibers incorporating geraniol – cyclodextrin inclusion complexes: High thermal stability and enhanced durability of geraniol," *Food Res. Int.*, 62, 424–431, 2014.
- [30] S. Rodríguez-Llamazares, P. Jara, N. Yutronic, M. Noyong, J. Bretschneider, and U. Simon, "Face preferred deposition of gold nanoparticles on alpha-cyclodextrin/octanethiol inclusion compound.," *J. Colloid Interface Sci.*, 316, 1, 202–205, 2007.
- [31] L. Barrientos, N. Yutronic, F. del Monte, M. C. Gutiérrez, and P. Jara, "Ordered arrangement of gold nanoparticles on an α -cyclodextrin–dodecanethiol inclusion compound produced by magnetron sputtering," *New J. Chem.*, 31, 8, 1400–1402, 2007.

- [32] N. Silva, S. Moris, B. Herrera, M. Diaz, M. Kogan, L. Barrientos, N. Yutronic, and P. Jara, "Formation of Copper Nanoparticles Supported onto Inclusion Compounds of α -cyclodextrin: A New Route to Obtain Copper Nanoparticles," *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 521, 1, 246–252, 2010.
- [33] S. Rodríguez-Llamazares, N. Yutronic, P. Jara, U. Englert, M. Noyong, and U. Simon, "The Structure of the First Supramolecular α -Cyclodextrin Complex with an Aliphatic Monofunctional Carboxylic Acid," *European J. Org. Chem.*, 26, 4298–4300, 2007.
- [34] G. Martínez and M. A. Gómez, "Ciclodextrinas: complejos de inclusión con polímeros," *Rev. Iberoam. Polim.*, 8, 4, 300–312, 2007.
- [35] R. Chadha, N. Kashid, and A. Saini, "Account of analytical techniques employed for the determination of thermodynamics of inclusion complexation of drugs with cyclodextrins," *J. Sci. Ind. Reseach*, 63, 211–229, 2004.
- [36] J. Turkevich, P. C. Stevenson, and J. Hillier, "A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold," *Discuss. Faraday Soc.*, 11, 55–75, 1951.
- [37] Y. R. Bustos Rodríguez, D. Oyola Lozano, "Contrucción y caracterización de un magnetron sputtering," *Rev. Colomb. Física*, 34, 1, 134–137, 2002.
- [38] P. Zhao, N. Li, and D. Astruc, "State of the art in gold nanoparticle synthesis," *Coord. Chem. Rev.*, 257, 638–665, 2013.
- [39] R. Chadha, P. Arora, R. Kaur, A. Saini, M. L. Singla, and D. S. Jain, "Characterization of solvatomorphs of methotrexate using thermoanalytical and other techniques," *Acta Pharm.*, 59, 3, 245–247, 2009.
- [40] B. Nikoobakht and M. A. El-sayed, "Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method," *Chem. Mater.*, 15, 1957–1962, 2003.
- [41] Y. Chen, C. Tsai, P. Huang, M. Chang, P. Cheng, C. Chou, D. Chen, C. Wang, A. Shiau, and C. Wu, "Methotrexate conjugated to Gold Nanoparticles Inhibits Tumor Growth in a Syngeneic Lung Tumor Model," *Mol. Pharm.*, 4, 5, 713–722, 2007.
- [42] D. G. Haiss, Wolfgang; Thanh, Nguyen T. K.; Aveyard, Jenny; Fernig, "Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra," *Anal. Chem.*, 79, 4215–4221, 2007.

- [43] L. Barrientos, E. Lang, G. Zapata-Torres, C. Celis-Barros, C. Orellana, P. Jara, and N. Yutronic, "Structural elucidation of supramolecular alpha-cyclodextrin dimer/aliphatic monofunctional molecules complexes.," *J. Mol. Model.*, 19, 5, 2119–2126, **2013**.
- [44] L. Barrientos, P. Allende, C. Orellana, and P. Jara, "Ordered arrangements of metal nanoparticles on alpha-cyclodextrin inclusion complexes by magnetron sputtering," *Inorganica Chim. Acta*, 380, 372–377, **2012**.
- [45] M. R. Caira, "On the isostructurality of cyclodextrin inclusion complexes and its practical utility," *Rev. Roum. Chim.*, 46, 4, 371–386, **2001**.
- [46] N. Singh, U. V; Aithal, K. S; Udupa, "Physicochemical and Biological Studies of Inclusion Complex of Methotrexate with β -Cyclodextrin," *Pharm. Sci.*, 3, 573–577, **1997**.
- [47] D. Mastropaolo, A. Camerman, and N. Camerman, "Crystal Structure of the Hydrated Strontium Salt of Methotrexate: Two Independent molecules with different conformations," *J. Med. Chem*, 44, 2, 269–273, **2001**.
- [48] N. V. Tanyakorn Muangnapoha, Noriaki Sano, Shin-Ichi Yusa and Tawatchai Charinpanitkul, "Facile strategy for stability control of gold nanoparticles synthesized by aqueous reduction method," *Curr. Appl. Phys.*, 10, 2, 708–714, **2010**.
- [49] M. B. Daming Feng, Zhengmao Zhou, "An investigation of the thermal degradation of melamine phosphonite by XPS and thermal analysis techniques," *Polym. Degrad. Stab.*, 50, 95, 65–70, **1995**.
- [50] S. L. R. Wojciech Fabianowski, Louis C. Coyle, Bruce A. Weber, Richard D. Granata, David G. Castner, Andrzej Sadownik, "Spontaneous assembly of phosphatidylcholine monolayers via chemisorption onto gold," *Langmuir*, 5, 1, 35–41, **1989**.
- [51] D. Y. Petrovykh, H. Kimura-Suda, L. J. Whitman, and M. J. Tarlov, "Quantitative analysis and characterization of DNA immobilized on gold.," *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 17, 5219–5226, **2003**.
- [52] S. D. Techane, L. J. Gamble, and D. G. Castner, "X-ray photoelectron spectroscopy characterization of gold nanoparticles functionalized with amine-terminated alkanethiols.," *Biointerphases*, 6, 3, 98–104, **2011**.

-
- [53] J. E. Baio, T. Weidner, J. Brison, D. J. Graham, L. J. Gamble, and D. G. Castner, "Amine Terminated SAMs: Investigating Why Oxygen is Present in these Films.," *J. Electron Spectros. Relat. Phenomena*, 172, 1–3, 2–8, **2009**.
- [54] M. Brown, Y. Fujimori, F. Ringleb, X. Shao, F. Stavale, N. Nilius, M. Sterrer, and H.-J. Freund, "Oxidation of Au by surface OH: nucleation and electronic structure of gold on hydroxylated MgO(001).," *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 27, 10668–10676, **2011**.
- [55] B. Herrera, C. Adura, N. Yutronic, M. J. Kogan, and P. Jara, "Selective nanodecoration of modified cyclodextrin crystals with gold nanorods.," *J. Colloid Interface Sci.*, 389, 1, 42–45, **2013**.
- [56] K. C. Grabar, R. G. Freeman, M. B. Hommer, and M. J. Natan, "Preparation and Characterization of Au colloid Monolayers," *Anal. Chem.*, 67, 4, 735–743, **1995**.
- [57] D. Eck, H. Mo, and C. A. Helm, "Preparation and Optical Properties of Colloidal Gold Monolayers," *Langmuir*, 15, 4, 3256–3266, **1999**.
- [58] L. Supriya and R. O. Claus, "Solution-based assembly of conductive gold film on flexible polymer substrates.," *Langmuir*, 20, 8870–8876, **2004**.

ANEXOS

Anexo1

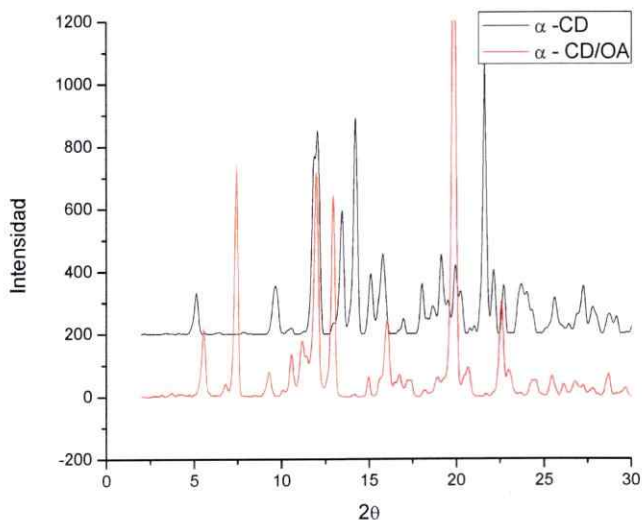


Figura A. 1. Comparación de los difractogramas de la α -CD nativa y del Cl α -CD/OA.

Tabla A. 1. Datos cristalográficos e indexaciones

Final values								α -CD
Zero	Lambda	a	b	c	alpha	beta	gamma	volume
0,000	1,54180	14,8919	34,0021	6,5312	90,00	90,00	90,00	4826,167
H	K	L	2Th(obs)	2Th(obs)shift	2Th(Calc)	diff,		
0	2	0	5.1300	5.1300	5.1979	-0.0679		
0	1	1	9.6100	9.6100	9.6370	-0.0270		
2	0	0	11.8500	11.8500	11.8853	-0.0353		
0	3	1	12.0700	12.0700	12.1326	-0.0626		
1	3	1	13.4800	13.4800	13.5161	-0.0361		
2	3	0	14.2700	14.2700	14.2317	0.0383		
2	0	1	15.0600	15.0600	15.0988	-0.0388		
2	4	0	15.7700	15.7700	15.8221	-0.0521		
2	3	1	16.9900	16.9900	17.0155	-0.0255		
3	1	0	18.0700	18.0700	18.0593	0.0107		
0	0	2	18.6200	18.6200	18.6185	0.0015		
1	6	1	19.1500	19.1500	19.1703	-0.0203		
3	3	0	19.5300	19.5300	19.5223	0.0077		
2	5	1	19.9500	19.9500	19.9859	-0.0359		
1	2	2	20.2900	20.2900	20.2497	0.0403		
3	4	0	20.7700	20.7700	20.7209	0.0491		
1	3	2	21.0500	21.0500	21.0841	-0.0341		
3	3	1	21.6400	21.6400	21.6542	-0.0142		
2	0	2	22.1400	22.1400	22.1459	-0.0059		
3	4	1	22.7200	22.7200	22.7455	-0.0255		
1	8	1	23.7100	23.7100	23.6859	0.0241		
2	8	0	24.1200	24.1200	24.1095	0.0105		

3	6	1	25.6200	25.6200	25.6215	-0.0015
2	6	2	27.2400	27.2400	27.2250	0.0150
0	10	1	27.8600	27.8600	27.8577	0.0023
1	8	2	28.8000	28.8000	28.7758	0.0242
3	8	1	29.2100	29.2100	29.2043	0.0057
4	6	1	30.2300	30.2300	30.2138	0.0162
5	3	0	31.0400	31.0400	31.0454	-0.0054
5	4	0	31.8600	31.8600	31.8359	0.0241
4	5	2	33.2500	33.2500	33.2578	-0.0078
0	8	3	35.2800	35.2800	35.2689	0.0111
1	2	4	38.6500	38.6500	38.6305	0.0195
1	4	4	39.7500	39.7500	39.7491	0.0009

Sqrt(Sum(2Th O-C)**2)/(Nref-Npar) : 0.0306

Sqrt(Sum(2Th O-C)**2)/Nref) : 0.0292

Final values

Zero	Lambda	a	b	c	alpha	beta	gamma	volume	α -CD/OA
0,000	1,54180	23,6343	23,6343	15,7855	90,00	90,00	120,00	7636,151	

H	K	L	2Th(obs)	2Th(obs)shift	2Th(Calc)	diff,
0	0	1	5.5600	5.5600	5.5984	-0.0384
1	1	0	7.4400	7.4400	7.4808	-0.0408
1	1	1	9.3200	9.3200	9.3485	-0.0285
0	0	2	11.2300	11.2300	11.2102	0.0198
0	1	2	12.0200	12.0200	12.0177	0.0023
0	3	0	12.9700	12.9700	12.9756	-0.0056
2	2	0	15.0100	15.0100	14.9937	0.0163
1	2	2	16.0500	16.0500	16.0418	0.0082
1	4	0	19.8800	19.8800	19.8778	0.0022
3	3	0	22.5800	22.5800	22.5721	0.0079

Sqrt(Sum(2Th O-C)**2)/(Nref-Npar) : 0.0244

Sqrt(Sum(2Th O-C)**2)/Nref) : 0.0219

Anexo 2

Tabla A. 2. Comparación de los desplazamientos químicos del MTX liofilizado con Manitol, el purificado y el reportado. Integración de las señales.

Desplazamientos químicos (ppm)	MTX + Manitol	MTX Purificado	MTX reportado	Integración purificado
A	8.57	8.46	8.59	0.93
B	8.09	8.24	8.20	1.00
C	7.63	7.76	7.74	2.38
D	7.62	7.73	7.70	1.21
E	7.39	7.54	7.50	0.87
F	6.82	6.82	6.83	2.38
G	6.59	6.76	6.70	1.24
J	4.32	4.35	4.37	1.15
K	3.16	3.24	3.21	3.53
L	1.00	1.05	2.03	3.53
M	2.35	2.32	2.33	2.03
N	1.93	2.07	2.07	1.05
P	1.83	1.92	1.94	1.00

De manera complementaria a los estudios de ^1H -RMN se tomó un espectro COSY para determinar la integridad del MTX posterior a la purificación. La figura A.1 muestra el espectro COSY del MTX en donde se observan las interacciones entre el protón *B* del N y el *K* que se encuentra a una corta distancia, así como también las interacciones entre los protones *P* y *N* del grupo metilo, interactuando con los protones *M* y *K*. Se observa además interacción entre los protones *F* y *C* del anillo de benceno. Algunas interacciones esperadas no son observadas mediante COSY, lo que puede ser atribuido a un tiempo bajo de acumulación de espectros.

El complemento de estas técnicas de resonancia magnética nuclear permitió verificar de manera inequívoca la integridad estructural de la molécula de MTX posterior a su purificación.

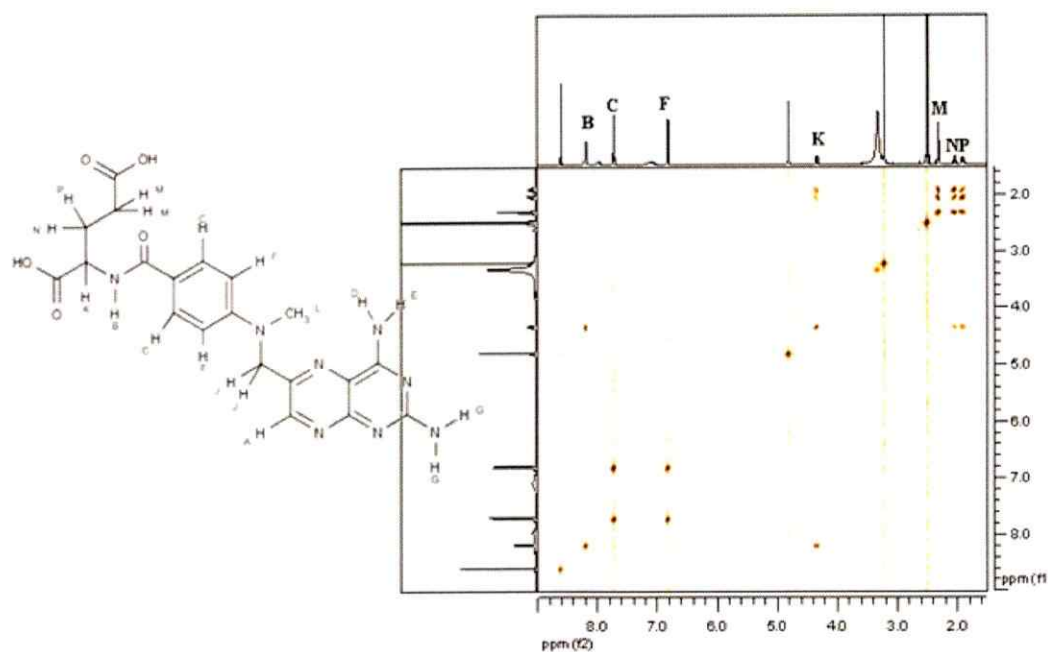


Figura A. 2. Espectro COSY y asignación de los protones de la molécula.

Tabla A. 3. Comparación de los desplazamientos químicos del MTX en el CI y en la mezcla física.

Desplazamientos químicos (ppm)	MTX Purificado	Integral	MTX CI	Integral	MTX mezcla física	Integral
A	8.46	0.93	-	-	8.59	1.01
B	8.24	1.00	8.18	-	8.18	1.01
C	7.76	2.38	7.73	-	7.73	1.19
D	7.73	1.21	7.71	-	7.71	1.13
E	7.54	0.87	7.45	0.92	-	-
F	6.82	2.38	6.89	1.08	6.82	2.37
G	6.76	1.24	6.80	0.89	6.77	1.36
J	4.84	2.05	-	-	4.79	2.05
K	4.35	1.15	4.33	0.98	4.34	1.19
L	3.24	3.53	3.21	3.14	3.21	3.23
M	2.32	2.03	2.30	2.00	2.31	2.18
N	2.07	1.05	2.06	1.13	2.06	1.15
P	1.92	1.00	1.89	1.00	1.91	1.00

Anexo 3

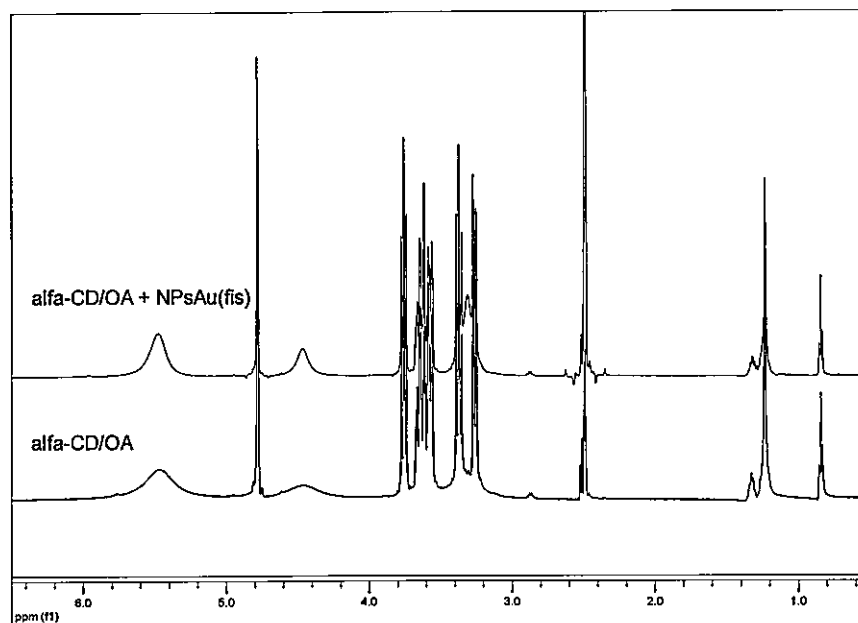
A 3.1 ^1H -RMN

Figura A. 3. Espectro RMN del CI y del CI conjugado a NEsAu.

Tabla A. 4. Desplazamientos químicos de los protones de la matriz en el CI conjugado a las NEsAu.

α -CD	H1 (ppm)	H2 (ppm)	H3 (ppm)	H4 (ppm)	H5 (ppm)	H6 (ppm)	-OH(2) (ppm)	-OH(3) (ppm)	-OH(6) (ppm)
α -CD/OA+NEsAu _{fis}	4.79	3.26	3.78	3.38	3.57	3.64	5.49	5.49	4.47

Tabla A. 5. Desplazamientos químicos de los protones de la OA en el CI conjugado a las NEsAu.

OA	-CH ₃ (ppm)	-(CH ₂) _n - (ppm)	-CH ₂ - (ppm)
α -CD/OA+NEsAu	0.85	1.24	1.32

A 3.2 DRXP

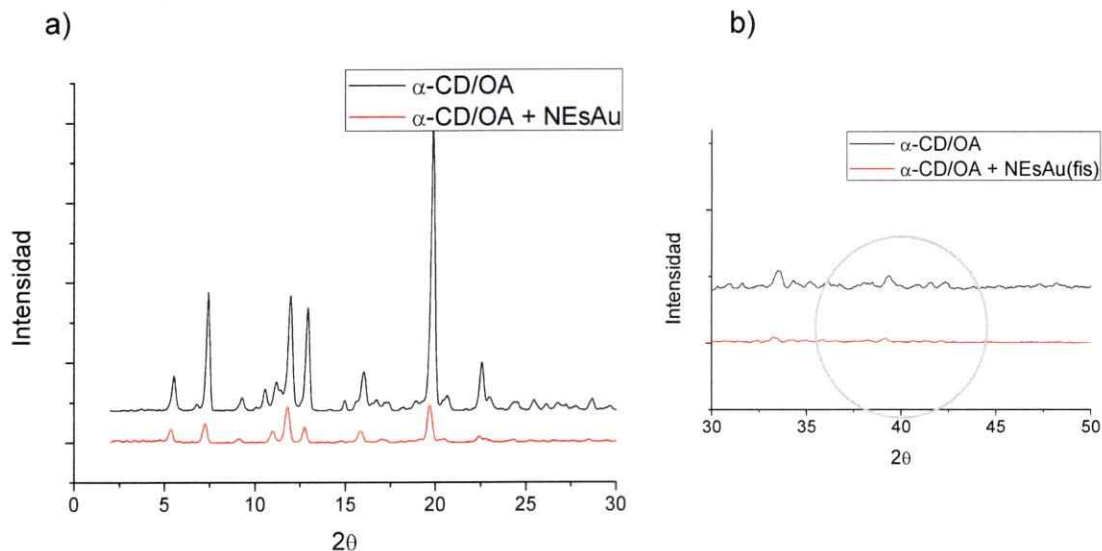


Figura A. 4. a) Difractograma del CI y el CI conjugado a las NEsAu, b) región 2θ de los planos del oro.

Tabla A. 6. Tipo de sistema cristalino para el CI y el CI con NEsAu, grupo espacial y parámetros de red.

Muestra	Sistema cristalino	Grupo espacial	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)	Volumen Å ³
α-CD/OA+NEsAu	Hexagonal	P6	23.830	23.830	16.081	90	90	120	7908.4

A.3.3 Análisis Térmicos

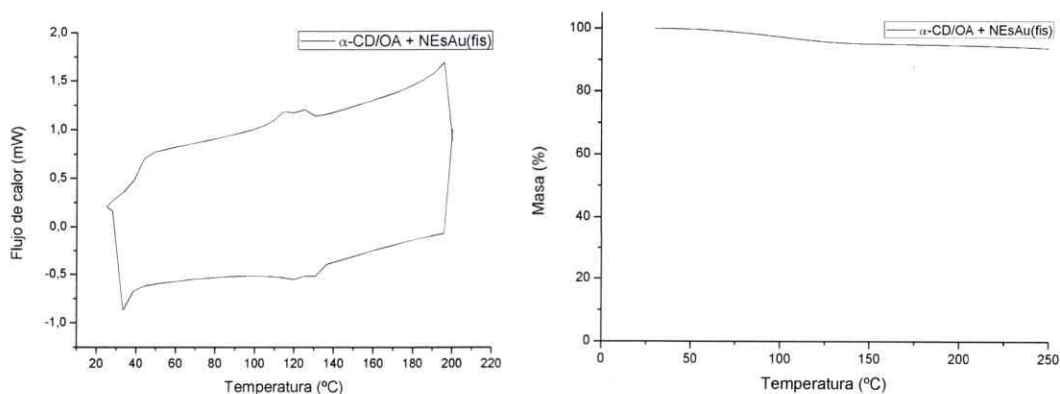


Figura A. 5. TGA y DSC de las NEsAu unidas al CI.

Anexo 4

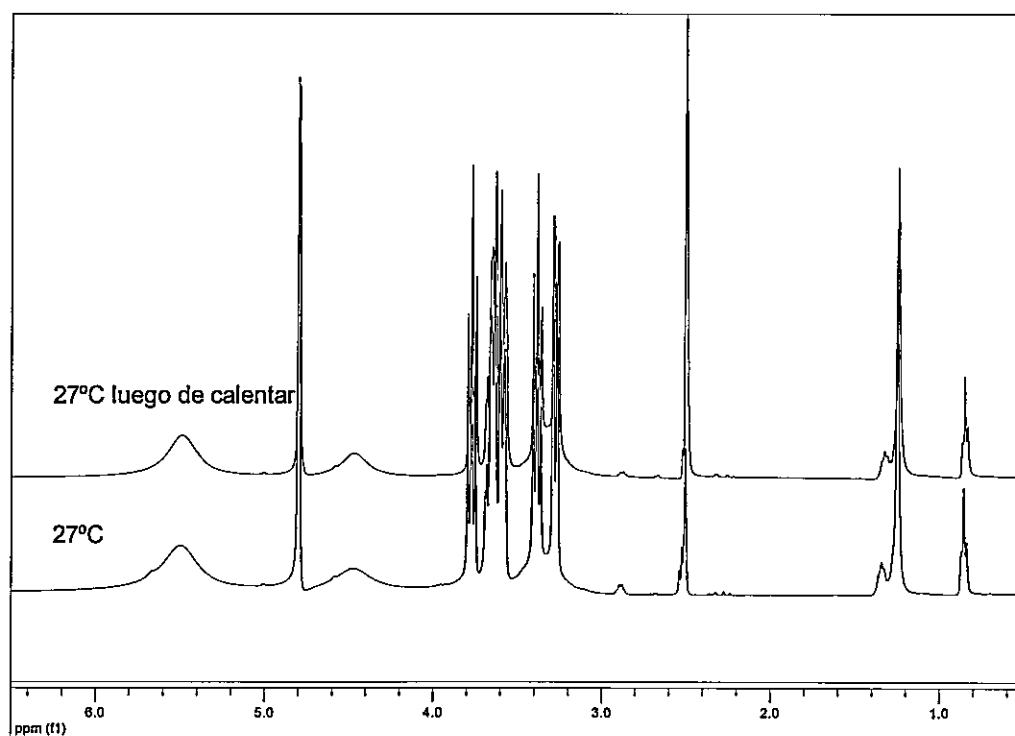


Figura A. 6. Espectros ^1H -RMN del Cl conjugado a NEsAu obtenidas por el método de Turkevich a 27°C, inicialmente y posterior al calentamiento.

Anexo 5

A.5.1 Primera prueba de irradiación al CI unido a NEsAu

Se disolvieron 26.7 mg del CI de α -CD/OA unido a NEsAu obtenidas por el método químico en 0.795 mL de DMSO- d_6 .

La solución se mantuvo en agitación constante en un tubo de RMN y se irradió con un láser de 532 nm, modificando el tiempo y potencia.

Tabla A. 7. Condiciones de potencia y tiempo de irradiación de la muestra.

Medida	Potencia (mW)	Tiempo (min)
Control sin irradiar	-	-
2	250	15
3	450	15
4	450	60

La Figura A.7 muestra los espectros ^1H -RMN del CI conjugado a las NEsAu sin irradiar y luego de irradiar con los tiempos y potencias especificados en la tabla a.7. Se observa que no existen variaciones en los espectros, al comparar los desplazamientos químicos (tabla A.8), se observa que los grupos -OH2, -OH3 y -OH6 sufren un leve desplazamiento químico hacia campo bajo, para todos los otros protones no se observan variaciones.

No es posible monitorear el cambio en los desplazamientos químicos generados por la irradiación, probablemente por inconvenientes técnicos. Debido a que alrededor de 5 min transcurren entre que se saca el magneto y se pone el tubo en el equipo para medir el espectro. Sabiendo que el cambio conformacional del CI es un proceso reversible, probablemente en este tiempo el CI vuelve a su estado original.

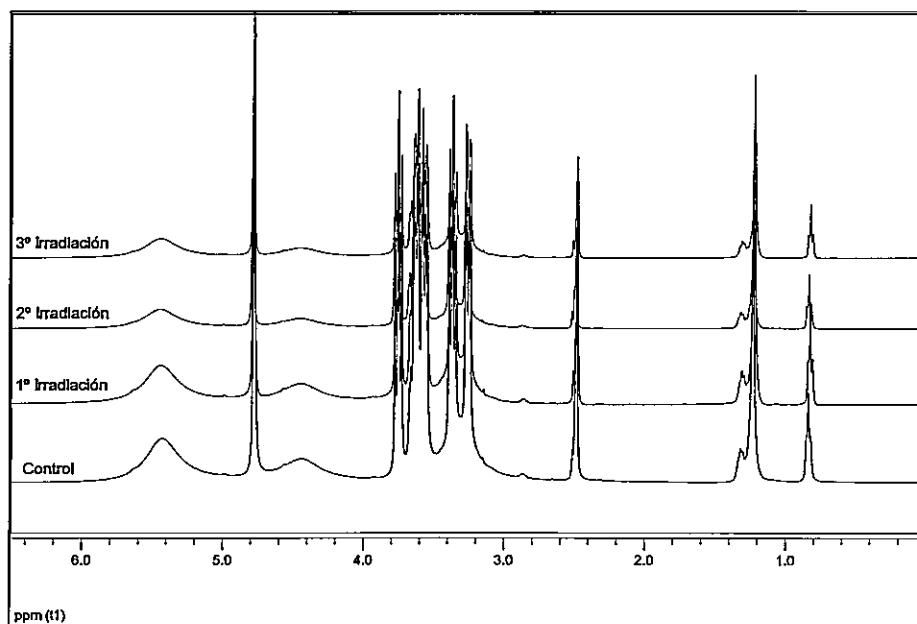


Figura A. 7. Espectros ^1H -RMN de CI conjugado a NEsAu sin irradiar y luego de irradiar con tres condiciones distintas de potencia y tiempo.

Tabla A. 8. Desplazamientos químicos de a) OA y b) de la matriz de CD en el CI conjugado a las NEsAu.

a)

Medida	CH_3 (ppm)	$-\text{CH}_2-$ (ppm)
control	0.84	1.32
1º Irradiación	0.84	1.32
2º Irradiación	0.84	1.32
3º Irradiación	0.84	1.32

b)

Medida	$-\text{OH}(2)$ (ppm)	$-\text{OH}(3)$ (ppm)	$-\text{OH}(6)$ (ppm)
Control	5.43	5.43	4.44
1º Irradiación	5.43	5.43	4.45
2º Irradiación	5.43	5.43	4.44
3º Irradiación	5.44	5.44	4.45

A.5.2. Estudio de la temperatura que alcanza las muestras luego de ser irradiadas.

Se disolvieron 15.97 mg del CI de α -CD/OA conjugado a NbsAu en 397.5 μ L de DMSO- d_6 . La solución se mantuvo en agitación constante en un tubo de RMN. Posteriormente la muestra se irradió con un láser de 808 nm y se monitoreó temporalmente la temperatura de la solución por medio de un termómetro láser.

Tabla A. 9. Datos del tiempo de irradiación y temperatura que alcanza la solución a) concentración inicial y b) luego de concentrar al doble la muestra.

a)			b)		
Medida	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Medida	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
control sin irradiar	0	26.4	Control sin irradiar	0	26.4
2	15	27.4	2	15	28.4
3	30	30.2	3	30	29.2
4	45	30.4	4	60	30.4
5	60	30.4	5	120	31.8
6	90	31.2			
7	150	31.2			
8	180	31.2			

La tabla A.9 muestra las temperaturas que alcanza la solución luego de ser irradiada, se observa que independiente de la concentración la temperatura máxima alcanzada es alrededor de 31 °C. Estos resultados solo entregan información de la temperatura de la solución pero no son representativos de la temperatura que alcanza el entorno de las NbsAu.