

UCH-FC  
Doc-Q  
H 565  
C.1



**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS  
SUPRAMOLECULARES DECORADOS CON  
NANOPARTÍCULAS METÁLICAS**

**Tesis**

**Entregada a la**

**Universidad de Chile**

**En Cumplimiento Parcial de los Requisitos**

**Para Optar al Grado de**

**Doctor en Química**

**Facultad de Ciencias**

**Por**

**Bárbara Andrea Herrera Ibarra**

**Octubre, 2013**

**Directores de Tesis**

**Dr: Paul Jara Vergara**

**Dr: Marcelo Javier Kogan**

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,

**Bárbara Andrea Herrera Ibarra**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Química, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 25 de Octubre de 2013

Director de Tesis:

Dr. Paul Jara Vergara

Handwritten signature of Paul Jara Vergara in black ink, positioned above a horizontal dotted line.

Director de Tesis:

Dr. Marcelo Javier Kogan

Handwritten signature of Marcelo Javier Kogan in black ink, positioned above a horizontal dotted line.

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Ernesto Clavijo (presidente)

Handwritten signature of Ernesto Clavijo in black ink, positioned above a horizontal dotted line.

Dra. Soledad Bollo

Handwritten signature of Soledad Bollo in black ink, positioned above a horizontal dotted line.

Dr. Carlos Díaz

Handwritten signature of Carlos Díaz in blue ink, positioned above a horizontal dotted line.

Dr. Patricio Häberle

A horizontal dotted line, indicating a signature position for Patricio Häberle.

Dr. Diego Venegas

A horizontal dotted line, indicating a signature position for Diego Venegas.



A mis padres, con mucho cariño....



Bárbara Andrea Herrera Ibarra nació el 19 de Junio de 1985 en Santiago de Chile.

Sus estudios de enseñanza media los realizó en el Liceo A-7 de Niñas "Teresa Prats de Sarratea" en la comuna de Santiago Centro.

En el año 2003 ingresó a la carrera de Licenciatura en Ciencias con mención en Química en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, logrando obtener el grado académico en el año 2008 gracias al trabajo de investigación titulado "*Síntesis y caracterización de nanoestructuras unidimensionales*" realizado en el Laboratorio de Síntesis Inorgánica y Electroquímica de la misma Facultad a cargo del Dr. Paul Jara. Ese mismo año ingresó al Programa de Doctorado en Química de la Universidad de Chile ampliando sus conocimientos en el área de la Química Supramolecular y la Nanoquímica, bajo la dirección del Dr. Marcelo Kogan y el Dr. Paul Jara, hasta la fecha.

Sus intereses científicos se centran en la preparación de nanoestructuras metálicas a través de métodos químicos y físicos, la síntesis de sistemas supramoleculares, el estudio de fenómenos de interfase, funcionalización de superficies, sistemas híbridos orgánico-inorgánico y la utilización de estos sistemas para fines biotecnológicos.

## Agradecimientos

Durante todo el tiempo que estuve trabajando en este proyecto, me fui nutriendo de muchos conocimientos que me permitieron avanzar en el ámbito profesional como investigadora, pero por sobre todo, este tiempo me ha permitido crecer como persona.

Mi experiencia ha sido satisfactoria en todos los ámbitos y es por eso que tengo mucho que agradecer a todas las personas que, ya sea en el ámbito académico o como compañeros personales, enriquecieron mi vida durante estos años de trabajo.

Quiero partir agradeciendo a mi familia, porque ellos siempre estarán conmigo.

Agradezco la fortaleza que me ha entregado mi novio, él me motivó día a día y sin él creo que todo habría sido mucho más difícil...

Agradezco con mucho cariño a mis tutores; el Dr. Paul Jara y el Dr. Marcelo Kogan, ellos me han forjado como investigadora y les agradezco su infinito apoyo, porque además de ser excelentes profesionales de los que he aprendido mucho, también son muy buenas personas.

En especial quiero agradecer al Dr. Nicolás Yutronic, por su enorme colaboración en mi formación siendo como un padrino para mí.

Quiero agradecer a todos los profesores del Laboratorio de Síntesis Inorgánica y Electroquímica, al Dr. Guillermo González, la profesora Eglantina Benavente, la profesora María Angélica Santa Ana y a todos mis compañeros de laboratorio en la Facultad de Ciencias y en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, ya que tuve la suerte de poder participar activamente en los dos grupos de investigación de mis tutores y tener muy buenos compañeros de trabajo y amigos.

Además quiero agradecer al Dr. Fernando Albericio, quien me otorgó la posibilidad de realizar una pasantía en su laboratorio... Un viaje que me entregó nuevas herramientas para crecer como investigadora y una alegre experiencia personal.

Finalmente, quisiera agradecer a los integrantes de mi comisión; el Dr. Ernesto Clavijo, la Dra. Soledad Bollo, el Dr. Carlos Díaz, el Dr. Diego Venegas y el Dr. Patricio Häberle, quienes corrigieron y apoyaron este proyecto, siempre con muy buenas observaciones y consejos.

Y no puedo olvidar a los funcionarios y secretarias de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, quienes con su gran disposición y una agradable sonrisa siempre me apoyaron en los problemas cotidianos y trámites urgentes.

# Índice

	Pág.
Lista de Tablas.....	xi
Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Abreviaturas.....	xxi
Resumen.....	xxiii
Abstract.....	xxv
<b>CAPÍTULO 1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Prólogo.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. Fundamentos teóricos.....</b>	<b>3</b>
1.2.1. <i>Sistemas supramoleculares.....</i>	<i>3</i>
1.2.2. <i>Ciclodextrinas y sus compuestos de inclusión.....</i>	<i>5</i>
1.2.3. <i>Nanopartículas.....</i>	<i>10</i>
1.2.4. <i>Síntesis de nanopartículas metálicas.....</i>	<i>17</i>
1.2.5. <i>Nanopartículas metálicas y ciclodextrinas.....</i>	<i>22</i>
<b>1.3. Hipótesis y Objetivos.....</b>	<b>23</b>
1.3.1. <i>Hipótesis.....</i>	<i>23</i>
1.3.2. <i>Objetivo general.....</i>	<i>24</i>
1.3.3. <i>Objetivos específicos.....</i>	<i>25</i>
<b>CAPÍTULO 2. Materiales y Métodos.....</b>	<b>26</b>
<b>2.1. Materiales.....</b>	<b>27</b>
2.1.1. <i>Reactivos y solventes.....</i>	<i>27</i>
<b>2.2. Metodología.....</b>	<b>29</b>
2.2.1. <i>Síntesis y caracterización de compuestos de inclusión de <math>\alpha</math>-ciclodextrina...29</i>	<i>29</i>
2.2.1.1. <i>Preparación de compuestos de inclusión de <math>\alpha</math>-ciclodextrina.....29</i>	<i>29</i>

2.2.1.2. Caracterización de los compuestos de inclusión mediante difracción de rayos X de polvo.....	29
2.2.1.3. Caracterización de los compuestos de inclusión mediante resonancia magnética nuclear de protones.....	30
<b>2.2.2. Obtención y caracterización de sistemas nanosupramoleculares formados por nanopartículas de níquel y cobalto con los compuestos de inclusión de <math>\alpha</math>-ciclodextrina.....</b>	<b>30</b>
2.2.2.1. Preparación de NPsNi y NPsCo sobre los compuestos de inclusión de $\alpha$ -ciclodextrina.....	30
2.2.2.2. Caracterización de NPsNi y NPsCo mediante espectroscopia UV-visible.....	32
2.2.2.3. Análisis de NPsNi y NPsCo sobre los compuestos de inclusión mediante microscopia electrónica de transmisión.....	32
2.2.2.4. Caracterización mediante espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDX).....	33
2.2.2.5. Purificación de los sistemas nanosupramoleculares; nanopartículas-compuestos de inclusión.....	33
2.2.2.6. Cuantificación de metal correspondiente a las NPsNi y NPsCo sobre los sustratos supramoleculares.....	34
2.2.2.7. Adición del péptido CLPFFD a los compuestos nanosupramoleculares.....	35
2.2.2.8. Análisis de aminoácidos a los sistemas nanosupramoleculares formadas por Nanopartículas funcionalizadas con Compuestos de Inclusión y el péptido CLPFFD (NPs-CI/Péptido).....	35
2.2.2.9. Evaluación de citotoxicidad de sistemas nanosupramoleculares en células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y).....	38
<b>2.2.3. Nanodecoración de cristales supramoleculares con nanoestructuras de oro.....</b>	<b>41</b>
2.2.3.1. Síntesis de nanobarras de oro estabilizadas con bromuro de cetiltrimetilamonio.....	41
2.2.3.2. Caracterización de nanobarras de oro mediante microscopia electrónica de transmisión.....	42
2.2.3.3. Análisis de la dispersión de nanobarras de oro mediante espectroscopia UV-visible.....	43
2.2.3.4. Preparación de compuestos de inclusión de $\alpha$ -ciclodextrina con octanotiol decorados con nanobarras de oro.....	43
2.2.3.5. Caracterización de los compuestos de inclusión decorados con nanobarras de oro, mediante microscopia de barrido.....	44
2.2.3.6. Análisis de resonancia magnética nuclear de protones de los compuestos de inclusión con nanobarras de oro.....	44
2.2.3.7. Caracterización de los compuestos de inclusión nanodecorados mediante espectroscopia UV-visible en estado sólido.....	44

2.2.3.8. Síntesis de nanopartículas de oro esféricas estabilizadas en bromuro de cetiltrimetilamonio.....	45
2.2.3.9. Caracterización de nanopartículas de oro esféricas mediante microscopía electrónica de transmisión.....	45
2.2.3.10. Caracterización de la dispersión de nanopartículas de oro mediante espectroscopía UV-visible.....	46
2.2.3.11. Preparación de cristales de compuestos de inclusión de $\alpha$ -ciclodextrina decorados con nanopartículas de esféricas de oro.....	46
2.2.3.12. Caracterización de compuestos de inclusión de $\alpha$ -ciclodextrina decorados con nanopartículas de oro mediante microscopía electrónica de barrido de alta resolución.....	47
2.2.3.13. Análisis de los compuestos de inclusión con nanopartículas de oro, mediante resonancia magnética nuclear de protones.....	47
2.2.3.14. Caracterización de las nanopartículas de oro depositadas sobre los cristales de compuestos de inclusión mediante espectroscopía UV-visible.....	47
<b>2.2.4. Preparación de nanoestructuras híbridas bio-inorgánicas compuestas por fibras <math>\beta</math>-amiloides decoradas con nanopartículas de oro.....</b>	<b>48</b>
2.2.4.1. Síntesis de nanopartículas de oro.....	48
2.2.4.2. Preparación de nanopartículas de oro funcionalizadas con los péptidos CLPFFD, C(Eg) <sub>3</sub> LPFFD y GSH.....	48
2.2.4.3. Caracterización de los conjugados nanopartícula-péptido mediante microscopía electrónica de transmisión.....	49
2.2.4.4. Caracterización de los conjugados nanopartícula-péptido mediante espectroscopía UV-visible.....	50
2.2.4.5. Desagregación previa del péptido $\beta$ -amiloide para la preparación de fibras.....	50
2.2.4.6. Obtención de fibras del péptido $\beta$ -amiloide, decoradas con los conjugados nanopartículas de oro-péptidos.....	51
2.2.4.7. Caracterización de fibras del péptido $\beta$ -amiloide ( $A\beta_{1-42}$ ) nanodecoradas, mediante microscopía electrónica de transmisión.....	52
 <b>CAPÍTULO 3. Resultados y Discusiones: “Compuestos de Inclusión de <math>\alpha</math>-Ciclodextrina con Alquiltioles y Alquilaminas”.....</b>	<b>53</b>
 3.1. Síntesis de compuestos de inclusión de $\alpha$ -ciclodextrina con moléculas n-alquilaminas y n-alquiltioles.....	54
3.2. Caracterización de compuestos de inclusión de $\alpha$ -ciclodextrina con moléculas n-alquilaminas y n-alquiltioles.....	56
3.2.1. Análisis mediante RMN- <sup>1</sup> H.....	57
3.2.2. Caracterización mediante DRX.....	62

**CAPÍTULO 4. Resultados y Discusiones: “Obtención y Caracterización de Nanopartículas de Níquel y Cobalto adheridas a Compuestos de Inclusión de  $\alpha$ -Ciclodextrina con Alquiltioles y Alquilaminas”.....70**

<b>4.1. Preparación de nanopartículas de níquel y cobalto, adheridas a compuestos de inclusión de <math>\alpha</math>-ciclodextrina, mediante pulverización catódica.....</b>	<b>71</b>
<b>4.2. Caracterización de NPsNi y NPsCo mediante microscopía electrónica de transmisión.....</b>	<b>71</b>
<b>4.3. Optimización de la síntesis de NPsNi y NPsCo mediante el método de PCV.....</b>	<b>76</b>
<b>4.4. Caracterización de NPsNi y NPsCo obtenidas bajo las nuevas condiciones mediante PCV.....</b>	<b>78</b>
<b>4.5. Caracterización mediante espectroscopía UV-visible de NPsONi y NPsOCo adheridas a los compuestos de inclusión.....</b>	<b>88</b>
<b>4.6. Efectos sobre la viabilidad celular de sistemas nanosupramoleculares.....</b>	<b>92</b>
<i>4.6.1. Evaluación de la viabilidad celular frente a los compuestos de inclusión de <math>\alpha</math>-ciclodextrina.....</i>	<i>94</i>
<i>4.6.2. Purificación de los sistemas nanosupramoleculares, NPsNi-<math>\alpha</math>-CD/DT y NPsCo-<math>\alpha</math>-CD/DDT.....</i>	<i>101</i>
<i>4.6.3. Funcionalización de sistemas supramoleculares NPsONi-<math>\alpha</math>-CD/DT y NPsOCo-<math>\alpha</math>-CD/DDT con el péptido CLPFFD.....</i>	<i>103</i>
<i>4.6.4. Evaluación de citotoxicidad de NPsONi y NPsOCo funcionalizadas con los compuestos de inclusión y el péptido CLPFFD.....</i>	<i>106</i>

**CAPÍTULO 5. Resultados y Discusiones: “Nanodecoración de Compuestos de Inclusión de  $\alpha$ -Ciclodextrina con nanobarras y nanopartículas de oro”.....108**

<b>5.1. Ordenamiento de nanopartículas sobre superficies cristalinas.....</b>	<b>109</b>
<b>5.2. Nanopartículas y nanobarras de oro estabilizadas en bromuro de cetiltrimetilamonio.....</b>	<b>111</b>
<i>5.2.1. Caracterización de las nanoestructuras de oro mediante microscopía electrónica.....</i>	<i>113</i>
<i>5.2.2. Análisis de espectrofotometría UV visible de nanopartículas y nanobarras de oro.....</i>	<i>122</i>
<b>5.3. Nanodecoración de cristales de compuestos de inclusión con nanobarras y nanopartículas de oro.....</b>	<b>125</b>
<i>5.3.1. Caracterización mediante microscopía electrónica de barrido de los cristales de compuestos de inclusión de <math>\alpha</math>-ciclodextrina nanodecorados.....</i>	<i>126</i>
<i>5.3.2. Caracterización mediante espectrofotometría UV-visible de los compuestos de inclusión nanodecorados.....</i>	<i>133</i>

5.3.3. <i>Análisis de resonancia magnética nuclear de protones de los compuestos de inclusión nanodecorados</i> .....	136
---	-----

**CAPÍTULO 6. Resultados y Discusiones: “Formación de estructuras unidimensionales; Nanodecoración de fibras amiloides”.....143**

6.1. <b>Obtención de nanoestructuras unidimensionales basadas en moldes</b> ....	144
6.2. <b>Preparación de nanoestructuras a partir del tratamiento térmico de nanopartículas metálicas adheridas a la superficie cristalina de los compuestos de inclusión</b> .....	145
6.3. <b>Materiales híbridos bio-inorgánicos</b> .....	147
6.4. <b>El péptido <math>\beta</math>-amiloide</b> .....	150
6.5. <b>Nanodecoración de las fibras del péptido <math>\beta</math>-amiloide con nanopartículas de oro funcionalidas con el péptido CLPFFD</b> .....	153
6.5.1. <i>Preparación y funcionalización de nanopartículas de oro</i> .....	154
6.5.2. <i>Preparación de fibras amiloides nanodecoradas</i> .....	158
6.6. <b>Utilización de nanopartículas de oro funcionalizadas con el péptido C(Eg)<sub>3</sub>LPFFD, para la formación de materiales bio-inorgánicos con el péptido A<math>\beta</math><sub>1-42</sub></b> .....	167

**CAPÍTULO 7. Discusión general**.....173

7.1. <b>Compuestos de inclusión de <math>\alpha</math>-ciclodextrina con huéspedes alquiltioles y alquilaminas</b> .....	174
7.2. <b>Nanopartículas de Ni y Co preparadas mediante el depósito físico en vapor</b> .....	176
7.3. <b>Nanodecoración de cristales de compuestos de inclusión de <math>\alpha</math>-ciclodextrina/ alquiltioles con nanobarras y nanopartículas esféricas de oro</b> .....	181
7.4. <b>Obtención de nanoestructuras unidimensionales</b> .....	183

**CAPÍTULO 8. Conclusiones**.....187

**ANEXOS**.....191

<b>ANEXO I</b> .....	192
<b>A. Síntesis del péptido CLPFFD</b> .....	192
<b>A.1. Parte experimental</b> .....	193
A.1.1. <i>Reactivos y solvente utilizados</i> .....	193
A.1.2. <i>Metodología</i> .....	194
A.1.2.1. <i>Acondicionamiento de la resina</i> .....	194
A.1.2.2. <i>Acoplamiento sucesivo de cada aminoácido</i> .....	196
A.1.2.3. <i>Desanclaje del péptido desde la resina</i> .....	196

<i>A.1.3. Caracterización del péptido CLPFFD</i> .....	197
<i>A.1.3.1. Análisis por HPLC</i> .....	197
<i>A.1.3.2. Análisis por espectroscopía de masa (EM) MALDI-TOF</i> .....	197
<i>A.1.3.3. Análisis de aminoácidos</i> .....	198
<b>A.2. Resultados</b> .....	198
<b>ANEXO II</b> .....	201
<b>B. Espectros, difractogramas y cromatogramas adicionales</b> .....	201
<b>REFERENCIAS</b> .....	216

## Lista de Tablas

**Tabla 3.1.** Porcentajes de rendimiento de los compuestos de inclusión sintetizados, donde el reactivo limitante es  $\alpha$ -ciclodextrina.

**Tabla 3.2.** Desplazamientos químicos de los protones de las moléculas de OT y  $\alpha$ -CD cuando se encuentran de manera aislada y cuando forman parte del CI  $\alpha$ -CD/OT.

**Tabla 3.3.** Relaciones molares (matriz:huésped) calculadas para cada compuesto de inclusión.

**Tabla 3.4.** Parámetros de red para los CI, según un sistema cristalino hexagonal.

**Tabla 3.5.** Reflexiones indexadas para el CI de  $\alpha$ -CD/DDT.

**Tabla 3.6.** Datos cristalográficos para el CI  $\alpha$ -CD/OT indexado según un sistema monoclinico y un sistema triclinico.

**Tabla 4.1.** Resumen de resultados de los análisis TEM en la preparación de NPsNi y NPsCo.

**Tabla 4.2.** Datos de la simulación de difracción de electrones para las NPsCo.

**Tabla 4.3.** Resumen de resultados para NPsONi y NPsOCu en las nuevas condiciones.

**Tabla 4.4.** Análisis de cuantificación de metales.

**Tabla 4.5.** Resultados de análisis de aminoácidos para los sustratos supramoleculares funcionalizados.

**Tabla 5.1.** Datos del patrón de difracción simulado realizado sobre la micrografía de las NPsAu.

**Tabla 5.2.** Datos de los patrones de difracción de electrones simulados para las NPsAu.

**Tabla 5.3.** Desplazamientos químicos de las señales de la molécula de OT en el CI, antes y luego de la nanodecoración.

**Tabla 5.4.** Desplazamientos químicos de las señales de la molécula de  $\alpha$ -CD en el CI, antes y después de la nanodecoración.

**Tabla 5.5.** Comparación de los desplazamientos químicos de las señales pertenecientes a la molécula huésped DDT en el CI, antes y después de la nanodecoración.

**Tabla 5.6.** Comparación de los desplazamientos químicos de las señales pertenecientes a la molécula de  $\alpha$ -CD en el CI, antes y después de la nanodecoración.

**Tabla S1.** Reflexiones indexadas del difractograma para el CI de  $\alpha$ -CD/OT.

**Tabla S2.** Intensidades indexadas del difractograma para el CI de  $\alpha$ -CD/DT.

**Tabla S3.** Intensidades indexadas del difractograma para el CI de  $\alpha$ -CD/DDT.

**Tabla S4.** Intensidades indexadas del difractograma para el CI de  $\alpha$ -CD/OA.

**Tabla S5.** Intensidades indexadas del difractograma para el CI de  $\alpha$ -CD/DA.

**Tabla S6.** Intensidades indexadas del difractograma para el CI de  $\alpha$ -CD/DDA.

**Tabla S7.** Desplazamientos de las señales correspondientes a los protones de la molécula de CTAB y de los mismos cuando las moléculas de CTAB rodean las NBsAu

## Lista de Figuras

**Figura 1.1.** Arriba: Estructura de las moléculas  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD (vista desde arriba). Abajo: disposición de los átomos de una de las unidades de glucopiranososa en la estructura de la CD (derecha) y esquema de la forma de “balde” que posee la  $\alpha$ -CD, con sus respectivas dimensiones (derecha). Los diámetros de las CD dependen del número de unidades de glucopiranososa de la molécula.

**Figura 1.2.** Estructuras cristalinas posibles para los CI de  $\alpha$ -CD: tipo caja (A), tipo capa (B) y tipo canal (C).

**Figura 1.3.** Representación de las tres orientaciones posibles para el dímero de  $\alpha$ -CD en una estructura tipo canal, denominadas; cabeza-cabeza, cola-cola y cabeza-cola, respectivamente.

**Figura 1.4.** Esquema de la variación en los niveles de energía conforme disminuye el tamaño: bandas de energía en un metal voluminoso (A), en un cúmulo metálico grande de 100 átomos, mostrando en ensanchamiento del *gap* (B) y en un cúmulo pequeño compuesto por tres átomos (C). (Adaptado de la referencia [17])

**Figura 1.5.** Esquema sencillo del equipo de pulverización catódica

**Figura 1.6.** Esquema del funcionamiento del proceso de PCV asistido por campo magnético.

**Figura 2.1.** Esquema representativo del proceso de formación de nanopartículas mediante pulverización catódica sobre los cristales de CI de  $\alpha$ -CD.

**Figura 2.2.** Esquema del proceso de purificación de las nanopartículas obtenidas sobre los compuestos de inclusión en estado sólido.

**Figura 2.3.** A) Fotografía de una cámara de Neubauer o hematocitómetro (Tomada del sitio <http://www.pro-lab.com.mx>) y B) vista amplificada de la cámara que muestra los cuadrantes donde se realiza el conteo celular.

**Figura 2.4.** Esquema que detalla el proceso general de síntesis, funcionalización y purificación de NPsAu.

**Figura 2.5.** Esquema representativo del proceso final escogido para la obtención de los materiales híbridos bio-inorgánico.

**Figura 3.1.** Espectro RMN- $^1\text{H}$  del CI de  $\alpha$ -CD/OT.

**Figura 3.2.** A) Esquema que muestra la disposición de los átomos que conforman una unidad de  $\alpha$ -glucopiranososa perteneciente a una molécula de  $\alpha$ -CD, B) Esquema aproximado de las unidades básicas de dímero para los diferentes CI donde se aprecian las disposiciones que adoptan las moléculas huésped de diferente tamaño dentro del canal de  $\alpha$ -CD.

**Figura 3.3.** Patrón de difracción de  $\alpha$ -CD

**Figura 3.4.** Análisis de DRXP del CI de  $\alpha$ -CD/DDT.

**Figura 3.5.** Difractogramade polvo del CI de  $\alpha$ -CD/OT, indexado según un sistema monoclinico P2.

**Figura 3.6.** Análisis de DRX de polvo del CI de  $\alpha$ -CD/OT, indexado según un sistema triclinico P1.

**Figura 4.1.** A) Micrografía TEM de NPsNi preparadas en el CI de  $\alpha$ -CD/OA (50 s de depósito), B) Histograma de dispersión de tamaño para NPsNi-  $\alpha$ -CD/OA (n=100), C) Imagen TEM de NPsNi de  $23,9 \pm 0,5$  nm de diámetro, obtenidas sobre el CI de  $\alpha$ -CD/DDA durante 50s de exposición y D) Histograma respectivo (n=100).

**Figura 4.2.** A) Micrografía TEM de NPsCo obtenidas en el CI de  $\alpha$ -CD/OT durante 60s de depósito B) Histograma de dispersión de tamaño para NPsCo-  $\alpha$ -CD/OT (n=100), C) Micrografía TEM de NPsCo obtenidas en el CI de  $\alpha$ -CD/DT después de 120s de exposición. D) Histograma que muestra una distribución de tamaño de  $83,2 \pm 1,7$  nm para estas NPs (n=100).

**Figura 4.3.** A) y B) Micrografías HRTEM de NPsCo obtenidas sobre el CI de  $\alpha$ -CD/DT a 60s, C) Histograma de dispersión de tamaño y D) Análisis EDS donde se detecta la presencia de Co perteneciente a las NPsCo ( $K_{\alpha 1} = 6,930$  keV y  $K_{\beta 1} = 7,649$  keV). La presencia de Fe y Cr podrían atribuirse a algunas contaminaciones provocadas por el equipo (material de composición del detector).

**Figura 4.4.** A1) y A2) Imágenes TEM de NPsNi sintetizadas sobre el CI de  $\alpha$ -CD/DA durante 120s de exposición. El tamaño de las partículas es de aproximadamente 5 nm de diámetro. Las imágenes TEM B1) y B2) muestran NPsNi de aproximadamente 7 nm, formadas sobre el CI de  $\alpha$ -CD/DDA durante 120s. Las imágenes C1) y C2) corresponden a micrografías TEM de NPsNi de aproximadamente 13 nm preparadas sobre el CI de  $\alpha$ -CD/DDA durante 240s.

**Figura 4.5.** A) y B) Micrografías TEM de NPsNi obtenidas en el CI de  $\alpha$ -CD/OT durante 120s y C) histograma correspondiente que arroja un diámetro promedio de  $12,7 \pm 2,2$  nm, pero también una distribución máxima a los 10 nm.

**Figura 4.6.** A) y B) Imágenes TEM de NPsNi obtenidas sobre el CI de  $\alpha$ -CD/DT y C) gráfico de distribución de tamaño que muestra un diámetro de  $7,9 \pm 0,5$  nm.

**Figura 4.7.** Análisis de EDX realizado en una zona del CI de  $\alpha$ -CD/DT donde se encuentran las NPsNi.

**Figura 4.8.** A) Imagen TEM de NPsCo obtenidas luego de 120s de depósito sobre el CI de  $\alpha$ -CD/DA y B) Histograma de distribución de tamaño muestra un diámetro de  $13,0 \pm 0,6$  nm.

**Figura 4.9.** Micrografía TEM de NPsCo formadas sobre el CI de  $\alpha$ -CD/OT después de 120s de exposición en el equipo de PCV (A) y que poseen un diámetro de  $5,4 \pm 0,8$  nm (B).

**Figura 4.10.** A), B) y C) Imágenes TEM de NPsCo obtenidas en el CI de  $\alpha$ -CD/OT luego de 240s de exposición. D) histograma respectivo que muestra un tamaño de  $13,4 \pm 1,6$  nm de diámetro.

**Figura 4.11.** Imagen A) corresponde a una micrografía TEM de NPsCo obtenidas luego de 120s de exposición del CI de  $\alpha$ -CD/DDT y B) histograma de dispersión de tamaño que muestra un diámetro de  $7,6 \pm 1,1$  nm.

**Figura 4.12.** Imagen SEM y análisis EDX realizado sobre las NPsCo adheridas al CI de  $\alpha$ -CD/DDT.

**Figura 4.13.** Micrografía de HRTEM de las NPsCo e inserto la difracción de electrones.

**Figura 4.14.** Seguimiento del espectro de absorción UV-visible a medida que aumenta el tiempo de depositación sobre el sustrato, para NPsONi (A) y NPsOCO (B).

**Figura 4.15.** Gráficos dosis-respuesta que indican la viabilidad celular al evaluar los CI de  $\alpha$ -CD/OT (A) y  $\alpha$ -CD/DDA (B) con un  $n=12$ .

**Figura 4.16.** Representación esquemática de las NPsOCO o NPsONi estabilizadas con el CI de  $\alpha$ -CD en disolución acuosa.

**Figura 4.17.** Gráficos dosis-respuesta que indica la viabilidad celular para las NPsONi sobre CI de  $\alpha$ -CD/DT (A) y NPsOCO sobre  $\alpha$ -CD/DDT (B) con un  $n=12$ .

**Figura 4.18.** Gráficos dosis-respuesta que indican la viabilidad presentada al aplicar los sistemas nanosupramoleculares purificados A) NPsONi- $\alpha$ -CD/DT y B) NPsOCO- $\alpha$ -CD/DDT sobre el cultivo celular SH-SY5Y ( $n=9$ ).

**Figura 4.19.** Esquema de la superficie de la nanopartícula funcionalizada con el CI y el péptido CLPFFD (No a escala).

**Figura 4.20.** Gráficos dosis-respuesta para evaluación de la citotoxicidad presentada por; A) NPsONi funcionalizadas con el CI de  $\alpha$ -CD/DT y el péptido CLPFFD y B) NPsOCo funcionalizadas con el CI de  $\alpha$ -CD/DDT y el péptido CLPFFD (n = 9).

**Figura 5.1.** Esquema que describe el proceso de preparación de cristales cubiertos con nanopartículas. (Adaptado de la referencia [125])

**Figura 5.2.** (A) y (B) Micrografías TEM de NBsAu estabilizadas en CTAB y (C) histograma realizado según la relación de aspecto (largo/ancho) con un promedio de  $3,9 \pm 0,5$ .

**Figura 5.3.** Micrografía HTEM de una NBsAu. Inserto en la parte inferior derecha se encuentra el patrón de difracción de electrones simulado.

**Figura 5.4.** Micrografía HRTEM que muestra las orientaciones de las NBsAu-CTAB sobre la grilla de microscopía. Un aumento de la imagen en cada NBs muestra la observación predominante de los planos (111) y (200).

**Figura 5.5.** Dibujo de la estructura cristalina de una NBsAu. Adaptado de la referencia [135]

**Figura 5.6.** Esquema del mecanismo propuesto por Garg y col. para la formación de las NBsAu. Tomado y adaptado de la referencia [136].

**Figura 5.7.** A) y B) Micrografías TEM de las NPsAu-CTAB. C) histograma que muestra la dispersión de tamaño.

**Figura 5.8.** Micrografía TEM de NPsAu-CTAB. Insertos en la imagen se muestran los patrones de difracción de electrones simulados.

**Figura 5.9.** Espectro UV-visible de la dispersión coloidal de NBsAu-CTAB.

**Figura 5.10.** Espectro UV-visible de la dispersión de NPsAu estabilizadas en CTAB.

**Figura 5.11.** Izquierda: A) dispersión de NBsAu-CTAB de color rosa y B) solución incolora que resulta después de la adición de los cristales de  $\alpha$ -CD/OT y su filtración. Derecha: C) cristales incoloros de CI de  $\alpha$ -CD/OT y D) cristales de color rosa después de la nanodecoración con NBsAu.

**Figura 5.12.** Imágenes SEM que muestran la nanodecoración preferencial de los cristales del CI de  $\alpha$ -CD/OT. Al aumentar la magnificación de la imagen, es posible observar en detalle a las NBsAu sobre la superficie de los cristales en el plano específico {001}.

**Figura 5.13.** Composición porcentual y espectro EDX que indica la presencia de carbono, oxígeno y azufre, que forman parte del CI de  $\alpha$ -CD/OT y el Au proveniente de las nanoestructuras.

**Figura 5.14.** A) y B) Micrografías SEM que muestra la nanodecoración selectiva de cristales de  $\alpha$ -CD/DDT con NPsAu.

**Figura 5.15.** Esquema de la decoración selectiva de CI de  $\alpha$ -CD/alquiltioles con NBsAu y NPsAu sobre el plano preferencial {001}.

**Figura 5.16.** Micrografías SEM que detallan la identificación de maclas cristalinas en los microcristales del CI de  $\alpha$ -CD/OT.

**Figura 5.17.** Comparación de los espectros UV-visible de las NBsAu en; la dispersión coloidal (línea negra) y sobre el CI de  $\alpha$ -CD/OT (línea roja).

**Figura 5.18.** Espectros UV visible de la dispersión de NPsAu-CTAB (línea negra) y de las NPsAu sobre la superficie del CI de  $\alpha$ -CD/DDT (línea roja).

**Figura 5.19.** Espectros de RMN- $^1\text{H}$  del CI de  $\alpha$ -CD/OT (azul) y del CI interactuando con NBsAu (rojo).

**Figura 5.20.** Espectros de RMN- $^1\text{H}$  del CI de  $\alpha$ -CD/DDT (azul) y del CI interactuando con NPsAu (rojo).

**Figura 5.21.** Espectro ROESY del CI de  $\alpha$ -CD/DDT interaccionando con NPsAu. La sección de líneas segmentadas indica la correlación entre las señales de los hidrógenos de la cadena alifática del huésped y los hidrógenos -H(3) y -H(5) de la molécula de  $\alpha$ -CD.

**Figura 6.1.** Nanoláminas y nanobarras de Co/OCo (A) y Ni/ONi (B, C) obtenidas luego del tratamiento térmico de los CI con NPs adheridas.

**Figura 6.2.** Representación de algunas biomoléculas adecuadas para ser utilizadas como moldes en la fabricación de materiales híbridos 1D (Imagen extraída de la referencia [160]).

**Figura 6.3.** Esquema representativo del proceso de formación de fibras amiloides a partir de los monómeros del péptido  $\text{A}\beta_{1-42}$  (modificada de la referencia [197])

**Figura 6.4.** Esquema de la secuencia del péptido  $\text{A}\beta$ , donde se destaca el núcleo hidrofóbico constituido por los aminoácidos LVFF y el péptido diseñado de secuencia similar LPFFD, el cual reconoce selectivamente los agregados amiloides.

**Figura 6.5.** Caracterización de NPsAu estabilizadas en citrato; imagen TEM (A), histograma de dispersión de tamaño ( $n=200$ ) (B), espectro UV-visible (C) e imagen HRTEM con el patrón de difracción de electrones simulado para las NPs (D).

**Figura 6.6.** Imagen TEM de NPsAu-CLPFFD y su respectivo histograma de tamaño ( $n=200$  partículas) (A). Comparación de los espectros UV-visible de las dispersiones de; NPsAu-citrato (línea negra) y NPsAu-CLPFFD (línea roja).

**Figura 6.7.** Fibras del péptido  $A\beta_{1-42}$  obtenidas a partir del pre-tratamiento con TFA y HFIP luego de 3 y 6 horas de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  y 300rpm (2,1 x g).

**Figura 6.8.** Micrografías TEM de fibras del péptido  $A\beta_{1-42}$ , incubadas con NPsAu-CLPFFD, presentando una forma de *alambre* (A) y en forma de *argolla* (B). Las secciones de líneas punteadas muestran agregados de NPsAu.

**Figura 6.9.** Micrografías TEM que muestran la presencia de oligómeros autoensamblados del péptido, sin la detección de fibras amiloides.

**Figura 6.10.** Micrografías TEM que muestran los resultados obtenidos al utilizar la metodología B. Las fibras  $A\beta_{1-42}$  fueron nanodecoradas uniformemente con NPsAu-CLPFFD luego de 24h (A y B) y 72h (C y D) de incubación.

**Figura 6.11.** Esquema de la estructura del péptido L-glutación, el cual está formado por un enlace isopeptídico entre el grupo  $\gamma$ -carboxilato de la cadena lateral del glutamato con el grupo amino del residuo de cisteína y, un enlace peptídico entre el grupo  $\alpha$ -carboxilo de la cisteína y el grupo  $\alpha$ -amino del residuo de glicina.

**Figura 6.12.** Caracterización de los conjugados NPsAu-GSH: Imagen TEM de NPsAu-GSH con el correspondiente histograma de dispersión de tamaño ( $n=200$ ) (A) y espectro UV-visible de las partículas, comparado con el espectro correspondiente a las NPsAu-citrato (B).

**Figura 6.13.** (A) y (B) Micrografías TEM que muestra la obtención de fibras amiloides con NPsAu-GSH, incubadas durante 72 horas.

**Figura 6.14.** Esquema de dos estrategias utilizadas en la funcionalización de NPsAu con péptidos de interés (Modificada de la referencia [213]).

**Figura 6.15.** Caracterización de los conjugados NPsAu-C(Eg)<sub>3</sub>LPFFD mediante: microscopia TEM con su respectivo histograma de dispersión de tamaño ( $n=200$ ) (A) y espectroscopía UV-visible, al comparar su espectro de absorción con el espectro para NPsAu-citrato.

**Figura 6.16.** Imágenes TEM que muestran la nanodecoración de las fibras del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> con NPsAu-C(Eg)<sub>3</sub>LPFFD, después de 72 horas de incubación en medio acuoso.

**Figura S1.** Esquema de la síntesis de péptidos en fase sólida mediante una estrategia lineal donde, X= O, péptido ácido; NH, péptido amida.

**Figura S2.:** Cromatograma HPLC del péptido CLPFFD.

**Figura S3.** Espectro EM MALDI-TOF del péptido CLPFFD.

**Figura S4:** Cromatograma del análisis de aminoácidos del péptido CLPFFD.

**Figura S5.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del CI de  $\alpha$ -CD/OT.

**Figura S6.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H para el CI de  $\alpha$ -CD/DT.

**Figura S7.** Espectro RMN-<sup>1</sup>H del CI de  $\alpha$ -CD/DDT.

**Figura S8.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H para el CI de  $\alpha$ -CD/OA.

**Figura S9.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H para el CI de  $\alpha$ -CD/DA.

**Figura S10.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H para el CI de  $\alpha$ -CD/DDA.

**Figura S11.** Difractograma para el CI de  $\alpha$ -CD/OT indexado para un sistema triclinico.

**Figura S12.** Difractograma para el CI de  $\alpha$ -CD/DT indexado para un sistema hexagonal.

**Figura S13.** Difractograma para el CI de  $\alpha$ -CD/DDT indexado para un sistema hexagonal.

**Figura S14.** Difractograma para el CI de  $\alpha$ -CD/OA indexado para un sistema hexagonal.

**Figura S15.** Difractograma para el CI de  $\alpha$ -CD/DA indexado para un sistema hexagonal.

**Figura S16.** Difractograma para el CI de  $\alpha$ -CD/DDA indexado para un sistema hexagonal.

**Figura S17.** Cromatograma de análisis de aminoácidos HPLC de NPsONi- $\alpha$ -CD/DT funcionalizadas con péptido CLPFFD

**Figura S18.** Análisis de AA mediante HPLC para NPsOCo- $\alpha$ -CD/DDT funcionalizadas con el péptido CLPFFD.

**Figura S19.** Espectros de RMN- $^1\text{H}$  del surfactante CTAB (negro) y de CTAB cuando se encuentra formando la bicapa alrededor de las NBsAu. TMS fue utilizado como referencia interna.

## Lista de Abreviaturas

Aaa: análisis de aminoácidos  
aabu : ácido aminobutírico  
ANOVA: Análisis de varianza (siglas en inglés)  
A $\beta_{1-42}$ : Péptido beta amiloide de 42 aminoácidos  
C(Eg)LPFFD: Péptido Cys-(etilenglicol)<sub>3</sub>-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH<sub>2</sub>  
CD: Ciclodextrina/s  
CI: Compuesto/s de inclusión  
CLPFFD:Péptido Cys-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH<sub>2</sub>  
DA:1-decilamina  
DC: corriente directa  
DDA: 1-dodecilamina  
DDT: 1-dodecanotiol  
DFV: Depósito físico en vapor  
DMEM: medio de cultivo enriquecido con glucosa  
DMSO-d<sub>6</sub>: dimetilsulfóxidodeuterado  
DRX: Difracción de rayos-X  
DRXP: Difracción de rayos-X de polvo  
DT: decanotiol  
EDX: Energía dispersiva de rayos X  
Eg: Etilenglicol  
ffc : celda cúbica centrada en las caras (siglas en inglés)  
FFT: transformada rápida de Fourier (siglas en inglés)  
GSH: péptido L-glutación  
HFIP: hexaflouroisopropanol  
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución (siglas en inglés)  
HRTEM: Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (siglas en inglés)  
MTS: sal de tetrazolio  
MTT: sal de tetrazolio  
NAs: Nanoalambres  
NBs: Nanobarras  
NPs: Nanopartículas  
NTs: Nanotubos  
OA: 1-octilamina  
OT: 1-octanotiol

PCV: Pulverización catódica en vacío  
RMN: Resonancia magnética nuclear  
RMN-<sup>1</sup>H: Resonancia magnética nuclear de protones  
ROS: Especies reactivas de oxígeno (siglas en inglés)  
RPS: Resonancia de plasmón superficial  
SEM: Microscopía electrónica de barrido (siglas en inglés)  
SEM-FE: microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (siglas en inglés)  
SFB: Suero fetal bovino  
TEM: Microscopía electrónica de transmisión (siglas en inglés)  
TFA: ácido trifluoro acético (siglas en inglés)  
TMS: trimetilsilano  
 $\alpha$ -CD/DA: Complejo de  $\alpha$ -CD con 1-decilamina  
 $\alpha$ -CD/DDA: Complejo de  $\alpha$ -CD con 1-dodecilamina  
 $\alpha$ -CD/DDT: Complejo de  $\alpha$ -CD con 1-dodecanotiol  
 $\alpha$ -CD/DT: Complejo de  $\alpha$ -CD con 1-decanotiol  
 $\alpha$ -CD/OA: Complejo de  $\alpha$ -CD con 1-octilamina  
 $\alpha$ -CD/OT: Complejo de  $\alpha$ -CD con 1-octanotiol  
 $\alpha$ -CD: alfa-Ciclodextrina  
 $\beta$ -CD : beta-Ciclodextrina  
 $\gamma$ -CD : gama-Ciclodextrina

## Resumen

Esta tesis tiene como objetivo principal aportar al conocimiento de la Química Supramolecular y de la Nanoquímica considerando la síntesis y caracterización de sistemas supramoleculares, funcionalización de nanopartículas (NPs), nanodecoración de cristales supramoleculares y su evaluación sobre los efectos de los mismos en la viabilidad celular. La promoción de estos sistemas básicos para la creación de sistemas útiles en aplicaciones biomédicas, es del interés de esta tesis.

Específicamente, fueron sintetizados compuestos de inclusión (CI) constituidos por moléculas matrices de alfa-ciclodextina ( $\alpha$ -CD) las cuales pueden albergar en su interior moléculas alquiltioles y alquilaminas como huéspedes. En estado cristalino, estos compuestos poseen una disposición espacial en la que los grupos funcionales de las moléculas huéspedes incluidas, quedan expuestos en la superficie de caras específicas del cristal, denotados como una familia de planos  $\{001\}$ . La naturaleza de esta superficie funcionalizada, permite el crecimiento de NPs producidas por el método físico de pulverización catódica en vacío (PCV), funcionando además, como un reservorio de NPs en estado sólido. Mediante esta técnica fue posible obtener NPs de óxidos de cobalto y níquel, inmovilizadas sobre la superficie de microcristales de CI de  $\alpha$ -CD, mejorando su estabilidad respecto de las obtenidas por métodos químicos. Estas NPs presentan especial interés debido a sus

potenciales bioaplicaciones formando parte de sistemas para entrega de drogas, separación de proteínas y como agentes de contraste para imágenes, por ejemplo. Consecuentemente, se realizó un estudio de citotoxicidad de estas partículas ancladas a los sistemas supramoleculares, mediante el análisis colorimétrico de viabilidad celular por reducción de sales de tetrazolio, obteniéndose resultados relevantes que resultan promisorios para una continuidad de esta investigación para fines biomédicos.

Por otra parte, la decoración de cristales de CI con nanoestructuras preparadas por síntesis química, permitió corroborar y revelar detalles estructurales de interfase de estos sistemas supramoleculares. Específicamente, NPs y nanobarras (NBs) de oro fueron quimisorbidas sobre la superficie cristalina de CI de  $\alpha$ -CD sin presentar agregación, abriendo perspectivas interesantes para la funcionalización de superficies de estructuras supramoleculares.

Otra contribución en este trabajo fue desarrollar la nanodecoración de estructuras supramoleculares formadas por el péptido  $\beta$ -amiloide. Este péptido es capaz de formar fibras mediante autoensamblaje y reconocimiento molecular, generando estructuras 1D. La nanodecoración se realizó con nanopartículas de oro (NPsAu) funcionalizadas con el péptido CLPFFD, el cual reconoce selectivamente al péptido amiloide, obteniendo materiales bio-inorgánicos, los cuales tienen potenciales aplicaciones en dispositivos electrónicos como componentes de circuitos o baterías.

## Abstract

This thesis aims to contribute to the knowledge of Supramolecular Chemistry and Nanochemistry considering the synthesis and characterization of supramolecular systems, functionalization of nanoparticles (NPs), nanodecoration of supramolecular crystals, and evaluation of the effects on cell viability. The promotion of these basic systems to create useful systems for biomedical applications, it is of interest to this thesis.

Specifically, inclusion compounds (IC) were synthesized from alpha-cyclodextrin ( $\alpha$ -CD) harboring inside alkylthiols and alkylamines as guest molecules. In the crystalline state, these compounds have a spatial arrangement in which the functional groups of included guest molecules are exposed on the surface of specific crystal faces are denoted as a family of planes  $\{001\}$ . The nature of functionalized surface allows the growth of the nanoparticles produced by the physical method; "sputtering", and also functions as a reservoir of nanoparticles in the solid state. Using this technique it was possible to obtain cobalt and nickel oxide NPs immobilized on the surface of  $\alpha$ -CD IC microcrystals, improving stability with respect to those obtained by chemical methods. These NPs are of particular interest by their potential bioapplications like of drug delivery systems, protein separation and as contrast agents for imaging, for example. Consistently, we performed a

cytotoxicity study of these particles anchored supramolecular systems, by colorimetric analysis of cell viability by tetrazolium salts reduction, obtaining relevant results that show promise for continuation of this research for biomedical purposes.

On the other hand, the decoration of IC crystals with nanostructures prepared by chemical synthesis, allowed to corroborate and to reveal structural details of these interfaces. Specifically, gold NPs and gold nanorods (NRs) were chemisorbed on the CD IC crystal surface, without aggregation, opening interesting perspectives for functionalization surfaces of supramolecular structures.

Another contribution in this research was the decoration of supramolecular structures formed by  $\beta$ -amyloid peptide. The  $\beta$ -amyloid peptide is capable of forming amyloid fibers by molecular recognition and self-assembly, generating 1D structures. Decoration was performed with gold NPs functionalized with CLPFFD peptide, which selectively recognizes amyloid peptide, obtaining bio-inorganic materials, which have potential applications in electronic devices like circuit components or batteries.

# **CAPÍTULO 1**

## **Introducción**

## 1.1. Prólogo

El estudio de materiales desde su unidad más básica a escala molecular y nanométrica nos permite indagar en la formación de nuevos sistemas, teniendo un control de sus propiedades, por lo que se ha convertido en un área de investigación interdisciplinaria con un creciente desarrollo hoy en día. En este ámbito, el reciente campo de la Nanociencia, que involucra las investigaciones científicas a cerca de materiales que se encuentran en la escala de tamaño entre 1 y 100 nm, es una ciencia con una estrecha relación con la Química Supramolecular.

La Química Supramolecular, denominada por el científico Jean Marie Lehn (Premio Nobel 1987) como "*La química que va más allá de la molécula*", aborda el estudio de entidades supramoleculares donde, la clave para su formación y estabilización son las interacciones intermoleculares capaces de generar en conjunto, mayores fuerzas que permiten la creación de estos sistemas sin que exista la formación de enlaces de tipo covalente. A partir de esta química, basada en conceptos como la auto-organización y el reconocimiento molecular, han surgido estrategias escalares ("de abajo hacia arriba") para la formación de nanomateriales o de materiales híbridos orgánico-inorgánicos. De esta manera, la Química Supramolecular se ha convertido en un pilar fundamental para el desarrollo de la Nanociencia en general, permitiendo la formación de conglomerados a nivel nanométrico realizando grandes avances hacia la miniaturización.

La asociación de entidades moleculares mediante interacciones no covalentes podrá permitir la manufactura de dispositivos capaces de albergar la información necesaria para desarrollar aplicaciones nanotecnológicas.

La presente tesis pretende ser un aporte a la Química Supramolecular y la Nanoquímica, a través de la preparación y estudio de sistemas supramoleculares que ofrecen superficies funcionalizadas aptas para la interacción con nanopartículas metálicas, creando materiales híbridos que abren nuevas expectativas de desarrollo nanotecnológico.

## **1.2. Fundamentos teóricos**

### *1.2.1. Sistemas supramoleculares*

La Química Supramolecular, definida como “la química de los enlaces intermoleculares, que estudia las estructuras y funciones de entidades formadas por dos o más especies químicas”, es un campo interdisciplinario que abarca el estudio químico, físico y biológico de las especies químicas que se mantienen unidas y organizadas a través de interacciones intermoleculares (no-covalentes), como fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno, entre otras [1].

La unión de estas especies mediante interacciones intermoleculares da lugar a la formación de sistemas supramoleculares, gracias al proceso de reconocimiento molecular entre las entidades químicas a través de interacciones dinámicas y reversibles.

Para que el reconocimiento sea eficiente entre las especies, es necesario que entre receptor y sustrato exista una gran área de contacto. Esto ocurre cuando el receptor es capaz de envolver completamente al huésped estableciendo numerosas interacciones de uniones no covalentes, detectando su forma, tamaño y arquitectura molecular [1].

Los receptores pueden ser moléculas que posean cavidades intra-moleculares en la que el sustrato puede acomodarse favorablemente gracias a factores estéricos, entrópicos y de afinidad química, a estos receptores se les denomina endo-receptores.

La interacción entre sustrato y receptor también puede ocurrir de manera frontal o externa. Tal es el caso de la molécula de ADN donde ambas hebras de ADN se unen fuertemente gracias a la sumatoria de interacciones por puentes de hidrógeno. A este tipo de receptores se les denomina exo-receptores.

Funciones más complejas pueden resultar de la interacción espontánea o auto-ensamblaje de varias subunidades, surgiendo el reconocimiento molecular que se apoya sobre la información molecular almacenada en cada especie que interactúa. Ejemplo de estructuras complejas formadas por el autoensamblaje son las capas, membranas, vesículas y cristales líquidos; supramoléculas funcionales que pueden conducir al desarrollo de dispositivos moleculares [2].

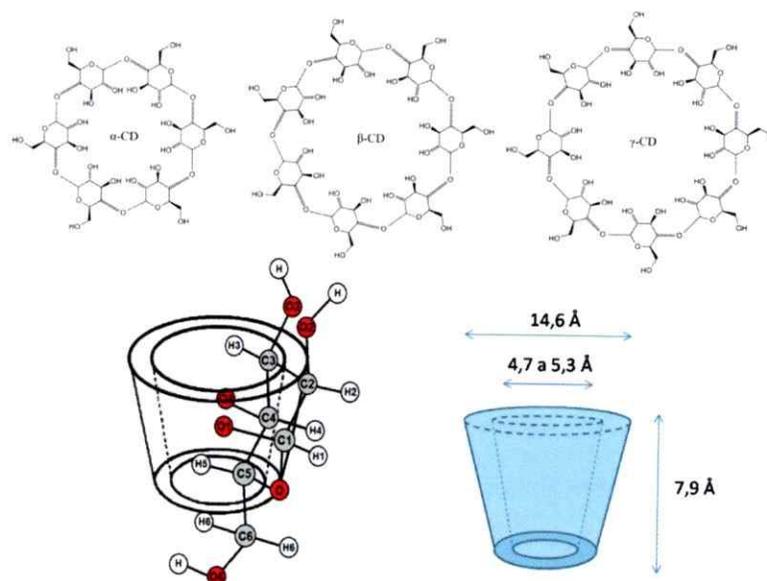
### 1.2.2. Ciclodextrinas y sus compuestos de inclusión

Las CD corresponden a moléculas endo-receptoras (llamadas también matrices) y se han convertido en objeto de gran interés debido a su alta estabilidad química y las innumerables posibilidades de formación de estructuras supramoleculares matriz-huésped, debido a que ofrecen una cavidad con un ambiente hidrofóbico apropiado para la inclusión de moléculas con una baja solubilidad en solventes acuosos. Las CD no modificadas más utilizadas corresponden a la  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD, las cuales poseen 6, 7 y 8 unidades de glucopiranosas unidas por enlaces  $\alpha$ -1,4 (ver Figura 1.1).

Fueron obtenidas por primera vez por Villiers en 1891, a partir de la digestión de almidón con la bacteria *Bacillus amylobacter* (que probablemente no era un cultivo puro y también contenía esporas de *Bacillus macerans* resistentes al calor). A su producto lo llamó "*celulosina*", porque se parecía a la celulosa con respecto a su resistencia frente a la hidrólisis ácida y porque no mostró propiedades reductoras. Posteriormente, Schardinger estudió varias cepas de bacterias resistentes al calor y que se creía eran responsables de algunos casos de intoxicación por alimentos. Publicó un informe en el que identificó a la bacteria *Bacillus macerans* como la responsable de la degradación del almidón y la formación de pequeñas cantidades de dos productos cristalinos diferentes, los cuales identificó como  $\alpha$ -CD y  $\beta$ -CD, luego de un estudio desarrollado al formar compuestos de inclusión (CI) de estas estructuras cristalinas con yodo. Por este motivo estas dextrinas son identificadas como "*dextrinas de Schardinger*" [3].

En 1936, Freudenberg y col. llegaron a la conclusión de que las *dextrinas de Schardinger* cristalinas se construyen a partir de unidades de maltosa unidas solamente por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4, presentando una estructura cíclica. Ya entre los años 1948 y 1950, la  $\gamma$ -CD había sido descubierta y su estructura dilucidada.

Actualmente las CD son obtenidas industrialmente mediante la degradación de almidón por acción de la enzima ciclodextrin glucosil transferasa (CGT) elaborada por bacterias como *Bacillus macerans*, *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus circulans*, o *Alkalophylic bacillus* modificadas genéticamente, de tal forma que se obtiene selectivamente solo una de las ciclodextrinas, abaratando el costo y aumentando la pureza en la producción [3].



**Figura 1.1.** Arriba: Estructura de las moléculas  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD (vista desde arriba). Abajo: disposición de los átomos de una de las unidades de glucopiranososa en la estructura de la CD (izquierda) y esquema de la forma de "balde" que posee la  $\alpha$ -CD, con sus respectivas dimensiones (derecha). Los diámetros de las CD dependen del número de unidades de glucopiranososa de la molécula.

Debido a la disposición geométrica que adoptan las unidades de glucopiranosas en la estructura macromolecular, los grupos hidroxilos pertenecientes a los carbonos C(2) y C(3) se localizan en la apertura más amplia del cono y reciben el nombre de hidroxilos secundarios. En la apertura menor del cono se ubican los llamados grupos hidroxilos primarios pertenecientes a los carbonos C(6) de cada unidad de glucopiranosas que conforman la molécula de CD (ver Figura 1.1). Esta disposición otorga a las CD una alta solubilidad en agua, aunque no todas las CD presentan igual grado de solvatación. Las  $\alpha$  y  $\gamma$ -CD presentan una solubilidad de 0,1211 y 0,168 mol/L, respectivamente, en cambio,  $\beta$ -CD presenta una solubilidad 10 veces menor (0,0163 mol/L). Coleman y col., han atribuido esta baja solubilidad a la formación de agregados de  $\beta$ -CD en agua en la cual, por el hecho de contener 7 unidades de glucosa en su estructura, la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de la CD y el agua se ve desfavorecida energéticamente por una perturbación en la estructura del agua, fenómeno que no se presenta en las estructuras de  $\alpha$  y  $\beta$ -CD por contener 6 y 8 unidades de glucosa respectivamente [4]. Esta explicación no puede dar cuenta de la mayor solubilidad que presenta la  $\delta$ -CD, que contiene 9 unidades de glucosa. Szejtli, propone que los enlaces de hidrógeno intramoleculares entre los hidroxilos secundarios del balde de  $\beta$ -CD son responsables de su baja solubilidad, otorgándole mayor rigidez a la estructura [3]. La alquilación de los hidroxilos de la  $\beta$ -CD conduce a un aumento de la solubilidad, y este fenómeno se ha convertido en una de las motivaciones para la realización de las CD modificadas [5].

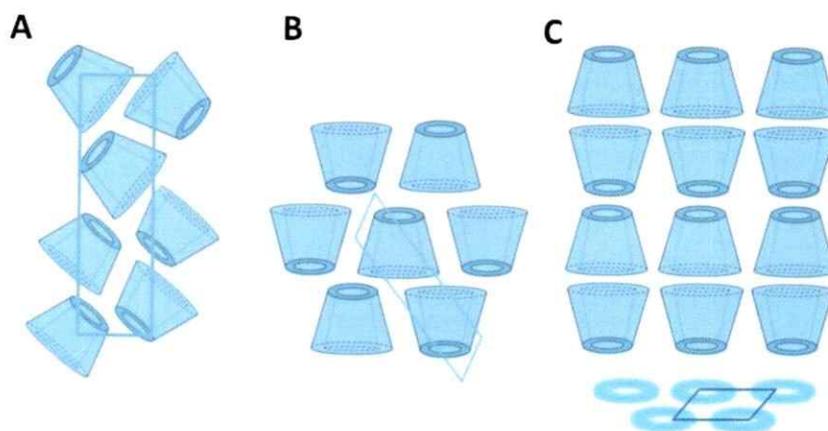
El interior de la cavidad de las CD presenta un carácter hidrofóbico debido a la orientación interna de átomos de hidrógeno y átomos de oxígeno de los enlaces glucosídicos que presentan sus pares de electrones no enlazantes orientados hacia el interior, otorgando una alta densidad electrónica a la cavidad [3].

De las propiedades antes mencionadas surge el gran interés por la formación de complejos/compuestos de inclusión (CI) de CD, ya que han sido ampliamente utilizados en la ciencia como modelos para la comprensión del reconocimiento molecular [6], en catálisis, en la industria de alimentos [7], en aplicaciones farmacéuticas [8] y como precursores en el diseño de nuevos nanomateriales [9].

Las CD forman CI en solución y en estado sólido. En solución acuosa, la cavidad ligeramente apolar de las CD está ocupada por moléculas de agua, instancia que está energéticamente desfavorecida (interacción polar-apolar) por lo tanto, estas moléculas pueden ser fácilmente sustituidas por moléculas huésped con un mayor carácter hidrofóbico. Las moléculas huésped pueden ser encapsuladas en las cavidades a través de interacciones no covalentes entrópicamente favorecidas, donde las fuerzas de van der Waals y puentes de hidrógeno son mayoritariamente las fuerzas que conducen a la formación de los CI [7].

Los CI de  $\alpha$ -CD formados, pueden ser aislados como sustancias cristalinas estables cristalizando en tres tipos de empaquetamiento, los cuales son representados sencillamente en la Figura 1.2. En el empaquetamiento "tipo caja" se presenta generalmente cuando el huésped es bastante pequeño como para ser completamente

encapsulado, cristalizando de manera tal que ambos extremos de la cavidad de  $\alpha$ -CD están bloqueados por las moléculas adyacentes.

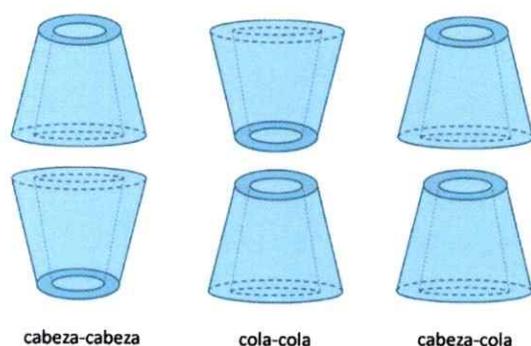


**Figura 1.2.** Estructuras cristalinas posibles para los CI de  $\alpha$ -CD: tipo caja (A), tipo capa (B) y tipo canal (C).

Cuando los CI cristalizan en una estructura “tipo capa” las capas adyacentes se desplazan una molécula por medio. Como resultado, ambos extremos de la cavidad están abiertos al espacio intermolecular de la capa adyacente. Este empaquetamiento se produce cuando la molécula huésped es demasiado grande para ser totalmente incluida en una sola cavidad, pero cabe en este espacio ampliado.

En la estructura “tipo canal” las moléculas de  $\alpha$ -CD se apilan para formar columnas infinitas en las que las moléculas huésped se organizan linealmente [6]. En la estructura “tipo canal” existen tres disposiciones posibles para las matrices de  $\alpha$ -CD llamados “cabeza-cabeza”, “cola-cola” y “cabeza-cola” [10] (ver Figura 1.3), donde la

orientación cabeza-cabeza es la más estable y favorable ya que presenta valores absolutos con signo negativo de energía libre de Gibbs según cálculos teóricos realizados para diversos CI formados por dímeros de  $\alpha$ -CD [10, 11].



**Figura 1.3.** Representación de las tres orientaciones posibles para el dímero de  $\alpha$ -CD en una estructura tipo canal, denominadas; cabeza-cabeza, cola-cola y cabeza-cola, respectivamente.

Comúnmente, los CI de  $\alpha$ -CD con un ordenamiento tipo canal, poseen moléculas huéspedes iónicos [6], poliméricos [12] o alquílicos [13-15].

### 1.2.3. Nanopartículas

La investigación en nanomateriales es actualmente un área de gran interés científico, debido a las extraordinarias propiedades que presentan los nanomateriales.

Los nanomateriales pueden ser clasificados en materiales nanoestructurados, que comúnmente se encuentran formados por tamaños de grano a nivel nanométrico o

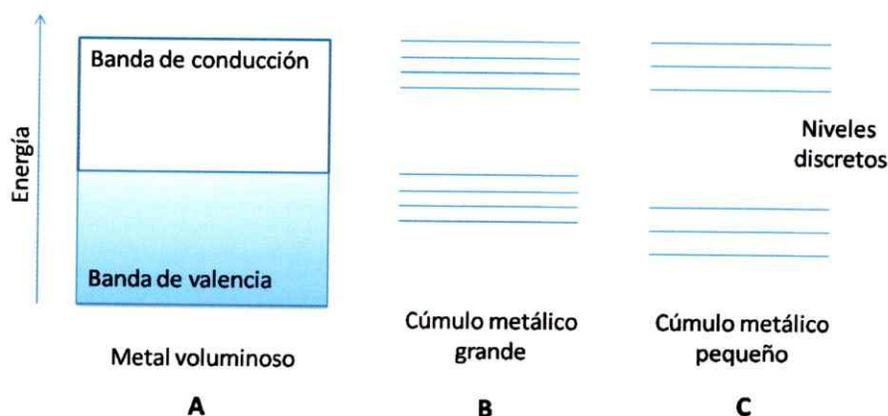
poseen al menos una de sus dimensiones en este rango de tamaño, y en materiales nanoparticulados que corresponden usualmente a dispersiones de nanopartículas (NPs) [16].

Las NPs corresponden a agregados de átomos ( $10^6$  o menos) que poseen un tamaño entre 1 y 100 nm y que deben sus propiedades a que su tamaño posee dimensiones menores que las longitudes críticas que caracterizan a muchos fenómenos físicos [17].

Por lo tanto, las NPs presentan propiedades diferentes de los átomos y de los materiales macroscópicos con la misma composición química. Propiedades electrónicas, magnéticas y ópticas pueden cambiar drásticamente debido a su pequeño tamaño y a su extremadamente grande relación superficie/volumen [18], proporcionando la interesante posibilidad de estudiar un estado de la materia intermedio entre el material macroscópico y los átomos o moléculas aisladas, así también como el confinamiento espacial del comportamiento de los electrones y fenómenos de superficie [19].

Interesantes fenómenos físicos pueden mostrar los metales cuando se llevan a escalas nanométricas. En un metal los electrones se encuentran altamente deslocalizados debido a la nula separación entre la banda de valencia y la banda de conducción, dando al metal sus propiedades conductoras. Cuando el tamaño del metal disminuye, la densidad de estados de la banda de valencia disminuye considerablemente confinando el movimiento electrónico a un conjunto de niveles de energía discretos, a este fenómeno se le conoce como *confinamiento cuántico*. La separación entre los niveles de energía discretos se vuelven comparables o mayores que la energía térmica  $k_B T$ , y el *gap* se ensancha [17, 20, 21]. En la Figura 1.4., se muestra una ilustración de la variación en la

estructura electrónica durante la transición desde un material metálico voluminoso hasta un cúmulo pequeño de tres átomos. En esta transición de metal conductor a semiconductor nuevas propiedades electrónicas y ópticas se presentan debido a la disminución del tamaño del metal.



**Figura 1.4.** Esquema de la variación en los niveles de energía conforme disminuye el tamaño: bandas de energía en un metal voluminoso (A), en un cúmulo metálico grande de 100 átomos, mostrando en ensanchamiento del *gap* (B) y en un cúmulo pequeño compuesto por tres átomos (C). (Adaptado de la referencia [17])

Las propiedades ópticas de las NPs se encuentran estrechamente relacionadas con los cambios inducidos por el tamaño en la estructura electrónica.

Las dispersiones de NPs metálicas presentan bandas de absorción o amplias regiones de absorción en el rango UV-visible. Este fenómeno es debido a la excitación de resonancias de plasmón superficial (RPS) o transiciones inter-bandas, por lo tanto son una propiedad muy característica de la naturaleza metálica de las partículas.

La RPS se presenta en partículas mucho más pequeñas que la longitud de onda de la luz. El campo electromagnético de la radiación incidente provoca una oscilación coherente de los electrones libres de conducción a través de la partícula debido a la polarización de su superficie.

Este fenómeno es responsable de que algunas dispersiones coloidales presenten bandas de absorción en la región visible, y como consecuencia, éstas exhiben colores llamativos, tal como los coloides de NPs de oro (NPsAu) o plata (NPsAg) usados desde la antigüedad para colorear vitrales y porcelanas. Conocida es la Copa de Lycurgo, creada para el rey Lycurgo en el siglo IV a.C. y que hoy se encuentra en el Museo Británico de Londres. Esta copa de vidrio fue decorada mayoritariamente con NPsAu de 50 – 60 nm de diámetro, produciendo un efecto fascinante. Durante el día (luz reflejada) en la copa aparece un color verdoso, pero si se ilumina desde el interior (luz transmitida) aparece un color rojo rubí [22]. Asimismo, la fotografía ha dependido del uso de coloides de NPsAg sensibles a la luz, por lo tanto, el uso de los materiales nanoestructurados no es tan reciente como se cree.

En 1857 Michael Faraday ya había atribuido la coloración del rojo rubí a la presencia de oro finamente dividido: *“I think that in all these cases the ruby tint is due simply to the presence of diffused finely-divided gold”* [23], pero este fenómeno no fue claramente establecido hasta que en 1908 Gustav Mie, un físico alemán, publicó su artículo *“Beiträge zur Optik über Medien, speziell kolloidaler Metallösungen”* (“Contribuciones a la óptica de coloides, particularmente de soluciones coloidales metálicas”) donde describe la interacción de una onda electromagnética con pequeñas

partículas metálicas esféricas, mediante la resolución analítica de las ecuaciones de Maxwell [24].

En la resolución, se asume que las partículas y el medio circundante son homogéneos, por lo tanto pueden ser descritos por sus constantes dieléctricas a macroescala.

La resolución de las ecuaciones de Maxwell permite relacionar la extinción de la sección transversal ( $\sigma_{ext} = \sigma_{abs} + \sigma_{dis} = \text{absorción} + \text{dispersión de la sección transversal}$ ) de las NPs metálicas como la sumatoria de las oscilaciones multipolares, las cuales resultan fuertemente dependientes del tamaño (para diámetros  $> 20$  nm). Por ejemplo, Jain y col. han estudiado la dependencia del máximo de extinción para dispersiones coloidales de NPsAu con diámetros que van desde 20 a 80 nm, observando un desplazamiento de la absorción a mayores valores de longitud de onda a medida que se incrementa el diámetro de las partículas [25].

Para partículas pequeñas (entre 3 y 20 nm de diámetro) que poseen un diámetro mucho menor que la longitud de onda de la radiación incidente ( $2R \ll \lambda$ , donde R es el radio de la partícula), la resolución puede simplificarse descartando términos de oscilaciones cuadripolares y de orden superior, de manera que la extinción de la sección transversal de una partícula esférica está dada solamente por el término dipolar. Para N partículas de volumen V, la aproximación de la expresión para la extinción de la sección transversal de una partícula esférica está dada por [26, 27]:

$$\sigma_{ext} = \frac{18\pi N V \varepsilon_m^{3/2}}{\lambda} \times \frac{\varepsilon_2}{[(\varepsilon_1 + 2\varepsilon_m)^2 + \varepsilon_2^2]} \quad (1)$$

Donde  $\lambda$  es la longitud de onda,  $\varepsilon(\omega) = \varepsilon_1(\omega) + i\varepsilon_2(\omega)$ , es la función dieléctrica compleja y  $\varepsilon_m$ , es la constante dieléctrica del medio.

Como se indica en la ecuación (1), el máximo de RPS aparece cuando  $\varepsilon_1(\omega) \approx -2\varepsilon_m$ , si  $\varepsilon_2$  es pequeña o si es débilmente dependiente de la frecuencia de la radiación incidente ( $\omega$ ). La longitud de onda de la RPS está dada por el valor de  $\varepsilon_1$  y, el ancho y alto de la resonancia se encuentra determinado por el valor de  $\varepsilon_2$ . Si  $\varepsilon_1$  es una función lineal de la frecuencia, la banda de absorción tendrá una forma Lorentziana con un ancho de banda y el recíproco del alto del máximo de absorción, proporcional a  $\varepsilon_2$ .

La ecuación (1) no muestra una dependencia con el tamaño de la partícula. Sin embargo, se ha apreciado que la función dieléctrica macroscópica por sí misma se vuelve dependiente del tamaño [26]. Cuando se tienen tamaños de partícula pequeños (diámetros < 10 nm) algunos coloides metálicos muestran una dependencia del tamaño debido a la restricción en el camino libre medio de los electrones (distancia que viaja el electrón entre colisiones con los centros de la red) de conducción del metal, cuando el diámetro de la partícula se acerca o se vuelve menor que el camino libre medio [28]. Este efecto se presenta notoriamente en metales que poseen un largo camino libre medio como el oro y la plata.

Mucho más drástico que el efecto del tamaño de la partícula sobre la absorción óptica (por ejemplo, en NPsAu) es el efecto de la forma de las partículas [29, 30]. En 1912 Gans extendió la aproximación dipolar de la ecuación de Mie para pequeñas partículas esféricas al caso de NPs en forma de barras (nanobarras, NBs) o elipsoides. Para NBs metálicas, el espectro de extinción se divide en dos máximos que corresponden a la oscilación coherente de electrones en la sección transversal y longitudinal de las NBs. Para un conjunto de NBs orientadas al azar, el espectro de extinción puede ser estimado a partir de la siguiente ecuación:

$$\sigma_{ext} = \frac{2\pi N V \epsilon_m^{3/2}}{3\lambda} \times \sum_j \frac{(1/P_j^2) \epsilon_2}{\left(\epsilon_1 + \frac{1-P_j}{P_j} \epsilon_m\right)^2 + \epsilon_2^2} \quad (2)$$

Donde,  $P_j$  son los factores de despolarización para los tres ejes A, B y C de la NB con  $A > B = C$ , por lo tanto,

$$P_A = \frac{1-e^2}{e^2} \left[ \frac{1}{2e} \ln \left( \frac{1+e}{1-e} \right) - 1 \right], \quad (3)$$

$$P_B = P_C = \frac{1-P_A}{2}, \quad (4)$$

y,

$$e = \sqrt{1 - \left(\frac{B}{A}\right)^2} = \sqrt{1 - \frac{1}{R^2}} \quad (5)$$

$P_A$ ,  $P_B$ , and  $P_C$  son los factores de forma en función de  $e$ , el cual corresponde a la función inversa de la relación de aspecto (largo/ancho).

En el espectro de extinción de NBsAu la posición del máximo de RPS de la sección transversal, coincide con la ubicación del máximo de absorción para una partícula esférica, mientras que la resonancia de la sección longitudinal es desplazada hacia mayores valores de longitud de onda, siendo extremadamente sensible a la relación de aspecto que presenta la dispersión de NBsAu. [29, 31].

#### *1.2.4. Síntesis de nanopartículas metálicas*

Existen dos alcances para la manufactura de NPs metálicas, los llamados métodos de “abajo hacia arriba” y de “arriba hacia abajo”. En el enfoque de “abajo hacia arriba” la formación ocurre de manera ascendente, reuniendo las entidades atómicas y moleculares para generar las nanoestructuras. En el método de “arriba hacia abajo” los átomos son desprendidos del material a granel, hasta obtener sólo las nanoestructuras deseadas [32, 33].

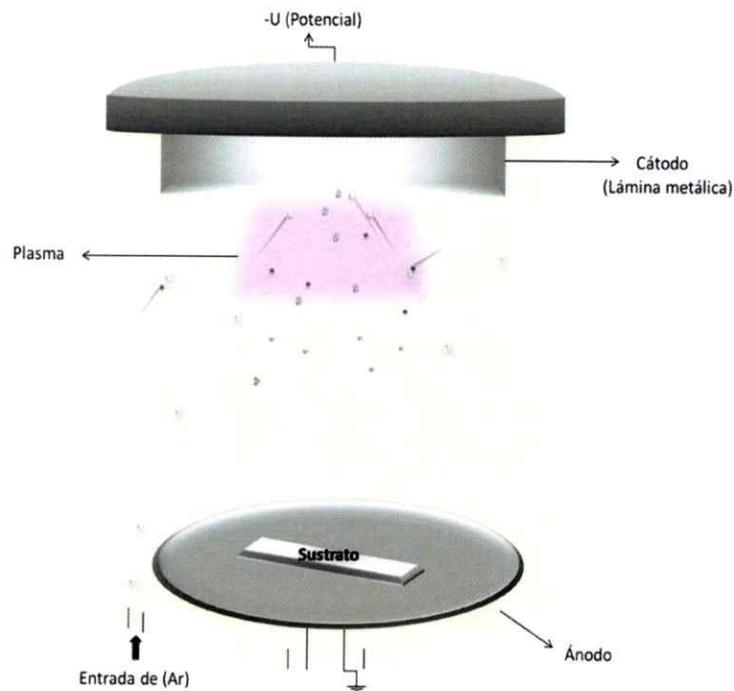
Dentro del enfoque de “abajo hacia arriba” se encuentran técnicas como la reducción de sales metálicas [34], la descomposición térmica de complejos organometálicos [35], la descomposición sonoquímica [36], el desplazamiento de ligandos [37], entre otras. Estos métodos químicos, usualmente emplean agentes para detener el crecimiento de las partículas, estabilizarlas y prevenir su agregación. La elección de la técnica de reducción, la sal precursora, el agente estabilizante y la temperatura son determinantes para el tamaño y forma de las partículas generadas. A partir del control de estos parámetros se ha reportado la preparación de nanomateriales

en forma de esferas [34, 38], barras [39, 40], prismas [41, 42], cubos [43], discos [44], etc.

La gran mayoría de los métodos físicos se encuentran en el alcance de “arriba hacia abajo”, ya que se basan en la subdivisión mecánica de agregados metálicos, produciendo dispersiones de NPs de diferentes tamaños. Dentro de este alcance se encuentra el método físico de nanolitografía, el cual consiste en la utilización de una capa sensible a la radiación (polímeros) para formar patrones bien definidos sobre una superficie. Lu y col., han obtenido nanoalambres de oro bajo esta técnica, con una orientación cristalina y conductividad de manera homogénea en toda la muestra [45].

Otro método físico es la ablación por láser [46], método basado en la vaporización y luego condensación de las partículas generadas en un solvente a partir de la aplicación de un pulso láser direccionado hacia el blanco metálico.

Dentro de esta categoría también se ubica la técnica de pulverización catódica en vacío (PCV), llamada comúnmente “*sputtering*”. Esta técnica de depósito físico en vapor (DFV) puede ser descrita brevemente como la pulverización de un blanco metálico de alta pureza por la acción de iones de Ar, seguida por el depósito de los átomos pulverizados sobre la superficie de un material soporte para crear una dispersión uniforme de NPs [47]. Un esquema sencillo del equipo se puede apreciar en la Figura 1.5.



**Figura 1.5.** Esquema sencillo del equipo de pulverización catódica.

La PCV consiste principalmente, en un proceso de bombardeo iónico que produce el depósito en fase vapor del material bombardeado sobre un sustrato, dentro de una cámara de vacío. Para evitar que el gas residual provoque una contaminación en el material depositado, es necesario conseguir un alto vacío ( $P < 10^{-6}$  mbar). La presión de trabajo se consigue mediante la introducción de un gas o una mezcla de gases en el sistema. Este proceso es denominado “*sputtering reactivo*”, cuando se tiene la presencia de oxígeno gaseoso, ya que permite la oxidación del material que es depositado, o “*sputtering no reactivo*”, cuando el gas de proceso no reacciona químicamente con el

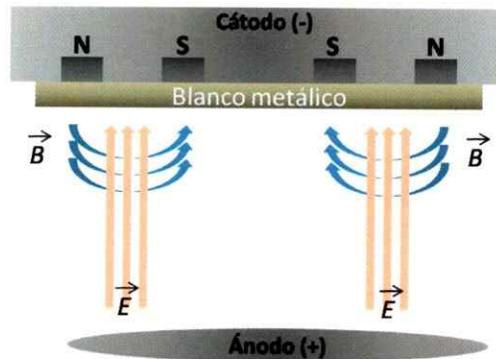
material depositado [48]. Generalmente se utiliza gas Ar por ser de menor costo comercial y producir altos rendimientos del material depositado. Habitualmente, se utilizan presiones de Ar alrededor de  $10^{-2}$  mbar, pero la presión óptima del proceso se debe evaluar considerando un compromiso entre el recorrido libre de las partículas del plasma y la presión necesaria para que se produzca la descarga [49].

En el proceso de PCV (en este caso “*sputtering no reactivo*”), la diferencia de potencial existente entre el cátodo y el ánodo provoca la ionización del gas inerte Ar, generando el plasma. Los iones formados impactan en el blanco (que se encuentra en la ubicación del cátodo) con la energía suficiente para arrancar átomos de la superficie mediante un proceso de transferencia de *momentum*. Cuando los iones golpean la superficie del material metálico, parte de su energía se transfiere a los átomos del blanco produciendo una colisión en cascada. Las múltiples colisiones hacen posible que algunos átomos del material adquieran la suficiente energía para abandonar la superficie, alcanzar el sustrato y adherirse a él. La mayor parte de la energía proporcionada por los iones incidentes se transforma en calor, siendo éste disipado mediante un circuito de refrigeración que evita el sobrecalentamiento del cátodo.

Además de la pulverización del material cuando es impactando por los iones, también se producen emisiones de electrones secundarios, los que se recombinan con los iones y provocan una intensa emisión de luz en la superficie del cátodo. Este efecto es aprovechado para aumentar la eficiencia del proceso, mediante la utilización de imanes

que confinan el movimiento de estos electrones secundarios y atraen a los iones Ar. Esta variación de la técnica recibe la denominación de “*Magnetron Sputtering*” [49].

En la PCV asistida por imanes o “*Magnetron Sputtering*”, el proceso se vuelve más eficiente al aplicar campos magnéticos perpendiculares al campo eléctrico que genera la descarga. El campo magnético es creado por unos imanes situados en línea en el cuerpo del cátodo, tal como se muestra en la Figura 1.6.



**Figura 1.6.** Esquema del funcionamiento del proceso de PCV asistido por campo magnético.

De esta manera, los electrones secundarios y los átomos de Ar ionizados quedan confinados en una región cercana a la superficie del cátodo y son forzados a recorrer trayectorias helicoidales y paralelas a la superficie del cátodo, consiguiendo ionizar una mayor proporción de átomos del gas en el proceso aumentando la eficiencia.

La aplicación de este campo magnético transversal también permite que los electrones secundarios generados en el blanco no impacten el sustrato, ya que quedan confinados en la cercanía del blanco. De esta manera se evita un posible daño por

radiación y el aumento de la temperatura en el sustrato. Esto permite realizar depósitos sobre sustratos que no resisten altas temperaturas, como por ejemplo, cristales orgánicos.

Esta técnica posee varias ventajas en comparación con otros métodos existentes, ya que no existen contaminaciones por solventes o moléculas precursoras [50]. Además, el proceso es amigable con el medio ambiente [51].

#### *1.2.5. Nanopartículas metálicas y ciclodextrinas*

Las CD nativas y modificadas han sido ampliamente utilizadas en Nanociencia. Se ha reportado la preparación de NPs<sub>Au</sub> mediante la estabilización con  $\beta$ -CD no modificadas, permitiendo el control de su tamaño, dispersión [52] y forma, a través de autoensamblajes supramoleculares [53]. Las CD también han sido útiles en la preparación y estabilización de NPs de óxidos de Ni, Co y Fe [54] y NPs de TiO<sub>2</sub> [55]. Por otro lado, debido a su mayor solubilidad en solventes polares, las CD también han sido empleadas como agentes de transferencia de fase para NPs entre líquidos con diferentes polaridades [56-58].

La estabilización de NPs con CD, incluso ha potenciado las propiedades intrínsecas que poseen las NPs. Por ejemplo, Jaiswal y col., informaron el aumento de las propiedades antibacterianas de NPs<sub>Ag</sub> al ser funcionalizadas con  $\beta$ -CD, ya que las CD permiten una mayor penetración de las partículas a través de la membrana celular [59].

Gracias a la versatilidad de autoensambles que ofrecen las matrices de CD, también se ha comunicado la construcción gradual de multicapas orgánicas/inorgánicas autoensambladas, en base a las interacciones supramoleculares entre dendrímeros funcionalizados con moléculas adamantanos y NPsAu funcionalizadas con  $\beta$ -CD [60], abriendo interesantes expectativas en la construcción de nanodispositivos.

Recientemente, mediante la técnica de PCV, NPs metálicas han sido sintetizadas sobre la superficie funcionalizada de CI de  $\alpha$ -CD, donde los CI formados por huéspedes alquílicos exponen hacia el exterior sus grupos funcionales  $-\text{SH}$ , [51]  $-\text{NH}_2$  [61] o  $-\text{COOH}$  [62] permitiendo la formación y fijación *in situ* de las NPs sobre la superficie correspondiente al plano específico preferencial que presentan este tipo de compuestos. Aquí, dos interesantes áreas de la química convergen: el fenómeno de reconocimiento molecular aplicado a los CI de CD y el ensamblaje de NPs metálicas [61].

### 1.3. Hipótesis y Objetivos

En base a los antecedentes mencionados se plantearon las siguientes hipótesis y objetivos:

#### 1.3.1. Hipótesis:

- Mediante la técnica de pulverización catódica en vacío se obtendrían nanopartículas magnéticas de níquel y cobalto de tamaño controlado en función

del tiempo de pulverización sobre compuestos de inclusión de  $\alpha$ -ciclodextrina con huéspedes alquílicos los cuales poseen un grupo funcional que sería apto para que ocurra la formación de las nanopartículas metálicas.

- Las nanoesferas funcionalizadas con biomoléculas podrían formar conjugados estables y sin efectos sobre la viabilidad celular.
- La decoración de cristales de CI con nanoestructuras preparadas por síntesis química, permitirían corroborar y revelar detalles estructurales de interfase de estos sistemas supramoleculares.
- La nanodecoración de estructuras supramoleculares sería una ruta para la obtención de nanoestructuras con la eliminación del sustrato orgánico por tratamiento térmico de los materiales híbridos orgánico-inorgánico.

### *1.3.2. Objetivo general*

Obtener y caracterizar materiales como nanoesferas y nanobarras metálicas utilizándolas en la decoración de estructuras supramoleculares.

### *1.3.3. Objetivos específicos*

1. Obtener compuestos de inclusión de  $\alpha$ -ciclodextrina, con moléculas huéspedes adecuadas, y utilizarlos como soporte para la síntesis de las nanopartículas de níquel y cobalto.
2. Sintetizar y caracterizar nanoesferas metálicas obtenidas mediante la técnica de pulverización catódica en vacío teniendo un control adecuado del tamaño.
3. Evaluar los efectos sobre la viabilidad celular de los nanomateriales obtenidos.
4. Preparar y caracterizar compuestos supramoleculares decorados con nanoestructuras metálicas.
5. Emplear estructuras supramoleculares como templados para la obtención de nanoestructuras metálicas.

# **CAPÍTULO 2**

## **Materiales y Métodos**

## 2.1. Materiales

### 2.1.1 Reactivos y solventes

En la preparación de los CI, se utilizaron los siguientes reactivos de grado analítico:  $\alpha$ -CD, OT, DT, DDT, OA, DA y DDA los cuales fueron proporcionados por la empresa Sigma-Aldrich. Como solventes fueron empleados: acetona, metanol y agua para cromatografía *LiChrosolv*®, todos de grado analítico, marca Merck.

Posteriormente, estos CI fueron utilizados como soportes en la fabricación de NPsNi y NPsCo mediante el método de depósito físico en vapor (DFV). Para este propósito se utilizaron láminas metálicas de Ni y Co de alta pureza (99,9%) como material precursor del metal.

En las síntesis por métodos químicos de nanomateriales, todo el material de vidrio utilizado fue lavado previamente con *agua regia* (HCl:HNO<sub>3</sub>; 3:1) para retirar restos de metales que pudieran contaminar las preparaciones.

Específicamente, en la síntesis de NPsAu se empleó: ácido tetracloroáurico (HAuCl<sub>4</sub>, 99,0% Sigma-Aldrich) y citrato de sodio dihidratado (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O, 99,5% Fluka). Agua *mili-Q*, obtenida en un sistema *Millipore* con una conductividad de 18,2 M $\Omega$ , fue utilizada como solvente principal en éste y el resto de los métodos de síntesis de nanopartículas realizados.

En un segundo método de síntesis de NPsAu se utilizó:  $\text{HAuCl}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  (99,9% Aldrich), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB, 99,0%, Sigma), borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ , Merck) y ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ , 99% Sigma).

Para la preparación de NBsAu se utilizaron los siguientes reactivos:  $\text{HAuCl}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  (99,9% Aldrich), CTAB (99%, Sigma),  $\text{NaBH}_4$  (Merck), nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ , 99,99%, Aldrich), ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ , 99,0% Sigma) y ácido clorhídrico (HCl fumante 37%, Merck).

Para la evaluación toxicológica de sistemas nanosupramoleculares se empleó un cultivo celular de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) y en su mantenimiento y preparación se utilizó: Medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, marca Sigma), suero fetal bovino (SFB, marca GIBCO Invitrogen), tripsina (GIBCO Invitrogen), tampón fosfato salino en tabletas (PBS, Sigma), azul de tripán ( $\text{C}_{34}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_{14}\text{S}_4$ , Merck). Además, se utilizaron los *kit* de análisis colorimétrico de MTT y MTS y dodecilsulfato de sodio (SDS,  $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$ , 98,5% Sigma).

Por otro lado, en la formación de estructuras supramoleculares amiloides se empleó principalmente el péptido beta amiloide de 42 aminoácidos ( $\text{A}\beta_{1-42}$ , 97%, r-Peptide) y según el protocolo utilizado fueron empleados los siguientes reactivos: 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP,  $(\text{CF}_3)_2\text{CHOH}$ , 99% Sigma-Aldrich), ácido trifluoroacético (TFA, 99%, Aldrich), tris(hidroximetil)aminometano (TRIS,  $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ , 99,0% Sigma), cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ , 99,0% Merck) y lentejas de hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ , 99,0% Merck).

## 2.2. Metodología

### 2.2.1. Síntesis y caracterización de compuestos de inclusión de $\alpha$ -ciclodextrina

#### 2.2.1.1. Preparación de compuestos de inclusión de $\alpha$ -ciclodextrina

Cada CI fue obtenido agregando gota a gota los reactivos utilizados como moléculas huésped (0,766 mmol de OT, DT, DDT, OA y DA) a una solución saturada de  $\alpha$ -CD (0,514 mmol) en agua a temperatura ambiente en una relación molar de 3:1, respectivamente. El CI de  $\alpha$ -CD/DDA fue preparado disolviendo 0,766 mmol de DDA en aproximadamente 2 mL de metanol para luego ser agregado de la misma forma anteriormente descrita, sobre la solución saturada de  $\alpha$ -CD, debido a que el reactivo DDA se presenta en estado sólido a temperatura ambiente.

La inmediata precipitación de un sólido cristalino de color blanco indicó la formación de cada CI. Después de 72 horas, los microcristales fueron filtrados, lavados con acetona, agua y secados al vacío.

#### 2.2.1.2. Caracterización de los compuestos de inclusión mediante difracción de rayos X de polvo

Se realizó el análisis de muestras policristalinas de todos los compuestos por Difracción de Rayos X de polvo (DRXP) en un rango de  $2^\circ < 2\theta < 30^\circ$ , utilizando un difractómetro marca Siemens D-5000 con una radiación Cu-K $\alpha$  (40 kV, 30 mA) y un monocromador de grafito ( $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ ).

Para la indexación de las reflexiones obtenidas en cada difractograma se utilizó el programa PowderX creado por Chen Dong del Instituto de Física de la Academia de Ciencias de China en 1999.

### *2.2.1.3. Caracterización de los compuestos de inclusión mediante resonancia magnética nuclear de protones*

La caracterización de los CI en solución mediante Resonancia Magnética Nuclear de protones (RMN- $^1\text{H}$ ) se llevó a cabo en un equipo Bruker Advance 400 Mhz a 30°C, utilizando TMS como referencia interna y DMSO- $d_6$  como solvente.

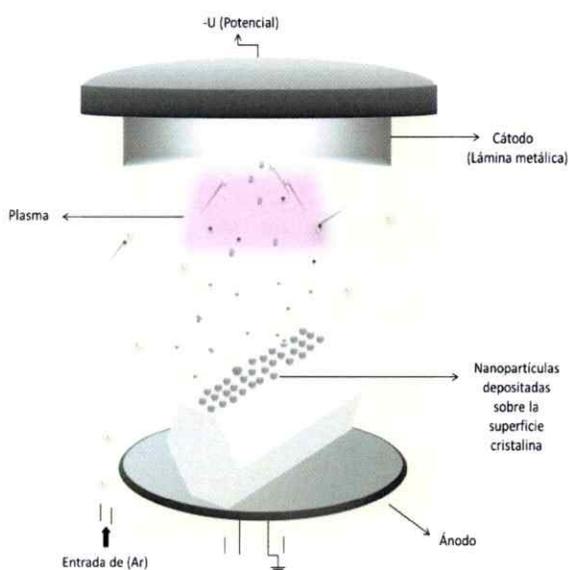
### *2.2.2. Obtención y caracterización de sistemas nanosupramoleculares formados por nanopartículas de níquel y cobalto con los compuestos de inclusión de $\alpha$ -ciclodextrina*

#### *2.2.2.1. Preparación de NPsNi y NPsCo sobre los compuestos de inclusión de $\alpha$ -iclodextrina*

Mediante PCV en un equipo Magnetron Sputter Coater PELCO SC-6 de corriente directa (DC) con una descarga de 220V, fue llevada a cabo la preparación de nanopartículas de níquel y cobalto, para lo cual, se espolvoreó entre 1 y 2 mg de cada CI formando una fina capa sobre una superficie de vidrio (portamuestras para microscopía óptica) la que se dispuso dentro de la cámara del equipo de PCV (ver Figura 2.1). En este proceso de depósito del metal, se utilizaron como fuente, láminas metálicas de níquel y cobalto de un 99,9% de pureza. Las nanopartículas fueron preparadas sobre los

CI en una atmósfera inerte con una presión de argón de 0,1 mbar y realizando un vacío previo de 0,05 mbar de presión.

Se evaluaron diferentes magnitudes de corriente y tiempos de exposición del sustrato al depósito del metal, de manera de encontrar las condiciones óptimas para la formación de nanopartículas sobre la superficie de los CI, considerando la dureza y naturaleza oxidable de los metales Ni y Co. Los tiempos de exposición para el depósito del metal variaron entre 50 y 120 segundos, homogenizando la muestra del polvo cristalino dentro de la cámara del equipo en etapas de 10 segundos para hacer más eficiente el depósito en el plano preferencial cristalino. Las corrientes utilizadas fueron de 20 mA y 25 mA que equivalen a 4,4 W y 5,5 W de potencia, respectivamente.



**Figura 2.1.** Esquema representativo del proceso de formación de nanopartículas mediante pulverización catódica sobre los cristales de CI de  $\alpha$ -CD.

#### 2.2.2.2. *Caracterización de NPsNi y NPsCo mediante espectroscopia UV-Vis*

Las NPsNi y NPsCo sobre cada CI, fueron caracterizadas por Espectroscopia UV-Vis en estado sólido en un rango de 200 a 600 nm y contra una referencia de sulfato de bario (BaSO<sub>4</sub>) en un equipo Shimadzu UV-2450 con una esfera de integración ISR-2200 asociada y controlado por el software UVProve Versión 1.10.

#### 2.2.2.3. *Análisis de NPsNi y NPsCo sobre los compuestos de inclusión mediante microscopía electrónica de transmisión*

Las muestras fueron preparadas dispersando aproximadamente 1 mg de los sistemas nanosupramoleculares en 1 mL de una solución de etanol 30% para los CI formados por  $\alpha$ -CD con moléculas alquiltioles y, en 1 mL de isopropanol para las NPs preparadas sobre CI formados por alquilaminas. Luego se depositó una gota de 10  $\mu$ L de cada suspensión sobre una rejilla de cobre con una película de *Formvar* continua, dejándola durante 1 minuto. Posteriormente se retiró el exceso de muestra sobre las rejillas, las cuales pudieron ser observadas directamente una vez que se secaron.

La caracterización de estas nanopartículas fue realizada en tres diferentes equipos: un microscopio Zeiss EM-109 a 50 kV, un microscopio JEOL JEM-1010 a 80 kV (ambos con filamento de Tungsteno) y en un microscopio electrónico de alta resolución (HRTEM) Jeol JEM-2100 a 200 kV con filamento de LaB<sub>6</sub> y detector de EDX, para el cual se necesitaron rejillas de cobre con una película de carbón continua.

Las imágenes capturadas en el microscopio HRTEM fueron tratadas con el programa computacional “Digital Micrograph” Gatan, Inc. Versión 1.2.4, 2003 el cual, permitió simular el patrón de difracción de electrones de las NPs a partir de una Transformada rápida de Fourier (FFT, por sus siglas en inglés) aplicada a los espaciados  $d$  observados por microscopía de alta resolución.

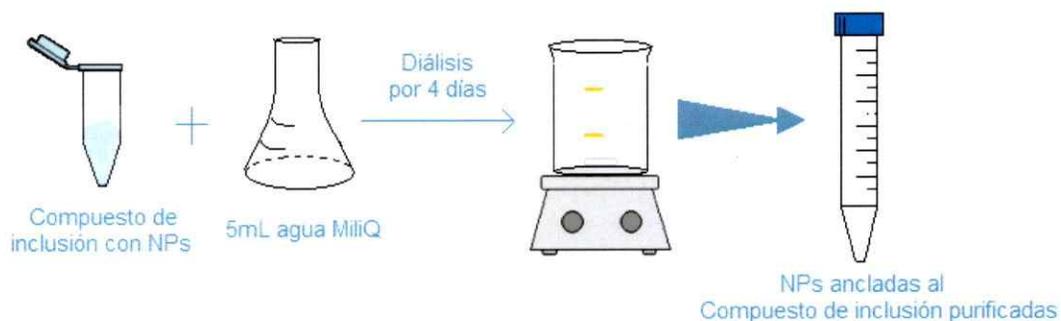
#### *2.2.2.4. Caracterización mediante espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDX)*

Los CI  $\alpha$ -CD/DT y  $\alpha$ -CD/DDT, fueron caracterizados por un análisis EDX en un detector Oxford 7424 asociado al microscopio electrónico de barrido LEO 1420VP operado a 25 kV.

#### *2.2.2.5. Purificación de los sistemas nanosupramoleculares; nanopartículas-compuestos de inclusión*

Se realizó un proceso de purificación de los sistemas nanosupramoleculares mediante diálisis a través de membrana, para retirar el exceso de CI que no posee NPs ancladas a su superficie. Brevemente, dentro de una membrana para diálisis Spectra/Por MWCO 6-8000, fueron dispuestos 5 mL de agua miliQ y aproximadamente 20 mg de cristales de cada CI con NPs. Esta membrana fue sellada y sumergida en un recipiente de 2 L que contenía una cantidad de 0,5 mg/L del sustrato nanosupramolecular. Después

de 4 días de agitación constante e intercambio del agua *miliQ* se obtuvo la muestra purificada.



**Figura 2.2.** Esquema del proceso de purificación de las nanopartículas obtenidas sobre los compuestos de inclusión en estado sólido.

#### 2.2.2.6. Cuantificación de metal correspondiente a las *NPsNi* y *NPsCo* sobre los sustratos supramoleculares

Las concentraciones de los metales en cada muestra fueron determinadas mediante Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) realizando los ensayos por triplicado, en un equipo Perkin Elmer ELAN600 con un módulo láser Cetax LSX-200 UV, luego de tratar las muestras por digestión ácida con una mezcla de ácido nítrico y ácido perclórico.

#### *2.2.2.7. Adición del péptido CLPFFD a los compuestos nanosupramoleculares*

Fueron agregados 5 mL de una solución acuosa del péptido CLPFFD 0,27 mmol/L a aproximadamente 20 mg de cada sistema nanosupramolecular y la mezcla fue agitada mecánicamente durante 5 segundos para promover el proceso de funcionalización dejando posteriormente las muestras en reposo durante toda la noche.

Posteriormente, la muestra fue dispuesta en una membrana de diálisis Spectra/Por MWCO 6-8000 contra 2 L de agua *miliQ*. El proceso se realizó durante 4 días en agitación constante y renovando el agua *miliQ* para eliminar el exceso de CI y de péptido.

#### *2.2.2.8. Análisis de aminoácidos a los sistemas nanosupramoleculares formadas por nanopartículas funcionalizadas con compuestos de inclusión y el péptido CLPFFD (NPs-CI/Péptido)*

Para estimar la cantidad de péptido unido a la superficie de las NPs se realizó un análisis de aminoácidos (Aaa) para las muestras que fueron purificadas previamente.

El procedimiento fue realizado en un equipo HPLC Water 2487, con una columna Nova-Pack C18 a 37°C y un detector a una longitud de onda  $\lambda = 254$  nm.

En detalle, dentro de un vial de vidrio con tapa rosca se dispuso de 5 mL de la dispersión acuosa del sistema NPs-CI/péptido y se agregaron 40  $\mu$ L de ácido aminobutírico (aabu) 2,5 mmol/L como patrón. La mezcla fue liofilizada durante 24

horas. Posteriormente, se agregó 1 mL de una solución de HCl 6 mol/L y se introdujo el tubo cerrado en un baño de arena a 110°C durante 6 días para producir la total hidrólisis del péptido. Posteriormente, la muestra fue rotavaporada y luego resuspendida en 1 mL de HCl 20 mmol/L, la cual se filtró en pequeños filtros de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0,45 µm.

De la muestra filtrada fueron tomados 10 µL para la derivatización con el reactivo 1-fluoro-2,4, nitrobenzeno y luego fue inyectada en el equipo de HPLC.

Para calcular la concentración del péptido presente en la muestra, se determinó la media de las concentraciones milimolares del péptido determinadas experimentalmente ( $\bar{X}_{exp}$ ), para luego obtener el valor corregido ( $\bar{X}_{real}$ ) utilizando la concentración del patrón aabu en la siguiente expresión;

$$\bar{X}_{exp} \times \frac{[aabu]_{teórico}}{[aabu]_{exp}} = \bar{X}_{real} \quad (6)$$

La concentración final reportada corresponde a la concentración inicial con la que se preparó la muestra para la medición.

Por otro lado, la concentración de NPs fue determinada mediante el protocolo descrito por Liu y col., en el cual se determina el número de átomos por NPs (N) mediante la siguiente ecuación [63];

$$N = \frac{\pi \rho D^3}{6M} N_A \quad (7)$$

Donde,

$\rho$  = densidad del metal,

D = diámetro promedio de las NPs

M = masa atómica del metal y

$N_A$  = número de Avogadro.

Posteriormente, la concentración molar de NPs en la dispersión coloidal  $C$  viene dada por;

$$C = \frac{N_T}{NVN_A} \quad (8)$$

Donde,

$N_T$  = número total de átomos metálicos en la dispersión,

N = número de átomos por NP, calculado apartir de la ecuación (7),

V = volumen de la dispersión coloidal de NPs y

$N_A$  = número de Avogadro.

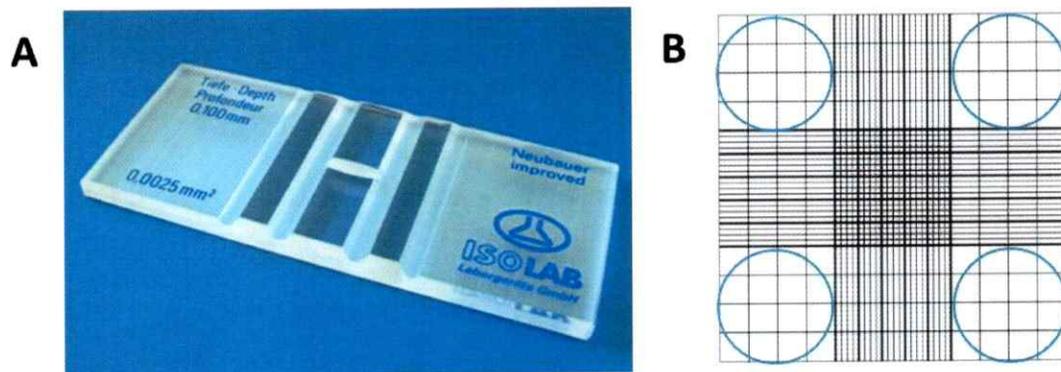
Finalmente, el número de moléculas del péptido que funcionalizan a cada NPs fue determinado al dividir la concentración del péptido por la concentración de NPs metálicas.

#### *2.2.2.9. Evaluación de citotoxicidad de sistemas nanosupramoleculares en células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y)*

Antes de realizar la evaluación, las células de neuroblastoma fueron preparadas mediante un proceso de activación y crecimiento. Para esto, las células que se encuentran dispersas en 90% de SFB y 10% de DMSO, fueron descongeladas desde una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta los  $37^{\circ}\text{C}$  en un baño termorregulado. Posteriormente, fueron centrifugadas y reconstituidas en un medio de cultivo DMEM que contiene 4,5 g/mL de glucosa, 10% SFB, 100  $\mu\text{g/mL}$  de penicilina y 100  $\mu\text{g/mL}$  de estreptomina, el cual será denominado sencillamente como "DMEM 10%SFB".

Para el crecimiento, las células fueron dispuestas en frascos estériles de cultivo con una superficie de  $75\text{ cm}^2$ , dentro de una estufa de cultivo a  $37^{\circ}\text{C}$  bajo una atmósfera compuesta por 95% de aire y 5% de  $\text{CO}_2$ . Cuando se obtuvo una cantidad suficiente de células, estas fueron lavadas con aproximadamente 4 mL de una solución de tampón fosfato salino (PBS) 1X, el cual fue eliminado y luego se agregaron 2 mL de tripsina 1X para despegar las células del frasco. Después de aproximadamente 2 minutos, la tripsina fue inactivada agregando DMEM 10% SFB y las células fueron traspasadas a un tubo estéril de 15 mL, donde luego fueron centrifugadas, reconstituyendo nuevamente con DMEM 10% SFB.

Para la realización del ensayo, fue determinada la cantidad de células en 1 mL de medio de cultivo mediante el conteo celular en una cámara de Neubauer o hematocitómetro (ver Figura 2.3).



**Figura 2.3.** A) Fotografía de una cámara de Neubauer o hematocitómetro (Tomada del sitio <http://www.pro-lab.com.mx> ) y B) vista ampliada de la cámara que muestra los cuadrantes donde se realiza el conteo celular.

Para este procedimiento, 20  $\mu\text{L}$  de la dispersión de células fueron llevados a un volumen de 100  $\mu\text{L}$  con DMEM 10%SFB (Factor de dilución  $F_{d1} = 5$ ). De esta dilución se tomaron 10  $\mu\text{L}$  y se mezclaron con 10  $\mu\text{L}$  de Azul de Tripán (Factor de dilución  $F_{d2} = 2$ ). Finalmente, fue tomada una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  para ser dispersados en la cámara de Neubauer, la cual se dispuso en un microscopio óptico para el conteo, calculando el número de células por mL de medio de cultivo, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Número de células}/_{\text{mL}} = N \times F_{d1} \times F_{d2} \times 10^4 \quad (9)$$

Donde,

$N$  = promedio de número de células contadas en un cuadrante de la cámara Neubauer

$F_{d1}$  y  $F_{d2}$  = factores de dilución

$10^4$  = factor que expresa el volumen (mL) en un cuadrante de la cámara Neubauer

Posteriormente, en placas de cultivo de 96 pocillos se sembraron 3000 células en 60 pocillos centrales, agregando 100  $\mu\text{L}$  de PBS en los pocillos laterales para evitar la evaporación del medio de cultivo. Las placas fueron dejadas dentro de la estufa de incubación durante 24 horas para su adhesión y crecimiento.

Al iniciar los ensayos de viabilidad celular, fue extraído cuidadosamente el medio de cultivo de cada pocillo de las placas, agregando nuevamente 80  $\mu\text{L}$  de DMEM 10% SFB y 20  $\mu\text{L}$  de las muestras a evaluar por triplicado. Para el control positivo (el cual indica el 100% de viabilidad celular) se dispusieron al menos 6 pocillos en los cuales se agregó 80  $\mu\text{L}$  de DMEM 10% SFB y 20  $\mu\text{L}$  de agua *mili-Q* (solvente de las muestras evaluadas) y para el control negativo se agregaron 80  $\mu\text{L}$  de DMEM 10% SFB y 20  $\mu\text{L}$  de una solución acuosa del surfactante aniónico; dodecil sulfato de sodio (SDS) al 2%, el cual provoca la muerte celular. Cada placa fue dispuesta en la estufa de incubación por 24 horas.

Para el ensayo de MTT, todo el sobrenadante en cada pocillo fue retirado y se agregaron nuevamente 100  $\mu\text{L}$  de DMEM 10% SFB y 50  $\mu\text{L}$  de MTT 1 mg/mL. Cada placa fue dejada en reposo dentro de la estufa de incubación durante 4 horas. Luego, el sobrenadante fue removido eliminando el medio de cultivo y el reactivo MTT no metabolizado y se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Después de lograr la solubilización de los cristales de formazán formados, fue determinada la absorbancia de este reactivo en cada pocillo en un lector de placas ELISA a 560 nm. Los valores de absorbancia fueron normalizados de acuerdo al control positivo y expresados como porcentajes de viabilidad.

En el ensayo de MTS, el procedimiento difiere al anteriormente descrito debido a que este reactivo es soluble en medio acuoso, por lo tanto, después de retirar las placas de cultivo con las muestras desde la estufa de cultivo, el sobrenadante fue retirado y se agregaron 90  $\mu$ L de DMEM 10% SFB y 10  $\mu$ L de MTS, dejando reaccionar a 37°C en la estufa de cultivo durante 2 horas. Después, las placas se retiraron de la estufa y se midieron las absorbancias en el lector de ELISA a 490 nm.

En el tratamiento de los datos obtenidos para cada ensayo, fue realizado un estudio estadístico de análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés) de un factor, considerando un  $P < 0.05$  para concluir que las concentraciones analizadas difieren significativamente entre sí. Este estudio se realizó a través del programa GraphPad Prism versión 5.0.3.477.

### ***2.2.3. Nanodecoración de cristales supramoleculares con nanoestructuras de oro***

#### ***2.2.3.1. Síntesis de nanobarras de oro estabilizadas con bromuro de cetiltrimetilamonio***

Las NBsAu estabilizadas en CTAB fueron sintetizadas mediante el método químico conocido como “crecimiento mediado por núcleos”, descrito por Nikoobakht y col., [64] con modificaciones de pH por la adición de HCl [65]. Este procedimiento consta de dos etapas: la preparación de una primera dispersión de semillas o núcleos de crecimiento que contiene pequeñas NPsAu sobre las que crecerán las nanoestructuras unidimensionales y una segunda solución llamada “de crecimiento” a la cual es agregada

una pequeña cantidad de la primera dispersión, para dar lugar a NBsAu formadas gracias a la acción de un reductor y reactivos directores de crecimiento.

En detalle, la primera dispersión coloidal fue obtenida al reducir 250  $\mu\text{L}$  de una solución de la sal metálica  $\text{HAuCl}_4$  0,01 mol/L en 9,5 mL de una solución de CTAB 0,1 mol/L con 600  $\mu\text{L}$  del reductor  $\text{NaBH}_4$  0,01 mol/L, ésta última, preparada con agua a 4°C para evitar la descomposición de este reductor. Esta mezcla fue agitada durante 30 minutos y luego dejada en reposo durante 2 horas a una temperatura de 27°C.

En una segunda etapa, fue preparada la solución “de crecimiento”, agregando 75  $\mu\text{L}$  de  $\text{AgNO}_3$  0,1 mol/L, 9,5 mL de CTAB 0,1 mol/L, 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{HAuCl}_4$  0,01 mol/L, 55  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico 0,1 mol/L y 250  $\mu\text{L}$  de HCl 0,1 mol/L. A esta solución fueron agregados 12  $\mu\text{L}$  de la dispersión coloidal de núcleos de crecimiento, iniciándose así el proceso de formación de las NBsAu. Esta mezcla se dejó reaccionar durante 10 minutos y luego fue centrifugada por 15 minutos a 5000 xg. Finalmente, las NBsAu que se encontraban en el *pellet* fueron resuspendidas en agua *mili-Q*.

### 2.2.3.2. Caracterización de nanobarras de oro mediante microscopía electrónica de transmisión

Las muestras fueron preparadas depositando una gota de la dispersión coloidal de NBsAu sobre rejillas de cobre con películas de *Formvar*, las cuales fueron observadas directamente, una vez que se secaron, en un microscopio electrónico Jeol 2000FX a 200 kV.

Las NBsAu también fueron caracterizadas por HRTEM en un microscopio Jeol J2010F a 200 kV utilizando grillas de cobre con películas de carbón como soporte de las muestras. Las imágenes capturadas en el microscopio HRTEM fueron tratadas con el programa computacional “Digital Micrograph” Gatan, Inc. Versión 1.2.4, 2003 para obtener el patrón de difracción de electrones simulado de las NPs.

#### *2.2.3.3. Análisis de la dispersión de nanobarras de oro mediante espectroscopia UV-visible*

En un espectrofotómetro UV-visible 2501PC Shimadzu fue caracterizada la dispersión acuosa de NBsAu-CTAB. El análisis fue realizado a temperatura ambiente en un rango de 350 a 900 nm de longitud de onda.

#### *2.2.3.4. Preparación de compuestos de inclusión de $\alpha$ -ciclodextrina con octanotiol decorados con nanobarras de oro*

La nanodecoración de los cristales de  $\alpha$ -ciclodextrina con octanotiol ( $\alpha$ -CD/OT) fue realizado agregando 0,4 g de cristales de CI de  $\alpha$ -CD/OT a 4 mL de la dispersión coloidal de NBsAu-CTAB dejando reposar durante aproximadamente 15 a 20 minutos.

Posteriormente los cristales fueron filtrados al vacío, lavados con 2 mL de agua *mili-Q* y secados al vacío.

*2.2.3.5. Caracterización de los compuestos de inclusión decorados con nanobarras de oro, mediante microscopía de barrido*

Las NBsAu fueron caracterizadas por Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo (SEM FE) en un microscopio NanoSEM NPE67 operado a 5 kV.

Un análisis de EDX de las muestras fue realizado en un detector Oxford 7424 acoplado a un microscopio electrónico de barrido LEO 1420VP operado a 25kV.

*2.2.3.6. Análisis de resonancia magnética nuclear de protones de los compuestos de inclusión con nanobarras de oro*

Los CI decorados con NBsAu fueron caracterizados mediante RMN-<sup>1</sup>H en un equipo Bruker Advance 400 a 400.133 MHz, utilizando DMSO-d<sub>6</sub> como solvente y TMS como referencia interna.

*2.2.3.7. Caracterización de los compuestos de inclusión nanodecorados mediante espectroscopia UV-visible en estado sólido*

Mediante espectroscopia UV-Vis en estado sólido fue caracterizado el CI nanodecorado, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-2450 en un rango de 350 a 800 nm de longitud de onda y contra una referencia de sulfato de bario BaSO<sub>4</sub>.

#### *2.2.3.8. Síntesis de nanopartículas de oro esféricas estabilizadas en bromuro de cetiltrimetilamonio*

Las NPsAu estabilizadas en CTAB (NPsAu-CTAB) fueron preparadas mediante el método de crecimiento por núcleos [66], adicionando 500  $\mu$ L de una solución muy fría de  $\text{NaBH}_4$  0,01 mol/L a una solución que contenía 125  $\mu$ L de  $\text{HAuCl}_4$  0,01 mol/L y 4,375 mL de CTAB 0,075 mol/L. Luego esta solución fue dejada en reposo durante 2 horas a 25-27°C.

Para completar la síntesis de NPsAu-CTAB, se preparó una solución de crecimiento que contenía 1,6 mL de CTAB 0,1 mol/L, 2mL de  $\text{HAuCl}_4$  0,01 mol/L y 600  $\mu$ L de ácido ascórbico 0,1 mol/L en 90 mL de agua. A esta solución fueron agregados 0,1 mL de la dispersión de núcleos y se agitó suavemente durante 10 segundos. Posteriormente, la dispersión final de NPsAu-CTAB, fue dejada en reposo durante 3 horas a 25-27°C y centrifugada a 600 rpm durante 1 hora.

#### *2.2.3.9. Caracterización de nanopartículas de oro esféricas mediante microscopía electrónica de transmisión*

Las NPsAu-CTAB fueron caracterizadas mediante microscopía TEM en dos equipos: un microscopio JEOL JEM-1010 a 80kV y un microscopio Hitachi HT7700 operado a 120kV, para los cuales se utilizaron grillas de cobre con películas de *Formvar* como soporte para las muestras.

Además, estas partículas fueron analizadas en un microscopio de alta resolución Jeol J2010F operado a 200 kV, utilizando grillas de cobre con películas de carbón continuo. Las imágenes capturadas en el microscopio HRTEM fueron tratadas con el programa computacional “Digital Micrograph” Gatan, Inc. Versión 1.2.4, 2003 el cual, permitió simular el patrón de difracción de electrones de las NPs a partir de una FFT aplicada a los espaciados  $d$  observados por microscopía de alta resolución.

#### *2.2.3.10. Caracterización de la dispersión de nanopartículas de oro mediante espectroscopía UV-visible*

Para la caracterización de las NPsAu-CTAB mediante espectroscopía UV-visible se midieron espectros entre 350 y 800 nm en un espectrofotómetro 2501PC Shimadzu.

#### *2.2.3.11. Preparación de cristales de compuestos de inclusión de $\alpha$ -ciclodextrina decorados con nanopartículas esféricas de oro estabilizadas con cetiltrimetilamonio*

La nanodecoración de los cristales de CI de  $\alpha$ -CD/DDT con NPsAu-CTAB se realizó agregando aproximadamente 0,4 g del CI a 4 mL de la dispersión de NPsAu-CTAB dejando la muestra en reposo durante 20 minutos. Luego estos cristales fueron lavados con agua *mili-Q*, filtrados y secados al vacío.

*2.2.3.12. Caracterización de compuestos de inclusión de  $\alpha$ -ciclodextrina decorados con nanopartículas de oro mediante microscopía electrónica de barrido de alta resolución*

Los cristales de CI nanodecorados con NPsAu fueron caracterizados mediante FE SEM en un microscopio Nova NanoSEM 230 operado a 4,8 kV.

*2.2.3.13. Análisis de los compuestos de inclusión con nanopartículas de oro, mediante resonancia magnética nuclear de protones.*

Mediante RMN-<sup>1</sup>H en 1D y 2D fueron caracterizados los CI nanodecorados con NPsAu para lo cual, las muestras se disolvieron en DMSO-d<sub>6</sub> y fueron medidas en un espectrómetro Bruker Advance 400 a 400 MHz, utilizando como referencia interna TMS.

*2.2.3.14. Caracterización de las nanopartículas de oro depositadas sobre los cristales de compuestos de inclusión mediante espectroscopía UV-visible*

Las NPsAu soportadas sobre los cristales de CI fueron caracterizadas mediante espectroscopía UV-visible en estado sólido utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-2450 en un rango de 350 a 800 nm de longitud de onda.

## ***2.2.4. Preparación de nanoestructuras híbridas bio-inorgánicas compuestas por fibras $\beta$ -amiloides decoradas con nanopartículas de oro***

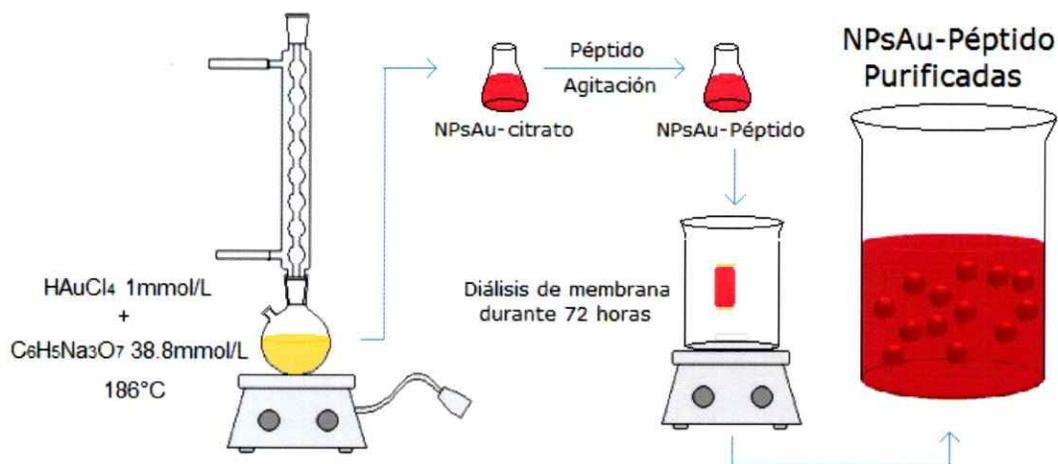
### ***2.2.4.1. Síntesis de nanopartículas de oro***

Las NPsAu esféricas fueron sintetizadas basándose en el método original de Turkevich y col., reportado en 1951 [67]. La síntesis consiste en la reducción de la sal de oro ( $\text{HAuCl}_4$ ) con citrato de sodio ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ ), el cual también actúa como estabilizador de la suspensión de NPsAu. Para esto se preparó un sistema a reflujo con 100 mL de una solución de  $\text{HAuCl}_4$  1 mmol/L a la cual le fueron agregados rápidamente 10 mL de una solución de  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$  38,8 mmol/L manteniendo un reflujo constante a 186°C. Después de 30 minutos, se obtuvo un coloide de color rojo vino el cual fue filtrado con filtros *Milipore* de acetato de celulosa de 0,45  $\mu\text{m}$ , para eliminar posibles impurezas.

### ***2.2.4.2. Preparación de nanopartículas de oro funcionalizadas con los péptidos CLPFFD, C(Eg)<sub>3</sub>LPFFD y GSH***

Para la formación del conjugado NPsAu-CLPFFD, el pH de la dispersión de NPsAu fue ajustado a pH=8 con una solución de NaOH 0,1mol/L. Luego, fue adicionado 1 mL de una solución acuosa del péptido 1,35 mmol/L a 20mL de la dispersión de NPsAu agitando continuamente durante 15 minutos. La muestra fue purificada mediante diálisis durante 72 horas en una membrana Spectra/Por MWCO 6-8000 contra una solución de citrato de sodio 1,2 mmol/L.

En la preparación de los conjugados NPsAu-C(Eg)<sub>3</sub>LPFFD y NPsAu-GSH se siguió el mismo protocolo anteriormente descrito, sin requerimientos de ajuste de pH.



**Figura 2.4.** Esquema que detalla el proceso general de síntesis, funcionalización y purificación de NPsAu.

#### 2.2.4.3. Caracterización de los conjugados nanopartícula-péptido mediante microscopía electrónica de transmisión

Cada conjugado NPsAu-péptido, fue caracterizado mediante TEM para lo cual se utilizaron los microscopios: JEOL JEM-1010 a 80 kV y Hitachi HT7700 operado a 120 kV, utilizando grillas de cobre con películas de *Formvar* como soporte para las muestras.

#### *2.2.4.4. Caracterización de los conjugados nanopartícula-péptido mediante espectroscopía UV-visible*

Los conjugados NPsAu-péptido, fueron caracterizados además, mediante Espectroscopía UV-visible en un equipo UV-2501PC Shimadzu, comparando la absorbancia presentada por estos conjugados con la absorbancia de las NPsAu-citrato antes de la funcionalización con los respectivos péptidos.

#### *2.2.4.5. Desagregación previa del péptido $\beta$ -amiloide para la preparación de fibras*

La formación de fibras  $\beta$ -amiloides se realiza a través de un proceso de incubación el cual se inicia con este péptido en condiciones de desagregación. Para ello, en un principio se utilizó el método desarrollado por Zagorski [68] para la desagregación del péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta_{1-42}$ ), el cual consiste en agregar pequeñas cantidades de ácido trifluoro acético (TFA) al péptido anteriormente liofilizado. El TFA agregado al péptido, fue evaporado al purgar  $N_2$  gaseoso, proceso que fue repetido al menos tres veces. Luego se agregó una cantidad similar de 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) y se reiteró el proceso de evaporación con  $N_2$  gaseoso para eliminar el exceso de TFA en el péptido. Posteriormente, el péptido fue dejado durante una noche en una desecadora con trozos de parafina sólida y lentejas de NaOH. Este proceso permite obtener monómeros del péptido amiloide (Método A).

En un segundo protocolo se utilizó el reactivo HFIP para provocar la desagregación del péptido  $A\beta_{1-42}$ . Este reactivo permitió obtener la desagregación del

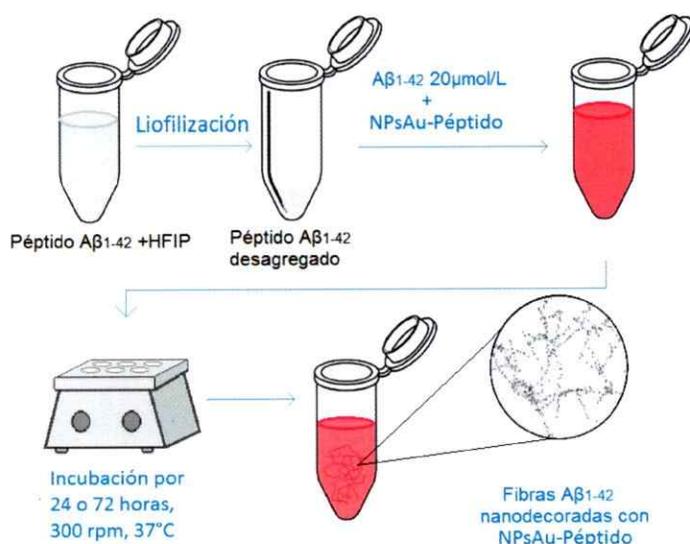
péptido convirtiéndolo en estructura  $\alpha$ -hélice [69, 70]. El procedimiento se realizó preparando alícuotas de 0,05 mg del péptido  $A\beta_{1-42}$ , a las que se agregó aproximadamente 100  $\mu$ L de HFIP. Las muestras fueron tratadas con ultrasonido durante 20 minutos y luego de otros 10 minutos de reposo, fueron liofilizadas durante 24 horas (Método B).

#### *2.2.4.6. Obtención de fibras del péptido $\beta$ -amiloide, decoradas con los conjugados Nanopartículas de oro-péptidos*

A partir de la obtención de estructuras monoméricas del péptido  $A\beta_{1-42}$  por el Método A, el péptido fue reconstituido con 600  $\mu$ L de una solución acuosa del tampón TRIS-NaCl (TRIS 10  $\mu$ mol/L y NaCl 100 mmol/L a pH 7,5) y 400  $\mu$ L de la dispersión NPsAu-péptido diluida (aproximadamente 74,96 nmol/L) obteniendo una concentración final del péptido  $A\beta_{1-42}$  de 20  $\mu$ mol/L.

El proceso de incubación se realizó en un termo-mezclador Eppendorf Thermomixer confort a 37°C y 2,1x g (300 rpm) durante; 3, 4, 5, 6, 24, 27 y 30 horas, obteniendo los mejores resultados a 3 y 6 horas de incubación.

Utilizando el Método B de desagregación, el proceso de formación de las fibras amiloides se llevó a cabo reconstituyendo las alícuotas del péptido  $A\beta_{1-42}$  en 600 $\mu$ L de agua *mili-Q* y 400 $\mu$ L de la dispersión de NPsAu-Péptido 74,96 nmol/L, resultando una concentración final del péptido de 20  $\mu$ mol/L. Las condiciones de incubación fueron de 2,1x g (300 rpm), a 37°C durante 24 o 72 horas.



**Figura 2.5.** Esquema representativo del proceso final escogido para la obtención de los materiales híbridos bio-inorgánicos.

#### 2.2.4.7. Caracterización de fibras del péptido $\beta$ -amiloide ( $A\beta_{1-42}$ ) nanodecoradas mediante microscopía electrónica de transmisión

El proceso de formación de las fibras amiloides y su nanodecoración para la formación de estructuras bio-inorgánicas fue monitoreado a través de microscopía electrónica TEM en los equipos Zeiss EM-109 50kV-80 kV y JEOL JEM-1010 a 80kV (ambos con filamento de Tungsteno), utilizando grillas de cobre de 300 mesh con películas de *Formvar* como soporte.

Para la visualización de las fibras amiloides se realizó un proceso de tinción negativa utilizando acetato de uranilo. Las muestras fueron preparadas sobreponiendo la

grilla en una gota de 10  $\mu\text{L}$  de la solución que contenía las fibras nanodecoradas. Luego de 1 minuto, el exceso de muestra fue retirado por contacto del borde de la grilla con papel filtro. El mismo procedimiento fue realizado tres veces con gotas de agua *mili-Q* para retirar el exceso de muestra. Finalmente, se agregó una gota de 10  $\mu\text{L}$  de una solución de acetato de uranilo al 2%, retirando luego de 1 minuto el exceso de reactivo. Las grillas fueron dejadas secar por al menos una noche y posteriormente fueron visualizadas por microscopía TEM.

# **CAPÍTULO 3**

## **Resultados y Discusiones**

“Compuestos de Inclusión de  $\alpha$ -Ciclodextrina con  
alquiltioles y alquilaminas”

### 3.1. Síntesis de compuestos de inclusión de $\alpha$ -ciclodextrina con moléculas n-alquilaminas y n-alquiltioles

Existen diferentes métodos para la obtención de CI, como la preparación de una mezcla física entre la CD y el huésped [71] o la co-precipitación, la cual consiste en preparar una disolución acuosa de la CD y luego se agrega el huésped con continua agitación [72, 73]. Entre los métodos existentes, fue escogido el método de formación de complejos por disolución saturada a temperatura ambiente, por la facilidad de disolución acuosa que posee la  $\alpha$ -CD [4].

Es importante la elección de un solvente adecuado para la formación de los compuestos de inclusión. El agua es el solvente comúnmente utilizado debido a que puede ser fácilmente desplazado desde el interior de la matriz por las moléculas huésped y después de la formación del compuesto, puede ser retirado sin inconvenientes por métodos como filtración y secado al vacío. Convenientemente, el huésped debe tener una menor solubilidad en agua, pero en algunos casos en que los huéspedes se encuentran en estado sólido o su solubilidad es despreciable, se vuelve necesaria su previa disolución en pequeñas cantidades de solventes como metanol, etanol, dietil éter o acetona los cuales son volátiles y pueden eliminarse rápidamente por evaporación.

En nuestro caso, sólo fue necesaria una previa disolución del huésped DDA en metanol, debido a que este huésped se encuentra en estado sólido a temperatura ambiente ( $T^{\circ}$  fusión = 27-29°C). El resto de los huéspedes fueron agregados directamente donde, una adición lenta y la continua agitación, favorecieron a la completa formación

de los sustratos supramoleculares, obteniéndose porcentajes de rendimiento superiores al 85%, tal como se aprecia en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1.** Porcentajes de rendimiento de los compuestos de inclusión sintetizados, donde el reactivo limitante es  $\alpha$ -ciclodextrina.

CI	% Rendimiento
$\alpha$ -CD/OT	95,7
$\alpha$ -CD/DT	93,1
$\alpha$ -CD/DDT	92,6
$\alpha$ -CD/OA	86,3
$\alpha$ -CD/DA	89,1
$\alpha$ -CD/DDA	90,0

### 3.2. Caracterización de compuestos de inclusión de $\alpha$ -ciclodextrina con moléculas n-alquilaminas y n-alquiltioles

Con el fin de verificar la formación de los CI de  $\alpha$ -CD y evaluar su estabilidad para hacer frente a la posible utilización de estos complejos como precursores de NPs metálicas, se vuelve necesario realizar una caracterización tanto en solución como en estado sólido de estos sustratos supramoleculares. Para esto fueron utilizadas técnicas como RMN- $^1\text{H}$  y DRXP.

### 3.2.1. Análisis mediante RMN-<sup>1</sup>H

Se ha reportado la elucidación estructural de CI de CD donde una de las principales herramientas utilizadas ha sido la espectroscopia RMN [74, 75]. Esta técnica permite verificar la formación de los CI al comparar los desplazamientos químicos que presentan la matriz y cada uno de los huéspedes por sí solos, con los desplazamientos químicos presentes en el CI final.

Este estudio resultó particularmente sencillo para los sistemas escogidos debido a que, las señales pertenecientes a cada molécula se encuentran en regiones restringidas en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H por lo que pueden ser claramente identificadas, tal como se muestra en la Figura 3.1.

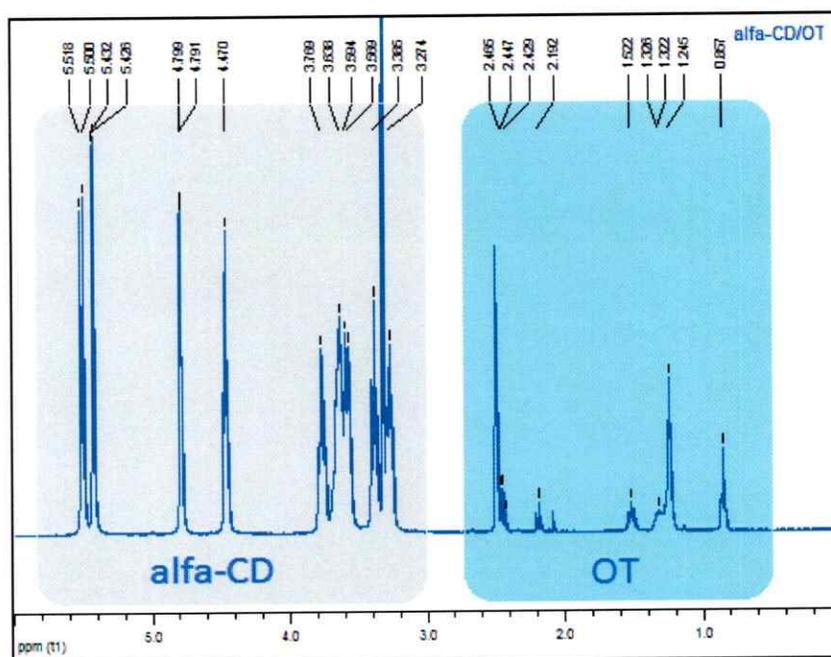


Figura 3.1. Espectro RMN-<sup>1</sup>H del CI de  $\alpha$ -CD/OT.

Los desplazamientos químicos que presentan los protones pertenecientes a las dos moléculas, evidencian el cambio de entorno químico que presentan al formar parte del CI, tal como se puede apreciar en el ejemplo de la siguiente tabla.

**Tabla 3.2.** Desplazamientos químicos de los protones de las moléculas de OT y  $\alpha$ -CD cuando se encuentran de manera aislada y cuando forman parte del CI  $\alpha$ -CD/OT.

Señal	OT (ppm)	$\alpha$ -CD/OT (ppm)	$\Delta \delta$ (ppm)
-CH <sub>3</sub>	0,859	0,857	0,002
-CH <sub>2</sub>	1,331	1,324	0,007
(-CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	1,250	1,245	0,005
-CH <sub>2</sub>	1,528	1,522	0,006
-CH <sub>2</sub>	2,464	2,456	0,008
-SH	2,120	2,192	0,072

Señal	$\alpha$ -CD(ppm)	$\alpha$ -CD/OT (ppm)	$\Delta \delta$ (ppm)
-H(1)	4,794	4,795	0,001
-H(2)	3,278	3,274	0,004
-H(3)	3,770	3,769	0,001
-H(4)	3,385	3,385	0,000
-H(5)	3,582	3,581	0,001
-H(6)	3,634	3,638	0,004
-OH(6)	4,468	4,470	0,002
-OH(3)	5,426	5,429	0,003
-OH(2)	5,502	5,509	0,007

Para todos los CI de  $\alpha$ -CD con alquiltioles como huéspedes, se observó un mayor desplazamiento de la señal correspondiente al grupo funcional de la molécula huésped. La inclusión de la molécula en la cavidad de las  $\alpha$ -CD, produce un desplazamiento de la señal de los grupos -SH hacia campos más altos, debido a la posible interacción mediante puente de hidrógeno que se puede establecer entre el grupo -SH y el grupo -

OH(6) que corresponde al hidroxilo primario de la cavidad inferior de la molécula de  $\alpha$ -CD [76, 77].

La dificultosa visualización de la señal del grupo  $-\text{NH}_2$  perteneciente a los huéspedes alquilamina, no permitió el reconocimiento de un desplazamiento para esta señal, por lo que no es posible inferir sobre una posible interacción entre este grupo funcional y el grupo  $-\text{OH}(6)$  de la molécula de  $\alpha$ -CD.

Por otro lado, a través de métodos de titulación por RMN- $^1\text{H}$ , se ha logrado establecer la estequiometría que define a la unidad básica de estos complejos en solución, los cuales se han desarrollado comúnmente para CI de  $\beta$ -CD que poseen relaciones estequiométricas de 1:1 (matriz:huésped). No se tienen resultados reproducibles para casos en que las relaciones molares corresponden a 2:1, matriz-huésped [76].

Un método sencillo para la determinación de la estequiometría de los CI de  $\alpha$ -CD sintetizados, se desarrolló a partir de la comparación entre la integral de referencia de los protones del grupo terminal  $-\text{CH}_3$  de la cadena alifática de la molécula huésped y las integrales correspondientes a los protones de los hidroxilos secundarios ( $-\text{OH}(2)$  y  $-\text{OH}(3)$ ) de las moléculas de  $\alpha$ -CD en cada espectro de RMN- $^1\text{H}$ . Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.3.

**Tabla 3.3.** Relaciones molares (matriz:huésped) calculadas para cada compuesto de inclusión.

CI	Relación molar
$\alpha$ -CD/OT	2:1
$\alpha$ -CD/DT	2:1
$\alpha$ -CD/DDT	2:1
$\alpha$ -CD/OA	1,5:1
$\alpha$ -CD/DA	1,8:1
$\alpha$ -CD/DDA	1,7:1

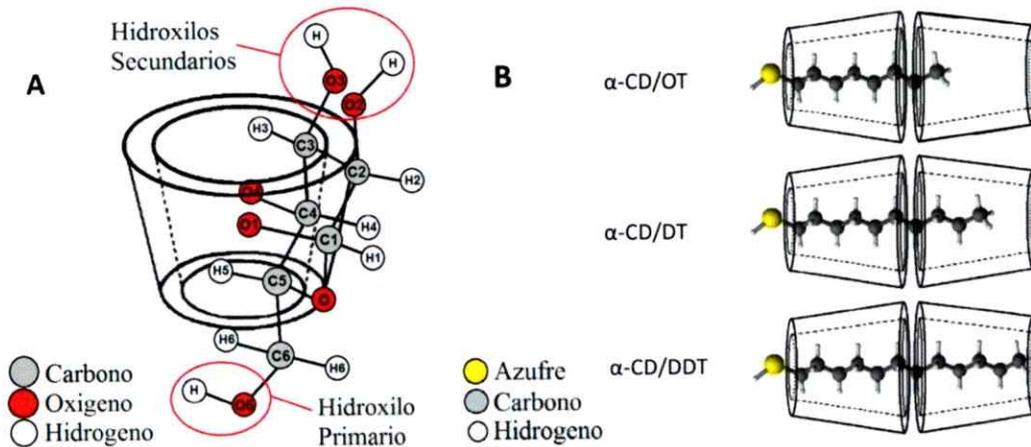
La relación molar matriz:huésped para los CI formados por alquiltioles fue de 2:1, en cambio, para los CI formados por alquilaminas se encontraron relaciones con una menor proporción para las moléculas de  $\alpha$ -CD. La variación en estos resultados podría estar relacionada con un exceso de la molécula huésped presente en los CI, que no fue retirado en el proceso de lavado de los microcristales. Además, los CI formados por alquilaminas podrían tener una menor estabilidad en disolución permitiendo la salida de la molécula huésped desde el interior del dímero formado por las moléculas de  $\alpha$ -CD.

Estos resultados concuerdan con reportes recientes de nuestro grupo de investigación en los que, mediante RMN y modelamiento molecular, se revela la estructura básica de los CI conformados por un dímero de moléculas de  $\alpha$ -CD en una disposición cabeza-cabeza con los huéspedes alquílicos dentro de este dímero [13, 15, 51, 76]. Específicamente, se ha indicado que en solución el huésped OA en el CI de  $\alpha$ -CD/OA se ubica en una conformación mucho menos estirada que el huésped OT en el CI de  $\alpha$ -CD/OT, de manera que el grupo funcional  $-NH_2$  no interactúa con el grupo -

OH(6) de la molécula de  $\alpha$ -CD tal como ocurre en el caso de los huéspedes alquiltioles, sino que, lo hace con los protones -H(4) y -H(5) de una de las unidades de  $\alpha$ -CD [76].

Por lo tanto, se podría corroborar que en solución la limitada presencia de interacciones intermoleculares por puentes de hidrógeno entre el grupo  $-\text{NH}_2$  de los huéspedes alquilaminas y el grupo hidroxilo primario -OH(6) de la molécula de  $\alpha$ -CD podría disminuir la fuerza de las interacciones intermoleculares que permiten la asociación matriz-huésped, otorgando una menor estabilidad en solución para estos complejos.

Por otra parte, para los CI de  $\alpha$ -CD con moléculas huéspedes alquiltioles con una cadena hidrocarbonada entre 8 y 12 carbonos se podría establecer la siguiente disposición: el protón del grupo  $-\text{SH}$  se encuentra formando enlace por puente de hidrógeno con el grupo -OH(6) que se encuentra en el borde de la apertura menor de la primera unidad de  $\alpha$ -CD. Los protones pertenecientes al segmento mayoritario de la cadena alifática interaccionan mayoritariamente con los protones -H(3) y -H(5) que se encuentran en el interior de esta primera unidad de  $\alpha$ -CD y finalmente los protones del grupo  $-\text{CH}_3$  del extremo de la cadena alquílica interaccionan con el protón -H(3) que se encuentra al interior de una segunda unidad de  $\alpha$ -CD. Esta asignación es una evidencia de que el huésped se encuentra en una conformación estirada a lo largo del canal generado por las moléculas de  $\alpha$ -CD, tal como se aprecia en la Figura 3.2B.

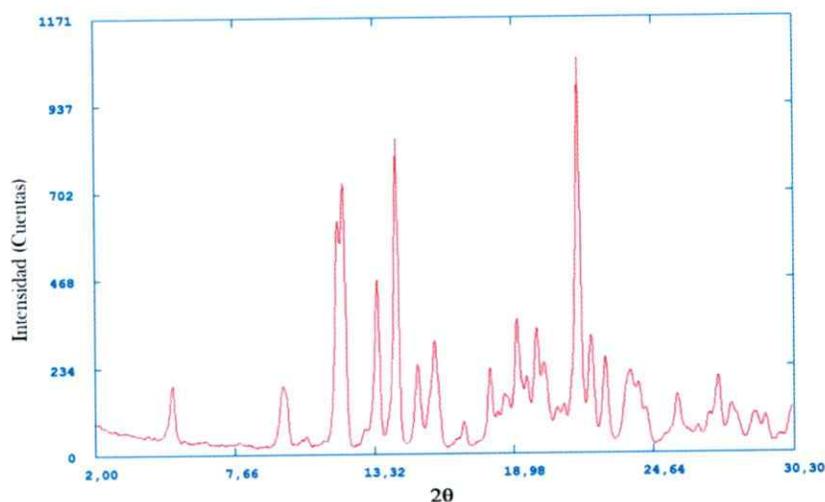


**Figura 3.2.** A) Esquema que muestra la disposición de los átomos que conforman una unidad de  $\alpha$ -glucopiranososa perteneciente a una molécula de  $\alpha$ -CD, B) Esquema aproximado de las unidades básicas de dímero para los diferentes CI donde se aprecian las disposiciones que adoptan las moléculas huésped de diferente tamaño dentro del canal de  $\alpha$ -CD.

### 3.2.2. Caracterización mediante DRX

Otra de las técnicas que ha contribuido enormemente a la elucidación estructural de los CI es la DRX de monocristal, revelando detalladamente el modo en que el huésped se encuentra en la cavidad de la matriz e identificando la naturaleza de las interacciones matriz-huésped y el rol estructural de las moléculas de agua. Sin embargo, la obtención de monocristales de CI es a menudo dificultosa, y cuando son obtenidos, la alta movilidad y agitación térmica de las moléculas huésped, incluso a baja temperatura, en algunas ocasiones impide una correcta determinación de los sitios específicos ocupados por las moléculas huésped en las cavidades de las moléculas de CD [78].

En cambio, en las síntesis de CI a menudo se obtienen precipitados microcristalinos, por lo que su caracterización mediante DRX de polvo (DRXP) en conjunto con otras técnicas puede permitir la identificación y caracterización rutinaria de los CI, basándose en resultados ya reportados de CI similares. La formación de los CI puede ser detectada mediante la aparición de nuevas intensidades en el difractograma de DRXP, las cuales se encuentran ausentes en el difractograma de la matriz y del huésped (para huéspedes sólidos). En este trabajo, los huéspedes utilizados en la formación de CI de  $\alpha$ -CD se encuentran en estado líquido, por lo que la cristalización de los CI depende del ordenamiento de la matriz. Los patrones de difracción pueden ser comparados con el patrón de difracción que presenta la  $\alpha$ -CD pura, la cual cristaliza en una estructura tipo caja y presenta intensidades características a los  $12,0^\circ$ ,  $14,4^\circ$  y  $21,7^\circ$  en  $2\theta$  [79, 80].



**Figura 3.3.** Patrón de difracción de  $\alpha$ -CD

Estudios mediante difracción de neutrones [81] y DRX de monocristal [15] de CI de  $\alpha$ -CD con moléculas huéspedes alquílicas, han mostrado una estructura básica tipo canal, constituida por un dímero de moléculas de  $\alpha$ -CD en cuyo interior se ubica una molécula huésped. En estas estructuras, las moléculas de agua juegan un importante rol en la formación de la estructura cristalina, las que interaccionan a través de puentes de hidrógeno con los grupos -OH de las moléculas de  $\alpha$ -CD, pudiendo concluirse en general, que los CI hidratados de  $\alpha$ -CD con huéspedes alquílicos presentan una estructura cristalina hexagonal [81].

Utilizando la información proporcionada anteriormente expuesta, se procedió a caracterizar los CI de  $\alpha$ -CD con huéspedes alquiltioles y alquilaminas mediante DRXP. Los parámetros de red de cada CI se muestran en la Tabla 3.4. Las reflexiones obtenidas fueron indexadas en base a un sistema cristalino hexagonal ( $\alpha = \beta = 90^\circ$  y  $\gamma = 120^\circ$ ). En la Figura 3.4, se muestra el patrón de difracción de polvo cristalino obtenido para el CI de  $\alpha$ -CD/DDT. La totalidad de los difractogramas se presentan en el Anexo II.

Tabla 3.4. Parámetros de red para los CI, según un sistema cristalino hexagonal

CI	a = b (Å)	c (Å)	2 $\theta$
$\alpha$ -CD/OT	23,68	15,82	0,05
$\alpha$ -CD/DT	24,14	15,47	0,2
$\alpha$ -CD/DDT	23,68	15,88	0,1
$\alpha$ -CD/OA	23,51	15,69	0,1
$\alpha$ -CD/DA	23,48	15,74	0,2
$\alpha$ -CD/DDA	23,57	15,64	0,05

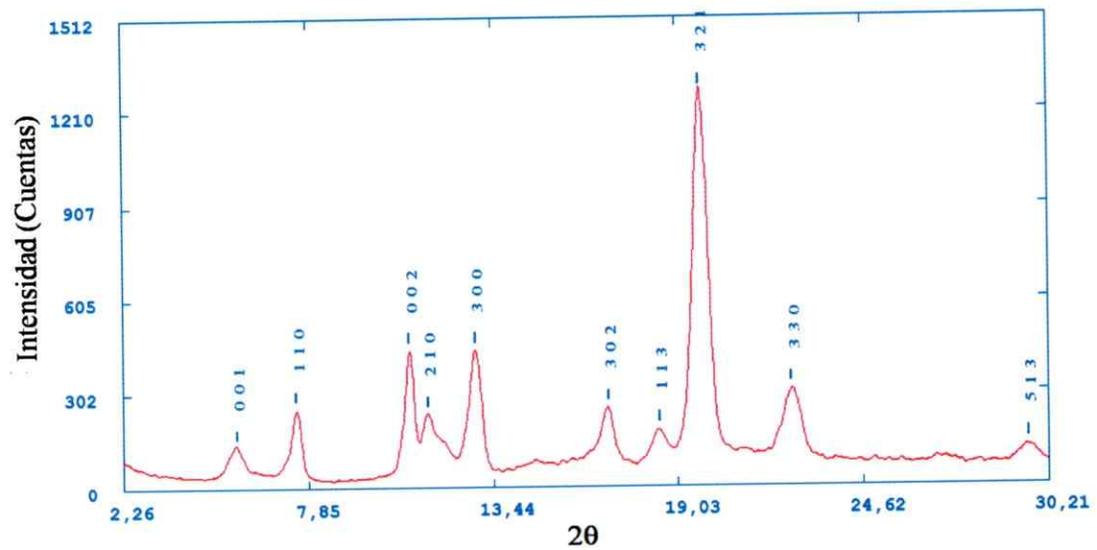


Figura 3.4. Análisis de DRXP del CI de  $\alpha$ -CD/DDT.

Tabla 3.5. Reflexiones indexadas para el CI de  $\alpha$ -CD/DDT.

h k l	$d_{\text{exp}}$ (Å)	$d_{\text{calc}}$ (Å)	Intensidad norm.(%)
0 0 1	15,5434	15,87999	9,01640712
1 1 0	11,80621	11,84	18,3958406
0 0 2	8,08592	7,94	32,778362
2 1 0	7,69971	7,7511	16,2076678
3 0 0	6,86572	6,83583	32,4654082
0 0 3	5,24664	5,29333	15,269641
1 1 3	4,79582	4,83238	8,70345334
3 2 1	4,4947	4,51093	100
3 3 0	3,95067	3,94667	19,3338674
5 1 3	3,01656	3,02335	5,2642999

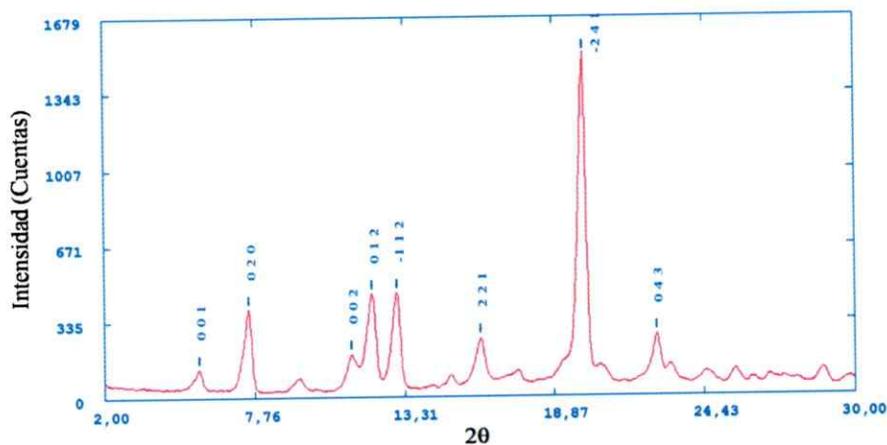
En la Tabla 3.5, se aprecian las reflexiones indexadas para el difractograma del CI de  $\alpha$ -CD/DDT donde la intensidad máxima se encuentra aproximadamente a los  $20^\circ$  en  $2\theta$ . La totalidad de los patrones de difracción presentan esta intensidad característica la cual corresponde a un ordenamiento tipo canal de las moléculas de  $\alpha$ -CD [80]. Así, la máxima intensidad ubicada en  $20^\circ$  en  $2\theta$  revela la formación de los CI con la desaparición de las intensidades máximas características que presenta la  $\alpha$ -CD pura.

Las distancias para el eje c en todos los CI se encuentran entre 15 y 16 Å, lo que coincide con la distancia aproximada correspondiente a dos unidades de  $\alpha$ -CD revelando la unidad mínima de los CI y su directa relación con la estructura cristalina. Así, las moléculas de  $\alpha$ -CD se apilan formando columnas infinitas creciendo en la dirección {001}.

De los CI estudiados fue posible obtener cristales bien definidos del CI  $\alpha$ -CD/OT, los cuales en primera instancia, fueron analizados mediante DRX de monocristal. Los datos arrojados indicaron que el sistema cristalino del CI de  $\alpha$ -CD/OT correspondía a una celda monoclinica P2 con parámetros de red;  $a = 14,037 \text{ \AA}$ ,  $b = 23,96 \text{ \AA}$ ,  $c = 15,65 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 90^\circ$ ,  $\beta = 95.19^\circ$ ,  $\gamma = 90^\circ$  y un volumen de  $5243 \text{ \AA}^3$ . La resolución cristalográfica de su estructura no se obtuvo de manera satisfactoria debido probablemente, al alto grado de desorden de las densidades electrónicas encontradas, lo que imposibilitó aclarar las posiciones atómicas a pesar de que se logró realizar este análisis a baja temperatura (100K).

En una segunda asignación, se estimó que el patrón de difracción también podría corresponder a un sistema cristalino triclinico P1 con los siguientes parámetros de red;  $a = 13,8045 \text{ \AA}$ ,  $b = 13,8406 \text{ \AA}$ ,  $c = 15,6534 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 92,978^\circ$ ,  $\beta = 91,780^\circ$ ,  $\gamma = 119,443^\circ$  y un volumen de  $2642 \text{ \AA}^3$ .

La ambigüedad de los resultados podría indicar una mezcla de fases o la tenencia de maclas cristalinas y no de monocristales. Por lo tanto, para la elección del sistema cristalino más apropiado los parámetros arrojados, tanto para el sistema monoclinico como para el triclinico, fueron utilizados en la indexación del patrón de DRXP para el CI de  $\alpha$ -CD/OT, tal como se muestra en las Figuras 3.5 y 3.6. Un resumen de los datos cristalográficos se puede apreciar en la Tabla 3.6.



**Figura 3.5.** Difractograma de polvo del CI de  $\alpha$ -CD/OT, indexado según un sistema monoclinico.

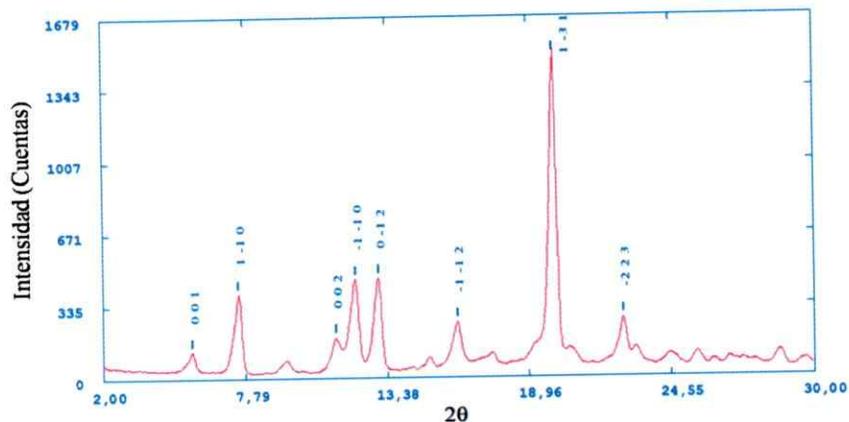


Figura 3.6. Análisis de DRX de polvo del CI de  $\alpha$ -CD/OT, indexado según un sistema triclinico.

Tabla 3.6. Datos cristalográficos para el CI  $\alpha$ -CD/OT indexado según un sistema monoclinico y un sistema triclinico

Compuesto de inclusión	$\alpha$ -CD/OT	$\alpha$ -CD/OT
Fórmula empírica (sin moléculas de H <sub>2</sub> O)	2 (C <sub>36</sub> H <sub>60</sub> O <sub>30</sub> ) 1(C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> S)	2 (C <sub>36</sub> H <sub>60</sub> O <sub>30</sub> ) 1(C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> S)
Peso molecular (g/mol)(sin H <sub>2</sub> O)	2091.97	2091.97
Temperatura (K)	100	100
$\lambda$ (Å)	0,71073	0,71073
Sistema cristalino	monoclinico	Triclinico
Grupo espacial probable	P2	P1
Cristal: color y forma	Incoloro, paralelepípedo	Incoloro, paralelepípedo
a (Å)	14,037	13,8045
b (Å)	23,96	13,8406
c (Å)	15,65	15,6534
$\alpha$ (°)	90	92,978
$\beta$ (°)	95,19	91,780
$\gamma$ (°)	90	119,443
V (Å <sup>3</sup> )	5243	2642
Rango $\theta$ para colección de datos (°)	2 a 30	2 a 30
R factor	0,00376	0,00162

Según los valores para R-factor calculados luego del refinamiento de las estructuras, el sistema cristalino que posee una menor magnitud de este valor corresponde al sistema cristalino triclinico con un R-factor = 0,00162, por lo que podría considerarse como el sistema más apropiado a pesar de que posee una menor simetría cristalina que el sistema monoclinico. Además, en base a resultados ya reportados el sistema cristalino triclinico P1 se ha obtenido con frecuencia para CI de  $\alpha$ -CD con huéspedes alquílicos en la que, el dímero matrices de  $\alpha$ -CD se encuentran en una orientación cabeza-cabeza [79]. Tal es el caso del CI de  $\alpha$ -CD con ácido decanoico [15] y el CI de  $\alpha$ -CD con butiltiocianato [82] en los que se revela una estructura tipo canal gobernada por la matriz donde la adsorción de moléculas de agua, que interactúan con los grupos -OH de las CD entre cada dímero y entre los canales de CD, juega un rol fundamental en la distorsión presentada por los canales de CD, su empaquetamiento cristalino y la estabilidad de la estructura de los complejos.

Posteriormente, se logró establecer que los cristales de  $\alpha$ -CD/OT analizados no eran monocristales propiamente tal, sino que correspondían a maclas, dificultando la correcta asignación a un sistema cristalino y su resolución estructural, incluso a baja temperatura. La existencia de maclas de microcristales del CI fue demostrada mediante la nanodecoración selectiva de un plano preferencial de estos cristales, como se detallará en el Capítulo 5.

# **CAPÍTULO 4**

## **Resultados y Discusiones**

“Obtención y Caracterización de Nanopartículas de Níquel  
y Cobalto adheridas a Compuestos de Inclusión de  
 $\alpha$ -Ciclodextrina con Alquiltioles y Alquilaminas”

#### **4.1. Preparación de nanopartículas de níquel y cobalto, adheridas a compuestos de inclusión de $\alpha$ -ciclodextrina, mediante pulverización catódica**

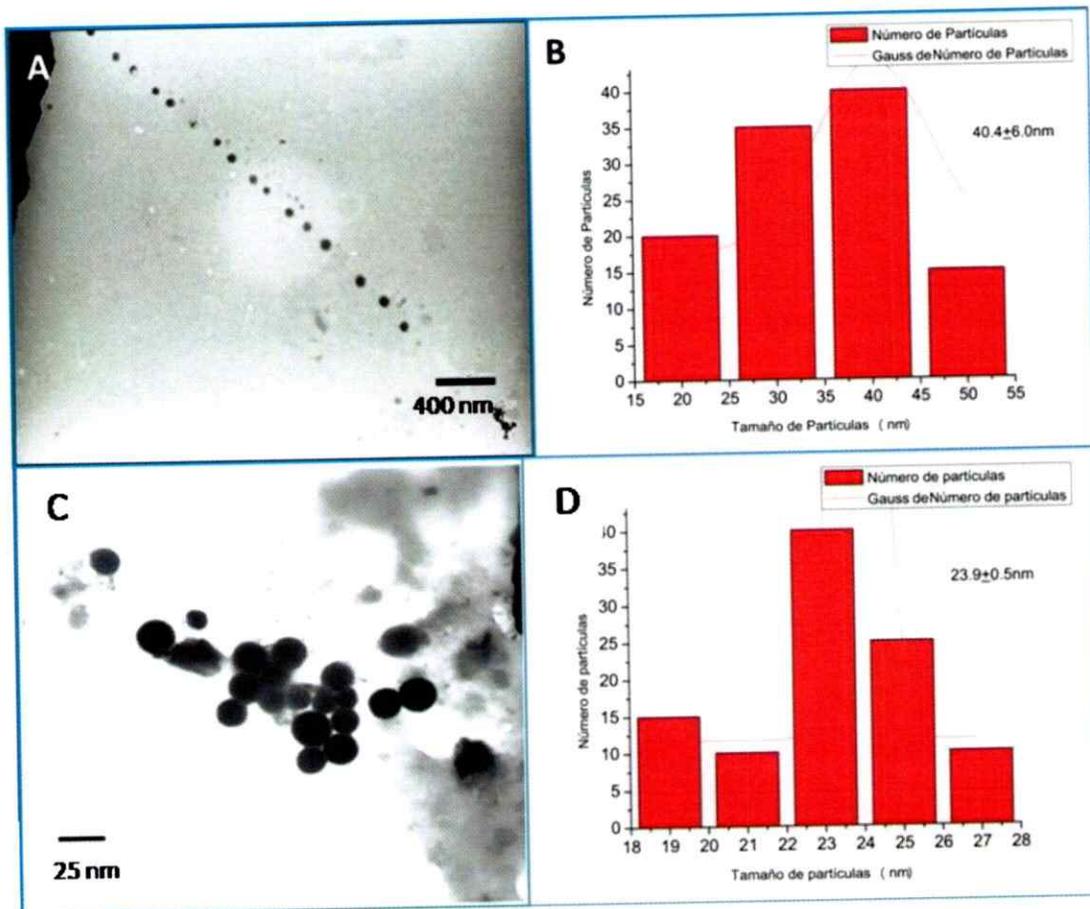
Existen limitados reportes de fabricación de nanopartículas de Ni, Co mediante PCV. Recientemente, Walia y col., han reportado la preparación de nanocompositos formados por películas delgadas de  $\text{SiO}_2$  cubiertas por NPsCo preparadas mediante PCV RF/DC, con expectativas en la elaboración de dispositivos electrónicos [83]. Por otro lado, Peng y col. también han reportado la preparación de NPsNi después de la calcinación de una fina capa de NiO depositada sobre  $\text{SiO}_2$  [84]. Sin embargo, no existen reportes de NPsNi o NPsCo adheridas a cristales orgánicos.

En este apartado se detallarán los resultados obtenidos en la preparación de NPsNi y NPsCo sobre cristales de CI de  $\alpha$ -Cdconalquiltioles y alquilaminas como huéspedes, mediante el método de PCV. La inmediata coloración gris (NPsCo) y marrón (NPsNi) de los cristales incoloros de CI de  $\alpha$ -CD después de realizado el depósito por PCV, indicó que el depósito fue efectivo.

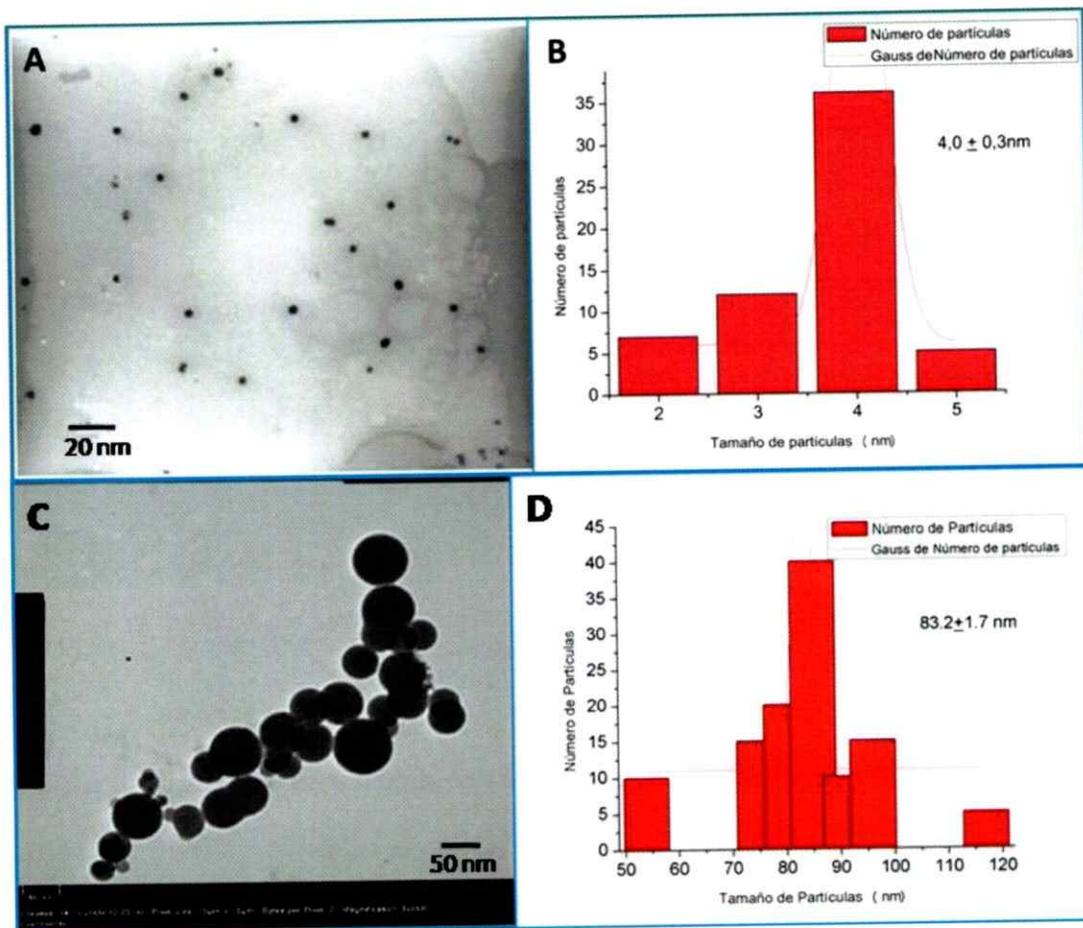
#### **4.2. Caracterización de NPsNi y NPsCo mediante microscopía electrónica de transmisión**

A través de TEM y HRTEM se consiguió determinar la presencia de NPsNi y NPsCo en cuatro de los CI de  $\alpha$ -CD (*vide infra*).

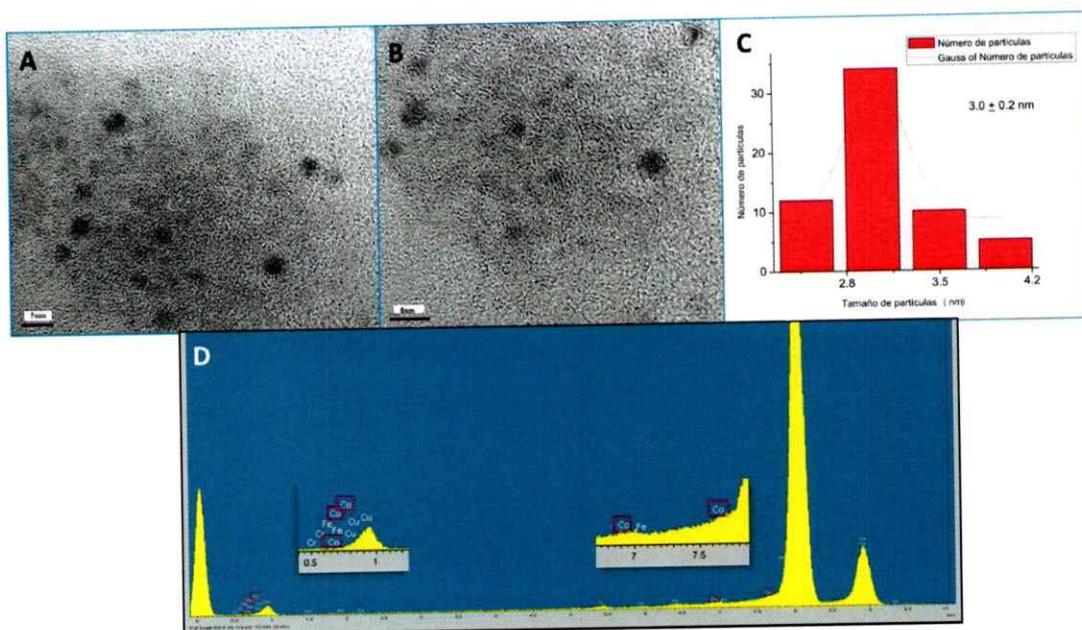
En las siguientes imágenes se muestran los resultados obtenidos al utilizar 20 mA de corriente y tiempos de exposición entre 50 y 120 s en el equipo de PCV (Figuras 4.1-4.3).



**Figura 4.1.** A) Micrografía TEM de NPsNi preparadas en el CI de  $\alpha$ -CD/OA (50 s de depósito), B) Histograma de dispersión de tamaño para NPsNi-  $\alpha$ -CD/OA (n=100), C) Imagen TEM de NPsNi de  $23,9 \pm 0,5$  nm de diámetro, obtenidas sobre el CI de  $\alpha$ -CD/DDA durante 50s de exposición y D) Histograma respectivo (n=100).



**Figura 4.2.** A) Micrografía TEM de NPs<sub>Co</sub> obtenidas en el CI de  $\alpha$ -CD/OT durante 60s de depósito B) Histograma de dispersión de tamaño para NPs<sub>Co</sub>-  $\alpha$ -CD/OT (n=100), C) Micrografía TEM de NPs<sub>Co</sub> obtenidas en el CI de  $\alpha$ -CD/DT después de 120s de exposición. D) Histograma que muestra una distribución de tamaño de  $83,2 \pm 1,7$  nm para estas NPs (n=100).



**Figura 4.3.** A) y B) Micrografías HRTEM de NPsCo obtenidas sobre el CI de  $\alpha$ -CD/DT a 60s, C) Histograma de dispersión de tamaño y D) Análisis EDX donde se detecta la presencia de Co perteneciente a las NPsCo ( $K_{\alpha 1} = 6,930$  keV y  $K_{\beta 1} = 7,649$  keV). La presencia de Fe y Cr podrían atribuirse a algunas contaminaciones provocadas por el equipo (material de composición del detector).

Una compilación de todos los resultados obtenidos se aprecia en la Tabla 4.1.

**Tabla 4.1.** Resumen de resultados obtenidos por análisis TEM de NPsNi y NPsCo.

NPsNi	CI utilizado	Tiempo de depósito (s)	Diámetro de NPs (nm)
	$\alpha$ -CD/OA	50	$40,4 \pm 6,0$
	$\alpha$ -CD/DDA	50	$23,9 \pm 0,5$
NPsCo	CI utilizado	Tiempo de depósito (s)	Diámetro de NPs (nm)
	$\alpha$ -CD/OT	60	$4,0 \pm 0,3$
	$\alpha$ -CD/DT	60	$3,0 \pm 0,2$
		120	$83,2 \pm 1,7$

Si bien, la observación de partículas no se consiguió en la totalidad de los CI de  $\alpha$ -CD utilizados, se destaca la exclusiva detección de NPsNi sobre CI que poseen alquilaminas como moléculas huéspedes. Por otra parte, NPsCo fueron visualizadas mediante microscopía electrónica sólo en los CI de  $\alpha$ -CD con moléculas huésped alquiltioles. Estos resultados previos pueden ser fundamentados en el principio de ácidos y bases duras y blandas de Pearson, el cual indica que “un ácido duro se une a una base dura y un ácido blando se une a una base blanda” [85], ya que el grupo  $-\text{NH}_2$  es clasificado como una base dura y el grupo  $-\text{SH}$  corresponde a una base blanda; a su vez, los metales Co y Ni son clasificados como ácidos intermedios donde, el metal Co posee un mayor carácter de blandura con respecto al Ni [85]. Esto indicaría que a pesar de que los metales Ni y Co pueden unirse covalentemente a grupos como;  $-\text{SH}$ ,  $-\text{NH}_2$  o  $-\text{COOH}$ , por su carácter de ácidos intermedios, la unión entre el grupo  $-\text{SH}$  y Co estaría favorecida, debido al mayor carácter blando del Co en comparación con Ni.

En cuanto a los tamaños de las partículas obtenidas, se establece que no existe un diámetro similar entre las NPsNi formadas luego de 50 s de exposición al depósito del metal sobre los CI de  $\alpha$ -CD/OA y  $\alpha$ -CD/DDA, debido probablemente, a la disposición azarosa en cada remoción de los cristales, realizada antes de comenzar cada depósito de 10s (en este caso realizada 5 veces, ver Capítulo 2, sección 2.2.2.1).

Por otro lado, NPsCo adheridas al CI de  $\alpha$ -CD/DT presentaron un tamaño de 3 nm y 84 nm de diámetro cuando se utilizaron tiempos de pulverización del metal de 60 s y 120 s, respectivamente. Este resultado sería indicativo de que mientras mayor sea el tiempo de depósito del metal, mayor será el tamaño de las NPs obtenidas sobre los CI.

No obstante, las NPs obtenidas presentan una gran dispersión de tamaño cuando se realizaron tiempos similares de exposición de los metales sobre los sustratos supramoleculares, por lo que fue necesario modificar las condiciones de obtención para lograr una menor dispersión de tamaño.

#### 4.3. Optimización de la síntesis de NPsNi y NPsCo mediante el método de PCV

Basándose en el mismo principio para la formación de películas delgadas mediante pulverización catódica, parámetros como; la presión del gas inerte, la corriente o potencia utilizada en el equipo, el tiempo de depósito o la distancia entre el blanco y el sustrato, pueden ser modificados para la obtención de materiales nanoestructurados [47, 86]. En el proceso, las partículas se generan en fase gaseosa debido a las colisiones entre los átomos del material precursor (blanco metálico), por lo tanto, el proceso de formación de NPs puede ser favorecido, ya sea aumentando la distancia entre el blanco y el sustrato o disminuyendo el recorrido libre medio de los átomos, el cual se define como:

$$l = \frac{k_B \times T}{\sqrt{2} \pi d^2 P} \quad (10)$$

Donde,

$k_B$  = constante de Boltzmann,

T = temperatura,

P = presión, y

d = diámetro atómico del metal pulverizado.

Según la Ecuación (10), un aumento en la presión puede promover la formación de NPs, ya que a presiones más altas se incrementa la densidad del plasma en la región cercana al blanco y se obtiene la termalización del plasma, los cuales son procesos necesarios para que ocurra la sobresaturación y la nucleación de los *clústers* [87]. Por ejemplo, Pearson y Edelstein han reportado la preparación de NPs de Silicio entre 5 y 13nm, indicando que generalmente el proceso de formación de NPs se ve favorecido a altas presiones de Ar y a mayores distancias entre el blanco y el sustrato [88]. Ashanithi y col., también han informado que a mayores distancias entre el blanco y el sustrato, manteniendo constantes parámetros como el tiempo de depósito y la corriente utilizada, se obtienen NPs con una forma y dispersión de tamaño más homogénea [47].

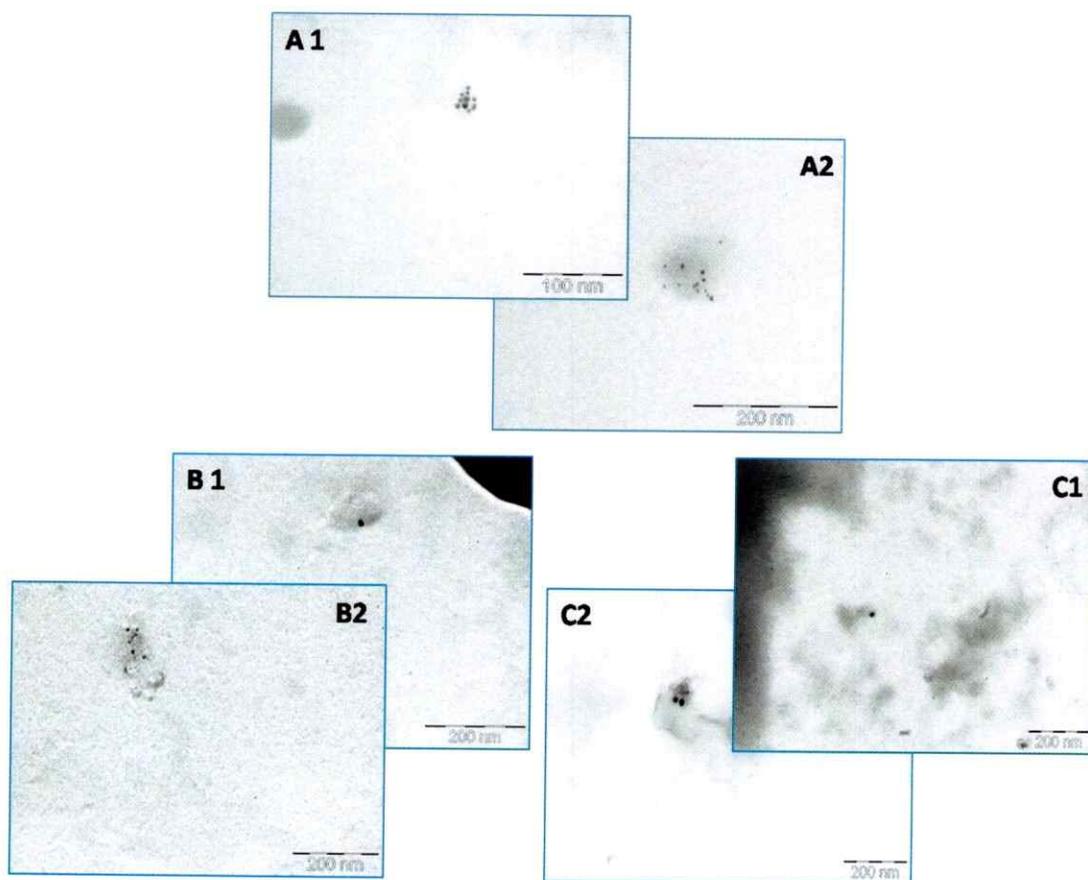
Por otro lado, Reznickova y col., evaluaron el depósito de NPs<sub>Au</sub> a diferentes tiempos de depósito y corrientes de descarga, concluyendo que un incremento en estos parámetros provoca un aumento en el tamaño de las NPs obtenidas [89].

Por lo tanto, un ajuste adecuado de los parámetros puede jugar un rol fundamental en la obtención de las NPs deseadas. Con el fin de optimizar el proceso de obtención de las NPs<sub>Ni</sub> y NPs<sub>Co</sub>, su preparación fue modificada de la siguiente manera:

- i. La corriente de descarga se incrementó desde 20 mA (4,4 W) a 25 mA (5,5 W),
- ii. la separación entre el blanco (lámina de metal pulverizada) y el sustrato supramolecular se aumentó de 3 a 4 cm,
- iii. los tiempos de depósito fueron aumentados a 120 y 240 s, y
- iv. los sustratos supramoleculares no fueron removidos dentro de la cámara cada 10 s para evitar que el metal fuera depositado donde ya existía la formación de NPs y de esta manera conseguir una dispersión de tamaño más homogéneo de las mismas.

#### **4.4. Caracterización de NPsNi y NPsCo obtenidas bajo las nuevas condiciones mediante PCV**

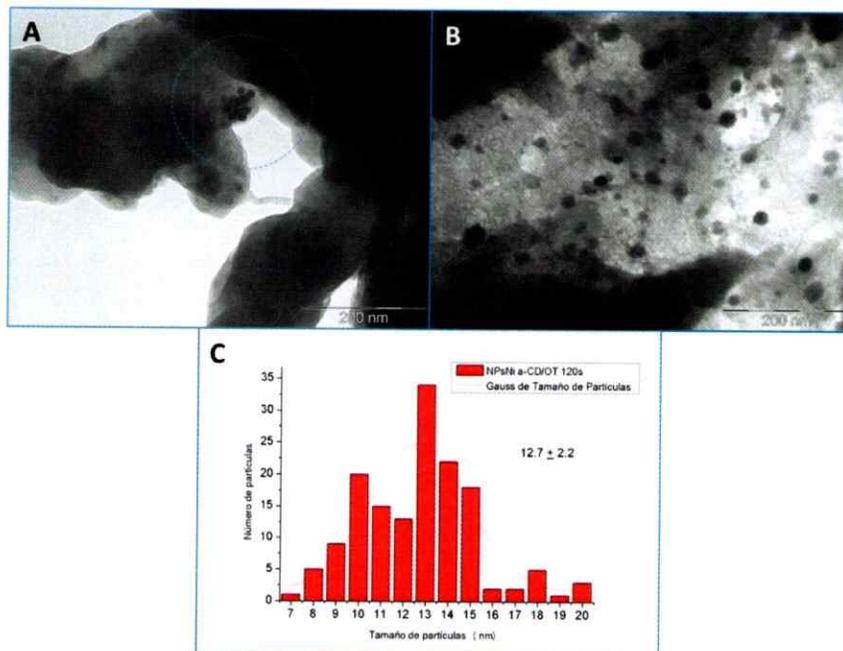
Utilizando estas nuevas condiciones se lograron obtener NPsNi y NPsCo adheridas a la mayoría de los CI de  $\alpha$ -CD. En las Figuras 4.4 - 4.13 se muestran a continuación los resultados de caracterización principalmente mediante TEM y HR-TEM de las NPs.



**Figura 4.4.** A1) y A2) Imágenes TEM de NPsNi sintetizadas sobre el CI de  $\alpha$ -CD/DA durante 120s de exposición. El tamaño de las partículas es de aproximadamente 5 nm de diámetro. Las imágenes TEM B1) y B2) muestran NPsNi de aproximadamente 7 nm, formadas sobre el CI de  $\alpha$ -CD/DDA durante 120s. Las imágenes C1) y C2) corresponden a micrograafias TEM de NPsNi de aproximadamente 13 nm preparadas sobre el CI de  $\alpha$ -CD/DDA durante 240s.

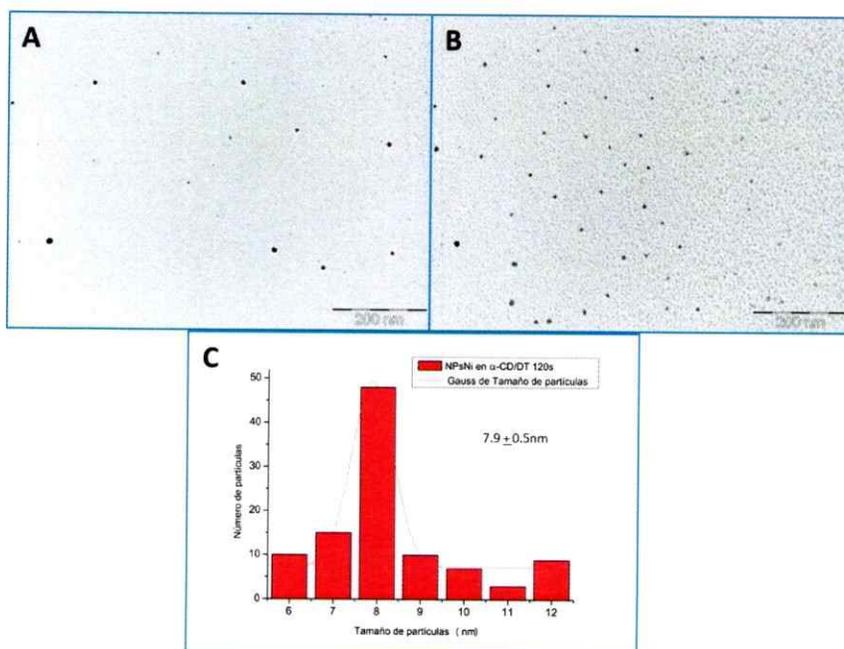
Las imágenes de la Figura 4.4 dan cuenta de una limitada visualización de las NPsNi, sin embargo los tamaños observados son homogéneos y muestran una dependencia con el tiempo de depósito realizado mediante PCV.

El alto contenido orgánico de las muestras dificulta la apreciación de las NPs, pero éstas son mayoritariamente encontradas insertas en el material orgánico pertenecientes a los CI, tal como se detecta en la Figura 4.5.

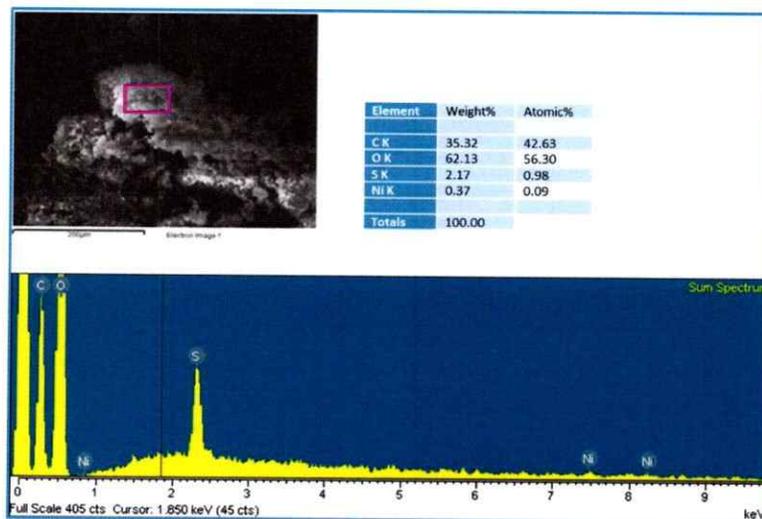


**Figura 4.5.** A) y B) Micrografías TEM de NPsNi obtenidas en el CI de  $\alpha$ -CD/OT durante 120s y C) histograma correspondiente que arroja un diámetro promedio de  $12,7 \pm 2,2$  nm, pero también una distribución máxima a los 10 nm.

Sin embargo, se apreció una dispersión homogénea de NPsNi sobre el CI de  $\alpha$ -CD/DT, probablemente debido a la mejor solubilización del CI en el medio acuoso utilizado en la preparación de las muestras para microscopía (ver Figura 4.6).



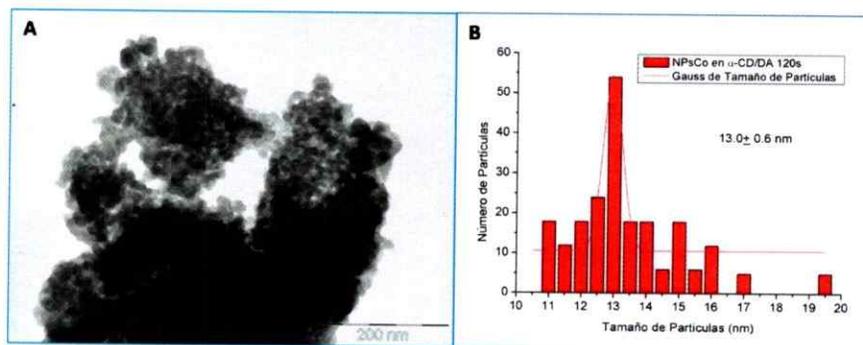
**Figura 4.6.** A) y B) Imágenes TEM de NPsNi obtenidas sobre el CI de  $\alpha$ -CD/DT y C) gráfico de distribución de tamaño que muestra un diámetro de  $7,9 \pm 0,5$  nm.



**Figura 4.7.** Análisis de EDX realizado en una zona del CI de  $\alpha$ -CD/DT donde se encuentran las NPsNi.

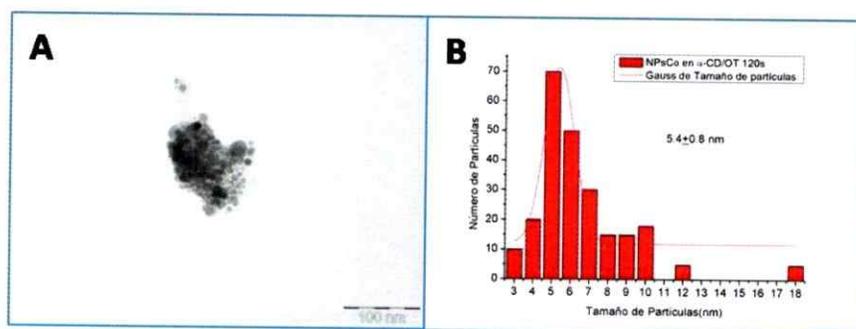
En el análisis mediante EDX de la Figura 4.7, se aprecia la presencia de C y O pertenecientes al CI de naturaleza orgánica. El alto porcentaje de S perteneciente al grupo -SH del huésped, indica la ubicación en el plano {001}, confirmando que la presencia de NPsNi se encuentra en ese plano cristalino [77]. La presencia de Ni perteneciente a las NPsNi es confirmada mediante su detección en las energías de ionización características  $K_{\alpha 1} = 7,6398 \text{ eV}$  y  $K_{\beta 1} = 8,264 \text{ eV}$ .

En los resultados anteriores no se reportaron resultados favorables para la visualización de NPsCo en CI de  $\alpha$ -CD y alquilaminas. Utilizando las nuevas condiciones, fue posible caracterizar NPsCo en el CI de  $\alpha$ -CD/DA, tal como se muestra en la Figura 4.8.

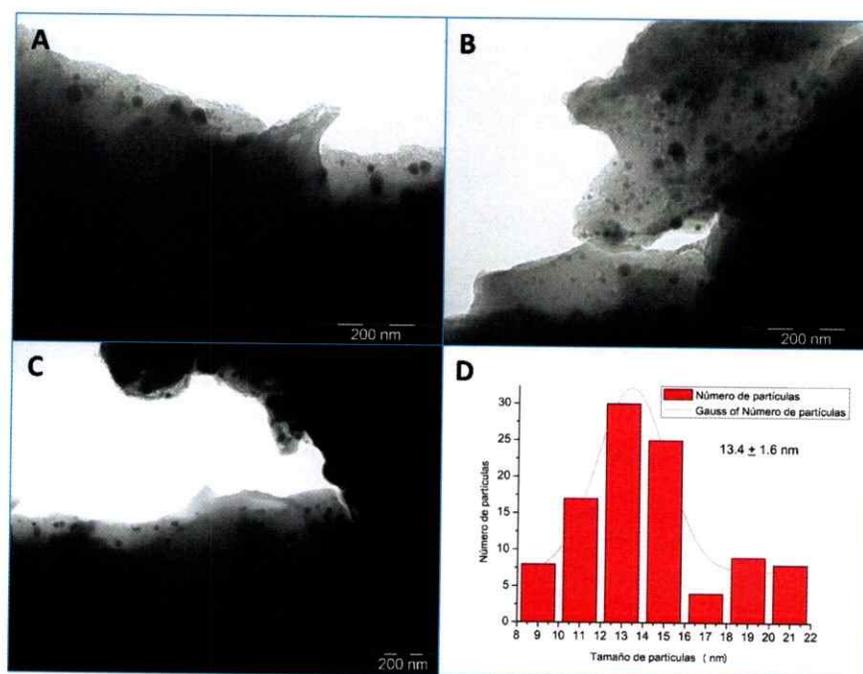


**Figura 4.8.** A) Imagen TEM de NPsCo obtenidas luego de 120s de depósito sobre el CI de  $\alpha$ -CD/DA y B) Histograma de distribución de tamaño muestra un diámetro de  $13,0 \pm 0,6 \text{ nm}$ .

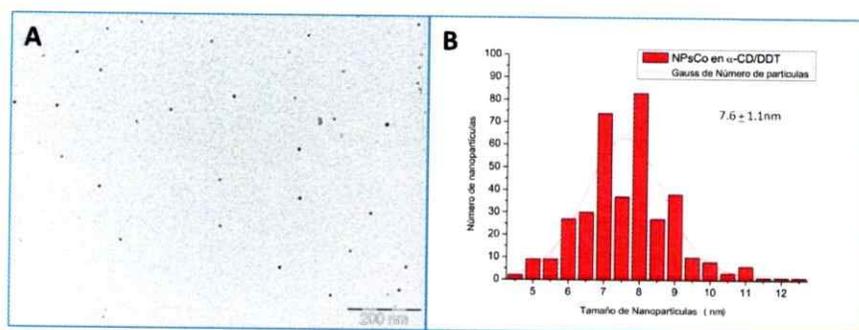
Las NPsCo fueron encontradas mayoritariamente en CI de  $\alpha$ -CD con huéspedes alquiltioles. Los resultados son apreciados en las Figuras 4.9, 4.10 y 4.11.



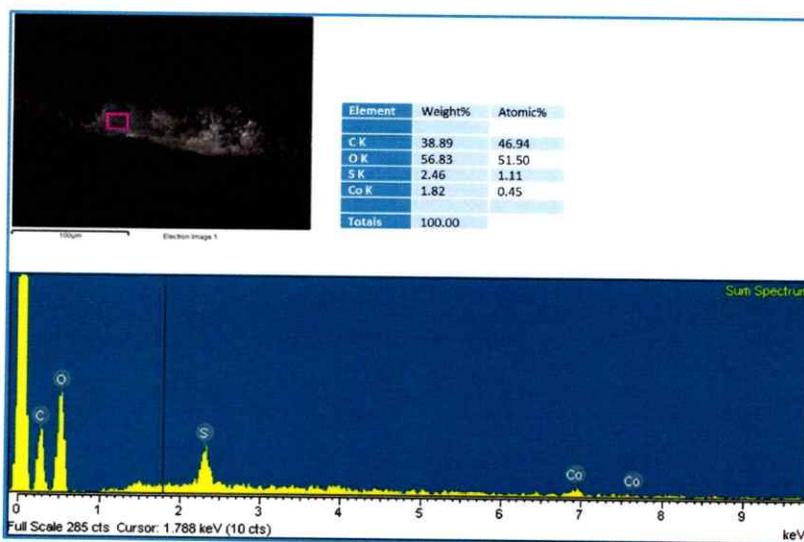
**Figura 4.9.** Micrografía TEM de NPsCo formadas sobre el CI de  $\alpha$ -CD/OT después de 120s de exposición en el equipo de PCV (A) y que poseen una diámetro de  $5,4 \pm 0,8$ nm (B).



**Figura 4.10.** A), B) y C) Imágenes TEM de NPsCo obtenidas en el CI de  $\alpha$ -CD/OT luego de 240s de exposición. D) histograma respectivo que muestra un tamaño de  $13,4 \pm 1,6$  nm de diámetro.



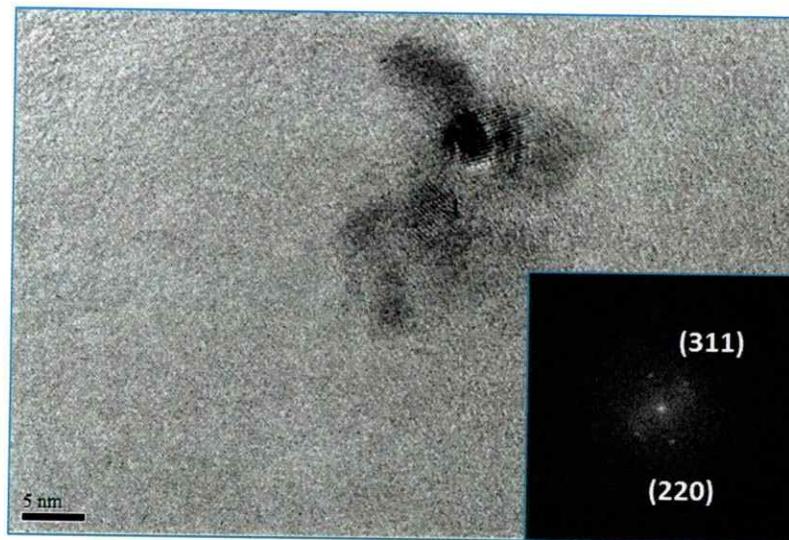
**Figura 4.11.** Imagen A) corresponde a una micrografía TEM de NPsCo obtenidas luego de 120s de exposición del CI de  $\alpha$ -CD/DDT y B) histograma de dispersión de tamaño que muestra un diámetro de  $7,6 \pm 1,1$  nm.



**Figura 4.12.** Imagen SEM y análisis EDX realizado sobre las NPsCo adheridas al CI de  $\alpha$ -CD/DDT.

En la Figura 4.12, se observa en análisis EDX capturado por un detector incorporado en el equipo de microscopía SEM. Nuevamente se detecta la presencia de C

y O perteneciente al CI y el alto porcentaje de S perteneciente al grupo -SH del huésped DDT, indica que las NPsCo se encuentran adheridas al plano cristalino  $\{001\}$ [77]. La detección de Co corresponde a las NPsCo sobre la superficie ( $K_{\alpha 1} = 6,930$  keV y  $K_{\beta 1} = 7,649$  keV).



**Figura 4.13.** Micrografía de HRTEM de las NPsCo e inserto la difracción de electrones.

El patrón de difracción de electrones inserto en la Figura 4.13, corresponde a la simulación obtenida a través del programa Digital Micrograph sobre la imagen de microscopía de alta resolución. Los espaciados revelados en el patrón de Morié de estas partículas se pueden apreciar en la Tabla 4.2.

**Tabla 4.2.** Datos de la simulación de difracción de electrones para las NPsCo.

Spot#	d- espaciado (nm)	Rec. Pos. (1/nm)	Grados al Spot 1	Grados al eje x	Amplitud	h k l
1	0,2437	3,128	0,00	109,06	238608,81	311
2	0,2860	3,128	60,82	48,24	181265,24	220
3	0,2432	3,155	179,68	-70,62	238608,81	311
4	0,2858	3,176	117,93	-133,02	171268,46	200

Los espaciados corresponden a los planos cristalográficos (311) y (220) pertenecientes a la estructura cristalina cúbica del óxido de cobalto (II, III) ( $\text{Co}_3\text{O}_4$ ) revelando así la naturaleza de óxidos de estas NPs [90].

En cuanto a la caracterización de NPsNi, no fue posible obtener imágenes de HRTEM para realizar su patrón de difracción simulado, debido al alto contenido orgánico de las muestras. Sin embargo, se presume que estas partículas también corresponderían a óxidos del metal debido a su naturaleza altamente oxidable y su tamaño nanométrico. Gen y col., han comprobado la rápida oxidación de estos nanomateriales, producidos mediante pulverización catódica debida a que, al disminuir el tamaño de grano del Ni depositado, existe una mayor disponibilidad de estos bordes como sitios de oxidación [91].

En la Tabla 4.3 se detalla un resumen que incluye los resultados de nanopartículas de óxidos de níquel (NPsONi) y nanopartículas de óxidos de cobalto (NPOCo) obtenidas.

**Tabla 4.3.** Resumen de resultados para NPsONi y NPsOCO en las nuevas condiciones.

<b>NPsONi</b>	<b>CI utilizado</b>	<b>Tiempo de depósito (s)</b>	<b>Diámetro de NPs (nm)</b>
	$\alpha$ -CD/OT	120	$12,7 \pm 2,2$
	$\alpha$ -CD/DT	120	$7,9 \pm 0,5$
	$\alpha$ -CD/DA	120	$\sim 5$
	$\alpha$ -CD/DDA	120	$\sim 7$
		240	$\sim 13$
<b>NPsOCO</b>	<b>CI utilizado</b>	<b>Tiempo de depósito (s)</b>	<b>Diámetro de NPs (nm)</b>
	$\alpha$ -CD/OT	120	$5,4 \pm 0,8$
		240	$13,4 \pm 1,6$
	$\alpha$ -CD/DDT	120	$7,6 \pm 1,1$
	$\alpha$ -CD/DA	120	$13,0 \pm 0,6$

Debido a la baja cantidad de NPs observadas por TEM no fue posible realizar un histograma de dispersión del tamaño para todos los casos (ver Figuras 4.4). Sin embargo, los tamaños fueron igualmente comparados.

En general, la escasa visualización de partículas podría tener relación con la modificación de los parámetros utilizados, ya que algunos autores revelan que la variación de la potencia puede dar lugar a una competencia entre los efectos resultantes [86]. Por un lado, el uso de una energía más alta genera más átomos en el plasma, potenciando la sobresaturación. Por otro lado, el uso de una energía más alta puede elevar la temperatura del plasma, lo que dificulta la termalización [88].

Además, al aumentar la distancia entre el blanco y el sustrato se favorece la termalización a presiones más bajas, pero la presión debe ser lo suficientemente alta para

favorecer la sobresaturación y proporcionar una densidad suficiente de núcleos para que se produzca la formación de NPs [87].

A pesar de que las partículas no se visualizaron en todos los CI utilizados en la síntesis, las NPsCo se observaron mayoritariamente en los CI formados por  $\alpha$ -CD con alquiltioles debido al mayor carácter de ácido blando del metal Co comparado con Ni, tal como ya había sido mencionado. Las NPsNi también fueron apreciadas en CI de  $\alpha$ -CD con alquiltioles, comprobando así su naturaleza de ácidos intermedios.

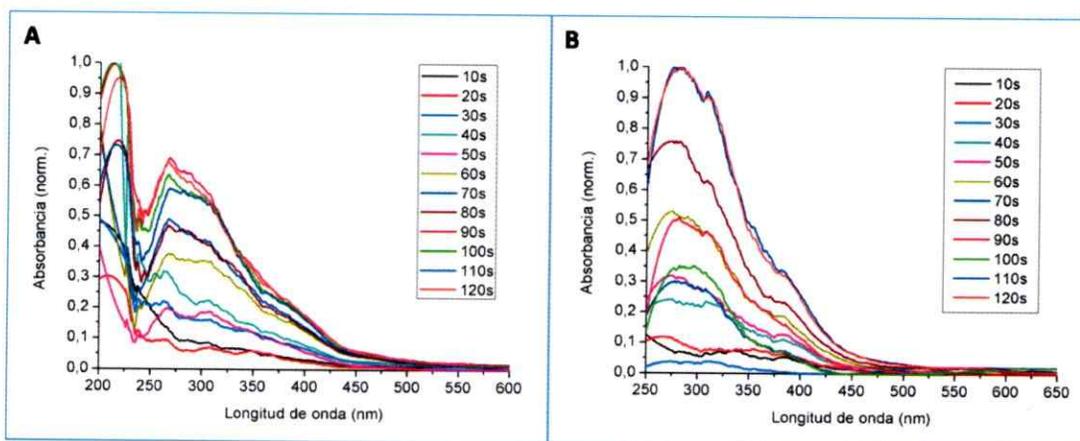
En la tabla 4.3 se puede apreciar una menor dispersión en los tamaños de NPsNi y NPsCo obtenidas. Al emplear tiempos de exposición de 120s y 240s sobre los sustratos supramoleculares, se registraron tamaños que van desde los 5 hasta los 13 nm de diámetro aproximadamente. La diferencia de tamaño entre partículas obtenidas luego de 120s y 240s de depósito de los metales en un mismo CI fue de casi el doble, demostrando que existe una estrecha relación entre el tiempo de depósito y el diámetro final que tendrán las NPs.

#### **4.5. Caracterización mediante espectroscopía UV-visible de NPsONi y NPsOCO adheridas a los compuestos de inclusión**

Debido a que las partículas grandes dispersan más la luz que las partículas pequeñas, cuando una radiación electromagnética incide sobre las NPs, el efecto que predomina es el de absorción por sobre la dispersión de la luz, por lo tanto el espectro de extinción puede denominarse sencillamente como espectro de absorción [29].

Las propiedades ópticas que presentan las NPs adheridas a la superficie cristalina de los CI, fueron caracterizadas mediante espectroscopía UV-visible en estado sólido.

Mediante espectroscopía de reflectancia difusa se realizó un seguimiento de la absorción que presentaron las partículas a medida que aumentaba el tiempo de depósito del metal sobre los CI desde 10 hasta 120s, tal como se muestra en la Figura 4.14, el cual es representativo de la formación de partículas sobre todos los CI utilizados en la síntesis. Los gráficos fueron normalizados debido a la baja intensidad de la absorción por el método utilizado.



**Figura 4.14.** Seguimiento del espectro de absorción UV-visible a medida que aumenta el tiempo de deposición sobre el sustrato, para NPsONi (A) y NPsOCO (B)

Estos resultados concuerdan con los cálculos teóricos realizados por Creighton y col., utilizando la aproximación dipolar de la ecuación de Mie, en el cual se deduce que para la mayoría de los metales de transición, excepto Cu, Ag y Au, los valores de la función dieléctrica se encuentran lejos de ser negativos para  $\epsilon_1$  y adquieren valores

positivos para  $\epsilon_2$ , por lo tanto la absorción máxima se presenta en las cercanías de los 200 nm de longitud de onda. Como consecuencia, aunque los espectros de estos metales muestran un fuerte incremento en la absorción a longitudes de onda muy cortas, el espectro de absorción en el rango visible es una curva bastante plana y sin rasgos distintivos (comparada con la intensidad en la absorción que presentan los coloides de Au, por ejemplo). Las absorciones en la región del ultravioleta confirman la coloración gris o marrón que presentan los coloides de NPs de estos metales [27], coloración que también fue apreciada sobre los cristales de CI de  $\alpha$ -CD.

Por su parte, Papavilliou y col., atribuyen la débil absorción de las dispersiones coloidales de Ni, Co, Pd y Pt a la alta polarización del núcleo y/o las transiciones inter-bandas [29].

Además, tal como se puede apreciar en la Figura 4.14, los espectros de absorción presentan máximos de absorción a mayores longitudes de onda, los cuales son atribuidos a transiciones inter-bandas debido a la rápida oxidación de estas partículas.

Específicamente, las NPsONi presentaron varios máximos de absorción a los 212, 266, 306 y 365 nm. Este último es asociado a la transición electrónica entre los orbitales  $3d^8$  correspondiente al *gap* de NiO ( $\sim 3,6\text{eV}$ ) [92].

No se descarta la presencia de NPsNi sin oxidar, debido a la absorción presentada a 212 nm, la cual se ha reportado anteriormente para dispersiones coloidales de NPsNi [93]. Además, en cálculos teóricos basados en la teoría de Mie para partículas de 10 nm en disolución acuosa, se asigna una absorción máxima cercana a los 210 nm y un

hombro menos pronunciado entre 300 y 400 nm, concordado con los resultados obtenidos [27]. La presencia de NPsNi sin oxidar puede justificarse debido a la rapidez en la medición después de realizado el depósito, no descartando su oxidación posterior.

Las NPsOCo presentaron dos máximos de absorción en 282 y 378 nm de longitud de onda. La absorción presente a los 282 nm puede ser atribuida a NPsCo sin oxidar, ya que coincide con la absorción entre 200 y 300 nm reportada según cálculos teóricos realizados por Creighton y col. para dispersiones de NPs metálicas en solución acuosa [27] y también se acerca a la absorbancia presente a 260 nm de longitud de onda, reportada para NPsCo según Su y col. [94].

La leve absorción ubicada a los 378 nm de longitud de onda puede ser asociada al comienzo de la oxidación de estas partículas, debido a las posibles transiciones electrónicas  $O^{2-} \rightarrow Co^{2+}$  y  $O^{2-} \rightarrow Co^{3+}$  [95, 96]. Absorciones a mayores longitudes de onda (entre 600 y 700 nm [96]) no fueron detectadas en el espectro UV-visible. Esta ausencia, es atribuida a la débil presencia de NPs de  $Co_3O_4$  al inicio de este proceso, debido a que la medición de los espectros UV-visible fue realizada a tiempos tempranos, inmediatamente después del depósito de las NPs mediante PCV. Probablemente la oxidación ocurre posteriormente, debido al contacto con el ambiente y a la disolución acuosa de estas partículas en una etapa posterior.

Por otro lado, el incremento en la intensidad de la absorción presentada por las partículas, es una clara evidencia del aumento en la población de las NPs formadas por PCV sobre el plano específico {001} de los CI de  $\alpha$ -CD [97].

Reznickova y col. también han observado un mayor pronunciamiento en la banda de absorción que presentan las NPs, a medida que se incrementa el tiempo de depositación del metal mediante pulverización catódica sobre el sustrato [89].

#### **4.6. Efectos sobre la viabilidad celular de sistemas nanosupramoleculares**

Los sistemas nanosupramoleculares formados por CI de  $\alpha$ -CD con huéspedes alquílicos que se encuentran anclados a NPs metálicas, pueden considerarse como sistemas preliminares en el diseño de nuevos nanotransportadores. La combinación del alcance supramolecular que otorgan las CD, además de su alta solubilidad en medios acuosos y su naturaleza inocua [8], con las interesantes propiedades físicas y químicas que presentan las NPs metálicas, pueden abrir un gran campo de aplicaciones en farmacología, específicamente en la entrega de drogas [98]. La inclusión de drogas de interés biológico dentro de matrices de CD unidos a NPs metálicas, podría dar lugar a sistemas nanosupramoleculares con potenciales aplicaciones en esta área.

Una futura utilización de nanodispositivos con aplicaciones biotecnológicas requiere de una evaluación preliminar toxicológica. Factores como el tipo de funcionalización de las NPs, los agentes estabilizantes, los parámetros fisicoquímicos de las NPs (diámetro, forma, carga superficial, etc.), condiciones de incubación (tiempo y concentración), tipo de células utilizadas, tipo de ensayo toxicológico y posibles interferencias de las NPs en la lectura del ensayo, vuelven complicada la evaluación de

la toxicidad producida por las NPs y la comparación de los resultados con otros encontrados en la literatura [99, 100].

Los resultados que se muestran a continuación, corresponden a ensayos colorimétricos de viabilidad celular desarrollados con los reactivos MTT o MTS, los cuales son reducidos por células metabólicamente activas al compuesto coloreado formazán, indicando de manera indirecta la viabilidad celular [101]. Este ensayo ha sido ampliamente utilizado para evaluar la citotoxicidad de diferentes nanomateriales como; NPs de quitosano [102], NPs<sub>Au</sub> [103], NPs<sub>Ag</sub> [104], NPs de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [105], "*Quantum Dots*" de CdTe [106], entre otras.

En general, el ensayo de MTT y el resto de los ensayos utilizados en toxicología han debido adecuarse para la medición de los distintos nanomateriales.

Investigadores han señalado que algunos nanomateriales pueden interferir en ensayos como el de MTT, dando resultados erróneos. Wörle-Knirsch y col., señalaron que nanotubos de carbono interactúan con los cristales de formazán formados después de la reducción de MTT y como consecuencia, estos cristales no pueden ser solubilizados en 2-propanol / HCl, SDS, o acetona, de manera que no logran ser detectados mediante espectrofotometría, registrando falsas disminuciones de la viabilidad celular [107]. Por otra parte, debido a sus propiedades ópticas, las NPs presentes en o sobre el cultivo celular pueden influir directamente en la lectura espectrofotométrica mediante el aumento de la absorción de la luz, como ya ha sido demostrado para NPs de titanato de sodio [108].

Para NPsONi y NPsOCo anteriormente se observó que presentan máximos de absorción entre 200 y 400 nm de longitud de onda, por lo que no constituyen un interferente en la medición de la absorbancia presentada por el compuesto formazán el cual será medido a 490 y 560 nm (para la reducción de MTS y MTT, respectivamente). Además, para descartar falsos negativos o positivos, se midió la absorbancia del estímulo (las NPs funcionalizadas con los CI) sobre el medio de cultivo sin células, registrando sólo la absorbancia de MTT o MTS sin reaccionar.

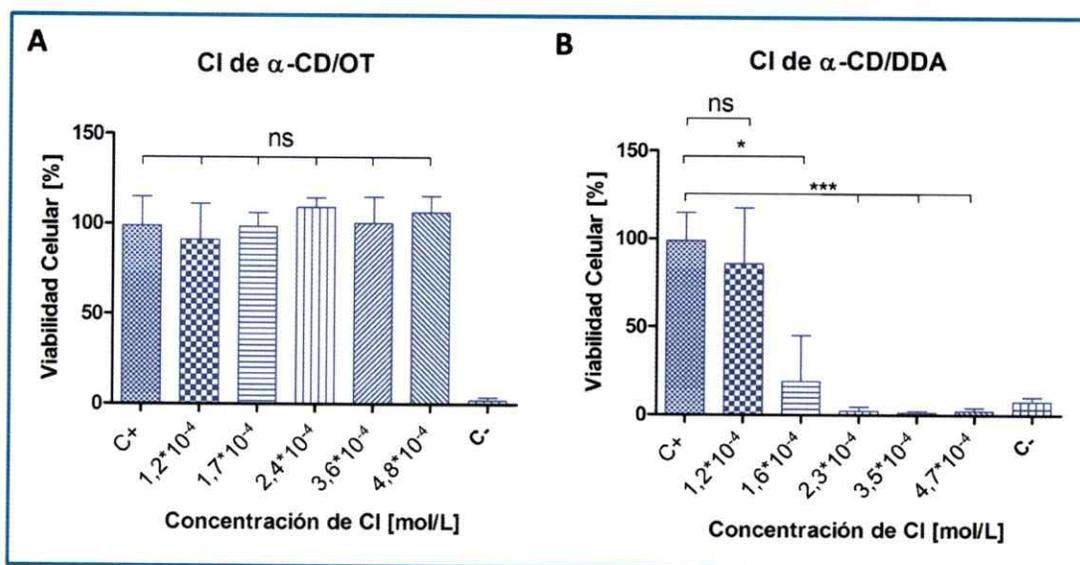
Todos los ensayos fueron realizados sobre la línea celular SH-SY5Y, direccionando esta investigación a posibles aplicaciones en enfermedades neuronales como lo es el mal de Alzhéimer.

#### *4.6.1. Evaluación de la viabilidad celular frente a los CI de $\alpha$ -CD*

La citotoxicidad de los nanomateriales también puede ser causada por las moléculas estabilizantes que cubren la superficie de los nanomateriales, y no por la propia partícula nanocrystalina [109].

Ante la posibilidad de una disminución en la viabilidad celular asociada a la toxicidad que pudiesen presentar los CI de  $\alpha$ -CD, los primeros ensayos realizados fueron la evaluación de la citotoxicidad presentada por un CI con un huésped alquiltiol ( $\alpha$ -CD/OT) y un CI formado por un huésped alquilamina ( $\alpha$ -CD/DDA). La elección de estos compuestos surge de la posibilidad de que sean más estables en solución acuosa debido a que presentaron un mayor porcentaje de rendimiento (ver Tabla 3.3).

Los análisis de viabilidad celular en los que fue evaluado el efecto provocado por los CI de  $\alpha$ -CD/OT y  $\alpha$ -CD/DDA, son presentados en la Figura 4.15.



**Figura 4.15.** Gráficos dosis-respuesta que indican la viabilidad celular al evaluar los CI de  $\alpha$ -CD/OT (A) y  $\alpha$ -CD/DDA (B) con un n=12.

Las concentraciones de CI analizadas corresponden a las mismas concentraciones que contendrán las muestras de CI con NPs, cuyos resultados se mostrarán posteriormente.

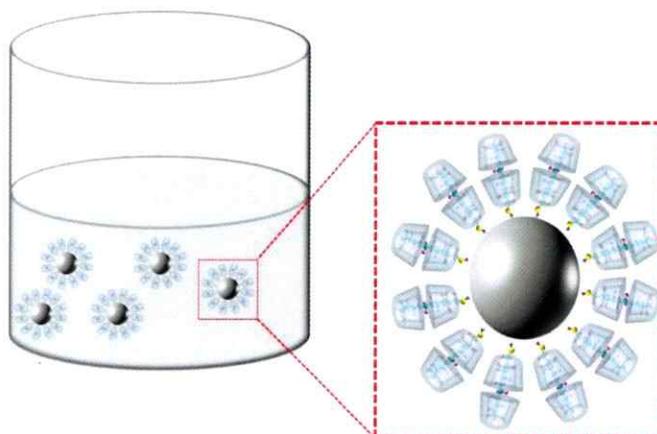
En la Figura 4.15.A, las concentraciones de CI de  $\alpha$ -CD/OT evaluadas ( $4,8 \times 10^{-4}$  mol/L –  $1,2 \times 10^{-4}$  mol/L), no indujeron muerte celular, presentando porcentajes de viabilidad cercanos al 100%. En cambio, una drástica disminución de la viabilidad

celular fue detectada al aplicar concentraciones mayores a  $1,6 \times 10^{-4}$  mol/L del CI de  $\alpha$ -CD/DDA (Figura 4.15.B).

A diferencia de las concentraciones de  $\alpha$ -CD/DDA que causaron una mayor muerte celular, concentraciones mayores a  $1,6 \times 10^{-4}$  mol/L del CI de  $\alpha$ -CD/OT no provocaron una disminución en la viabilidad celular, por lo que se presume que los CI de  $\alpha$ -CD con moléculas huésped alquiltioles producirían una menor toxicidad frente a la línea celular, en comparación con los CI de  $\alpha$ -CD que contienen alquilaminas.

Este fenómeno podría estar asociado a la conjeturada menor estabilidad en solución que poseen los CI de  $\alpha$ -CD con huéspedes alquilaminas, debido a una menor asociación matriz-huésped, permitiendo la salida del huésped desde la matriz y causando una mayor citotoxicidad. La toxicidad provocada por las moléculas alquilaminas puede deberse a su carga positiva en medio acuoso, lo que podría dar origen a una perforación de poros en las membranas biológicas, tal como actúan las moléculas de cetiltrimetilamonio [110].

En base a estos resultados, y que NPsONi y NPsOCO fueron obtenidas en CI de  $\alpha$ -CD con alquiltioles como huéspedes, sin aparente agregación y con una homogénea dispersión de tamaño alrededor de 8 nm de diámetro (ver Figura 4.6 y 4.11), estos sistemas nanosupramoleculares fueron seleccionados para la evaluación de citotoxicidad. Un esquema de estos sistemas nanosupramoleculares en disolución acuosa puede apreciarse en la Figura 4.16.



**Figura 4.16.** Representación esquemática de las NPsOCu o NPsONi estabilizadas con el CI de  $\alpha$ -CD en disolución acuosa.

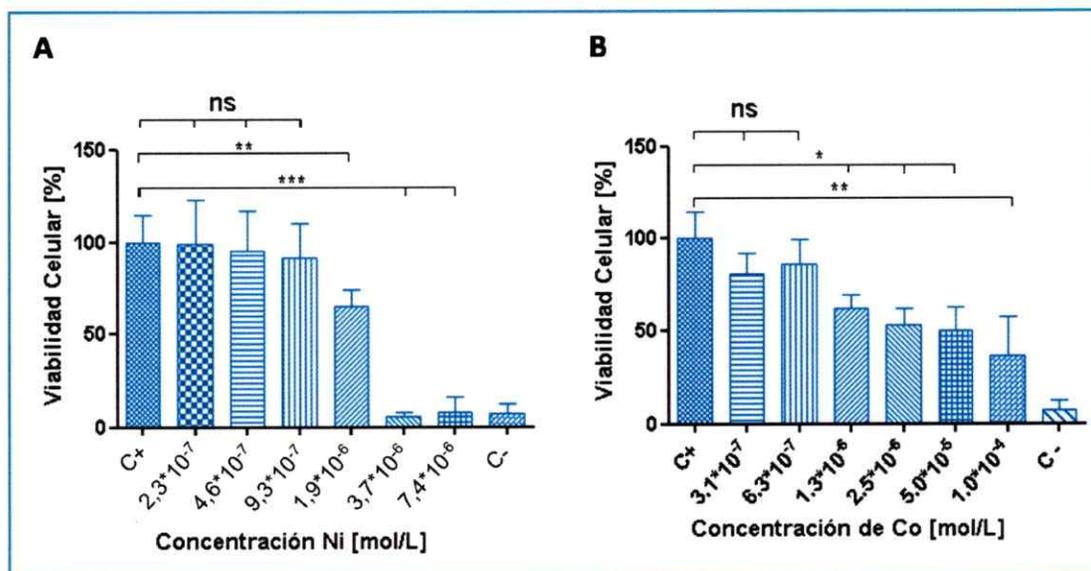
La concentración de los metales de Ni y Co en cada uno de los CI utilizados, fue determinada previamente mediante ICP-MS. En la Tabla 4.4 se expresa la cantidad de metal por gramo de CI.

**Tabla 4.4.** Análisis de cuantificación de metales.

CI	Metal	Tiempo de depósito por PCV (s)	Concentración ( $\mu\text{g/g}$ )
$\alpha$ -CD/DT	Ni	120	85,0
$\alpha$ -CD/DDT	Co	120	70,4

A partir de estos datos, fueron calculadas las concentraciones molares de los metales en cada CI para su evaluación de citotoxicidad.

Las concentraciones de Ni y Co que fueron evaluadas son inferiores a  $1 \times 10^{-4}$  mol/L o  $1 \mu\text{g/mL}$  debido a que, estudios de citotoxicidad encontrados en literatura indican que a concentraciones mayores de estos metales, el porcentaje de viabilidad celular decae drásticamente [111, 112].



**Figura 4.17.** Gráficos dosis-respuesta que indica la viabilidad celular para las NPSONi sobre CI de  $\alpha$ -CD/DT (A) y NPSCo sobre  $\alpha$ -CD/DDT (B) con un n=12.

En la Figura 4.17, se aprecia una disminución de la viabilidad celular conforme la concentración de los metales aumenta.

En la evaluación de NPONi se evidencia claramente que a concentraciones de Ni mayores que  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, la viabilidad disminuye considerablemente al 10% (Figura 4.17A). Para las NPSCo, la disminución de la viabilidad ocurre de manera paulatina y sólo comienza a tener una toxicidad considerable (menor al 50%) después de  $5 \times 10^{-5}$  mol/L de Co (Figura 4.17B).

Los resultados muestran una menor citotoxicidad de las NPSCo frente a la línea celular SH-SY5Y, comparado con la citotoxicidad provocada por las NPSONi,

considerando que las muestras que contenían NPsOC<sub>o</sub> fueron evaluadas en un rango mayor de concentraciones.

Estos resultados coinciden con los informados por Lanone y col. En base a resultados obtenidos por dos laboratorios de investigación, aplicados sobre dos líneas de células pulmonares humanas (A549 y THP-1), ellos indicaron que para partículas de aproximadamente 50 nm de diámetro, las NPsONi provocan una mayor citotoxicidad que las NPsOC<sub>o</sub> [112].

Sin embargo, es difícil deducir la causal de la mayor toxicidad provocada por las NPsONi debido a la gran diversidad de parámetros a considerar, y a que no se conoce la composición mayoritaria de estos óxidos, los cuales podrían corresponder a NPs de NiO ó Ni<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Reportes de evaluación toxicológica utilizando modelos teóricos y experimentos *in vitro* e *in vivo* de NPs de óxidos de metales de transición sobre líneas celulares de tejidos pulmonares, han revelado que NPsOC<sub>o</sub> provocan efectos tóxicos similares a las NPsONi, destacando entre ellas la elevada citotoxicidad provocada por NPs de Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> debido a la mayor generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) [113-116].

La generación de ROS en cultivos celulares, es un fenómeno bastante común, que puede darse por la presencia de metales como Fe, Co y Ni, los que desencadenan la reacción de Fenton que conlleva a la formación del radical hidroxilo [117]. En general, cuando las células son expuestas a efectos externos como la acción de patógenos o calor,

se generan moléculas que contienen oxígeno químicamente activo. Estas especies ROS pueden ser del tipo radicalarias y no radicalarias. La mayoría de las células poseen mecanismos de defensa para neutralizar una cierta cantidad de especies ROS, pero cuando el aumento de las ROS es demasiado alto, las células son propensas a sufrir diversos efectos negativos [99].

Varios reportes han establecido que la energía de *band gap* de NPs de óxidos de metales de transición, podría explicar la generación del estrés oxidativo cuando estas partículas entran en contacto con las células. Si la energía de la banda de valencia y de conducción del óxido son comparables con el potencial redox celular (correspondiente a las reacciones biológicas que se producen dentro de las células y que varía de -4,12 a -4,84 eV), entonces los electrones se pueden transferir y el óxido actúa como un catalizador o como un donante o aceptor de electrones. El resultado global es el desequilibrio del sistema redox celular, provocando la disminución de antioxidantes y/o un aumento en la producción de ROS, lo que se traduce en respuestas inflamatorias y citotóxicas [113-116].

Entre las partículas que presentan una energía de banda de conducción necesaria para que ocurra esta transferencia electrónica están las NPs de:  $\text{Ni}_2\text{O}_3$  (-4,31 eV),  $\text{CoO}$  (-4,42 eV) y  $\text{Co}_3\text{O}_4$  (-4,59 eV). Las NPs de  $\text{NiO}$  presentan una energía de banda de conducción de -3,57 eV. Esta predicción coincide con resultados experimentales que muestran una alta toxicidad para las especies  $\text{Co}_3\text{O}_4$ ,  $\text{CoO}$ ,  $\text{Ni}_2\text{O}_3$ , pero una baja toxicidad para  $\text{NiO}$  frente a líneas celulares pulmonares [113].

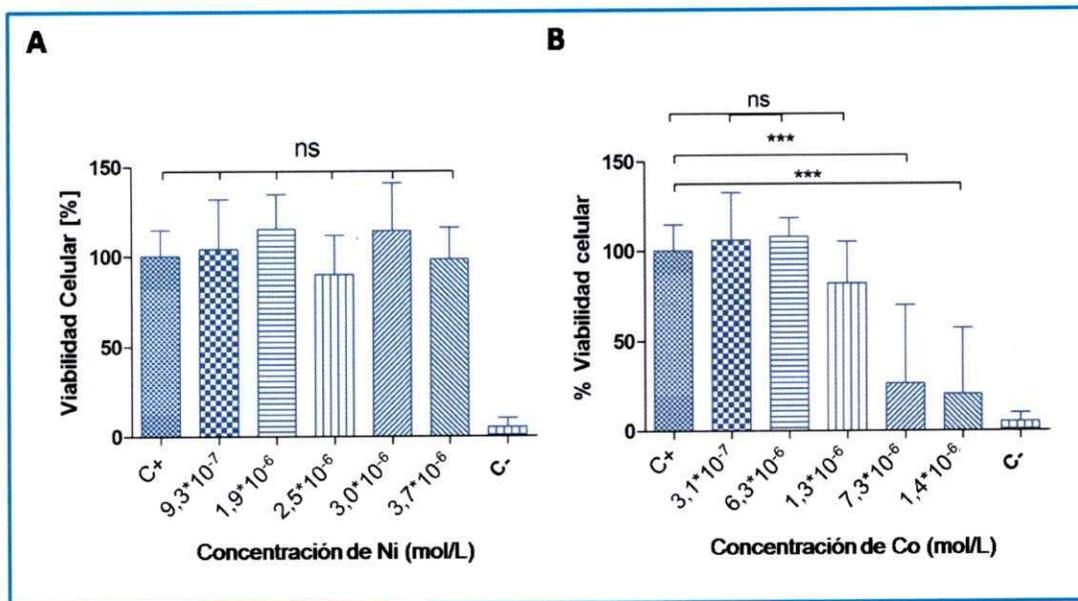
Por otro lado, otro factor que podría estar involucrado en los efectos tóxicos visualizados en el análisis anterior, es la gran cantidad de CI sin NPs adheridas que se encuentra en suspensión, para lo cual se desarrolló una metodología para la purificación de los sistemas nanosupramoleculares.

#### *4.6.2. Purificación de los sistemas nanosupramoleculares, NPsNi- $\alpha$ -CD/DT y NPsCo- $\alpha$ -CD/DDT.*

Desde la síntesis de las nanopartículas metálicas mediante PCV sobre los CI, se tiene cierta cantidad del CI que no posee NPs adheridas a su superficie debido a la naturaleza aleatoria del método. Por este motivo, se realizó un proceso de purificación de los sistemas nanosupramoleculares mediante diálisis a través de membrana, para retirar el exceso de CI que no posee NPs (ver Capítulo 2, Metodología 2.2.2.5).

Desde este estudio en adelante, en los ensayos de viabilidad celular se utilizó el reactivo MTS, el cual es reducido a un compuesto formazán que es soluble en medio acuoso.

La evaluación de los sistemas nanosupramoleculares purificados luego de 4 días de diálisis, se presentan en la Figura 4.18. Las concentraciones de los metales Ni y Co en esta evaluación, son mayores a las que resultaron tóxicas en el análisis anterior, para evaluar el efecto luego del procedimiento de purificación.



**Figura 4.18.** Gráficos dosis-respuesta que indican la viabilidad presentada al aplicar los sistemas nanosupramoleculares purificados A) NPsONi- $\alpha$ -CD/DT y B) NPsOCO- $\alpha$ -CD/DDT sobre el cultivo celular SH-SY5Y (n=9).

En la Figura 4.18 A, no se aprecia una disminución de la viabilidad celular con respecto al control positivo para concentraciones de Ni que van desde  $3,7 \times 10^{-6}$  mol/L a  $9,3 \times 10^{-7}$  mol/L. Al comparar esta evaluación con los resultados anteriores, se verifica claramente una disminución en los efectos citotóxicos provocados por estos sistemas nanosupramoleculares luego de la purificación.

Sin embargo, las NPsOCO luego de la purificación, provocaron una mayor muerte celular, llegando a un porcentaje de viabilidad celular cercano al 25% (Figura 4.18 B). Probablemente, la mayor muerte celular tenga relación con la oxidación total de las partículas a  $\text{Co}_3\text{O}_4$ , las cuales inducen estrés oxidativo.

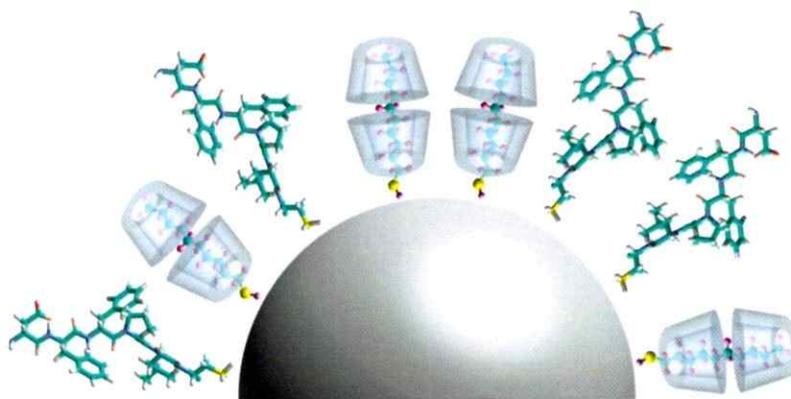
Con el fin de disminuir la citotoxicidad presentada por estos sistemas, se realizó un recubrimiento de las NPs metálicas ya funcionalizadas con los CI, con el péptido CLPFFD, donde el grupo -SH del residuo de cisteína interactúan con la superficie de las NPsOCo y NPsONi.

#### *4.6.3. Funcionalización de sistemas supramoleculares NPsONi- $\alpha$ -CD/DT y NPsOCo- $\alpha$ -CD/DDT con el péptido CLPFFD*

El péptido LPFFD, diseñado por Soto y col., posee una secuencia similar al centro hidrofóbico del péptido  $\beta$ -amiloide de 42 aminoácidos ( $A\beta_{1-42}$ ), el cual corresponde al dominio entre los aminoácidos 17-20 de la estructura peptídica [118]. Estudios han revelado que el péptido  $A\beta_{1-42}$  es un componente mayoritario de los agregados insolubles presentes en placas amiloides extracelulares y alrededor de las paredes de los vasos sanguíneos cerebrales de personas que padecen la enfermedad de Alzheimer [119].

El péptido LPFFD fue creado como disruptor de la estructura de sábana beta del péptido amiloide, pero en bajas concentraciones, es un reconocedor selectivo del péptido  $A\beta_{1-42}$ . Al agregar un residuo de cisteína (C) a la secuencia del péptido LPFFD, es posible la funcionalización de nanopartículas metálicas a través de la interacción entre el grupo -SH del residuo de cisteína y la superficie de la NP metálica [38, 120]. Esta estrategia representa una posible herramienta para crear sistemas que permitan la llegada de dispositivos hacia el cerebro como posible terapia para esta enfermedad.

La funcionalización de NPs inorgánicas con biomoléculas es ya un método ampliamente utilizado para generar materiales híbridos que se pueden utilizar para dejar interactuar específicamente a las NPs con los sistemas biológicos. Con el fin de mejorar la estabilidad de las partículas, las moléculas de ligando en la superficie pueden ser intercambiadas por otros que posiblemente puedan proporcionar nuevas propiedades o funcionalidades a las partículas. En la mayoría de los casos, las moléculas de ligando entrante se unen más fuertemente a la superficie de las NPs inorgánicas [121]. En esta oportunidad, se adhirió a la superficie de las NPs, el péptido CLPFFD que posee un grupo  $-SH$  con las mismas posibilidades de funcionalización que el CI de  $\alpha$ -CD con moléculas alquiltioles, por lo que se supone un sistema bifuncionalizado tal como se aprecia en la Figura 4.19.



**Figura 4.19.** Esquema de la superficie de la nanopartícula funcionalizada con el CI y el péptido CLPFFD

(No a escala).

Luego de la funcionalización con el péptido CLPFFD, se realizó un proceso de purificación mediante diálisis a través de membrana para eliminar el exceso de Cl y de péptido no adherido a la superficie de las NPs (ver Capítulo 2, Metodología 2.2.2.7).

Para estimar la cantidad de péptido unido a la superficie de las NPs se realizó un análisis de aminoácidos (Aaa) de las muestras (ver Anexo II, Figuras S17 y S18).

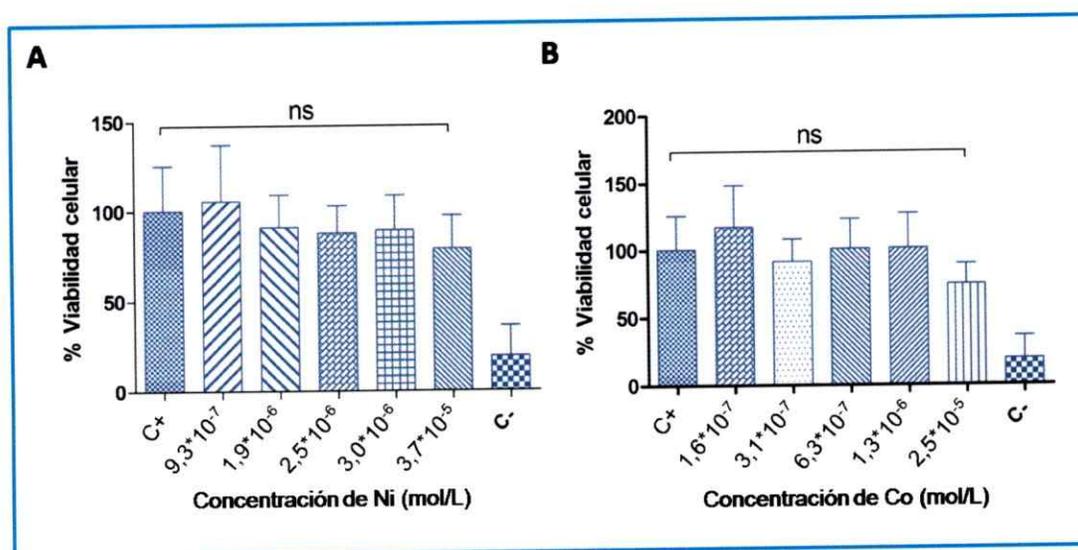
A partir del procedimiento descrito y la ecuación (6) (ver Capítulo 2, Metodología 2.2.2.8), fue calculada la concentración del péptido CLPFFD. Las concentraciones molares de NPs utilizadas en el Aaa, fueron determinadas por la ecuación (8) utilizando las densidades y las masas moleculares promedio de cada óxido del metal. El número aproximado de moléculas de péptido por NPs fue calculado sencillamente mediante la división de la concentración de NPs por la concentración de péptido determinada en el análisis. Los resultados se aprecian en la Tabla 4.5.

**Tabla 4.5.** Resultados de análisis de aminoácidos para los sustratos supramoleculares funcionalizados.

Metal NPs	Diámetro de NPs (nm)	Concentración de metal [ $\mu\text{mol/L}$ ]	Concentración de NPs [ $\mu\text{mol/L}$ ]	Concentración del péptido [ $\mu\text{mol/L}$ ]	Nº de péptido por NP
Co	$7,9 \pm 0,5$	11,9	0,0048	4,5	948
Ni	$7,6 \pm 0,4$	14,5	0,0196	17,7	902

4.6.4. Evaluación de citotoxicidad de NPsONi y NPsOCo funcionalizadas con los compuestos de inclusión y el péptido CLPFFD

Los porcentajes de viabilidad celular obtenidos al exponer al cultivo celular a las NPs bifuncionalizadas se muestran en la Figura 4.20.



**Figura 4.20.** Gráficos dosis-respuesta para evaluación de la citotoxicidad presentada por; A) NPsONi funcionalizadas con el CI de  $\alpha$ -CD/DT y el péptido CLPFFD y B) NPsOCo funcionalizadas con el CI de  $\alpha$ -CD/DDT y el péptido CLPFFD (n = 9).

Los nuevos sistemas formados por las NPs bifuncionalizadas casi no provocan muerte celular en los rangos de concentraciones de los metales evaluadas. Destacablemente, para las NPsOCo que se encuentran funcionalizadas con el CI de  $\alpha$ -CD/DDT y el péptido CLPFFD, se aprecia un alto porcentaje de viabilidad celular presentando una diferencia notable con los resultados presentados anteriormente en la

Figura 4.18 B donde, a concentraciones mayores que  $1,3 \times 10^{-6}$  mol/L existe una drástica disminución de la viabilidad celular.

Es importante mencionar que los resultados entregados son preliminares, por lo cual se hace necesario una caracterización más detallada incluyendo otros tipos de ensayos citotxicológicos [122]. Estos resultados iniciales de viabilidad celular realizados *in vitro*, abren interesantes expectativas para la utilización de sistemas nanosupramoleculares formados por CI de CD unidos a NPs metálicas para aplicaciones biomédicas. Tanto, el uso de CI de CD como del péptido CLPFFD, contribuyeron a disminuir la citotoxicidad que presentan estos sistemas. Además, la funcionalización adicional de los nanomateriales con moléculas biológicas como péptidos, permiten la estabilización de los nanomateriales y a su vez, ayudan a dirigirlos a los blancos terapéuticos.

# **CAPÍTULO 5**

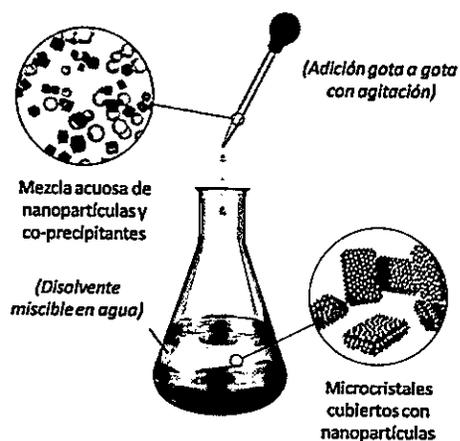
## **Resultados y Discusiones**

“Nanodecoración de Compuestos de Inclusión de  
 $\alpha$ -Ciclodextrina con nanobarras y nanopartículas de oro”

## 5.1. Ordenamiento de nanopartículas sobre superficies cristalinas

La adsorción selectiva de NPs metálicas sobre superficies sólidas es una técnica valiosa para la fabricación de dispositivos [123], y se utiliza debido a que las NPs metálicas poseen únicas propiedades ópticas, electrónicas, catalíticas, etc., que pueden ser potenciadas a través del ensamblaje, en un enfoque de “abajo hacia arriba”, para la creación de dispositivos de tamaño nanométrico [124].

En el grupo de investigación de Moore, se ha reportado la cobertura de microcristales inorgánicos con NPs. El proceso ocurre directamente por co-precipitación a partir de una dispersión de NPs y de los iones o moléculas pequeñas que, en un mecanismo ascendente de auto-ensamblaje, forman los microcristales cubiertos [125]. Este proceso se ha denominado “autoensamblaje mediado por una red cristalina” (CLAMS, por sus siglas en inglés). Una imagen que describe el proceso se aprecia en la Figura 5.1.



**Figura 5.1.** Esquema que describe el proceso de preparación de cristales cubiertos con nanopartículas. (Adaptado de la referencia [125])

Este procedimiento ha sido utilizado para obtener cristales inorgánicos cubiertos por NPs y ordenados sobre superficies, donde es posible medir sus propiedades de conducción eléctrica para potenciales usos en la fabricación de dispositivos [126].

Por otra parte el grupo de investigación de Sada, ha introducido un nuevo concepto de “decoración selectiva” para cristales orgánicos. Los autores afirmaron que la superficie de los cristales individuales orgánicos podría otorgar mayor versatilidad que las de cristales inorgánicos, dando la oportunidad de explorar una amplia variedad de materiales con propiedades anisótropas. [124, 127, 128].

Estos autores han reportado la decoración selectiva de un monocristal orgánico hexagonal de L-cisteína con NPsAu. El depósito de las NPsAu ocurre en los planos cristalinos  $\{001\}$  o  $\{00\bar{1}\}$  mediante interacciones electrostáticas gracias al mayor carácter polar de estos planos cristalográficos [124].

En un trabajo reciente de nuestro grupo de investigación, se ha demostrado que NPsAu estabilizadas en citrato de sodio, pueden ser depositadas en un plano cristalino preferencial  $\{001\}$  del CI de  $\alpha$ -CD/OT [129]. La superficie funcionalizada del CI de CD, en donde los grupos funcionales de las moléculas huésped se exponen en el plano cristalino  $\{001\}$ , puede interactuar directamente con las NPs metálicas, desplazando a las moléculas surfactantes de la superficie de las partículas. Las partículas son quemisorbidas sobre la superficie funcionalizada con grupos  $-SH$ , de manera que este proceso puede ser utilizado para inmovilizar diferentes nanoestructuras, tales como NPs y NBs.

En este capítulo, cristales de CI de  $\alpha$ -CD con huéspedes alquiltioles fueron nanodecorados con NPsAu y NBsAu estabilizadas en CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio). Los experimentos y análisis revelan que las nanoestructuras de oro son quemisorbidas preferencialmente sobre el plano cristalino {001} del CI, debido a la interacción producida entre los grupos -SH de las moléculas huésped y las nanoestructuras [77].

## **5.2. Nanopartículas y nanobarras de oro estabilizadas en bromuro de cetiltrimetilamonio**

Las NPsAu y NBsAu, fueron sintetizadas a través del método de síntesis química de “crecimiento mediado por núcleos”, el cual consta de dos etapas. La primera etapa corresponde a la formación de los “núcleos de crecimiento” que posteriormente, (en una segunda etapa) son añadidos a una “solución de crecimiento” que permite la nucleación y formación final de las nanoestructuras metálicas.

En la síntesis de NPsAu, el proceso comienza con la reducción del precursor  $\text{HAuCl}_4$ , mediante la adición de  $\text{NaBH}_4$  en una solución acuosa de CTAB, dando origen a la formación de pequeñas NPsAu  $< 4\text{nm}$  de diámetro, los cuales actuarán como núcleos de crecimiento [64].

En la preparación de la solución de crecimiento, el color amarillo-anaranjado de la sal de oro en la solución acuosa de CTAB desaparece al añadir la solución de ácido ascórbico, lo que indica la reducción de  $\text{Au}^{+3}$  a  $\text{Au}^+$ , según los potenciales de reducción

$E^{\circ}_{\text{Au}^{3+}/\text{Au}^{+}} = 0,80 \text{ V}$  y  $E^{\circ}_{\text{ascorbato}/\text{ác. ascórbico}} = 0,13 \text{ V}$ . En la solución de crecimiento se inhibe una nueva nucleación y formación de núcleos al utilizar un agente reductor suave como el ácido ascórbico, el cual produce solamente la reducción final de  $\text{Au}^{+}$  a  $\text{Au}^0$  en presencia de los núcleos de crecimiento [130].

En la preparación de NBsAu, el procedimiento difiere del descrito anteriormente, por la añadidura de una solución de  $\text{AgNO}_3$  a la solución de crecimiento. El mecanismo a través del cual los iones  $\text{Ag}^{+}$  modifican la forma final de los nanomateriales aún no ha sido totalmente esclarecido.

Nikoobakht y El-Sayed, proponen la formación de un templado creado por las moléculas del surfactante CTAB. En la solución de crecimiento se encuentran presentes iones de oro y plata, de los cuales, sólo son reducidos los iones de oro por la adición de ácido ascórbico, debido a que los iones de plata sólo son reducidos a pH básico cuando el sistema se encuentra a temperatura ambiente. Los iones  $\text{Ag}^{+}$  interactúan con los grupos polares del tensioactivo formando pares Ag-Br. La disminución de la densidad de carga de los iones de bromuro, y por lo tanto, la repulsión entre los grupos vecinos  $-\text{NH}_4^{+}$  de las moléculas de CTAB sobre la superficie del oro, conducen a la formación de una “plantilla de elongación”. Esta propuesta está apoyada por la mayor afinidad de las moléculas de CTAB por los planos laterales (más reactivos) en comparación con los planos del borde final de las NBs [64].

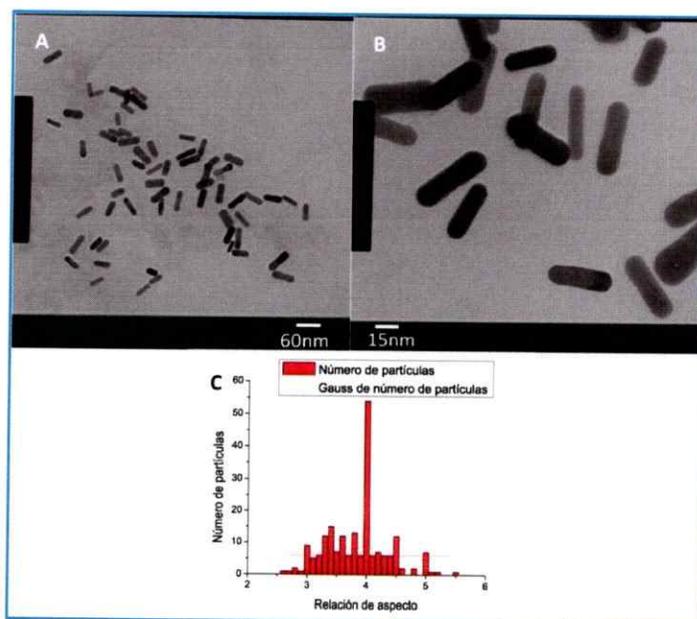
Por otro lado, Murphy y col., proponen la formación de AgBr adsorbido sobre los planos cristalinos laterales restringiendo así el crecimiento de la nanoestructura a la

forma de barra. Además, se propone la formación de una bicapa de moléculas de CTAB, la cual ayuda a mantener la dirección del crecimiento, deteniendo la reducción de oro e induciendo el crecimiento cristalino de las NBs, al limitar la tasa de interacción de los iones de oro y el ácido ascórbico con los núcleos de crecimiento [131, 132].

### 5.2.1. Caracterización de las nanoestructuras de oro mediante microscopía electrónica

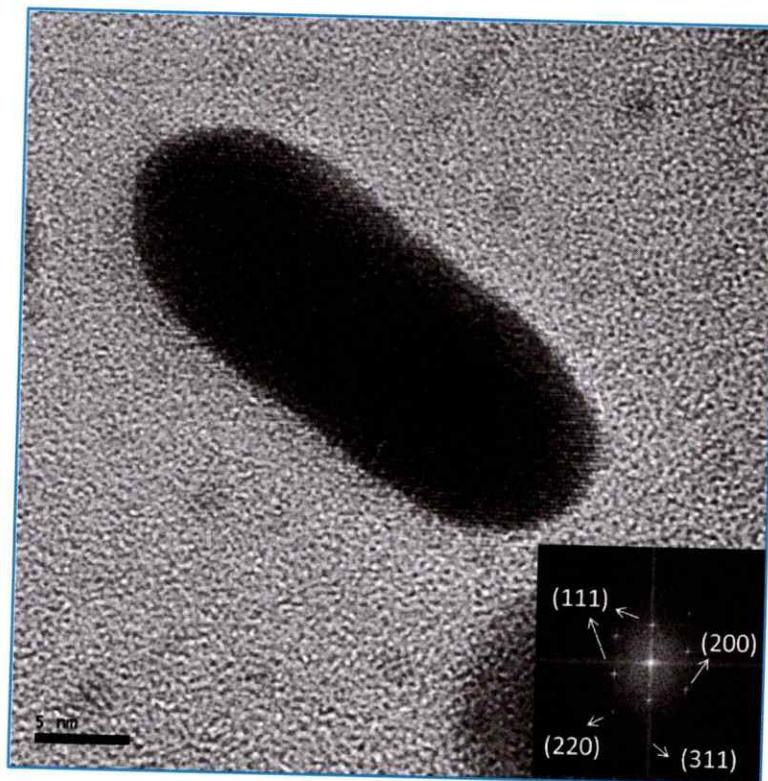
La microscopía electrónica ha sido una herramienta útil en la caracterización estructural de las NBsAu, para confirmar los mecanismos de formación propuestos [40].

El tamaño, la morfología y la naturaleza cristalina de las nanoestructuras de oro estabilizadas en CTAB obtenidas fueron caracterizadas mediante microscopía TEM y HRTEM.



**Figura 5.2.** (A) y (B) Micrográficas TEM de NBsAu estabilizadas en CTAB y (C) histograma realizado según la relación de aspecto (largo/ancho) con un promedio de  $3,9 \pm 0,5$ .

Las imágenes de TEM de la Figura 5.2, revelan la homogeneidad en forma y baja dispersión de tamaño que presentan las NBsAu. El promedio de tamaño estimado para estas nanoestructuras es de  $43 \pm 2$  nm de largo y  $11 \pm 0,6$  nm de ancho.



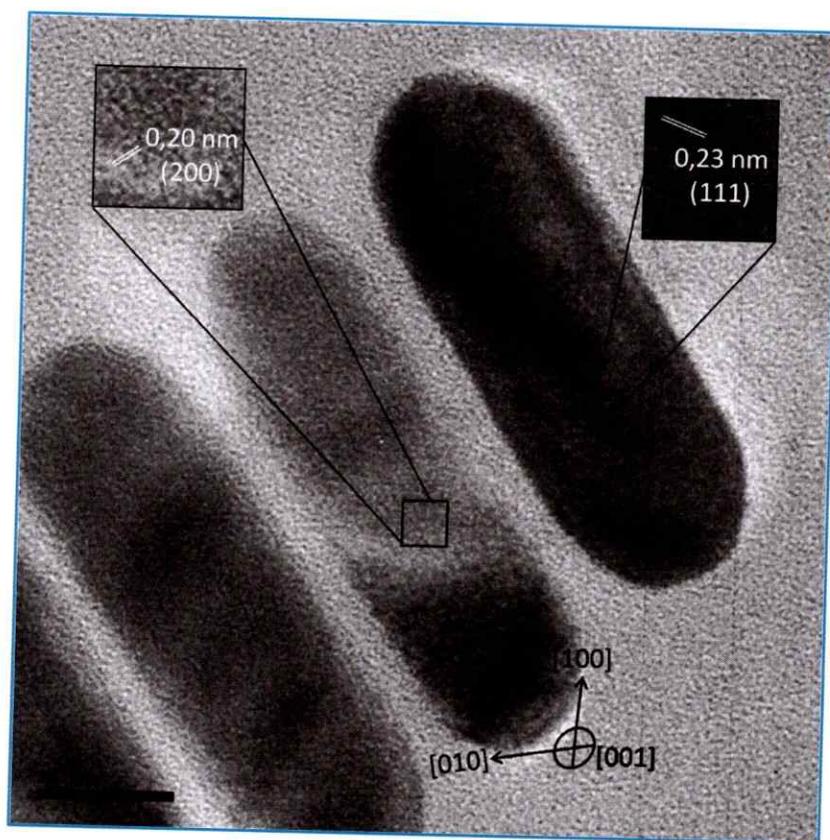
**Figura 5.3.** Micrografía HTEM de una NBsAu. Inserto en la parte inferior derecha se encuentra el patrón de difracción de electrones simulado.

La Figura 5.3 muestra la imagen HRTEM de una NBsAu, en la cual se aprecia el patrón de difracción de electrones simulado mediante el programa computacional “Digital Micrograph”, luego de la FFT realizada sobre la micrografía (ver Capítulo 2, Metodología 2.2.3.2). Los espaciados correspondientes se presentan en la Tabla 5.1.

**Tabla 5.1.** Datos del patrón de difracción simulado realizado sobre la micrografía de las NBsAu.

<i>Spot#</i>	d-espaciado (nm)	Rec. Pos. (1/nm)	Grados al <i>Spot</i> 1	Grados al eje x	Amplitud	h k l
1	0,1458	6,857	0,00	53,24	59030,14	220
2	0,2359	4,239	35,20	18,04	229496,01	111
3	0,2029	4,928	89,09	-35,85	111226,59	200
4	0,2362	4,234	143,90	-90,66	281438,53	111
5	0,1456	6,867	179,48	-126,24	59030,14	220
6	0,2369	4,220	145,35	-161,41	229496,01	111
7	0,2046	4,887	91,11	144,35	111226,59	200
8	0,2388	4,188	35,57	88,81	281438,53	111
9	0,1196	8,364	36,08	89,32	44675,67	311
10	0,1185	8,441	143,56	-90,32	44675,67	311

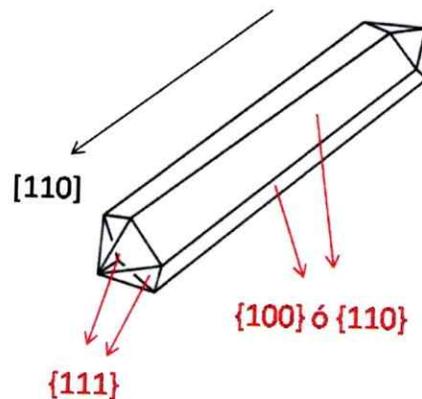
Los espaciados obtenidos del patrón de difracción simulado, corresponden a los planos cristalinos característicos de una celda tipo cúbica centrada en las caras (fcc, por sus siglas en inglés) para el oro metálico [133]. Sin embargo, las imágenes TEM no revelan directamente la forma de la sección transversal de las NBsAu.



**Figura 5.4.** Micrografía HRTEM que muestra las orientaciones de las NBsAu-CTAB sobre la grilla de microscopía. Un aumento de la imagen en cada NBs muestra la observación predominante de los planos (111) y (200).

En la Figura 5.4, se observan las dos orientaciones para las NBsAu sobre la grilla de microscopía, las cuales fueron apreciadas repetidamente en la totalidad de la muestra. Liu y col., han reportado orientaciones [011] y [001] vistas por HRTEM de NBsAu-CTAB sintetizadas mediante el crecimiento mediado por núcleos en presencia de  $\text{Ag}^{+1}$ . Estas orientaciones confirman que los planos laterales de las NBsAu deberían corresponder a los planos {110} y {100} [134]. Por lo tanto, la estructura que tendrían las NBsAu sería exactamente la misma que ha sido reportada para las NBsAu

sintetizadas electroquímicamente por Murphy y col., quienes mediante estudios de HRTEM han reportado que la estructura crece en dirección  $[110]$  con una sección transversal correspondiente a un pentágono. Los extremos de la barra son cerrados por 5 planos triangulares asignados como  $\{111\}$ , mientras que los laterales corresponden a los planos  $\{100\}$  ó  $\{110\}$  si se presentan truncamientos (ver Figura 5.5) [135].



**Figura 5.5.** Dibujo de la estructura cristalina de una NBsAu. Adaptado de la referencia [135]

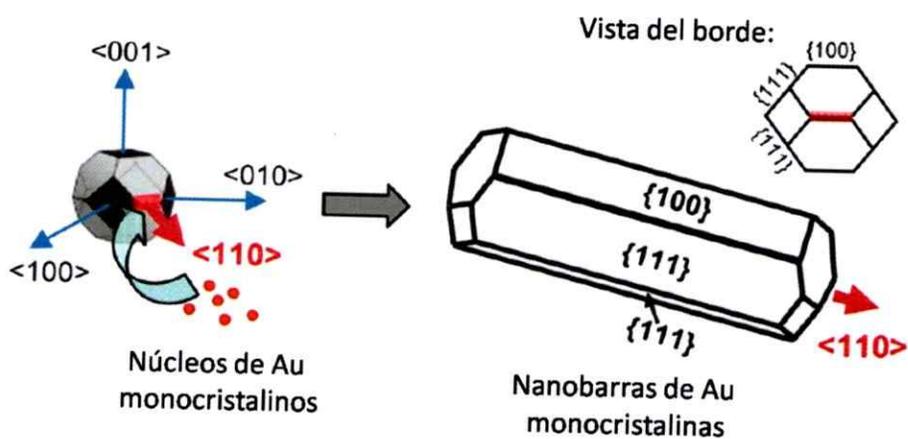
Sin embargo, las imágenes de HRTEM analizadas no mostraron defectos cristalinos, apreciando en cada difracción de electrones simulada, los planos correspondientes a una estructura de celda fcc (ver Figura 5.3) con una presencia predominante del plano (111) correspondiente al espaciado de 0,235 nm, y el plano (200) asignado al espaciado de 0,204 nm (ver Figura 5.4).

Liu y col. han indicado que la estructura final de las NBsAu depende de la estructura que presentan los núcleos de crecimiento. Los núcleos preparados con CTAB

formarán NBsAu monocristalinas y si los núcleos son estabilizados con citrato, éstas presentarán una sección transversal pentagonal [134].

Garg y col., han propuesto un mecanismo de crecimiento y formación de NBsAu, basándose en la importancia de tener una alta concentración de iones  $\text{Br}^-$  en solución [136].

Los resultados experimentales revelan que las NBsAu pueden formarse incluso a concentraciones menores que la concentración micelar crítica (CMC) de CTAB al agregar NaBr aumentando así la concentración de iones  $\text{Br}^-$  en solución, los cuales juegan un rol importante en la formación de la estructura monocristalina de los núcleos de crecimiento, determinando la estructura final de la NB. Un esquema de esta propuesta se observa en la Figura 5.6.



**Figura 5.6.** Esquema del mecanismo propuesto por Garg y col., para la formación de las NBsAu.

Tomado y adaptado de la referencia [136].

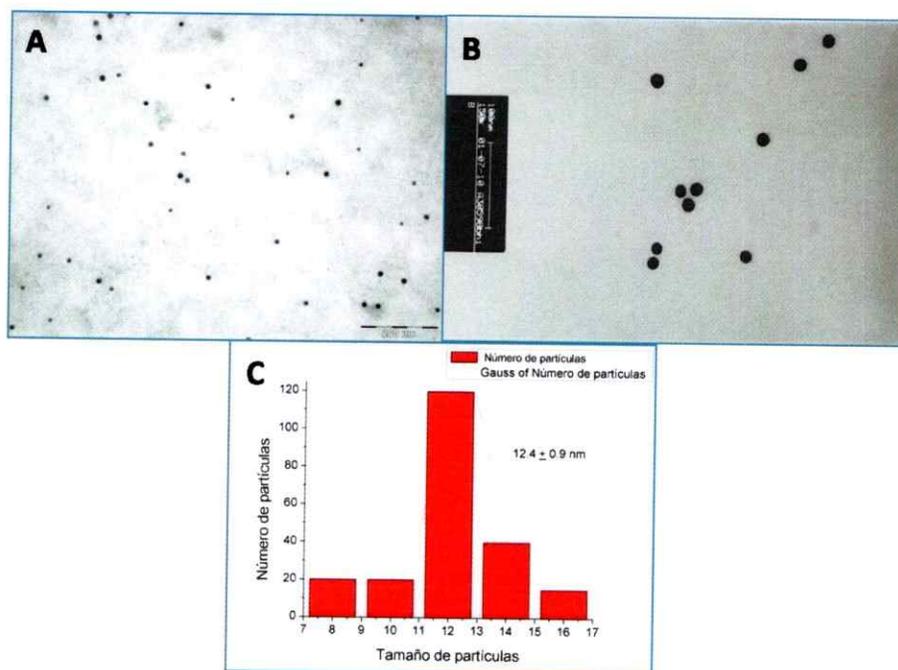
Según el modelo propuesto (ver Figura 5.6) las caras laterales corresponden a cuatro planos {111} y dos planos {100} debido al truncamiento longitudinal. El crecimiento de las NBsAu ocurre en la dirección [110], la cual es más favorable energéticamente que las direcciones [100] ó [111] [136].

El mecanismo propuesto por Garg y col., confirma la presencia mayoritaria de los planos (111) y (200) encontrados mediante la caracterización por HRTEM.

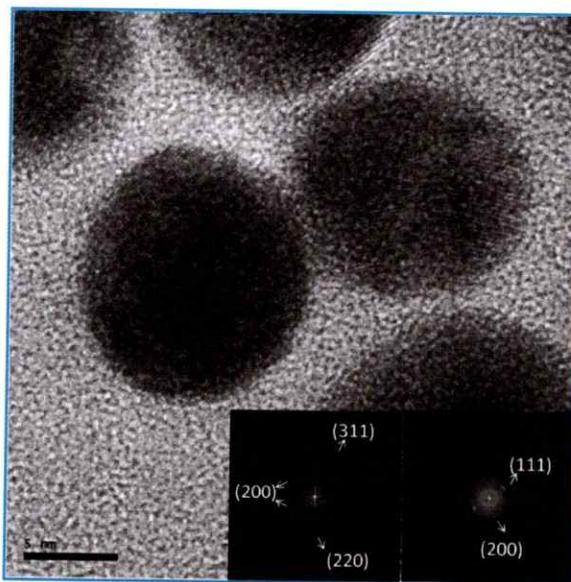
Este mecanismo no descarta el importante rol que cumple la formación de la bicapa de moléculas de CTAB y la interacción de los iones  $\text{Ag}^+$  con los planos laterales de las NBsAu, pero confirma que la presencia de iones  $\text{Br}^-$  también es un factor relevante en la formación de NBsAu monocristalinas, al participar en la generación de “núcleos de crecimiento” con forma octaédrica y al adsorberse también en los planos {111} y {100} permitiendo la elongación en la dirección [110] [136].

Por otro lado, las NPsAu-CTAB que fueron utilizadas en la nanodecoración de superficies cristalinas de CI de  $\alpha$ -CD, también fueron caracterizadas mediante microscopía.

Las imágenes visualizadas por TEM revelan una forma esférica homogénea verificada en toda la muestra. Estas partículas presentaron una baja dispersión de tamaño con un diámetro promedio de  $12,4 \pm 0,9$  nm, tal como se aprecia en la Figura 5.7.



**Figura 5.7.** A) y B) Micrografías TEM de las NPs Au-CTAB. C) histograma que muestra la dispersión de tamaño.



**Figura 5.8.** Micrografía TEM de NPs Au-CTAB. Insertos en la imagen se muestran los patrones de difracción de electrones simulados.

La Figura 5.8 corresponde a una micrografía HRTEM de las NPsAu estabilizadas en CTAB. Los insertos en la imagen pertenecen a los patrones de difracción simulados obtenidos sobre los patrones de Moiré de cada partícula en la micrografía. Los datos calculados por el programa de simulación se presentan en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Datos de los patrones de difracción de electrones simulados para las NPsAu.

<i>Spot#</i>	d-espaciado (nm)	Rec. Pos. (1/nm)	Grados al <i>Spot 1</i>	Grados al eje x	Amplitud	h k l
1	0,1410	7,093	0,00	60,68	7978,93	220
2	0,1248	8,015	3,66	64,34	6535,54	311
3	0,1441	6,938	25,49	86,17	8717,52	220
4	0,2042	4,897	70,92	131,60	50414,67	200
5	0,2007	4,983	19,55	41,13	38901,80	200
6	0,1998	5,005	108,87	-48,19	50414,67	200
7	0,1423	7,029	153,29	-92,61	8717,52	220
8	0,1245	8,032	175,38	-114,70	6535,54	311
9	0,1404	7,122	178,95	-118,27	7978,93	220
10	0,2015	4,964	161,39	-137,93	38901,80	200

<i>Spot#</i>	d-espaciado (nm)	Rec. Pos. (1/nm)	Grados al <i>Spot 1</i>	Grados al eje x	Amplitud	h kl
1	0,2371	4,218	0,00	37,61	231095,08	111
2	0,2125	4,705	111,49	-73,87	135980,65	200
3	0,2376	4,209	178,58	-140,97	231095,08	111
4	0,2133	4,687	70,85	108,46	53481,04	200

Los espaciados cristalinos encontrados corresponden a los planos característicos presentes en la estructura cristalina de celda fcc del oro [133].

Para la gran mayoría de las imágenes analizadas que fueron escogidas al azar, los planos cristalinos con una difracción más intensa y frecuentemente visualizados fueron los planos (111) y (200).

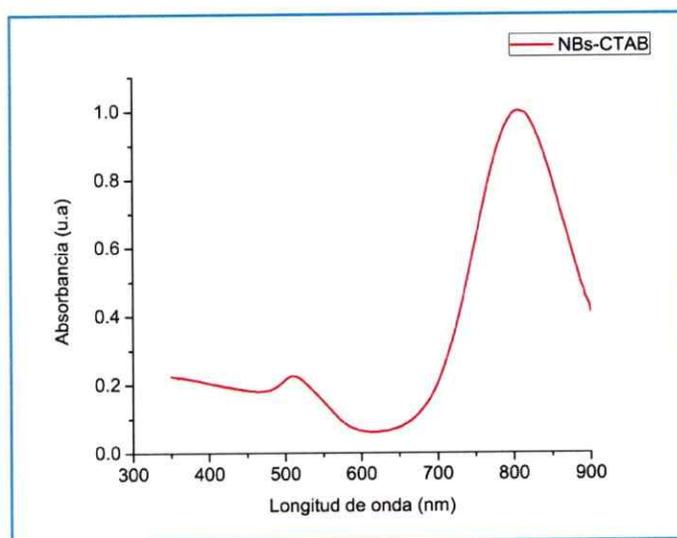
Wang y col., han reportado que cristalográficamente las NPsAu presentan generalmente dos tipos de estructuras más estables; una forma poliédrica de octaedro truncado, donde se aprecia la presencia de los planos {111} y {100}, y una decaédrica formada por la unión de los planos {111} [137]. Por lo tanto, se deduce que las muestras preparadas bajo este método presentan generalmente una forma de octaedro truncado, exponiendo los planos (111) y (200).

### *5.2.2. Análisis de espectrofotometría UV -visible de nanopartículas y nanobarras de oro*

Las técnicas espectroscópicas son una herramienta útil en la caracterización de las propiedades ópticas de las nanoestructuras entregando múltiple información. Por ejemplo, el análisis de la banda de absorción tomado mediante espectrofotometría UV-visible, no sólo permite caracterizar las transiciones electrónicas o resonancias plasmónicas en los nanomateriales sino que, también pueden proporcionar información valiosa sobre el tamaño, la forma y la agregación de las nanopartículas [138]

Las NBsAu-CTAB, debido a su forma, se caracterizan por presentar dos máximos de absorción correspondientes a la RPS de las secciones trasversal y longitudinal de las NBs.

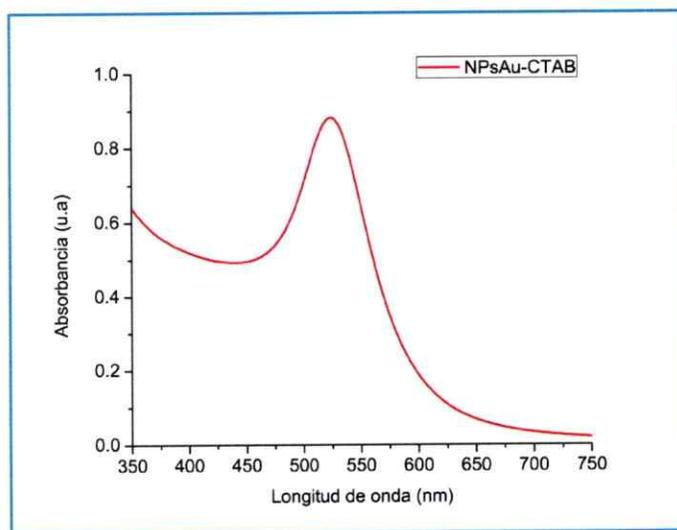
Al incrementar la relación de aspecto (largo/ancho) de las NBs, la absorción correspondiente al modo longitudinal se desplaza batocrómicamente, siendo esta absorción altamente sensible al largo que presentan las NBs. Para NBs con una relación de aspecto de 4, el espectro de absorción muestra una máximo de RPS de la sección longitudinal cercano a los 800 nm de longitud de onda [40].



**Figura 5.9.** Espectro UV-visible de la dispersión coloidal de NBsAu-CTAB.

La Figura 5.9 da cuenta de la RPS característica para las NBsAu, la cual se relaciona íntimamente con los resultados de tamaño y forma obtenidos por microscopía electrónica (ver Figura 5.2). La absorción correspondiente a la sección transversal de la NBs fue localizada a 510 nm y la absorción asignada a la sección longitudinal se ubicó en 800 nm de longitud de onda.

Las NPsAu presentan una RPS característica alrededor de los 520 nm de longitud de onda. Para la dispersión coloidal de NPsAu estabilizadas en CTAB, se presentó un máximo de absorción a 524 nm de longitud de onda, tal como observa en la Figura 5.10.



**Figura 5.10.** Espectro UV-visible de la dispersión de NPsAu estabilizadas en CTAB.

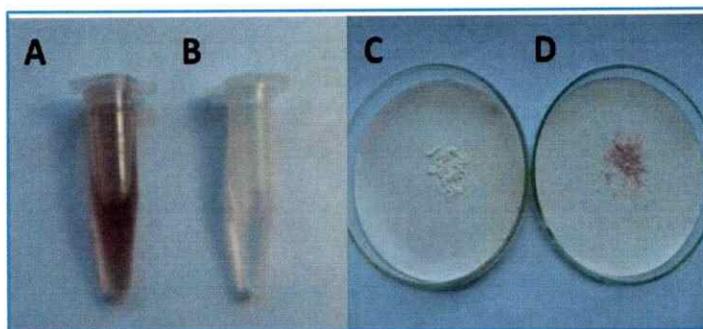
En la Figura 5.10., la RPS de las partículas se observa como un agudo máximo indicando la homogénea dispersión de tamaño que fue visualizada también por microscopía TEM.

Jana y col., reportaron la preparación de NPsAu estabilizadas en CTAB, mediante el método de crecimiento mediado por núcleos obteniendo NPs entre 5 y 40 nm de diámetro. Las partículas entre 5 y 17 nm de diámetro presentaron coincidentemente un máximo de absorción a 524 nm de longitud de onda, la cual concuerda exactamente con nuestros resultados [130].

### 5.3. Nanodecoración de cristales de compuestos de inclusión con nanobarras y nanopartículas de oro

En la preparación de los cristales de CI de  $\alpha$ -CD nanodecorados con NPsAu y NBsAu, se observó un efecto de coloración similar al reportado por Fujiki y col. en la decoración anisotrópica de cristales de L-cisteína con NPsAu [124], los cuales adquirieron una coloración púrpura asociada a una agregación de las NPsAu [139].

Cuando los microcristales incoloros de los CI de  $\alpha$ -CD/OT y  $\alpha$ -CD/DDT fueron inmersos en las dispersiones coloidales color rosa de las NBsAu-CTAB y NPsAu-CTAB, respectivamente, los cristales se tiñeron inmediatamente del color de las dispersiones coloidales, manteniendo el color después del lavado. El agua de lavado de los cristales resultó una solución prácticamente incolora. Este fenómeno se puede apreciar en la Figura 5.11, la cual describe el proceso de coloración de los cristales de  $\alpha$ -CD/OT al ser decorados con NBsAu.



**Figura 5.11.** Izquierda: A) dispersión de NBsAu-CTAB de color rosa y B) solución incolora que resulta después de la adición de los cristales de  $\alpha$ -CD/OT y su filtración. Derecha: C) cristales incoloros de CI de  $\alpha$ -CD/OT y D) cristales de color rosa después de la nanodecoración con NBsAu.

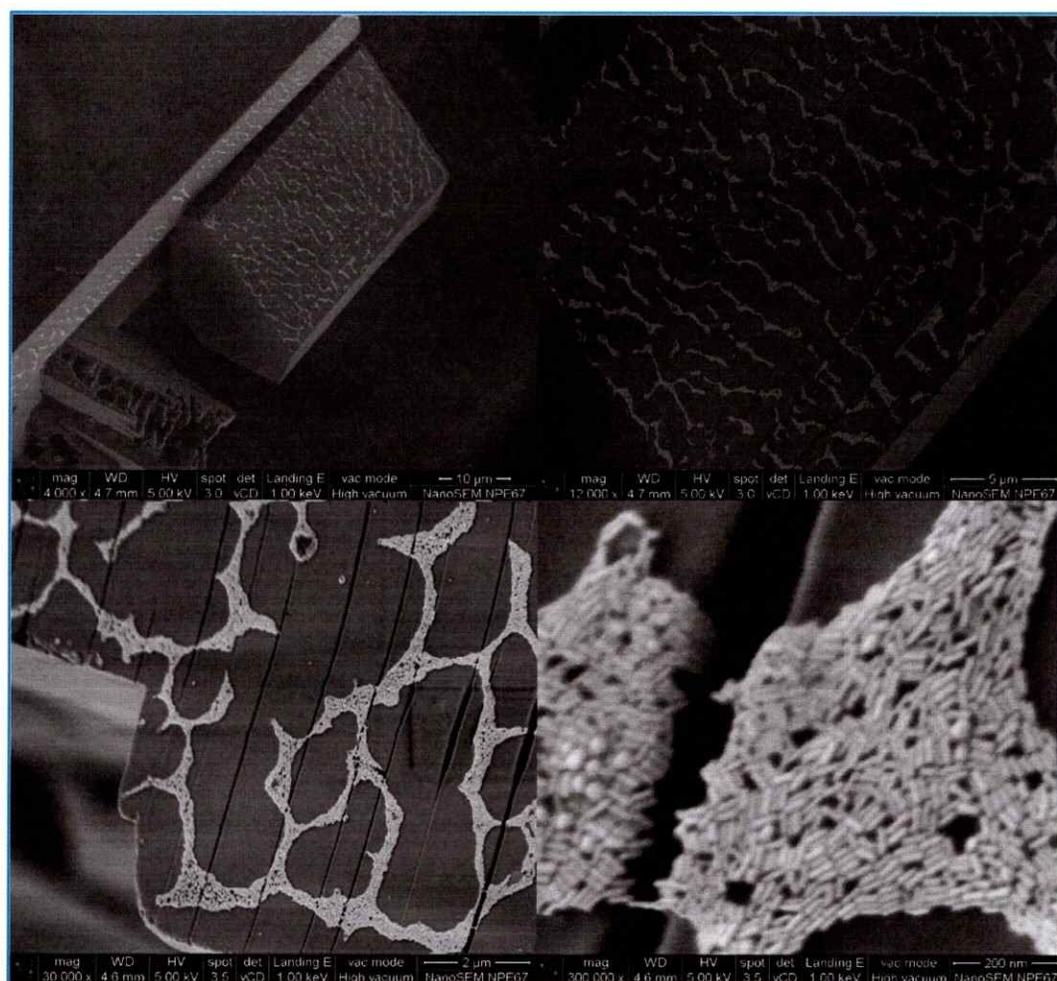
En base a la permanencia de la coloración de los microcristales, es posible establecer una fuerte adsorción de las nanoestructuras sobre las superficies cristalinas de los CI.

El color rosa de los cristales también sería indicativo de una leve o nula agregación de las nanoestructuras de oro al adherirse a las superficies cristalinas.

### *5.3.1. Caracterización mediante microscopía electrónica de barrido de los cristales de compuestos de inclusión de $\alpha$ -ciclodextrina nanodecorados*

Para investigar la nanodecoración selectiva de los cristales de CI de  $\alpha$ -CD/alquiltioles coloreados, estos microcristales fueron caracterizados mediante SEM de alta resolución.

En la Figura 5.12, se muestran cuatro micrografías SEM tomadas sobre la superficie de los cristales del CI de  $\alpha$ -CD/OT nanodecorados con NBsAu. En estas imágenes se observa una decoración preferencial de las caras cristalinas. Este plano preferencial es asumido como el plano {001} en el cual quedan expuestos los grupos funcionales -SH de las moléculas huésped OT, por lo tanto la interacción CI-NBsAu, se atribuye totalmente a una quimisorción de las NBsAu sobre la superficie cristalina, debido a la fuerte interacción S-Au [77].



**Figura 5.12.** Imágenes SEM que muestran la nanodecoración preferencial de los cristales del CI de  $\alpha$ -CD/OT. Al aumentar la magnificación de la imagen, es posible observar en detalle a las NBsAu sobre la superficie de los cristales en el plano específico  $\{001\}$ .

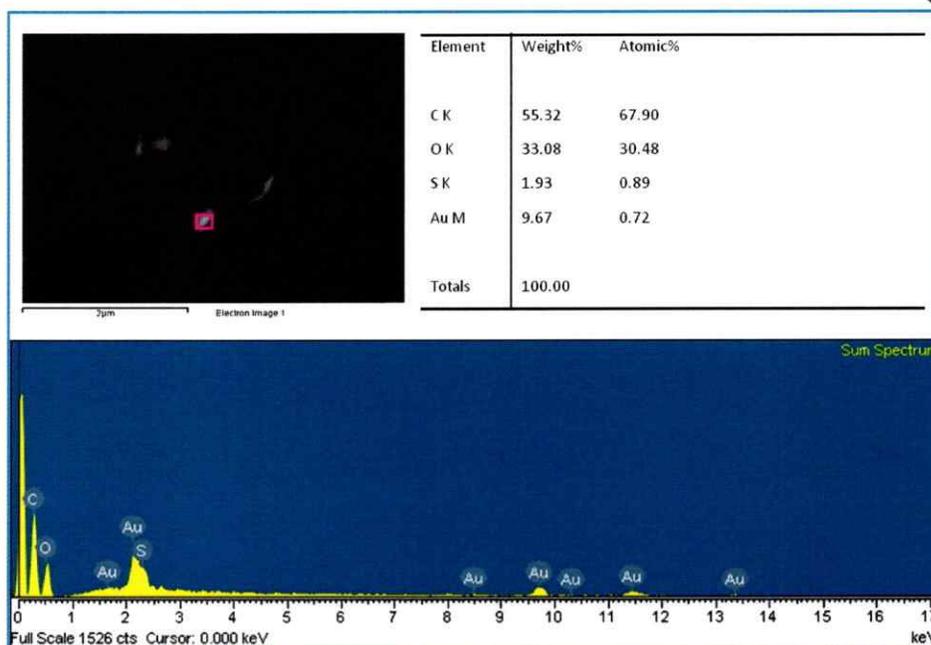
La concentración del surfactante CTAB en la dispersión coloidal de NBsAu es de  $8,19 \times 10^{-4}$  mol/L [77]. Esta concentración es superior a la CMC de CTAB que corresponde a  $4,8 \pm 0,3 \times 10^{-4}$  mol/L [140], por lo tanto, es suficiente para formar una bicapa estabilizadora de las nanoestructuras.

Nikoobakht y El Sayed, han evidenciado la existencia de una bicapa de moléculas de CTAB que rodean a las NBsAu [141]. Estas moléculas pueden ser reemplazadas por otras moléculas estabilizadoras como; surfactantes catiónicos [142], polímeros [143] o péptidos [144] unidos a la superficie de las nanoestructuras por interacciones S-Au.

En la interacción de las NBsAu con la superficie del CI, los grupos -SH de las moléculas huésped que se encuentran expuestas en el plano específico {001}, provocan una disrupción de la bicapa y un subsecuente desplazamiento de las moléculas de CTAB de la superficie de las NBsAu, permitiendo la adhesión de las nanoestructuras a las superficies cristalinas. En la Figura 5.12 se observa un patrón de NBsAu alineadas lateralmente en la superficie del CI, este efecto es probablemente provocado por una cantidad remanente de CTAB en la superficie de las NBsAu, la cual permite la interacción lateral de las moléculas de CTAB tendiendo a un auto-ensamblaje [145].

El depósito de una capa única de NBsAu sobre la superficie cristalina, observado en las imágenes de microscopía, puede ser atribuido a la mayor fuerza de interacción entre el CI y las NBsAu (producida por la interacción S-Au) comparado con las fuerzas de van der Waals entre las moléculas de CTAB que rodean las NBsAu.

Un análisis EDX realizado sobre una zona donde se aprecian las NBsAu sobre la superficie cristalina del CI, muestra la presencia de azufre de los grupos -SH de las moléculas de OT presentes en el CI de  $\alpha$ -CD/OT y el oro correspondiente a la NBsAu (Figura 5.13).



**Figura 5.13.** Composición porcentual y espectro EDX que indica la presencia de carbono, oxígeno y azufre, que forman parte del CI de  $\alpha$ -CD/OT y el Au proveniente de las nanoestructuras.

Este análisis es indicativo de que la nanodecoración selectiva ocurre sobre el plano cristalino donde los grupos  $-SH$  de las moléculas huésped se encuentran hacia el exterior de este plano, asignado como  $\{001\}$ .

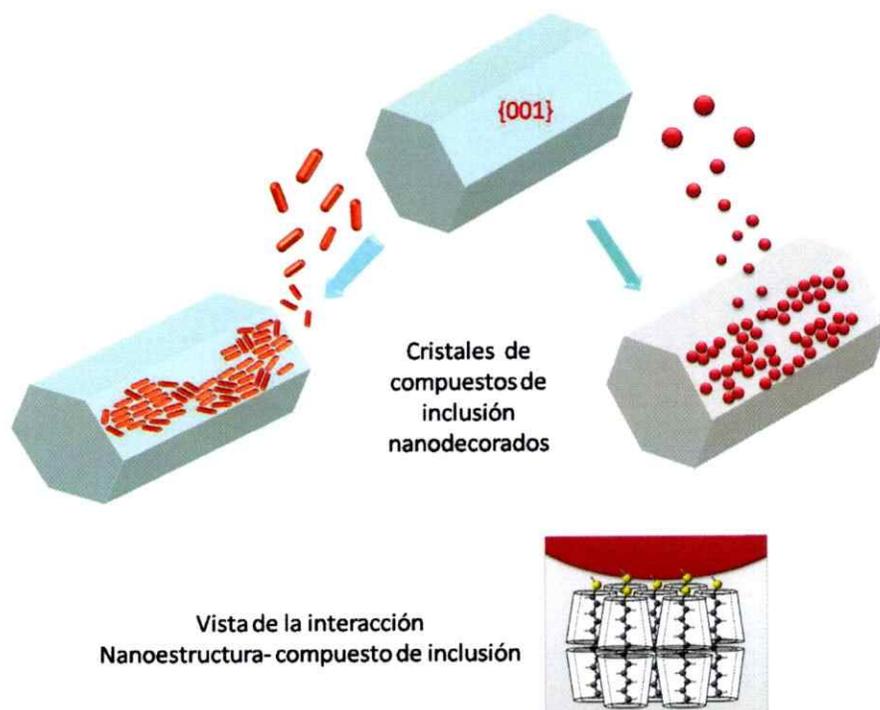
El fenómeno de nanodecoración de los cristales del CI de  $\alpha$ -CD/DDT con NPsAu también fue corroborado por microscopía SEM. Similar a lo reportado en la nanodecoración con NBsAu, en la Figura 5.14 se aprecia una decoración preferencial de las caras laterales del cristal correspondiente al plano cristalino  $\{001\}$ .



**Figura 5.14.** A) y B) Micrografías SEM que muestran la nanodecoración selectiva de cristales de  $\alpha$ -CD/DDT con NPsAu.

Debido al menor tamaño de este tipo de nanoestructuras y las limitaciones del microscopio SEM, no es posible verificar que no existe una aglomeración de las partículas en la superficie, pero cabe destacar que es apreciable el mismo patrón de alineamiento de las NPs sobre la superficie cristalina debido a la cantidad de CTAB remanente en su superficie.

La nanodecoración también sería gobernada por la interacción entre los grupos –SH del huésped DDT presentes en plano {001} del CI de  $\alpha$ -CD al ocurrir el desplazamiento de las moléculas de CTAB que rodean la nanoestructura. Un esquema de la nanodecoración de los CI de  $\alpha$ -CD/alquiltioles con las nanoestructuras de oro se presenta en la Figura 5.15.

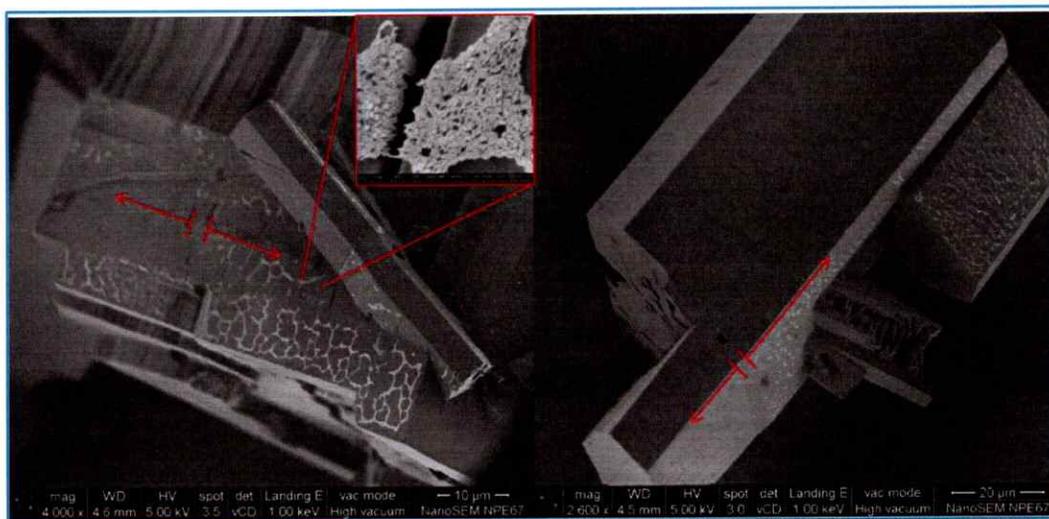


**Figura 5.15.** Esquema de la decoración selectiva de CI de  $\alpha$ -CD/alquiltioles con NBsAu y NPsAu sobre el plano preferencial {001}.

Un aspecto importante observado en las imágenes SEM en la nanodecoración del CI de  $\alpha$ -CD/OT con NBsAu, fue que no sólo se logró identificar el plano específico {001} de los cristales de CI gracias a la nanodecoración selectiva, sino que también este procedimiento permitió revelar la existencia de maclas cristalinas (ver Figura 5.16).

En el Capítulo 3, el cual aborda la caracterización de los CI de  $\alpha$ -CD, no se tenía certeza de la naturaleza monocristalina de los cristales del CI de  $\alpha$ -CD/OT, debido a que su resolución cristalina mediante DRX de monocristal resultó dificultosa.

En la nanodecoración del CI de  $\alpha$ -CD/OT con NBsAu, las imágenes SEM revelan una decoración delimitada, aparentemente en el mismo plano del microcristal. En la Figura 5.16 se resaltan estas zonas con una flecha roja, la cual indica los dos sentidos en que, en un mismo plano observado en la micrografía, ocurre una nanodecoración segmentada.



**Figura 5.16.** Micrografías SEM que detallan la identificación de maclas cristalinas en los microcristales del CI de  $\alpha$ -CD/OT.

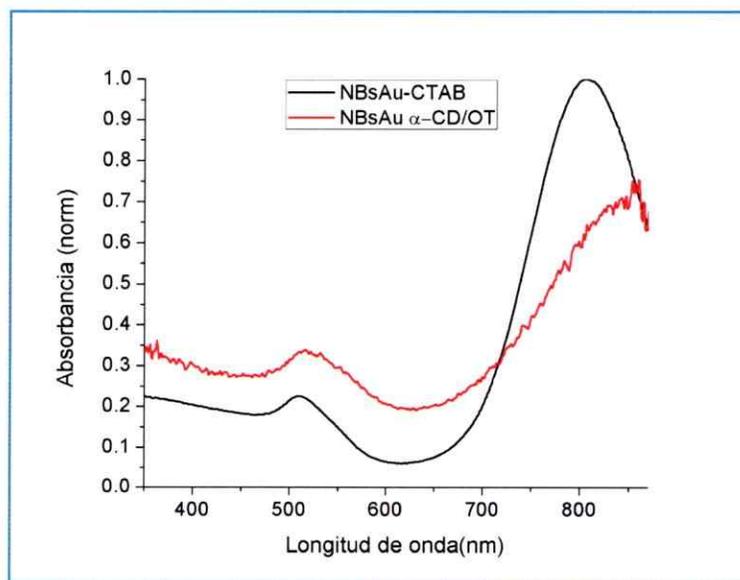
Debido a que la fijación de las nanoestructuras metálicas ocurre únicamente en el plano cristalino  $\{001\}$ , es posible deducir que los microcristales del CI de  $\alpha$ -CD/OT no corresponden a monocristales sino que, a la unión de varios monocristales, formando maclas.

### 5.3.2. Caracterización mediante espectrofotometría UV-visible de los compuestos de inclusión nanodecorados

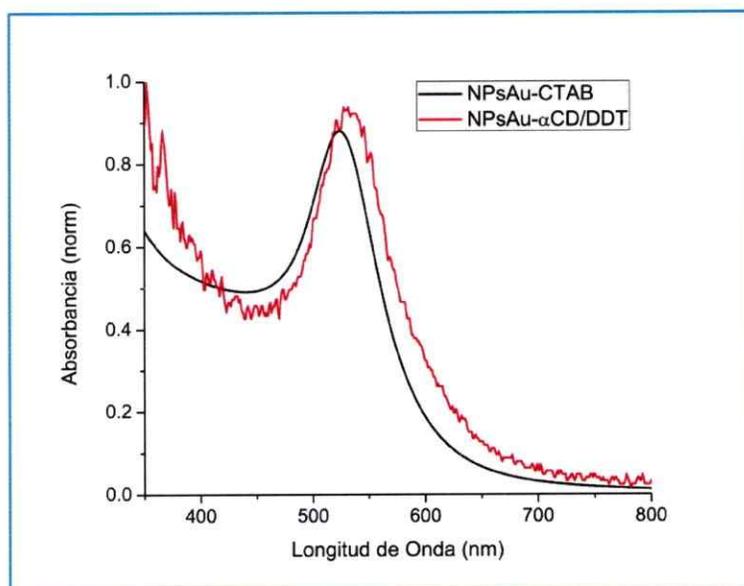
Los cristales de los CI de  $\alpha$ -CD/alquiltioles nanodecorados, fueron caracterizados mediante espectroscopía UV-vis-NIR en estado sólido.

Debido a que los cristales de CI son transparentes a la luz, solamente fue adquirida la o las bandas de absorción de la RPS presentada por las nanoestructuras en la superficie de los cristales.

En las Figuras 5.17 y 5.18 se muestran los espectros de absorción para las NBsAu y NPsAu adheridas a los microcristales de CI de  $\alpha$ -CD/OT y  $\alpha$ -CD/DDT, respectivamente. En cada uno de los espectros se realiza una comparación con las absorciones de las nanoestructuras presentadas en la dispersión coloidal.



**Figura 5.17.** Comparación de los espectros UV-visible de las NBsAu en; la dispersión coloidal (línea negra) y sobre el CI de  $\alpha$ -CD/OT (línea roja).



**Figura 5.18.** Espectros UV visible de la dispersión de NPsAu-CTAB (línea negra) y de las NPsAu sobre la superficie del CI de  $\alpha$ -CD/DDT (línea roja).

Al comparar los espectros de absorción de las nanoestructuras en la dispersión coloidal y luego, cuando se encuentran depositadas sobre los CI, se aprecia claramente un desplazamiento batocrómico tanto, de la absorción de RPS de las NPsAu como para la absorción de RPS de las NBsAu.

El espectro de absorción de las NPsAu sobre los cristales de CI de  $\alpha$ -CD/DDT es desplazado desde 524 a 532 nm y las absorciones correspondientes a las secciones transversal y longitudinal de las NBsAu sobre los cristales de CI de  $\alpha$ -CD/OT, presentaron desplazamientos batocrómicos desde 510 a 520 nm y de 800 a 850 nm de longitud de onda, respectivamente. Los desplazamientos de las absorciones hacia mayores longitudes de onda son atribuidos principalmente al acoplamiento de las

oscilaciones dipolares, provocado por la menor distancia interpartícula. Las nanoestructuras que decoran la superficie cristalina se encuentran más próximas unas de otras, por lo que los electrones resonantes de cada partícula, perciben el campo eléctrico generado por la oscilación electrónica de la partícula vecina, generando un efecto de RPS colectivo [139, 146, 147].

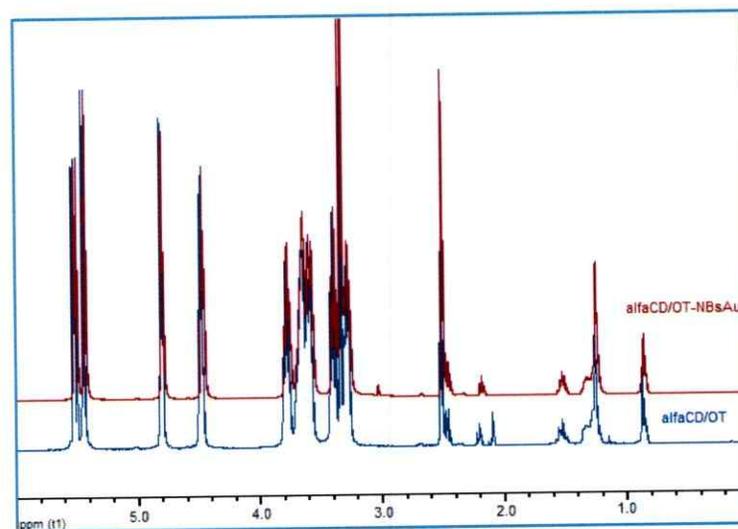
El nulo ensanchamiento de la señal de absorción, en el espectro de absorción de las NPsAu, da cuenta de que no existe una agregación de las partículas sobre las superficies cristalinas, que altere su morfología o propiedades ópticas iniciales. En el espectro de absorción correspondiente a las NBsAu, sólo se aprecia un ensanchamiento de la señal de absorción perteneciente a la RPS de la sección longitudinal de las NBs debido al ensamblaje lateral de las NBs sobre la superficie cristalina.

La no agregación de las NBsAu sobre la superficie cristalina del CI de  $\alpha$ -CD/OT fue comprobada en las imágenes de microscopía SEM (Figura 5.12). En el caso de las NPsAu adheridas a la superficie del CI de  $\alpha$ -CD/DDT, no es claro evidenciar una agregación de las partículas mediante microscopía SEM, pero debido a que no se observa un ensanchamiento de la señal en el espectro UV-visible, se deduce que tampoco existe una agregación.

### 5.3.3. Análisis de resonancia magnética nuclear de protones de los compuestos de inclusión nanodecorados

Una información detallada a cerca de la interacción de las nanoestructuras de oro con los CI de  $\alpha$ -CD/alquiltioles puede obtenerse mediante RMN- $^1\text{H}$  en solución. Una pequeña cantidad de los microcristales decorados fue disuelta para el análisis de RMN- $^1\text{H}$ . Estos resultados pueden ser extrapolados a lo que ocurre en estado sólido, ya que se ha observado que los CI conservan su integridad y estructura básica en solución.

Cada espectro de RMN- $^1\text{H}$  de los CI, interactuando con las nanoestructuras de oro, fue comparado con su respectivo espectro antes de ser nanodecorado. Las Figuras 5.19 y 5.20 muestran los espectros de RMN- $^1\text{H}$  para los CI de  $\alpha$ -CD/OT-NBsAu y  $\alpha$ -CD/DDT-NPsAu, respectivamente. Las Tablas 5.3, 5.4, 5.5 y 5.6, dan cuenta de los desplazamientos químicos de las moléculas de  $\alpha$ -CD y de los huéspedes OT y DDT presentes en los CI, antes y después de interactuar con las nanoestructuras metálicas.



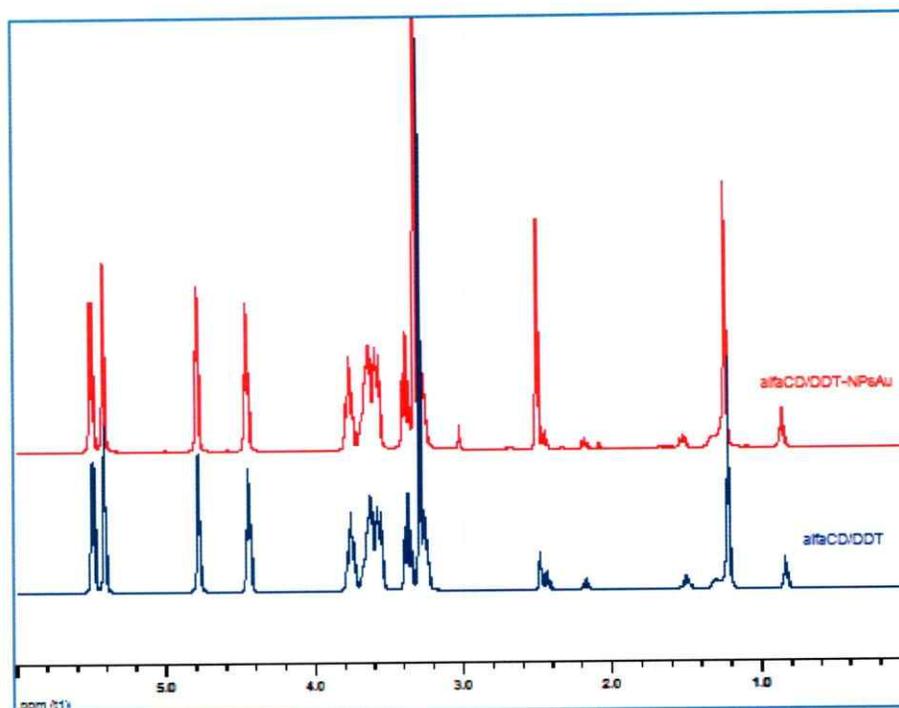
**Figura 5.19.** Espectros de RMN- $^1\text{H}$  del CI de  $\alpha$ -CD/OT (azul) y del CI interactuando con NBsAu (rojo).

**Tabla 5.3.** Desplazamientos químicos de las señales de la molécula de OT en el CI, antes y luego de la nanodecoración.

Señal	$\alpha$ -CD/OT (ppm)	$\alpha$ -CD/OT-NBsAu (ppm)	$\Delta \delta$ (ppm)
-CH <sub>3</sub>	0,857	0,857	0,000
-CH <sub>2</sub>	1,324	1,323	0,001
(-CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	1,245	1,245	0,000
-CH <sub>2</sub>	1,522	1,522	0,000
-CH <sub>2</sub>	2,456	2,456	0,000
-SH	2,192	2,177	0,015

**Tabla 5.4.** Desplazamientos químicos de las señales de la molécula de  $\alpha$ -CD en el CI, antes y después de la nanodecoración.

Señal	$\alpha$ -CD/OT (ppm)	$\alpha$ -CD/OT-NBsAu (ppm)	$\Delta \delta$ (ppm)
-H(1)	4,470	4,466	0,004
-H(2)	3,274	3,276	0,002
-H(3)	3,769	3,769	0,000
-H(4)	3,385	3,385	0,000
-H(5)	3,581	3,582	0,001
-H(6)	3,638	3,640	0,002
Hidroxilo primario -OH(6)	4,795	4,795	0,000
Hidroxilos secundarios -OH(2) y -OH(3)	5,429	5,427	0,002
	5,509	5,504	0,005



**Figura 5.20.** Espectros de RMN-<sup>1</sup>H del CI de  $\alpha$ -CD/DDT (azul) y del CI interactuando con NPsAu (rojo).

**Tabla 5.5.** Comparación de los desplazamientos químicos de las señales pertenecientes a la molécula huésped DDT en el CI, antes y después de la nanodecoración.

Señal	$\alpha$ -CD/DDT (ppm)	$\alpha$ -CD/DDT-NPsAu(ppm)	$\Delta \delta$ (ppm)
-CH <sub>3</sub>	0,855	0,854	0,001
-CH <sub>2</sub>	1,321	1,319	0,002
(-CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub>	1,239	1,237	0,002
-CH <sub>2</sub>	1,521	1,521	0,000
-CH <sub>2</sub>	2,456	2,456	0,000
-SH	2,189	2,177	0,012

**Tabla 5.6.** Comparación de los desplazamientos químicos de las señales pertenecientes a la molécula de  $\alpha$ -CD en el CI, antes y después de la nanodecoración.

Señal	$\alpha$ -CD/DDT (ppm)	$\alpha$ -CD/DDT-NPsAu (ppm)	$\Delta \delta$ (ppm)
-H(1)	4,460	4,464	0,004
-H(2)	3,276	3,276	0,000
-H(3)	3,771	3,770	0,001
-H(4)	3,387	3,386	0,001
-H(5)	3,584	3,583	0,001
-H(6)	3,640	3,640	0,002
<b>Hidroxilo primario -OH(6)</b>	4,796	4,796	0,000
<b>Hidroxilos secundarios - OH(2) y -OH(3)</b>	5,425 5,502	5,425 5,502	0,000 0,000

En los espectros de RMN-<sup>1</sup>H tomados para cada CI después de la nanodecoración, no fue posible detectar señales correspondientes a la molécula del surfactante CTAB (ver Anexo II, Figura S19), ya que este compuesto sólo se encontraba a nivel de trazas. Este resultado indica una gran pérdida del surfactante que rodeaba a las nanoestructuras de oro, confirmando su desplazamiento provocado por la mayor interacción entre el CI y las nanoestructuras.

A partir de los datos reportados en las Tablas 5.3, 5.4, 5.5 y 5.6, se deduce que la integridad de los CI permanece intacta después de la nanodecoración ya que, la variación de los desplazamientos químicos de las señales pertenecientes a los protones de las moléculas de  $\alpha$ -CD y de los huéspedes OT y DDT, son prácticamente nulas.

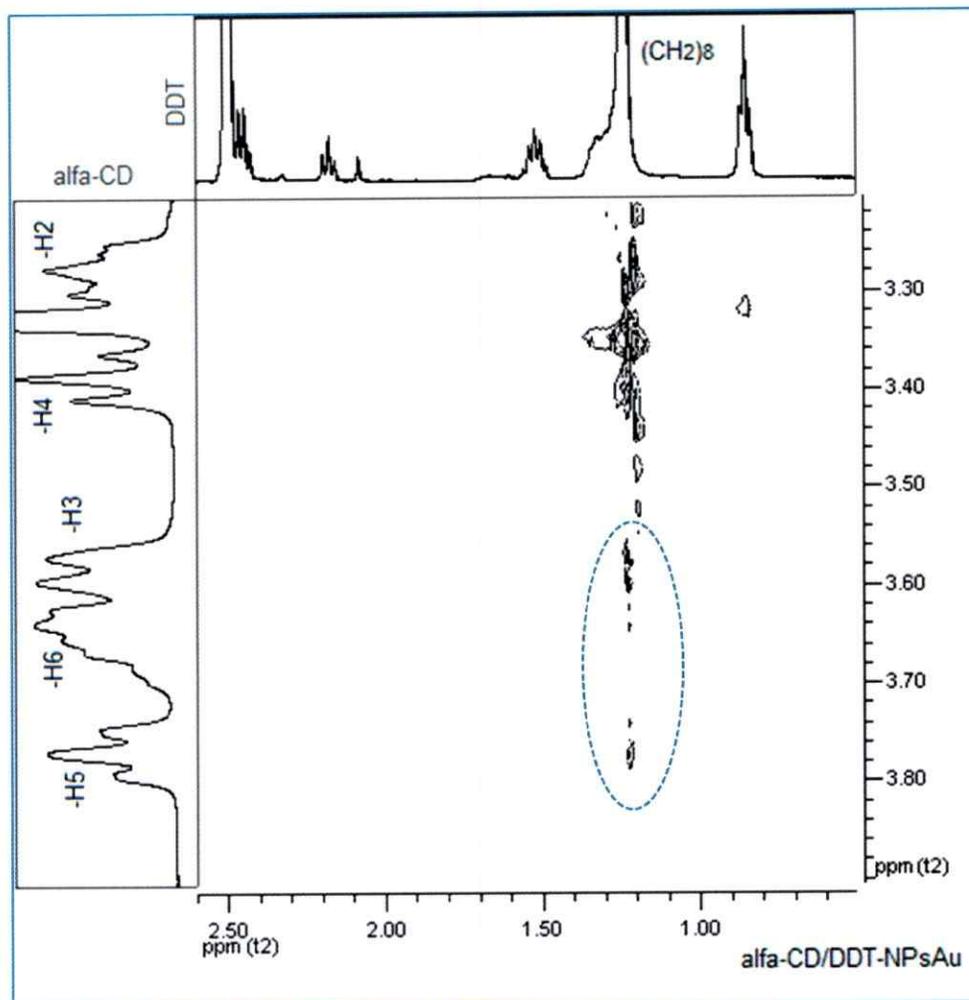
Un cambio leve, pero notable en comparación con el resto de los resultados, es una variación  $> 0,010$  ppm en el desplazamiento químico detectado para las señales correspondientes a los átomos de hidrógeno de los grupos  $-SH$  de las moléculas huésped. Estas señales son desplazadas hacia mayores campos presumiblemente, debido a la interacción entre los grupos  $-SH$  y las nanoestructuras de oro.

Las NBsAu y NPsAu poseen una alta densidad electrónica que provoca un efecto de apantallamiento de la señal del protón correspondiente al grupo  $-SH$ . Esta es una evidencia inequívoca de que la interacción entre las nanoestructuras metálicas y los CI está gobernada por la interacción S-Au. Interacción que se conserva en solución.

La fuerte interacción entre el grupo  $-SH$  de los CI de  $\alpha$ -CD/alquiltioles y las NPsAu también ha sido estudiada mediante DRXP. Barrientos y col., verificaron la migración de los huéspedes OT, DT y DDT, hacia el exterior del plano cristalino  $\{001\}$  de los cristales de CI, debido a la interacción de los grupos  $-SH$  de las moléculas huéspedes y las NPsAu. Este fenómeno recibe el nombre de “tropismo metálico” y es evidenciado por un aumento en los parámetros de la red cristalina, especialmente en el eje c [148].

En solución, el fenómeno de “tropismo metálico” también puede comprobarse mediante un análisis de espectroscopia RMN- $^1H$  bidimensional ROESY (espectroscopía de correlación homonuclear), el cual entrega información acerca de la interacción manifiesta entre los núcleos que se encuentran más cercanos entre sí. En la Figura 5.21,

se presenta una sección amplificada del espectro ROESY para el CI de  $\alpha$ -CD/DDT al interactuar con las NPsAu.



**Figura 5.21.** Espectro ROESY del CI de  $\alpha$ -CD/DDT interaccionando con NpsAu. La sección de líneas segmentadas indica la correlación entre las señales de los hidrógenos de la cadena alifática del huésped y los hidrógenos -H(3) y -H(5) de la molécula de  $\alpha$ -CD.

En el espectro bidimensional ROESY de la Figura 5.21, se indica en una zona segmentada, la correlación entre las señales de los protones de la cadena alifática de la

molécula huésped DDT y los hidrógenos -H(3) y -H(5) que se encuentran al interior de la cavidad de las moléculas de  $\alpha$ -CD. Esta cercanía entre los núcleos verifica la permanencia de la estructura del CI de  $\alpha$ -CD/DDT en solución, cuando interactúa con las NPsAu. Cabe destacar que estas señales están disminuidas con respecto a las señales de correlación con los protones -H(4) y -H(2) que se orientan al exterior de la cavidad de la molécula de  $\alpha$ -CD. Esto hecho podría corresponder a la fuerte interacción entre la molécula huésped del CI y las NPsAu, permitiendo un movimiento de la molécula huésped hacia el exterior de la matriz, cuando el CI se encuentra interaccionando con la NPsAu en solución.

El experimento permite concluir que la interacción S-Au gobierna el proceso de nanodecoración, al corroborar que molécula huésped actúa como un *pivote* o *eje mecánico*, saliendo hacia el exterior del canal de moléculas de  $\alpha$ -CD, debido a la cercanía de la nanopartícula metálica (ver Figura 5.15).

# **CAPÍTULO 6**

## **Resultados y Discusiones**

“Formación de estructuras unidimensionales;

Nanodecoración de fibras amiloides”

### **6.1. Obtención de nanoestructuras unidimensionales basadas en moldes**

Las nanoestructuras unidimensionales (1D) como NBs, nanotubos (NTs) y nanoalambres (NAs), han recibido un gran interés científico debido a que ofrecen un buen modelo para investigar la dependencia del transporte eléctrico y propiedades mecánicas a medida que disminuye el tamaño de los materiales. Esto convierte a las nanoestructuras 1D en excelentes candidatos para la manufactura de dispositivos de tamaño nanométrico [149].

Un método sencillo para la fabricación de nanoestructuras 1D es la técnica basada en templados o moldes. En esta técnica, la nanoestructura preparada dentro o alrededor del molde utilizado, adopta una morfología que es complementaria a este molde [150].

Existen variados tipos de moldes que han sido utilizados ampliamente en la formación de estructuras 1D, tales como; sustratos sólidos con superficies escaladas [151], canales de membranas porosas [152], estructuras formadas a partir del autoensamblaje de moléculas tensioactivos [153], moléculas biológicas [154], etc.

En algunos de los procedimientos utilizados, cuando el molde se encuentra unido físicamente a la nanoestructura formada, para obtener finalmente las nanoestructuras 1D, es necesario el uso de tratamientos post-síntesis para la eliminación del sustrato, como por ejemplo, un ataque químico o calcinación [149].

Genaro y col., han reportado la preparación de NAs de Cu por reducción electroquímica en canales de membranas de alúmina. El soporte de alúmina es retirado químicamente mediante dos métodos; utilizando una solución ácida de  $H_3PO_4$  y adicionando una solución básica concentrada de NaOH [155].

Por otro lado, las nanoestructuras 1D también pueden ser utilizadas como moldes para generar otras nanoestructuras 1D. Fullam y col., han informado la utilización de nanotubos de carbono como moldes para el autoensamblaje de NPsAu sobre su superficie. Posteriormente, un tratamiento térmico de los NTs decorados, condujo a la formación de NAs de Au policristalinos de longitudes micrométricas [156]

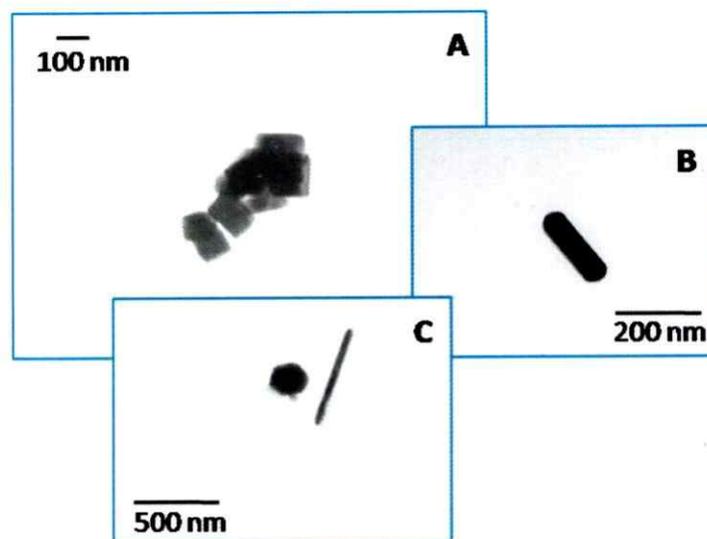
## **6.2. Preparación de nanoestructuras a partir del tratamiento térmico de nanopartículas metálicas adheridas a la superficie cristalina de los compuestos de inclusión**

Los CI de  $\alpha$ -CD con huéspedes alquílicos, ofrecen una superficie apta para la adhesión e inmovilización de NPs metálicas sobre el plano cristalino {001} a través de la interacción de las NPs con los grupos funcionales que quedan expuestos en este plano.

Estos sistemas nanosupramoleculares pueden utilizarse como precursores para la generación de nanoestructuras 1D a través de un tratamiento térmico en el que, al aplicar altas temperaturas (800°C) se produce la coalescencia de las NPs metálicas, originando NBs o NAs, con la eliminación simultánea del sustrato orgánico por combustión del mismo.

Para demostrar esta hipótesis, sistemas nanosupramoleculares formados por CI de  $\alpha$ -CD/alquiltioles con NPsNi y NPsCo, preparadas sobre la superficie cristalina mediante PCV, fueron sometidos a un tratamiento térmico. Las muestras sólidas fueron introducidas en un crisol de Pt y llevadas a una mufla a 800°C (a una velocidad de

calentamiento de 10°C/min). Las nanoestructuras resultantes fueron caracterizadas mediante microscopía TEM, tal como se muestra en la Figura 6.1.



**Figura 6.1.** Nanoláminas y nanobarras de Co/OCo (A) y Ni/ONi (B, C) obtenidas luego del tratamiento térmico de los CI con NPs adheridas.

En la Figura 6.1, se aprecian las nanoestructuras metálicas obtenidas luego del tratamiento térmico, las que presentan formas de nanoláminas (NLs) cuadradas (Figura 6.1 A), NBs (Figuras 6.1 B y C) y NLs hexagonales (Figura 6.1 C). Si bien, la hipótesis para la obtención de NBs metálicas a través del tratamiento térmico realizado a los sistemas nanosupramoleculares ha sido comprobada, también se obtuvieron nanoestructuras bidimensionales debido a la coalescencia de las NPs que se encuentran ordenadas sobre las superficies de los cristales de CI.

La producción de NBs y NLs a través de este método, no tiene una tendencia mayoritaria hacia la obtención de un solo tipo de nanoestructuras. Por lo tanto, como

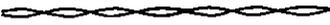
método alternativo para la preparación de nanomateriales 1D, se desarrolló una estrategia a través de la formación de materiales híbridos bio-inorgánicos.

### **6.3. Materiales híbridos bio-inorgánicos**

Una reciente área de investigación en la construcción de materiales 1D a través de una estrategia “de abajo hacia arriba”, es la utilización de moléculas biológicas unidas a materiales inorgánicos, para la obtención de nuevos materiales híbridos bio-inorgánicos con propiedades útiles en tecnologías ópticas [157] y electrónicas [158].

Las moléculas biológicas son excelentes candidatos para la obtención de sistemas híbridos bio-inorgánicos 1D, debido a que poseen la capacidad de autoensamblarse mediante el reconocimiento molecular formando sistemas con dimensiones y formas adecuadas para ser utilizadas como moldes para la fabricación y organización de nanoestructuras [159, 160].

Estas interesantes características las convierten en atractivos materiales para la generación de NAs y nanocircuitos, útiles en la manufacturación de dispositivos nanométricos. En la Figura 6.2, se muestran ejemplos de moléculas biológicas con dimensiones y propiedades adecuadas para convertirse en moldes para la generación de materiales bio-inorgánicos 1D.

ADN		2 nm
Fibra amiloide		7-10 nm
Filamento de actina		7 nm

**Figura 6.2.** Representación de algunas biomoléculas adecuadas para ser utilizadas como moldes en la fabricación de materiales híbridos 1D (Imagen extraída de la referencia [160]).

Existen variados reportes de la utilización de biomoléculas como moldes para la generación de nanomateriales 1D o materiales bio-inorgánicos. Una de las metodologías utilizadas para su fabricación es la metalización. Debido a que muchas moléculas biológicas pueden acomplejar iones metálicos en su superficie, estos iones son reducidos posteriormente *in situ*, generando los materiales híbridos [161].

En base a esta técnica, se ha reportado la preparación de materiales bio-inorgánicos 1D compuestos por; Cu [162], Pd [163, 164], Pt [165, 166], Ag [167, 168], Au [169], Co [170], Ni [171] y NiO [172] utilizando ADN como molécula molde. Investigadores también han informado la utilización de virus y péptidos capaces de formar estructuras microtubulares donde, a partir de la reducción de los iones metálicos dentro del canal, se han obtenido NAs de Ni, Co, Ag y Au [173-175].

Otra técnica utilizada para la preparación de materiales híbridos bio-inorgánicos es la incorporación directa de NPs metálicas en los biomateriales [176-178]. Recientemente, Li y col., han informado la formación de arreglos lineales de NPs de

BaWO<sub>4</sub> sobre moléculas de ADN [179]. Por otro lado, Patolsky y col., han reportado la formación de un material híbrido formado por NPsAu funcionalizadas con moléculas capaces de intercalarse en la estructura helicoidal de las moléculas de ADN [180].

Estructuras fibrilares decoradas con NPs también han recibido una gran atención por sus características de flexibilidad, estabilidad y dimensiones adecuadas para su utilización en dispositivos. Por ejemplo, Li y col. han diseñado una nueva estrategia utilizando microorganismos como moldes, al preparar fibras del hongo *Aspergillus niger* con NPsAu funcionalizadas con pequeños fragmentos de ADN, las cuales se incorporan en las células del hongo formando una estructura fibrilar [181]. Filamentos de actina [182] y fibras de polianilina [183] también han sido decorados con NPsAu, mostrando excelentes propiedades conductoras.

En general, la naturaleza nos ofrece múltiples ejemplos de ensamblaje para la construcción de nanoestructuras supramoleculares con alta precisión [184]. Un ejemplo interesante, y que preocupa desde el punto de vista patológico, es la formación de cúmulos de estructuras fibrilares amiloides presentes en enfermedades como el Parkinson, la diabetes tipo II y la enfermedad de Alzhèimer [185, 186]. Estas enfermedades se caracterizan por la transformación de las proteínas solubles en agregados fibrilares depositados en diferentes órganos y tejidos [187].

Las fibras del péptido  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ), pueden ser fácilmente reproducidas en sistemas *in vitro*, lo que ha permitido analizar su estructura mediante técnicas como microscopía de fuerza atómica (AFM) [188], DRX [189] y RMN en estado sólido [190].

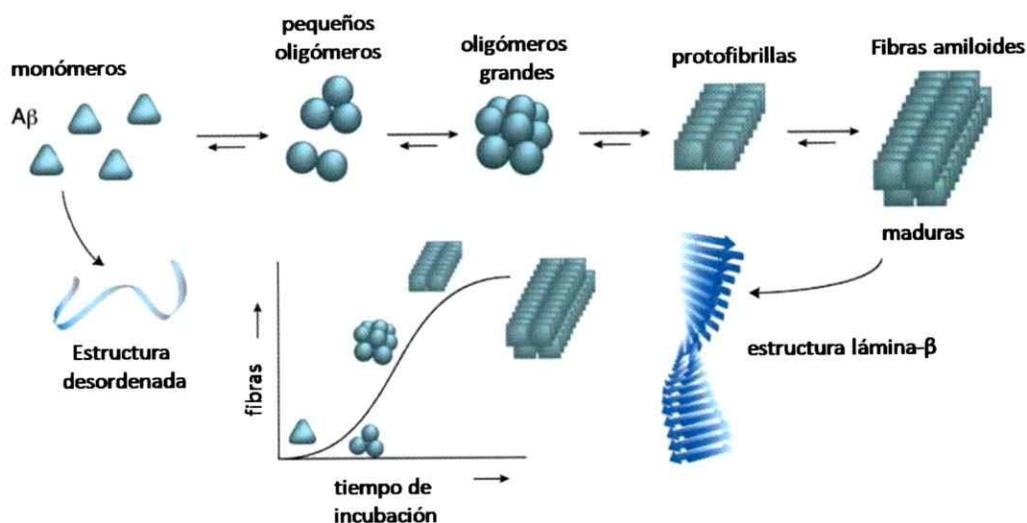
Los análisis indican la presencia de una estructura de láminas- $\beta$  paralelas a lo largo de las fibras, formadas a través de interacciones intermoleculares por; puentes de hidrógeno, de tipo van der Waals e interacciones aromáticas  $\pi$ - $\pi$  [191], dando lugar a especies con una morfología y dimensiones adecuadas para ser utilizadas como moldes en la manufactura de estructuras nanométricas, útiles en la industria electrónica [192].

Scheibel y col., han construido NAs híbridos formados por estructuras amiloides decoradas con NPsAu para la fabricación de dispositivos nanoelectrónicos. Un segmento de la proteína amiloide de la levadura *Saccharomyces cerevisiae Sup35* que forma estructuras fibrilares, fue modificada genéticamente para incluir residuos de cisteína en la secuencia peptídica. Estos residuos fueron utilizados para unir NPsAu a lo largo de las fibras autoensambladas, produciendo nanocables conductores [193].

#### **6.4. El péptido $\beta$ -amiloide**

El péptido A $\beta$  es uno de los principales componentes de los cúmulos insolubles fibrilares, denominados placas seniles, presentes en pacientes que padecen de la enfermedad neurodegenerativa de Alzhèimer [194]. El origen del péptido surge de la degradación de la proteína transmembrana precursora amiloide por la acción de las enzimas  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasa, generando péptidos formados por 40 (A $\beta_{1-40}$ ) y 42 (A $\beta_{1-42}$ ) aminoácidos, respectivamente. Este último, ha presentado una mayor tendencia a la formación de estructuras fibrilares y se encuentra mayoritariamente en las placas seniles [195, 196]. Los monómeros generados, sufren procesos de cambios conformacionales a

una estructura de láminas- $\beta$  y se autoensamblan para dar lugar a la formación de especies fibrilares [197]. Un esquema del proceso de formación de las fibras amiloides se muestra en la Figura 6.3.

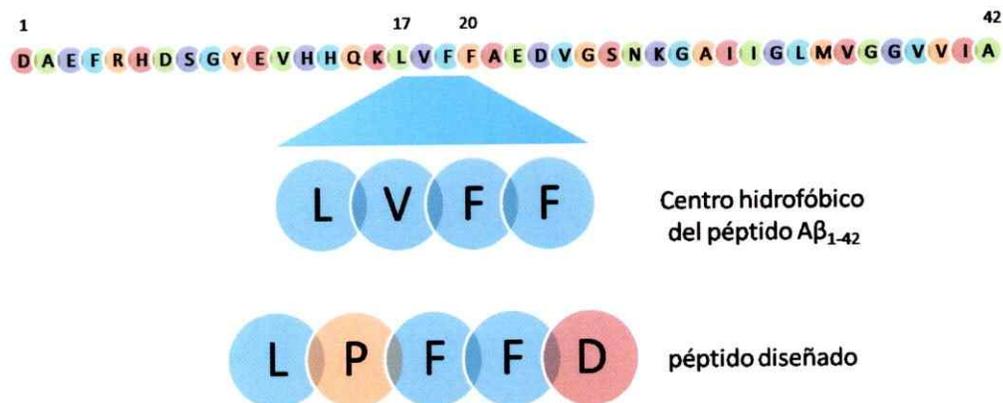


**Figura 6.3.** Esquema representativo del proceso de formación de fibras amiloides a partir de los monómeros del péptido A $\beta_{1-42}$  (modificada de la referencia [197])

El proceso de formación de las fibras amiloides señalado en la Figura 6.3, se inicia con la presencia de monómeros, los cuales presentan una estructura desordenada. Le siguen en la formación, la presencia de intermediarios como oligómeros pequeños (dímeros, trímeros, tetrameros), oligómeros de mayor tamaño y protofibrillas, los que han sido reportados por diversos autores [188, 198, 199]. Los oligómeros poseen una estructura similar a la de las micelas, con formas cilíndricas o esféricas, presentando tamaños que oscilan entre 2 a 15 nm de diámetro. Las protofibrillas son agregados de

forma lineal, que en conjunto con los oligómeros son considerados como “bloques de construcción” para la formación de fibras amiloides [200]. Al igual que los oligómeros, las protofibrillas no presentan una estructura secundaria bien definida [201].

Posteriormente, el autoensamblaje de estas estructuras conduce a la formación de filamentos con un diámetro entre 3 y 5 nm los cuales poseen una estructura de lámina- $\beta$  bien definida. Un conjunto pequeño de estos filamentos (2-6 filamentos) da origen a la obtención de fibras maduras con diámetros entre 7 y 10 nm y largos micrométricos [201, 202].



**Figura 6.4.** Esquema de la secuencia del péptido  $A\beta$ , donde se destaca el núcleo hidrofóbico constituido por los aminoácidos LVFF y el péptido diseñado de secuencia similar LPFFD, el cual reconoce selectivamente los agregados amiloides.

La Figura 6.4 muestra la secuencia de 42 aminoácidos que conforman el péptido  $A\beta_{1-42}$ . La sección entre los aminoácidos 17 y 20 (LVFF) es reconocida como un centro

hidrofóbico de nucleación, esencial en el proceso de autoensamblaje para la formación de las fibras amiloides [197]. Soto y col., diseñaron el péptido LPFFD el cual posee una secuencia similar a este centro hidrofóbico y por lo tanto, reconoce selectivamente al péptido amiloide. El residuo de valina (V) fue sustituido por el aminoácido prolina (P) debido a su conocida acción como bloqueador de la estructura lámina- $\beta$  y un residuo de ácido aspártico (D) fue adicionado al final de la secuencia para otorgar mayor solubilidad [118].

La secuencia del péptido LPFFD ha sido modificada por Kogan y col., al agregar un residuo de cisteína (C) al inicio de la secuencia [120, 203, 204]. Esta estrategia permitió funcionalizar NPsAu a través de la interacción Au-S, permitiendo la unión específica de los conjugados NPs-péptido, hacia los agregados fibrilares del péptido  $A\beta_{1-42}$ . Posteriormente, un calentamiento local provocado al irradiar con microondas los conjugados unidos a los agregados amiloides, permitió la desagregación de las estructuras fibrilares del péptido  $A\beta_{1-42}$ , reportando la obtención de dímeros, trímeros y pequeñas fibras amiloides [120].

#### **6.5. Nanodecoración de las fibras del péptido $\beta$ -amiloide con nanopartículas de oro funcionalizadas con el péptido CLPFFD**

La unión selectiva de las NPsAu funcionalizadas con el péptido CLPFFD, hacia las fibras del péptido  $A\beta_{1-42}$  [120], permitió postular el uso de este conjugado como una

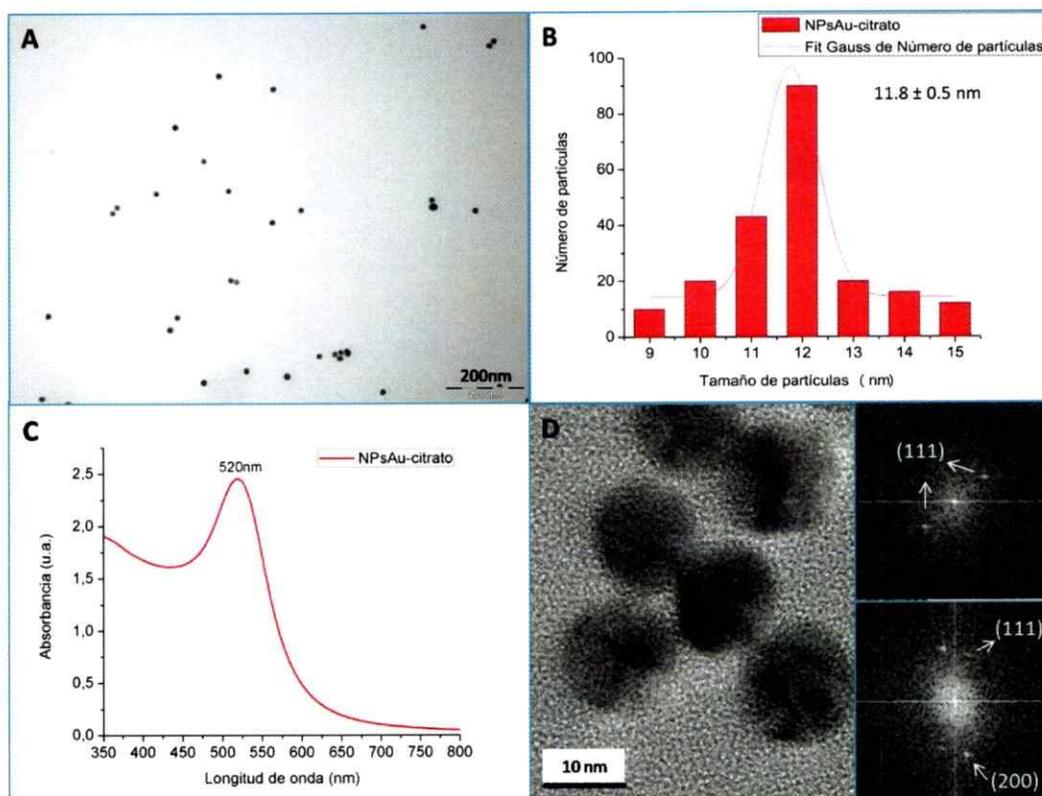
posible estrategia para la fabricación de materiales bio-inorgánicos 1D, los cuales podrían conducir a la formación de NBs o NAs.

En el siguiente apartado se presentan los resultados de la síntesis y caracterización de los conjugados NPs-péptido y de los métodos utilizados para encontrar la óptima preparación de las fibras amiloides nanodecoradas.

#### *6.5.1. Preparación y funcionalización de nanopartículas de oro*

La síntesis de NPsAu fue llevada a cabo mediante el reconocido método de reducción y estabilización con citrato (ver Capítulo 2, sección 2.4.4.1). Para la caracterización de las partículas fueron empleadas las técnicas de microscopía TEM, HRTEM y espectroscopía UV-visible.

En la Figura 6.5 A, se presenta una imagen TEM de las NPsAu estabilizadas con citrato (NPsAu-citrato). Se aprecia una vista general de la muestra en la que se detecta una forma esférica para las partículas, con una homogénea distribución de tamaño. El tamaño promedio registrado en el histograma reportado en la Figura 6.5 B fue de  $11,8 \pm 0,5$  nm de diámetro.



**Figura 6.5.** Caracterización de NPs Au estabilizadas en citrato; imagen TEM (A), histograma de dispersión de tamaño ( $n=200$ ) (B), espectro UV-visible (C) e imagen HRTEM con el patrón de difracción de electrones simulado para las NPs (D).

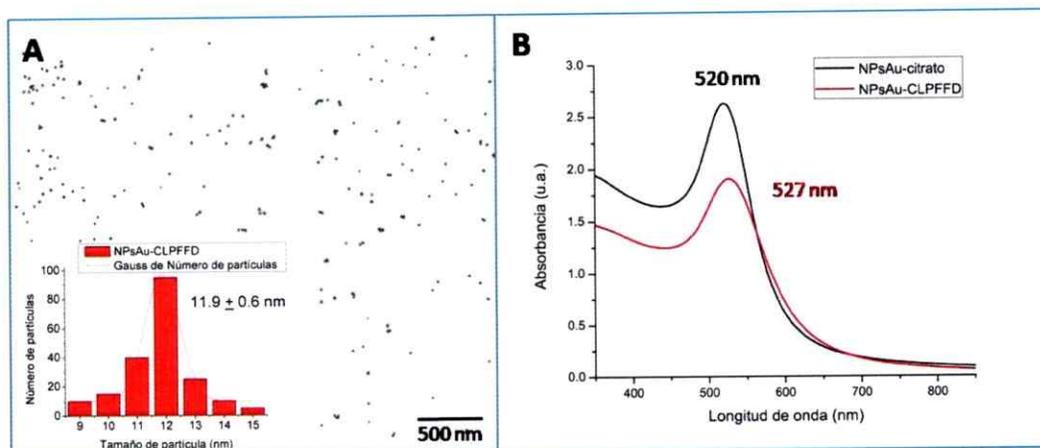
La observación mediante microscopía HRTEM de partículas escogidas al azar, permitió identificar una forma icosaédrica de las NPs Au. Al realizar el patrón de difracción de electrones simulado sobre estas imágenes de microscopía, se reportaron con gran frecuencia las distancias interplanares de 0,235 y 0,204 Å, correspondientes a los planos cristalinos (111) y (200), respectivamente, indicando que las partículas

presentan una forma estable de octaedro truncado [137] y con una estructura cristalina fcc característica para el oro [133] (ver Figura 6.5 D).

El espectro UV-visible de las NPsAu-citrato de la Figura 6.5 C, revela que el máximo de RPS para las partículas se encuentra a 520 nm de longitud de onda. Este máximo de absorción coincide con resultados reportados anteriormente para NPsAu-citrato de partículas entre 5 y 15 nm de diámetro [205].

Para lograr la unión específica entre las NPsAu y las fibras del péptido  $A\beta_{1-42}$ , las NPsAu-citrato fueron funcionalizadas con el péptido CLPFFD, el cual fue obtenido previamente a través del método de síntesis de péptidos en fase sólida (ver Apéndice 2).

En el proceso de funcionalización de las partículas, el grupo -SH del residuo de cisteína del péptido CLPFFD, actúa desplazando las moléculas de citrato que rodean la superficie de las NPsAu, permitiendo su funcionalización a través de la interacción Au-S. Posteriormente las NPsAu funcionalizadas con el péptido CLPFFD (NPsAu-CLPFFD), fueron purificadas mediante un proceso de diálisis a través de membrana para retirar el citrato desplazado y el exceso de péptido adicionado (ver Capítulo 2 sección 2.2.4.2). Las NPsAu-CLPFFD fueron caracterizadas por microscopía TEM y espectroscopía UV-visible (Figura 6.6).



**Figura 6.6.** Imagen TEM de NPsAu-CLPFFD y su respectivo histograma de tamaño ( $n=200$  partículas) (A). Comparación de los espectros UV-visible de las dispersiones de; NPsAu-citrato (línea negra) y NPsAu-CLPFFD (línea roja).

Los conjugados NPsAu-CLPFFD fueron visualizados mediante microscopía TEM donde se aprecia una dispersión homogénea de las NPsAu funcionalizadas sin presentar agregación, con un diámetro promedio de  $11,9 \pm 0,6$  nm (Figura 6.6 A).

En la Figura 6.6 B, se comparan los espectros UV-visible de las dispersiones coloidales de NPsAu-citrato y NPsAu-CLPFFD donde se evidencia un desplazamiento batocrómico de la señal correspondiente a la RPS de las NPsAu-CLPFFD a 527 nm de longitud de onda. Este desplazamiento se debe, probablemente, a un aumento de la constante dieléctrica del medio. Un incremento en el diámetro de las partículas o agregación de éstas, fue descartado mediante las imágenes de microscopía electrónica.

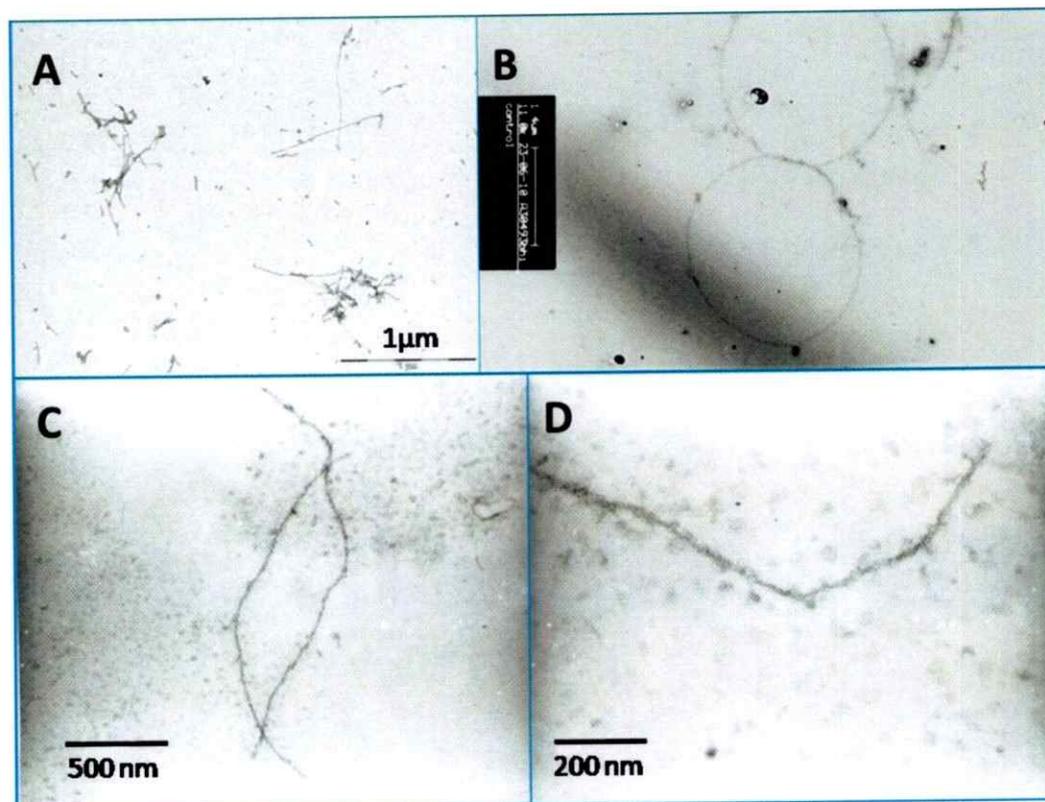
### 6.5.2. Preparación de fibras amiloides nanodecoradas

El proceso de formación de fibras amiloides *in vitro* conlleva un pre-tratamiento de desagregación del péptido. Para ello se han utilizado solventes orgánicos como DMSO, TFA, TFE (Trifluoroetanol) y HFIP, siendo más efectivos en la disolución del péptido los solventes volátiles [206, 207].

En la búsqueda de las condiciones aptas para la preparación de las fibras amiloides, fueron llevadas a cabo dos metodologías (Método A y Método B). En la Metodología A, la desagregación previa del péptido amiloide se desarrolló a través del protocolo descrito por Zagorski y col., el cual consiste en la adición y evaporación sucesiva de pequeñas cantidades de TFA y HFIP agregadas al péptido que se encuentra anteriormente alicuotado y liofilizado [68] (ver Capítulo 2, sección 2.2.4.5). La combinación de estos solventes ha sido utilizada para la desagregación del péptido amiloide, siendo catalogada como particularmente efectiva en la disrupción de las interacciones por puente de hidrógeno intra y/o intermoleculares presentes en agregados de proteínas [207].

El péptido desagregado en estado sólido posteriormente es reconstituido en solución acuosa, utilizando comúnmente soluciones tampón y la introducción de sales para conseguir la fuerza iónica del medio necesaria para la formación de las fibras amiloides. En esta primera metodología, el péptido fue reconstituido en una solución tampón que contenía TRIS 10  $\mu\text{mol/L}$  y NaCl 100  $\text{mmol/L}$  a  $\text{pH} = 7,5$ . Rápidamente, las muestras fueron incubadas a  $37^\circ\text{C}$  y 300 rpm durante; 3, 4, 5, 6, 24, 27 y 30 horas. Los

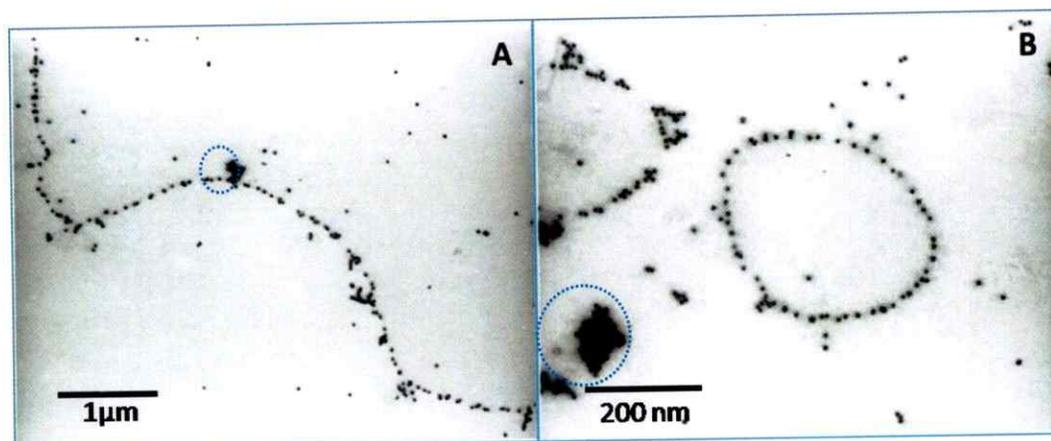
tiempos de incubación que produjeron una considerable producción de las fibras amiloides fueron de 3 y 6 horas. Los resultados se presentan en la Figura 6.7.



**Figura 6.7.** Fibras del péptido  $A\beta_{1-42}$  obtenidas a partir del pre-tratamiento con TFA y HFIP luego de 3 y 6 horas de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  y 300rpm ( $2,1 \times g$ ).

En la Figura 6.7, se aprecia la obtención de fibras amiloides de aproximadamente 10 a 15 nm de diámetro y largos de  $1 \mu\text{m}$  o más.

Para conseguir la nanodecoración de las fibras amiloides, se incluyó en el proceso de incubación a las NPsAu-CLPFFD, utilizando los mismos parámetros de tiempo, temperatura y agitación. Los resultados son presentados en la Figura 6.8.

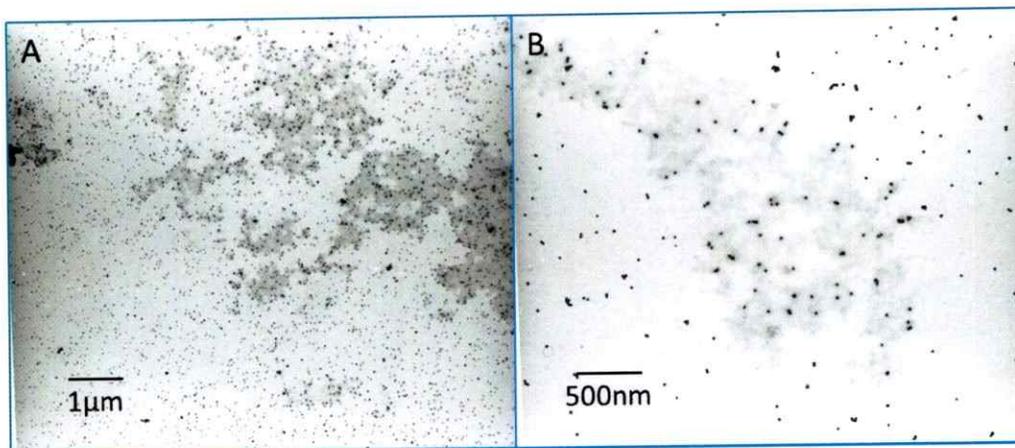


**Figura 6.8.** Micrografías TEM de fibras del péptido  $A\beta_{1-42}$ , incubadas con NPsAu-CLPFFD, presentando una forma de *alambre* (A) y en forma de *argolla* (B). Las secciones de líneas punteadas muestran agregados de NPsAu.

En la Figura 6.8, se observa una nanodecoración uniforme de las fibras amiloides, presentando incluso formas menos frecuentes como el material híbrido en forma de argolla descrito en la Figura 6.8 B. Además, se detectó la presencia de pequeños agregados de NPsAu (zonas marcadas con líneas punteadas) probablemente formados por el depósito de partículas en agregados amiloides que no formaron fibras.

El procedimiento descrito en la metodología A, no condujo frecuentemente a la formación de fibras amiloides. Imágenes TEM que corroboran estos resultados se pueden apreciar en la Figura 6.9.

Desafortunadamente, la irreproducibilidad en la formación de fibras del péptido  $A\beta$  es un problema frecuente, asociado probablemente, a la purificación del péptido proveniente de distintos laboratorios [208] y/o a factores como el pH, el tipo de solución tampón y la fuerza iónica del medio [68].



**Figura 6.9.** Micrografías TEM que muestran la presencia de oligómeros autoensamblados del péptido, sin la detección de fibras amiloides.

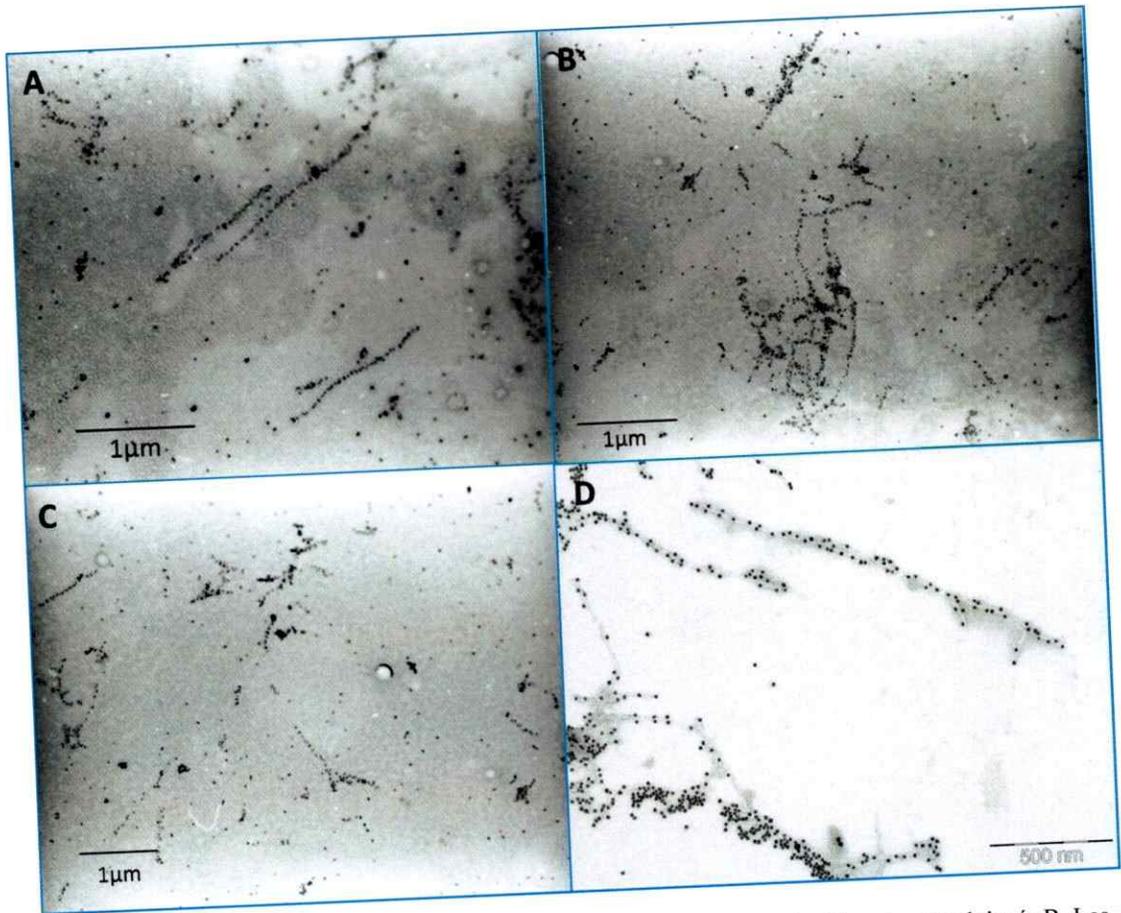
Otras causas de la irreproducibilidad podrían estar asociadas a la estructura inicial del péptido y su estado de agregación tanto en estado sólido como luego de la solvatación al iniciar el proceso de formación de las fibras [208, 209]. Debido a que el TFA produce predominantemente la disrupción de las interacciones por puentes de hidrógeno intermoleculares promoviendo una estructura de  $\alpha$ -hélice, una eliminación no efectiva de este ácido podría desfavorecer la formación de fibras amiloides.

Errores sistemáticos en la preparación de las alícuotas del péptido utilizadas antes de realizar los procesos de desagregación e incubación, podrían afectar adicionalmente el rendimiento, debido a la baja concentración del péptido, ya que una alta concentración del péptido es un factor importante que promueve la formación de fibras amiloides debido a la mayor presencia de estructuras preagregadas (oligómeros y fibrillas) que sirven como centros de nucleación [209, 210].

Con el fin de eliminar algunos factores que pueden afectar el rendimiento final en la formación de fibras amiloides se desarrolló un método más sencillo (Metodología B, ver Capítulo 2, sección 2.2.4.5) utilizando HFIP como solvente en la preparación de las alícuotas y en la desagregación inicial de péptido. El HFIP ha sido considerado como uno de los mejores solventes ya que, puede disolver el péptido A $\beta_{1-42}$  mejor que otros medios y, al mismo tiempo, tiene la capacidad de promover la estructura  $\alpha$ -hélice [69, 211].

En el proceso de incubación del péptido A $\beta_{1-42}$  con las NPsAu-CLPFFD se empleó agua *mili-Q* como solvente, para evitar variaciones en la fuerza iónica del medio o cambios de pH.

Al utilizar este segundo protocolo, se mejoró notablemente la reproducibilidad en la obtención de fibras amiloides. Utilizando una concentración de 20  $\mu\text{mol/L}$  del péptido amiloide y con tiempos de incubación de 24 y 72 horas, a una temperatura de 37°C y una agitación constante a 300 rpm, se obtuvieron fibras del péptido A $\beta_{1-42}$  nanodecoradas en su totalidad con el conjugado NPsAu-CLPFFD (ver Figura 6.10).

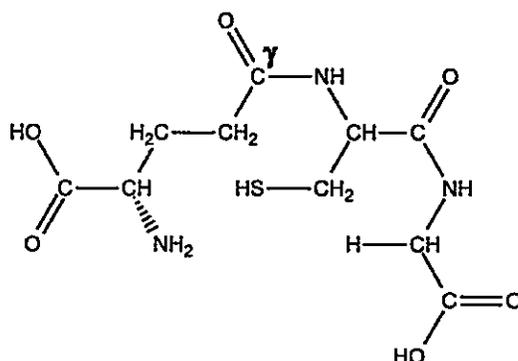


**Figura 6.10.** Micrografías TEM que muestran los resultados obtenidos al utilizar la metodología B. Las fibras  $A\beta_{1-42}$  fueron nanodecoradas uniformemente con NPsAu-CLPFFD luego de 24h (A y B) y 72h (C y D) de incubación.

La interacción del péptido CLPFFD con el péptido  $A\beta_{1-42}$  produce una efectiva nanodecoración de las fibras amiloides con el conjugado NPsAu-CLPFFD, originando nanomateriales híbridos bio-inorgánicos 1D que podrían dar lugar a la formación de nanoestructuras metálicas 1D.

Para evaluar la selectividad de la interacción entre el conjugado NPsAu-péptido y el péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> se investigó la posible formación de materiales híbridos con NPsAu funcionalizadas con el péptido L-glutación (GSH).

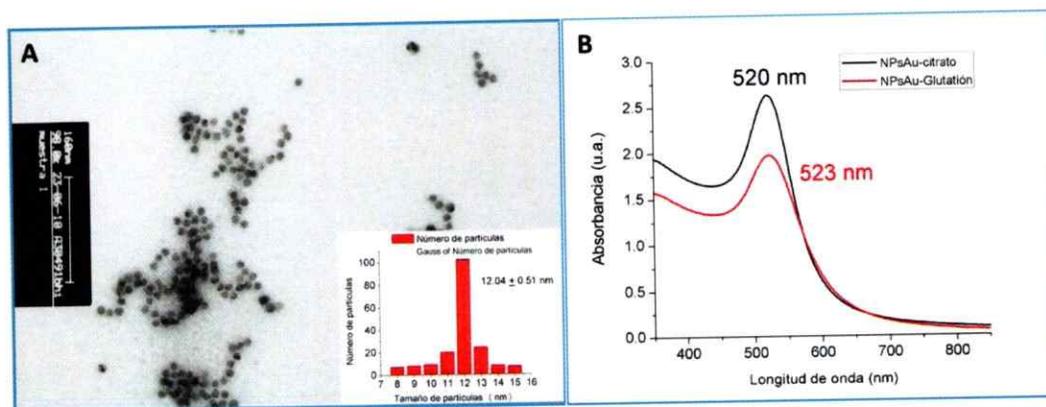
El péptido GSH es un tripéptido con una activa función en el metabolismo celular como reductor de especies ROS tales como, el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Este péptido está compuesto por los aminoácidos: L-glutámico, L-cisteína y L-glicina presentando la siguiente estructura [212]:



**Figura 6.11.** Esquema de la estructura del péptido L-glutación, el cual está formado por un enlace isopeptídico entre el grupo  $\gamma$ -carboxilato de la cadena lateral del glutamato con el grupo amino del residuo de cisteína y, un enlace peptídico entre el grupo  $\alpha$ -carboxilo de la cisteína y el grupo  $\alpha$ -amino del residuo de glicina.

La secuencia peptídica del GSH no tiene similitud con la secuencia del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> (ver Figura 6.4), por lo tanto, constituye un control negativo en la formación de nanomateriales híbridos a través de la incubación del péptido amiloide con los conjugados formados por NPsAu funcionalizadas con el péptido GSH (NPsAu-GSH).

El grupo  $-SH$  del residuo de cisteína expuesto favorablemente, permitió la funcionalización de la superficie de las NPs metálicas a través de interacciones Au-S. Los conjugados NPsAu-GSH fueron preparados (Capítulo 2, sección 2.2.4.6) y posteriormente caracterizados mediante microscopía TEM y espectroscopía UV-visible.

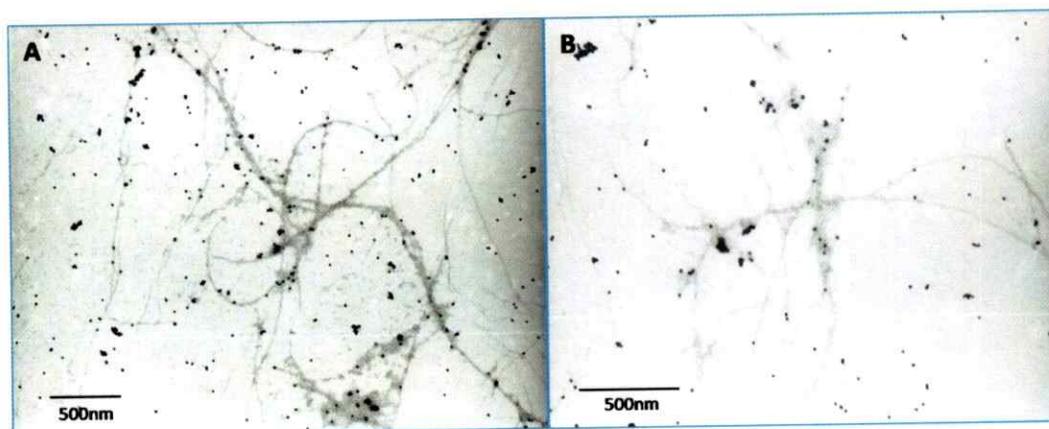


**Figura 6.12.** Caracterización de los conjugados NPsAu-GSH: Imagen TEM de NPsAu-GSH con el correspondiente histograma de dispersión de tamaño ( $n=200$ ) (A) y espectro UV-visible de las partículas, comparado con el espectro correspondiente a las NPsAu-citrato (B).

En la Figura 6.12 A se muestra una imagen representativa de microscopía TEM de las partículas funcionalizadas, las cuales presentaron una morfología esférica y una distribución homogénea, con un tamaño promedio de  $12,04 \pm 0,5$  nm de diámetro. La caracterización mediante espectroscopía UV-visible revela un desplazamiento batocrómico de la señal de RPS para las partículas NPsAu-GSH ubicada a 523 nm de longitud de onda, comparada con la absorción ubicada a 520 nm de longitud de onda perteneciente a las NPsAu-citrato (ver Figura 6.12 B). Probablemente, este pequeño

desplazamiento de la señal sea provocado por un cambio en la constante dieléctrica del medio y una leve agrupación de las partículas visualizada por microscopía.

La preparación de los materiales híbridos fue monitoreada mediante microscopía TEM, después de efectuar el proceso de incubación del péptido  $A\beta_{1-42}$  con las NPsAu-GSH (ver Figura 6.13).



**Figura 6.13.** (A) y (B) Micrografías TEM que muestra la obtención de fibras amiloides con NPsAu-GSH, incubadas durante 72 horas.

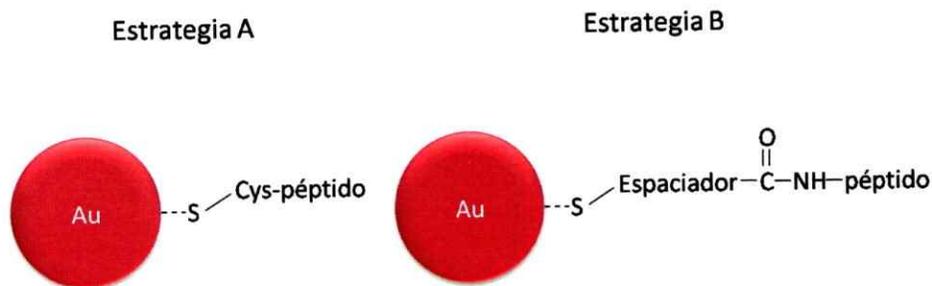
En la Figura 6.13 se aprecia que los conjugados NPsAu-GSH no presentaron una interacción efectiva con el péptido  $A\beta_{1-42}$  debido a la baja similitud de la secuencia peptídica de GSH con la del péptido amiloide. Si bien, el péptido  $A\beta_{1-42}$  también posee en su secuencia los aminoácidos glicina (G) y ácido glutámico (E) (ver Figura 6.4), el péptido GSH carece de aminoácidos de naturaleza hidrofóbica que permitan interacciones aromáticas  $\pi$ - $\pi$  ó van der Waals, con el péptido amiloide.

Las micrografías TEM de la Figura 6.13 dan cuenta de una interacción inespecífica entre los conjugados y las fibras amiloides, pero muestran una presencia significativa de fibras maduras del péptido, por lo que a partir de estas imágenes es posible inferir, que los conjugados NPs-péptido no participarían en el proceso de nucleación para la generación de los agregados amiloides, sino que los conjugados (si el péptido que rodea la NPs reconoce selectivamente al péptido amiloide) interactúan con las fibras amiloides en una etapa posterior a su formación.

El control negativo realizado al incubar los conjugados NPsAu-GSH con el péptido  $A\beta_{1-42}$ , demuestra que las interacciones supramoleculares entre el péptido que se encuentra unido a la superficie de las NPsAu y las fibras amiloides, juegan un papel crucial en la formación de este tipo de nanoestructuras híbrida bio-inorgánica.

#### **6.6. Utilización de nanopartículas de oro funcionalizadas con el péptido C(Eg)<sub>3</sub>LPFFD, para la formación de materiales bio-inorgánicos con el péptido $A\beta_{1-42}$**

Existen dos estrategias comúnmente utilizadas para la funcionalización de NPs metálicas con péptidos de interés biológico [213]. En la Figura 6.14 se describe un esquema de las estrategias para la preparación de los conjugados NPsAu-péptido.



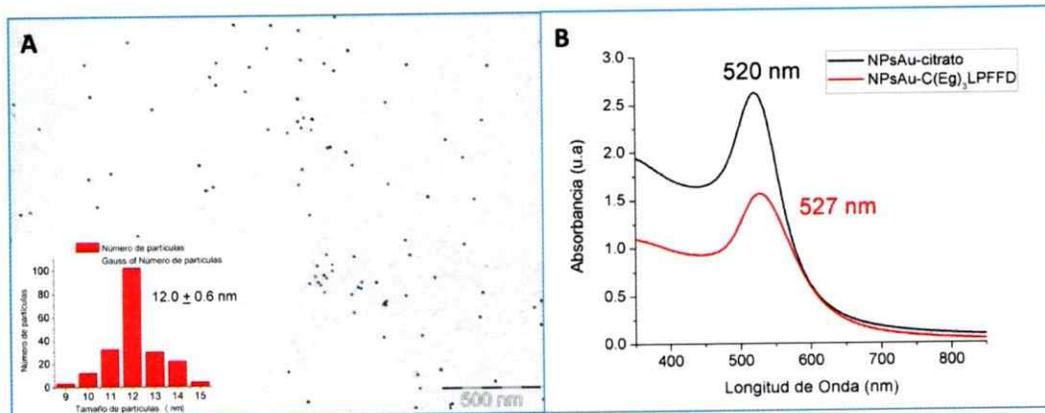
**Figura 6.14.** Esquema de dos estrategias utilizadas en la funcionalización de NPsAu con péptidos de interés (Modificada de la referencia [213])

La estrategia A comprende la funcionalización de las NPsAu por la interacción favorable entre el grupo  $-SH$  de un residuo de cisteína (el cual generalmente se ubica al final de la secuencia peptídica) y la superficie de las NPsAu. Esta estrategia fue utilizada en la funcionalización de NPsAu con el péptido CLPFFD.

En la estrategia B, las NPsAu son funcionalizadas con una molécula “espaciadora” bifuncional, la cual contiene un grupo  $-SH$  en su estructura que permite la interacción con la superficie de la NPsAu y además posee un grupo funcional que puede enlazar covalentemente al péptido de interés (por ejemplo un grupo  $-COOH$ ) [213, 214]. La estrategia B es particularmente interesante debido a que otorga una separación entre las NPs y el péptido, permitiendo que este último se encuentre más expuesto, favoreciendo su funcionalidad biológica.

Utilizando la estrategia B, las NPsAu-citrato fueron funcionalizadas con el péptido C(Eg)<sub>3</sub>LPFFD para evaluar este conjugado en la formación de nanomateriales híbridos bio-inorgánicos. Este péptido presenta una secuencia similar al péptido CLPFFD pero contiene tres unidades de etilenglicol (Eg) unidas por enlaces éter, ubicadas entre el residuo de cisteína y el residuo de leucina que es el primer residuo de la secuencia LPFFD, el cual es un reconocedor selectivo del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Las unidades de etilenglicol actúan como un “espaciador” que permitirían una mayor exposición de la secuencia LPFFD.

Los conjugados NPsAu-C(Eg)<sub>3</sub>LPFFD fueron preparados siguiendo el protocolo descrito en el Capítulo 2, sección 2.2.4.6 y su caracterización fue realizada mediante las técnicas de microscopía TEM y espectroscopía UV-visible.



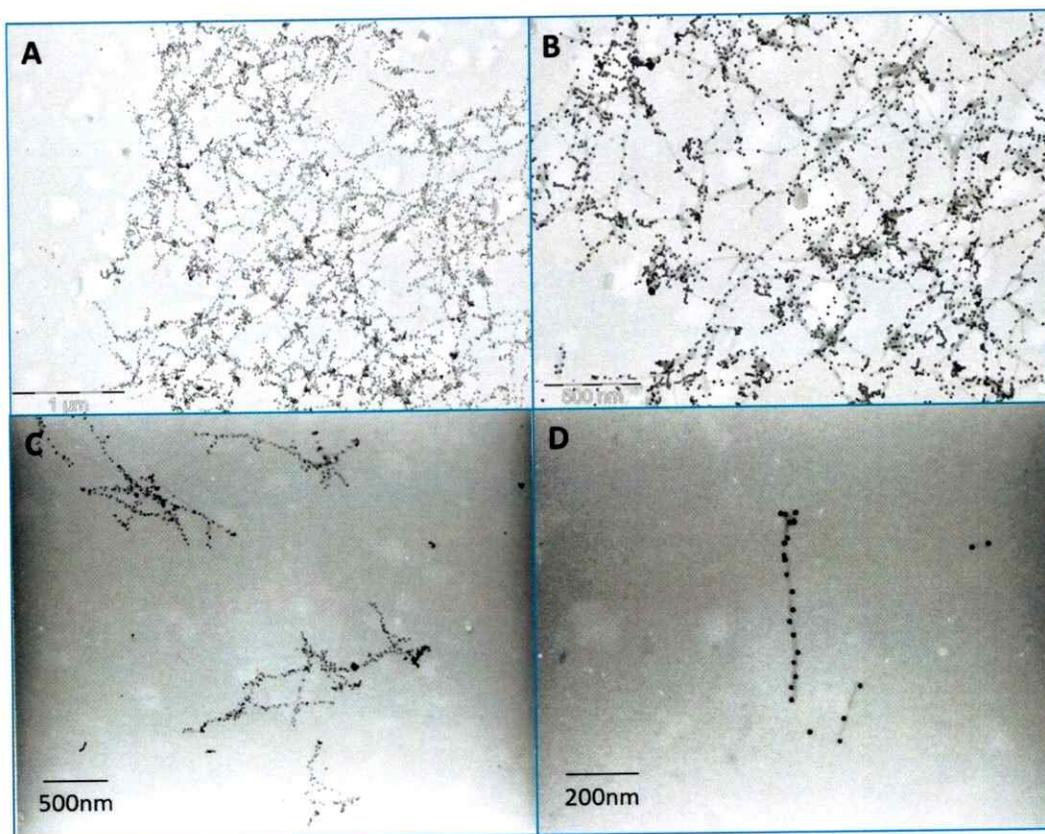
**Figura 6.15.** Caracterización de los conjugados NPsAu-C(Eg)<sub>3</sub>LPFFD mediante: microscopía TEM con su respectivo histograma de dispersión de tamaño (n=200) (A) y espectroscopía UV-visible, al comparar su espectro de absorción con el espectro para NPsAu-citrato.

La Figura 6.15 A muestra la caracterización de las NPsAu-C(Eg)<sub>3</sub>LPFFD mediante microscopía TEM, revelando una homogénea distribución con un tamaño promedio de  $12,0 \pm 0,6$  nm de diámetro. No se aprecia una agregación de las partículas, por lo que se presume que las unidades de etilenglicol que actúan como espaciador, permitirían una estabilización estérica de las NPsAu.

El espectro UV-visible de los conjugados NPsAu- C(Eg)<sub>3</sub>LPFFD que muestra la Figura 6.15 B, presenta un marcado desplazamiento de la señal de absorción hacia una mayor longitud de onda (527 nm), comparado con la absorción que presentan las NPsAu-citrato (520 nm). Presumiblemente, este desplazamiento batocrómico de la señal de absorción, es causado por un incremento de la constante dieléctrica del medio, y no por un aumento en el tamaño de los conjugados, debido a que las imágenes TEM revelan una dispersión sin agregación de las partículas.

La dispersión coloidal de NPsAu-C(Eg)<sub>3</sub>LPFFD fue utilizada en la preparación de fibras amiloides a través del proceso de incubación de la metodología B (ver Capítulo 2, sección 2.2.4.5).

Los resultados fueron evaluados mediante microscopía TEM revelando que los conjugados NPsAu-C(Eg)<sub>3</sub>LPFFD lograron cubrir efectivamente la superficie de las fibras amiloides, dando lugar a la formación de nanomateriales híbridos bio-inorgánicos 1D (ver Figura 6. 16).



**Figura 6.16.** Imágenes TEM que muestran la nanodecoración de las fibras del péptido  $A\beta_{1-42}$  con NPs Au-C(Eg)<sub>3</sub>LPFFD, después de 72 horas de incubación en medio acuoso.

La nanodecoración homogénea de las fibras amiloides que se aprecia en las micrografías de la Figura 6.16, revelan la afinidad del péptido LPFFD por la secuencia del péptido amiloide. El péptido LPFFD se ubica presumiblemente hacia el exterior de la “corona” que rodea la NPs metálica, permitiendo una mayor exposición de este péptido hacia las fibras del péptido  $A\beta_{1-42}$ , gracias a la utilización del espaciador, compuesto por tres unidades de etilenglicol. Además, las imágenes TEM indican una interacción favorable entre los conjugados NPs Au-C(Eg)<sub>3</sub>LPFFD y las fibras del péptido amiloide

debido a que, una gran cantidad de las NPsAu se encuentran adheridas a las fibras amiloides y no libres en la suspensión.

En general, los resultados revelaron que el procedimiento de autoensamblaje de las estructuras peptídicas a través del reconocimiento molecular, permite la efectiva formación de nanomateriales, útiles en nanotecnología. La preparación de materiales híbridos bio-inorgánicos 1D, abre la posibilidad de múltiples aplicaciones debido a las nuevas propiedades colectivas que surgen del ordenamiento 1D de las NPs sobre las estructuras formadas por biomoléculas, tales como el acoplamiento de la absorbancia de plasmón superficial y la transferencia de electrones (conductividad) [159].

# **CAPÍTULO 7**

## **Discusión general**

### 7.1. Compuestos de inclusión de $\alpha$ -ciclodextrina con huéspedes alquiltioles y alquilaminas

Los CI de  $\alpha$ -CD con huéspedes alquiltioles y alquilaminas, preparados a partir de una solución saturada de  $\alpha$ -CD en agua, presentaron un alto porcentaje de rendimiento sintético con valores superiores al 85%. Especialmente, los porcentajes de rendimiento en la preparación de los CI con huéspedes alquiltioles mostraron los más altos valores (superiores al 93%), lo que podría estar relacionado con un mayor valor de la constante de equilibrio de asociación de estos complejos.

Las relaciones molares de los CI en solución, fue determinada por RMN- $H^1$ , comprobándose una relación estequiométrica de 2:1 (matriz:huésped) para los CI de  $\alpha$ -CD/alquiltioles. Por el contrario, las relaciones molares calculadas para los complejos formados con huéspedes alquilaminas, fueron menores indicando siempre un exceso de la molécula huésped en solución. Este hecho podría ser una consecuencia provocada luego del proceso de lavado de los cristales. Una menor asociación entre estos huéspedes y las matrices de  $\alpha$ -CD, podría justificar la pérdida parcial de la configuración del CI; matriz:huésped.

La menor estabilidad de los CI de  $\alpha$ -CD/alquilaminas en solución, podría deberse a una disminución en la sumatoria neta de las fuerzas de intermoleculares que estabilizan estos complejos supramoleculares, debido a que, los estudios mediante RMN- $H^1$  no proporcionaron información sobre interacciones por puentes de hidrógeno entre el grupo  $-NH_2$  de los huéspedes y los grupos  $-OH$  de las  $\alpha$ -CD, tal como en el caso de los CI de  $\alpha$ -CD/alquiltioles, donde se aprecia claramente un desplazamiento de la señal de los grupos  $-SH$  hacia campos más altos provocada posiblemente, por interacciones por

puentes de hidrógeno con los grupos -OH de las matrices de  $\alpha$ -CD que, en conjunto con el resto de las interacciones (principalmente de tipo van der Waals, dentro de la cavidad), otorgan a los CI de  $\alpha$ -CD/alquiltioles una alta estabilidad.

Todos los cristales de CI fueron analizados mediante DRXP presentando una intensidad máxima de reflexión alrededor de los  $20^\circ$  en  $2\theta$ . Esta reflexión característica para los CI de  $\alpha$ -CD con una estructura tipo canal, fue registrada en todos los difractogramas comprobando la formación de los CI en estado sólido. Debido a que la cristalización de estos complejos se encuentra dada por el ordenamiento de las matrices de  $\alpha$ -CD, se presume una estructuración en la que las CD forman canales infinitos creciendo en la dirección  $\{001\}$ . Todos los difractogramas pudieron ser indexados en un sistema cristalino hexagonal, con parámetros de red que coincidieron con resultados previos de nuestro grupo de investigación. Las dimensiones del parámetro de red  $c$  en los CI ( $\sim 16 \text{ \AA}$ ), coincidieron con el alto de dos moléculas de  $\alpha$ -CD apiladas formando un canal, corroborando la estructura básica de dímero con una molécula huésped ubicada al interior de este canal de  $\alpha$ -CD. Esta estructura básica de los CI permanece en solución acuosa, al ser verificada también mediante estudios de RMN- $H^1$ .

El análisis mediante DRX de monocristal realizado a los microcristales definidos del CI de  $\alpha$ -CD/OT, en dos asignaciones arrojó datos cristalográficos coincidentes con dos posibles sistemas cristalinos; monoclinico y triclinico. En general, varios autores han reportado la difícil elucidación estructural mediante DRX de monocristal de los CI supramoleculares, debido en primer lugar, a la complicada obtención de los monocristales de complejos supramoleculares y en segundo lugar, a la alta movilidad térmica de las moléculas en el complejo, lo que muchas veces puede dar resultados

erróneos en la asignación estructural. Por este motivo, técnicas como DRXP y RMN son ampliamente utilizadas de manera complementaria, ya que entregan información valiosa a cerca de la estructuras de los complejos supramoleculares.

La dificultosa resolución de la estructura del CI de  $\alpha$ -CD/OT fue justificada debido a la presencia de maclas cristalinas. Gracias a la nanodecoración selectiva de los microcristales del CI de  $\alpha$ -CD/OT con NBsAu, se descubrió mediante imágenes de microscopía SEM, que los microcristales del CI correspondían a maclas cristalinas.

Los parámetros de red de los dos sistemas cristalinos posibles, fueron utilizados en la indexación del patrón de DRXP para el CI de  $\alpha$ -CD/OT. El refinamiento de los parámetros de red, permitió obtener un R-factor de menor magnitud para el sistema triclinico, por lo tanto, este sistema fue escogido como el más apropiado, a pesar de que posee una menor simetría que el sistema monoclinico. Además, este último sistema cristalino ha sido reportado frecuentemente para CI de  $\alpha$ -CD con estructuras tipo canal.

## **7.2. Nanopartículas de Ni y Co preparadas mediante el depósito físico en vapor**

Según el principio de ácidos y bases duros y blandos de Pearson, el cual postula favorables interacciones entre los pares; ácido duro/base dura y ácido blando/base blanda, los metales Ni y Co son catalogados como ácidos de naturaleza intermedia. Por otro lado, el grupo -SH es considerado una base blanda y el grupo -NH<sub>2</sub> corresponde a una base dura, por lo tanto, en principio podrían estar favorecidas las interacciones de los dos metales con los dos grupos funcionales.

Mediante el método físico de DFV, se obtuvieron NPsNi y NPsCo tanto sobre los cristales de CI de  $\alpha$ -CD/alquiltioles, como sobre los CI de  $\alpha$ -CD/alquilaminas

corroborando el postulado de Pearson. Particularmente, los resultados obtenidos mediante microscopía TEM, indicaron que NPsCo fueron mayoritariamente obtenidas al utilizar CI de  $\alpha$ -CD/alquiltioles como sustratos. Este resultado también puede ser justificado mediante el postulado de Pearson debido a que, entre los metales Ni y Co, este último presenta un mayor carácter de ácido blando, por lo tanto, su interacción con moléculas que poseen un grupo funcional -SH se ve favorecida.

La caracterización mediante microscopía SEM de los cristales de CI de  $\alpha$ -CD/alquiltioles con NPsCo y NPsNi adheridas a su superficie cristalina, permitió revelar que el depósito preferencial de las NPs ocurrió sobre el plano cristalino {001} de los CI. El análisis de EDX realizado en la zona donde se encontraron NPs mostró un alto porcentaje de S, lo que podría indicar que las partículas se encuentran ubicadas sólo en el plano donde se encuentran ubicados hacia el exterior los grupos funcionales -SH de las moléculas huésped de los CI.

Para lograr un depósito controlado de las partículas sobre los cristales de los CI, los parámetros de la síntesis mediante PCV fueron modificados, evaluando los factores que afectan el crecimiento de las partículas depositadas sobre sustratos mediante esta técnica física. Por ejemplo, la obtención de NPs puede ser favorecida incrementando; la distancia entre el blanco y el sustrato, la presión del gas inerte, la corriente utilizada en el equipo o disminuyendo la temperatura. En base a estos antecedentes, fueron aumentadas; la distancia entre el blanco y el sustrato, y la corriente de descarga, logrando obtener una menor dispersión de tamaño en las partículas sintetizadas y una correlación entre el tiempo de depósito del metal y el tamaño final de las NPs.

Sin embargo, la microscopía TEM reveló bajos rendimientos en la síntesis de NPs, a pesar de las modificaciones en los parámetros en el proceso. La baja cantidad de partículas visualizadas podría estar relacionada con el aumento de la corriente utilizada debido a que, si bien, al aumentar la corriente aumenta la densidad del plasma favoreciendo su sobresaturación, generando una mayor población de partículas, el aumento en la corriente también puede provocar un incremento de la temperatura, lo que altera el equilibrio térmico del plasma y finalmente provoca un menor rendimiento en la obtención de NPs. Por lo tanto, se propone para futuras investigaciones en la fabricación de NPs de metales como Ni y Co que probablemente, un aumento de la distancia entre el blanco y el sustrato y un aumento en la presión del gas Ar, manteniendo una corriente constante en el proceso, podrían mejorar el rendimiento en la producción de este tipo de nanomateriales mediante PCV.

La técnica de PCV desarrollada en un ambiente inerte produce partículas libres de óxido, pero la exposición inmediata al ambiente y probablemente el contenido de moléculas de agua que conforman la estructura cristalina de los CI, provocarían la oxidación paulatina de las partículas, de acuerdo a las transiciones electrónicas observadas en los espectros de absorción de las partículas de Ni y Co. Al analizar los espectros de absorción se aprecian tanto las absorciones características para NPsNi y NPsCo, como las transiciones electrónicas correspondientes a los óxidos de estos metales (en su menor estado de oxidación). La completa oxidación de las partículas se produce probablemente en un tiempo posterior, cuando los sistemas supramoleculares quedan expuestos a la humedad del ambiente o al encontrarse en una dispersión acuosa. Este hecho explicaría la presencia de NPs de  $\text{Co}_3\text{O}_4$ , identificadas a través de su

caracterización mediante microscopía HRTEM y el cálculo posterior de sus distancias interplanares.

Para una posible utilización de los sistemas nanosupramoleculares como nanotransportadores en sistemas biológicos, se realizaron ensayos de viabilidad celular frente a la línea celular SH-SY5Y.

Previamente, se evaluaron los efectos sobre la viabilidad celular de los CI de  $\alpha$ -CD/OT y  $\alpha$ -CD/DDA donde, los resultados revelaron una mayor toxicidad frente a la línea celular provocada por el CI de  $\alpha$ -CD/DDA. Este fenómeno podría estar directamente relacionado con la menor estabilidad en solución acuosa de los CI de  $\alpha$ -CD/alquilminas. Si en solución acuosa el huésped alquilamina se encuentra total o parcialmente fuera de las unidades de  $\alpha$ -CD, el huésped podría eventualmente causar una alta toxicidad debido a la protonación del grupo  $-\text{NH}_2$ , creando grupos con cargas positivas que podrían perforar la membrana celular, debido a la gran interacción con los fosfolípidos cargados negativamente de la membrana.

Debido a que los CI de  $\alpha$ -CD/alquiltioles presentaron una mayor estabilidad en solución acuosa y que además, permitieron la obtención de partículas metálicas de tamaño homogéneo y sin agregación, los sistemas nanosupramoleculares;  $\text{NPsONi-}\alpha$ -CD/DT y  $\text{NPsOC}_0$ - $\alpha$ -CD/DDT, fueron evaluados en los ensayos posteriores de viabilidad celular.

La toxicidad provocada por estos sistemas se produjo probablemente, debido a la oxidación de las NPs en la disolución acuosa y a la alta concentración de CI sin NPs que se encontraba en la dispersión. La posible presencia de NPs de  $\text{Co}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Ni}_2\text{O}_3$  y  $\text{CoO}$  podría provocar efectos altamente tóxicos en la viabilidad celular, debido a que estos

óxidos metálicos poseen una energía de banda de conducción comparable a la energía de potencial redox celular, provocando transiciones electrónicas que favorecerían la producción de ROS. Además, las partículas podrían liberar iones metálicos en solución favoreciendo la reacción de Fenton.

Por otro lado, la síntesis de las partículas metálicas sobre los CI mediante PCV, es realizada con cristales dispuestos al azar en una fina capa dentro de la cámara de vacío del equipo, por lo tanto, las NPs sólo serán formadas en las superficies cristalinas de los cristales que quedan directamente expuestos al depósito del metal, el resto de los cristales que no reciben el depósito en el proceso, estarán en exceso y podrían eventualmente causar una mayor toxicidad.

Este exceso de CI sin NPs, fue retirado mediante un proceso de diálisis a través de membrana permitiendo la purificación de los sistemas nanosupramoleculares. Como estrategia adicional para disminuir los efectos tóxicos provocados por estos sistemas, se prepararon sistemas bifuncionalizados con el péptido CLPFFD, los cuales también fueron purificados para eliminar las moléculas del péptido y el CI en exceso.

Esta estrategia provocó efectos positivos disminuyendo notablemente la muerte celular debido probablemente, a la ocupación de sitios superficiales descubiertos de las partículas por moléculas del péptido, permitiendo una mayor estabilización estérica y una protección al recubrir la superficie reactiva de las NPsONi y NPsOC<sub>o</sub>.

### **7.3. Nanodecoración de cristales de compuestos de inclusión de $\alpha$ -ciclodextrina/alquiltioles con nanobarras y nanopartículas esféricas de oro**

Para la decoración de CI de  $\alpha$ -CD/alquiltioles, fueron depositadas NPsAu y NBsAu, estabilizadas en CTAB, sobre los cristales de CI.

Previamente, las nanoestructuras de oro fueron sintetizadas por el método de crecimiento mediado por núcleos y caracterizadas mediante microscopía TEM, HRTEM y espectroscopía UV-visible, revelando sus dimensiones, forma, naturaleza cristalina, composición y propiedades ópticas. Estas caracterizaciones fueron fundamentales en su identificación y la argumentación de los cambios presentados al ser adheridas a las superficies cristalinas.

La decoración selectiva de los cristales de CI fue empleada como una herramienta para corroborar detalles estructurales de los complejos, al permitir la identificación del plano exclusivo {001}, el cual presenta una mayor polaridad debido a la presencia de los grupos funcionales de las moléculas huésped ubicados hacia el exterior de esta cara cristalina.

Los resultados mediante microscopía SEM FE otorgaron información acerca del depósito preferencial y el ordenamiento de las nanoestructuras sobre las superficies cristalinas. En las imágenes se apreció el depósito de una única capa de las nanoestructuras sobre el plano cristalino, las cuales presentaron un patrón de ordenamiento lateral (principalmente visualizado en la decoración con NBsAu) en la superficie.

El depósito de una única capa de las nanoestructuras se relaciona posiblemente con la mayor fuerza de interacción existente entre el Au perteneciente a las nanoestructuras y

los grupos -SH de la superficie cristalina, comparada con la fuerza de interacción de tipo van der Waals de las moléculas de CTAB que rodean la superficie de las nanoestructuras metálicas.

Las nanoestructuras de oro se encuentran estabilizadas en solución acuosa por una bicapa de moléculas de CTAB. Cuando las nanoestructuras entran en contacto con la superficie de los CI se produce la disrupción de esta bicapa, provocada por la interacción de las nanoestructuras y los grupos -SH del plano específico, y por lo tanto, se provoca un desplazamiento de las moléculas de CTAB desde la superficie de las nanoestructuras. Se presume que las moléculas de CTAB remanentes en la superficie de las nanoestructuras son las causantes del patrón de decoración alineado visualizado en las imágenes.

Resultados obtenidos mediante análisis EDX sobre una zona de los cristales donde se encuentran las nanoestructuras y los análisis de RMN- $H^1$  1D y 2D de los sistemas nanosupramoleculares en solución, confirmaron la interacción Au-SH y la estabilidad de los CI de  $\alpha$ -CD/alquiltioles luego de su interacción con las nanoestructuras metálicas.

Por otro lado, la caracterización de las nanoestructuras de oro sobre los cristales de CI de  $\alpha$ -CD/alquiltioles mediante espectroscopia UV-visible en estado sólido, permitió corroborar que el depósito de las partículas no causó una agregación de las mismas, debido a que sus propiedades ópticas se mantuvieron. El desplazamiento batocrómico de las absorciones de RPS de las nanoestructuras se debió posiblemente a la mayor cercanía interpartícula causando un efecto de acoplamiento dipolar.

Interesantemente, la decoración del CI de  $\alpha$ -CD/OT con NBsAu, permitió además identificar la presencia de maclas cristalinas. Las imágenes de microscopía SEM

revelaron una decoración delimitada de los cristales de CI. Debido a que, la nanodecoración es producida sólo en el plano específico {001} por la interacción favorable Au-S, las imágenes permitieron deducir que los cristales del CI de  $\alpha$ -CD/OT correspondían a la unión de dos o más monocristales del CI, lo cual explica la dificultosa caracterización de estos cristales mediante DRX de monocristal.

#### **7.4. Obtención de nanoestructuras unidimensionales**

El tratamiento térmico de los sistemas nanosupramoleculares conformados por CI de  $\alpha$ -CD con NPsNi y NPsCo adheridas a su superficie cristalina, condujo a la obtención de nanoestructuras 1D y 2D. La obtención de NBs y NLs se debe posiblemente, a la disposición de los cristales al realizar el depósito del metal mediante PCV. Una disposición perpendicular (de la superficie del plano {001} del cristal de CI) al depósito de las partículas podría permitir un recubrimiento total de la superficie cristalina, lo que daría lugar a la formación de NLs cuadradas o hexagonales, luego de la coalescencia de las partículas y la eliminación del sustrato orgánico a elevadas temperaturas. Las NBs se formarían debido al tratamiento térmico realizado a cristales con NPs adheridas sólo en una zona de la superficie total de la cara del cristal.

La utilización de caras cristalinas como una superficie apta para realizar el depósito y posterior tratamiento térmico de estos materiales no condujo exclusivamente a la formación de nanoestructuras 1D, pero podría contribuir al estudio y preparación de nuevos nanomateriales al explorar la funcionalización de cristales de CI.

Alternativamente, para obtener exclusivamente nanomateriales 1D, se propuso como estrategia la utilización de materiales híbridos bio-inorgánicos, formados por fibras del péptido  $A\beta_{1-42}$ , decoradas con los conjugados NPsAu-CLPFFD.

La preparación de las fibras amiloides se llevó a cabo utilizando dos metodologías. La metodología A, consistió en la desagregación previa del péptido amiloide con TFA y HFIP para luego ser sometido al proceso de incubación mediante su reconstitución en una solución acuosa del buffer TRIS-NaCl. Esta metodología no fue completamente reproducible y las causas podrían tener relación con factores como; la pureza del péptido, la baja concentración del péptido amiloide por errores en su manipulación y las posibles contaminaciones con excesos de TFA o HFIP que no fueron retirados completamente y que además, podrían interferir con la estabilidad de la dispersión de los conjugados NPsAu-péptido.

Con el fin de mejorar la obtención de los materiales híbridos, la metodología de preparación de las fibras fue modificada realizando un método más sencillo (método B). Las fibras del péptido  $A\beta_{1-42}$  fueron preparadas mediante un proceso de desagregación previa utilizando solamente el reactivo HFIP, el cual, permite la completa disolución del péptido y consigue la desagregación del mismo al modificar su estructura secundaria a  $\alpha$ -hélice.

Esta estrategia permitió disminuir los factores que podrían provocar la irreproducibilidad del proceso de formación de las fibras amiloides, logrando la obtención de fibras maduras luego de la incubación.

Los conjugados NPsAu-CLPFFD fueron agregados en el proceso de incubación y debido a la alta afinidad del péptido CLPFFD por la secuencia del péptido  $A\beta_{1-42}$ , las fibras del péptido fueron decoradas en su totalidad.

Para corroborar que la formación de los materiales híbridos es gobernada por la interacción favorable entre el péptido adherido a la superficie de las NPsAu y las fibras del péptido amiloide, se evaluó la formación de las fibras nanodecoradas con los conjugados NPsAu-GSH y NPsAu-C(Eg)<sub>3</sub>LPFFD.

Las imágenes de microscopía TEM revelaron que la interacción entre los conjugados NPsAu-GSH y las fibras amiloides fue inespecífica. Este resultado podría estar fundado en nula presencia de aminoácidos con un carácter hidrofóbico en la secuencia del péptido GSH, que permitan interacciones supramoleculares favorables entre los conjugados y las fibras amiloides.

Por otro lado, la utilización de los conjugados NPsAu-C(Eg)<sub>3</sub>LPFFD en la preparación de materiales híbridos 1D, mostró satisfactorios resultados mediante microscopía TEM. Las fibras amiloides fueron completamente nanodecoradas por estos conjugados, debido a la presencia de tres unidades de etilenglicol que actúan como espaciador, facilitando la interacción entre el péptido reconocedor de la secuencia amiloide y las fibras.

La preparación de los materiales híbridos bio-inorgánicos 1D, corresponde a un cumplimiento parcial del objetivo en la obtención de nanoestructuras metálicas 1D. La obtención de una superficie apta para realizar el depósito y posterior tratamiento térmico de estos materiales (que se encuentran en una dispersión acuosa) no fue conseguida,

pero su obtención es un interesante resultado, ya que podría contribuir al estudio y preparación de nanoarreglos 1D útiles en aplicaciones ópticas y electrónicas.

# **CAPÍTULO 8**

## **Conclusiones**

1. Los CI formados por  $\alpha$ -CD con huéspedes alquiltioles y alquilaminas, presentan una estructura básica conformada por una molécula huésped ubicada al interior del canal formado por un dímero de moléculas de  $\alpha$ -CD, siendo corroborada por las técnicas de DRXP y RMN- $H^1$ . Los cristales de estos CI, presentan un plano específico asignado como {001}, en el cual se exponen los grupos funcionales –SH y –NH<sub>2</sub> los cuales, permitieron la obtención de NPsONi y NPsOC<sub>o</sub> mediante la técnica de PCV.
2. Al modificar los parámetros utilizados en la preparación de las NPsONi y NPsOC<sub>o</sub> mediante la técnica de PCV, éstas presentaron una dispersión de tamaño homogénea y una correlación entre los tiempos de depósito de los metales Ni y Co.
3. La presencia de NPs oxidadas fue confirmada mediante microscopía HRTEM y espectroscopía UV-visible, indicando que la oxidación de las partículas es paulatina llegando a su estado máximo de oxidación cuando las partículas son dispersadas en medios acuosos.
4. Los sistemas nanosupramoleculares conformados por los CI de  $\alpha$ -CD/alquiltioles con NPsONi y NPsOC<sub>o</sub>, no mostraron efectos sobre la viabilidad frente a la línea celular SH-SY5Y (en las concentraciones de metales que fueron evaluadas), al realizar la purificación de estos sistemas y su posterior funcionalización con el

péptido CLPFFD. Estas estrategias podrían ser una herramienta de gran importancia para que sistemas similares pudiesen ser utilizados en futuras aplicaciones biomédicas.

5. La nanodecoración de cristales de CI de  $\alpha$ -CD/alquiltioles con NBsAu y NPsAu esféricas podría considerarse como una herramienta útil en la corroboración de detalles estructurales y de interfase de los CI debido a que, la decoración selectiva con estas nanoestructuras permitió identificar el plano específico cristalino {001} y revelar de manera adicional, la existencia de maclas cristalinas.
6. Los cristales de CI podrían ser utilizados como reservorios de nanoestructuras metálicas en estado sólido, debido a que las nanoestructuras no presentaron agregación en la superficie y sus propiedades ópticas de RPS fueron preservadas.
7. El tratamiento térmico de los sistemas nanosupramoleculares a elevadas temperaturas en las que se produce la coalescencia de las partículas y la eliminación simultánea de los sustratos orgánicos, conduce a la formación de nanoestructuras 1D y 2D, de abundancia azarosa para el tipo de nanoestructura.
8. La decoración homogénea de fibras del péptido  $A\beta_{1-42}$  con los conjugados NPsAu-CLPFFD, conduce a la formación de materiales híbridos bio-inorgánicos 1D. Estas nuevas estructuras podrían ser utilizadas como componentes de

nanodispositivos. Esta decoración es gobernada por la afinidad del péptido CLPFFD (que se encuentra unido a la superficie de las NPsAu) a la secuencia del péptido amiloide, debido a la similitud de esta secuencia con la secuencia del núcleo hidrofóbico (17-20) del péptido  $A\beta_{1-42}$ .

# **ANEXOS**

## ANEXO I.

### A. Síntesis del péptido CLPFFD

El péptido CLPFFD fue sintetizado por el método de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS, por sus siglas en inglés) con una estrategia lineal (ver Figura S1), la cual consiste en la formación sucesiva de enlaces amida entre el grupo carboxilo del aminoácido entrante, con el grupo amina del aminoácido adyacente, protegiendo los grupos laterales de los aminoácidos.

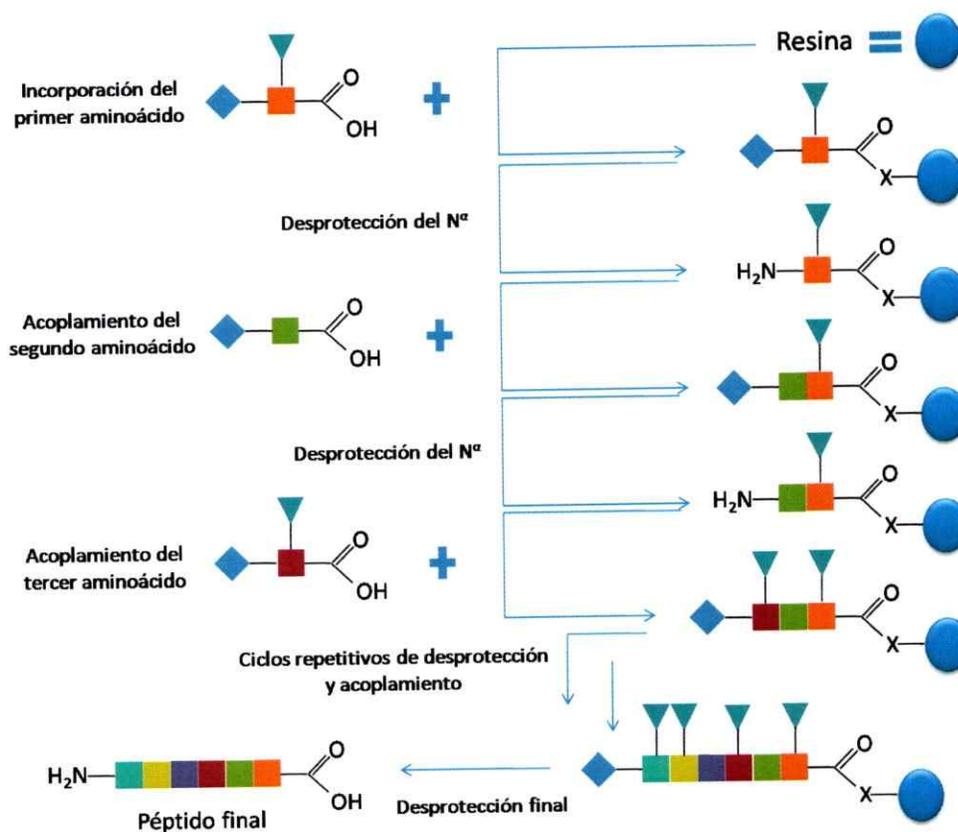


Figura S1. Esquema de la síntesis de péptidos en fase sólida mediante una estrategia lineal donde, X= O, péptido ácido; NH, péptido amida.

En la SPPS, la elongación del péptido se realiza desde el extremo C-terminal al N-terminal, para evitar la pérdida de quiralidad del residuo asociado a la función carbonilo que se acopla. El grupo carbonilo (C-terminal) es protegido permanentemente con una molécula *linker* unida covalentemente al polímero o resina, los cuales son insolubles en los solventes utilizados en el proceso sintético. Así, los excesos de reactivos, y productos secundarios en la reacción pueden eliminarse simplemente por filtración y lavado del polímero que contienen el péptido en crecimiento.

En la síntesis del péptido CLPFFD fue utilizada la estrategia Fmoc/tBu, en la cual el grupo Fmoc (9-flourenilmetoxicarbonilo) actúa como protector de la función  $\alpha$ -amino y el grupo tBu (tert-butilo) protege las funciones laterales de los aminoácidos.

## **A.1. Parte experimental**

### *A.1.1. Reactivos y solvente utilizados*

- Resina: Aminomethyl Chem Matrix (1.5g), Funcionalización: 0,57 mmol/g. PCAS BioMatrix Inc.
- DCM (Diclorometano. Carlo Hebra -SDS)
- DMF (Dimetilformamida)
- TFA (Ácido trifluoroacético)
- DIPEA (N, N-Diisopropylethylamine. Sigma-Aldrich, 99, 5% Biotech. grade)
- Test de Ninhidrina. Solución A, Solución B.
- Linker (Fmoc-Rink Amide-Linker  $C_{32}H_{29}NO_7$ , MW = 539,58g/mol. Iris Biotech GmbH)

- DIPCDI (N, N'-Diisopropilcarbodimida,  $C_7H_{14}N_2$ , MW = 126,2g/mol,  $\rho = 0,813$   
– 0,815 g/mL, Merck 99%)
- Oxima (Etil cianogloxilato-2-oxima, 97% Aldrich)
- HOAt (1-hidroxi-7-azabenzotriazol) MW = 136,14 g/mol
- TIS (tri-isopropilsilano)
- Aminoácidos, Marca Iris Biotech GmbH:

Ácido aspártico (D): Fmoc-L-Asp(tBu)-OH N-alpha-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)-  
L-aspartic acid beta-t-butyl ester  $C_{23}H_{25}NO_6$ , MW = 411,5g/mol

Fenilalanina (F): (Fmoc-L-Phe-OH N-alpha-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)-L-  
phenilalanine  $C_{24}H_{21}NO_4$ , MW = 387,4 g/mol

Prolina (P): (Fmoc-L-Pro-OH N-alpha-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)-L-proline  
 $C_{20}H_{19}NO_4$ , MW=337,40 g/mol

Leucina (L): (Fmoc-L-Leu-OH N-alpha-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)-L-leucine  
 $C_{21}H_{23}NO_4$ , MW=353,4 g/mol

Cisteína (C): (Fmoc-L-Cys-NH<sub>2</sub> N-alpha-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)-L-cysteine  
amide  $C_{18}H_{18}N_2O_3S$ , MW = 342,41 g/mol.

### *A.1.2. Metodología*

#### *A.1.2.1. Acondicionamiento de la resina*

La resina fue acondicionada en un proceso sucesivo de lavados continuos de 1 minuto de duración, con los solventes DCM y DMF de manera alternada. Los lavados continuos fueron realizados para aumentar y disminuir el tamaño de las bolas de

poliestireno que conforman la resina y de esta manera, aumentar la superficie de exposición de todos los puntos funcionalizados de la resina, a los reactivos y solventes.

Lavados posteriores con TFA/DCM 1% (99mL de DCM y 1mL de TFA) y DIPEA/DCM al 5% (5mL de DIPEA en 95mL de DCM), permitieron dejar expuestos los grupos amino para el comienzo de la síntesis, finalizando con lavados de 5 minutos con DCM y DMF.

Para comprobar la presencia de grupos aminos libres en la resina, fue realizado el Test de Ninhidrina, el cual permite identificar la presencia de grupos aminos primarios libres al formarse un complejo de color azul.

Posteriormente se realizó el acoplamiento del *linker*. Este espaciador permite otorgar una terminación amida en el péptido y une al soporte polimérico, la cadena peptídica en formación. El proceso se realizó agregando 3 equivalentes del linker, DIPCDI y Oxima, permaneciendo en reposo durante 2 horas y lavando finalmente con DCM y DMF.

El espaciador utilizado posee el grupo Fmoc como protector de la función  $\alpha$ -amino, por lo tanto, al chequear la presencia de grupos aminos primarios libres mediante el test de Ninhidrina resultó ser negativo (inoloro). Esta función fue removida con una solución de Piperidina/DMF al 20% para proseguir con el acoplamiento del primer aminoácido, en este caso el residuo de ácido aspártico (D).

#### *A.1.2.2. Acoplamiento sucesivo de cada aminoácido*

El acoplamiento de todos los aminoácidos que conforman el péptido CLPFFD fue realizado agregando 3 equivalentes de cada aminoácido con 3 equivalentes de DIPCDI y HOAT, dejando reposar durante 2 horas.

De manera sucesiva después de cada acoplamiento, se realizó el test de Ninhidrina para chequear la efectividad del proceso y la desprotección del grupo  $\alpha$ -amino, para continuar con la adición del siguiente aminoácido en la estructura.

Este procedimiento se efectuó continuamente, excepto en el acoplamiento del residuo de Prolina (P), ya que este péptido posee un grupo amino secundario en su estructura por lo tanto, el test de Ninhidrina (sólo para aminas primarias) fue reemplazado por el test de Cloranil.

El test de Cloranil se realizó añadiendo 20 gotas de acetona y 5 gotas de la solución de cloranil, agitando durante 5min. En este test, una coloración verde intenso indica la desprotección de la amina secundaria y si está protegida, el test es negativo, y la resina presenta un color amarillo.

#### *A.1.2.3. Desanclaje del péptido desde la resina*

Se agregó una solución de TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (95:2,5:2,5) sobre la resina cubriéndola completamente y exponiéndola a los vapores emanados de 50 mL de la misma solución dentro de un balón. Este proceso fue dejado en reposo durante 40 minutos y se repitió una vez más. Posteriormente la resina se dejó secar completamente y para apresurar el proceso ésta fue lavada con DCM.

El solvente fue removido por rotavaporación hasta un mínimo de 20 mL y el péptido fue precipitado con 200mL de éter dietílico frío.

La fase éter fue decantada y lavada dos veces con éter dietílico, centrifugando durante 5 minutos a 3500rpm para obtener el péptido crudo.

El péptido crudo fue disuelto en ACN/H<sub>2</sub>O 1:1, agregando de 3 a 5 gotas de HCl 200mmol/L para reemplazar el ión TFAcetato por iones Cl<sup>-</sup>. Finalmente, el péptido fue liofilizado.

### **A.1.3. Caracterización del péptido CLPFFD**

#### *A.1.3.1. Análisis por HPLC*

El análisis de HPLC para detectar la pureza del péptido fue realizado en un equipo analítico Waters 1525 con detección UV a 214 nm de longitud de onda. El equipo consta de en una columna Waters Sunfire C18 y se utilizó un gradiente de 5-100 ACN/H<sub>2</sub>O.

#### *A.1.3.2. Análisis por Espectroscopía de Masa (EM) MALDI-TOF.*

El péptido CLPFFD, fue caracterizado mediante EMMALDI-TOF en un equipo Bruker ModelBiflex III utilizando como matriz una solución de ácido 2,5-dihidrobenzóico 10mg/mL preparada en acetonitrilo/ácido fórmico 0,1%v/v.

### A.1.3.3. Análisis de aminoácidos

El análisis de aminoácidos fue realizado en un equipo HPLC Water 2487 con columna Nova-Pak C18 a 37°C y ocupando como patrón interno ácido amino butírico (aaba).

## A.2. Resultados

Considerando el grado de funcionalización de la resina utilizada y la masa molecular teórica del péptido sintetizado, fue calculado el porcentaje de rendimiento de la síntesis, el cual fue de un 60,2%.

El péptido CLPFFD fue catacterizado mediante HPLC. La Figura S2, muestra el cromatograma de HPLC donde se aprecia una intensidad máxima alrededor de 5 minutos (tiempo de retención) con una pureza del péptido de 97,51%.

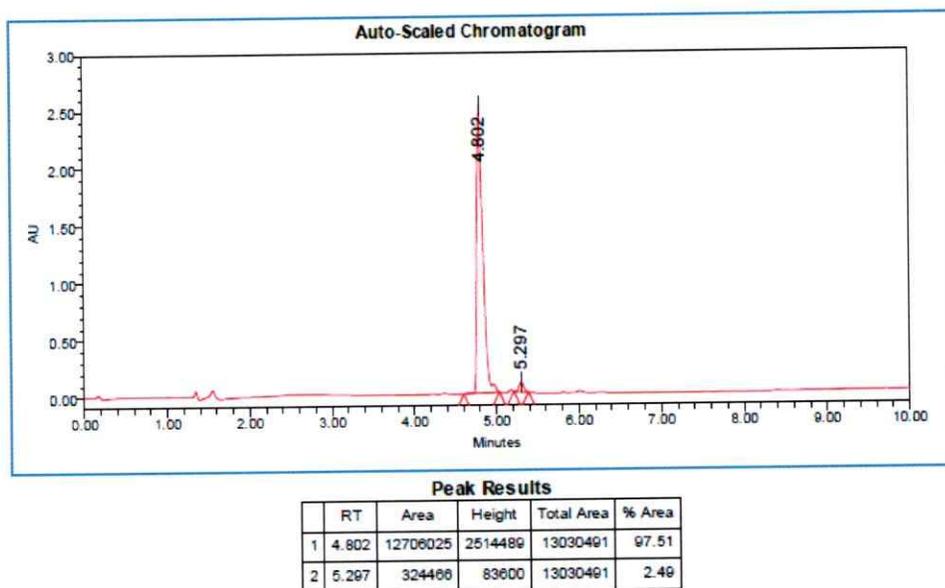
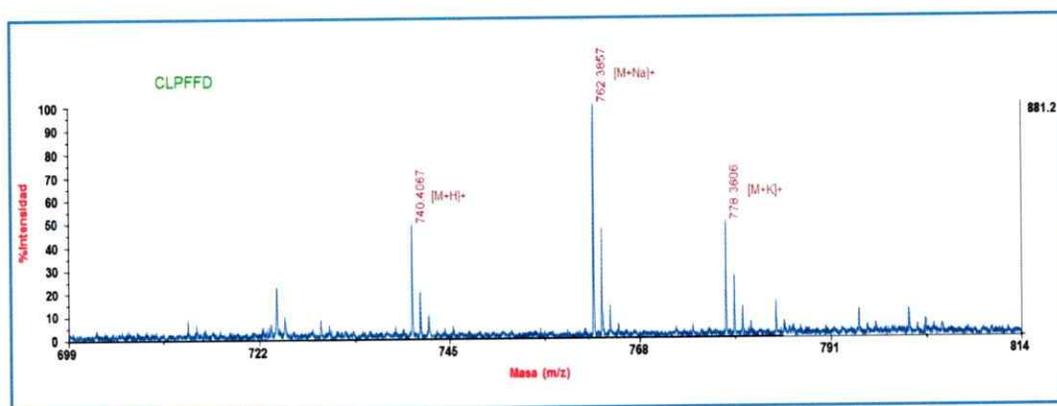


Figura S2.: Cromatograma HPLC del péptido CLPFFD.

La masa molecular del péptido fue determinada mediante espectroscopía de masas MALDI-TOF, detectando la presencia de los iones cuasimoleculares  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$  y  $[M+K]^+$  (ver Figura S3)

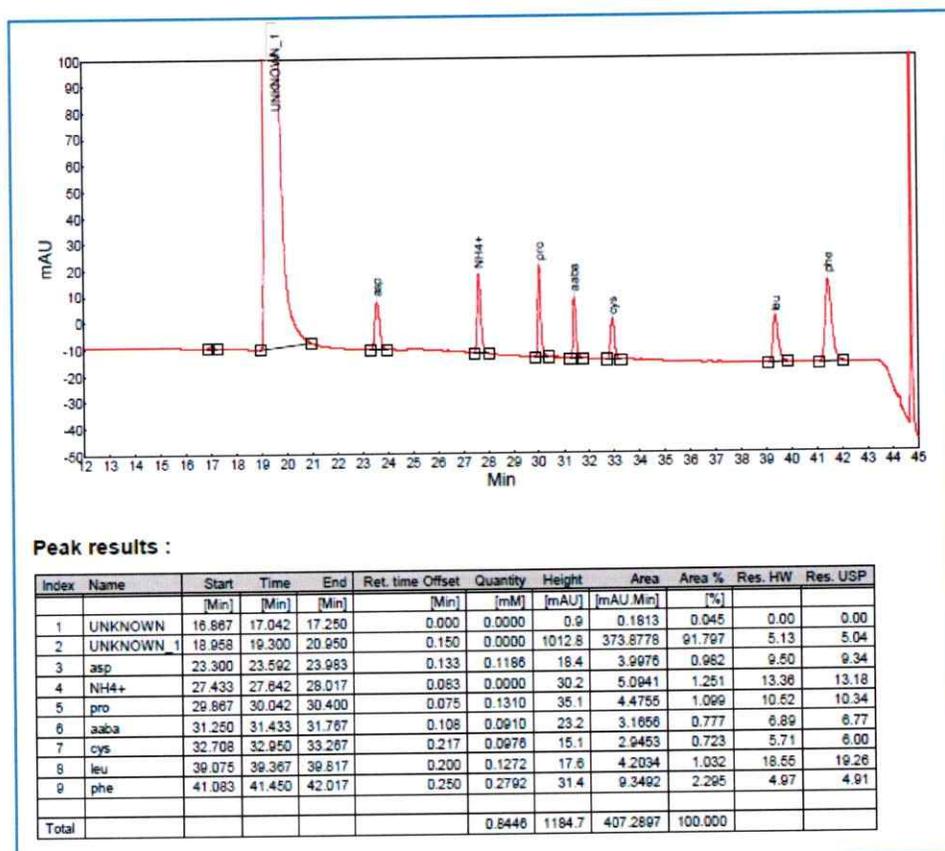


**Figura S3.** Espectro EM MALDI-TOF del péptido CLPFFD.

Mediante EM MALDI-TOF fue detectada la presencia del ión cuasimolecular  $[M+H]^+$  con una masa molecular igual a 740,4067 g, la cual concuerda con la masa molar teórica calculada para el péptido CLPFFD que es de 739,88 g/mol.

Las intensidades presentes a 762,39 g y 778,36 g corresponden a la masa encontrada para el péptido más iones de sodio y potasio, respectivamente. Estos iones se encuentran debido a la presencia de sales en el proceso de ionización de la muestra.

Para verificar la presencia de todos los aminoácidos que componen la secuencia peptídica del péptido CLPFFD, éste fue caracterizado mediante análisis de aminoácidos



**Figura S4:** Cromatograma del análisis de aminoácidos del péptido CLPFFD.

El estudio muestra cualitativamente todos los residuos presentes en la secuencia peptídica, confirmando la presencia de todos los aminoácidos que componen el péptido CLPFFD. De manera cuantitativa, el análisis muestra la concentración de cada aminoácido, la cual concuerda con la estequiometría del mismo.

## Anexo II

### Espectros, difractogramas y cromatogramas adicionales

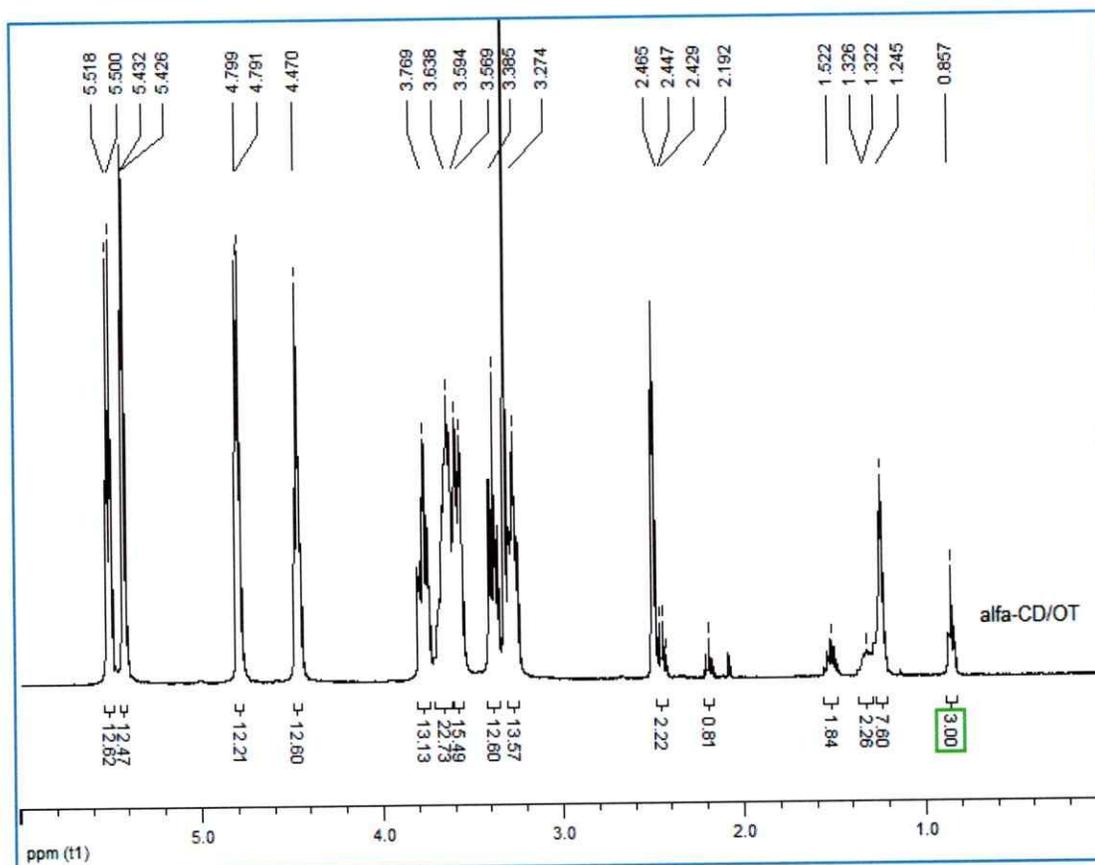


Figura S5. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del CI de  $\alpha$ -CD/OT.

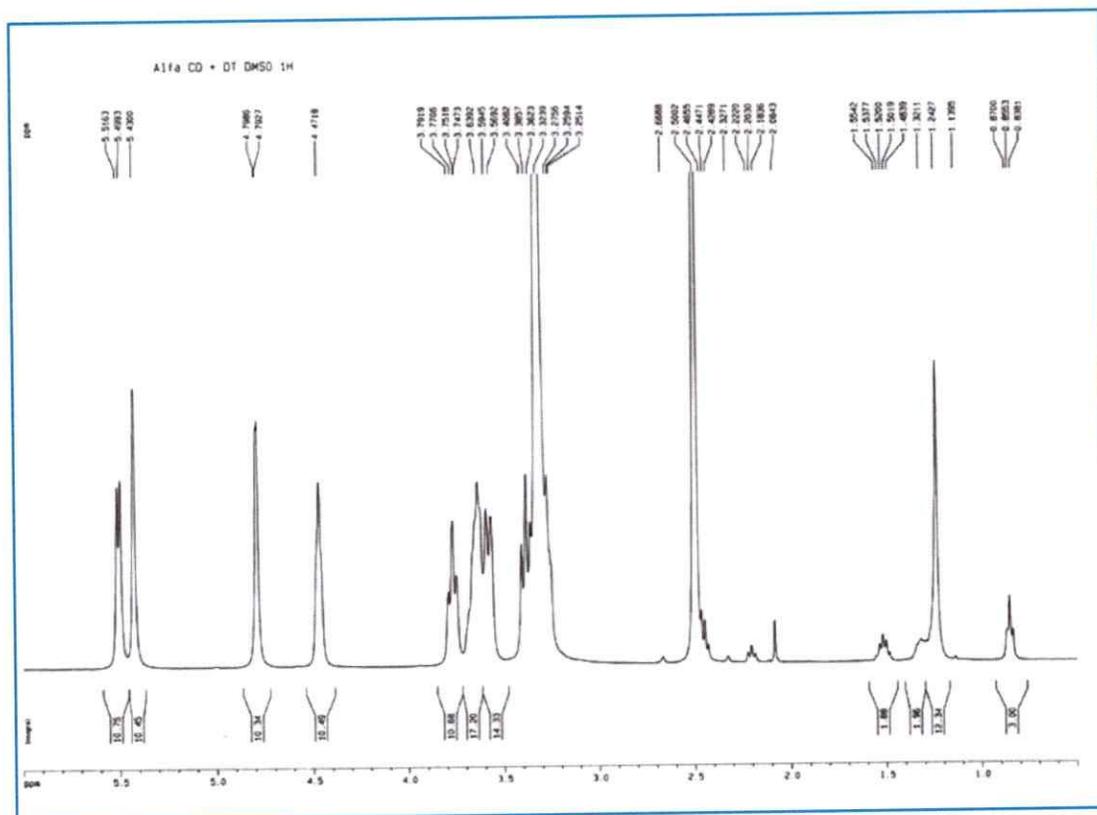


Figura S6. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H para el CI de  $\alpha$ -CD/DT.

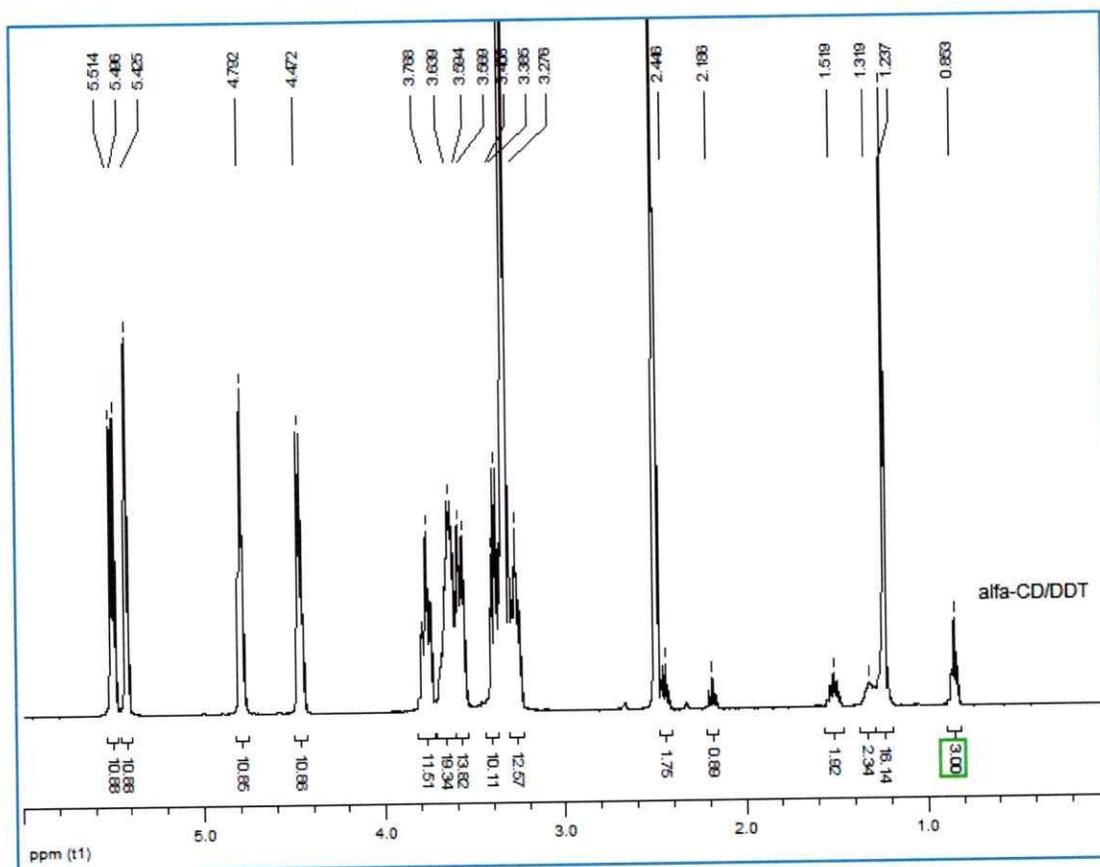


Figura S7. Espectro RMN-<sup>1</sup>H del CI de α-CD/DDT.

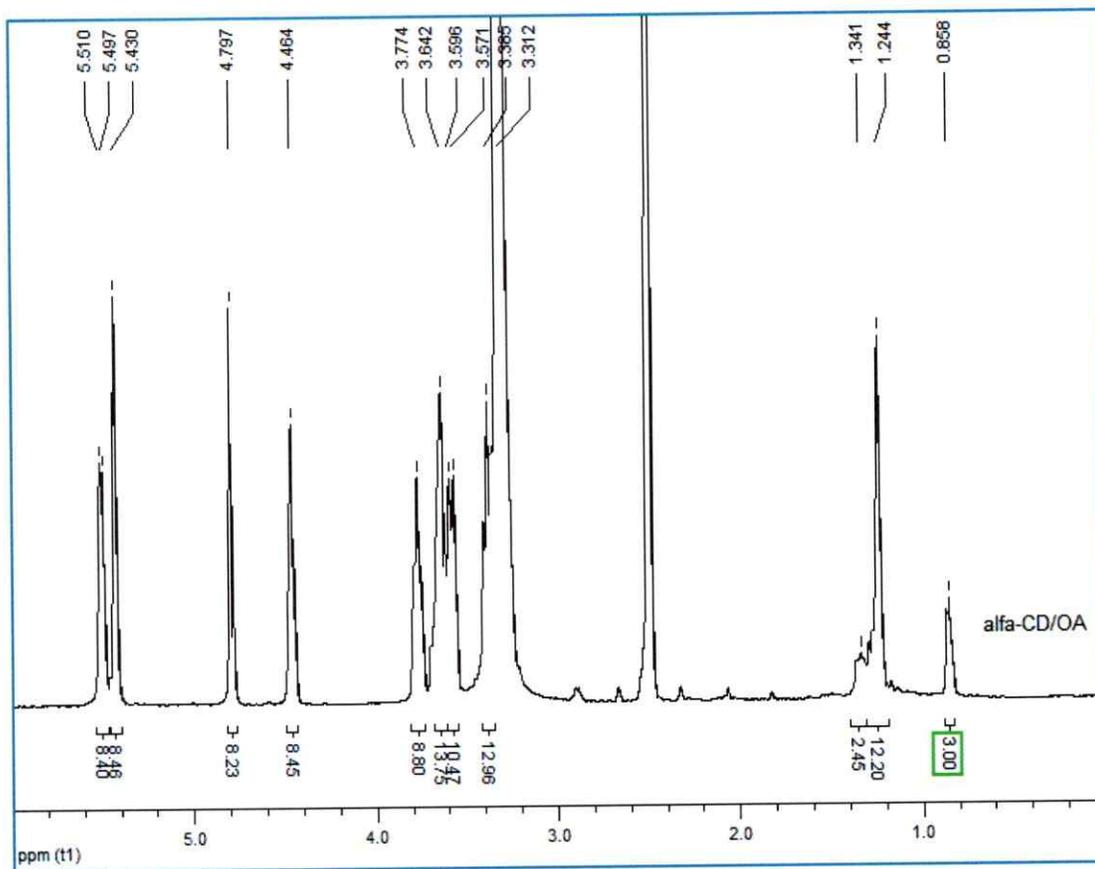


Figura S8. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H para el CI de  $\alpha$ -CD/OA.

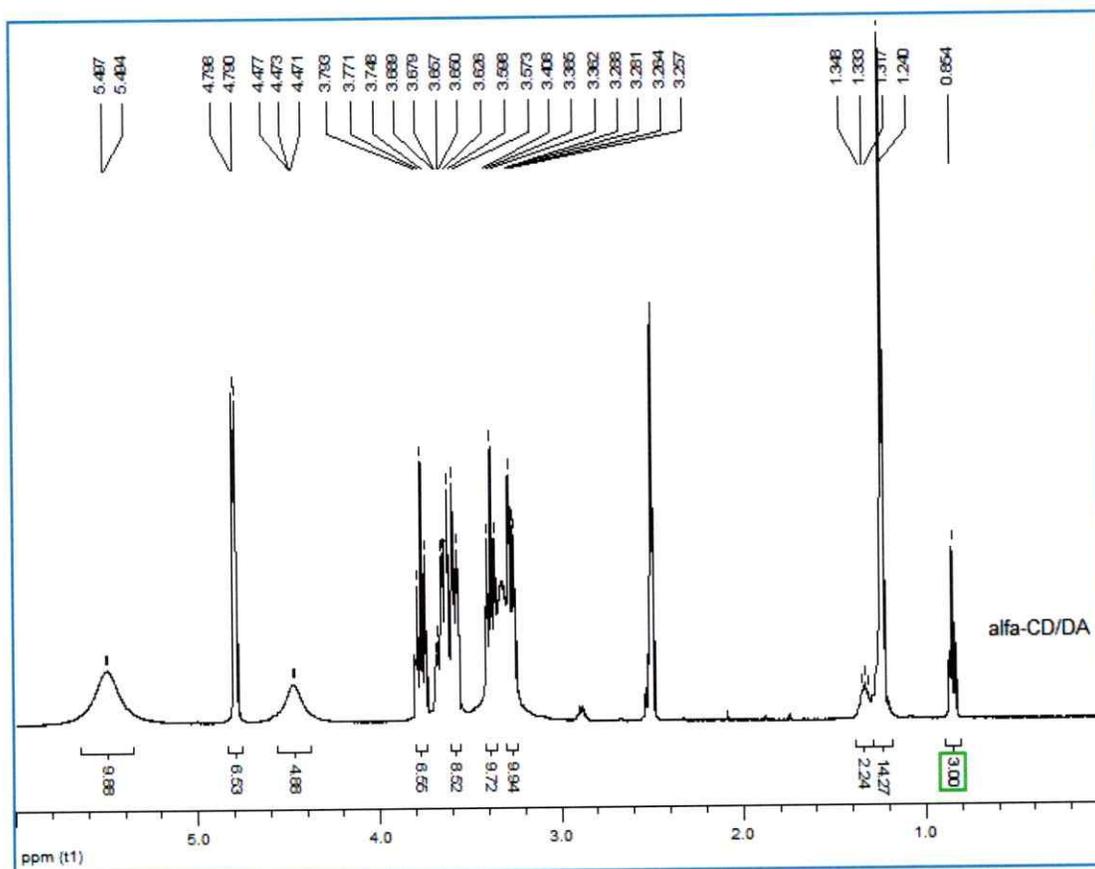


Figura S9. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H para el CI de α-CD/DA.

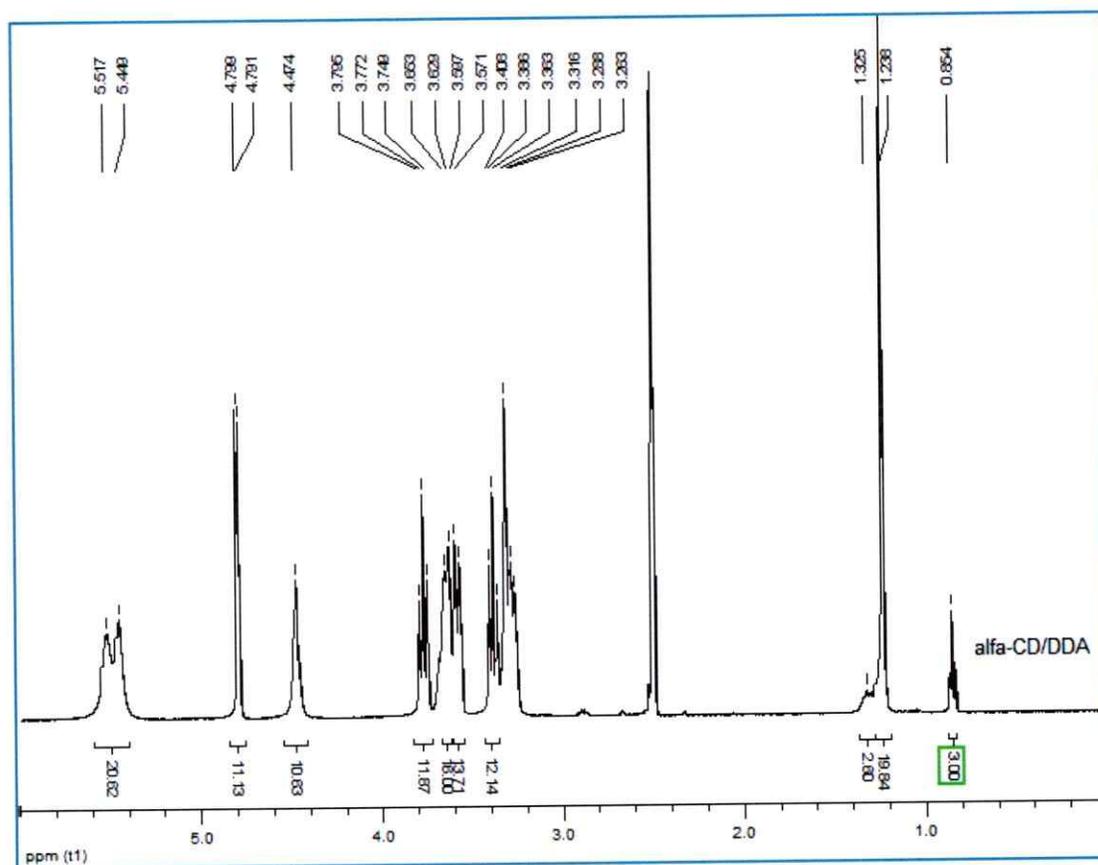


Figura S10. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H para el CI de  $\alpha$ -CD/DDA.

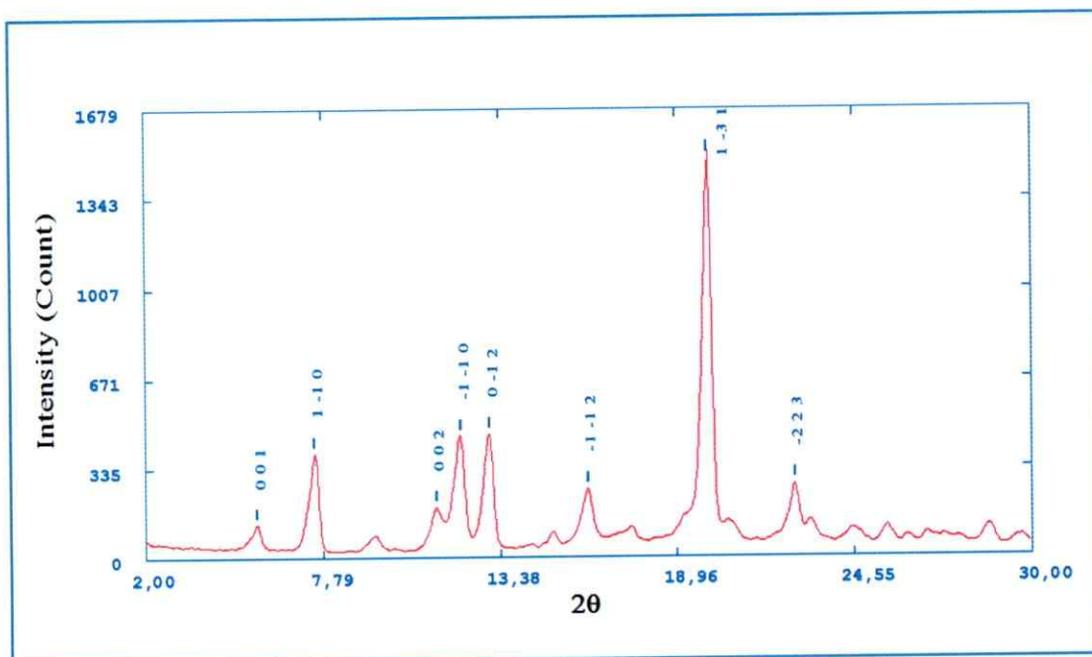


Figura S11. Difractograma para el CI de  $\alpha$ -CD/OT indexado para un sistema triclinico.

Tabla S1. Intensidades indexadas del difractograma para el CI de  $\alpha$ -CD/OT

h k l	d (Å, Exp.)	d (Å, Calc.)	Intensidad (Exp. %)
0 0 1	15,50853	15,6026	8,10500366
1 -1 0	11,75006	11,80393	26,055444
0 0 2	7,7778	7,8013	12,3919366
-1 -1 0	7,28203	7,15178	30,3417052
0 -1 2	6,77544	6,78189	30,8777398
-1 -1 2	5,47935	5,49091	16,9462152
1 -3 1	4,44054	4,4481	100
-2 2 3	3,91734	3,92321	18,0176126

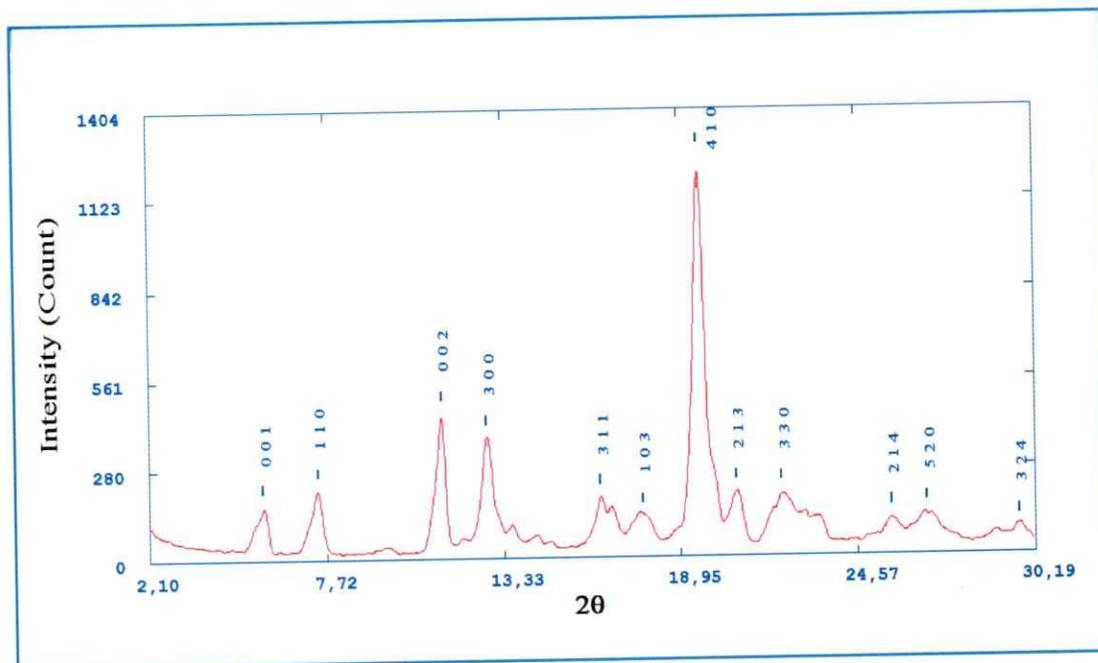


Figura S12. Difractograma para el CI de  $\alpha$ -CD/DT indexado para un sistema hexagonal.

Tabla S2. Intensidades indexadas del difractograma para el CI de  $\alpha$ -CD/DT

h	k	l	d (Å, Exp.)	d (Å, Calc.)	Intensidad (%)
0	0	1	15,49734	15,467	14,4451538
1	1	0	11,89081	12,06903	18,2907317
0	0	2	7,76675	7,7335	37,1954632
3	0	0	6,901	6,96806	31,1074854
3	1	1	5,39199	5,4289	16,0475436
1	0	3	4,98964	5,00567	11,2411624
4	1	0	4,52767	4,56166	100
2	1	3	4,28178	4,31774	17,0083469
3	3	0	4,0079	4,02301	16,6883419
2	1	4	3,47386	3,47313	10,2795709
5	2	0	3,32877	3,34735	11,2411624
3	2	4	3,00788	3,01017	7,7163778

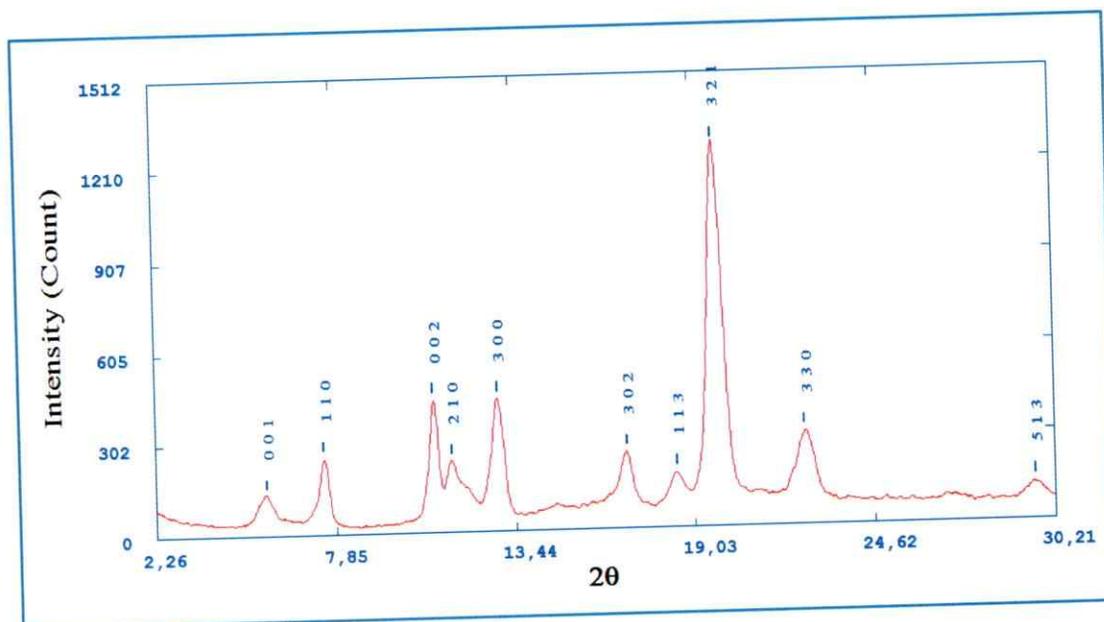


Figura S13. Difractograma para el CI de  $\alpha$ -CD/DDT indexado para un sistema hexagonal.

Tabla S3. Intensidades indexadas del difractograma para el CI de  $\alpha$ -CD/DDT

<b>h k l</b>	<b>d (Å, Exp.)</b>	<b>d (Å, Calc.)</b>	<b>Intensidad (Exp.%)</b>
0 0 1	15,5434	15,87999	9,01640712
1 1 0	11,80621	11,84	18,3958406
0 0 2	8,08592	7,94	32,778362
2 1 0	7,69971	7,7511	16,2076678
3 0 0	6,86572	6,83583	32,4654082
0 0 3	5,24664	5,29333	15,269641
1 1 3	4,79582	4,83238	8,70345334
3 2 1	4,4947	4,51093	100
3 3 0	3,95067	3,94667	19,3338674
5 1 3	3,01656	3,02335	5,2642999

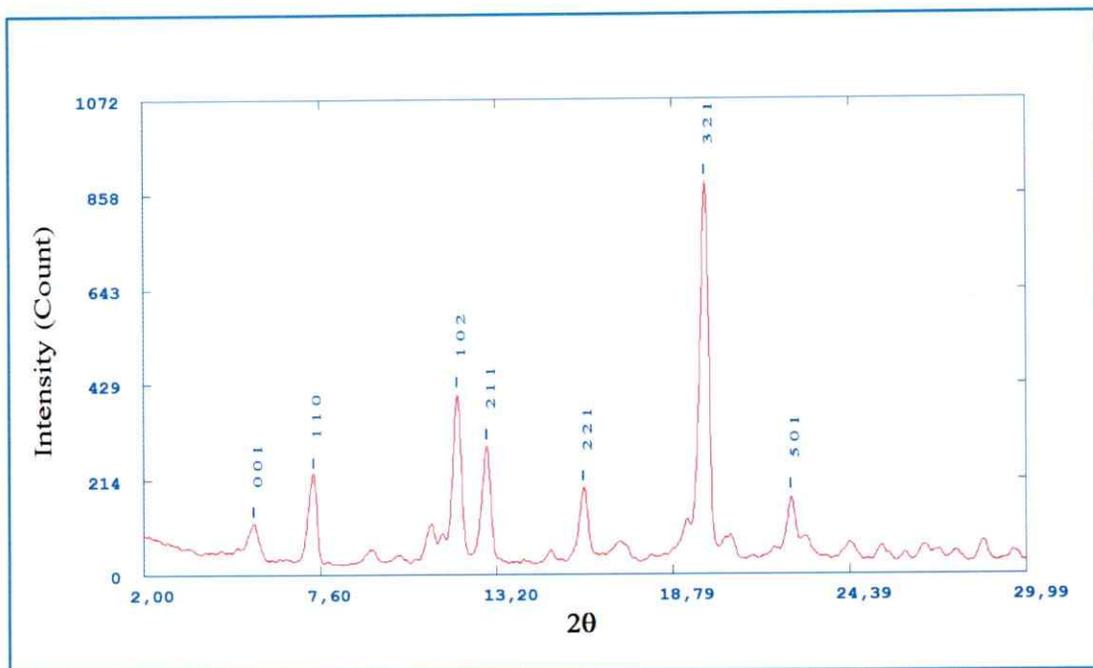


Figura S14. Difractograma para el CI de  $\alpha$ -CD/OA indexado para un sistema hexagonal.

Tabla S4. Intensidades indexadas del difractograma para el CI de  $\alpha$ -CD/OA.

h k l	d (Å, Exp.)	d (Å, Calc.)	Intensidad (Exp. %)
0 0 1	16,04073	15,68999	12,7864418
1 1 0	11,98067	11,755	25,2455215
1 0 2	7,40152	7,32039	45,7920342
2 1 1	6,85976	6,90916	32,4588524
2 2 1	5,5414	5,50399	21,7479767
3 2 1	4,47479	4,47679	100
5 0 1	3,94293	3,94147	19,5621533

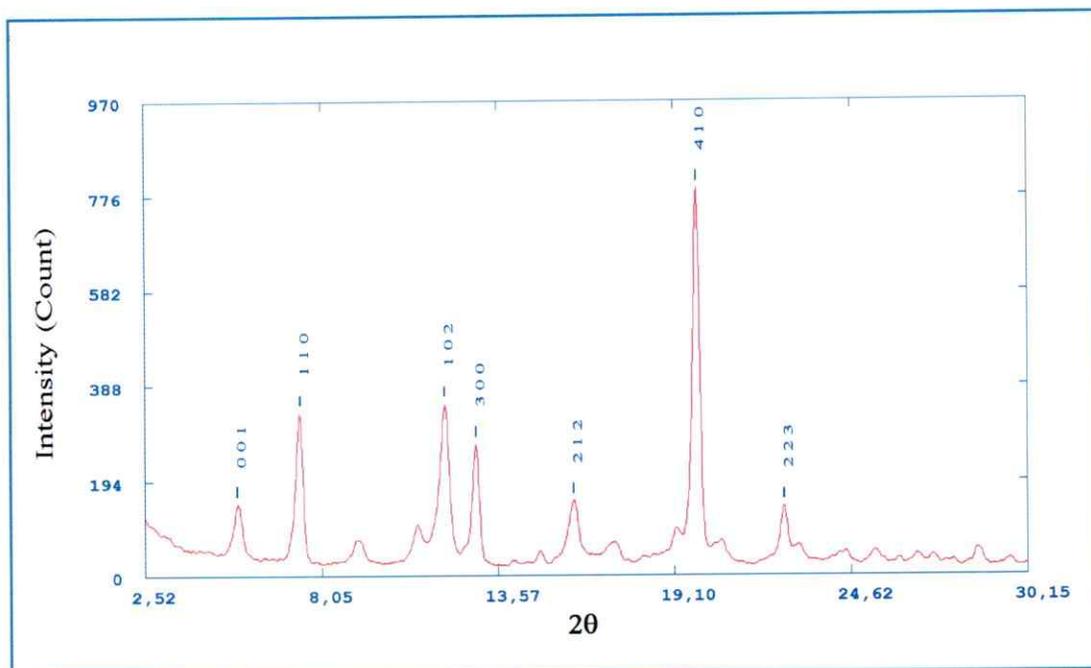


Figura S15. Difractograma para el CI de  $\alpha$ -CD/DA indexado para un sistema hexagonal.

Tabla S5. Intensidades indexadas del difractograma para el CI de  $\alpha$ -CD/DA.

<b>h k l</b>	<b>d(Å, Exp.)</b>	<b>d(Å, Calc.)</b>	<b>Intensidad (Exp.%)</b>
<b>0 0 1</b>	16,28899	15,90917	18,4968383
<b>1 1 0</b>	11,96593	11,91526	41,9712015
<b>1 0 2</b>	7,42288	7,42233	44,2250552
<b>3 0 0</b>	6,86056	6,87928	33,896691
<b>2 1 2</b>	5,54611	5,56942	19,0606191
<b>4 1 0</b>	4,47229	4,50354	100
<b>2 2 3</b>	3,94172	3,96111	17,5584732

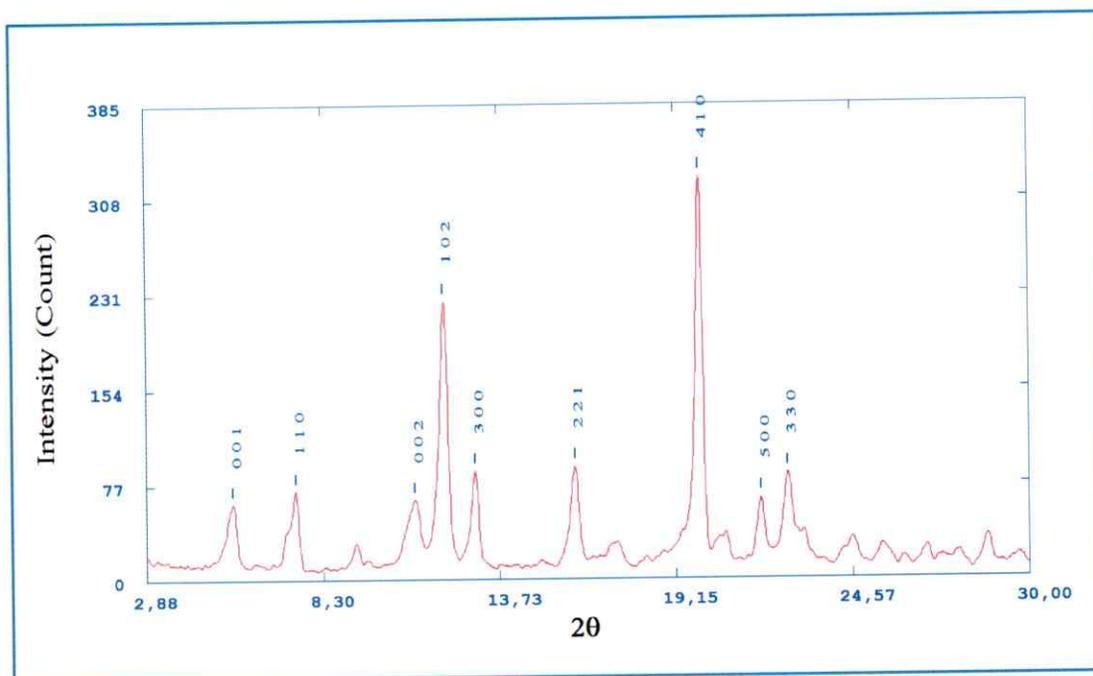
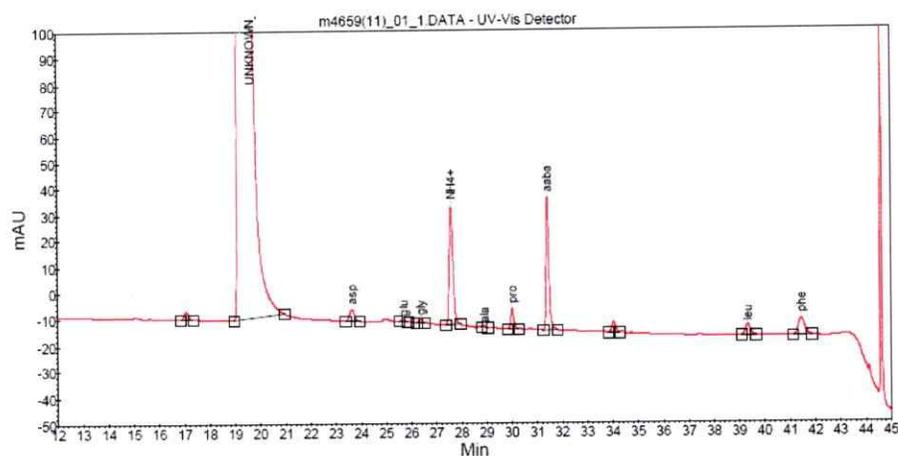


Figura S16. Difractograma para el CI de  $\alpha$ -CD/DDA indexado para un sistema hexagonal.

Tabla S6. Intensidades indexadas del difractograma para el CI de  $\alpha$ -CD/DDA.

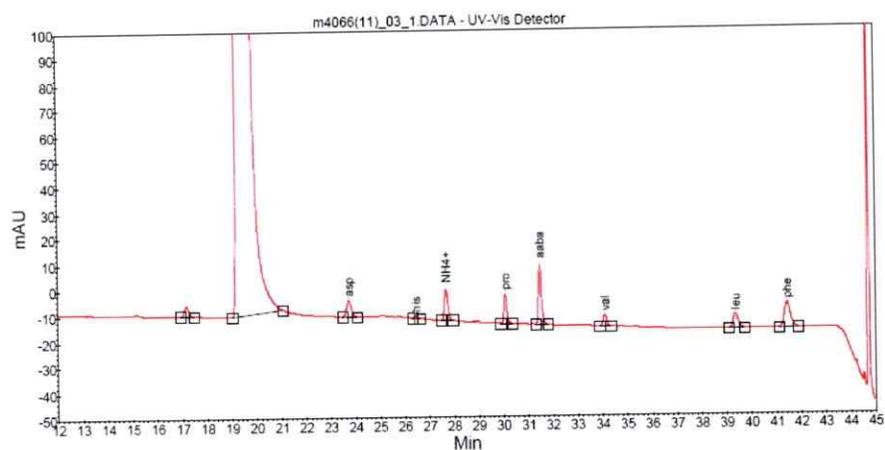
h	k	l	d (Å, Exp.)	d (Å, Calc.)	Intensidad (Exp. %)
0	0	1	15,97958	15,63999	18,8169725
1	1	0	11,83058	11,785	21,9700702
0	0	2	7,94215	7,82	19,605247
1	0	2	7,35649	7,30245	69,2603769
3	0	0	6,8092	6,80407	26,8967853
2	2	1	5,51313	5,51412	27,8821283
4	1	0	4,45423	4,45431	100
5	0	0	4,0779	4,08244	19,8023156
3	3	0	3,93372	3,92833	26,1085109



**Peak results :**

Index	Name	Start [Min]	Time [Min]	End [Min]	Ret. time Offset [Min]	Quantity [mM]	Height [mAU]	Area [mAU.Min]	Area % [%]	Res. HW	Res. USP
1	UNKNOWN	16.850	17.067	17.350	0.000	0.0000	3.0	0.5641	0.129	0.00	0.00
2	UNKNOWN_1	18.950	19.275	20.950	-0.133	0.0000	1130.7	414.8543	95.215	5.16	5.08
3	asp	23.383	23.833	23.950	-0.300	0.0295	4.6	0.9476	0.217	9.89	9.67
4	glu	25.525	25.675	25.867	-0.217	0.0037	0.9	0.1273	0.029	7.24	7.10
5	gly	26.208	26.367	26.542	-0.183	0.0071	1.5	0.2143	0.049	2.99	2.94
6	NH4+	27.383	27.592	27.967	-0.192	0.0000	45.0	7.4450	1.709	5.07	5.02
7	ala	28.800	28.892	29.050	-0.125	0.0014	0.5	0.0480	0.011	6.14	6.08
8	pro	29.833	30.017	30.283	-0.092	0.0287	7.8	1.0164	0.233	6.17	6.06
9	aaba	31.233	31.417	31.800	-0.067	0.2002	50.7	7.0309	1.614	6.81	6.67
10	UNKNOWN	33.842	34.033	34.275	0.000	0.0000	4.1	0.6621	0.152	11.11	10.99
11	leu	39.083	39.325	39.650	-0.025	0.0286	4.0	0.9139	0.210	16.97	16.93
12	phe	41.117	41.433	41.850	-0.058	0.0532	6.5	1.8803	0.432	5.12	5.09
Total						0.3506	1259.3	435.7042	100.000		

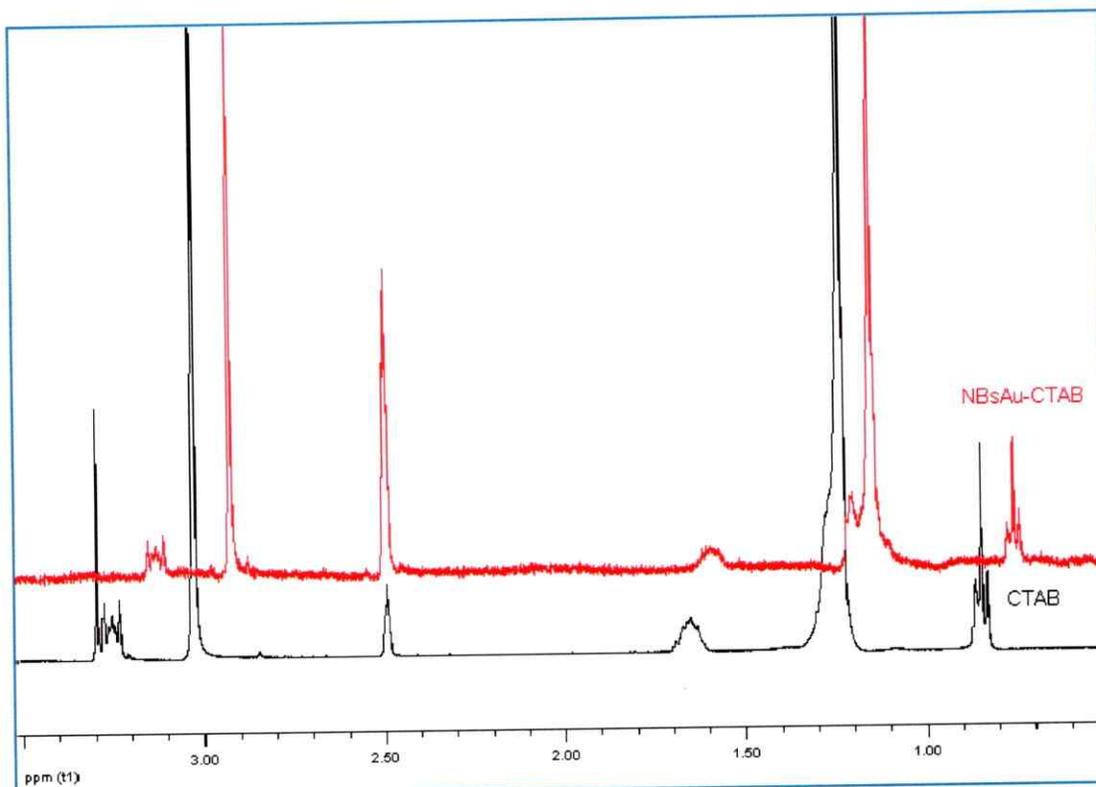
**Figura S17.** Cromatograma de análisis de aminoácidos HPLC de NPsONi- $\alpha$ -CD/DT funcionalizadas con péptido CLPFFD



Peak results :

Index	Name	Start [Min]	Time [Min]	End [Min]	Ret. time Offset [Min]	Quantity [mM]	Height [mAU]	Area [mAU.Min]	Area % [%]	Res. HW	Res. USP
1	UNKNOWN	16.933	17.167	17.467	0.000	0.0000	4.0	0.7759	0.168	0.00	0.00
2	UNKNOWN	19.025	19.358	21.067	0.000	0.0000	1180.4	448.6001	97.011	4.95	4.84
3	asp	23.483	23.742	24.067	0.283	0.0402	6.4	1.3549	0.293	9.59	9.41
4	his	26.308	26.450	26.625	-0.100	0.0038	1.0	0.1323	0.029	9.73	9.58
5	NH4+	27.492	27.683	27.967	0.125	0.0000	12.1	1.9929	0.431	5.12	5.06
6	pro	29.892	30.083	30.367	0.117	0.0424	11.3	1.4478	0.313	10.54	10.37
7	aaba	31.300	31.483	31.800	0.158	0.0913	23.2	3.1741	0.686	6.90	6.79
8	val	33.900	34.100	34.342	-0.150	0.0210	4.5	0.7394	0.160	11.00	10.87
9	leu	39.083	39.358	39.717	0.192	0.0401	5.7	1.3266	0.287	16.59	16.44
10	phe	41.100	41.425	41.867	0.225	0.0859	9.9	2.8781	0.622	4.99	4.95
Total						0.3247	1258.5	462.4222	100.000		

Figura S18. Análisis de AA mediante HPLC para NP<sub>5</sub>OC<sub>o</sub>- $\alpha$ -CD/DDT funcionalizadas con el péptido CLPFFD.



**Figura S19.** Espectros de RMN-<sup>1</sup>H del surfactante CTAB (negro) y de CTAB cuando se encuentra formando la bicapa alrededor de las NBsAu. TMS fue utilizado como referencia interna.

**Tabla S7.** Desplazamientos de las señales correspondientes a los protones de la molécula de CTAB y de los mismos cuando las moléculas de CTAB rodean las NBsAu

Señal	CTAB (ppm)	NBsAu/CTAB (ppm)	$\Delta \delta$ (ppm)
-CH <sub>3</sub>	0.839	0.751	0.088
-CH <sub>2</sub>	1.642	1.585	0.057
-CH <sub>2</sub>	3.223	3.122	0.101
-CH <sub>2</sub>	3.266	3.156	0.110
(-CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub>	1.225	1.142	0.083
-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	3.020	2.918	0.102

## REFERENCIAS

- [1] Lehn, J. M. (1990) Perspectives in supramolecular chemistry From molecular recognition towards molecular information processing and self-organization. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29:1304-1319
- [2] Lehn J. M., (1988) Supramolecular chemistry –Scope and perspectives molecules, supermolecules, and molecular devices (Nobel Lecture) *Angew. Chem. Int Ed. Engl.* 27: 89-112
- [3] Szejtli J. (1998) Introduction and overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev.* 98: 1743-1753
- [4] Coleman, A. W., Nicolis, I., Keller, N. and Dalbiez, J. P.(1992) Aggregation of cyclodextrins: An explanation of the abnormal solubility of  $\beta$ -cyclodextrin. *J. Inclus. Phenom. Mol.* 13: 139-143
- [5] Kenneth A. Connors (1997) The stability of cyclodextrin complexes in solution, *Chem. Rev.*, 97: 1325-1357
- [6] Harata, K. (1998) Structural aspects of stereo-differentiation in the solid state. *Chem. Rev.* 98: 1803-1827
- [7] Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J. C., Rial-Otero, R., Simal Gándara, J. (2009) A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloid.* 23: 1631–1640
- [8] Loftsson, T., Duchêne, D. (2007) Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.* 329: 1-11
- [9] He, Y., Fu, P., Shen, X., Gao, H. 2008. Cyclodextrin-based aggregates and characterization by microscopy. *Micron* 39: 495–516
- [10] Nascimento, C. S. Jr., Anconi, C. P. A., Dos Santos, H. F. and De Almeida W. B. (2005) Theoretical study of the  $\alpha$ -cyclodextrin dimer. *J. Phys. Chem. A.* 109: 3209-3219

- [11] Nagaraju, M. and Narahari Sastry, G. (2009) Theoretical studies on inclusion complexes of cyclodextrins. *J. Phys. Chem. A* 113: 9533–9542
- [12] Shin, K., Dong, T., He, Y., Taguchi, Y., Oishi, A., Nishida H., Inoue Y. (2004) Inclusion complex formation between  $\alpha$ -cyclodextrin and biodegradable aliphatic polyesters. *Macromol. Biosci.* 4: 1075–1083
- [13] Jara, P., Barrientos, L., Herrera, B., Sobrados, I. (2008) Inclusion compounds of  $\alpha$ -cyclodextrin with alkylthiols. *J. Chil. Chem. Soc.* 53(2): 1399-1401
- [14] Jara, P., Justiniani, M., Yutronic, N., Sobrados, I. (1998) Synthesis and structural aspects of cyclodextrin/dialkylamine inclusion compounds. *J Incl. Phenom.* 32(1): 1-8
- [15] Rodríguez-Llamazares, S., Yutronic, N., Jara, P., Noyong, M., Bretschneider, J., Simon, U. (2007) The structure of the first supramolecular  $\alpha$ -cyclodextrin complex with an aliphatic monofunctional carboxylic acid. *Eur. J. Org. Chem.* 2007(26): 4298-4300
- [16] Wang Z. L. (2000) Capítulo 1: “Nanomaterials for Nanoscience and Nanotechnology” Editado por Wang Z. L., “Characterization of Nanophase Materials” pp. 1, Editorial Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim (Alemania).
- [17] Poole, Jr. C. P., Owens, F. K. (2007) “Introducción a la Nanotecnología”. Versión editada por Cao Vázquez, R., pp. 79-80. Editorial Reverté, Barcelona, España.
- [18] Alivisatos, A. P. (1996) Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science* 271(5251): 933-937
- [19] Zhang J. Z. (1997) Ultrafast studies of electron dynamics in semiconductor and metal colloidal nanoparticles: Effects of size and surface. *Acc. Chem. Res.* 30: 423-429
- [20] Daniel M. C., Astruc, D. (2004) Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem. Rev.* 104: 293-346
- [21] El-Sayed, M. A. (2001) Some interesting properties of metals confined in time and nanometer space of different shapes. *Accounts. Chem. Res.* (4): 257-264

- [22] Barber, D. J. (1990) An investigation of the origin of the colour of the Lycurgus cup by analytical transmission electron microscopy, *Archaeometry* 32(1): 33-45.
- [23] Faraday, M. (1857) The bakerian lecture: Experimental relations of gold (and other metals) to light. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 147: 145-181.
- [24] Mie, G. (1908) Beiträge zur Optik triiber Medien, speziell kolloidaler Metalllösungen. *Ann. Phys.* 25(3): 377-445.
- [25] Jain, P. K., Lee, K. S., El-Sayed, I. H. and El-Sayed, M. A. (2006) 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
- [26] Burda, C., Green, T., Landes, C., Link, S., Little, R., Petroski, J., and El-Sayed, M. A. (2000) Capítulo 7: "Optical Spectroscopy of Nanophase Material" Editado por Wang Z. L., "Characterization of Nanophase Materials" pp. 200-204, Editorial Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim (Alemania).
- [27] Creighton J. A. and Eadon, D. G. (1991) Ultraviolet-visible absorption spectra of the colloidal metallic elements, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 87(24): 3881-3891
- [28] Berciaud, S., Cognet, L., Tamarat, P. and Lounis, B. (2005) Observation of intrinsic size effects and optical response of individual gold nanoparticles, *Nano Lett.* 5(3):515-518
- [29] Papavassiliou, G. C. (1979) Optical properties of small inorganic and organic metal particles, *Prog. Solid St. Chem.* 12: 185-271.
- [30] Kelly, K. L., Coronado, E., Zhao, L. L., and Schatz, G. C. (2003) The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment. *J. Phys. Chem. B* 107: 668-677
- [31] Eustis, S. and El-Sayed, M. A. (2006) Determination of the aspect ratio statistical distribution of gold nanorods in solution from a theoretical fit of the observed inhomogeneously broadened longitudinal plasmon resonance absorption spectrum. *J. Appl. Phys.* 100 (044324); doi: 10.1063/1.2244520

- [32] Eustis, S. and El-Sayed, M. A. (2006) Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface Plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chem. Soc. Rev.* 35: 209–217
- [33] Brust, M., Kiely, C. J. (2002) Some recent advances in nanostructure preparation from gold and silver particles: a short topical review. *Colloids Surf., A* 202:175–186
- [34] Turkevich, J., Stevenson P.C., Hillier, J. (1953) The formation of colloidal gold. *J. Phys. Chem.* 57(7): 670-673
- [35] Sun, S. and Zeng, H., (2002) Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* 124: 8204-8205
- [36] Gedanken, A., (2004) Using sonochemistry for the fabrication of nanomateriales. *Ultrason. Sonochem.* 11: 47–55
- [37] Rodriguez-Llamazares, S., Merchán, J., Olmedo, I., Marambio, H. P., Muñoz, J. P., Jara, P., Sturm, J. C., Chornik, B., Peña, O., Yutronic, N. and Kogan, M. J. (2008) Ni/Ni oxides nanoparticles with potential biomedical applications obtained by displacement of a nickel-organometallic complex. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 8(9): 1-8
- [38] Khan, Z., Al-Thabaiti, S. A., Obaid, A. Y., Al-Youbi, A.O. (2011) Preparation and characterization of silver nanoparticles by chemical reduction method. *Colloids Surf. B* 82: 513–517
- [39] Xiao, C., Ding, H., Shen, C., Yang, T., Hui, C. and Gao, H.-J. (2009) Shape-controlled synthesis of palladium nanorods and their magnetic properties. *J. Phys. Chem. C.* 113: 13466–13469
- [40] Pérez-Juste, J., Pastoriza-Santos, I., Liz-Marzán, L. M., Mulvaney, P. (2005) Gold nanorods: synthesis, characterization and applications. *Coordin. Chem. Rev.* 249: 1870–1901
- [41] Dong, X., Ji, X., Jing, J., Li, M., Li, J. and Yang, W. (2010) Synthesis of triangular silver nanoprisms by stepwise reduction of sodium borohydride and trisodium citrate. *J. Phys. Chem. C* 114: 2070–2074

- [42] Yu, P., Huang J., Yuan, C.-T. and Tang, J. (2010) Synthesis of silver nanoprisms and nanodiscs and applications in fluorescence blinking suppression. *J. Chin. Chem. Soc.-Taip* 57: 528-533
- [43] Im, S. H., Lee, Y. T., Wiley, B., and Xia, Y. (2005) Large-scale synthesis of silver nanocubes: The role of HCl in promoting cube perfection and monodispersity. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44: 2154–2157
- [44] Puentes, V. F., Zanchet, D., Erdonmez, C. K. and Alivisatos, A. P. (2002) Synthesis of hcp-Co nanodisks. *J. Am. Chem. Soc.*, 124: 12874-12880
- [45] Lu, Y., Huang, J. Y., Wang, C., Sun, S. and Lou, J. (2010) Cold welding of ultrathin gold nanowires. *Nat. Nanotechnol.* 5: 218 – 224
- [46] Mafuné, F., Kohno, J.-Y., Takeda, Y. and Kondow, T. (2000) Formation and size control of silver nanoparticles by laser ablation in aqueous solution. *J. Phys. Chem. B* 104: 9111-9117
- [47] Asanithi, P., Chaiyakun, S., Limsuwan, P. (2012) Growth of silver nanoparticles by DC magnetron sputtering. *Dig J Nanomater.* DOI:10.1155/2012/963609
- [48] Safi, I. (2000) Recent aspects concerning DC reactive magnetron sputtering of thin films: a review. *Surf. Coat. Tech.* 127: 203-219
- [49] Kelly, P.J. and Arnell, R.D. (2000) Magnetron sputtering: a review of recent developments and applications. *Vacuum* 56: 159-172
- [50] Zhou, X., Wei, Q., Sun, K., Wang, L. (2009) Formation of ultrafine uniform gold nanoparticles by sputtering and redeposition. *Appl Phys Lett* 94(133107) DOI: 10.1063/1.3111443
- [51] Barrientos, L., Yutronic, N., del Monte, F., Gutiérrez, M. C., Jara, P. (2007) Ordered arrangement of gold nanoparticles on  $\alpha$ -cyclodextrins-dodecanethiol Inclusion Compound Produced by Magnetron Sputtering. *New J. Chem.* 31(8): 1400-1402
- [52] Liu, Y., Male, K. B., Bouvrette, P., Luong, J. H. T. (2003) Control of the size and distribution of gold nanoparticles by unmodified cyclodextrins. *Chem Mater* 15 (22): 4172–4180

- [53] Huang, Y., Li, D., Li, J. (2004)  $\beta$ -Cyclodextrin controlled assembling nanostructures from gold nanoparticles to gold nanowires. *Chemical Physics Letters* 389: 14–1
- [54] Bonacchi, D., Caneschi, A., Gatteschi, D., Sangregorio, C., Sessoli, R., Falqui, A. (2004) Synthesis and 221 a 221 equimetria 221 n of metal oxides nanoparticles entrapped in cyclodextrin. *J. Phys. Chem. Solids*. 65: 719–722
- [55] Li, L., Sun, X., Yang, Y., Guan, N. and Zhang, F. (2006) Synthesis of anatase TiO<sub>2</sub> nanoparticles with  $\beta$ -cyclodextrin as a supramolecular shell. *Chem. Asian J.* 1: 664 – 668
- [56] Lala, N., Lalbegi, S., Adyanthaya, S., Sastry, M. (2001) Phase transfer of aqueous gold colloidal particles capped with inclusion complexes of cyclodextrin and alkanethiol molecules into chloroform. *Langmuir* 17(12): 3766-3768
- [57] Wang, Y., Wong, J. F., Teng, X. W., Lin, X. Z., Yang, H. (2003) “Pulling” nanoparticles into water: phase transfer of oleic acid stabilized monodisperse nanoparticles into aqueous solutions of alpha-cyclodextrin. *Nano Lett.* 3(11): 1555-1559
- [58] Liu, J., Alvarez, J., Ong, W., Román, E. And Kaifer, A. E. (2001) Phase transfer of hydrophilic, cyclodextrin-modified gold nanoparticles to chloroform solutions. *J. Am. Chem. Soc.* 123: 11148-11154
- [59] Jaiswal, S., Duffy, B., Jaiswal, A. K., Stobie, N., McHal, P.(2010) Enhancement of the antibacterial properties of silver nanoparticles using  $\beta$ -cyclodextrin as a capping agent. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 36: 280–283
- [60] Crespo-Biel, O., Dordi, B., Reinhoudt, D. N. and Huskens, J. (2005) Supramolecular layer-by-layer assembly: alternating adsorptions of guest- and host-functionalized molecules and particles using multivalent supramolecular interactions. *J. Am. Chem. Soc.*, 127: 7594-7600
- [61] Barrientos, L., Allende, P., Orellana, C., Jara, P. (2012) Ordered arrangements of metal nanoparticles on alpha-cyclodextrin inclusion complexes by magnetron sputtering. *Inorg. Chim. Acta* 380: 372–377
- [62] Herrera, B., Bruna, T., Guerra, D., Yutronic, N., Kogan, M. J., Jara, P. (2013) Silver nanoparticles produced by magnetron sputtering and selective nanodecoration onto

- alpha- cyclodextrin/carboxylic acid inclusion compounds crystals. ANP 2(2): 112-119
- [63] Liu, X., Atwater, M., Wang, J. and Huo, Q (2007) Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids Surf. B* 58: 3-7
- [64] Nikoobakht, B. and El-Sayed, M.A. (2003) Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. *Chem. Mater.* 15: 1957-1962
- [65] Smith, D. K., Korgel, B. A. (2008) The importance of the CTAB surfactant on the colloidal seed-mediated synthesis of gold nanorods. *Langmuir* 24: 644-649
- [66] Hutter, E., Boridy, S., Labrecque, S., Lalancette-Hébert, M., Kriz, J., Winnik, F. M., Maysinger D. (2010) Microglial response to gold nanoparticles. *ACS Nano.* 4 (5): 2595–2606.
- [67] Turkevich, J., Stevenson, P. C. and Hillier, J. (1951) A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* 11: 55-75
- [68] Zagorski, M. G., Yang, J., Shao, H., Ma, K., Zeng, H., and Hong, A. (1999) Methodological and chemical factors affecting amyloid  $\beta$  peptide amyloidogenicity. *Methods Enzymol.* 309:189-204
- [69] Crescenzi, O., Tomaselli, S., Guerrini, R., Salvadori, S., D'Ursi, A. M., Temussi, P. A. and Picone, D. (2002) Solution structure of the Alzheimer amyloid b-peptide (1–42) in an apolar microenvironment. *Eur. J. Biochem.* 269: 5642–5648.
- [70] Bhattacharjya, S., Venkatraman, J., Kumar, A. and Balaram, P. (1999) Fluoroalcohols as structure modifiers in peptides and proteins: hexafluoroacetone hydrate stabilizes a helical conformation of melittin at low pH. *J. Peptide Res.* 54:100–111.
- [71] Huang, L., Allen, E., Tonelli, A. E. (1998) Study of the inclusion compounds formed between  $\alpha$ -cyclodextrin and high molecular weight poly(ethylene oxide) and poly( $\epsilon$ -caprolactone). *Polymer* 39(20): 4857–4865

- [72] Manolikas, M. K., Sawant, M. R. (2003) Study of solubility of isoproturon by its complexation with  $\beta$ -cyclodextrin. *Chemosphere* 51(8): 811–816
- [73] Martin Del Valle, E. M. (2004) Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem.* 39: 1033–1046
- [74] Fielding, L. (2000) Determination of association constants ( $K_a$ ) from solution NMR data. *Tetrahedron* 56:6151–6170
- [75] Inoue, Y. (1993) NMR Studies of the structure and properties of cyclodextrins and their inclusion complexes. *Ann. R. NMR S.* 27:59–101.
- [76] Barrientos, L., Lang, E., Zapata-Torres, G., Celis-Barros, C., Orellana, C., Jara, P., Yutronic, N. (2013) Structural elucidation of supramolecular  $\alpha$ -cyclodextrin dimer/aliphatic monofunctional molecules complexes. *J. Mol. Model.* 19:2119–2126
- [77] Herrera, B., Adura, C., Yutronic, N., Kogan, M. J., Jara, P. (2013) Selective nanodecoration of modified cyclodextrin crystals with gold nanorods. *J. Colloid. Interf. Sci.* 389: 42–45
- [78] Caira, M. (2011) On the structurality of cyclodextrin inclusion complexes and its practical utility. *Rev. Roum. Chim.* 46(4): 371-386
- [79] Hunt, M. A., Rusa, C. C., Tonellia, A. E. and C. Balik, C. M. (2004) Structure and stability of columnar cyclomaltohexaose ( $\alpha$ -cyclodextrin) hydrate. *Carbohydr. Res.* 339: 2805–2810
- [80] Dang, Z., Xin Song, L., Qing Guo, X., Yun Du, F., Yang, J., Yang, J. (2011) Applications of powder X-ray diffraction to inclusion complexes of cyclodextrins. *Curr. Org. Chem.* 15 (6): 848-861
- [81] Gallois-Montbrun, D., Le Bas, G., Mason, S. A., Prangé, T., Lesieur, S. (2013) A highly hydrated  $\alpha$ -cyclodextrin/1-undecanol inclusion complex: crystal structure and hydrogen-bond network from high-resolution neutron diffraction at 20K. *Acta Crystallogr. B Struct. Sci. Cryst. Eng. Mater.* 69(Pt 2):214-227
- [82] Sicard-Roselli, C., Perly, B. and Le Bas, G. (2001) The Respective Benefits of X-ray Crystallography and NMR for the Structural Determination of the Inclusion

Complex Between Butyl-isothiocyanate and alpha-cyclodextrin. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* 39: 333-337

- [83] Walia, R., Pivin, J. C., Chaw, A. K., Jayaganthan, R., Chandra, R. (2011) Structural and magnetic properties of sputter deposited cobalt-silica nanocomposite thin films. *J. Alloy. Compd.* 509: L103-L108
- [84] Peng, T., Xiao X., Wu W., Fan L., Zhou X., Ren F., Jiang C. (2012) Size control and magnetic properties of single layer monodisperse Ni nanoparticles prepared by magnetron sputtering. *J. Mater. Sci.* 47:508-513
- [85] Pearson, R. G. (1963) Hard and soft acids and bases. *J. Am. Chem. Soc.* 85(22): 3533-3539
- [86] Haas, V. and Birringer, R. (1992) The morphology and size of nanostructured Cu, Pd and W generated by sputtering. *Nanostructured Materials* 1: 491-504
- [87] Kaatz F. H., Chow G.M. and Edelstein A.S. (1993) Narrowing sputtered nanoparticle size distributions. *J. Mater. Res.* 8(5): 995-1000
- [88] Pearson, D.H. and Edelstein, A.S. (1999) Threshold behavior in the formation of nanoscale silicon particles prepared by sputtering. *Nanostruct. Mater.* 11(8):1111-1122
- [89] Reznickova, A., Novotna, Z., Kasalkova, N. S., Svorecik, V. (2013) Gold nanoparticles deposited on glass: physicochemical characterization and cytocompatibility. *Nanoscale. Res. Lett.* 8(252).doi:10.1186/1556-276X-8-252
- [90] Hendricks, S. B., Albrecht, W. H. (1928) Röntgenographische und chemische Untersuchungen an einigen Oxyden des Eisens und Kobalts. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 61: 2153-2161
- [91] Geng, S., Wang, F., Zhang, S. (2003) High temperature oxidation behavior of a sputtered pure Ni nanocrystalline coating at 700-900 °C. *Surf. Coat. Technol.* 167: 212-216
- [92] Davar, F., Fereshteh, Z., Salavati-Niasari, M. (2009) Nanoparticles Ni and NiO: Synthesis, characterization and magnetic properties. *J. Alloys Compd.* 476: 797-801.

- [93] Cárdenas, G. and Oliva, R. (1998) Synthesis and characterization of bimetallic Ni-Cu colloids. *Mater. Res. Bull.* 33(11): 1599–1608
- [94] Su, Y. K., Shen, C.M., Yang, T.Z., Yang, H. T., Gao, H.J., Li, H.L. (2004) The dependence of Co nanoparticle sizes on the ratio of surfactants and the influence of different crystal sizes on magnetic properties. *Appl. Phys. A*. DOI: 10.1007/s00339-004-2713-z
- [95] Wang, X., Chen, X., Gao, L., Zheng, H., Zhang, Z. and Qian, Y. (2004) One-dimensional arrays of  $\text{Co}_3\text{O}_4$  nanoparticles: synthesis, characterization, and optical and electrochemical properties. *J. Phys. Chem. B* 108: 16401–16404
- [96] Barreca, D., Massign, C., Daolio, S., Fabrizio, M., Piccirillo, C., Armelao, L., Tondello, E. (2001) Composition and microstructure of cobalt oxide thin films obtained from a novel cobalt(II) precursor by chemical vapor deposition. *Chem. Mater.* 13: 588–593
- [97] Silva, N., Moris, S., Herrera, B., Díaz M., Kogan, M. J., Barrientos, L., Yutronic, N., Jara, P. (2010) Formation of copper nanoparticles supported onto inclusion compounds of  $\alpha$ -cyclodextrin: A new route to obtain copper nanoparticles. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 521: 246–252
- [98] Zhang, L., Gu, F. X., Chan, J. M., Wang, A. Z., Langer, R. S. and Farokhzad, O. C. (2008) Nanoparticles in medicine: Therapeutic applications and developments. *Clin. Pharmacol. Ther.* 83(5): 761–769
- [99] Soenen, S. J, Rivera-Gil, P., Montenegro, J.-M., Parak, W. J., De Smedt, S. C., Braeckmans, K. (2011) Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *Nano Today* 6: 446–465
- [100] Fadeel, B., Garcia-Bennett, A. E. (2010) Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. *Adv. Drug. Deliver. Rev.* 62: 362–374
- [101] Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65: 55–63.

- [102] Huang, M., Khor, E., Lim, L.-Y. (2004) Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: Effects of molecular weight and degree of deacetylation. *Pharmaceut. Res.* 21(2): 344–353
- [103] Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U., Schmid, G., Brandau, W. and Jahnen-Dechent, W. (2007) Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* 3(11): 1941 – 1949
- [104] Kim, S., Choi, J. E., Choi, J., Chung, K.-H., Park, K., Yi, J., Ryu, D.-Y.(2009) Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol. in Vitro* 23 (6): 1076–1084
- [105] Gupta, A. K. and Wells, S. (2004) Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: Preparation, characterization, and cytotoxicity studies. *IEEE Trans. Nanobiosci.* 3(1): 66–73
- [106] Cho, S.J., Maysinger, D., Jain, M., Röder, B., Steffen Hackbarth, S. and Winnik, F. M. (2007) Long-term exposure to CdTe quantum dots causes functional impairments in live cells. *Langmuir* 23: 1974–1980
- [107] Wörle-Knirsch, J. M., Pulskamp, K. and H. F. Krug (2006) Oops They did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano Lett.* 6(6): 1261–1268
- [108] Davis, R. R., Lockwood, P. E., Hobbs, D. T., Messer, R. L. W., Price, R. J. Lewis, J. B., Wataha, J. C. (2007) In vitro biological effects of sodium titanate materials. *J. Biomed. Mater. Res. B* 83B: 505-511. DOI 10.1002/jbmb
- [109] Hoshino, A., Fujioka, K., Oku, T., Suga, M., Sasaki, Y. F., Ohta, T., Yasuhara, M., Suzuki, K. and Yamamoto K. (2004) Physicochemical properties and cellular toxicity of nanocrystal quantum dots depend on their surface modification. *Nano Lett.* 4(11): 2163–2169
- [110] Adura, C., Guerrero, S., Salas, E., Medel, L., Riveros, A., Mena, J., Arbiol, J., Albericio, F., Giralt, E. and Kogan, M. J. (2013) Stable conjugates of peptides with gold nanorods for biomedical applications with reduced effects on cell viability. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 5 (10): 4076–4085

- [111] Ahamed, M., (2011) Toxic response of nickel nanoparticles in human lung epithelial A549 cells. *Toxicol. in Vitro* 25: 930–936
- [112] Lanone, S., Rogerieux, F., Geys, J., Dupont, A., Maillot-Marechal, E., Boczkowski, J., Lacroix, G. and Hoet, P. (2009) Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. *Part. Fibre. Toxicol.* 6 (14): 1–12
- [113] Zhang, H., Ji, Z., Xia, T., Meng, H., Low-Kam, C., Liu, R., Pokhrel, S., Lin, S., Wang, X., Liao, Y.-P., Wang, M., Li, L., Rallo, R., Damoiseaux, R., Telesca, D., Mädler, L., Cohen, Y., Zink, J. I. and Nel, A. E. (2012) Use of metal oxide nanoparticle band gap to develop a predictive paradigm for oxidative stress and acute pulmonary inflammation. *ACS Nano* 6(5): 4349–4368
- [114] Nel A, Xia T, Meng H, Wang X, Lin S, Ji Z, Zhang H. (2013) Nanomaterial toxicity testing in the 21<sup>st</sup> century: Use of a predictive toxicological approach and high-throughput screening. *Acc. Chem. Res.* 46(3):607–621
- [115] Limbach, L. K., Wick, P., Manser, P., Grass, R. N., Bruinink, A. and Stark, W. J. (2007) Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: Influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. *Environ. Sci. Technol.* 41: 4158–4163
- [116] Burello, E. and Worth, A. P. (2011) A theoretical framework for predicting the oxidative stress potential of oxide nanoparticles. *Nanotoxicology* 5(2): 228–235
- [117] Casarett, L. J., Doull, J., Klaassen, C. D. (2001) *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. McGraw-Hill Medical Pub. Division, 6<sup>a</sup> Edición, pp. 40
- [118] Soto, C., Sigurdsson, E. M., Morelli, L., Kumar, R. A., Castaño E.M. and Frangione, B. (1998) Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy. *Nat. Med.* 4(7): 822–826
- [119] Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberbug, I., Rommens, J., Kim, S., Schenk, D., Fraser, P., Hyslop, P. S. G. and Selkoe, D. J. (1997) Mutant presenilins of

Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid  $\beta$ -protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat. Med.* 3(1): 67-72

- [120] Kogan, M. J., Bastus, N. G., Amigo, R., Grillo-Bosch, D., Araya, E., Turiel, A., Labarta, A., Giralt, E. and Puntès, V. F. (2006) Nanoparticle-mediated local and remote manipulation of protein aggregation. *Nano Lett.* 6(1): 110-115
- [121] Sperling, R. A. and Parak, W. J. (2010) Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Phil. Trans. R. Soc. A.* 368: 1333–1383
- [122] Love, S. A., Maurer-Jones, M. A., Thompson, J. W., Lin, Y. S. and Haynes, C. L. (2012) Assessing Nanoparticle Toxicity *Annu. Rev. Anal. Chem.* 5: 181-205.
- [123] Kondo, T., Aoshima, S., Hirata, K., Honda, K., Einaga, Y., Fujishima, A. and Kawai, T. (2008) Crystal-face-selective adsorption of Au nanoparticles onto polycrystalline diamond surfaces. *Langmuir* 24:7545–7548
- [124] Fujiki Y., Tokunaga, N., Shinkai, S. and Sada, K. (2006) Anisotropic decoration of gold nanoparticles onto specific crystal faces of organic single crystals. *Angew. Chem.* 118: 4882–4885
- [125] Murugesan, M., Cunningham, D., Martínez-Albertos, J.-L., Vrcelj, R. M. and Moore B. D. (2005) Nanoparticle-coated microcrystals. *Chem. Commun.* 2677–2679 DOI: 10.1039/b501046b
- [126] Zoy, A., Nassiopoulou, A. G., Ioannou-Sougleridis, V., Murugesan, M. and Moore, B. D. (2005) Electrical conductivity of Au-nanoparticle-coated  $K_2SO_4$  microcrystals deposited by DC trapping. *J. Phys. Conf. Ser.* 10: 105–108. DOI:10.1088/1742-6596/10/1/026
- [127] Tokunaga, N., Fujiki, Y., Shinkai, S. and Sada, K. (2006) Face-selective decoration of an organic single crystal toward photochemical devices. *Chem. Commun.* 3617–3618. DOI: 10.1039/b606085d
- [128] Fujiki, Y., Shinkai, S. and Sada, K. (2009) Selective deposition of metal complex nanocrystals onto the surfaces of organic single crystals bearing pyridine moieties. *Cryst. Growth. Des.* 9(6): 2751–2755

- [129] Rodríguez-Llamazares, S., Jara, P., Yutronic, N., Noyong, M., Bretschneider, J., Simon, U. (2007) Face preferred deposition of gold nanoparticles on  $\alpha$ -cyclodextrin/octanethiol inclusion compound. *J. Colloid. Interf. Sci.* 316: 202–205
- [130] Jana, N. R., Gearheart, L. and Murphy, C. J. (2001) Seeding growth for size control of 5-40 nm diameter gold nanoparticles. *Langmuir* 17(22): 6782-6786
- [131] Sau T. K. and Murphy, C. J. (2004) Seeded high yield synthesis of short Au nanorods in aqueous solution. *Langmuir* 20: 6414-6420
- [132] Jana, N. R., Gearheart, L. and Murphy, C. J. (2001) Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal and rod-like gold nanoparticles Using a Surfactant Template. *Adv. Mater.* 13: 1389–1393
- [133] Downs, R. T. and Hall-Wallace, M. (2003) The American mineralogist crystal structure database. *American Mineralogist* 88: 247–250
- [134] Liu, M. and Guyot-Sionnest, P. (2005) Mechanism of silver(I)-assisted growth of gold nanorods and bipyramids. *J. Phys. Chem. B* 109: 22192–22200
- [135] Murphy, C. J., Sau, T. K., Gole, A. M., Orendorff, C. J., Gao, J., Gou, L., Hunyadi, S. E. and Li, T. (2005) Anisotropic metal nanoparticles: Synthesis, a, and optical applications. *J. Phys. Chem. B* 109: 13857-13870
- [136] Garg, N., Scholl, C., Mohanty, A. and Jin, R. (2010) The Role of Bromide Ions in Seeding Growth of Au Nanorods. *Langmuir* 26(12): 10271–10276
- [137] Wang, Z. L., Mohamed, M.B., Link, S., El-Sayed, M.A. (1999) Crystallographic facets and shapes of gold nanorods of different aspect ratios. *Surf. Sci.* 440: L809–L814
- [138] Liu, X., Atwater, M., Wang, J., Huo, Q. (2007) Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids Surf., B* 58: 3–7
- [139] Ghosh, S. K. and Pal, T. (2007) Interparticle coupling effect on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles: From theory to applications. *Chem. Rev.* 107: 4797-4862

- [140] Huang, X., Yang, J., Zhang, W., Zhang, Z., An, Z. (1999) Determination of the Critical Micelle Concentration of Cationic Surfactants: An Undergraduate Experiment. *J. Chem. Educ.* 76: 93–94
- [141] Nikoobakht B. and El-Sayed, M. A. (2001) Evidence for bilayer assembly of cationic surfactants on the surface of gold nanorods. *Langmuir* 17: 6368-6374
- [142] Alkilany, A. M. Nagaria, P. K., Wyatt, M. D., Murphy, C. J. (2010) Cation exchange on the surface of gold nanorods with a polymerizable surfactant: Polymerization, stability, and toxicity evaluation. *Langmuir* 26: 9328–9333
- [143] Hotchkiss, J. W., Lowe, A. B. and Boyes, S. G. (2007) Surface modification of gold nanorods with polymers synthesized by reversible addition–fragmentation chain transfer polymerization. *Chem. Mater.* 19 (1): 6–13
- [144] Oyelere, A. K., Chen, P. C., Huang, X., El-Sayed, I. H. and El-Sayed, M. A. (2007) Peptide-conjugated gold nanorods for nuclear targeting. *Bioconjugate Chem.* 18: 1490-1497
- [145] Nikoobakht, B., Wang, Z. L. and El-Sayed, M. A. (2000) Self-Assembly of Gold Nanorods. *J. Phys. Chem. B* 104: 8635-8640
- [146] Simon, U., “Nanoparticles. From Theory to Application”, ed. Schmid, G. Wiley-VCH, Weinheim, 328, 2004
- [147] Su, K.-H., Wei, Q.-H. and Zhang, X. (2003) Interparticle coupling effects on plasmon resonances of nanogold particles. *Nano Lett.* 3(8):1087-1090
- [148] Barrientos, L., Yutronic, N., Muñoz, M., Silva, N., Jara, P. (2009) Metallic nanoparticle tropism of alkylthiol guest molecules included into  $\alpha$ -cyclodextrin host. *Supramol. Chem.* 21(3): 264-267
- [149] Xia, Y., Yang, P., Sun, Y., Wu, Y., Mayers, B., Gates, B., Yin, Y., Kim, F., and Yan, H. (2003) One-Dimensional Nanostructures: Synthesis, Characterization, and Applications. *Adv. Mater.* 15(5) 353–389
- [150] Rao, C. N. R., Deepak, F. L., Gundiah, G. and Govindaraj, A. (2003) Inorganic nanowires. *Prog. Solid. State. Ch.* 31(1): 5–147

- [151] Jorritsma, J., Gijs, M. A. M., Kerkhof, J. M. and Stienen, J. G. H. (1996) General technique for fabricating large arrays of nanowires. *Nanotechnology* 7: 263–265
- [152] Sarkar, J. Khan, G. G. and Basumallick, A. (2007) Nanowires: properties, applications and synthesis via porous anodic aluminium oxide template. *Bull. Mater. Sci.* 30(3): 271–290
- [153] Jana, N. R., Gearheart, L. and Murphy, C. J. (2001) Wet chemical synthesis of silver nanorods and nanowires of controllable aspect ratio. *Chem. Commun.* (7): 617–618. DOI: 10.1039/b100521i
- [154] Weizmann, Y., Patolsky, F., Popov, I., and Willner, I. (2004) Telomerase-Generated Templates for the Growing of Metal Nanowires. *Nano Lett.* 4(5): 787–792
- [155] Gelves, G. A., Murakami, Z. T. M., Krantz, M. J. and Haber, J. A. (2006) Multigram synthesis of copper nanowires using ac electrodeposition into porous aluminium oxide templates. *J. Mater. Chem.* 16: 3075–3083
- [156] Fullam, S., Cottell, D., Rensmo, H. and Fitzmaurice, D. (2000) Carbon nanotube templated self-assembly and thermal processing of gold nanowires. *Adv. Mater.* 12(19): 1430–1432
- [157] Jones, M. R., Osberg, K. D., Macfarlane, R. J., Langille, M. R. and Mirkin, C. A. (2011) Templated techniques for the synthesis and assembly of plasmonic nanostructures. *Chem. Rev.* 111: 3736–3827
- [158] Geng, Y., Pearson, A. C., Gates, E. P., Uprety, B., Davis, R. C., Harb, J. N. and Adam T. Woolley, A. T. (2013) Electrically conductive gold- and copper-metallized DNA origami nanostructures. *Langmuir* 29: 3482–3490
- [159] Katz, E. and Willner, I. (2004) Integrated nanoparticle–biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* 43: 6042–6108
- [160] Ehud Gazit, E. (2007) Use of biomolecular templates for the fabrication of metal nanowires. *FEBS J.* 274: 317–322
- [161] Stoltenber, R. M. and Woolley, A. T. (2004) DNA-Templated nanowire fabrication. *Biomed. Microdevices* 6(2): 105–111

- [162] Monson, C. F. and Woolley, A. T. (2003) DNA-Templated construction of copper nanowires. *Nano. Lett.* 3(3): 359–363
- [163] Richter, J., Seidel, R., Kirsch, R., Mertig, M., Pompe, W., Plaschke, J. and Schackert, H. K. (2000) Nanoscale palladium metallization of DNA. *Adv. Mater.* 12(7): 507–510
- [164] Deng, Z. and Mao, C. (2003) DNA-Templated fabrication of 1D parallel and 2D crossed metallic nanowire arrays. *Nano Lett.* 3(11): 1545–1548
- [165] Ford, W. E., Harnack, O., Yasuda, A., Wessels, J. M. (2001) Platinated DNA as precursors to templated chains of metal nanoparticles. *Adv. Mater.* 13(2): 1793 – 1797
- [166] Mertig, M., Ciacchi, L. C., Seidel, R. and Pompe, W. (2002) DNA as a selective metallization template. *Nano Lett.* 2 (8): 841–844
- [167] Berti, L., Alessandrini, A. and Facci, P. (2005) DNA-Templated photoinduced silver deposition. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 11216–11217
- [168] Keren, K., Berman, R. S. and Braun, E. (2004) Patterned DNA metallization by sequence-specific localization of a reducing agent. *Nano. Lett.* 4(2): 323–326
- [169] Kundu, S., Maheshwari, V. and Saraf, R. F. (2008) Photolytic metallization of Au nanoclusters and electrically conducting micrometer long nanostructures on a DNA scaffold. *Langmuir* 24: 551–555
- [170] Gu, Q., Cheng, C. and Haynie, D. T. (2005) Cobalt metallization of DNA: toward magnetic nanowires. *Nanotechnology* 16: 1358–1363
- [171] Becerril, H. A., Ludtke, P., Willardson, B. M. and Woolley, A. T. (2006) DNA-Templated nickel nanostructures and protein assemblies. *Langmuir* 22: 10140–10144
- [172] Liu, Z., Zu, Y., Fu, Y., Zhang, Y., Liang, H. (2008) Growth of the oxidized nickel nanoparticles on a DNA template in aqueous solution. *Mater. Lett.* 62: 2315–2317

- [173] Knez, M., Bittner, A. M., Boes, F., Christina Wege, C., Jeske, H., Maiß, E. and Kern, K. (2003) Biotemplate synthesis of 3-nm nickel and cobalt nanowires. *Nano Lett.* 3(8):1079–1082
- [174] Reches, M., Gazit, E. (2003) Casting metal nanowires within discrete self-assembled peptide nanotubes. *Science* 300: 625–627
- [175] Zhou, J. C., Wang, X., Xue, M., Xu, Z., Hamasaki, T., Yang, Y., Wang, K., Dunn, B. (2010) Characterization of gold nanoparticle binding to microtubule filaments. *Mat. Sci. Eng. C-Bio. S.* 30: 20–26
- [176] Le, J. D., Pinto, Y., Seeman, N. C., Musier-Forsyth, K., Taton, T. A. and Kiehl, R. A. (2004) DNA-Templated self-assembly of metallic nanocomponent arrays on a surface. *Nano Lett.* 4(12): 2343–2347
- [177] Nakao, H., Shiigi, H., Yamamoto, Y., Tokonami, S., Nagaoka, T., Sugiyama, S. and Ohtani, T. (2003) Highly ordered assemblies of Au nanoparticles organized on DNA. *NanoLett.* 3(10): 1391–1394
- [178] Young, M., Willits, D., Uchida, M. and Douglas, T. (2008) Plant viruses as biotemplates for materials and their use in nanotechnology. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46:361–84
- [179] Li, N., Gao, F., Hou, L. and Gao, D. (2010) DNA-Templated rational assembly of BaWO<sub>4</sub> nano pair-linear arrays. *J. Phys. Chem. C*114: 16114–16121
- [180] Patolsky, F., Weizmann, Y., Lioubashevski, O. and Willner, I. (2002) Au-nanoparticle nanowires based on DNA and polylysine templates. *Angew. Chem.* 114(13): 2429 – 2433
- [181] Li, Z., Chung, S.-W., Nam, J.-M., Ginger, D. S. and Mirkin, C. A. (2003) Living templates for the hierarchical assembly of gold nanoparticles. *Angew. Chem.* 115: 2408 – 2411
- [182] Patolsky, F., Weizmann, Y. and Willner, I. (2004) Actin-based metallic nanowires as bio-nanotransporters. *Nat. Mater.* 3: 692–695
- [183] Tseng, R. J., Huang, J., Ouyang, J., Kaner, R. B. and Yang, Y. (2005) Polyaniline nanofiber/gold nanoparticle nonvolatile memory. *Nano Lett.* 5(6): 1077–1080

- [184] Baumann, M. K., Textor, M. and Reimhult, E. (2008) Understanding self-assembled amphiphilic peptide supramolecular structures from primary structure helix propensity. *Langmuir* 24: 7645–7647
- [185] Ross, C. A., Poirier, M. A. (2005) Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration?. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6: 891–898
- [186] Lorenzo, A., Yankner, B. A. (1999) Amyloid fibril toxicity in Alzheimer's disease and diabetes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 777: 89–95
- [187] Reches, M. and Gazit, E. (2006) Molecular self-assembly of peptide nanostructures: Mechanism of association and potential uses. *Curr. Nanosci.* 2: 105-111
- [188] Arimon, M., Diez-Pérez, I., Kogan, M. J., Durany, N., Giralt, E., Sanz, F., Fernández-Busquets, X. (2005) Fine structure study of A $\beta$ <sub>1-42</sub> fibrillogenesis with atomic force microscopy. *FASEB J.* 19: 1344–1346
- [189] Sunde, M., Serpell, L. C., Bartlam, M., Fraser, P. E., Pepys, M. B. and Blake, C. C. F. (1997) Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J. Mol. Biol.* 273: 729–739
- [190] Petkova, A. T., Ishii, Y., Balbach, J. J., Antzutkin, O. N., Leapman, R. D., Delaglio, F. and Tycko, R. (2002) A structural model for Alzheimer's  $\beta$ -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *PNAS* 99 (26): 16742–16747
- [191] Gazit, E. (2002) A possible role for  $\pi$ -stacking in the self-assembly of amyloid fibrils. *FASEB J.* 16: 77–83
- [192] Zhang, S. (2003) Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nat. Biotechnol.* 21(10): 1171–1178
- [193] Scheibel, T., Parthasarathy, R., Sawicki, G., Lin, X.-M., Jaeger, H. and Lindquist, S. L. (2003) Conducting nanowires built by controlled self-assembly of amyloid fibers and selective metal deposition. *PNAS* 100(8): 4527–4532
- [194] Güntert, A., Döbeli, H., Bohrmann, B. (2006) High sensitivity analysis of amyloid-peptide composition in amyloid deposits from human and PS2APP mouse brain. *Neuroscience* 143: 461–475

- [195] Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N. and Ihara, Y. (1994). Visualization of A $\beta$ <sub>42</sub> and A $\beta$ <sub>40</sub> in senile plaques with end-specific A $\beta$  monoclonals: evidence that an initially deposited species is A $\beta$ <sub>42(43)</sub>. *Neuron*. 13: 45–53
- [196] Gu, L., Guo, Z. (2013) Alzheimer's A $\beta$ <sub>42</sub> and A $\beta$ <sub>40</sub> peptides form interlaced amyloid fibrils. *J. Neurochem.* 126: 305–311
- [197] Takahashi, T. and Mihara, H. (2008) Peptide and protein mimetics inhibiting amyloid peptide aggregation. *Acc. Chem. Res.* 41(10): 1309–1318
- [198] Chromy, B. A., Nowak, R. J., Lambert, M. P., Viola, K. L., Chang, L., Velasco, P. T., Jones, B. W., Fernandez, S. J., Lacor, P. N., Horowitz, P., Finch, C. E., Krafft, G. A., Klein, W. L. (2003) Self-assembly of A $\beta$ <sub>1-42</sub> into globular neurotoxins. *Biochemistry* 42: 12749–12760
- [199] Harper, J. D.; Wong, S. S., Lieber, C. M., Lansbury, P. T. (1999) Assembly of A $\beta$  amyloid protofibrils: An in vitro model for a possible early event in Alzheimer's disease. *Biochemistry* 38:8972–8980
- [200] Jeong, J. S., Ansaloni, A., Mezzenga, R., Lashuel, H. A. and Dietler, G. (2013) Novel mechanistic insight into the molecular basis of amyloid polymorphism and secondary nucleation during amyloid formation. *J. Mol. Biol.* 425: 1765–1781
- [201] Murphy, R. M. (2007) Kinetics of amyloid formation and membrane interaction with amyloidogenic proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1768: 1923–1934
- [202] Serpell, L. C., Sunde, M., Benson, M. D., Tennent, G. A. Pepys, M. B. and Fraser, P. E. (2000) The protofilament substructure of amyloid fibrils. *J. Mol. Biol.* 300: 1033–1039
- [203] Olmedo, I., Araya, E., Sanz, F., Medina, E., Arbiol, J., Toledo, P., Alvarez-Lueje, A., Giralt, E., and Kogan, M. J. (2008) How changes in the sequence of the peptide CLPFFD-NH<sub>2</sub> can modify the conjugation and stability of gold nanoparticles and their affinity for beta-amyloid fibrils, *Bioconjugate. Chem.* 19: 1154-1163.
- [204] Kogan, M. J., Guerrero, S., Araya, E., Fiedler, J. L., Arias, J. I., Adura, C., Albericio, F., Giralt, E., Arias, J. L., and Fernandez, M. S. (2010) Improving the brain delivery of gold nanoparticles by conjugation with an amphipathic peptide. *Nanomedicine* 5: 897- 913.
- [205] Pong, B.-K., Elim, H. I., Chong, J. C., Ji, W., Trout, B. L. and Lee, J.-Y. (2007) New insights on the nanoparticle growth mechanism in the citrate reduction of gold (III)

- salt: formation of the Au nanowire intermediate and its nonlinear optical properties.  
J. Phys. Chem. C 111: 6281–6287
- [206] Fülöp, L., Zarándi, M., Soós, K. and Penke, B. (2006) Self-assembly of Alzheimer's disease-related amyloid peptides into highly ordered nanostructures. Nano pages 1: 69–83
- [207] Chen, S. and Wetzel, R. (2001) Solubilization and disaggregation of polyglutamine peptides. Protein Sci. 10:887–891
- [208] Teplow, D. B. (2006) Preparation of amyloid  $\beta$ -protein for structural and studies. Methods Enzymol. 413: 20–33
- [209] Hortschansky, P., Schroeckh, V., Christopeit, T., Zandomenighi, G. and Fändrich, M. (2005) The aggregation kinetics of Alzheimer's b-amyloid peptide is controlled by stochastic nucleation. Protein Sci. 14:1753–1759
- [210] Barrow, C. J., Yasuda, A., Kenny, P. T. M. and Zagorski, M. G. (1992) Solution Conformations and Aggregational Properties of Synthetic Amyloid  $\beta$ -Peptides of Alzheimer's Disease. J. Mol. Biol. 225: 1075–1093
- [211] Stine, Jr. W. B., Dahlgren, K. N., Krafft, G. A. and LaDu, M. J. (2003) *In Vitro* Characterization of Conditions for Amyloid- $\beta$  Peptide Oligomerization and Fibrillogenesis. J. Biol. Chem. 278(13): 11612–11622
- [212] Voet, D., Voet, J. G., Pratt, C., W. (2007) Fundamentos de Bioquímica, la vida a nivel molecular. 2ª Edición, Editorial Médica Panamericana, pp. 91
- [213] Kogan, M. J., Olmedo, I., Hosta, L., Guerrero, A. R., Cruz, L. J. and Albericio, F. (2007) Peptides and metallic nanoparticles for biomedical applications. Nanomedicine 2(3): 287–306
- [214] De la Fuente, J. M., Berry, C. C., Riehle, M. O. and Curtis, A. S. G. (2006) Nanoparticle targeting at cells. Langmuir 22: 3286–3293