

UNIVERSIDAD DE CHILE
PROGRAMA DOCTORADO EN QUÍMICA



“ESTUDIO DE NANOPARTÍCULAS DE Au Y DE Ag Y SU INTERACCIÓN CON COMPLEJOS DE β CICLODEXTRINA COMO POTENCIALES SISTEMAS DE ENTREGA DE FÁRMACOS”.

**Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al Grado de Doctor en Química**

Por:

RODRIGO ALFREDO SIERPE BUSTAMANTE

Directores de Tesis

DR. NICOLÁS YUTRONIC SÁEZ.

DR. MARCELO JAVIER KOGAN.

**SANTIAGO- CHILE
2016**

**UNIVERSIDAD DE CHILE
PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA**

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis presentada por el candidato:

RODRIGO ALFREDO SIERPE BUSTAMANTE

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Química, en el examen de defensa de Tesis rendida el día 28 de enero de 2016.

Directores de Tesis:

Dr. Nicolás Yutronic S.

Dr. Marcelo J. Kogan

Comisión Informante:

Dra. Soledad Bollo D. (Presidente)

Dra. Carolina Jullian M.

Dr. Ernesto Clavijo C.

Dr. Humberto Gómez M.

A DIOS Y A MIS PADRES.

Ninguno de los caminos que he tomado, ni las pequeñas cosas que he alcanzado, las podría tener si no fuera por Dios, a Él le agradezco todo lo que ha puesto en mi camino.

Quiero agradecer a mi familia, a mis hermanos, a mis amados sobrinos y en especial a mis padres, quienes fueron responsables de mi formación y quienes con esfuerzo me entregaron las herramientas necesarias para cumplir todos mis desafíos.

Agradezco a mi novia (muy pronto esposa) Constanza Aguayo, a quien amo enormemente y quien estuvo conmigo casi todos estos largos años que duró el doctorado. Qué linda prueba fue el compartir mis emociones completas con ella, el cansancio, el amor a mi trabajo y la felicidad de lo que poco a poco fui logrando.

Quiero agradecer a mis tutores, tuve la suerte que no todos tienen, de conocer, compartir y crecer junto a dos grandes personas, Marcelo Kogan y Nicolás Yutronic. A ellos debo mis logros académicos durante esta etapa.

No puedo dejar de agradecer a todos quienes también compartieron conmigo días completos de trabajo, y de no tanto trabajo. Mis compañeros de laboratorio de ambas facultades, muchos de ellos me soportaron, me ayudaron y se volvieron mis amigos.

También quiero darle las gracias a los profesores que conformaron mi comisión: Dra. Soledad Bollo, Dra. Carolina Jullian, Dr. Ernesto Clavijo y al Dr. Humberto Gómez, por sus oportunas críticas a mi trabajo, logrando que esta investigación alcanzara el carácter de una tesis doctoral.

A mis ex compañeros y ex profesores del Pedagógico, en especial al profesor Germán Mena, que confió en mis capacidades, impulsándome a que me dedicara a la investigación, presentándome "al profe Nico".

Al Dr. Michael Noyong, al Dr. Simon Ulrich y a todos quienes fueron por unos pocos meses mis compañeros de laboratorio en la Universidad de Aachen, en Alemania, agradezco su hospitalidad y ayuda en la caracterización de mis muestras.

A todos quienes contribuyeron, quizás sin siquiera pensarlo, en mi formación, en los diferentes estudios requeridos y en todos los trámites realizados durante estos años de investigación.

A Conicyt por la beca de doctorado, por el financiamiento de gastos operacionales y congresos internacionales; a la Universidad de Chile por financiar mi pasantía a Alemania; y a los proyectos U-Apoya, FONDECYT 1130425 y FONDAP 15130011.

Índice de contenidos

	página
Índice de contenidos	iii
Índice de figuras	vii
Índice de tablas	xvii
Abreviaturas	xxii
Resumen	xxiv
Abstract	xxvi
Capítulo 1: Introducción	1
1.1. Nanopartículas de Au y nanopartículas de Ag	6
1.2. Nanopartículas de Au y Ag usadas en administración de fármacos	8
1.3. Bioaplicaciones de las NPsAu	11
1.4. Formación de nanopartículas de Au y Ag	13
1.5. Compuestos de inclusión	18
1.6. β ciclodextrina usada en administración de fármacos	20

1.7. Inclusión de fármacos en matrices de β CD	23
1.8. Convergencia entre NPsM y ciclodextrinas	27
1.9. Fármacos 6-Tioguanina y 6-Mercaptopurina	28
1.10. Fármaco Melfalán	29
1.11. Fármaco 2-amino-4-(4-clorofenil)tiazol	30
1.12. Fármaco Feniletilamina	31
1.13. Hipótesis	31
1.13. Objetivos generales	32
1.14. Objetivos Específicos	32
Capítulo 2: Materiales y métodos	33
2.1. Reactivos y solventes	34
2.2. Metodología	35
2.2.1. Síntesis de los complejos	35
2.2.2. Tratamiento de los cristales	36
2.2.3. Depósito de NPsAu y NPsAg	37
2.3. Equipos para la caracterización de las muestras	38
2.4. Protocolos para el análisis de las muestras	42

2.4.1. Determinación de la estequiometría de β CD-FEA	42
2.4.2 Obtención de las constantes de asociación	42
2.4.3. Cuantificación de Au en el sistema ternario	42
2.4.4. Determinación de la capacidad de carga de FEA en el sistema	43
2.4.5. Ensayos de permeabilidad por PAMPA	43
2.4.6. Ensayos de irradiación láser de β CD-FEA-NPsAu	44
Capítulo 3: Resultados y discusión	45
Formación de los complejos de inclusión de β ciclodextrina con fármacos	
3.1. Estudio de los CI mediante DRXP	47
3.2. Indexación de los sistemas cristalinos	54
3.3. Estudio de los CI mediante ^1H -RMN	57
3.4. Estequiometría de los CI	78
3.5. Constantes de asociación de los complejos de β CD con fármacos	83
3.5.1. Obtención de los coeficientes de extinción molar para cada fármaco	84
3.5.2. Obtención de las constantes de asociación	84
3.6. Estudios de la geometría de inclusión por ROESY	89
Capítulo 4: Resultados y discusión	97
Interacción de nanopartículas de Au y Ag con complejos de inclusión	

4.1. Espectroscopía UV-Vis en estado sólido	98
4.2. Imágenes de SEM y TEM de los sistemas ternarios	107
4.3. Estudio mediante DRXP de los sistemas ternarios	133
4.4. Estudio del sistema β CD-FEA-NPsAu mediante RMN.	137
4.5. Estudio vibracional IR y Raman	141
Capítulo 5: Resultados y discusión	148
Evaluación de β CD-FEA-NPsAu en transporte y liberación del fármaco	
5.1. Cuantificación del contenido de Au, β CD y FEA en cristales del Cl	149
5.2. Capacidad de carga de FEA en el sistema β CD-FEA-NPsAu	152
5.3. Ensayos de permeabilidad PAMPA	155
5.4. Liberación del fármaco FEA por irradiación láser	159
Capítulo 6: Conclusiones	164
Capítulo 7: Referencias	169
Capítulo 8: Anexos	188

Índice de figuras

	página
Figura 1.1. Ilustración de la variación de los niveles de energía de un metal en función de la reducción del tamaño: (a) bandas de un metal voluminoso, (b) cúmulo metálico grande de 100 átomos, mostrando el ensanchamiento del <i>gap</i> de la banda y (c) cúmulo metálico pequeño que contiene 3 átomos.	4
Figura 1.2. Inclusión de un huésped en una matriz a través del proceso de reconocimiento molecular.	5
Figura 1.3. Esquema de la entrega específica de fármacos a través de NPsAu funcionalizadas a células de cáncer (Gosh, 2008).	9
Figura 1.4. (a) Esquema que ilustra el efecto de resonancia de plasmón superficial localizada (Wang, 2013). (b) Esquema que ilustra el efecto fototérmico en NPsAu (Guerrero, 2014).	12
Figura 1.5. Imágenes TEM de: (a) nanoesferas de Au (15 nm); (b) nanobarras de Au (15x50 nm); SEM de: (c) nanocápsulas de sílice/Au (160/17 nm núcleo/coraza); (d) nanocucos de Au (250 nm) con semillas de Au al interior (55 nm); (e) nanocubos de Ag y nanocajas de Au (de inserción); (f) nanoestrellas; (g) nanobipirámides; y (h) nanooctaedros (Khlebtsov, 2010).	13

Figura 1.6.	Esquema del equipo de pulverización catódica ilustrando la formación de NPsM depositadas sobre CI en estado sólido.	15
Figura 1.7.	Fotografías del equipo de PC asistido por imanes. A la izquierda se observa el plasma producido durante la desintegración de la lámina. A la derecha se observa la cámara abierta, con la lámina metálica puesta en la sección catódica.	17
Figura 1.8.	Representación esquemática de tres formas de CD: α -CD, β -CD y γ -CD, con su estructura molecular desarrollada y modelos tipo cono.	20
Figura 1.9.	Modelo propuesto para la extracción de colesterol por CD (López, 2013).	23
Figura 1.10	Representación de las tres orientaciones posibles para dímeros de CD en denominadas; cabeza-cabeza, cola-cola y cabeza-cola, respectivamente.	24
Figura 1.11	Mecanismo de reacción propuesto por Chang en 1976 sobre la desestabilización de MF en solución acuosa.	30
Figura 2.1.	Esquema general del proceso de inclusión de fármacos en β CD (a, b y c), la formación de cristales (d), y la obtención y estabilización de NPsM por PC (e y f).	38
Figura 3.1.	Difractogramas de polvo cristalino de: (a) β CD, (b) TG, (c) complejo β CD-TG, y (d) mezcla física entre β CD y TG.	47
Figura 3.2.	Tres conformaciones cristalinas posibles para una CD formando complejos: (a) estructura tipo caja, (b) estructura tipo capa y (c) estructura tipo canal.	48
Figura 3.3.	Difractogramas de polvo cristalino de: (a) β CD, (b) MP, (c), complejo β CD-MP y (d) mezcla física entre β CD y MP.	49

Figura 3.4.	Difractogramas de polvo cristalino de: (a) β CD, (b) MF, (c) complejo β CD-MF, y (d) mezcla física entre β CD y MF.	51
Figura 3.5.	Difractogramas de polvo cristalino de: (a) β CD, (b) AT, (c) complejo β CD-AT, y (d) mezcla física entre β CD y AT.	52
Figura 3.6.	Difractogramas de polvo cristalino de: (a) β CD y (b) complejo β CD-FEA.	53
Figura 3.7.	Esquemas tipo balde de β CD: (a) con el esqueleto de átomos para una unidad de glucopiranososa, y (b) con la asignación de protones y su orientación espacial.	58
Figura 3.8.	Espectros ^1H -RMN (a 400 MHz) de α CD a 298 K: (a) en D_2O y (b) en DMSO-d_6 (Schneider, 1998).	59
Figura 3.9.	Espectro ^1H -RMN de β CD pura y sin huésped en DMSO-d_6 .	61
Figura 3.10.	Estructura de TG con la numeración de sus átomos.	61
Figura 3.11.	Estructuras tautoméricas de TG (Latosinska, 2009).	62
Figura 3.12.	Espectro ^1H -RMN de TG pura en DMSO-d_6 .	63
Figura 3.13.	Espectro ^1H -RMN del complejo β CD-TG en DMSO-d_6 .	64
Figura 3.14.	Estructura de MP con la numeración de sus átomos.	66
Figura 3.15.	Espectro ^1H -RMN de MP pura en DMSO-d_6 .	67
Figura 3.16.	Espectro ^1H -RMN del complejo β CD-MP en DMSO-d_6 .	67
Figura 3.17.	Estructura de MF con la numeración de sus átomos.	68
Figura 3.18.	Espectro ^1H -RMN de MF puro en DMSO-d_6 .	70
Figura 3.19.	Espectro ^1H -RMN del complejo β CD-MF en DMSO-d_6 .	70
Figura 3.20.	Estructura de AT con la numeración de sus átomos.	71
Figura 3.21.	Espectro ^1H -RMN de AT puro en DMSO-d_6 .	73

Figura 3.22.	Espectro ^1H -RMN del complejo βCD -AT en DMSO-d_6 .	73
Figura 3.23.	Estructura de FEA con la numeración de sus átomos.	74
Figura 3.24.	Espectro ^1H -RMN de FEA pura en DMSO-d_6 .	76
Figura 3.25.	Espectro ^1H -RMN del complejo βCD -FEA en DMSO-d_6 .	76
Figura 3.26	Integración de señales del espectro ^1H -RMN de βCD -TG en DMSO-d_6 .	78
Figura 3.27.	Integración de señales del espectro ^1H -RMN de βCD -MP en DMSO-d_6 .	79
Figura 3.28.	Integración de señales del espectro ^1H -RMN de βCD -MF en DMSO-d_6 .	80
Figura 3.29.	Integración de señales del espectro ^1H -RMN de βCD -AT en DMSO-d_6 .	80
Figura 3.30.	Integración de señales del espectro ^1H -RMN de βCD -FEA en DMSO-d_6 .	81
Figura 3.31.	Gráfico de variaciones continuas del complejo βCD -FEA. El valor de Abs_0 fue de 0,2698, que corresponde a la absorbancia de FEA en ausencia de βCD ($\chi_{\text{FEA}} = 1$).	82
Figura 3.32.	Gráfica lineal de diferentes concentraciones de TG solubilizada versus las concentraciones de βCD agregada.	85
Figura 3.33.	Gráfica lineal de diferentes concentraciones de MP solubilizada versus las concentraciones de βCD agregada.	86
Figura 3.34.	Gráfica lineal de diferentes concentraciones de MF solubilizada versus las concentraciones de βCD agregada.	87
Figura 3.35.	Gráfica lineal de diferentes concentraciones de AT solubilizada versus las concentraciones de βCD agregada.	87

Figura 3.36.	Gráfica lineal de diferentes concentraciones de FEA solubilizada versus las concentraciones de β CD agregada.	88
Figura 3.37.	Espectros ROESY del complejo β CD-MP en DMSO- d_6 .	90
Figura 3.38.	Geometría de inclusión propuesta para β CD-MP.	91
Figura 3.39.	Espectros ROESY del complejo β CD-MF en DMSO- d_6 .	92
Figura 3.40.	Geometría de inclusión propuesta para β CD-MF.	92
Figura 3.41.	Espectros ROESY del complejo β CD-AT en DMSO- d_6 .	93
Figura 3.42.	Espectro ROESY del complejo β CD-AT en DMSO- d_6 .	94
Figura 3.43.	Geometría de inclusión propuesta para β CD-AT.	94
Figura 3.44.	Espectros ROESY del complejo β CD-FEA en DMSO- d_6 .	95
Figura 3.45.	Geometría de inclusión propuesta para β CD-FEA.	96
Figura 4.1.	Espectro de absorbancia de NPsAu sobre β CD-TG por 20 s de pulverización catódica.	99
Figura 4.2.	Espectros de absorbancia de NPsAu sobre β CD-TG a diferentes tiempos de pulverización catódica.	101
Figura 4.3.	Espectro de absorbancia de NPsAg sobre β CD-TG por 20 s de pulverización catódica.	101
Figura 4.4.	Espectro de absorbancia de NPsAu sobre β CD-MP por 20 s de pulverización catódica.	102
Figura 4.5.	Espectro de absorbancia de NPsAg sobre β CD-MF por 20 s de pulverización catódica.	103

Figura 4.6.	Espectro de absorbancia de NPsAu sobre β CD-AT por 30 s de pulverización catódica.	104
Figura 4.7.	Espectros de absorbancia de NPsAu sobre β CD-AT a diferentes tiempos de pulverización catódica.	104
Figura 4.8.	Espectro de absorbancia de NPsAu sobre β CD-FEA por 20 s de pulverización catódica.	105
Figura 4.9.	Imágenes SEM del polvo de β CD recubierto con Au por 90 s.	108
Figura 4.10.	Imágenes SEM para cristales de β CD-TG con NPsAu depositadas por 60 s.	110
Figura 4.11.	Imágenes SEM para cristales de TG pura recubiertos con Au por 60 s.	110
Figura 4.12.	Imagen SEM y análisis EDX de β CD-TG con NPsAu depositadas por 20 s.	111
Figura 4.13.	Imagen SEM y análisis EDX de β CD-TG con NPsAg depositadas por 20 s.	111
Figura 4.14.	Imágenes de FE-SEM de β CD-TG con NPsAu depositadas por 60 s.	112
Figura 4.15.	Imágenes de FE-SEM de β CD-TG con NPsAu depositadas por 32 s.	113
Figura 4.16.	Imágenes de FE-SEM de β CD-TG con NPsAg depositadas por 32 s.	113
Figura 4.17.	Imagen TEM de NPsAu sobre β CD-TG (20 s) con su respectivo histograma de tamaños.	114
Figura 4.18.	Imagen TEM de NPsAg sobre β CD-TG (20 s) con su respectivo histograma de tamaños.	115
Figura 4.19.	Imágenes SEM para cristales de β CD-MP con NPsAu depositadas por 60 s.	115

Figura 4.20.	Imágenes SEM para cristales de MP pura recubiertos con Au por 60 s.	116
Figura 4.21	Imagen SEM y análisis EDX de diferentes caras de un cristal de β CD-MP con NPsAu depositadas por 20 s.	117
Figura 4.22.	Imagen SEM y análisis EDX para muestras de polvo cristalino de β CD-MP con NPsAu depositadas por 20 s.	118
Figura 4.23.	Imagen de FE-SEM de β CD-MP con NPsAu depositadas por 32 s.	119
Figura 4.24.	Imágenes de FE-SEM de β CD-MP con NPsAu depositadas por 60 s.	120
Figura 4.25.	Imagen TEM de NPsAu sobre β CD-MP (20 s), con su respectivo histograma de tamaños.	121
Figura 4.26.	Imágenes SEM para cristales de β CD-MF con NPsAg depositadas por 60 s.	122
Figura 4.27.	Imágenes SEM para una muestra de MF puro recubierto con Au por 60 s.	122
Figura 4.28.	Imagen SEM y análisis EDX de β CD-MF con NPsAg depositadas por 20 s.	123
Figura 4.29.	Imagen de FE-SEM de β CD-MF con NPsAg depositadas por 32 s.	124
Figura 4.30.	Imagen de FE-SEM de β CD-MF con NPsAg depositadas por 60 s.	124
Figura 4.31.	Imagen TEM de NPsAg sobre β CD-MF (20 s), con su respectivo histograma de tamaños.	125
Figura 4.32.	Imágenes SEM de cristales de β CD-AT con NPsAu depositadas por 60 s.	126
Figura 4.33.	Imagen SEM de MF puro recubierto con Au por 60 s.	126
Figura 4.34.	Imagen SEM y análisis EDX para un cristal de β CD-AT con NPsAu depositadas por 30 s.	127

Figura 4.35.	Imagen de FE-SEM de β CD-AT con NPsAu depositadas por 60 s.	128
Figura 4.36.	Imagen de FE-SEM de β CD-AT con NPsAu depositadas por 60 s.	128
Figura 4.37.	Imagen TEM de NPsAu sobre β CD-AT (30 s), con su respectivo histograma de tamaños.	129
Figura 4.38.	Imágenes SEM de cristales de β CD-FEA con NPsAu depositadas por 60 s.	130
Figura 4.39.	Imagen SEM y análisis EDX para un cristal de β CD-FEA con NPsAu depositadas por 20 s.	130
Figura 4.40.	Imagen de FE-SEM de β CD-FEA con NPsAu depositadas por 60 s.	131
Figura 4.41.	Imagen TEM de NPsAu sobre β CD-FEA (20 s), con su respectivo histograma de tamaños.	132
Figura 4.42.	Imagen TEM de NPsAu sobre β CD-FEA (20 s).	132
Figura 4.43.	Difractogramas de polvo cristalino de: (a) β CD-AT y (b) β CD-AT-NPsAu.	134
Figura 4.44.	Difractogramas de polvo cristalino de: (a) β CD-FEA y (b) β CD-FEA-NPsAu.	136
Figura 4.45.	Espectro ^1H -RMN de β CD-FEA-NPsAu en DMSO- d_6 .	138
Figura 4.46.	Espectros ROESY de β CD-FEA-NPsAu en DMSO- d_6 .	139
Figura 4.47.	Geometría de inclusión propuesta para (a) β CD-FEA y (b) β CD-FEA-NPsAu.	140
Figura 4.48.	Espectros IR de: (a) FEA, (b) β CD, (c) β CD-FEA and (d) β CD-FEA con NPsAu.	142
Figura 4.49.	Espectros Raman de: (a) FEA, (b) β CD, (c) β CD-FEA and (d) β CD-FEA con NPsAu.	145
Figura 4.50.	Espectros IR experimental y teórico de FEA.	146

Figura 4.51.	Espectros Raman experimental y teórico de FEA.	146
Figura 5.1.	Gráfico de torta de los porcentajes de cada componente en el sistema ternario β CD-FEA-NPsAu.	152
Figura 5.2.	Esquema del proceso de separación de FEA en todos sus estados, por centrifugación en solución acuosa.	153
Figura 5.3.	Gráfico de los diferentes porcentajes de FEA en la solución, comparados con el total de FEA cargada inicialmente.	154
Figura 5.4.	Esquematación del sistema ternario, primero en estado sólido (izquierda) y luego en solución (derecha).	155
Figura 5.5.	Esquema representativo de un pocillo (izquierda) y fotografía de las placas usadas (derecha), para la realización de ensayos PAMPA.	156
Figura 5.6.	Espectros de absorbancia del complejo β CD-MP y los controles positivo (tiopental) y negativo (azul de Evans) en las placas (a) donadoras y (b) aceptoras.	158
Figura 5.7.	Esquematación del sistema de dos fases montado para evaluar la liberación de FEA por irradiación láser.	161
Figura 5.8.	(a) Porcentajes de absorción de FEA observados desde los máximos obtenidos a 258 nm en cloroformo después de diferentes periodos de irradiación. (n = 3). (b) Porcentajes de absorción de FEA en 4 diferentes sistemas a 60 minutos de irradiación, donde CI/sl es complejo de inclusión/sin irradiación; CI-NPsAu/sl es complejo de inclusión con NPsAu/sin irradiación; CI/I complejo de inclusión/irradiado; CI-NPsAu/I es complejo de inclusión con NPsAu/irradiado. (n = 3). El porcentaje máximo corresponde al total de FEA cargada para cada ensayo	163

Figura 8.1.	Difractograma de β CD pura con la indexación de sus picos principales.	189
Figura 8.2.	Difractograma de β CD-AT con la indexación de sus picos principales.	190
Figura 8.3.	Difractograma de β CD-FEA con la indexación de sus picos principales.	191
Figura 8.4.	Gráfica lineal de absorbancias de TG versus concentración a 324 nm.	192
Figura 8.5.	Gráfica lineal de absorbancias de MP versus concentración a 323 nm.	193
Figura 8.6.	Gráfica lineal de absorbancias de MF versus concentración a 301 nm.	194
Figura 8.7.	Gráfica lineal de absorbancias de AT versus concentración a 234 nm.	195
Figura 8.8.	Gráfica lineal de absorbancias de FEA versus concentración a 258 nm.	196
Figura 8.9	Espectro ROESY completo del complejo β CD-MP en DMSO- d_6 .	200
Figura 8.10	Espectro ROESY completo del complejo β CD-MF en DMSO- d_6 .	200
Figura 8.11.	Espectro ROESY completo del complejo β CD-AT en DMSO- d_6 .	201
Figura 8.12.	Figura 8.12: Espectro ROESY completo del complejo β CD-FEA en DMSO- d_6	201
Figura 8.13.	Imágenes de FE-SEM de polvo de β CD pura cubierto con Au por 64 s (a y b) y por 100 s (c y d).	202
Figura 8.14.	Difractograma de β CD-AT-NPsAu con la indexación de sus picos principales.	203
Figura 8.15.	Difractograma de β CD-FEA-NPsAu con la indexación de sus picos principales.	204
Figura 8.16.	Espectro ROESY completo del complejo β CD-FEA con NPsAu en DMSO- d_6	205

Índice de tablas

	página
Tabla 1.1. Características estructurales y propiedades químicas de CD nativas y sustituidas (Crestani, 2011).	26
Tabla 3.1. Parámetros de red teóricos y experimentales para el sistema cristalino de β CD pura y sin huésped.	55
Tabla 3.2. Parámetros de red teóricos y experimentales para el sistema cristalino de β CD-AT.	56
Tabla 3.3. Parámetros de red teóricos y experimentales para el sistema cristalino de β CD-FEA.	56
Tabla 3.4. Desplazamientos químicos de los protones de β CD-TG con respecto a las especies puras.	65
Tabla 3.5. Desplazamientos químicos de los protones de β CD-MP con respecto a las especies puras.	68
Tabla 3.6. Desplazamientos químicos de los protones de β CD-MF con respecto a las especies puras.	71
Tabla 3.7. Desplazamientos químicos de los protones de β CD-AT con respecto a las especies puras.	74
Tabla 3.8. Desplazamientos químicos de los protones de β CD-FEA con respecto a las especies puras.	77

Tabla 3.9.	Coeficiente de extinción molar para cada fármaco disuelto en agua.	84
Tabla 4.1.	Parámetros de red teóricos y experimentales para el sistema cristalino de β CD-AT-NPsAu.	135
Tabla 4.2.	Parámetros de red teóricos y experimentales para el sistema cristalino de β CD-FEA-NPsAu.	136
Tabla 4.3.	Desplazamientos químicos de los protones de β CD-FEA-NPsAu con respecto a las especies puras.	138
Tabla 5.1.	Absorbancia y concentraciones de FEA en los diferentes sistemas estudiados. (*) Las concentraciones en el sobrenadante se calcularon usando la ley de Lambert-Beer y ϵ (7.230 mol ⁻¹ L cm ⁻¹). (**) La concentración de FEA libre se calculó usando K_a (674 M ⁻¹). (***) La concentración de FEA en el sistema ternario se obtuvo por la diferencia en el sobrenadante y el total del CI disuelto en agua (0,132 mM).	154
Tabla 8.1.	Datos obtenidos de la indexación de las reflexiones de β CD.	189
Tabla 8.2.	Datos obtenidos de la indexación de las reflexiones de β CD-AT.	190
Tabla 8.3.	Datos obtenidos de la indexación de las reflexiones de β CD-FEA.	191
Tabla 8.4.	Datos de volúmenes y concentraciones de TG en agua y sus respectivos máximos de absorbancia a 324 nm.	192
Tabla 8.5.	Datos de volúmenes y concentraciones de MP en agua y sus respectivos máximos de absorbancia a 323 nm.	193
Tabla 8.6.	Datos de volúmenes y concentraciones de MF en agua y sus respectivos máximos de absorbancia a 301 nm.	194

Tabla 8.7.	Datos de volúmenes y concentraciones de AT en agua y sus respectivos máximos de absorbancia a 234 nm.	195
Tabla 8.8.	Datos de concentraciones de FEA en agua y sus respectivos máximos de absorbancia a 234 nm.	196
Tabla 8.9.	Valores de los diferentes ensayos realizados paa calcular la K_a del sistema β CD-TG en agua.	197
Tabla 8.10.	Valores de los diferentes ensayos realizados para calcular la K_a del sistema β CD-MP en agua.	197
Tabla 8.11.	Valores de los diferentes ensayos realizados para calcular la K_a del sistema β CD-MF en agua.	198
Tabla 8.12.	Valores de los diferentes ensayos realizados para calcular la K_a del sistema β CD-AT en agua.	198
Tabla 8.13.	Valores de los diferentes ensayos realizados para calcular la K_a del sistema β CD-FEA en agua.	199
Tabla 8.14.	Datos obtenidos de la indexación de las reflexiones de β CD-FEA-NPsAu.	203
Tabla 8.15.	Datos obtenidos de la indexación de las reflexiones de β CD-FEA-NPsAu.	204
Tabla 8.16.	Absorbancias y concentraciones del total de FEA cargado en los ensayos de irradiación láser.	206
Tabla 8.17.	Absorbancias de FEA liberada de β CD-FEA-NPsAu por irradiación láser.	206
Tabla 8.18.	Concentraciones de FEA liberada de β CD-FEA-NPsAu por irradiación láser.	206
Tabla 8.19.	Porcentajes de FEA liberada de β CD-FEA-NPsAu por irradiación láser.	207

Tabla 8.20.	Valores de absorbancias, concentraciones y porcentajes de FEA liberada desde β CD-FEA sin irradiación láser.	207
Tabla 8.21.	Valores de absorbancias, concentraciones y porcentajes de FEA liberada desde β CD-FEA-NPsAu sin irradiación láser.	208
Tabla 8.22.	Valores de absorbancias, concentraciones y porcentajes de FEA liberada desde β CD-FEA-NPsAu sin irradiación láser.	208

Abreviaturas

AgNPs	<i>Silver nanoparticles</i>
AuNPs	<i>Gold nanoparticles</i>
AT:	2-amino-4-(4-clorofenil)tiazol, <i>2-amino-4- (4-chlorophenyl) thiazole</i>
CD:	Ciclodextrina (s)
CI:	Complejo (s) de inclusión
CLAMS	Autoensamblaje mediado por una red cristalina, <i>crystal lattice mediated self-assembly</i>
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DRXP	Difracción de rayos X de polvo
EDX	Energía dispersiva de rayos X, <i>energy dispersive X-ray</i>
EHT	<i>Extra high tension</i>
FEA:	Feniletilamina
FE-SEM	<i>Field emission-SEM</i>

IC	<i>Inclusion complexes</i>
IR	Infrarojo, <i>infrared</i>
MF:	Melfalán, melphalan
MP:	6-mercaptopurina, <i>6-mercaptopurine</i>
MNPs	<i>Metal nanoparticles</i>
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
NPs:	Nanopartícula (s)
NPsAg:	Nanopartícula (s) de plata
NPsAu:	Nanopartícula (s) de oro
NPsM:	Nanopartícula (s) metálicas
PAMPA:	<i>Parallel artificial membrane permeability assay</i>
PBS:	<i>buffer</i> fosfato salino
PC:	Pulverización catódica
PhEA	<i>Phenylethylamine</i>
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROESY	<i>Rotacional overhauser enhancement spectroscopy</i>
SEM	Microscopía electrónica de barrido, <i>scanning electron microscopy</i>

TEM	Microscopía electrónica de transmisión, <i>transmission electron microscopy</i>
TG:	6-tioguanina, <i>6-thioguanine</i>
UV-Vis:	UV-visible
βCD:	βciclodextrina (s), <i>βcyclodextrin</i>

Resumen

Las nanopartículas metálicas (NPsM), específicamente, las nanopartículas de oro (NPsAu) y las nanopartículas de plata (NPsAg), exhiben excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas, intrínsecas a su tamaño nanométrico y tienen una aplicación directa en el tratamiento de enfermedades. Se ha logrado diseñar nanosistemas usados para el transporte de fármacos, permitiendo que estos lleguen activos al sitio de acción, atravesando diversas barreras biológicas. Gracias al efecto de plasmón de las NPsM, es posible promover la liberación de un fármaco en células o tejidos específicos de manera controlada a través de terapia fototérmica.

Otra manera interesante de modificar las propiedades fisicoquímicas de algún compuesto, es mediante la formación de complejos de inclusión (CI), que se basan en interacciones no convencionales entre una especie llamada matriz con otra denominada huésped. La β ciclodextrina (β CD) ha sido ampliamente utilizada como matriz ya que logra variar algunas de las propiedades desfavorables de los fármacos que incluyen, como por ejemplo, aumentar la solubilidad en agua y disminuir la toxicidad de muchas moléculas, entre otras múltiples ventajas.

Existen diversos fármacos que presentan desventajas terapéuticas y que son candidatos a ser incluidos en matrices de β CD y transportados a través de sistemas nanoparticulados, entre ellos 6-tioguanina (TG), 6-mercaptopurina (MP), melfalán (MF),

2-amino-4-(4-clorofenil)tiazol (AT) y feniletilamina, los cuales han sido estudiados en la presente tesis doctoral.

Los complejos formados β CD-TG, β CD-MP, β CD-MF, β CD-AT y β CD-FEA en estado sólido y en solución se caracterizaron mediante difracción de rayos X de polvo, RMN de 1 (1 H) y 2 dimensiones (ROESY). El proceso de inclusión deja fuera de la cavidad de β CD los grupos funcionales de los huéspedes que estabilizan NPsM que se depositaron a través de la técnica de pulverización catódica en alto vacío, formándose los sistemas ternarios β CD-TG-NPsAu, β CD-TG-NPsAg, β CD-MP-NPsAu, β CD-MF-NPsAg, β CD-AT-NPsAu y β CD-FEA-NPsAu. Espectroscopia UV-visible en sólido mostró el plasmón de NPsAu y NPsAg, mediante SEM, FE-SEM, EDX y TEM se observó de manera directa la morfología de los cristales y de las NPsM obtenidas, que tienen un tamaño promedio de 20 nm de diámetro.

Adicionalmente, el sistema ternario β CD-FEA-NPsAu fue caracterizado por espectroscopia IR y RAMAN que permitió analizar las interacciones del huésped al interior de la matriz, cuando forman el CI y los cambios generados por la presencia de las NPsAu. Los estudios mediante ROESY corroboran que FEA se desplaza parcialmente hacia fuera de la matriz debido a la interacción NH_2 -Au. Se cuantificó el porcentaje de cada componente del sistema ternario, evaluándose una alta capacidad de carga del fármaco, por otra parte, fue posible la liberación de FEA desde β CD-FEA-NPsAu de manera controlada a través de irradiación láser. Consideramos que un sistema único que posee dos componentes (NPsM y β CD) puede ser más eficiente en sus funciones para el transporte y la entrega de fármacos.

Abstract

Metal nanoparticles (MNPs), specifically, gold nanoparticles (AuNPs) and silver nanoparticles (AgNPs), exhibit excellent physical, chemical and biological properties, intrinsic to their nanometric size and have a direct application in the treatment of diseases. The nanosystems are designed to transport drugs, which can reach the site of action through various biological barriers. Thanks to the plasmon effect of the nanoparticles, it is possible promote the release of a drug into specific cells or tissues in a controlled manner through photothermal therapy.

Another way to modify the physicochemical properties of a compound is through the formation of inclusion complexes (IC), which is based on unconventional interactions between a matrix and a guest. The β cyclodextrin (β CD) has been widely used as matrix, it is possible change some unfavorable properties of drugs including, for example, increase aqueous solubility and decrease toxicity of many molecules, among other advantages.

There are several drugs that have therapeutic disadvantages, these may be included in matrices of β CD and may be transported through nanoparticulate systems, such as 6-thioguanine (TG), 6-mercaptopurine (MP), melphalan (MF), 2-amino-4- (4-chlorophenyl) thiazole (AT) and phenylethylamine (PhEA), which they have been studied in this doctoral thesis.

The complexes β CD-TG, β CD-MP, β CD-MF, β CD-AT and β CD-PhEA in solid state and in solution using X-ray diffraction, 1 H NMR (1 H) and 2D (ROESY) were characterized. After of the inclusion process, the functional groups of the guests remain outside of the β CD cavity can stabilize MNPs, which they were deposited through the sputtering technique in high vacuum, forming the ternary systems β CD-TG-AuNPs, β CD-TG-AgNPs, β CD-MP-AuNPs, β CD-MF-AgNPs, β CD-AT-AuNPs and β CD-PhEA-AuNPs. Using UV-Visible solid spectroscopy, the plasmons of AuNPs and AgNPs were observed, using SEM, FE-SEM, EDX and TEM, the morphology of the crystals and of the MNPs obtained were observed directly, these MNPs have an average size of 20 nm diameter.

Additionally, the ternary system was characterized using IR and Raman spectroscopy. The interactions of the guest with the matrix, forming the IC and the changes brought about by the presence of NPsAu were observed. The partial displacement of PhEA outwardly of the matrix due to the NH_2 -Au interactions has been corroborated using ROESY studies. The percentage of each component in the ternary system was evaluated and a high capacity drug-loading was calculated. On the other hand, it was possible to release PhEA from β CD-PhEA-NPsAu of controlled manner using laser irradiation. We believe that a unique system, which has two components (MNPs and β CD) could be more efficient in its functions for the transportation and delivery of drugs.

CAPÍTULO 1

Introducción

La palabra "nano" se deriva del latín "*nanus*" que significa enano y ha sido comúnmente utilizada como un recurso para miniaturizar algo. En ciencias, la palabra "nano" es utilizada como un prefijo que significa una milmillonésima parte. Así, cuando se trabaja a escala nanométrica, estamos investigando estructuras o materiales que tienen dimensiones del orden de 1×10^{-9} metros. La comunidad científica no ha aclarado aún en qué momento se comenzaron a crear o aplicar partículas con dimensiones nanométricas. En el siglo IV (a.C.) por ejemplo, artesanos de Roma fabricaban cristales que contenían nanopartículas metálicas, es conocido que en el Museo Británico de Londres se encuentra la *Copa de Licurgo*, la cual está hecha de sosa y cal, y que contiene además nanopartículas de oro y plata que provocan un cambio de color, de verde a rojo intenso, cuando se incorpora una fuente luminosa en su interior. Gran parte de las catedrales medievales poseen vidrios de múltiples colores intensos debido a la presencia de nanopartículas metálicas en su composición.

Desde siglos pasados, podemos asegurar que la humanidad ha utilizado la nanotecnología, sin embargo, el diseño y la aplicación de nanosistemas en la naturaleza es muy anterior. Los Haliotidos, son una familia de moluscos comercializados en Chile por su carne. Esta especie construye conchas muy firmes, y cuyas superficies interiores son iridiscentes, todo esto mediante nanoestructuras de carbonato de calcio unidas entre sí por una mezcla de carbohidrato y proteínas que actúan como pegamento. Además de entender que existen especies que utilizan nanopartículas desde hace miles de años, se demuestra que un sistema que cambia sus dimensiones a una escala nanométrica puede ser más resistente, su estudio da origen a disciplinas tan interesantes como la nanoquímica.

Dentro de las diferentes nanoestructuras que se investigan, destacan las nanopartículas metálicas, debido a que poseen útiles propiedades ópticas, electrónicas y magnéticas, entre otras, las cuales dependen de su tamaño, naturaleza, morfología y ordenamiento espacial. Con respecto al cambio de tamaño, cuando se reduce algún metal a dimensiones nanométricas, muchas de sus propiedades cambian (Lance, 2003; Daniel, 2004).

La formación de un sólido genera niveles de energía que se ensanchan, agrupándose en bandas con zonas prohibidas entre ellas, los electrones externos que mantienen unidos a los átomos del cristal ocupan la banda de valencia. En un material conductor la banda de valencia está llena, existiendo electrones que se posicionan parcialmente en la banda de conducción y ambas bandas pueden llegar a solaparse. Cuando una partícula metálica con macro-propiedades se reduce al tamaño de unos cientos de átomos, la densidad de estados en la banda de conducción cambian de manera significativa, dejan de ser continuos y son reemplazados por un conjunto de niveles de energía discretos, y la antes mencionada zona prohibida aumenta (ver figura 1.1). Con ello se justifican muchos de los cambios en las propiedades de un material que reduce significativamente su tamaño (Lance, 2003); por ejemplo, diferencias en su comportamiento óptico. El color de un material está determinado por la longitud de onda de la luz que absorbe para efectuar transiciones de electrones entre los niveles llenos inferiores y los niveles no ocupados superiores; si una partícula presenta distintos tamaños, también presentará estructuras electrónicas con diferentes separaciones entre los niveles de energía, y con ello un cambio de color.

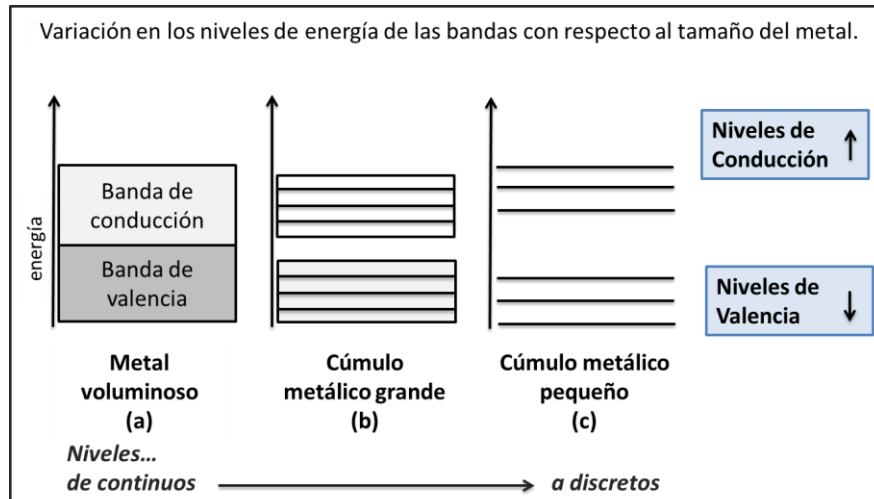


Figura 1.1: Ilustración de la variación de los niveles de energía de un metal en función de la reducción del tamaño: (a) bandas de un metal voluminoso, (b) cúmulo metálico grande de 100 átomos, mostrando el ensanchamiento del *gap* de la banda y (c) cúmulo metálico pequeño que contiene 3 átomos.

Otra manera interesante de cambiar las propiedades fisicoquímicas de algún material o compuesto, es a través de interacciones sutiles, que no sean covalentes, y que por tanto no alteren su estructura química, sino más bien, que provean de nuevas condiciones, formando una nueva estructura que adhiera ventajas al compuesto. Esto puede realizarse a través de la química supramolecular.

La química supramolecular estudia las estructuras y funciones de entidades formadas por dos o más especies, cuyas interacciones no se basan en enlaces moleculares del tipo covalente, sino más bien corresponden a interacciones intermoleculares por puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals y fuerzas electrostáticas principalmente (Lehn, 1990).

Diversos procesos que ocurren en todas las áreas de la ciencia pueden ser definidos en esta disciplina, por ejemplo en biología: interacciones entre proteínas y administración de fármacos usando nanotransportadores; en química: estabilidad de coloides y formación de complejos; en física: sistemas fotovoltaicos orgánicos y revestimiento óptico. En la actualidad, los *kits* para detectar anticuerpos usan películas delgadas que contienen un antígeno en su superficie, la complejación entre el anticuerpo y un antígeno específico a través de interacciones "no covalentes" son definidos como procesos supramoleculares.

En el área supramolecular, se utilizan los términos de matriz y huésped; conceptos que se asocian para nombrar a las entidades que interactúan entre sí formando la supramolécula. La matriz, receptor o anfitrión, es una molécula o conjunto de ellas que puede envolver total o parcialmente, de manera geométrica a la otra, llamada huésped o sustrato. Esta situación peculiar de unión selectiva matriz-huésped es un fenómeno llamado reconocimiento molecular, que comprende a receptores o matrices con cavidades de naturaleza energética y estereoquímicas aptas para albergar huéspedes, dando origen a los complejos de inclusión (Gellman, 1997). La figura 1.2 muestra un esquema que representa la unión específica entre una matriz y un huésped.

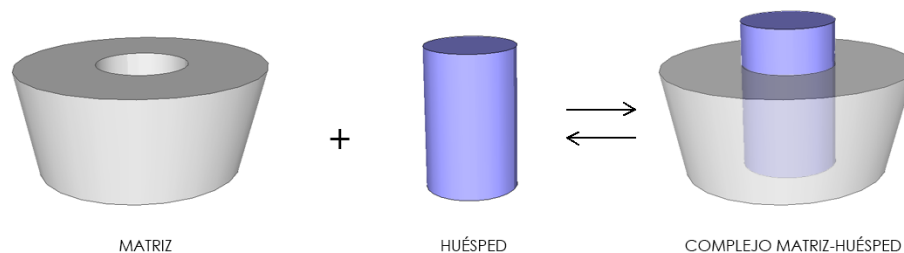


Figura 1.2: Inclusión de un huésped en una matriz a través del proceso de reconocimiento molecular.

La asociación de dos áreas atrayentes como la nanoquímica y la química supramolecular, específicamente el uso de nanopartículas metálicas y complejos de inclusión, pueden resultar en un avance en la construcción de nuevos sistemas nano-supramoleculares, aplicados a especies que requieren la modificación de algunas de sus propiedades, tal es el caso de moléculas con aplicaciones biológicas y que actualmente son utilizados como fármacos, pero que presentan diversas desventajas terapéuticas como baja solubilidad acuosa, inestabilidad temprana, o tienen una acción inespecífica en el organismo.

La investigación desarrollada en esta tesis pretende ser un aporte en el estudio, principalmente químico, de sistemas que se componen de fármacos que actúan como huéspedes albergados en matrices de β ciclodextrina, y que a su vez, interactúen con nanopartículas de Au o Ag para mejorar algunas de sus propiedades que dificultan las aplicaciones en terapia, como por ejemplo la baja solubilidad o la gran cantidad de efectos secundarios.

1.1. Nanopartículas de Au y nanopartículas de Ag

Debido a las propiedades únicas alcanzadas con la reducción de un material a escala nanométrica, es que las nanopartículas metálicas (NPsM) altamente reactivas, pueden ser sintetizadas con distintos tamaños y formas, y ser fácilmente funcionalizadas con diversos ligandos tales como polímeros, fármacos y/o material genético (Gibson, 2007; Kogan, 2007; Sperling, 2010; Collen, 2012; Adura, 2013). Estos ligandos se unen a los átomos superficiales de las NPsM a través de quimisorción o interacciones electrostáticas, entre otras (Daniel, 2004; Kumar, 2007).

Las nanoestructuras en general son inestables debido a su alta energía superficial, por lo que necesitan ser estabilizadas para evitar la agregación mediante la modificación de su superficie, las nanopartículas de Au (NPsAu) y las nanopartículas de Ag (NPsAg), en términos generales, pueden reaccionar con diversas especies o moléculas con grupos funcionales adecuados tales como SH, NH₂ y/o COOH (Kumar, 2003; Häkkinen, 2012; Sperling, 2010, Sierpe, 2015). Comúnmente han sido utilizadas moléculas tioladas para dicho proceso (Brust, 1994; Porter, 1998, Vasiliev, 2009). Sin embargo, el uso de moléculas aminadas también es una estrategia adecuada. Leff y colaboradores en el año 1996 demostraron que las aminas primarias forman enlaces parcialmente covalentes con NPsAu, asegurando que la interacción de un grupo NH₂ con Au es fuerte y similar a la producida con enlaces tiolados. Kumar y colaboradores en el año 2003, mostraron algunos resultados señalando que alcanotioles que cubren a las NPsAu pueden ser reemplazados por alquilaminas mediante un mecanismo de intercambio de ligandos, mientras que el proceso inverso, es decir, el intercambio de alquilaminas por alcanotioles no se produce.

Las NPsAg por su parte, poseen diversas aplicaciones como optimización de espectroscopía óptica, se utilizan en diagnóstico como biosensores y se aprovechan sus propiedades conductoras y antibacterianas (Prabhu, 2012), y pueden ser obtenidas con una alta monodispersión cuando grupos carboxilos estabilizan los átomos de su superficie (Yamamoto, 2006). Actualmente, ambas especies metálicas son profundamente investigadas en el área de administración de fármacos (Bhattacharyya, 2011).

1.2. Nanopartículas de Au y Ag usadas en administración de fármacos

El concepto de administración de fármacos o "*drug delivery*", no solo está ligado a la investigación y creación de procesos de ingreso y entrega de fármacos, sino a mecanismos cada vez más complejos y eficientes. Una serie de avances significativos se han hecho en el desarrollo de tecnologías para optimizar la administración, los nuevos sistemas de entrega, deben ser capaces de regular la velocidad de liberación y focalización del fármaco en un sitio específico. De esta manera lograr tratamientos terapéuticos aún más eficaces, con reducción de efectos adversos, minimizando la frecuencia de dosificación, aumentando la concentración en el sitio de acción y disminuyendo la cantidad utilizada (Álvarez, 2006; Feng, 2010).

Uno de los principales retos para la investigación en "*drug delivery*", es evitar los posibles efectos secundarios del fármaco administrado en lugares del organismo que no están alterados, esto es especialmente difícil para el tratamiento del cáncer. La toxicidad de la quimioterapia, se debe a la baja selectividad de los fármacos, los que ingresan y se distribuyen por todo el organismo.

Las NPs ofrecen estrategias para una terapia más específica, mejorando la focalización y aumento de la concentración local; su pequeño tamaño permite la penetración de las membranas celulares con un sofisticado, pero efectivo "*drug delivery*" después de la endocitosis de la fármaco (De Jong, 2008).

En general, existen procesos biológicos que se pueden interferir a nivel nanométrico, esto conlleva a avances en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades habituales para nuestra sociedad, como cáncer (Brigger, 2002). A este nivel de tamaño podemos construir nanoestructuras capaces de ser usadas como sistemas de transporte y liberación de fármacos en células y tejidos específicos (Gosh, 2008). En la figura 1.3 se presenta un esquema del uso de NPsAu como nanotransportadores. En ella se esquematiza la llegada de estas nanoestructuras a tejidos enfermos después de su administración en el sistema circulatorio.

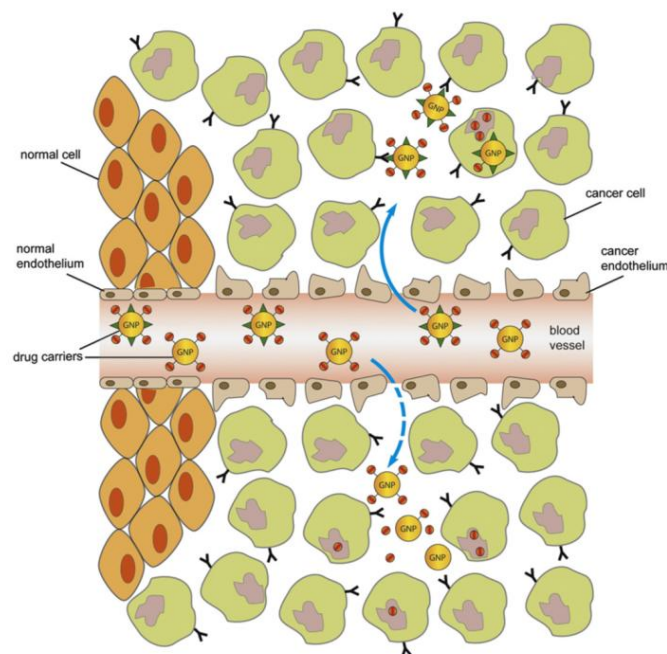


Figura 1.3: Esquema de la entrega específica de fármacos a través de NPsAu funcionalizadas a células de cáncer (Gosh, 2008).

En este sentido, los sistemas de NPs pueden ser aplicados al tratamiento de enfermedades asociadas con la inflamación y los tumores. En tales condiciones patológicas, el revestimiento endotelial de la pared del vaso sanguíneo se vuelve más permeable que en el estado normal del tejido, lo que permite la acumulación selectiva de nanopartículas, conocido como efecto de permeabilidad y retención mejorada (EPR). En consecuencia, ciertas nanopartículas que poseen tamaños de 10 a 500 nm de tamaño pueden salir del lecho vascular y se acumulan en el interior del espacio intersticial, lo que permite una orientación pasiva de fármacos activos asociados con ellos (Shaji, 2013; Bertrand, 2014; Nehoff, 2014; Kobayashi, 2014). Así, las NPs dan la oportunidad de mejorar la entrega de fármacos a tumores, actuando como transportador, al tiempo que lo protegen de la inactivación prematura durante su transporte (Huang, 2007). Hace algunos años se han comenzado a abordar estudios de NPsAu en cáncer (Gibson, 2007; Jain, 2012) y recientemente se investigan NPsAg para esta enfermedad (Jeyaraj, 2013; Ong, 2013).

Por otra parte, una cierta proporción de estos sistemas puede atravesar la barrera hematoencefálica y llegar al cerebro, como se ha demostrado para NPsAu (Lasagna-Reeves, 2010; Guerrero, 2010; Prades, 2012). Las NPsAg poseen una actividad antimicrobiana intrínseca, estudiada con *Echerichia coli*, estafilococos y levaduras, entre otras, transformándolas en candidatas potenciales para ser ingresadas al organismo con fines terapéuticos (Kim, 2007; Bhattacharyya, 2011; Akolade, 2012). Todo lo anterior amplía aún más las aplicaciones biológicas de estas estructuras.

1.3. Bioaplicaciones de las NPsAu

Es evidente que entre la gran diversidad de NPsM, las NPsAu han tenido un crecimiento constante en su investigación debido a su amplio espectro de aplicaciones, en el organismo son inocuas y existen variados métodos de síntesis y funcionalización. Se ha demostrado que nanoesferas que poseen un tamaño entre 4 y 100 nm poseen una baja citotoxicidad (Connor, 2005; Tirelli, 2006; Pan, 2007; Yen, 2009). En sistemas de liberación de fármacos las NPsAu muestran varias características interesantes, incluyendo una alta solubilidad, estabilidad en sistemas vivos y capacidad de biodistribución, además de mejorar la cinética de distribución de fármacos. Ellas pueden actuar como nanovehículos para transportar y posteriormente entregar de manera sostenida y controlada fármacos, con el fin de mantenerlos dentro de la ventana terapéutica (Bansal, 2005; Sonavane, 2008; Wang, 2010; Dykman, 2012).

Gracias al efecto de plasmón de las NPsAu, es posible promover la liberación del fármaco de manera controlada a través de terapia fototérmica. La resonancia de plasmón superficial localizada o efecto plasmón, corresponde a la oscilación colectiva de los electrones de los átomos que se encuentran en la superficie del metal debido a la interacción con la luz. La absorción de energía conduce a una transición de los electrones de la superficie de un estado fundamental a otro excitado, luego, esta energía se disipa como calor local en todas las direcciones (efecto fototérmico). Lo que podría ser utilizado para la liberación de fármacos (Aroca, 2006; Huang, 2008; Le Ru, 2009; Guerrero, 2014). En la figura 1.4 se muestran dos imágenes que representan el efecto de plasmón (a) y el efecto fototérmico (b) de NPsAu.

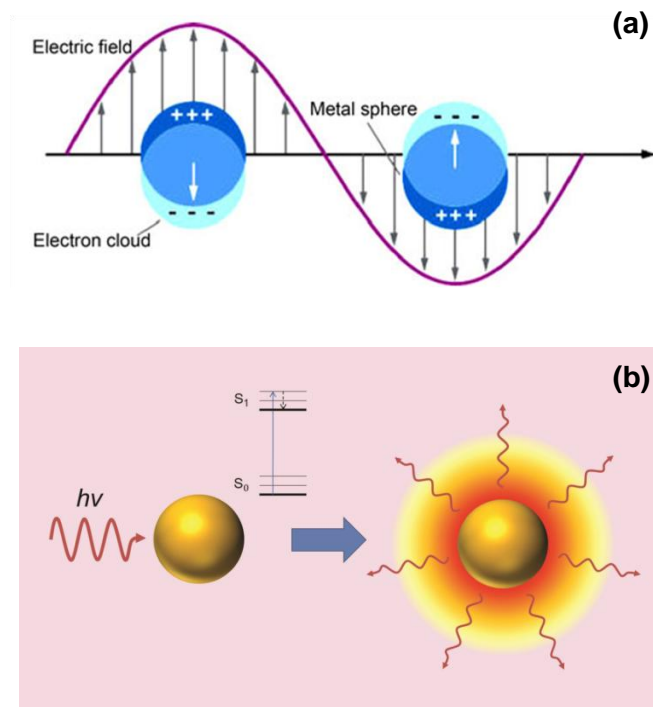


Figura 1.4: (a) Esquema que ilustra el efecto de resonancia de plasmón superficial localizada (Wang, 2013). (b) Esquema que ilustra el efecto fototérmico en NPsAu (Guerrero, 2014).

En el contexto de las aplicaciones clínicas de NPsAu, es importante tener en cuenta que sus usos son aún incipientes. En la actualidad, existen algunas aplicaciones de NPsAu en terapia; sin embargo, muchos de estos tratamientos existen solo en la fase de ensayos clínicos (Etheridge, 2013). Un ejemplo en la fase clínica II es el uso potencial de NPsAu marcadas con el factor alfa recombinante de necrosis humana tumoral (TNF- α) para la focalización de los tumores sólidos en pacientes con cáncer en etapas avanzadas (Libutti, 2010).

1.4. Formación de nanopartículas de Au y Ag

Existen diversos métodos para la síntesis de NPsM, tales como descomposición térmica de complejos organometálicos (Sun, 2002), reducción de sales metálicas por agentes químicos (Turkevich, 1953) o mediante enzimas (Kulkarni, 2014), ablación láser (Mafuné, 2000) o pulverización catódica (Sierpe, 2015), entre otros más. Estos métodos pueden ser clasificados en tres categorías, métodos químicos, biológicos y físicos. Los métodos químicos son sin lugar a dudas los más utilizados, y emplean diferentes agentes para reducir las sales metálicas, detener el crecimiento de las partículas y estabilizarlas. La gran variedad de síntesis estudiadas por este método promueve la obtención de nanoestructuras de diferentes formas y tamaños.

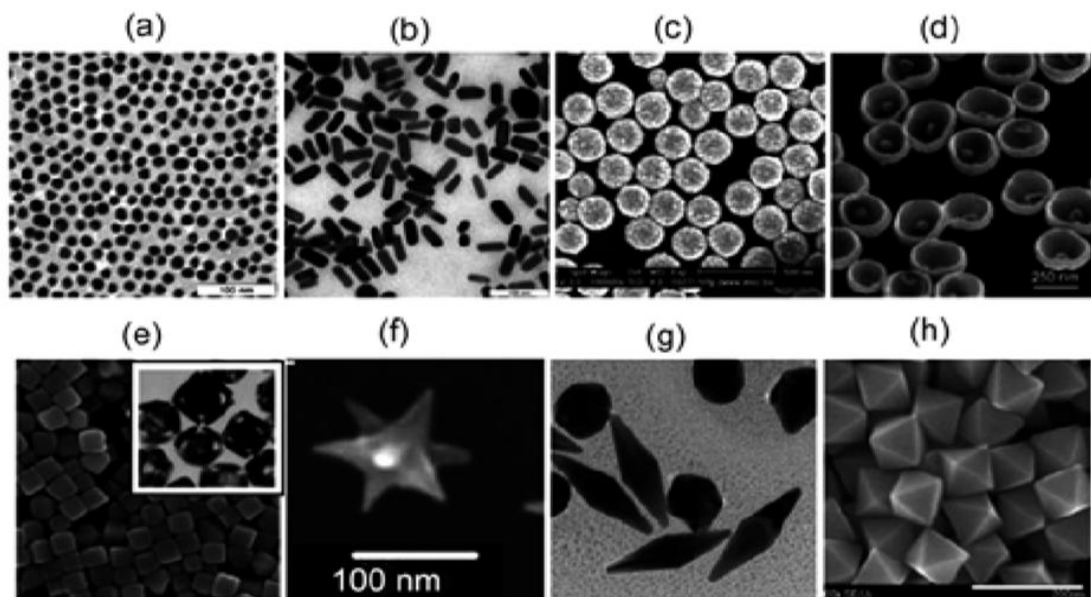


Figura 1.5: Imágenes TEM de: (a) nanoesferas de Au (15 nm); (b) nanobarras de Au (15x50 nm); SEM de: (c) nanocápsulas de sílice/Au (160/17 nm núcleo/coraza); (d) nanocucos de Au (250 nm) con semillas de Au al interior (55 nm); (e) nanocubos de Ag y nanocajas de Au (de inserción); (f) nanoestrellas; (g) nanobipirámides; y (h) nanooctaedros (Khlebtsov, 2010).

Los métodos químicos, a su vez, dan mejores resultados en concentración de NPs y dispersión de tamaños, sin embargo los precursores propios de la síntesis pueden ser tóxicos, lo cual es relevante si el propósito de la formación de las NPsM es para bioaplicaciones. En este sentido, los métodos físicos son adecuados, debido a que la técnica no implica el uso de agentes tóxicos que puedan permanecer remanentes.

Los métodos físicos se basan en la división mecánica de un metal, produciendo pequeñas fracciones de NPs con un tamaño y forma que dependen fuertemente de las condiciones utilizadas (Hatakeyama, 2011). Entre ellos podemos nombrar la nanolitografía que consiste en el empleo de una capa polimérica sensible a la radiación para formar patrones bien definidos sobre una superficie, Lu y colaboradores han obtenido nanoalambres de Au mediante esta técnica, los cuales tienen una orientación cristalina y conductividad homogénea (Lu, 2010). La ablación láser se basa en la vaporización y condensación de NPs producidas por la aplicación de un láser pulsado sobre un blanco metálico que se encuentra en solución (Mafuné, 2000).

Otra técnica física es la pulverización catódica (PC) en alto vacío y consiste en la desintegración de un área de una lámina metálica delgada, y los átomos desprendidos se estabilizan a través de su depósito sobre la superficie de un sustrato. El método de PC tiene varias ventajas respecto de los métodos químicos trabajados actualmente, no hay contaminación de solventes o moléculas de precursores sobre la superficie, el proceso es económico, rápido y no causa daño ambiental (Kelly, 2000).

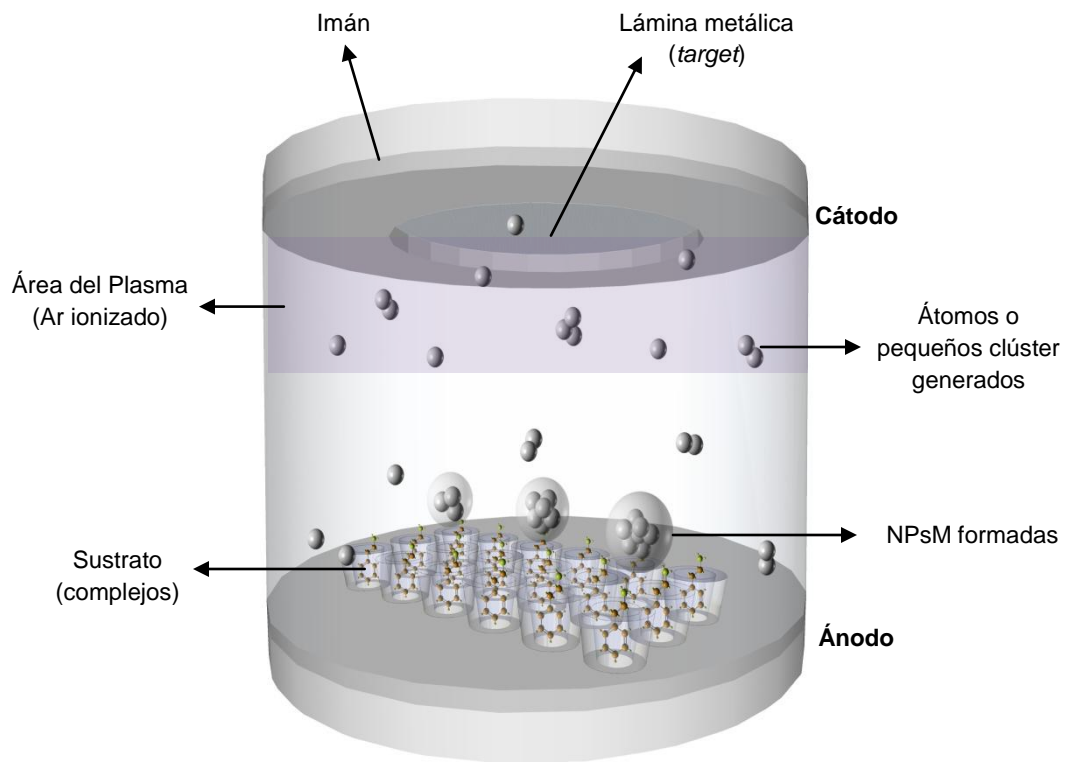


Figura 1.6: Esquema del equipo de PC ilustrando la formación de NPsM depositadas sobre CI en estado sólido.

Múltiples variables se deben considerar para el depósito de NPsM por este método. Existen dos tipos de procesos de PC, el primero denominado PC reactiva, consiste en la aplicación de un gas como oxígeno que interfiere oxidando el metal que es depositado y PC no reactiva y comprende a un mecanismo de desintegración de la lámina metálica con un gas inerte como argón sin producir una reacción química.

Para comenzar el proceso de PC, se requiere un alto vacío, así se evita que gases inicialmente contenidos en la cámara interfieran en la desintegración de la lámina, en el trayecto de los átomos liberados hacia el sustrato o que contaminen las muestras. Los equipos, en general, operan a un alto vacío ($P < 10^{-6}$ mbar). Luego se introduce el gas modificando la presión del sistema, la cual debe adaptarse a los requerimientos de la técnica, es decir, al nivel de plasma y número de descargas aplicados (Kelly, 2000).

Posteriormente se aplica una corriente eléctrica del orden de los 20 a 25 mA, la diferencia de potencial generada entre el cátodo (lámina metálica) y el ánodo (sustrato) provoca la ionización del gas formando el plasma. Estos iones se dirigen al cátodo golpeando al metal con una alta energía, liberando átomos de su superficie o pequeños clústeres mediante una transferencia de *momentum*. En esta etapa, el control de la corriente aplicada se utiliza para modificar el nivel de ionización del gas y el número de colisiones contra la lámina. Una vez iniciada la colisión en cascada, parte de la energía de los iones se transfiere a los átomos metálicos, los que adquieren energía suficiente para desprenderse del material y dirigirse hacia el ánodo. La mayor parte de la energía proporcionada por los iones incidentes se transforma en calor, siendo este disipado mediante un circuito de refrigeración que evita el sobrecalentamiento del sistema.

El proceso puede ser más eficiente a través de la aplicación de un campo magnético perpendicular al campo eléctrico que se genera tras la descarga, esto se denomina PC asistida por imanes. El impacto de los iones produce electrones secundarios que pueden combinarse con los iones provocando una fuerte emisión de luz en el área del cátodo; al aplicar un campo magnético se evita la dispersión del plasma en la cámara y estos electrones secundarios son llevados hacia la lámina y son forzados a recorrer

trayectorias helicoidales, acumulándose en esa zona junto con el gas ionizado, lo que provoca un mayor número de colisiones sobre el metal. La aplicación de este campo magnético transversal también permite que los electrones secundarios generados no impacten el sustrato (Kelly, 2000). En la figura 1.7 se presenta una imagen del equipo de PC, mostrándose el proceso de formación de NPs y los componentes de la cámara.

Fujiki y colaboradores en el año 2006 fueron los primeros en reportar el depósito anisotrópico de NPsAu sobre caras específicas de cristales orgánicos. Los estudios comenzaron a abordar otros campos, obteniéndose por ejemplo, NPsM sobre CI de CD para posibles aplicaciones biológicas (Sierpe, 2015), o incluso, el uso de líquidos con presiones de vapor extremadamente bajas para ser usados como sustrato (Wender, 2010; Vanecht, 2011; Torimoto, 2015).



Figura 1.7: Fotografías del equipo de PC asistido por imanes. A la izquierda se observa el plasma producido durante la desintegración de la lámina. A la derecha se observa la cámara abierta, con la lámina metálica puesta en la sección catódica.

1.5. Compuestos de inclusión

La química supramolecular nace durante la década del 60' de la mano de tres investigadores, que en 1987 ganan el premio Nobel de Química por el desarrollo de este nuevo campo investigativo. El profesor Jean-Marie Lehn, el único de los tres galardonados aún vivo, la definió brevemente como: "la química que va más allá de la molécula" (Lehn, 1990). Es la química supramolecular quien da origen a la investigación de los CI. En el año 1886, Mylius fue el primero en reportar estructuras supramoleculares entre la hidroquinona y numerosas especies volátiles, pero fue Schlenk, en 1949, el primero en usar el término "compuesto de inclusión" para describir estos sistemas. Su clasificación debe respetar algunos criterios básicos. Los CI son especies químicas constituidas principalmente por una estructura matriz compleja, relativamente rígida, que contiene cavidades en las que se albergan otras especies químicas de menor tamaño y de movilidad relativamente alta. Otras características generales que poseen los CI es que las interacciones matriz-huésped son menos fuertes que las interacciones químicas covalentes, siendo estas a menudo del tipo van der Waals y/o por puentes de hidrógeno; su existencia como agregado supramolecular está marcado por una afinidad y especificidad estructural entre la cavidad de la matriz y la geometría del huésped. Además, se debe comprender que en los CI, las especies huéspedes al interior de la matriz están dotadas de una movilidad alta, sin embargo, presentan restricciones en sus grados de libertad de traslación y rotación (Takemoto, 1984).

Los compuestos de inclusión pueden ser clasificados de diferentes maneras, una de ellas es según el tipo de matriz utilizada y la naturaleza de los intersticios que la conforma, existen CI monomoleculares, polimoleculares, de intercalación y macromoleculares y deben cumplir con poseer o formar una cavidad apta para albergar moléculas huéspedes en su interior. Otra manera de clasificarlos es por su permanencia al cambiar de la fase sólida a la fase dispersa. Un tipo de CI es aquel que se construye a través del reconocimiento molecular entre la matriz y el huésped en fase sólida formando verdaderas arquitecturas soportadas únicamente a través de interacciones de baja energía. El segundo tipo de CI es aquel que puede existir en fase sólida o dispersado en una solución donde la ruptura de la estructura no desarticula al complejo, es decir, las interacciones entre la matriz y el huésped permanecen en equilibrio dinámico una vez en solución. Probablemente, la matriz más estudiada en CI corresponde a las ciclodextrinas (CD), la cual clasifica como entidad monomolecular y puede formar CI tanto en fase sólida como dispersa.

Las CD son oligosacáridos cíclicos, no tóxicos, formados por varias unidades de glucosa unidas por medio de enlaces $\alpha(1-4)$, como un cono truncado, con una cavidad interior parcialmente apolar y una superficie exterior polar. Se ha demostrado que varias fuerzas débiles principalmente del tipo van der Waals, determinan el comportamiento de las CD como matrices en CI. Las formas más comunes son α , β y γ CD, compuestas por 6, 7 y 8 unidades de glucosa respectivamente (del Valle, 2004) (ver figura 1.8). Debido a su estructura hidrofóbica en la cavidad interna e hidrofílica en la superficie externa, las CD son capaces de incluir preferentemente moléculas apolares como hidrocarburos alifáticos y cíclicos (Douhal, 2004).

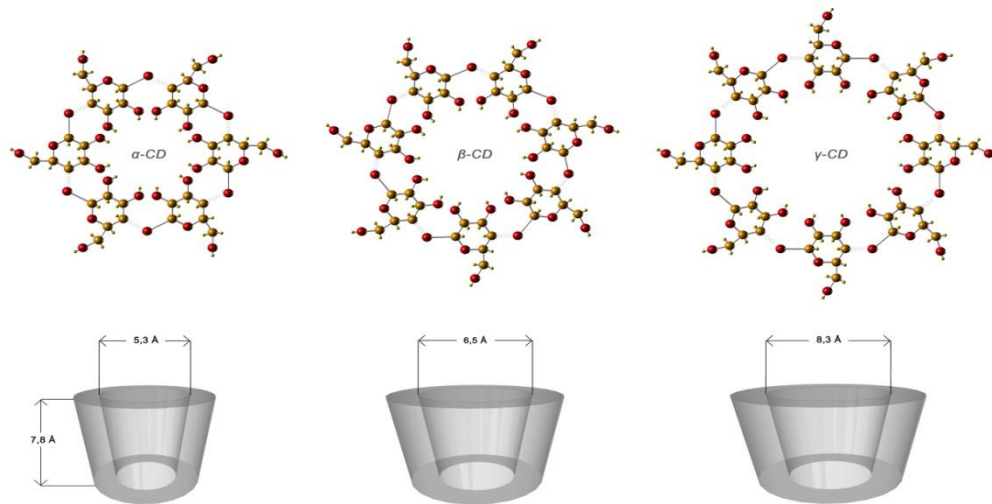


Figura 1.8: Representación esquemática de tres formas de CD: α-CD, β-CD y γ-CD, con su estructura molecular desarrollada y modelos tipo cono.

Tras exitosos resultados, las CD están presentes en numerosos trabajos de investigación, patentes y conferencias. Fueron descubiertas en 1891 y desde entonces han tenido una consecutiva línea investigativa, aunque su mayor estudio está relacionado con sus potenciales aplicaciones farmacéuticas (Loftsson, 1996; del Valle, 2004).

1.6. β-ciclodextrina usada en administración de fármacos

Como matrices en CI, las CD han sido ampliamente utilizadas en administración de fármacos, debido a que logran variar algunas propiedades desfavorables de los huéspedes incluidos. Además de las propiedades ya nombradas, implícitas por su estructura química, las CD proporcionan una serie de ventajas tales como: diversidad de tamaños de su cavidad, lo que hace posible albergar fármacos de diferentes dimensiones moleculares, protegiéndolos contra la degradación, poseen una elevada

estabilidad térmica, con una temperatura de descomposición próxima a 300 °C, son estables a pH básico y neutro, y se degradan lentamente a pH más ácido, evitan la inestabilidad de moléculas expuestas a degradarse por exposición al oxígeno, agua, radiación, calor o reacciones químicas internas, reducen la irritación provocada por el ingreso directo de algunos fármacos al organismo y evitan la incompatibilidad entre fármacos o con otros ingredientes inactivos presentes; con el proceso de inclusión además es posible disminuir la toxicidad y aumentar la solubilidad en agua de muchas especies. Adicionalmente las CD son utilizadas para administrar fármacos al organismo y transportarlos al sitio de acción de manera estable, liberando al huésped en un tiempo prolongado y de manera uniforme (Loftsson, 2007; Laza-Knoerr, 2010).

Entre las diversas matrices de CD aplicadas en administración de fármacos, sin lugar a dudas la β ciclodextrina (β CD) y sus derivados son las más usadas. En general, se pueden encontrar diferentes aplicaciones de β CD que han sido llevadas al mercado. β CD fue aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) de Estados Unidos en el año 2001, lo que permite su uso en la industria alimentaria, cosmetología, y aplicaciones clínicas en seres humanos. En ese año, las CD experimentaron un fuerte crecimiento; seis productos fueron aprobados por la FDA, se publicaron alrededor de 600 patentes y aplicaciones en formulaciones de fármacos, y más de 500 artículos científicos incluían CD en sus estudios. En la actualidad, las contribuciones de β CD y sus derivados siguen aumentando, y nuevos sistemas se siguen desarrollando. El uso de hidroxipropil- β CD en la enfermedad de Niemann-Pick tipo C y CD en forma polimérica o con AuNPs acoplados para el transporte de fármacos antitumorales son algunas de sus aplicaciones (Park, 2009; Loftsson, 2010; Adeli, 2011; Liu, 2012; Stella, 2012; Shi, 2013; Ottinger, 2014; Vite, 2015).

El gran número de patentes y artículos de investigación publicados y el constante desarrollo de nuevas estrategias para la administración de fármacos que utilizan CD muestran el alcance de este campo dentro de la industria farmacéutica. Los mecanismos que describen el proceso de entrega de fármacos albergados en matrices de β CD son aún discutidos, sin embargo existen estudios que apuestan que una vez llegada la CD al sitio de acción, el fármaco puede ser removido por un mecanismo de intercambio con colesterol. Se informó que las CD debido a su capacidad de extraer el colesterol, puede aumentar la fluidez de la membrana e inducir la invaginación de esta a través de una pérdida de resistencia a la flexión haciendo más accesible la entrada del fármaco (Rasheed, 2008; López, 2013).

El estudio computacional realizado por López y colaboradores en el año 2013 y publicado por la revista *Nature* como un artículo abierto, explica que la β CD forma dímeros que se unen a una superficie de la membrana con una alta afinidad, específicamente de 35 kJ/mol, independientemente de la fase de membrana ya sea Lo (líquido ordenado) o Ld (líquido desordenado). La extracción de colesterol, sin embargo, es más favorable desde la fase Ld, con una ganancia en la energía libre de 40 kJ/mol en comparación con 10 kJ/mol desde el dominio Lo. La extracción de colesterol de los dominios Ld causará por tanto una redistribución de colesterol en la membrana, y la interrupción de la coexistencia de fases, permitiendo con ello el ingreso de moléculas que pueden llegar al sitio transportadas por la CD. En la figura 1.9 se muestra una ilustración del mecanismo de llegada e interacción de CD con membranas biológicas.

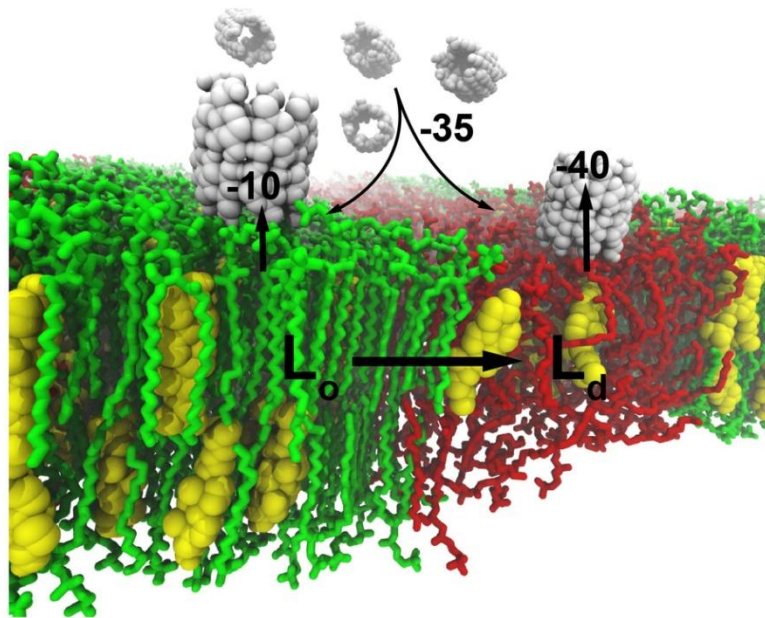


Figura 1.9: Modelo propuesto para la extracción de colesterol por CD (López, 2013).

1.7. Inclusión de fármacos en matrices de β CD

Las CD pueden albergar diferentes moléculas que tengan una región apolar y de dimensiones menores al área de su cavidad interna. La β CD forma CI preferentemente con moléculas que posean anillos aromáticos en su estructura o heterociclos de dimensiones similares. La estabilidad de formación del complejo no solo está dada por la naturaleza energética de la interacción matriz-huésped, sino también por las interacciones entre matrices vecinas. Existen tres disposiciones posibles para las CD llamadas cabeza-cabeza, cola-cola y cabeza-cola (ver figura 1.10). La orientación cabeza-cabeza es la más estable, ya que presenta valores absolutos con signo negativo de energía libre de Gibbs según cálculos teóricos realizados para diversos CI formados por dímeros de CD (Nagaraju, 2009; Dang, 2011).

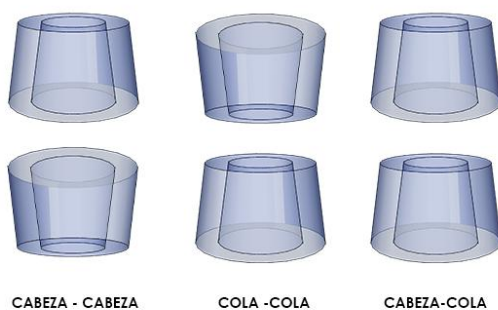


Figura 1.10: Representación de las tres orientaciones posibles para dímeros de CD en denominadas; cabeza-cabeza, cola-cola y cabeza-cola, respectivamente.

Wei Chen y colaboradores en el año 2004, realizaron estudios teóricos para calcular las interacciones de α CD, β CD y γ CD con cinco moléculas huéspedes: benceno, resorcinol, y los fármacos antiinflamatorios flurbiprofeno, naproxeno, y nabumetona. Los cálculos de rendimiento se encuentran en excelente acuerdo con datos experimentales, proporcionando una visión detallada en los cambios de entropía configuracional y de diversos componentes de energía tras la formación de los CI. Además, estos resultados entregan una idea de la química-física de reconocimiento molecular. La unión cavidad-sustrato de moléculas de benceno y las tres formas de CD es impulsada principalmente por las interacciones atractivas de van der Waals, que cambian entre -10 a -13 kcal/mol tras la inclusión, encajando perfectamente en α CD, y luego más libremente en β y γ CD, con ello, el proceso de ensamblaje molecular es más favorable según la siguiente secuencia: α CD > β CD > γ CD, mientras que la tendencia de la entropía configuracional se invierte; lo cual refleja no sólo la movilidad de benceno, sino también la flexibilidad propia de las CD.

La existencia de mayores restricciones para la especie benceno en α CD, implica que no hay variaciones significativas en su conicidad, como ocurre para las otras dos matrices. La inclusión completa y favorable de un benceno en α CD, se vuelve parcial y de poca atracción si ingresamos nuevas moléculas, que contengan nuevos grupos en su estructura, además de anillos aromáticos; volviéndose un proceso más complejo, como es el caso de resorcinol, flurbiprofeno, nabumetona y naproxeno. Los resultados indican que las cuatro estructuras ingresan en β CD y γ CD, siendo de interacciones más débiles para la última matriz. Para estos cuatro huéspedes que poseen grupos apolares, se definen nuevas interacciones coulombicas, donde los grupos presentes en la superficie exterior de la cavidad de cada CD, se doblan al interior para facilitar la interacción con la parte hidrofílica de los fármacos, obteniéndose como resultado que los anillos no entran completamente en α CD, mientras que en β CD están profundamente insertados, siendo una inclusión similar en γ CD, aunque esta última, otorga mayor libertad del huésped dentro de la cavidad. Sumamos a estas condiciones la desolvatación del fármaco para poder ingresar en la matriz, siendo un factor importante, además de la entropía configuracional, la entropía de solvatación tanto del huésped como del disolvente.

En la elección de fármacos que pueden ser albergados en β CD, se debe considerar la presencia de una región apolar y la existencia de grupos funcionales en su estructura, además de las dimensiones tanto de la cavidad de la CD como de la molécula huésped. Estudios teóricos y experimentales (Chen, 2004; Melo, 2008) predicen que los grupos funcionales pueden permanecer expuestos en las aberturas de las CD. La tabla 1 muestra las características estructurales y algunas propiedades de las tres especies de CD y sus principales derivados.

Tabla 1.1. Características estructurales y propiedades químicas de CD nativas y sustituidas (Crestani, 2011).

Tipo de CD	Unidades de glucosa	Peso molecular (g/mol)	Dimensión de la cavidad (Å)	Punto de fusión (°C)	Solubilidad acuosa a 25 °C (g/100 mL)
αCD	6	973	5	275	15
Dimetil-αCD	6	1141	5	260-264	-
βCD	7	1153	6	280	1,85
Dimetil- βCD	7	1331	6	295-300	57
Trimetil- βCD	7	1430	4-7	157	31
γCD	8	1297	8	275	23

Debido a las dimensiones de borde de la cavidad de βCD (diámetro de ~6 Å para el borde angosto y ~6,5 Å para el borde ancho), los grupos hidroxilos primarios y secundarios de los residuos de glucosa, que la hacen soluble en agua, y otras características desplegadas del análisis anterior, se puede definir a la βCD como la matriz más adecuada para la inclusión de fármacos que poseen anillos aromáticos en su estructura o heterociclos que además contienen grupos funcionales.

1.8. Convergencia entre NPsM y ciclodextrinas

En literatura, es posible encontrar estudios acerca de NPsM en conjunto a diferentes tipos de CD. Se ha reportado la preparación de NPsAu mediante el uso de β CD como agentes estabilizantes, permitiendo una mejora en el tamaño y dispersión de estos sistemas, en comparación al método de Turkevich clásico (Liu, 2003, Huang, 2004); incluso por métodos físicos (Kabasin, 2003; Sylvestre, 2004). Por otra parte, numerosos sistemas nanométricos han sido diseñados con NPs cubiertas por CD modificadas para posibles aplicaciones biológicas (Giménez, 2005; Li, 2008; Tang, 2008; Park, 2009; Adeli, 2011; Shi, 2013). Interesantemente, se demostró que el uso de CD puede potenciar las propiedades antibacterianas intrínsecas de NPsAg, ya que las CD permiten una mayor penetración de las partículas a través de la membrana celular (Jaiswal, 2010). En los últimos años se han reportado una serie de CI formados por CD que albergan huéspedes que poseen grupos funcionales SH, NH₂ o COOH y que son utilizados como sustrato para la formación y estabilización de NPsAu y NPsAg por el método de PC (Barrientos, 2007; 2009; 2012; Herrera, 2013; Sierpe; 2015).

Existen diversos fármacos que presentan desventajas terapéuticas y que son candidatos a ser incluidos en matrices de β CD y transportados a través de sistemas nanoparticulados. Las motivaciones de generar estos nuevos sistemas ternarios β CD-Fármaco-NPsM son principalmente dos: en primer lugar aumentar la solubilidad del fármaco, disminuir su toxicidad por inespecificidad, aumentar su concentración local, evitar su reactividad temprana, entre otras, y segundo, liberar el fármaco en su sitio de acción, promoviendo una entrega sostenida en el tiempo.

1.9. Fármacos 6-Tioguanina y 6-Mercaptopurina

El fármaco 6-tioguanina (TG) es un análogo de la guanina y de la adenina, se utiliza clínicamente para tratar la leucemia linfoblástica infantil aguda (LLA) y otras formas de leucemia, además, es usado como inmunosupresor en cirugía de trasplante, y más recientemente se ha demostrado que dificulta la replicación del VIH. TG fue descubierto en 1951 por Gertrude B. Elion, junto con el fármaco 6-mercaptopurina (MP) y ante la evidencia de que podría producir una remisión completa en los niños con LLA, el medicamento fue aprobado por la FDA apenas dos años después de su primera síntesis (Elion, 1989). A pesar de su demostrada eficacia como agente antineoplásico, TG tiene algunas desventajas terapéuticas. Después de su administración oral presenta una pobre absorción, alcanzando concentraciones plasmáticas luego de 10 a 12 horas, por otra parte, los alimentos reducen considerablemente su biodisponibilidad. El fármaco se distribuye por todo el organismo, concentrándose preferentemente en médula ósea. La TG no atraviesa la barrera hematoencefálica y es ampliamente metabolizada en el hígado, siendo luego excretada a través de la orina. Se han realizado diversos esfuerzos en investigación para generar modificaciones a su estructura y sintetizar nuevos análogos nucleosídicos con el fin de promover un efecto más selectivo y aumentar la solubilidad acuosa de este fármaco (Erb, 1998; Bohon, 2003).

Tal como TG, MP es un fármaco que fue aprobado rápidamente por la FDA, luego de su síntesis en 1951, siendo aplicado para el tratamiento de la LLA. Aunque ambos tienen la misma aplicación quimioterapéutica, este fármaco no posee el grupo funcional NH_2 en el carbono 2; debido a esta modificación química presenta un ordenamiento cristalino diferente, lo cual implica diferencias en algunas de sus propiedades como una mayor solubilidad (Latosinska, 2009).

1.10. Fármaco Melfalán

Melfalán (MF) es un compuesto antineoplásico eficaz en el tratamiento del mieloma múltiple, cáncer de ovario, amiloidosis y melanoma maligno (Anonymous, 1997), su nombre IUPAC es ácido (2S)-2-amino-3-[4-[bis(2-cloroetil)amino] fenil] propanoico. Se comercializa en la actualidad como un producto liofilizado junto con un segundo vial que contiene un codisolvente para su dilución. Un inconveniente importante en la terapia con MF surge de su baja solubilidad acuosa y la inestabilidad en la reconstitución y dilución. El sistema de dos viales para comercializarlo es otro inconveniente y el uso de los codisolventes contribuye potencialmente a los efectos secundarios de la terapia (Medlicott, 1998; Ma, 1999).

Luego de que MF fue aprobado por la FDA las investigaciones se centraron en dos áreas importantes, estudiar su mecanismo de acción en múltiples tipos de cáncer y mejorar su estabilidad, para esto último, actualmente MF se comercializa en un vial aislado, cuya mezcla para ser aplicado se debe realizar solo unos minutos antes ya que consta con una breve vida media. La reacción que procede en solución se muestra en la figura 1.11 y corresponden a las etapas I, II y III del mecanismo por hidrólisis propuesto por Chang en 1976.

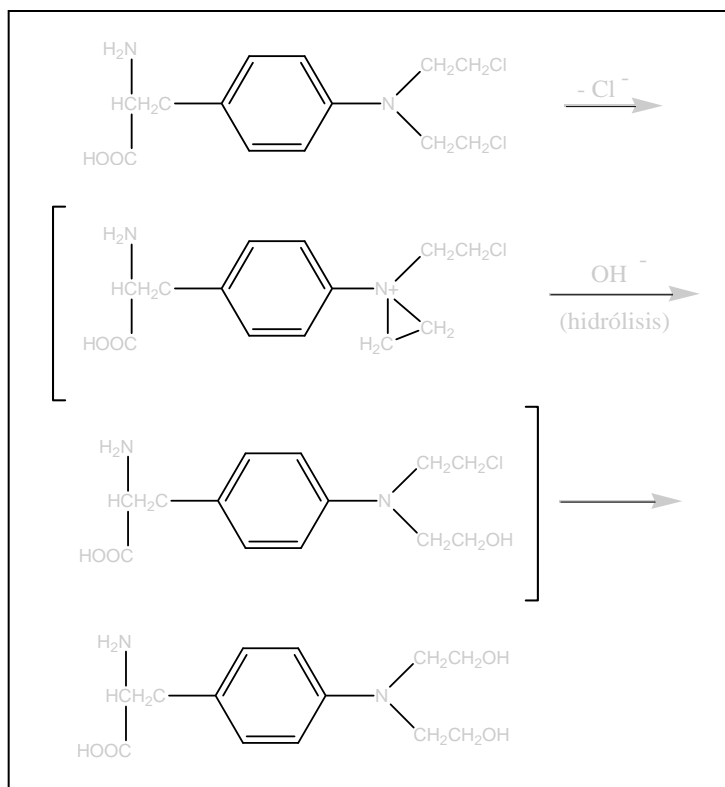


Figura 1.11: Mecanismo de reacción propuesto por Chang en 1976 sobre la desestabilización de MF en solución acuosa.

1.11. Fármaco 2-amino-4-(4-clorofenil)tiazol

Diversos estudios han demostrado que grupos tiazoles y derivados de estos mismos tienen diversas propiedades biológicas en función de la sustitución en distintas posiciones del anillo aromático, dichas funciones son del tipo antifungicida, antibacterianas, antiinflamatoria (Holla, 2003), además también son utilizados para el tratamiento de la hipertensión e infecciones por VIH (Das, 2006). Recientemente se ha evaluado el uso de estos derivados en cáncer. El fármaco 2-amino-4-(4-clorofenil)tiazol (AT), es uno de estos derivados utilizado actualmente como antimicrobiano (Venkatachalam, 2001; Holla, 2003; Das, 2006).

1.12. Fármaco Feniletilamina

Feniletilamina es un estimulante psicoactivo que produce efectos tales como aumentar el estado de vigilia, excitación y taquicardia, empleándose como antidepresivo. Esta neuroamina endógena posee efectos similares a las anfetaminas, pero sin inducir tolerancia. A pesar de sus propiedades favorables, se metaboliza rápidamente en el organismo a través de la enzima MAO-B, con una vida media biológica que va desde los 30 s a los 10 minutos como máximo, sin alcanzar concentraciones significativas en el cerebro. Por otra parte, FEA presenta una baja solubilidad acuosa y puede formar una sal tras reaccionar con el CO₂ del medio (Suzuki, 1981; Sabelli, 1995; 1996; Szabo, 2001).

1.13. Hipótesis

Se propone la formación de sistemas ternarios β CD-Fármaco-NPsM, con los fármacos presentados anteriormente. En base a lo expuesto anteriormente podemos formular la siguiente hipótesis:

"La β CD puede albergar a las moléculas TG, MP, MF, AT y FEA, formando CI con los grupos funcionales de estos huéspedes expuestos hacia una de las aberturas de la matriz para la estabilización de NPsAu y NPsAg depositadas por el método de PC".

"La presencia de las NPsAu en el sistema ternario β CD-FEA-NPsAu permite la liberación del fármaco en solución acuosa por irradiación láser".

1.13. Objetivos generales

1. Estudiar el proceso de inclusión de fármacos en β CD y analizar la interacción de estos CI con nanopartículas metálicas de Au y Ag.
2. Evaluar la permeabilidad y liberación de uno de los fármacos desde el sistema ternario β CD-Fármaco-NPsM.

1.14. Objetivos Específicos

1. Sintetizar y caracterizar los complejos β CD-TG, β CD-MP, β CD-MF y β CD-AT, por difracción de rayos X de polvo y RMN de 1 y 2 dimensiones.
2. Calcular las constantes de asociación de todos los complejos a través del método de solubilidad de fases.
3. Describir las interacciones y la estabilidad de los complejos con NPs de Au y Ag a través de las técnicas de UV-visible en sólido, TEM, SEM y EDX.
4. Realizar ensayos PAMPA a los CI con y sin NPsM.
5. Cuantificar la carga y evaluar la liberación de FEA desde el sistema β CD-FEA-NPsAu a través de irradiación láser.

CAPÍTULO 2

Materiales y métodos

2.1. Reactivos y solventes

En la preparación de los CI, se utilizaron los siguientes reactivos de grado analítico: β CD hidratada (98%), TG (>98%), MP (>98%), MF (>98%), AT (>98%), y FEA (99,5%), los cuales fueron proporcionados por la empresa Sigma-Aldrich. Como solventes se emplearon etanol y agua para cromatografía LiChrosolv®, todos de grado analítico, marca Merck y agua de grado mili-Q.

Para la obtención de NPs de Au y de Ag mediante el método de PC en alto vacío se utilizaron láminas metálicas de Au y Ag de alta pureza (99,9%) como precursor.

Para la caracterización de las muestras por RMN se utilizaron ampollas de 0,75 mL de DMSO- d_6 (99,8%), para la cuantificación de Au por absorción atómica se usó una solución ácida de HCl (38%) y HNO₃ (65%), para los ensayos de irradiación láser se utilizó cloroformo (p.a.), los cuales fueron provistos por la compañía Merck. Para obtener los espectros por UV-Vis en sólido se utilizó una línea base de sulfato de bario (>99%), y para espectroscopia IR, se hicieron pastillas de bromuro de potasio (>99%), para la caracterización por TEM se utilizó isopropanol (>99,7%), para los ensayos PAMPA se utilizó fosfatidilcolina (>99%), dodecano (líquido, >99%), tiopental (>98%), azul de Evans (>75%) y pastillas de PBS, todos provistos por la compañía Sigma-Aldrich.

2.2. Metodología

2.2.1. Síntesis de los complejos

La síntesis de todos los complejos se realizó en relaciones molares 1:1 matriz-huésped.

Para formar el complejo β CD-TG, se disolvieron 50 mg de TG (167,2 g/mol) en etanol, con agitación constante a 30 °C durante 24 horas, agregando pequeñas alícuotas del alcohol para no perder volúmenes significativos en la disolución, lográndose una solución saturada. Además, se disolvieron 0,3394 g de β CD en agua con agitación constante durante 6 horas, a temperatura ambiente. Ambas disoluciones se enfriaron hasta 10°C aproximadamente y se mezclaron con agitación suave y constante durante 6 horas más, dejando que la temperatura ascienda lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente. La mezcla se cubrió con papel aluminio y se guardó inmóvil bajo campana durante 2 a 4 semanas; poco a poco el solvente se evaporó, formándose pequeños cristales que precipitaron en el fondo de la solución, los cuales fueron retirados antes de la evaporación completa de los solventes.

Para formar el complejo β CD-MP, se disolvieron 50 mg de MP (152,2 g/mol) en etanol a 30 °C durante 24 horas, agregando pequeñas alícuotas hasta alcanzar una solución saturada. Además, se preparó una solución de 0,3337g de β CD en agua a temperatura ambiente. El procedimiento que continuó es análogo a la síntesis del complejo con TG, obteniéndose después de 2 semanas los complejos en estado sólido.

Para la síntesis de β CD-MF, se utilizaron 0,2025 g de MF (305,2 g/mol) disueltos en etanol a 30 °C, agregando poco a poco el solvente, con agitación suave durante 2 horas. Por otra parte, se disolvieron 0,7525 g de β CD en agua. El procedimiento de mezcla de ambas disoluciones y la obtención de cristales es análogo a los anteriormente mencionados para TG y MP albergados en β CD.

Para la síntesis de β CD-AT, se disolvieron 0,1140 g de AT (210,7 g/mol) en etanol y por otra parte, 0,6000 g de β CD en agua, ambos con agitación constante y a temperatura ambiente durante una hora. Una vez solubilizados ambos compuestos, las soluciones fueron mezcladas con agitación suave y se dejaron en reposo por 10 días hasta la formación de cristales que fueron separados de los restos de solvente.

Para formar el complejo β CD-FEA, se preparó una solución saturada de 0,5000 g de β CD en agua con agitación constante a temperatura ambiente, luego se agregaron directamente 55,5 μ L de FEA ($\rho = 0,964$ g/mL). La mezcla permaneció bajo agitación durante dos horas a temperatura ambiente. La solución fue guardada bajo campana, inmóvil hasta la formación de los cristales, los cuales precipitaron al cabo de 48 horas.

2.2.2. Tratamiento de los cristales

Una vez formados los cristales, estos fueron lavados con una mezcla al 50% v/v de agua y etanol a 4 °C y filtrados al vacío en un kitasato con embudo Büchner, con una doble capa de papel filtro, para eliminar los excesos de matriz, huésped o solventes que humedecen los compuestos. Finalmente los cristales fueron secados en una línea de vacío para remover el agua o etanol que pueden permanecer ocluidos en el sólido y luego guardados en frascos ámbar con sello de teflón.

2.2.3. Depósito de NPsAu y NPsAg

Las NPsM fueron obtenidas a través del método físico de PC en alto vacío, en un equipo Magnetron Sputter Coater PELCO SC-6 de corriente directa con una descarga de 220 V, según parámetros ya publicados (Sierpe y col. 2015). Se pesaron aproximadamente 20 mg de cada CI, los cuales fueron pulverizados en un mortero de ágata y luego colocados como una fina capa de polvo cristalino en un portamuestras de vidrio para microscopía óptica dentro del equipo de PC. Una lámina de Au o Ag (según corresponda) fue usada como cátodo y el polvo cristalino de cada CI se usó como un sustrato en una cámara de vacío a 0,5 mbar de presión y ambiente inerte de argón; una corriente de 25 mA fue utilizada para ionizar el gas. Una vez iniciado el proceso de pulverización, los átomos de Ar ionizados golpean la lámina metálica liberando átomos o pequeños clústeres de oro los cuales migran y se estabilizan sobre la superficie de los microcristales del CI. Las NPsAu se forman aparentemente con un crecimiento epitaxial. La exposición de las muestras a la técnica se realizó durante tiempos entre 5 y 100 s.

Un esquema que resume el proceso de inclusión del fármaco en matrices de β CD y el depósito de NPsM sobre los cristales se presenta en la figura 2.1.

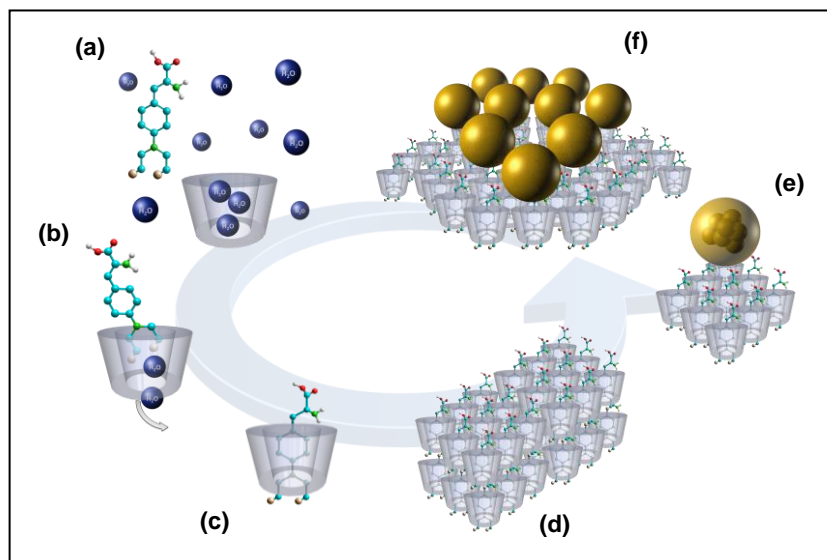


Figura 2.1: Esquema general del proceso de inclusión de fármacos en β CD (a, b y c), la formación de cristales (d), y la obtención y estabilización de NPsm por PC (e y f).

2.3. Equipos para la caracterización de las muestras

Se realizó el análisis de muestras cristalinas para los sistemas β CD, TG, β CD-TG, MP, β CD-MP, MF, β CD-MF, AT, β CD-AT, β CD-AT-NPsAu, β CD-FEA y β CD-FEA-NPsAu por difracción de rayos X de polvo (DRXP) en un rango de $2^\circ < 2\theta < 80^\circ$, utilizando un difractómetro Siemens D-5000 con una radiación Cu-K α (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.

La caracterización mediante Resonancia Magnética Nuclear de protones (^1H y ROESY) en solución de: βCD , TG, $\beta\text{CD-TG}$, MP, $\beta\text{CD-MP}$, MF, $\beta\text{CD-MF}$, AT, $\beta\text{CD-AT}$, FEA, $\beta\text{CD-FEA}$ y $\beta\text{CD-FEA-NPsAu}$; 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. El tratamiento de los espectros se realizó con el programa MestRec. Las mediciones ROESY de todos los CI se realizó usando el método de gradientes seleccionado de campo pulsado. Por otra parte, la estequiometría de cada CI fue calculada mediante la integración de las señales de los espectros $^1\text{H-RMN}$ usando el programa MestRec.

La estequiometría del complejo $\beta\text{CD-FEA}$ fue determinada además por el método de variaciones continuas usando un espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer modelo Lambda 25.

Para el cálculo de las constantes de estabilidad de los complejos $\beta\text{CD-TG}$, $\beta\text{CD-MP}$, $\beta\text{CD-MF}$, $\beta\text{CD-AT}$ y $\beta\text{CD-FEA}$, los espectros de absorbancia de los diferentes fármacos en solución acuosa con y sin CD fueron obtenidos mediante espectrofotometría UV-Vis utilizando un equipo Perkin Elmer modelo Lambda 25. Estas mediciones fueron realizadas en cubetas de cuarzo de 1 cm de diámetro en un rango entre 200 y 800 nm empleándose agua como blanco.

El espectro de absorción de NPsAu y NPsAg depositadas sobre los diferentes CI se realizó mediante espectrofotometría UV-Vis en estado sólido en un rango de 200 a 800 nm, empleando una referencia de sulfato de bario en un equipo Shimadzu UV-2450 con una esfera de integración ISR-2200 asociada y controlado por el software UVProbe Versión 1.10. Primero se midió la reflectancia difusa de las muestras y luego, a través de la transformación matemática Kubelka-Munk, se obtuvieron sus absorbancias.

Las NPsAu y NPsAg obtenidas fueron caracterizadas por TEM, usando un equipo JEOL JEM 1200 EX con filamento de Tungsteno, operado a bajas presiones (1×10^{-5} Pa), con un voltaje de aceleración de 80 kV. Las muestras fueron preparadas dispersando aproximadamente 1 mg de muestra en 0,5 mL de una solución de isopropanol 30%. Luego se depositó una gota de 10 μ L sobre una rejilla de cobre con una película de Formvar continua. Posteriormente se retiró el exceso de muestra sobre las rejillas, las cuales pudieron ser observadas directamente una vez que se secaron.

Imágenes de los cristales se obtuvieron en primera instancia a través de un microscopio digital de luz polarizada Twist, de magnitud X10~X200. Imágenes de los cristales mediante SEM fueron obtenidas usando en un equipo LEO 1420VP con un instrumento de análisis de energía dispersiva acoplado, modelo Oxford 7424 a un voltaje de aceleración de 25 kV. Para imágenes de FE-SEM se utilizó un equipo modelo Zeiss Leo Supra 35-VP con voltajes de aceleración de 15kV y 2kV. Únicamente para muestras de β CD-FEA-NPsAu se utilizó un equipo JOEL JIB4500 con un voltaje de aceleración de 15 kV. Las muestras fueron preparadas depositando NPsAu o NPsAg usando el método de PC por tiempos entre 20 y 100 s.

Espectros IR de los sistemas β CD-FEA y β CD-FEA-NPsAu fueron registrados usando un equipo Perkin Elmer 2000 con pastillas de KBr, los espectros de β CD y FEA puras se registraron usando un equipo Interspec 200-x FTIR. Espectros Raman de β CD, β CD-FEA y β CD-FEA-NPsAu se midieron directamente en estado sólido y FEA en estado líquido, usando un equipo Renishaw Ramanscope 1000, excitado con un láser He-Ne de 632,8 nm. Además, para la medición del sistema β CD-FEA-NPsAu el poder del láser fue reducido a un 25% del usado en las otras muestras.

Para interpretar los resultados de los espectros IR y Raman, se realizó un cálculo teórico de la molécula FEA con un Gaussian 09, revisión D.01 (Frisch, 2009) usando la teoría funcional de densidad al nivel de teoría B3LYP/6-311+G(d,p), en el estado gaseoso, además de una optimización de la geometría y cálculos de frecuencia, incluyendo actividad Raman que fueron requeridos.

La concentración de Au en el sistema ternario en estado sólido se obtuvo por espectroscopia de absorción atómica usando un PinAAcle 900F equipado con una lámpara doble de cátodo hueco (Au y Ag) y llama laminar. Para obtener la capacidad de carga del fármaco, las concentraciones de FEA en el sistema ternario en solución se calcularon por absorbancia en el UV-Vis usando un equipo Perkin Elmer modelo Lambda 25.

Para los ensayos de irradiación se utilizó un láser continuo Power Technology Inc. a 532 nm, con un diámetro de haz de 1 mm y 45 mW de potencia. Las concentraciones de FEA libre en los diferentes ensayos fueron determinadas por absorbancia en el UV-Vis, con cubetas rectangulares de cuarzo de 1 cm de diámetro, usando un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo Lambda 25, el cual también fue utilizado para medir las absorbancias en todos los ensayos PAMPA realizados.

2.4. Protocolos para el análisis de las muestras

2.4.1. Determinación de la estequiometría de β CD-FEA por variaciones continuas

Para realizar el cálculo a través del método de variaciones continuas se usó una solución de β CD (23 mg/100 mL) y otra solución de FEA (3 μ L/100 mL) con concentraciones equimolares (0,20 mM).

Se prepararon ensayos de diferentes volúmenes de cada una de estas soluciones de manera tal que la concentración final de la mezcla (β CD + FEA) permanezca constante. La fracción molar de FEA ($\chi(\text{FEA})$) en cada mezcla varió de 0,125 a 1,0.

2.4.2 Obtención de las constantes de asociación

Los diferentes ensayos fueron preparados agregando aproximadamente 5,0 mg de cada fármaco en frascos ámbar con sello de teflón. Para el fármaco FEA, se agregaron volúmenes de 1,0 mL en cada frasco. Luego se agregaron diferentes volúmenes de una solución acuosa de β CD, llenando con agua hasta completar 1,0 mL, los valores exactos de cada volumen y concentración usada se detallan para cada sistema según corresponda. Las muestras fueron almacenadas a 25 °C con una agitación de 300 rpm durante 24 horas. Posterior a esto, las soluciones obtenidas fueron filtradas, para eliminar el exceso de sólido que quedó sin disolver, la solución de FEA con β CD fue separada cuidadosamente con jeringa de la fase del fármaco sin disolver. Todas las soluciones fueron medidas por espectroscopia UV-Vis. Los datos obtenidos se aplican a la ecuación 2.1. para calcular las constantes de cada sistema, donde $[H_0]$ corresponde a la concentración del huésped en ausencia de CD, obtenida desde la recta graficada.

$$K_{a(1:1)} = \frac{\text{Pendiente}}{[H_0](1 - \text{Pendiente})} \quad \text{Ecuación 2.1.}$$

2.4.3. Cuantificación de Au en el sistema ternario

Se cuantificó la concentración de Au en el sistema β CD-FEA con NPsAu depositadas por PC durante 20 s, mediante espectroscopia de absorción atómica. Las muestras fueron tratadas con una digestión ácida de HCl (1N) y HNO₃ (1N), disolviendo 2,0 mg del complejo en 2,0 mL de la solución ácida, y se mantuvieron durante 24 horas a 60°C en viales sellados antes de ser medidas.

2.4.4. Determinación de la capacidad de carga de FEA en el sistema

Se prepararon 3 muestras que contienen 6,0 mg del sistema β CD-FEA con NPsAu depositadas por PC durante 20 s, y se disolvieron en 600 μ L de agua (10 mg/mL), luego fueron centrifugadas a 15700 xg durante 30 minutos. El *pellet* obtenido fue separado y la solución que corresponde al sobrenadante se utilizó para medir la absorbancia de FEA por UV-Vis. Las concentraciones de FEA se calcularon usando los máximos de absorción a 258 nm y el ϵ de FEA aplicando la ecuación de Lambert-Beer.

2.4.5. Ensayos de permeabilidad por PAMPA

Se utilizaron placas de doble fondo (*transwell*) con dos tipos de pocillo, uno inferior llamado donador y otro superior llamado aceptor, este último posee además una membrana semipermeable de PVDF (fluoruro de polivinilideno). Se preparó una disolución del fosfatidilcolina en dodecano (20 mg/ml) y se depositaron 4 μ L sobre las membranas de PVDF en la placa aceptor dejándose inmóvil durante 5 minutos aproximadamente hasta la evaporación completa del dodecano, posteriormente se agregaron 300 μ L de PBS (pH = 7,4). En los pocillos donadores se depositaron 300 μ L de las muestras disueltas en PBS, preparadas a una concentración de 200 μ g/mL.

Adicionalmente, se preparó una solución de tiopental (10 mg/100 mL de PBS 10 mM) y otra solución de azul de Evans (200 mg/100 mL de PBS 10mM) usadas como control positivo y negativo, respectivamente. Luego de cargar las placas donadoras con las muestras y controles; y las aceptoras con PBS, éstas se ensamblan, se tapan y se cierran usando parafilm. Cada ensayo PAMPA se realizó por triplicado (n=3) durante tiempos de 24 horas a una temperatura de 37 °C con agitación constante a 280 rpm. Las mediciones en el espectrofotómetro UV-Vis fueron hechas tomando 200 uL de cada placa (donadora y aceptora) y diluidas con PBS hasta un volumen de 1,0 mL.

2.4.6. Ensayos de irradiación láser de β CD-FEA-NPsAu

Se preparó una solución *stock* del complejo β CD-FEA-NPsAu en agua (concentración de 4,0 mg/ml) para realizar todos los ensayos de irradiación láser. En una cubeta de cuarzo, de 700 μ L de llenado, se agregaron 300 μ L de cloroformo y sobre este, 150 μ L de la solución *stock* del complejo formado. Luego de excitar la fase acuosa con el láser por diferentes tiempos, la absorbancia UV-Vis de FEA en cloroformo se midió directamente desde la cubeta sin separar las fases. Como control, se utilizó una solución acuosa de β CD-FEA (4,0 mg/ml) disuelta en cloroformo. Los valores máximos de absorbancia obtenidos desde los espectros de FEA se convirtieron en concentraciones de FEA usando la ley de Lambert- Beer ($\epsilon = 7,23 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 258 nm) y a porcentajes, comparándolos con la concentración máxima de FEA cargada en la cubeta (ver anexos, capítulo 8). La concentración máxima de FEA se obtuvo disolviendo directamente una cantidad equivalente del fármaco que está presente en la solución *stock* de β CD-FEA-NPsAu en la fase orgánica, es decir 0,41 uL de FEA en 1 mL de cloroformo. Cada ensayo fue realizado por triplicado (n=3).

CAPÍTULO 3

Resultados y discusión

Formación de los complejos de inclusión de β ciclodextrina con fármacos

Para la síntesis de los diferentes CI en estado sólido, se utilizó el método de disoluciones saturadas (Coleman, 1992). La β CD fue disuelta en agua a temperatura ambiente, mientras que los diferentes huéspedes fueron disueltos en etanol. La pausada evaporación de los solventes generó cristales que alcanzaron un mayor tamaño con respecto a los precipitados comúnmente obtenidos tras la mezcla directa de las especies a temperatura ambiente. La β CD tiene una solubilidad aproximada de 18,5 mg/mL a 25 °C; la cual es inferior a la solubilidad de α CD y γ CD (Crestani, 2011), sin embargo la adición de un mayor volumen de agua en la mezcla también promueve una cristalización más lenta. Para la solubilización de los fármacos se debe considerar que las interacciones de los solventes con cada especie sean energéticamente menores a las interacciones del tipo van der Waals o hidrofóbicas entre el interior de la matriz y el huésped. Todos los fármacos en estado sólido fueron disueltos en etanol, el cual no es lo suficientemente afín con cada huésped para que su solvatación impida la inclusión en β CD; además posee una mayor presión de vapor y volatilidad que el agua.

Los complejos β CD-TG, β CD-MP, β CD-MF, β CD-AT y β CD-FEA obtenidos, fueron caracterizados en estado sólido por DRXP y posteriormente fueron disueltos y caracterizados mediante ^1H -RMN y ROESY.

3.1. Estudio de los CI mediante DRXP

Para el análisis de DRXP, un proceso riguroso implica registrar los patrones difractométricos de la matriz, el huésped (si es sólido), una mezcla física de ambos y del CI supuestamente formado. Cuando la traza difractométrica de un cristal difiere de los otros, debido a la desaparición de los picos característicos de los componentes y la aparición de nuevos picos, la formación del CI se considera muy probable (Caira, 2001; Dang 2011). Esto se deduce del hecho de que la disposición de empaquetamiento cristalino del CI es en general diferente a la de los compuestos iniciales, por lo tanto representa una fase cristalina distinta. La figura 3.1 muestra los patrones de difracción de β CD (a), TG (b), el complejo β CD-TG (c) y la mezcla física entre ambos (d).

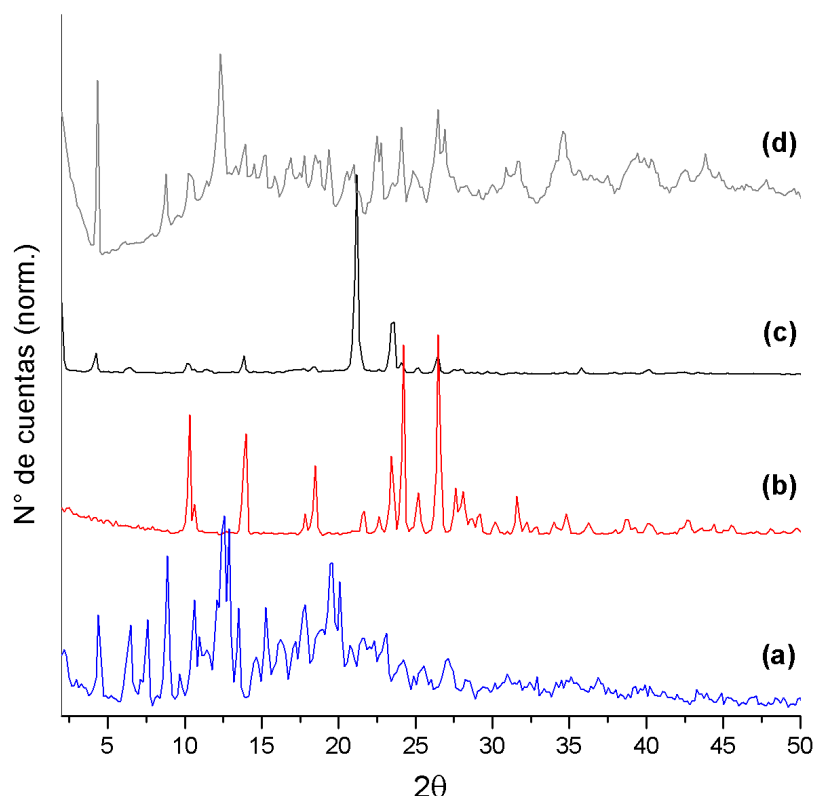


Figura 3.1: Diffractogramas de polvo cristalino de: (a) β CD, (b) TG, (c) complejo β CD-TG, y (d) mezcla física entre β CD y TG.

Al comparar la huella de los difractogramas de β CD y TG pura (trazas a y b) con respecto a la huella del CI (traza c), se observó la desaparición de la mayoría de los picos y se obtuvo una traza completamente distinta, con la aparición de cinco picos característicos, incluyendo un pico intenso a 21° aproximadamente para 2θ .

Las CD se apilan formando cristales con diferentes disposiciones geométricas, todas dependientes del huésped, el cual está incluido de manera total o parcial dentro de su cavidad. Las tres conformaciones más estudiadas son las tipo caja, capa y canal, un esquema que enuncia su disposición, omitiendo el huésped que dirige su ordenamiento, se muestra en la figura 3.2. El pico con mayor intensidad observado para este complejo muestra un ángulo cercano a 20° para 2θ , característico de baldes de CD con un ordenamiento tipo canal (figura 3.2 c). Se ha reportado que las CD que albergan heterociclos pequeños o cadenas alifáticas pueden adquirir esta disposición (Dang, 2011).

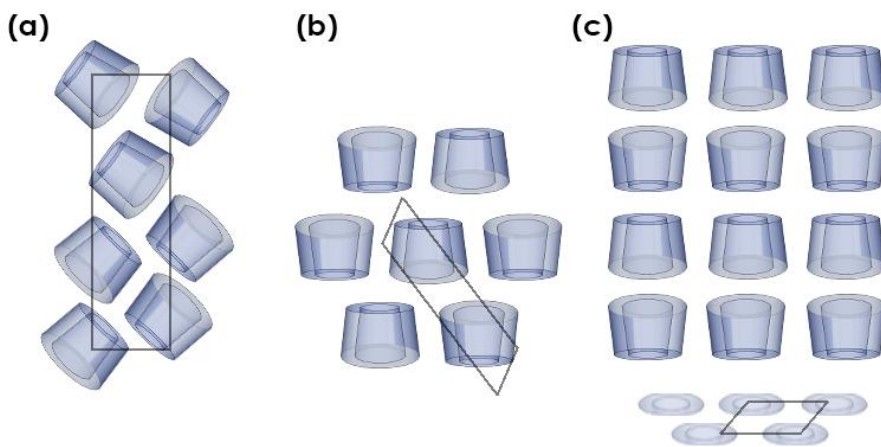


Figura 3.2: Tres conformaciones cristalinas posibles para una CD formando complejos: (a) estructura tipo caja, (b) estructura tipo capa y (c) estructura tipo canal.

A través de la observación del patrón de difracción de la mezcla física (figura 3.2 (d)) se evidenció que la traza del CI no es la simple precipitación de sus especies puras. A su vez, se observaron regiones en que los picos de las especies puras y la mezcla física claramente coinciden, y cuyas diferencias en posición e intensidad con respecto al complejo nos permite inferir la formación de β CD-TG en estado sólido.

MP presenta un empaquetamiento del tipo $P2_1/n$, mientras que TG tiene un empaquetamiento $P2_12_12$ (Latosinska, 2009), pese a su similitud molecular existen evidentes diferencias de su red cristalina. La figura 3.3 corresponde a los difractogramas de β CD (a), MP (b), β CD-MP (c) y la mezcla física entre ambos (d).

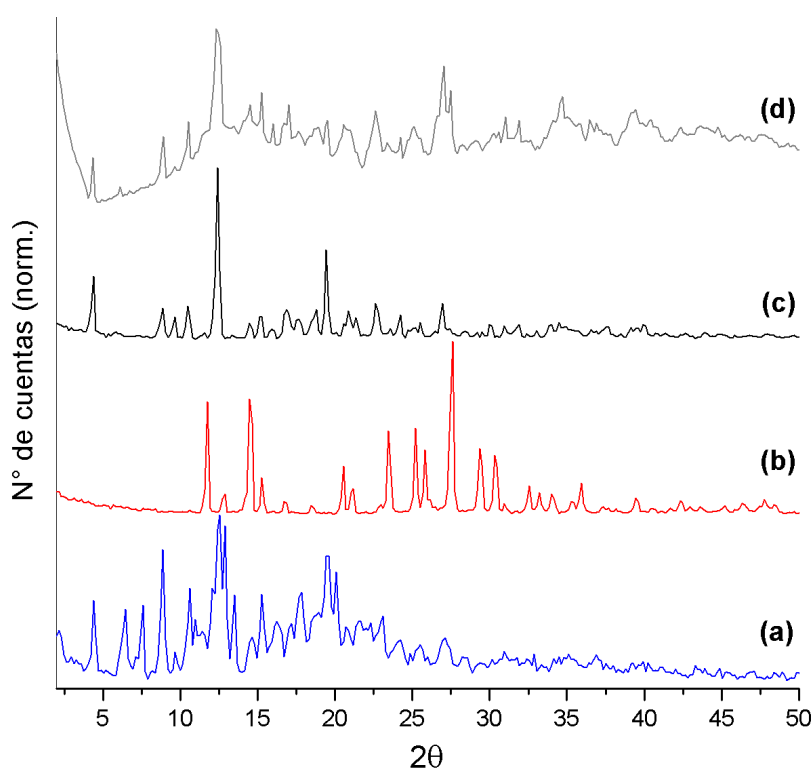


Figura 3.3: Difractogramas de polvo cristalino de: (a) β CD, (b) MP, (c), complejo β CD-MP y (d) mezcla física entre β CD y MP.

Es posible observar entre todas las trazas, diferencias en los picos, tanto en sus intensidades como en ubicación. El patrón de difracción de β CD-MP (traza c) presenta picos intensos a 4, 12 y 20° aproximadamente para 2θ . Se ha reportado la formación de complejos con una estructura tipo $P2_1$ para matrices de β CD albergando anillos en relaciones molares 1:1 matriz-huésped, en que la traza también presenta tres picos intensos en igual ubicación (Caira, 2001; Chen, 2006).

Para completar el análisis, se realizó la mezcla física de ambos componentes con un patrón de difracción que corresponde a la traza d. La formación del CI posee un patrón de difracción único, y diferente a la mezcla física. Cabe destacar la baja cristalinidad que posee dicha mezcla, debido a una pronunciada área bajo la curva, por el contrario, para el CI los picos delgados e intensos y una reducida área bajo la curva, indican el alto ordenamiento cristalino que alcanzó el complejo.

La formación del complejo β CD-MF en estado sólido se evidencia a través del análisis del patrón de difracción de rayos X, en la figura 3.4 se muestran las trazas para β CD (a), MF (b), el CI (c) y la mezcla física de las especies puras (d). La aparición de nuevos picos y la desaparición de picos en el CI comparado con los difractogramas de las especies puras revelan que el CI es una nueva estructura cristalina. En la traza c se observaron tres picos intensos a 4, 12 y 20° aproximadamente para 2θ , de acuerdo a lo discutido anteriormente, son picos característicos de matrices de β CD albergando anillos aromáticos en su cavidad, donde la disposición geométrica y por ende el patrón de difracción respectivo varía según el tipo de estructura molecular del huésped aromático, según la región parcialmente expuesta al exterior de β CD y a las moléculas de agua que contribuyen al empaquetamiento.

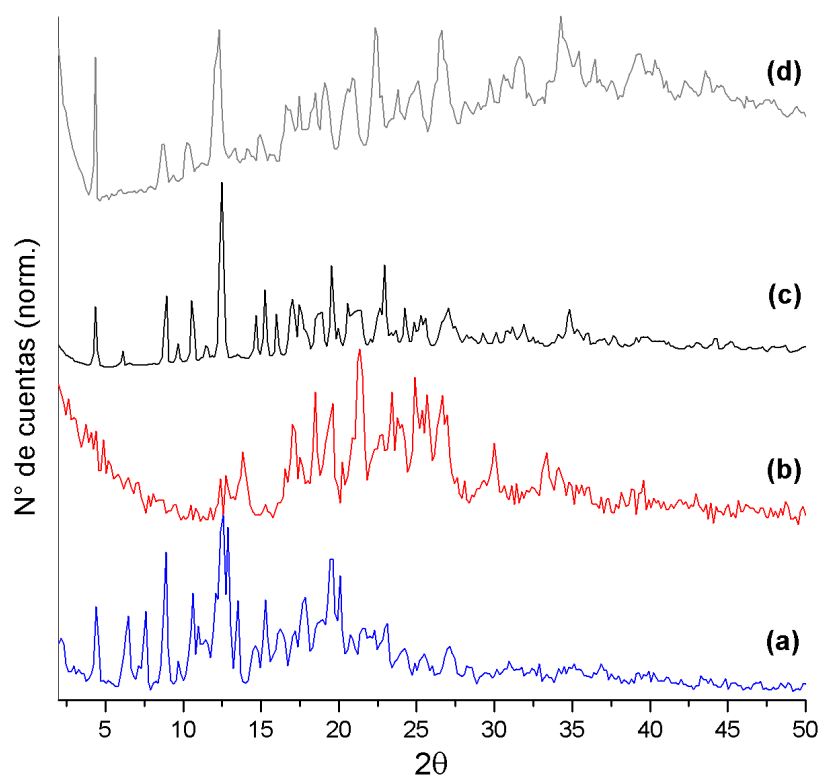


Figura 3.4: Difractogramas de polvo cristalino de: (a) β CD, (b) MF, (c) complejo β CD-MF, y (d) mezcla física entre β CD y MF.

Con respecto al complejo y la mezcla física de sus componentes puros (trazas c y d) la observación de sus difractogramas es evidentemente distinta en intensidad y posición de los picos, demostrando que la mezcla física es solo es una superposición entre las trazas de las especies puras. La formación del complejo en estado sólido provoca la desaparición de los picos de MF puro, especialmente en la región por sobre los 25° , manteniendo un pico correspondiente a β CD a un ángulo aproximado de 12° para 2θ .

La figura 3.5 muestra los difractogramas de β CD (a), AT (b), el complejo β CD-AT (c) y su mezcla física correspondiente (d), con ello fue posible observar la diferencia entre sus trazas y deducir la formación de un nuevo sistema cristalino.

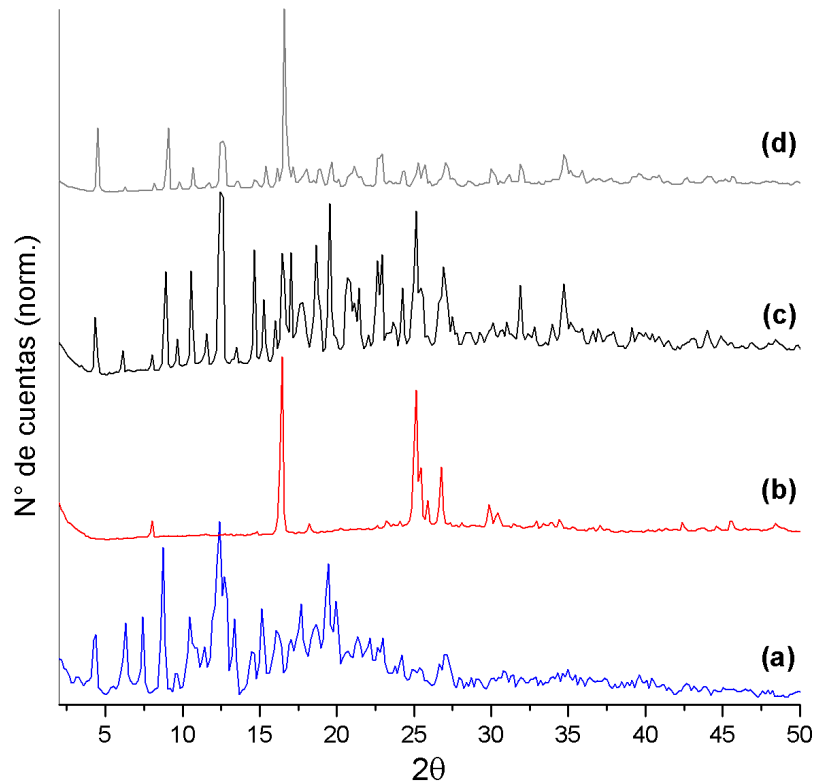


Figura 3.5: Diffractogramas de polvo cristalino de: (a) β CD, (b) AT, (c) complejo β CD-AT, y (d) mezcla física entre β CD y AT.

Debido a que el fármaco posee un ordenamiento altamente cristalino, lo cual se pudo observar en su traza difractométrica (traza b), es que la mezcla física (traza d) superpone un pico intenso correspondiente a AT, frente al patrón de difracción de la β CD. Dicho pico que está ubicado a 16° aproximadamente para 2θ , desaparece, junto con otros picos, en el patrón del complejo formado (traza c). El ordenamiento cristalino, que depende tanto del huésped como de la matriz, es también completamente diferente al de la β CD pura (traza a).

El polvo cristalino obtenido de la síntesis del complejo β CD-*FEA* fue caracterizado por DRXP, la figura 3.6 muestra el difractograma de β CD pura (a) y CI formado (b), el cambio observado en las trazas es debido al ingreso de la *FEA* al interior de la cavidad de la matriz lo cual permite la obtención de una nueva estructura cristalina. Tres picos intensos fueron observados a ángulos de 6, 12 y 18° aproximadamente para 2θ , lo cual corresponde a la inclusión del anillo aromático del fármaco. Cabe destacar que *FEA* es un líquido por tanto no se registraron los patrones difractométricos del fármaco puro ni de la mezcla física.

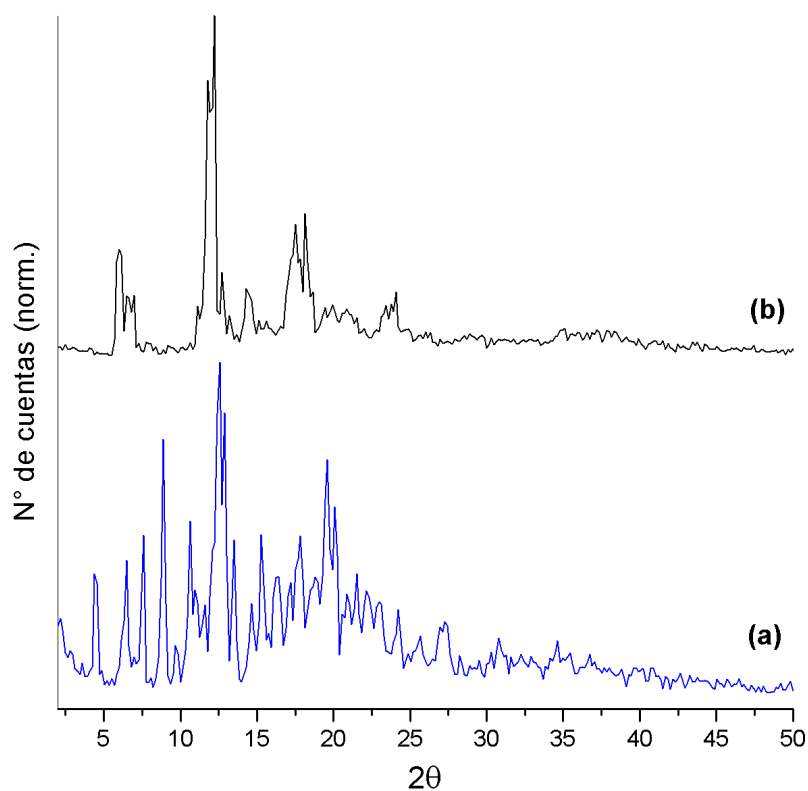


Figura 3.6: Difractogramas de polvo cristalino de: (a) β CD y (b) complejo β CD-*FAE*.

3.2. Indexación de los sistemas cristalinos

Un cristal obtenido de un CI de CD estudiado por difracción de rayos X entrega una caracterización estructural inequívoca del sistema a escala atómica, ya que muestra el máximo detalle sobre el modo de inclusión de los huéspedes en su cavidad, la naturaleza de las interacciones matriz-huésped, como por ejemplo los enlaces por puentes de hidrógeno involucrados, e incluso el rol estructural de agua. Sin embargo, en este tipo de cristales orgánicos no es común obtener estructuras cristalinas de un tamaño adecuado y sin defectos para realizar este tipo de análisis. El estudio por DRXP se utiliza a menudo para sistemas sólidos que no alcanzan un tamaño adecuado y que en general se forman rápidamente como polvos cristalinos, como es el caso de los CI discutidos en esta investigación. La información que aporta el análisis de DRXP puede ser superior a una interpretación visual generalizada de sus trazas, la indexación de las reflexiones obtenidas en cada difractograma puede mejorar la interpretación de los resultados y determinar específicamente los sistemas cristalinos que se obtienen.

El difractograma de β CD pura y sin huésped pudo ser indexado sobre la base de una red teórica monoclinica del tipo P (figura 8.1, sección anexos), los parámetros de red teóricos fueron corregidos y ajustados a parámetros de difracción experimentales, todos estos valores calculados se muestran en la tabla 3.1. Luego del refinamiento de los parámetros de red, se encontraron 13 picos intensos entre 2° y 50° para 2θ , el detalle de su asignación hkl, los ángulos, distancias e intensidades relativas se detallan en la tabla 8.1 de la sección de anexos (capítulo 8).

Tabla 3.1. Parámetros de red teóricos y experimentales para el sistema cristalino de β CD pura y sin huésped.

Sistema cristalino: Monoclínico			Tipo de celda: Primitiva				
Parámetros de red de β CD	$\alpha = \gamma$	β	a (Å)	b (Å)	c (Å)	Volumen (Å ³)	Factor R
Teóricos	90°	112,22°	21,233	10,294	15,103	3301	---
Experimentales	90°	112,037°	21,359	10,468	15,180	3394	0,00387

Autores como Mino Caira de la Universidad de Ciudad del Cabo en Sudáfrica y Janusz Lipkowski de la Academia Polaca de Ciencias en Polonia, han liderado los estudios cristalográficos de CD y han demostrado la existencia de ciertos fenómenos en este tipo de matrices cuando forman complejos cristalinos, estos son: isoestructuralidad, polimorfismo, pseudopolimorfismo y amorfismo (Aree, 2008; Bettinetti, 2006; Caira, 2001).

Se realizó la indexación de los difractogramas de polvo cristalino de los complejos β CD-AT y β CD-FEA (ver figuras 8.2 y 8.3, sección anexos) basados en el criterio de isoestructuralidad donde la disposición de embalaje de cristales con diferentes moléculas huéspedes es esencialmente la misma, por lo tanto los parámetros de red son similares. Específicamente, para el sistema β CD-AT, los parámetros teóricos utilizados corresponden a parámetros de red experimentales de β CD con sulfatiazol ya que pertenecen a la misma familia isoestructural. Para el sistema β CD-FEA, los parámetros de red teóricos empleados fueron los parámetros de red experimentales del complejo β CD con alcohol bencílico ya que también forman parte de una misma familia isoestructural (Caira, 2001).

Los patrones cristalográficos de los complejo β CD-AT y β CD-FEA fueron indexados para sistemas monoclinicos del tipo $P2_1$, los parámetros de red están especificados en las tablas 3.2 y 3.3, respectivamente.

Tabla 3.2. Parámetros de red teóricos y experimentales para el sistema cristalino de β CD-AT.

Sistema cristalino: Monoclinico			Tipo de celda: $P2_1$				
Parámetros de red de β CD-AT	$\alpha = \gamma$	β	a (Å)	b (Å)	c (Å)	Volumen (Å ³)	Factor R
	Teóricos	90°	117,29°	15,264	16,500	15,559	3919
Experimentales	90°	117,29°	15,303	16,509	15,504	3917	0,0041

Tabla 3.3. Parámetros de red teóricos y experimentales para el sistema cristalino de β CD-FEA.

Sistema cristalino: Monoclinico			Tipo de celda: $P2_1$				
Parámetros de red β CD-FEA	$\alpha = \gamma$	β	a (Å)	b (Å)	c (Å)	Volumen (Å ³)	Factor R
	Teóricos	90°	112,81°	21,287	10,101	15,356	3302
Experimentales	90°	112,22°	21,516	10,397	15,092	3376	0,0105

Los valores de hkl, los ángulos, distancias e intensidades relativas de ambos sistemas obtenidos desde el refinamiento de los parámetros de red de β CD-AT y β CD-FEA se detallan en las tablas 8.2 y 8.3 de la sección de anexos (capítulo 8), respectivamente.

La formación de nanoestructuras por PC es un proceso gobernado por el grado de ordenamiento de los grupos funcionales sobre la superficie de los microcristales que actúan como sustrato, el fenómeno fue denominado autoensamblaje mediado por una red cristalina, o también llamado CLAMS de sus siglas en inglés *crystal lattice mediated self-assembly* (Murugesan, 2005; Fujiki, 2006; Nikolic, 2007). El alto grado de cristalinidad que alcanza el complejo observado por DRXP demuestra que todos los sistemas estudiados pueden actuar como sustratos adecuado para estabilizar átomos y pequeños clústeres que se van depositando sobre la superficie y formando las NPsM.

3.3. Estudio de los CI mediante ^1H -RMN

RMN es una de las técnicas más eficientes para el estudio de las interacciones moleculares. La formación de complejos de inclusión puede ser analizada por los desplazamientos químicos de las señales de los protones que estén interactuando, tanto de la matriz como del huésped, esto debido al cambio en el entorno químico de ambas especies producido por el fenómeno de inclusión (Schneider, 1998; Singh, 2010).

En la matriz β CD, los protones 1, 2 y 4 del esqueleto de átomos de carbono están orientados hacia el exterior, mientras que los protones 3, 5 y 6 se encuentran orientados hacia el interior del macrociclo formando parte de la cavidad hidrofóbica de β CD. Los grupos hidroxilos primarios se encuentran orientados hacia el exterior desde la superficie de la apertura más angosta de la cavidad y los grupos hidroxilos secundarios se ubican orientados hacia el exterior por la superficie más ancha (Szejtli, 1998), la figura 3.7 (a) es un esquema que resume la posición de los protones de β CD.

La efectiva inclusión de una molécula huésped al interior de la matriz y la permanencia del complejo en solución puede ser estudiada específicamente a través de los desplazamientos químicos de las señales correspondientes a los protones internos de β CD (ver Figura 3.7 (b)) y del fármaco estudiado.

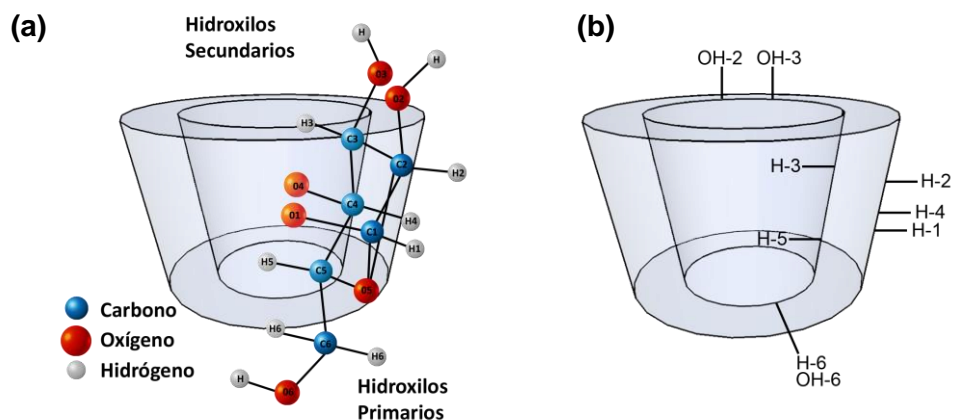


Figura 3.7: Esquemas tipo balde de β CD: (a) con el esqueleto de átomos para una unidad de glucopiranososa, y (b) con la asignación de protones y su orientación espacial.

En 1971 fueron registrados los primeros estudios de complejación de α CD caracterizados mediante ^1H -RMN (Thakkar, 1971); en el cual se observaron específicamente las señales H-3 y H-5 que corresponden a la serie de protones orientados hacia el interior de la cavidad de las CD, demostrándose que en presencia de moléculas aromáticas, el efecto anisotrópico del anillo genera un cambio en su entorno químico el cual fue registrado. El fenómeno pudo ser extrapolado a diferentes huéspedes observándose el cambio en los desplazamientos químicos de los hidrógenos internos, cambiando las condiciones del ensayo, como por ejemplo el solvente utilizado. (Wood, 1976; Schneider, 1998).

El estudio por ^1H -RMN de CD en solución, depende entre otros factores del disolvente; existe un cambio en la ubicación de las señales de los protones internos H-3, H-5 y H-6 en el espectro, cuando se utiliza DMSO-d_6 en vez de D_2O como disolvente. En la figura 3.8 se muestra este fenómeno que ocurre para las diferentes CD.

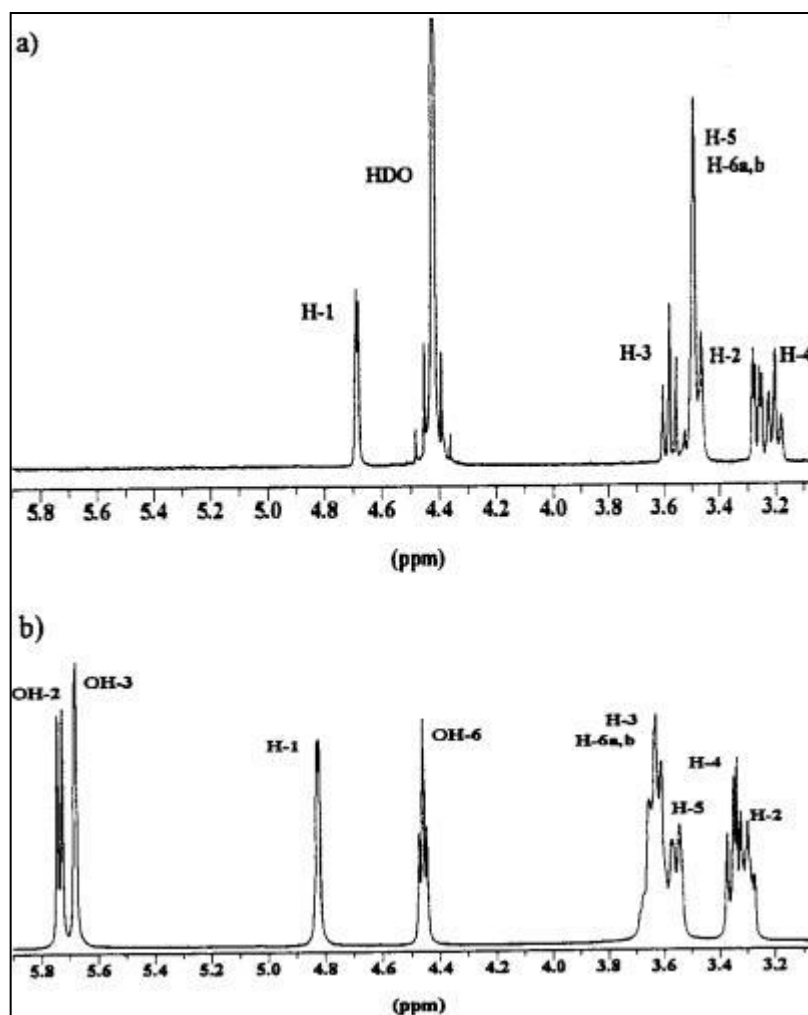


Figura 3.8: Espectros ^1H -RMN (a 400 MHz) de α CD a 298 K: (a) en D_2O y (b) en DMSO-d_6 (Schneider, 1998).

Los complejos de β CD pueden apilarse formando estructuras cristalinas que dependen del huésped albergado, y del agua que se encuentra incluida dentro de la cavidad y en los espacios entre moléculas de CD vecinas. Este fenómeno puede trascender a la formación de especies pseudo-polimorfas, lo que implica que el agua que forma parte de los cristales es muy difícil de extraer (Stezowski 2001; Dang, 2011). Tras el proceso de disolución de los cristales para su estudio por RMN; el agua permanece en el espectro, observándose alrededor de los 3,3 ppm cuando el CI es disuelto en DMSO- d_6 (Gottlieb, 1997), esto implica el solapamiento de las señales de algunos protones que se orientan hacia el exterior de la macromolécula. El espectro de la figura 3.9 corresponde a β CD pura y sin huésped, disuelta en DMSO- d_6 , donde se muestran las señales de los protones internos H-3, H-5 y H-6 y de los grupos hidroxilos primarios y secundarios, una señal intensa a 3,3 ppm aproximadamente corresponde a la señal de las moléculas de agua que solapan a los protones H-2 y H-4.

A través de la técnica ^1H -RMN se evaluó la permanencia de los fármacos TG, MP, MF, AT y FEA en matrices de β CD una vez formados los CI en estado sólido y luego disueltos en DMSO- d_6 , los desplazamientos químicos evaluados corresponden a los delta entre el CI formado y las especies puras respectivas que lo conforman.

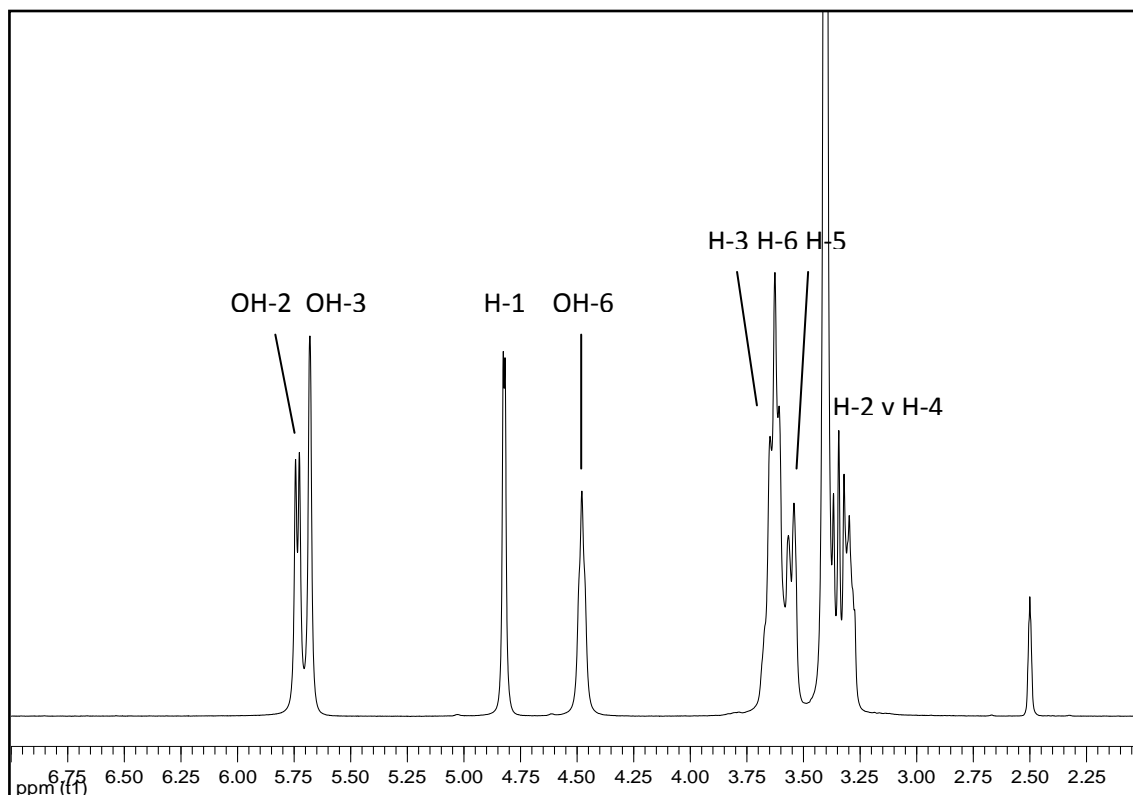


Figura 3.9: Espectro ^1H -RMN de β CD pura y sin huésped en DMSO-d_6 .

La molécula TG que se muestra en la figura 3.10 posee dos protones (NH y CH) que forman parte del heterociclo además de los protones de los grupos NH_2 y SH.

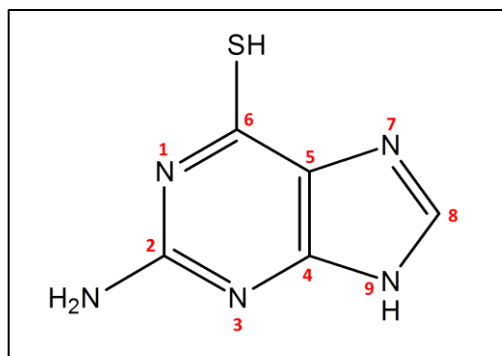


Figura 3.10: Estructura de TG con la numeración de sus átomos.

Diferentes estudios teóricos y experimentales han reportado la formación de 4 especies tautoméricas para TG, en estado líquido como sólido (ver figura 3.11). Las formas a y b de 6-TG son más estables y por ende están en una mayor proporción con respecto a las especies c y d. Entre las dos moléculas tautoméricas más estables, la especie a con un protón en el C-9 es prioritaria (Leszczynski 1993; Stewart, 1997; Latosinska, 2009).

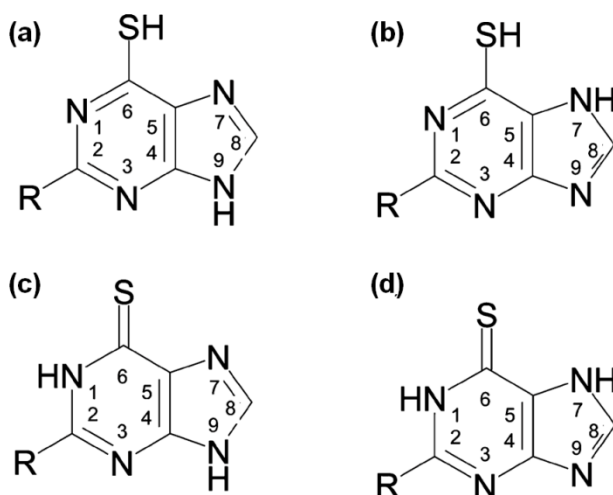


Figura 3.11: Estructuras tautoméricas de TG (Latosinska, 2009).

Latosinska y colaboradores en el año 2009 realizaron un estudio sobre las interacciones intermoleculares para las moléculas TG y MP. Estos cálculos revelaron diferentes tipos de interacciones entre purinas, un apilamiento vertical de bases paralelas y la interacción de hasta ocho puentes de hidrógeno intermoleculares; los cuales pueden explicar dos fenómenos que ocurren entre moléculas de TG: primero la formación de pentámeros y segundo, una superposición de doble capa. Esto explica por qué el espectro de protones para TG no se resuelve completamente.

En la figura 3.12 se muestra el espectro de TG pura en DMSO- d_6 . Es posible atribuir el ensanchamiento de las señales a los efectos de agregación entre 5 moléculas de TG por interacciones entre átomos de H, y a la doble capa generada entre dos moléculas de TG a través del apilamiento de sus nubes π . En la figura 3.13 se muestra el espectro de los cristales disueltos del complejo β CD-TG con la asignación de protones para la matriz y el huésped. Es posible observar que no se produce el ensanchamiento de las señales de los protones NH-7 y NH-9, debido probablemente al fenómeno de inclusión, donde el apilamiento de TG no ocurre y cada molécula de fármaco se encuentra incluida en las matrices de CD, y por lo tanto, aisladas unas de otras.

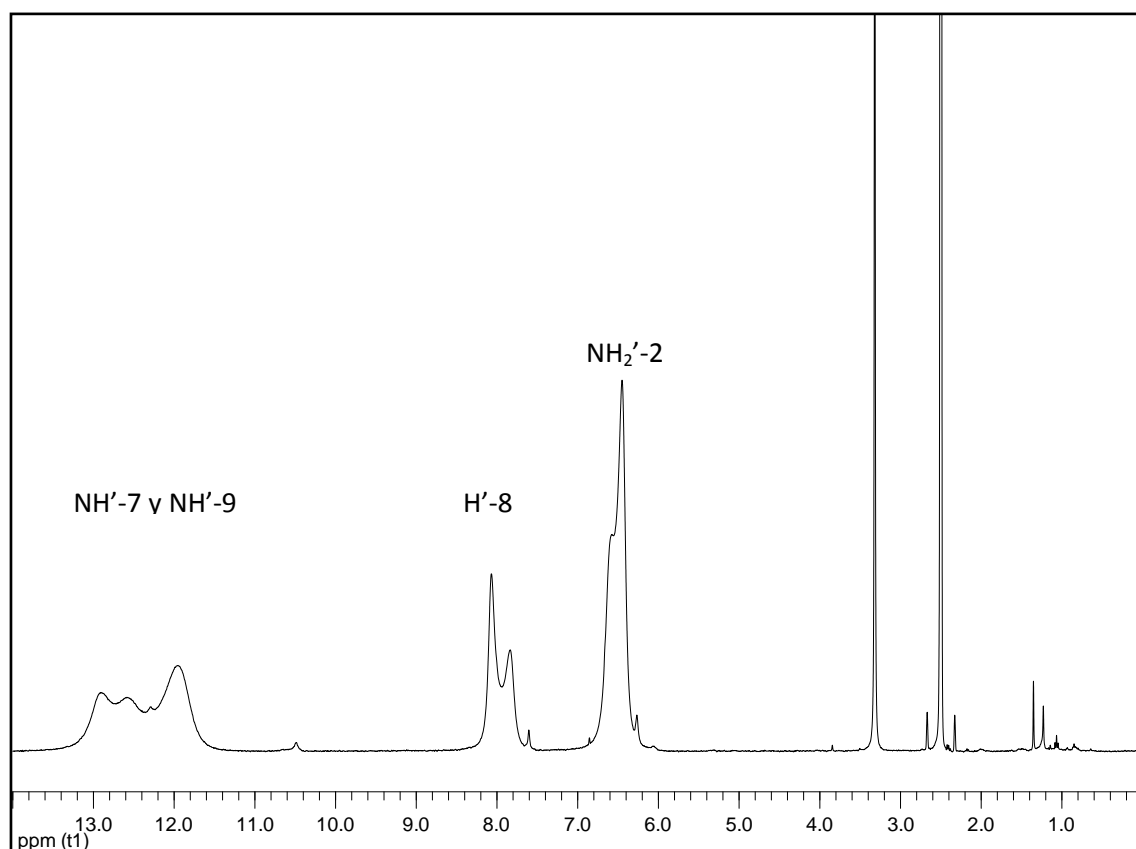


Figura 3.12: Espectro ^1H -RMN de TG pura en DMSO- d_6 .

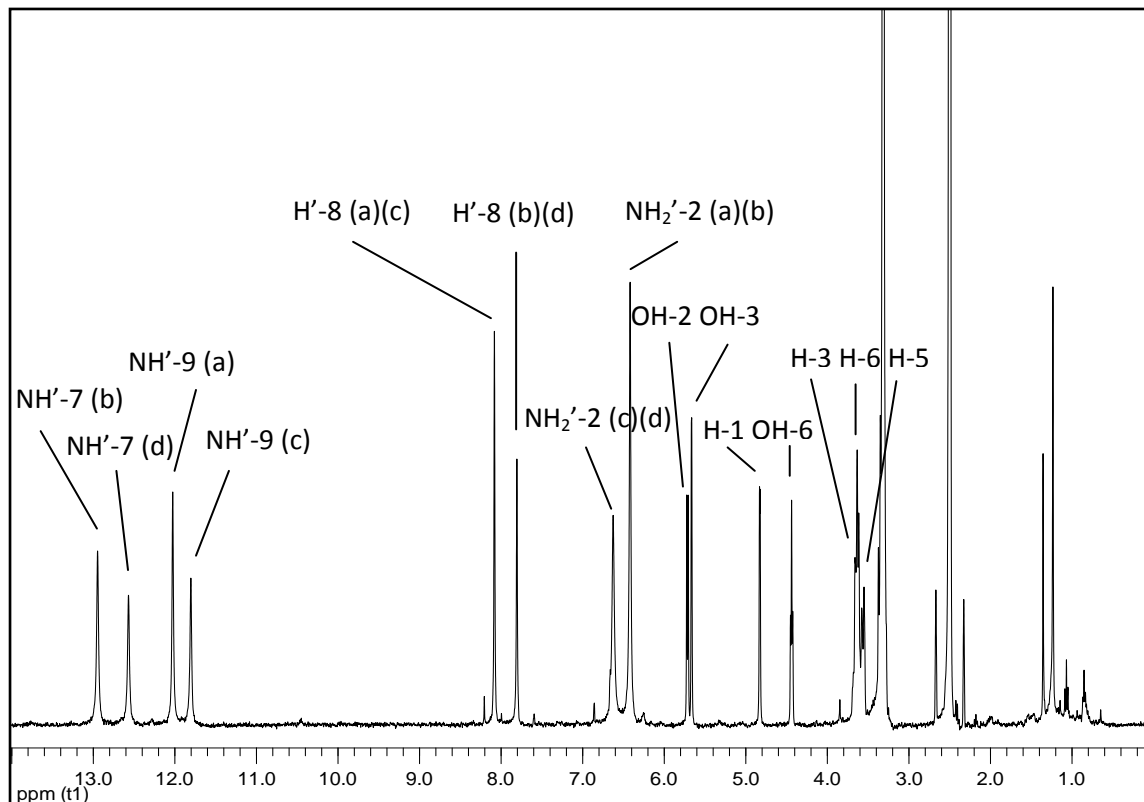


Figura 3.13: Espectro ^1H -RMN del complejo βCD -TG en DMSO-d_6 .

La tabla 3.4 corresponde a los desplazamientos químicos del CI formado, con respecto a las especies puras βCD y TG, demostrándose la efectiva inclusión del fármaco. Los desplazamientos calculados para los hidroxilos OH-2, OH-3 y OH-6 hacia campos más altos indicaron una interacción con áreas altamente electronegativas de TG, como los grupos funcionales SH y NH_2 ; estos desplazamientos podrían deberse además, a interacciones entre grupos hidroxilos de moléculas vecinas. Se ha reportado la formación de dímeros de βCD en solución cuando alberga huéspedes pequeños (Douhal, 2004), este fenómeno único para βCD puede explicar la aparición de señales a campos más altos, debido a un acoplamiento de las aperturas entre dos conos.

Los desplazamientos químicos para los protones H-3 y H-5 de β CD indican que probablemente el heterociclo del fármaco se encuentra incluido con una orientación hacia la apertura más ancha. Los protones H'-8 y el grupo NH₂' de TG también muestran desplazamientos químicos debido al fenómeno de inclusión, sin embargo son diferentes entre las especies tautoméricas lo que implica una geometría relativamente distinta entre las diferentes estructuras que hay presentes en la solución.

Tabla 3.4: Desplazamientos químicos de los protones de β CD-TG con respecto a las especies puras.

H de β CD	δ β CD (ppm)	δ β CD-TG (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
H-3	3,648	3,676	0,028
H-5	3,555	3,568	0,013
H-6	3,617	3,624	0,007
OH-2	5,735	5,714	-0,021
OH-3	5,680	5,671	-0,009
OH-6	4,479	4,438	-0,041
H' de TG	δ TG (ppm)	δ β CD-TG (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
H'-8ac	8,068	8,081	0,013
H'-8bd	7,835	7,806	-0,029
NH ₂ '-2ab	6,449	6,418	-0,031
NH ₂ '-2cd	6,566	6,626	0,060

Para confirmar la permanencia del complejo β CD-MP se evaluaron los desplazamientos químicos del CI y las especies libres. La designación de los protones para el fármaco se obtiene a partir de la numeración expuesta en la figura 3.14.

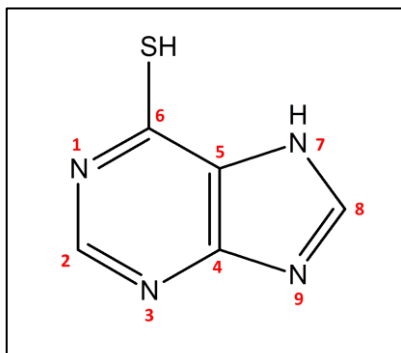


Figura 3.14: Estructura de MP con la numeración de sus átomos.

Los espectros del fármaco MP y del complejo β CD-MP en solución se muestran en las figuras 3.15 y 3.16 respectivamente. La tabla 3.5 muestra los desplazamientos químicos del CI formado, con respecto a las especies puras β CD y MP. Los desplazamientos evaluados corresponden a los protones internos de la matriz de CD, los grupos OH de la cavidad inferior y superior, y los protones de MP. Los desplazamientos químicos H-3, H-5 demuestran un cambio en el entorno químico, atribuido a la efectiva inclusión del fármaco. Existe una superposición de las señales para OH-2, OH-3, mientras que la señal de los protones de los grupos OH-6 no puede ser resuelta. Esto puede ser atribuido a la formación de dímeros de CD en solución, fenómeno ya discutido anteriormente para β CD cuando alberga huéspedes de dimensiones pequeñas (Douhal, 2004). Se evaluaron también los desplazamientos químicos para los protones de MP, destacándose un delta mayor en NH'-7.

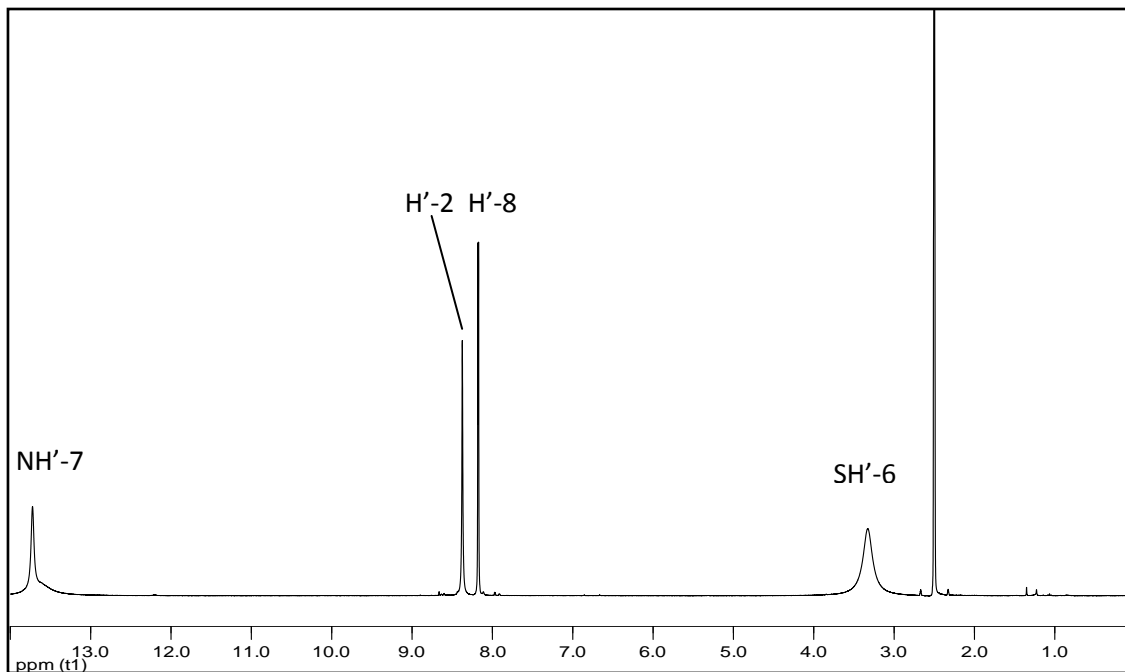


Figura 3.15: Espectro ^1H -RMN de MP pura en DMSO-d_6 .

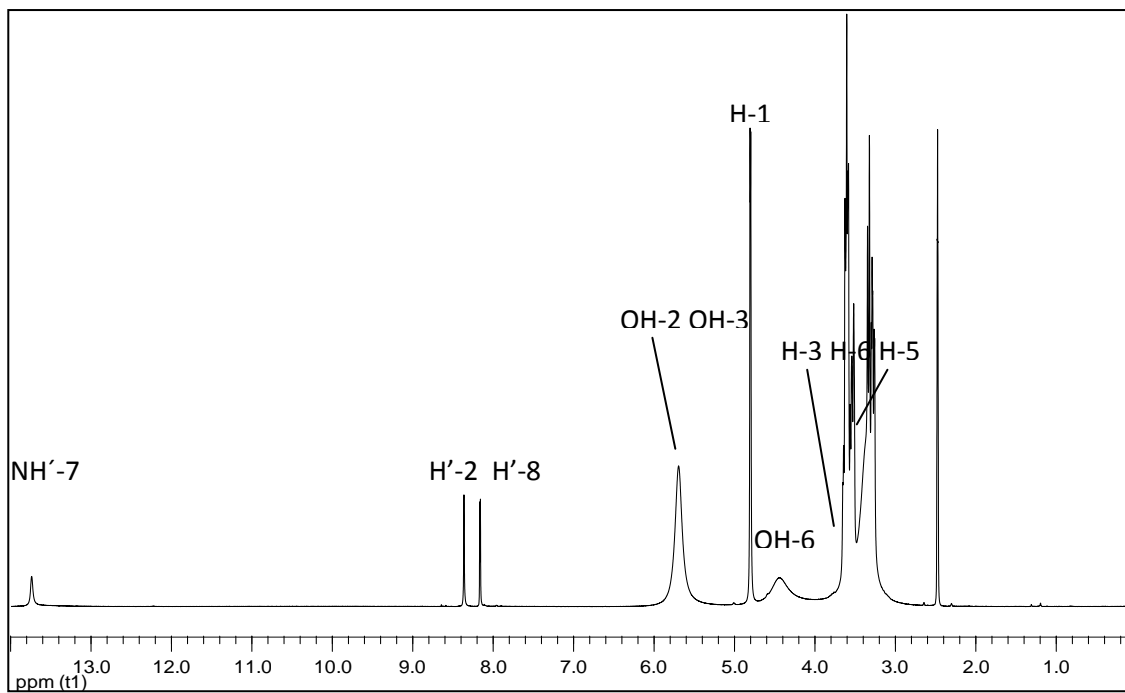


Figura 3.16: Espectro ^1H -RMN del complejo β CD-MP en DMSO-d_6 .

Tabla 3.5: Desplazamientos químicos de los protones de β CD-MP con respecto a las especies puras.

H de β CD	δ β CD (ppm)	δ β CD-MP (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
H-3	3,648	3,668	0,020
H-5	3,555	3,580	0,025
H-6	3,617	3,620	0,003
OH-2	5,735	-	-
OH-3	5,680	-	-
OH-6	4,479	-	-
H' de MP	δ MP (ppm)	δ β CD-MP (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
H'-2	8,373	8,382	0,009
H'-8	8,176	8,178	0,002
SH'-6	3,326	-	-
NH'-7	13,723	13,740	0,017

La designación de los protones de MF se obtiene a partir de la numeración expuesta en la figura 3.17.

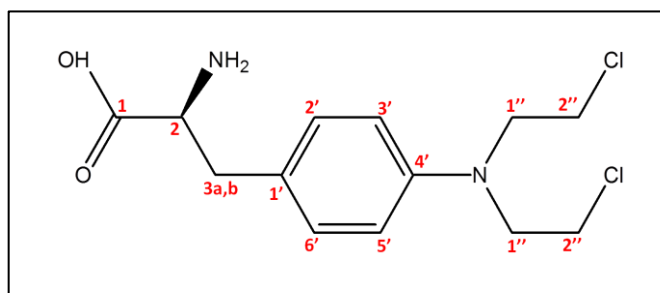


Figura 3.17: Estructura de MF con la numeración de sus átomos.

Los espectros del fármaco MF y del complejo β CD-MF en solución se muestran en las figuras 3.18 y 3.19 respectivamente. La tabla 3.6 muestra los desplazamientos químicos de β CD-MF en comparación a sus especies puras. Los desplazamientos de los protones 2'/6', 3'/5' del anillo y de los protones 1'' y 2'' de la cadena del huésped hacia campos más bajos demuestran la interacción con la matriz de CD; mientras que los desplazamientos químicos de los protones H'-3 a y b de MF pueden ser atribuidos probablemente a interacciones con los grupos OH presentes en la superficie de la cavidad de β CD. Los protones internos de la matriz H-3, H-5 y H-6 demuestran que el fármaco permanece albergado. Los grupos OH-6, a diferencia de los hidroxilos OH-2 y OH-3, se desplazan a campos más altos, esto podría ocurrir por la proximidad de grupos electronegativos tales como COOH y NH₂ que se encuentran cercanos hacia una de las aperturas de la CD.

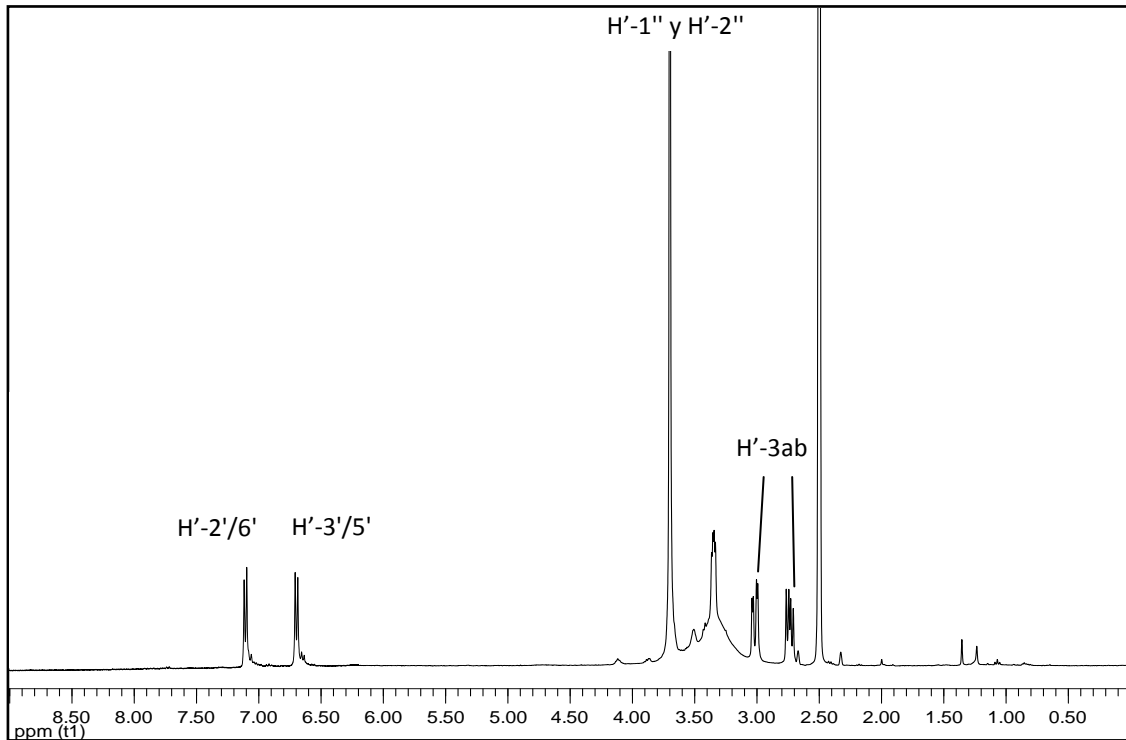


Figura 3.18: Espectro ^1H -RMN de MF puro en DMSO-d_6 .

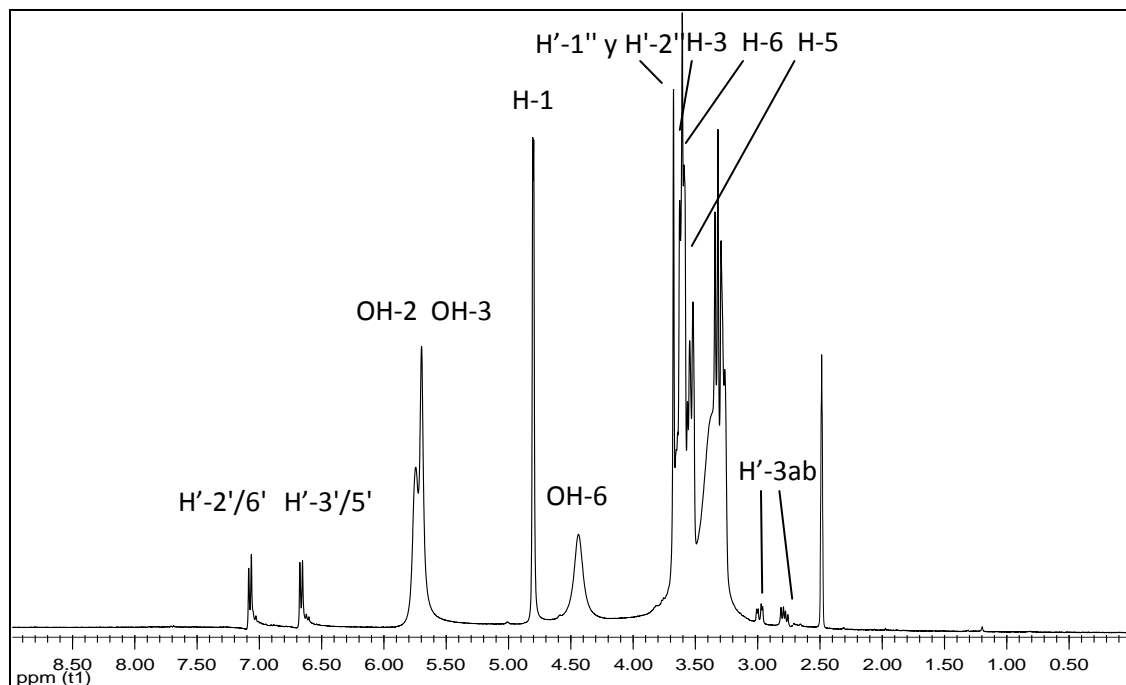


Figura 3.19: Espectro ^1H -RMN del complejo $\beta\text{CD-MF}$ en DMSO-d_6 .

Tabla 3.6: Desplazamientos químicos de los protones de β CD-MF con respecto a las especies puras.

H de β CD	δ β CD (ppm)	δ β CD-MF (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
H-3	3,648	3,653	0,005
H-5	3,555	3,570	0,015
H-6	3,617	3,625	0,006
OH-2	5,735	5,766	0,031
OH-3	5,680	7,719	0,039
OH-6	4,479	4,464	-0,015
H' de MF	δ MF (ppm)	δ β CD-MF (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
H'-1"/2"	3,699	3,702	0,003
H'-3a	2,736	2,814	0,078
H'-3b	3,017	3,012	-0,005
H'-2'/6'	7,087	7,093	0,006
H'-3'/5'	6,671	6,683	0,012

En la figura 3.20 se muestra la designación de los átomos para el fármaco AT.

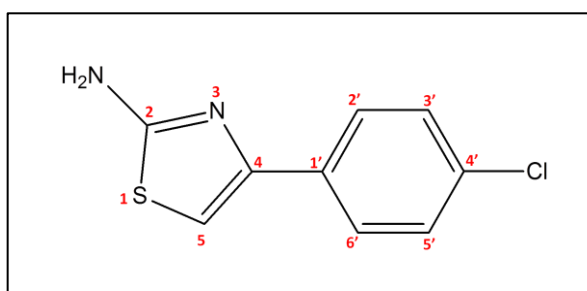


Figura 3.20: Estructura de AT con la numeración de sus átomos.

Para confirmar la permanencia del complejo β CD-AT se evaluaron los desplazamientos químicos del Cl y las especies libres. Los espectros del fármaco AT y del complejo β CD-AT en solución se muestran en las figuras 3.21 y 3.22 respectivamente. En la tabla 3.7 se muestran todos los desplazamientos químicos evaluados para los protones de β CD y del fármaco AT. Las señales de los protones internos de la β CD, y los grupos OH fueron resueltos. Las señales pertenecientes a los protones H-3 y H-5 de la β CD se desplazan hacia campos más bajos tras la inclusión de AT, mientras que las señales de todos los grupos hidroxilos y la señal del protón H-6 de la matriz aparecen en campos más altos, esto debido a la interacción con especies que restan densidad electrónica, como los grupos funcionales o el átomo de Cl del huésped. Con respecto a las señales del fármaco, el anillo aromático se encuentra completamente albergado en la matriz, debido a los desplazamientos a campos bajos de los protones H'-2'/6' y H'-3'/5'. También se puede observar que los protones H'-5 y NH₂'-2 se desplazan hacia campos más altos, lo que implica que el grupo tiazol posee una interacción con la matriz.

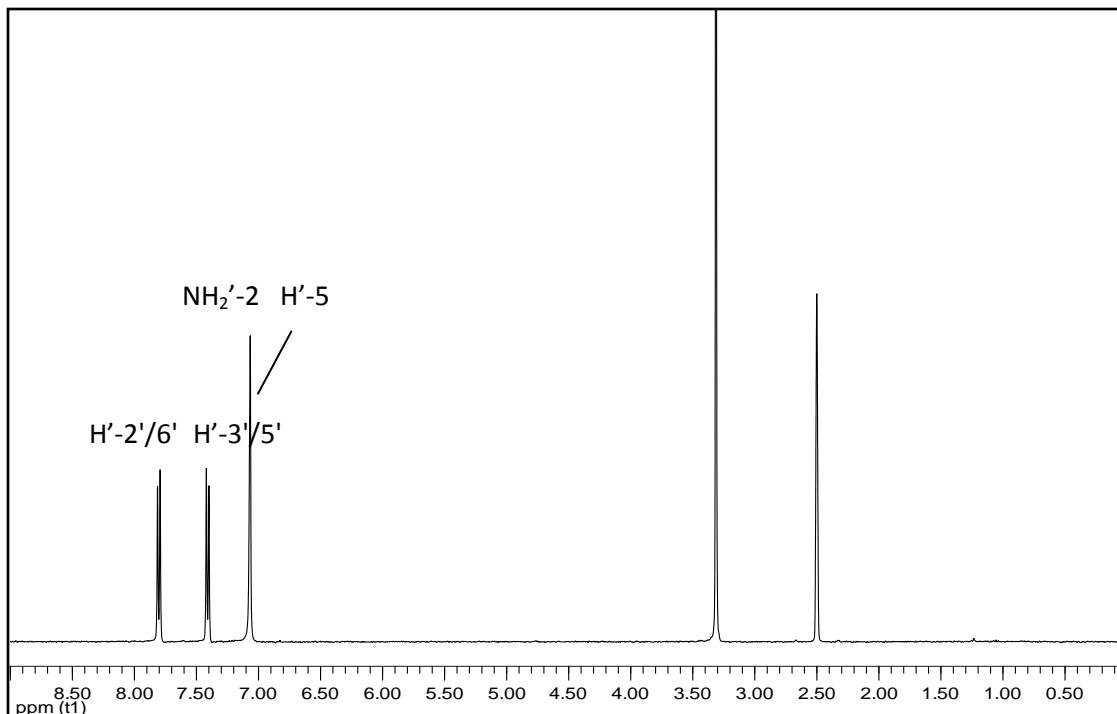


Figura 3.21: Espectro ^1H -RMN de AT puro en DMSO-d_6 .

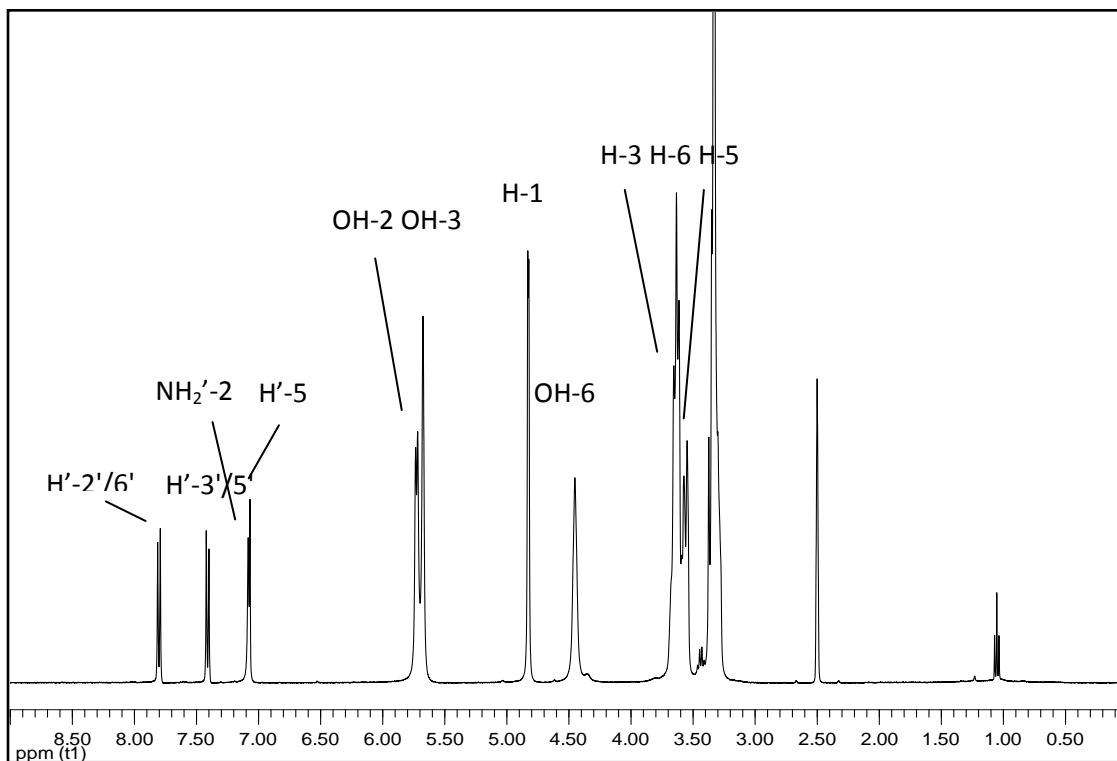


Figura 3.22: Espectro ^1H -RMN del complejo $\beta\text{CD-AT}$ en DMSO-d_6 .

Tabla 3.7: Desplazamientos químicos de los protones de β CD-AT con respecto a las especies puras.

H de β CD	δ β CD (ppm)	δ β CD-AT (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
H-3	3,648	3,655	0,007
H-5	3,555	3,561	0,006
H-6	3,617	3,612	-0,005
OH-2	5,735	5,726	-0,009
OH-3	5,680	5,675	-0,005
OH-6	4,479	4,451	-0,028
H' de AT	δ AT (ppm)	δ β CD-AT (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
H'-5	7,065	7,058	-0,007
H'-2'/6'	7,802	7,797	-0,005
H'-3'5'	7,410	7,405	-0,005
NH ₂ '-2	7,065	7,066	0,001

Para corroborar la permanencia del complejo β CD-FEA en solución, tal como se ha realizado para los 4 fármacos anteriores, se evaluaron los desplazamientos químicos de las especies puras y se compararon con las correspondientes al CI formado. La figura 3.23 muestra la designación de protones para FEA.

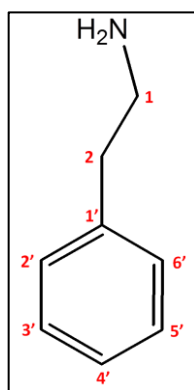


Figura 3.23: Estructura de FEA con la numeración de sus átomos.

Los espectros ^1H -RMN de FEA pura y del complejo βCD -FEA fueron registrados y se muestran en las figuras 3.24 y 3.25 respectivamente. La señal que corresponde al grupo NH_2 no se observó en el espectro del CI.

En la tabla 3.8 se muestran los desplazamientos químicos de la matriz; y los protones del anillo aromático y la cadena etilamina libre del huésped, comparándose con los desplazamientos químicos de estos protones en el CI. Se observaron desplazamientos químicos hacia campos más altos para todos los protones de FEA, debido a su permanencia al interior de la cavidad de βCD la cual provee una alta densidad electrónica. Con respecto a la matriz, se observa un apantallamiento de los protones internos H-3, H-5 y H-6 producido por la contribución electrónica del anillo aromático. Por otra parte, los grupos hidroxilos muestran una interacción diferente, el desplazamiento químico de estos hacia campos más bajos se debe a la proximidad del grupo amino y al efecto de desapantallamiento producido por la corriente del anillo aromático.

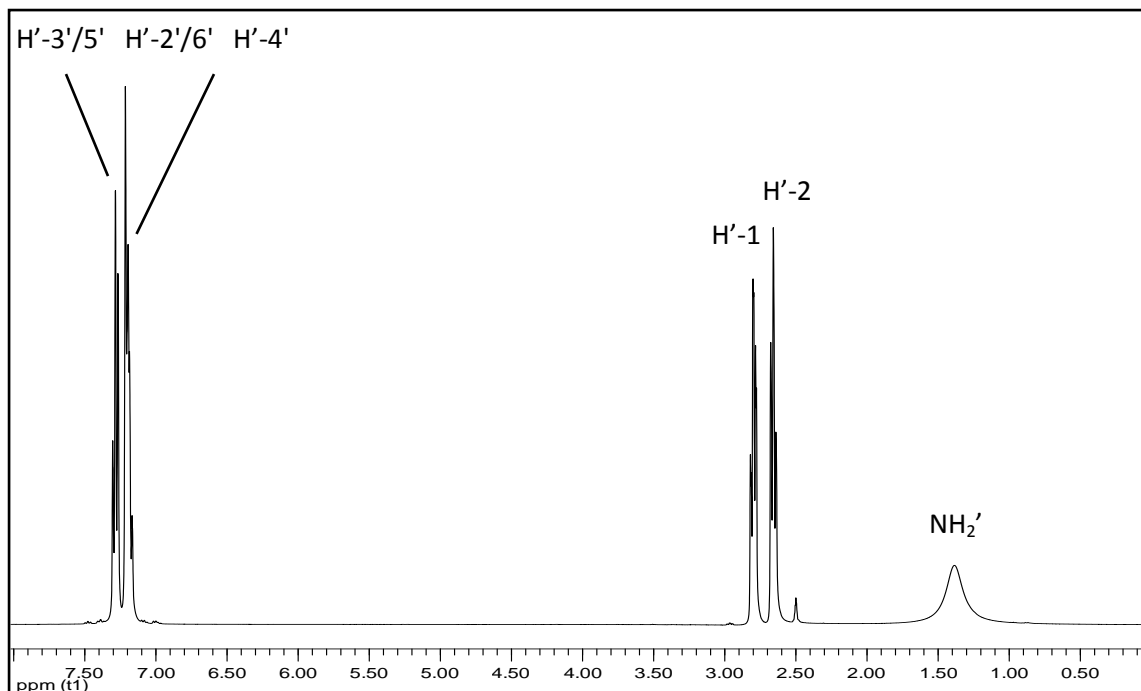


Figura 3.24: Espectro ^1H -RMN de FEA pura en DMSO-d_6 .

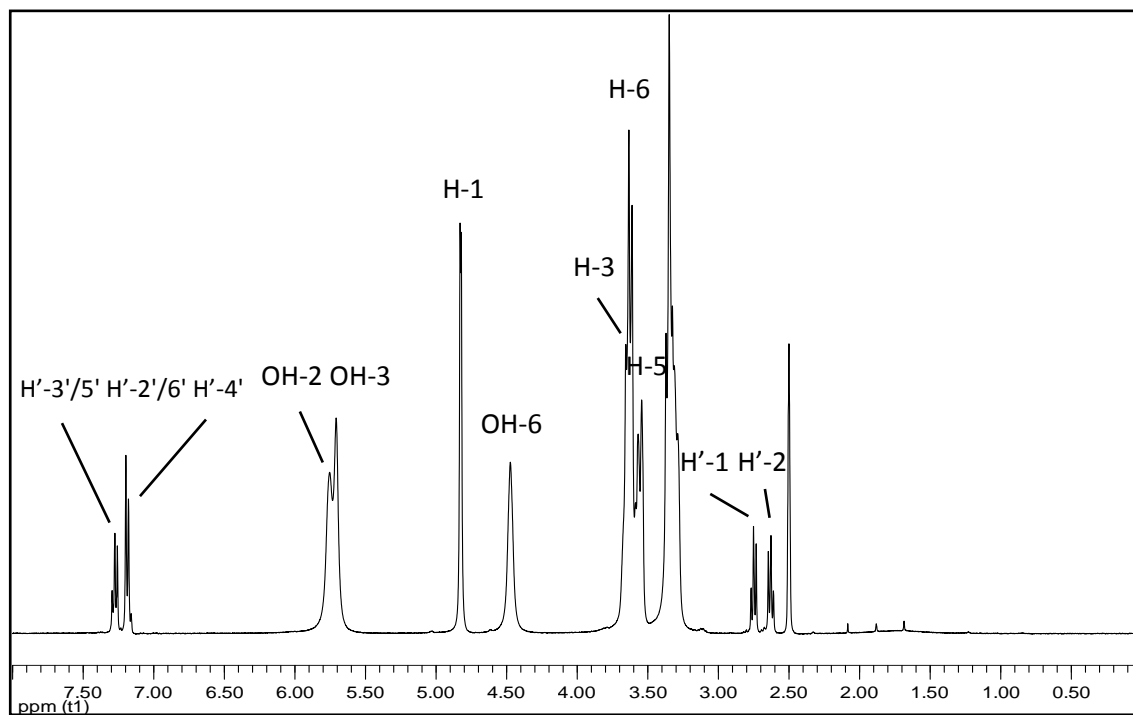


Figura 3.25: Espectro ^1H -RMN del complejo $\beta\text{CD-FEA}$ en DMSO-d_6 .

Tabla 3.8: Desplazamientos químicos de los protones de β CD-FEA con respecto a las especies puras.

H de β CD	δ β CD (ppm)	δ β CD-FEA (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
H-3	3,669	3,656	-0,013
H-5	3,566	3,556	-0,010
H-6	3,622	3,610	-0,012
OH-2	5,707	5,753	0,046
OH-3	5,660	5,707	0,047
OH-6	4,435	4,473	0,038
H' de FEA	δ FEA (ppm)	δ β CD-FEA (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
H'-1	2,795	2,750	-0,045
H'-2	2,658	2,628	-0,030
H'-2'/6'	7,205	7,197	-0,008
H'-3'/5'	7,285	7,276	-0,009
H'-4'	7,176	7,169	-0,007

La evaluación de los desplazamientos químicos de todos los CI estudiados demostraron que tras formarse en estado sólido, los complejos solubilizados permanecen estables, es decir, los fármacos se mantienen albergados al interior de la matriz de β CD, lo que permitiría que cada CI interaccione como una supramolécula con NPsM en estado sólido y en solución.

3.4. Estequiometría de los CI

La integración de las señales de los protones de β CD como matriz y de cada fármaco como huésped en los espectros ^1H -RMN de los CI, permite la determinación de la estequiometría de cada sistema en solución de acuerdo con la metodología utilizada en diferentes complejos de CD (Rodríguez-Llamazares, 2007; Barrientos, 2009 y 2013). Se utilizó la integración del protón H-1 de la matriz como referencia, y fue comparado con la integración de las señales de los protones de cada fármaco que se encuentren correctamente resueltas.

Para el complejo β CD-TG se integraron los protones H'-8 de TG, que corresponden a las cuatro especies tautoméricas observadas y se comparó con el protón H-1 de β CD. La relación estequiométrica calculada fue 1:1. Las señales del complejo se muestran en la figura 3.26.

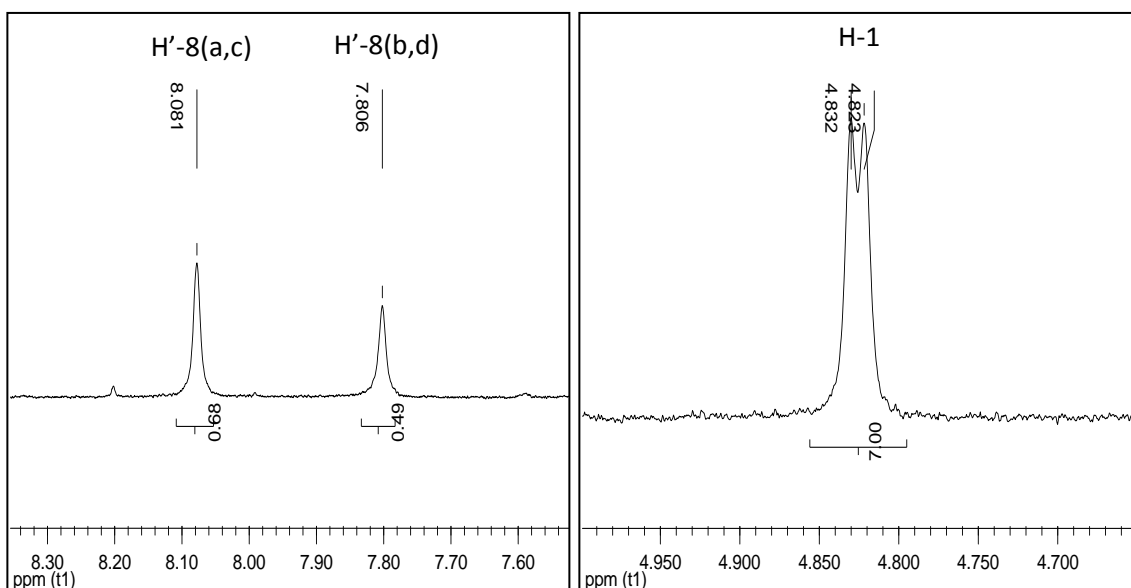


Figura 3.26: Integración de señales del espectro ^1H -RMN de β CD-TG en DMSO-d_6 .

La figura 3.27 corresponde a las señales integradas del espectro ^1H -RMN de βCD -MP, se determinó una relación molar 1:1 tomando como referencia la integración del protón H-1 de βCD y el protón H'-4 de MP.

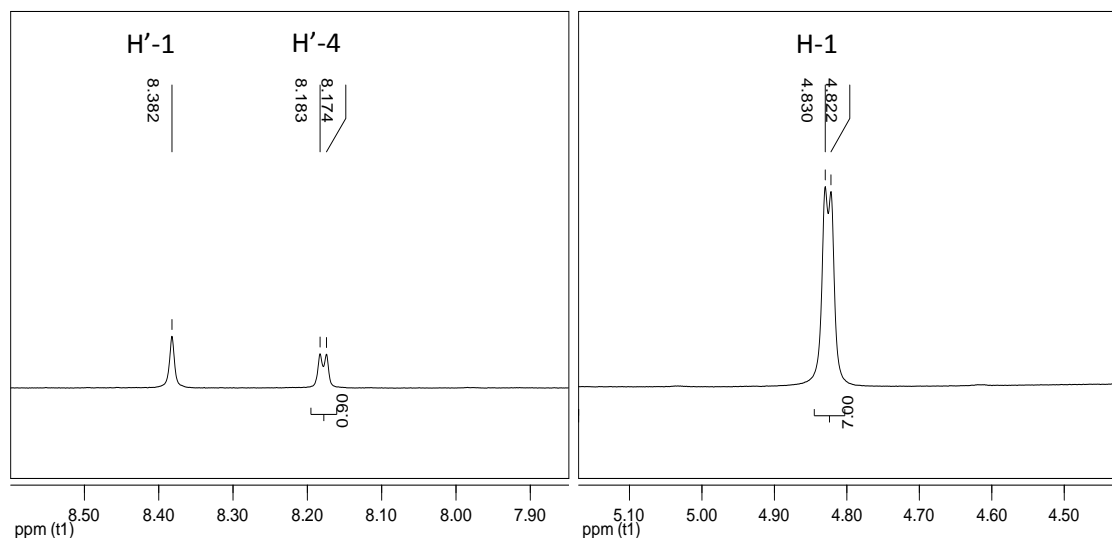


Figura 3.27: Integración de señales del espectro ^1H -RMN de βCD -MP en DMSO-d_6 .

En la figura 3.28 se muestra la porción del espectro del complejo βCD -MF que corresponde a las señales integradas de los protones H'-2'/6' y H'-3'/5' del anillo aromático de MF y se comparó al protón H-1 de βCD . La relación estequiométrica calculada fue 1:1.

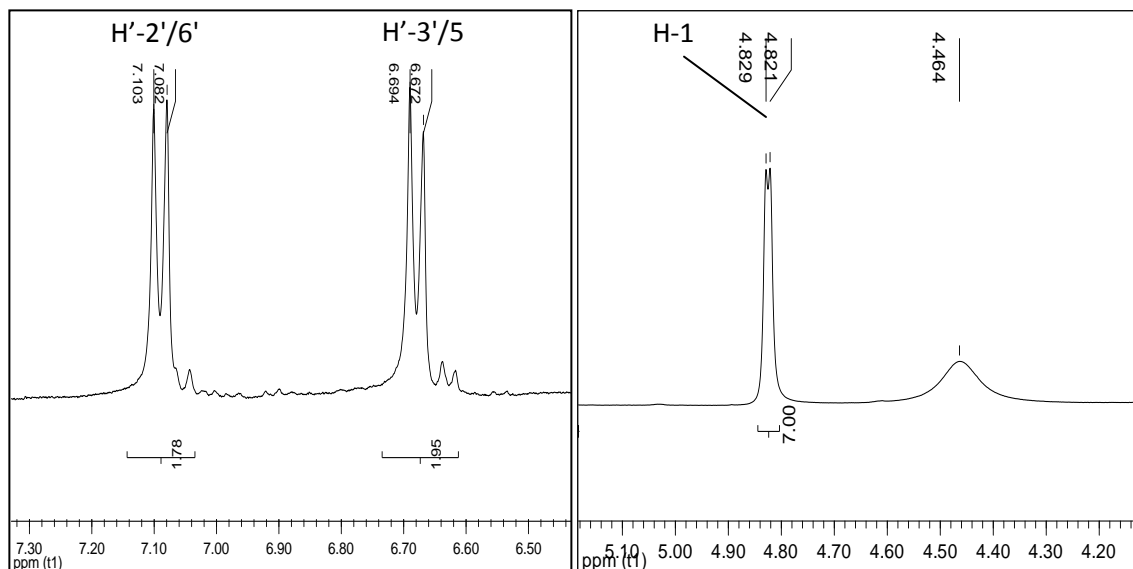


Figura 3.28: Integración de señales del espectro ^1H -RMN de $\beta\text{CD-MF}$ en DMSO-d_6 .

La relación estequiométrica del complejo $\beta\text{CD-AT}$ se calculó a partir del protón H-1 de βCD y los protones del anillo aromático del fármaco AT. Se determinó una relación molar 1:1 matriz-huésped. Las señales integradas del espectro se muestran en la figura 3.29.

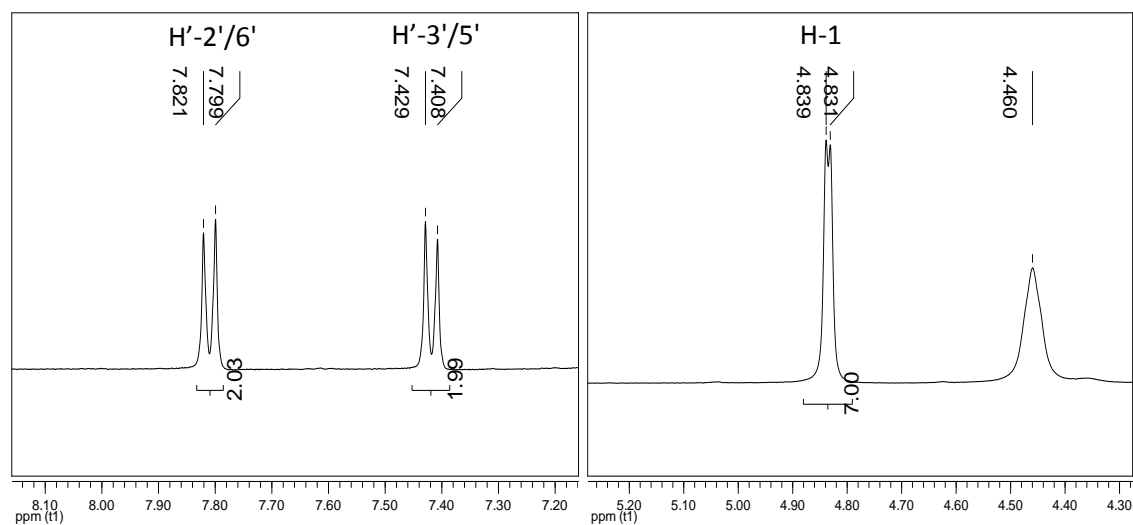


Figura 3.29: Integración de señales del espectro ^1H -RMN de $\beta\text{CD-AT}$ en DMSO-d_6 .

La relación estequiométrica del complejo β CD-*FEA* fue determinada usando la integración de los protones H-1 de β CD y los protones H'-1 y H'-2 de *FEA* en los espectros del complejo en solución. La figura 3.30 muestra una relación 1:1 del CI.

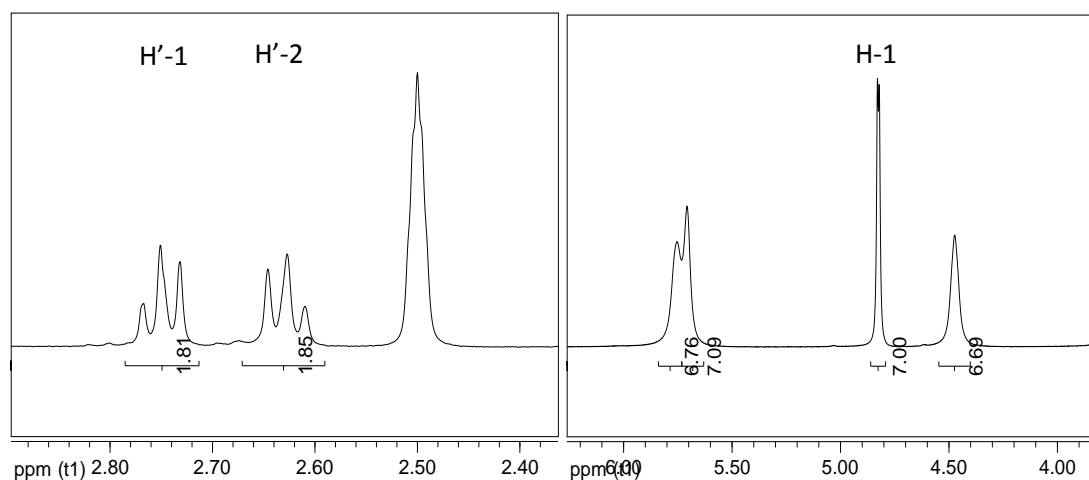


Figura 3.30: Integración de señales del espectro ^1H -RMN de β CD-*FEA* en DMSO-d_6 .

Complementariamente, la estequiometría de β CD-*FEA* también fue determinada usando el método de variaciones continuas. El método permite identificar la cantidad de huésped que se incluye en la matriz obteniéndose la relación molar predominante en que ambos componentes constituyen el complejo. Usando una solución de β CD y otra solución de *FEA* con concentraciones equimolares, se graficó la variación de la absorbancia (ΔA) de *FEA* en presencia de β CD multiplicado por la concentración de *FEA* en ese punto versus la fracción molar de *FEA* (figura 3.31). Un punto máximo se observa a una fracción 0,5; esto indica que la relación molar matriz- huésped es 1:1, lo cual resulta consistente con lo observado por RMN.

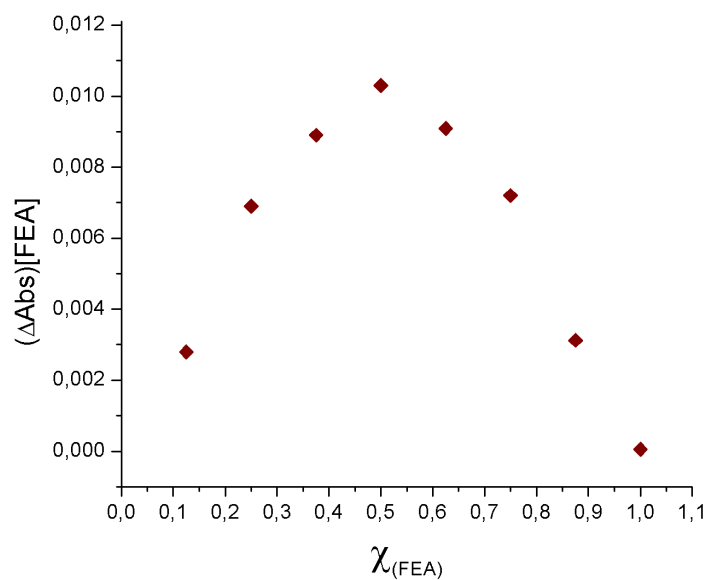


Figura 3.31: Gráfico de variaciones continuas del complejo β CD-FEA. El valor de Abs_0 fue de 0,2698, que corresponde a la absorbancia de FEA en ausencia de β CD ($\chi_{FEA} = 1$).

Todos los complejos β CD-TG, β CD-MP, β CD-MF, β CD-AT y β CD-FEA, presentan una relación estequiométrica 1:1. Por lo tanto, es posible utilizar el método de solubilidad de fases, que requiere de esta condición, para determinar las constantes de asociación de cada uno en solución.

3.5. Constantes de asociación de los complejos de β CD con fármacos

Para ser farmacológicamente activo, todos los medicamentos deben poseer algún grado de solubilidad en agua. Favorablemente, es posible aumentar la solubilidad acuosa de diversos fármacos a través de la inclusión de estos en matrices de CD. En la formación de los CI en solución, las moléculas huéspedes dentro del complejo se encuentran en equilibrio con una cierta porción de moléculas libres, dicho equilibrio dinámico puede ser interpretado a través del cálculo de su constante de asociación (K_a) (Rasheed, 2008).

Debido a que algunas propiedades fisicoquímicas de las moléculas de CD y del fármaco libre cambian cuando se forma el CI, el valor numérico de la K_a se puede determinar mediante la observación de estos cambios en propiedades tales como solubilidad, reactividad química, absorbancia en el UV-vis, retención de fármaco, estabilidad química y efectos sobre la permeabilidad del fármaco a través de membranas artificiales, etc. (Hirose, 2001).

La K_a de los diferentes CI formados se determinó usando espectroscopia UV-Vis siguiendo la metodología descrita por Higuchi y Connors y los ajustes matemáticos reportados (Higuchi, 1965; Connors, 1997) (ver ecuación 2.1, capítulo 2). El protocolo utilizado para realizar los diferentes ensayos fue descrito en la sección 2.4.2 del capítulo 2 (materiales y métodos), cuidando que la cantidad de β CD agregada no provoque la precipitación del complejo formado. Primero se determinó el coeficiente de extinción molar (ϵ) para cada fármaco disuelto en agua y posteriormente se obtuvieron las K_a respectivas para todos los sistemas por el método de solubilidad de fases.

3.5.1. Obtención de los coeficientes de extinción molar para cada fármaco

El cálculo de ϵ se realizó a través de la medición de la absorbancia de diferentes concentraciones conocidas de cada fármaco disuelto en agua. Los máximos de absorbancia en los espectros se grafican en función de las concentraciones usadas. Considerando la ley de Lambert-Beer, el valor de todos los coeficientes se calcularon con la pendiente de las rectas obtenidas (ver detalles en anexos, capítulo 8). La tabla 3.9 muestra los valores de ϵ para todos los fármacos estudiados.

Tabla 3.9: Coeficiente de extinción molar para cada fármaco disuelto en agua.

Fármaco	ϵ ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	Error estándar
TG	26,03	0,3
MP	8,405	0,2
MF	10,58	0,1
AT	21,91	0,7
FEA	7,234	0,3

3.5.2. Obtención de las constantes de asociación

La constante de asociación fue determinada usando el método de solubilidad de fases. Se prepararon soluciones que contienen diferentes concentraciones conocidas de β CD en solución acuosa, y agregadas a frascos que contienen una masa constante de fármaco, o un volumen exacto para el caso de FEA, produciendo la solubilización del fármaco. A través de las absorbancias obtenidas del fármaco disuelto, la concentración de cada uno pudo ser determinada con la ecuación de Lambert-Beer y el ϵ calculado (ver detalles en anexos, capítulo 8).

La figura 3.32 corresponde al gráfico de las concentraciones de TG calculadas versus las concentraciones de β CD agregadas, obteniéndose una relación lineal (ver detalles en anexos, tabla 8.9), la constante para el complejo β CD-TG fue calculada a través de la pendiente de la recta y la ecuación 2.1. El valor determinado fue 261 M^{-1} .

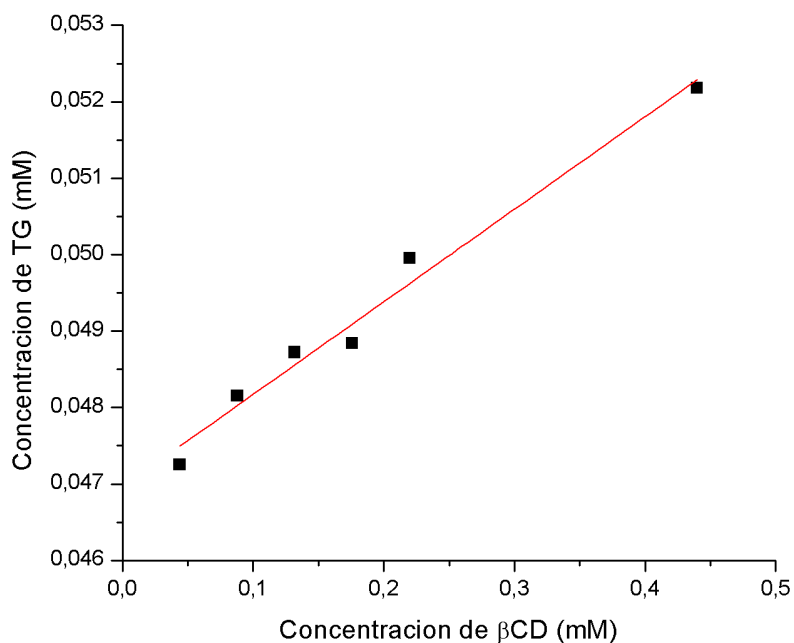


Figura 3.32: Gráfica lineal de diferentes concentraciones de TG solubilizada versus las concentraciones de β CD agregada.

Para obtener la constante de estabilidad del sistema β CD-MP en solución acuosa, se realizaron diferentes ensayos, todos los valores calculados se encuentran en la sección de anexos (tabla 8.10). Se graficó la concentración de MP incluida versus la concentración de β CD utilizada (figura 3.33), obteniéndose una recta, de la pendiente y la ecuación 2.1 se determinó el valor de la constante de asociación que corresponde a 368 M^{-1} .

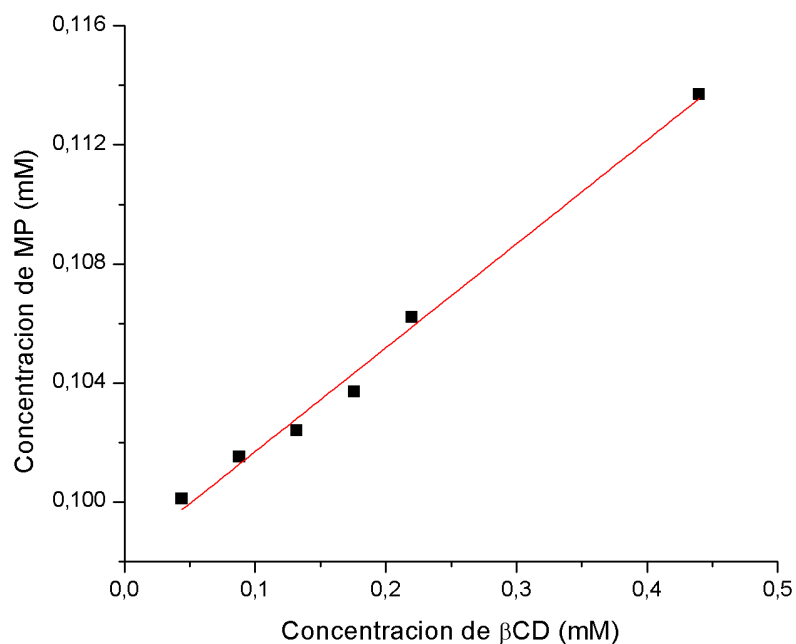


Figura 3.33: Gráfica lineal de diferentes concentraciones de MP solubilizada versus las concentraciones de β CD agregada.

En la figura 3.34 se muestra la recta obtenida de las concentraciones de β CD agregadas en cada ensayo frente a las concentraciones de MF. La constante de asociación para el complejo β CD-MF corresponde a 603 M^{-1} y se calculó a partir de la pendiente de la recta y la ecuación 2.1. Los valores obtenidos de todos los ensayos para calcular la constante se encuentran en anexos (tabla 8.11).

En la figura 3.35 se presenta la recta obtenida graficando las concentraciones de AT versus las de β CD. Para obtener la constante de estabilidad de β CD-AT se utilizó la pendiente de la recta y la ecuación 2.1, resultando un valor de 970 M^{-1} . Los detalles de cada ensayo se encuentran en la sección de anexos (tabla 8.12).

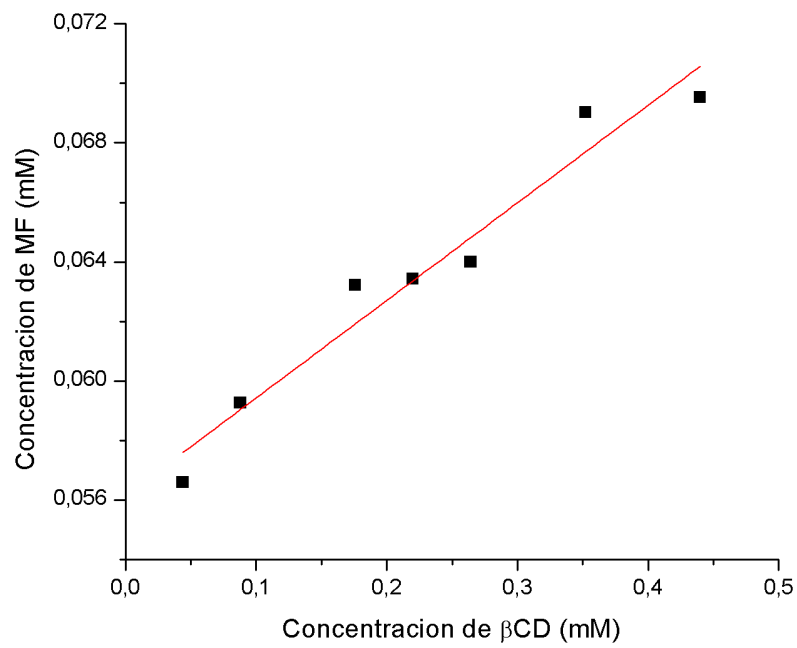


Figura 3.34: Gráfica lineal de diferentes concentraciones de MF solubilizada versus las concentraciones de β CD agregada.

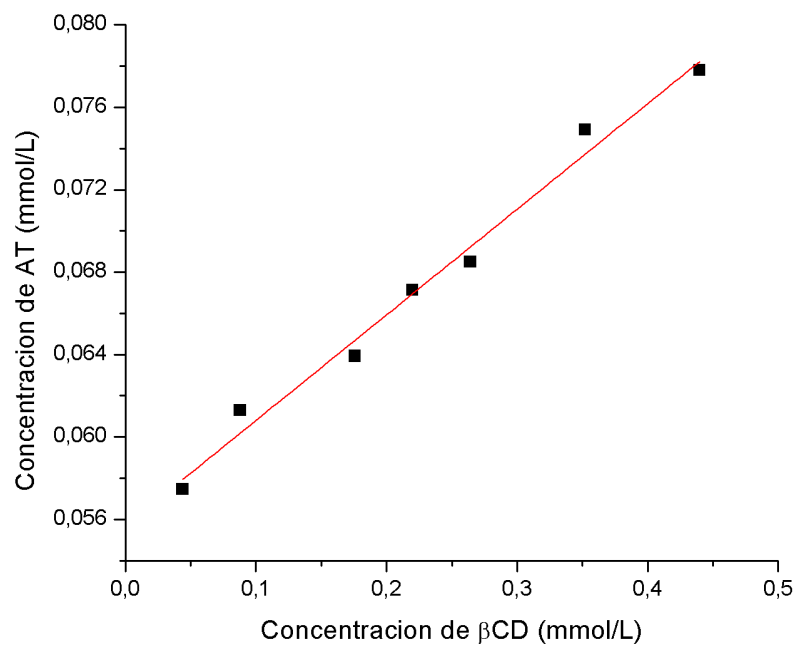


Figura 3.35: Gráfica lineal de diferentes concentraciones de AT solubilizada versus las concentraciones de β CD agregada.

La constante de asociación del sistema β CD-FEA fue calculada a partir de la pendiente de la recta que se muestra en la figura 3.36 y la ecuación 2.1 y corresponde a 674 M^{-1} . Los detalles de cada ensayo realizado se muestran en los anexos (tabla 8.13).

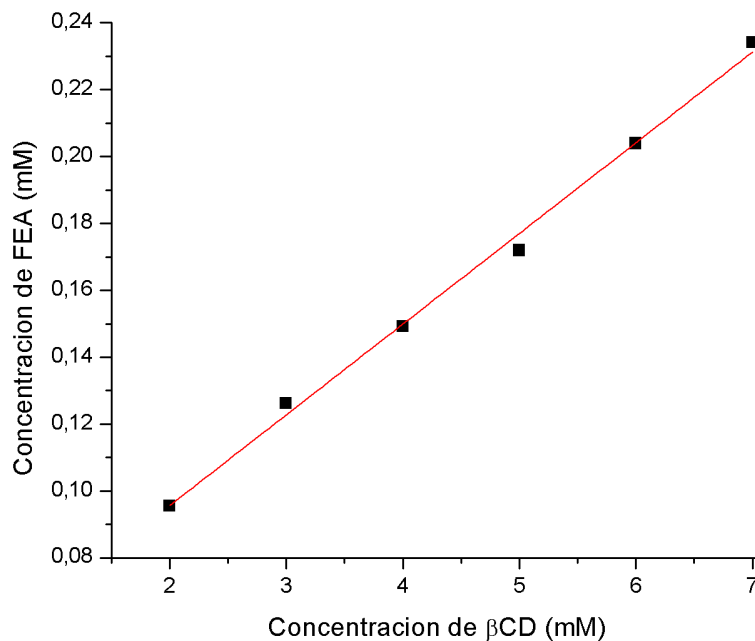


Figura 3.36: Gráfica lineal de diferentes concentraciones de FEA solubilizada versus las concentraciones de β CD agregada.

Las K_a de todos los sistemas fueron calculadas considerando una relación estequiométrica 1:1 matriz-huésped. Los valores obtenidos son apropiados para CI con aplicaciones biológicas en la entrega de fármacos (Rasheed, 2008; Loftsson, 2010). Se ha reportado extensamente que los usos farmacéuticos más comunes de las CD son mejorar la solubilidad, la estabilidad, la seguridad y la biodisponibilidad de los fármacos albergados, para ello es necesaria una reacción de formación favorable de los CI, con valores apropiados de sus constantes de asociación.

En general, los valores de K_a de los complejos de CD varían entre 50 y 2000 M^{-1} , debido, por una parte que a valores más bajos ($< 50 M^{-1}$) la viabilidad de una formulación farmacéutica puede estar limitada por su baja estabilidad sin favorecer una liberación controlada (por ejemplo, una liberación temprana en la sangre y no en el tejido deseado). Por otro lado, con valores altos de K ($> 2000 M^{-1}$) las velocidades de reacción pueden verse afectadas por el alto grado de inclusión del fármaco en la cavidad de la CD evitando la liberación y retrasando excesivamente su farmacocinética, entre otras posibles desventajas terapéuticas (Connors, 1997; Rao, 2003).

3.6. Estudios de la geometría de inclusión por ROESY

La técnica ROESY (*Rotacional overhauser enhancement spectroscopy*) permite observar las interacciones entre núcleos de hidrógenos de estructuras no enlazadas químicamente y que se encuentran a una distancia no mayor a 5 Å, por lo tanto, a través de esta técnica es posible determinar en solución la estructura geométrica de CI de CD con un alto grado de precisión. Entregando mayor información acerca de la organización supramolecular de estos sistemas, que un análisis de sus desplazamientos químicos (Schneider, 1998; Pessine, 2014).

Estudios ROESY permitieron confirmar la permanencia en solución de los complejos β CD-MP, β CD-MF, β CD-AT y β CD-FEA mostrando interacciones entre los núcleos de los hidrógenos internos de la CD con los diferentes fármacos. Se evaluaron los picos cruzados entre los protones de la cavidad de β CD con los protones C-H de MP. En el espectro de la figura 3.37 (a) se observó que el protón H-3 de la matriz posee una correlación intensa con el protón H'-8 y una correlación bastante menor con H'-2.

También se observó una correlación entre los protones H-5 con el protón H'-8. En el espectro (b) se observa la correlación entre el NH'-7 del fármaco y los protones H-3 de la matriz, mientras que el espectro (c) se muestra la correlación de los OH secundarios con H'-8. Considerando las correlaciones principales, es probable que el fármaco se encuentre orientado hacia la apertura más ancha de la β CD, exponiendo el grupo SH hacia el exterior, por la abertura más angosta.

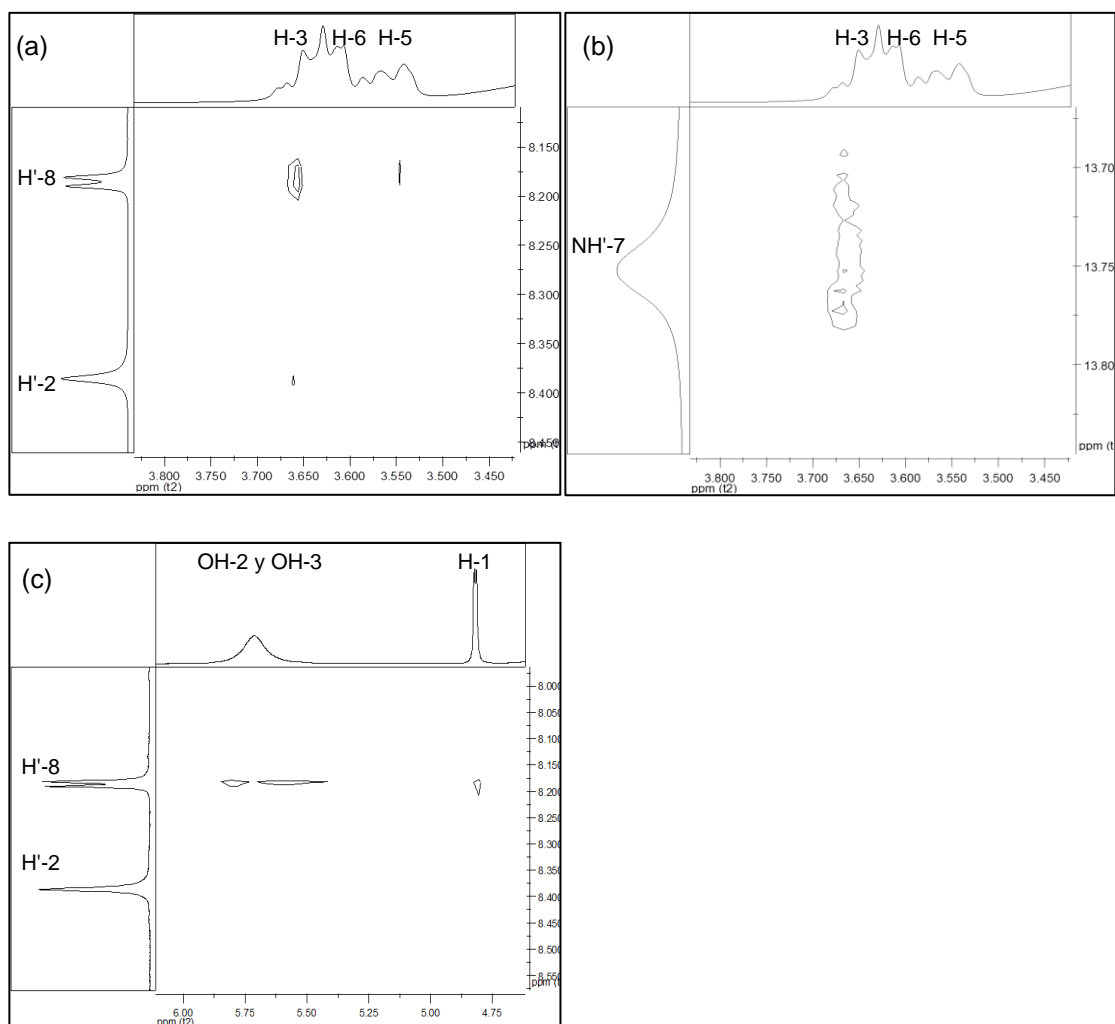


Figura 3.37: Espectros ROESY del complejo β CD-MP en DMSO- d_6 .

Un modelo que esquematiza la geometría propuesta se presenta en la figura 3.38.

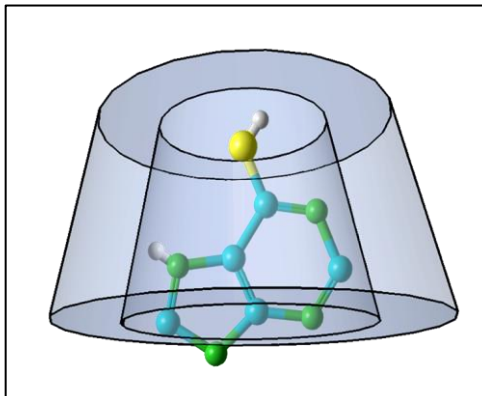


Figura 3.38: Geometría de inclusión propuesta para β CD-MP.

Los espectros ROESY del complejo β CD-MF se muestran en la figura 3.39. El análisis deja en manifiesto que el anillo aromático de MF que comprende los protones H'-2'/6' y H'-3'/5' presenta una correlación evidente con los protones H-3 de β CD y una correlación menos intensa con los H-5 (figura 3.39 a), esto indica que el anillo aromático se ubica en la zona más ancha de la matriz, la orientación exacta del fármaco puede ser elucidada a partir de los picos cruzados que se observaron entre los protones internos de β CD con el protón H'-3a de MF (figura 3.39 b). la cual revela que MF se encuentra expuesto hacia la apertura mayor y que por lo tanto las cadenas cloroetil se orientan hacia el otro extremo.

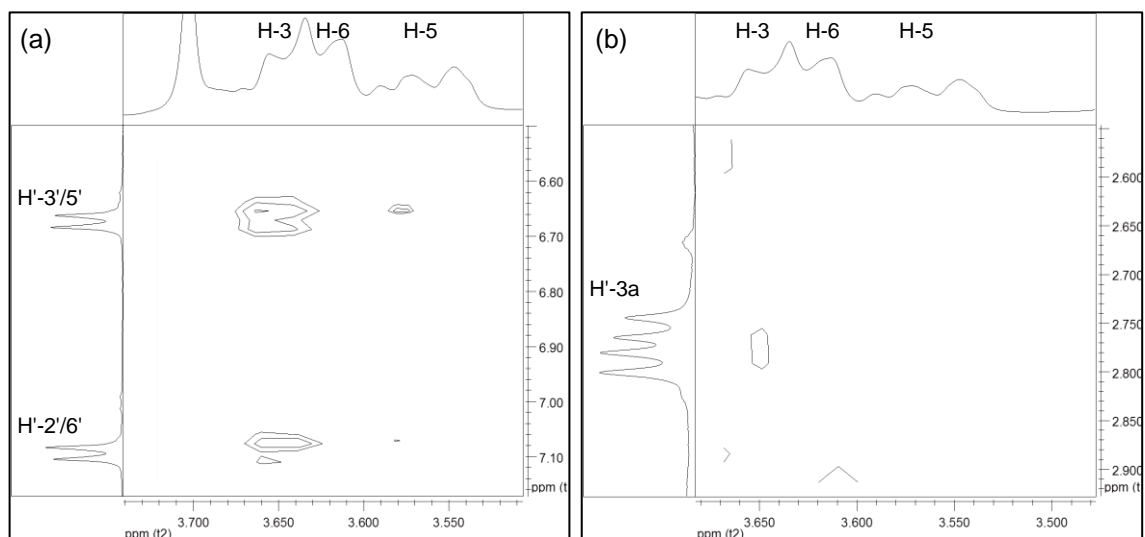


Figura 3.39: Espectros ROESY del complejo β CD-MF en DMSO-d_6 .

Estos resultados explican los desplazamientos químicos observados en los espectros $^1\text{H-RMN}$ y que los desplazamientos hacia campos más bajos de los OH-6 y de los protones H'-1'' y H'-2'' se debe a la interacción de los grupos hidroxilo primario con las cadenas cloroetil de MF. Un modelo que muestra la geometría de β CD-MF se muestra en la figura 3.40.

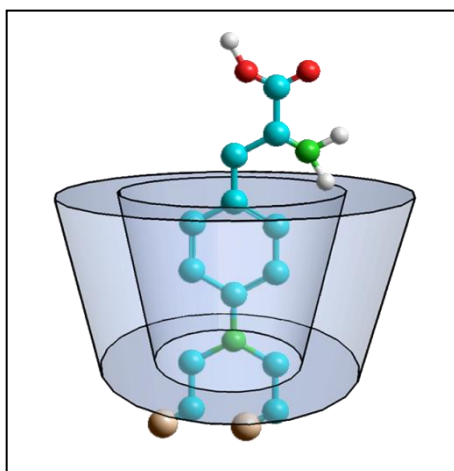


Figura 3.40: Geometría de inclusión propuesta para β CD-MF.

En la figura 3.41 y 3.42 se muestran los espectros ROESY para el complejo β CD-AT. La evaluación de los picos cruzados entre los protones internos de β CD y los protones H'-2'/6' y H'-3'/5' que comprenden el anillo aromático de AT muestran la efectiva inclusión del fármaco (figura 3.41 a). Específicamente la correlación del anillo se observa con los protones H-3 y H-5 de la matriz indicando una orientación prioritaria del fármaco hacia la cavidad más ancha. Del espectro ROESY (figura 3.41 b) y la correlación observada entre el anillo aromático de AT y los grupos hidroxilo tanto primarios como secundarios de β CD se pudo inferir que las moléculas del fármaco se encuentran albergadas por la parte angosta del balde, pero también desde la zona más ancha, lo que implica que no exista un mecanismo único de inclusión.

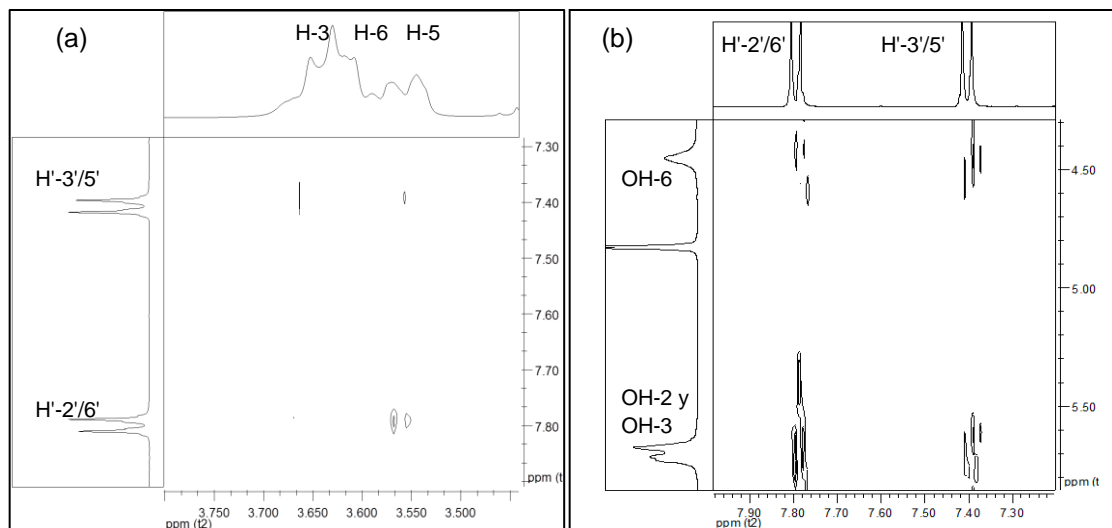


Figura 3.41: Espectros ROESY del complejo β CD-AT en DMSO- d_6 .

El espectro ROESY de la figura 3.42 es la evaluación de los picos cruzados entre los protones de los grupos hidroxilos de la matriz y el protón H'-5 de AT. El espectro muestra la correlación intensa entre los grupos OH-2 y OH-3 de β CD y el protón H'-5. Una correlación menos intensa se observó para los grupos OH-6 con el protón H'-5. La geometría de inclusión para el fármaco en β CD es por tanto de dos formas, las que se esquematizan en la figura 3.43.

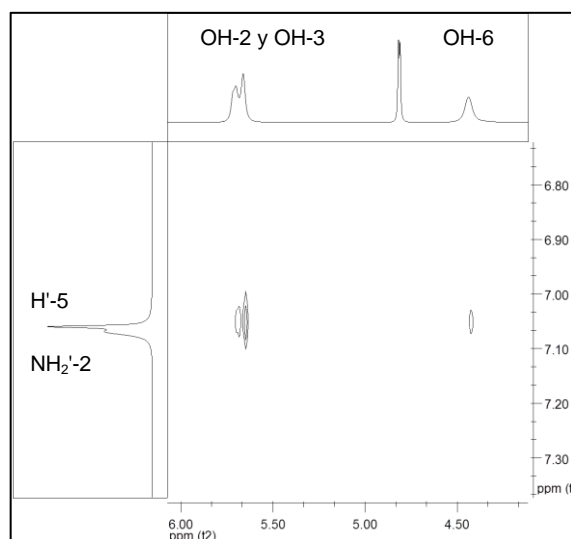


Figura 3.42: Espectro ROESY del complejo β CD-AT en DMSO-d_6 .

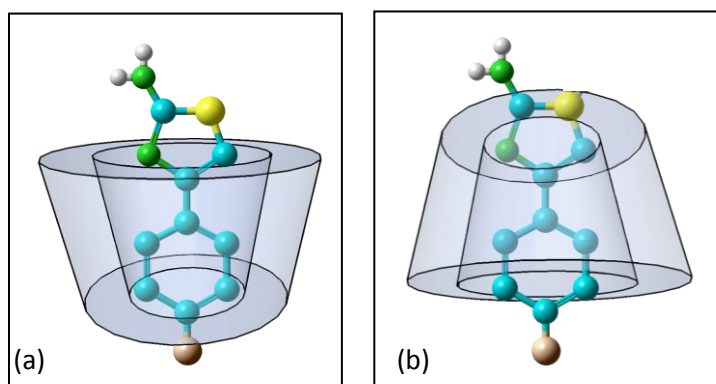


Figura 3.43: Geometría de inclusión propuesta para β CD-AT.

Un análisis de la disposición del huésped FEA al interior de la cavidad de la β CD se realizó por ROESY. En la figura 3.44 a y b se muestran los picos cruzados producidos por la interacción entre los protones de la cadena etilamina ($H'-1$ y $H'-2$) y del anillo aromático ($H'-2'/6'$, $H'-3'/5'$ y $H'-4'$) de FEA con los protones H-3, H-5 y H-6 de la β CD. Las diferentes intensidades demuestran que existe una mayor correlación entre los protones de la cadena del huésped con los protones H-6 de la β CD, y entre los protones del anillo aromático de FEA con los protones H-5 y H-6 de la β CD, lo que indica que el huésped está orientado con el grupo amina hacia la apertura más estrecha de la matriz.

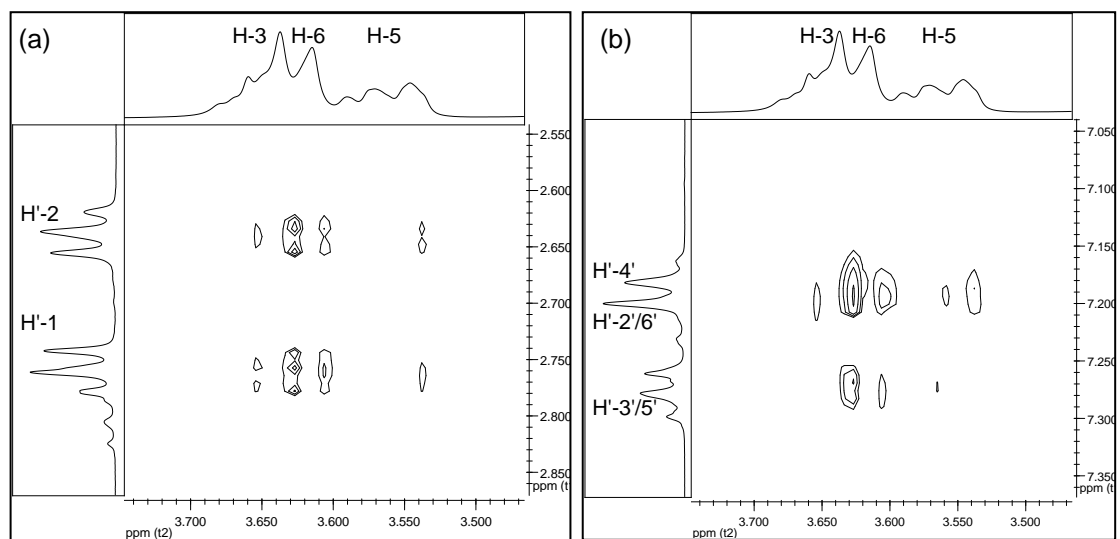


Figura 3.44: Espectros ROESY del complejo β CD-FEA en $DMSO-d_6$.

Basado en el análisis de los espectros ROESY, la figura 3.45 muestra una representación esquemática de la geometría de inclusión del complejo β CD-FEA formado.

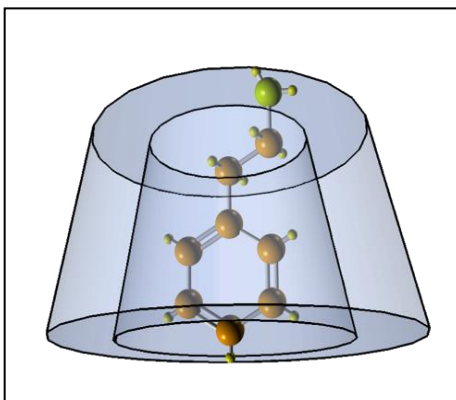


Figura 3.45: Geometría de inclusión propuesta para β CD-FEA.

Este resultado es importante para entender la disposición del complejo en solución. Para todos los casos, los grupos funcionales de cada fármaco permanecen fuera de la cavidad lo cual es necesario para mantener una interacción con los átomos de la superficie de las NPsM. Los espectros ROESY completos de todos los CI discutidos se encuentran en la sección de anexos (capítulo 8).

Una vez caracterizados los complejos β CD-TG, β CD-MP, β CD-MF, β CD-AT y β CD-FEA, en estado sólido y en solución, se obtuvieron NPsAu y NPsAg que fueron depositadas sobre cristales de estos complejos formando diferentes sistemas ternarios comprendidos por β CD-Fármaco-NPsM, sus caracterizaciones se detallan en el capítulo siguiente.

CAPÍTULO 4

Resultados y discusión

Interacción de nanopartículas de Au y Ag con complejos de inclusión

La obtención y depósito de NPs de Au y Ag se realizó usando el método físico de PC en alto vacío. La técnica consiste en la desintegración de una lámina metálica delgada, los átomos desprendidos se estabilizan a través de su interacción sobre el material que actúa como sustrato. La inclusión parcial de los fármacos seleccionados en β CD expone los grupos funcionales tiol, amina y/o ácido carboxílico de sus estructuras hacia una de las aperturas de la matriz. Cuando los complejos alcanzan el estado sólido, ciertas caras cristalinas exhiben los grupos funcionales antes nombrados, permitiendo que la superficie de los CI pueda estabilizar átomos altamente reactivos producidos por PC acumulándose en función del tiempo de exposición a la técnica y obteniéndose finalmente las NPsM.

A continuación se detallarán los resultados obtenidos sobre la interacción de los complejos β CD-TG, β CD-MP, β CD-AT y β CD-FEA con NPsAu y de los complejos β CD-TG y β CD-MF con NPsAg.

4.1. Espectroscopia UV-Vis en estado sólido

Debido a las propiedades ópticas que presentan las NPsM, los sistemas supramoleculares con NPsAg y NPsAg fueron caracterizados mediante espectroscopia UV-Vis en estado sólido. Primero se evaluó la reflectancia difusa de todas las muestras y luego, a través de la transformación matemática Kubelka-Munk (Kubelka, 1931) fueron obtenidas sus absorbancias.

Para NPs esféricas de 10nm de diámetro promedio, se ha determinado un efecto de plasmón para oro y plata con máximos de absorbancia a longitudes de onda de 520 nm y 400 nm, respectivamente (Creighton, 1991). A través del análisis del espectro de la figura 4.1, que corresponde a NPsAu depositadas durante 20 s sobre el polvo cristalino de β CD-TG, se observó un plasmón con un máximo de absorción a 524 nm. El desplazamiento batocrómico de la banda puede deberse a varios factores, entre ellos al mayor tamaño de estas nanoestructuras, o al cambio en el medio, incluso cuando las NPsM están soportadas sobre un sustrato, o también debido al fenómeno de acoplamiento interpartículas provocado por la proximidad que existe entre nanoesferas estabilizadas en estado sólido (Chen, 2013; Daniel, 2004; Lance, 2003; Mock, 2003; Okamoto, 2003; Su, 2003).

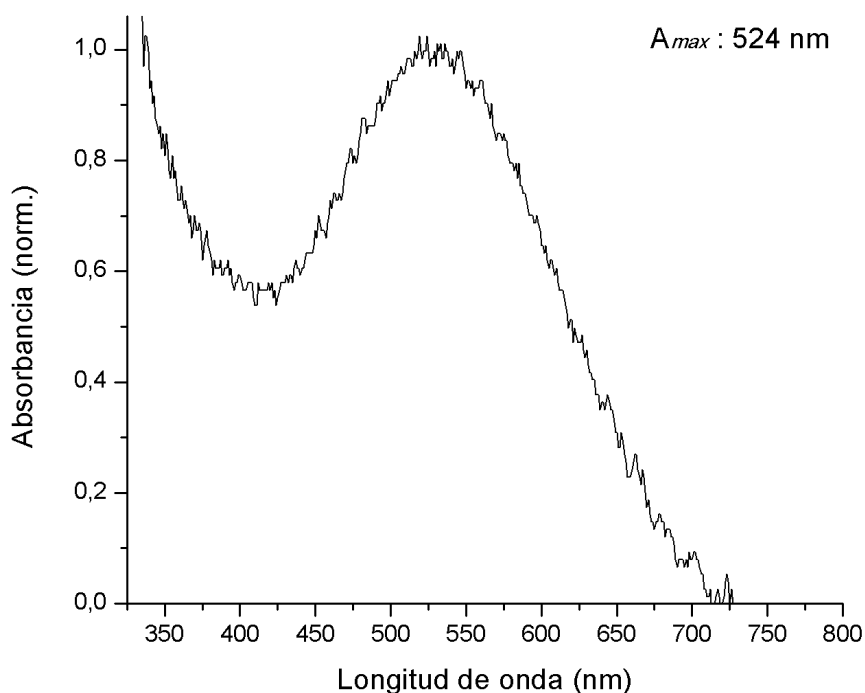
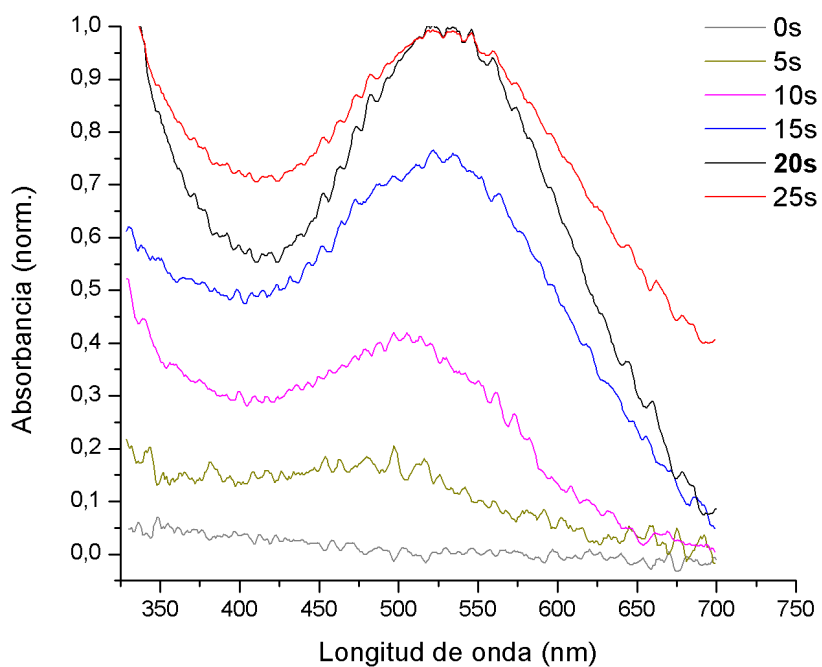
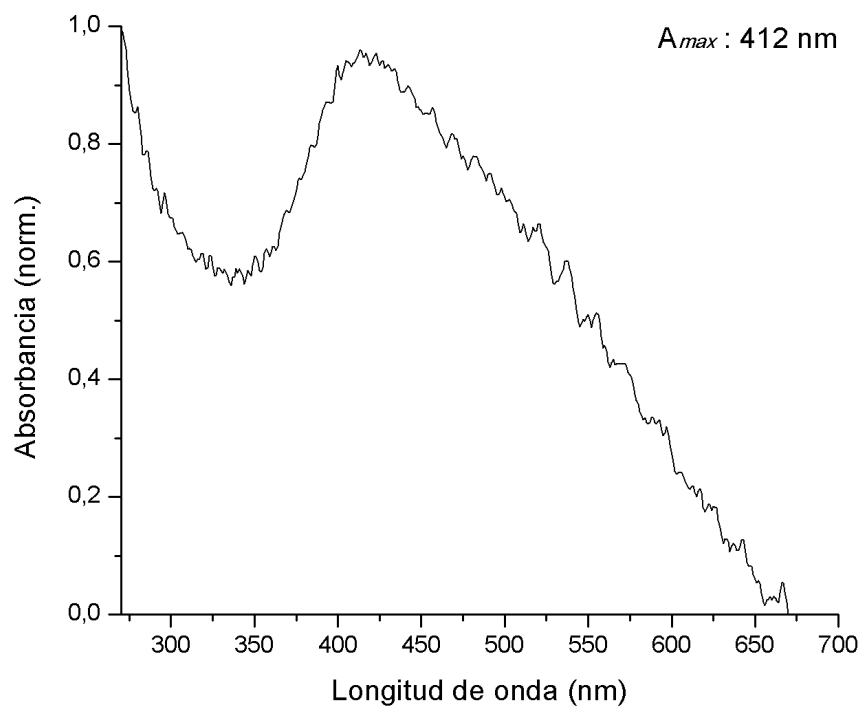


Figura 4.1: Espectro de absorción de NPsAu sobre β CD-TG por 20 s de PC.

La estabilización de NPsM sobre el complejo β CD-TG se logró desde los primeros segundos de PC. Una manera fácil de corroborar el posicionamiento efectivo de las NPs en el complejo, es observando el tinte característicos de los cristales al generarse el plasma, fenómeno reportado por Fujiki y colaboradores en el año 2006. Los cristales de la muestra pasan de un color blanco a uno morado pálido para el caso de NPsAu, y a un color amarillo arena para NPsAg. En ambos, el cambio en su coloración informa sobre el posicionamiento efectivo de las NPsM en el complejo, acrecentándose aún más el color, en función al tiempo de exposición de la muestra a la técnica.

Un estudio del depósito de NPs en función del tiempo de exposición del polvo cristalino, al equipo de PC, se detalla en la figura 4.2. Se aplicaron tiempos exposición al equipo de 5 s hasta obtener una relación ancho de banda e intensidad de absorción óptimo, el cual fue alcanzado para los primeros 20 s. A mayores tiempos, la intensidad no varía considerablemente, sin embargo, si lo hace el ancho de la banda, lo que implica un aumento en la dispersión de tamaños.

En la figura 4.3 se presenta el espectro de absorbancia para NPsAg depositadas sobre β CD-TG durante 25 s, observándose el máximo a 412 nm. Cabe destacar que en comparación a la obtención de NPsAu, el tiempo requerido para la formación óptima de NPsAg fue mayor.

Figura 4.2: Espectros de absorción de NPsAu sobre β CD-TG a diferentes tiempos de PC.Figura 4.3: Espectro de absorción de NPsAg sobre β CD-TG por 20 s de PC.

El polvo cristalino del complejo β CD-MP fue utilizado como sustrato para la obtención de NPsAu, el depósito efectivo fue confirmado mediante absorción UV-Vis en sólido. El espectro mostrado en la figura 4.4 corresponde al plasmón superficial de las NPs depositadas durante 20 s, con un máximo de absorbancia a 521 nm.

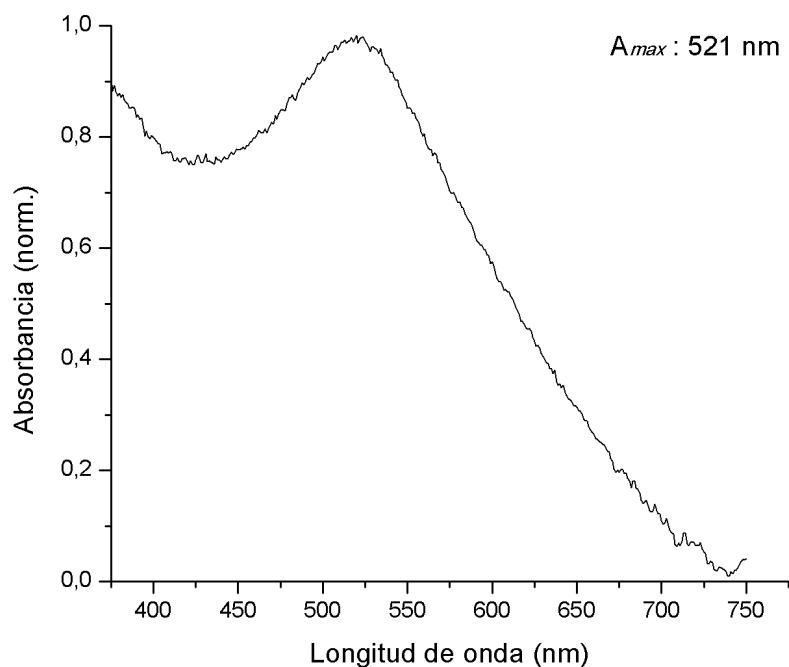


Figura 4.4: Espectro de absorción de NPsAu sobre β CD-MP por 20 s de PC.

La figura 4.5 corresponde al espectro de absorción de NPsAg depositadas sobre cristales de β CD-MF durante 20 s. Existen algunos reportes de formación de NPsAg mediante PC, adheridas a diferentes tipos de sustratos y fabricadas bajo diferentes condiciones (Okumu, 2005; Wong-eg, 2010; Asanithi, 2012; Herrera, 2013), a pesar de sus conocidas propiedades ópticas, los estudios mediante espectroscopia UV-Vis en sólido, son limitados. Herrera y colaboradores discutieron el efecto de plasmón superficial de NPsAg depositadas sobre cristales de α CD con huéspedes alifáticos, atribuyendo los cambios en el máximo de absorbancia de sus espectros al cambio de

tamaños, el acoplamiento interpartícula y al cambio en el entorno dieléctrico. El máximo de absorbancia ubicado a 450 nm puede ser atribuido a un aumento en el tamaño del nanomaterial o al acoplamiento de las oscilaciones dipolares, provocado por la menor distancia interpartícula.

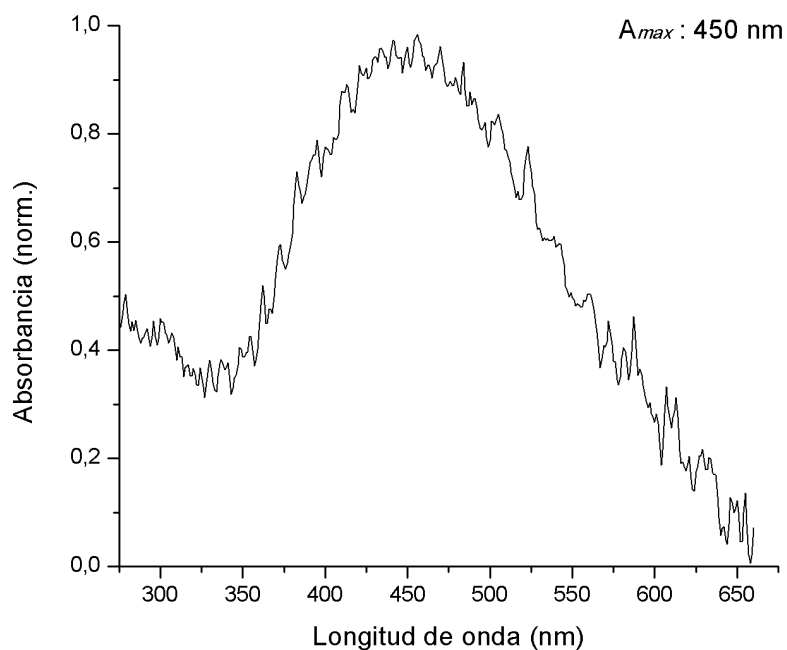
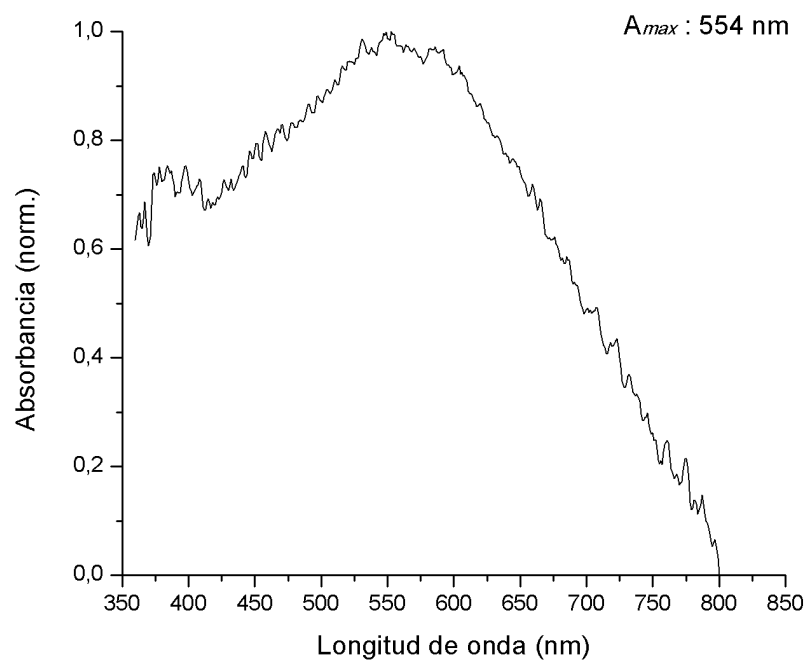
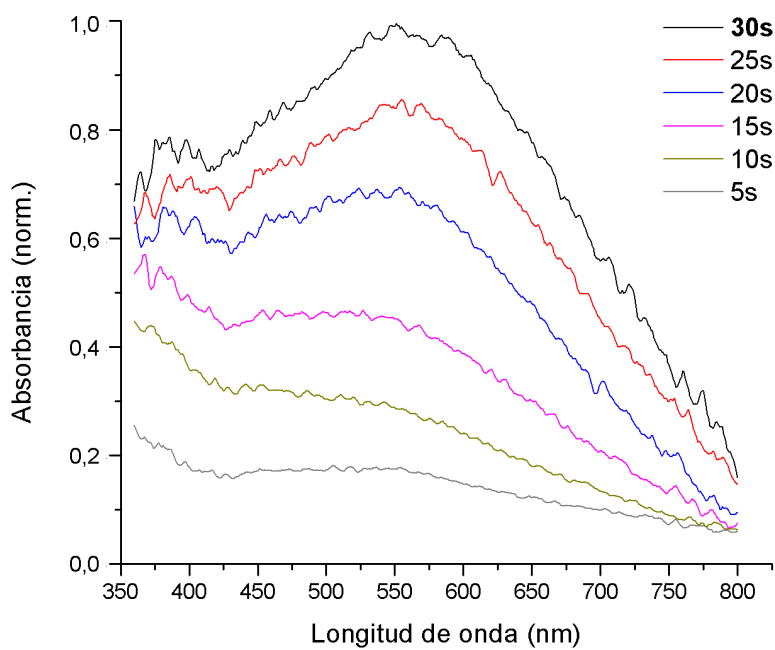


Figura 4.5: Espectro de absorción de NPAg sobre β CD-MF por 20 s de PC.

El depósito de NP_{Au} sobre cristales de β CD-AT presentó una absorbancia óptima a 30 s de PC, la figura 4.6 muestra el plasmón de las NP_{Au} con un máximo de absorbancia a 554 nm. El tiempo de formación y depósito de NPs sobre el CI aumentó respecto a los otros sistemas anteriormente estudiados, se realizó un seguimiento a diferentes tiempos, los espectros de absorción se muestran en la figura 4.7.

Figura 4.6: Espectro de absorción de NPs Au sobre β CD-AT por 30 s de PC.Figura 4.7: Espectros de absorción de NPs Au sobre β CD-AT a diferentes tiempos de PC.

En la figura 4.8 se muestra el espectro de absorción de NPsAu depositadas sobre el polvo cristalino del complejo β CD-FEA con un máximo a 533 nm. Es posible observar en el espectro que el plasmón tiene una alta relación intensidad/ancho de banda con respecto a los otros sistemas estudiados.

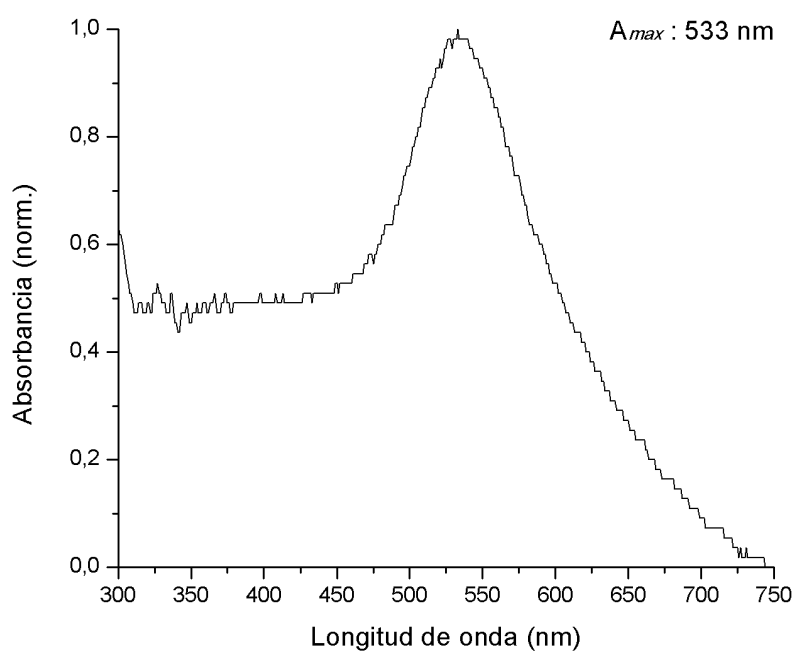


Figura 4.8: Espectro de absorbancia de NPsAu sobre β CD-FEA por 20 s de PC.

El aumento en el ancho de banda y los desplazamientos de las absorciones hacia mayores longitudes de onda pueden deberse al acoplamiento de las oscilaciones dipolares de las NPs cuando se encuentran estabilizadas sobre un sustrato sólido, provocado por la menor distancia entre estas. Cuando las NPsM se encuentran más próximas unas de otras, los electrones resonantes de unas perciben el campo eléctrico

generado por la oscilación electrónica de las partícula vecinas, promoviendo la absorción colectiva (Ghosh 2007; Su, 2003; Ulrich, 2004). Este fenómeno podría explicar la diferencia del plasmón entre las NPs de Au y de Ag soportadas sobre un sustrato en estado sólido, en contraste con el de las mismas NPs en solución.

Fue posible controlar el crecimiento de la banda plasmónica de las nanoestructuras obtenidas por PC en función del tiempo de exposición de los cristales a la técnica. Las NPsM fueron estabilizadas debido al fenómeno CLAMS anteriormente discutido, el cual depende del grado de ordenamiento de los grupos funcionales expuestos en su superficie. En todos los sistemas estudiados se demostró que los planos cristalinos que forman las caras superficiales de los cristales actúan como sustrato estabilizando átomos de Au o Ag liberados desde la lámina metálica, formando NPsAu y NPsAg que crecen en tamaño cuando el tiempo de PC aumenta.

Los resultados obtenidos por UV-Vis en estado sólido fueron homologados a través de técnicas de microscopía electrónica. A continuación se describen a través de imágenes SEM y TEM la morfología de los cristales, el depósito de NPsM sobre ciertos planos superficiales y el tamaño que alcanzan estas nanoestructuras.

4.2. Imágenes de SEM y TEM de los sistemas ternarios

Los cristales de los complejos con NPsM fueron caracterizados por SEM con un equipo de análisis EDX acoplado para conocer la morfología de los sólidos formados y a su vez corroborar la presencia de NPs de Au y Ag en las muestras. Mediante TEM fue posible determinar el tamaño promedio de las NPsM realizando un conteo estadístico de las imágenes obtenidas para cada sistema ternario. Las NPsM depositadas sobre los diferentes CI formando los sistemas ternarios se enlistan a continuación:

- | | |
|------------------------|-------------------------|
| 1. β CD-TG-NPsAu | 4. β CD-MF-NPsAg |
| 2. β CD-TG-NPsAg | 5. β CD-AT-NPsAu |
| 3. β CD-MP-NPsAu | 6. β CD-FEA-NPsAu |

En la figura 4.9 se muestran imágenes del polvo de β CD sin huésped y recubierto con Au durante 90 s, el cual no presenta una morfología cristalina definida, debido probablemente a los diferentes empaquetamientos que puede presentar cuando solo alberga moléculas de agua, sin un arreglo cristalino característico (Caira, 2001). Es conocido que las moléculas de agua se pueden encontrar en monocristales, polvos o incluso en CI de CD, actuando como huéspedes debido a su inserción dentro de las cavidades, además de encontrarse fuera de estas. Por lo tanto, es evidente que la conformación de cristal de las CD depende también de la cantidad de moléculas de agua. Debido a la presencia de los grupos hidroxilos en los bordes de la CD, algunas moléculas de agua están situadas cerca de las aberturas de su cavidad mediante puentes de hidrógeno, y otras encapsuladas dentro de un conjunto de CD apiladas sin ingresar necesariamente a la cavidad, adquiriendo diferentes distribuciones de densidad de agua dentro, fuera y entre matrices vecinas (Dang, 2011).

Por otra parte, la β CD muestra un fenómeno de polarización que hace difícil su caracterización. Esto es debido a las condiciones de vacío y voltajes generados a los que se somete un sustrato para realizar un estudio por SEM, el material orgánico puede desfigurarse su morfología superficial o quebrarse si no es buen conductor. Por lo tanto fue necesario recubrir la muestra con Au por PC durante 90 s.

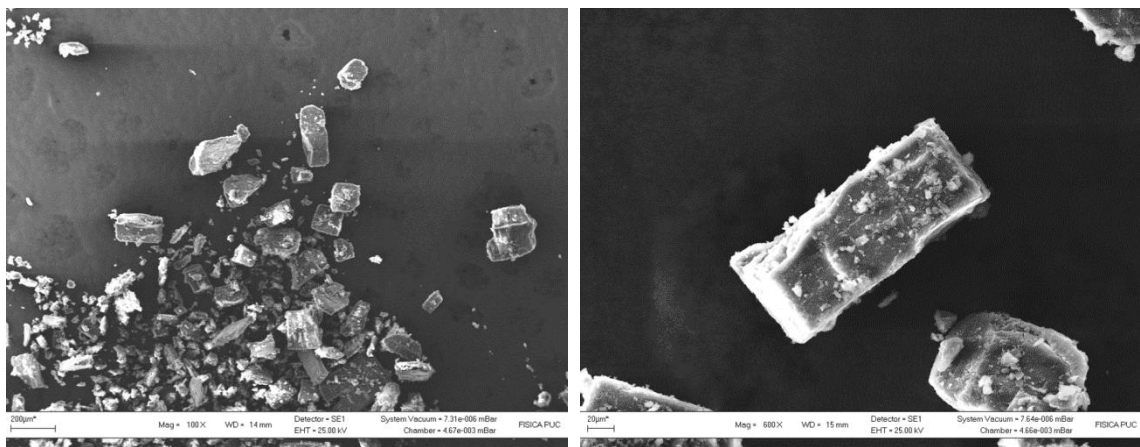


Figura 4.9: Imágenes SEM del polvo de β CD recubierto con Au por 90 s.

Se realizó un estudio a diferentes tiempos de PC con NPsAu únicamente a la matriz β CD sin fármacos albergados y bajo las mismas condiciones que las descritas para los CI formados, con el fin de observar si β CD es capaz de estabilizar NPsM sin la presencia de un huésped.

El depósito no fue efectivo para los primeros 32 s de PC, ya que no se visualizó el tinte morado característico de los cristales con NPsAu, y así fue corroborado en el estudio de microscopía, no se obtuvieron imágenes SEM para β CD con un aumento superior a 40000x. Para tiempos de 64 s y 100 s las imágenes fueron obtenidas con una tensión de voltaje o EHT de sus siglas en inglés (*extra high tension*) no superior a 15kV, aun así, las muestras se cargaron; y no fue posible observar NPsAu en ninguna de sus caras. Las imágenes (figura 8.13) se muestran en la sección de anexos (capítulo 8).

Estos resultados concuerdan con el estudio por espectroscopia UV-Vis donde no se reveló la banda plasmónica para NPsAu sobre polvo cristalino de β CD a diferentes tiempos de PC. Es necesario por lo tanto la presencia de los grupos funcionales SH, NH₂ o COOH que forman parte de las estructuras moleculares de cada fármaco para que los átomos o pequeños clúster producidos por la técnica, se establezcan sobre el polvo del CI formando las NPsM.

En la figura 4.10 se presentan imágenes SEM de cristales del complejo β CD-TG-NPsAu que fueron sometidos a PC durante 60 s para poder ser observados en el microscopio. El complejo obtenido posee una morfología diferente y visiblemente más cristalina que β CD pura, esta contraposición de apariencias se correlaciona con los cambios en el patrón difractométrico del CI discutido en el capítulo anterior (sección 3.1.) corroborándose la formación de una nueva estructura cristalina.

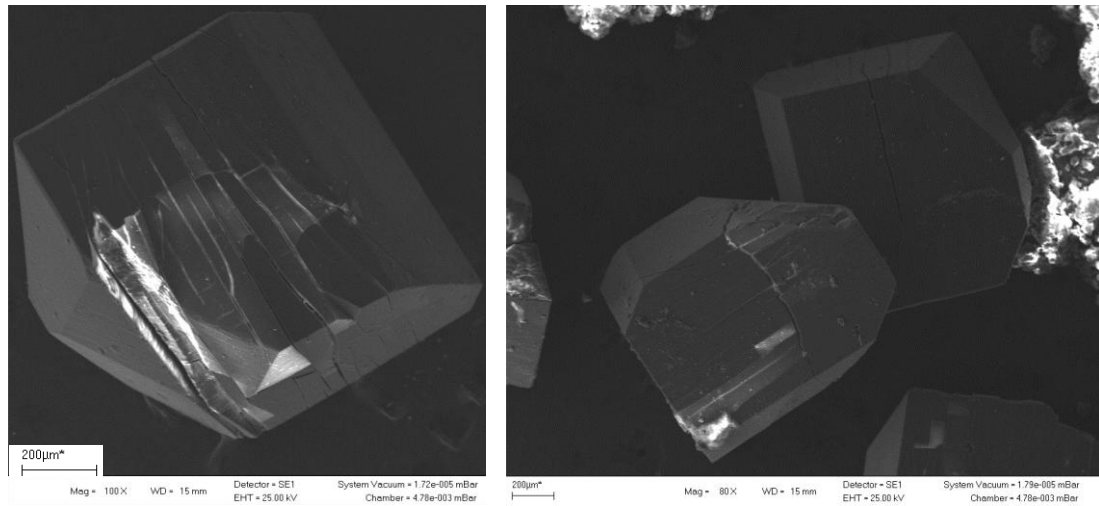


Figura 4.10: Imágenes SEM para cristales de β CD-TG con NPsAu depositadas por 60 s.

Al igual que la comparación en los patrones de DRXP descritos en el capítulo anterior, fue posible comparar la disposición geométrica de los cristales por SEM observando sus diferencias morfológicas, en la figura 4.11 se presentan imágenes de cristales de TG pura las que se contraponen con la forma que adquieren los cristales de β CD-TG.

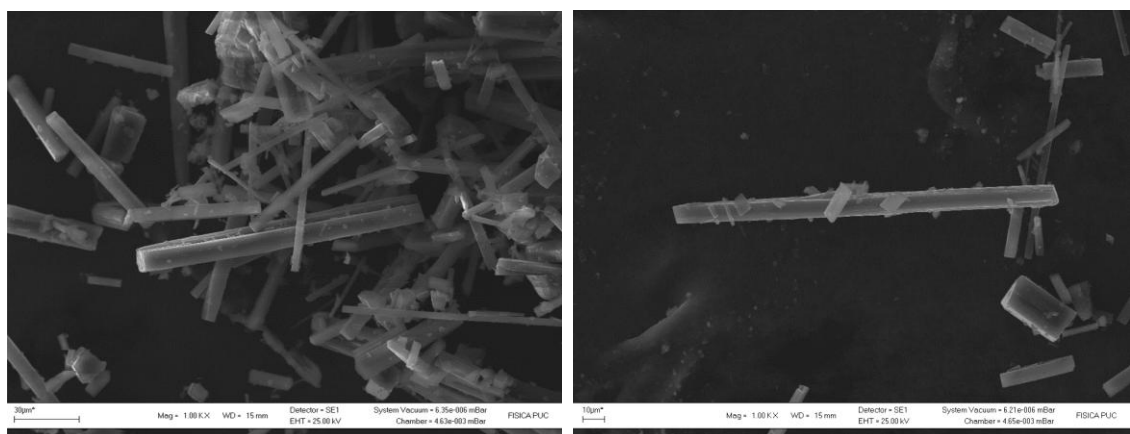


Figura 4.11: Imágenes SEM para cristales de TG pura recubiertos con Au por 60 s.

Un análisis elemental de los cristales del complejo β CD-TG-NPsAu fue realizado. En la figura 4.12 se muestra una micrografía SEM con análisis EDX del depósito de NPsAu por PC durante 20 s, en el cual se encontraron, además de los elementos que naturalmente conforman el compuesto, la presencia de Au.

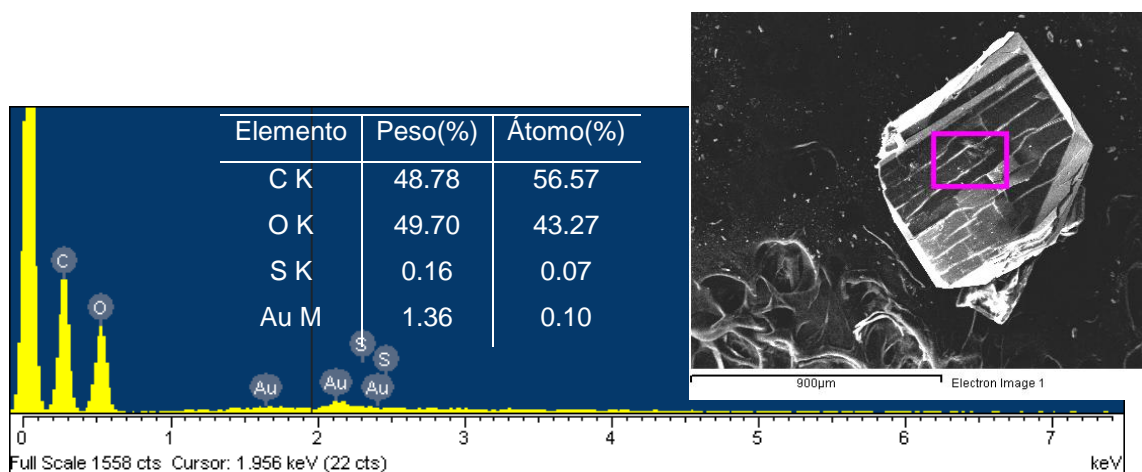


Figura 4.12: Imagen SEM y análisis EDX de β CD-TG con NPsAu depositadas por 20 s.

Imagen SEM y análisis EDX para cristales de β CD-TG con NPsAg depositadas por PC durante 30 s, se presentan en la figura 4.13.

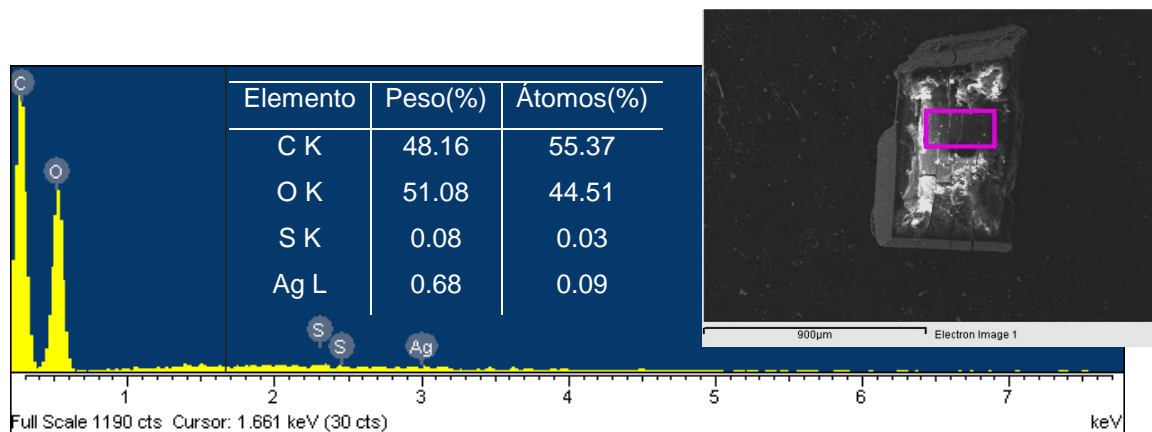


Figura 4.13: Imagen SEM y análisis EDX de β CD-TG con NPsAg depositadas por 20 s.

A través de microscopía de alta resolución (*field emission* SEM o FE-SEM), fue posible observar de forma directa las NPsM depositadas sobre caras específicas del polvo cristalino de los CI estudiados. Para imágenes de cristales de β CD-TG (Figura 4.14), se muestran NPsAu obtenidas por PC durante 60 s con un buen control de tamaño sobre las caras del cristal, sin un plano específico.

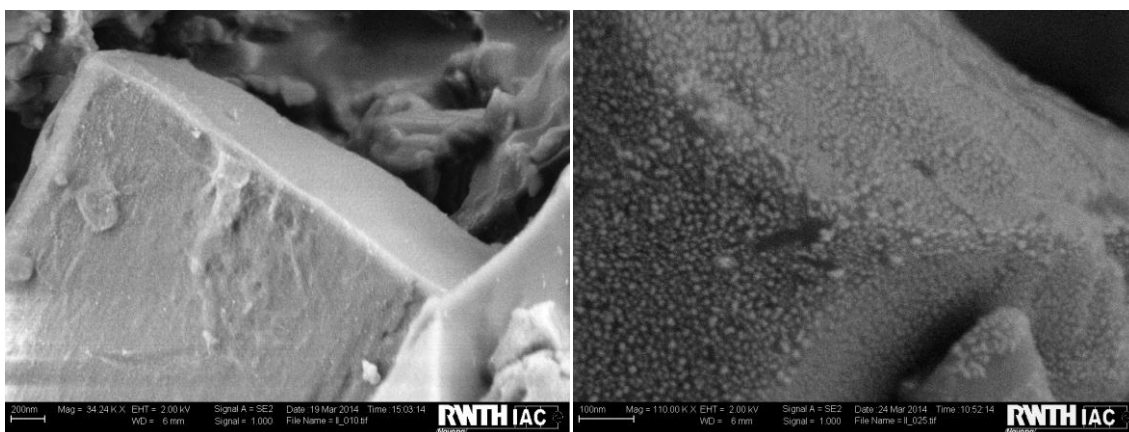


Figura 4.14: Imágenes de FE-SEM de β CD-TG con NPsAu depositadas por 60 s.

Para determinar si el tiempo es un factor determinante por el cual las NPs no residen en un solo plano preferencial, sino más bien se estabilizan alrededor de todo el cristal, fue necesario estudiar diferentes tiempos de exposición de las muestras al equipo, en la figura 4.15 se muestran cristales de β CD-TG con 32 s de NPsAu, si bien el tamaño y concentración de estas nanoestructuras es evidentemente menor, y la mayoría de las nanoesferas se observaron en una sola cara, el depósito para este tiempo tampoco fue selectivo.

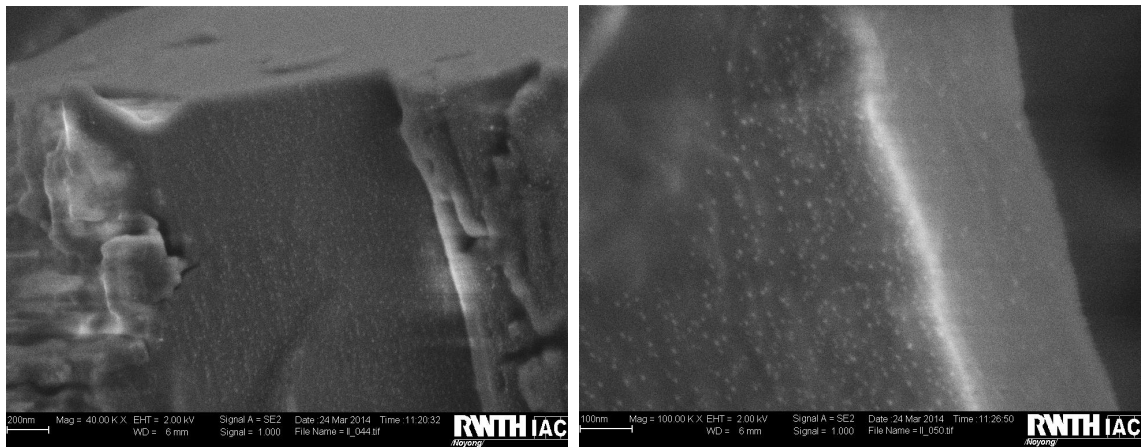


Figura 4.15: Imágenes de FE-SEM de β CD-TG con NPsAu depositadas por 32 s.

El mismo estudio fue llevado a cabo para β CD-TG con NPsAg (Figura 4.16). Evaluados a un tiempo de exposición de 32 s, se observó un depósito mayoritario de NPsAg en una cara del cristal, sin embargo no se descarta la presencia de NPsAg más pequeñas en otras caras del complejo.

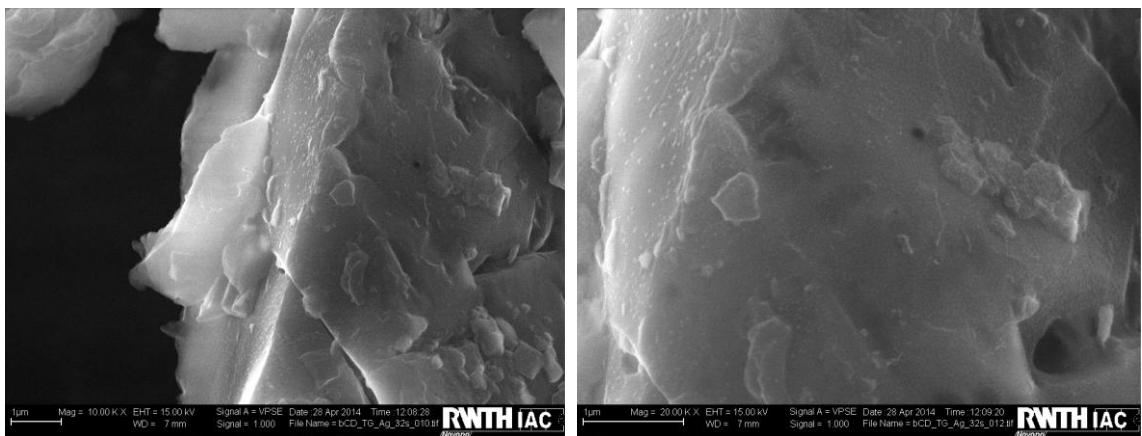


Figura 4.16: Imágenes de FE-SEM de β CD-TG con NPsAg depositadas por 32 s.

Debido a que el depósito de NPs de Au y Ag en β CD-TG, no fue específico en una sola cara de los cristales es probable que el tipo de empaquetamiento cristalino sea del tipo caja (ver figura 3.2), en donde las CD se orientan a diferentes ángulos, y la región que expone a los grupos funcionales permanece en todos los planos superficiales del cristal.

Se realizó un estudio por TEM para determinar el tamaño de las NPs de Au y Ag depositada sobre los cristales de β CD-TG. En la figura 4.17 se muestra una imagen TEM de NPs Au sobre β CD-TG depositadas por 20 s y en la figura 4.18 se muestra una imagen de NPs Ag bajo las mismas condiciones. Se calculó un tamaño promedio de 23 nm y 21 nm respectivamente.

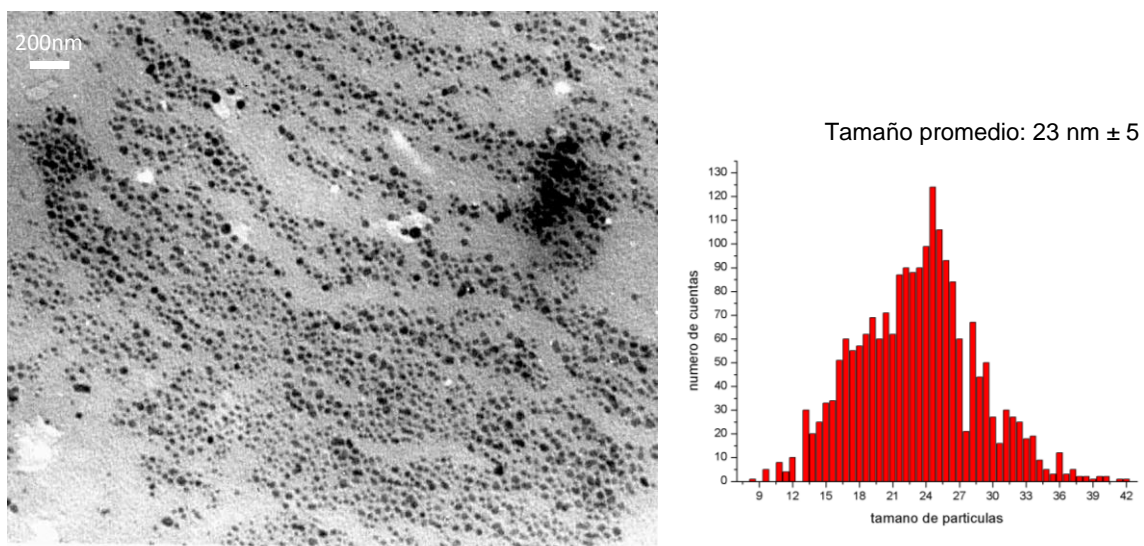


Figura 4.17: Imagen TEM de NPs Au sobre β CD-TG (20 s) con su respectivo histograma de tamaños.

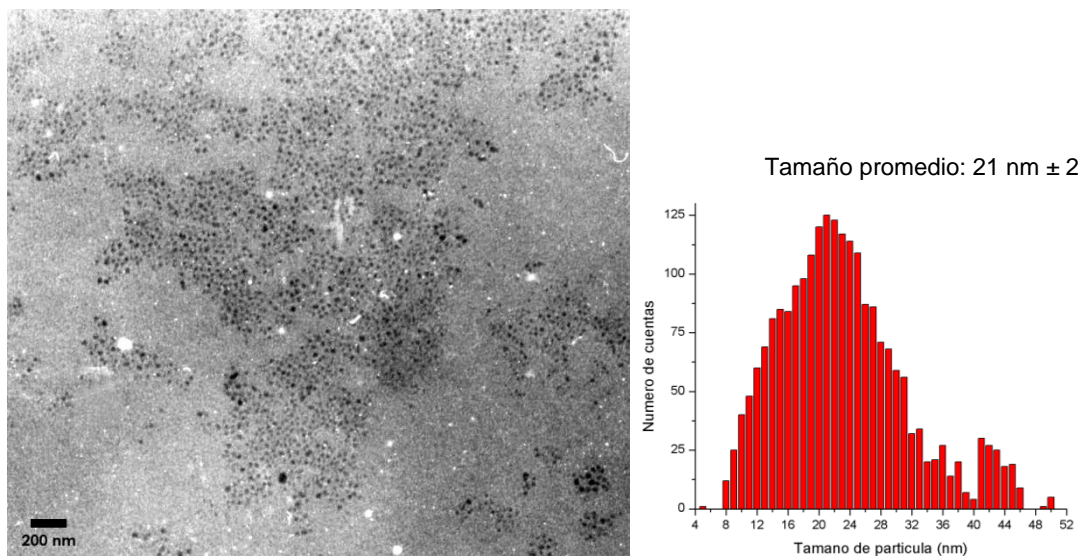


Figura 4.18: Imagen TEM de NPsAg sobre β CD-TG (20 s) con su respectivo histograma de tamaños.

El sistema β CD-MP-NPsAu en estado sólido fue caracterizado por SEM y EDX. Las muestras fueron recubiertas con Au durante 60 s, generando mayor conducción en el material. La figura 4.19 corresponde a imágenes de los cristales del complejo, extraídos directamente desde los precipitados de la disolución y cuidadosamente secados al vacío para no generar alteraciones importantes en su estructura.

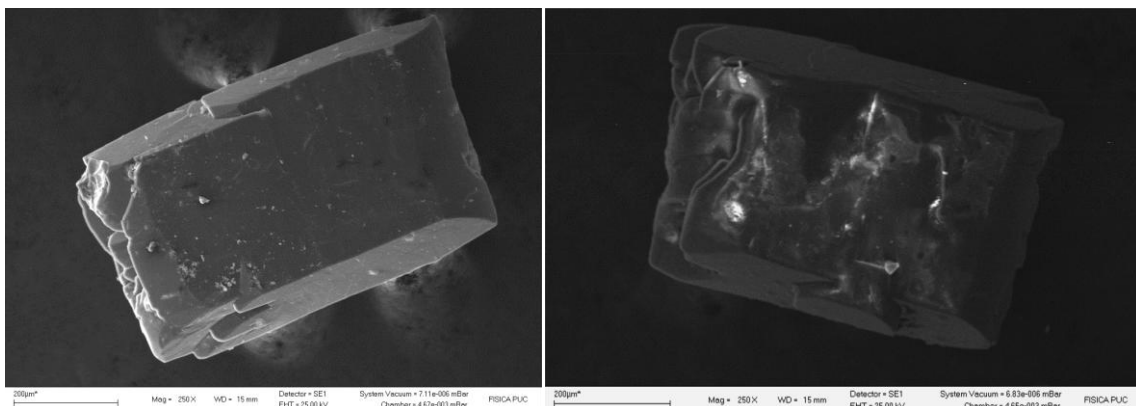


Figura 4.19: Imágenes SEM para cristales de β CD-MP con NPsAu depositadas por 60 s.

Imágenes de SEM de MP pura recubiertas con Au por 60 s se presentan en la figura 4.20. La morfología es completamente diferente con respecto al sólido de β CD-MP-NPsAu formado.

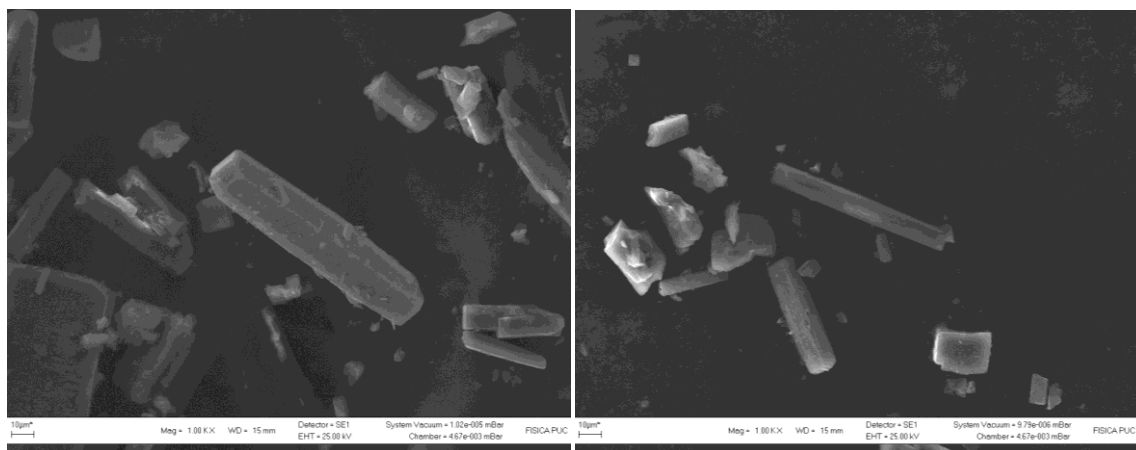


Figura 4.20: Imágenes SEM para cristales de MP pura recubiertos con Au por 60 s.

Una comparación entre dos caras del mismo cristal de β CD-MP-NPsAu se muestra en las imágenes SEM y el análisis EDX adjunto (Figura 4.21), la composición porcentual de todos sus elementos varía según el cambio de plano analizado, junto con ello se observó un aumento en el porcentaje de Au en directa relación con el aumento del porcentaje de S. Las NPsAu interactúan con el grupo funcional de la molécula huésped, en este caso SH (Häkkinen, 2012). Si los grupos están expuestos en una cara específica del cristal, la estabilización de NPsAu será preferencial en ese plano (Barrientos, 2007; Herrera, 2013).

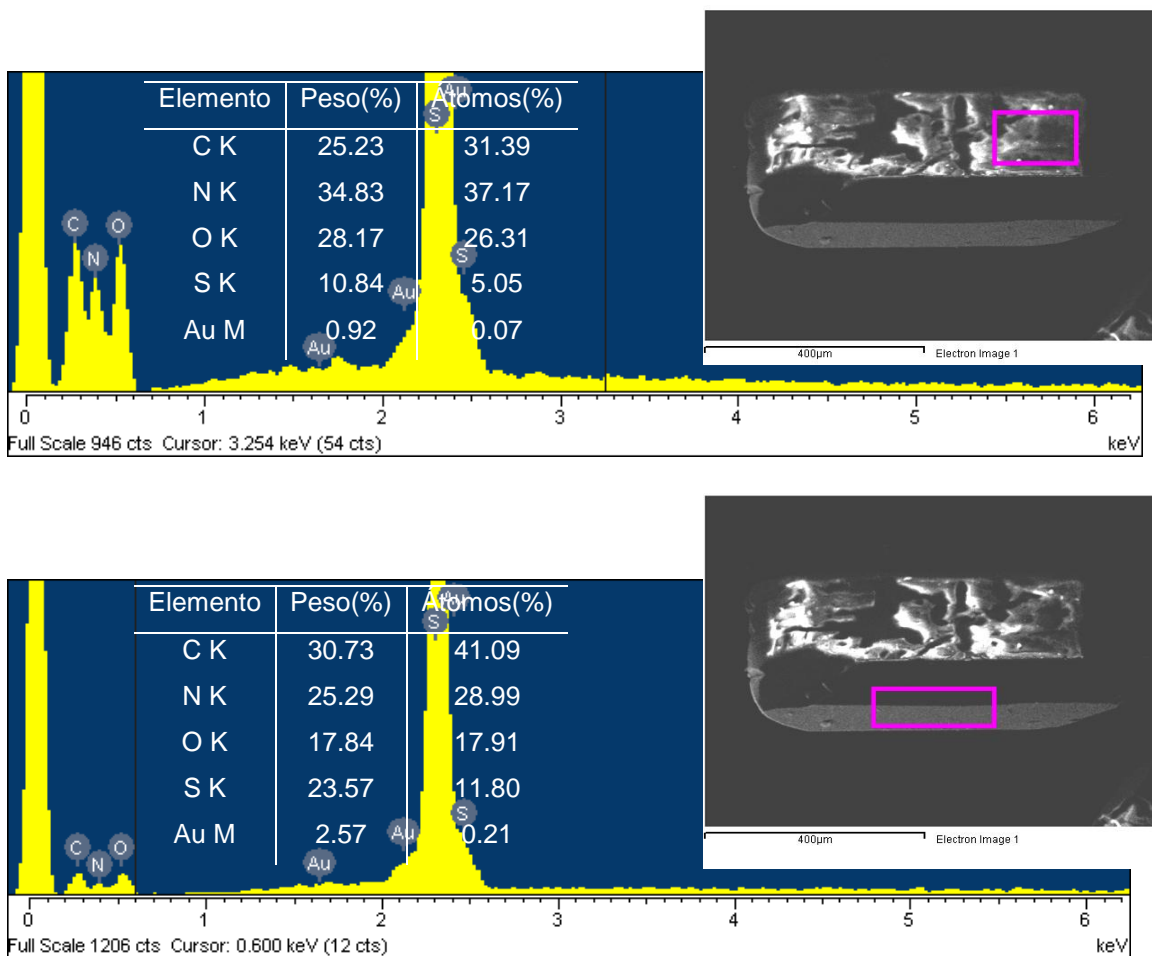


Figura 4.21: Imagen SEM y análisis EDX de diferentes caras de un cristal de β CD-MP con NPsAu depositadas por 20 s.

La figura 4.22 corresponde a imágenes de una nueva muestra de polvo cristalino del sistema ternario β CD-MP-NPsAu y el análisis por EDX respectivo. Se observó una vez más la estrecha relación S-Au. El polvo cristalino no tiene una orientación definida, por lo que es posible dirigir el análisis elemental a una cara en particular, aun así, se observó que al realizar un conteo en una zona representativa de la muestra, el porcentaje de Au calculado está es proporcional a la cantidad de S de la misma.

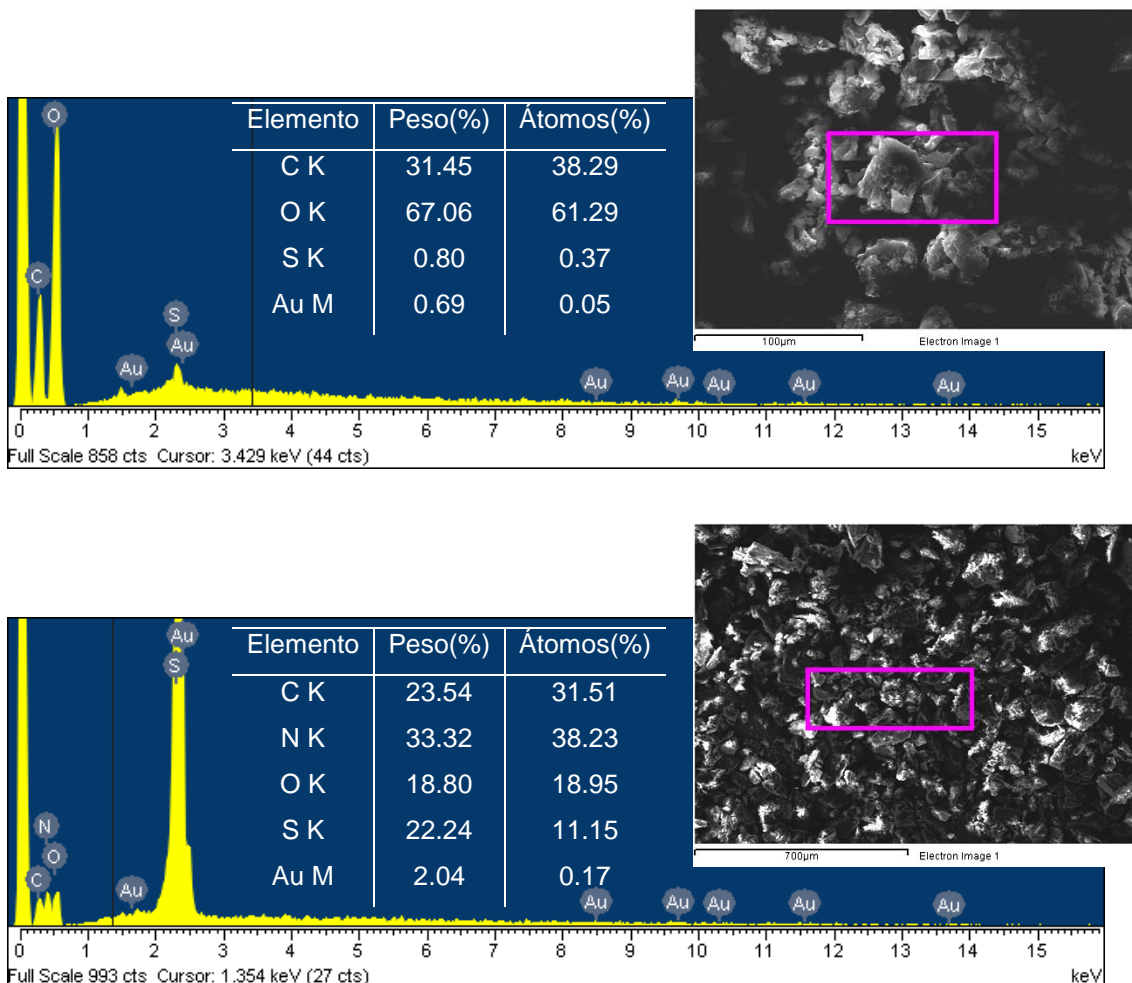


Figura 4.22: Imagen SEM y análisis EDX para muestras de polvo cristalino de β CD-MP con NPsAu depositadas por 20 s.

Las muestras sólidas del CI fueron caracterizadas por FE-SEM, para continuar el análisis sobre el depósito selectivo de NPsM en cristales del CI. La imagen de la figura 4.23 muestra de forma representativa lo que ocurre con el depósito de NPsAu por 32 s, las cuales solo fueron observadas en una cara del cristal con una baja concentración.

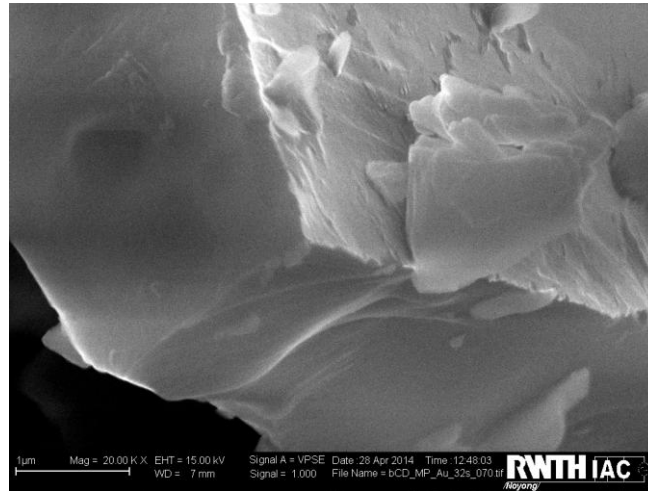


Figura 4.23: Imagen de FE-SEM de β CD-MP con NPsAu depositadas por 32 s.

Para tiempos de PC mayores, a través de imágenes de FE-SEM (Figura 4.24) no fue posible visualizar NPsAu sobre ninguna cara, sin embargo, los cristales no se vieron afectados por el haz de electrones, esto probablemente se debe a un recubrimiento casi total de las muestras por Au. En algunos cristales se observaron pequeñas NPsAu depositadas en las orillas de sus caras cristalinas.

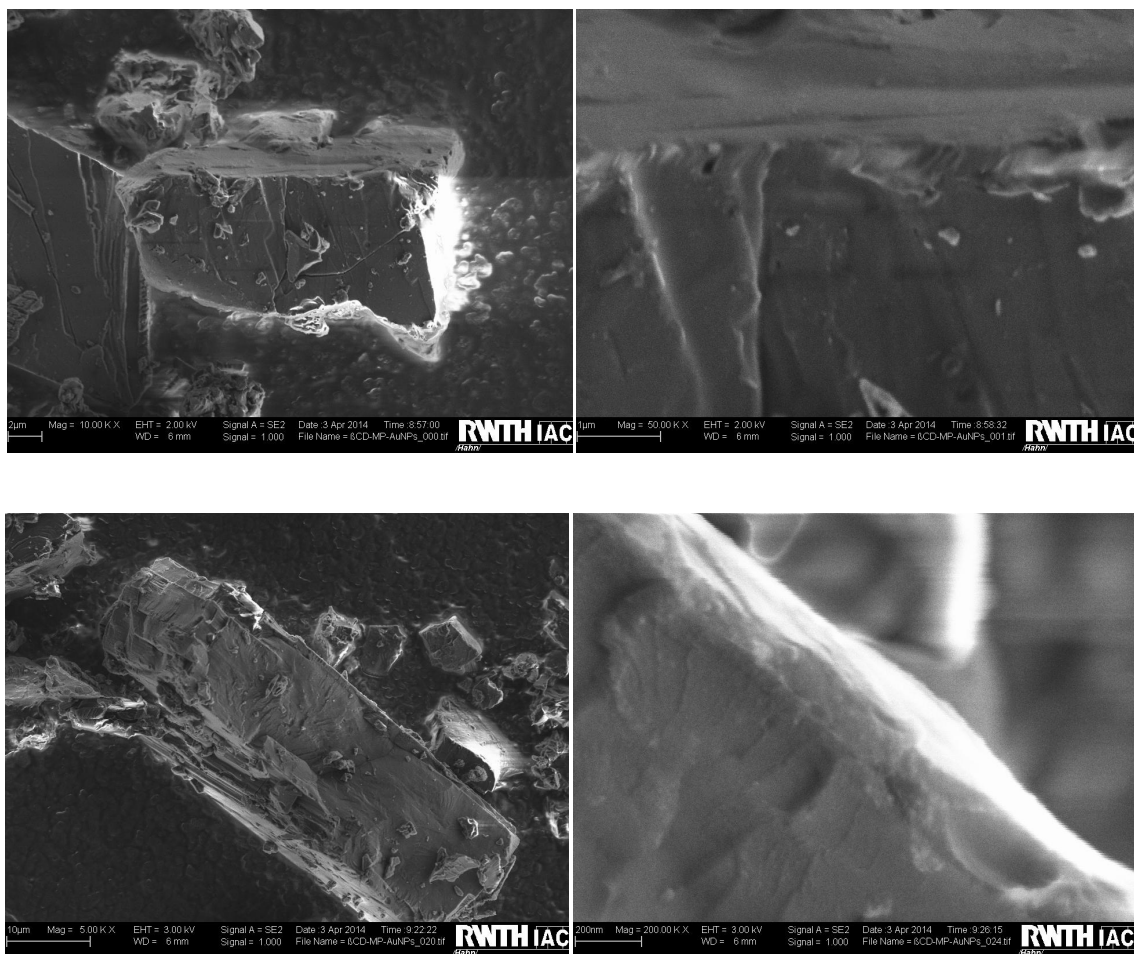


Figura 4.24: Imágenes de FE-SEM de β CD-MP con NPs Au depositadas por 60 s.

Las NPsAu sobre β CD-MP se caracterizaron también por TEM. En la imagen de la figura 4.25 se revela un sistema homogéneo de NPsAu sobre el CI con una baja dispersión de tamaños. El huésped MP que estabiliza al nanometal solo posee un grupo funcional SH, sin embargo es suficiente para generar una alta concentración de NPs esféricas que alcanzan un tamaño promedio de 21 nm aproximadamente.

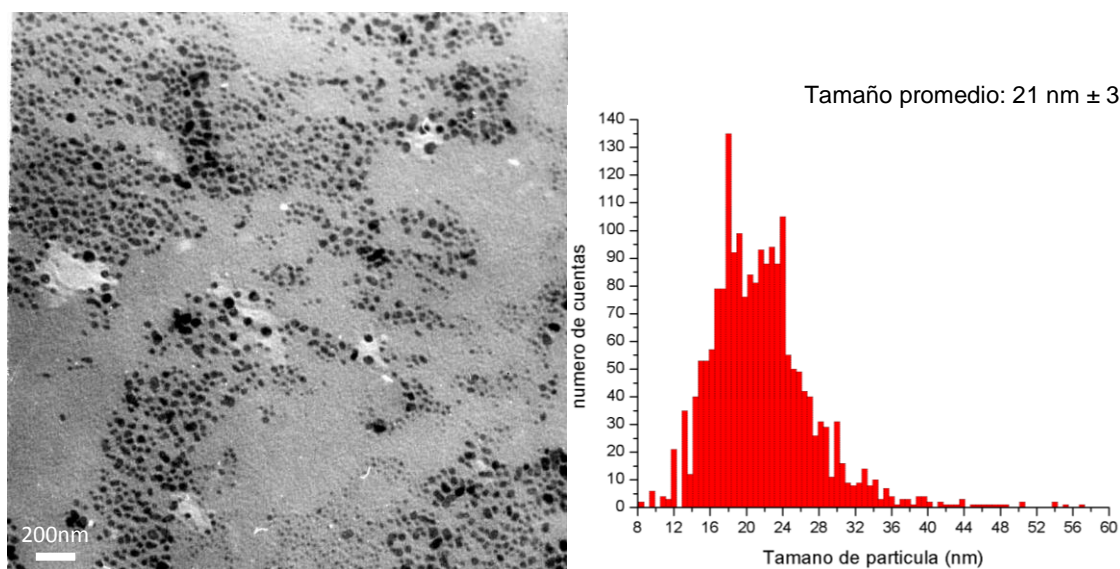


Figura 4.25: Imagen TEM de NPsAu sobre β CD-MP (20 s), con su respectivo histograma de tamaños.

Los cristales de β CD-MF obtenidos en estado sólido fueron usados como sustrato para la estabilización de NPsAg producidas por PC. La figura 4.26 muestra la morfología de los cristales del CI con NPsAg depositadas por 60 s.

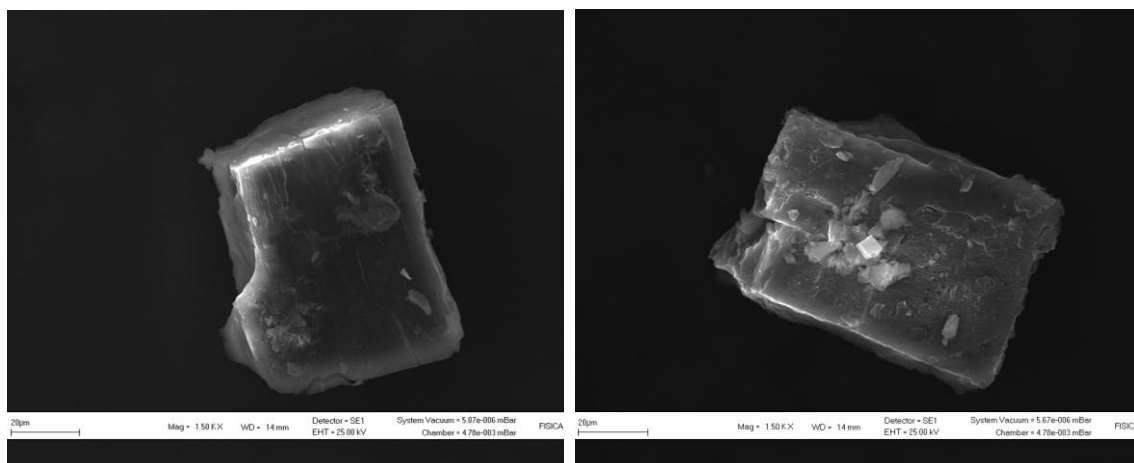


Figura 4.26: Imágenes SEM para cristales de β CD-MF con NPsAg depositadas por 60 s.

MF es un sólido amorfo, lo que pudo ser inferido desde el difractograma de rayos X discutido en el capítulo 3 (Figura 3.4). En la figura 4.27 se muestra el polvo del compuesto puro, el cual es morfológicamente diferente al CI formado.

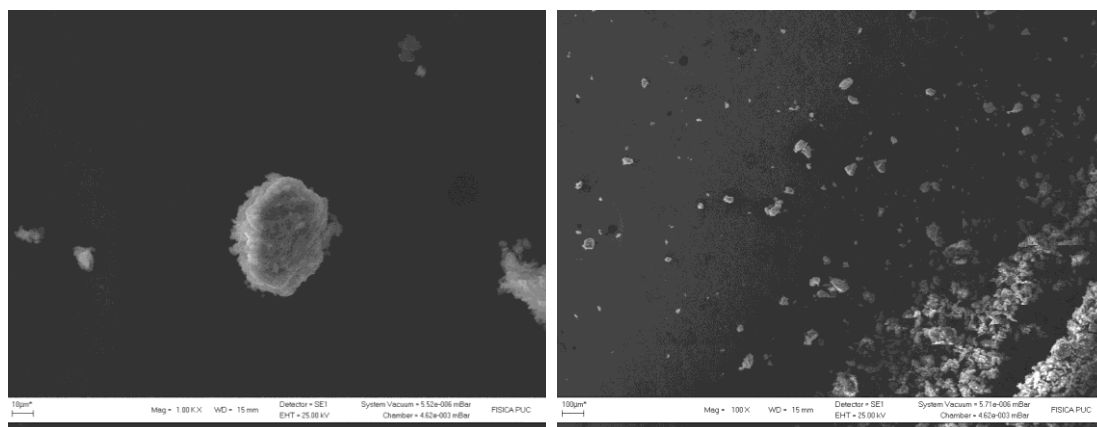


Figura 4.27: Imágenes SEM para una muestra de MF puro recubierto con Au por 60 s.

Por otra parte, se realizó un análisis elemental de los cristales del complejo β CD-MF. En la figura 4.28 se muestra la composición porcentual de todos los elementos que componen la muestra analizada en una cara del cristal. El porcentaje de átomos de Ag corresponde a 0,04% cuando el tiempo de PC es de 20 s.

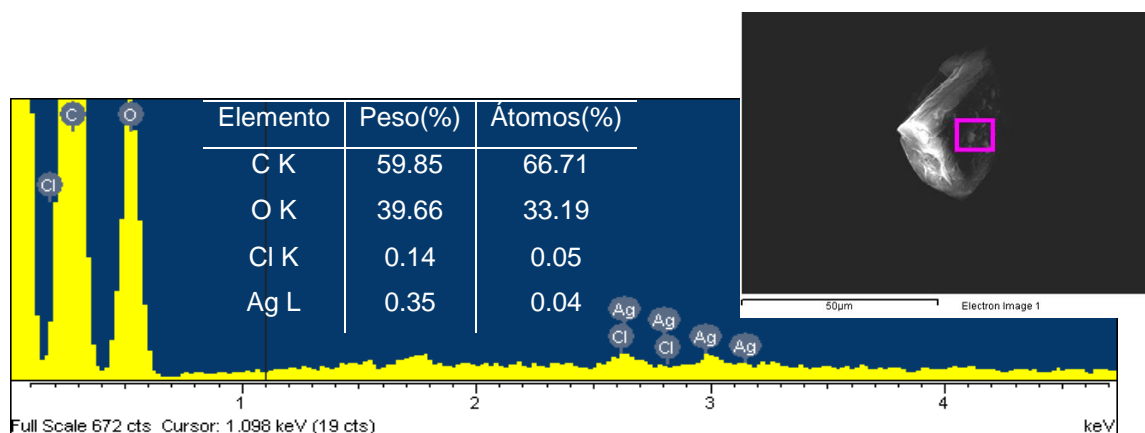


Figura 4.28: Imagen SEM y análisis EDX de β CD-MF con NPsAg depositadas por 20 s.

A diferencia de los sistemas anteriormente formados de β CD-TG-NPsAu y β CD-MP-NPsAu, un tiempo de 30 s fue suficiente para que los cristales de β CD-MF sean lo suficientemente conductores para que un estudio por FE-SEM no destruya la muestra. Las imágenes de FE-SEM se obtuvieron con tiempos de 32 s y 60 s, y se presentan en las figuras 4.29 y 4.30, respectivamente. A partir de un tiempo de 32 s, fue posible observar un depósito preferencial de NPsAg sobre una cara de los cristales, con una alta concentración.

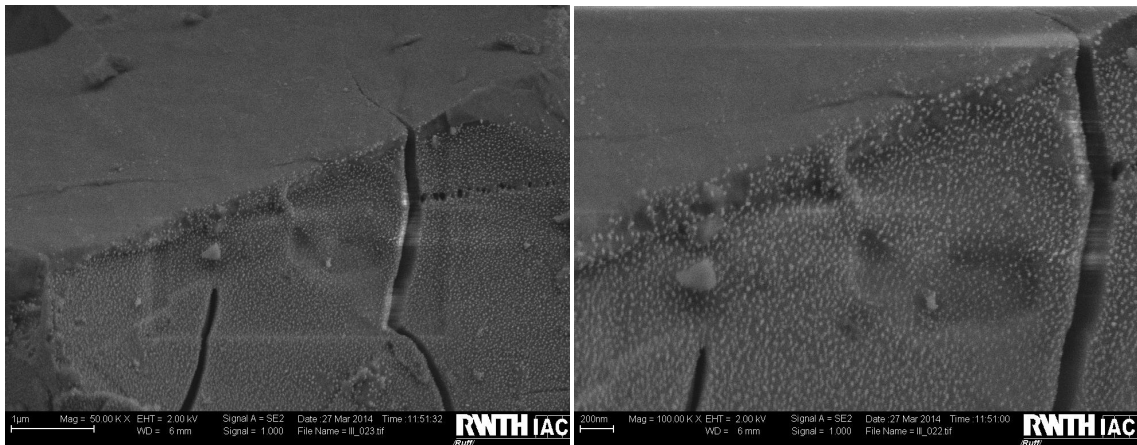


Figura 4.29: Imagen de FE-SEM de β CD-MF con NPsAg depositadas por 32 s.

Como se observa en la figura 4.30, al aumentar el tiempo de depósito a 60 s, las NPsAg comenzaron a estabilizarse en otras caras cristalinas, con un menor tamaño. Los cristales alcanzan una alta concentración de NPsAg muy próximas unas de otras.

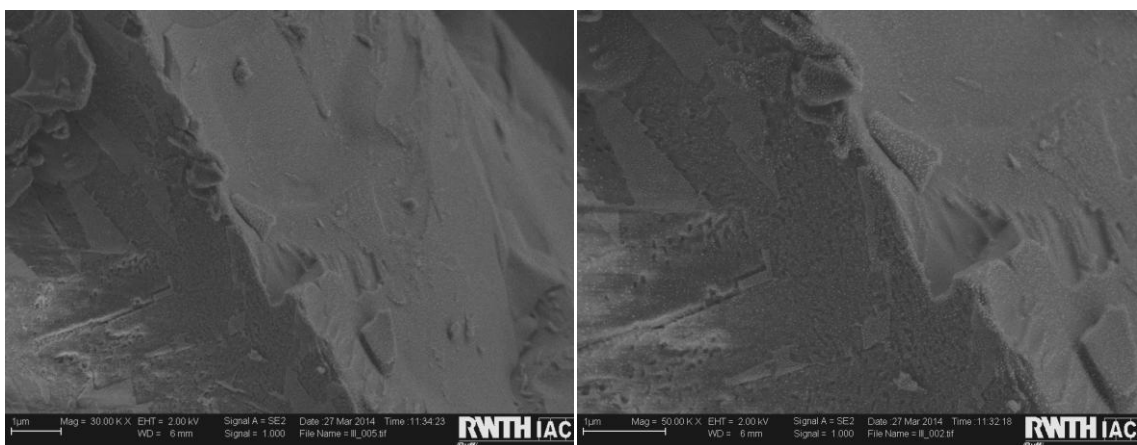


Figura 4.30: Imagen de FE-SEM de β CD-MF con NPsAg depositadas por 60 s.

El estudio de tamaños por medio de TEM se llevó a cabo para NPsAg depositadas por PC sobre β CD-MF. En la imagen de la figura 4.31 se observa una alta concentración de NPsAg muy cercanas entre sí, sin embargo por FE-SEM se corroboró que el fenómeno de agregación no ocurre. El tamaño promedio fue de 16 nm de diámetro y se calculó a partir de casi 2500 NPs observadas. Esto a su vez explica la conductividad que alcanzaron los cristales a 32 s de PC.

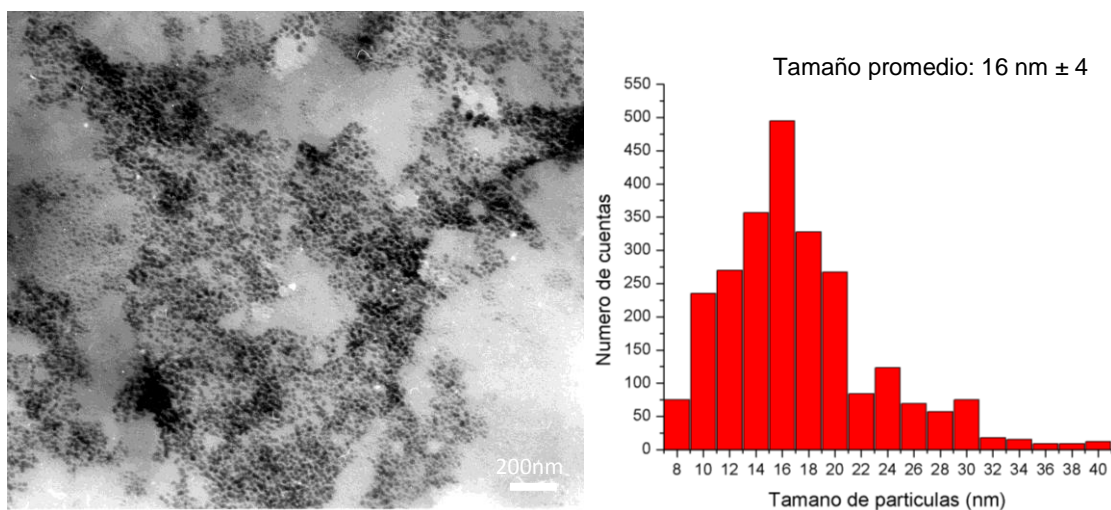


Figura 4.31: Imagen TEM de NPsAg sobre β CD-MF (20 s), con su respectivo histograma de tamaños.

Un estudio del sistema β CD-AT-NPsAu en estado sólido a través de imágenes que se obtuvieron por SEM y FE-SEM se detalla a continuación. La figura 4.32 muestra imágenes de cristales de los complejos obtenidos, cubiertos con NPsAu por 60 s, con ello se apreció claramente la morfología que poseen estos sistemas, inclusive, se observaron pequeños cristales adheridos a las paredes de estos, que corresponden posiblemente a excesos del fármaco AT.

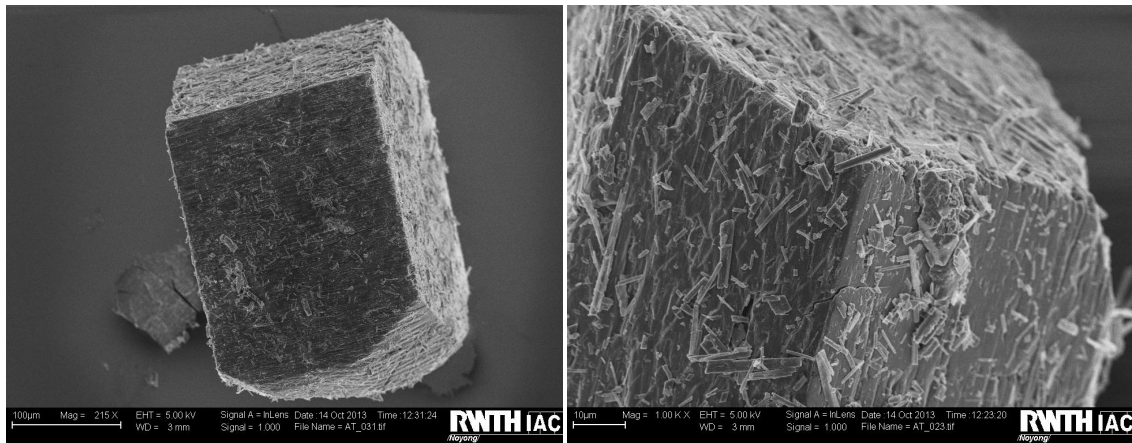


Figura 4.32: Imágenes SEM de cristales de β CD-AT con NPsAu depositadas por 60 s.

Se obtuvieron imágenes del fármaco AT puro (Figura 4.33). El análisis de su morfología confirmó la discusión realizada a través de DRXP (Figura 3.5) donde la formación del CI adquiere un nuevo patrón difractométrico, con una estructura cristalina diferente a la de sus especies puras.

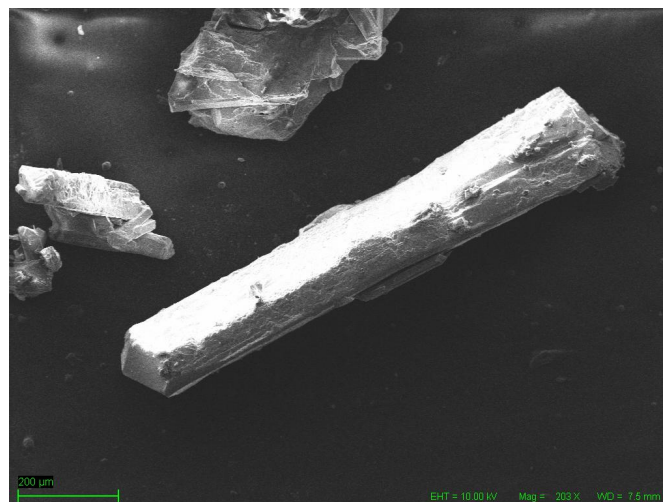


Figura 4.33: Imagen SEM de MF puro recubierto con Au por 60 s.

Un análisis EDX se realizó a una cara específica de estos cristales para determinar los porcentajes de cada componente en la muestra (figura 4.34). Para un depósito de NPs durante 30 s, estipulado previamente como el tiempo óptimo, se observaron todos los componentes constituyentes del CI y la presencia de Au en un 0,5%.

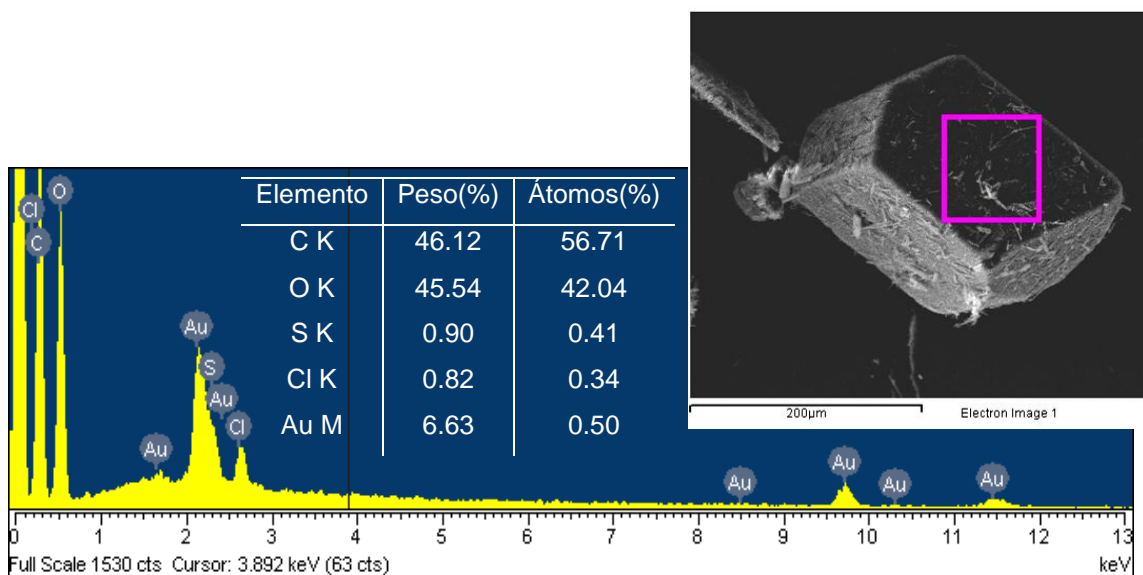


Figura 4.34: Imagen SEM y análisis EDX para un cristal de β CD-AT con NPsAu depositadas por 30 s.

Mediante imágenes de alta resolución se confirmó el depósito de NPsAu sobre caras específicas de los cristales de β CD-AT-NPsAu. Las imágenes de las figura 4.35 y 4.36 demuestran que en algunas caras del complejo en estado sólido con 60 s de PC existe un depósito preferencial. Específicamente, en la figura 4.35 se observaron NPsAu que repletan una cara del cristal, en cambio, en la figura 4.36 que corresponde a imágenes del mismo cristal, pero desde una cara cristalina diferente, el acercamiento demuestra que no hay presencia de NPsAu.

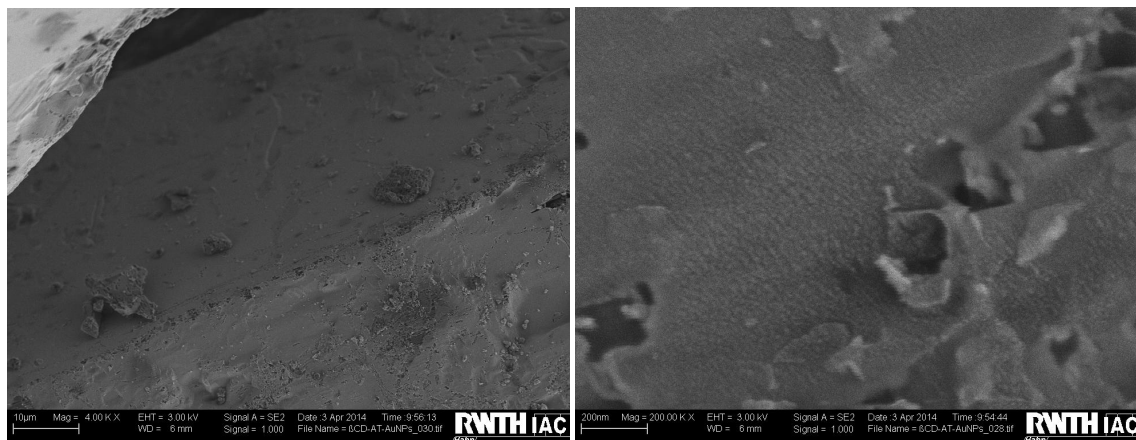


Figura 4.35: Imagen de FE-SEM de β CD-AT con NPsAu depositadas por 60 s.

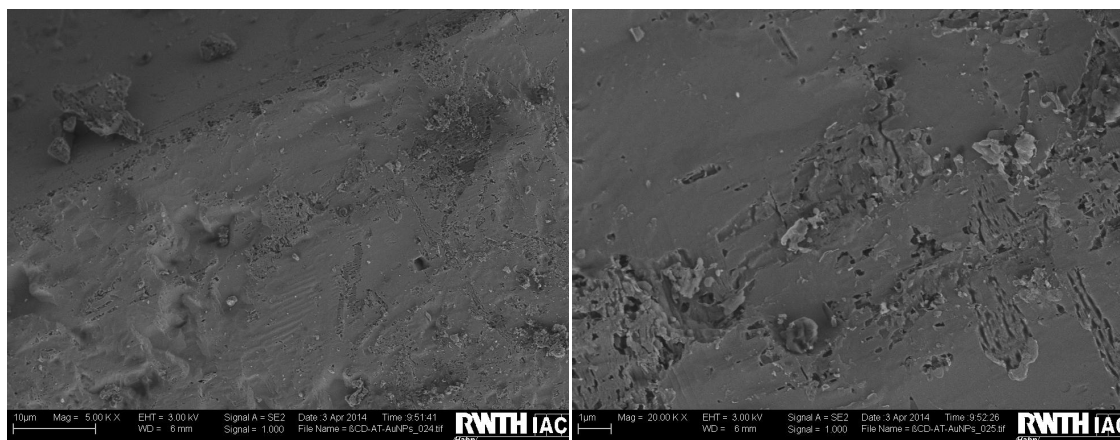


Figura 4.36: Imagen de FE-SEM de β CD-AT con NPsAu depositadas por 60 s.

Para determinar el tamaño de las NPsAu depositadas sobre el polvo cristalino del CI, se realizó un estudio por TEM. En la figura 4.37 se muestra una sección representativa de NPsAu, el diámetro promedio calculado fue de 32 nm.

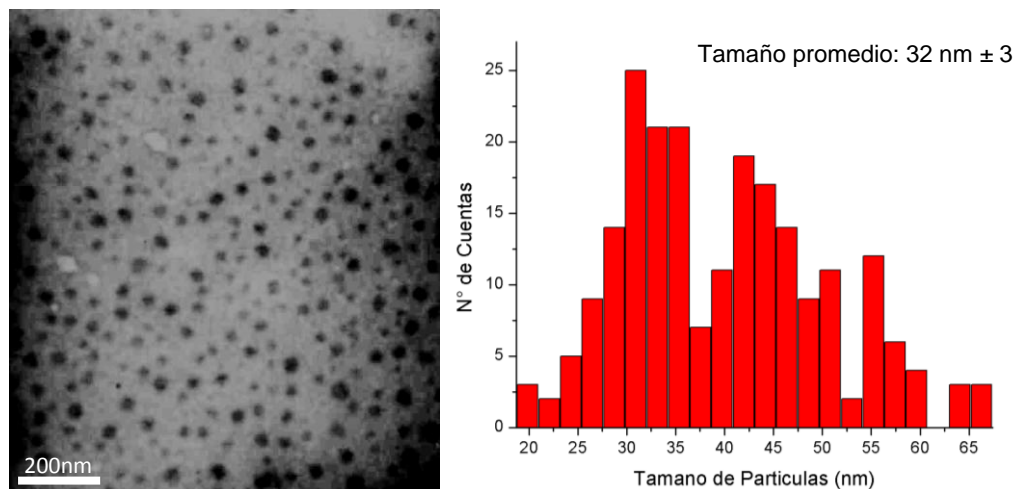


Figura 4.37: Imagen TEM de NPsAu sobre β CD-AT (30 s), con su respectivo histograma de tamaños.

El polvo cristalino del complejo β CD-FEA con NPsAu fue finamente dispersado sobre un soporte conductor y observado por SEM. La imagen 4.38 muestra la estructura de los microcristales con NPsAu, el cambio de morfología observado con respecto a la β CD pura, es consistente con el análisis realizado por DRXP (ver figura 3.6). Las matrices de β CD con su forma planar de heptágono pueden formar paralelogramos con moléculas pequeñas albergadas en su interior; lo cual es una de las razones de por qué estos CI poseen esta morfología y tienden a formar estructuras de sistemas monoclinicos (Caira, 2001; Dang, 2011), tal como fue demostrado en la indexación de su difractograma (ver discusión de la sección 3.2).

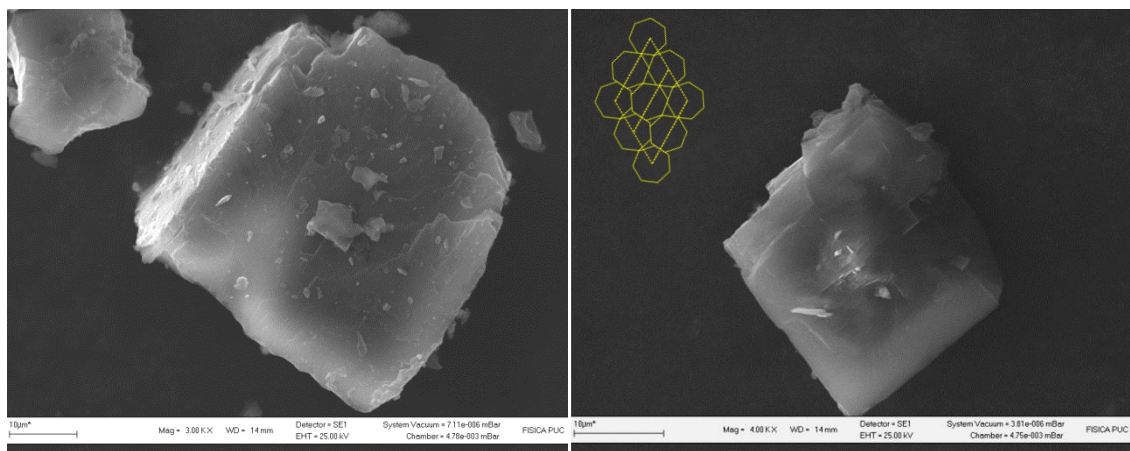


Figura 4.38: Imágenes SEM de cristales de β CD-FEA con NPsAu depositadas por 60 s.

El análisis EDX presentado en la figura 4.39 corresponde al sistema ternario β CD-FEA-NPsAu en estado sólido con 20 s de PC. El porcentaje de oro es un 0,16% respecto al porcentaje total de átomos de la muestra.

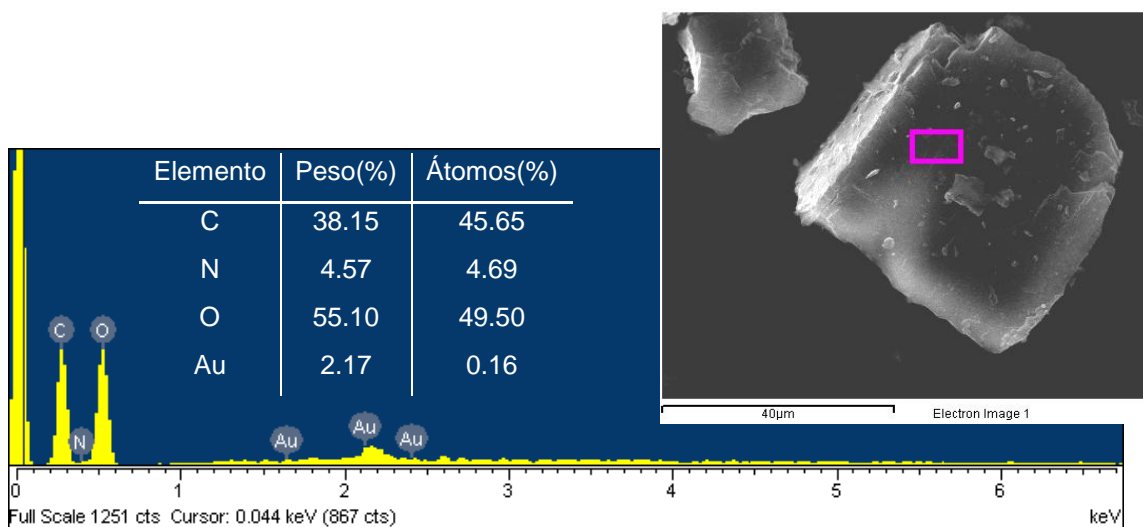


Figura 4.39: Imagen SEM y análisis EDX para un cristal de β CD-FEA con NPsAu depositadas por 20 s.

Los cristales del CI fueron observados usando FE-SEM, el tiempo de PC se aumentó hasta 60 s para lograr que la muestra se ajuste a las condiciones del equipo. En la figura 4.40 se muestran las nanoestructuras sobre la superficie del cristal con un tamaño de aproximadamente 40 nm de diámetro promedio, un crecimiento de las NPsAu acorde al aumento en el tiempo de exposición a la técnica.

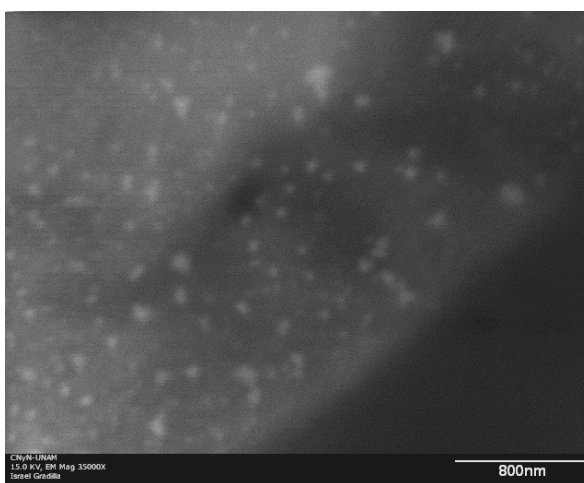


Figura 4.40: Imagen de FE-SEM de β CD-FEA con NPsAu depositadas por 60 s.

La muestra del sistema ternario fue disuelta y observada por TEM (Figura 4.41). Las NPsAu poseen un diámetro promedio de 14 nm basado en el análisis estadístico de la imagen, tomando en cuenta aproximadamente 2600 NPs. Una segunda imagen TEM que representa una visión general de la muestra, y donde se observó un mayor número de NPsAu muy cercanas entre ellas se presenta en la figura 4.42.

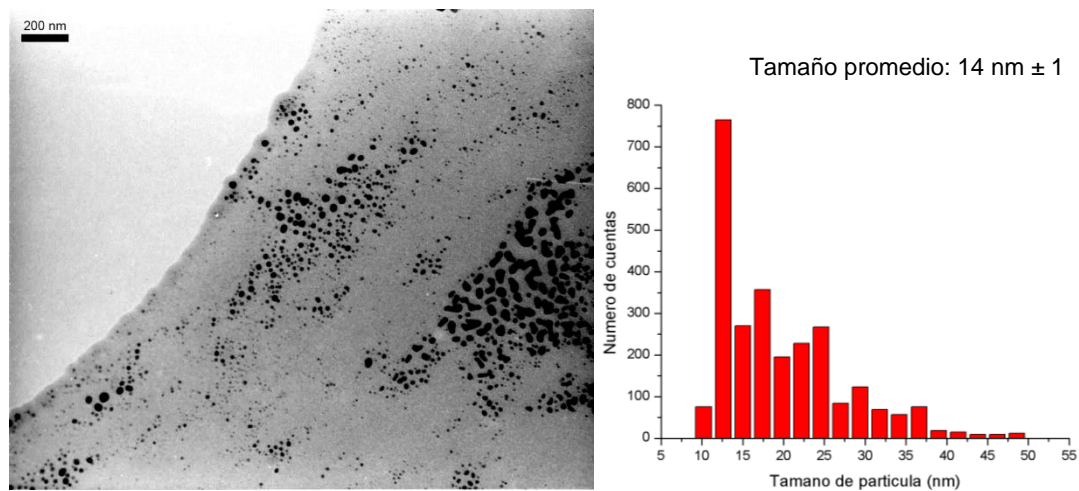


Figura 4.41: Imagen TEM de NPsAu sobre β CD-FEA (20 s), con su respectivo histograma de tamaños.

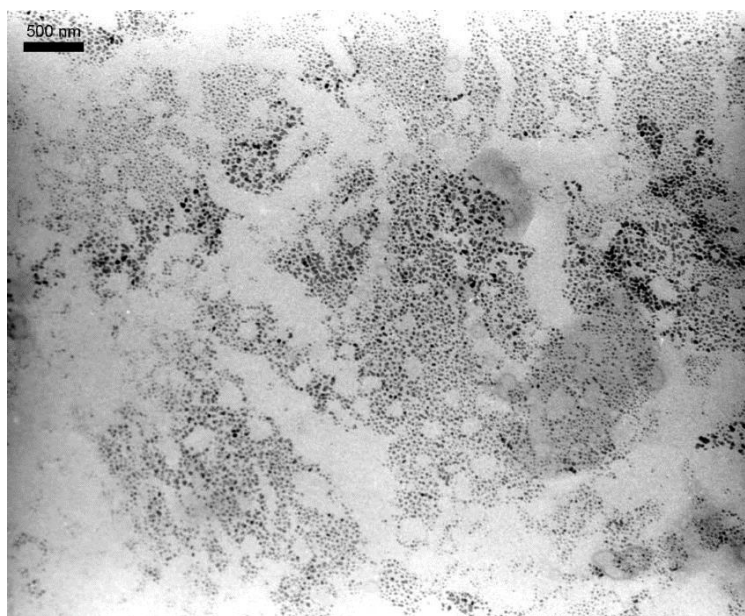


Figura 4.42: Imagen TEM de NPsAu sobre β CD-FEA (20 s).

Las imágenes adquiridas por SEM demuestran que la morfología de los CI es diferente a la de sus especies puras, validando los resultados obtenidos por DRXP (capítulo 3, sección 3.1) que demuestran la formación de nuevas formas cristalinas. El depósito de NPsAu en los sólidos pueden observarse a través de FE-SEM; su tamaño, disposición en ciertos planos superficiales e incluso el número de partículas está en función del tiempo de exposición de las muestras al método de PC.

4.3. Estudio mediante DRXP de los sistemas ternarios

Para formar NPsM mediante el método físico de PC, es necesario un sustrato que permita interacciones favorables entre su superficie y los átomos desprendidos desde la lámina metálica. El sustrato debe resistir el impacto de los átomos metálicos o pequeños clúster, que se depositan con una alta energía, y las condiciones en las que trabaja el equipo sin descomponerse, ni volatilizarse para el caso de los líquidos o alterar su estructura para el caso de sustratos sólidos. Es por esto que únicamente líquidos con una baja presión de vapor, como los líquidos iónicos (Wender, 2010; Vanecht, 2011; Torimoto, 2015), y compuestos en estado sólido (Roustom, 2005; Barrientos, 2007; Wang, 2011; Sierpe 2015) son utilizados como sustratos para la producción de NPsM por esta técnica.

Se realizó un análisis por DRXP de los complejos β CD-AT y β CD-FEA con NPsAu para evaluar el estado de la estructura cristalina de cada sustrato luego de la exposición al equipo de PC. Junto con ello, los difractogramas obtenidos fueron indexados para determinar el tipo de empaquetamiento cristalino que poseen los sistemas ternarios β CD-AT-NPsAu y β CD-FEA-NPsAu formados.

En la figura 4.43 se muestra el difractograma del complejo β CD-AT comparado con el sistema β CD-AT-NPsAu. Se observó que todos los picos intensos varían en intensidad sin embargo permanecen en la misma ubicación, lo que implica que no existen cambios en su estructura cristalina. Es probable que los cambios observados en las intensidades se deban al tratamiento de los cristales tras el depósito de NPsAu en alto vacío, lo que genera una pérdida de moléculas de agua que puede modificar las dimensiones del empaquetamiento cristalino del sistema.

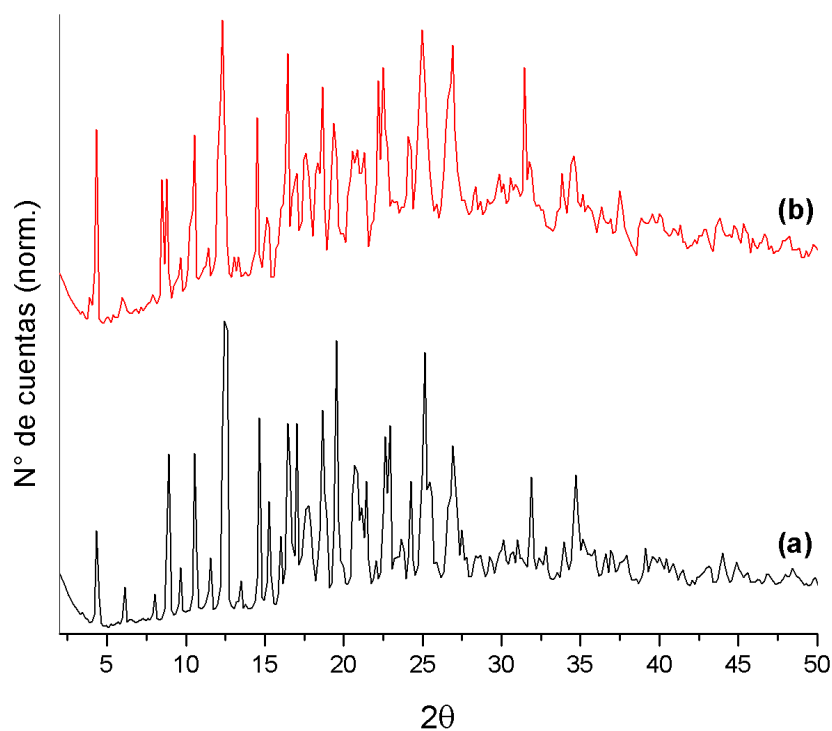


Figura 4.43: Difractogramas de polvo cristalino de: (a) β CD-AT y (b) β CD-AT-NPsAu.

Se realizó la indexación de β CD-AT-NPsAu, los parámetros de red se exponen en la tabla 4.1. El sistema tipo $P2_1$ obtenido corrobora que la estructura cristalina se mantiene. Adicionalmente, los parámetros del sistema y hkl encontrados corresponden a los mismos índices que fueron calculados para el sistema sin NPsAu (ver detalles en anexos, figura 8.14 y tabla 8.14).

Tabla 4.1. Parámetros de red teóricos y experimentales para el sistema cristalino de β CD-AT-NPsAu.

Sistema cristalino: Monoclínico			Tipo de celda: $P2_1$				
Parámetros de red de β CD-AT	$\alpha = \gamma$	β	a (Å)	b (Å)	c (Å)	Volumen (Å ³)	Factor R
Teóricos	90°	117,29°	15,264	16,500	15,559	3919	---
Experimentales	90°	117,39°	15,299	16,398	15,734	3947	0,0046

En la figura 4.44 se presentan los difractogramas del complejo β CD-FEA con y sin NPsAu. Se pudo evidenciar de manera directa que la traza difractométrica se mantiene luego de la interacción del CI con las NPsAu, lo que implica que el sistema cristalino mantiene su estructura. En la tabla 4.2 se detallan los parámetros de red usados para la indexación de β CD-FEA-NPsAu que demostraron que el tipo de celda fue $P2_1$ al igual que el obtenido para β CD-FEA. En la sección de anexos (capítulo 8) se muestran las tablas con los índices obtenidos de la indexación del sistema ternario (tabla 8.15) y el difractograma completo con los índices hkl obtenidos (figura 8.15).

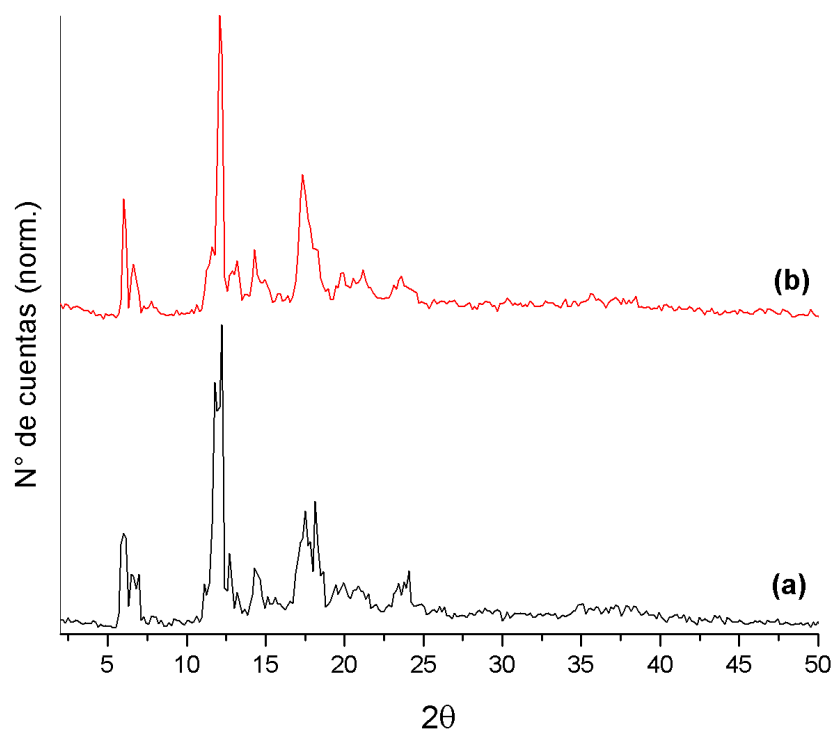


Figura 4.44: Difractogramas de polvo cristalino de: (a) β CD-FEA y (b) β CD-FEA-NPsAu.

Tabla 4.2. Parámetros de red teóricos y experimentales para el sistema cristalino de β CD-FEA-NPsAu.

Sistema cristalino: Monoclínico				Tipo de celda: $P2_1$			
Parámetros de red	$\alpha = \gamma$	β	a (Å)	b (Å)	c (Å)	Volumen (Å ³)	Factor R
Teóricos	90°	112,81°	21,287	10,101	15,356	3302	---
Experimentales	90°	112,22°	21,293	10,299	14,893	3266	0,0120

El método de PC no destruye ni altera las muestras en estado sólido, esto se puede deducir del hecho de que los sistemas β CD-AT-NPsAu y β CD-FEA-NPsAu caracterizados por DRXP muestran patrones cristalográficos equivalentes a los observados para los CI respectivos.

4.4. Estudio del sistema β CD-FEA-NPsAu mediante RMN.

Se realizó un estudio del sistema β CD-FEA-NPsAu con el propósito de evaluar el comportamiento del complejo en solución cuando está interactuando con las NPsM mediante la observación de los desplazamientos químicos de sus protones, y los cambios con respecto al CI sin NPsAu tabulado en el capítulo anterior (sección 3.3).

En la figura 4.45 se muestra el espectro ^1H -RMN del complejo β CD-FEA con NPsAu en solución. Cambios en los desplazamientos químicos con respecto a las especies puras y al complejo sin NPsAu se muestran en la tabla 4.3. Los cambios en todos los protones del huésped demuestran que FEA permanece incluida en la matriz. El protón H-3 de β CD está desplazado hacia campos más altos, mientras que los protones H-5 y H-6 presentan desplazamientos químicos hacia campos bajos, lo cual implica que existe un cambio en la disposición del huésped al interior de la cavidad con respecto a β CD-FEA (ver tabla 3.8). Los protones de los grupos hidroxilos por su parte también muestran un comportamiento diferente, mientras que los hidroxilos secundarios (OH-2 y OH-3) se localizan en campos más bajos, los hidroxilos primarios (OH-6) se desplazan hacia campos más altos. Estas diferencias sugieren que el huésped se desplazó debido a la interacción con las NPsAu.

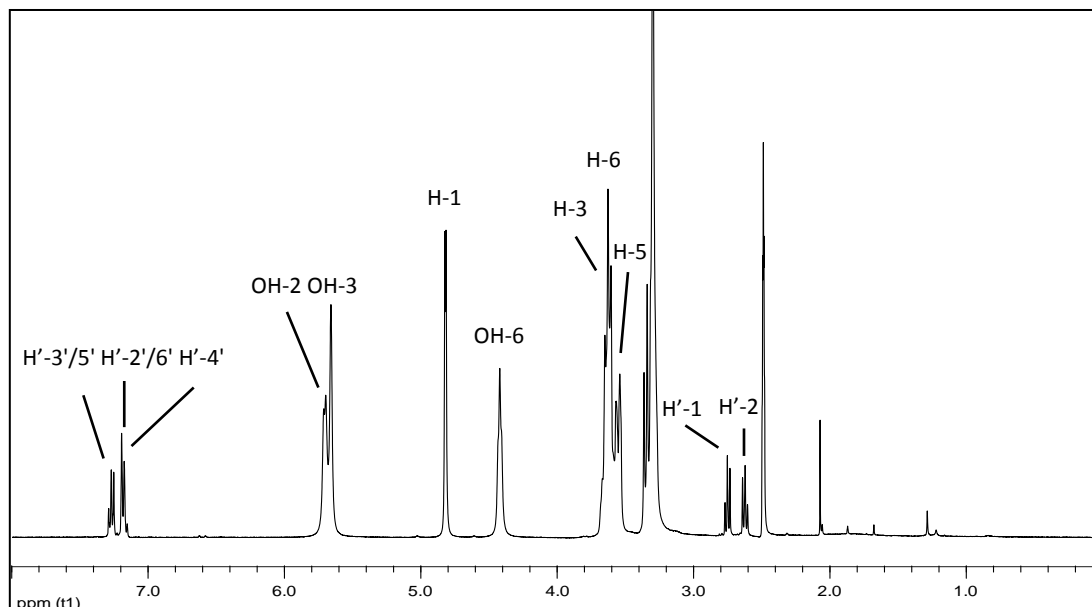


Figura 4.45: Espectro ^1H -RMN de $\beta\text{CD-FeA-NPsAu}$ en DMSO-d_6 .

Tabla 4.3: Desplazamientos químicos de los protones de $\beta\text{CD-FeA-NPsAu}$ con respecto a las especies puras.

H de βCD	δ βCD (ppm)	δ $\beta\text{CD-FeA-NPsAu}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
H-3	3.669	3.660	-0.009
H-5	3.566	3.569	0.003
H-6	3.622	3.627	0.005
OH-2	5.707	5.712	0.005
OH-3	5.660	5.667	0.007
OH-6	4.435	4.430	-0.005
H' de FEA	δ FEA (ppm)	δ $\beta\text{CD-FeA-NPsAu}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
H'-1	2.795	2.750	-0.032
H'-2	2.658	2.628	-0.024
H'-2'/6'	7.205	7.197	-0.005
H'-3'/5'	7.285	7.276	-0.010
H'-4'	7.176	7.169	-0.006

Para el sistema ternario β CD-FEA-NPsAu, un análisis ROESY deja en evidencia los cambios producidos en la geometría de inclusión del huésped en la matriz debido a la interacción de FEA con la superficie de las NPsAu. En la figura 4.46 (a) y (b) se muestran los cambios en las correlaciones intermoleculares de los protones internos de la β CD con los protones de la FEA, lo que indica una disposición diferente a la discutida en el capítulo anterior (ver sección 3.6).

El análisis de los picos cruzados que se presentan en 4.46 (a) muestra que la cadena etilamina se encuentra parcialmente fuera de la cavidad, debido a la interacción de los H'-1 y H'-2 únicamente con H-6; mientras que en el espectro de la figura 4.46 (b) se observa que el anillo aromático permanece dentro, esto puede ser deducido de los picos cruzados que se observan entre el H-5 y H-6 de la β CD con los protones H'-2'/6', H'-3'/5' y H'-4' de la FEA (ver espectro complejo en anexos, figura 8.16).

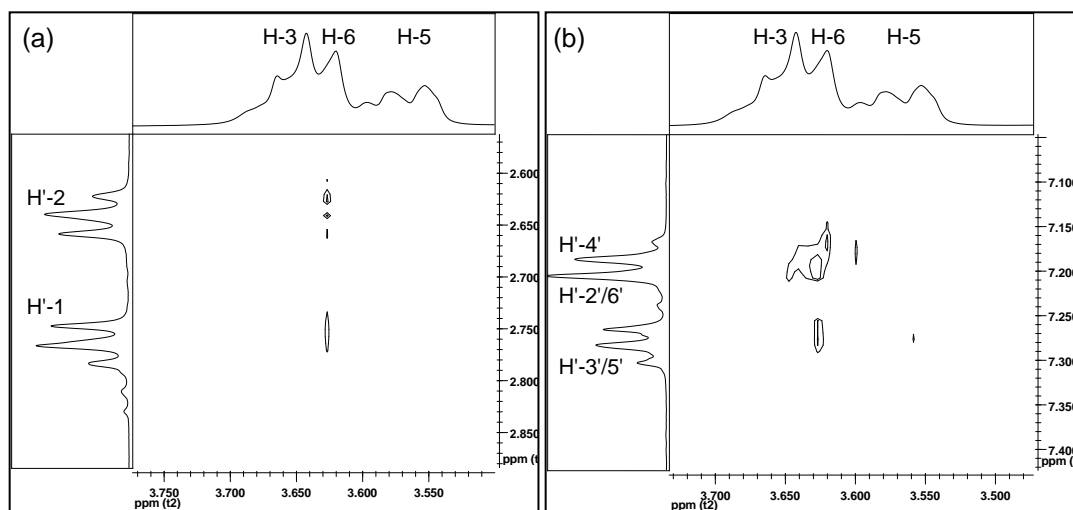


Figura 4.46: Espectros ROESY de β CD-FEA-NPsAu en DMSO- d_6 .

Esto implica un desplazamiento parcial del huésped hacia la superficie de la apertura más angosta de la β CD, lo cual podría explicarse por la competencia entre la tendencia hacia la inclusión de la FEA con la cavidad de la matriz y la atracción generada por las NPsAu. Mediante este análisis se comparó la disposición del complejo y del sistema ternario en solución. Si bien al formar el complejo β CD-FEA, el huésped permanece completamente albergado en la matriz, cuando se forma el sistema ternario β CD-FEA-NPsAu, la cadena etilamina se desplaza fuera de la cavidad, fenómeno promovido por la interacción NH_2 -Au. Por otra parte, el anillo aromático permanece incluido, lo cual demostró que las interacciones hidrofóbicas permiten que la β CD se integre en el sistema ternario albergando al huésped a través del fenómeno de inclusión.

Basado en el análisis de los espectros ROESY de β CD-FEA (sección 3.6) y β CD-FEA-NPsAu, se construyó una representación esquemática (ver figura 4.47) del CI formado (a) y el desplazamiento parcial del huésped debido a la presencia de las NPsAu (b).

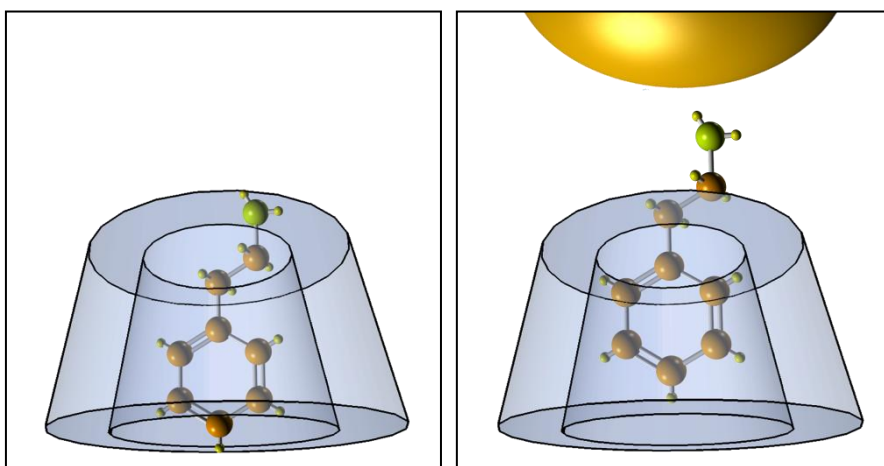


Figura 4.47: Geometría de inclusión propuesta para (a) β CD-FEA y (b) β CD-FEA-NPsAu.

4.5. Estudio vibracional IR y Raman

Para continuar con el análisis de las interacciones del complejo y los cambios generados por las NPsAu, se realizaron estudios por espectroscopia IR y RAMAN de los sistemas β CD-FEA y β CD-FEA-NPsAu.

Comúnmente los estudios de CI por espectroscopia vibracional IR y Raman se centran en los cambios observados en las trazas de la molécula libre y como huésped formando el CI, debido a que los picos de esta molécula generalmente se encuentran desplazados o sus intensidades se ven alteradas tras el fenómeno de inclusión (Heise, 2010; de Oliveira, 2011; Pandian, 2013; Sampaio, 2014). En la Figura 4.48 se muestran los espectros IR para (a) FEA, (b) β CD, (c) β CD-FEA y (d) β CD-FEA-NPsAu; observándose un cambio en algunas señales para el CI, comparado con el complejo con NPsAu y las especies puras.

En el espectro de FEA (a), las bandas más intensas observadas fueron a: 592 cm^{-1} que corresponde a la deformación del anillo aromático; 744 cm^{-1} y 698 cm^{-1} que corresponden al aleteo del anillo; 1317 cm^{-1} que corresponde a una torsión de la cadena etilo; 1360 cm^{-1} que corresponde a la flexión de los C-H del anillo; y 1495 cm^{-1} que corresponde a la deformación C-H del anillo aromático, todas estas desaparecen en los espectros de β CD-FEA (c) y β CD-FEA-NPsAu (d), probablemente debido a la inclusión de fármaco FEA, donde el anillo aromático pierde grados de libertad, similar al fenómeno observado por Pandian y colaboradores. Además, en el espectro de FEA, una banda a 1029 cm^{-1} que corresponde principalmente a otra torsión de la cadena etil y al estiramiento moderado del anillo aromático, permanecen en el espectro del CI con

y sin NPsAu. El estiramiento del C-N a 1082 cm^{-1} permanece en el espectro del complejo, pero desaparece para el espectro del complejo con NPsAu. La banda a 1453 cm^{-1} que corresponde a un aleteo de los CH_2 y una flexión del C-N desaparecen en el espectro de $\beta\text{CD-FEA}$ y reaparecen en el espectro de $\beta\text{CD-FEA-NPsAu}$, aunque con una baja intensidad, probablemente debido al desplazamiento parcial del huésped hacia el exterior de la βCD en presencia de las NPsAu.

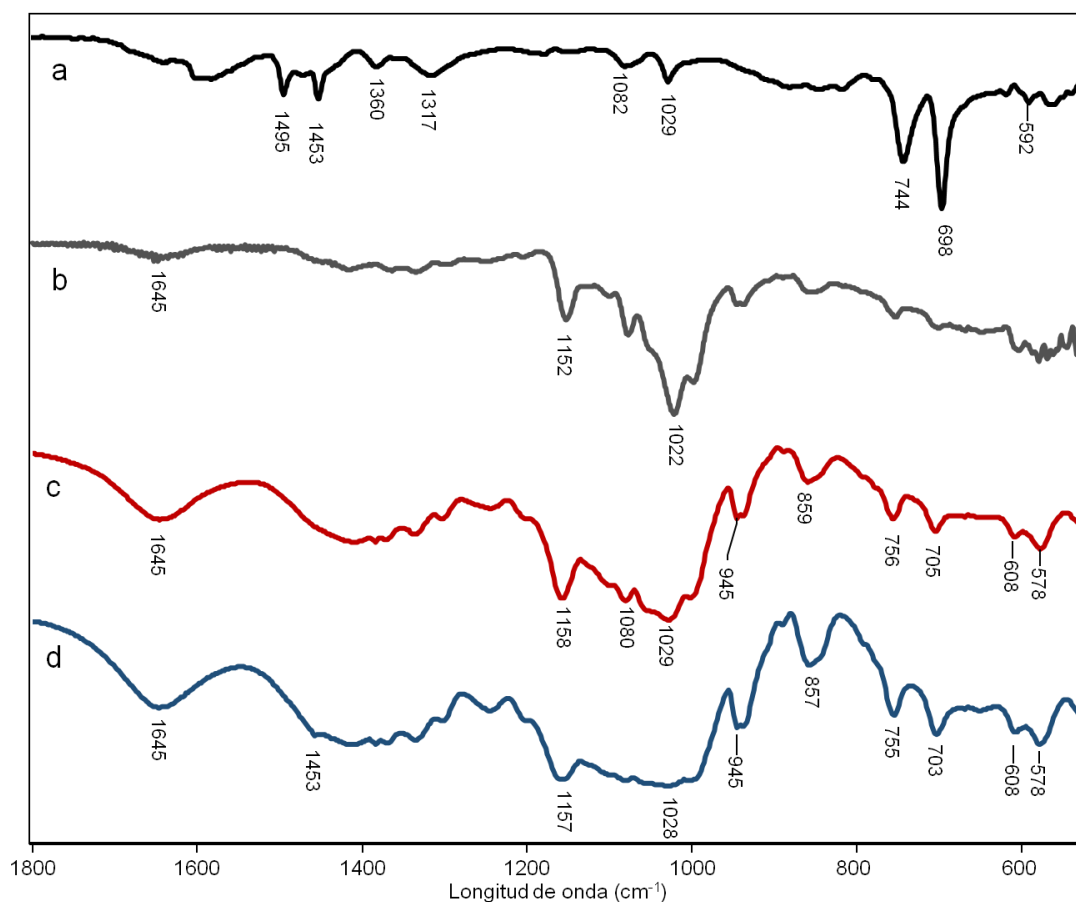


Figura 4.48: Espectros IR de: (a) FEA, (b) βCD , (c) $\beta\text{CD-FEA}$ and (d) $\beta\text{CD-FEA}$ con NPsAu.

A través de los espectros Raman (figura 4.49), también fue posible estudiar el comportamiento del huésped en el CI. La adición de las NPsAu incrementa las señales del espectro debido al aumento en la superficie de dispersión Raman, también llamado SERS (surface-enhanced Raman scattering) el cual es producido cuando la molécula de estudio se encuentra cercana a NPsAu y Ag (Aroca, 2006; Le Ru, 2009). En este sentido, para obtener señales en el espectro del CI con NPsAu con una intensidad comparable a las otras mediciones realizadas, fue necesario reducir la potencia en el equipo a un 25% (de un 100% inicial), siendo esto una evidencia del fenómeno SERS.

La figura 4.49 corresponde a los espectros Raman del huésped FEA (a), de la matriz β CD (b) y del CI con (c) y sin NPsAu (d). La traza (a) muestra el espectro Raman de FEA con sus bandas características. La banda a 491 cm^{-1} que corresponde a un tijereteo C-C-N y junto con una deformación en el plano del anillo aromático a 620 cm^{-1} , la cual es débil, pueden ser observadas en el espectro del CI así como en el espectro SERS del complejo con NPsAu. La banda a 759 cm^{-1} corresponde a una flexión de los C-H aromáticos y del anillo. La banda a 821 cm^{-1} corresponde a un balanceo de los CH_2 y un aleteo del grupo NH_2 ; la siguiente banda a 850 cm^{-1} es otro aleteo del NH_2 . La banda más prominente a 1001 cm^{-1} es la respiración típica del anillo fenilo, seguido por otro estiramiento del anillo y una torsión de la cadena etil a 1029 cm^{-1} , estas dos bandas permanecen en el espectro del CI así como en el espectro SERS del CI con NPsAu. Una banda muy débil a 1069 cm^{-1} fue asignada a un estiramiento C-N; la banda siguiente a 1155 cm^{-1} y la que se encuentra a 1178 cm^{-1} corresponden a la flexión de los C-H aromáticos. La banda a 1201 cm^{-1} es un estiramiento C-C que ocurre entre el anillo fenilo y la cadena etilamina y puede ser observada también en el espectro del CI con y sin NPsAu. La banda a 1441 cm^{-1} corresponde a una vibración de

tijereteo de la cadena etil; la banda a 1601 cm^{-1} corresponde a una deformación en el plano del anillo.

Al depositar las NPsAu sobre el complejo se observó que las bandas que tuvieron un mayor aumento por SERS son las que corresponden al fenilo, por sobre las de la cadena etilamina, siendo ambas cercanas a su superficie; esto se debe principalmente a la baja polarizabilidad que presenta el grupo amino en comparación a las vibraciones del anillo aromático. Esto implica que las interacciones del NH_2 con la superficie del Au no pueden resolverse completamente por SERS. Este fenómeno está descrito en otras investigaciones (Kumar, 2003; Sperling, 2010), donde las bandas de N-H desaparecen en los espectros IR, lo cual también fue observado en estos espectros IR, Raman y SERS. Adicionalmente, podemos discutir que el estudio SERS muestra de manera más prominente las bandas de la FEA, en lugar de las bandas de βCD , una molécula mucho más grande que tiene una sección transversal aún mayor. Este resultado apoya la idea de que FEA en el CI está más cerca de la NPsAu que la matriz de CD.

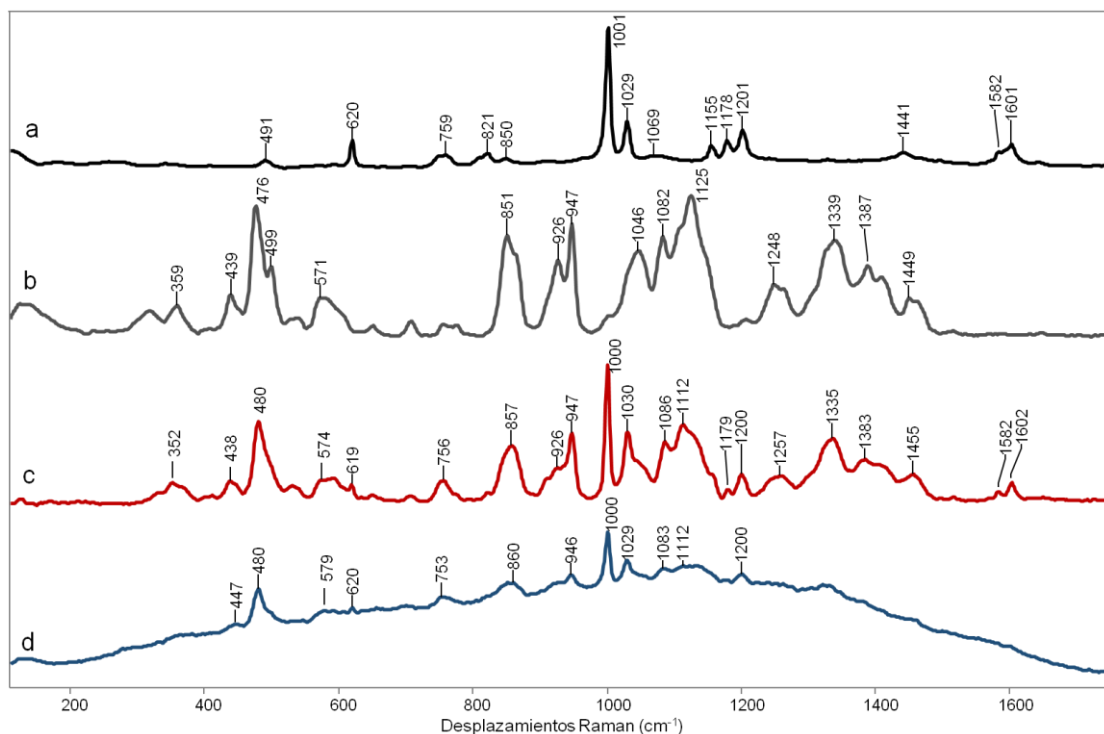


Figura 4.49: Espectros Raman de: (a) FEA, (b) β CD, (c) β CD-FEA and (d) β CD-FEA con NPsAu.

La geometría de equilibrio y una comparación “cara a cara” entre los espectros teóricos y calculados de FEA en los espectros IR y Raman se muestran en las figuras 4.50 y 4.51. Las bandas se asignaron por la comparación entre el espectro experimental y el teóricamente calculado, usando Gaussian 09 (Frisch, 2009); posteriormente se realizó una optimización de la geometría en fase gaseosa.

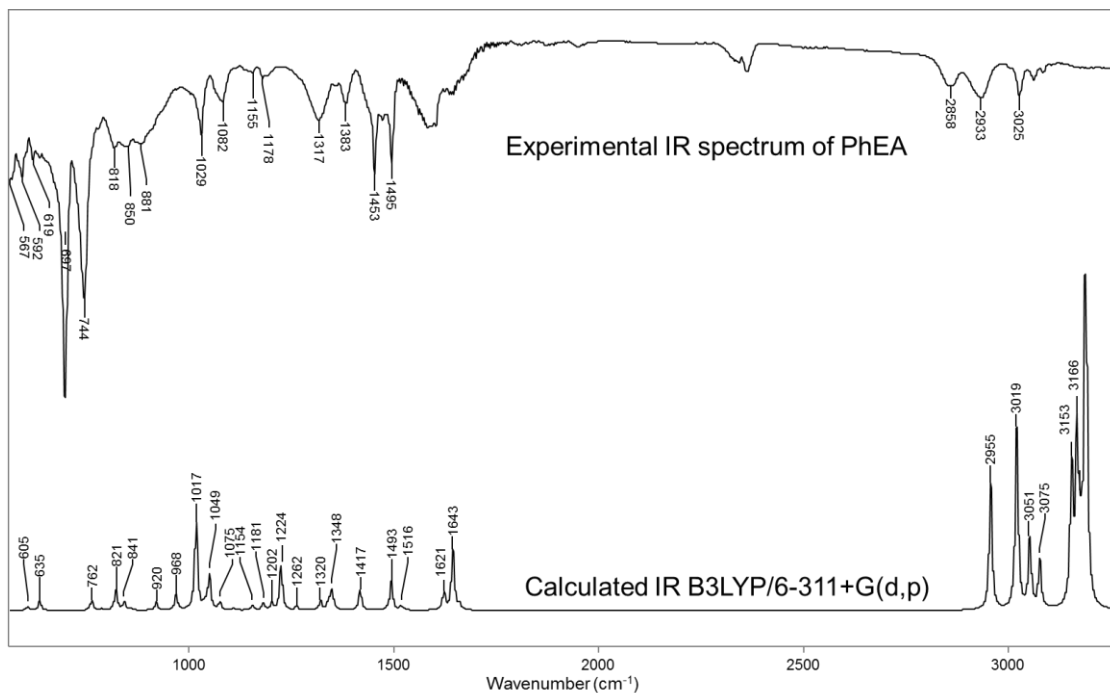


Figura 4.50: Espectros IR experimental y teórico de FEA.

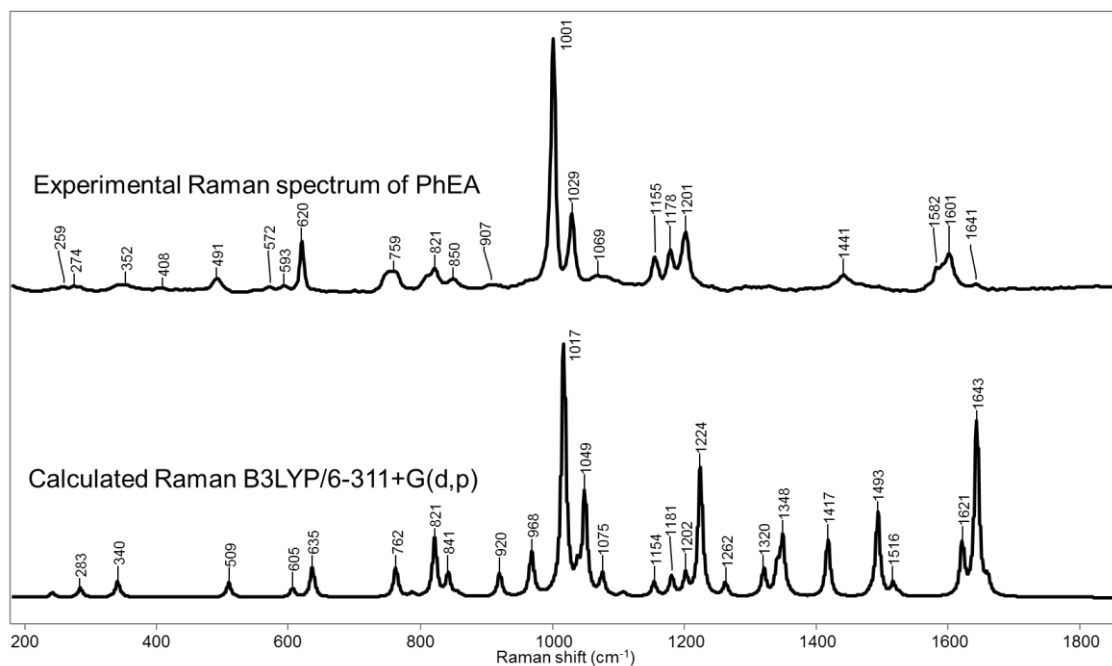


Figura 4.51: Espectros Raman experimental y teórico de FEA.

Los sistemas ternarios obtenidos fueron caracterizados principalmente por diversas técnicas espectroscópicas, DRXP y mediante microscopía electrónica TEM y SEM. Se demostró la interacción de los CI con NPs de Au y Ag, e incluso se compararon los cambios estructurales del CI con y sin NPs. Se espera que los diferentes sistemas ternarios generados sean potenciales sistemas para el transporte y entrega de fármacos, unificando las ventajas en terapia del uso de β CD y NPsM. Con el propósito de acercarnos a este objetivo, se realizaron algunos estudios preliminares para β CD-FEA-NPsAu, se evaluaron los porcentajes de cada componente en el sistema, la capacidad de carga que posee y la liberación del fármaco a través de irradiación láser. Todos los resultados y su discusión respectiva se detallan en el capítulo siguiente.

CAPÍTULO 5

Resultados y discusión

Evaluación de β CD-FEA-NPsAu en transporte y liberación del fármaco.

Con el fin de desarrollar sistemas ternarios que comprendan el uso de β CD, NPsM y fármacos con un potencial uso en *drug delivey*, es necesario además de demostrar su formación con una caracterización completa, realizar ensayos que permitan validar estos sistemas. Ensayos de permeabilidad (Tabatabaei, 2015), toxicidad (Coradeghini, 2012), farmacocinética (Li, 2008) y capacidad de carga (Chu, 2013; El-Dakdouki, 2013), entre otros, son comúnmente requeridos (de Jong, 2008). Para realizar algunos de estos estudios se utilizó como modelo el sistema β CD-FEA-NPsAu; se cuantificó el porcentaje de cada componente y la capacidad de carga del fármaco en el nanosistema en solución acuosa. Adicionalmente, se realizaron ensayos de permeabilidad en membranas *in vitro* y de irradiación láser del CI con y sin NPsAu en solución para evaluar la liberación del huésped usando el tratamiento fototérmico.

5.1. Cuantificación del contenido de Au, β CD y FEA en cristales del CI

En primera instancia se determinó el contenido de Au que poseen los cristales de β CD-FEA a los tiempos de PC trabajados. Para ello, se realizó una cuantificación de Au por absorción atómica, el polvo cristalino del CI con NPsAu fue tratado con una digestión ácida de una mezcla de ácido nítrico y ácido clorhídrico. A continuación, las muestras en una concentración de 1,0 mg/mL fueron medidas a una longitud de onda de 242,8 nm (slit 0,7) usando un espectrómetro de absorción atómica con lámpara doble de cátodo hueco (Au y Ag) y llama laminar. El porcentaje de Au que fue depositado en las muestras por PC durante 20 s fue del 0,673% respecto de la masa total del sistema ternario β CD-FEA-NPsAu.

Si consideramos que se pesó 1,0 mg del sistema ternario de β CD-FEA-NPsAu, el peso de oro ($W_{(Au)}$) puede ser calculado usando el porcentaje del metal ($P_{(Au)}$) en la muestra según la ecuación 5.1 y corresponde a 0,007 mg aproximadamente.

$$W_{(Au)} = \frac{W_{(t)} \cdot P_{(Au)}}{100} \quad \text{Ecuación 5.1}$$

Considerando el peso con que contribuye el Au depositado en la muestra, se pudo obtener el peso del complejo β CD-FEA según las siguientes ecuaciones:

$$W_{(t)} = W_{(\beta CD)} + W_{(FEA)} + W_{(Au)} \quad \text{Ecuación 5.2}$$

$$W_{(\beta CD-FEA)} = W_{(t)} - W_{(Au)} \quad \text{Ecuación 5.3}$$

Los pesos de β CD ($W_{(\beta CD)}$) y de FEA ($W_{(FEA)}$) se calcularon desde el peso del complejo β CD-FEA y sus fracciones másicas correspondientes ($\chi_{(\beta CD)}$ y $\chi_{(FEA)}$), según las ecuaciones 5.4 y 5.5.

$$W_{(\beta CD)} = W_{(\beta CD-FEA)} \cdot \chi_{(\beta CD)} \quad \text{Ecuación 5.4}$$

$$W_{(FEA)} = W_{(\beta CD-FEA)} \cdot \chi_{(FEA)} \quad \text{Ecuación 5.5}$$

Las fracciones másicas fueron determinadas usando el peso molecular (M.W.) de cada especie y considerando los coeficientes estequiométricos (ν) calculados para el complejo β CD-FEA. Esto fue expresado las ecuaciones 5.6 y 5.7.

$$\chi_{(\beta\text{CD})} = \frac{\text{M.W.}(\beta\text{CD}) \cdot \nu(\beta\text{CD})}{\text{M.W.}(t)} \quad \text{Ecuación 5.6}$$

$$\chi_{(\text{FEA})} = \frac{\text{M.W.}(\text{FEA}) \cdot \nu(\text{FEA})}{\text{M.W.}(t)} \quad \text{Ecuación 5.7}$$

Donde M.W.(t) corresponde a la peso molecular total del complejo β CD-FEA. El peso molecular de β CD es 1134,98 g/mol y de FEA es 121,18 g/mol. Considerando que la relación estequiométrica del complejo β CD-FEA fue 1:1, las fracciones másicas son las siguientes:

$$\chi_{(\beta\text{CD})} = \frac{1134,98 \text{ g/mol} \cdot 1}{(1134,98 + 121,18)\text{g/mol}} = 0,9$$

$$\chi_{(\text{FEA})} = \frac{121,18 \text{ g/mol} \cdot 1}{(1134,98 + 121,18)\text{g/mol}} = 0,1$$

Para 1,0 mg del sistema ternario, el peso de β CD fue de 0,894 mg y el de FEA fue de 0,099 mg. Por lo tanto, los porcentajes de β CD y FEA son 89,4% y 9,90% respectivamente. En el gráfico de la figura 5.1 se presenta un resumen de los porcentajes de cada componente en el sistema ternario β CD-FEA-NPsAu.

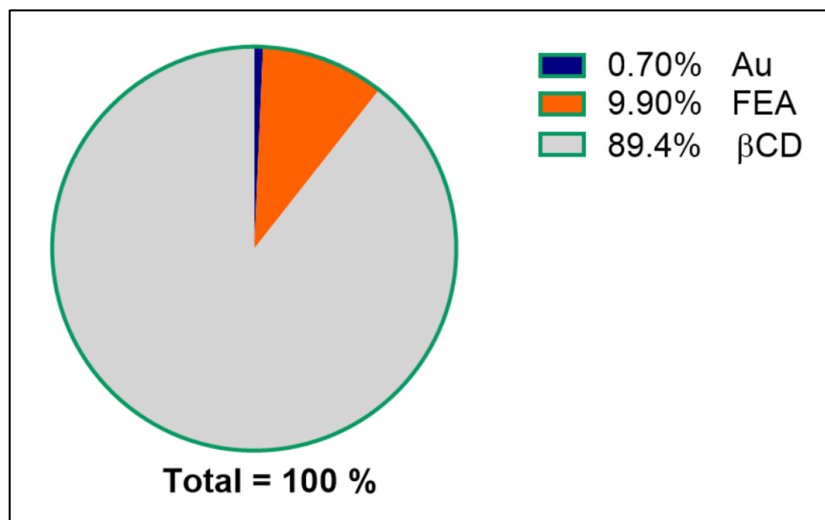


Figura 5.1: Gráfico de torta de los porcentajes de cada componente en el sistema ternario β CD-FEA-NPsAu.

5.2. Capacidad de carga de FEA en el sistema β CD-FEA-NPsAu

El sistema ternario en estado sólido al ser solubilizado posee un arreglo espacial distinto, el CI pierde su estructura cristalina y las NPsAu ahora en suspensión, son estabilizadas por las moléculas de FEA que permanecen al interior de la matriz. Las NPsAu por lo tanto son capaces de interactuar con un cierto porcentaje del complejo, sin embargo también existe otra porción de este que no cubre a las nanoestructuras, dicha porción es considerada como CI libre en solución. Por otra parte, existe una fracción aún menor del huésped que está completamente dissociado de la matriz debido al equilibrio químico entre β CD y FEA cuando forman el complejo. Para determinar la capacidad de carga del sistema, es decir, el porcentaje exacto de FEA que interactúa con las nanopartículas formando el sistema ternario en solución acuosa, y el porcentaje de FEA en exceso, se realizó un ensayo de separación de fases.

Para determinar la capacidad de carga de las NPsAu, el sistema ternario se separó de los componentes que no estaban asociados, para ello, las muestras de β CD-FEA-NPsAu fueron centrifugadas a 15700 xg por 30 minutos (ver esquema en figura 5.2). El *pellet* que contiene las NPsAu cubiertas con β CD-FEA fue separado del sobrenadante que contiene el exceso de Cl y cuantificado usando espectroscopia UV-Vis (absorbancia máxima a 258 nm) y la ley de Lamber-Beer (donde $\epsilon = 7.230 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Las concentraciones obtenidas en el sobrenadante corresponden a la porción de FEA que se encuentra libre o en el complejo β CD-FEA en solución. La fracción que corresponde a cada una de estas fue determinada usando la constante de estabilidad calculada anteriormente (674 M^{-1}). En la tabla 5.1 se muestran en detalle los valores obtenidos.

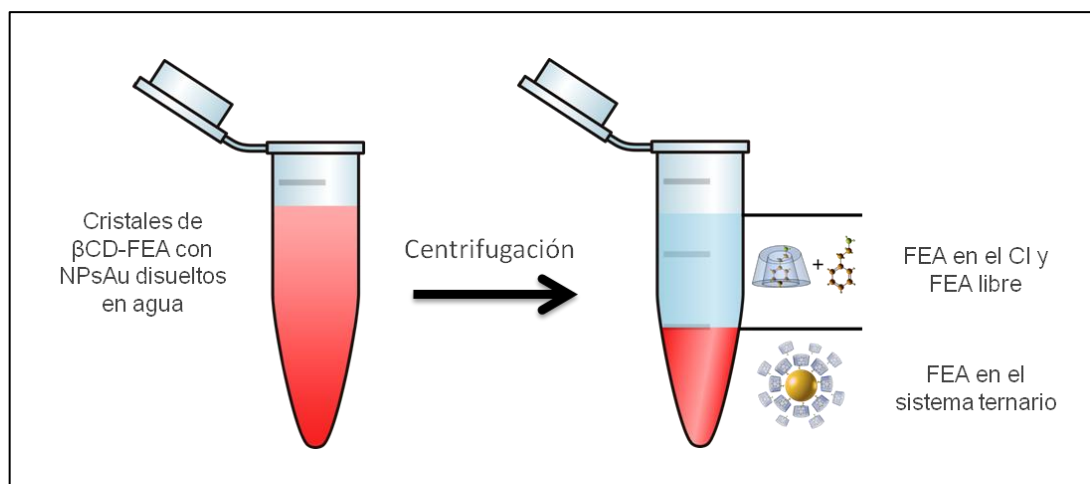


Figura 5.2: Esquema del proceso de separación de FEA en todos sus estados, por centrifugación en solución acuosa.

Tabla 5.1: Absorbancia y concentraciones de *FEA* en los diferentes sistemas estudiados. (*) Las concentraciones en el sobrenadante se calcularon usando la ley de Lambert-Beer y ϵ ($7.230 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$). (**) La concentración de *FEA* libre se calculó usando K_a (674 M^{-1}). (***) La concentración de *FEA* en el sistema ternario se obtuvo por la diferencia en el sobrenadante y el total del CI disuelto en agua ($0,132 \text{ mM}$).

Absorbancias (u.a.)	Concentración en el sobrenadante (mM) (*)	Concentración de <i>FEA</i> libre (mM) (**)	Concentración de <i>FEA</i> en el CI libre (mM)	Concentración de <i>FEA</i> en el sistema ternario (mM) (***)
0,3246	0,04490	$7,056 \times 10^{-3}$	0,03784	0,08710
0,2778	0,03842	$6,482 \times 10^{-3}$	0,03194	0,09358
0,2278	0,03151	$5,815 \times 10^{-3}$	0,02570	0,10049

La capacidad de carga del sistema ternario corresponde a un 71% con respecto al total de fármaco disuelto, mientras que el 24% de *FEA* permanece en el CI, pero sin interactuar con las NPsAu, un 5% de *FEA* se encuentra libre y dissociada de la matriz. En el gráfico de la figura 5.3 se exponen estos valores.

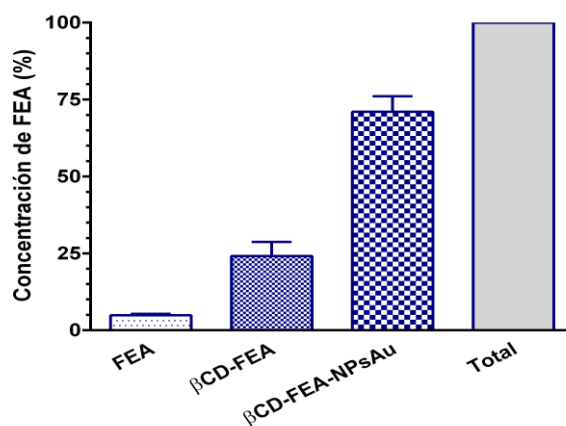


Figura 5.3: Gráfico de los diferentes porcentajes de *FEA* en la solución, comparados con el total de *FEA* cargada inicialmente.

Una representación esquemática del proceso de solubilización del sistema ternario se muestra en la figura 5.4. Las NPsAu que fueron formadas por el método de PC están depositadas en su primera etapa sobre los cristales del CI (a la izquierda) y luego, tras ser solubilizado, las moléculas del complejo cubren completamente la superficie de las NPsAu (a la derecha).

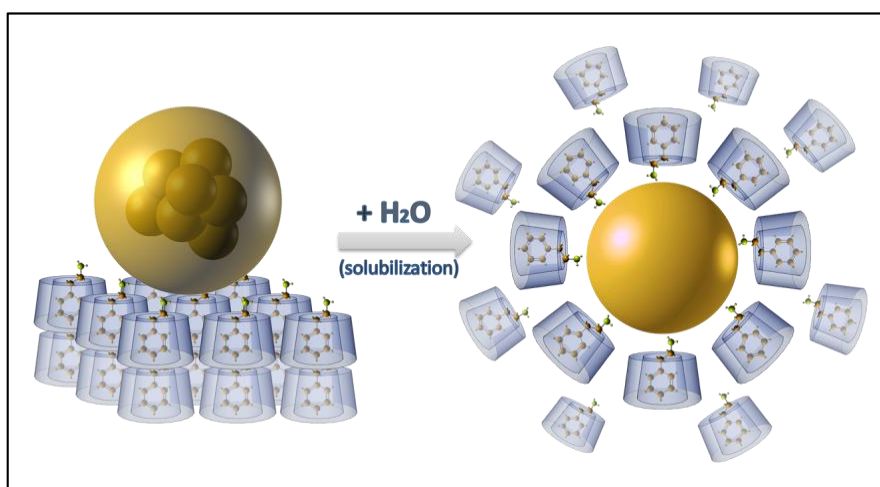


Figura 5.4: Esquematización del sistema ternario, primero en estado sólido (izquierda) y luego en solución (derecha).

5.3. Ensayos de permeabilidad PAMPA

El método PAMPA de sus siglas en inglés *parallel artificial membrane permeability assay*, es un tipo de ensayo que predice la absorción pasiva de fármacos. El análisis se desarrolla en una placa donadora y otra aceptora de doble fondo, en la que se mide la capacidad de un compuesto de difundir entre ambas placas separadas por un filtro de fosfatidilcolina; la cual actúa como membrana lipídica y simula la bicapa lipídica de distintos tipos de células (ver esquemas en figura 5.5)

El método fue diseñado para predecir la permeabilidad de ciertos compuestos, obteniéndose una buena correlación con valores de absorción en humanos para la mayoría de ellos. Puesto que las membranas artificiales no contienen ningún sistema de transporte activo o enzimas metabólicas, sólo puede estudiarse la difusión pasiva de las especies bajo este análisis (Kansy, 1998; Ottaviani, 2006).

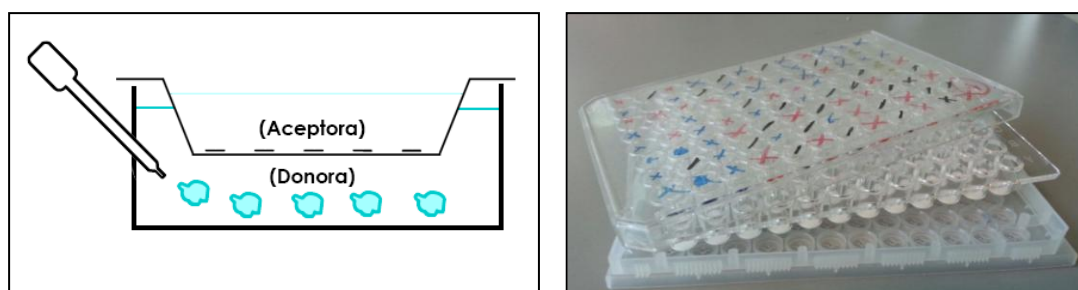


Figura 5.5: Esquema representativo de un pocillo (izquierda) y fotografía de las placas usadas (derecha), para la realización de ensayos PAMPA.

Las CD son capaces de mejorar la permeabilidad de fármacos a través de membranas artificiales si las condiciones experimentales lo permiten. Diferentes estudios han demostrado que factores como el espesor de la capa de agua estática es fundamental para evaluar permeabilidad, por ejemplo, un aumento en su espesor puede generar puentes de hidrógeno entre moléculas de agua cercanas a la membrana y las CD, actuando de manera cooperativa para evitar la movilidad del fármaco incluido. Si bien las CD formando complejos aumentan la cantidad total de moléculas de fármaco en solución, y a su vez aumentando la gradiente de concentración, el exceso de estas en el medio puede disminuir la penetración, especialmente en fármacos lipofílicos que por sí solos podrían permear la membrana. Otros factores como la velocidad de agitación,

el pH, el tipo de CD o la constante de asociación de cada complejo CD-Fármaco son variables importantes que se deben considerar (Loftsson, 2007).

Se realizaron los ensayos PAMPA de todos los sistemas obtenidos en el desarrollo de esta investigación, además de los fármacos puros, los cuales se enlistan a continuación:

- | | |
|------------------------|-----------------------------------|
| 1. β CD-TG | 9. β CD-AT-NPsAu |
| 2. β CD-TG-NPsAu | 10. β CD- <i>FEA</i> |
| 3. β CD-TG-NPsAg | 11. β CD- <i>FEA</i> -NPsAu |
| 4. β CD-MP | 12. TG |
| 5. β CD-MP-NPsAu | 13. MP |
| 6. β CD-MF | 14. MF |
| 7. β CD-MF-NPsAg | 15. AT |
| 8. β CD-AT | 16. <i>FEA</i> |

En la figura 5.6 se muestran los espectros del ensayo PAMPA del complejo β CD-MP, donde se evaluó la absorbancia en el UV-Vis para las placas donadoras (espectro a) y las placasceptoras (espectro b). Los controles utilizados se comportaron de la forma esperada, lo que indica que las membranas estaban bien construidas. En el caso del complejo estudiado, no se observó una absorbancia en la placa aceptora, por lo tanto no existe una permeabilidad efectiva de β CD-MP por difusión pasiva. Para los ensayos PAMPA realizados al fármaco MP puro, y al sistema β CD-MP-NPsAu, tampoco se observaron absorbancias en las placasceptoras, lo que implica que no fueron permeables en estas membranas. En general, los 16 sistemas estudiados no presentaron permeabilidad efectiva a las condiciones específicas de los ensayos PAMPA realizados.

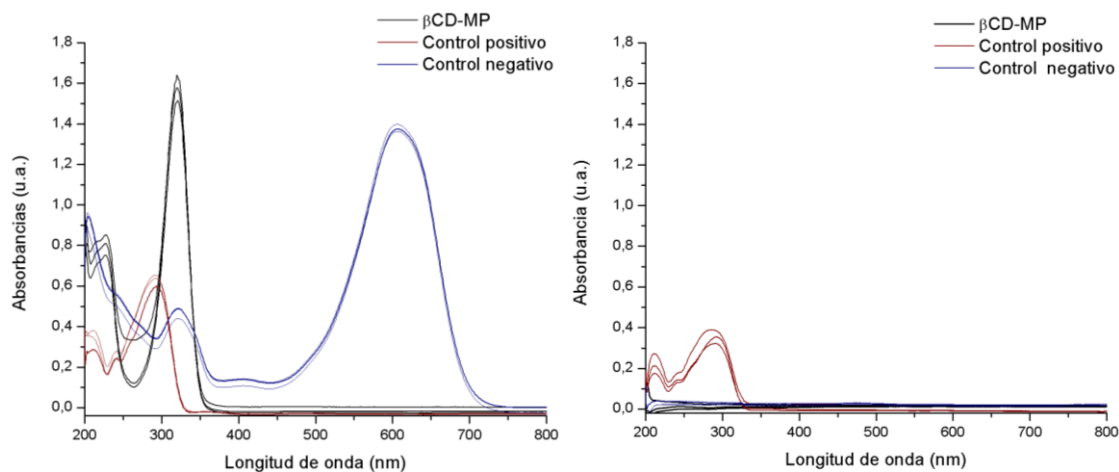


Figura 5.6: Espectros de absorbancia del complejo β CD-MP y los controles positivo (tiopental) y negativo (azul de Evans) en las placas (a) donadoras y (b) aceptoras.

Los fármacos que fueron estudiados por PAMPA no atraviesan la membrana, en primer lugar, esto podría deberse a que ninguna de estas moléculas es una especie neutra al pH y medio acuoso trabajados. Además, el uso de β CD no logró cambiar los resultados en esas condiciones experimentales; por lo tanto factores como el pH y el medio usado, junto con las constantes de asociación en esas condiciones podrían ser estudiados. Los CI con NPsAu y NPsAg no presentaron permeabilidad efectiva, lo cual es un resultado acorde con lo observado anteriormente para otros nanosistemas estudiados por nuestro grupo de investigación, en el que NPs con citrato o moléculas poliméricas no atraviesan las membranas, posiblemente debido a su tamaño. Junto con ello, cuando las NPsAu son funcionalizadas con moléculas específicas como péptidos presentan una permeabilidad efectiva muy baja en PAMPA.

Estos resultados son beneficiosos desde el punto de vista de una potencial aplicación en entrega de fármacos. Los antineoplásicos estudiados son inespecíficos, por lo tanto, en vista de una nueva ruta de entrega, estos por sí solos, formando CI o cargados a NPsM no deben atravesar las membranas por difusión pasiva, ni ingresar a células sanas o malignas sin especificidad ni control de su concentración, excepto cuando un estímulo de preferencia externo, libere el fármaco desde el sistema transportador y promueva su entrada hacia células tumorales.

5.4. Liberación del fármaco FEA por irradiación láser

Las NPsAu pueden interactuar con la radiación electromagnética generando la resonancia de plasmón superficial localizada. La energía incidente es absorbida y luego disipada en forma de calor local, lo que conlleva a su vez a la liberación de las moléculas que interactúan directamente con su superficie. A través de este fenómeno denominado en nanomedicina como terapia fototérmica, es posible promover una liberación controlada de fármacos desde estos sistemas nanoparticulados usando irradiación láser (Aroca, 2006; Le Ru, 2009; Huang, 2008; Guerrero, 2014).

Un sistema de dos fases fue diseñado para evaluar la liberación de fármacos desde el sistema ternario. Una fase acuosa que contiene NPsAu cubiertas con el CI y una fase orgánica que contiene cloroformo, donde se espera que las moléculas de FEA migren luego de la irradiación láser. Las NPsAu con el complejo fueron irradiadas desde su fase acuosa usando un láser continuo a 532 nm; provocando la liberación de FEA (insoluble en esta fase) y su migración hacia la fase orgánica. La absorbancia en el UV-Vis de FEA fue registrada en la fase orgánica a tiempos de 15, 30, 60, 90 y 120 minutos de irradiación y fueron comparados con el máximo del fármaco agregado. El sistema ternario irradiado durante 60 minutos fue comparado con otras 3 muestras usadas como controles; la primera permite evaluar la liberación de FEA desde el complejo β CD-FEA sin irradiar; la segunda muestra corresponde al complejo β CD-FEA con NPsAu y sin irradiación; la tercera corresponde al complejo β CD-FEA irradiado. Todos los controles descritos fueron medidos luego de 60 minutos y también fueron comparados con el total de fármaco utilizado para realizar estos estudios. Para los ensayos de irradiación y medición de absorbancia en el UV-Vis, se usaron cubetas de cuarzo con una solución de cloroformo como primera fase orgánica y una solución acuosa que contiene β CD-FEA-NPsAu como segunda fase (ver esquematización en la figura 5.7). El volumen de la solución acuosa fue exactamente igual al ancho del haz del láser utilizado, de manera que las NPsAu estaban completamente excitadas por la luz. Las NPsAu recubiertas con el CI fueron expuestas a irradiación láser sin la separación de las fases, y las absorbancias de FEA liberada fueron medidas únicamente en la solución de cloroformo.

Para todos los espectros de FEA registrados, los máximos de absorbancia obtenidos a 258 nm fueron convertidos a porcentajes y comparados con el máximo de absorbancia correspondiente al total de FEA agregada en el sistema, esta última curva de absorbancia fue obtenida por dilución directa en cloroformo de una cantidad equivalente del fármaco que está presente en la solución acuosa de β CD-FEA-NPsAu. Un esquema que representa los ensayos de irradiación del sistema ternario se presenta en la figura 5.7.

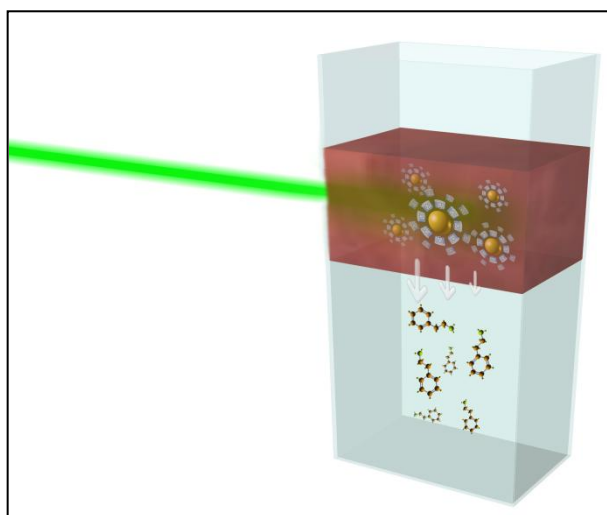


Figura 5.7: Esquemización del sistema de dos fases montado para evaluar la liberación de FEA por irradiación láser.

Durante los ensayos de liberación de FEA a diferentes tiempos (ver figura 5.8 a), fue posible medir la absorbancia de FEA en cloroformo desde los primeros 15 minutos, esto implica que desde un comienzo el fármaco es transferido a la fase orgánica de manera gradual hasta llegar a un plató observado a los 60 minutos. Al continuar aumentando el tiempo de irradiación láser, la absorbancia de FEA en la fase orgánica sigue aumentando, pero de forma desacelerada, esto fue concluyente para determinar

que 60 minutos es el tiempo óptimo de liberación de FEA desde el sistema ternario β CD-FEA-NPsAu. Con respecto a los controles realizados (ver figura 5.8 b), los ensayos de liberación sin irradiación de β CD-FEA sin nanopartículas fueron necesarios para observar si FEA migra a la fase orgánica de manera espontánea. Efectivamente, hay una porción menor de FEA que es transferida desde el complejo no irradiado, debido probablemente al equilibrio dinámico que existe en solución, donde una pequeña porción del fármaco no está incluido en la cavidad de la matriz de β CD, lo que anteriormente fue corroborado al evaluar la capacidad de carga. Con respecto al segundo ensayo control del complejo β CD-FEA con NPsAu pero sin irradiación, la porción de FEA transferida hacia la fase orgánica es aún menor, es decir, el equilibrio químico donde FEA se libera desde la matriz es interrumpido por la presencia de las NPsAu, manteniendo al huésped en la fase acuosa. Ensayos de irradiación del complejo sin la presencia de NPsAu por 60 minutos mostraron que existe una porción de FEA en la fase orgánica, sin embargo es menor a la porción de FEA liberada desde el sistema ternario irradiado. Estos resultados demuestran con certeza que el efecto fototérmico causado por las nanoesférmas promueve la liberación del fármaco desde la fase acuosa a la fase orgánica de manera más eficiente.

Todos los valores de absorbancia para los diferentes ensayos realizados, las concentraciones obtenidas y los porcentajes calculados se encuentran en la sección de anexos, tablas de la 8.16 a la 8.22.

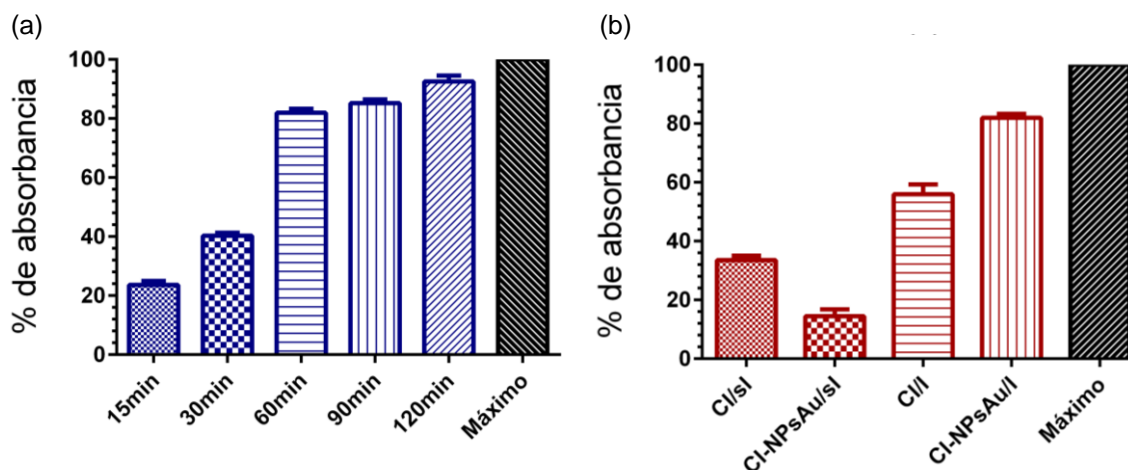


Figura 5.8: (a) Porcentajes de absorción de FEA observados desde los máximos obtenidos a 258 nm en cloroformo después de diferentes periodos de irradiación. ($n = 3$). (b) Porcentajes de absorción de FEA en 4 diferentes sistemas a 60 minutos de irradiación, donde CI/sI es complejo de inclusión/sin irradiación; CI-NPsAu/sI es complejo de inclusión con NPsAu/sin irradiación; CI/I complejo de inclusión/irradiado; CI-NPsAu/I es complejo de inclusión con NPsAu/irradiado. ($n = 3$). El porcentaje máximo corresponde al total de FEA cargada para cada ensayo.

La alta capacidad de carga y liberación que poseen los sistemas nanoparticulados son una de las características claves para su uso en terapia. El sistema β CD-FEA-NPsAu posee una capacidad de carga de FEA por sobre el 70% en solución acuosa. Además, se demostró que este sistema ternario permite la liberación del huésped de manera eficiente después de la irradiación con un láser continuo. Cabe destacar que el estudio realizado constituye el primer precedente en el que se obtuvieron este tipo de sistemas para la liberación espacial y temporalmente controlada por fototermia, empleando NPsAu y CD.

CAPÍTULO 6

Conclusiones

Los complejos de β CD con los fármacos TG, MP, MF, AT y FEA pueden ser formados en estado sólido, de manera reproducible y en relaciones molares 1:1 matriz-huésped, lo cual fue corroborado a través de DRXP y SEM. El cambio de las trazas difractométricas y de la morfología de todos los complejos con respecto a las especies puras y a la mezcla física de sus componentes, demuestran la formación de nuevas estructuras cristalinas. La indexación de las nuevas formas adquiridas de los complejos β CD-AT y β CD-FEA muestra que son sistemas cristalinos monoclinicos del tipo P2₁.

Las matrices de CD mantienen albergados a los diferentes huéspedes en solución, esto implica que las interacciones matriz-huésped permanecen, lo cual se observó mediante ¹H-RMN, las constantes de asociación determinadas en solución acuosa así lo corroboran, alcanzando valores adecuados para posibles aplicaciones en entrega de fármacos. Cada sistema posee una geometría de inclusión particular obtenida en base al análisis de sus espectros ROESY. Los grupos funcionales de los diferentes huéspedes permanecen expuestos ya sea por la abertura más ancha o por la abertura más angosta de la β CD.

En β CD-TG se observó que TG permanece al interior de la macromolécula con una variedad de formas tautoméricas, el grupo SH está orientado hacia la abertura más ancha. La molécula MP permanece completamente dentro de la matriz, y el grupo funcional SH se encuentra expuesto hacia la abertura mayor, interactuando con los grupos hidroxilos secundarios. Para el sistema β CD-MF, los análisis por RMN muestran que tanto el anillo aromático como parte de las cadenas alifáticas permanecen dentro, mientras que los grupos funcionales NH₂ y COOH se encuentran

orientados hacia la abertura más ancha. Con respecto al complejo β CD-AT se pudo demostrar que el anillo aromático y el grupo CH del anillo tiazol se encuentran incluidos en la matriz, mientras que los grupos funcionales pueden estar expuestos hacia la cavidad menor o la cavidad mayor de esta. El anillo aromático y la cadena etilo de FEA en el complejo β CD-FEA permanecen completamente albergados, orientados hacia la apertura más estrecha de β CD. Un fenómeno de tropismo fue descubierto cuando las NPsAu interactúan con este complejo, las interacciones NH_2 -Au desplazan parcialmente a la molécula FEA hacia fuera en solución, mientras que el anillo aromático permanece dentro de la matriz. Lo cual además fue corroborado por espectroscopias vibracionales IR y RAMAN; donde se observó el cambio en las vibraciones del huésped libre con respecto al huésped albergado en β CD, y los nuevos cambios cuando interactúa con NPsAu.

El alto grado de ordenamiento cristalino alcanzado implica que todos los complejos son sustratos adecuados para la formación de NPsAu de un tamaño homogéneo a través de PC en alto vacío. El método utiliza la superficie bien definida de los CI y la exposición de los grupos funcionales en las caras superficiales de los cristales para que estabilicen los átomos que se van depositando y formando las NPsM. Mediante las imágenes obtenidas por TEM se calcularon tamaños de las NPs de 20 nm de diámetro en promedio, por lo tanto el aumento en el máximo de la banda de plasmón de las nanoestructuras se debe probablemente al acoplamiento interpartícula generado por la proximidad de estas en estado sólido. En este sentido, el estudio de caras específicas de los cristales usando FE-SEM y la cuantificación generada por EDX de los componentes mayoritarios en las muestras, indican que las NPsM no se depositan en un plano preferencial en los complejos β CD-TG, β CD-MP y β CD-FEA, lo que podría

corresponder a empaquetamientos cristalinos tipo caja, obtenidos comúnmente para huéspedes de dimensiones pequeñas con respecto a la matriz; y que provoca que los grupos funcionales se orienten en múltiples direcciones. Los complejos de β CD con MF y AT, que son huéspedes con una estructura molecular de mayor tamaño, muestran con claridad un depósito preferencial en ciertos planos, debido probablemente a un ordenamiento del tipo canal o capa que genera que los grupos funcionales estén expuestos en caras cristalinas específicas. Adicionalmente, las imágenes de FE-SEM evidencian que la concentración y el número de caras pobladas por NPsAu y NPsAg dependen del tiempo de exposición de los cristales al recubrimiento efectuado por PC.

Los estudios de permeabilidad de todos los sistemas por PAMPA demostraron que ninguno de los complejos con y sin NPsM pueden atravesar las membranas artificiales por difusión pasiva, tampoco lo hacen los fármacos puros a las condiciones en que se realizaron los ensayos. La liberación de los fármacos desde los sistemas ternarios debe ser promovida por estímulos externos como irradiación láser, de este modo podrían actuar en sitios específicos del organismo durante la terapia.

Efectivamente, para el sistema β CD-FEA-NPsAu evaluado, es posible promover la liberación de FEA en solución acuosa de manera eficiente y controlada en el tiempo mediante irradiación láser. El sistema ternario, además, muestra una alta capacidad de carga del fármaco.

La construcción de sistemas ternarios puede ser útil para el transporte y liberación específica de diferentes fármacos, además de mejorar algunas desventajas terapéuticas de estos debido a las propiedades intrínsecas que poseen tanto las CD como las NPsM.

CAPÍTULO 7

Referencias

Adeli, M., et. al. Polyrotaxane/Gold Nanoparticle Hybrid Nanomaterials as Anticancer Drug Delivery Systems. *J. Mater. Chem.* 2011, 21, 18686–18695.

Adura, C., et. al. Stable Conjugates of Peptides with Gold Nanorods for Biomedical Applications with Reduced Effects on Cell Viability. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2013, 5, 4076–4085.

Akolade, J., et. al. Phyto-Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Application to Bioactive Products Development, *J. Environ. Res.* 2012, 6(2), 136-140.

Álvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A. Molecularly Imprinted Materials as Advanced Excipients for Drug Delivery Systems. *Biotechnol. Annu. Rev.* 2006, 12, 225-268.

Anonymous, Physician's Desk Reference. Medical Economics Data Production Company, Montvale, NJ. 1997.

Aree, T., et. al. Polymorphism in β -cyclodextrin–benzoic Acid Inclusion Complex: a Kinetically Controlled Crystal Growth According to the Ostwald's Rule. *Carbohydr. Res.* 2008, 343, 2451-2458.

Aroca, R. The Interaction of Light with Nanoscopic Metal Particles and Molecules on Smooth Reflecting Surfaces. In *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*; John Wiley and Sons: Chichester, 2006; Chapter 2, pp 35–71.

Asanithi, P., et. al. Growth of Silver Nanoparticles by DC Magnetron Sputtering. *J. Nanomater.* 2012, 2012, 1-8.

-
- Bansal, S., et. al. Biocompatibility of Gold Nanoparticles and their Endocytotic Fate inside the Cellular Compartment: A Microscopic Overview. *Langmuir* 2005, 21, 10644–10654.
- Barrientos, L., et. al. Ordered Arrangement of Gold Nanoparticles on an α -Cyclodextrin–Dodecanethiol Inclusion Compound Produced by Magnetron Sputtering. *New J. Chem.* 2007, 31, 1400–1402.
- Barrientos, L., et. al. Metallic Nanoparticle Tropism of Alkylthiol Guest Molecules Included into α -Cyclodextrin Host. *Supramol. Chem.* 2009, 21, 264–267.
- Barrientos, L., et. al. Ordered Arrangements of Metal Nanoparticles on Alpha-Cyclodextrin Inclusion Complexes by Magnetron Sputtering. *Inorg. Chim. Acta* 2012, 380, 372–377.
- Barrientos, L., et. al. Structural Elucidation of Supramolecular Alpha-Cyclodextrin Dimer/Aliphatic Monofunctional Molecules Complexes. *J. Mol. Model.* 2013, 19, 2119–2126.
- Bertrand, N., et. al. Cancer Nanotechnology: The Impact of Passive and Active Targeting in the Era of Modern Cancer Biology. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2014, 66, 2–25.
- Bettinetti, G., e. al. Polymorphism, Pseudopolymorphism, and Amorphism of Peracetylated α -, β -, and γ -Cyclodextrins. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, 41, 1205-1211.

-
- Bhattacharyya, S., et. al. Inorganic Nanoparticles in Cancer Therapy. *Pharm. Res.* 2011, 28(2), 237-259.
- Bohon, J., De los Santos, C. Structural Effect of the Anticancer Agent 6-Thioguanine on Duplex DNA. *Nucleic Acids Res.* 2003, 31(4), 1331-1338.
- Brigger, I., et. al. Nanoparticles in Cancer Therapy and Diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev*; 2002, 54, 631–651.
- Brust, M., et. al. Synthesis of Thiol-Derivatised Gold Nanoparticles in a Two-Phase Liquid–Liquid System. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1994, 801-802.
- Caira, M. R. On the Isostructurality of Cyclodextrin Inclusion Complexes and its Practical Utility. *Rev. Roum. Chim.* 2001, 46, 371– 386.
- Chang, S., Alberts, D. Hydrolysis and Protein Binding of Melphalan. *J. Pharm. Sci.* , 1978, 67(5), 682-684.
- Chen, M., et. al. Study of Inclusion Complex of β -Cyclodextrin and Nitrobenzene. *Chemosphere* 2006, 63, 522–529.
- Chen, M. C., et. al. Self-Assembled Monolayer Immobilized Gold Nanoparticles for Plasmonic Effects in Small Molecule Organic Photovoltaic. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2013, 5, 511–517.
- Chen, W., et. al. Calculations of Cyclodextrin Binding Affinities: Energy, Entropy and Implications for Drug Design. *Biophys. J.* 2004, 87(5), 3035-3049.

-
- Chu, K., et. al. Nanoparticle Drug Loading as a Design Parameter to Improve Docetaxel Pharmacokinetics and Efficacy. *Biomaterials*, 2013, 34(33), 8424-8429.
- Coleman A. W., et. al. Aggregation of Cyclodextrins: An explanation of the Abnormal Solubility of β -cyclodextrin. *J. Inclus. Phenom. Mol.* 1992, 13, 139-143.
- Colleen, M. A., et. al. Investigation of the Drug Binding Properties and Cytotoxicity of DNA-Capped Nanoparticles Designed as Delivery Vehicles for the Anticancer Agents Doxorubicin and Actinomycin D. *Bioconjugate Chem.* 2012, 23, 2061–2070.
- Connor, E., et. al. Gold Nanoparticles are Taken Up by Human Cells but do not Cause Acute Cytotoxicity. *Small* 2005, 1, 325–327.
- Connors, K. A. The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. *Chem. Rev.* 1997, 97, 1325–1357.
- Coradeghini, R., et. al. Size-dependent toxicity and cell interaction mechanisms of gold nanoparticles on mouse fibroblasts. *Toxicol. Lett.* 2013, 217(3):205-216.
- Creighton J., Eadon D. Ultraviolet-Visible Absorption Spectra of the Coloidal Metallic Elements. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1991, 87(24), 3881-3891.
- Crestani J., et. al. Cyclodextrins and Ternary Complexes: Technology to Improve Solubility of Poorly Soluble Drugs. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2011, 47, 665-681.
- Dang, Z., et. al. Applications of Powder X-Ray Diffraction to Inclusion Complexes of Cyclodextrins. *Curr. Org. Chem.* 2011, 15, 848-861.

-
- Daniel, M.; Astruc, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chem. Rev.* 2004, 104, 293–346.
- Das, B., et. al. A Rapid and High-Yielding Synthesis of Thiazoles and Aminothiazoles using Ammonium-12-molybdophosphate. *J. Mol. Catal. A Chem.* 2006, 252, 235-237.
- De Jong W., Borm P. Drug Delivery and Nanoparticles: Applications and Hazards. *Int. J. Nanomedicine* 2008 3, 133-149.
- de Oliveira, V., et. al. Carotenoids and β -Cyclodextrin Inclusion Complexes: Raman Spectroscopy and Theoretical Investigation. *J. Phys. Chem. A* 2011, 115, 8511–8519.
- Del Valle E.M.M. Cyclodextrins and Their Uses: a Review. *Process Biochem.* 2004, 39, 1033-1046.
- Douhal A. Ultrafast Guest Dynamics in Cyclodextrin Nanocavities. *Chem. Rev.* 2004, 104, 1955-1976.
- Dykman, L., Khlebtsov, N. Gold Nanoparticles in Biomedical Applications: Recent Advances and Perspectives. *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41, 2256–2282.
- Elion, G. B. The Purine Path to Chemotherapy. *Science* 1989, 244, 41-47.
- El-Dakdouki, M., et. al. Development of Drug Loaded Nanoparticles for Tumor Targeting. Part 1: Synthesis, Characterization, and Biological Evaluation in 2D Cell Cultures. *Nanoscale*, 2013,5, 3895-3903.

-
- Erb, N., et. al. Pharmacokinetics and Metabolism of Thiopurines in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia Receiving 6-Thioguanine versus 6-Mercaptopurine. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1998, 42, 266-272.
- Etheridge, M., et. al. The Big Picture on Nanomedicine: The State of Investigational and Approved Nanomedicine Products. *Nanomedicine (N. Y., NY, U. S.)* 2013, 9, 1–14.
- Feng, X., et. al. Conjugated Polymer Nanoparticles for Drug Delivery and Imaging. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2010, 2, 2429–2435.
- Frisch, M. J., et. al. Gaussian 09, revision D.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2009.
- Fujiki, Y., et. al. Anisotropic decoration of gold nanoparticles onto specific crystal faces of organic single crystals. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 2006, 45, 4764–4767.
- Gellman, S.H. Introduction: Molecular Recognition. *Chem. Rev.* 1997, 97, 1231-1232.
- Ghosh S. and Pal T. Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: from Theory to Applications. *Chem. Rev.* 2007, 107, 4797-4862.
- Gibson, J. D., et. al. Paclitaxel Functionalized Gold Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 11653–11661.
- Gimenez, L., et. al. Cytotoxicity on V79 and HL60 Cell Lines by Thiolated- β -Cyclodextrin-Au/Violacein Nanoparticles. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2005, 1, 1–7.
- Guerrero, A., et. al. Gold Nanoparticles for Photothermally Controlled Drug Release. *Nanomedicine (London, U. K.)* 2014, 13, 2023-2029.

Gottlieb, H; Kotlyar, V.; Nudelman, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J. Org. Chem.* 1997, 62, 7512-7515.

Guerrero, S., et. al. Improving the Brain Delivery of Gold Nanoparticles by Conjugation with an Amphipathic Peptide. *Nanomedicine* 2010, 5, 897–913.

Häkkinen, H. The Gold–Sulfur Interface at the Nanoscale. *Nat. Chem.* 2012, 4, 443–455.

Hatakeyama, Y., et. al. Effects of Sputtering Conditions on Formation of Gold Nanoparticles in Sputter Deposition Rechnique. *RSC Adv.* 2011, 1, 1815–1821.

Heise, H., et. al. Infrared Spectroscopy and Raman Spectroscopy of Cyclodextrin Derivatives and their Ferrocene Inclusion Complexes. *Vib. Spectrosc.* 2010, 53, 19–23.

Herrera, B., et. al. Silver Nanoparticles Produced by Magnetron Sputtering and Selective Nanodecoration onto α -Cyclodextrin/Carboxylic Acid Inclusion Compounds Crystals. *Adv. Nanopart.* 2013, 2, 112-119.

Higuchi, T.; Connors, K. A. Phase Solubility Techniques. *Adv. Anal. Chem. Instrum.* 1965, 4, 117–122.

Hirose K. A Practical Guide for the Determination of Binding Constants. *J. Incl. Phenom. Macroc. Chem.* 2001, 39, 193–209.

Holla, B. S., et. al. Synthesis of Some New 2,4-disub- Stituted Thiazoles as Possible Antibacterial and Anti-In- Flammatory Agents. *Eur. J. Med. Chem.* 2003, 38(3), 313-318.

Huang, X., et. al. Special Focus: Nanoparticles for Cancer diagnosis & Therapeutics – Review. Gold nanoparticles: Interesting Optical Properties and Recent Applications in Cancer Diagnostics and Therapy. *Nanomedicine* 2007, 2(5), 681-693.

Huang, X., et. al. Plasmonic Photothermal Therapy (PPTT) Using Gold Nanoparticles. *Lasers Med. Sci.* 2008, 23, 217-228.

Huang, Y., et. al. β -Cyclodextrin Controlled Assembling Nanostructures from Gold Nanoparticles to Gold Nanowires. *Chem. Phys. Lett.* 2004, 389, 14–18.

Jain, S., et. al. Gold Nanoparticles as Novel Agents for Cancer Therapy. *Br. J. Radiol.* 2012, 85, 101–113.

Jaiswal, S., et. al. Enhancement of the Antibacterial Properties of Silver Nanoparticles using β -cyclodextrin as a Capping Agent. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2010, 36, 280–283.

Jeyaraj, M., et. al., Biogenic Silver Nanoparticles for Cancer Treatment: an Experimental Report. *Colloids Surf., B* 2013, 106, 86-92.

Kabashin, A., et. al. Fabrication and Characterization of Gold Nanoparticles by Femtosecond Laser Ablation in an Aqueous Solution of Cyclodextrins. *J. Phys. Chem. B* 2003, 107, 4527–4531.

Kansy, M., et. al. Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes. *J. Med. Chem.* 1998, 41(7), 1007-1009.

Kelly, P., Arnell, R. Magnetron Sputtering: a Review of Recent Developments and Applications. *Vacuum*, 2010, 56, 159-172.

-
- Khlebtsov, N., Dykman, L. Optical Properties and Biomedical Applications of Plasmonic Nanoparticles. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer* 2010, 111, 1–35.
- Kim, J., et. al. Antimicrobial Effects of Silver Nanoparticles. *Nanomedicine* 2007, 3(1), 95-101.
- Kobayashi, H., et. al. Improving Conventional Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effects; What Is the Appropriate Target? *Theranostics* 2014, 4, 81–89.
- Kogan, M., et. al. Peptides and Metallic Nanoparticles for Biomedical Applications. *Nanomedicine* 2007, 2 (3), 287-306.
- Kubelka, P. and Munk, F. Ein Beitrag Zur Optik Der Farbanstriche. *Z. Tech. Phys.* 1931, 12, 593-601.
- Kulkarni, N., et. al. Biosynthesis of Metal Nanoparticles: A Review. *J. Nanotechnol.* 2014, 2014, 1-8.
- Kumar, A., et. al. Investigation into the Interaction between Surface-Bound Alkylamines and Gold Nanoparticles. *Langmuir* 2003, 19,6277–6282.
- Kumar, S., et. al. Modeling of Formation of Gold Nanoparticles by Citrate Method. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2007, 46, 3128–3136.
- Lance, K., et. al. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B* 2003, 107, 668–677.

Lasagna-Reeves, C., et. al. Bioaccumulation and Toxicity of Gold Nanoparticles after Repeated Administration in Mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010, 393, 649–655.

Latosinska, J; et. al. Hydrogen Bonding and Stacking π - π Interactions in Solid 6-Thioguanine and 6-Mercaptopurine (Antileukemia and Antineoplastic Drugs) Studied by NMR-NQR Double Resonance Spectroscopy and Density Functional Theory. *J. Phys. Chem. A* 2009, 113, 8781–8790.

Laza-Knoerr A. Cyclodextrins for Drug Delivery. *J. Drug. Target* 2010, 18, 645–656.

Le Ru, E.; Etchegoin, P. Introduction to Plasmons and Plasmonics. In *Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy (and Related Plasmonic Effects)*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2009; Chapter 3, pp 121–183.

Leff, D., et. al. Synthesis and Characterization of Hydrophobic, Organically-Soluble Gold Nanocrystals Functionalized with Primary Amines. *Langmuir*, 1996, 12(20), 4723–4730.

Lehn, J. M. Perspectives in Supramolecular Chemistry from Molecular Recognition towards Molecular Information Processing and Self-Organization. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1990, 29, 1304-1319.

Leszczynski, J. Tautomers of 6-thioguanine: structures and properties. *J. Phys. Chem.* 1993, 97 (14), 3520–3524.

Li, S., Huang, L. Pharmacokinetics and Biodistribution of Nanoparticles. *Mol. Pharmaceutics* 2008, 5(4):496-504.

-
- Li, X., et. al. An Artificial Supramolecular Nanozyme Based on β -Cyclodextrin Modified Gold Nanoparticles. *Catal. Lett.* 2008, 124, 413–417.
- Libutti, S., et. al. Phase, I. and Pharmacokinetic Studies of CYT-6091, a Novel PEGylated Colloidal Gold-rhTNF Nanomedicine. *Clin. Cancer Res.* 2010, 16, 6139–6149.
- Liu, B. Therapeutic Potential of Cyclodextrins in the Treatment of Niemann–Pick type C disease. *J. Clin. Lipidol.* 2012, 7, 289–301.
- Liu, Y., et. al. Control of the Size and Distribution of Gold Nanoparticles by Unmodified Cyclodextrins. *Chem. Mater.* 2003, 15, 4172–4180.
- Loftsson T., Brewster M. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 1. Drug Solubilization and Stabilization, Review. *J. Pharm. Sci.* 1996, 85(10), 1017-1025.
- Loftsson, T.; et. al. Effects of Cyclodextrins on Drug Delivery Through Biological Membranes. *J. Pharm. Sci.* 2007, 96(10), 1532-1546.
- Loftsson, T.; Brewster, M. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins: Basic Science and Product Development. *J. Pharm. Pharmacol.* 2010, 62, 1607–1621.
- López, C., et. al. Computational Microscopy of Cyclodextrin Mediated Cholesterol Extraction from Lipid Model Membranes. *Scientific reports*, 3, 2071. DOI: 10.1038/srep02071
- Lu, Y., et. al. Cold Welding of Ultrathin Gold Nanowires. *Nat. Nanotechnol.* 2010, 5, 218-224.

Ma, D., et. al. New injectable melphalan formulations utilizing (SBE) γ -CD or HP- β -CD. *Int. J. Pharm.* 1999, 189, 227-234.

Mafuné, F., et. al. Formation and Size Control of Silver Nanoparticles by Laser Ablation in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. B* 2000, 104, 9111-9117.

Medlicott, N., et. al. Evaluation of the Extravasation Potential Vehicles for Anticancer Drugs (Organic Co-solvents and Cyclodextrin Solutions) Using Cultured Endothelia Cells (HUV-EC). *J. Pharm. Sci.* 1998, 87, 1138–1143.

Mock, J., et. al. Local Refractive Index Dependence of Plasmon Resonance Spectra from Individual Nanoparticles. *Nano Lett.* 2003, 3, 485–491.

Murugesan, M., et. al. Nanoparticle-Coated Microcrystals. *Chem. Commun.* (Cambridge, U. K.) 2005, 2677–2679.

Nikolic, K., et. al. Self-assembly of Nanoparticles on the Surface of Ionic Crystals: Structural Properties. *Surf. Sci.* 2007, 600, 2730-2734.

Nagaraju, M., Narahari, G. Theoretical Studies on Inclusion Complexes of Cyclodextrins. *J. Phys. Chem. A* 2009, 113, 9533–9542.

Nehoff, H., et. al. Nanomedicine for Drug Targeting: Strategies Beyond the Enhanced Permeability and Retention Effect. *Int. J. Nanomed.* 2014, 9, 2539–2555.

Okamoto, T.; Yamaguchi, I. Optical Absorption Study of the Surface Plasmon Resonance in Gold Nanoparticles Immobilized onto a Gold Substrate by Self-Assembly Technique. *J. Phys. Chem. B* 2003, 107, 10321–10324.

-
- Okumu, J., et. al. Photochromic silver nanoparticles fabricated by sputter deposition. *J. Appl. Phys.* 2005, 97 (094305), 1-6.
- Ong, C., Lim, J. Z. 2013. Silver Nanoparticles in Cancer: Therapeutic Efficacy and Toxicity. *Curr. Med. Chem.* 2013, 20(6), 772-781.
- Ottaviani, G., et. al. Parallel Artificial Membrane Permeability Assay: a New Membrane for the Fast Prediction of Passive Human Skin Permeability. *J. Med. Chem.* 2006, 49(13), 3948-3954.
- Ottinger, E., et. al. Collaborative Development of 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin for the Treatment of Niemann-Pick Type C1 Disease. *Curr. Top. Med. Chem. (Sharjah, United Arab Emirates)* 2014, 14, 330–339.
- Pan, Y., et. al. Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. *Small* 2007, 3, 1941–1949.
- Pandian, K., et. al. Synthesis and Characterization of the Inclusion Complex of β -Cyclodextrin and Azomethine. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 3671–3682.
- Park, C., et. al. Cyclodextrin-Covered Gold Nanoparticles for Targeted Delivery of an Anti-Cancer Drug. *J. Mater. Chem.* 2009, 19, 2310– 2315.
- Pessine, F.; Calderini, A.; Alexandrino, G. Review: Cyclodextrin Inclusion Complexes Probed by NMR Techniques. In: *Magnetic Resonance Spectroscopy*, Edited by Donghyun Kim: 2014; chapter 12, 237-265.
- Porter, L., et. al. Gold and Silver Nanoparticles Functionalized by the Adsorption of Dialkyl Disulfides. *Langmuir*, 1998, 14(26), 7378–7386.

Prades, R., et. al. Delivery of Gold Nanoparticles to the Brain by Conjugation with a Peptide that Recognizes the Transferrin Receptor. *Biomaterials* 2012, 33, 7194–7205.

Rao, V. M.; Stella, V. J. When can Cyclodextrins be Considered for Solubilizing Purposes. *J. Pharm. Sci.* 2003, 92, 927–932.

Rasheed A., et. al. Cyclodextrins as Drug Carrier Molecule: A Review. *Sci. Pharm.* 2008, 76, 567–598.

Melo N., et. al. Interaction between Nitroheterocyclic Compounds with β -cyclodextrins: Phase Solubility and HPLC Studies. *J. Pharmaceut. Biomed.* 2008, 47, 865-869.

Rodriguez-Llamazares, S., et. al. Face Preferred Deposition of Gold Nanoparticles on α -Cyclodextrin/Octanethiol Inclusion Compound. *J. Colloid. Interface Sci.* 2007, 316, 202–205.

Roustom, B., et. al. Preparation of Gold Nanoparticles by Heat Treatment of Sputter Deposited Gold on Boron-Doped Diamond Film Electrode. *Electrochem. Commun.* 2005, 7, 398-405.

Sabelli, H., Javaid, J. Phenylethylamine Modulation of Affect: Therapeutic and Diagnostic Implications. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 1995, 7,6–14.

Sabelli, H., et. al. Sustained Antidepressant Effects of PEA Replacement. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 1996, 8, 168–171.

Sampaio, C., et. al. Curcumin- β -Cyclodextrin Inclusion Complex: Stability, Solubility, Characterisation by FT-IR, FT-Raman, X-Ray Diffraction and Photoacoustic Spectroscopy, and Food Application. *Food Chem.* 2014, 153, 361-370.

-
- Safi, I. Recent Aspects Concerning DC Reactive Magnetron Sputtering of Thin Films: a Review. *Surf. Coat. Tech.* 2000, 127, 203-219.
- Schneider, H.; Hacket, F.; Rudiger, V. NMR Studies of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes. *Chem. Rev.* 1998, 98, 1755-1785.
- Shaji, J., Lal, M. Nanocarriers for Targeting in Inflammation. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 2013, 6, 3-12.
- Shi, Y., et. al. Cyclodextrin Capped Gold Nanoparticles as a Delivery Vehicle for a Prodrug of Cisplatin. *Inorg. Chem.* 2013, 52, 9418-9426.
- Sierpe, R.; et. al. Gold Nanoparticles Interacting with β -Cyclodextrin-Phenylethylamine Inclusion Complex: A Ternary System for Photothermal Drug Release. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2015, 7(28), 15177-15188.
- Singh, R.; et. al. Characterization of Cyclodextrin Inclusion Complexes. A Review. *J. Pharm. Sci. Technol.* 2010, 2(3), 171-183.
- Sonavane, G., et. al. Biodistribution of Colloidal Gold Nanoparticles after Intravenous Administration: Effect of Particle Size. *Colloids Surf., B* 2008, 66, 274-280.
- Sperling, R.; Parak, W. Surface Modification, Functionalization and Bioconjugation of Colloidal Inorganic Nanoparticles. *Philos. Trans. R. Soc., A* 2010, 368, 1333-1383.
- Stella, V., He, Q. Cyclodextrins. *Toxicol. Pathol.* 2008, 36, 30- 42.
- Stewart, M.; Leszczynski, J.; et. al. Tautomerism of Thioguanine: From Gas Phase to DNA. *J. Phys. Chem. A* 1997, 101 (26), 4753- 4760.

-
- Stezowski, J; et. al. Pseudopolymorphism in Tetradeca-2,6-O-methyl- α -cyclodextrin: The Crystal Structures for Two New Hydrates Conformational Variability in the Alkylated α -Cyclodextrin Molecule. *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123(17), 3919–3926.
- Su, K., et. al. Interparticle Coupling Effects on Plasmon Resonances of Nanogold Particles. *Nano Lett.* 2003, 3, 1087– 1090.
- Sun, S., Zeng, H. Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 8204-8205.
- Suzuki, O., et. al. Oxidation of β -Phenylethylamine by Both Types of Monoamine Oxidase: Examination of Enzymes in Brain and Liver Mitochondria of Eight Species. *J. Neurochem.* 1981, 36, 1298–1301.
- Sylvestre, J., et. al. Stabilization and Size Control of Gold Nanoparticles during Laser Ablation in Aqueous Cyclodextrins. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 7176–7177.
- Szabo, A., et. al. Phenylethylamine, a Possible Link to the Antidepressant Effects of Exercise? *Br. J. Sports Med.* 2001, 35, 342–343.
- Szejtli, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev.* 1998, 98, 1743-1753.
- Tabatabaei, S., et. al. Remote Control of the Permeability of the Blood–Brain Barrier by Magnetic Heating of Nanoparticles: A Proof of Concept for Brain Drug Delivery. *J. Controlled Release* 2015, 206, 49-57.
- Takemoto, K., Sonoda, N. Inclusion Compounds. J.L. Attwood, J.E.D.Davies, D.D. McNicols, Eds.; Academic Press, New York; Vol. 2, 1984.

-
- Tang, B., et. al. A New Nanobiosensor for Glucose with High Sensitivity and Selectivity in Serum Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) between CdTe Quantum Dots and Au Nanoparticles. *Chem. Eur. J.* 2008, 14, 3637–3644.
- Tirelli, N. (Bio)Responsive Nanoparticles. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2006, 11, 210–216.
- Thakkar, A.; Demarco, V. Cycloheptaamylose Inclusion Complexes of Barbiturates: Correlation between Proton Magnetic Resonance and Solubility Studies. *Eur. J. Pharm. Sci.* 1971, 60, 652–653.
- Torimoto, T., et. al. Ultrathin Oxide Shell Coating of Metal Nanoparticles Using Ionic Liquid/Metal Sputtering. *J. Mater. Chem. A* 2015, 3, 6177-6186.
- Turkevich, J., et. al. The Formation of Colloidal Gold. *J. Phys. Chem.* 1953, 57(7), 670-673.
- Ulrich S., 2004. Nanoparticles: from theory to application. Editorial Schmid, G. Wiley-VCH, Weinheim, 328.
- Vanecht, E., et. al. Growth of Sputter-Deposited Gold Nanoparticles in Ionic Liquids. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2011, 13,13565–13571.
- Vasiliev, A., et. al. Highly Dispersible Polymer-Coated Silver Nanoparticles. *Surf. Coat. Technol.* 203 (2009) 2841–2844.
- Venkatachalam, T. K., et. al. Anti-HIV Activity of Aromatic and Heterocyclic Thiazolyl Thiourea Compounds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2001, 11, 523-528.

-
- Vite, C., et. al. Intracisternal Cyclodextrin Prevents Cerebellar Dysfunction and Purkinje Cell Death in Feline Niemann-Pick Type C1 disease. *Sci. Transl. Med.* 2015, 7, 276-296.
- Wang, J.; Zhang, W. Sputtering Deposition of Gold Nanoparticles onto Vertically Aligned Carbon Nanotubes for Electroanalysis of Uric Acid. 2011, 654, 79-84.
- Wang, L., et. al. Characterization of Gold Nanorods in Vivo by Integrated Analytical Techniques: Their Uptake, Retention, and Chemical Forms. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, 396, 1105–1114.
- Wang, Z. Plasmon-Resonant Gold Nanoparticles for Cancer Optical Imaging. *Sci. China: Phys., Mech. Astron.* 2013, 56(3), 506-513.
- Wender, H., et. al. Ionic Liquid Surface Composition Controls the Size of Gold Nanoparticles Prepared by Sputtering Deposition. *J. Phys. Chem. C* 2010, 114, 11764–11768.
- Wong-ek, K., et. al. Silver Nanoparticles Deposited on Anodic Aluminum Oxide Template using Magnetron Sputtering for Surface-Enhanced Raman Scattering Substrate. *Thin Solid Films* 2010, 518, 7128–7132.
- Wood, D.; Hruska, F.; Saengeric, W. ¹H-NMR Study of the Inclusion of Aromatic Molecules in α -Cyclodextrin. *J. Am. Chem. Soc.* 1977, 99(6), 1735-1740.
- Yamamoto, M., et. al. Size-Controlled Synthesis of Monodispersed Silver Nanoparticles Capped by Long-Chain Alkyl Carboxylates from Silver Carboxylate and Tertiary Amine. *Langmuir*, 2006, 22 (20), 8581–8586.

Yen, H. J., et. al. Cytotoxicity and Immunological Response of Gold and Silver Nanoparticles of Different Sizes. *Small* 2009, 5, 1553–1561.

CAPÍTULO 8

Anexos

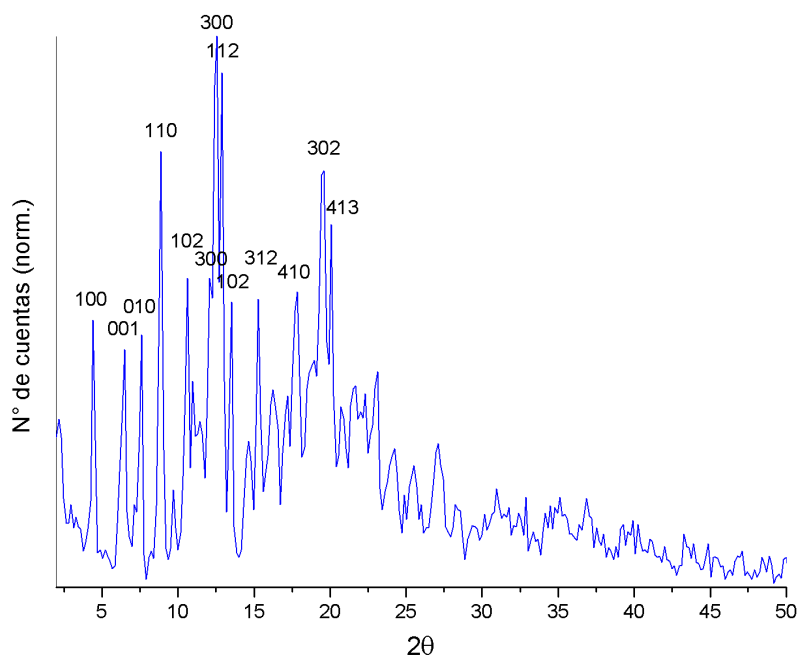


Figura 8.1: Difractograma de β CD pura con la indexación de sus picos principales.

Tabla 8.1. Datos obtenidos de la indexación de las reflexiones de β CD.

hkl	Ángulo experimental (2θ)	Ángulo calculado (2θ)	Diferencia (2θ)	Distancia experimental (Å)	Distancia calculada (Å)	Intensidad porcentual (norm.)
100	4,797	4,492	0,305	18,406	19,656	34,2
001	7,030	6,317	0,714	12,563	13,981	27,0
010	8,252	8,583	-0,331	10,706	10,294	30,9
110	9,717	9,691	0,026	9,095	9,119	54,1
102	11,776	11,713	0,063	7,509	7,549	36,0
300	13,451	13,503	-0,052	6,577	6,552	35,6
300	13,870	13,503	0,366	6,380	6,522	100,0
112	14,358	14,539	-0,181	6,164	6,088	67,6
102	14,986	14,958	0,028	5,907	5,918	30,2
312	17,010	16,968	0,043	5,208	5,221	29,0
410	19,906	20,006	-0,100	4,457	4,435	29,8
302	21,756	21,801	-0,045	4,082	4,073	47,9
413	22,419	22,450	-0,032	3,962	3,957	36,4

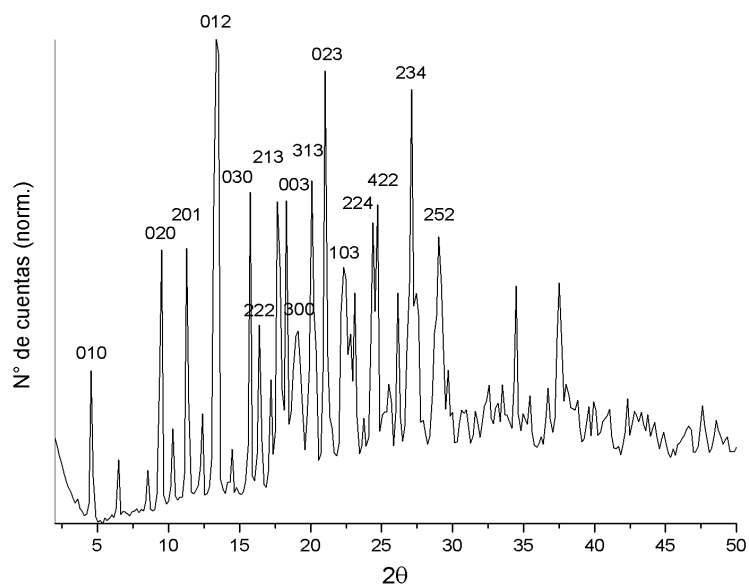


Figura 8.2: Diffractograma de β CD-AT con la indexación de sus picos principales.

Tabla 8.2. Datos obtenidos de la indexación de las reflexiones de β CD-AT.

hkl	Ángulo experimental (2 θ)	Ángulo calculado (2 θ)	Diferencia (2 θ)	Distancia experimental (Å)	Distancia calculada (Å)	Intensidad porcentual (norm.)
010	4,884	5,349	-,0465	18,079	16,509	55,5
020	9,912	10,709	-0,797	8,916	8,255	48,6
201	11,820	11,565	0,255	7,481	7,646	70,0
012	13,866	13,918	-0,052	6,382	6,358	100,0
030	16,398	16,093	0,304	5,402	5,503	47,4
300	17,126	17,226	-0,100	5,173	5,144	30,7
222	18,478	18,456	0,022	4,798	4,803	88,5
213	19,103	19,311	-0,208	4,642	4,593	47,2
003	19,657	19,567	0,091	4,513	4,533	31,5
313	20,941	20,948	-0,007	4,239	4,237	64,8
023	21,877	22,132	-0,255	4,059	4,013	65,8
103	23,160	23,089	0,071	3,837	3,849	46,8
224	25,345	25,397	-0,052	3,511	3,504	39,8
422	25,657	25,660	-0,003	3,469	3,469	50,3
234	28,154	28,166	-0,012	3,167	3,166	57,9
252	30,235	30,265	-0,030	2,954	2,951	38,4

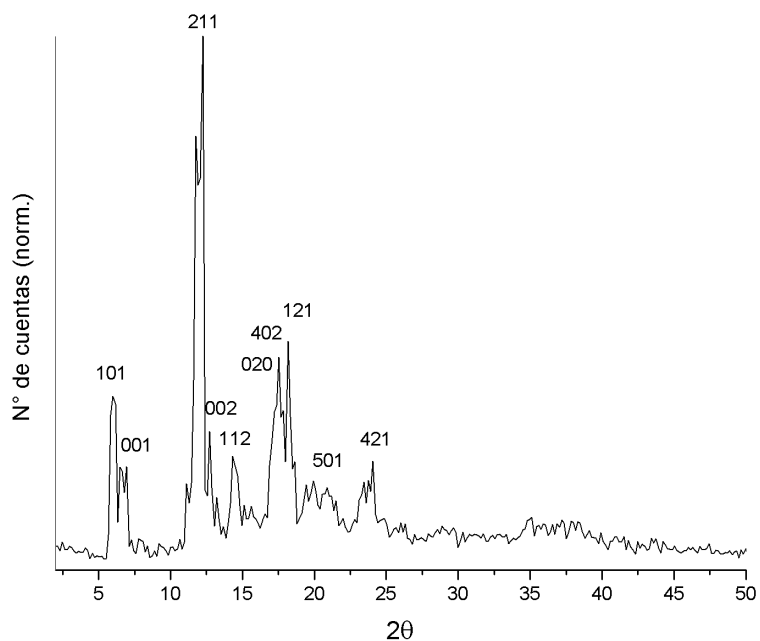


Figura 8.3: Difractograma de β CD-FEA con la indexación de sus picos principales.

Tabla 8.3. Datos obtenidos de la indexación de las reflexiones de β CD-FEA.

hkl	Ángulo experimental (2 θ)	Ángulo calculado (2 θ)	Diferencia (2 θ)	Distancia experimental (Å)	Distancia calculada (Å)	Intensidad porcentual (norm.)
101	6,076	6,214	-0,139	14,535	14,211	49,6
001	6,697	6,317	0,380	13,188	13,981	20,2
211	12,250	12,319	-0,068	7,219	7,179	100,0
002	12,768	12,652	0,115	6,928	6,991	30,0
112	14,423	14,539	-0,115	6,136	6,088	25,7
020	17,227	17,214	0,012	5,143	5,147	31,4
402	17,562	17,693	-0,130	5,046	5,009	40,8
121	18,183	18,318	-0,135	4,875	4,839	43,5
501	21,081	21,017	0,063	4,211	4,223	19,1
421	24,047	24,069	-0,022	3,698	3,694	22,0

Tabla 8.4. Datos de volúmenes y concentraciones de TG en agua y sus respectivos máximos de absorbancia a 324 nm.

Volumen de TG (mL)	Volumen de solvente (mL)	Concentración (mmol/L)	Absorbancia (u.a.)
0,100	1,4000	$4,43 \times 10^{-2}$	1,1255
0,090	1,4100	$3,99 \times 10^{-2}$	0,9974
0,080	1,4200	$3,54 \times 10^{-2}$	0,8933
0,070	1,4300	$3,10 \times 10^{-2}$	0,7932
0,060	1,4400	$2,66 \times 10^{-2}$	0,6692
0,050	1,4500	$2,22 \times 10^{-2}$	0,5531
0,040	1,4600	$1,77 \times 10^{-2}$	0,4250
0,030	1,4700	$1,33 \times 10^{-2}$	0,3049
0,020	1,4800	$8,86 \times 10^{-3}$	0,1888
0,015	1,4850	$6,64 \times 10^{-3}$	0,1368
0,010	1,4900	$4,43 \times 10^{-3}$	0,1088

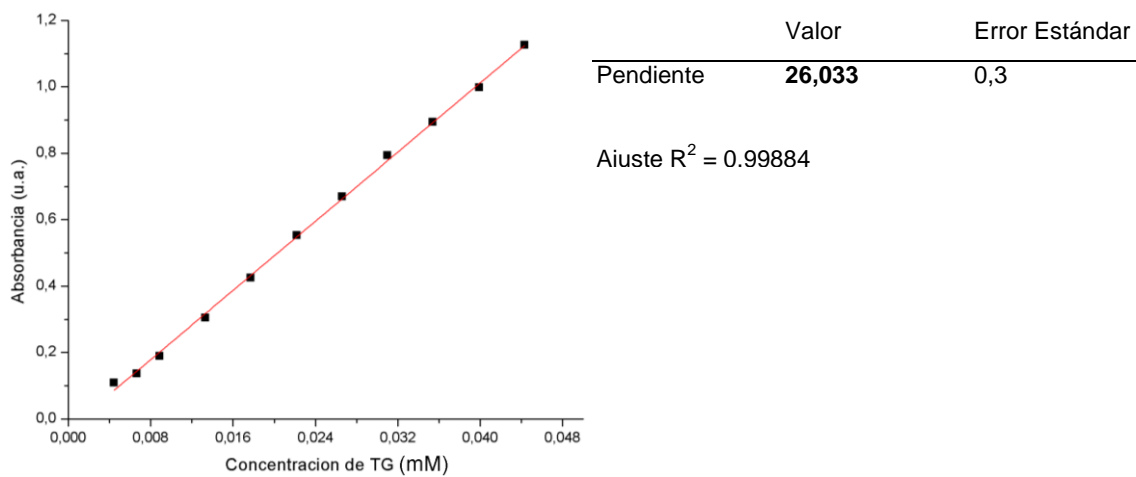


Figura 8.4: Gráfica lineal de absorbancias de TG versus concentración a 324 nm.

Tabla 8.5. Datos de volúmenes y concentraciones de MP en agua y sus respectivos máximos de absorbancia a 323 nm.

Volumen de MP (mL)	Volumen de solvente (mL)	Concentración (mmol/L)	Absorbancia (u.a.)
0,1000	1,4000	$8,48 \times 10^{-2}$	0,7440
0,0900	1,4100	$7,63 \times 10^{-2}$	0,6544
0,0800	1,4200	$6,78 \times 10^{-2}$	0,5928
0,0700	1,4300	$5,94 \times 10^{-2}$	0,5225
0,0600	1,4400	$5,09 \times 10^{-2}$	0,4520
0,0500	1,4500	$4,24 \times 10^{-2}$	0,3809

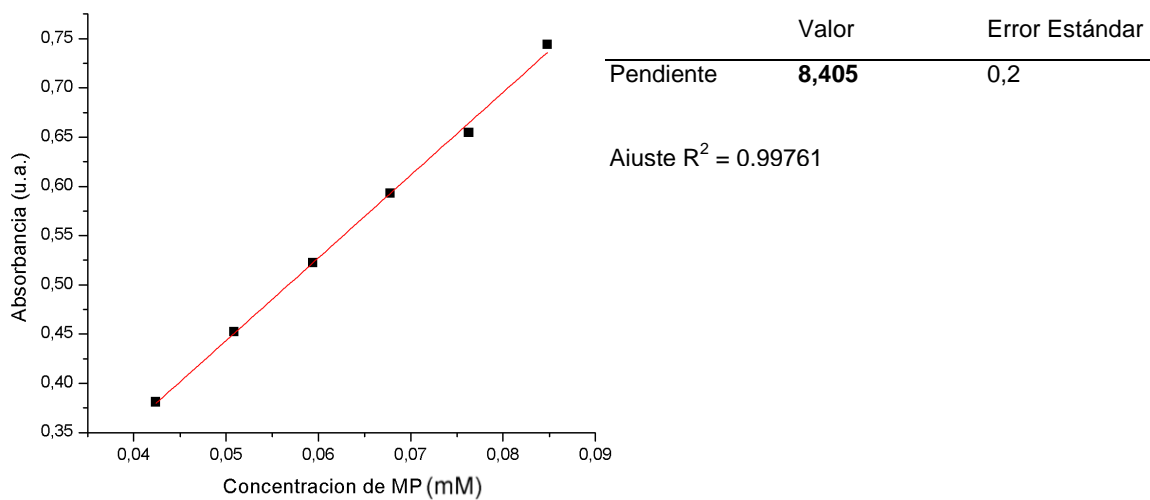


Figura 8.5: Gráfica lineal de absorbancias de MP versus concentración a 323 nm.

Tabla 8.6. Datos de volúmenes y concentraciones de MF en agua y sus respectivos máximos de absorbancia a 301 nm.

Volumen de MF (mL)	Volumen de solvente (mL)	Concentración (mmol/L)	Absorbancia (u.a.)
1,00	0,50	$4,20 \times 10^{-2}$	0,4452
0,90	0,60	$3,78 \times 10^{-2}$	0,4010
0,80	0,70	$3,36 \times 10^{-2}$	0,3585
0,70	0,80	$2,94 \times 10^{-2}$	0,3143
0,60	0,90	$2,52 \times 10^{-2}$	0,2738
0,50	1,00	$2,10 \times 10^{-2}$	0,2212
0,40	1,10	$1,68 \times 10^{-2}$	0,1811
0,30	1,20	$1,26 \times 10^{-2}$	0,1335

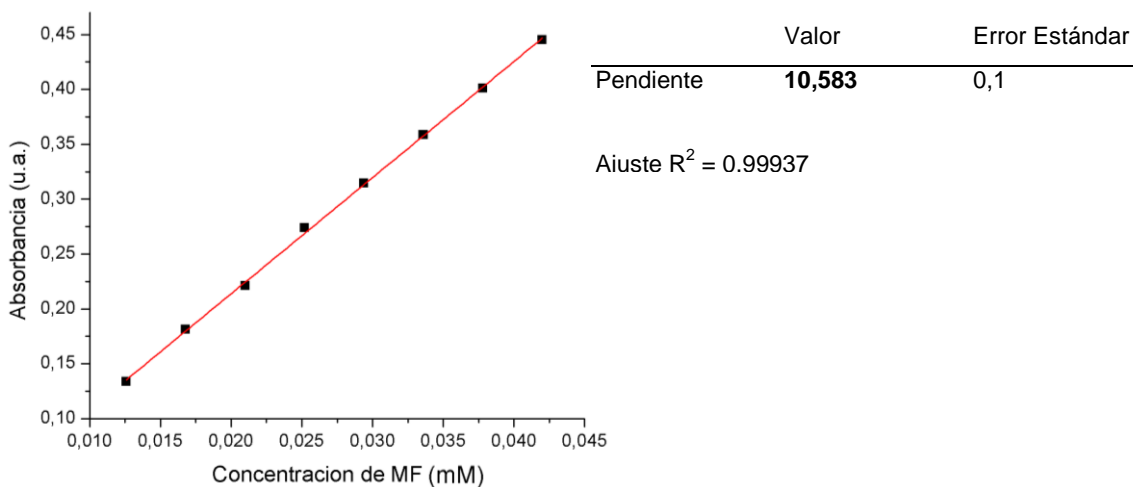


Figura 8.6: Gráfica lineal de absorbancias de MF versus concentración a 301 nm.

Tabla 8.7. Datos de volúmenes y concentraciones de AT en agua y sus respectivos máximos de absorbancia a 234 nm.

Volumen de AT (mL)	Volumen de solvente (mL)	Concentración (mmol/L)	Absorbancia (u.a.)
1,200	0,300	$6,96 \times 10^{-3}$	1,5192
1,100	0,400	$6,38 \times 10^{-3}$	1,3287
0,900	0,600	$5,22 \times 10^{-3}$	1,0940
0,800	0,700	$4,64 \times 10^{-3}$	0,9459
0,700	0,800	$4,06 \times 10^{-3}$	0,8537
0,600	0,900	$3,48 \times 10^{-3}$	0,7109
0,500	1,000	$2,90 \times 10^{-3}$	0,6167

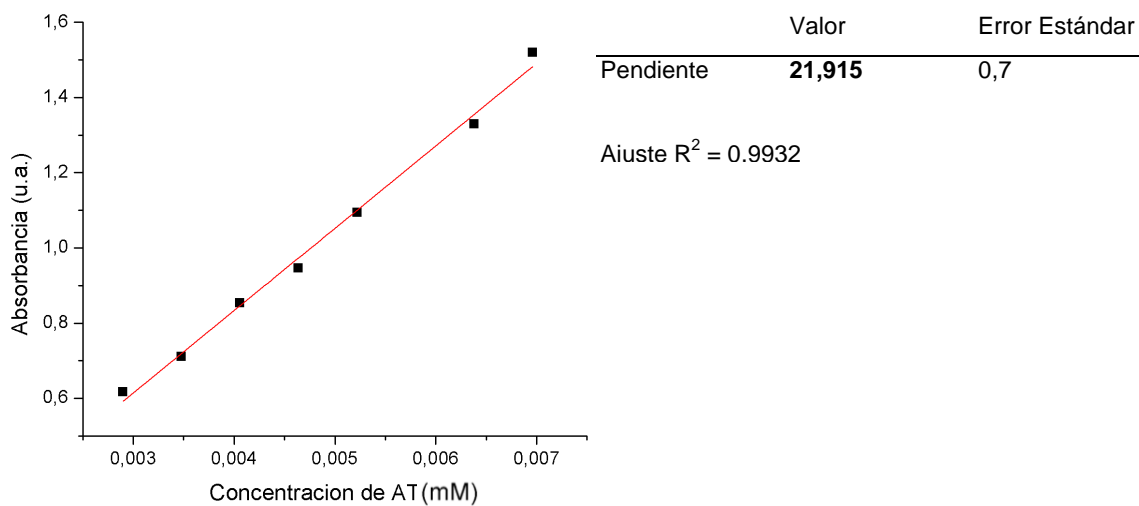


Figura 8.7: Gráfica lineal de absorbancias de AT versus concentración a 234 nm.

Tabla 8.8. Datos de concentraciones de FEA en agua y sus respectivos máximos de absorbancia a 258 nm.

Volumen de FEA (uL)	Volumen de solvente (mL)	Concentración (mmol/L)	Absorbancia (u.a.)
1,0	2,999	0,0265	0,2355
2,0	2,998	0,0529	0,4255
6,0	2,994	0,1588	1,2731
7,0	2,993	0,2117	1,5361

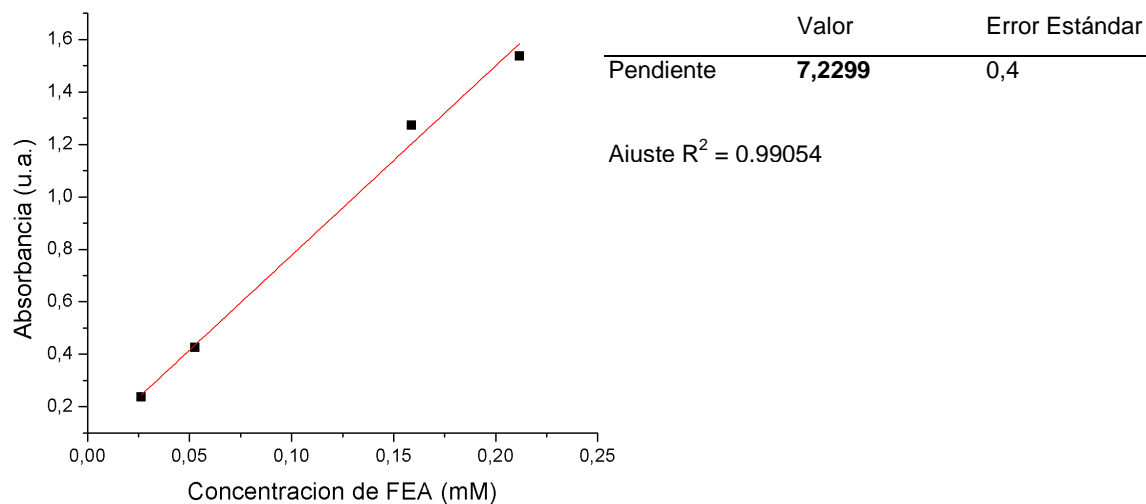


Figura 8.8: Gráfica lineal de absorbancias de FEA versus concentración a 258 nm.

Tabla 8.9: Valores de los diferentes ensayos realizados para calcular la K_a del sistema β CD-TG en agua.

Volumen de β CD/H ₂ O (μ L)	Concentración de β CD (mM)	Absorbancia (u.a.)	Concentración de TG (mM)
0/1000	0,0000	1,2235	0,04670
100/900	0,0440	1,2301	0,04725
200/800	0,0881	1,2535	0,04815
300/700	0,1320	1,2684	0,04872
400/600	0,1760	1,2716	0,04884
500/500	0,2200	1,3004	0,04995
1000/0	0,4400	1,3584	0,05218

Tabla 8.10: Valores de los diferentes ensayos realizados para calcular la K_a del sistema β CD-MP en agua.

Volumen de β CD/H ₂ O (μ L)	Concentración de β CD (mM)	Absorbancia (u.a.)	Concentración de MP (mM)
0/1000	0,0000	0,8266	0,0983
100/900	0,0440	0,8411	0,1001
200/800	0,0881	0,8531	0,1015
300/700	0,1320	0,8608	0,1024
400/600	0,1760	0,8714	0,1037
500/500	0,2200	0,8925	0,1062
1000/0	0,4400	0,9557	0,1137

Tabla 8.11: Valores de los diferentes ensayos realizados para calcular la K_a del sistema β CD-MF en agua.

Volumen de β CD/H ₂ O (μ L)	Concentración de β CD (mM)	Absorbancia (u.a.)	Concentración de MF (mM)
0/1000	0,0000	0,5871	0,05547
100/900	0,0440	0,5988	0,05658
200/800	0,0881	0,6271	0,05925
400/600	0,1760	0,6691	0,06322
500/500	0,2200	0,6712	0,06342
600/400	0,2643	0,6772	0,06399
800/200	0,3524	0,7305	0,06902
1000/0	0,4400	0,7359	0,06953

Tabla 8.12: Valores de los diferentes ensayos realizados para calcular la K_a del sistema β CD-AT en agua.

Volumen de β CD/H ₂ O (μ L)	Concentración de β CD (mM)	Absorbancia (u.a.)	Concentración de AT (mM)
0/1000	0,0000	1,2175	0,05556
100/900	0,0440	1,2593	0,05746
200/800	0,0881	1,3431	0,06129
400/600	0,1760	1,4009	0,06392
500/500	0,2200	1,4711	0,06713
600/400	0,2643	1,5012	0,06850
800/200	0,3524	1,6416	0,07491
1000/0	0,4400	1,7047	0,07779

Tabla 8.13: Valores de los diferentes ensayos realizados para calcular la K_a del sistema β CD-FEA en agua.

Volumen de β CD/ H_2O (μ L)	Concentración de β CD (mM)	Absorbancia (u.a.)	Concentración de FEA (mM)
0/1000	0,00	0,2698	0,0373
200/800	2,00	0,6905	0,0955
300/700	3,00	0,9124	0,1262
400/600	4,00	1,0780	0,1491
500/500	5,00	1,2428	0,1719
600/400	6,00	1,4742	0,2039
700/300	7,00	1,6933	0,2342

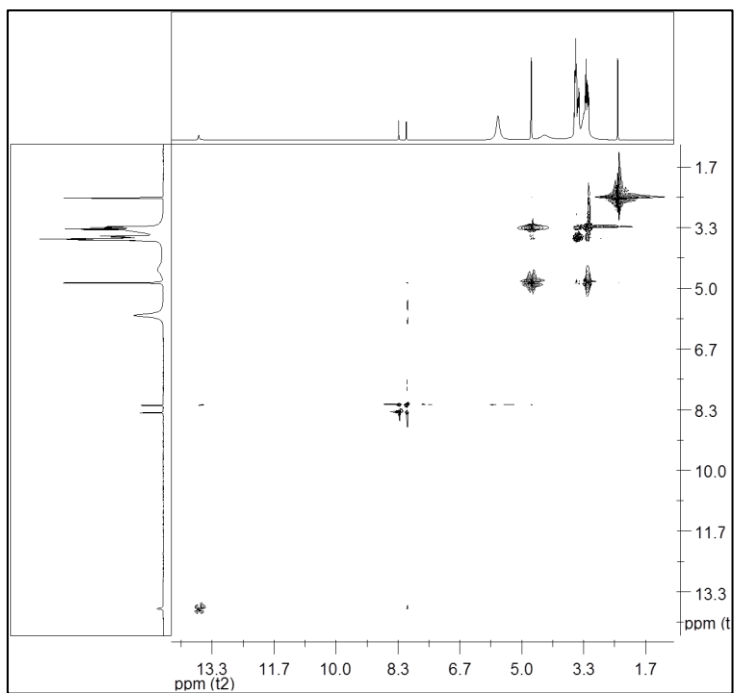


Figura 8.9: Espectro ROESY completo del complejo β CD-MP en DMSO- d_6 .

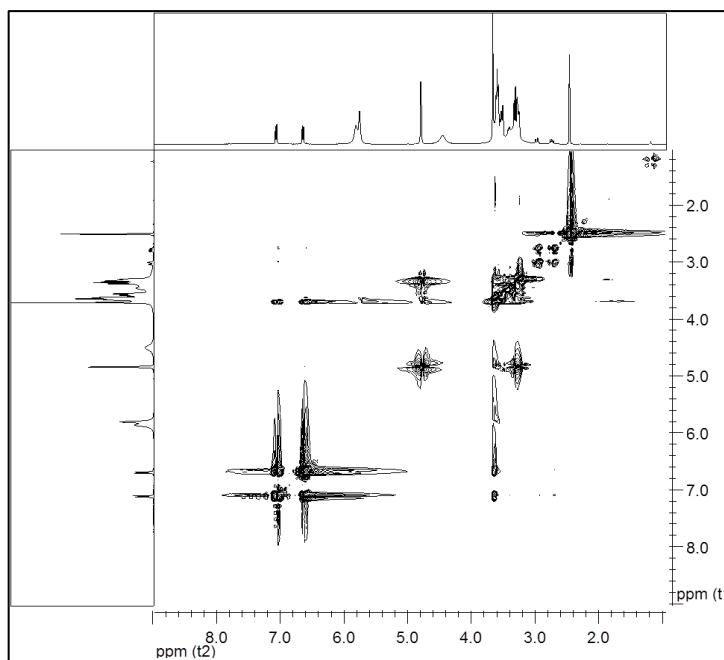


Figura 8.10: Espectro ROESY completo del complejo β CD-MF en DMSO- d_6 .

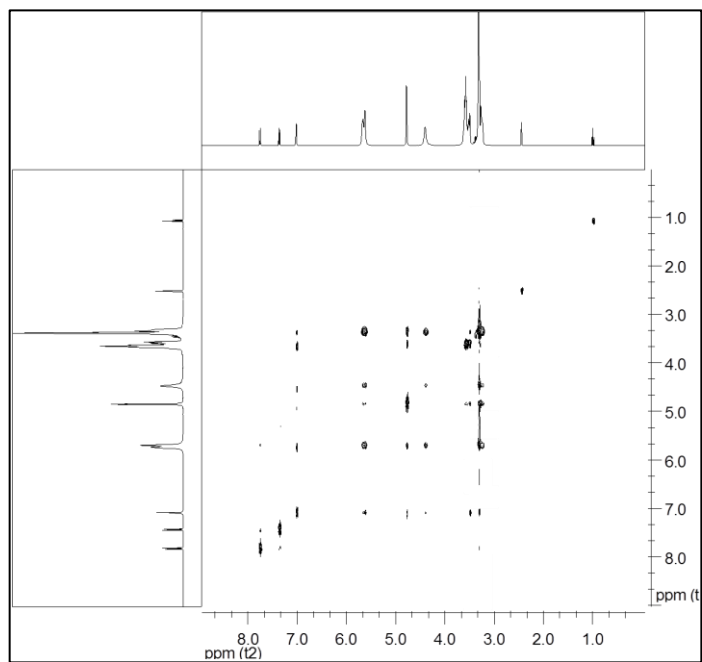


Figura 8.11: Espectro ROESY completo del complejo β CD-AT en DMSO- d_6 .

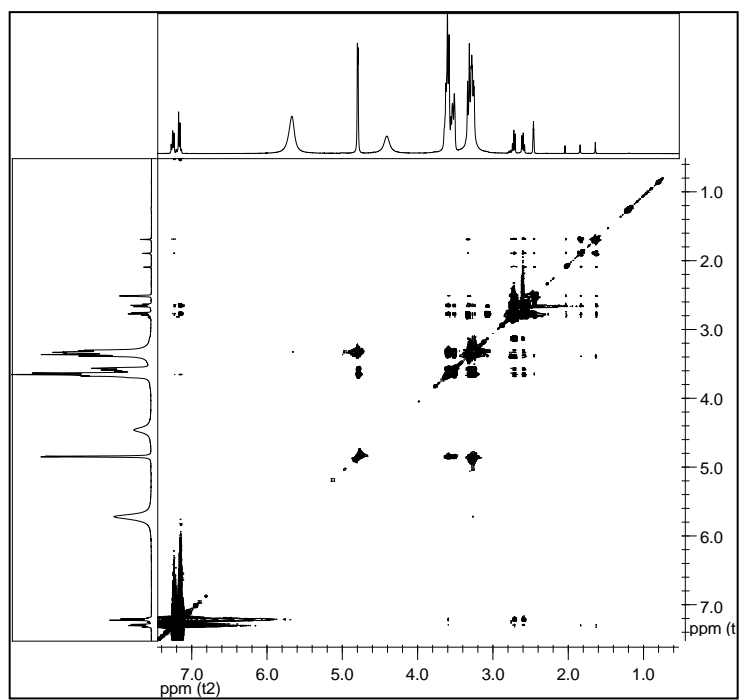


Figura 8.12: Espectro ROESY completo del complejo β CD-FEA en DMSO- d_6 .

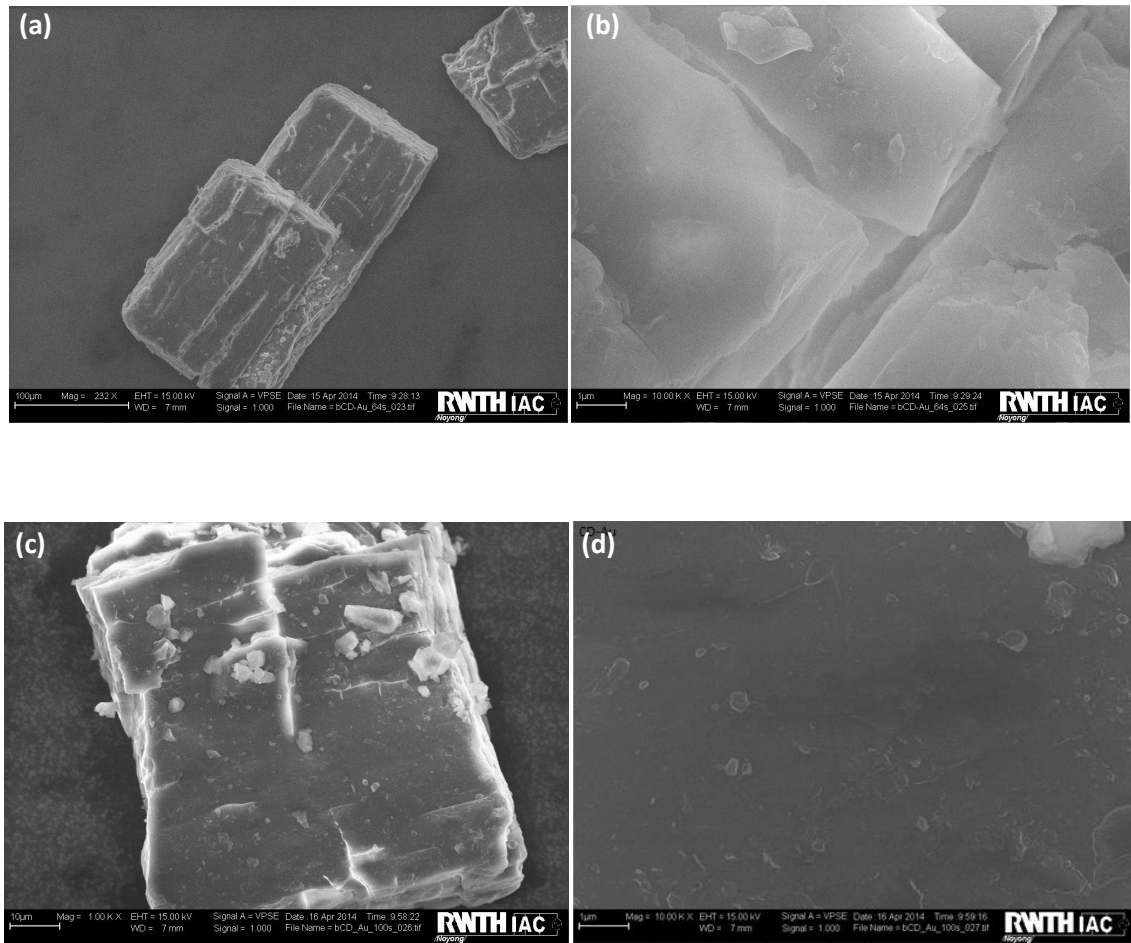


Figura 8.13: Imágenes de FE-SEM de polvo de β CD pura cubierto con Au por 64 s (a y b) y por 100 s (c y d).

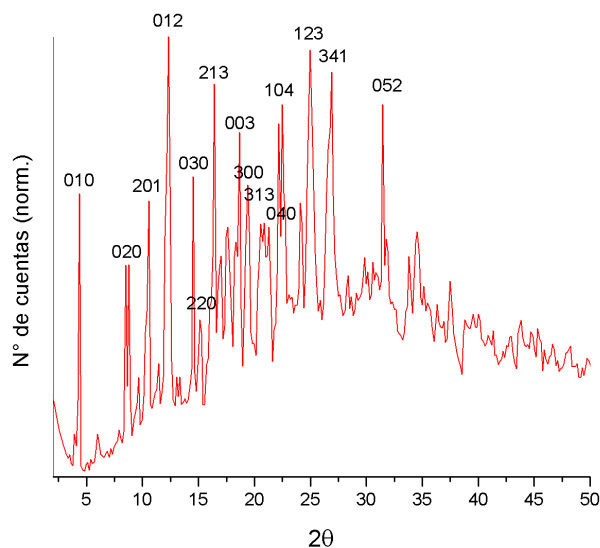


Figura 8.14: Difractograma de β CD-AT-NPsAu con la indexación de sus picos principales.

Tabla 8.14. Datos obtenidos de la indexación de las reflexiones de β CD-FEA-NPsAu.

hkl	Ángulo experimental (2 θ)	Ángulo calculado (2 θ)	Diferencia (2 θ)	Distancia experimental (Å)	Distancia calculada (Å)	Intensidad porcentual (norm.)
010	4,761	5,385	-0,624	18,546	16,398	25,4
020	9,848	10,782	-0,934	8,975	8,199	20,7
201	11,649	11,564	0,085	7,590	7,646	52,7
012	13,733	13,769	-0,035	6,443	6,426	100,0
030	16,277	16,203	0,074	5,441	5,466	32,9
220	16,983	16,938	0,046	5,217	5,230	25,4
213	18,325	18,258	0,068	4,837	4,855	29,4
003	18,961	19,043	-0,082	4,677	4,657	37,1
300	19,526	19,589	-0,063	4,542	4,528	26,8
313	20,798	20,811	-0,012	4,268	4,265	35,9
040	21,752	21,660	0,091	4,082	4,100	42,6
104	53,023	23,177	-0,154	3,860	3,834	41,8
123	25,249	25,320	-0,071	3,524	3,515	37,1
341	28,075	28,032	0,043	3,176	3,180	53,7
052	30,088	30,078	0,010	2,968	2,969	40,3

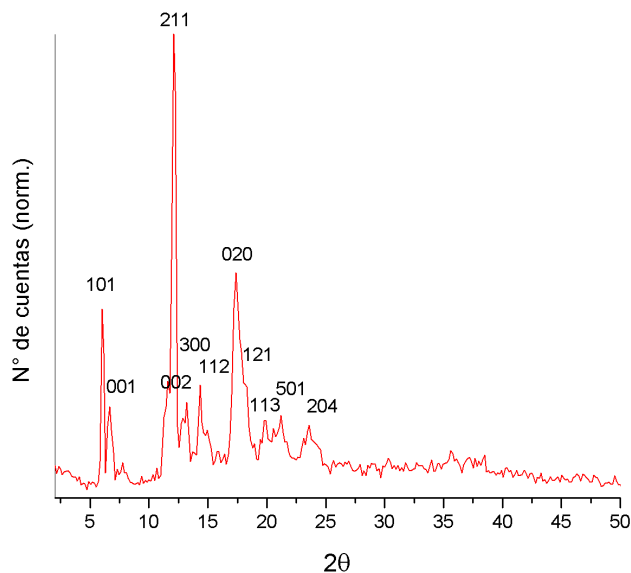


Figura 8.15: Difractograma de β CD-FEA-NPsAu con la indexación de sus picos principales.

Tabla 8.15. Datos obtenidos de la indexación de las reflexiones de β CD-FEA-NPsAu.

hkl	Ángulo experimental (2θ)	Ángulo calculado (2θ)	Diferencia (2θ)	Distancia experimental (Å)	Distancia calculada (Å)	Intensidad porcentual (norm.)
101	6,054	6,214	-0,160	14,586	14,211	50,7
001	6,623	6,317	0,306	13,335	13,981	21,3
211	12,039	12,319	-0,279	7,345	7,179	100,0
002	12,878	12,652	0,225	6,869	6,991	17,3
300	13,257	13,503	-0,246	6,673	6,552	19,5
112	14,347	14,539	-0,192	6,169	6,088	21,6
020	17,427	17,214	0,213	5,085	5,147	50,5
121	18,280	18,318	-0,038	4,849	4,839	26,4
113	19,844	19,798	0,045	4,471	4,481	15,5
501	21,067	21,017	0,050	4,213	4,223	16,8
204	23,635	23,550	0,084	3,761	3,775	15,2

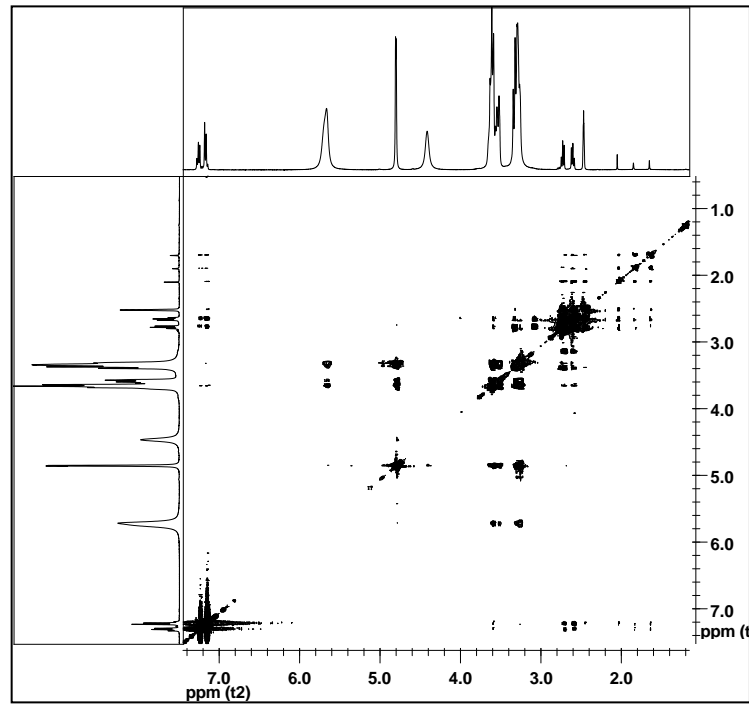


Figura 8.16: Espectro ROESY completo del complejo β CD-FAA con NPsAu en DMSO- d_6 .

Tabla 8.16. Absorbancias y concentraciones del total de FEA cargado en los ensayos de irradiación láser.

Solución Stock	Absorbancias máximas	Concentración total	Porcentaje
	(u.a.)	(mmol/L)	(%)
1	2,057	0,284	100
2	2,057	0,284	100
3	2,079	0,288	100
Promedio	2,064	0,285	100
Desv. Est	0,01	0,002	0

Tabla 8.17. Absorbancias de FEA liberada de β CD-FEA-NPsAu por irradiación láser.

Ensayos	Tiempo (minutos) / Absorbancias (u.a.)					Máximo
	15	30	60	90	120	
1	0,497	0,868	1,655	1,792	1,956	2,064
2	0,529	0,798	1,746	1,776	1,828	2,064
3	0,436	0,832	1,675	1,708	1,948	2,064
Promedio	0,487	0,833	1,692	1,758	1,911	2,064
Desv. Est.	0,05	0,03	0,05	0,04	0,07	---

Tabla 8.18. Concentraciones de FEA liberada de β CD-FEA-NPsAu por irradiación láser.

Ensayos	Tiempo (minutos) / Concentración (mmol/L)					Máximo
	15	30	60	90	120	
1	0,0687	0,120	0,229	0,248	0,271	0,285
2	0,0732	0,110	0,242	0,246	0,253	0,285
3	0,0603	0,115	0,232	0,236	0,269	0,285
Promedio	0,0674	0,115	0,234	0,243	0,264	0,285
Desv. Est.	0,006	0,005	0,007	0,006	0,01	---

Tabla 8.19. Porcentajes de FEA liberada de β CD-FEA-NPsAu por irradiación láser.

Ensayos	Tiempo (minutos) / Porcentajes (%)					Máximo
	15	30	60	90	120	
1	24	42	80	87	95	100
2	26	39	84	86	88	100
3	21	40	81	83	94	100
Promedio	24	40	82	85	92	100
Desv. Est.	2	2	2	2	3	---

Tabla 8.20. Valores de absorbancias, concentraciones y porcentajes de FEA liberada desde β CD-FEA sin irradiación láser.

Ensayos	β CD-FEA / Sin irradiación (por 60 minutos)		
	Absorbancia (u.a.)	Concentración (mmol/L)	Porcentaje (%)
1	0,730	0,101	35
2	0,717	0,099	35
3	0,630	0,087	31
Promedio	0,692	0,0957	34
Desv. Est.	0,05	0,01	2
Máximo	2,064	0,285	100

Tabla 8.21. Valores de absorbancias, concentraciones y porcentajes de FEA liberada desde β CD-FEA-NPsAu sin irradiación láser.

Ensayos	β CD-FEA-NPsAu / Sin irradiación (por 60 minutos)		
	Absorbancia (u.a.)	Concentración (mmol/L)	Porcentaje (%)
1	0,213	0,0295	10
2	0,302	0,0418	15
3	0,380	0,0526	18
Promedio	0,298	0,0413	14
Desv. Est.	0,08	0,01	4
Máximo	2,064	0,285	100

Tabla 8.22. Valores de absorbancias, concentraciones y porcentajes de FEA liberada desde β CD-FEA con irradiación láser.

Ensayos	β CD-FEA / con irradiación (por 60 minutos)		
	Absorbancia (u.a.)	Concentración (mmol/L)	Porcentaje (%)
1	1,290	0,1784	62
2	1,056	0,1461	51
3	1,118	0,1546	54
Promedio	1,155	0,1597	56
Desv. Est.	0,1	0,02	6
Máximo	2,064	0,285	100

