



Universidad de Chile – Facultad de Ciencias – Escuela de Pregrado

**“Optimización del funcionamiento de Fármacos Alquilantes como método preventivo a la producción de sus efectos contaminantes: El caso de Dacarbazina”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título de Químico Ambiental

**Sebastián Pablo Quintana Contardo**

Director del Seminario de Título:

Dr. Nicolás Yutronic Sáez

Co-Director:

Dr. Rodrigo Sierpe Bustamante

Patrocinante:

Dr. Marcelo Kogan Bocian

**Marzo 2020**

**Santiago - Chile**



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el

**Sr. Sebastián Pablo Quintana Contardo**

**“Optimización del funcionamiento de Fármacos Alquilantes como método preventivo a la producción de sus efectos contaminantes: El caso de Dacarbazina”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Químico Ambiental

**Director Seminario de Título:**

Dr. Nicolás Yutronic Sáez

---

**Co-Director:**

Dr. Rodrigo Sierpe Bustamante

---

**Patrocinante:**

Dr. Marcelo Kogan Bocian

---

**Comisión Revisora y Evaluadora:**

**Presidente Comisión:**

Dr. Álvaro Aliaga Cerón

---

**Evaluador:**

Dr. Paul Jara Vergara

---

Santiago de Chile, .....



Sebastián Pablo Quintana Contardo, nació un 27 de diciembre de 1991 en la ciudad de Santiago, producto de la locura de una pareja de profesores.

Su educación escolar básica y media fue realizada en el colegio Jorge Prieto Letelier de la comuna de Peñalolén, en donde se destacó por su rendimiento académico y participación en la organización estudiantil.

En el año 2010 ingresa a la carrera de Química Ambiental en la Facultad de ciencias de la Universidad de Chile, durante el año 2014 comienza a trabajar como pasante en el Laboratorio de Síntesis Inorgánica y Electroquímica, a cargo del Dr. Nicolás Yutronic Sáez.

En el año 2016 realiza su unidad de investigación titulada “Generación de un Compuesto de Inclusión de  $\beta$ -Ciclodextrina como base para un sistema de Drug Delivery”, en el marco de la realización de dicha unidad obtiene el premio al Primer Lugar en la presentación de su trabajo en formato poster en el Congreso Nacional de Nanociencia y Nanotecnología de 2016.

En el año 2017 termina su Licenciatura en Ciencias Ambientales con mención en Química y durante el año 2018 comienza a trabajar como investigador en la Pontificia Universidad Católica de Chile, en el primer proyecto de reciclaje de baterías de Litio realizado en Sudamérica, generando con el grupo de trabajo una vía de proceso ambientalmente responsable para fabricar nuevas a partir de material desechado.

Para mis Padres y esas Personas Especiales

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera partir agradeciendo a mis padres, quienes han sido los que han dejado mucho de su tiempo de vida para que yo pueda llegar hasta donde lo he hecho, trabajando duro y sin descanso. Ellos han sido quienes siempre me han recalcado la importancia de ir hacia adelante sin dejar de lado los buenos valores y la importancia de que el “cómo se hacen las cosas” siempre es un factor más relevante que lograr un objetivo pasajero. Además, no podría dejar de agradecer a dos mujeres que han sido para mí un ejemplo de superación y lucha, a mi querida Lela por enseñarme que jamás hay que rendirse ante ninguna circunstancia y que sin sus sacrificios mi vida sería muy distinta. A mi Tía Laura, luchadora incansable que me enseñó la importancia del medio ambiente, que debíamos respetarlo y cuidarlo.

Al recorrer el camino universitario, este largo camino de tropezar, divertirse y aprender, tuve la oportunidad de conocer a muchas personas excepcionales y que me enseñaron distintas cosas valiosas, pero, en primer lugar, quiero agradecer a la profesora Cecilia Labbé, a la cual le debo mucho de mi aprendizaje como alumno y como persona durante mi paso por esta universidad, quien fue una guía y defensa en situaciones que quizás no esperé jamás vivir dentro de este ámbito. A los profesores Nicolás Yutronic y Paul Jara, por aceptarme dentro de su laboratorio y permitirme aprender de su experiencia, quienes me ayudaron a mejorar tanto en cuestiones académicas como personales con sus pertinentes consejos, siempre con la mejor disposición y buen humor. Al profesor Guillermo Gonzales, por compartir sus geniales ideas y teorías siempre que tenía tiempo, teniendo un punto de vista que siempre te hacía mirar más allá, a la profesora Erika Lang

por toda su desinteresada ayuda, al profesor Raúl Morales por su confianza y al profesor Francisco Muñoz, del departamento de física de la facultad, quien sin duda es una de las mejores personas que he conocido. No puedo dejar de mencionar a María Luisa Valenzuela, por confiar en mis capacidades, todo su apoyo y empuje en este proceso, y también a Marisol Aravena, la mejor secretaria de la facultad por lejos, quien siempre trabaja mucho más de lo que le corresponde para ayudar a los alumnos, ya que no es fácil encontrar a alguien que le ponga tanta preocupación a su trabajo en esta facultad como lo hace ella.

Agradecer a mis compañeros del laboratorio en ciencias, pero en especial a Daniel Guerra, Max y al “Vikingo”, y también a mis compañeros de carrera Coni Fredes, Nathalie Fleiderman, Mario Romero, Camilo Carrasco, Lilia Flores y Tomás Claramunt, por todos los buenos momentos. No podría dejar tampoco de agradecer a los chicos del “Team Kogan”, quienes me acogieron en su laboratorio de manera muy amable, y sobre todo a la directora de orquesta de los carretes “La Tía Su” (alias Sujey Palma) por su gran amistad, inteligencia y buena onda.

Quiero agradecer también a mis amigos de la vida, con quienes he compartido más de veinte años de amistad, al Guille, Xupetin, Lalo, Guatón, Cesar y Ricardo quienes siempre han estado ahí, siendo un apoyo muy importante en todo momento. Por último, quiero agradecer a mi querida Thesi por todo su cariño y apoyo.

## Índice de contenidos

<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1 La Industria Farmacéutica y su Impacto .....	1
1.2 Los Antineoplásicos .....	5
1.2.1 Antineoplásicos en el medio ambiente .....	8
1.2.2 Alquilantes: Los más tóxicos.....	11
1.3 <i>Green Pharmacy</i> : Multidisciplina en el desarrollo de fármacos .....	14
1.3.1 Compuestos de Inclusión: Empaquetamiento a través de la Química Supramolecular .....	15
1.3.2 Ciclodextrinas como matrices.....	17
1.3.3 Nanopartículas de Oro en el tratamiento del Cáncer .....	22
1.4 El caso de Dacarbazina.....	27
1.5 Propuesta: Sistema Ternario.....	31
1.6 Hipótesis de Trabajo .....	32
1.7 Objetivos.....	33
1.7.1 Objetivo General.....	33
1.7.2 Objetivos Específicos .....	33
<b>2. Materiales y Métodos</b> .....	<b>34</b>
2.1 Reactivos y Solventes.....	34
2.2 Metodología.....	35
2.2.1 Síntesis de Compuesto de Inclusión .....	35
2.2.2 Docking Molecular .....	36
2.2.3 Síntesis de AuNPs .....	36
2.2.4 Preparación del Sistema Ternario.....	38
2.2.5 Irradiación Láser .....	39
2.3 Equipos para análisis de muestras .....	41
2.4 Protocolos para Análisis de muestras .....	43
2.4.1 Estudio de constante de asociación y Estequiometría del CI .....	43
2.4.2 Determinación de Capacidad de Carga del Sistema.....	45
2.4.3 Medición de DLS y Potencial Z .....	45
2.4.4 Ensayos de Irradiación Láser.....	46

2.4.5 Estabilidad en el Tiempo .....	47
<b>3. Resultados y Discusión.....</b>	<b>48</b>
3.1 Formación del Compuesto de Inclusión .....	48
3.1.1 Resolución de Fase Cristalina.....	52
3.1.2 Estudio mediante H <sup>1</sup> -RMN.....	56
3.1.3 Estequiometría y Constante de Asociación .....	58
3.1.4 Estudio de Geometría de inclusión a través de ROESY.....	63
3.1.5 Docking Molecular .....	65
3.2 Formación del Sistema Ternario .....	68
3.2.1 Análisis de DLS y Potencial Z.....	68
3.2.2 Espectroscopía Raman.....	70
3.3 Liberación del Fármaco mediante irradiación láser .....	74
3.2 Estabilidad en el Tiempo .....	75
<b>4. Conclusiones .....</b>	<b>78</b>
<b>5. Bibliografía .....</b>	<b>80</b>
<b>6. Anexos .....</b>	<b>96</b>
6.1 Caracterizaciones para estudio de CI.....	96
6.2 Caracterizaciones para estudio de AuNPs .....	100
6.3 Caracterizaciones para estudio de Sistema Ternario .....	101

## Índice de Tablas

### 3. Resultados y Discusión

Tabla 3.1: Corrimientos químicos observados en H <sup>1</sup> -RMN para el CI con respecto a protones de βCD y DB. ....	56
---	----

### 6. Anexos

Tabla 6.1: Parametros de ensayos realizados para la determinación del coeficiente de extinción molar de DB en solución acuosa, pH igual a 7 y 25°C. ....	97
Tabla 6.2: Valores de coeficientes obtenidos para parámetros de ajuste matemático en la determinación de coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de DB en solución acuosa, donde la pendiente corresponde al valor de $\epsilon$ (mM <sup>-1</sup> •cm <sup>-1</sup> ) ....	98
Tabla 6.3: Ejemplo de una tanda de ensayos realizada para medición de DLS y Potencial Z.....	101
Tabla 6.4: Asignación de señales para Dacarbazina en espectro Raman. ....	102
Tabla 6.5: Masas de DB detectadas en sobrenadantes (SN) del sistema ternario luego de la centrifugación. ....	104
Tabla 6.6: Masas de DB liberadas en cada intervalo en ensayos irradiación láser ....	105

## Índice de Figuras

### 1. Introducción

Figura 1.1: Cantidad de productos farmacéuticos detectados en distintos tipos de aguas y cuerpos acuáticos alrededor del mundo hasta el año 2016 .....	3
Figura 1.2: Esquema de proceso de inicio del cáncer .....	6
Figura 1.3: Ruta de entrada y transporte de productos farmacéuticos citostáticos en el medio ambiente. Las líneas de trazos indican rutas inciertas .....	9
Figura 1.4: Vías de entrada teóricas para fármacos contra el cáncer en el medio acuático con contribución relativa de cada vía de entrada. Basado en datos recopilados en Francia .....	10
Figura 1.5: Mecanismo de resistencia a los tratamientos contra el cáncer propiciada por mutaciones inheridas en el ADN de células cancerígenas .....	13
Figura 1.6: Representación de $\alpha$ -CD, $\beta$ -CD y $\gamma$ -CD en su fórmula estructural y tipo como .....	18
Figura 1.7: Representación de la unidad básica de glucosa que compone las CDs y características estructurales .....	19
Figura 1.8: Equilibrio de formación teórico de un compuesto de inclusión de CD y una molécula orgánica.....	20
Figura 1.9: Orientaciones espaciales posibles de CDs: (a) cabeza-cabeza, (b) cabeza-cola y (c) cola-cola .....	21
Figura 1.10: (a) Ácaro junto a engranes manométricos de silicio y (b) acercamiento a engranes nanométricos .....	23
Figura 1.11: Entrega sitio específica de fármacos propiciado por efecto EPR .....	24
Figura 1.12: Representación del efecto de resonancia de plasmón superficial de una nanopartícula metálica.....	26
Figura 1.13: Mecanismo de metilación del ADN por parte de Dacarbazina.....	28
Figura 1.14: Degradación de DB por factores ambientales.....	29
Figura 1.15: Mecanismo propuesto para daño ocasionado al ADN inducido por DB irradiada con luz solar .....	30

### 2. Materiales y Métodos

Figura 2.1: Resumen de la metodología de trabajo con los pasos más importantes para la investigación .....	40
--	----

Figura 2.2: Tipos de diagramas de solubilidad de fase según Higuchi y Connors .....43

### 3. Resultados y Discusión

Figura 3.1: Difractogramas de polvo cristalino de: (a) $\beta$ CD, (b) Mezcla física de $\beta$ CD y DB, (c) DB y (d) CI.....	49
Figura 3.2: SEM de (a) DB y (b) CI, (c) FE-SEM de CI .....	51
Figura 3.3: Esquemas de tipo balde de $\beta$ CD: (a) representación del esqueleto atómico del grupo piranosa y (b) asignación de protones y su orientación .....	53
Figura 3.4: Desde arriba hacia abajo: Espectros $H^1$ -RMN de CI, DB y $\beta$ CD realizados en DMSO .....	54
Figura 3.5: Espectro obtenido para el CI formado con sus señales tabuladas e integradas .....	55
Figura 3.6: Estructuras tautoméricas de DB que se dan en solución a pH neutro.....	55
Figura 3.7: Gráfica obtenida a partir de la realización del método de Higuchi y Connors para $\beta$ CD y DB .....	58
Figura 3.8: ROESY obtenido para el CI entre $\beta$ CD y DB .....	59
Figura 3.9: Ampliación de ROESY de CI: zona de interacción Metilo- $\beta$ CD .....	60
Figura 3.10: Ampliación de ROESY de CI: zona de interacción anillo imidazol- $\beta$ CD y grupo amido-metilo .....	61
Figura 3.11: Ampliación ROESY de CI: zona de interacción de anillo imidazol e hidroxilos secundarios de $\beta$ CD .....	62
Figura 3.12: <i>Docking</i> molecular: (a) estructura favorable de inclusión, (b) interacciones de los protones de DB con los protones internos de $\beta$ CD .....	64
Figura 3.13: <i>Docking</i> molecular: (a) inclusión leve de DB en $\beta$ CD y (b) interacción del anillo imidazol con grupos hidroxilo de $\beta$ CD .....	65
Figura 3.14: (a) Balón de dos bocas con solución de AuNPs obtenidas y (b) microscopía TEM de las mismas .....	66
Figura 3.15: Espectros UV-vis comparativo de AuNPs estabilizadas con citrato y estabilizadas con complejo CI-PEG .....	67
Figura 3.16: HR-TEM de nanopartículas estabilizadas con CI-PEG, (a) vista amplia y (b) acercamiento .....	67
Figura 3.17: Ejemplo de gráfica comparativa de DLS para AuNPs estabilizadas con citrato y con CI-PEG .....	69

Figura 3.18: Ejemplo de gráfica comparativa de Potencial Z para AuNPs estabilizadas con citrato y con CI-PEG .....	70
Figura 3.19: Desde abajo hacia arriba, espectros Raman de: Dacarbazina, Compuesto de Inclusión y Sistema Ternario .....	72
Figura 3.20: Promedio de porcentajes de masa de fármaco liberado mediante irradiación laser del sistema ternario en cada intervalo .....	75
Figura 3.21: Distribución de tamaños de AuNPs entregada por NTA .....	77
Figura 3.22: NTA para Sistema ternario antiguo mantenido a 4°C .....	77
Figura 3.23: NTA para Sistema ternario mantenido a temperatura ambiente .....	78

## 6. Anexos

Figura 6.1: Integración de señales de H <sup>1</sup> -RMN del CI: (a) zona de amida y protón del anillo imidazol y (b) protón H <sub>I</sub> de βCD .....	96
Figura 6.2: Bandas de absorbancia de DB a 235 nm en solución acuosa detectadas en los ensayos de determinación del coeficiente de extinción molar con DB a distintas concentraciones .....	97
Figura 6.3: Regresión lineal de datos de la absorbancia a 235 nm en función de la concentración molar de DB .....	98
Figura 6.4: Ensayos realizados para determinación de constante de asociación por método de fases, mediante la mezcla de DB y βCD .....	99
Figura 6.5: Espectroscopía UV-vis para ensayos de preparación de AuNPs estabilizadas con citrato .....	100
Figura 6.6: Microscopía TEM de AuNPs estabilizadas con citrato .....	100
Figura 6.7: Espectros IR para DB y CI .....	103
Figura 6.8: UV-vis de sobre nadantes (SN) de sistema ternario .....	104
Figura 6.9: UV-vis para AuNPs estabilizadas con citrato (NPsAu-cit), funcionalización con estabilizantes CI-PEG y sobrenadante (SN1) obtenido producto de centrifugación .....	105
Figura 6.10: Ensayos de NTA para AuNPs .....	106
Figura 6.11: Ensayos de NTA para Sistema ternario guardado a 4°C .....	106
Figura 6.12: Ensayos de NTA para Sistema ternario guardado a temperatura ambiente .....	107

## Lista de Abreviaturas

$\beta$ CD	Beta Ciclodextrina
DB	Dacarbazina
CDs	Ciclodextrinas
CI	Compuesto de Inclusión
PEG	Polietilenglicol Tiolado
AuNPs	Nanopartículas de Oro
$H^1$ -RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROESY	Espectroscopía Overhauser de marco Rotatorio
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
HR-TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
FE-SEM	Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo
UV-vis	Espectroscopía de Espectro Ultravioleta-Visible
DRX	Difracción de Rayos X de Polvo Cristalino
RPS	Resonancia de Plasmón Superficial
Ec	Ecuación

## RESUMEN

Los fármacos antitumorales han presentado una creciente utilización durante los últimos treinta años debido a que, por factores genéticos y medio ambientales, es cada vez más frecuente la aparición de cáncer en la población humana. Esto ha propiciado que dichos medicamentos y sus productos de degradación hayan comenzado a aparecer en los cuerpos de agua de todo el mundo y afecten a los ecosistemas, provocando contaminación ambiental y efectos nocivos sobre la biota, constituyendo una preocupación en el campo de las ciencias ambientales y considerándose hoy en día en la categoría de *Contaminantes Emergentes*.

Este estudio enfoca sus esfuerzos en combinar los beneficios comprobados de la aplicación de la química supramolecular y la nanociencia para lograr la fabricación de un sistema que tenga el potencial para la aplicación segura de uno de los fármacos anticancerígenos de la categoría más peligrosa.

Dacarbazina (DB) es un fármaco anticancerígeno altamente sensible a la descomposición por diversos factores fisicoquímicos y ambientales, poseyendo un actuar poco selectivo en el cuerpo humano y teniendo una alta tasa de excreción vía urinaria. Con el fin de alterar sus propiedades desfavorables se desarrolló un *Sistema Ternario*, conformado por: un compuesto de inclusión (CI), en el cual DB se introduce dentro de la macromolécula  $\beta$ -Ciclodextrina ( $\beta$ CD), cuya formación y estabilidad fue comprobada mediante Espectroscopía de Rayos X de polvo Cristalino,  $H^1$ -RMN y ROESY. Dicho compuesto de inclusión fue anclado mediante el grupo funcional amido del fármaco a nanopartículas de

oro (AuNPs), especies nanoquímicas conocidas por sus propiedades fisicoquímicas favorables y de selectividad en el tratamiento del cáncer.

En paralelo se ancló polietilenglicol tiolado (PEG) a las AuNPs para otorgarle mayor estabilidad al sistema, comprobando dicha estabilidad y cambios morfológicos del nuevo sistema ternario formado mediante las técnicas de espectroscopía UV-visible, Potencial Z, espectroscopía IR, DLS, espectroscopía Raman, Nano Tracking Analysis, microscopías TEM y HR-TEM.

Finalmente se estableció la capacidad del sistema ternario para liberar el fármaco bajo la incidencia de un láser monocromático hacia una fase orgánica, obteniendo una liberación promedio de 10,73% durante 60 min de irradiación y comprobando de esta manera que posee potencial para ser probado en sistemas biológicos.

## ABSTRACT

The antitumor drugs have presented an increasing use during the last thirty years because due to genetic and environmental factors the appearance of cancer in the human population is increasingly frequent. This has led to these medicines and their degradation products having begun to appear in water bodies around the world and affecting ecosystems, causing environmental pollution and harmful effects on biota, constituting a concern in the field of environmental sciences and considered today in the category of Emerging Pollutants.

This study focuses its efforts on combining the proven benefits of the application of supramolecular chemistry and nanoscience to achieve the manufacture of a system that has the potential for the safe application of one of the most dangerous anticancer drugs.

Dacarbazine (DB) is an anticancer drug highly sensitive to decomposition by various physicochemical and environmental factors, possessing an unselective action in the human body and having a high rate of urinary excretion. In order to alter its unfavorable properties, a Ternary System was developed, consisting of: an inclusion compound (IC), in which DB is introduced into the  $\beta$ -Cyclodextrin ( $\beta$ CD) macromolecule, whose formation and stability was checked by spectroscopy X-Ray of crystalline powder,  $H^1$ -RMN and ROESY. Said inclusion compound was anchored by the amide functional group of the drug to gold nanoparticles (AuNPs), nanochemical species known for their favorable physicochemical properties and selectivity in the treatment of cancer.

In parallel, thiolated polyethylene glycol (PEG) was anchored to the AuNPs to give greater stability to the system, checking said stability and morphological changes of the new ternary system formed by UV-visible spectroscopy, Potential Z, IR spectroscopy, DLS, Raman spectroscopy techniques, Nano Tracking Analysis, TEM and HR-TEM microscopes.

Finally, the capacity of the ternary system to release the drug under the influence of a monochromatic laser towards an organic phase was established, obtaining an average release of 10.73% during 60 min of irradiation and thus verifying that it has the potential to be tested in biological systems.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 La industria Farmacéutica y su impacto.

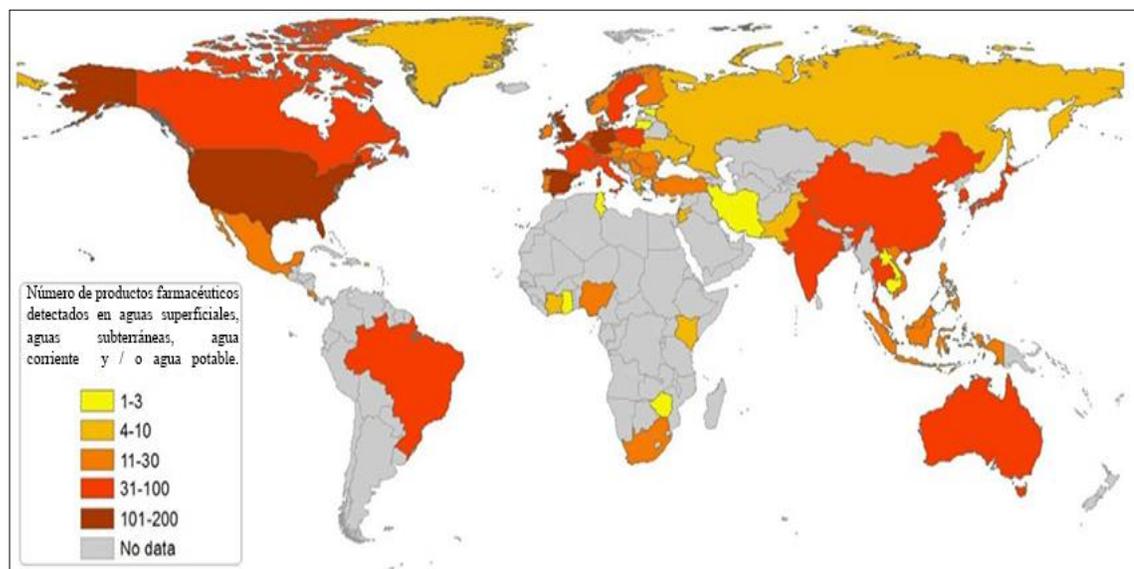
Si la historia moderna del ser humano pudiera mirarse como un gran edificio en construcción, sin lugar a dudas los cimientos que la sostienen y han permitido el modelo de vida tendrían como material constitutivo a la industria Farmacológica. Desde que en el siglo XIX un químico francés llamado Joseph Pelleterier logró obtener un alcaloide que llamó Quinina a partir de los restos secos de la corteza de una planta proveniente de la selva amazónica, ensayo que permitió establecer un protocolo para la extracción de principios activos desde las plantas, desde el descubrimiento de la Penicilina y sus propiedades antibióticas por parte de Alexander Fleming y hasta la producción de medicamentos que permiten el tratamiento de miles de enfermedades, que hoy nos parecen inofensivas pero antes eran mortales; La humanidad ha pasado de tener 1.000 millones de habitantes a los casi 7.500 millones en la actualidad. Así de frenético ha sido, en un poco más de doscientos años, las sociedades humanas han pasado de ir a orar por sus enfermos de “La fiebre”, a simplemente ir a una farmacia por un par de pastillas que las harán de curanderas milagrosas.

El aumento de la esperanza de vida y la cantidad de población a nivel mundial tiene directa relación con la industria farmacéutica, gracias a ella se han masificado productos químicos que han permitido erradicar, controlar, combatir enfermedades y males congénitos. La influencia comercial en la industria es tal, que representó durante el año 2017 una producción global equivalente a 1.228 miles de millones de dólares, un aumento del 21% con respecto al año 2012 (crecimiento mayor a cualquier otra área industrial a nivel

mundial en ese periodo) y que es consecuencia de la gran demanda de medicamentos a nivel mundial por parte de la población. Pero este fenómeno de gran demanda y crecimiento socioeconómico ha tenido una consecuencia inesperada revelada por recientes investigaciones en el campo de las ciencias ambientales, abriendo un nuevo tópico en la temática de contaminantes emergentes que está demostrando que nuestro entusiasmo excesivo por los fármacos ha mermado ostensiblemente la calidad del bien más escaso y valioso del cual dependemos: El agua.

Los Compuestos Farmacéuticamente Activos (CFA) son un gran grupo de compuestos químicos utilizados para el control y tratamiento de enfermedades, dentro de los cuales existen miles de medicamentos que se entregan con o sin prescripción médica como lo son antibióticos, antidepresivos, analgésicos, reguladores de azúcar, anticonceptivos y agentes quimioterapéuticos (Benotti y col., 2009; Ratola y col., 2012). Los CFA son relativamente estables y no pueden ser completamente metabolizados durante su uso hasta en más de 90% (Castiglioni y col., 2006), lo que provoca que sean excretados a través de la orina y las heces, entrando en el sistema de aguas residuales domésticas y posteriormente siendo liberados al medio ambiente debido a que las plantas de tratamiento de aguas no pueden eliminarlos significativamente (Ashton y col., 2004; Yan y col., 2017). Su liberación al medio ambiente ha hecho que se detecten actualmente de manera extensiva en medios acuáticos, representando un riesgo de alto potencial para la salud humana, la vida acuática y los ecosistemas en general (Jie y col., 2017). En definitiva, los CFA se han transformado en los mayores contaminantes de las aguas a nivel global debido a su intensivo uso y falta de regulación en su deposición (Richardson y Thomas, 2014),

siendo encontrados en concentraciones que llegan hasta los microgramos por litro en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, aguas superficiales, aguas subterráneas e incluso algunas aguas potables (ver figura 1.1) (Ykehata y col., 2006; Delgado y col., 2012).



**Figura 1.1:** Cantidad de productos farmacéuticos detectados en distintos tipos de aguas y cuerpos acuosos alrededor del mundo hasta el año 2016 (Adaptado de: T.A der Beek y col., 2016).

Los efectos negativos provocados por la liberación de fármacos al medio ambiente están dados por la capacidad de actuar de sus principios activos en los organismos expuestos que posean biomoléculas similares (Fent y col., 2006), es así que pueden actuar por ejemplo como disruptores endocrinos (generando problemas hormonales), agentes tóxicos y mutagénicos (Crane y col., 2006; Daughton, 2003b). Se ha demostrado que las aguas cargadas con fármacos son responsables de aumentar la resiliencia bacteriana (Booker y col., 2014), poseer un efecto tóxico crónico o agudo en peces y organismos invertebrados

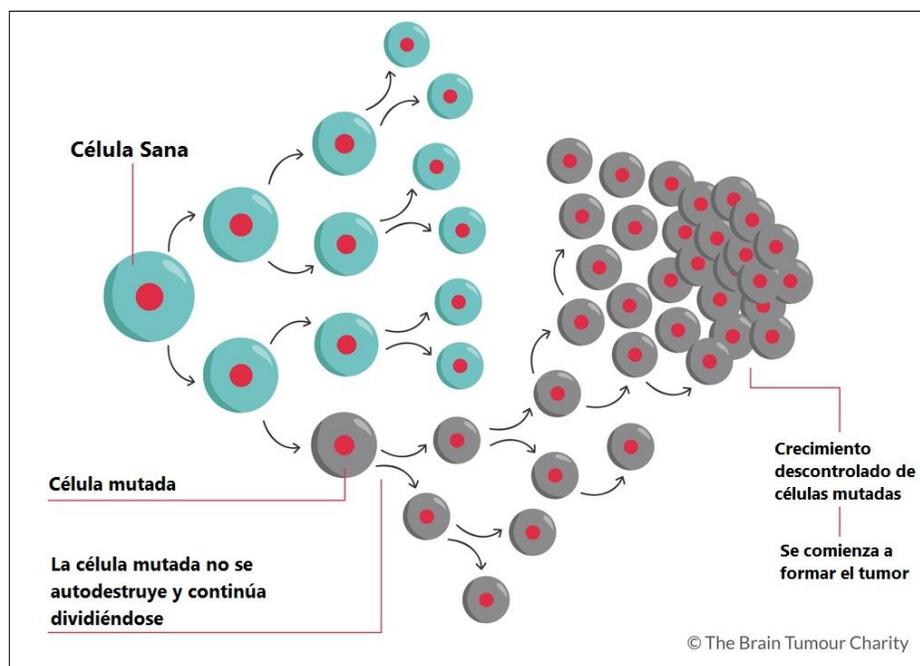
(Boxall y col., 2012). Resultados de estudios recientes demuestran que los 100 medicamentos más utilizados en hospitales generan una contribución de hasta el 38% de la carga total de contaminación local de aguas en las ciudades (Lienert y col.,2011), así como también aguas residuales contaminadas con fármacos poseen una baja tasa de biodegradación (Booker y col., 2014) y que una vez en el medio ambiente es difícil la remoción de los mismos. Todo lo anterior constituye una preocupación de alta complejidad para países como China, en el cual se ha detectado que de un total 92.700 Ton de 36 antibióticos en uso durante el año 2013 cerca de 53.800 Ton ingresaron al medio ambiente a través de las aguas residuales (Zhang y col., 2015).

¿Será entonces que el uso descuidado de nuestros remedios de la era moderna generará mayores enfermedades a futuro?, por lo que nos indican los antecedentes científicos, la respuesta es un rotundo sí y ese futuro ha comenzado ahora. Se ha demostrado experimentalmente que la exposición a corto plazo a una mezcla de 13 medicamentos de múltiples clases de uso común a concentraciones tan bajas como nanogramos por litro puede inhibir significativamente el crecimiento de células embrionarias humanas in vitro (Pomati y col., 2006). Esto debiese ser motivo suficiente para crear regulaciones que sean capaces de evitar su deposición en el medio ambiente que lleva décadas ocurriendo sin restricciones (Bound y Voulvoulis, 2005) y para también realizarnos otra pregunta que ya está haciendo eco en países como Alemania y Reino Unido: ¿Qué pasa con los fármacos que tienen la capacidad de actuar sobre el ADN?

## **1.2 Los antineoplásicos**

El envejecimiento de la población y la exposición a contaminantes ha provocado que la aparición de cáncer sea cada vez más común en las personas. Esto se refleja en la demanda incremental de quimioterapia por parte de las poblaciones en países desarrollados, la cual crece cerca de 10% cada año (Health Canada, 2004; Varadhachary, 2005; Bergmann y col., 2011; Besse y col., 2012;) y se espera que la incidencia de cáncer siga aumentando en los años venideros, como consecuencia de lo anterior la investigación y desarrollo de nuevos fármacos para combatirlo está en pleno auge (Stewart and Wild, 2014).

El cáncer es una enfermedad no contagiable que se caracteriza por un crecimiento celular descontrolado, anómalo y con capacidad de invadir o diseminarse indiscriminadamente en órganos y tejidos cercanos (metástasis), dentro de la denominación de cáncer se pueden encontrar cerca de 200 tipos de diferentes variaciones que afectan a cuatro de cada diez personas a nivel mundial. En la actualidad se le atribuye a esta enfermedad ser la principal causa de muerte en el mundo, un antecedente que lo confirma es que el año 2015 ocasionó 8.8 millones de muertes, lo que quiere decir que una de cada seis muertes es causada por cáncer y las proyecciones más recatadas esperan que la cifra aumente a 13 millones para el año 2030 (IARC, 2013; OMS, 2017).



**Figura1.2:** Esquema de proceso de inicio del cáncer (Adaptado de: The Brain Tumour Charity, 2017).

En el crecimiento (ver figura 1.2), tratamiento y evolución del cáncer en un organismo se van produciendo nuevas alteraciones genéticas que provocan transformaciones, que genera como resultado nuevas propiedades bioquímicas, tiempo de duplicación y nuevas respuestas por parte de las células tumorales a los fármacos, estas nuevas condiciones se relacionan directamente con la aparición de resistencia a los tratamientos (Rodríguez-Galindo y col., 2000). El último fenómeno mencionado es materia interesante de análisis más adelante.

A los fármacos utilizados para combatir el cáncer se les llama antineoplásicos o citostáticos, poseen distintos mecanismos de acción que funcionan en base a principios

activos que son capaces de imitar propiedades de biomoléculas para interrumpir el crecimiento o destruir las células y su actuar se caracteriza por no ser selectivo, es decir, afectan tanto células cancerosas como sanas (OMS, 2017).

Los tratamientos utilizados recurren a la acción de cinco grupos farmacológicos: Antimetabolitos, Antibióticos, Agentes Alquilantes, Complejos de Platino, Inhibidores de la mitosis e Inhibidores de la topoisomerasa, dentro de los cuales los más utilizados son los agentes Alquilantes. Estos tratamientos tienen la capacidad de interferir en una o varias fases del ciclo celular o sobre los mecanismos de control de la proliferación celular, utilizándose al menos dos fármacos para actuar sobre diferentes dianas terapéuticas y evitar la aparición de resistencias.

Existen variados efectos adversos como consecuencia de la falta de especificidad de los tratamientos con citostáticos, los más frecuentes son muerte de células sanas de crecimiento rápido, depresión de la médula ósea, anemia, náuseas, vómitos, alopecia, alteración en la cicatrización, trastornos de crecimiento en niños, necrosis, esterilidad y quizás el más paradójico: Carcinogénesis a largo plazo (Global Cancer Facts and Figures, 2013). Desafortunadamente, debido a las características de las terapias actuales, es inevitable que los fármacos citostáticos y sus metabolitos provoquen daño a las células sanas, lo que no se limita solamente a los pacientes, ya que involucra a todos aquellos expuestos a la producción de los citostáticos y a quienes los administran (Sessink y col., 2011; Turci y col., 2003). Demostrativo de esto último son las investigaciones que han observado un aumento excepcionalmente significativo de aberraciones cromosómicas estructurales en enfermeras involucradas en la preparación y la administración de

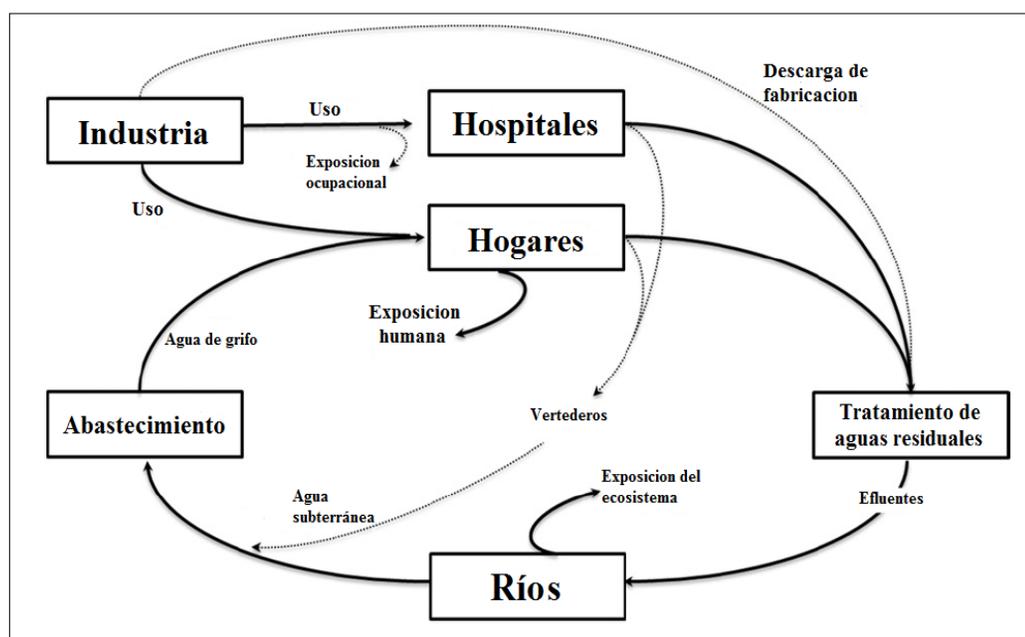
fármacos anticancerígenos con poder citotóxico, lo que a todas luces resulta en un riesgo elevado de contraer cáncer (Bouraoui y col., 2011; Snerhovsky y col., 2001).

### **1.2.1 Antineoplásicos en el medio ambiente**

En la década de los 90' aparecieron los primeros estudios que mostraban la presencia de fármacos antineoplásicos en el medio ambiente, a lo que no se le tomó demasiada importancia debido a lo que se consideraba una baja concentración detectada en el rango de los nanogramos por litro (Aherne y col., 1990). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la preocupación por el impacto de estos fármacos, como consecuencia de su liberación al medio ambiente, debe ser aún mayor ya que todos poseen un alto potencial citotóxico, genotóxico, teratógeno o mutagénico a pesar de su baja concentración detectada en comparación a otros fármacos. Actualmente, se han denominado como compuestos de estudio prioritario en el área de los contaminantes emergentes (Allwood y col., 2002; Kummerer, 2001; Kosjek and Heath, 2011; Cai y col., 2017).

Se ha detectado la presencia de variados fármacos anticancerígenos y algunos de sus metabolitos en concentraciones que alcanzan los microgramos por litro en aguas superficiales y cuerpos de agua en diferentes áreas del mundo, siendo de especial preocupación para la salud pública su presencia en aguas superficiales que son utilizadas para cultivos o consumo rural. Su detección indica que los tratamientos de aguas residuales son ineficientes e incapaces de retenerlos mediante adsorción o eliminarlos en sedimentos (Valcarcel y col., 2011; Ashton y col., 2004; Calamari y col., 2003; Kolpin y col., 2002; Monpelat y col., 2009).

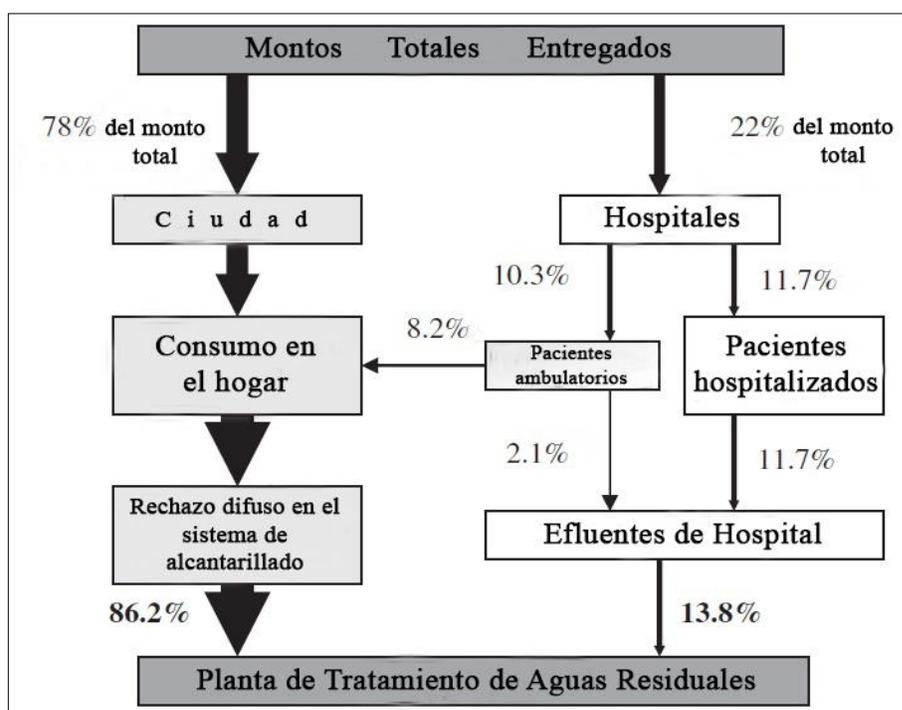
La contaminación por fármacos antineoplásicos tiene como principales fuentes a los efluentes de aguas hospitalarias, aguas residuales domésticas, descargas de producción y eliminación de desechos de medicamentos. De las cuatro fuentes mencionadas se podría pensar que los hospitales o las industrias son los que generan los principales aportes, pero se ha demostrado que, debido al gran aumento de los pacientes ambulatorios en tratamiento, son estos los que más contaminación por citostáticos provocan a través de los efluentes de sus casas (Ferrado-Climent, 2013; Kummerer y Al-Ahmad, 2010).



**Figura 1.3:** Ruta de entrada y transporte de productos farmacéuticos citostáticos en el medio ambiente. Las líneas de trazos indican rutas inciertas (Adaptado de: Zhang y col., 2013).

Lo anterior se debe a que la tasa de excreción para este tipo de fármacos, en cuanto a la molécula inalterada, varía en un amplio intervalo de 10 a un 80%. La contaminación es aún mayor cuando se toma en cuenta la excreción de metabolitos y productos de

degradación, de los cuales no se tienen estudios suficientes, pero existen algunos casos en donde estos son más tóxicos que el químico original y según estudios la Agencia Alemana de Medio Ambiente (UBA) cerca del 89% de los antineoplásicos no son fácilmente biodegradables, el 30% de ellos son persistentes en fase acuosa y se propone como un nivel pragmático de  $0,01\mu\text{g/L}$  por compuesto genotóxico en el agua asociado a riesgo de contraer cáncer a través del recurso hídrico (Unweltbundesamt, 2003; Harris y Dodds, 1985; Cass y Mysgrave, 1992; Kummerer, 2014; Rowney y col., 2009).



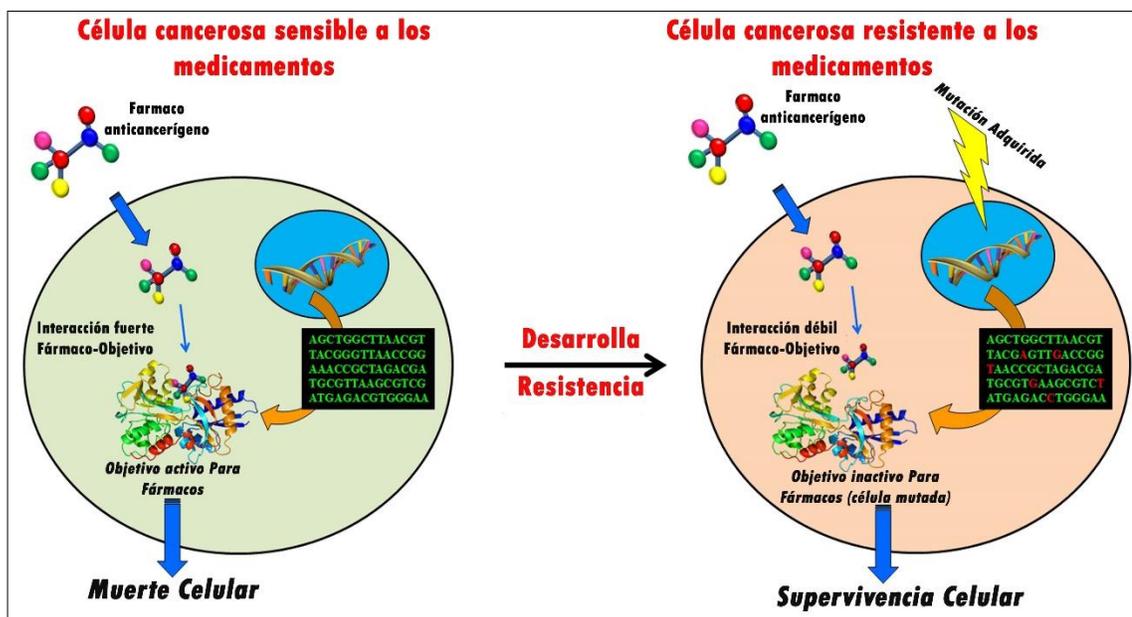
**Figura 1.4:** Vías de entrada teóricas para fármacos contra el cáncer en el medio acuático con contribución relativa de cada vía de entrada. Basado en datos recopilados en Francia (Adaptado de: AFSSAPS, 2009).

El conocimiento que se posee sobre el destino ambiental de este tipo contaminación y los posibles riesgos ecotóxicos relacionados con su presencia en los cuerpos de agua aún es muy bajo, pero se sabe por estudios de corto plazo que la exposición ante los antineoplásicos puede inducir efectos agudos de fetotoxicidad, cambios genéticos sutiles y alterar los ciclos celulares de la flora y fauna expuesta de manera más crónica (Booker y col., 2014; Johnson, 2008; Rowney y col., 2009). Debido a que estos medicamentos están diseñados para actuar en tejidos específicos son sospechados por sus efectos perjudiciales en la población humana, así se han identificado como los grupos de la población más sensibles a sus efectos a los no nacidos, bebés, niños pequeños y adultos mayores, así como también la exposición continua a los citostáticos puede poner a todo el ecosistema en un peligro mayor debido a los efectos sinérgicos no previstos (Fent y col., 2006; Johnson y col., 2008).

### **1.2.2 Alquilantes: Los más tóxicos**

Dentro de todas las categorías de moléculas utilizadas en quimioterapia, el grupo de los fármacos Alquilantes es el que más enciende las alarmas desde el punto de vista medio ambiental, debido a que son los más utilizados y porque son capaces de interactuar directamente con el ADN, el ARN y variadas enzimas, lesionando estas moléculas, efecto que puede derivar en mutaciones no deseadas debido a que su actuar no es exclusivo a células cancerosas, es por ello que ante estos fármacos no existe un nivel de exposición seguro (Booker y col., 2014). Existen tres grupos de Alquilantes: Alquilantes Clásicos, Nitrosoureas y Tetrazinas.

Los fármacos Alquilantes actúan interfiriendo con la replicación celular, provocando un efecto citotóxico mediante la formación de enlaces covalentes entre sus grupos alquilo y diversas moléculas nucleófilas presentes en las células, siendo sus objetivos más comunes las bases nitrogenadas del ADN (Kummerer y col., 2014). Su capacidad de alterar el material genético los hace candidatos a infringir daño a cualquier organismo eucariota en desarrollo independientemente de que su interacción sea limitada a una sola célula, ya que como sabe, basta con generar una sola mutación para originar carcinogénesis a largo o mediano plazo (esto último depende de la velocidad de replicación celular) (Besse y col., 2012). De hecho, los tratamientos con fármacos Alquilantes se caracterizan por generar toxicidad en la médula ósea, que puede ser en forma de mielosupresión o inmunosupresión, son capaces de afectar la gametogénesis generando esterilidad en los hombres, reducir el periodo reproductivo en las mujeres, se les asocia con la incidencia de leucemia aguda y con la formación de células progenitoras de cáncer (Sarkar y col., 2013; Byler y col., 2014). Además de lo ya mencionado, el autor cree que existen antecedentes suficientes para prever un impacto aún mayor asociado a la aparición de resistencia a los fármacos antineoplásicos por parte de los tumores, fenómeno del cual se ha investigado, pero no relacionado con posibles influencias ambientales.



**Figura 1.5:** Resistencia a los tratamientos contra el cáncer propiciada por mutaciones inferidas en el ADN de células cancerígenas (Adaptado de: Cancer Drug Resistance Database, 2016).

La resistencia a los medicamentos se produce cuando las enfermedades se vuelven tolerantes a los tratamientos, fenómeno que actualmente ha propiciado la aparición de bacterias inmunes a los antibióticos. Estudios sugieren que la metilación del ADN, ARN y proteínas (modo de acción de los Alquilantes) está asociada con la resistencia a los tratamientos anticancerígenos (Bonanno y col., 2014; Olaussen y col., 2006; Baker y El-Osta, 2003). ¿La contaminación por Alquilantes será capaz de generar un fenómeno de resistencia, como el ocurrido con las bacterias, en los cánceres?

Si ocurriera el escenario hipotético, esto no solo afectaría a los seres humanos, sino que a todos los organismos eucariotas expuestos a la contaminación y significaría un riesgo

mayor de cáncer en conjunto con tratamientos cada vez menos efectivos. Por todo aquello, es absolutamente necesario buscar nuevos enfoques y mecanismos para la administración de fármacos con el fin de evitar las consecuencias ecotóxicas ya demostradas y que potencialmente posee el ingreso de estos fármacos al medio ambiente.

### **1.3. *Green Pharmacy*: Multidisciplina en el desarrollo de los fármacos.**

La utilización del principio de precaución por parte de los científicos es necesaria frente a cualquier tipo de contaminación por más pequeña que sea, cualquier contaminación posee efectos negativos sobre la naturaleza y cuando existen problemas que presentan consecuencias desconocidas o impredecibles se debe adoptar un enfoque proactivo y preventivo para evitar una “sorpresa” en los sistemas ambientales. El concepto de sorpresa se refiere a cuando las causas provocan comportamientos y respuestas inesperadas en los sistemas ambientales, un ejemplo de esto es cuando la realidad de los efectos contaminantes supera ampliamente las predicciones realizadas (Crawford, 1970).

Como respuesta al problema de contaminación ambiental provocada por los fármacos antineoplásicos y sus posibles consecuencias se ha propuesto el enfoque de la *Green Pharmacy* (Farmacia Verde) para buscar mecanismos que impidan el ingreso de fármacos peligrosos al medio ambiente. La *Green Pharmacy* plantea los principios y enfoques preventivos como estrategia para aplicarse al diseño de medicamentos a través de la creación de mecanismos de entrega, sistemas de empaquetamiento, dispensación eficiente y control de eliminación de los mismos, con el objetivo de que sus beneficios sean aditivos para el usuario final y el medio ambiente. De este modo, el diseño de un fármaco y su formulación deben tener en cuenta todos los factores y variables para que su uso sea

compatible con la preservación de los ecosistemas (Daughton; 2003a,b; Khetan and Collins; 2007).

El diseño o aplicación de *Drug Delivery* en fármacos antineoplásicos apunta a mejorar las características de sorción fisiológica y al mismo tiempo generar rutas de administración que permitan establecer la dirección o control al movimiento de las especies químicas en el organismo, otorgando una administración exclusivamente en el sitio de acción como consecuencia de la inhibición o disminución de las interacciones con otras moléculas que no son el objetivo del tratamiento (en contraposición a fármacos “sucios” o “promiscuos”, que poseen una amplia gama de reacciones posibles dentro del organismo y fuera de él) y la integración de mecanismos para la liberación controlada del fármaco in situ. El desarrollo de tratamientos mejor diseñados a través de estrategias eco-amigables permite reducir las dosis de aplicación, minimizar las reacciones adversas de los tratamientos y disminuir ostensiblemente la excreción directa del compuesto y sus metabolitos al medio ambiente. Lo anterior da como resultado la administración del ciclo de vida de las especies químicas antineoplásicas utilizadas que han sido concebidas bajo esta estrategia, respetando la estrecha relación existente entre la salud humana y la salud de los ecosistemas (Daughton; 2003a).

### **1.3.1 Compuestos de inclusión: Empaquetamiento a través de la Química Supramolecular**

La química supramolecular es la rama de la ciencia que estudia la naturaleza y propiedades de las interacciones suscitadas entre moléculas, fue definida por primera vez por Jean-Marie Lehn en el año 1978 y posee su raíz en el comportamiento observado en los

mecanismos enzimáticos. Estas interacciones tienen su origen en la acción de fuerzas no covalentes, como interacciones electrostáticas, fuerzas de van der Waals y enlaces mediante puente de hidrógeno, que en su conjunto dan como resultado la formación de “supermoléculas” compuestas de dos o más especies químicas complejas. La unidad básica de las estructuras supramoleculares son las moléculas, las que pueden ser de naturaleza orgánica, inorgánica o una mezcla de ambas, formando una estructura cristalina estable y bien definida con propiedades físico-químicas propias que pueden ser diferentes a las observadas en las moléculas individuales que la conforman.

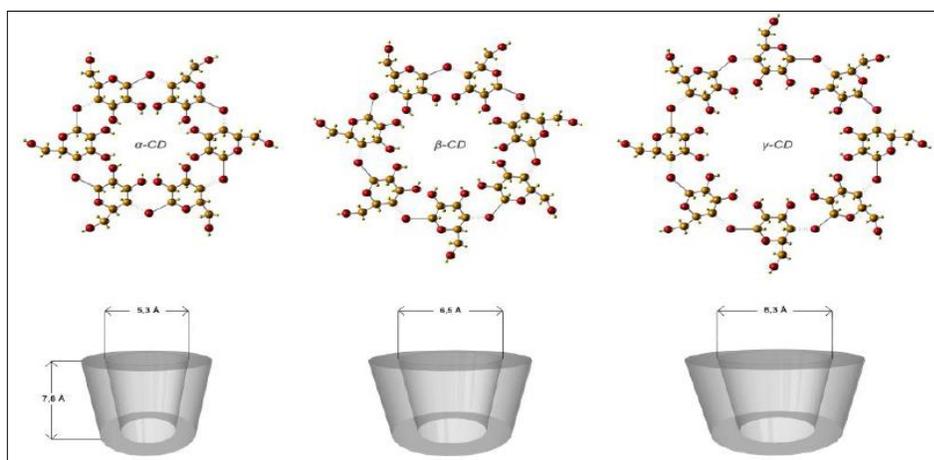
El control de características energéticas y estereoquímicas de las fuerzas intermoleculares es de gran utilidad para el diseño de supermoléculas con características convenientes para generar una gran variedad de “dispositivos moleculares” capaces de generar movimiento frente a estímulos externos (máquinas moleculares), ser soporte para otras moléculas, empaquetamiento y obtención de estructuras con aplicaciones tecnológicas.

Actualmente se han caracterizado gran variedad de supermoléculas y dentro de ellas existen algunas capaces de retener otras especies químicas en los intersticios característicos de la estructura cristalina que poseen mediante un fenómeno denominado reconocimiento molecular. Se define el reconocimiento molecular como la unión o selección de una especie química que es capaz de ingresar o interactuar con un intersticio cristalino (Huésped), debido a un equilibrio generado por el conjunto de fuerzas intermoleculares existentes con la cavidad de la supermolécula (Matriz), encontrando de esta manera un equilibrio energético más favorable al interactuar con la matriz y conservando ciertos grados de libertad de manera reducida.

Un compuesto de inclusión (CI) es un sistema supramolecular formado por dos o más especies químicas, en el cual una molécula o un conjunto de ellas (matriz) envuelven a otra (huésped) como consecuencia del fenómeno de reconocimiento molecular, dando como resultado una mezcla cristalina con propiedades propias. La estabilidad del CI se expresa a través de la constante de equilibrio termodinámico ( $K_f$ ) dada por la suma de las fuerzas intermoleculares y las interacciones con el entorno, en donde de acuerdo con la estabilidad de la inclusión, la matriz puede otorgarle al huésped propiedades como mayor solubilidad en distintos solventes, protección ante agentes degradantes externos y disminución de la biodisponibilidad en el medio ambiente (Ming y col., 2006; Lehn, 1988; Gellman, 1997).

### **1.3.2 Ciclodextrinas como matrices**

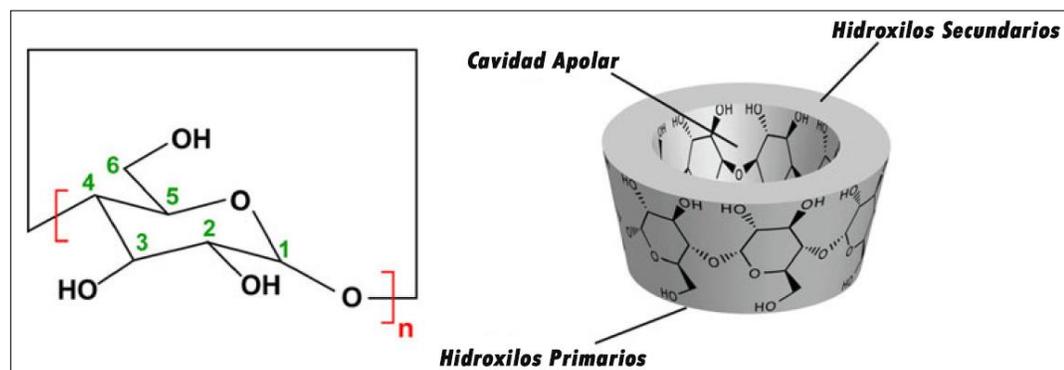
Uno de los conjuntos de supermoléculas más estudiados en química supramolecular corresponde a las Ciclodextrinas (CDs), las cuales son oligosacáridos cíclicos que se obtienen a partir de la degradación enzimática del almidón, generando estructuras con forma de cono truncado, cuyas especies más comúnmente estudiadas poseen seis, siete y ocho unidades de glucosa en su esqueleto molecular (formas que se denominan con las letras  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  respectivamente), lo que tiene como resultado la modificación del tamaño de la cavidad que poseen (ver figura 1.6).



**Figura 1.6:** Representación de  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD en su fórmula estructural tipo cono.

Las unidades de glucosa que componen a estas macromoléculas se encuentran unidas mediante enlaces tipo  $\alpha(1-4)$ , la disposición de los grupos funcionales de la estructura rígida de las CDs deja los grupos hidroxilo primarios en el lado más estrecho de la cavidad y los grupos hidroxilo secundarios quedan ubicados en el lado más ancho de la misma. Mientras que el exterior de la estructura posee características polares otorgadas por las dos periferias hidrofílicas, la cavidad genera un ambiente favorable para la interacción con moléculas de características apolares (ver figura 1.7), lo que le otorga a las CDs una gran habilidad para incluir dentro de sí varios tipos de moléculas orgánicas presentes en medios polares o acuosos y desde el punto de vista toxicológico se ha observado que ninguna de las formas de CDs muestra efectos perjudiciales para el ser humano. No se han observado efectos mutagénicos, teratogénicos ni carcinógenos, lo que ha traído como consecuencia que un gran número de productos o procesos comerciales comiencen a incorporar CDs

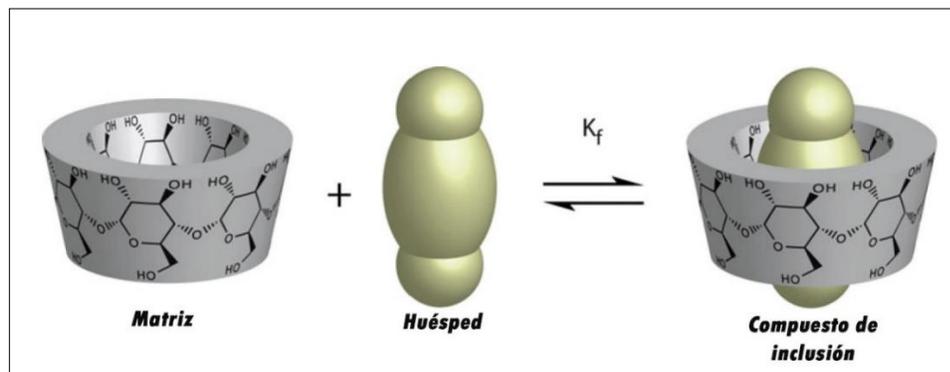
nativas o modificadas (French y col., 1965; Nakagawa y col., 1994; Szejtli, 1982; Saenger y col., 1998).



**Figura 1.7:** Representación de la unidad básica de glucosa que compone las CDs (izquierda) y características estructurales (Adaptado de: Zhang y col., 2013).

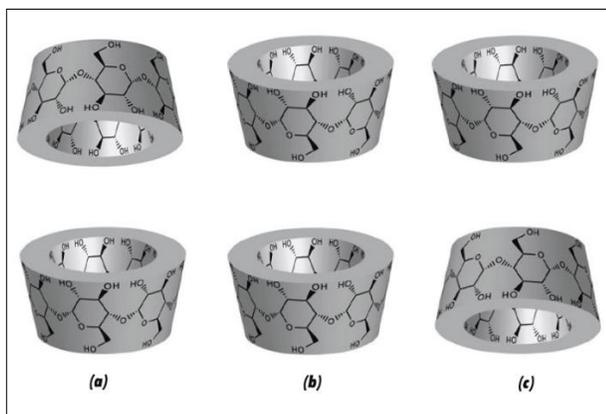
La inclusión dentro de CDs puede ocurrir en fase sólida, líquida o gaseosa, sin embargo, la mayoría de los estudios están dedicados a soluciones acuosas. Esto se debe al papel central que desempeña el agua en el proceso de complejación, ya que la presencia de moléculas de agua dentro de la cavidad apolar de las CDs produce una inestabilidad relativa que termina favoreciendo el desplazamiento de las mismas a cambio del ingreso de moléculas menos polares. Luego el complejo matriz-huésped se estabiliza mediante fuerzas débiles, generando un fenómeno de equilibrio dinámico entre especies libres e incluidas, donde la formación y disociación son generalmente rápidas en periodos que van desde micro a milisegundos (ver figura 1.8). El equilibrio de cada uno de los CI se ve influenciado también por las matrices cercanas y su ordenamiento, existiendo tres orientaciones posibles: cabeza-cabeza, cabeza-cola y cola-cola. De las tres disposiciones espaciales posibles, la más estable es la cabeza-cabeza (ver figura 1.9) (Bergeron, 1977;

Connors, 1997; Landy y col., 2000; Fourmentin y col., 2007; Nagaraju, 2009; Dang, 2011).



**Figura 1.8:** Equilibrio de formación teórico de un compuesto de inclusión de CD y una molécula orgánica (Adaptado de: Zhang y col., 2013).

La versatilidad que poseen las CDs para ser excelentes matrices las ha hecho objeto de estudio en distintos campos de aplicación que van desde la captación y encapsulamiento de contaminantes, pasando por la industria alimentaria hasta el empaquetamiento de fármacos para sistemas de Drug Delivery. Y es este último el que ha tenido un gran éxito debido a las propiedades físico-químicas favorables que acumulan las CDs para mejorar los tratamientos y dentro de las cuales se pueden encontrar: son capaces de proteger a los fármacos de interacciones químicas no deseadas en el organismo y con factores ambientales (como la fotodegradación), amplio rango de estabilidad térmica (su temperatura de descomposición es de 300°C), disminuye los efectos tóxicos posibles al limitar su biodisponibilidad, es capaz de aumentar la solubilidad de especies aromáticas o alifáticas y además su rango de distintos tamaños permite empaquetar fármacos de variadas clases (Loftsson, 2007; Landy y col., Cairra, 2001; Rasheed, 2008).



**Figura 1.9:** Orientaciones espaciales posibles de CDs: (a) cabeza-cabeza, (b) cabeza-cola y (c) cola-cola (Adaptado de: Zhang y col., 2013).

De las tres especies de CDs nombradas, la más utilizada como método de empaquetamiento en sistemas de Drug Delivery es  $\beta$ CD, debido al tamaño de su cavidad se acopla de mejor manera con especies químicas que contienen en su morfología anillos aromáticos o heterociclos, otorgándoles los grados de libertad necesarios para que puedan ser liberados posteriormente y al mismo tiempo siendo capaz de encapsular completamente las estructuras bencénicas o de propiedades similares, dejando expuestos grupos funcionales de interés. Además,  $\beta$ CD es la especie química que más se obtiene en mayor proporción al sintetizar CDs, lo que la hace ser un reactivo más económico (Chen, 2004; Melo, 2008).

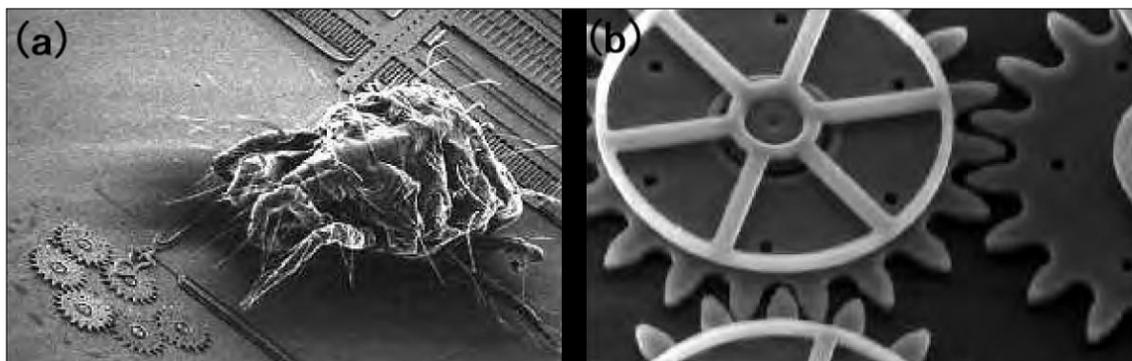
La formación y estabilidad de un CI se pueden comprobar mediante la verificación de la existencia de nuevas propiedades físico-químicas que son el reflejo de los cambios en el entorno electrónico de las moléculas y la nueva morfología generada por el complejo matriz-huésped. Dichos cambios se pueden apreciar al contrastar los puntos de fusión de

las especies por separado y formando el CI, observando el desplazamiento químico en una resonancia magnética nuclear de protones ( $H^1$ -RMN) del complejo supramolecular con respecto a las señales de las especies químicas por sí solas y comprobar la conformación de una nueva configuración cristalina mediante Difracción de Rayos X de polvo cristalino (DRXP), estableciendo la celda unitaria característica del nuevo CI (Szejtli, 1998; Ming, 2006; Dipak y col., 2012).

### **1.3.3 Nanopartículas de Oro en tratamiento de cáncer**

La Nanociencia es un campo de la investigación que se ha ido desarrollando con una fuerza creciente en los últimos diez años, la capacidad de poder controlar diminutos conglomerados atómicos con aplicaciones en diferentes áreas del conocimiento y desarrollo ha hecho que se convierta en el “Boom científico” del momento. El origen de la palabra “nano” es proveniente del prefijo “ $\nu\alpha\nu\omicron\varsigma$ ” del vocablo griego que significa diminuto, enano o pequeño, y en la actualidad el sistema internacional de medidas (S.I.) utiliza dicha palabra para referirse al factor  $10^{-9}$ , que representa la mil millonésima parte de algo. La Nanociencia se remite al estudio del comportamiento y propiedades asociadas a los objetos que poseen un tamaño mil-millonésimo-métrico (átomos o moléculas), lo cual representa una longitud 80.000 veces más pequeña que el diámetro de un cabello humano y que actualmente permite el desarrollo de estructuras en aquella escala (ver figura 1.10) con aplicaciones en química de materiales, tecnologías computacionales, descontaminación y biomedicina. Las interesantes aplicaciones tienen su origen en el cambio de la relación superficie/volumen que experimentan los nanomateriales, a medida que los objetos se hacen más pequeños se van pareciendo más a superficies, y en ellas los

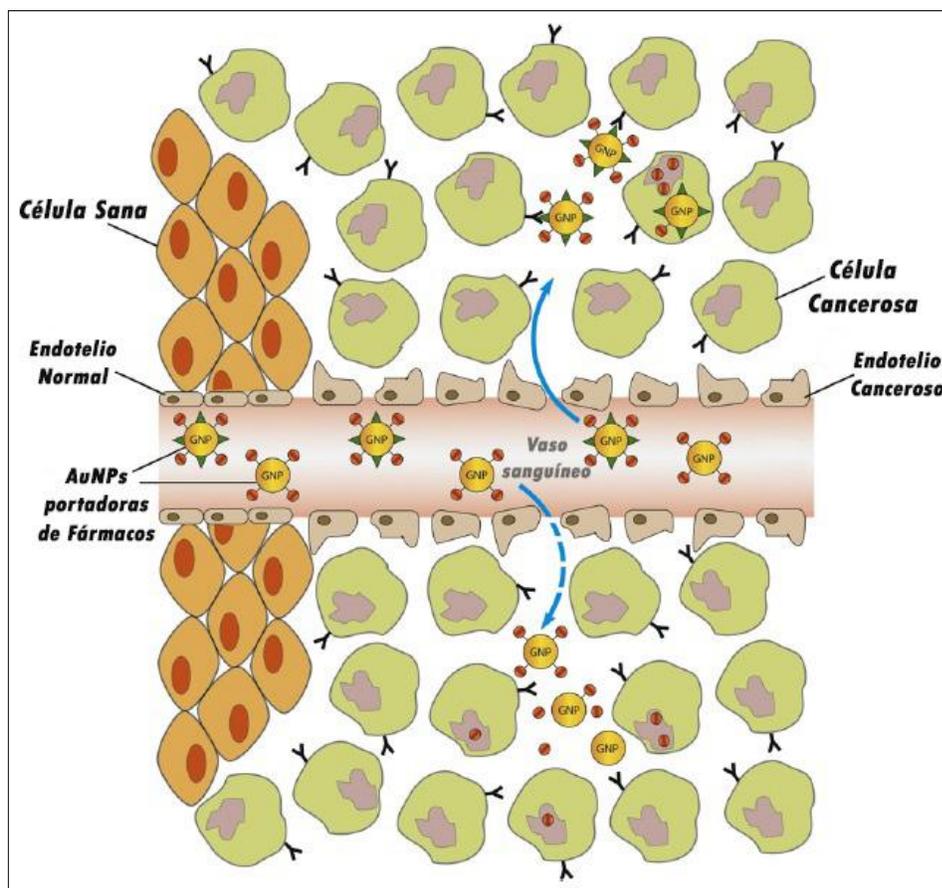
átomos tienen menos vecinos, pero sienten con mayor fuerza las interacciones de otros átomos, lo que genera la aparición de propiedades cuánticas.



**Figura 1.10:** (a) Ácaro junto a engranes manométricos de silicio y (b) acercamiento a engranes nanométricos (Imagen propiedad de Sandia National Laboratories).

En el estudio de nanomateriales con aplicación biomédica las nanopartículas de oro (AuNPs) resaltan por ser las estructuras que aparecen en mayor número de publicaciones en los últimos años y a un ritmo que va en aumento. El gran interés por dicho nanomaterial se debe a que AuNPs con diferentes formas y tamaños exhiben propiedades físicas, químicas y biológicas únicas que les confieren el potencial para ser utilizadas en el transporte y entrega con sitio selectividad de diversas cargas útiles en el tratamiento de enfermedades. Estas se pueden sintetizar fácilmente con una gran variedad de métodos, generando nanopartículas monodispersas con tamaños que varían de 1 a 150 nm, pero las utilizadas en aplicaciones biomédicas se preparan comúnmente usando métodos de síntesis coloidal (Paciotti y col., 2006; Rotello y col., 2010; Connor y col., 2005; Niidome y col., 2011; Fen-Ying, 2017).

Estudios han demostrado que las AuNPs son biocompatibles con los organismos en tamaños superiores a los 10 nm, lo que quiere decir que con la reducción del tamaño por debajo de ese límite comienzan a mostrar toxicidad (Pan y col., 2007; Chen y col., 2009; Johnston y col., 2010) y se ha observado que al ser aplicadas vía intravenosa se ubican pasivamente de forma selectiva en zonas tumorales (ver figura 1.11), debido a que en esas zonas la vasculatura sanguínea presenta fenestraciones más amplias que los vasos sanguíneos normales, a esto se le ha llamado Efecto de Permeabilidad y Retención mejorada (EPR) (Maeda., 2001).



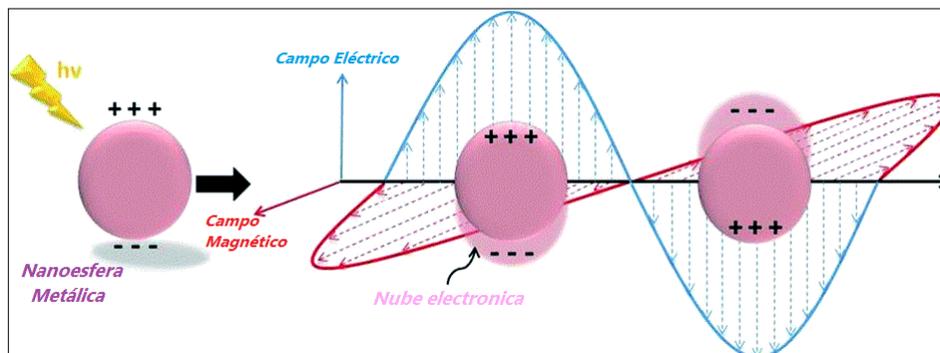
**Figura 1.11:** Entrega sitio específica de fármacos propiciado por efecto EPR (Adaptado de: Gosh, 2008).

Además de lo anterior, las AuNPs poseen la capacidad de unirse a grupos funcionales químicos como Carboxilo, Amino y Tiol, permitiendo la estabilización mediante interacciones que pueden tener carácter no covalente (Chen y col., 2008). Es así como pueden adherirse y conjugarse con polímeros o fármacos, lo que permite junto con el EPR generar terapias que actúen de manera selectiva en zonas donde se encuentran las células tumorales.

Un caso a destacar dentro de la conjugación con polímeros es la estabilización mediante PEG-tiolado, que es capaz de aumentar los tiempos de circulación de las AuNPs en el sistema sanguíneo e incrementando a su vez la cantidad de nanopartículas que pueden ubicarse en las zonas donde existen células tumorales (Park y col., 2008). En casos donde se ha utilizado PEG-tiolado y fármacos para quimioterapia conjugados con AuNPs se ha reportado que se puede incrementar la concentración de fármaco que llega a los tumores entre 10 a 100 veces en comparación a la utilización del fármaco por si solo para el tratamiento (Kaul y Amiji, 2002).

Otra de las propiedades fisicoquímicas interesantes que exhiben las AuNPs es la resonancia de plasmón superficial (RPS), fenómeno que se produce al incidir una fuente de radiación electromagnética no ionizante (como un láser) sobre las nanopartículas causando la excitación de los electrones libres de los átomos de oro, generando una resonancia electrónica colectiva y que tiene como resultado la deslocalización de la nube electrónica que tiene como producto final la entrega de energía y calor (ver figura 1.12) (Kumar y col., 2007). El movimiento y el calor producidos pueden ser utilizados para

liberar de manera sitio-específica especies químicas adheridas a la superficie de las nanopartículas y además se puede inducir hipertermia de manera local.



**Figura 1.12:** Representación del efecto de resonancia de plasmón superficial de una nanopartícula metálica.

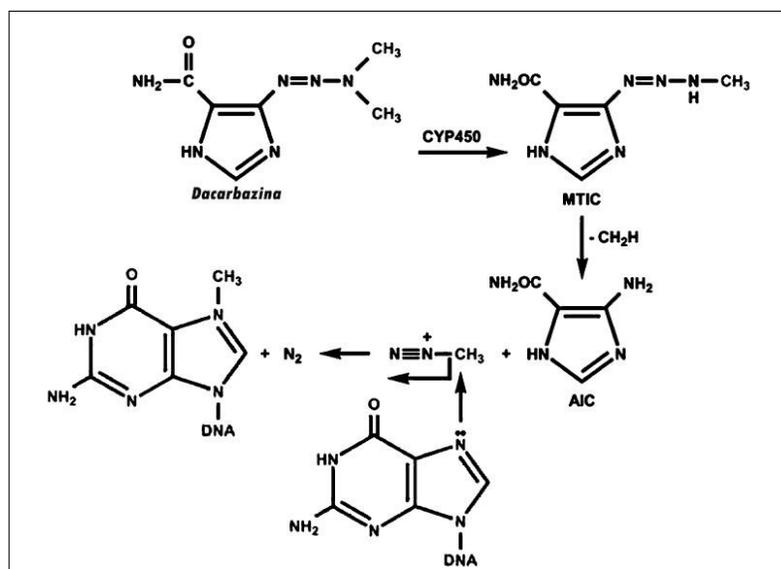
La hipertermia es un tratamiento contra el cáncer en el cual se genera calor en una zona del organismo para inducir la muerte celular, esta terapia se puede administrar de manera externa, intersticial o endoluminal mediante la incidencia de ondas de radiofrecuencia, microondas o ultrasonido (Koch y col., 2005; Huang y col., 2008). En el caso de las AuNPS el calor liberado ante la inducción del efecto RPS y la rápida transferencia del mismo al entorno circundante provocan la muerte de las células tumorales con un mínimo de daño colateral al tejido circundante, lo que se ha llamado terapia fototérmica plasmónica (Zhao-Zing y col., 2011). Un ejemplo de esta terapia se llevó a cabo por un grupo de investigadores asociando nanopartículas de 110 nm de diámetro conjugado con PEG-tiolado para tratar xenoinjertos de cáncer de próstata humanos en ratones, inyectando intravenosamente el sistema AuNPS-PEG y aplicando terapia laser 18hrs después. Obteniendo como resultado la eliminación total de la masa tumoral en el 93% en

los ratones que recibieron el sistema conjugado y terapia láser, en contraposición con la ausencia de efectos en aquellos que recibieron solo terapia láser (Stern y col., 2007).

Todas las propiedades descritas anteriormente muestran que las AuNPs poseen un potencial inmenso no solo para ser utilizadas como nano-transportadores de fármacos antineoplásicos provocar liberación de los mismos de manera selectiva, sino que para convertirse además en un agente activo en la destrucción de células tumorales y generar una terapia que logre una alta eficiencia a través de diversas vías.

#### **1.4 El caso de Dacarbazina**

Dacarbazina (DB) es un fármaco del grupo de los Alquilantes antineoplásicos, es una molécula pequeña y está químicamente diseñada para liberar un ión diazóxido durante su degradación que es capaz de alquilar el ADN celular (ver figura 1.13). Es utilizado para combatir varios tipos de cáncer como Linfoma de Hodking, Melanoma, Carcinoma de Islotes Pancreáticos y Sarcomas, siendo utilizado en conjunto con otros fármacos anticancerígenos en casos más extremos, presentando consumo que aumenta cerca de 12% por año desde el 2004 (Al-Badr y Alodhaib, 2015; Besse y col., 2012). Tiene un comportamiento agresivo y poco selectivo, como todos los Alquilantes, causando daño también a células sanas y ha sido clasificado dentro del grupo de antitumorales ante los cuales no existe un rango de exposición que se considere seguro (Umweltbundesamt, 2003; Bouraoui y col., 2011).

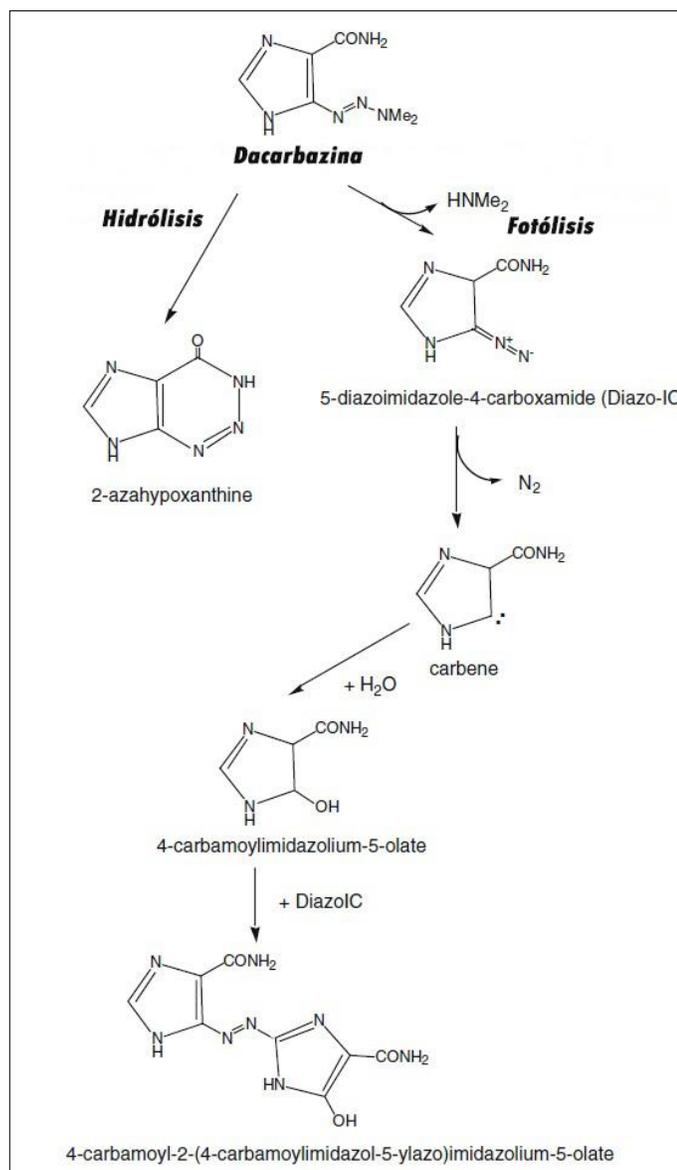


**Figura 1.13:** Mecanismo de metilación del ADN por parte de Dacarbazina (Adaptado de: Pourahmad y col., 2009).

La degradación de DB al interior del cuerpo humano produce especies reactivas de oxígeno que poseen alta toxicidad, lo que se ve reflejado en los efectos secundarios reportados por los pacientes en ensayos clínicos, los cuales son vómitos, náuseas y dolor intravenoso al ser inyectado el fármaco. El dolor se asocia con la producción de peróxido de hidrógeno que termina por generar radicales hidroxilo y superóxido, estas especies radicales tienen el potencial de atacar membranas celulares, organelos, enzimas y cadenas de ADN (Asashi y col., 2002; Pourahmad y col., 2009).

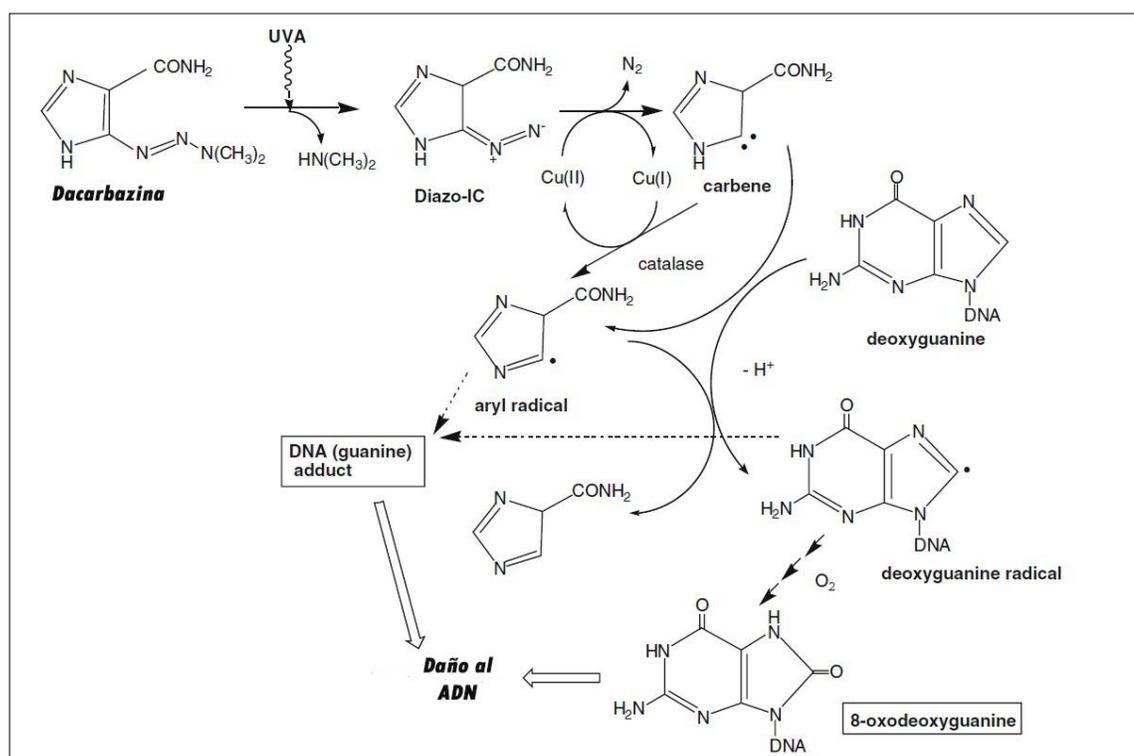
DB es inestable en solución acuosa y comienza a degradarse rápidamente en presencia de la luz del sol (ver figura 1.14), demostrándose que en su fotodegradación se forman los radicales carbeno y arilo, informándose además que dichos radicales están involucrados en el daño del ADN (ver figura 1.15). Se sospecha que estos radicales generados por la

acción de la luz sobre DB también son causantes del dolor experimentado por los pacientes y la incidencia de este fármaco en los efectos carcinogénicos, teratogénicos y mutagénicos que han sido probados sobre diversos organismos eucariotas.



**Figura 1.14:** Degradación de DB por factores ambientales (Adaptado de: Iwamoto y col., 2007).

Esta droga antineoplásica posee una tasa de excreción intacta vía urinaria del 40%, su vida media en el cuerpo es de 5 hrs, además según estimaciones realizadas de acuerdo al consumo en Francia, luego de pasar por procesos de biodegradación en plantas de tratamiento de aguas residuales permanece intacta en un 98,2% generando una concentración de 0,7 ng/L y que luego en cauces de ríos se traduce en de 0,1 ng/L (Iwamoto y col., 2007; Martines y Chignell, 1998; Zhang y col., 2012; Booker y col., 2013).



**Figura 1.15:** Mecanismo propuesto para daño ocasionado al ADN inducido por DB irradiada con luz solar (Adaptado de: Iwamoto y col., 2007).

### **1.5. Propuesta: Sistema Ternario**

Definimos un sistema ternario (nano-complejo) como la interacción entre un CI a través de los grupos funcionales del huésped, expuestos fuera de la matriz, con las AuNPs. Estos sistemas ya han sido reportados con anterioridad y catalogados como estables (Sierpe y col., 2015). DB posee un grupo amido primario que puede interactuar con los átomos superficiales de las nanopartículas producidas mediante un método de suspensión coloidal (Kimling, 2006), debido a que el grupo funcional de interés del fármaco permite una estabilización más favorable en términos energéticos con la nanoesfera de oro que la dispuesta por los grupos estabilizantes citrato utilizados en la síntesis. También posee en su estructura un anillo imidazol de dimensiones y polaridad adecuadas para ingresar dentro de la cavidad hidrofóbica de la macromolécula  $\beta$ CD.

En base a los antecedentes recabados se propone la obtención de un sistema ternario en suspensión coloidal, el cual a partir del encapsulamiento del fármaco dentro de la matriz permitirá limitar su reactividad con respecto al entorno, obtener mayor solubilidad acuosa y evitar su degradación fuera del sitio de acción. Mientras que la asociación con la AuNPs le otorgará mayor especificidad en su actuar, mejor capacidad de permeabilización de las paredes celulares y la oportunidad de liberar el fármaco de manera controlada.

El conjunto de todas las nuevas propiedades otorgadas por la formación del sistema ternario permitirá evitar la liberación del fármaco en el medio ambiente y los daños que su mecanismo de acción puede efectuar, debido a que se espera que la dosis aplicada actúe en su totalidad de manera sitio-específica. Al lograr esta optimización se obtendría un

conjunto de beneficios de distinta índole que provocarían que la terapia con DB fuera más amigable con el medio ambiente, dentro de los cuales se destacan:

- La mayor selectividad otorgada al fármaco, en su actuar dentro del organismo, evitaría la excreción de DB sin metabolizar y disminuiría el ingreso de sus correspondientes metabolitos a los cuerpos de agua, reduciendo su impacto en los ciclos biogeoquímicos y ecosistemas.
- Disminuiría ostensiblemente la interacción del fármaco con células sanas, que no son el objetivo, reduciendo la producción de aberraciones genéticas y toxicidad que a largo plazo pueden ser cruciales en la generación de cánceres y mutaciones indeseadas en los organismos expuestos a su contacto.
- Al ser necesaria menos cantidad de antineoplásico para el tratamiento, reduciría el uso de recursos y la producción de contaminación en su fabricación.
- Disminuiría el gasto de recursos económicos para la remoción de DB en plantas de tratamiento de aguas. Los antineoplásicos necesitan un tratamiento específico que encarece el tratamiento de aguas residuales y la mayoría de los países ni siquiera cuenta con la tecnología para realizarlo (Por ejemplo: Aplicación de Electrolisis, el cual es el método más efectivo).

## **1.6 Hipótesis**

“Las propiedades físico-químicas de Dacarbazina permitirán obtener un compuesto de inclusión estable debido a su interacción con los protones internos de  $\beta$ -Ciclodextrina, dejando expuesto el grupo funcional amido del fármaco. El grupo funcional será capaz de

estabilizar nanoesferas de oro, obteniendo de esta manera un nano-sistema ternario que responderá a la incidencia de irradiación láser con la liberación del fármaco”.

## **1.7 Objetivos**

### **1.7.1 Objetivo general**

“Obtener un nano-sistema ternario estable con el potencial de ser utilizado en sistemas biológicos, reducir la contaminación provocada por su uso y los efectos no deseados sobre los organismos eucariotas”.

### **1.7.2 Objetivos específicos**

- Preparar el compuesto de inclusión  $\beta$ CD/DB en medio acuoso.
- Preparar nanopartículas de oro con características adecuadas para ser utilizadas en sistemas biológicos mediante recubrimiento polimérico.
- Generar y caracterizar un sistema híbrido  $\beta$ CD/DB/Au.
- Comprobar la liberación del fármaco por parte del sistema generado.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Reactivos y solventes

Para llevar a cabo la experimentación durante el desarrollo de la presente investigación se utilizaron reactivos y materiales disponibles comercialmente, sin realizarles modificaciones y manteniéndolos en condiciones de protección óptimas para impedir reacciones, contaminaciones o degradaciones por la interacción con el medio circundante.

En la preparación del compuesto de inclusión se utilizó  $\beta$ -Ciclodextrina hidratada (98%) y Dacarbazina (>99%), proporcionados por la empresa Sigma Aldrich. Como solventes fueron utilizados Agua para cromatografía y Etanol grado analítico marca Merck. Mientras que para la caracterización del compuesto de inclusión mediante  $H^1$ -RMN se utilizó DMSO- $d_6$  (99,8%) marca Sigma Aldrich. En el caso de las mediciones de espectroscopía IR se utilizó Bromuro de Potasio (>99%) para realizar las pastillas.

Luego, en la síntesis de las AuNPs se utilizó Sal Tetracloro Áurica, Citrato Trisódico Dihidratado y como disolvente, Agua de grado Mili Q; Para la formación del sistema ternario se utilizó como coestabilizante de las AuNPs PEG Tiolado (HS-PEG5000-OMe) obtenido a través de la empresa Jenkem Technology desde Beijing, China y para realizar los ensayos de irradiación láser se utilizó como fase orgánica Hexano (99,9%) proporcionado por Merck. Para la realización de las mediciones TEM se utilizó Isopropanol (>99,7%) de la compañía Sigma Aldrich.

## 2.2 Metodología

### 2.2.1 Síntesis de Compuesto de Inclusión

Se masan 0,400 gr de  $\beta$ -CD (correspondientes a  $3,52 \times 10^{-4}$  mol) y se depositan en un cristalizador de 20 mL, a la cual se le han recubierto previamente las paredes con papel aluminio. Para luego añadir una cantidad de 16,4 mL correspondientes a una solución Etanol-Agua con una razón de volumen de 1:2. Se introduce un agitador magnético, se cubre el cristalizador con Parafilm® y a esta cubierta se le realizan algunos agujeros mediante una aguja esterilizada. Una vez preparado, se lleva el sistema descrito a una placa calefactora que se encuentra a 30 °C, se deja a una agitación constante de 400 rpm durante una hora.

Paralelamente se masan 0,096 gr de Dacarbazina (correspondientes a  $5,28 \times 10^{-4}$  mol) y se depositan rápidamente en un Matraz Erlenmeyer de 100 mL, al que previamente se le han cubierto las paredes con papel aluminio. Luego se agrega una cantidad de 16,4 mL correspondientes a una solución Etanol-Agua con una razón de volumen 2:1. Se deposita un agitador magnético, se tapa la boquilla del matraz con Parafilm® realizando algunos agujeros con una aguja esterilizada. Llevando posteriormente el sistema descrito a una placa calefactora que se encuentra a 25 °C, manteniendo con una agitación constante de 400 rpm y suave durante una hora.

Una vez que ambos compuestos se encuentran solubilizados por completo, se toma la solución que contiene la Dacarbazina y se agrega pausadamente a él cristalizador que contiene la solución de  $\beta$ -CD mientras esta se agita a una velocidad de 500 rpm. Mezcladas

ambas soluciones, la nueva solución debe permanecer en agitación constante durante una hora y media.

Finalmente se toma el cristalizador y se deja en reposo de 6 a 8 semanas en una campana de extracción. Luego de que el solvente se haya reducido aproximadamente a un 15% de su cantidad original se pueden retirar los cristales, los cuales se secan mediante un filtro de vacío en un Kitasato con embudo Büchner y papel filtro, para finalmente ser liofilizados durante 48 hrs en una línea de vacío para eliminar cualquier resto de líquido ocluido en los cristales.

### **2.2.2. Docking molecular del compuesto de inclusión**

El Docking molecular se realizó con el software Autodock Vina 1.1.2 (2014). Utilizando  $\beta$ -CD como receptor y DB como ligando. Las medidas de la cuadrícula de modelación fueron 40x40x40 Angstrom para cubrir toda la superficie de  $\beta$ -CD y se dejó al programa calcular las posiciones más favorables de complejación para el sistema en solución acuosa, este método ya ha sido ampliamente utilizado en modelación de este tipo de sistemas.

### **2.2.3 Síntesis de AuNPs**

El método utilizado para sintetizar las AuNPs es basado en otro método reportado, que permite obtener nanopartículas en solución con pH cercano a 7 (Turkevic y Col, 1953). Se maza 0,4989 gr de Sal Tetracloro Áurica ( $1,267 \cdot 10^{-3}$  mol) y se disuelven en 30 mL de agua Mili-Q, generando una concentración formal de 0,0422 M, esta solución será la “Solución Stock” para las síntesis realizadas posteriormente, Cuyo protocolo de síntesis se presenta a continuación:

- a) De la Solución Stock se toman 2,37 mL y se diluyen a 100mL en un matraz de aforo, introduciendo un agitador magnético dentro.
- b) La solución, que posee una concentración 1,0 mM, se introduce en un balón de dos bocas, el cual es puesto en una placa calefactora con ambiente aislante para evitar variaciones de temperatura. Una vez aislado el sistema se conecta la columna de refrigerante (sistema de reflujo) y se termina de aislar cubriéndolo con papel aluminio.
- c) Luego se enciende la agitación, el sistema de reflujo y la placa calefactora, llevando la solución hasta una temperatura de 186°C. Una vez alcanzada la temperatura, esta debe permanecer constante a lo menos cinco minutos.
- d) Habiendo mizado previamente 0,1141 gr de Citrato ( $3,88 \cdot 10^{-4}$  mol), se disuelven en un matraz de aforo de 10 mL. Obteniendo una concentración formal de citrato igual a 38,8 mM. Una vez lista la solución de citrato, esta se calienta hasta 60°C.
- e) Una vez pasados los cinco minutos a temperatura constante para la solución de sal de oro en el balón, se agrega cuidadosamente la solución de citrato a través de una jeringa y se deja a reflujo constante el sistema durante treinta minutos.
- f) Una vez pasados los treinta minutos se debe apagar rápidamente la placa calefactora y dejar que baje la temperatura manteniendo la agitación. Teniendo en todo momento aislado de la luz el contenido del balón y abriendo una de las boquillas para dejar escapar el dióxido de carbono generado.

g) Finalmente, cuando el sistema llega a temperatura ambiente, se observa una solución de color Rojiza, a la cual se le debe medir la absorbancia en un espectrofotómetro UV-vis para comprobar la formación de AuNPs.

#### **2.2.4 Preparación de Sistema Ternario**

a) Se masan 40mg del CI dentro de un tubo Eppendorf de 2 mL, con una micropipeta analítica se llena de agua para cromatografía. Se cierra el Eppendorf y se sónica durante 5 min, para posteriormente ser agitado vigorosamente hasta la completa disolución del CI.

b) Paralelamente se tienen 2,5 mL de AuNPs con una concentración de 8,83 mM en agitación constante a una velocidad de 500 rpm dentro de un tubo Falcon de 14 mL, que ha sido cubierto completamente con papel aluminio. Luego, se procede a agregar la solución con el compuesto de inclusión disuelto para producir el intercambio de estabilizante Citrato por CI. Se agita la solución durante 10 minutos y posteriormente se le agregan 0,5 mL de una solución con PEG  $4,2 \cdot 10^{-4}$  mM, para posteriormente dejar la solución en agitación durante una hora.

c) Durante el tiempo de intercambio se prepara el medio para realizar una diálisis que facilite la salida del ion citrato del medio acuoso en donde se encuentra el sistema ternario. Para ello se utiliza una membrana de intercambio de celulosa marca Spectrum™ de forma tubular, con un tamaño de poro de 5000 d, en donde se introduce la solución preparada con anterioridad. Luego se toma un Vaso de precipitado de 2 L y se llena con Agua, agregando una cantidad de citrato correspondiente al 8% de la concentración que se

encontrará en el interior de la membrana que contendrá la solución de intercambio, generando la salida del citrato mediante difusión.

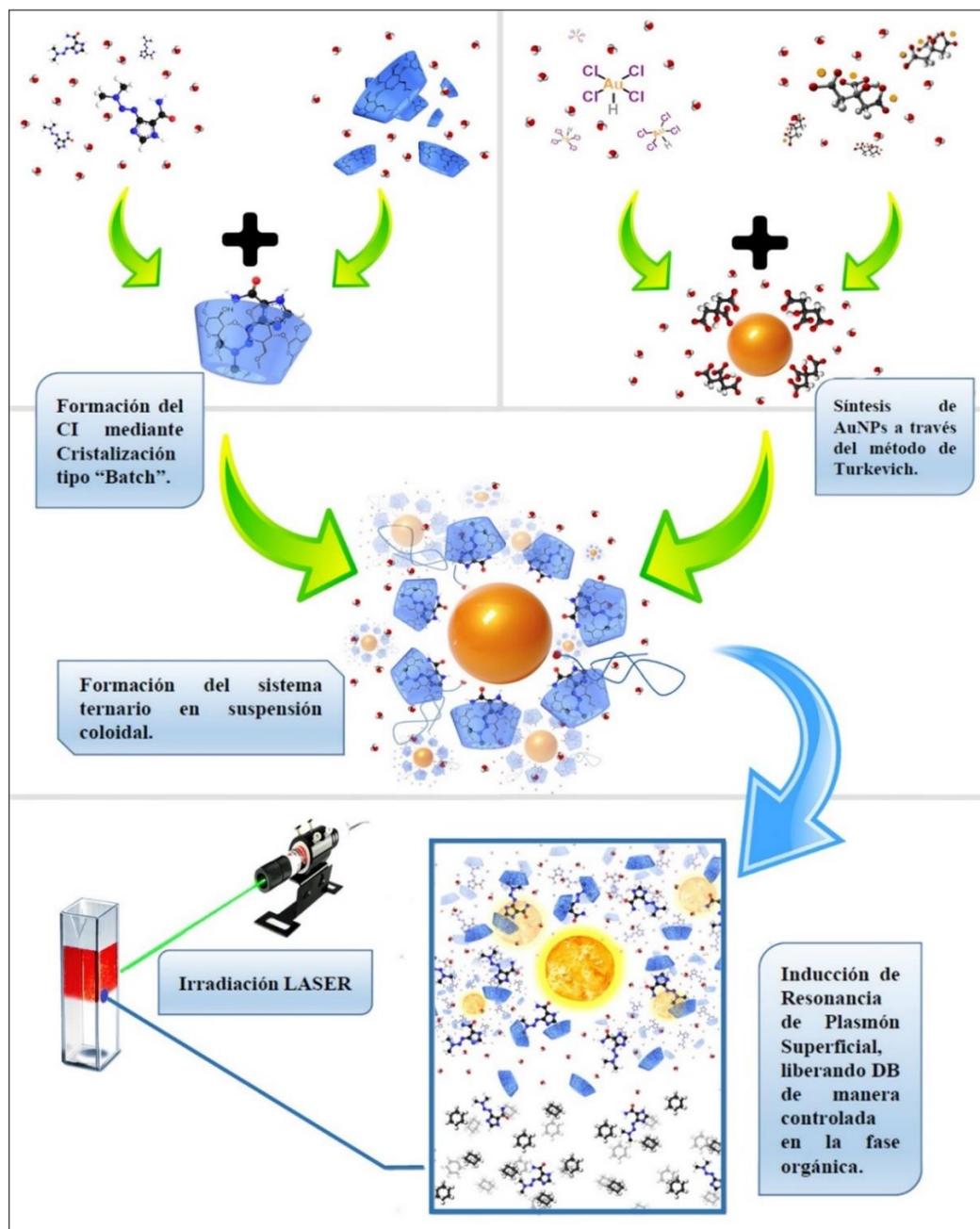
d) Ahora se toma la membrana y se procede a agregar dentro de ella la solución obtenida a partir de la mezcla de CI-AuNPs-PEG, cerrándola cuidadosamente y depositándola en el medio de diálisis que se encuentra bajo una agitación constante de 500 rpm. La diálisis se realiza durante 48 hrs y se cambia el “líquido de Diálisis” cada 12 hrs, disminuyendo su concentración de citrato siempre a la mitad para luego llegar a cero.

e) Una vez terminado el proceso de diálisis, se retiran de la membrana los 5 mL de solución CI-AuNPs-PEG depositándolos en tubos Eppendorf. Las muestras en los Eppendorf son centrifugadas a 3200 rpm para luego retirarles 800  $\mu$ L de sobrenadante y re-suspender rápidamente los 200  $\mu$ L restantes hasta 1mL con agua para cromatografía, mientras que el sobrenadante es retirado para examinar si existe pérdida de fármaco.

### **2.2.5. Irradiación Laser**

Preparando previamente una habitación para la experimentación y medición totalmente fuera de la influencia de cualquier tipo de contaminación lumínica que pueda afectar los ensayos, se toma una cubeta de cuarzo, de volumen total 700  $\mu$ L, se le agregan 300  $\mu$ L de Hexano y sobre él 300  $\mu$ L de la solución obtenida a partir del proceso de formación del sistema ternario (fase acuosa). Posteriormente se procedió a excitar la fase acuosa mediante la incidencia de un haz laser de longitud de onda de 532 nm durante diferentes intervalos de tiempo (15, 30, 45 y 60 min), midiendo mediante espectroscopia UV-vis la absorbancia asociada al fármaco en el medio orgánico entre los intervalos, con el objeto

de cuantificar que cantidad de DB ha sido capaz de liberar el sistema ternario, extrapolando esto a la eficiencia de liberación del sistema.



**Figura 2.1:** Resumen de la metodología de trabajo con los pasos más importantes para la investigación.

### 2.3. Equipos para la caracterización de las muestras

El análisis de cristalinidad para los sistemas  $\beta$ CD, DB, mezcla física DB- $\beta$ CD y compuesto de inclusión (CI) se realizó por la técnica de difracción de rayos X de polvo (DRXP) en un rango de  $2^\circ < 2\theta < 80^\circ$ , mediante un difractómetro Siemens D-5000 con una radiación Cu-K $\alpha$  (40 kV, 30 mA) y un monocromador de grafito ( $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ ). Para la indexación de las reflexiones obtenidas en cada difractograma se utilizó el programa PowderX creado por Chen Dong del Instituto de Física de la Academia de Ciencias de China en 1999.

La Resonancia Magnética Nuclear de protones ( $^1\text{H}$  y ROESY) en solución de  $\beta$ CD, DB y CI se analizó mediante un equipo Bruker Advance 400 Mhz a  $30^\circ\text{C}$ , siendo TMS la referencia interna y DMSO-d<sub>6</sub> el disolvente de las muestras, mientras que la medición del CI con la técnica ROESY se realizó usando el método de gradientes seleccionado de campo pulsado. Luego, para calcular la estequiometría del CI los espectros se analizaron y trataron con el programa MestRec.

El cálculo de la constante de estabilidad del CI, el coeficiente de extinción molar de DB (tanto en fase acuosa como orgánica) y la cuantificación de la liberación de fármaco en los ensayos de irradiación laser fueron medidos mediante espectrofotometría UV-Vis utilizando un equipo Perkin Elmer modelo Lambda 25 UV con cubetas de cuarzo de 1 cm de diámetro en un rango entre 200 y 800 nm. De la misma manera fue utilizado dicho equipo para la detección de los plasmones para las muestras de nanopartículas sintetizadas.

AuNPs y el Sistema Ternario fueron caracterizados por TEM, usando un equipo JEOL JEM 1200 EX con filamento de Tungsteno, operado a bajas presiones ( $1 \times 10^{-5}$  Pa), con un voltaje de aceleración de 80 kV. Se prepararon las muestras depositando 10  $\mu$ L de solución sobre una rejilla de cobre con película de Formvar continua y fueron secadas lentamente mediante la exposición ante una lámpara IR.

Las Imágenes SEM de los cristales de DB y CI 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. Por otra parte, los espectros IR de las muestras de DB y CI fueron obtenidos usando un equipo Perkin Elmer 2000 con pastillas de KBr.

Espectros Raman de DB, CI y CI-AuNPs-PEG se obtuvieron de la medición directa de las muestras en estado sólido y acuoso, usando un equipo Renishaw Ramanscope 1000, excitado con un láser He-Ne de 632,8 nm.

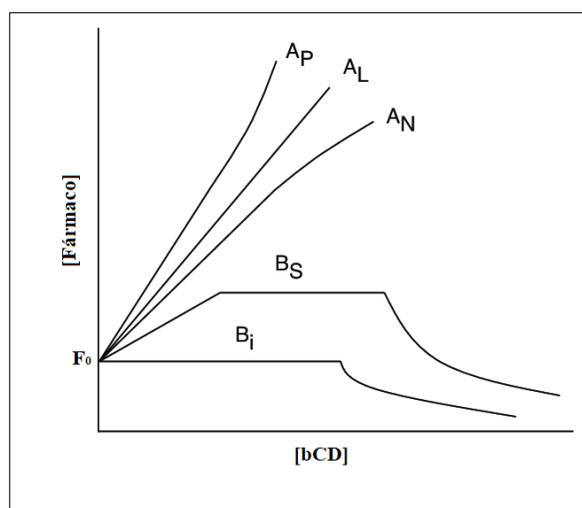
Con el fin de datar las variaciones del diámetro hidrodinámico, la dispersión de tamaño y la carga superficial de los sistemas AuNPs y CI-AuNPs-PEG se utilizó el equipo Malvern ZetaSizer Nano ZS, con una celda capilar con electrodos de oro. El Laser utilizado en los ensayos de irradiación es de la marca Power Technology Inc., con una longitud de onda de 532 nm, con un diámetro de haz de 1 mm y 45 mW de potencia.

Finalmente, para medir la variación del tamaño en el tiempo del sistema ternario se utilizó un equipo NanoSight con tecnología Nano Tracking Analysis.

## 2.4. Protocolos para el análisis de las muestras

### 2.4.1. Estudio de constante de asociación y estequiometría del CI

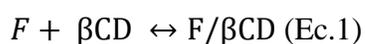
Se preparó una batería de ensayos según los parámetros establecidos por Higuchi y Connors, los cuales consisten en adicionar dentro de frascos ámbar una cantidad constante y en exceso de DB (en este caso fueron 8,22 mg) para luego agregar soluciones acuosas con diferentes concentraciones de  $\beta$ CD en orden ascendente. Se mantuvieron en agitación durante 48 hrs a 400 rpm, con una temperatura constante de 25°C y luego se filtraron con una membrana de celulosa para eliminar los sólidos no disueltos. Finalmente se miden las soluciones mediante espectroscopia UV-vis y se establece la relación entre concentración de  $\beta$ CD agregada y cantidad de DB solubilizada, comparándose con los diagramas de fase establecidos por bibliografía (figura contigua), los cuales entregan información relevante sobre el cálculo de la constante y el tipo de inclusión que se da en cada caso.



**Figura 2.2:** Tipos de diagramas de solubilidad de fase según Higuchi y Connors (Higuchi y Connors, 1975).

Los diagramas de tipo  $A_L$  se forman cuando el complejo es soluble en los medios acuosos y la formación de estos posee una relación molar 1:1 entre fármaco y ciclodextrina, el tipo  $A_n$  posee una desviación negativa de la pendiente y sugiere la formación de complejos de orden superior respecto de fármaco, como por ejemplo un complejo 2:1. A diferencia del anterior los diagramas tipo  $A_p$  poseen una desviación positiva respecto a la pendiente e indican que existe la formación de complejos de orden superior con respecto a ciclodextrina, dentro de los cuales la relación molar más común es 1:2. Los diagramas de tipo B se observan cuando el complejo posee una solubilidad limitada en el medio, donde en el caso de  $B_1$  el complejo posee una solubilidad limitada y en  $B_2$  el complejo es insoluble.

Luego de observar la curva obtenida se debe relacionar con la cinética que representa, y con dicha cinética pueden desprenderse las ecuaciones para calcular la constante de asociación de cada tipo de complejación molecular. Por ejemplo, para una cinética de complejación de primer orden con respecto al fármaco (F) y a  $\beta$ -CD el equilibrio es:



Siendo entonces la manera de calcular su constante de asociación:

$$K_{a1:1} = \frac{S}{F_0(1-S)} \text{ (Ec.2)}$$

Donde “S” es la pendiente de la gráfica realizada y  $F_0$  es la concentración de fármaco en solución en ausencia de  $\beta$ CD (Dong-Hyun Kim y Col, 2019).

#### **2.4.2. Determinación de la capacidad de Carga del sistema**

Definimos “capacidad de Carga” como la cantidad de fármaco límite que puede transportar el sistema ternario sintetizado, entonces, todo el fármaco que se detecta en el sobrenadante obtenido en el último paso de la síntesis del sistema ternario se considera fármaco en exceso.

De acuerdo a lo anterior, se toman los 800  $\mu$ L de sobrenadante y se les realiza una medición de espectroscopia UV-vis para detectar el plasmón característico de DB a 235 nm, tomando el máximo de absorción y transformando esta magnitud a masa mediante la ley de Lambert-Beer.

#### **2.4.3. Medición de DLS y Potencial Z**

La técnica Dispersión de La Luz Dinámica (DLS: Dynamic Light Scattering) permite saber el perfil de distribución de tamaños de partículas en una suspensión coloidal, mientras que la técnica Potencial Z establece el potencial eléctrico que existe en la superficie de la partícula, es decir, su carga. Ambas técnicas son complementarias y permiten establecer como varía el entorno de una partícula, estableciendo como se transforma su superficie mediante cambios en la estabilización y la interacción con estos.

El equipo utilizado es capaz de medir DLS y Potencial Z de manera simultánea en cada muestra y por triplicado. Para esto se tomó una alícuota de 25  $\mu\text{L}$  de muestra, diluyéndose en 975  $\mu\text{L}$  de agua Mili-Q y se colocó cada dilución en una celda capilar para posteriormente medirse en el equipo. Las muestras medidas corresponden a AuNPs, AuNPs estabilizadas solo con CI y finalmente Sistema Ternario, para luego comparar las variaciones en el radio hidrodinámico y la carga superficial.

#### **2.4.4. Ensayos de Irradiación láser del Sistema Ternario**

Se tomó la solución obtenida a partir del proceso de diálisis para realizar directamente los ensayos de irradiación láser. Con una cubeta de cuarzo de 700  $\mu\text{L}$  de llenado se genera un sistema de simulación entre una fase acuosa (que representa la sangre) y una fase orgánica (que representa las células), agregando 300  $\mu\text{L}$  de Hexano y sobre este 300  $\mu\text{L}$  de la solución stock del sistema ternario preparado.

Luego se irradia la fase acuosa con el láser por diferentes tiempos, en el tiempo entre intervalos se mide la absorbancia de DB en hexano desde la misma cubeta, contrarrestando las mediciones con los ensayos hechos a partir de la disolución de 4,22 mg en 1 mL de hexano. El máximo de absorbancia obtenido en el plasmón característico de DB para el medio orgánico en cada ensayo fue convertido en masa mediante el uso de la ley de Lambert- Beer, previo cálculo del coeficiente de extinción molar ( $\epsilon = 9,47 \text{ mM}\cdot\text{cm}^{-1}$  a 235 nm). Dicha masa luego fue transformada en porcentajes para establecer la eficiencia de liberación de fármaco por parte del sistema.

#### **2.4.5. Estabilidad del Sistema ternario en el tiempo**

La técnica de Análisis de rastreo de Nanopartículas permite la medición de los tamaños y poblaciones de nanopartículas a través de la incidencia de un láser sobre una muestra líquida en movimiento, cuya dispersión permite ver las partículas con un microscopio que posee montada una cámara de video, el video es analizado por un software que ve muchas partículas al mismo tiempo aplicando la ecuación de Stokes-Einstein, calculando así sus diámetros hidrodinámicos. Esta técnica fue realizada gracias a la utilización del equipo NanoSight.

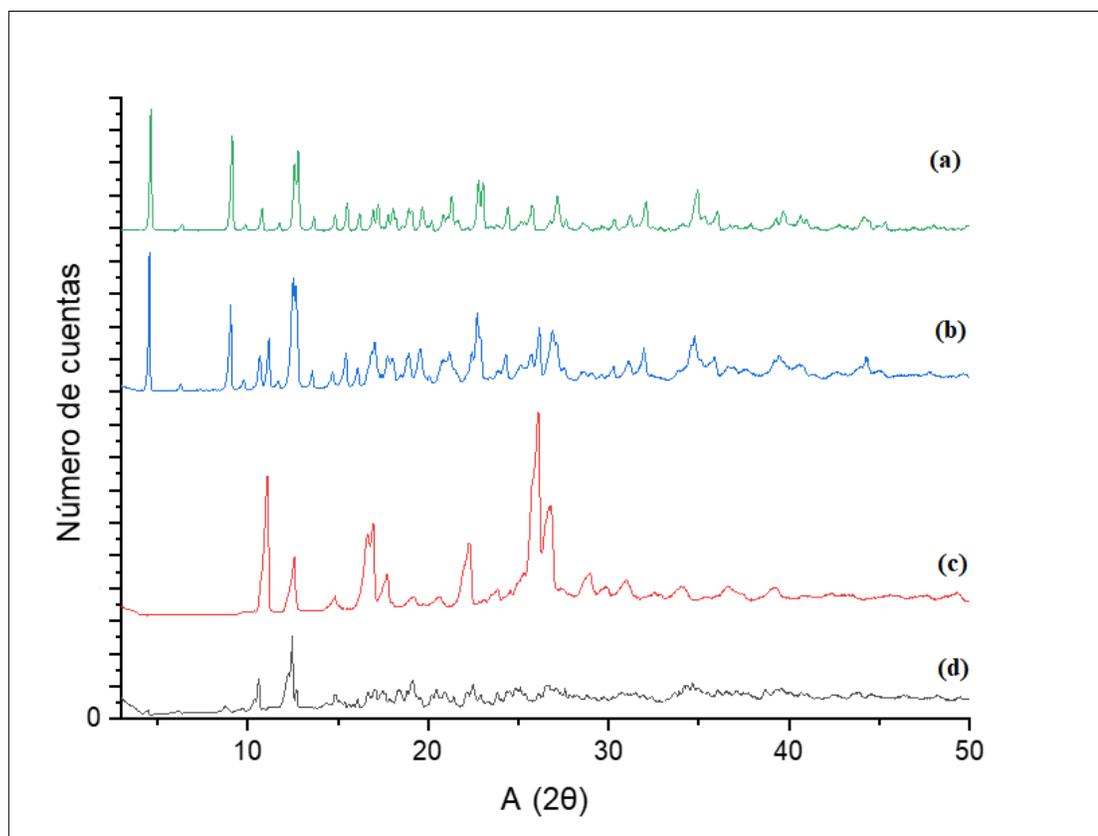
Se tomaron muestras de Sistema Ternario sintetizadas bajo el protocolo descrito en la sección 2.2.4. 387 días atrás, con un grupo mantenidas bajo refrigeración a 4°C y el otro grupo siendo mantenidas la misma cantidad de días, pero a temperatura ambiente, para comparar ambas muestras con AuNPs sintetizadas recientemente con el fin de establecer si el sistema es suficientemente estable en el tiempo y mantiene sus propiedades. Para esto se toma 1µL de cada muestra y se diluye veinte veces, para luego inyectar la muestra en el equipo NanoSight y obtener las poblaciones de tamaños que se encuentran presentes en solución, realizando cada ensayo por triplicado.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1.1. Resolución de Fase cristalina del CI

La Difracción de Rayos X de Polvo cristalino (DRX) es una técnica muy efectiva y no invasiva para la identificación de muestras cristalinas o mezclas de cristales. Esta se basa en la inducción de un haz de radiación cuya longitud de onda es cercana a la distancia interatómica. Entonces, al irradiar un cristal se generan patrones de difracción (llamados trazas difractométricas) que son característicos exclusivamente para ese cristal, representando una “huella dactilar” de cada especie química.

Las diferencias estructurales se reflejan cambios de intensidad, aparición y desaparición de señales en las trazas difractométricas como consecuencia de la formación de una “celda unitaria” diferente, esto quiere decir que la unión de átomos básica que se repite una y otra vez en la estructura de un cristal ha cambiado. Como consecuencia del fenómeno anterior podemos intuir la formación de un CI cuando observamos variaciones en el patrón difractométrico de una muestra, para asegurarnos de esto se debe realizar una minuciosa comparación de los patrones difractométricos del fármaco, la matriz, una mezcla física de ambos y el supuesto CI formado (Caira 2001; Dang 2011)

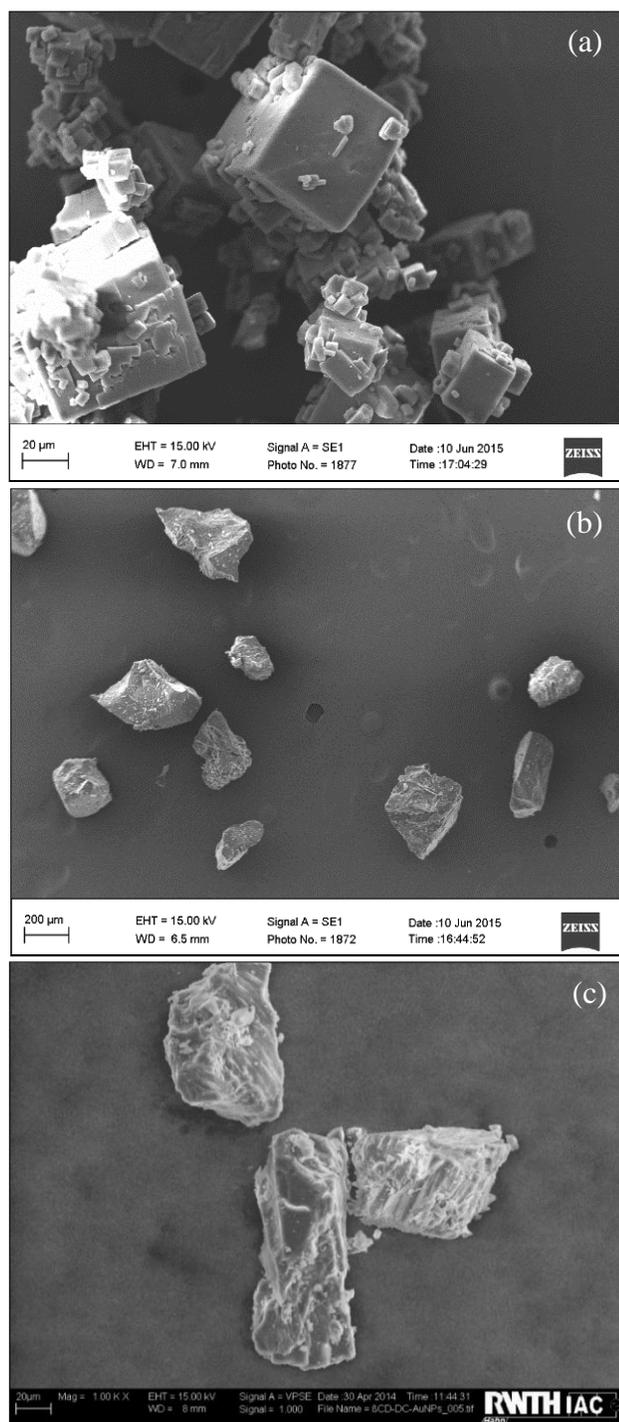


**Figura 3.1:** Difractogramas de polvo cristalino de: (a)  $\beta$ CD, (b) Mezcla física de  $\beta$ CD y DB, (c) DB y (d) CI.

En la figura 3.1 se pueden observar las diferentes trazas difractométricas que se deben comparar para afirmar la conformación de una nueva estructura, en el caso del patrón de  $\beta$ CD se pueden observar los picos característicos asociados a su conformación monoclinica tipo P, así mismo como DB posee sus picos característicos asociados a una estructura monoclinica de un grupo estructural  $P2_{1/n}$  (Bei y col, 2010), la mezcla física conserva señales de ambos tipos de cristales, pero la intensidad de estas varía en la mayoría de los casos. Luego, al indexar el difractograma obtenido para el CI se observa

que no posee estructura cristalina, es más bien amorfo, debido a que la intensidad de los picos de difracción presentados por la muestra no es suficientemente alta, ni son definidos, y por lo cual, muchas de las señales reportadas se entremezclan con el ruido. En este caso puede asegurarse la formación de un nuevo tipo de estructura, pero no su tipo de empaquetamiento ni su celda unitaria, este razonamiento debe ser apoyado por otras técnicas que permitan reafirmar o bien refutar este resultado.

Como medida para comprobar si lo reportado por el análisis DRX es correcto, se realizó un análisis mediante microscopía SEM a modo comparativo entre una muestra de DB y otra de CI, este análisis visual (que se puede observar en la fig. 3.2) confirma que mientras los cristales de DB poseen una clara y definida estructura, el producto obtenido para el CI es bastante amorfo. Esto último fue confirmado nuevamente mediante la realización de un análisis por microscopía FE-SEM, técnica mucho más potente y que entrega mayor definición, que permitió descartar que la muestra fuese una aglomeración de cristales más pequeños.



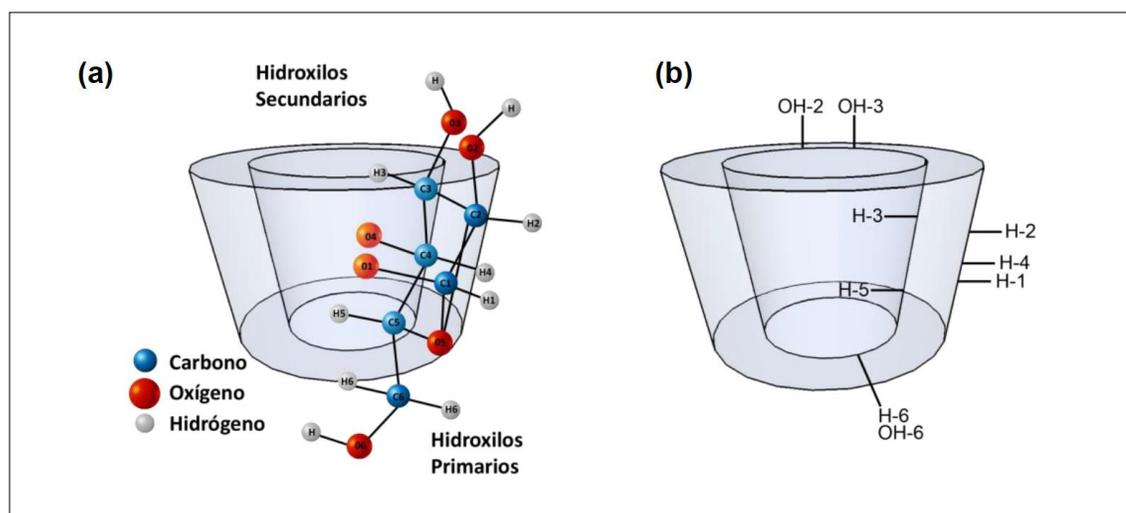
**Figura 3.2:** SEM de (a) DB y (b) CI, (c) FE-SEM de CI.

### 3.1.2. Estudio del CI mediante $H^1$ -RMN

La Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Protones ( $H^1$ -RMN) es quizás la técnica más utilizada en la identificación de formación de especies acomplejadas, su uso para la confirmación de la formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas es casi un dogma de la química supramolecular, ya que entrega información muy precisa sobre la manera en que interactúan la matriz y el huésped. El fundamento del funcionamiento de esta técnica tiene origen en la respuesta que poseen los protones frente a la incidencia de un campo magnético. Un protón al tener un número masico impar posee un spin nuclear y al girar sobre sí mismo se comporta como un imán, por lo que al incidir sobre él un campo magnético ocurre un cambio en su orientación y dicho cambio se puede medir como una variación en el entorno magnético (Singh, 2010).

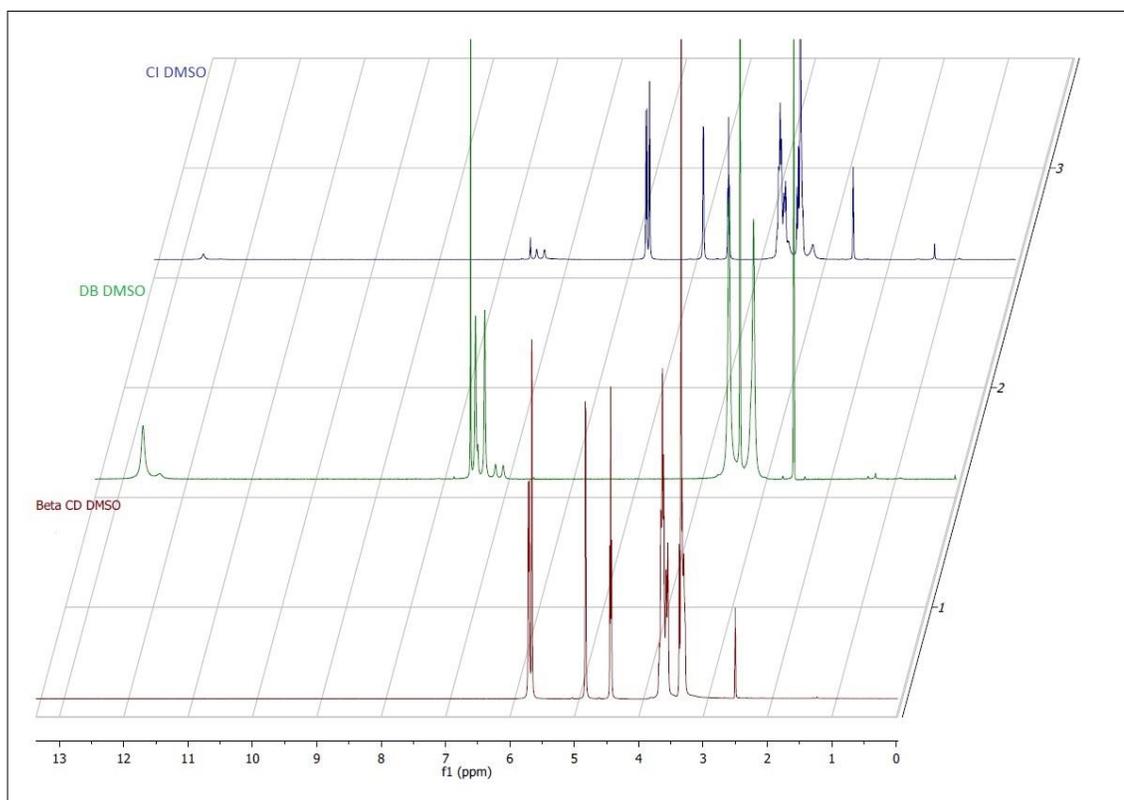
De la misma manera, cuando un protón tiene en sus cercanías otros protones, estos también interactúan entre si generando influencia de momento magnético, lo que produce corrimientos de las señales en los espectros  $H^1$ -RMN y esos corrimientos son los que en este caso nos permiten establecer la formación de un compuesto de inclusión.  $\beta$ CD posee protones en su cavidad interna (específicamente los protones  $H_3$ ,  $H_5$  y  $H_6$ ), por lo que cuando una molécula ingresa en dicha cavidad (huésped) produce un cambio en el entorno magnético de estos protones, reflejándose en una variación de intensidad y ubicación en el espectro de las señales características de estos protones, produciéndose el mismo efecto en las señales asociadas a los protones del huésped. Otros grupos funcionales de  $\beta$ CD que se ven afectados por estas interacciones generadas a partir de inclusiones son los hidroxilos primarios que se ubican en la parte exterior de la apertura más angosta del

macrociclo y los hidroxilos secundarios que se ubican en la parte exterior de la apertura más grande. A diferencia de los grupos funcionales anteriores, los protones  $H_1$ ,  $H_2$  y  $H_4$  cuando ocurre el fenómeno de la inclusión sólo presentan interacciones que son reflejo de otras ciclodextrinas en su entorno próximo (Szejtli, 1998; Uekama y col, 1998).



**Figura. 3.3:** Esquemas de tipo balde de  $\beta$ CD: (a) representación del esqueleto atómico del grupo piranosa y (b) asignación de protones y su orientación (Guerrero y col, 2009).

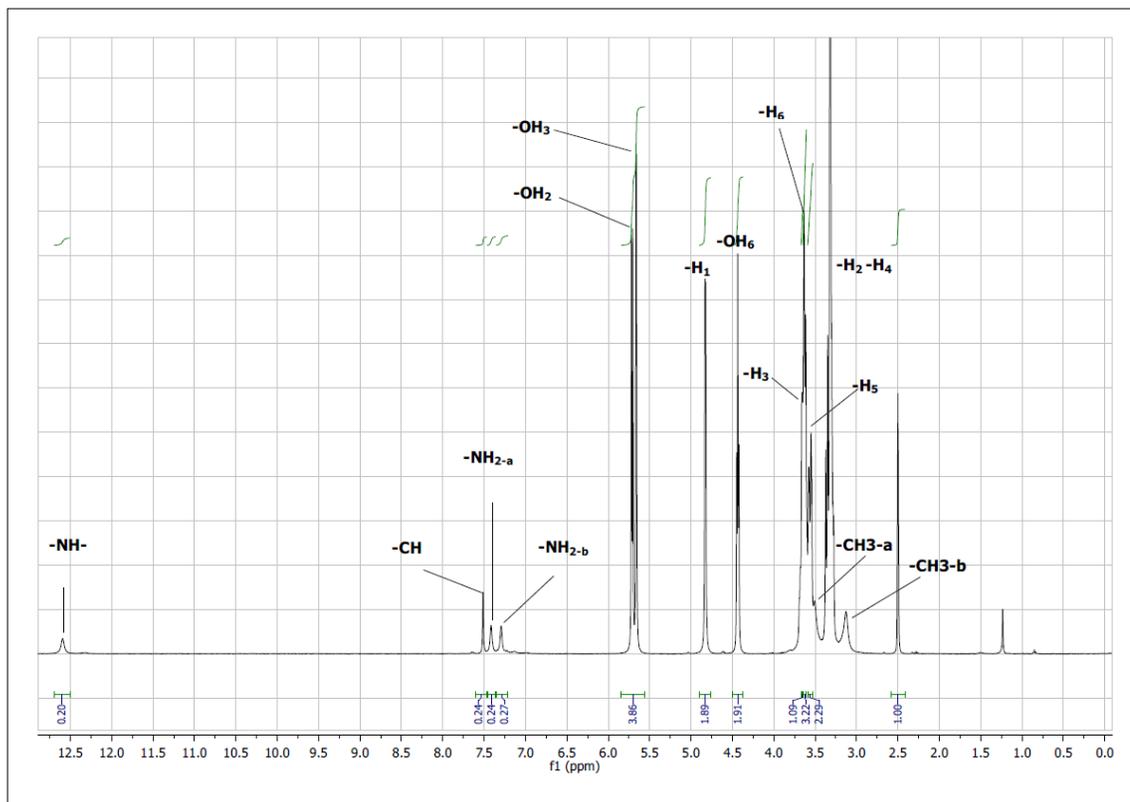
Entonces, a través de esta técnica se pretende evaluar la formación del compuesto de inclusión entre la matriz  $\beta$ CD y el huésped DB. En la Figura 3.4 se pueden observar los espectros superpuestos obtenidos para CI, DB y  $\beta$ CD, reconociéndose las señales características de las especies químicas individuales en el espectro obtenido para CI, pero con una variación apreciable en las intensidades.



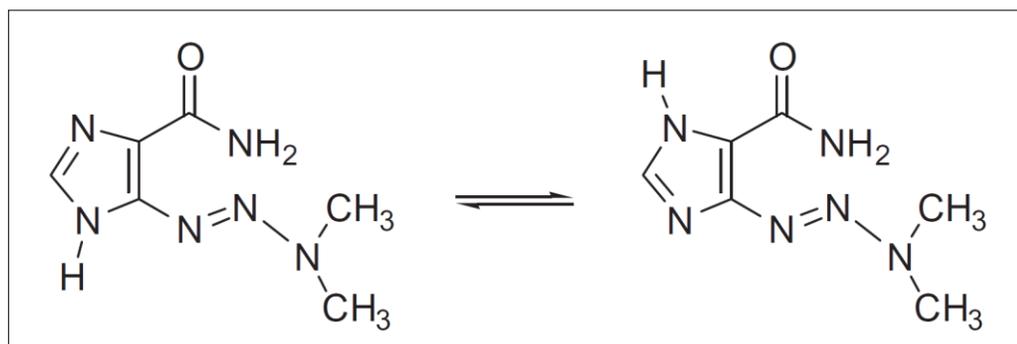
**Figura. 3.4:** Desde arriba hacia abajo: Espectros  $H^1$ -RMN de CI, DB y  $\beta$ CD realizados en DMSO.

Se realiza entonces un análisis comparativo más exhaustivo del espectro obtenido para el CI, tabulando e integrado las señales (Fig. 3.5), para luego evaluar los corrimientos químicos de los grupos funcionales de interés con respecto a los espectros de las especies libres. Se puede ver en la tabla 3.1 que efectivamente existen desplazamientos químicos importantes en los protones de DB, habiendo en este caso desplazamientos a campos más altos para todos los protones de la molécula implicando un mayor apantallamiento, lo que podría indicar que DB está completamente dentro de  $\beta$ CD. Mientras que los protones internos de  $\beta$ CD se desplazan todos hacia campos más bajos indicando que hay grupos

más electronegativos cerca y los grupos hidroxilo hacia campos más altos, lo que muestra nuevamente mayor apantallamiento, confirmando la complejación de las dos especies.



**Figura. 3.5:** Espectro obtenido para el CI formado con sus señales tabuladas e integradas.



**Figura. 3.6:** Estructuras tautoméricas de DB que se dan en solución a pH neutro.

**Tabla 3.1:** Corrimientos químicos observados en  $H^1$ -RMN para el CI con respecto a protones de  $\beta$ CD y DB.

H de $\beta$ CD	$\delta$ $\beta$ CD (ppm)	$\delta$ $\beta$ CD en CI (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\delta$ DB en CI (ppm)	$\delta$ DB (ppm)	H de DB
-H <sub>3</sub>	3,648	3,657	0,009	- 0,026	12,591	12,617	-N-H
-H <sub>5</sub>	3,555	3,561	0,006	- 0,014	3,504	3,518	-CH <sub>3a</sub>
-H <sub>6</sub>	3,617	3,623	0,006	- 0,005	3,126	3,131	-CH <sub>3b</sub>
-OH <sub>2</sub>	5,735	5,711	- 0,024	- 0,014	7,513	7,527	-CH
-OH <sub>3</sub>	5,680	5,662	- 0,010	- 0,035	7,416	7,451	-NH <sub>2a</sub>
-OH <sub>6</sub>	4,479	4,436	- 0,043	- 0,013	7,294	7,307	-NH <sub>2b</sub>

Otro aspecto que permite dilucidar el análisis  $H^1$ -RMN es la estimación de la estequiometría de un CI (Rodríguez-Llamanares, 2007), esto se logra a través de la comparación de las integrales de las señales de los protones más estables de la matriz y el huésped (es decir, que no se vean afectadas por estructuras tautoméricas que varíen su presencia). En este caso se ha tomado la integral del protón H<sub>1</sub> de  $\beta$ CD y el protón NH<sub>b</sub> para saber la relación estequiométrica en el CI, otorgando una relación 1:1 (Anexos: Figura 6.1).

### 3.1.3. Estequiometría y constante de asociación

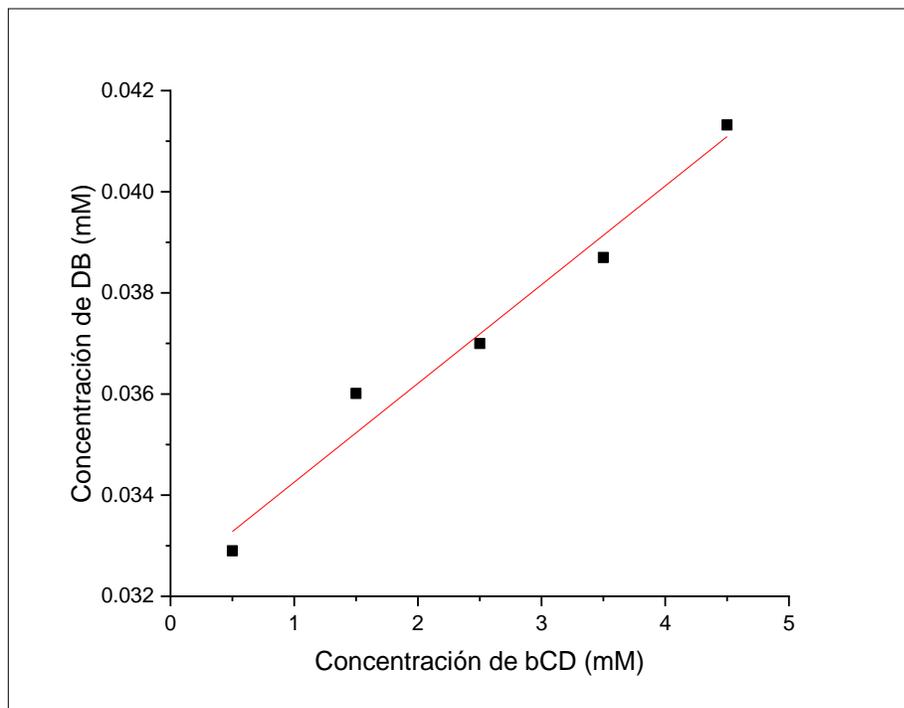
Para conocer la estabilidad y la cinética de formación del CI se utilizó el método de solubilidad de fases descrito previamente en la metodología. La base teórica de estos ensayos se fundamenta en el hecho de que existen propiedades fisicoquímicas del fármaco y  $\beta$ CD en estado aislado que cambian cuando se forma un CI, entonces, la observación y

cuantificación de esos cambios permite obtener un valor numérico para la Constante de Asociación ( $K_a$ ).

Un aspecto importante dentro de las propiedades fisicoquímicas de un fármaco que la inclusión en  $\beta$ CD puede mejorar es la solubilidad, y para fármacos pobremente solubles como DB esto puede hacer la diferencia de manera positiva en su actuar en el organismo. Precisamente para esta determinación se sigue la metodología informada por Higuchi y Connors (Higuchi y Connors, 1975) que relaciona el aumento de la solubilidad del fármaco a medida que aumenta la concentración de  $\beta$ CD en solución, midiendo esto a través de espectroscopia UV-vis, habiendo obtenido previamente el coeficiente de extinción molar en medio acuoso para DB (ver Anexos: Tabla 6.2 y Figura 6.4). Luego de obtener el diagrama (ver figura 3.7), se analiza a qué tipo de cinética de formación corresponde comparándola con la fig. 2.1, estableciendo que corresponde a un diagrama tipo  $A_L$ , sugiriendo que se trata de un compuesto de inclusión de estequiometría 1:1. Posteriormente se realizan las operaciones matemáticas correspondientes para determinar los parámetros de la recta y al utilizar la ecuación 2 se obtiene un valor de  $K_a$  para el CI que corresponde a  $79,842 \text{ M}^{-1}$ .

El valor de  $K_a$  obtenido indica que es un compuesto de inclusión con interacciones entre huésped y matriz que son estables, acercándose bastante al rango más bajo de estabilidad ( $50 \text{ M}^{-1}$ ), por lo que debería ser muy susceptible a métodos de liberación de fármaco, debido a que la interacción con  $\beta$ CD no es tan fuerte como para retenerlo en su cavidad ante un estímulo externo sostenido (al estar bastante lejos del valor considerado alto para

una constante, que es igual a  $2000 \text{ M}^{-1}$ ) por lo que el CI si posee propiedades adecuadas para utilizarse en sistemas de *Drug Delivery* (Rao, 2003).

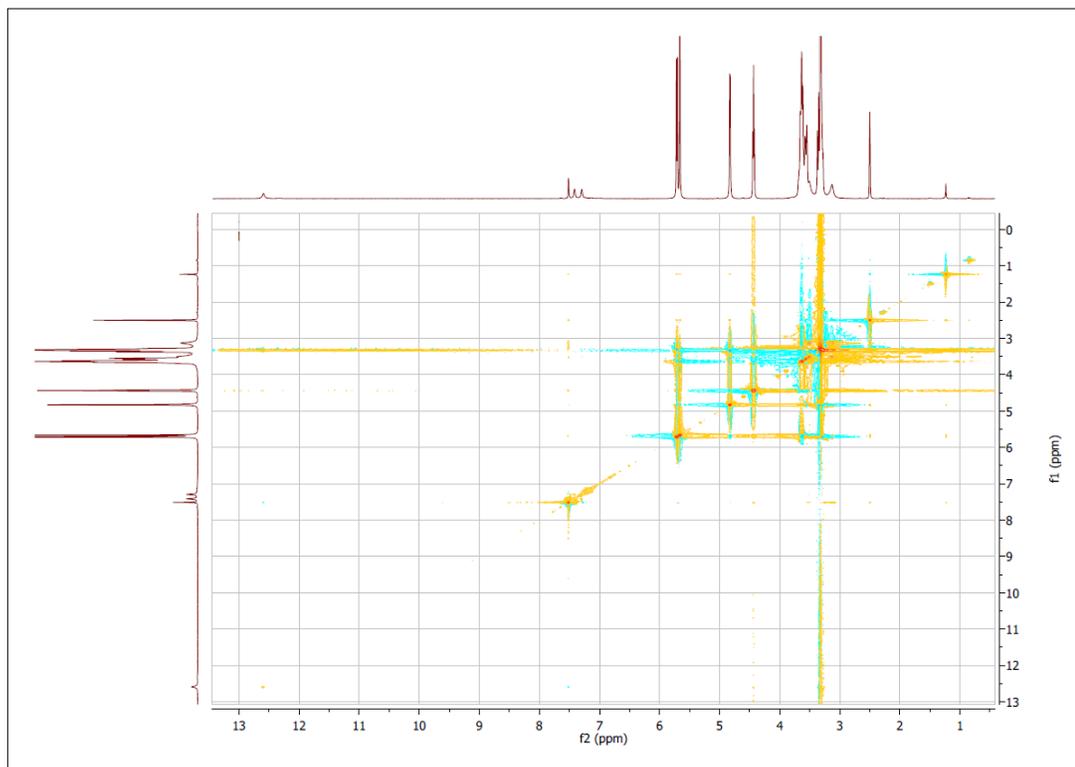


**Figura. 3.7:** Gráfica obtenida a partir de la realización del método de Higuchi y Connors para  $\beta$ CD y DB a 235 nm.

#### 3.1.4. Estudio de geometría de inclusión a través de ROESY

La utilización de la técnica ROESY (*Rotational overhauser enhancement spectroscopy*) entrega información muy localizada de las perturbaciones en el entorno químico de los hidrógenos pertenecientes a las moléculas que poseen interacciones de carácter débil entre sí, permitiendo establecer la distribución y orientación de los componentes de estas

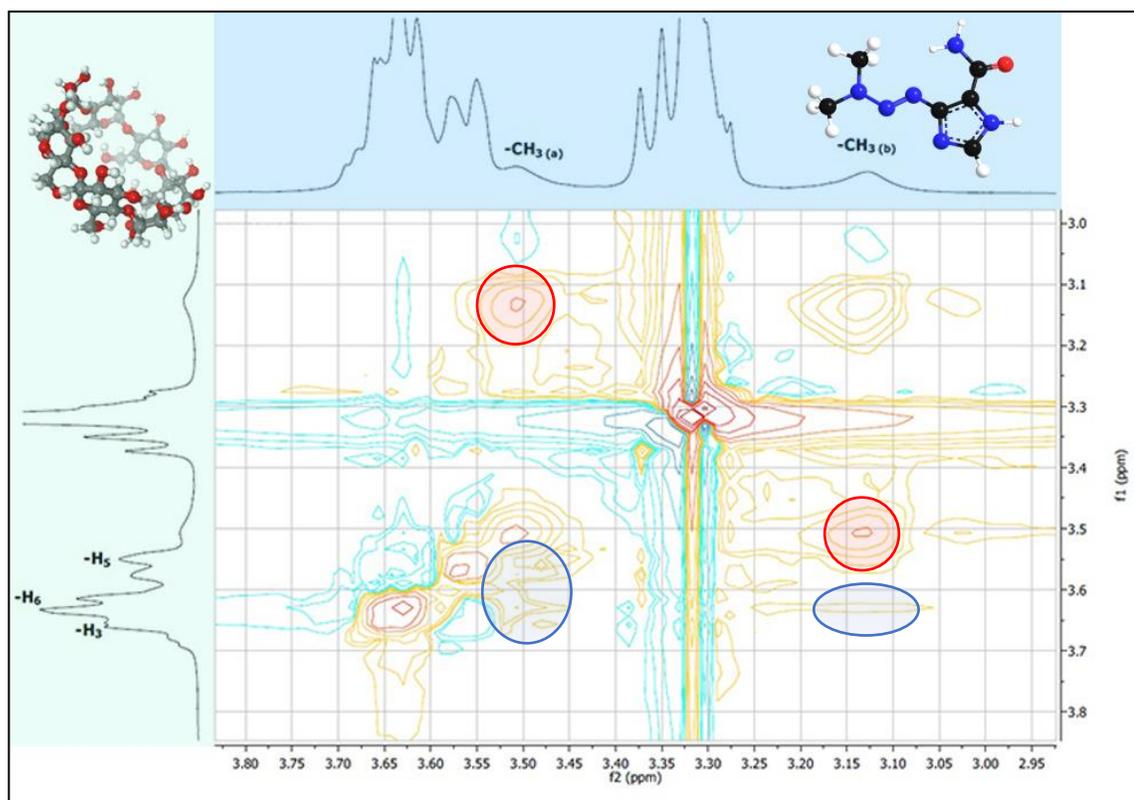
estructuras supramoleculares (Pessine, 2014). El espectro de dos dimensiones obtenido para el CI compuesto de  $\beta$ CD y DB puede observarse en la figura 3.8.



**Figura. 3.8:** ROESY obtenido para el CI entre  $\beta$ CD y DB.

La primera ampliación del espectro representada en la figura 3.9, muestra la interacción de los grupos metilos de DB entre sí (marcados en rojo) y las perturbaciones de campo que estos grupos funcionales del fármaco provocan en los protones H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub> y H<sub>6</sub> de la molécula de  $\beta$ CD (marcado en azul). Refiriéndonos a las interacciones que denotan la formación del CI, las más intensas para el grupo metilo-(a) se producen con el protón interior H<sub>5</sub> y de manera más leve con el protón H<sub>3</sub>, aunque también muestra muy leve interacción con el protón H<sub>6</sub> de  $\beta$ CD. Mientras que el grupo metilo-(b) de DB muestra únicamente una interacción con el protón H<sub>6</sub>, lo que indica que estos grupos funcionales

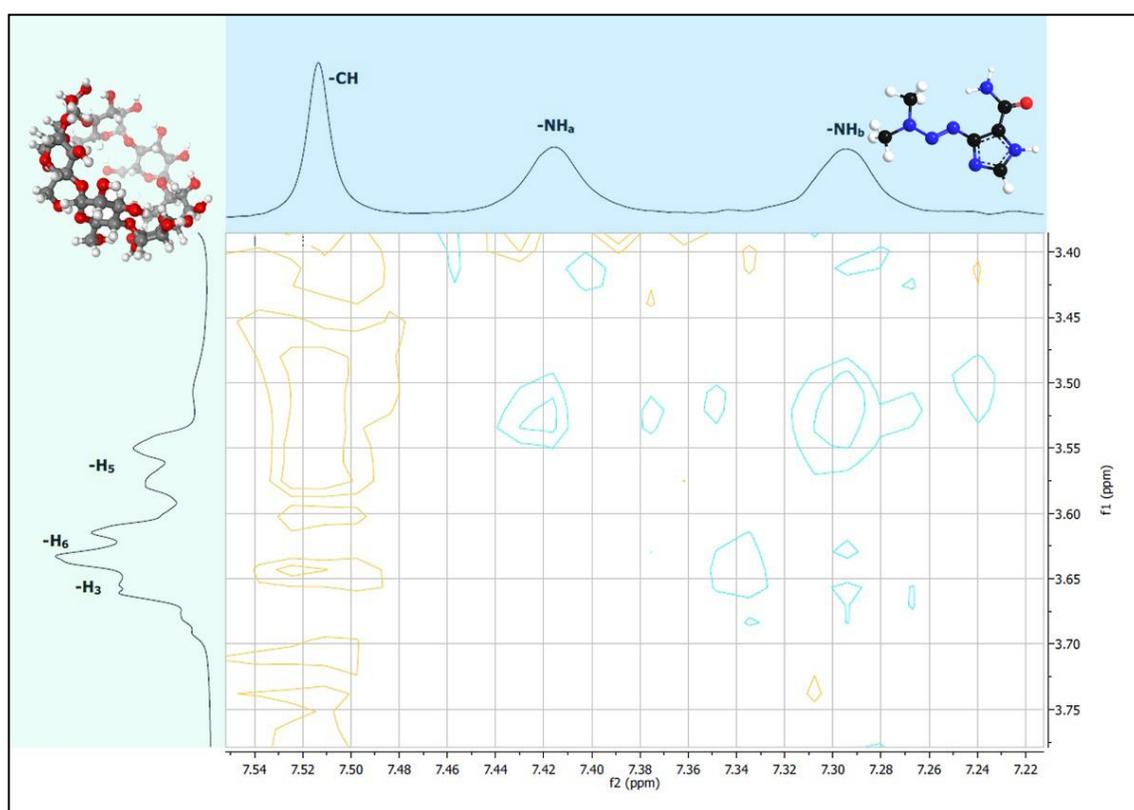
de DB se encuentran interactuando interiormente cerca de la apertura más angosta de  $\beta$ CD. Las señales de interés en esta zona del espectro se ven interferidas por las respuestas de la técnica de análisis hacia las interacciones entre los grupos metilo de DB, haciendo que el espectro muestre señales intensas en las zonas de interés.



**Figura. 3.9:** Ampliación de espectro ROESY de CI: zona de interacción Metilo- $\beta$ CD.

La segunda ampliación del espectro ROESY (ver Figura 3.10) muestra una clara interacción entre el grupo  $-\text{CH}$  del anillo imidazol y los protones  $\text{H}_3$  y  $\text{H}_5$  de  $\beta$ CD, pero, además, se puede observar que las señales indican también una cercanía entre el protón del anillo y los protones del grupo metilo de la propia DB. La Información derivada de lo

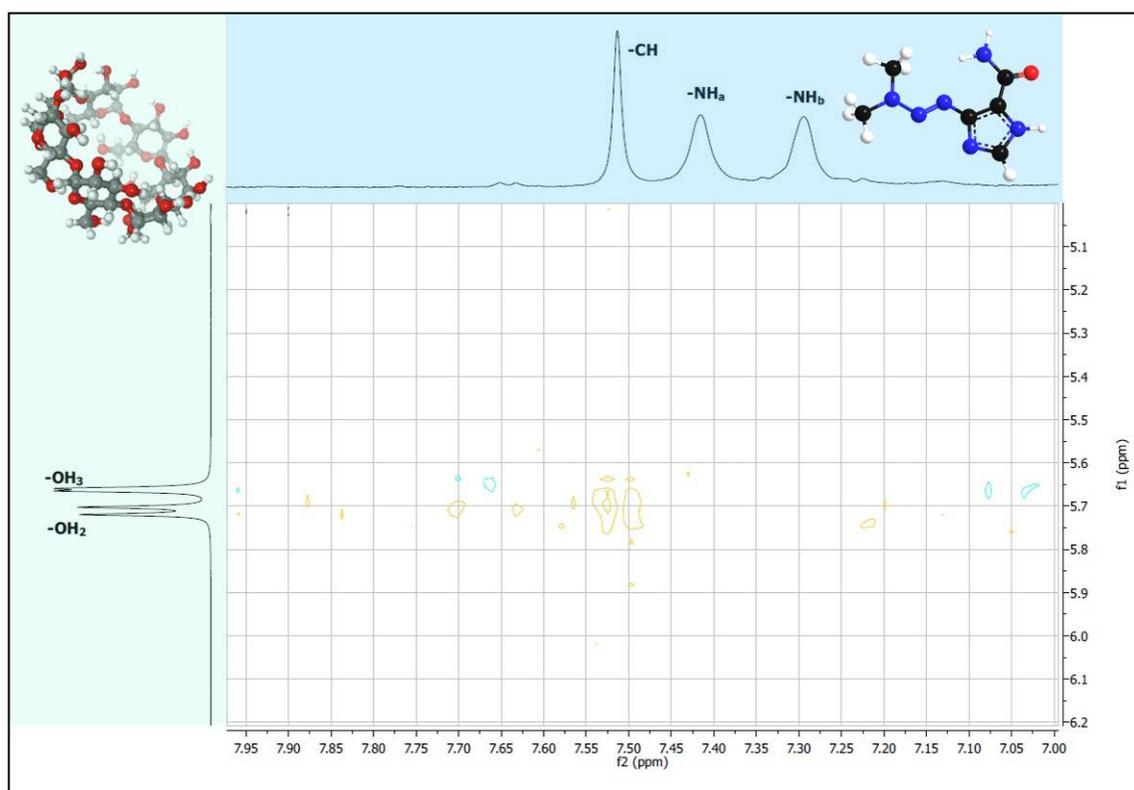
anterior, al ser contrastada, indicaría que existe un equilibrio rápido en el cual la molécula de DB cambia su conformación estirándose y enroscándose dentro de la cavidad de  $\beta$ CD. También se puede establecer la interacción débil entre los protones del grupo amido y el grupo metilo de la propia DB, sustentando la hipótesis de que existe una dinámica en la cual DB cambia su conformación debido al equilibrio presente en solución, entregando señales que corresponderían a conformaciones distintas.



**Figura. 3.10:** Ampliación de espectro ROESY de CI: zona de interacción anillo imidazol- $\beta$ CD y grupos amido y metilo.

La última ampliación (ver Figura 3.11) indica la existencia una interacción entre el grupo -CH del anillo imidazol de DB y los hidroxilos secundarios de  $\beta$ CD, esto puede explicarse

considerando el equilibrio de entrada y salida de DB de la cavidad de la matriz en una dinámica molecular en solución, o bien, la conformación de dos estructuras de inclusión que poseen distintos grados de internamiento dentro de  $\beta$ CD. Para establecer fehacientemente la estructura del compuesto de inclusión se hace necesario realizar un estudio de modelación computacional que permita encontrar los equilibrios conformacionales que ocurren en el proceso de inclusión.

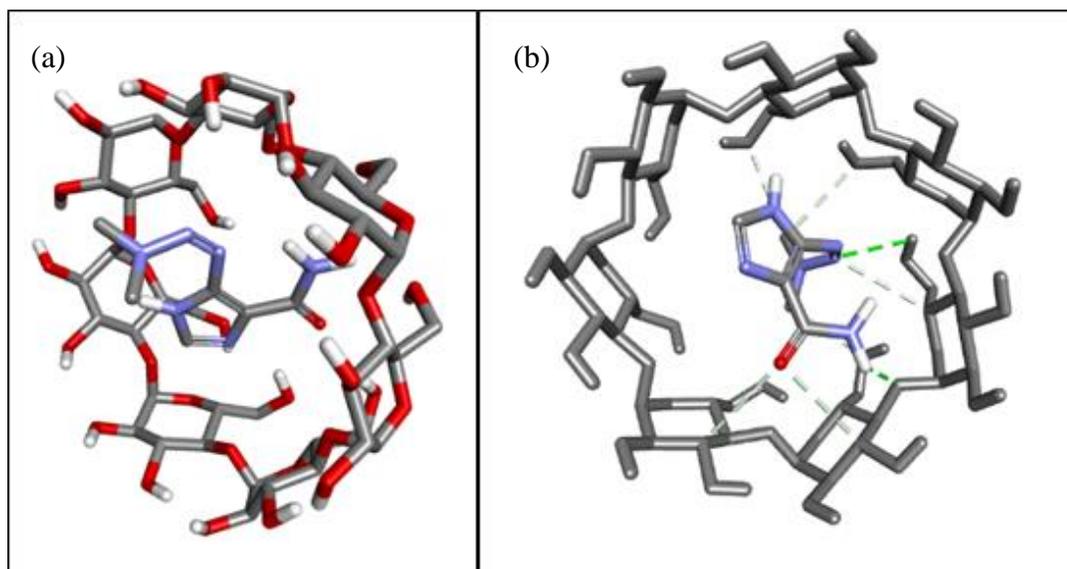


**Figura. 3.11:** Ampliación de espectro ROESY de CI: zona de interacción del protón del anillo imidazol y los hidroxilos secundarios de  $\beta$ CD.

### 3.1.5. *Docking* Molecular para el CI

El *Docking* o modelamiento molecular es un método computacional que permite establecer la conformación más estable o la dinámica de estabilidad más probable entre dos o más moléculas con el fin de predecir asociaciones intermoleculares. Este tipo de ejercicios teóricos son muy útiles a la hora de complementar análisis que parecen complicados o entregan información que parece ser contradictoria (Dua y col, 2011).

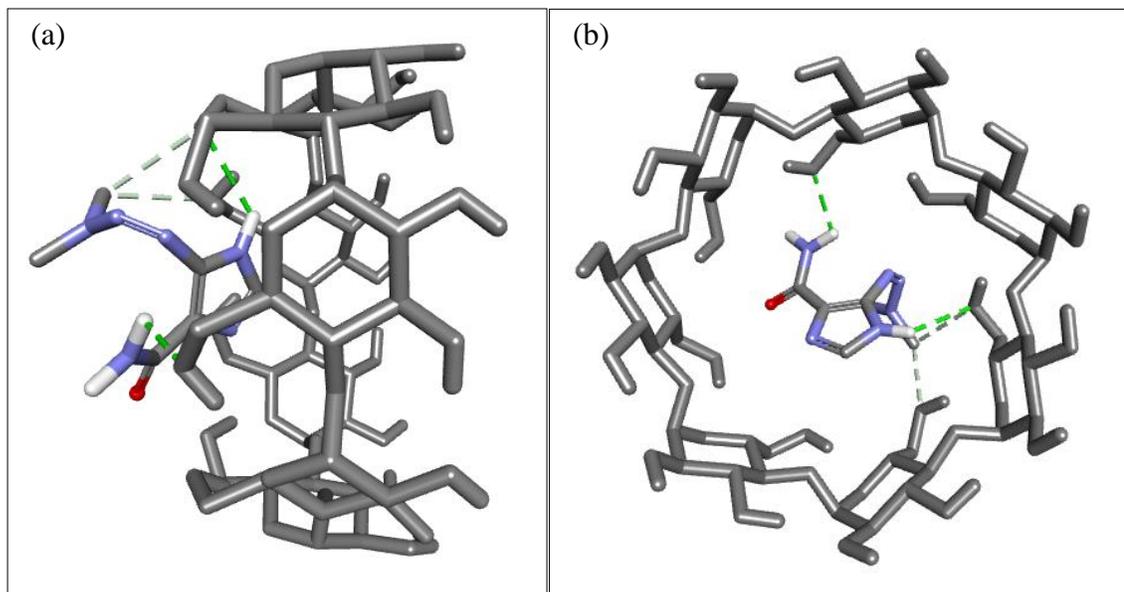
En este caso se realizó una modelación molecular según los parámetros establecidos en la sección 2.2.2, encontrando la existencia de dos estructuras de inclusión favorables, dichas estructuras se relacionan de manera consecuente con las interacciones encontradas en los estudios de geometría realizados por ROESY. En la figura 3.12 podemos observar la inclusión de la molécula DB de manera completa en  $\beta$ CD, reflejando claramente las interacciones observadas en ROESY que denotaban una conformación del CI con la molécula de fármaco estirada dentro de la matriz de inclusión. Mostrando, además, las interacciones entre los grupos metilo de DB y los protones cercanos a la cavidad más pequeña de  $\beta$ CD, así como también la interacción del grupo -CH del anillo imidazol con los protones H<sub>3</sub> y H<sub>5</sub>. Esta primera conformación es favorable solamente en el 40% de los casos según esta modelación.



**Figura. 3.12:** *Docking* molecular: (a) estructura favorable de inclusión, (b) interacciones de los protones de DB con los protones internos de  $\beta$ CD.

Por otra parte, en la figura 3.13 se puede observar como la dinámica molecular de la inclusión lleva a una conformación de empaquetamiento mucho más superficial que representa claramente las interacciones que se observan en ROESY entre en los grupos amido y metilo de DB, de las cuales se suponía que entregaban información sobre una molécula de fármaco enroscada. En la misma figura se puede apreciar la cercanía entre el grupo -CH del anillo imidazol y los hidroxilos secundarios que se detectó mediante ROESY, dejando muy claro que dichas interacciones se deben a la dinámica de equilibrio

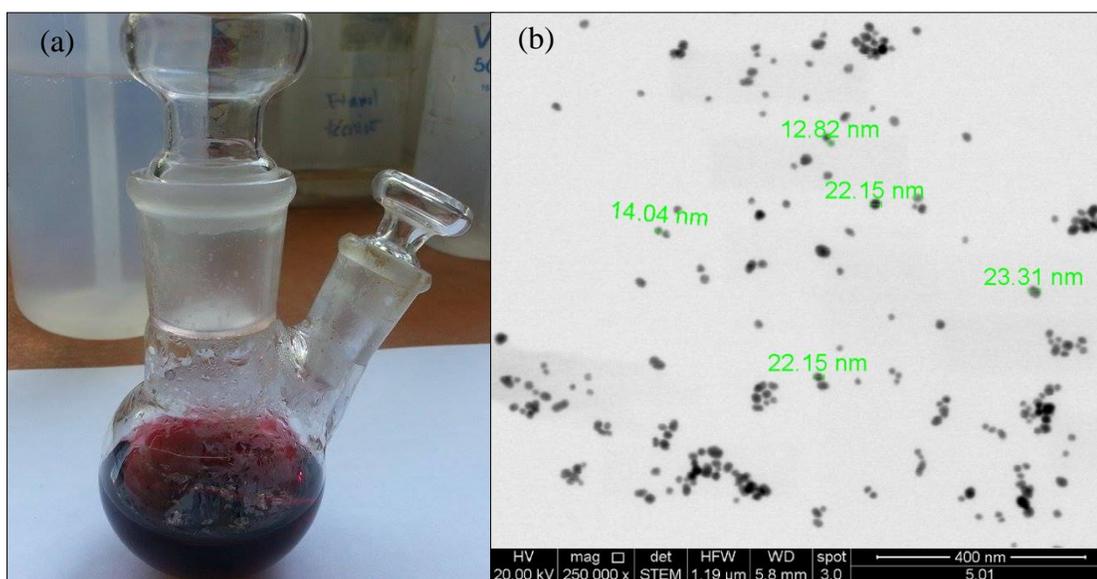
molecular que posee el sistema en solución, y resultando esta configuración más favorable con respecto a la anterior.



**Figura 3.13:** *Docking* molecular: (a) inclusión leve de DB en  $\beta$ CD y (b) interacción del anillo imidazol con grupos hidroxilo de  $\beta$ CD.

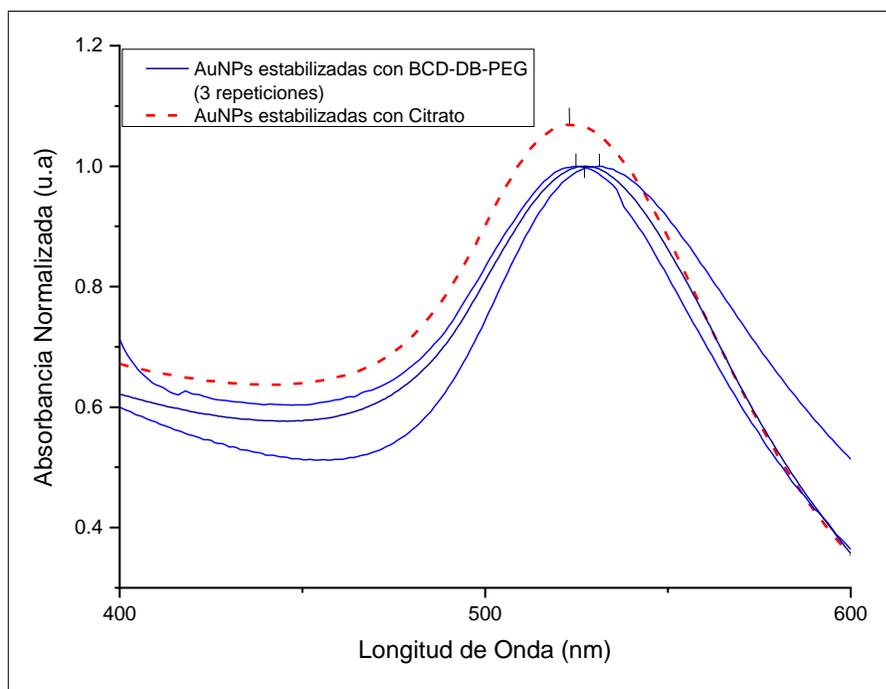
### 3.2. Formación del Sistema Ternario

La formación del sistema ternario comienza con la síntesis de AuNPs mediante el método ya descrito en la sección 2.2.3., comprobando su obtención mediante espectroscopía UV-vis a través de la observación del plasmón característico para nanopartículas esféricas de oro a 520 nm y posteriormente analizando su morfología por microscopía TEM (ver Anexos: Figuras 6.5 y 6.6). Además, se les realizan mediciones de DLS y Potencial Z para caracterizar sus propiedades de superficie, lo que será de utilidad posteriormente para comprobar la formación del sistema ternario.

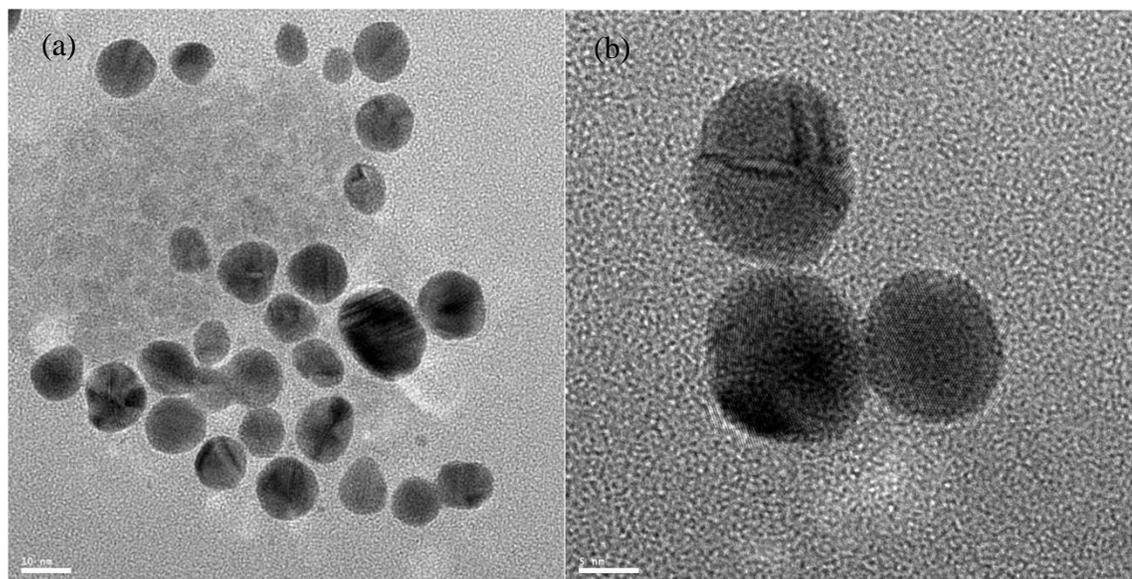


**Figura 3.14:** (a) Balón de dos bocas con solución de AuNPs obtenidas y (b) microscopía TEM de las mismas.

Luego, las AuNPs obtenidas se utilizaron para la formación del nuevo sistema en suspensión coloidal siguiendo la metodología de la sección 2.2.4, realizándose luego, una comparación entre los plasmones obtenidos para las AuNPs estabilizadas con citrato y las estabilizadas en el sistema ternario (figura 3.15), comprobando que, si bien existe un pequeño desplazamiento en el plasmón de 0,5 a 1,5 nm, aún se tienen nanopartículas en solución y se ha formado un sistema estable. También se analizó la muestra obtenida visualmente utilizando la microscopía HR-TEM (Fig. 3.16), en donde puede verse una característica que se repite en los sistemas nanoparticulados que han sido estabilizados con grandes complejos moleculares, en este caso la combinación de CI y PEG, generándose un halo alrededor de la nanopartícula, semejante a un recubrimiento micelar.



**Figura. 3.15:** Espectros UV-vis comparativo de AuNPs estabilizadas con citrato y estabilizadas con complejo CI-PEG.

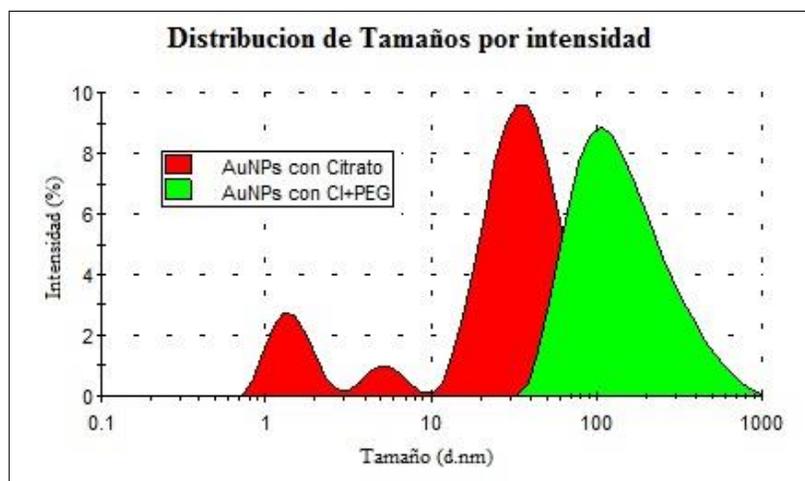


**Figura. 3.16:** HR-TEM de nanopartículas estabilizadas con CI-PEG, (a) vista amplia y (b) acercamiento.

Posteriormente al realizar la centrifugación y resuspensión del sistema, se analiza el contenido de fármaco que posee el sobrenadante extraído para evaluar la capacidad de carga, restando la masa de fármaco perdida por el sistema en este proceso. Llegando al resultado de que el 99,8% de la masa inicial agregada de CI para la formación del sistema ternario (ver Anexos: Figura 6.8 y Tabla 6.5).

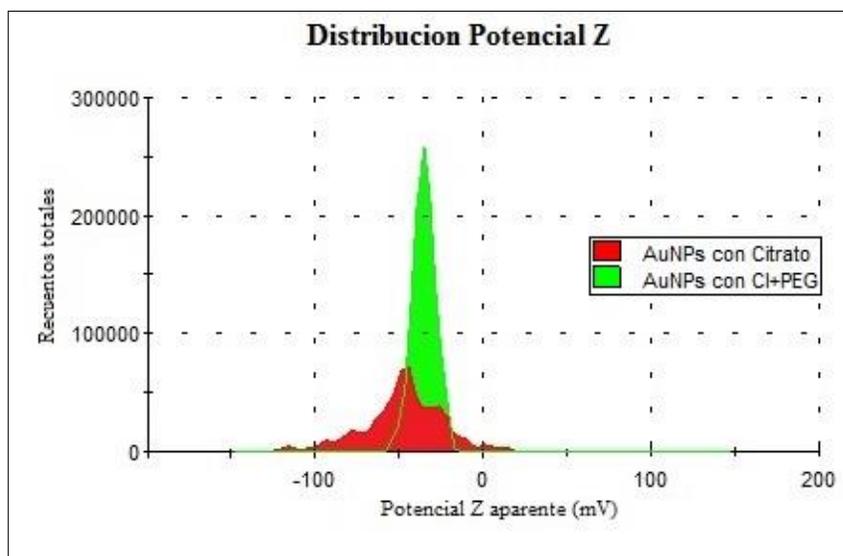
### **3.2.1. Análisis DLS y Potencial Z**

Se realizan alrededor de treinta mediciones de DLS (un ejemplo en Figura 3.17) y Potencial Z (un ejemplo en Figura 3.18) al sistema ternario para evaluar los posibles efectos de superficie que tiene el cambio de estabilizante (ver Anexos: Tabla 6.3). El análisis DLS revela que al cambiar el estabilizante citrato por el conjunto CI-PEG los tamaños de las nanopartículas se hacen más uniformes, es decir, disminuye la polidispersidad de la muestra. También se puede observar un aumento en el radio hidrodinámico de las nanopartículas, esto es coincidente con lo que se espera, ya que el tamaño de CI-PEG como estabilizante es mucho mayor que el tamaño del anión citrato. Se puede confirmar que es el estabilizante el que produce el aumento de tamaño analizando la figura 3.13, ya que la funcionalización de las AuNPs con CI-PEG no hace variar demasiado el plasmón característico, indicando que no ha habido aumento de tamaño ni agregación de las AuNPs.



**Figura. 3.17:** Ejemplo de gráfica comparativa de DLS para AuNPs estabilizadas con citrato y con CI-PEG.

En el caso del análisis de Potencial Z se observa que la estabilización de AuNPs con CI-PEG produce una disminución en la carga superficial de las partículas y al mismo tiempo acota dicha carga en un rango de dispersión menor. La disminución de la carga de superficie de las AuNPs es consistente con el proceso de sustitución del anión citrato como estabilizante, debido a que se está reemplazando una carga iónica negativa por pares de electrones libres pertenecientes por una parte al grupo amido de DB y, por otra, al grupo tiol presente en PEG, estos electrones, al encontrarse pareados, no generan desbalance de cargas en el sistema químico y producen al mismo tiempo una interacción más estable que el anión con las nanopartículas. De acuerdo a lo anterior se puede establecer que la formación del sistema ternario es capaz de darle propiedades de superficie más uniformes a las nanopartículas.



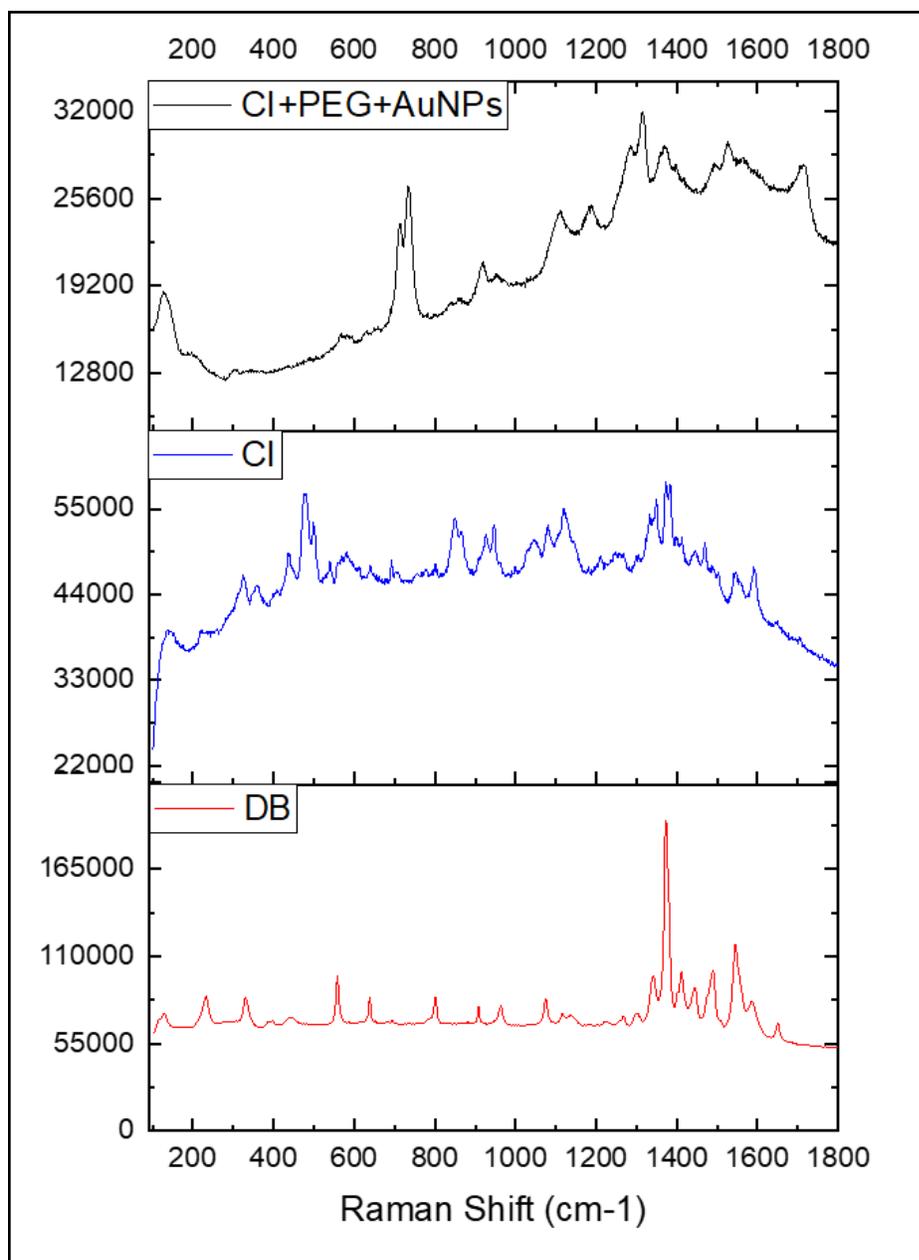
**Figura. 3.18:** Ejemplo de gráfica comparativa de Potencial Z para AuNPs estabilizadas con citrato y con CI-PEG.

### 3.2.2. Análisis mediante espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman es un método de análisis que permite estudiar los modos de vibración en un compuesto, su uso para la caracterización de compuestos de inclusión es útil debido a que mediante esta técnica se puede apreciar cambios sus vibraciones debido al fenómeno de la inclusión. Los efectos más comunes observados en un espectro Raman para moléculas incluidas son: disminución de la intensidad de señales debido a la restricción estérica que supone la cavidad de inclusión, y corrimiento de señales debido a distintos factores como: vibración influenciada por el entorno, la restricción total del movimiento, el apantallamiento de la molécula matriz, que impide que la energía del láser pueda estimular a la molécula incluida en zonas particulares.

En el caso del análisis concerniente a este estudio, se pretende observar como las señales características de DB se alteran, primeramente, debido al fenómeno de inclusión en  $\beta$ CD y luego con el efecto SERS (Surface-enhanced Raman scattering) que debiese ocurrir en el espectro como respuesta a la conjugación del CI con AuNPs. Para ello se toman espectros Raman del fármaco en su estado puro y se identifican sus señales características (ver Anexos: Tabla 6.4), luego las del CI y finalmente las del sistema ternario (ver figura 3.19).

Al observar la figura 3.19, se aprecia que cuando DB pasa de estar libre a incluida dentro de la cavidad de  $\beta$ CD la intensidad de sus trazas características en la inclusión son bastante menores que en su contraparte libre, lo cual tiene relación con la restricción en los movimientos que posee la especie incluida y que disminuye su respuesta vibracional frente a la incidencia del láser. Este efecto descrito se ve respaldado por el análisis mediante espectroscopía IR (ver Anexos: Figura 6.7), donde al estar incluida DB en  $\beta$ CD se observa el mismo efecto.



**Figura. 3.19:** Desde abajo hacia arriba, espectros Raman de: Dacarbazina (DC), Compuesto de Inclusión (CI) y Sistema Ternario (CI/PEG/AuNps).

Además de la disminución en la intensidad de las señales por la restricción de los movimientos, la variación de las trazas también refleja el cambio del entorno químico, esto es, porque al caracterizar el fármaco puro se está analizando una muestra que posee una celda de red cristalina de moléculas de DB puestas una al lado de la otra. Luego, el análisis del compuesto de inclusión, nos entrega información de moléculas de DB aisladas por la inclusión y esto genera que fenómenos como la influencia de la carga formal del propio fármaco sobre las moléculas iguales circundantes no esté presente o se vean notablemente disminuido, lo que genera que la dinámica de equilibrio sea completamente distinta.

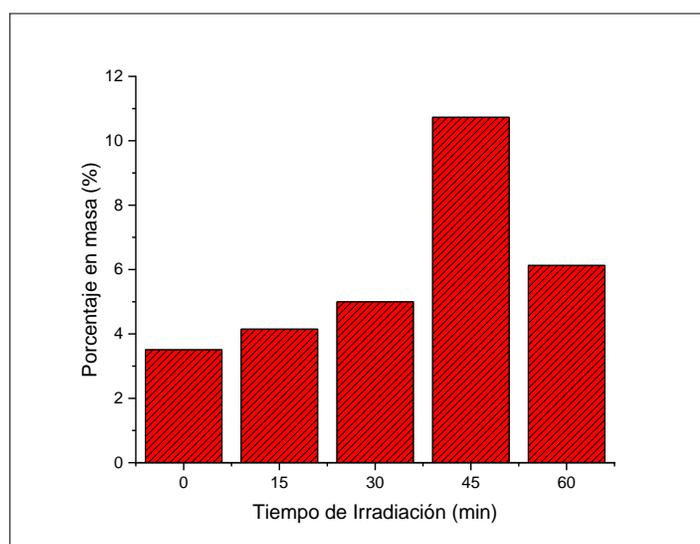
Al conjugarse el CI con la nanopartícula, teóricamente, la intensidad de algunas trazas correspondientes a grupos funcionales cercanos a las AuNPs debería incrementar sustancialmente o desplazarse en el espectro, fenómeno conocido como SERS, teniendo su origen en el aumento de la superficie de dispersión por la cercanía con una nanopartícula. Pero este no es el caso, que puede su origen en el apantallamiento provocado por las moléculas de PEG que recubren el sistema, las cuales pueden actuar como una barrera impidiendo la oscilación coherente de los electrones de conducción en las nanopartículas de oro, lo que tiene como consecuencia que no se aprecien las señales del fármaco y la predominancia en el espectro de nuevas trazas pertenecientes a PEG.

### **3.3. Liberación de Fármaco mediante Irradiación laser**

Como ya se mencionó en la sección 1.5, las nanopartículas poseen la capacidad de interactuar con la luz electromagnética incidente respondiendo con la generación de movimiento y calor, se le conoce a esto como Resonancia de Plasmón Superficial (RPS). Estos movimientos de las AuNPs generan en primera instancia la liberación de los estabilizantes a su superficie, que en este caso corresponde al CI y si la incidencia de la radiación es más prolongada pueden generar el fenómeno conocido como hipertermia, la cual es otra forma de destruir las células cancerosas de manera efectiva y localizada mediante el calor generado por las AuNPs.

Con el objetivo de generar la liberación del fármaco a través de la inducción de la RPS en el sistema ternario sintetizado se realiza la metodología descrita en la sección 2.2.5, obteniendo mediante distintos ensayos (ver Anexos: Tabla 6.6 y Figura 6.9) los resultados promedio que se observan en la figura 3.20., que se encuentran en porcentaje de masa liberada en cierto intervalo de tiempo de irradiación respecto de la masa total de DB que existe en el sistema original, estableciendo que la mayor liberación de DB ocurre a los 45 min de irradiación, posicionando la mayor concentración promedio de liberación con un 10,73%, dicho resultado se ve aumentado por la liberación más alta obtenida en dos ensayos, los que hicieron crecer la tendencia de liberación por parte del sistema. Cabe destacar que la liberación de fármaco por parte de este sistema ternario es bastante más alta que en otros trabajos similares (Sierpe y col., 2015), esto puede deberse a la dinámica molecular encontrada para el CI, que a pesar de ser estable no retiene demasiado el huésped, mostrando en algunos momentos interacciones muy débiles, lo que permite

liberar más fácilmente a DB frente a perturbaciones externas. También hay que considerar la presencia de la molécula PEG, que como ya se dijo con anterioridad, recubre el sistema y así como disminuye la respuesta del mismo frente a la incidencia del láser en las mediciones de espectroscopía Raman, probablemente también lo hace en este caso, moderando y amortiguando el efecto de la incidencia del láser en los ensayos de liberación, ya que por las características de baja estabilidad del CI se podría esperar una liberación mucho más cuantiosa del fármaco.



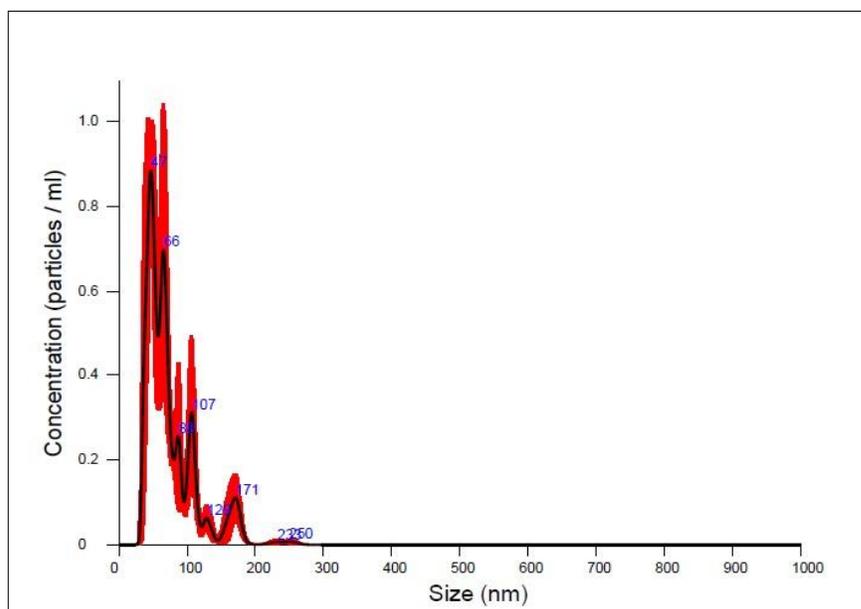
**Figura. 3.20:** Promedio de porcentajes de masa de fármaco liberado mediante irradiación laser del sistema ternario en cada intervalo.

#### 3.4. Estabilidad del sistema en el tiempo

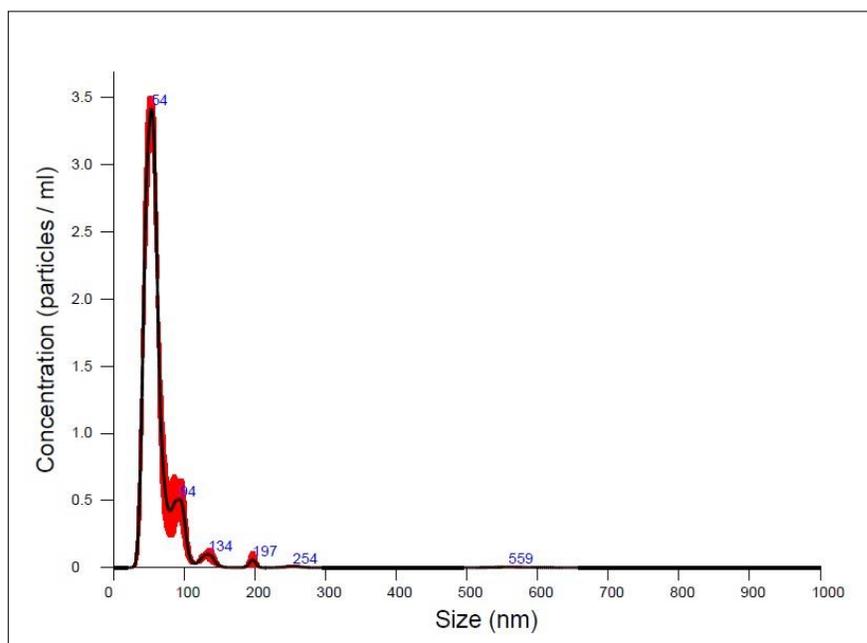
Las nanopartículas son muy sensibles a estímulos externos, como cambios de temperatura, exposición a luz solar o interacción con especies químicas presentes en el medio ambiente

circundante que pueden afectar su estabilidad, es por esto que son mantenidas a temperatura constante (usualmente a 4°C) y aislados de estímulos externos. Además de lo anterior, las nanopartículas se agregan entre sí con el paso del tiempo, aumentando su tamaño, perdiendo sus propiedades y transformándose en materiales inútiles. La generación de un sistema estable debe considerar que este pueda ser almacenado y posteriormente ser utilizado sin problemas, además, la resistencia ante condiciones no favorables representa una cualidad que permite reducir los riesgos a la hora de la aplicación y tener certeza de que no se producirán efectos no deseados.

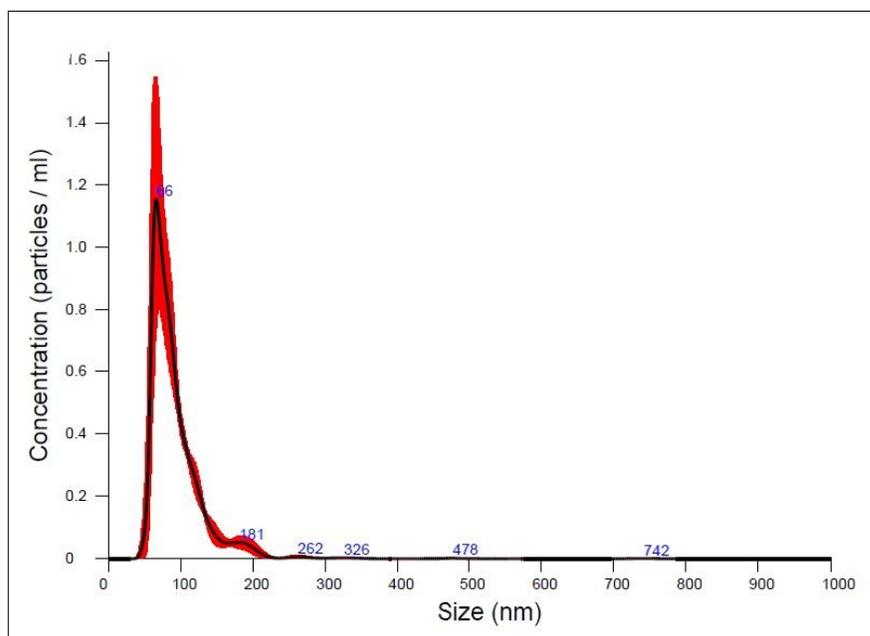
Entonces, se realiza la metodología descrita en la sección 2.4.5., y la comparación de distintas mediciones (ver Anexos: Figuras 6.10, 6.11 y 6.12) resultante de analizar la distribución de tamaños entregada por el Análisis de Rastreo de Nanopartículas (NTA) entre una síntesis de AuNPs reciente (Figura 3.21) y las muestras que poseen más de un año de antigüedad (387 días) indica que, independientemente de si estas se conservan bajo condiciones óptimas o no, las nanopartículas estabilizadas en el sistema ternario siguen teniendo una menor polidispersidad (Figura 3.22), incluso en el caso de las que no se encontraban refrigeradas (Figura 3.23) aún mantienen una alta concentración de ellas en estado óptimo de tamaño para ser utilizadas en sistemas biológicos. De acuerdo a lo anterior, se puede decir que la generación de un sistema ternario con los componentes utilizados es estable y su dinámica de interacciones le permite conservar esa estabilidad en el tiempo, incluso a condiciones desfavorables.



**Figura 3.21:** Distribución de tamaños de AuNPs entregada por NTA.



**Figura 3.22:** NTA para Sistema ternario antiguo mantenido en refrigeración a 4°C.



**Figura 3.23:** NTA para Sistema ternario mantenido a temperatura ambiente.

Relacionando los resultados vistos para la irradiación láser y la estabilidad del sistema ternario, se entiende que la adición de PEG ha sido capaz de otorgarle la estabilidad suficiente para concluir que el sistema si tiene el potencial para proporcionar al sistema ternario un alto periodo de circulación en sangre (que es lo que se busca adicionando este tipo de polímeros). Sin embargo, esto se contrapone frente a la liberación del fármaco, ya que al otorgarle tanta estabilidad no permite una liberación mayor de DB. El efecto de la molécula PEG es importante, teniendo en consideración la baja constante de estabilidad que posee el CI anclado a las AuNPs por lo que debe buscarse la concentración mínima de PEG que permita maximizar la estabilidad y al mismo tiempo la liberación de fármaco.

#### 4. CONCLUSIONES

Se obtuvo manera de exitosa el CI entre el fármaco DB y  $\beta$ CD, demostrando dicha obtención y su estequiometría mediante difracción de Rayos X y Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno. El complejo se encuentra en el límite inferior de la escala de estabilidad, de acuerdo a un valor de su constante de  $79,842 \text{ M}^{-1}$  y con la realización de una modelación teórica.

Se obtuvieron AuNPs estables mediante síntesis coloidal, que las hacen adecuadas para emplearse en sistemas biológicos. Posteriormente se les intercambié la molécula estabilizante (anión citrato) de manera efectiva por la unión de estabilizantes CI-PEG, dando como resultado un sistema ternario estable en el tiempo, con alta capacidad de carga y resistente frente a condiciones ambientales no favorables.

Los ensayos de irradiación láser demostraron que el sistema ternario es capaz de liberar fármaco de manera controlada mediante la excitación provocada por una onda electromagnética incidente, confirmando la generación del efecto de resonancia de plasmón superficial, teniendo una cantidad máxima de liberación promedio correspondiente al 10,73 % respecto de la masa de fármaco que contiene el sistema. Se considera que la presencia de PEG afecta negativamente el proceso de irradiación, apantallando el efecto de excitación producido por el láser, impidiendo una liberación más rápida y cuantiosa del fármaco DB.

De acuerdo a lo anterior, se entiende que el sistema ternario generado posee el potencial para ser probado en sistemas biológicos como alternativa de mejoramiento a los

tratamientos de cáncer actuales, de manera que compatibilice el cuidado de las personas con el cuidado del medio ambiente a través de la entrega del fármaco de manera controlada y específica en el sitio de acción, evitando que el fármaco sea depuesto en las aguas servidas de las ciudades.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

Aherne GW, Hardcastle A, Nield AH. 1990. Cytotoxic drugs and the aquatic environment: estimation of bleomycin in river and multi samples. *J Pharm Pharmacol* 42:741–742.

Allwood M, Stanley A, Wright P (2002) *The cytotoxics handbook*. Radcliffe Medical Press, Oxford.

Andreozzi R, Raffaele M, Nicklas P. 2003. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* 50:1319–30.

Ashton D, Hilton M, Thomas KV. 2004. Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Sci Total Environ* 333:167–84.

D. Bei, T. Zhang, J.B. Murowchick, B.-B.C. Youan, Formulation of dacarbazine loaded cubosomes. Part III. Physicochemical characterization, *AAPS PharmSciTech* 11 (2010) 1243–1249.

Benotti M. J., R. A. Trenholm, B. J. Vanderford, J. C. Holady, B. D. Stanford and S. A. Snyder, *Environ. Sci. Technol.*, 2009, 43, 597-603.

Besse J-P, Latour J-F, et al. 2012. Anticancer drugs in surface waters: what can we say about the occurrence and environmental significance of cytotoxic, cytostatic and endocrine therapy drugs? *Environ Int.* 39(1):73–86.

Booker V, Halsall C, Llewellyn N, Johnson A, Williams R. 2014. Prioritizing anticancer drugs for environmental monitoring and risk assessment purposes. *Sci Total Environ* 473–474:159–170.

Bonanno, L.; Favaretto, A.; Rosell, R. Platinum drugs and DNA repair mechanism in lung cancer. *Anticancer Res.* 2014, 34, 493–502.

Bound JP, Voulvoulis N. Household disposal of pharmaceuticals as a pathway for aquatic contamination in the United Kingdom. *Environ Health Perspect* 2005; 113:1705–11.

Bouraoui S, Brahem A, Tabka F, Mrizek N, Saad A, Elghezal H. 2011. Assessment of chromosomal aberrations, micronuclei and proliferation rate index in peripheral lymphocytes from Tunisian nurses handling cytotoxic drugs. *Environ Toxicol Pharmacol* 31:250–7.

Boxall ABA. The environmental side effects of medication—how are human and veterinary medicines in soils and water bodies affecting human and environmental health? *EMBO Rep* 2004; 5:1110–6.

Boxall A. B. A., M. A. Rudd, B. W. Brooks, D. J. Caldwell, K. Choi, S. Hickmann, E. Innes, K. Ostapyk, J. P. Staveley, T. Verslycke, G. T. Ankley, K. F. Beazley, S. E. Belanger, J. P. Berninger, P. Carriquiriborde, A. Coors, P. C. DeLeo, S. D. Dyer, J. F. Ericson, F. Gagne, J. P. Giesy, T. Gouin, L. Hallstrom, M. V. Karlsson, D. G. J. Larsson, J. M. Lazorchak, F. Mastrocco, A. McLaughlin, M. E. McMaster, R. D. Meyerhoff, R. Moore, J. L. Parrott, J. R. Snape, R. Murray-Smith, M. R. Servos, P. K. Sibley, J. O.

Straub, N. D. Szabo, E. Topp, G. R. Tetreault, V. L. Trudeau and G. Van Der Kraak, *Environ. Health Perspect.*, 2012, 120, 1221-1229.

Buchberger WW. Current approaches to trace analysis of pharmaceuticals and personal care products in the environment. *J Chromatography, A* 2011;1218:603–18.

Byler, S.; Goldgar, S.; Heerboth, S.; Leary, M.; Housman, G.; Moulton, K.; Sarkar, S. Genetic and epigenetic aspects of breast cancer progression and therapy. *Anticancer Res.* 2014, 34, 1071–1077.

Caira, M. R. On the Isostructurality of Cyclodextrin Inclusion Complexes and its Practical Utility. *Rev. Roum. Chim.* 2001, 46, 371– 386.

Calamari D, Zuccato E, Castiglioni S, Bagnati R, Fanelli R. Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in Northern Italy. *Environ Sci Technol*, 2003;37: 1241–8.

Castiglioni S, Bagnati R, et al. A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. *J Chromatogr, A* 2005;1092(2):206–15.

Castiglioni S., R. Bagnati, R. Fanelli, F. Pomati, D. Calamari and E. Zuccato, *Environ. Sci. Technol.*, 2006, 40, 357-363.

Chen YS, Hung YC, Liao I, Huang GS. Assessment of the in vivo toxicity of gold nanoparticles. *Nanoscale Res Lett* 2009; 4: 858–64.

Collier AC (2007) Pharmaceutical contaminants in potable water: potential concerns for pregnant women and children. *EcoHealth* 4:164–171.

Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small* 2005;1:325e7.

Crane M, Watts C, Boucard T. 2006. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Sci Total Environ* 367:23–41.

Dang, Z., et. Al. Applications of Powder X-Ray Diffraction to Inclusion Complexes of Cyclodextrins. *Curr. Org. Chem*, 2011, 15, 848-861.

Dakrong Pissuwan, Stella M. Valenzuela and Michael B. Cortie. 2006. Therapeutic possibilities of plasmonically heated gold nanoparticles, *TRENDS in Biothechnology*, 24, 2.

Daughton CG. 2003a. Cradle-to-cradle stewardship of drugs for minimizing their environmental disposition while promoting human health. I. Rationale for and avenues toward a green pharmacy. *Environ Health Perspect*; 111:757–74.

Daughton CG. 2003b. Cradle-to-cradle stewardship of drugs for minimizing their environmental disposition while promoting human health. II. Drug disposal, waste reduction, and future directions. *Environ Health Perspect*; 111:775–85.

Delgado LF, Charles P, Glucina K, Morlay C. QSAR-like models: a potential tool for the selection of PhACs and EDCs for monitoring purposes in drinking water treatment systems: a review. *Water Res* 2012;46:6196–209.

Der Beek, F. A. Weber, A. Bergmann, S. Hickmann, I. Ebert, A. Hein and A. Kuster, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2016, 35, 823-835.

Dieter HH, Mückter H (2007) Assessment of so called organic trace compounds in drinking water from the regulatory, health and aesthetic-quality points of view, with special consideration given to pharmaceuticals. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz* 50:322–331.

Dieter HH (2014) Health related guide values for drinking-water since 1993 as guidance to assess presence of new analytes in drinking water. *Int J Hyg Environ Health* 217:117–132.

DoH (Department of Health) (2004) Variations in usage of cancer drugs approved by NICE. Report of the review undertaken by the National Cancer Director. *London: Department of Health*.

Emmanuel E, Perrodin Y, Keck G, Blanchard JM, Vermande P. Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. *J. Hazard Mater.*, 2005;117:1-11.

Escher BI, Baumgartner R, Koller M, Treyer K, Lienert J, McArdell CS. Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. *Water Res* 2011;45:75–92.

FDA: Approved drug products with therapeutic equivalence evaluations, *Center for Drug Evaluation and Research*, Rockville, MD, 2003.

Fent K, Weston AA, Caminada D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.*, 2006;76:122–59.

Ferk F, Misik M, Grummt T, Majer B, Fuerhacker M, Buchmann C, et al. Genotoxic effects of wastewater from an oncological ward. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2009;672:69–75.

Ferrando-Climent L, Rodriguez-Mozaz S, Barceló D (2013) Development of a UPLC-MS/MS method for the determination of ten anticancer drugs in hospital and urban wastewaters, and its application for the screening of human metabolites assisted by information-dependent acquisition tool (IDA) in sewage samples. *Anal Bioanal. Chem.*, 405:5937–5952.

Gellman, S.H. 1997. Introduction: Molecular Recognition, *Chem. Rev.*, 97, 1231.

Glassmeyer ST, Furlong ET, Kolpin DW, Cahill JD, Zaugg SD, Werner SL, et al. Transport of chemical and microbial compounds from known wastewater discharges: potential for use as indicators of human fecal contamination. *Environ Sci Technol* 2005; 39:5157–69.

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.

Guan Y. D., B. Wang, Y. X. Gao, W. Liu, X. L. Zhao, X. F. Huang and J. H. Yu, *Pedosphere*, 2017, **27**, 42-51.

Guerrero A., Hassan N., Escobar C., Albericio F., Kogan M. and Araya E. 2014. *Nanomedicine*, 9, 2023-2039.

Gunasekaran S., Kumaseran S., Arumbalaji R., Anand G. and Srinivasan S. (2008). Density functional theory study of vibrational spectra, and assignment of fundamental modes of dacarbazine. *J. Chem. Sci.*, Vol. 120, No. 3, pp. 315–324.

Han, G., You, C.C., Kim, B.J., Turingan, R.S., Forbes, N.S., Martin, C.T. & Rotello, V.M. 2006. Light regulated release of DNA and its delivery to nuclei by means of photolabile gold nanoparticles. *Angew. Chem. Int.*, Ed. 45: 3165-3169.

Harris J, Dodds LJ (1985) Handling waste from patients receiving cytotoxic drugs. *Pharm J*, 7:289–291

Health Canada (2004). Progress report on cancer control in Canada. *Health Canada*, Ottawa.

Hernando MD, Mezcuca M, Fernandez-Alba AR, Barcelo D. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta.*, 2006; 69:334–42.

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

Housman, Byler, Heerboth, Lapinska, Longacre, Snyder and Sarkar, Drug Resistance in Cancer: An Overview. *Cancers.*, 2014, 6(3), 1769-1792.

Huang X, Jain P, El-Sayed I, El-Sayed M. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers Med Sci.*, 2008; 23: 217–28.

Iwamoto Takuya, Yusuke Hiraku, Masahiro Okuda, and Shosuke Kawanishi, Mechanism of UVA-dependent DNA Damage Induced by An Antitumor Drug Dacarbazine in Relation to its Photogenotoxicity. *Pharmaceutical Research*, Vol. 25, No. 3, March 2008.

Ikehata K., N. J. Naghashkar and M. G. Ei-Din, *Ozone-Sci. Eng.*, 2006, 28, 353-414.

Issels RD, Lindner LH, Verweij J, Wust P, Reichardt P, Schem BC, et al. Neo-adjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for 87ulticent high-risk soft-tissue sarcoma: a 87ulticente phase 3 multicentre study. *Lancet Oncol.*, 2010; 11:561–70.

Johnson AC, Jürgens MD, et al. 2008. Do cytotoxic chemotherapy drugs discharged into rivers pose a risk to the environment and human health? An overview and UK case study. *J Hydrol.*, 348(1–2):167–75.

Johnston H, Hutchison G, Christensen F, Peters S, Hankin S, Stone V. A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Crit Rev Toxicol.*, 2010; 40: 328–46.

Jones OA, Lester JN, et al. Pharmaceuticals: a threat to drinking water? *Trends Biotechnol.*, 2005;23(4):163–7.

Kaul G, Amiji M. Long-circulating poly(ethylene glycol)- modified gelatin nanoparticles for intracellular delivery. *Pharm Res.*, 2002; 19:1061–7.

Khetan SK, Collins TJ. 2007. Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a challenge to green chemistry. *Chem Rev*; 107:2319–64.

Kim C, Ghosh P, Rotello V. Multimodal drug delivery using gold nanoparticles. *Nanoscale.*, 2009; 1: 61–7.

Koch A, Reynolds F, Merkle H, Weissleder R, Josephson L. Transport of surface-modified nanoparticles through cell monolayers. *ChemBiochem.*, 2005; 6: 337–45.

Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999–2000: a national reconnaissance. *Environ Sci Technol.*, 2002;36:1202–11.

Kosjek T, Heath E (2011) Occurrence, fate and determination of cytostatic pharmaceuticals in the environment. *TrAC.*, 30:1065–1087

Kumar S, Harrison N, Richards-Kortum R, Sokolov K. Plasmonic nanosensors for imaging intracellular biomarkers in live cells. *Nano Lett.*, 2007; 7: 1338–43.

Kummerer K. Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks. *Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. K*; 2001.

Kümmerer K, Al-Ahmad A (2010) Estimation of the cancer risk to humans from 88ulticenter88mide and ifosfamide excreta emitted into surface water via hospital effluents. *Environ Sci Pollut Res*; 17:486–496

Kummerer K, Hail A, Schuster S, Hein A and Ebert I. 2014. Antineoplastic compounds in the environment-substances of special concern. *Environ Sci Pollut Res*; 15:14791-14804.

Lambert JC, Lipscomb JC. Mode of action as a determining factor in additivity models for chemical mixture risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol* 2007;49(3):183–94.

Lee SH, Bae KH, Kim SH, Lee KR, Park TG. Amine-functionalized gold nanoparticles as non-cytotoxic and efficient intracellular siRNA delivery carriers. *Int. J. Pharm.* 2008; 364: 94–101.

Lehn J.-M., 1995. *Supramolecular Chemistry-Concepts and Perspectives*, VCH, Weinheim, ch. 9.

Lienert J, Koller M, Konrad J, McArdell CS, Schuwirth N. Multiple-criteria decision analysis reveals high stakeholder preference to remove pharmaceuticals from hospital wastewater. *Environ Sci Technol.*, 2011;45:3848–57.

Link S, El-Sayed MA. Shape and size dependence of radiative, nonradiative and photothermal properties of gold nanocrystals. *Int Rev Phys Chem.*, 2000; 19: 409–53.

Liu Y, Miyoshi H, Nakamura M. Nanomedicine for drug delivery and imaging: a promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles. *Int J Cancer* 2007; 120: 2527–37.

Liu C, Li BQ, Mi CC. Fast transient thermal analysis of gold nanoparticles in tissue-like medium. *IEEE Trans Nanobioscience*, 2009; 8: 271–80.

Maeda H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv Enzyme Regul* 2001; 41:189–207

Michael I., L. Rizzo, C. S. McArdell, C. M. Manaia, C. Merlin, T. Schwartz, C. Dagot and D. Fatta-Kassinos, *Water Res.*, 2013, 47, 957-995.

Ming Chen, Guowang Diao, Enren Zhang. 2006. Study of inclusion complex of  $\beta$ -cyclodextrin and nitrobenzene. *Chemosphere* 63, 522–529.

Mino R. Caira. 2001. On the isostructurality of cyclodextrin inclusion complexes and its practical utility. Department of Chemistry, University of Cape town. *Revue Roumaine de Chimie*, 46 (4), 371-386.

Mompelat S, Le Bot B, Thomas O. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environ Int.*, 2009;35:803–14.

Nghiem L. D., A. I. Schafer and M. Elimelech, *Environ. Sci. Technol.*, 2005, 39, 7698-7705.

Paciotti GF, Myer L, Weinreich D, Goia D, Pavel N, McLaughlin RE, et al. Colloidal gold: a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery. *Drug Deliv.*, 2004; 11: 169–83.

Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U, et al. Sizedependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* 2007; 3: 1941–9.

Park JH, von Maltzahn G, Ruoslahti E, Bhatia SN, Sailor MJ. Micellar hybrid nanoparticles for simultaneous magnetofluorescent imaging and drug delivery. *Angew Chem Int Ed Engl.*, 2008;47:7284–8.

Partha Ghosh, Gang Han, Mrinmoy De, Chae Kyu Kim, Vincent M. Rotello. 2008. Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Volume 60, Pages 1307–1315.

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.

Pomati F, Castiglioni S, Zuccato E, Fanelli R, Vigetti D, Rossetti C, et al. Effects of a complex mixture of therapeutic drugs at environmental levels on human embryonic cells. *Environ Sci Technol.*, 2006;40:2442–7.

Ramos C. et al. Tratamiento de las aguas residuales provenientes de la industria de medicamentos. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 36, 39, 2005.

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

Ratola N., A. Cincinelli, A. Alves and A. Katsoyiannis, *J. Hazard. Mater.*, 2012, 239, 1-18.

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

Rotello VM, Duncan B, Kim C. Gold nanoparticle platforms as drug and biomacromolecule delivery systems. *J Control Release* 2010;148: 1227.

Rowney NC, Johnson AC, et al. 2008. Cytotoxic drugs in drinkingwater: a prediction and risk assessment exercise for the Thames catchment in the United Kingdom. *Environ Toxicol Chem*; 27:33–43.

Sarkar, S.; Goldgar, S.; Byler, S.; Rosenthal, S.; Heerboth, S. Demethylation and re-expression of epigenetically silenced tumor suppressor genes: Sensitization of cancer cells by combination therapy. *Epigenomics* 2013, 5, 87–94

Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, Basu A, Bhone RR, Sastry M. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir* 2005;21:10644–54.

Singh, R.; et. Al. Characterization of Cyclodextrin Inclusion Complexes. *A Review. J. Pharm. Sci. Technol.* 2010, 2(3), 171-183.

Smerhovsky Z, Landa K, Rossner P, Brabec M, Zudova Z, Hola N, et al. Risk of cancer in an occupationally exposed cohort with increased level of chromosomal aberrations. *Environ Health Perspect.*, 2001;109:41–5.

Stackelberg P. E., E. T. Furlong, M. T. Meyer, S. D. Zaugg, A. K. Henderson and D. B. Reissman, *Sci. Total Environ.*, 2004, 329, 99-113.

Stanford BD, Weinberg HS. Evaluation of on-site wastewater treatment technology to remove estrogens, nonylphenols, and estrogenic activity from wastewater. *Environ Sci Technol.*, 2010;44(8):2994–3001.

Stern JM, Stanfield J, Lotan Y, Park S, Hsieh JT, Cadeddu JA. Efficacy of laser-activated gold nanoshells in ablating prostate cancer cells in vitro. *J Endourol.*, 2007;21:939–43

Stewart BW, Wild CP, World cancer report 2014. *IARC Non Serial publication. WHO Press.*

Szejtli J. 1998. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev.*, 98, 1743-1753.

Tauxe-Wuersch A, de Alencastro LF, Grandjean D, Tarradellas J. Trace determination of tamoxifen and 5-fluorouracil in hospital and urban wastewaters. *Int J Environ Anal Chem.*, 2006;86:473–85.

Tuerk J, Kiffmeyer TK, Hadtstein C, Heinemann A, Hahn M, Stuetzer H, et al. Development and validation of an LC–MS/MS procedure for environmental monitoring of eight cytostatic drugs in pharmacies. *Int J Environ Anal Chem.*, 2011;91:1178–90.

Turci R, Sottani C, Spagnoli G, Minoia C. Biological and environmental monitoring of hospital personnel exposed to antineoplastic agents: a review of analytical methods. *J Chromatogr., B* 2003;789:169–209.

Valcarcel Y, Alonso SG, Rodriguez-Gil JL, Gil A, Catala M. Detection of pharmaceutically active compounds in the rivers and tap water of the Madrid Region (Spain) and potential ecotoxicological risk. *Chemosphere* 2011;84:1336–48.

T. P. Van Boeckel, S. Gandra, A. Ashok, Q. Caudron, B. T. Grenfell, S. A. Levin and R. Laxminarayan, *Lancet Infect. Dis.*, 2014, 14, 742-750.

Uekama K., Hirayam F. and Irie T., Cyclodextrin drug carrier systems, *Chem. Rev.*, 98, 2045-2076, (1998).

Umweltbundesamt. 2003. Assessment of the presence partially or not valueable materials in the drinking water from health view. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz* 46:249–251.

Van der Zee J, González D, van Rhoon GC, van Dijk JDP, van Putten WLJ, Hart AAM. Comparison of radiotherapy alone with radiotherapy plus hyperthermia in locally advanced pelvic tumours: a prospective, 94ulticente, 94ulticenter trial. *Lancet* 2000;355:1119–25.

Varadhachary GR, Hoff PM (2005) Front-line therapy for advanced colorectal cancer: emphasis on chemotherapy. *Semin Oncol.*, 32: 40–42

Verlicchi P, Al Aukidy M, Galletti A, Petrovic M, Barceló D. Hospital effluent: investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *Sci Total Environ.*, 2012a;430:109–18.

Verlicchi P, Al Aukidy M, Zambello E. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment: a review. *Sci Total Environ.*, 2012b;429:123–55.

Vernon CC, Hand JW, Field SB, Machin D, Whaley JB, Van Der Zee J, et al. Radiotherapy with or without hyperthermia in the treatment of superficial localized breast cancer: results from five randomized controlled trials. *Int J Radiation Oncol Biol Phys.*, 1996;35:731–44.

Webb S, Ternes T, Gibert M, Olejniczak K (2003) Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water. *Toxicol Lett.*, 142:157–167

WHO: *World Cancer Report 2008*. In: Boyle P, Levin B, editors. 150 cours Albert Thomas, 69372 Lyon Cedex 08, France; 2008.

Wim H De Jong, Paul JA Borm. 2008. Drug delivery and nanoparticle: Applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine* 3(2), 133-149.

Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, Rau B, Gellermann J, Riess H, et al. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol.*, 2002; 3: 487–97.

Yan S., B. Yao, L. Lian, X. Lu, S. A. Snyder, R. Li and W. Song, *Environ. Sci. Technol.*, 2017, 51, 2738-2747.

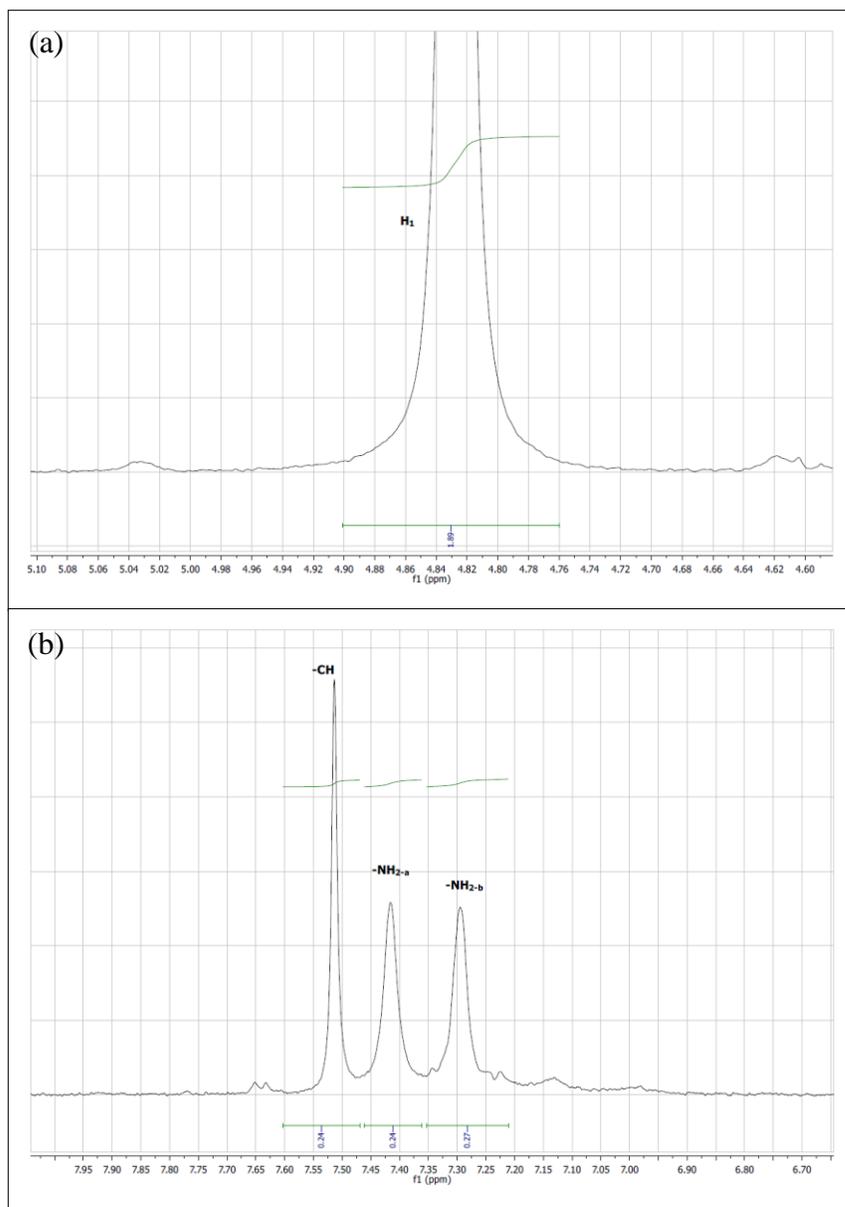
Zhang J, ChangVWC, Giannis A, Wang JY. 2013. Removal of cytostatic drugs from aquatic environment: a review. *Sci Total Environ.*, 445–446:281–298.

Zhang Q.Q., Ying G. G., Pan C. G., Liu Y. S. and Zhao J. L., *Environ. Sci. Technol.*, 2015, 49, 6772-6782.

Zuccato E, Castiglioni S, Fanelli R (2005) Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. *J Hazard Mater.*, 122:205–209.

## 6. ANEXOS

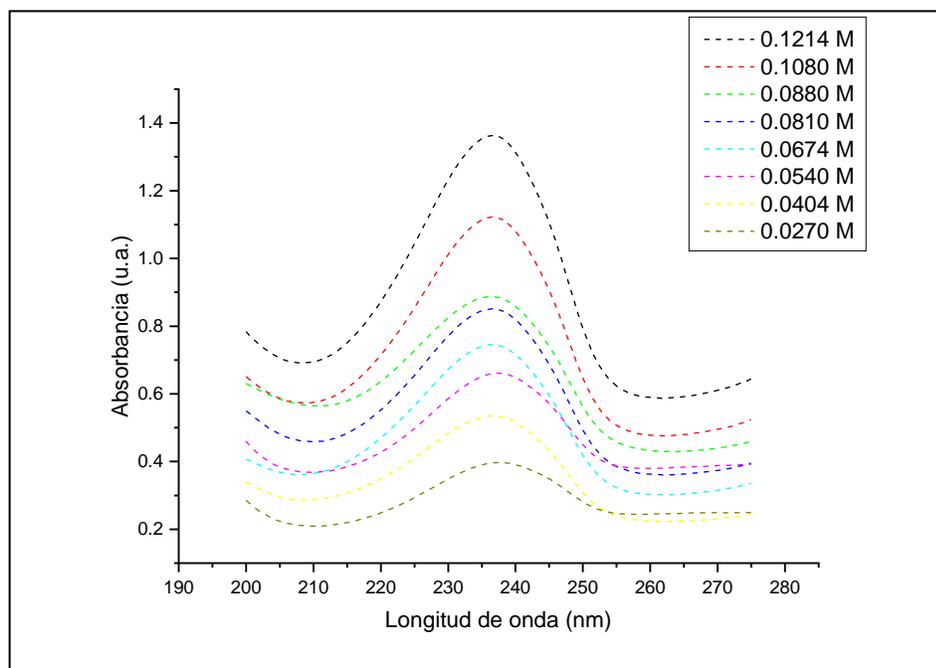
### 6.1 Caracterizaciones para estudio de CI



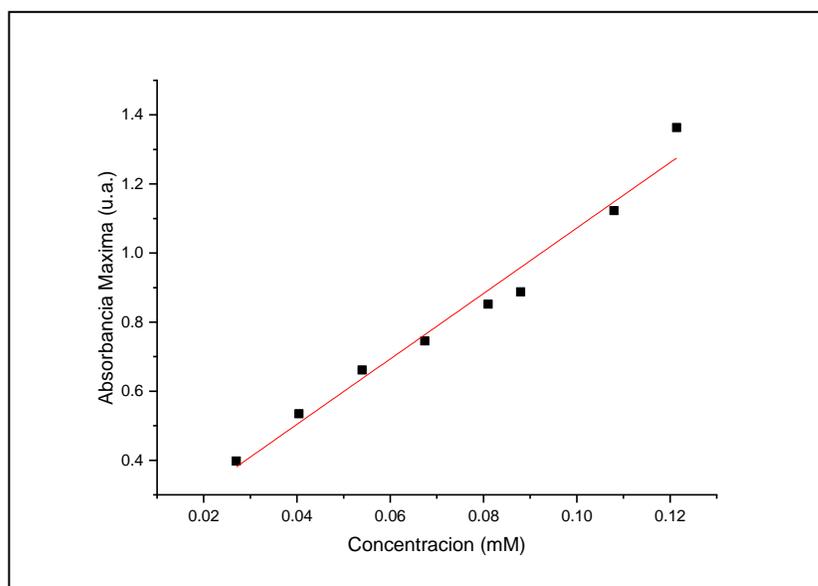
**Figura 6.1:** Integración de señales de  $\text{H}^1\text{-RMN}$  del CI: (a) zona de amida y protón del anillo imidazol y (b) protón  $\text{H}_1$  de  $\beta\text{CD}$ .

**Tabla 6.1:** Parámetros de ensayos realizados para la determinación del coeficiente de extinción molar de DB en solución acuosa, pH igual a 7 y 25°C.

$N^{\circ}$	Vol. DC ( $\mu\text{L}$ )	Vol. H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{L}$ )	[ ] = mM	Abs Máxima 237nm (u.a)
1	180	520	0.1214	1.3633
2	160	540	0.1080	1.1227
3	130	570	0.0880	0.8877
4	120	580	0.0810	0.8517
5	100	600	0.0674	0.7453
6	80	620	0.0540	0.6612
7	60	640	0.0404	0.5348
8	40	660	0.0270	0.3974



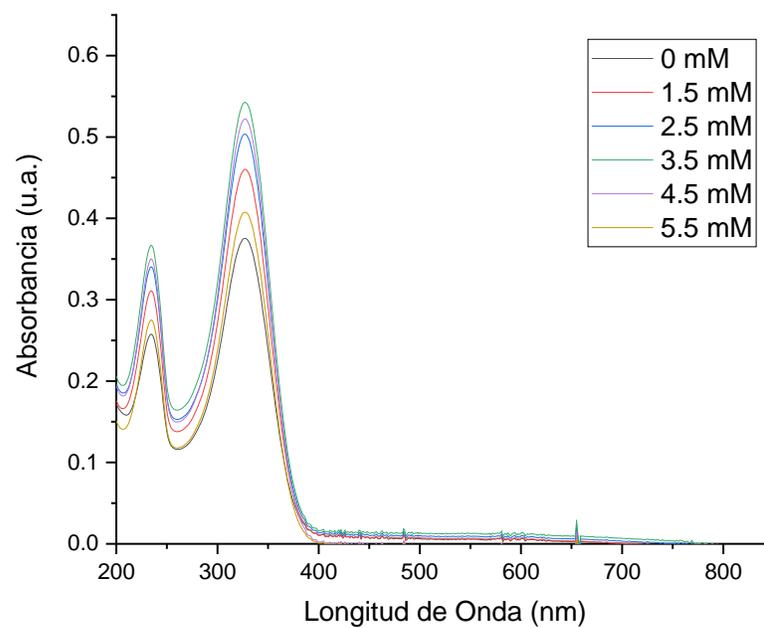
**Figura 6.2:** Bandas de absorbancia de DB a 235 nm en solución acuosa detectadas en los ensayos de determinación del coeficiente de extinción molar con DB a distintas concentraciones.



**Figura 6.3:** Regresión lineal de datos de la absorbancia a 235 nm en función de la concentración molar de DB.

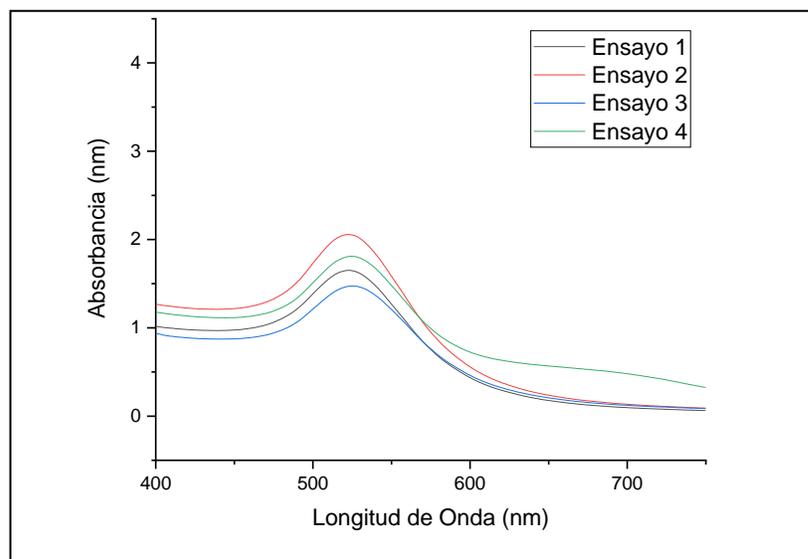
**Tabla 6.2:** Valores de coeficientes obtenidos para parámetros de ajuste matemático en la determinación de coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de DB en solución acuosa, donde la pendiente corresponde al valor de  $\epsilon$  ( $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

<b>Pendiente</b>	<i>0.97089</i>	
	<b>Valor</b>	<b>Error estándar</b>
<b>Intercepto</b>	<i>0.12513</i>	<i>0.04917</i>

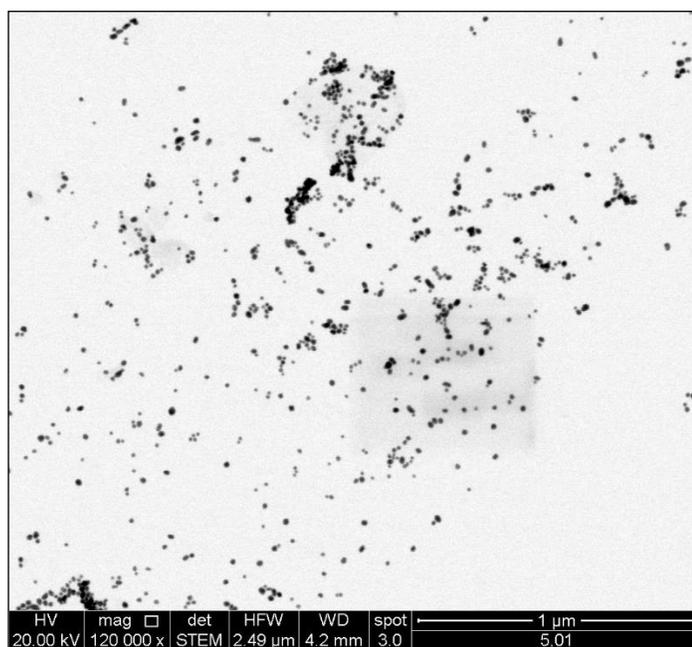


**Figura 6.4:** Ensayos realizados para determinación de constante de asociación por método de fases, mediante la mezcla de DB y  $\beta$ CD.

## 6.2 Caracterizaciones para estudio de AuNPs



**Figura 6.5:** Espectroscopía UV-vis para ensayos de preparación de AuNPs estabilizadas con citrato.



**Figura 6.6:** Microscopía TEM de AuNPs estabilizadas con citrato.

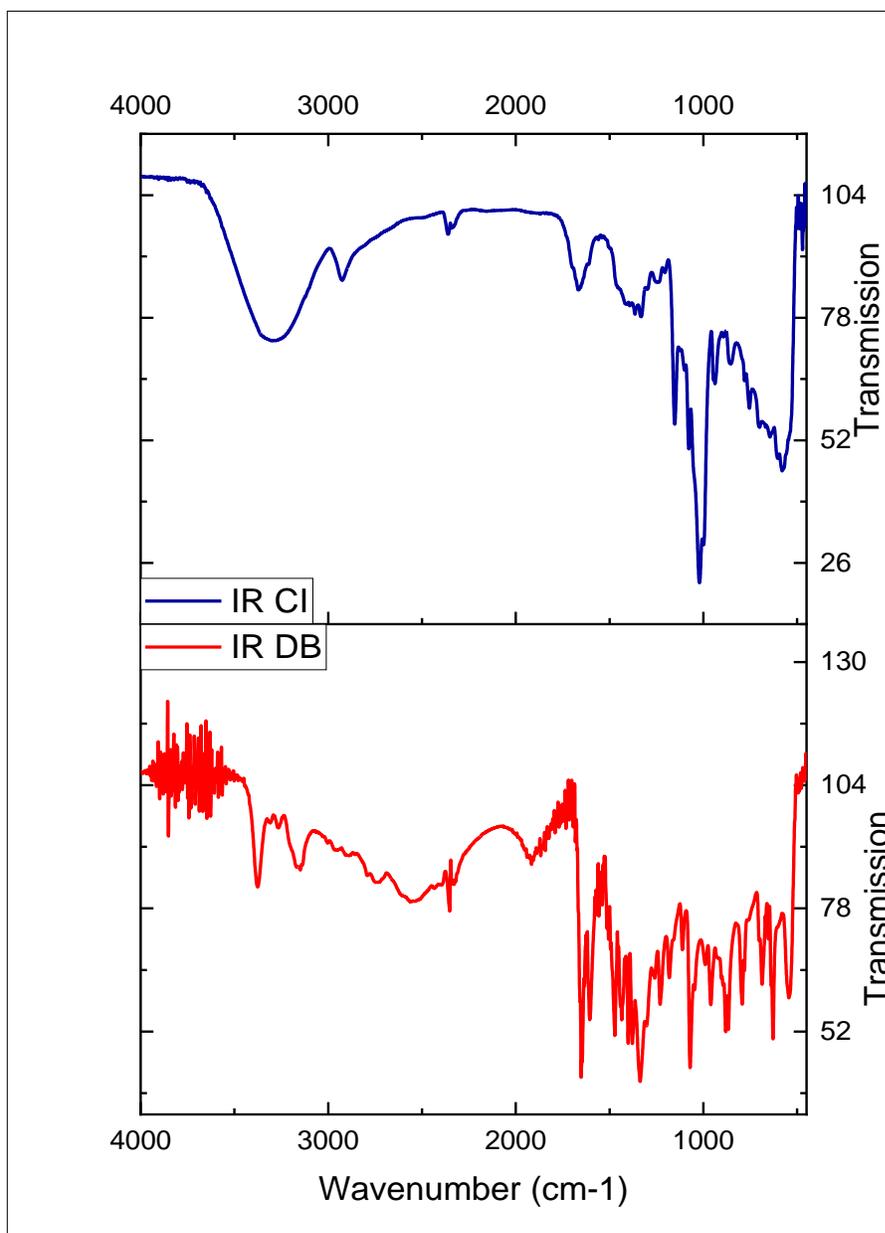
### 6.3 Caracterizaciones para Sistema Ternario

**Tabla 6.3:** Ejemplo de tanda de ensayos realizada para medición de DLS y Potencial Z.

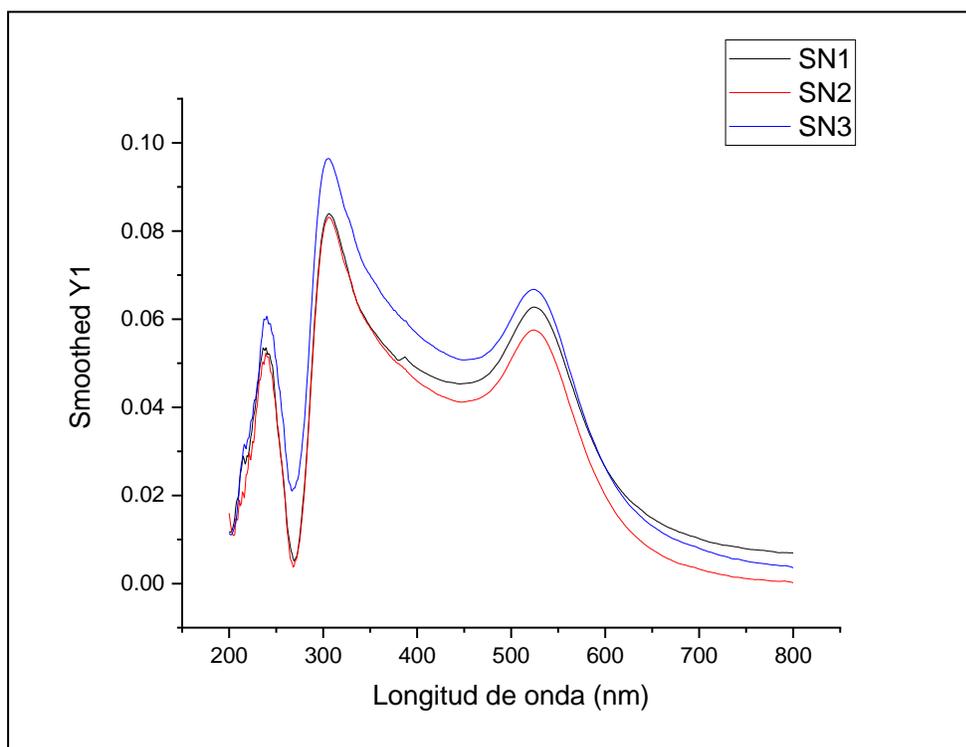
Número	Tipo de medición	Muestra	T	Z-Ave	ZP
			°C	d.nm	mV
1	Size	Au-f 01 1	25	30.67	
2	Size	Au-f 01 2	25	30.17	
3	Size	Au-f 01 3	25	31.09	
4	Zeta	Au-f 01 1	25		-36.9
5	Zeta	Au-f 01 2	25		-39.6
6	Zeta	Au-f 01 3	25		-39.2
7	Size	Au-c 01 1	25	37.97	
8	Size	Au-c 01 2	25	40.37	
9	Size	Au-c 01 3	25	39.51	
10	Zeta	Au-c 01 1	25		-18.1
11	Zeta	Au-c 01 2	25		-18.7
12	Zeta	Au-c 01 3	25		-25
13	Size	Au-F 02 1	25	29.64	
14	Size	Au-F 02 2	25	30.03	
15	Size	Au-F 02 3	25	30.12	
16	Zeta	Au-F 02 1	25		-30.7
17	Zeta	Au-F 02 2	25		-25.5
18	Zeta	Au-F 02 3	25		-33.1
19	Size	Au-F 03 1	25	35.33	
20	Size	Au-F 03 2	25	37.03	
21	Size	Au-F 03 3	25	38.28	
22	Zeta	Au-F 03 1	25		-31.8
23	Zeta	Au-F 03 2	25		-34.2
24	Zeta	Au-F 03 3	25		-35.3
25	Size	Au-C 02 1	25	41.77	
26	Size	Au-C 02 2	25	40.58	
27	Size	Au-C 02 3	25	50.13	
28	Size	Au-C 03 1	25	43.46	
29	Size	Au-C 03 2	25	43.1	
30	Size	Au-C 03 3	25	43.18	
31	Zeta	Au-C 03 1	25		-20.5
32	Zeta	Au-C 03 2	25		-16.5
33	Zeta	Au-C 03 3	25		-19

**Tabla 6.4:** Asignación de señales para Dacarbazina en espectro Raman (En base a: Gunasekaran y col. 2008).

<b>Freq/cm<sup>-1</sup></b>	<b>Observed</b>	<b>Assignment</b>
<b>312</b>	330	N-C-C and N-N-C scissoring modes
<b>414</b>	436	N-C-O scissoring
<b>568</b>	558	N-N-N scissoring and amide bond in-plane bending
<b>602</b>	638	N-C-O scissoring and C-N(azide) in-plane bending
<b>799</b>	802	C-N-C stretching and ring in-plane deformation
<b>800</b>		C-N-C stretching and ring in-plane deformation
<b>912</b>	908	Ring deformation and N-CH <sub>3</sub> stretching
<b>955</b>	964	Ring in-plane deformation
<b>1074</b>	1074	NH <sub>2</sub> rocking and ring in-plane deformation
<b>1100</b>	1117	NH <sub>2</sub> rocking and CH <sub>3</sub> rocking
<b>1152</b>	1137	CH <sub>3</sub> twisting
<b>1233</b>	1222	Aromatic C-N stretching and NH <sub>2</sub> rocking
<b>1260</b>	1267	Aromatic C-H bending and ring deformation
<b>1328</b>	1302	C-N-C symmetric stretching
<b>1348</b>	1341	Ring in-plane bending, azide N-N stretching, and C-NH <sub>2</sub> stretching
<b>1387</b>	1372	Ring in-plane bending and azide N-N stretching
<b>1429</b>	1402	CH <sub>3</sub> twisting, azide N-N stretching and ring bending
<b>1452</b>	1411	CH <sub>3</sub> scissoring
<b>1498</b>	1444	Azide N-N stretching and CH <sub>3</sub> scissoring
<b>1525</b>	1489	Ring stretching and CH <sub>3</sub> scissoring
<b>1526</b>	1508	CH <sub>3</sub> scissoring
<b>1587</b>	1545	NH <sub>2</sub> scissoring
<b>1607</b>	1585	NH <sub>2</sub> scissoring and aromatic C-C stretching
<b>1740</b>	1650	C=O stretching



**Figura 6.7:** Espectros IR para DB y CI.



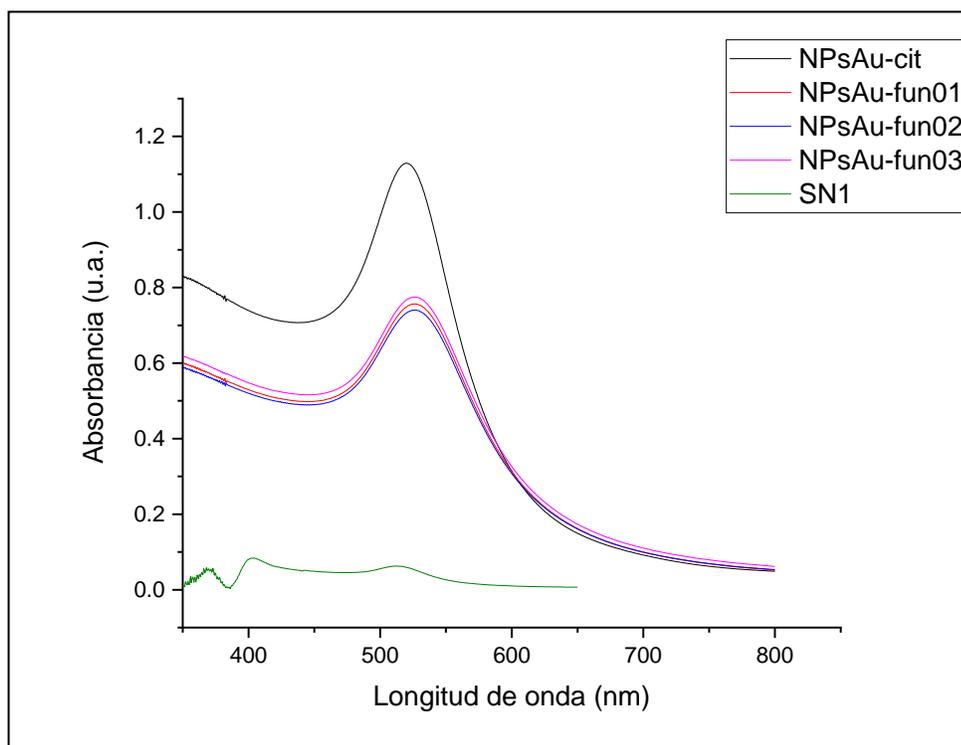
**Figura 6.8:** UV-vis de sobre nadantes (SN) de sistema ternario.

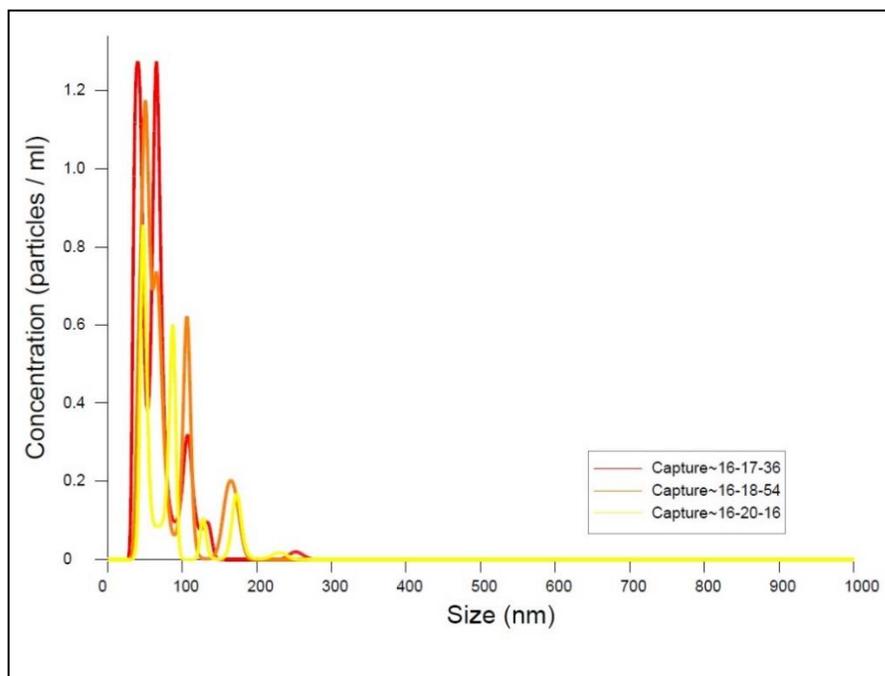
**Tabla 6.5:** Masas de DB detectadas en sobrenadantes (SN) del sistema ternario luego de la centrifugación.

Muestra	Masa de DB (g)
SN1	$5.30 \cdot 10^{-8}$
SN2	$2.81 \cdot 10^{-8}$
SN3	$1.10 \cdot 10^{-8}$
SNA	$7.09 \cdot 10^{-8}$
SNB	$7.02 \cdot 10^{-8}$
SNC	$8.72 \cdot 10^{-8}$

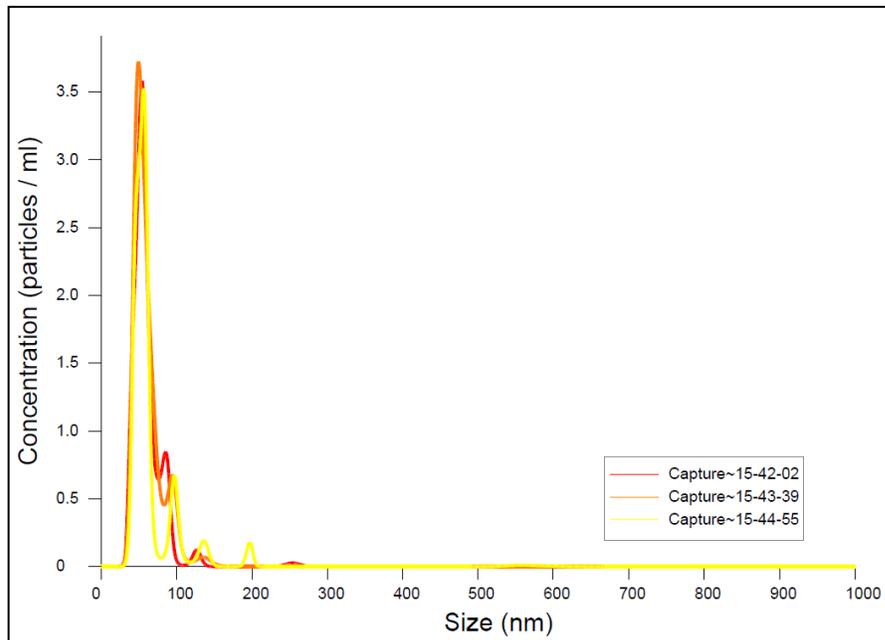
**Tabla 6.6:** Masas de DB liberadas en cada intervalo en ensayos de irradiación láser.

Tiempo de Irradiación (min)	Ensayo 1 (g)	Ensayo 2 (g)	Ensayo 3 (g)	Ensayo 4 (g)	Promedio (g)	Desviación Estándar
0	$2.44 \cdot 10^{-6}$	$3.46 \cdot 10^{-7}$	$3.20 \cdot 10^{-6}$	$7.18 \cdot 10^{-7}$	$3.03 \cdot 10^{-6}$	$1.32 \cdot 10^{-6}$
15	$2.63 \cdot 10^{-6}$	$4.14 \cdot 10^{-6}$	$3.51 \cdot 10^{-6}$	$1.01 \cdot 10^{-6}$	$3.43 \cdot 10^{-6}$	$1.20 \cdot 10^{-6}$
30	$3.86 \cdot 10^{-5}$	$4.72 \cdot 10^{-6}$	$3.57 \cdot 10^{-6}$	$1.24 \cdot 10^{-6}$	$4.05 \cdot 10^{-6}$	$1.77 \cdot 10^{-6}$
45	$3.97 \cdot 10^{-6}$	$5.51 \cdot 10^{-6}$	$3.70 \cdot 10^{-6}$	$7.46 \cdot 10^{-6}$	$4.40 \cdot 10^{-6}$	$1.72 \cdot 10^{-6}$
60	$4.01 \cdot 10^{-6}$	$6.71 \cdot 10^{-6}$	$3.82 \cdot 10^{-6}$	$2.21 \cdot 10^{-6}$	$4.90 \cdot 10^{-6}$	$1.86 \cdot 10^{-6}$

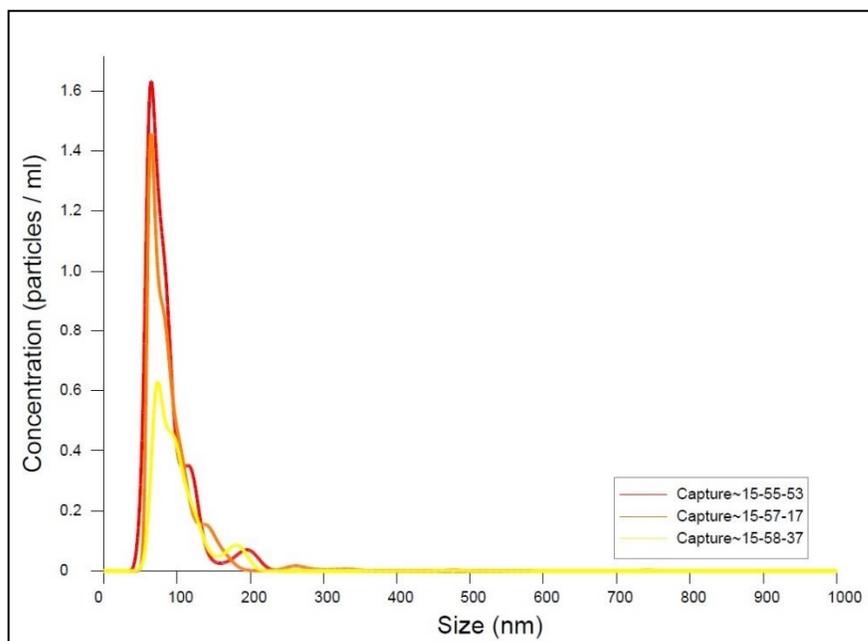
**Figura 6.9:** UV-vis para AuNPs estabilizadas con citrato (NPsAu-cit), funcionalización con estabilizantes CI-PEG y sobrenadante (SN1) obtenido producto de centrifugación.



**Figura 6.10:** Ensayos de NTA para AuNPs.



**Figura 6.11:** Ensayos de NTA para Sistema Ternario guardado a 4°C.



**Figura 6.12:** Ensayos de NTA para Sistema ternario guardado a temperatura ambiente.