

UCH-Fc  
MAD-G  
A 816  
C.1



# **SÍNTESIS DE NANOESPONJAS DE $\beta$ -CICLODEXTRINA Y LA INTERACCIÓN CON NANOPARTÍCULAS DE ORO COMO SISTEMA TRANSPORTADOR DE FÁRMACOS**

**Tesis Entregada A La Universidad De Chile**

**En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos**

**Para Optar Al Grado De**

**Magíster en Ciencias Químicas**

**Facultad De Ciencias**

**Por**

**Isabel Leonora Asela Montes**



**Septiembre, 2017**

**Director de Tesis:**

**Dr. Nicolás Ignacio Yutronic Saéz**

**Co-director:**

**Dr. Rodrigo Alfredo Sierpe Bustamante**

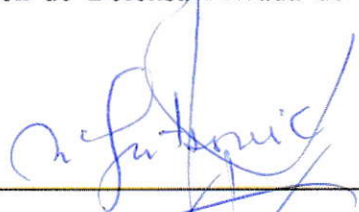
FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE  
INFORME DE APROBACION  
TESIS DE MAGÍSTER

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

ISABEL LEONORA ASELA MONTES

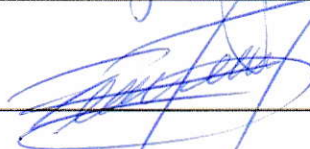
Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Químicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 22 de septiembre de 2017.

Director de Tesis:  
Dr. Nicolás Yutronic Sáez



---

Co-Director de Tesis:  
Dr. Rodrigo Sierpe Bustamante



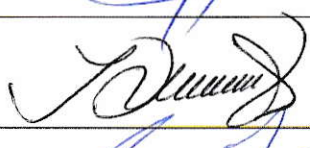
---

Comisión de Evaluación de la Tesis:  
Dr. Paul Jara Vergara (presidente)



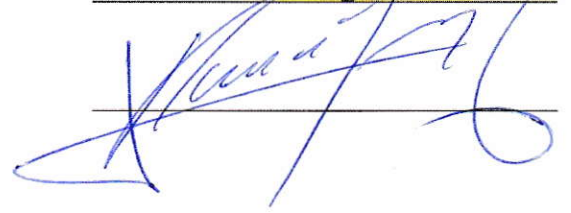
---

Dra. Inés Ahumada Torres



---

Dr. Victor Manriquez Castro



---

Tu verdad aumentará en la medida que sepas escuchar la verdad de los otros.

Martin Luther King.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Rosa María Montes, mi madre, pues gracias a ella, su fuerza y su temple yo he logrado todo lo que soy.

A Camilo y Sofía, mi hermano y sobrina, por estar siempre atentos e interesados en esto que yo hago.

A Eduardo, mi pareja, mi compañero y amigo, que ha estado conmigo en todo momento, por entenderme, apoyarme y dejarme ser.

Al profesor Nicolás, por aceptarme en el laboratorio y permitirme ser parte de este grupo de investigación desde hace ya 4 años. Y a Rodrigo por todo su apoyo, enseñanzas y acompañamiento en todo este largo proceso, él ha sido una parte fundamental en el desarrollo de esta investigación.

A los profesores de la comisión, por sus consejos y su comprensión en este proceso tan rápido que las circunstancias nos han impuesto.

A la “nueva patrulla juvenil”, amigos entrañables con los que he podido ser yo, sin vergüenzas ni tapujos, los que estamos desde hace ya ocho años juntos y los que se nos han ido uniendo. Por lo que fuimos, lo que somos y lo que seremos, juntos, estemos donde estemos.

A mis amigos del Laboratorio de Síntesis Inorgánica y Electroquímica, todas personas buenas, de mente y corazón cálidos, con sueños de ser grandes científicos, y a los profesores del laboratorio, que a pesar de todo están ahí presentes.

A las nuevas personas que aparecieron en mi camino este último año, un grupo cálido que me aceptó y me hizo sentir cómoda y al que siempre recordaré con cariño, y al que espero volver a ver en algún tiempo más.

A mis muertos, por su protección.

Gracias a todos porque han sido, de una forma u otra, parte del desarrollo de esta investigación, pero más importante aún, parte de mi desarrollo personal.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	xv
ABSTRACT .....	xvii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. HIPÓTESIS.....	9
1.2. OBJETIVOS .....	10
1.2.1. Objetivo General.....	10
1.2.2. Objetivos Específicos.....	10
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	11
2.1. Metodología para la síntesis de nanoesponjas de $\beta$ -ciclodextrina.....	11
2.2. Pruebas de solubilidad de las nanoesponjas de $\beta$ -ciclodextrina.....	12
2.3. Formación de compuestos de inclusión con nanoesponjas de $\beta$ -ciclodextrina.....	13
2.4. Estudio de la constante de asociación.....	13
2.5. Síntesis y estabilización de nanopartículas de oro.....	15
2.6. Preparación de las muestras para análisis mediante resonancia magnética nuclear de protones $^1\text{H}$ -RMN.....	16
2.7. Preparación de las muestras para estudios mediante microscopía electrónica de barrido y de transmisión, SEM y TEM.....	16
2.8. Preparación de las muestras para estudios mediante dispersión dinámica de la luz y potencial Z, DLS y Z.....	17

2.9.	Equipos para la caracterización de las muestras. ....	17
2.9.1.	Resonancia magnética nuclear de protones, <sup>1</sup> H-RMN. ....	17
2.9.2.	Espectroscopia infrarroja, IR. ....	17
2.9.3.	Análisis termogravimétrico, TGA. ....	18
2.9.4.	Microscopía electrónica de barrido y de transmisión, SEM y TEM. ....	18
2.9.5.	Espectrofotometría UV-Visible, UV-Vis. ....	18
2.9.6.	Dispersión dinámica de la luz y potencial Z, DLS y Z. ....	19
2.9.7.	Liofilización de las muestras. ....	19
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	20
3.1.	Síntesis de nanoesponjas de β-ciclodextrina. ....	20
3.1.1.	Análisis mediante resonancia magnética nuclear de protones, <sup>1</sup> H-RMN. ....	21
3.1.2.	Análisis mediante espectroscopía infrarroja, IR. ....	25
3.1.3.	Análisis mediante microscopia electrónica de transmisión, TEM. ....	27
3.1.4.	Análisis mediante microscopia electrónica de barrido, SEM. ....	28
3.1.5.	Análisis termogravimétrico, TGA. ....	30
3.1.6.	Pruebas de solubilidad de las nanoesponjas de β-ciclodextrina. ....	33
3.2.	Inclusión de los fármacos en nanoesponjas de β-ciclodextrina. ....	34
3.2.1.	Análisis mediante resonancia magnética nuclear de protones, <sup>1</sup> H-RMN. ....	34
3.2.1.1.	Análisis <sup>1</sup> H-RMN para la inclusión del fármaco 2-amino-4-(4-clorofenil)tiazol. ....	38

3.2.1.2.	Análisis <sup>1</sup> H-RMN para la inclusión del fármaco feniletilamina.....	42
3.2.2.	Análisis mediante espectroscopía infrarroja, IR. ....	48
3.2.2.1.	Análisis IR para la inclusión del fármaco 2-amino-4-(4-clorofenil)tiazol... ..	48
3.2.2.2.	Análisis IR para la inclusión del fármaco feniletilamina. ....	50
3.2.3.	Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión, TEM. ....	52
3.2.3.1.	Análisis TEM para la inclusión del fármaco 2-amino-4-(4-clorofenil)tiazol.....	52
3.2.3.2.	Análisis TEM para la inclusión del fármaco feniletilamina.....	54
3.3.	Obtención de las constantes de asociación.....	55
3.4.	Síntesis de nanopartículas de oro. ....	61
3.4.1.	Análisis mediante espectrofotometría UV-Visible. ....	61
3.4.2.	Análisis TEM para nanopartículas de oro.....	63
3.5.	Formación del sistema ternario NPsAu-NS-Fármaco.....	64
3.5.1.	Estudio de la estabilización de NPsAu sobre los CI mediante espectrofotometría UV-Visible.....	64
3.5.2.	Análisis mediante microscopía electrónica de barrido, SEM. ....	69
3.5.2.1.	Análisis SEM para la inclusión del fármaco 2-amino-4-(4-clorofenil)tiazol.....	69
3.5.2.2.	Análisis SEM para la inclusión del fármaco feniletilamina. ....	70
3.6.	Estudio mediante dispersión dinámica de la luz, DLS, y potencial Z.....	72
4.	CONCLUSIONES .....	78

5. BIBLIOGRAFÍA .....	81
6. ANEXOS .....	89
6.1. Espectros <sup>1</sup> H-RMN para la síntesis de NS.....	89
6.2. Curvas de calibración y constante de asociación.....	92
6.3. Gráficos de tamaño y carga mediante análisis DLS y potencial Z.....	94



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. a) Representación estructural de la $\beta$ CD. b) Representación esquemática de una unidad de glucosa en el balde de ciclodextrina.....	2
Figura 2. Esquema general de la formación de NS usando una molécula reticulante. (Modificado de Trotta, 2012).....	4
Figura 3. Estructura molecular del fármaco 2-amino-4-(4-clorofenil)tiazol.....	6
Figura 4. Estructura molecular del fármaco feniletilamina.....	6
Figura 5. Espectros $^1\text{H}$ -RMN de la síntesis de NS 1:4 (rojo) y NS 1:8 (celeste).....	21
Figura 6. Espectros $^1\text{H}$ -RMN de DPC puro (azul), $\beta$ CD pura (verde) y NS sintetizadas mediante el método B a una razón 1:4 $\beta$ CD:DPC (rojo).....	23
Figura 7. Esquema de protones en la estructura de $\beta$ CD (a) y DPC (b). ....	24
Figura 8. Espectro IR de la NS sintetizada en razón 1:4 $\beta$ CD:DPC. ....	25
Figura 9. Espectro IR de $\beta$ CD pura.....	26
Figura 10. Espectro IR de DPC puro. ....	26
Figura 11. Micrografía TEM de campo claro para las NS sintetizadas a una amplitud de 30000x. ....	27
Figura 123. Histograma correspondiente a la población de tamaño de las NS sintetizadas de la figura 12.....	28
Figura 13. Micrografía TEM de campo claro para las NS sintetizadas a una amplitud de 60000x ..... .....	28
Figura 14. Micrografía SEM para las NS. ....	29

Figura 15. Micrografía SEM para cristales de $\beta$ CD.....	29
Figura 16. Termograma de $\beta$ CD pura.....	30
Figura 17. Termograma de DPC puro.....	31
Figura 18. Termograma de NS sintetizada.....	32
Figura 19. Espectros $^1\text{H}$ -RMN del precipitado liofilizado empleando el primer método de inclusión de AT en NS, en relaciones molares 1:2 (rojo) y 1:3 (celeste). ....	35
Figura 20. Espectros $^1\text{H}$ -RMN del sobrenadante liofilizado utilizando el primer método de inclusión de AT en NS, en las razones molares de inclusión 1:2 (rojo) y 1:3 (celeste). ....	36
Figura 21. Espectros $^1\text{H}$ -RMN del precipitado liofilizado empleando el primer método de inclusión de FEA en NS, en relaciones molares 1:2 (rojo) y 1:3 (celeste). ....	36
Figura 22. Espectros $^1\text{H}$ -RMN del sobrenadante liofilizado utilizando el primer método de inclusión de FEA en NS, en relaciones molares 1:2 (rojo) y 1:3 (celeste). ....	37
Figura 23. Estructuras moleculares con asignación de protones de los fármacos FEA (a) y AT (b). .....	38
Figura 24. Espectros $^1\text{H}$ -RMN de NS-AT empleando el primer método de síntesis para precipitado liofilizado en rojo y sobrenadante liofilizado en verde, NS puras en celeste y fármaco AT puro en violeta.....	38
Figura 25. Espectros $^1\text{H}$ -RMN empleando el segundo método de inclusión para NS-AT en el precipitado liofilizado (rojo) y en el sobrenadante liofilizado (verde), NS sintetizada (celeste) y fármaco AT puro (violeta). ....	39
Figura 26. Espectros $^1\text{H}$ -RMN del compuesto de inclusión NS-AT (rojo), NS (verde) y fármaco AT puro (azul).....	41

Figura 27. Espectros $^1\text{H}$ -RMN utilizando el primer método de inclusión para NS-FEA en el precipitado liofilizado (rojo) y en el sobrenadante liofilizado (verde), NS sintetizada (celeste), fármaco FEA pura (morado).....	43
Figura 28. Espectros $^1\text{H}$ -RMN de la inclusión NS-FEA <sub>precipitado</sub> liofilizado (rojo), NS (verde) y fármaco FEA puro (azul). .....	44
Figura 29. Espectros $^1\text{H}$ -RMN del compuesto de la inclusión NS-FEA <sub>sobrenadante</sub> (rojo), NS (verde) y fármaco FEA puro (azul). .....	46
Figura 30. Espectro IR del CI NS-AT.....	48
Figura 31. Espectro IR de la NS. ....	49
Figura 32. Espectro IR del fármaco AT puro.....	49
Figura 33. Espectro IR del CI NS-FEA <sub>sobrenadante</sub> . ....	50
Figura 34. Espectro IR del CI NS-FEA <sub>precipitado</sub> . ....	51
Figura 35. Espectro IR teórico del fármaco FEA. Obtenido del National Institute of Standards and Technology, U.S. Department of Commerce, NIST WebBook, SRD 69. ....	51
Figura 36. Micrografía TEM de campo claro de NS-AT, a una magnificación de 80000x.....	52
Figura 37. Micrografía TEM de campo claro para dos nanopartículas de NS-AT a una magnificación de 80000x. ....	53
Figura 38. Micrografía TEM de campo claro de NS-AT a una magnificación de 80000x.....	53
Figura 39. Micrografías TEM de campo claro para NS-FEA en el precipitado liofilizado. ....	54
Figura 40. Micrografía TEM de campo claro para NS-FEA en el sobrenadante liofilizado. ....	54

Figura 41. Gráfica lineal entre la concentración de AT versus sus respectivos máximos de absorbancia a 290 nm.....	56
Figura 42. Gráfica lineal de la concentración de AT solubilizada versus la concentración de NS agregada.....	57
Figura 43. Gráfica lineal de la concentración de FEA versus sus respectivos máximos de absorbancia a 310 nm.....	58
Figura 44. Gráfica lineal de la concentración de FEA solubilizada versus la concentración de NS agregada.....	60
Figura 45. Espectro de absorbancia para las NPsAu diluidas a pH 5,5 (rojo) y pH 8,8 (negro) a un máximo de absorbancia de 527,5 nm.....	62
Figura 46. Micrografía TEM de campo claro para NPsAu sintetizadas con magnificación de 90000x.....	63
Figura 47. Micrografía TEM de campo claro para NPsAu sintetizadas con magnificación de 160000x (izquierda) y el histograma correspondiente a la población de NPsAu presentes en dicha micrografía (derecha).....	64
Figura 48. Espectro de absorbancia para el sistema NPsAu-NS-AT antes de centrifugar (negro), de la resuspensión luego de centrifugar (rojo) y del sobrenadante luego de centrifugar (azul)...	65
Figura 49. Espectro de absorbancia para el sistema NPsAu-NS-FEA <sub>sobrenadante</sub> antes de centrifugar (negro), de la resuspensión después de centrifugar (rojo) y del sobrenadante después de centrifugar (azul).....	67

Figura 50. Espectro de absorbancia para el sistema NPsAu-NS-FEA <sub>precipitado</sub> antes de centrifugar (negro), de la resuspensión después de centrifugar (rojo) y del sobrenadante después de centrifugar (azul). .....	68
Figura 51. Micrografía SEM para una NS del CI NS-AT con NPsAu estabilizadas sobre su superficie.....	70
Figura 52. Micrografía SEM para una NS del precipitado liofilizado del CI NS-FEA con NPsAu estabilizadas sobre su superficie. ....	71
Figura 53. Micrografía SEM para una NS del sobrenadante liofilizado del CI NS-FEA con NPsAu estabilizadas sobre su superficie. ....	71
Figura 54. Gráfico de barras para la distribución del diámetro hidrodinámico por DLS con su respectiva desviación estándar de los distintos sistemas medidos. ....	74
Figura 55. Gráfico de barras para la carga superficial con su respectiva desviación estándar de los distintos sistemas medidos. ....	77
Figura 56. Curva de calibración para la obtención del coeficiente de extinción molar para AT. ....	92
Figura 57. Gráfico de absorbancias para la obtención de la constante de asociación para AT....	92
Figura 58. Curva de calibración para la obtención del coeficiente de extinción molar para FEA. ....	93
Figura 59. Gráfico de absorbancias para la obtención de la constante de asociación para FEA. ....	93
Figura 60. Gráfico de distribución de tamaños (intensidad) para el sistema NPsAu-citrato no filtrado.....	94
Figura 61. Gráfico de carga (cuentas totales) para el sistema NPsAu-citrato no filtrado. ....	94

Figura 62. Gráfico de distribución de tamaños (intensidad) para el sistema NPsAu-citrato filtrado. .....	95
Figura 63. Gráfico de carga (cuentas totales) para el sistema NPsAu-citrato filtrado. ....	95
Figura 64. Gráfico de distribución de tamaños (intensidad) para el sistema NPsAu-NS filtrado.	95
Figura 65. Gráfico de carga (cuentas totales) para el sistema NPsAu-NS filtrado. ....	96
Figura 66. Gráfico de distribución de tamaños (intensidad) para el sistema NPsAu-NS filtrado y centrifugado. ....	96
Figura 67. Gráfico de carga (cuentas totales) para el sistema NPsAu-NS filtrado y centrifugado. .....	96
Figura 68. Gráfico de distribución de tamaños (intensidad) para el sistema NPsAu-NS-AT no filtrado.....	97
Figura 69. Gráfico de carga (cuentas totales) para el sistema NPsAu-NS-AT no filtrado. ....	97
Figura 70. Gráfico de distribución de tamaños (intensidad) para el sistema NPsAu-NS-AT filtrado. .....	97
Figura 71. Gráfico de carga (cuentas totales) para el sistema NPsAu-NS-AT filtrado. ....	98
Figura 72. Gráfico de distribución de tamaños (intensidad) para el sistema NPsAu-NS- FEA <sub>sobrenadante</sub> filtrado. ....	98
Figura 73. Gráfico de carga (cuentas totales) para el sistema NPsAu-NS-FEA <sub>sobrenadante</sub> filtrado.	98
Figura 74. Gráfico de distribución de tamaños (intensidad) para el sistema NPsAu-NS-FEA <sub>precipitado</sub> filtrado.....	99
Figura 75. Gráfico de carga (cuentas totales) para el sistema NPsAu-NS-FEA <sub>precipitado</sub> filtrado..	99

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Resumen de síntesis de NS. ....	12
Tabla 3.1. Rendimientos obtenidos para cada síntesis de nanoesponjas. ....	20
Tabla 3.2. Desplazamiento de las señales de los protones de $\beta$ CD para las dos relaciones molares utilizadas en síntesis y el delta de desplazamientos calculado. ....	22
Tabla 3.3. Señales de los protones de $\beta$ CD y NS 1:4 con su desplazamiento químico. ....	24
Tabla 3.4. Solubilidad de NS en distintos solventes. ....	33
Tabla 3.5. Desplazamientos químicos $^1\text{H}$ -RMN para el compuesto de inclusión de NS con el fármaco AT. ....	41
Tabla 3.6. Desplazamientos químicos para el compuesto de inclusión formado entre NS y fármaco FEA en el precipitado previamente liofilizado de la mezcla. ....	45
Tabla 3.7. Desplazamientos químicos para el compuesto de inclusión formado entre la NS y fármaco FEA en el sobrenadante de la mezcla. ....	47
Tabla 3.8. Datos de volúmenes y concentraciones del fármaco AT en agua y sus máximos de absorbancia a 290 nm. ....	55
Tabla 3.9. Valores de los diferentes ensayos realizados para calcular la $K_a$ del sistema NS-AT en agua. ....	57
Tabla 3.10. Datos de volúmenes y concentraciones fármaco FEA en agua y sus máximos de absorbancia a 310 nm. ....	58
Tabla 3.11. Valores de los diferentes ensayos realizados para calcular la $K_a$ del sistema NS-FEA en agua. ....	59

Tabla 3.12. Datos obtenidos a partir del estudio por espectrofotometría UV-visible para las NPsAu.....	62
Tabla 3.13. Datos obtenidos a partir del estudio por espectrofotometría UV-visible para el sistema NPsAu-NS-AT.....	66
Tabla 3.14. Valores de absorbancia y longitud de onda. Datos obtenidos a partir del estudio por espectrofotometría UV-Visible para el sistema NPsAu-NS-FEA <sub>sobrenadante</sub> .....	67
Tabla 3.15. Valores de absorbancia y longitud de onda. Datos obtenidos a partir del estudio por espectrofotometría UV-visible para el sistema NPsAu-NS-FEA <sub>precipitado</sub> .....	68
Tabla 3.16. Datos obtenidos a partir del estudio por dispersión dinámica de la luz (DLS) para cada sistema medido, triplicado para cada uno.....	73
Tabla 3.17. Datos de la carga superficial y su porcentaje presente en las distintas muestras, triplicado para cada uno.....	76
Tabla 6.1. Descripción de las señales de los protones para las inclusiones 1:2 y 1:3 del CI NS-AT <sub>precipitado</sub> siguiendo el primer método.....	89
Tabla 6.2. Descripción de las señales de los protones para las inclusiones 1:2 y 1:3 del CI NS-AT <sub>sobrenadante</sub> siguiendo el primer método.....	90
Tabla 6.3. Descripción de las señales de los protones para las inclusiones 1:2 y 1:3 del CI NS-FEA <sub>precipitado</sub> siguiendo el primer método.....	90
Tabla 6.4. Descripción de las señales de los protones para las inclusiones 1:2 y 1:3 del CI NS-FEA <sub>sobrenadante</sub> siguiendo el primer método de síntesis.....	91



## ABREVIATURAS

AT: 2-amino-4-(4-clorofenil)tiazol

$\beta$ CD:  $\beta$ -ciclodextrina

CI: compuesto(s) de inclusión

DPC: difenilcarbonato

FEA: feniletilamina

NaOH: hidróxido de sodio

NPsAg: nanopartículas de plata

NPsAu: nanopartículas de oro

NPsM: nanopartículas metálicas

NS: nanoesponjas de  $\beta$ -ciclodextrina

US: ultrasónico/ultrasonido

## RESUMEN

En la presente investigación se ha estudiado el proceso de inclusión de dos moléculas de interés farmacéutico en nanoesponjas de  $\beta$ -ciclodextrina (NS), y la interacción de estos sistemas con nanopartículas de oro (NPsAu).

Para la formación de las NS se evaluaron dos métodos de síntesis entre moléculas de  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD) y difenilcarbonato (DPC) como moléculas puente, en el primer método se empleó un baño ultrasónico a temperatura constante y el segundo método consistió en emplear agitación y temperatura constante en una placa magnética, ambas estrategias se realizaron en ausencia de solventes líquidos. Una vez obtenidas las NS, en las múltiples cavidades formadas por los baldes de  $\beta$ CD y los espacios intersticiales originados por el puente de DPC, se incluyeron los fármacos huésped que poseen un anillo aromático en su estructura. Para las inclusiones se utilizaron dos métodos, uno clásico de disoluciones saturadas y otro que implica la disolución de las NS en hidróxido de sodio.

Ambas moléculas que actúan como huéspedes poseen además grupos funcionales en su estructura que permanecen expuestos hacia las aberturas de la matriz, por ello fue posible estabilizar NPsAu en la superficie del compuesto de inclusión. La síntesis de las NPsAu se llevó a cabo mediante un método químico, basado en la reducción de  $\text{Au}^{3+}$  en solución acuosa.

La caracterización de los distintos sistemas obtenidos se realizó a través de espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protones, análisis termogravimétrico, espectrofotometría UV-Vis, espectroscopía infrarroja, microscopía electrónica de barrido, microscopía electrónica de transmisión, potencial Z y dispersión dinámica de la luz (DLS).

Las NS aumentaron la inclusión de los fármacos respecto al uso de la  $\beta$ CD nativa como matriz, originando sistemas adecuados para la estabilización de NPsAu, lo que podría ampliar sus aplicaciones en el campo del *drug delivery*.

## ABSTRACT

In the present research the process of inclusion of two molecules of pharmaceutical interest in nanosponges of  $\beta$ -cyclodextrin (NS), and the interaction of these systems with gold nanoparticles (NPsAu) have been studied.

Two synthesis methods were evaluated for  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ CD) and diphenylcarbonate (DPC) as bridge molecules for the formation of NS. In the first method, an ultrasonic bath was used at constant temperature and the second method consisted of using agitation and constant temperature in a magnetic plate, both strategies were carried out in the absence of liquid solvents. Once the NS were obtained in the multiple cavities formed by the  $\beta$ CD buckets and the interstitial spaces originated by the DPC bridges, host drugs possessing an aromatic ring in their structure were included. For the inclusions two methods were used, one classical of saturated solutions and another that involves the dissolution of NS in sodium hydroxide.

Both host-acting molecules also have functional groups in their structure that remain exposed to the matrix openings, so it was possible to stabilize NPsAu on the surface of the inclusion compound. The synthesis of the NPsAu was carried out by a chemical method, based on the reduction of  $\text{Au}^{3+}$  in aqueous solution.

The characterization of the different systems was performed through proton nuclear magnetic resonance spectroscopy, thermogravimetric analysis, UV-Vis spectrophotometry, infrared spectroscopy, scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, Z-potential and dynamic light scattering (DLS).

The NS increased the inclusion of the drugs with respect to the use of the native  $\beta$ CD as matrix, giving adequate systems for the stabilization of NPsAu, which could expand its applications in the field of drug delivery.

## 1. INTRODUCCIÓN

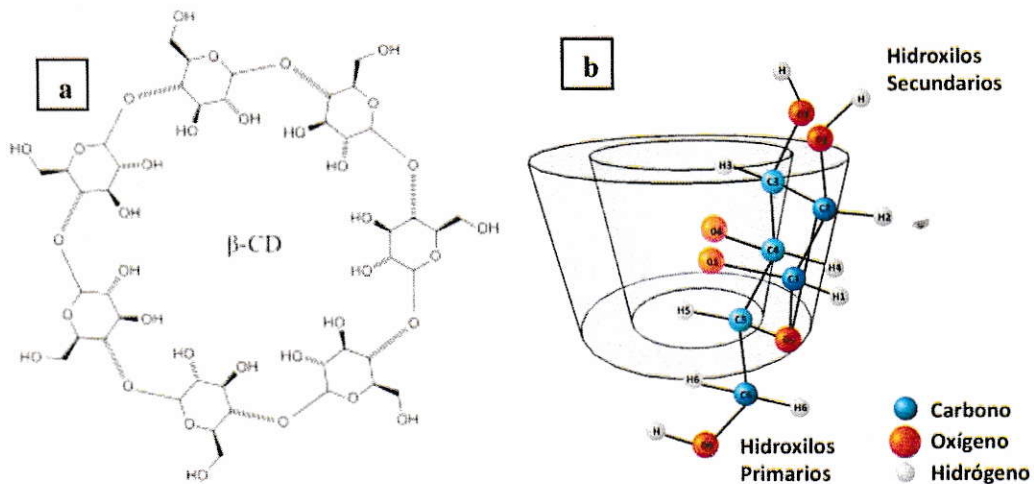
La convergencia entre las áreas de la nanoquímica y la química supramolecular genera un nuevo campo de investigación con potenciales aplicaciones en catálisis o en administración de fármacos, por ejemplo.

El concepto de química supramolecular fue descrito por primera vez en 1978 por Jean-Marie Lehn quien la define como *“la química que va más allá de la molécula, que da origen a entidades organizadas de mayor complejidad que resultan de la asociación de dos o más especies químicas que se mantienen unidas por fuerzas intermoleculares”* (Lehn, 1995); estas fuerzas son, en su mayoría, fuerzas de van der Waals y fuerzas electrostáticas. Como estas interacciones son generalmente más débiles que los enlaces covalentes se dice que la química supramolecular representa una *“química suave”* (Lehn, 1995). Esta disciplina estudia el reconocimiento molecular y la formación de agregados supramoleculares, es decir, de moléculas que interactúan entre sí por enlaces no covalentes. Algunos ejemplos de agregados supramoleculares son las enzimas, micelas, coloides y ciclodextrinas, entre otros.

En química supramolecular se utilizan los términos huésped y matriz, haciendo una analogía al término *“llave-cerradura”* enunciado por Emil Fischer (Fischer, 1890), ya que para formar la nueva supramolécula, existe una molécula matriz que debe envolver total o parcialmente al sustrato o molécula huésped. Para que la matriz envuelva al huésped debe existir un ensamblaje geométrico selectivo entre ambas partes de la supramolécula, al igual que ocurre en la unión *“llave-cerradura”*.

Esta unión selectiva “matriz-huésped” ocurre por un fenómeno denominado “reconocimiento molecular” y es este reconocimiento lo que permite que se originen los compuestos de inclusión (CI).

Las ciclodextrinas(CD), que actúan como matrices formando CI, son oligosacáridos cíclicos compuestos por varias moléculas de glucosa. Existen varios tipos, siendo las más comunes la  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  ciclodextrina, que se diferencian entre sí por la cantidad de moléculas de glucosa que las conforman. La  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD) está compuesta por 7 moléculas unidas entre sí por un enlace glicosídico  $\alpha$ -1,4 (ver figura 1a) (Connors, 1997), adoptando un ordenamiento tridimensional de balde truncado, con grupos hidroxilos primarios que quedan expuestos en la parte más angosta e hidroxilos secundarios expuestos hacia la parte más ancha. En el interior de la cavidad formada, se encuentran los grupos CH y oxígenos glicosídicos (ver figura 1b). Todo esto le otorga una superficie exterior hidrofílica y una cavidad parcialmente hidrofóbica (Inoue, 1993).



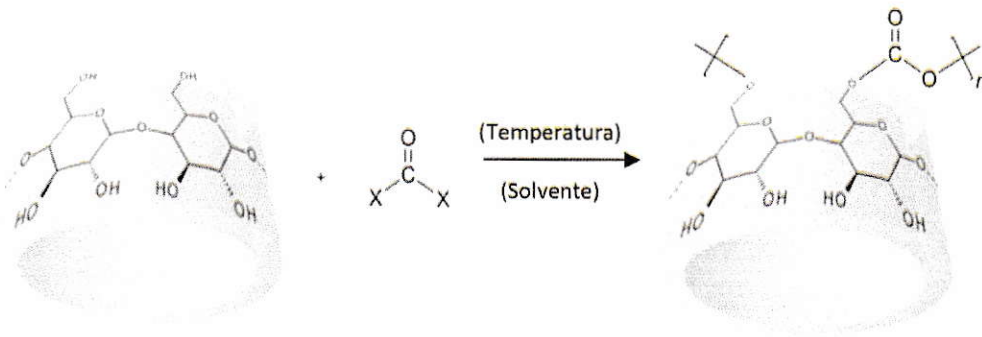
**Figura 1.** a) Representación estructural de la  $\beta$ CD. b) Representación esquemática de una unidad de glucosa en el balde de ciclodextrina.

Los nanomateriales son el objetivo principal de estudio de la nanoquímica en sus aspectos de síntesis y caracterización de sus propiedades físicas y químicas. La definición más simple de nanomateriales es que son aquellos que existen dentro de una escala dimensional entre 1 a 100nm y se pueden presentar en diversas formas, tales como nanoesferas, nanobarras, puntos cuánticos, etc. (Burda, 2005; Liu, 2012; Rao, 2004). Hoy en día, los nanomateriales forman parte del desarrollo de dispositivos electrónicos, catalizadores, como transportadores de fármacos en diversos sistemas biológicos, y en producción de energía mediante celdas solares, entre otros (Tala-Ighil, 2016; Yang, 2011).

Actualmente se han realizado modificaciones a los diferentes tipos de ciclodextrinas para la construcción de especies macromoleculares más complejas, como polímeros o incluso redes de  $\beta$ CD capaces de formar estructuras con un tamaño nanométrico, denominadas nanoesponjas (NS), debido a la forma que adquieren tras su ensamblaje; las NS, por lo tanto, se insertan en el campo de la nanociencia y de la química supramolecular. Las propiedades y funciones que poseen estas nuevas nanoestructuras son análogas a las observadas para las matrices de  $\beta$ CD nativa, sin embargo, la inclusión de moléculas que actúan como huéspedes al interior de las múltiples cavidades de una NS es favorecida por la capacidad de carga de la matriz, ya que su conformación espacial genera una mayor área superficial respecto a otras nanoestructuras. Tras el fenómeno de inclusión, las NS pueden aumentar la solubilidad acuosa de especies poco solubles, mejorar la entrega de fármacos, aumentar la estabilidad de moléculas protegiéndolas de la luz, de medios ácidos o básicos, o de reaccionar con otras especies químicas del entorno (Bardi, 2000). Las NS pueden capturar gases y albergar un mayor número de moléculas con dimensiones que sobrepasan el diámetro de cavidad de la  $\beta$ CD; todo esto implica que las NS tienen una aplicación directa en campos como farmacología, medicina, agricultura y medioambiente (Patel, 2014; Trotta, 2011; 2012).



Para la formación de las NS se utilizan diversos métodos de síntesis, que en general consisten en enlazar un cierto número de matrices de  $\beta$ CD usando un *crosslinker* o reticulante, que en condiciones adecuadas forma enlaces C-O entre dos unidades de  $\beta$ CD vecinas, a partir de los oxígenos de sus grupos hidroxilos primarios. La figura 2 representa un esquema que resume la síntesis descrita.



**Figura 2.** Esquema general de la formación de NS usando una molécula reticulante. (Modificado de Trotta, 2012).

Por otra parte, dentro de la nanociencia, las nanopartículas metálicas se destacan, ya que poseen propiedades específicas que dependen de su tamaño, naturaleza, morfología y ordenamiento espacial. (Lance, 2003; Daniel, 2004). Específicamente, las nanopartículas de oro (NPsAu) son ampliamente investigadas en campos como nanomedicina o *drug delivery*, debido entre otros múltiples factores, a que pueden ser funcionalizadas con diferentes moléculas como material genético, polímeros e incluso complejos supramoleculares. (Sierpe, 2015; Guerrero, 2014).

Las NPsAu presentan propiedades, ópticas, electrónicas, magnéticas, etc., intrínsecas a su tamaño, a su morfología y a su ordenamiento espacial (Weller, 1993). Estos efectos tienen consecuencias directas sobre su comportamiento superficial y la reactividad química, por ejemplo, cambios de color en estado sólido y en solución (Novak, 2000; Okamoto, 2004; Sosa, 2003) y de conductividad (Frenkel, 2001; Lewis, 1993).

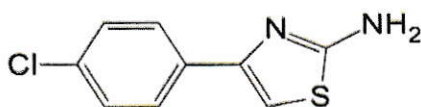
Las NPsAu en general, son altamente reactivas, pueden ser sintetizadas con distintos tamaños y formas y pueden ser estabilizadas con diversos ligandos, como polímeros, fármacos, material genético o complejos de inclusión (Kogan, 2007; Schmid, 2006). Grupos funcionales SH, NH<sub>2</sub> o COOH son comúnmente utilizados para estabilizar a estas nanoestructuras (Häkkinen, 2012; Pensa, 2012; Sierpe, 2015; Sperling, 2010), sin embargo, aunque son más conocidas las interacciones SH-NPsAu (Pensa, 2012; Schuetze 2016) y las interacciones NH<sub>2</sub>-NPsAg (Deng, 2016; Rameshkumar 2013) se ha demostrado que los grupos amino son tan eficientes para la estabilización de las NPsAu como los grupos tiol; por ejemplo, en el año 1996 se demostró que las aminas primarias forman enlaces parcialmente covalentes con NPsAu, asegurando que la interacción de un grupo NH<sub>2</sub> con Au es fuerte y similar a la producida con enlaces tiolados (Leff, 1996). Otra investigación mostró algunos resultados señalando que alcanotioles que cubren a las NPsAu pueden ser reemplazados por alquilaminas mediante un mecanismo de intercambio de ligandos, mientras que el proceso inverso, es decir, el intercambio de alquilaminas por alcanotioles no se produce (Kumar, 2003).

En los últimos años se han reportado una serie de CI formados por CD que albergan huéspedes que poseen estos grupos funcionales y por lo tanto pueden ser utilizados como sustrato para la formación y estabilización de nanopartículas metálicas generadas por pulverización catódica y reducción de una sal de Au. (Barricento, 2007, 2009, 2011; Herrera, 2013).

Un método comúnmente usado para la obtención de NPsAu mediante una síntesis química, es el llamado método de Turkevich (Turkevich, 1951), que consiste en emplear citrato como agente reductor de la sal metálica, el cual también detiene el crecimiento de las nanopartículas y las estabiliza. Una de las principales ventajas de este método es que se puede variar el tamaño de las NPsAu variando la relación citrato/HAuCl<sub>4</sub> (Daniel M, 2004), además, es posible cambiar el

citrato estabilizante por otros tipos de moléculas que tengan mayor afinidad por la superficie de átomos de Au, como los CI antes mencionados.

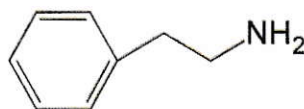
Diversos estudios han demostrado que los tiazoles y derivados de los mismos tienen diversas propiedades biológicas según la sustitución que tenga el anillo aromático, algunas de estas funciones biológicas son del tipo antifúngica, antibacteriana, antiinflamatoria (Holla, 2003), también son utilizados para el tratamiento de la hipertensión e infecciones por VIH (Das, 2006). El AT (ver figura 3), es uno de estos derivados, y es utilizado actualmente como agente antimicrobiano (Venkatachalam, 2001; Holla, 2003; Das, 2006).



**Figura 3.** Estructura molecular del fármaco 2-amino-4-(4-clorofenil)tiazol.

La molécula de AT presenta una baja solubilidad, sin embargo, se ha propuesto que al estar incluida en  $\beta$ CD, puede aumentar su solubilidad acuosa y mejorar su transporte en el organismo.

Por su parte, FEA (ver figura 4) es un estimulante psicoactivo que se utiliza como antidepresivo, ya que produce efectos como aumento del estado de vigilia, excitación y taquicardia. Este fármaco posee efectos similares a las anfetaminas, pero sin inducir tolerancia y adicción.



**Figura 4.** Estructura molecular del fármaco feniletilamina.

A pesar de sus propiedades favorables, se metaboliza rápidamente en el organismo con una vida media biológica que va desde los 30 segundos a los 10 minutos como máximo, sin alcanzar concentraciones significativas en el cerebro. Además, posee baja solubilidad acuosa y puede formar sales tras reaccionar con el CO<sub>2</sub> del medio (Suzuki, 1981; Sabelli, 1995; 1996; Szabo, 2001).

Tanto AT como FEA poseen en su estructura un anillo aromático que puede incluirse favorablemente al interior de las cavidades de las NS formando compuestos de inclusión (CI) y además, poseen grupos funcionales amino que, como se explicó anteriormente, pueden interactuar con los átomos superficiales de las NPsAu.

Las NPsAu presentan un alto interés en su aplicación como sistemas de liberación de fármacos, ya que poseen una alta solubilidad, estabilidad en sistemas vivos y mejoran la cinética de distribución de fármacos, por lo tanto, pueden actuar como vehículos de transporte y entrega sostenida de fármacos (Wang, 2010; Dykman, 2012). Debido al efecto plasmón que poseen las NPsM en general, y en este caso específico las NPsAu, es posible promover la liberación del fármaco de manera controlada a través de terapia fototérmica. La resonancia de plasmón superficial (RPS) o efecto plasmón, corresponde a la oscilación colectiva de los electrones superficiales del metal debido a su interacción con una onda electromagnética incidente. La absorción de energía origina una transición de los electrones de la superficie de un estado fundamental a otro excitado, luego, esta energía se disipa como calor local en todas las direcciones (efecto fototérmico), esto podría ser utilizado para la liberación de fármacos (Le Ru, 2009; Guerrero, 2014), por lo tanto, su estabilización sobre CI destinados a aplicaciones en entrega de fármacos potenciaría aún más esta función.

En esta investigación, se proponen algunos ajustes a los métodos ya reportados para la formación de NS, las que son obtenidas en estado sólido, incluyendo a los fármacos AT y FEA.

Adicionalmente, NPsAu serán sintetizadas por un método químico y depositadas sobre estos sistemas para ampliar sus potenciales aplicaciones.

## 1.1. HIPÓTESIS

Nanoesponjas de  $\beta$ -ciclodextrina pueden albergar dentro de sus múltiples cavidades a las moléculas 2-amino-4-(4-clorofenil)tiazol y feniletilamina, dejando los grupos funcionales de estos huéspedes expuestos hacia una de las aberturas de la matriz. Los CI formados pueden actuar como sustratos y estabilizar nanopartículas de oro para formar los sistemas ternarios NS-Huésped-NPsAu.

## **1.2. OBJETIVOS**

### **1.2.1. Objetivo General.**

- Estudiar el proceso de inclusión en nanoesponjas de  $\beta$ -ciclodextrina.
- Evaluar la interacción de los compuestos de inclusión con nanopartículas de oro.

### **1.2.2. Objetivos Específicos.**

- Sintetizar y caracterizar nanoesponjas de  $\beta$ -ciclodextrina.
- Caracterizar la inclusión de las moléculas huésped en nanoesponjas.
- Obtener y caracterizar nanopartículas de oro a través de la reducción de una sal de oro.
- Estabilizar las nanopartículas de oro usando el compuesto NS-Huésped.
- Caracterizar los sistemas ternarios NS-Huésped-NPsAu.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Metodología para la síntesis de nanoesponjas de $\beta$ -ciclodextrina.

Para la síntesis de NS se utilizaron como precursores  $\beta$ -ciclodextrina anhidra ( $\beta$ CD), con una masa molar de 1134,98 g/mol y una pureza del 99%, y difenilcarbonato (DPC), con una masa molar de 214,22 g/mol sin porcentaje de pureza reportado, ambos de Sigma-Aldrich.

Los métodos seguidos para la síntesis de NS se detallan a continuación.

#### **Método A.** (Patel, 2014)

En un balón de fondo redondo se mezclan 0,189 g de  $\beta$ CD, junto con 0,285 g de DPC, obteniéndose una razón molar 1:8, respectivamente. El balón se introduce en un baño ultrasónico a 90 °C durante 5 horas. Posteriormente, el producto sólido obtenido se lava reiteradas veces con agua destilada y se filtra en vacío durante 2 horas usando un matraz Kitasato con embudo Büchner, con una doble capa de papel filtro. El producto se lava por 24 horas con etanol en un sistema Soxhlet y finalmente se seca y se guarda en un frasco ámbar con sello de teflón. El protocolo puede ser replicado para diferentes relaciones molares, siempre con un exceso de DPC.

#### **Método B.** (Modificado de Patel, 2014)

En un balón de fondo redondo se mezclan 0,189 g de  $\beta$ CD con 0,143 g de DPC, en una razón molar de 1:4, respectivamente. El balón se calienta, en un baño de aceite sobre una placa calefactora con agitación constante por 5 horas a 100 °C, la boca del balón se tapa con un septum



y a este se le introduce una jeringa con el fin de dejar pasar los gases de fenol que se liberan de la reacción. La mezcla sólida obtenida se extrae del balón, agregándole un poco de agua bajo baño ultrasónico para soltar residuos de las paredes, una vez extraído todo el sólido se muele en mortero y se lava con agua destilada, filtrándose posteriormente al vacío durante 2 horas. El producto obtenido se lava en un sistema Soxhlet con acetona por 24 horas. Finalmente, el producto se seca entre 48 y 72 horas a 65 °C y se guarda.

Debido a las diferencias entre ambos métodos se decidió estandarizarlos, realizando para ambos métodos interacciones molares 1:4 y 1:8 entre  $\beta$ CD y DPC respectivamente, y el lavado final en el sistema Soxhlet se hace tanto con acetona como con etanol para ambas razones molares, por lo que finalmente se tendrán 8 formas de síntesis de las NS de  $\beta$ CD. Esto se resume en la tabla 2.1.

**Tabla 2.1.** Resumen de síntesis de NS.

Método A (con baño ultrasónico)	Etanol	1:4
		1:8
	Acetona	1:4
		1:8
Método B (con placa calefactora)	Etanol	1:4
		1:8
	Acetona	1:4
		1:8

## 2.2. Pruebas de solubilidad de las nanoesponjas de $\beta$ -ciclodextrina.

Con el fin de determinar si las NS son solubles se realizó una prueba de solubilidad de las mismas en distintos tipos de solventes, tanto orgánicos como inorgánicos. Se disolvieron 5,0 mg de NS en 2,5 mL de solvente, dentro de viales de 10 mL cerrados. Las mezclas se agitaron por 15 minutos

en baño ultrasónico a temperatura ambiente, terminado este tiempo se dejaron reposar para evaluar la disolución de las NS en cada solvente.

### **2.3. Formación de compuestos de inclusión con nanoesponjas de $\beta$ -ciclodextrina.**

Los fármacos utilizados para la inclusión fueron 2-amino-4-(4-clorofenil)tiazol (AT), con una masa molar de 210,68 g/mol y una pureza del 98%, y feniletilamina (FEA), con una masa molar de 121,18 g/mol, densidad de 0,92 g/mL y una pureza de 99%, ambos de Sigma-Aldrich.

Para la formación del CI en estado sólido se utilizaron dos métodos. El primero es el método de disoluciones saturadas (Coleman, 1992), en este caso las NS se dispersan en agua a temperatura ambiente, mientras que los huéspedes se disuelven en etanol. Para el segundo método, las NS se disuelven en una solución de NaOH a temperatura ambiente y, por otro lado, se preparó una solución stock de FEA/etanol mientras que el AT se disolvió en una mezcla etanol/agua a 40 °C, aproximadamente. En ambos métodos, una vez disueltos matriz y huésped, estos se mezclan con agitación constante por 15 minutos y luego se deja en reposo por 24 horas. La solución resultante se centrifuga y se separa el sobrenadante del precipitado, ambas partes de la mezcla se liofilizan y reservan para posteriores análisis (Lala, 2011).

### **2.4. Estudio de la constante de asociación.**

Para ambos fármacos los estudios de la constante de asociación se realizaron siguiendo el método de Higuchi y Connors (Higuchi, Connors;1965) con pequeñas modificaciones. Se tomó una cantidad fija de cada fármaco, 0,5 mL para FEA y 5 mg para AT, se preparó una solución stock con 200 mg de NS y agua en un matraz de aforo de 25 mL y, para cada fármaco, se tomaron volúmenes desde 0 hasta 2 mL del stock y se rellenó con agua hasta completar un volumen total de 2 mL. Esta mezcla de volúmenes se realizó en la misma cubeta en que se les midió absorbancia por espectrofotometría UV-Vis.



Previo a la obtención de las constantes de asociación ( $K_a$ ), fue necesario determinar el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) para cada fármaco, esto con el fin de calcular las concentraciones de fármaco presentes en las soluciones anteriormente descritas. Para ello se midieron por UV-Vis concentraciones conocidas de cada fármaco. Usando las absorbancias obtenidas y las concentraciones calculadas de cada fármaco, se realizó una gráfica lineal, de cuya pendiente se obtuvo el valor de  $\epsilon$ .

En el caso del fármaco AT, se preparó una solución stock con 5 mg de AT y agua hasta 25 mL en un matraz de aforo. Se tomaron volúmenes desde 0 hasta 2 mL del stock y se llevaron cada uno hasta 2 mL con agua nanopura. Para el fármaco FEA se tomaron volúmenes desde 0 hasta 0,7 mL y se llevaron a 2 mL con agua nanopura, estos volúmenes FEA/agua se dejaron en reposo por una hora antes de ser analizados. En ambos casos las diluciones se prepararon en las mismas cubetas en que se mediría la absorbancia mediante espectrofotometría UV-Vis para obtener los valores de absorbancia máxima de cada muestra.

Así, con los valores de las absorbancias máximas y las concentraciones medidas se realizó una gráfica lineal en donde la pendiente obtenida de los gráficos de cada fármaco correspondió al valor de  $\epsilon$ . Luego, el valor obtenido de  $\epsilon$  y el valor de las absorbancias máximas, medidas por el método de Higuchi y Connors, se introducen en la ecuación de Lambert-beer (ecuación 2.1), obteniéndose el valor de la concentración de cada fármaco. Con estos datos se graficó concentración de NS versus concentración del fármaco y el valor de la pendiente de cada gráfico se introdujo en la ecuación 2.2 para calcular finalmente las constantes de cada sistema.

$$A = c * l * \epsilon, \quad \text{Ecuación 2.1}$$

donde  $A$  corresponde a la absorbancia,  $c$  a la concentración del absorbente,  $l$  a la longitud de paso óptico (1,0 cm) y  $\epsilon$  el coeficiente de extinción molar.

$$K_{a(1:1)} = \frac{\text{Pendiente}}{[\text{Ho}](1-\text{Pendiente})}$$

Ecuación 2.2

donde [Ho] corresponde a la concentración del huésped en ausencia de NS, y la pendiente se obtiene a partir de la recta graficada.

## 2.5. Síntesis y estabilización de nanopartículas de oro.

La síntesis de NPsAu se realizó mediante el método de Turkevich. Para este método se utiliza la reducción de ácido tetracloroáurico (HAuCl<sub>4</sub>) con citrato de sodio.

Previo a la síntesis de las nanopartículas, se prepararon 30 mL de una solución acuosa 0,00425 mM de HAuCl<sub>4</sub> y se guardaron a 4 °C para su posterior uso.

El sistema montado consiste en un balón de fondo redondo de 25 mL con dos bocas cubierto con papel aluminio, una de ellas conectada a un sistema de reflujo. Al balón de dos bocas se le agregan 0,474 mL de la sal de oro y se lleva a 18 mL con agua nanopura. Por otra parte, se masan 22,8 mg de citrato de sodio y se disuelven en 2,0 mL de agua nanopura, la solución se calienta a 60 °C por unos 5 minutos aproximadamente. Cuando el balón de dos bocas se encuentra en un baño de arena a 186 °C, y con reflujo constante, se agrega la solución de citrato por la boca libre del balón, bajo agitación constante (200 rpm) durante 30 minutos. Finalizado este tiempo, el sistema se enfría lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente, se detiene el reflujo, pero se continúa con la agitación por otros 10 minutos para dejar escapar los gases de CO<sub>2</sub> producidos durante la síntesis. Las nanopartículas obtenidas se filtran con un filtro de jeringa de 0,45 μm, para descartar agregados de NPsAu, y se almacenan en un tubo Falcon cubierto con papel aluminio a 4 °C. Las NPsAu son analizadas por espectrofotometría UV-Vis para conocer su concentración y estudiar el plasmón de resonancia superficial. Posterior a esto, las NPsAu se disuelven con agua nanopura a pH 8,8 y nuevamente se caracterizan mediante espectrofotometría UV-Vis.

Para estabilizar las NPsAu sobre los CI, se usaron 10 mL de NPsAu y 0,8  $\mu\text{mol}$  de CI, por lo tanto, se masaron 1,25 mg de NS-AT y 1,17 mg de NS-FEA. Cada masa de CI se mezcló con la solución de NPsAu en viales de 20 mL cubiertos con papel aluminio, el sistema se mantuvo en agitación durante 12 horas, a 25 °C y 200 rpm de agitación. Posteriormente, se tomaron 1,5 mL de los tres sistemas formados, NPsAu-NS-AT, NPsAu-NS-FEA<sub>sobrenadante</sub> y NPsAu-NS-FEA<sub>precipitado</sub>, se centrifugaron a 12000 rpm por 15 minutos a 25 °C y se separó cuidadosamente el sobrenadante del pellet obtenido, este último que contiene el sistema NPsAu-NS-Fármaco, fue resuspendido en 1,5 mL de agua nanopura a pH 8,8. Todas las etapas fueron caracterizadas mediante espectrofotometría UV-Vis. El proceso se replicó tres veces para cada sistema.

## **2.6. Preparación de las muestras para análisis mediante resonancia magnética nuclear de protones $^1\text{H}$ -RMN.**

Todas las muestras en estado sólido se disolvieron en 750  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido deuterado, DMSO- $d_6$ .

## **2.7. Preparación de las muestras para estudios mediante microscopía electrónica de barrido y de transmisión, SEM y TEM.**

Las muestras estudiadas por SEM se prepararon tomando una gota de los distintos CI con NPsAu y poniéndolas directamente sobre el portamuestras con cinta de carbón en su superficie, la gota se demoró en secar 2 horas aproximadamente antes de llevarse a medición.

Por otra parte, las muestras para TEM, específicamente los CI, se disolvieron en una mezcla etanol/agua al 20 %, se agitaron unos segundos en vórtex y una gota de 10  $\mu\text{L}$  se dispuso sobre una grilla de cobre con película de Formvar continua y se dejó secar toda la noche antes de llevar las muestras a medición. Además, para visualizar las muestras orgánicas, estas se tiñeron con ácido

fosfotúngstico. 10  $\mu\text{L}$  de las NPsAu en suspensión coloidal se depositaron directamente sobre la grilla.

## **2.8. Preparación de las muestras para estudios mediante dispersión dinámica de la luz y potencial Z, DLS y Z.**

Tanto las NPsAu como los CI se encontraban en solución por lo que para preparar las muestras para su medición se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de cada solución coloidal y se disolvieron en 900  $\mu\text{L}$  de agua nanopura consiguiendo así llenar el volumen total de la cubeta para llevar a la medición. En primera instancia las muestras se midieron sin ningún tipo de filtración, luego las mismas soluciones coloidales se filtraron con un filtro de jeringa de 0,45  $\mu\text{m}$  y, tomando los mismos volúmenes antes descritos, se midió DLS y potencial Z. Finalmente, la solución de NPsAu estabilizadas con NS además de ser filtrada se centrifugó, esto con el fin de estudiar su comportamiento luego de realizar este procedimiento. Todas las mediciones se realizaron tres veces para cada muestra y el equipo automáticamente en cada medición realizó 5 repeticiones para DLS y 15 repeticiones para potencial Z.

## **2.9. Equipos para la caracterización de las muestras.**

### **2.9.1. Resonancia magnética nuclear de protones, $^1\text{H}$ -RMN.**

La caracterización mediante  $^1\text{H}$ -RMN en solución para las muestras NS, NS-AT, NS-FEA, AT y FEA se realizó en un equipo Bruker Advance 400 MHz a 30°C, utilizando TMS como referencia interna. El tratamiento de los espectros se realizó con el programa MestreNova.

### **2.9.2. Espectroscopía infrarroja, IR.**

Este análisis se realizó en un equipo Jasco FT/IR-4600. El tratamiento de los espectros se realizó con el programa KnowItAll, edición académica.

### **2.9.3. Análisis termogravimétrico, TGA.**

Los análisis se realizaron en un equipo Perkin-Elmer modelo 4000, en un rango de temperatura de 0 °C a 800 °C con un flujo de 10 °C/min bajo una atmósfera de aire con un flujo de 20 mL/min.

### **2.9.4. Microscopía electrónica de barrido y de transmisión, SEM y TEM.**

Para ambas caracterizaciones se utilizó el equipo Inspect F50 HR-SEM, FEI. Para las imágenes SEM se utilizó un detector ETD mientras que para las imágenes TEM el detector utilizado fue STEM. Las mediciones se realizaron con un voltaje de aceleración de 10,0 kV, la presión del sistema del equipo era  $9,71 \times 10^{-8}$  Pa y las magnitudes de observación variaron entre 16000 y 100000X.

### **2.9.5. Espectrofotometría UV-Visible, UV-Vis.**

Para el cálculo de las constantes de estabilidad de los complejos NS-AT y NS-FEA los espectros de absorbancia de los diferentes fármacos en solución acuosa a pH 8,8, con y sin NS, fueron obtenidos mediante espectrofotometría UV-Vis utilizando un equipo Shimadzu UV-2450. Estas mediciones fueron realizadas en cubetas de cuarzo de 1,0 cm de diámetro en un rango entre 200 y 800 nm empleándose agua a pH 8,8 como blanco.

Las NPsAu, estabilizadas tanto con citrato como las depositadas sobre los diferentes CI se estudiaron mediante espectrofotometría UV-Vis, en el mismo equipo mencionado anteriormente. Las mediciones se realizaron en cubetas de cuarzo de 1,0 cm de diámetro en un rango de 200 a 800 nm.

En ambos casos el tratamiento de los espectros se realizó con el programa UVProve, versión 1.10.

### **2.9.6. Dispersión dinámica de la luz y potencial Z, DLS y Z.**

Las muestras se midieron en un equipo Malvern Zetasizer Nano ZS y los datos se recolectaron en el software incorporado de equipo.

### **2.9.7. Liofilización de las muestras.**

Este procedimiento se llevó a cabo en un equipo BenchTop Pro, Omnitronic. La presión del equipo alcanzó los 110 mTorr y la temperatura  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , con variaciones en ambos casos de 5 a 10 unidades. Todas las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido durante 15 minutos antes de realizar el proceso de secado.



### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Síntesis de nanoesponjas de $\beta$ -ciclodextrina.

En una primera instancia se desarrollaron los métodos A y B sin ninguna modificación, tal como se explica en el punto 2.1.1. El método A se realizó siguiendo una razón molar 1:8  $\beta$ CD:DPC, aplicando lavados con etanol, el método B por su parte, se realizó una relación molar 1:4  $\beta$ CD:DPC y el producto fue lavado con acetona. Para ambos métodos se obtuvieron porcentajes de rendimiento bajos, 24,73 % para el método A, y 32,19 % para el método B.

Debido a lo anterior, se aumentó la cantidad en masa de  $\beta$ CD utilizada, la síntesis se realizó con 2,0 g, y las correspondientes cantidades en masa de DPC con tal de cumplir con las razones molares 1:4 y 1:8  $\beta$ CD:DPC. Los rendimientos obtenidos se presentan en la tabla 3.1.

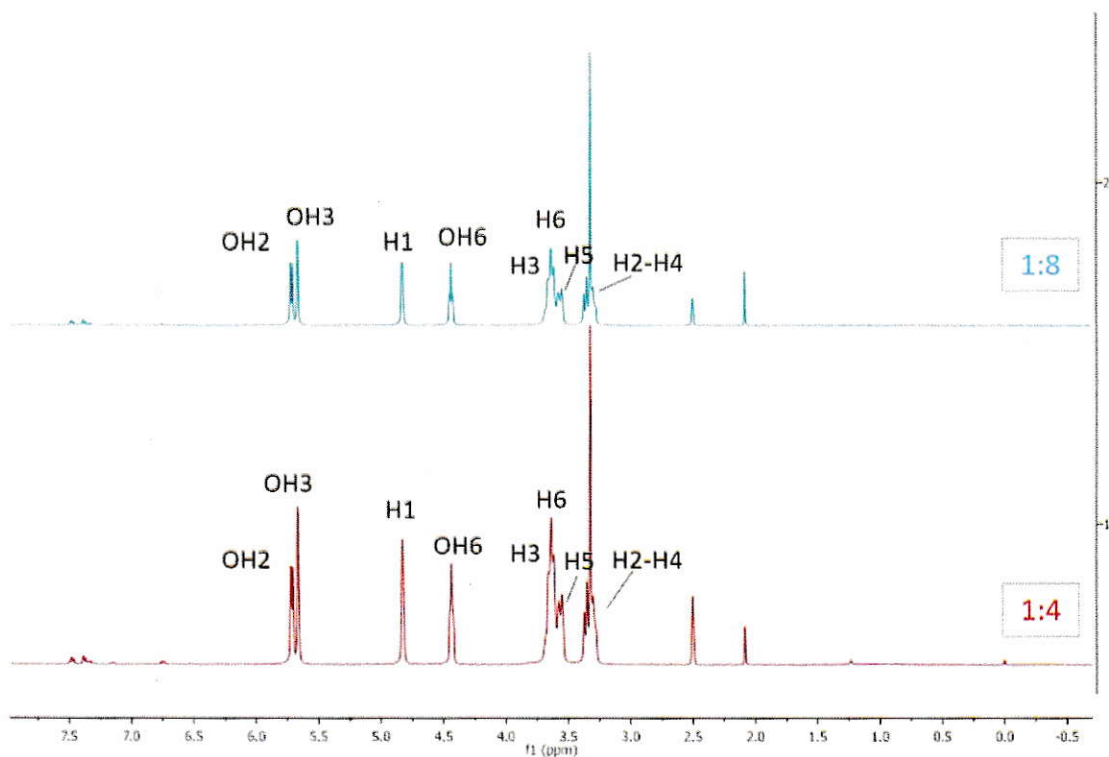
**Tabla 3.1.** Rendimientos obtenidos para cada síntesis de nanoesponjas.

Método de síntesis	Solvente para lavado	Razón molar	Rendimiento porcentual (%)
Método A (con baño ultrasónico)	Etanol	1:4	36,42
		1:8	27,32
	Acetona	1:4	63,90
		1:8	52,15
Método B (con placa calefactora)	Etanol	1:4	37,76
		1:8	31,58
	Acetona	1:4	64,29
		1:8	54,73

Debido al rendimiento obtenido es que se determinó seguir el método B para la síntesis de NS, aplicando como etapa de lavado, el sistema Soxhlet con acetona.

### 3.1.1. Análisis mediante resonancia magnética nuclear de protones, $^1\text{H}$ -RMN.

En la figura 5 se observan los espectros  $^1\text{H}$ -RMN de la síntesis mediante el método B, la cual presenta mayores rendimientos, para las dos relaciones molares, 1:4 (en celeste) y 1:8 (en rojo). Es posible observar que los espectros son similares, obteniéndose desplazamientos químicos entre sus señales de aproximadamente cero (ver tabla 3.2). Debido a lo anterior, se seleccionó una relación molar 1:4  $\beta\text{CD}$ :DPC como protocolo definitivo.



**Figura 5.** Espectros  $^1\text{H}$ -RMN de la síntesis de NS 1:4 (rojo) y NS 1:8 (celeste).

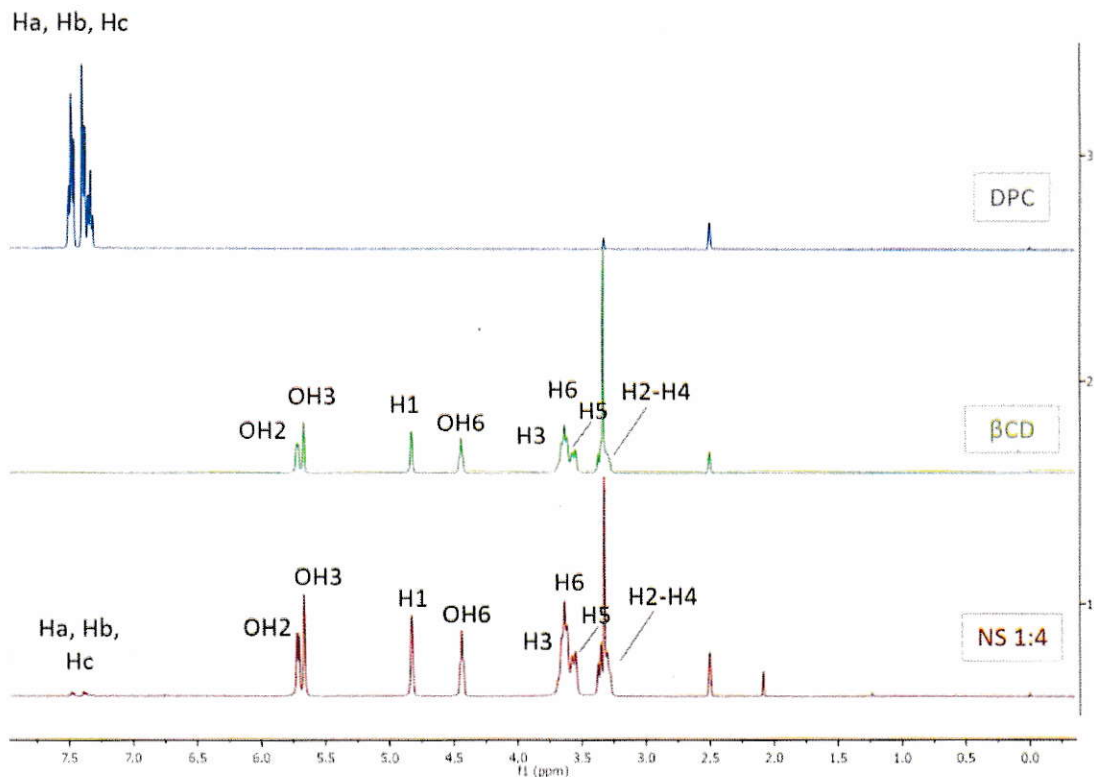
**Tabla 3.2.** Desplazamiento de las señales de los protones de  $\beta$ CD para las dos relaciones molares utilizadas en síntesis y el delta de desplazamientos calculado.

Protones	$\delta$ NS 1:4 (ppm)	$\delta$ NS 1:8 (ppm)	$ \Delta\delta $ (ppm)
H1	4,827	4,830	0,003
H2	3,301	3,300	0,001
H3	3,655	3,653	0,002
H4	3,361	3,361	0
H5	3,549	3,549	0
H6	3,655	3,653	0,002
OH2	5,722	5,721	0,001
OH3	5,665	5,665	0
OH6	4,437	4,436	0,001

En la tabla 3.2 se considera el valor absoluto de  $\delta$ , para mostrar la variación cercana a cero en la posición de todas las señales entre ambas síntesis.

Para aumentar la producción de NS, manteniendo la relación molar 1:4  $\beta$ CD:DPC, se utilizaron 10 g de  $\beta$ CD y 3,78 g de DPC obteniéndose una masa final de NS de 5,93 g, lo que equivale a un rendimiento de reacción del 59,3 %.

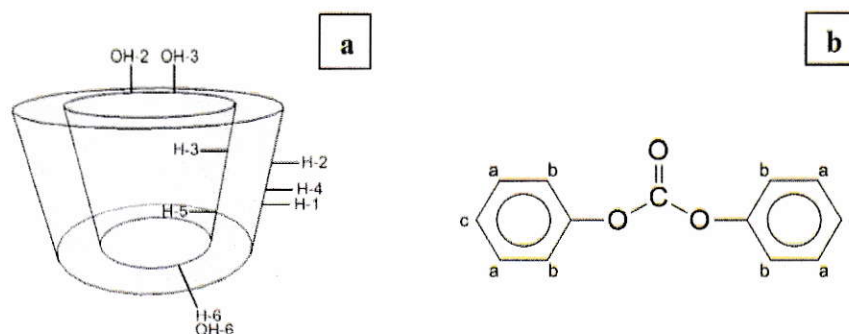
Una vez definida la síntesis de NS se hizo una comparación entre los espectros  $^1\text{H}$ -RMN de la misma con sus precursores (figura 6).



**Figura 6.** Espectros <sup>1</sup>H-RMN de DPC puro (azul), βCD pura (verde) y NS sintetizadas mediante el método B a una razón 1:4 βCD:DPC (rojo).

En la figura 6 se muestran los espectros de las NS sintetizadas y de sus precursores respectivos. Se indican todos los protones de cada precursor, para βCD en verde y para DPC en azul. La figura 7a y 7b corresponde a un esquema de los protones en ambos precursores, para elucidar las estructuras y posición de los mismos. En el espectro de la NS (en rojo) se observó que los protones correspondientes a la βCD son de mayor intensidad con respecto a los del DPC, esto sucede porque mientras ocurre la reacción de síntesis de las NS, se producen moléculas de fenol liberadas al medio, originadas a partir de la reacción entre los anillos bencénicos del DPC y el protón proveniente del OH6 de la βCD. Por tanto, estas señales de baja intensidad corresponden a trazas de fenol que no fueron completamente removidas de las NS. Fue posible observar la aparición de una señal a 2,083 ppm que no se encuentra en los espectros de los precursores, esta señal

corresponde a los protones de la acetona con la que se lavan las NS, que en estado puro aparecen a 2,1 ppm.



**Figura 7.** Esquema de protones en la estructura de βCD (a) y DPC (b).

El estudio del desplazamiento de las señales presentes (ver tabla 3.3) mostró que existe un desplazamiento cercano a cero de todas las señales de la NS respecto de βCD pura, exceptuando el protón correspondiente a los grupos OH6. Esto indica que la nueva estructura formada no ha perdido las características de su precursor original, siendo únicamente observable un cambio en el entorno químico de los OH6 que no han sido modificados.

**Tabla 3.3.** Señales de los protones de βCD y NS 1:4 con su desplazamiento químico.

Protones	δ βCD (ppm)	δ NS 1:4 (ppm)	Δδ (ppm)
H1	4,828	4,827	0,001
H2	3,302	3,301	0,001
H3	3,656	3,655	0,001
H4	3,360	3,361	-0,001
H5	3,562	3,562	0
H6	3,656	3,655	0,001
OH2	5,715	5,714	0,001
OH3	5,666	5,665	0,001
OH6	4,440	4,437	0,003

### 3.1.2. Análisis mediante espectroscopía infrarroja, IR.

En las figuras 8, 9 y 10 se presentan los espectros IR de la NS sintetizada,  $\beta$ CD pura y DPC puro, respectivamente, con las bandas características de cada uno.

Es posible observar que el espectro del DPC es completamente distinto al de  $\beta$ CD y las NS formadas, presentando una banda característica para el grupo carbonilo (ver figura 7b), correspondiente a un estiramiento a  $1774,19\text{ cm}^{-1}$ . Por otra parte, los espectros  $\beta$ CD y NS son similares, las bandas alrededor de  $3300\text{ cm}^{-1}$ ,  $2930\text{ cm}^{-1}$  y  $1157\text{ cm}^{-1}$  observadas en ambos corresponden al estiramiento simétrico y antisimétrico de los grupos OH,  $\text{CH}_2$  y enlaces C-C respectivamente. Además, la banda cercana a  $1030\text{ cm}^{-1}$ , presente en ambos espectros nuevamente, corresponde a una vibración de flexión del enlace O-H (Sambasevam, 2013). Adicionalmente, el espectro de la NS (figura 8) posee tres bandas alrededor de los  $1700\text{ cm}^{-1}$ , que corresponden al grupo carbonilo aportado por el DPC, y además un par de bandas adicionales que también son aportadas por el DPC alrededor de los  $2300\text{ cm}^{-1}$ .

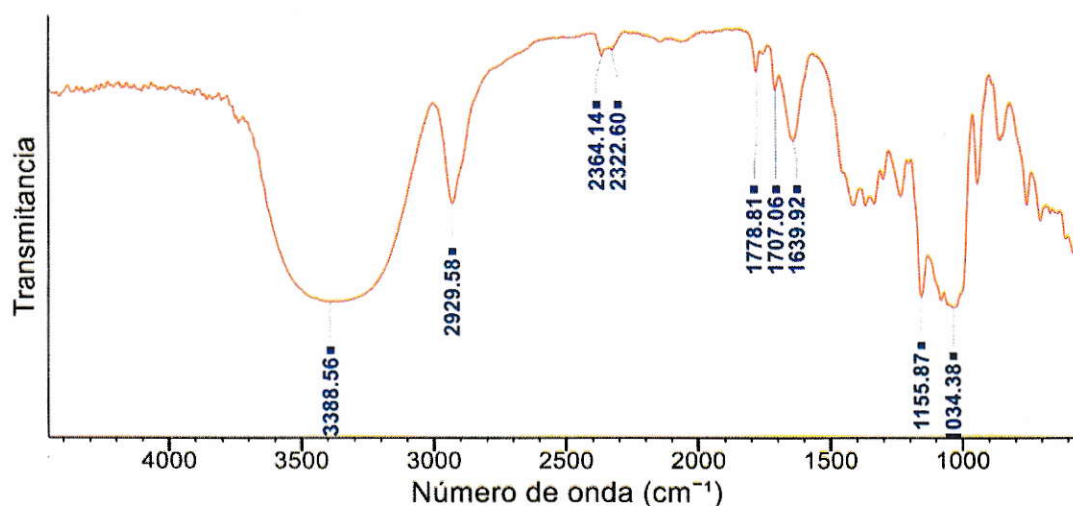


Figura 8. Espectro IR de la NS sintetizada en razón 1:4  $\beta$ CD:DPC.

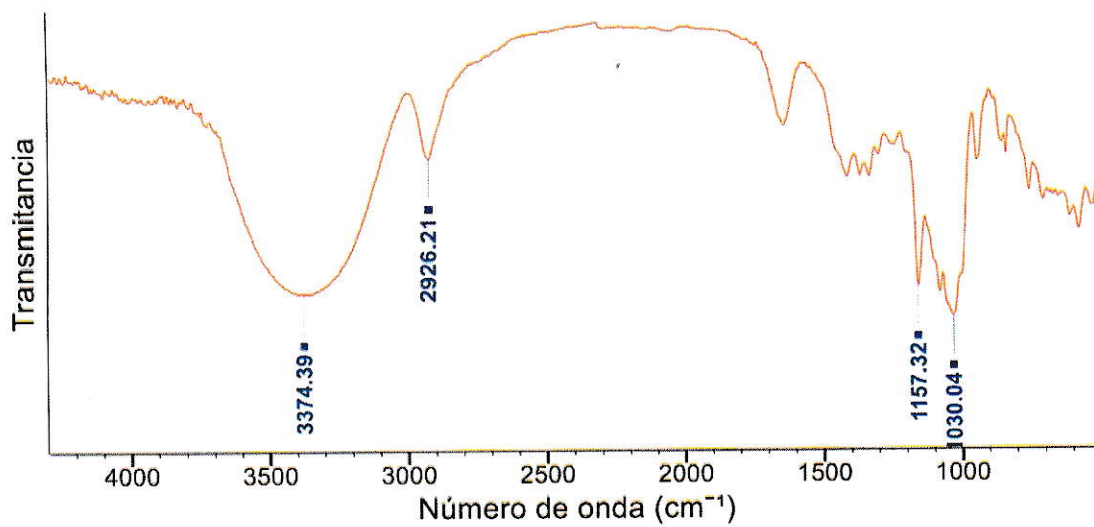


Figura 9. Espectro IR de  $\beta$ CD puro.

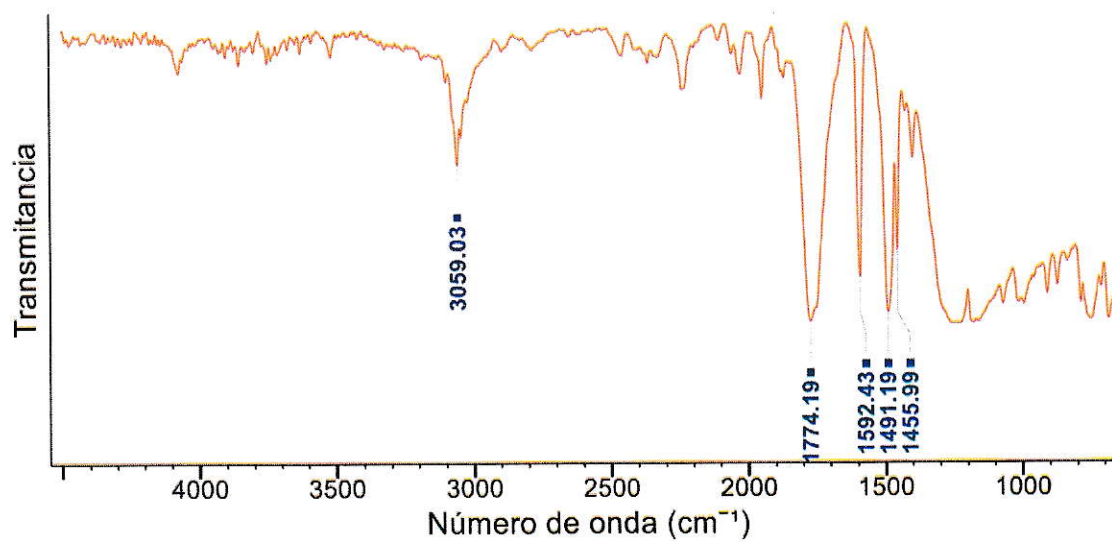
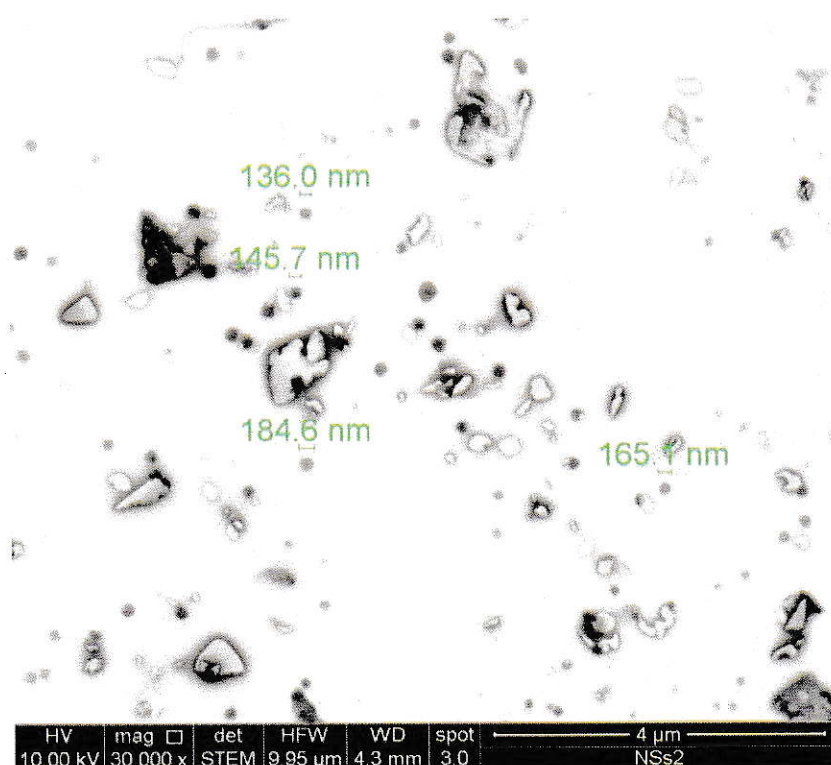


Figura 10. Espectro IR de DPC puro.

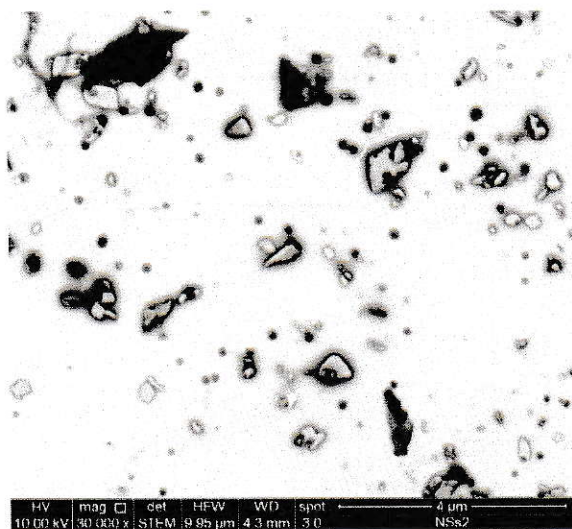
### 3.1.3. Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión, TEM.

El estudio mediante TEM, entregó un análisis estadístico de tamaños de una cantidad representativa de NS formadas. En las figuras 11 y 12 se muestran micrografías en campo claro de dos muestras de las NS sintetizadas teñidas con ácido fosfotúngstico, además de excesos de material orgánico precursor. Es posible reconocer formaciones esféricas, las que corresponden a las NS sintetizadas. El tamaño promedio de las mismas fue de 350 nm, variando desde 136 a 500 nm.

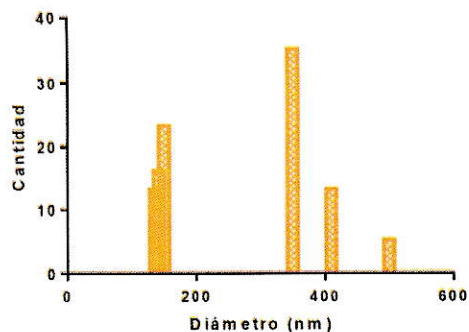


**Figura 11.** Micrografía TEM de campo claro para las NS sintetizadas a una amplitud de 30000x.





**Figura 13.** Micrografía TEM de campo claro para las NS sintetizadas a una amplitud de 60000x



**Figura 12.** Histograma correspondiente a la población de tamaño de las NS sintetizadas de la figura 13.

#### 3.1.4. Análisis mediante microscopía electrónica de barrido, SEM.

Mediante esta técnica se pudo observar la morfología de las muestras de NS sintetizadas (figura 14) que se presentan como una estructura porosa y fina como polvo, la que es completamente distinta a la morfología de la  $\beta$ CD pura (ver figura 15) que se presenta como cristales sólidos irregulares. Esta diferencia morfológica corroboró entonces la formación de la nueva nanoestructura.

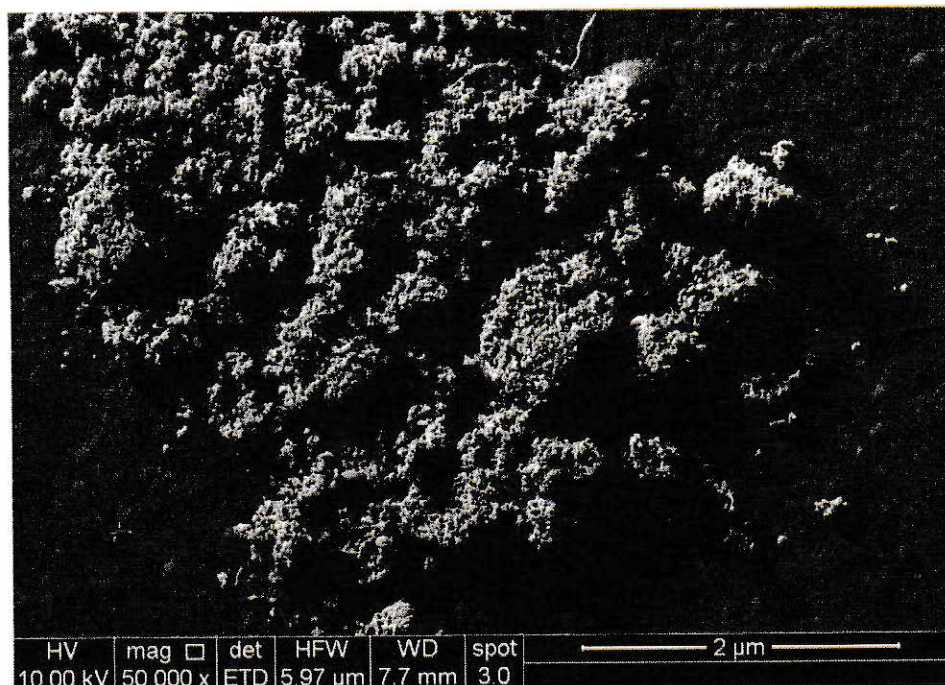


Figura 14. Micrografía SEM para las NS.

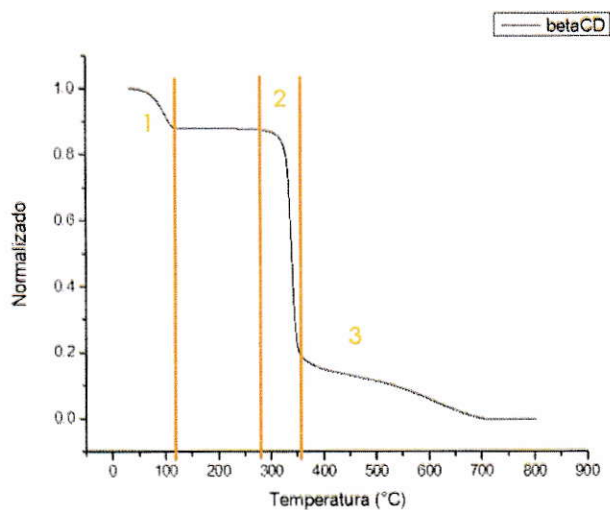


Figura 15. Micrografía SEM para cristales de βCD.

### 3.1.5. Análisis termogravimétrico, TGA.

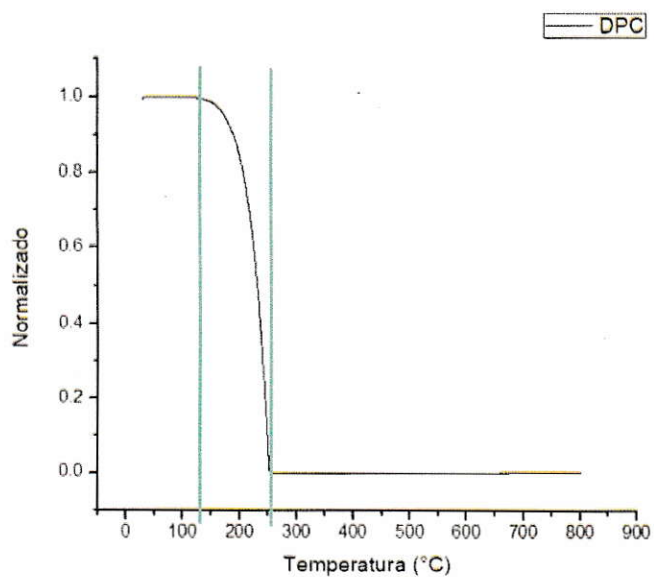
Se realizó un análisis termogravimétrico, para corroborar la formación de las NS, observando cambios con respecto a sus precursores.

La figura 16 muestra el termograma clásico de  $\beta$ CD, en él se observó que el proceso de descomposición ocurre en 3 etapas, la primera (1), hasta 100 °C que indica la pérdida del agua presente en la  $\beta$ CD, correspondiendo aproximadamente al 1,15 % en masa de la muestra total, la segunda etapa (2) muestra un decaimiento de la masa entre 300 °C y 350 °C aproximadamente e indica la degradación térmica de la muestra, esto corresponde al 71 % en masa, y a partir de los 350 °C, etapa 3, se produce la carbonización de los residuos de  $\beta$ CD, lo que se conoce como oxidación térmica (Trotta, 2000) que finaliza a los 700 °C.



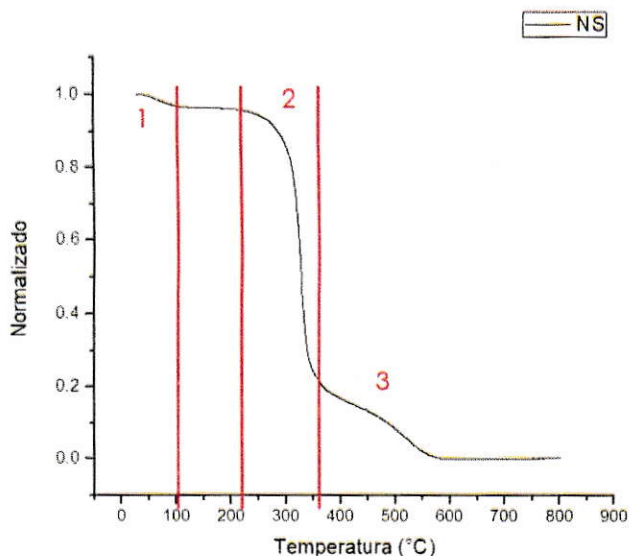
**Figura 16.** Termograma de  $\beta$ CD pura.

En el termograma de DPC, figura 17, se observó que el inicio del decaimiento de la masa comienza a una temperatura cercana a los 130 °C, consumiéndose el 100 % de la muestra hasta los 250,3 °C.



**Figura 17.** Termograma de DPC puro.

Por otra parte, en la figura 18, se muestra el termograma de las NS, se observó un comportamiento similar al de  $\beta$ CD pura, existiendo una curva en tres etapas. El primer decaimiento (1), hasta los 100 °C, corresponde a la pérdida del agua, que equivale a un 2,7 % en masa de la muestra, luego a los 210 °C aproximadamente comienza el decaimiento de la masa de la NS (2) y finaliza cuando la temperatura llega casi a los 350 °C, consumiéndose un 70 % de la muestra. Por último, la etapa de oxidación de los residuos (3) ocurre entre los 350 °C y los 580 °C.



**Figura 18.** Termograma de NS sintetizada.

La principal diferencia entre los termogramas de la  $\beta$ CD pura y de la NS sintetizada se observó en los intervalos tanto de oxidación como de degradación térmica. El intervalo de oxidación para la NS fue de 230 °C, mientras que para la  $\beta$ CD es de 350 °C

Por otra parte, el intervalo de la degradación térmica en el caso de la NS fue de 140 °C comenzando a los 210 °C, mientras que para la  $\beta$ CD este intervalo fue de 50 °C y comenzó a los 300 °C, la disminución de la temperatura en el comienzo de la degradación térmica se debe al hecho de que las moléculas reticulantes de DPC se unen a los grupos OH primarios de las moléculas de  $\beta$ CD, formando grupos carbonilos, siendo estos sustituyentes los responsables en el aumento o disminución de la temperatura de descomposición (Trotta, 2000).

El punto de fusión de un compuesto puro en general muestra una sola temperatura, y el intervalo de fusión del mismo es muy pequeño, mientras que para un compuesto que no es puro, esta temperatura de fusión disminuye y el intervalo de fusión aumenta considerablemente, tal como ocurre entre la NS y la  $\beta$ CD como su precursor. También hay que considerar que el inicio del

intervalo de degradación térmica de la NS no es un valor arbitrario de temperatura que presenta la muestra, si no que se relaciona con la definición de “mezcla eutéctica”, la que se puede explicar como la mezcla de dos sólidos que poseen un punto de fusión más bajo que el que poseen los sólidos individualmente. Considerando entonces un promedio entre las temperaturas del inicio de la degradación térmica de la  $\beta$ CD y del DPC, 300 °C y 130 °C respectivamente, se puede encontrar el valor del inicio de la degradación térmica de la NS, que coincide con el valor entregado por el termograma de la misma, 215 °C.

### 3.1.6. Pruebas de solubilidad de las nanoesponjas de $\beta$ -ciclodextrina.

Se realizó una prueba de solubilidad para determinar en primer lugar en que tipo de solvente la NS es soluble, ya sea orgánico como inorgánico, y en segundo, para utilizar este solvente en la metodología de inclusión propuesta en la sección 2.3. En la tabla 3.4 se presentan los resultados de estas pruebas, considerando 5 mg de NS por 2,5 mL de solvente.

**Tabla 3.4.** Solubilidad de NS en distintos solventes.

Solvente	Solubilidad
Acetato de etilo	No presenta
Acetonitrilo	No presenta
Amoníaco	Total
Agua	Parcial
Diclorometano	No presenta
Dietil éter	No presenta
Dimetilsulfoxido	Total
Hexano	No presenta
Hidróxido de sodio	Total
Isopropanol	No presenta
Metanol	No presenta
Peróxido de hidrógeno	Total

Se considera que las NS son solubles en algún solvente cuando la masa se dispersa de manera homogénea en la solución, sin observarse partículas en suspensión ni decantación del compuesto. En base a los resultados mostrados en la tabla, se decidió trabajar con NaOH 0,1 M, en el cual las NS fueron efectivamente disueltas, formando una solución coloidal estable. Dicha solución entonces fue utilizada para evaluar la inclusión de los fármacos AT y FEA.

### **3.2. Inclusión de los fármacos en nanoesponjas de $\beta$ -ciclodextrina.**

Diversas investigaciones demuestran que la matriz de  $\beta$ CD posee una cavidad adecuada como para albergar moléculas que posean un anillo aromático en su estructura (Chen, 2006; Köhler, 2014; Mangolim, 2014; Sierpe, 2015). Por este motivo es que se utilizaron dos fármacos distintos, ambos con un anillo aromático en su estructura (ver figuras 3 y 4). Tal como se mencionó en la sección 2.3, se probaron dos métodos para la inclusión de los fármacos AT y FEA. El proceso de inclusión implica la obtención de un precipitado y un sobrenadante, ambos contienen NS, por tanto, estas dos porciones fueron caracterizadas para evaluar en cuál de ellas se encuentra cada fármaco. Para el tratamiento de las muestras, cada porción fue en primera instancia liofilizada.

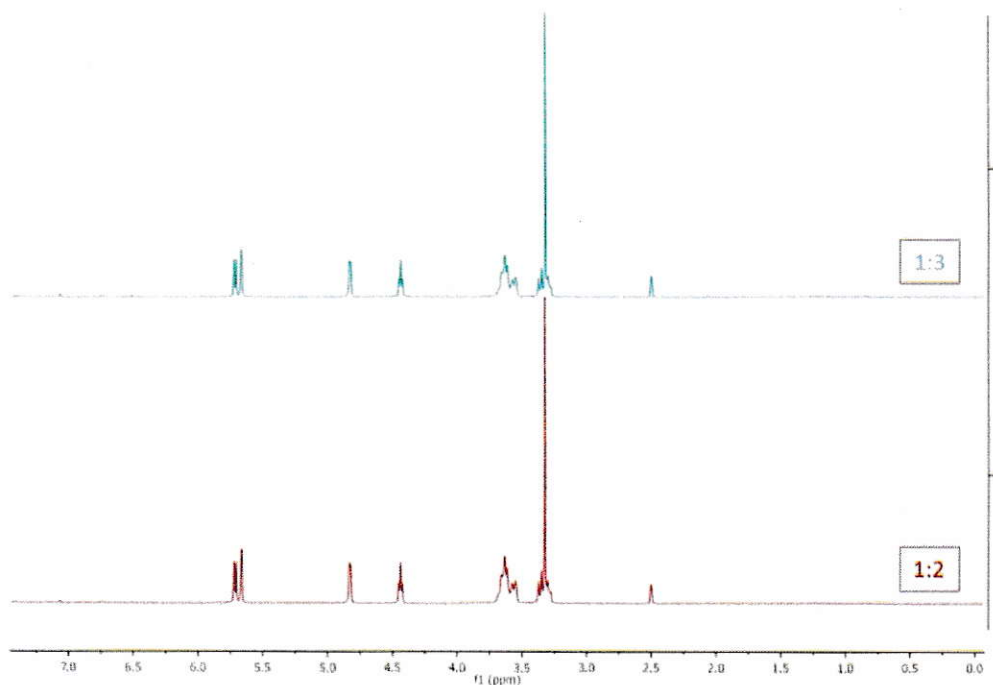
Para la inclusión de los fármacos, se utilizaron dos relaciones estequiométricas, 1:2 y 1:3 entre NS y fármaco respectivamente, siempre con una masa de 200 mg de NS y su equivalente en masa AT y FEA.

#### **3.2.1. Análisis mediante resonancia magnética nuclear de protones, $^1\text{H}$ -RMN.**

Una caracterización mediante  $^1\text{H}$ -RMN permite obtener información acerca de la existencia de nuevos complejos de inclusión, ya que los espectros de estos suelen ser diferentes al de sus precursores. En las figuras 19, 20, 21 y 22 se muestran los espectros  $^1\text{H}$ -RMN para el primer método de inclusión, basado en disoluciones saturadas entre la matriz y el huésped, analizados

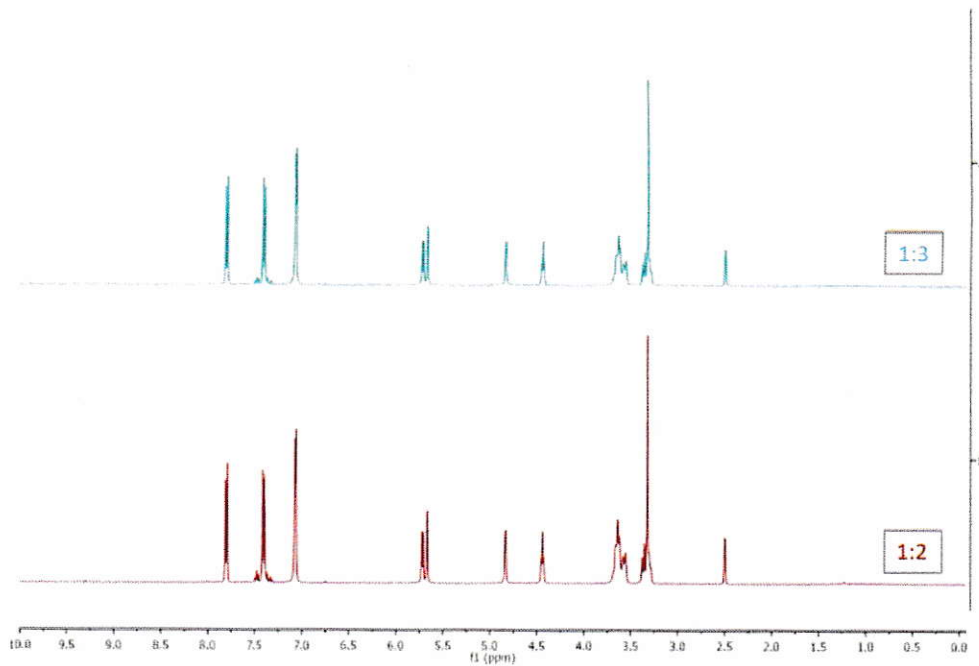
para el precipitado y el sobrenadante, ambos liofilizados, comparando las dos razones molares de inclusión para los fármacos AT (figuras 19 y 20) y FEA (figuras 21 y 22).

El método de disoluciones saturadas es una estrategia clásica para la formación de complejos a partir de CD y diferentes huéspedes, siendo un punto de partida para la exploración de formación de complejos con NS.

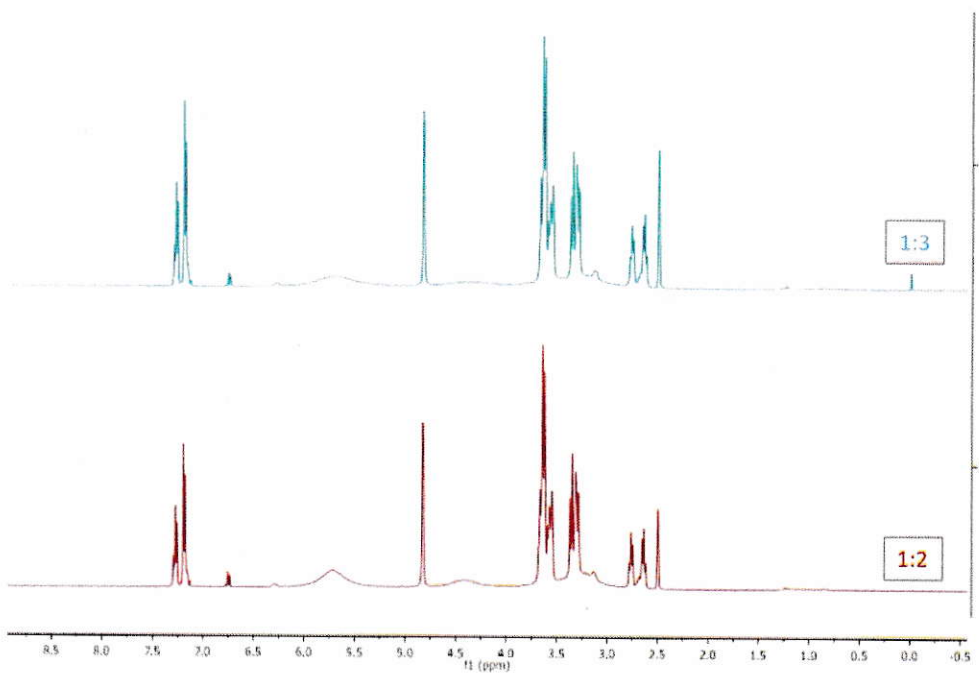


**Figura 19.** Espectros  $^1\text{H}$ -RMN del precipitado liofilizado empleando el primer método de inclusión de AT en NS, en relaciones molares 1:2 (rojo) y 1:3 (celeste).

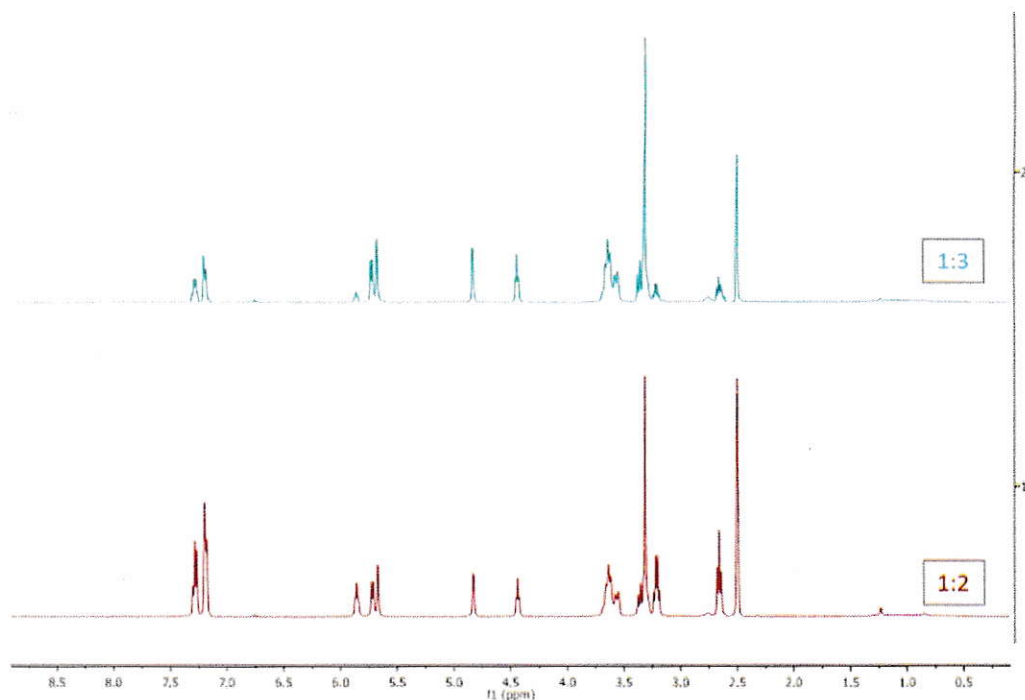




**Figura 20.** Espectros  $^1\text{H}$ -RMN del sobrenadante liofilizado utilizando el primer método de inclusión de AT en NS, en las razones molares de inclusión 1:2 (rojo) y 1:3 (celeste).



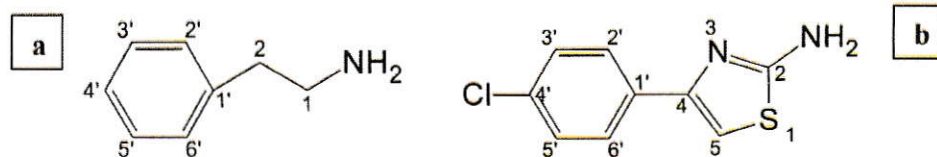
**Figura 21.** Espectros  $^1\text{H}$ -RMN del precipitado liofilizado empleando el primer método de inclusión de FEA en NS, en relaciones molares 1:2 (rojo) y 1:3 (celeste).



**Figura 22.** Espectros  $^1\text{H}$ -RMN del sobrenadante liofilizado utilizando el primer método de inclusión de FEA en NS, en relaciones molares 1:2 (rojo) y 1:3 (celest).

En los cuatro casos no se observaron diferencias en el número de señales, ni en los desplazamientos químicos calculados (ver tablas 6.1, 6.2, 6.3 y 6.4 en anexo 6.1), el único factor que distingue los espectros es la intensidad de algunas de sus señales. Con esta observación se determinó que la razón molar a emplear para la inclusión de los de los fármacos sería 1:2, NS:fármaco, esto considerando que es una proporción suficiente para acomplejar totalmente a las NS con los fármacos respectivos.

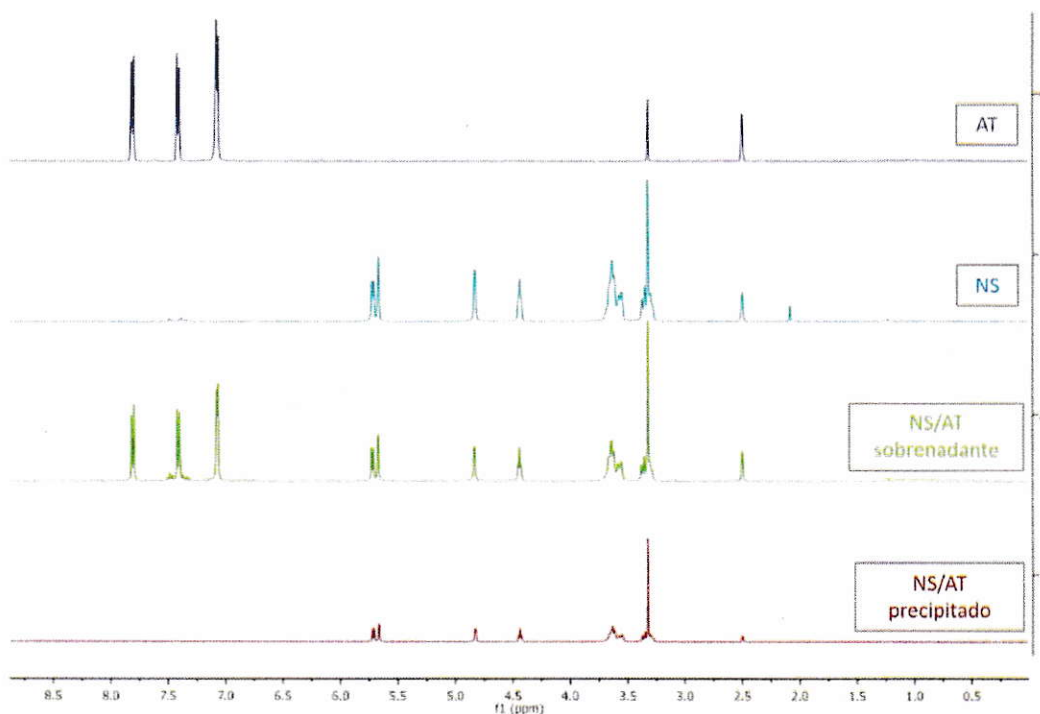
Luego de validar que la razón estequiométrica para formar los complejos es 1:2, se realizó una comparación entre dos metodologías propuestas para la inclusión de los fármacos en NS. En las figuras 23(a) y 23(b) se presentan las estructuras moleculares de cada fármaco, cada una con la asignación de protones correspondiente, para el posterior estudio de los espectros  $^1\text{H}$ -RMN.



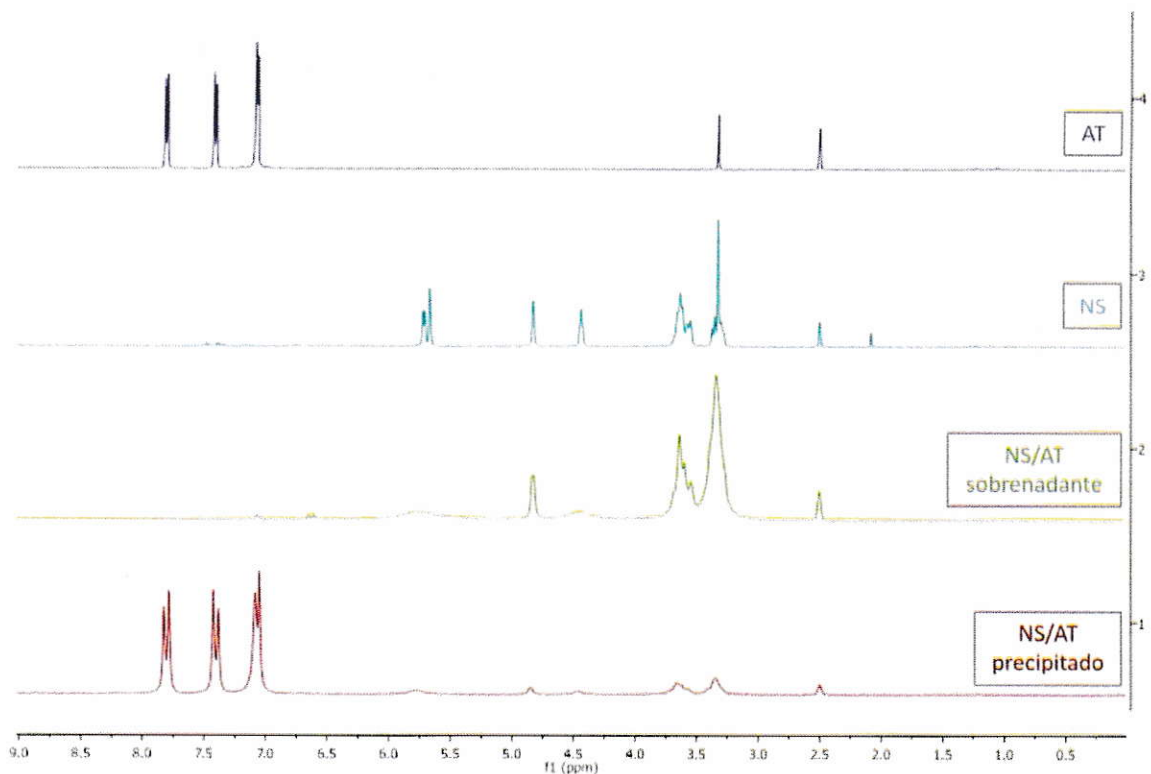
**Figura 23.** Estructuras moleculares con asignación de protones de los fármacos FEA (a) y AT (b).

### 3.2.1.1. Análisis $^1\text{H}$ -RMN para la inclusión del fármaco 2-amino-4-(4-clorofenil)tiazol.

Con respecto a la formación de los complejos NS-AT, en la figura 24 se presentan los espectros considerando el primer método de síntesis de disoluciones saturadas, mientras que en la figura 25, los espectros correspondientes al compuesto sintetizado usando el segundo método de preparación (ver especificaciones en sección 2.1, de métodos).



**Figura 24.** Espectros  $^1\text{H}$ -RMN de NS-AT empleando el primer método de síntesis para precipitado liofilizado en rojo y sobrenadante liofilizado en verde, NS puras en celeste y fármaco AT puro en violeta.



**Figura 25.** Espectros  $^1\text{H}$ -RMN empleando el segundo método de inclusión para NS-AT en el precipitado liofilizado (rojo) y en el sobrenadante liofilizado (verde), NS sintetizada (celeste) y fármaco AT puro (violeta).

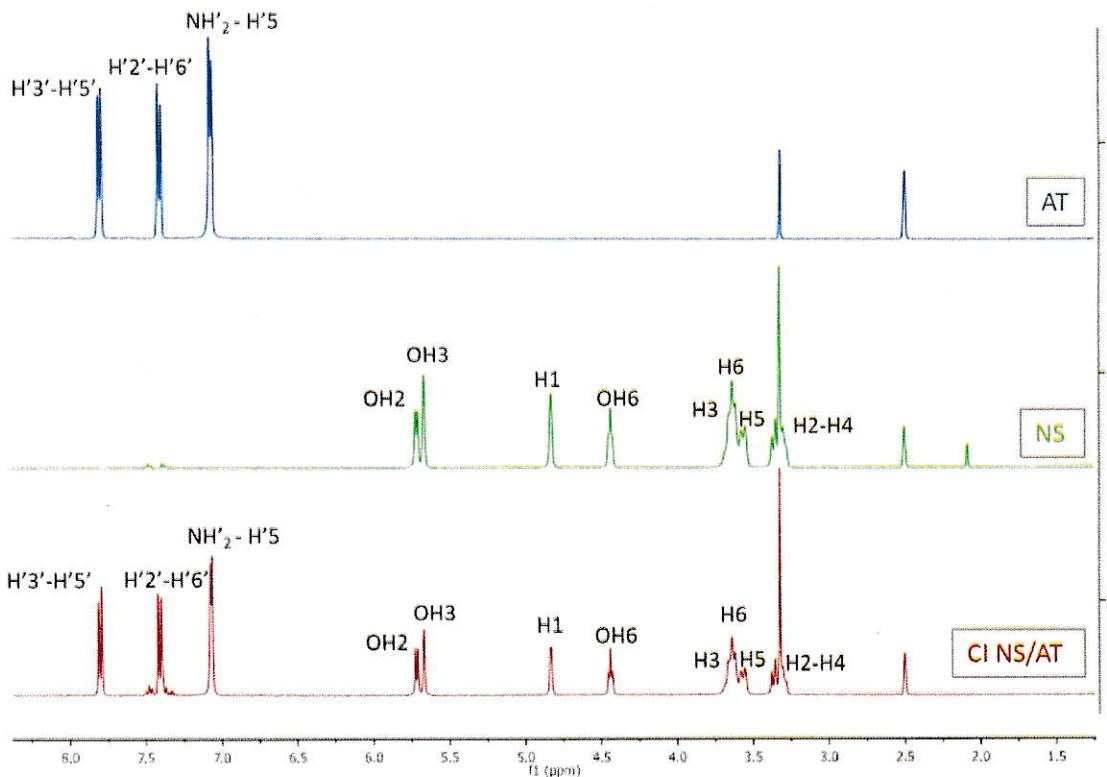
Al analizar los espectros presentados en las figuras 24 y 25, los dos métodos de inclusión generaron distintos productos, a su vez, en cada método, el producto obtenido del precipitado y del sobrenadante, son distintos entre sí.

La figura 24 mostró que el espectro del CI precipitado liofilizado, en rojo, contiene solo las señales poco intensas de la NS, por lo que se puede inferir que en ese producto sólo hay presencia de NS, mientras que, en el espectro del CI sobrenadante liofilizado, en verde, se observan tanto las señales de la NS como las del fármaco, por lo tanto, es en solución en donde se encuentra el complejo. Al observar la figura 25, el espectro del CI precipitado liofilizado, en rojo, mostró señales muy intensas equivalentes a las del fármaco AT y levemente se observa la presencia de algunas señales

de la NS, por otra parte, el espectro del CI sobrenadante liofilizado, en verde, no contiene las señales del fármaco, pero sí algunas señales de la NS, por lo tanto, la presencia de estas no son concluyentes para determinar que existe un CI presente.

Es así como, mediante análisis  $^1\text{H}$ -RMN se pudo determinar que, en el caso del fármaco AT, la metodología óptima para la obtención del CI es mediante disoluciones saturadas. Además, se confirmó lo descrito en literatura, que es en el sobrenadante de la solución donde se encuentra el complejo (Lala, 2011; Bolmal, 2013). A continuación, se muestra un análisis más detallado sobre la inclusión respecto del primer método.

En la figura 26 se observan los espectros  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto NS-AT, las NS y el fármaco puro. Como se mencionó anteriormente, el espectro del CI presentó las señales de ambos precursores, confirmándose la inclusión efectiva de AT al interior de las cavidades de las NS. Un análisis más detallado se puede realizar a partir de los desplazamientos químicos de los protones tanto de la matriz como del huésped. Estos corrimientos de señales se pueden observar en la tabla 3.5.



**Figura 26.** Espectros  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto de inclusión NS-AT (rojo), NS (verde) y fármaco AT puro (azul).

**Tabla 3.5.** Desplazamientos químicos  $^1\text{H}$ -RMN para el compuesto de inclusión de NS con el fármaco AT.

Protones	$\delta$ NS (ppm)	$\delta$ AT (ppm)	$\delta$ CI NS-AT (ppm)	$\Delta \delta$ (ppm)
H1	4,827	---	4,832	-0,005
H2	3,301	---	3,305	-0,004
H3	3,655	---	3,662	-0,007
H4	3,301	---	3,305	-0,004
H5	3,562	---	3,567	-0,005
H6	3,624	---	3,628	-0,004
OH2	5,713	---	5,717	-0,004
OH3	5,665	---	5,667	-0,002
OH6	4,437	---	4,440	-0,003
NH'2-H'5	---	7,070	7,067	0,003
H'2'-H'6'	---	7,803	7,802	0,001
H'3'-H'5'	---	7,408	7,407	0,001

Los protones correspondientes a la  $\beta$ CD en la NS, tanto internos como externos, presentaron un delta de desplazamiento negativo, con desplazamientos hacia campos más bajos. Las matrices de  $\beta$ CD cuando albergan huéspedes, originan cambios en las señales de los protones internos, observadas por RMN, esto debido al cambio en el entorno químico de la cavidad tras el ingreso de alguna molécula. La NS posee espacios intersticiales originados por la interacción entre la  $\beta$ CD y el reticulante DPC, dentro de éstos es posible que se incluyan también moléculas del fármaco, lo que originó el desplazamiento no solo de las señales de los protones internos de la NS sino que también de los externos.

Por otra parte, los protones del fármaco AT presentaron un delta de desplazamiento positivo, lo que significa que estos se desplazaron hacia campos más altos y presentan un apantallamiento debido al fenómeno de inclusión, ya sea dentro de las cavidades de la NS o de los intersticios que se forman entre CD vecinas.

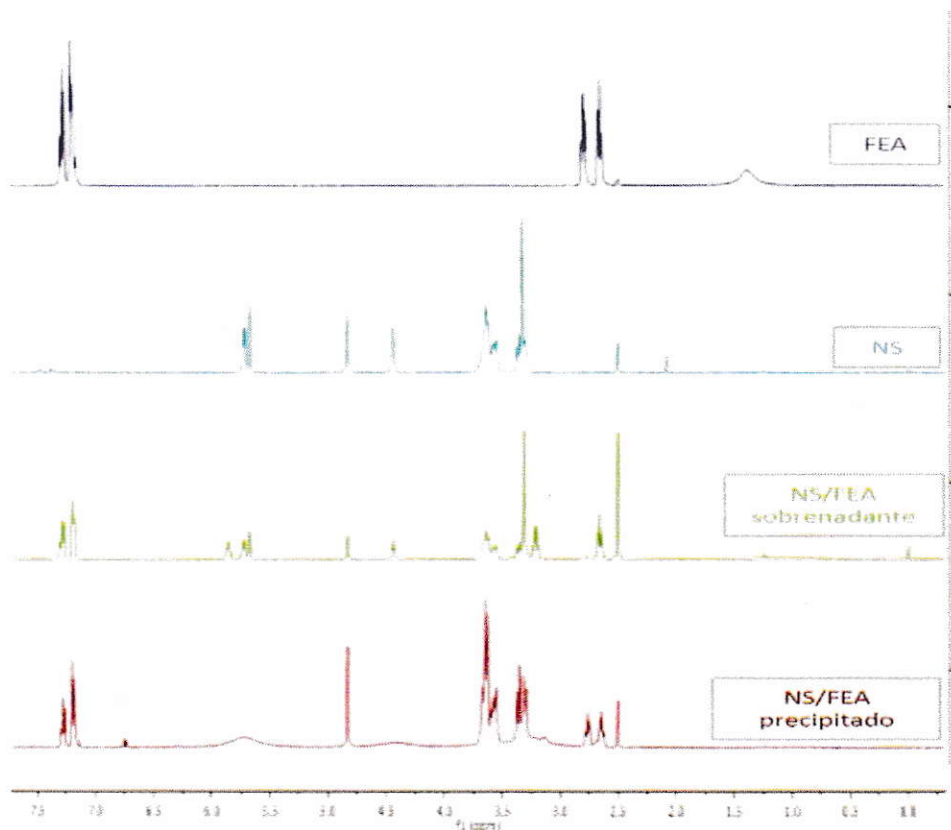
Es relevante destacar que existen desplazamientos de los protones de los grupos hidroxilos OH2, OH3 y OH6, lo que implica que las moléculas del fármaco además están interactuando con los bordes externos de las múltiples cavidades de las NS, esto debido a una inclusión parcial de AT.

#### **3.2.1.2. Análisis $^1\text{H}$ -RMN para la inclusión del fármaco feniletilamina.**

Como se comprobó previamente para la inclusión de AT, un método adecuado para la inclusión de fármacos es mediante disoluciones saturadas, por lo tanto, se empleó esta estrategia para la inclusión del fármaco FEA en las NS.

Debido a lo discutido en el punto 3.2.1, la inclusión de FEA se realizó en una razón molar 1:2 NS:FEA, y se estudiaron las señales obtenidas para el precipitado liofilizado de la mezcla y para el sobrenadante obtenido, también liofilizado. Como es posible de observar en la figura 27, los espectros tanto del precipitado como del sobrenadante presentan las señales de sus precursores,

con distintas intensidades, esto indica que el CI se encontró presente en ambas fases de la síntesis, contrariamente al caso de la inclusión de AT.

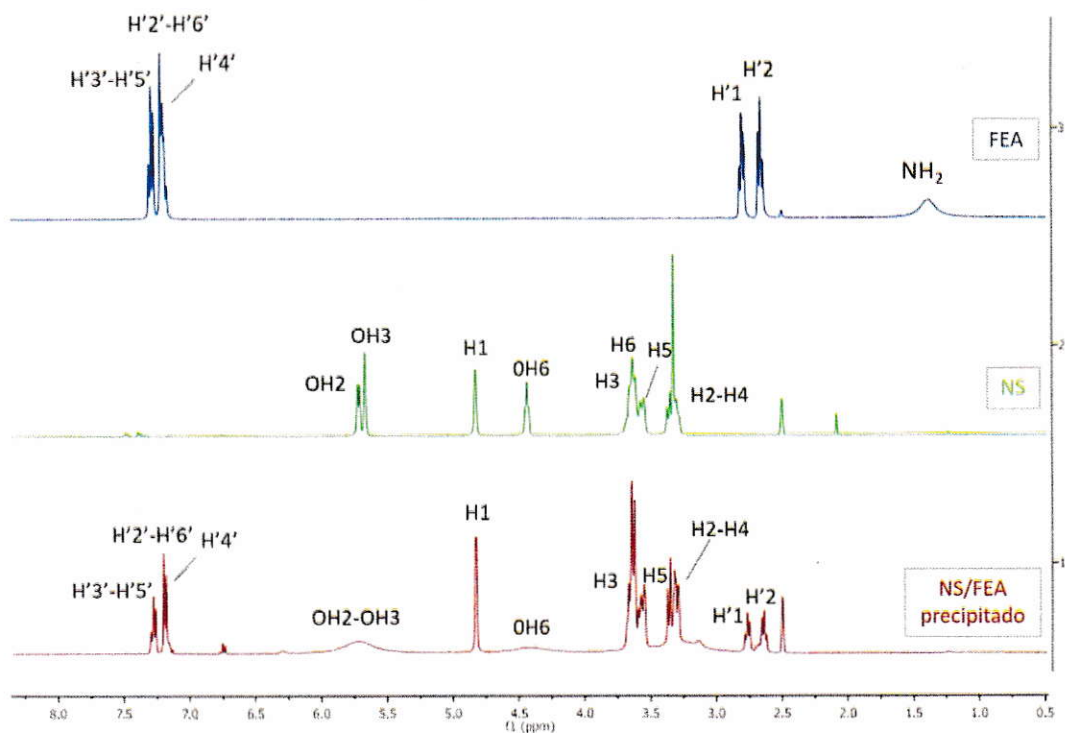


**Figura 27.** Espectros  $^1\text{H}$ -RMN utilizando el primer método de inclusión para NS-FEA en el precipitado liofilizado (rojo) y en el sobrenadante liofilizado (verde), NS sintetizada (celeste), fármaco FEA pura (morado).

Debido a que en ambas fases (precipitado y solución) podemos encontrar la complejo NS-FEA formado, se realizó el análisis de los desplazamientos químicos de los protones por RMN para ambos sistemas. La figura 28 presenta los espectros  $^1\text{H}$ -RMN para el CI NS-FEA<sub>precipitado</sub>, previamente liofilizado, los desplazamientos químicos correspondientes se presentan en la tabla 3.6, mientras que en la figura 29 se muestran los espectros correspondientes para el CI NS-



FEA<sub>sobrenadante</sub>, también anteriormente liofilizado, con sus respectivos valores de desplazamientos químicos en la tabla 3.7.



**Figura 28.** Espectros  $^1\text{H}$ -RMN de la inclusión NS-FEA<sub>precipitado</sub> liofilizado (rojo), NS (verde) y fármaco FEA puro (azul).

En el caso de este sistema binario, se observó en el espectro en rojo que las señales correspondientes a los grupos OH provenientes de la NS han bajado su intensidad, casi desapareciendo para el caso del OH6, mientras que en el caso de los OH2 y OH3 éstos se han solapado mostrándose como una sola señal ancha y de poca intensidad, esto se debe a interacciones entre NS mediante puentes de hidrógeno o con moléculas de FEA luego de ser sometidos a las condiciones de la inclusión, lo que provoca que estos grupos hidroxilo se acerquen en extremo. La señal del grupo  $\text{NH}_2$  presente en el espectro del fármaco puro se observa a campo alto, sin embargo, ha desaparecido en el espectro del CI, se conoce que los protones de los grupos amino se

mueven en un rango amplio del espectro, entre 0 y 5 ppm, por lo que lo más probable es que en este caso se hayan desplazado hacia campos más bajos y por lo tanto su señal esté solapada con las señales de la NS. Este mismo efecto se pudo observar para el complejo  $\beta$ CD-FEA, que ya fue reportado por nuestro grupo (Sierpe, 2015).

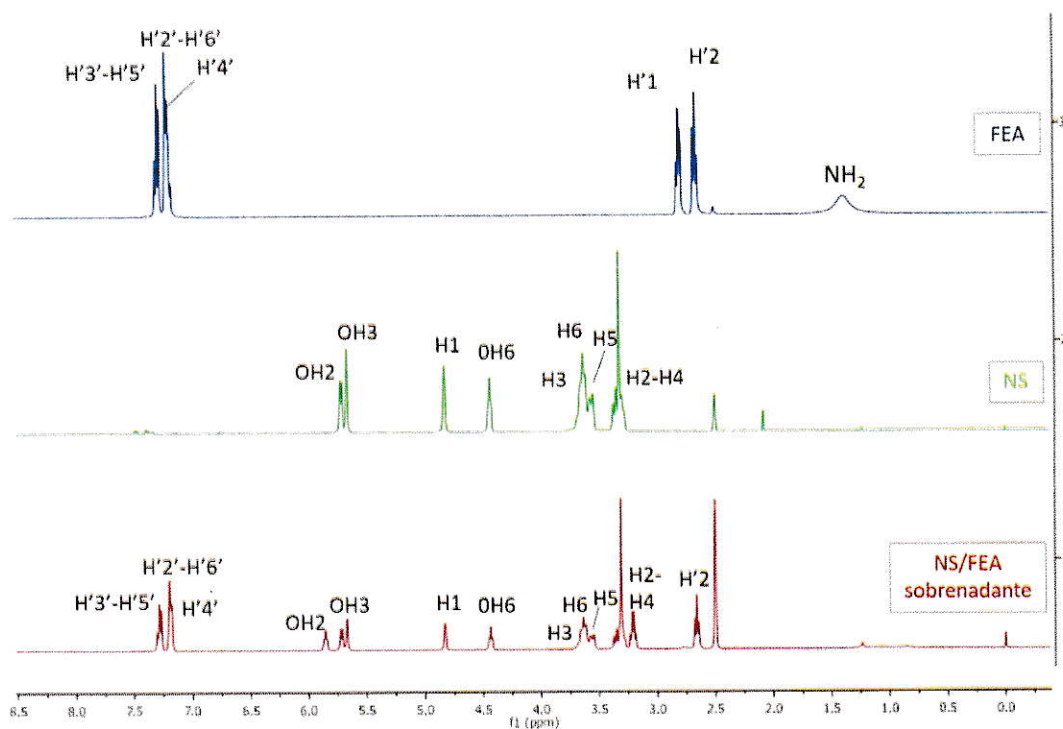
**Tabla 3.6.** Desplazamientos químicos para el compuesto de inclusión formado entre NS y fármaco FEA en el precipitado previamente liofilizado de la mezcla.

Protones	$\delta$ NS (ppm)	$\delta$ FEA (ppm)	$\delta$ CI NS-FEA <sub>precipitado</sub> (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
H1	4,827	---	4,828	-0,001
H2	3,301	---	3,301	0
H3	3,655	---	3,667	-0,012
H4	3,301	---	3,301	0
H5	3,562	---	3,573	-0,011
H6	3,624	---	3,632	-0,008
OH2	5,713	---	5,719	-0,006
OH3	5,665	---	5,719	-0,054
OH6	4,437	---	4,422	0,015
NH <sub>2</sub>	---	1,385	---	---
H'1	---	2,798	2,765	0,033
H'2	---	2,658	2,659	-0,001
H'2'-H'6'	---	7,205	7,191	0,014
H'4'	---	7,178	7,165	0,013
H'3'-H'5'	---	7,285	7,278	0,007

Analizando los desplazamientos químicos del CI en la tabla 3.6, fue posible determinar que los mayores corrimientos son propios de los protones H3 y H5, orientados hacia el interior de la matriz de  $\beta$ CD, y los OH3 y OH6 en los bordes secundarios y primarios respectivamente, esto último indica que ocurre una inclusión parcial del huésped en la matriz de  $\beta$ CD, además los protones del anillo aromático de FEA se desplazan hacia campos más altos, lo que indica que estos presentan

un apantallamiento de su nube electrónica, confirmándose la inclusión del anillo principalmente en las cavidades de las unidades de  $\beta$ CD que conforman a las NS.

Para el caso del CI NS- $\text{FEA}_{\text{sobrenadante}}$  su espectro y el de sus precursores se presenta en la figura 29.



**Figura 29.** Espectros  $^1\text{H-RMN}$  del compuesto de la inclusión NS- $\text{FEA}_{\text{sobrenadante}}$  (rojo), NS (verde) y fármaco FEA puro (azul).

Al observar el espectro del CI, en rojo, fue posible determinar que desaparecen las señales del  $\text{NH}_2$  y del  $\text{H}'_1$  del fármaco FEA mientras que todas las otras aparecen con baja intensidad. La desaparición de estas señales se debe probablemente a que estén solapadas. La tabla 3.7 corresponde a los desplazamientos químicos para el CI NS- $\text{FEA}$  en el sobrenadante de la mezcla.

**Tabla 3.7.** Desplazamientos químicos para el compuesto de inclusión formado entre la NS y fármaco FEA en el sobrenadante de la mezcla.

Protones	$\delta_{NS}$ (ppm)	$\delta_{FEA}$ (ppm)	$\delta_{CI\ NS-FEA_{sobrenadante}}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
H1	4,827	---	4,829	-0,002
H2	3,301	---	3,211	0,090
H3	3,655	---	3,660	-0,005
H4	3,301	---	3,211	0,090
H5	3,562	---	3,565	-0,003
H6	3,624	---	3,626	-0,002
OH2	5,713	---	5,856	-0,143
OH3	5,665	---	5,671	-0,006
OH6	4,437	---	4,436	0,001
NH <sub>2</sub>	---	1,385	---	---
H'1	---	2,798	---	---
H'2	---	2,658	2,660	-0,002
H'2'-H'6'	---	7,205	7,198	0,007
H'4'	---	7,178	7,179	-0,001
H'3'-H'5'	---	7,285	7,285	0

Al analizar los desplazamientos químicos, se pudo observar que los mayores corrimientos corresponden a los protones H2 y H4 de la NS, es decir para los protones externos de la matriz de  $\beta$ CD, también ocurre para los protones de los grupos hidroxilos secundarios OH3 y en mayor medida para los OH2, lo que indica una alta interacción entre éstos debido probablemente a una deformación de la NS al momento de incluir al fármaco FEA. La inclusión entonces es prioritariamente entre los espacios intersticiales de los baldes de  $\beta$ CD con las moléculas de FEA, lo anterior no descarta la efectiva inclusión al interior de las cavidades, debido a que la magnitud de los desplazamientos químicos observados está en acuerdo con lo reportado en literatura (Sierpe, 2015).

### 3.2.2. Análisis mediante espectroscopía infrarroja, IR.

Espectroscopía IR fue utilizada también para estudiar la inclusión de los fármacos en las NS formadas, mediante el análisis vibracional de los enlaces propios de cada uno de sus componentes, confirmando que los CI son estructuras con un espectro diferentes al de sus precursores, esto por comparación de las señales más características de cada uno de ellos.

#### 3.2.2.1. Análisis IR para la inclusión del fármaco 2-amino-4-(4-clorofenil)tiazol.

En la figura 30 se presenta el espectro IR del CI y en las figuras 31 y 32 los espectros de sus precursores, NS y AT, respectivamente.

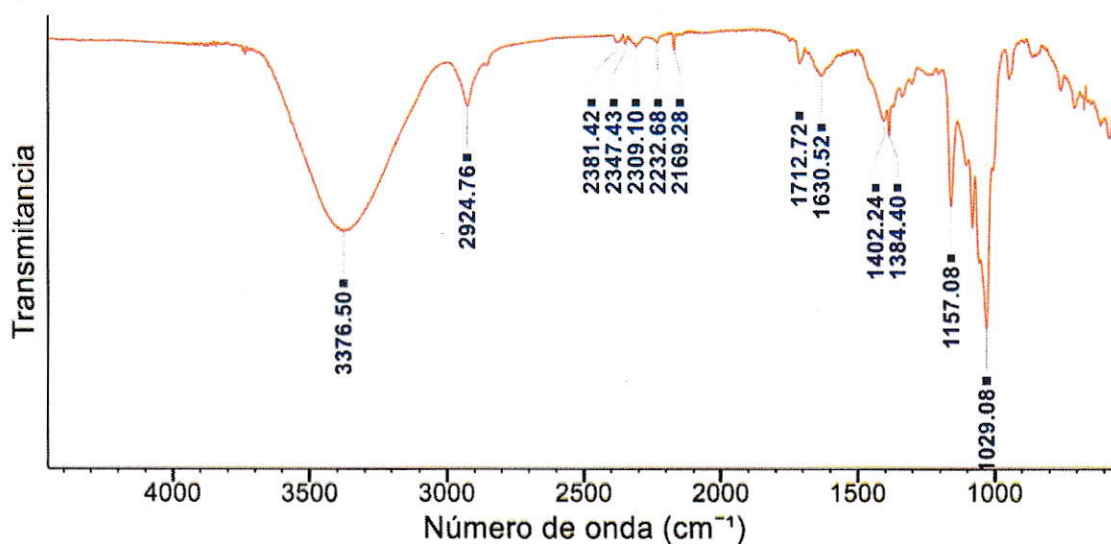


Figura 30. Espectro IR del CI NS-AT.

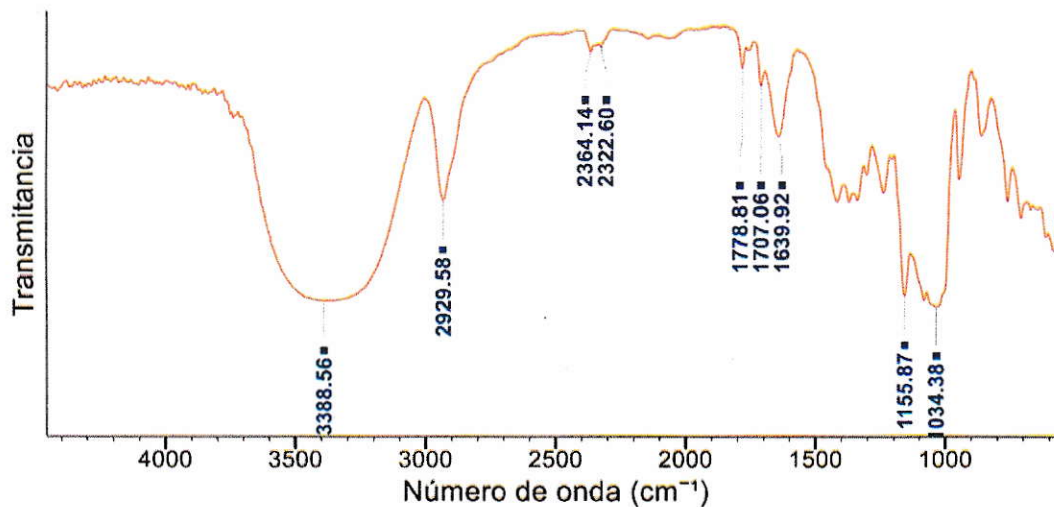


Figura 31. Espectro IR de la NS.

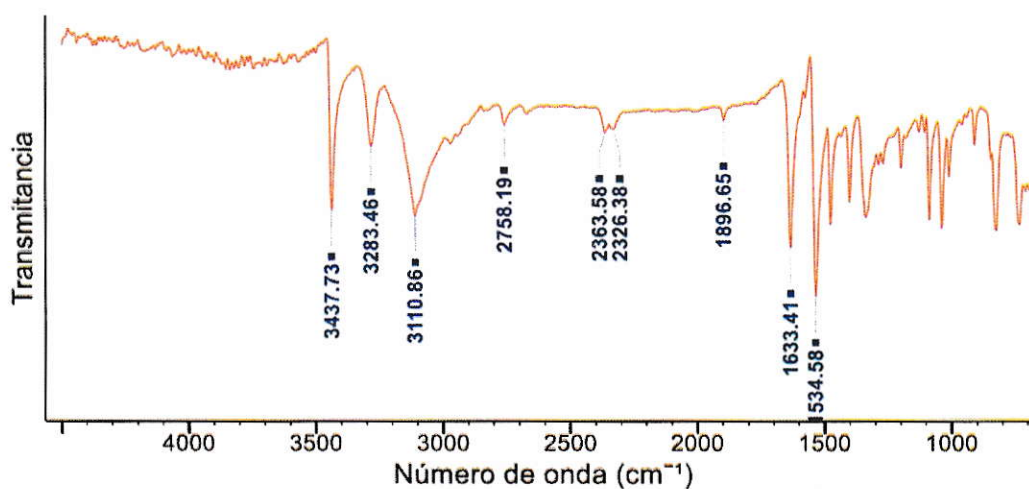


Figura 32. Espectro IR del fármaco AT puro.

Se observaron las diferencias entre los tres espectros presentados. El espectro del fármaco puro muestra una serie de bandas débiles y angostas, a 3110,86 cm⁻¹ y 1534,58 cm⁻¹ se presentan bandas del anillo aromático para-sustituido y a 1633,41 cm⁻¹ una banda característica para el grupo NH₂ propio de la estructura.

Comparando los espectros de la NS y del CI NS-AT, fue posible observar que las bandas presentes en el CI son menos anchas, con respecto a las de la NS. Además, en la región media del espectro, entre los  $2100\text{ cm}^{-1}$  y  $2400\text{ cm}^{-1}$  se presentan 5 bandas pequeñas pudiendo atribuirse a una mezcla de las bandas que aparecen en esa zona tanto en el fármaco como en la NS, confirmándose la formación de esta nueva nanoestructura, diferente a sus precursores.

### 3.2.2.2. Análisis IR para la inclusión del fármaco feniletilamina.

Las figuras 33 y 34 muestran los espectros IR de los CI NS-FEA<sub>sobrenadante</sub> y NS-FEA<sub>precipitado</sub>, respectivamente. Al compararlos no se observaron diferencias significativas entre si, lo que sugiere que el CI se formó en ambas fases. lo que está de acuerdo con lo anteriormente observado usando  $^1\text{H-RMN}$  (ver figura 27).

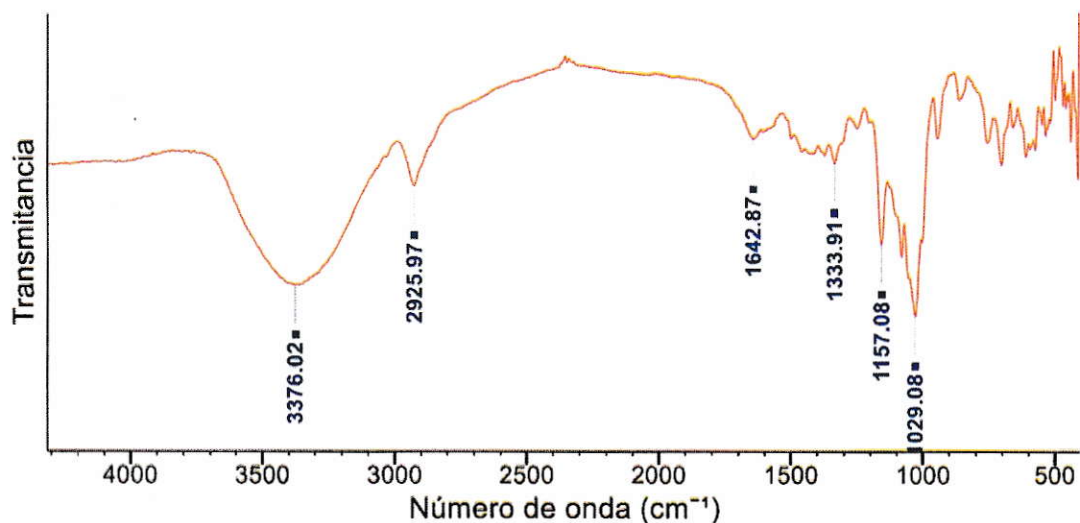
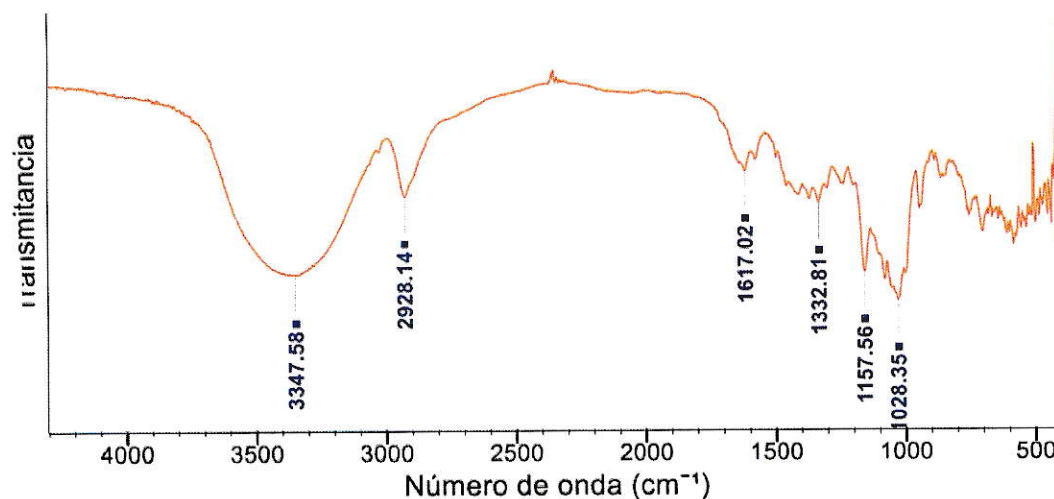
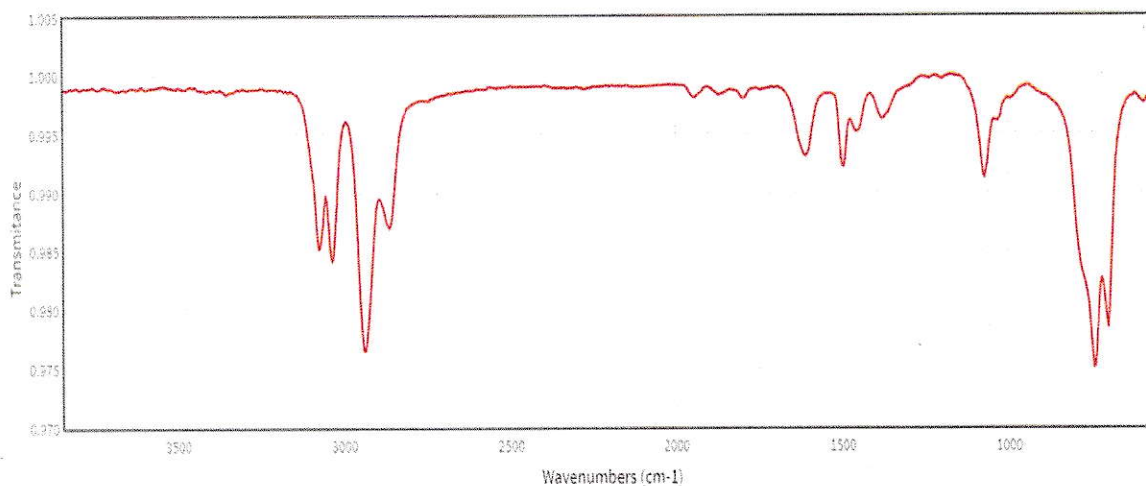


Figura 33. Espectro IR del CI NS-FEA<sub>sobrenadante</sub>.



**Figura 34.** Espectro IR del CI NS-FEA<sub>precipitado</sub>.



**Figura 35.** Espectro IR teórico del fármaco FEA. Obtenido del National Institute of Standards and Technology, U.S. Department of Commerce, NIST WebBook, SRD 69.

Fue posible observar en ambos espectros las bandas características para los grupos funcionales en el CI. Entre 1617 y 1642  $\text{cm}^{-1}$  se presenta una banda correspondiente al grupo amino del fármaco FEA, una banda ancha a 3300  $\text{cm}^{-1}$  aproximadamente que es propia de los grupos OH presentes en la NS, y acoplada a ésta también debe encontrarse la banda correspondiente para el anillo aromático de la FEA. Además, al compararlos con el espectro teórico del fármaco puro, figura 35,



y con el espectro de la NS pura, figura 31, se observa claramente las diferencias entre ellos, lo que confirma que se trata de una nueva especie.

### 3.2.3. Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión, TEM.

#### 3.2.3.1. Análisis TEM para la inclusión del fármaco 2-amino-4-(4-clorofenil)tiazol.

Del mismo modo que se realizó esta caracterización para las NS sintetizadas, también se empleó para observar las NS con el fármaco AT incluido. Las figuras 36, 37 y 38 muestran micrografías TEM del complejo binario NS-AT. El rango de tamaños se mantuvo entre 240 a 460 nm, es decir, en la misma escala que las NS sin huésped. La forma de las nanoestructuras no es completamente esférica, debido probablemente a la aglomeración de NS tras el protocolo de inclusión de AT.

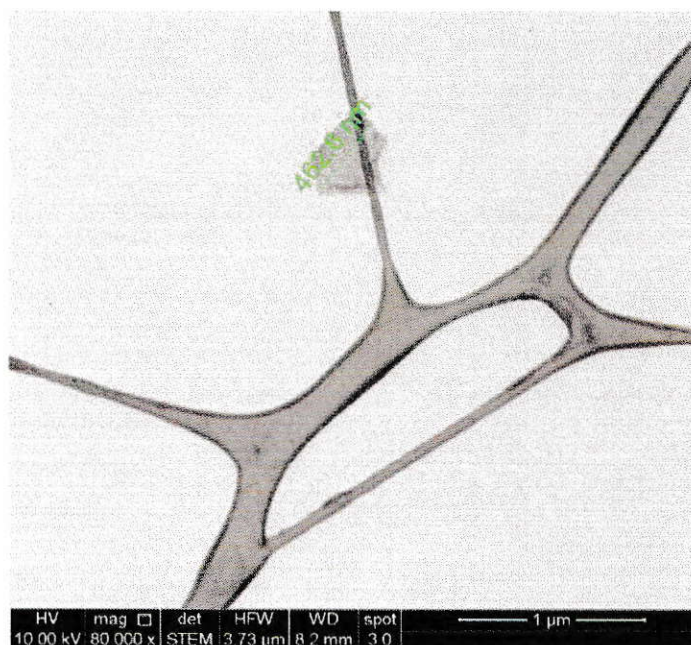
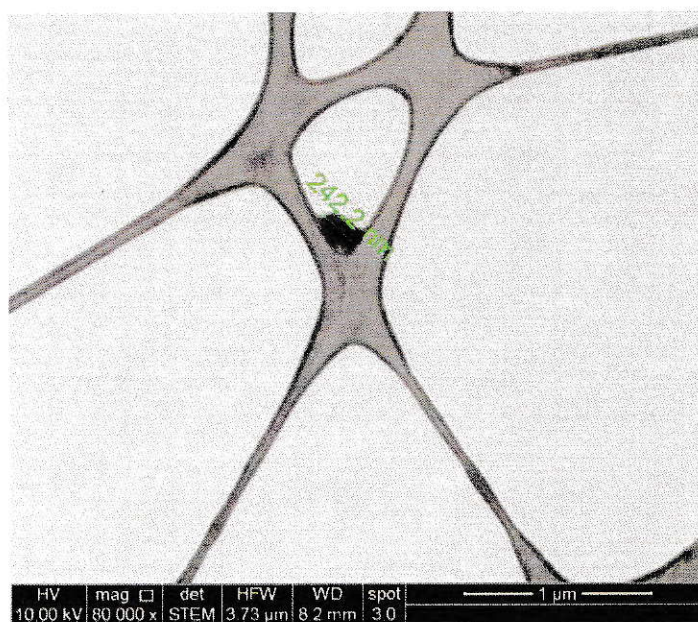


Figura 36. Micrografía TEM de campo claro de NS-AT, a una magnificación de 80000x.



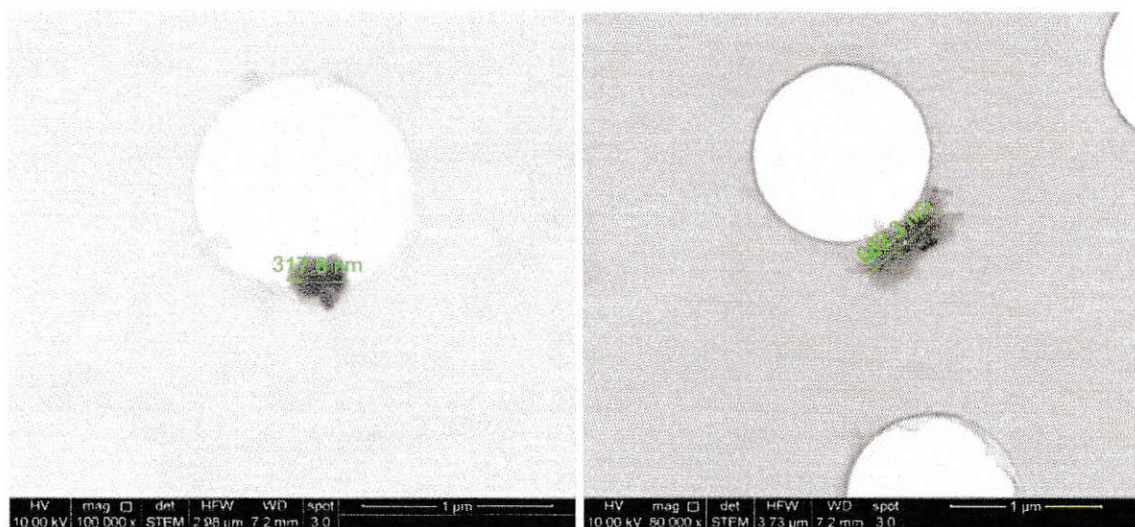
**Figura 37.** Micrografía TEM de campo claro para dos nanopartículas de NS-AT a una magnificación de 80000x.



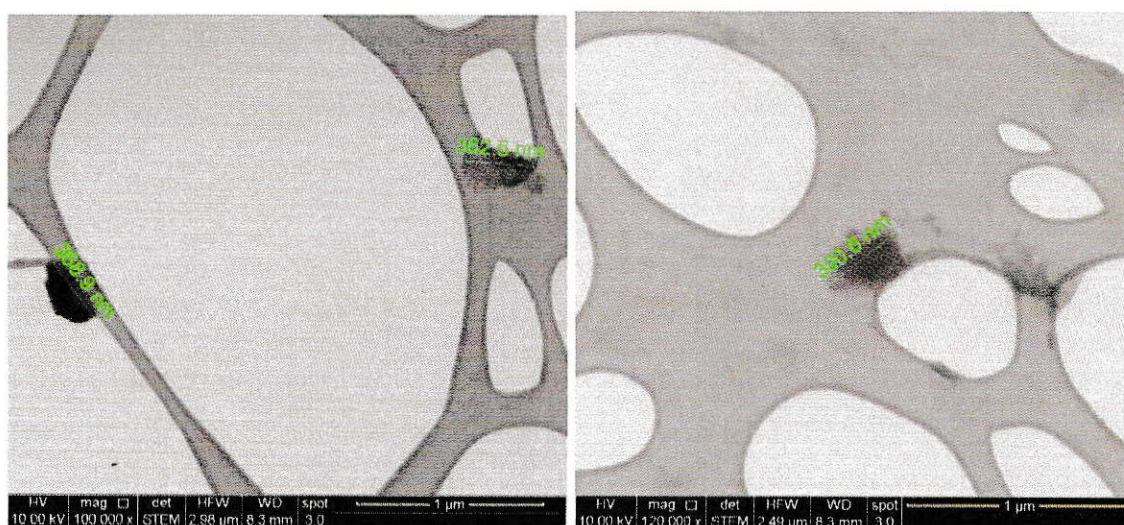
**Figura 38.** Micrografía TEM de campo claro de NS-AT a una magnificación de 80000x.

### 3.2.3.2. Análisis TEM para la inclusión del fármaco feniletilamina.

Al igual que se hizo para el CI anterior, en este caso se pudo observar la forma de las nuevas NS con FEA obtenidas, tanto para la muestra tomada del precipitado, figura 39, como la del sobrenadante, figura 40.



**Figura 39.** Micrografías TEM de campo claro para NS-FEA en el precipitado liofilizado.



**Figura 40.** Micrografía TEM de campo claro para NS-FEA en el sobrenadante liofilizado.

Fue posible evaluar los tamaños de las nanoestructuras obtenidas, los CI mantuvieron el rango de tamaño que presentaron las NS sintetizadas y libres de huésped, entre 136 y 500 nm (ver figuras 11 y 12), pero al igual que lo presentado en el CI con AT, estos nuevos CI sufrieron una deformación en su estructura, lo que nuevamente se explica por la inclusión de las moléculas de FEA en las distintas cavidades de la NS. Cabe destacar que en la figura 39, la micrografía de la derecha presenta 2 nanoesponjas juntas que el equipo STEM midió como una sola de 682 nm, por lo que puede considerarse que cada una presenta un tamaño de 341 nm, lo que se presenta dentro del rango de las NS sin huésped incluido.

### 3.3. Obtención de las constantes de asociación.

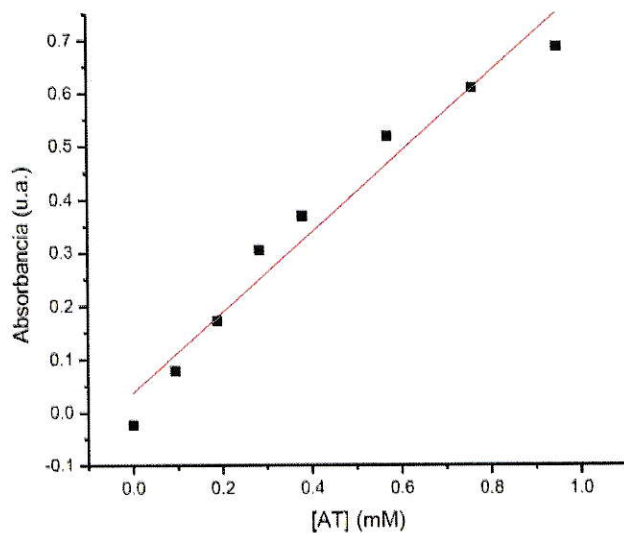
Como se explicó anteriormente, en la sección 2.4, para determinar el valor de la constante de asociación fue necesario previamente determinar el valor del coeficiente de extinción molar,  $\epsilon$ , para cada fármaco a través de una curva de calibración.

En primer lugar, se presentan los datos obtenidos para los ensayos con el fármaco AT. En la tabla 3.8 se presentan los datos medidos para la determinación del valor de  $\epsilon$ .

**Tabla 3.8.** Datos de volúmenes y concentraciones del fármaco AT en agua y sus máximos de absorbancia a 290 nm.

Volumen AT (mL)	Volumen agua (mL)	AT (mg)	[AT] (mM)	Absorbancia (u.a.)
2,0	0	5,0	0,949	0,6866
1,6	0,4	4,0	0,759	0,6095
1,2	0,8	3,0	0,569	0,5180
0,8	1,2	2,0	0,380	0,3704
0,6	1,4	1,5	0,285	0,3054
0,4	1,6	1,0	0,190	0,1721
0,2	1,8	0,5	0,095	0,0781
0	2	0	0	0

Al graficar la concentración de AT versus la absorbancia máxima, a 290 nm, se obtuvo la recta que se presenta en la figura 41, en la que la pendiente corresponde al valor de  $\epsilon$ , que en este caso fue  $0,7547 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .



Pendiente	Error estándar
0,7547	0,007

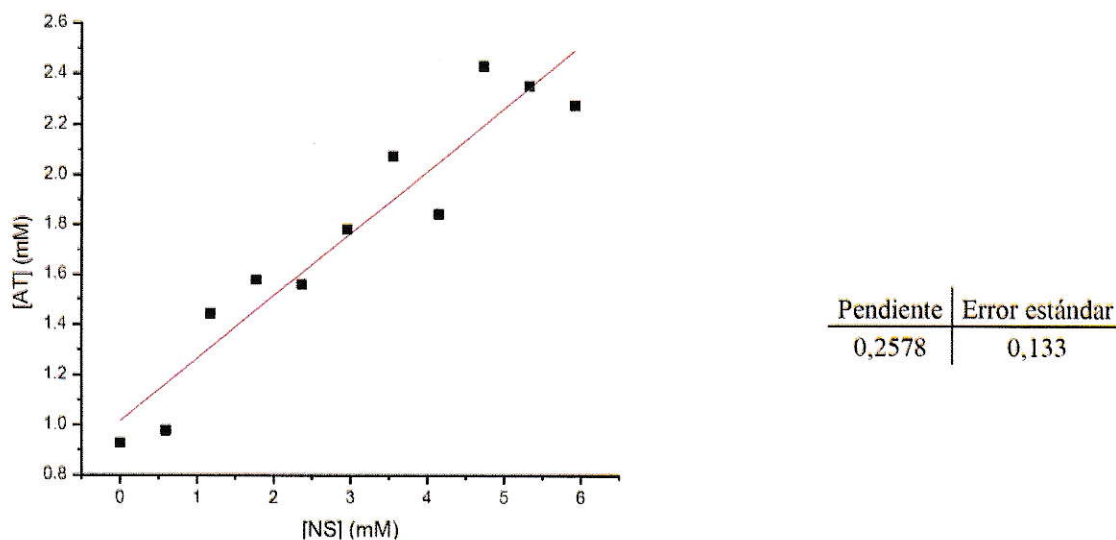
**Figura 41.** Gráfica lineal entre la concentración de AT versus sus respectivos máximos de absorbancia a 290 nm.

Aplicando el valor del coeficiente de extinción  $\epsilon$  a la ecuación 2.1 fue posible determinar las concentraciones de AT presentes en los distintos ensayos utilizando el modelo Higuruchi-Connors. Estos datos se presentan en la tabla 3.9 y son acompañados por el gráfico de la figura 42.

**Tabla 3.9.** Valores de los diferentes ensayos realizados para calcular la  $K_a$  del sistema NS-AT en agua.

AT (mg)	Volumen stock (mL)	Volumen agua (mL)	NS (mg)	[NS] (mM)	Absorbancia (u.a.)	[AT] (mM)
5,0	2,0	0	200	5,920	1,7177	2,276
5,0	1,8	0,2	180	5,328	1,7751	2,352
5,0	1,6	0,4	160	4,736	1,8331	2,429
5,0	1,4	0,6	140	4,144	1,3908	1,843
5,0	1,2	0,8	120	3,552	1,5662	2,075
5,0	1,0	1,0	100	2,960	1,3437	1,780
5,0	0,8	1,2	80	2,368	1,1789	1,562
5,0	0,6	1,4	60	1,776	1,1909	1,578
5,0	0,4	1,6	40	1,184	1,0889	1,443
5,0	0,2	1,8	20	0,592	0,7392	0,979
5,0	0	2,0	0	0	0,7000	0,927

La figura 42 muestra la recta que se obtuvo a partir de las concentraciones de AT solubilizada frente a las concentraciones de NS agregadas en cada ensayo. La constante de asociación,  $K_a$ , para el sistema NS-AT fue  $3744,8 \text{ M}^{-1}$  y se calculó a partir de la pendiente de la recta y empleando la ecuación 2.2.



**Figura 42.** Gráfica lineal de la concentración de AT solubilizada versus la concentración de NS agregada.

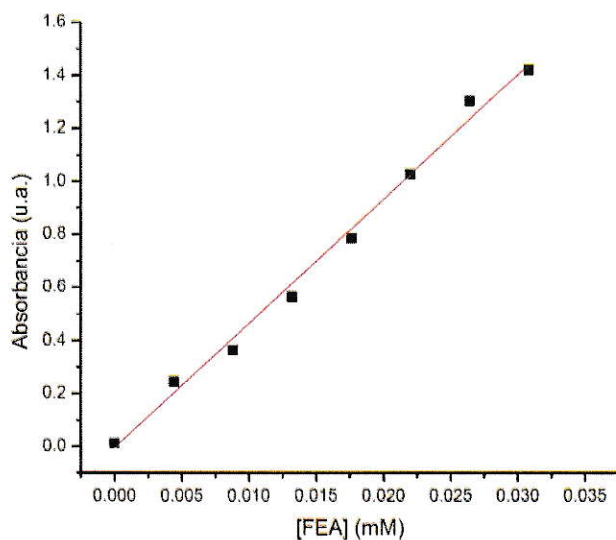
A continuación, se presentan los resultados obtenidos para los ensayos con FEA.

En la tabla 3.10 se presentan los datos empleados para la obtención del valor de  $\epsilon$ .

**Tabla 3.10.** Datos de volúmenes y concentraciones fármaco FEA en agua y sus máximos de absorbancia a 310 nm.

Volumen FEA (mL)	Volumen agua (mL)	[FEA] mM	Absorbancia (u.a)
0	2,0	0	0,0132
0,1	1,9	0,00441	0,2441
0,2	1,8	0,00882	0,3648
0,3	1,7	0,01323	0,5642
0,4	1,6	0,01764	0,7851
0,5	1,5	0,02205	1,0267
0,6	1,4	0,02646	1,3023
0,7	1,3	0,03087	1,4199

Al graficar la concentración de FEA versus la absorbancia máxima a 310 nm, se obtuvo la recta mostrada en la figura 43, en este caso el valor de  $\epsilon$  fue  $46,821 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .



Pendiente	Error estándar
46,821	0,126

**Figura 43.** Gráfica lineal de la concentración de FEA versus sus respectivos máximos de absorbancia a 310 nm.

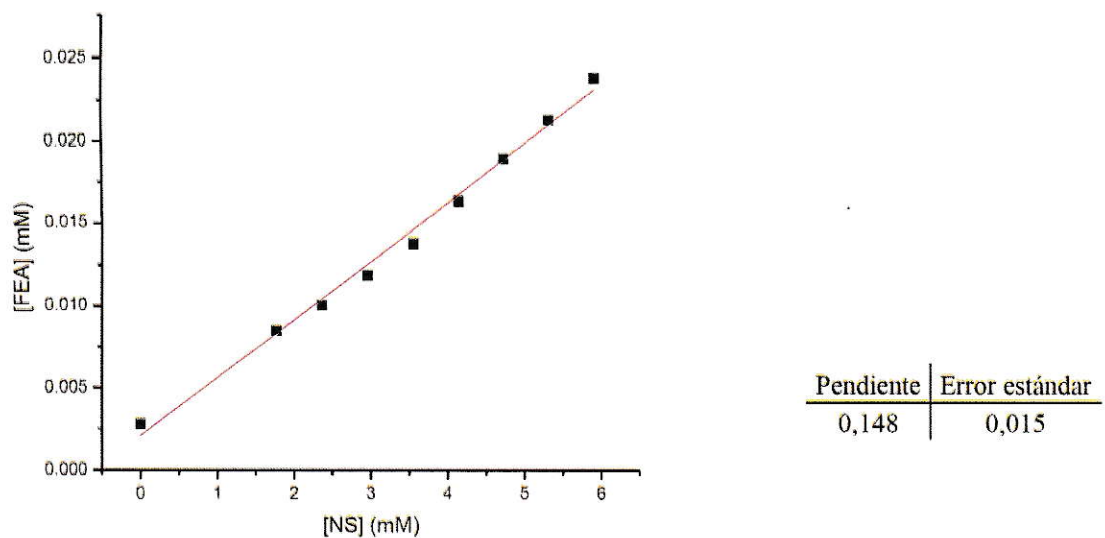
Al introducir este valor de  $\epsilon$  en la ecuación 2,1 fue posible obtener el valor de la concentración de FEA en los distintos ensayos realizados. Los datos se presentan en la tabla 3.11, que es acompañada, además, con el gráfico correspondiente (figura 44).

**Tabla 3.11.** Valores de los diferentes ensayos realizados para calcular la  $K_a$  del sistema NS-FEA en agua.

FEA (mL)	Volumen stock (mL)	Volumen agua (mL)	NS (mg)	[NS] (mM)	Absorbancia (u.a.)	[FEA] (mM)
0,5	2,0	0	200	5,920	1,1267	0,0237
0,5	1,8	0,2	180	5,328	1,0067	0,0212
0,5	1,6	0,4	160	4,736	0,8961	0,0189
0,5	1,4	0,6	140	4,144	0,7751	0,0163
0,5	1,2	0,8	120	3,552	0,6542	0,0138
0,5	1,0	1,0	100	2,960	0,5648	0,0119
0,5	0,8	1,2	80	2,368	0,4788	0,0101
0,5	0,6	1,4	60	1,776	0,4041	0,0085
0,5	0	2,0	0	0	0,1326	0,0028

Se muestra en la figura 44 la recta obtenida a partir de las concentraciones de FEA solubilizada, versus las concentraciones de NS agregadas en cada ensayo. La constante de asociación,  $K_a$ , para el sistema NS-FEA fue  $1334,24 \text{ M}^{-1}$  y se calculó a partir de la pendiente de la recta y el uso de la ecuación 2,2.





**Figura 44.** Gráfica lineal de la concentración de FEA solubilizada versus la concentración de NS agregada.

Tanto las curvas de calibración para la determinación de los coeficientes de extinción molar, para cada fármaco, como las curvas de absorbancia para la constante de asociación de cada uno se presentan en la sección 6.2 de los anexos.

A pesar de que la inclusión de los fármacos en la NS se realizó en una razón estequiométrica 1:2 matriz:huésped, las  $K_a$  de ambos sistemas se calcularon considerando una relación de tipo 1:1 matriz:huésped, ya que el exceso de fármaco que se agregó permitía asegurar que ocurriera la inclusión de una molécula de fármaco por cada balde de  $\beta$ CD en la NS, no de más moléculas de fármaco, ya que es conocido que un balde de  $\beta$ CD tiene capacidad para albergar un solo anillo aromático en su interior (Chen, 2006).

En general, los valores de  $K_a$  de los complejos de CD varían entre 50 y 2000  $M^{-1}$ . Valores más bajos a 50  $M^{-1}$  indican una limitación en la viabilidad de una formulación farmacéutica, ya que puede que no se lleve a cabo una liberación controlada del fármaco. Por otra parte, valores

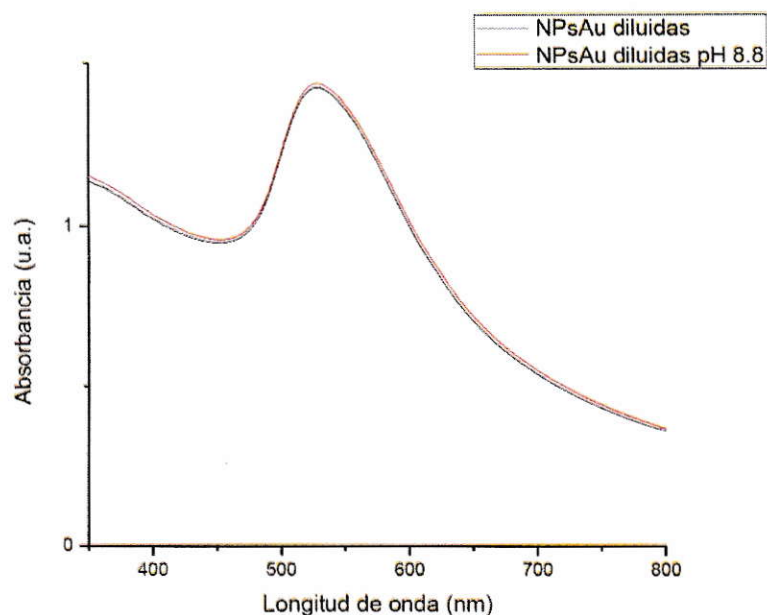
superiores a  $2000 \text{ M}^{-1}$  también presentan limitantes, ya que las velocidades de reacción se pueden ver afectadas por el alto grado de inclusión del fármaco en la cavidad de la CD, evitando de este modo la liberación del fármaco y retrasando, por ejemplo, la farmacocinética (Connors, 1997; Rao, 2003). Sin embargo, esta misma condición genera un efecto positivo si se considera la retención, por ejemplo, de contaminantes en agua y suelos.

### **3.4. Síntesis de nanopartículas de oro.**

Para estudiar la formación de las NPsAu, se realizó una caracterización mediante espectrofotometría UV-Vis, y TEM.

#### **3.4.1. Análisis mediante espectrofotometría UV-Visible.**

Como se explicó anteriormente la dilución de las NPsAu se realizó en agua nanopura a pH 8,8, esto con el fin de promover la dilución de los CI al momento de funcionalizar las NPsAu con éstos; se midió la absorbancia a esta dilución y se comparó con la absorbancia de las NPsAu diluidas en agua nanopura a pH 5,5. En la figura 45, se observa que las bandas de plasmón de resonancia no presentan cambios si la dilución se realiza a diferentes pH, por lo que se puede afirmar que aumentar el pH, no desestabiliza el sistema, ni genera ningún tipo de modificación en las características estructurales de las NPsAu.



**Figura 45.** Espectro de absorción para las NPsAu diluidas a pH 5,5 (rojo) y pH 8,8 (negro) a un máximo de absorción de 527,5 nm.

Con los datos de absorción obtenidos y conociendo que el valor del coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) para las NPsAu es  $0,2266 \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , se puede determinar la concentración de las NPsAu, usando la ecuación 2.1. Estos datos se expresan en la tabla 3.12.

**Tabla 3.12.** Datos obtenidos a partir del estudio por espectrofotometría UV-visible para las NPsAu.

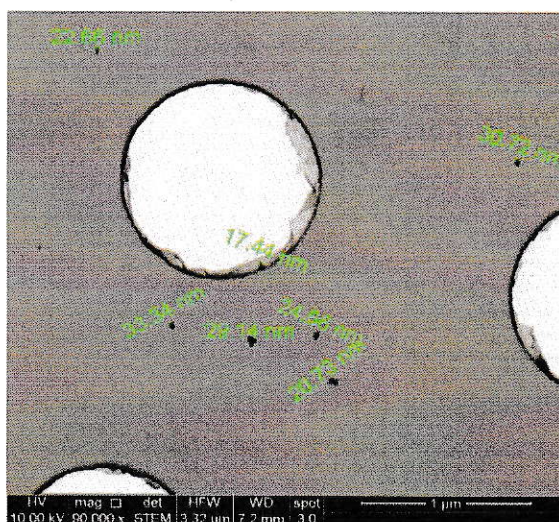
Sistema	Absorbancia máxima (u.a)	Longitud de onda (nm)	Concentración NPsAu (nM)
NPsAu concentradas	3,0683	527,5	13,5406
NPsAu diluidas	1,4204	527,5	6,2683
NPsAu diluidas pH 8,8	1,4314	527,5	6,3168

Se conoce que para NPsAu esféricas de 10 nm de diámetro promedio, la resonancia de plasmón superficial (RPS) presenta un máximo de absorción a 520 nm (Creighton, 1991); un desplazamiento a mayores longitudes de onda indica un mayor tamaño de la nanopartícula, por lo

tanto, para un valor de absorbancia máxima a 528 nm aproximadamente, se puede estimar que el diámetro de las NPsAu sintetizadas debe ser cercano a los 20 nm. Para una valorización exacta del tamaño, se realizaron estudios mediante TEM.

### 3.4.2. Análisis TEM para nanopartículas de oro.

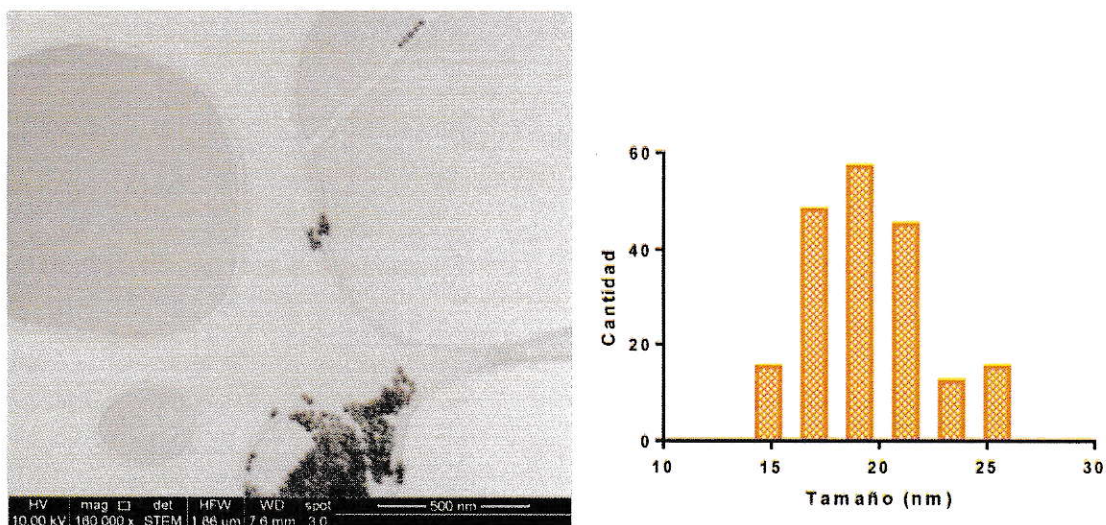
Usando TEM fue posible observar de manera directa las NPsAu formadas, además de determinar su forma y calcular el tamaño promedio de las mismas. Es así como en las figuras 46 y 47 se muestran dos micrografías distintas de las NPsAu sintetizadas. Se observa claramente su forma esférica, con diámetros que varían entre 17 nm y 33 nm, aproximadamente.



**Figura 46.** Micrografía TEM de campo claro para NPsAu sintetizadas con magnificación de 90000x.

En la figura 47 se presenta además el histograma de la población, representativa para las NPsAu sintetizadas. Un análisis de este indica que el tamaño promedio de las nanopartículas obtenidas es de 19,51 nm, lo que corrobora la estimación entregada por el análisis mediante espectrofotometría UV-Vis en la sección anterior, 3.4.1. NPsAu entre 4 y 100 nm no presentan efectos citotóxicos (Yen, 2009), por lo tanto, podemos afirmar que las NPsAu obtenidas presentan un tamaño

adecuado para esta investigación y además no presentarían toxicidad en una posible entrega del fármaco en el organismo.



**Figura 47.** Micrografía TEM de campo claro para NPsAu sintetizadas con magnificación de 160000x (izquierda) y el histograma correspondiente a la población de NPsAu presentes en dicha micrografía (derecha).

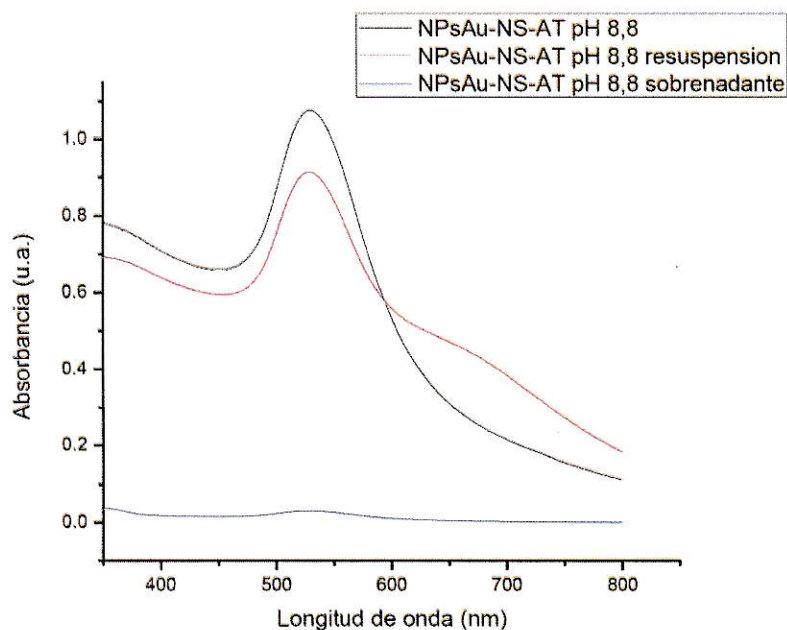
### **3.5. Formación del sistema ternario NPsAu-NS-Fármaco.**

#### **3.5.1. Estudio de la estabilización de NPsAu sobre los CI mediante espectrofotometría UV-Visible.**

Se determinó la concentración mediante absorbancia por UV-Visible a los sistemas NS-Fármaco a pH 8,8 antes de centrifugar, al sobrenadante extraído y a la resuspensión, esto con el fin de determinar si las NPsAu perdían concentración debido a la agregación cuando son estabilizadas sobre los CI o posterior a la centrifugación.

En la figura 48, se presentan los espectros de absorbancia correspondientes, observándose la curva típica de plasmón para el sistema NPsAu-NS-AT a pH 8,8, en negro. La tabla 3.13 da cuenta del valor de la concentración de la misma. Como se explicó anteriormente la solución coloidal se centrifugó y el sobrenadante fue retirado, éste último también fue evaluado (espectro en rojo), para

determinar la cantidad de NPsAu que quedaron en solución. Si bien se observa una pequeña absorbancia cercana a 530 nm, correspondiente a las NPsAu, la concentración respectiva es baja, en comparación a la del sistema original. El pellet obtenido después de centrifugar se resuspendió, obteniéndose un volumen mayor al de la muestra original, esto permite inferir que la concentración de las NPsAu disminuyó debido a una pequeña dilución, (ver espectro en azul). La curva en rojo además muestra un hombro cercano a los 700 nm, lo que sugiere una agregación de una porción del sistema o el acoplamiento interpartícula, fenómeno esperado si las NPsAu se encuentran sobre las NS muy próximas unas de otras.



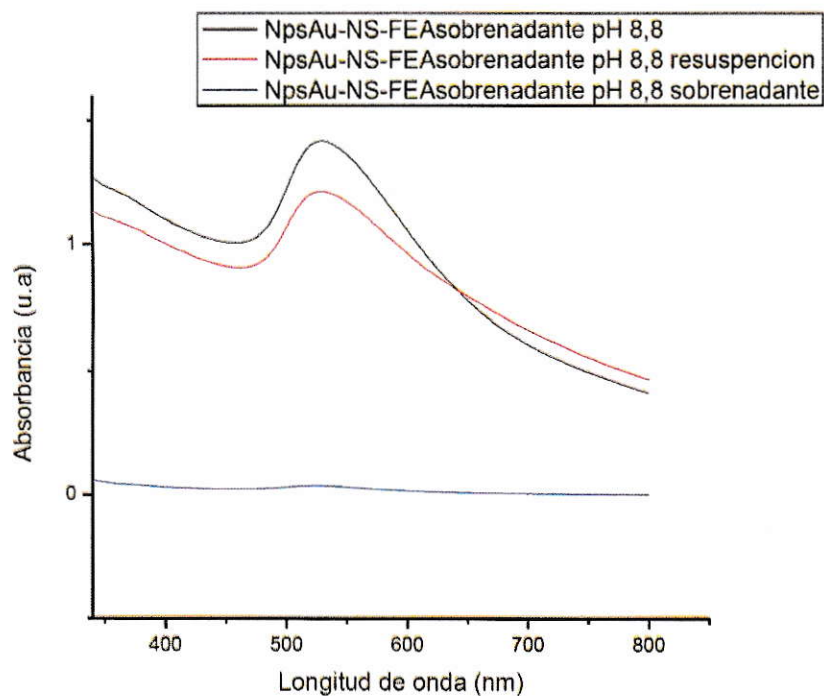
**Figura 48.** Espectro de absorción para el sistema NPsAu-NS-AT antes de centrifugar (negro), de la resuspensión luego de centrifugar (rojo) y del sobrenadante luego de centrifugar (azul).

**Tabla 3.13.** Datos obtenidos a partir del estudio por espectrofotometría UV-visible para el sistema NPsAu-NS-AT.

Sistema a pH 8,8	Absorbancia Máxima (u.a.)	Longitud de onda (nm)	Concentración NPsAu (nM)
NPsAu-NS-AT	1,0757	529,5	4,7471
NPsAu-NS-AT resuspensión	0,9115	531,0	4,0225
NPsAu-NS-AT sobrenadante	0,0281	528,5	0,1240

Es posible observar en la tabla 3.13 que la longitud de onda para la absorbancia máxima aumentó respecto de las NPsAu, tanto para el sistema antes de centrifugar como para después de haber sido centrifugado. Esto indica, a pesar de que el desplazamiento en la longitud de onda no fue drástico, que las NPsAu pueden haberse agregado luego de estabilizarse sobre el CI NS-AT, lo que tiene directa relación con el hecho de que en el espectro se muestre una segunda señal que implica el crecimiento en alguna dimensión de la nanopartícula, por lo tanto, el espectrofotómetro UV-Vis al medirlas considera que éstas poseen un tamaño mayor.

Al igual que para el sistema NPsAu-NS-AT se midió la absorbancia de los sistemas NPsAu-NS-FEA sobrenadante y precipitado. Los espectros de absorción se presentan en las figuras 49 y 50, respectivamente. Al comparar ambos espectros entre sí, es posible apreciar que las curvas son muy semejantes, lo que se corrobora también con los valores mostrados en las tablas 3.14 y 3.15. Esto sugiere que la cantidad de fármaco FEA agregado para la síntesis se divide en partes prácticamente iguales entre el sobrenadante y el precipitado de la solución. Esto permite explicar entonces por qué mediante análisis de los espectros <sup>1</sup>H-RMN se determinó que los complejos se forman en ambas fases (precipitado y solución), a diferencia del sistema NPsAu-NS-AT en donde claramente se determina que el CI está presente únicamente en la solución.

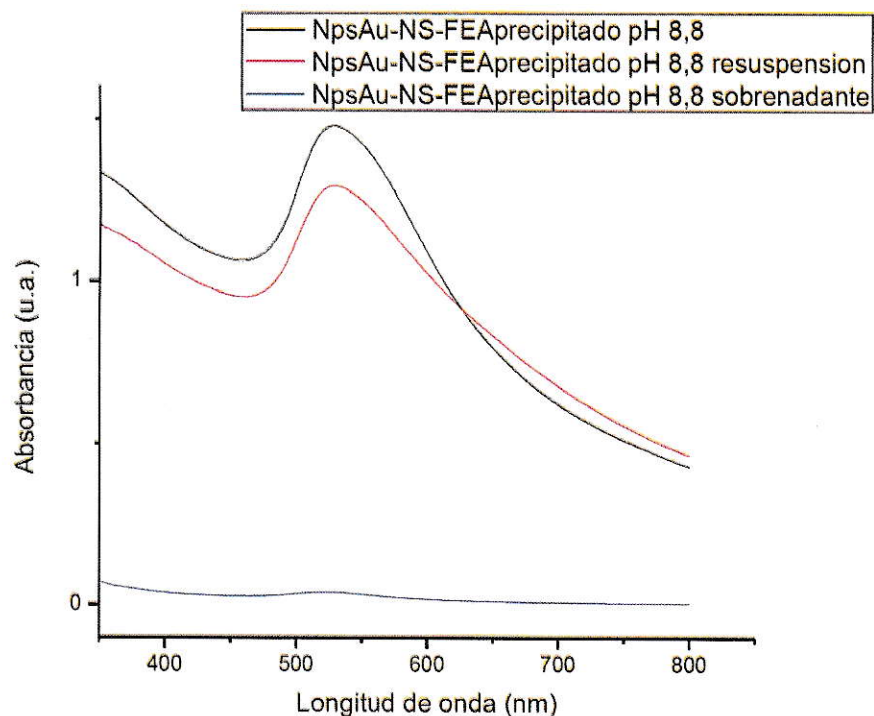


**Figura 49.** Espectro de absorción para el sistema NPsAu-NS-FEA<sub>sobrenadante</sub> antes de centrifugar (negro), de la resuspensión después de centrifugar (rojo) y del sobrenadante después de centrifugar (azul).

**Tabla 3.14.** Valores de absorción y longitud de onda. Datos obtenidos a partir del estudio por espectrofotometría UV-Visible para el sistema NPsAu-NS-FEA<sub>sobrenadante</sub>.

Sistema a pH 8,8	Absorbancia máxima (u.a.)	Longitud de onda (nm)	Concentración NPsAu (nM)
NPsAu-NS-FEA <sub>sobrenadante</sub>	1,4191	529,0	6,2625
NPsAu-NS-FEA <sub>sobrenadante</sub> resuspensión	1,2139	529,0	5,3570
NPsAu-NS-FEA <sub>sobrenadante</sub> sobrenadante	0,0339	525,0	0,1496





**Figura 50.** Espectro de absorción para el sistema NPsAu-NS-FEA<sub>precipitado</sub> antes de centrifugar (negro), de la resuspensión después de centrifugar (rojo) y del sobrenadante después de centrifugar (azul).

**Tabla 3.15.** Valores de absorción y longitud de onda. Datos obtenidos a partir del estudio por espectrofotometría UV-visible para el sistema NPsAu-NS-FEA<sub>precipitado</sub>.

Sistema a pH 8,8	Absorbancia máxima (u.a.)	Longitud de onda (nm)	Concentración NPsAu (nM)
NPsAu-NS-FEA <sub>precipitado</sub>	1,4803	528,0	6,5326
NPsAu-NS-FEA <sub>precipitado</sub> resuspensión	1,2874	529,0	5,6813
NPsAu-NS-FEA <sub>precipitado</sub> sobrenadante	0,0379	524,0	0,1672

Observando los valores de las longitudes de onda máximas para ambos sistemas se aprecia que, al igual que ocurrió con el sistema NPsAu-NS-AT, éstos experimentan un desplazamiento que indica un crecimiento de las NPsAu, sin embargo, menor que para el sistema anteriormente descrito. Este

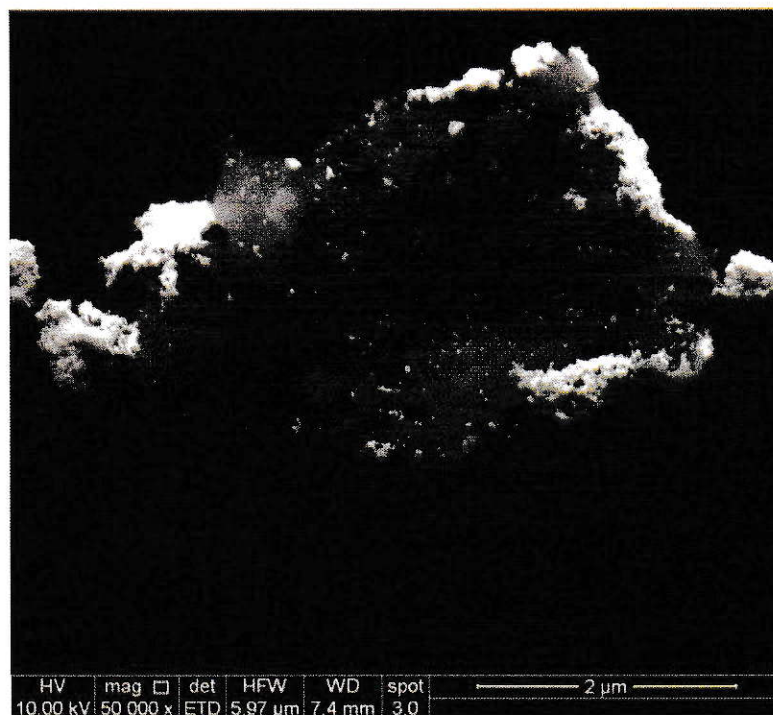
desplazamiento indica que existe un acoplamiento interpartículas al momento de estabilizarse sobre ambos CI, NS-FEA<sub>sobrenadante</sub> y NS-FEA<sub>precipitado</sub>.

### **3.5.2. Análisis mediante microscopía electrónica de barrido, SEM.**

Nuevamente se utilizó esta técnica para caracterizar la morfología de los CI, es decir, de las NS incluyendo a las moléculas huésped, con el fin de determinar si existió algún cambio respecto de la NS en su estado puro.

#### **3.5.2.1. Análisis SEM para la inclusión del fármaco 2-amino-4-(4-clorofenil)tiazol.**

En la figura 51 se muestran micrografías SEM del sistema NS-AT-NPsAu, en las cuales se muestran las NS actuando como matrices, con una morfología irregular y porosa. Además, se observó claramente las NPsAu depositadas sobre la superficie del CI, esto implica que las NPsAu se estabilizaron gracias a la presencia del grupo funcional NH<sub>2</sub> de las moléculas del fármaco que quedaron expuestos hacia el exterior de la NS. El depósito arbitrario de NPsAu que se observa sobre el CI se debió a la forma irregular del mismo.

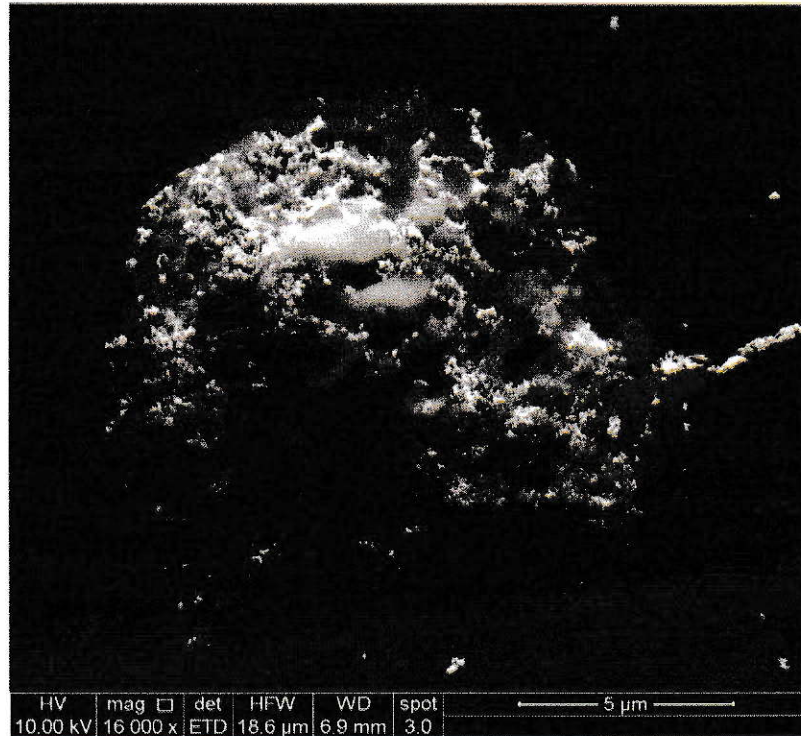


**Figura 51.** Micrografía SEM para una NS del CI NS-AT con NPsAu estabilizadas sobre su superficie.

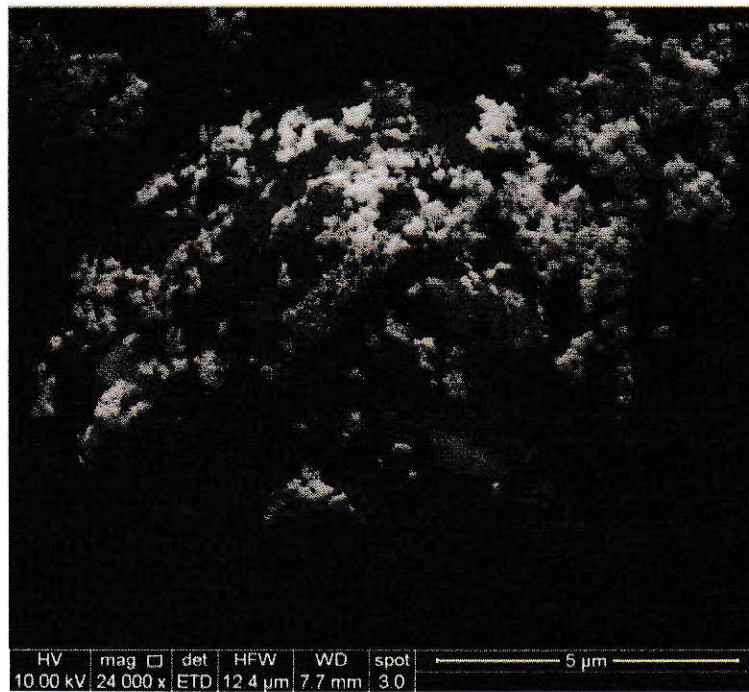
### **3.5.2.2. Análisis SEM para la inclusión del fármaco feniletilamina.**

En este caso se analizó mediante esta caracterización tanto al sobrenadante como al precipitado, ambos liofilizados, de la síntesis de inclusión.

Fue posible observar en las figuras 52 y 53 que las morfologías de los sistemas NS-FEA-NPsAu sobrenadante y precipitado son muy similares entre sí, pero, aunque se mantiene una morfología irregular y porosa, distintos a la morfología de la NS en su estado original (figura 14). En ambos casos se observó una morfología predominantemente esférica.



**Figura 52.** Micrografía SEM para una NS del precipitado liofilizado del CI NS-FEA con NPsAu estabilizadas sobre su superficie.



**Figura 53.** Micrografía SEM para una NS del sobrenadante liofilizado del CI NS-FEA con NPsAu estabilizadas sobre su superficie.

Se observó también la presencia de NPsAu en la superficie de ambos sistemas, lo que corroboró nuevamente la existencia de los fármacos, quienes mediante sus grupos funcionales expuestos hacia el exterior de la NS son capaces de estabilizar a las nanopartículas metálicas. Cabe destacar que las NS sin fármacos no pueden estabilizar a las NPsAu, debido a que no presentan grupos funcionales adecuados, tales como tioles o aminas que puedan interactuar con su superficie, esto se ha evaluado incluso para matrices de  $\beta$ CD pura.

### **3.6. Estudio mediante dispersión dinámica de la luz, DLS, y potencial Z.**

Esta técnica física está orientada a determinar la distribución de tamaños de distintas partículas en suspensión. El índice de polidispersidad (IPD) entrega información sobre la distribución de tamaños de una muestra, si se considera un rango de IPD desde 0 hasta 1, al presenta un valor de IPD inferior a 0,1 se considera que la muestra presenta una alta homogeneidad en la población de partículas, por otra parte, valores superiores a 0,5 indican una amplia distribución en el tamaño o incluso varias poblaciones de tamaños diferentes (Gaumet 2007, Schwarz 1994). Estos datos, tamaño y polidispersidad, se muestran en la tabla 3.16 para todos los sistemas medidos.

Las NPsAu obtenidas directamente de la síntesis estaban estabilizadas con citrato. Una vez depositadas sobre los complejos NS-Fármaco, los átomos superficiales de las NPsAu interactúan con los grupos funcionales de los fármacos albergados, removiendo el citrato presente en su superficie, debido principalmente a que las interacciones químicas  $\text{NH}_2\text{-Au}$  involucradas son energéticamente mayores a las existentes entre los iones de citrato y el Au.

**Tabla 3.16.** Datos obtenidos a partir del estudio por dispersión dinámica de la luz (DLS) para cada sistema medido, triplicado para cada uno.

Sistema	Diámetro			
	hidrodinámico (nm)	IPD	%	Desviación estándar
NPsAu-citrato no filtrado	42,29	0,606	70,8	±1,53
NPsAu-citrato filtrado	33,86	0,537	69,7	±0,24
NPsAu-NS filtrado	34,58	0,542	70,0	±0,45
NPsAu-NS filtrado y centrifugado	60,07	0,636	76,4	±0,76
NPsAu-NS-AT no filtrado	114,47	0,718	84,3	±13,52
NPsAu-NS-AT- filtrado	114,0	0,663	86,3	±14,53
NPsAu-NS-FEA <sub>sobrenadante</sub> filtrado	51,16	0,571	85,8	±0,36
NPsAu-NS-FEA <sub>precipitado</sub> filtrado	66,81	0,656	81,3	±6,24

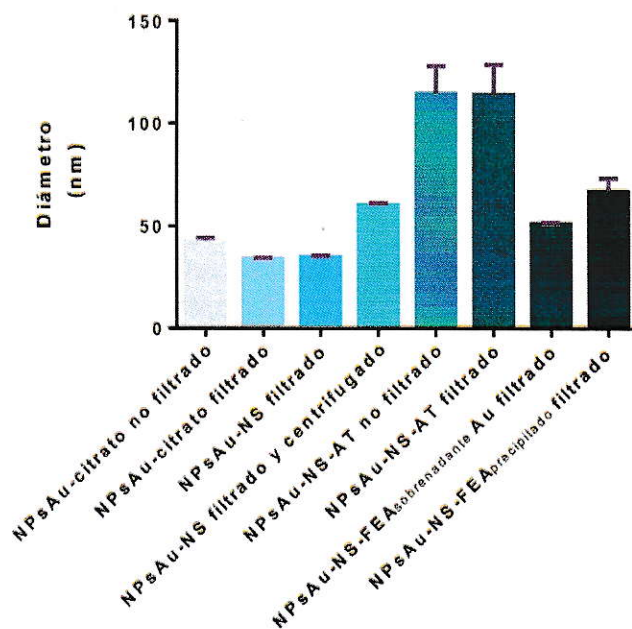
A continuación, se detalla el análisis de los datos presentados en la tabla 3.16. Comparando los tamaños obtenidos entre NPsAu-citrato no filtradas con NPsAu-citrato filtradas se pudo observar una disminución en el diámetro de las segundas puesto que al pasar la solución por el filtro quedaron retenidas los agregados de NPsAu que aportan un mayor tamaño, lo que indica que la filtración es un buen método de purificación. Ahora bien, al comparar las NPsAu filtradas con las NPsAu-NS filtradas se observó que sus diámetros hidrodinámicos no variaron significativamente, esto se debe a que las NS no interactúan con las NPsAu, ni tampoco perturban el sistema coloidal. Al incorporar el paso de la centrifugación se observó que el diámetro de las NPsAu aumentó, junto con su polidispersidad, lo que indica de las NPsAu se agregaron, por lo tanto, el método de centrifugación no es adecuado para su purificación.

Estudiando los sistemas NPsAu-NS-AT tanto filtrados como no filtrados se observó que el diámetro hidrodinámico de las NPsAu en ambos casos fue mayor. Esto se explica pues la nanoesponja está albergando en su interior moléculas de AT, no distribuidas de manera uniforme, generando regiones en el que se depositan las NPsAu, muy juntas unas de otras, estos agregados parciales de NPsAu son detectados por el equipo como una partícula de mayor diámetro. Ahora,

comparando los sistemas NPsAu-NS-AT entre sí, los diámetros hidrodinámicos fueron prácticamente iguales aún después de haber filtrado el sistema, lo que sugirió que el fármaco AT fue un buen estabilizante, ya que a pesar de que éstas estén depositadas de manera irregular y en algunas zonas del CI y se presenten muy próximas, una vez estabilizadas sobre el CI no generan una agregación.

Por último, al estudiar los sistemas NPsAu-NS-FEA<sub>precipitado</sub> y NPsAu-NS-FEA<sub>sobrenadante</sub> fue posible observar que los diámetros eran similares entre ellos, esto ocurrió debido a que el CI estaba presente en ambos componentes de la solución original.

En la figura 54 se muestra gráficamente los datos de la tabla, que demuestran las variaciones en los diámetros hidrodinámicos de cada sistema con sus respectivas desviaciones estándar.



**Figura 54.** Gráfico de barras para la distribución del diámetro hidrodinámico por DLS con su respectiva desviación estándar de los distintos sistemas medidos.

En la tabla 3.16 también se observaron índices de polidispersidad cercanos a 0,5 para las NPsAu filtradas, sin embargo, este valor aumentó cuando las NPsAu fueron estabilizadas sobre las NS-Fármaco, aunque los porcentajes medidos son superiores al 70% para todos los sistemas, las medidas entregaron diámetros hidrodinámicos sobre los 500 nm, correspondientes probablemente a NS y bajo los 20 nm aproximadamente, correspondientes a NPsAu libres en solución. Esto se puede observar de manera directa en los gráficos entregados por el equipo y que se encuentran en la sección 6.3 de los anexos.

Consecutivamente a la medición del diámetro hidrodinámico, se midió la carga superficial para todos los sistemas. El potencial Z es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática entre partículas, esta medida se utiliza principalmente en el análisis de coloides, como lo son en este caso las muestras analizadas. Si la carga es suficientemente elevada, ya sea negativa o positivamente, las nanopartículas permanecen discretas, dispersas y en suspensión, por el contrario, si la carga presenta un valor cercano a cero, y no existen estabilizantes estéricos, las nanopartículas no se repelerán entre ellas y se agregarán inevitablemente, aumentando sus dimensiones. En la tabla 3.17 se encuentran los valores para la carga superficial de cada sistema, así como el porcentaje de carga de cada uno.



**Tabla 3.17.** Datos de la carga superficial y su porcentaje presente en las distintas muestras, triplicado para cada uno.

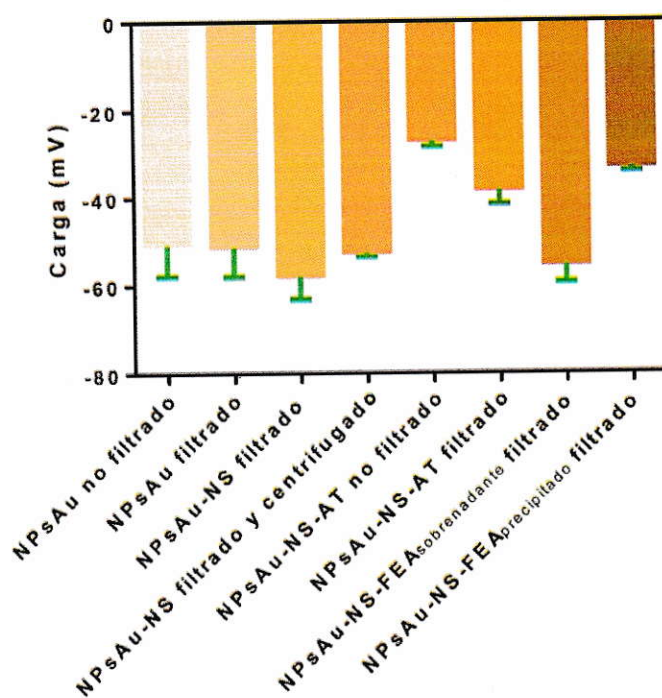
Sistema	Carga superficial		
	(mV)	%	Desviación estándar
NPsAu-citrato no filtrado	-50,93	93,8	±6,11
NPsAu-citrato filtrado	-51,40	81,6	±7,86
NPsAu-NS filtrado	-58,03	71,6	±7,01
NPsAu-NS filtrado y centrifugado	-52,70	100	±9,85
NPsAu-NS-AT no filtrado	-27,07	76,4	±6,88
NPsAu-NS-AT filtrado	-38,37	92,1	±6,90
NPsAu-NS-FEA <sub>sobrenadante</sub> filtrado	-55,40	90,1	±10,95
NPsAu-NS-FEA <sub>precipitado</sub> filtrado	-33,03	100	±5,26

Las mediciones presentadas en la tabla nos muestran que la carga superficial de los sistemas NPsAu-citrato filtrado y no filtrado fueron similares, esto debido a que los iones de citrato presentes en la solución y que proveen la carga negativa a la superficie de las nanoestructuras metálicas no varían con el proceso de filtrado. Cuando las NPsAu se encuentran en solución frente a las NS, una interacción debiese arrojar un aumento en el valor de su carga, debido a la remoción de los aniones de citrato, esto no ocurre, y la carga superficial del sistema, de hecho, disminuye unas cuantas unidades, lo que corrobora que no existe interacción entre ambas estructuras sin la presencia de los fármacos.

Por otra parte, al incluir NS-Fármacos en la solución coloidal de NPsAu, estos actuaron como estabilizantes, y la carga superficial del sistema aumentó, haciéndose de un valor más positivo. Esto indica de forma certera que el citrato fue removido por una interacción preferente con las moléculas de fármacos contenidas en las NS. En particular, al comparar los valores del sistema NPsAu-NS-AT filtrado con el sistema NPsAu-NS también filtrado, se observa que existió una disminución del valor de carga para el primero, esto significa que se removió el citrato debido únicamente a la presencia del fármaco.

Por último, al comparar entre sí los sistemas NPsAu-NS-FEA sobrenadante y precipitado, ambos filtrados, se observa que el sistema obtenido del sobrenadante presentó valores de carga mayores, lo que indica que estos complejos pueden remover eficientemente el citrato del coloide.

Al igual que se hizo para el estudio del tamaño, se realizó un gráfico comparativo de las cargas medidas para cada sistema. Este gráfico se presenta en la figura 55.



**Figura 55.** Gráfico de barras para la carga superficial con su respectiva desviación estándar de los distintos sistemas medidos.

#### 4. CONCLUSIONES

Se pudo sintetizar NS con DPC como reticulante en una razón estequiométrica 1:4, respectivamente, y con un porcentaje de rendimiento cercano al 60%, siguiendo un método novedoso y reproducible. Esta síntesis pudo corroborarse a través de  $^1\text{H}$ -RMN, IR, TEM, SEM y TGA. El análisis de los desplazamientos de las señales en los espectros RMN mostraron un corrimiento hacia campos altos del protón OH6 de la  $\beta\text{CD}$  cuando se formaron las NS, lo que se origina debido a la sustitución de algunos hidroxilos tras la reacción con DPC para formar la nueva nanoestructura. Por otra parte, una comparación de los espectros obtenidos mediante espectroscopía IR mostró que las NS contienen las bandas propias de cada precursor y bandas nuevas, como las de los grupos carbonilos formados. La morfología de la NS se observó en las micrografías obtenidas mediante SEM, siendo ésta irregular, porosa y como un polvo fino, muy distinta a la de sus precursores, mientras que su tamaño se determinó en un rango de entre 136 y 500 nm gracias al estudio de análisis TEM. Por último, un análisis TGA permitió determinar la estabilidad térmica de las NS lo que hace proyectar su uso en diversos campos de la ciencia, incluyendo *drug delivery*.

La inclusión de los fármacos FEA y AT en las NS se realizó con una estequiometría de inclusión 1:2 matriz huésped, siguiendo el método clásico de disoluciones saturadas. La formación de los complejos se confirmó mediante  $^1\text{H}$ -RMN, en cuyos espectros se confirmó que el complejo NS-AT se formó prioritariamente en la fase acuosa de la mezcla, mientras que el complejo NS-FEA

se formó en ambas fases (precipitado y solución acuosa). Los desplazamientos químicos calculados de estos sistemas indican que la inclusión del fármaco AT ocurrió en mayor medida en las cavidades de los baldes de  $\beta$ CD que forman la esponja, mientras que para el fármaco FEA se encontró que en el precipitado de la solución de síntesis el fármaco se incluyó en los baldes de  $\beta$ CD mientras que en el sobrenadante de la solución el fármaco se incluyó en los intersticios originados entre el borde exterior de los baldes de  $\beta$ CD y el reticulante. Nuevamente el análisis usando IR confirmó la formación de los CI, esto mediante una comparación de los espectros de los complejos con sus precursores respectivos. Se observó también un cambio en la forma de las NS cuando albergan a los fármacos, en comparación a las NS puras, mediante estudios TEM. Las micrografías obtenidas mostraron una alteración de la forma esférica de las NS, las que se mantuvieron iguales en el rango de tamaños reportado. Por último, un estudio de la constante de asociación permitió determinar la capacidad de retención de la NS, siendo esta superior a la de los CI formados por unidades de  $\beta$ CD libres con los fármacos AT y FEA, lo que sugiere que esta nueva nanoestructura aumenta significativamente su capacidad de carga y por ende su potencial uso en *drug delivery*.

La síntesis de las NPsAu mediante la reducción de una sal de oro usando citrato se confirmó mediante espectrofotometría UV-Vis y TEM, esta última mostró la forma esférica con un diámetro promedio de 25nm. Los espectros de absorbancia de las NPsAu se compararon con los obtenidos para los diferentes procesos de estabilización de estas en NS con y sin fármacos. Inicialmente las NPsAu presentan un plasmón de resonancia a 528 nm aproximadamente, el que no varía cuando se modifica el pH de la solución coloidal. El máximo de absorbancia se desplazó hacia longitudes de onda mayores cuando las NPsAu fueron depositadas sobre los complejos de NS con fármacos en su interior. El desplazamiento comúnmente implica un aumento en los tamaños de las NPsAu, sin embargo, en este caso, se debe al acoplamiento interpartícula, debido a la proximidad entre

estas cuando se encuentran inmovilizadas sobre la superficie de los sistemas NS-Fármacos, esto se pudo ver de manera directa mediante imágenes SEM. Las NPsAu al interactuar con los complejos varían su diámetro hidrodinámico dando cuenta de que la presencia de los fármacos con grupos funcionales amino remueven eficientemente el citrato que estabiliza a las NPsAu, por su parte, la carga superficial aumenta de  $-60$  a  $-30$  mV en promedio, debido a que los iones de citrato que aportaban la carga negativa son removidos de la superficie de las nanopartículas.

Se propone que la formación de estos nuevos sistemas, NS-Fármaco, pueden ser más eficientes que las matrices de  $\beta$ CD respecto a la inclusión y transporte de fármacos, en este sentido la NS, pueden ser empleadas para la inclusión de otros tipos de moléculas huéspedes con usos diversos tales como contaminantes, pesticidas y lípidos, entre otros. A su vez, los complejos son sustratos adecuados para la estabilización de NPsAu, formando los sistemas ternarios NPsAu-NS-Fármacos, que amplían aún más sus potenciales aplicaciones, por ejemplo, abriendo la posibilidad de irradiar estas nanoestructuras con un láser para liberar las moléculas albergadas en su interior, o multifuncionalizarlas para vectorización o imagenología.

Por tanto, se da cumplimiento a los objetivos propuestos, NS pudieron incluir a los fármacos AT y FEA dejando los grupos funcionales aminos expuestos hacia una de las aberturas de la matriz formando CI, los que estabilizaron posteriormente NPsAu, formando los sistemas ternarios NS-Huésped-NPsAu y así validando la hipótesis planteada al comienzo de este trabajo de investigación.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

Aslam M, Fu L, Su M, Vijayamohanan K, Dravid V. 2004. Novel one-step synthesis of amine-stabilized aqueous colloidal gold nanoparticles. *J Mater Chem*. 14: 1795-1797.

Bardi L, Mattei A, Steffan S, Marzona M. 2000. Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with cyclodextrin as surfactant to enhance bioavailability. *Enzyme Microb Technol*. 27: 709-713.

Barrientos L, Yutronic N, del Monte F, Gutierrez M, Jara P. 2007. Ordered arrangement of gold nanoparticles on an  $\alpha$ -cyclodextrin-dodecanethiol inclusion compound produced by magnetron sputtering. *New J Chem*. 31: 1400-1402.

Barrientos L, Yutronic N, Muñoz M, Silva N, Jara P. 2009. Metallic nanoparticle tropism of alkylthiol guest molecules included into  $\alpha$ -cyclodextrin host. *Supramol Chem*. 21:3-4, 264-267.

Barrientos L, Allende P, Orellana C, Jara P. 2012. Ordered arrangements of metal nanoparticles on alpha-cyclodextrin inclusion complexes by magnetron sputtering. *Inorg Chim Acta*. 380: 372-377.

Bolmal U, Manvi F, Rajkumar K, Palla S, Paladugu A, Reddy K. 2013. Recent advances in nanosponges as drug delivery system. *Int J Pharm Sci Nanotech*. 6(1): 1934-1944.

Burda C, Chen X, Narayanan R, El-Sayed M. 2005. Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. *Chem. Rev*. 105(4): 1025-1102.

- Chen M, Diao G, Zhang E. 2006. Study of inclusion complex of  $\beta$ -cyclodextrin and nitrobenzene. *Chemosphere*. 63: 522-529.
- Coleman A, Nicolis I, Keller N, Dalbiez J. 1992. Aggregation of cyclodextrins: An explanation of the abnormal solubility of  $\beta$ -cyclodextrin. *J Inclusion Phenom Mol Recognit Chem*. 13: 139-143.
- Connors K.A. The stability of cyclodextrin complexes in solution. 1997. *Chem Rev*. 97: 1325-1357.
- Creighton J, Eadon D. 1991. Ultraviolet-visible absorption spectra of the colloidal metallic elements. *J Chem Soc, Faraday Trans*. 87: 3881-3891.
- Daniel MC, Astruc D. 2004. Gold nanoparticles assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem Rev*. 104: 293-346.
- Das B, Reddy V.S, Ramu R. 2006. A rapid and high-yielding synthesis of thiazoles and aminothiazoles using ammonium-12-molybdophosphate. *J Mol Catal A: Chem*. 252(1-2): 235-237.
- Deng Y, Li J, Yu J, Zhao J, Tang J. 2016. Silver nanoparticles well-dispersed in amine-functionalized, one-pot made vesicles as an effective antibacterial agent. *Mater Sci Eng: C*. 60:92-99.
- Dykman L, Khlebtsov N. 2012. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. *Chem Soc Rev*. 41: 2256-2282.
- Fischer E. 1890. Ueber die optischen Isomeren des Traubenzuckers, der Gluconsäure und der Zuckersäure. *Ber Dtsch Chem Ges*. 23(2):2611-2624.

- Frenkel A, Hills C, Nuzzo R. 2001. A view from the inside: complexity in the atomic scale ordering of supported metal nanoparticles. *J Phys Chem B*. 105(51): 12689-12703.
- Gaumet M, Vargas A, Gurny R, Delie F. 2008. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *Eur J Pharm Biopharm*. 69: 1-9.
- Guerrero A, Hassan N, Escobar C, Albericio F, Kogan M, Araya E. 2014. Gold nanoparticles for photothermally controlled drug release. *Nanomedicine (London U.K.)*. 9(13): 2023-2039.
- Häkkinen H. 2012. The gold-sulfur interface at the nanoscale. *Nat Chem*. 4: 443-455.
- Herrera B, Adura C, Yutronic N, Kogan M, Jara P. 2013. Selective nanodecoration of modified cyclodextrin crystals with gold nanorods. *J Colloid Interface Sci*. 389: 42-45.
- Higuchi T, Connors K.A. 1965. Phase solubility techniques. *Adv Anal Chem Instrum*. 4: 117-122.
- Holla B, Malini K, Rao B, Sarojini B, Kumari N. 2003. Synthesis of some new 2,4-disubstituted thiazoles as possible antibacterial and anti-inflammatory agents. *Eur J Med Chem*. 38(3):313-318.
- Inoue Y, Hakushi T, Liu Y, Tong L, Shen B, Jin D. 1993. a. Thermodynamics of molecular recognition by cyclodextrins. 1. Calorimetric titration of inclusion complexation of phthalenesulfonates with alpha-, beta-, and gamma- cyclodextrins: enthalpy-entropy compensation. *J Am Chem Soc*. 115: 475-481.
- Kelly K, Coronado E, Zhao L, Schatz G. 2003. The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment. *J Phys Chem B*. 107: 668-677.
- Kogan M, Olmedo I, Hosta L, Guerrero A, Cruz L, Albericio F. 2007. Peptides and metallic nanoparticles for biomedical applications. *Nanomedicine*. 2(3): 287-306.



- Köhler J, Grzelschak-Mick N. 2013. The  $\beta$ -cyclodextrin/benzene complex and its hydrogen bonds – a theoretical study using molecular dynamics, quantum mechanics and COSMO-RS. *Beilstein J Org Chem*. 9: 118-134.
- Kumar A, Mandal S, Selvakannan P, Pasricha R, Mandale A, Sastry M. 2003. Investigation into the interaction between surface-bound alkylamines and gold nanoparticles. *Langmuir*. 19: 6277-6282.
- Lala R, Amit T, Chandrashekhar G. 2011. Current trends in  $\beta$ -cyclodextrin based drug delivery systems. *Int J Res Ayurveda Pharm*. 2(5): 1520-1526.
- Le Ru E, Etchegoin P. 2009. Introduction to plasmons and plasmonics. In *principles of surface enhanced raman spectroscopy (and related plasmonic effects)*. Elsevier: Amsterdam, The Netherlands; Chapter 3: 121-183.
- Leff D, Brandt L, Heath J. 1996. Synthesis and Characterization of Hydrophobic, Organically-Soluble Gold Nanocrystals Functionalized with Primary Amines. *Langmuir*. 12: 4723-4730.
- Lehn J.M. 1995. *Supramolecular chemistry. Concepts and perspectives*. Springer. 1<sup>st</sup> Ed.
- Lewis L. 1993. Chemical catalysis by colloids and clusters. *Chem Rev*. 93(8): 2693-2730.
- Liu Y, Tan J, Thomas A, Ou-Yang D, Muzykantov V. 2012. The shape of things to come: importance of design in nanotechnology for drug delivery. *Ther Delivery*. 3(2): 181-194.
- Mangolim C, Moriwaki C, Nogueira A, Sato F, Baesso M, Neto A, et al. 2014. Curcumin- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex: Stability, solubility, characterisation by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application. *Food Chem*. 153: 361-370.

- Novak J, Brousseau L, Vance F, Johnson R, Lemon B, Hupp J, et al. 2000. Nonlinear optical properties of molecularly bridged nanoparticle arrays. *J Am Chem Soc.* 122: 12029-12030.
- Okamoto T, Yamaguchi I. 2004. Optical absorption study of the surface plasmon resonance in gold nanoparticles immobilized onto a gold substrate by self-assembly technique. *J Phys Chem B.* 107(38): 10321-10324.
- Patel P, Desphande A. 2014. Patent review on cyclodextrin based nanosponges prepared by different methods: physicochemical characterization, factors influencing formation and applications. *World J Pharm Sci.* 2(4): 380-385.
- Pensa E, Cortés E, Corthey G, Carro P, Vericat C, Fonticelli M, et al. 2012. The chemistry of the sulfur-gold interface: in search of a unified model. *Acc Chem Res.* 45(8): 1183-1192.
- Rameshkumar P, Manivannan S, Ramaraj R. 2013. Silver nanoparticles deposited on amine-functionalized silica spheres and their amalgamation-based spectral and colorimetric detection of Hg(II) ions. *J Nanopart Res.* 15: 1639-1647.
- Rao C, Muller A, Cheetham, A. 2004. *The Chemistry of Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications.* Willey-VCH. 1<sup>st</sup> Ed.
- Rao V, Stella V. 2003. When can cyclodextrins be considered for solubilizing purposes. *J Pharm Sci.* 92: 927-932.
- Sabelli H, Javaid J. 1995. Phenylethylamine modulation of affect: therapeutic and diagnostic implications. *J Neuropsychiatry.* 7(1): 6-14.
- Sabelli H, Fink P, Fawcett J, Tom C. 1996. Sustained antidepressant effect of PEA replacement. *J. Neuropsychiatry.* 8(2): 168-171.

Sambasevam K, Mohamad S, Sarih N, Ismail N. 2013. Synthesis and Characterization of the Inclusion Complex of  $\beta$ -cyclodextrin and Azomethine. *Int J Mol Sci.* 14: 3671-3682.

Schmid G. 2006. Synthesis of: metal nanoparticles. *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry.* Vol 10. 2<sup>nd</sup> Ed. p. 1-14.

Schuetze B, Mayer C, Loza K, Gocyla M, Heggen M, Epple M. 2016. Conjugation of thiol-terminated molecules to ultrasmall 2 nm-gold nanoparticles leads to remarkably complex <sup>1</sup>H-NMR spectra. *J. Mater. Chem. B.* 4: 2179-2189.

Schwarz C, Mehnert W, Lucks J, Müller R. 1994. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. *J. Controlled Release.* 30(1): 83-96.

Sierpe R, Lang E, Jara P, Guerrero A, Chornik B, Kogan M, Yutronic N. 2015. Gold nanoparticles interacting with  $\beta$ -cyclodextrin-phenylethylamine inclusion complex: a ternary system for photothermal drug release. *ACS Appl Mater Interfaces.* 7(28): 15177-15188.

Sosa I, Noguez C, Barrera R. 2003. Optical properties of metal nanoparticles with arbitrary shapes. *J Phys Chem B.* 107(26): 6269-6275.

Sperling B, Parak W. 2010. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticle. *Phil Trans R Soc A.* 368: 1333-1383.

Suzuki O, Katsumata Y, Oya M. 1981. Oxidation of beta-phenylethylamine by both types of monoamine oxidase: examination of enzymes in brain and liver mitochondria of eight species. *J Neurochem.* 36(3): 1298-1301.

- Szabo A, Billett E, Turner J. 2001. Phenylethylamine, a possible link to the antidepressant effects of exercise? *Br J Sports Med.* 35: 342-343.
- Tala-Ighil R. 2016. Nanomaterials in solar cells. In: Aliofkhaezrai M, Hamdy A (eds). *Handbook of nanoelectrochemistry.* Springer International. p.1251-1270.
- Trotta F, Zannetti M, Camino G. 2000. Thermal degradation of cyclodextrins. *Polym Degrad Stab.* 69(3): 373-379.
- Trotta F. 2011. Cyclodextrin Nanosponges and their Applications. *Cyclodextrins in Pharmaceutics, Cosmetics, and Biomedicine: Current and Future Industrial Applications.* Wiley-VCH. 1<sup>st</sup> Ed. p.323-342.
- Trotta F, Zanetti M, Cavalli R. 2012. Cyclodextrin-based nanosponges as drug carriers. *Beilstein J Org Chem.* 8: 2091–2099.
- Turkevich J, Stevenson P, Hillier J. 1951. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Society.* 11: 55-75.
- Venkatachalam T, Sudbeck E, Mao C, Uckun F. 2001. Anti-HIV activity of aromatic and heterocyclic thiazolyl thiourea compounds. *Bioorg Med Chem Lett.* 11: 523-528.
- Wang L, Li YF, Zhou L, Liu Y, Meng L, Zhang K, et. al. 2010. Characterization of gold nanorods in vivo by integrated analytical techniques: their uptake, retention, and chemical forms. *Anal Bioanal Chem.* 396: 1105-1114.
- Weller H.1993. Colloidal semiconductor Q-particles: chemistry in the transition region between solid state and molecules. *Angew Chem, Int Ed Engl.* 32: 41–53.

Yang Z, Chen C, Roy P, Chang H. 2011. Quantum dot-sensitized solar cells incorporating nanomaterials. *Chem Commun*, 47: 9561-9571.

Yen H, Hsu S, Tsai C. 2009. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small*. 5(13): 1553-1561.

## 6. ANEXOS

### 6.1. Espectros<sup>1</sup>H-RMN para la síntesis de NS.

**Tabla 6.1.** Descripción de las señales de los protones para las inclusiones 1:2 y 1:3 del CI NS-AT<sub>precipitado</sub> siguiendo el primer método.

Protones	Señales para 1:2 (ppm)	Señales para 1:3 (ppm)
H1	4,825	4,286
H2	3,286	3,285
H3	3,658	3,658
H4	3,286	3,285
H5	3,561	3,562
H6	3,622	3,622
OH2	5,712	5,712
OH3	5,664	5,664
OH6	4,437	4,436
NH'2, H'5	---	---
H'3'-H'5'	---	---
H'2'-H'6'	---	---

**Tabla 6.2.** Descripción de las señales de los protones para las inclusiones 1:2 y 1:3 del CI NS-AT<sub>sobrenadante</sub> siguiendo el primer método.

Protones	Señales para 1:2 (ppm)	Señales para 1:3 (ppm)
H1	4,832	4,832
H2	3,292	3,291
H3	3,662	3,664
H4	3,292	3,291
H5	3,568	3,568
H6	3,638	3,639
OH2	5,718	5,717
OH3	5,667	5,669
OH6	4,440	4,440
NH <sub>2</sub> , H'5	7,068	7,067
H'3'-H'5'	7,408	7,407
H'2'-H'6'	7,802	7,801

**Tabla 6.3.** Descripción de las señales de los protones para las inclusiones 1:2 y 1:3 del CI NS-FEA<sub>precipitado</sub> siguiendo el primer método.

Protones	Señales para 1:2 (ppm)	Señales para 1:3 (ppm)
H1	4,828	4,828
H2	3,301	3,289
H3	3,667	3,670
H4	3,301	3,289
H5	3,573	3,574
H6	3,632	3,647
OH2	5,719	5,714
OH3	5,719	5,714
OH6	4,422	4,381
NH <sub>2</sub>	---	---
H'1	2,765	2,767
H'2	2,659	2,660
H'2'-H'6'	7,191	7,201
H'4'	7,165	7,159
H'3'-H'5'	7,278	7,279

**Tabla 6.4.** Descripción de las señales de los protones para las inclusiones 1:2 y 1:3 del CINS- $FEA_{sobrenadante}$  siguiendo el primer método de síntesis.

Protones	Señales para 1:2 (ppm)	Señales para 1:3 (ppm)
H1	4,829	4,287
H2	3,211	3,211
H3	3,660	3,564
H4	3,211	3,211
H5	3,565	3,660
H6	3,626	3,625
OH2	5,856	5,719
OH3	5,671	5,672
OH6	4,436	4,436
NH <sub>2</sub>	---	---
H'1	---	2,759
H'2	2,660	2,645
H'2'-H'6'	7,198	7,198
H'4'	7,179	7,179
H'3'-H'5'	7,285	7,278



## 6.2. Curvas de calibración y constante de asociación.

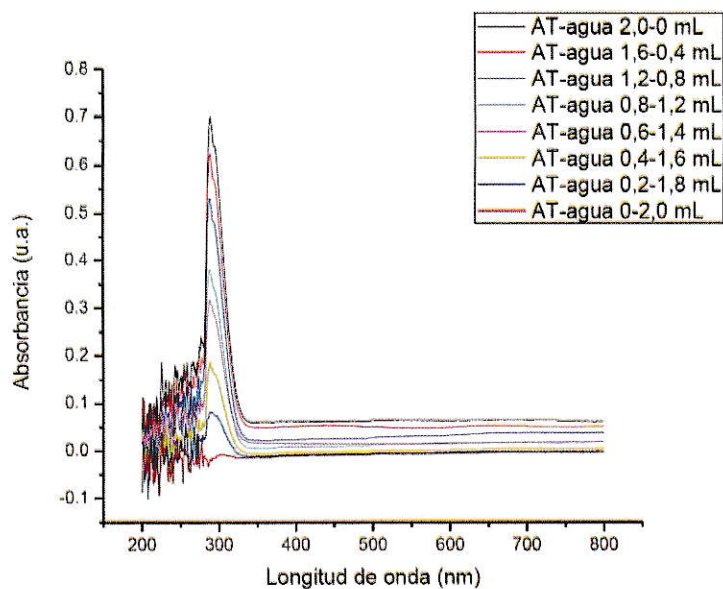


Figura 56. Curva de calibración para la obtención del coeficiente de extinción molar para AT.

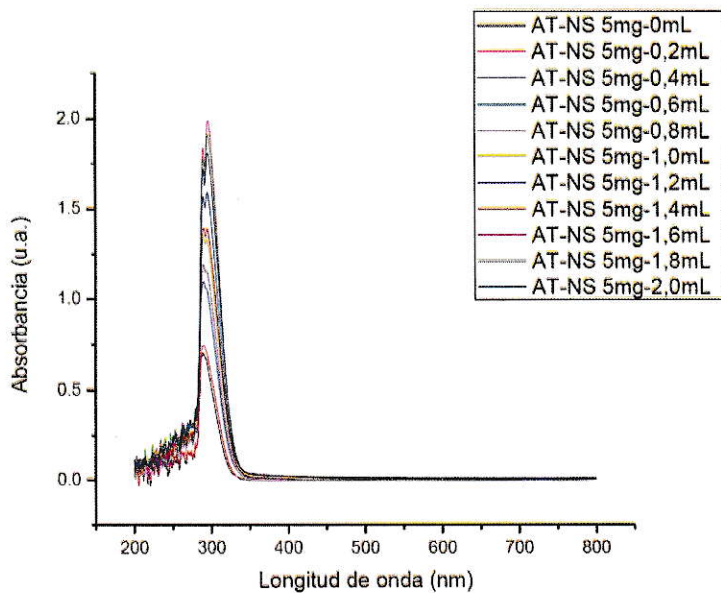


Figura 57. Gráfico de absorancias para la obtención de la constante de asociación para AT.

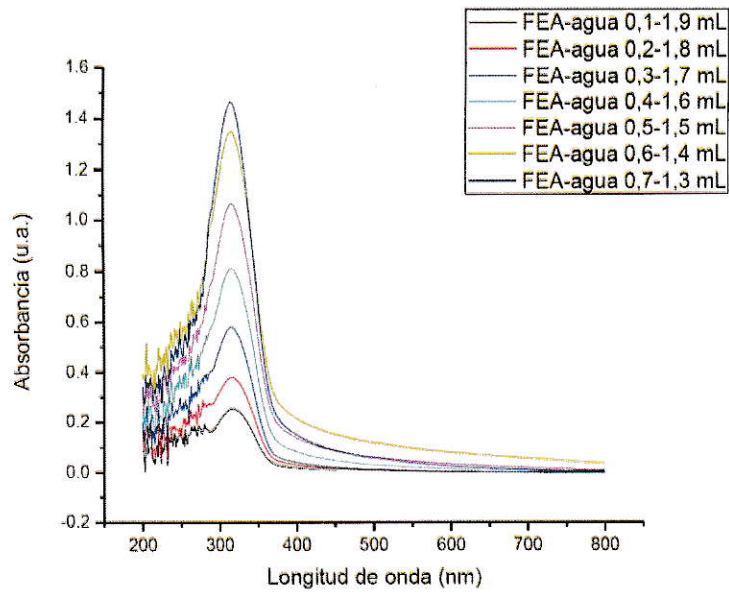


Figura 58. Curva de calibración para la obtención del coeficiente de extinción molar para FEA.

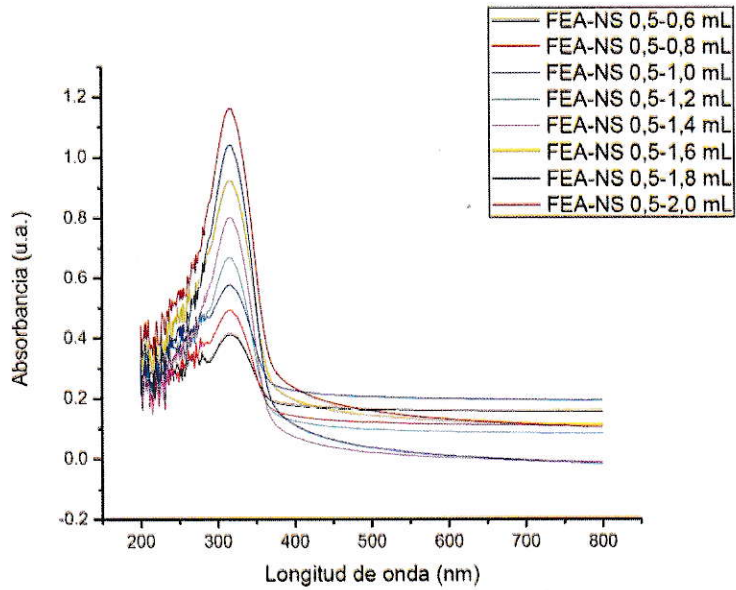


Figura 59. Gráfico de absorbancias para la obtención de la constante de asociación para FEA.

### 6.3. Gráficos de tamaño y carga mediante análisis DLS y potencial Z.

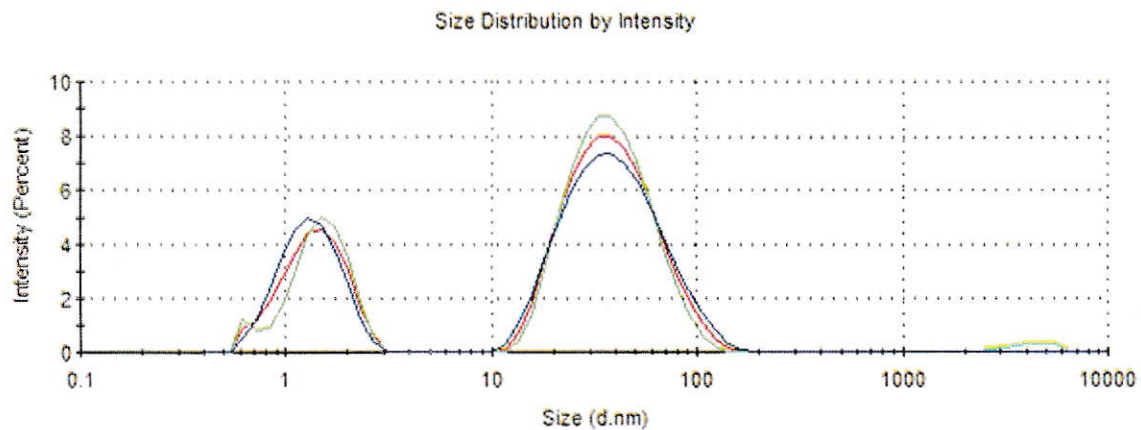


Figura 60. Gráfico de distribución de tamaños (intensidad) para el sistema NPsAu-citrato no filtrado.

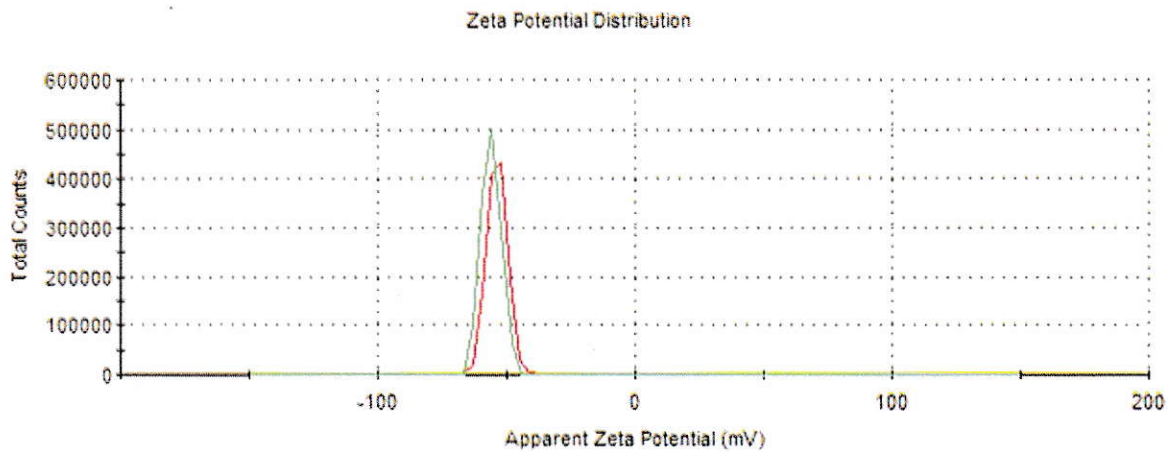


Figura 61. Gráfico de carga (cuentas totales) para el sistema NPsAu-citrato no filtrado.

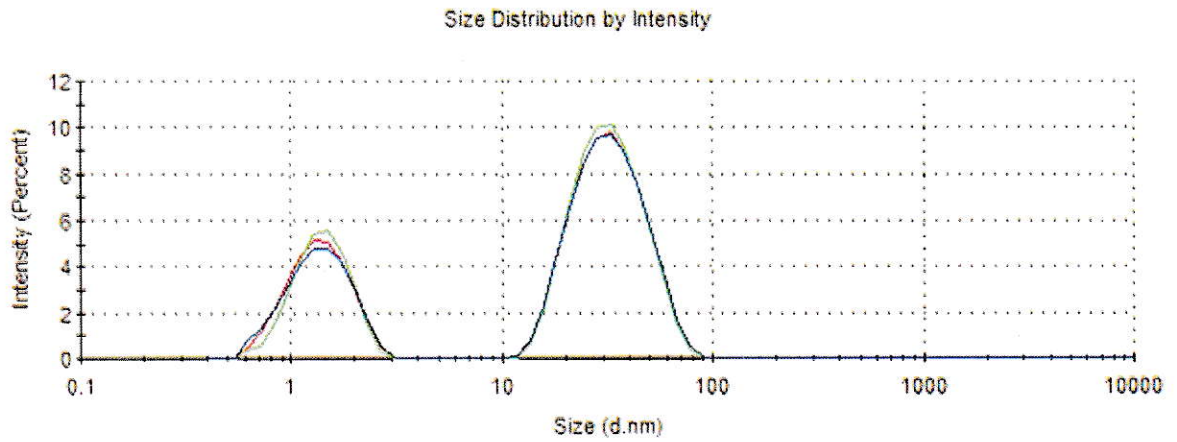


Figura 62. Gráfico de distribución de tamaños (intensidad) para el sistema NPsAu-citrato filtrado.

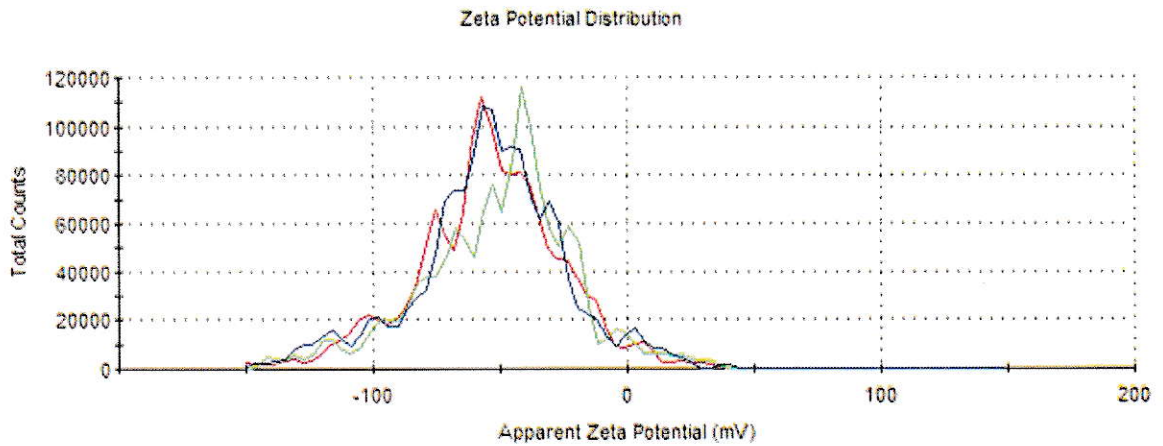


Figura 63. Gráfico de carga (cuentas totales) para el sistema NPsAu-citrato filtrado.

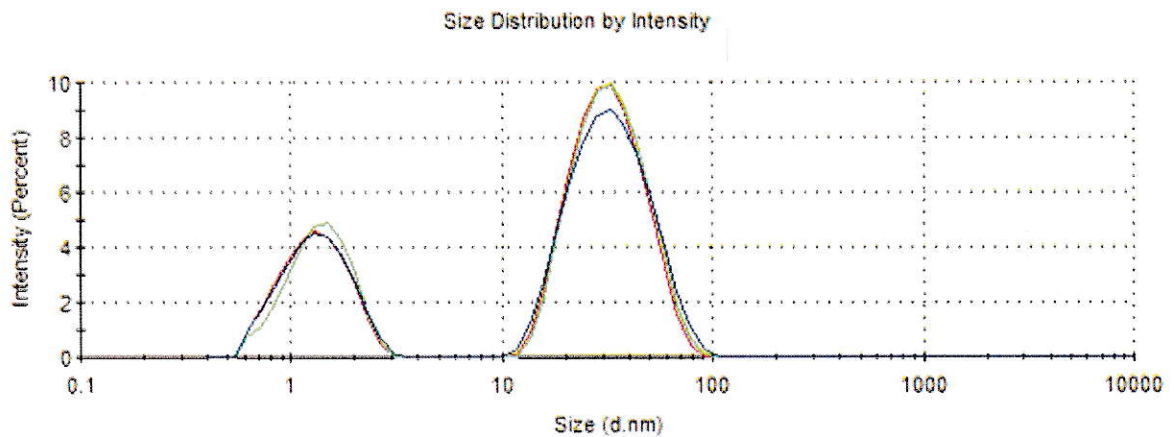


Figura 64. Gráfico de distribución de tamaños (intensidad) para el sistema NPsAu-NS filtrado.

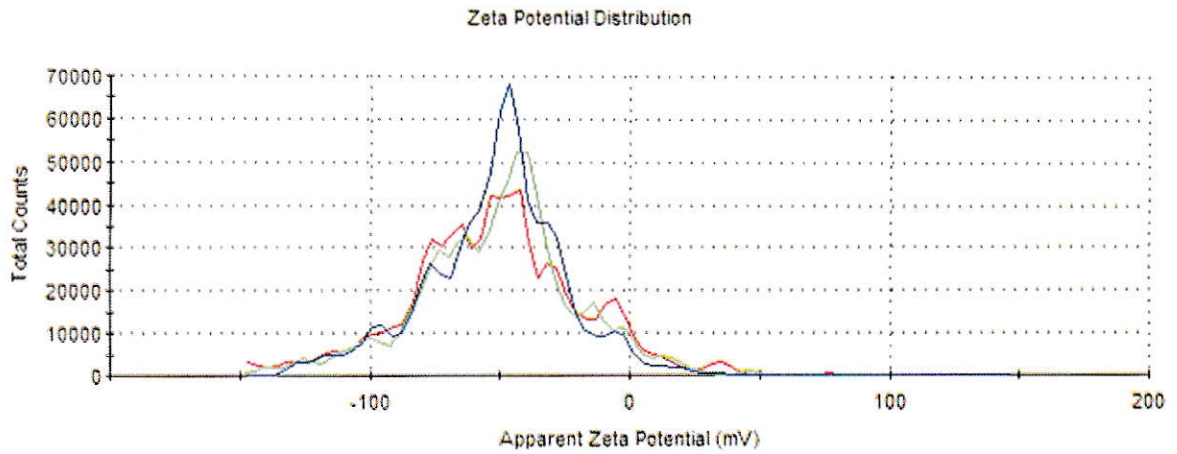


Figura 65. Gráfico de carga (cuentas totales) para el sistema NPsAu-NS filtrado.

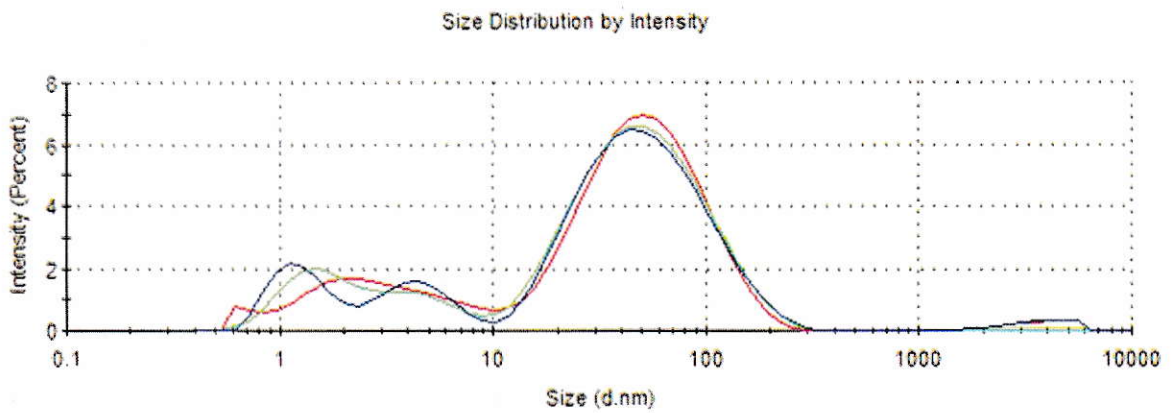


Figura 66. Gráfico de distribución de tamaños (intensidad) para el sistema NPsAu-NS filtrado y centrifugado.

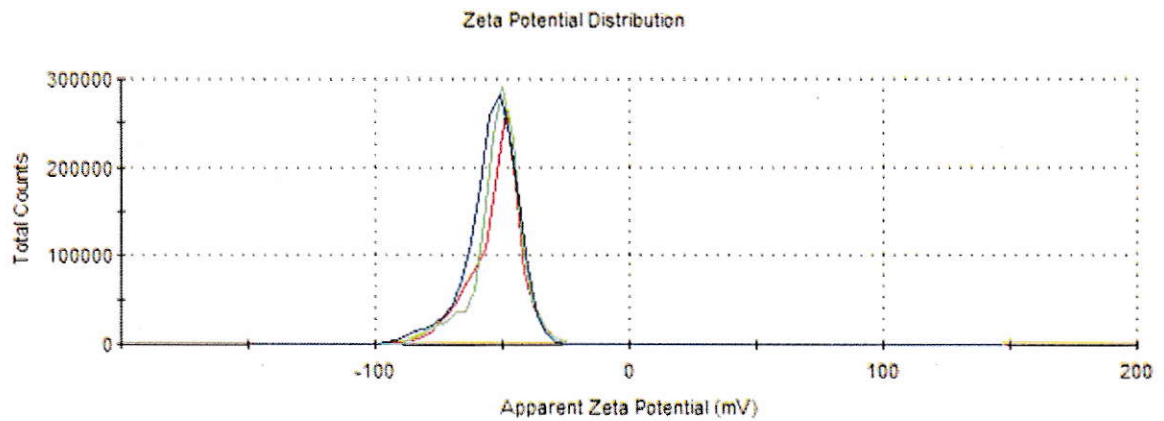


Figura 67. Gráfico de carga (cuentas totales) para el sistema NPsAu-NS filtrado y centrifugado.

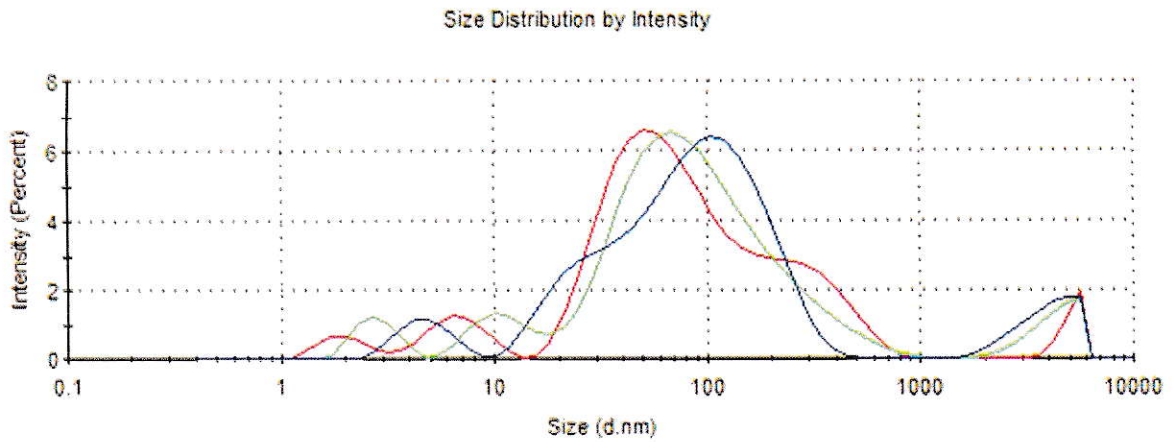


Figura 68. Gráfico de distribución de tamaños (intensidad) para el sistema NPsAu-NS-AT no filtrado.

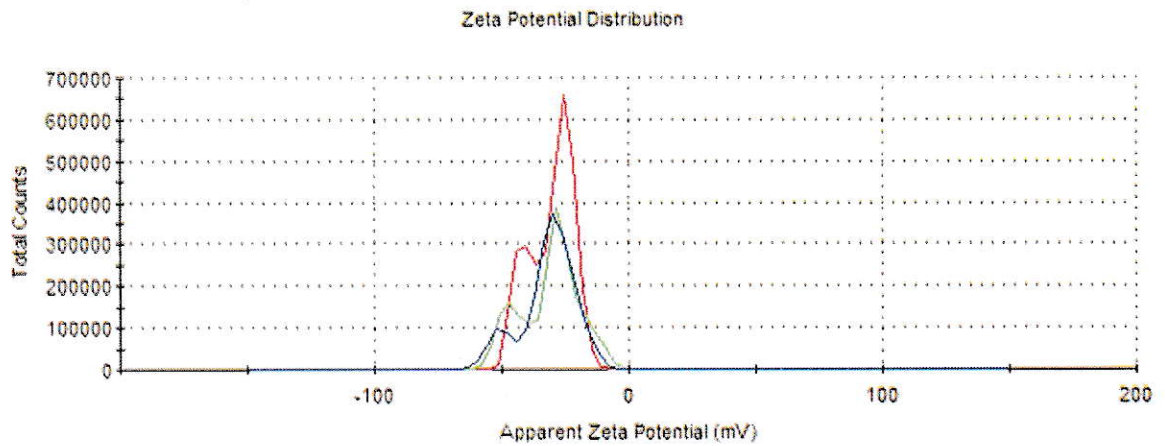


Figura 69. Gráfico de carga (cuentas totales) para el sistema NPsAu-NS-AT no filtrado.

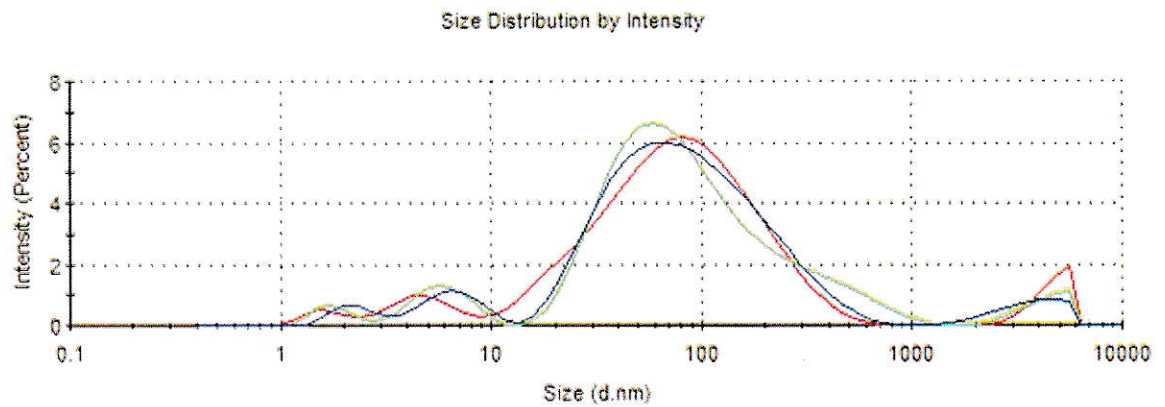


Figura 70. Gráfico de distribución de tamaños (intensidad) para el sistema NPsAu-NS-AT filtrado.

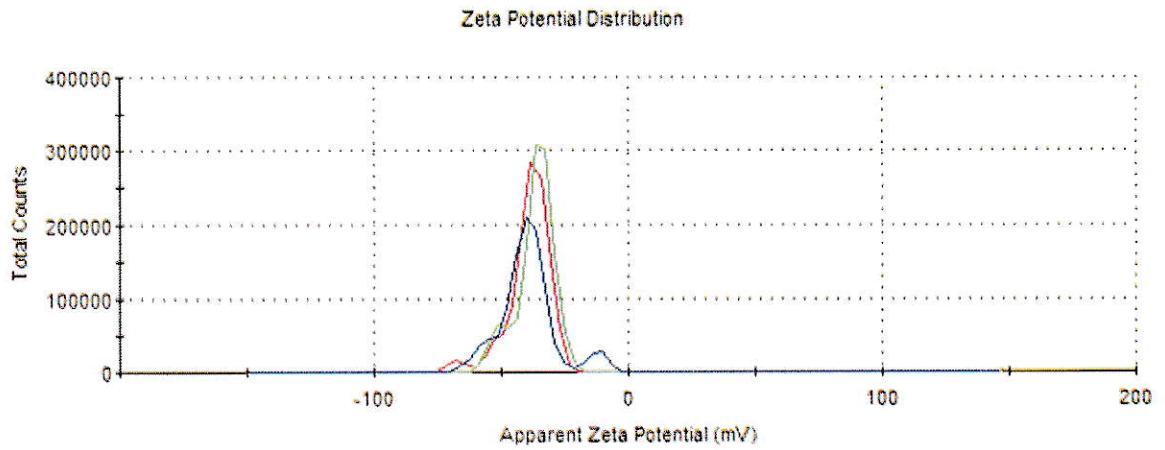


Figura 71. Gráfico de carga (cuentas totales) para el sistema NPsAu-NS-AT filtrado.

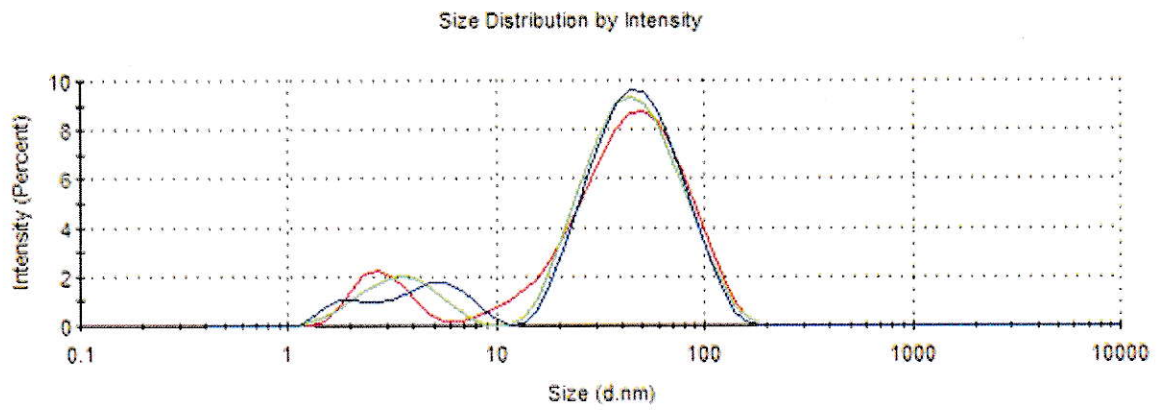


Figura 72. Gráfico de distribución de tamaños (intensidad) para el sistema NPsAu-NS-FEA<sub>sobrenadante</sub> filtrado.

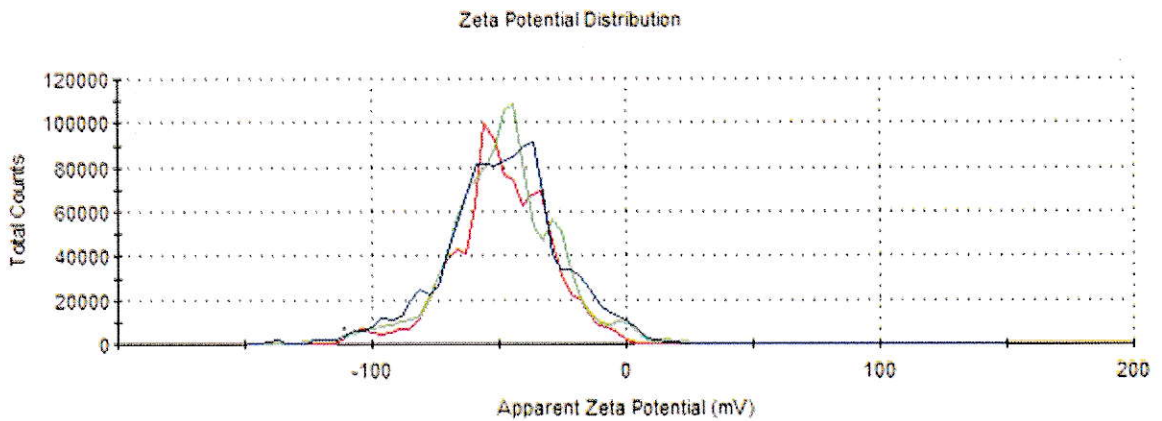


Figura 73. Gráfico de carga (cuentas totales) para el sistema NPsAu-NS-FEA<sub>sobrenadante</sub> filtrado.

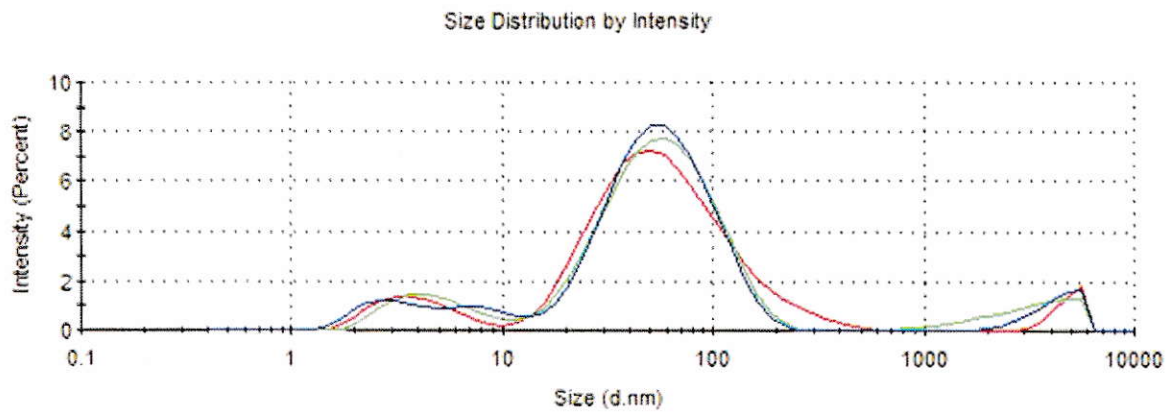


Figura 74. Gráfico de distribución de tamaños (intensidad) para el sistema NPsAu-NS-FEA<sub>precipitado</sub> filtrado.

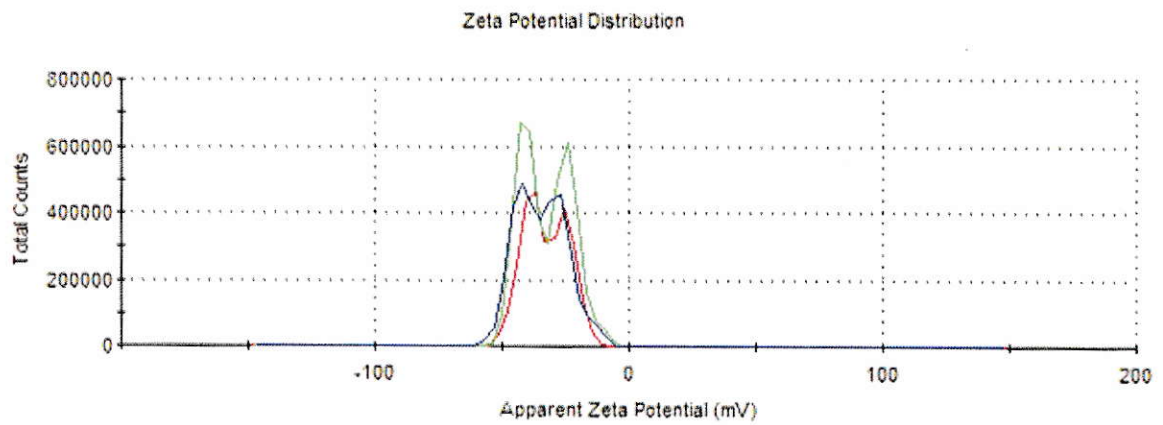


Figura 75. Gráfico de carga (cuentas totales) para el sistema NPsAu-NS-FEA<sub>precipitado</sub> filtrado.