



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**CONSTRUCCIÓN DE ESTRUCTURAS SUPRAMOLECULARES DE BETA-
CICLODEXTRINA POR MEDIO DE *QUÍMICA CLICK* PARA SU APLICACIÓN COMO
SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

Kendra Ivón Sorroza Martínez

Ciudad de México, 2016.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Dr. Francisco Hernández Luis

VOCAL: Profesor: Dra. Maria Josefa Bernad Bernad

SECRETARIO: Profesor: Dra. Yareli Rojas Aguirre

1er. SUPLENTE: Profesor: M. en C. Viridiana Gisela Llera Rojas

2° SUPLENTE: Profesor: M. en C. Luz Xochiquetzalli Vasquez Bochm

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: FACULTAD DE QUÍMICA, EDIFICIO F,
LABORATORIO 305**

ASESOR DEL TEMA: DRA. YARELI ROJAS AGUIRRE

SUSTENTANTE: KENDRA IVÓN SORROZA MARTÍNEZ

PARTE DE ESTE TRABAJO FUE PRESENTADO EN LA JORNADA DE INVESTIGACIÓN EN LA FACULTAD DE QUÍMICA:

CIUDAD UNIVERSITARIA, DF, 9 DE OCTUBRE DE 2015.

“SINTESIS Y CARACTERIZACION DE SISTEMAS CONJUGADOS β -CICLODEXTRINA-POLIETILENGLICOL”. Israel González Méndez, **Kendra Ivón Sorroza Martínez** y Yareli Rojas Aguirre, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM.

Cartel

Índice

1. Índice

2. Resumen	2
3. Antecedentes	
3.1 Química Supramolecular	3
3.2 Ciclodextrinas.....	4
3.2.1 CI con CDs.....	5
3.2.1.1 Métodos para preparar CI con CDs.....	10
3.2.2 La modificación química de las CDs y sus aplicaciones farmacéuticas....	11
3.2.2.1 Conjugación de CDs con polímeros.....	12
3.2.3 Polietilenglicol (PEG).....	13
3.2.4 <i>Química Click</i>	14
3.3 Nanomedicina y sistemas autoensamblables.....	15
3.4 Adamantano.....	17
Hipótesis	20
Objetivo general	20
Objetivos particulares	20
4. Parte experimental	22
4.1 Síntesis química.....	23
4.1.1 Síntesis de per-6-yodo- β -CD (β -CDI).....	23
4.1.2 Síntesis de per-6-azido- β -CD (β -CDN ₃).....	24
4.1.3 Método general para la síntesis de Alquinil-PEG.....	25
4.1.4 Síntesis de Alquinil-PEG ₅₅₀	26
4.1.5 Síntesis de Alquinil-PEG ₂₀₀₀	26
4.1.6 Síntesis de Alquinil-PEG ₅₀₀₀	26
4.1.7 Formación de β -CD-PEG.....	26
4.1.8 Síntesis del conjugado β -CD-PEG ₅₅₀	27
4.1.9 Síntesis del conjugado β -CD-PEG ₂₀₀₀	27
4.1.10 Síntesis del conjugado β -CD-PEG ₅₀₀₀	27
4.2 Preparación de CI.....	27

4.2.1 Método general para la preparación de CI β -CD/FF y β -CD-PEG/FF.....	27
4.2.2 Preparación de CI β -CD/FF (1:1).....	27
4.2.3 Preparación de CI β -CD-PEG ₅₅₀ /FF (1:1).....	27
4.2.4 Preparación de CI β -CD-PEG ₂₀₀₀ /FF (1:1).....	28
4.2.5 Preparación de CI β -CD-PEG ₅₀₀₀ /FF (1:1).....	28
4.2.6 Método general para la preparación de CI β -CD/Ad y β -CD-PEG/Ad.....	28
4.2.7 Preparación de CI β -CD/Ad (1:1).....	28
4.2.8 Preparación de CI β -CD-PEG ₅₅₀ /Ad (0.5:1).....	28
4.2.9 Preparación de CI β -CD-PEG ₅₅₀ /Ad (1:1).....	28
4.2.10 Preparación de CI β -CD-PEG ₅₅₀ /Ad (2:1).....	28
4.2.11 Preparación de CI β -CD-PEG ₂₀₀₀ /Ad (0.5:1).....	29
4.2.12 Preparación de CI β -CD-PEG ₂₀₀₀ /Ad (1:1).....	29
4.2.13 Preparación de CI β -CD-PEG ₂₀₀₀ /Ad (2:1).....	29
4.2.14 Preparación de CI β -CD-PEG ₅₀₀₀ /Ad (0.5:1).....	29
4.2.15 Preparación de CI β -CD-PEG ₅₀₀₀ /Ad (1:1).....	29
4.2.16 Preparación de CI β -CD-PEG ₅₀₀₀ /Ad (2:1).....	29
5. Resultados y discusión	
5.1 Síntesis de β -CDI.....	31
5.2 Síntesis de β -CDN ₃	31
5.2.1 Caracterización de β -CD, β -CDI y β -CDN ₃	31
5.3 Síntesis de Alquilil-PEG (550, 2000 y 5000 Da).....	34
5.3.1 Caracterización de PEG y cálculo del peso molecular.....	35
5.3.2 Caracterización de Alquilil-PEG y cálculo del peso molecular.....	37
5.4 Formación de los conjugados β -CD-PEG.....	40
5.5 Formación de CI y caracterización.....	44
6. Conclusiones	55
Perspectivas	55
7. Bibliografía	56
8. Apéndice I	61

1.1 Índice de Figuras

Figura 1. α , β y γ ciclodextrinas, estructura química, tridimensional y tamaño.....	5
Figura 2. Esquema de la formación de los CI con ciclodextrina y una molécula huésped.....	6
Figura 3. Métodos de preparación de CI fármaco/CD.....	11
Figura 4. Ejemplos de sistemas autoensamblados de CDs anfífilas, hidrofóbicas, polímeros de CDs, e hidrogeles de CDs.....	12
Figura 5. Tipos de PEG funcionalizados.....	14
Figura 6. Mecanismo de reacción de la cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen.....	15
Figura 7. Ejemplos de sistema supramolecular β -CD/Ad.....	17
Figura 8. Sistemas con múltiples componentes	18
Figura 9. Split de espectros de IR de β -CD (A), β -CDI (B) y β -CDN ₃ (C).....	32
Figura 10. Split de espectros de ¹ H de β -CD (A), β -CDI (B) y β -CDN ₃ (C).....	33
Figura 11. Espectro de RMN ¹ H de PEG ₅₅₀	35
Figura 12. Espectro de RMN ¹ H de PEG ₂₀₀₀	35
Figura 13. Espectro de RMN ¹ H de PEG ₅₀₀₀	36
Figura 14. Ecuación general para determinar el peso molecular de un polímero.....	36
Figura 15. Espectro de RMN ¹ H de Alquilil-PEG ₅₅₀	38
Figura 16. Espectro de RMN ¹ H de PEG ₂₀₀₀	38
Figura 17. Espectro de RMN ¹ H de PEG ₅₀₀₀	39
Figura 18. Espectro de MALDI-TOF del conjugado β -CD-PEG ₅₅₀	42
Figura 19. Espectro de MALDI-TOF del conjugado β -CD-PEG ₂₀₀₀	43
Figura 20. Espectro de MALDI-TOF del conjugado β -CD-PEG ₅₀₀₀	43
Figura 21. Equilibrio de la FF dependiente del pH y formación del complejo de inclusión β -CD/FF.....	45

Figura 22. Espectro de ^1H de la FF.....	46
Figura 23. Espectro de ^1H β -CD/FF.....	47
Figura 24. Espectro de RMN ^1H β -CD-PEG ₅₅₀ /FF.....	48
Figura 25. Espectro de RMN ^1H β -CD-PEG ₂₀₀₀ /FF.....	48
Figura 26. Espectro de RMN ^1H β -CD-PEG ₅₀₀₀ /FF.....	49
Figura 27. Espectro de RMN ^1H Ad.....	50
Figura 28. Espectro de RMN ^1H β -CD/Ad.....	50
Figura 29. Espectro de RMN ^1H β -CD-PEG ₅₅₀ /Ad (1:1).....	51
Figura 30. Espectro de RMN ^1H β -CD-PEG ₂₀₀₀ /Ad (1:1).....	51
Figura 31. Espectro de RMN ^1H β -CD-PEG ₅₀₀₀ /Ad (1:1).....	52

1.2 Índice de Esquemas

Esquema 1. Condiciones de reacción: (i) PPh_3 , I_2/DMF , 24 h 80°C (ii) NaN_3/DMF , 24 h 70°C (iii) Alquinil-PEG (550, 2000 y 5000 Da), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{H}_2\text{Asc}/\text{DMSO}:\text{H}_2\text{O}$, 24 h 70°C	23
Esquema 2. Obtención de per-yodo-6- β -CD.....	24
Esquema 3. Obtención de per-azido-6- β -CD.....	25
Esquema 4. Obtención de Alquinil-PEG (Esterificación de Steglich).....	25
Esquema 5. Obtención del conjugado β -CD-PEG a través de <i>Química Click</i>	26

Resumen

2. Resumen

Los sistemas supramoleculares se pueden definir como estructuras bien definidas de moléculas unidas mediante enlaces no covalentes. Los sistemas supramoleculares abarcan una serie de estructuras de diversa naturaleza. Una de las más estudiadas es la ciclodextrina (CD). Las CDs son oligosacáridos cíclicos formados por varias unidades de glucopiranosas unidas por enlaces α -1,4-glicosídicos que presentan una estructura de cono truncado. Los grupos hidroxilo de las CDs, que se encuentran localizados en la superficie externa de la molécula, hacen que estos macrociclos sean solubles en agua, pero al mismo tiempo, generen una cavidad interna poco polar. Así, las CDs son reconocidas por su habilidad de formar complejos de inclusión (CI) con moléculas hidrofóbicas por medio de interacciones huésped-anfitrión.

Por otro lado, la modificación y funcionalización de las CDs ha expandido los horizontes sobre las posibles aplicaciones de estas moléculas. La síntesis de conjugados polímero-CD, por ejemplo, ha dado origen a sistemas con diversas propiedades y características que pueden funcionar como vectores para transportar fármacos, péptidos e incluso, ácidos nucleicos, ya que se utiliza la funcionalidad del polímero y se aprovecha la cavidad hidrofóbica de la CD. El polietilenglicol (PEG) es un polímero hidrofílico ampliamente utilizado en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos, ya que, además de conferir estabilidad coloidal a nanoestructuras, puede ser conjugado con moléculas de diversa naturaleza, con lo cual se pueden construir sistemas dirigidos (targeted drug delivery systems) o bien, marcarlos para rastrearlos en modelos in vivo o realizar técnicas de imagen.

En este trabajo se presenta la síntesis de β CDs funcionalizadas con PEG (β CD-PEG) de distintos tamaños (550, 2000 y 5000 Da) por medio de *Química Click*, la cual consiste en una cicloadición 1,3-dipolar entre un grupo azida y un grupo alquino, reacción que es cuantitativa y se lleva a cabo en condiciones suaves. La funcionalización de la β -CD es selectiva para la cara primaria de manera que la cavidad quede disponible para formar CI. Posteriormente se presenta la preparación de CI con dos moléculas modelo, adamantano y fenolftaleína (Ad y FF) y se determina el efecto de la conjugación de las cadenas de PEG con la β -CD en el fenómeno de complejación. Finalmente, se discuten las condiciones en las que se obtienen los CI, de manera que esta información contribuya a la utilización de los sistemas supramoleculares β CD-PEG como acarreadores por sí mismos o como bloques de construcción de plataformas complejas.

3. Antecedentes

3.1 Química Supramolecular

El concepto moderno de "química supramolecular" se introdujo por Lehn en 1978. Sin embargo, el término "supramolecular" ya había aparecido en el diccionario Webster en 1903 y la palabra "übermoleküle" comenzó a circular en 1937 para describir a las especies de organización superior derivadas de la asociación de moléculas más pequeñas (Bazzicalupi, Bianchi, García-España, & Delgado-Pinar, 2014). La química supramolecular ha evolucionado durante las últimas tres décadas en un campo muy dinámico e interdisciplinario de la investigación, lo que ha impulsado las investigaciones en áreas como la química, la biología, la física, ciencias e ingeniería de los materiales (Pastor & Martínez-Viviente, 2008).

La química supramolecular se define como la química del enlace no covalente, lo cual implica un conjunto de entidades organizadas, por medio de la asociación de dos o más moléculas a través de enlaces no covalentes, fuerzas electrostáticas o fuerzas débiles de van der Waals. Centra su atención en el reconocimiento, la fijación y coordinación de especies moleculares o iónicas, gracias a las interacciones intermoleculares, así como en las propiedades de las entidades complejas y organizadas que se forman (El-Bindary, El-Sonbati, Diab, Ghoneim, & Serag, 2016).

Las funciones básicas de tales entidades son los procesos de reconocimiento, autoensamblaje, catálisis y transporte. Se han construido una gran variedad de ensamblajes supramoleculares, especialmente los de tipo macrociclo, incluyendo éter corona, ciclodextrinas, calixarenos, porfirinas, polipéptidos cíclicos, entre otros. Las ciclodextrinas (CDs) tienen excelentes propiedades en términos de interacción molecular y autoensamblaje. Muchas moléculas huésped con tamaños adecuados son capaces de formar complejos de inclusión (CI) con estas entidades (Liu, Zhou, Zhou, & Yuan, 2015). Este proceso de reconocimiento molecular hace que la Química Supramolecular incluya entre sus intereses a los procesos de ensamblaje espontáneo de moléculas individuales en estructuras más grandes las cuales presentan un cierto orden, con propiedades distintas a las de los componentes por separado. Las ciclodextrinas son de particular importancia ya que no solo han demostrado gran potencial en distintas áreas como la catálisis, la biotecnología, la química analítica, el medio ambiente, la industria alimenticia, la industria textil; sino también en el área de sistemas de liberación de fármacos (Singh, Sharma, & Banerjee, 2002).

3.2 Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos unidos a través de enlaces α -1,4 glucosídicos. La nomenclatura de las CDs se basa en las unidades de glucosa contenidas en su estructura, de forma que las CDs que contienen seis unidades se llaman alfa-CD (α -CD), siete unidades beta-CD (β -CD) y ocho unidades gamma-CD (γ -CD) (Figura 1) (Gómez-Galván et al., 2016). Como resultado de la rotación restringida de los enlaces de las unidades de glucopiranososa debido a la conformación de silla, las CDs son moléculas en forma de cono truncado con una cavidad de volumen determinado, en las que los grupos hidroxilos unidos a los carbonos 3 y 4 se encuentran en la cara secundaria o cara más amplia y los grupos hidroxilos unidos al carbono 6 están localizados en la cara primaria o cara más estrecha de la CD, estos grupos hidroxilo tiene una reactividad diferente debido a que están unidos a carbonos secundarios y primarios respectivamente. El exterior de la cavidad está revestido por estos grupos hidrófilos y la superficie interna está revestida por grupos éter, de átomos de oxígeno unidos a carbonos anoméricos. Por lo tanto, las CD tienen una cavidad interna hidrofóbica y una superficie externa hidrófila (Zafar, Fessi, & Elaissari, 2014b). La cavidad interna de las CDs proporciona la capacidad especial para atrapar huéspedes hidrófobos y formar complejos de inclusión; sin embargo, estas moléculas deben tener un tamaño compatible con la cavidad interna de la CD, con el fin de formar un complejo de inclusión estable (Suárez-Cerda, Nuñez, Espinoza-Gómez, & Flores-López, 2014).

Los estudios toxicológicos han demostrado que las CDs que son administradas por vía oral prácticamente no son tóxicas debido a su baja absorción, incluso cuando se administran vía parenteral, las ciclodextrinas hidrófilas se eliminan sin cambios por el cuerpo a través de la excreción renal con un aclaramiento plasmático total que está cerca de las tasas de filtración glomerular. En pacientes con función renal normal, aproximadamente el 90% de las CDs se excretan dentro de las 6 h y aproximadamente 99% dentro de 12 h después de la administración intravenosa. Por lo que estos estudios dieron la pauta para considerar el uso farmacéutico de las CDs (Loftsson & Brewster, 2012). La situación reglamentaria de las CDs se encuentra en continuo cambio, la β -CD se encuentra en una serie de formulaciones de productos farmacéuticos en muchos países del mundo. En ciertas condiciones se reconoce generalmente como segura por la FDA y se enumera en la Farmacopea Europea y la

Farmacopea de Estados Unidos, así como en el Codex Farmacéutico Japonés (Loftsson & Duchene, 2007).

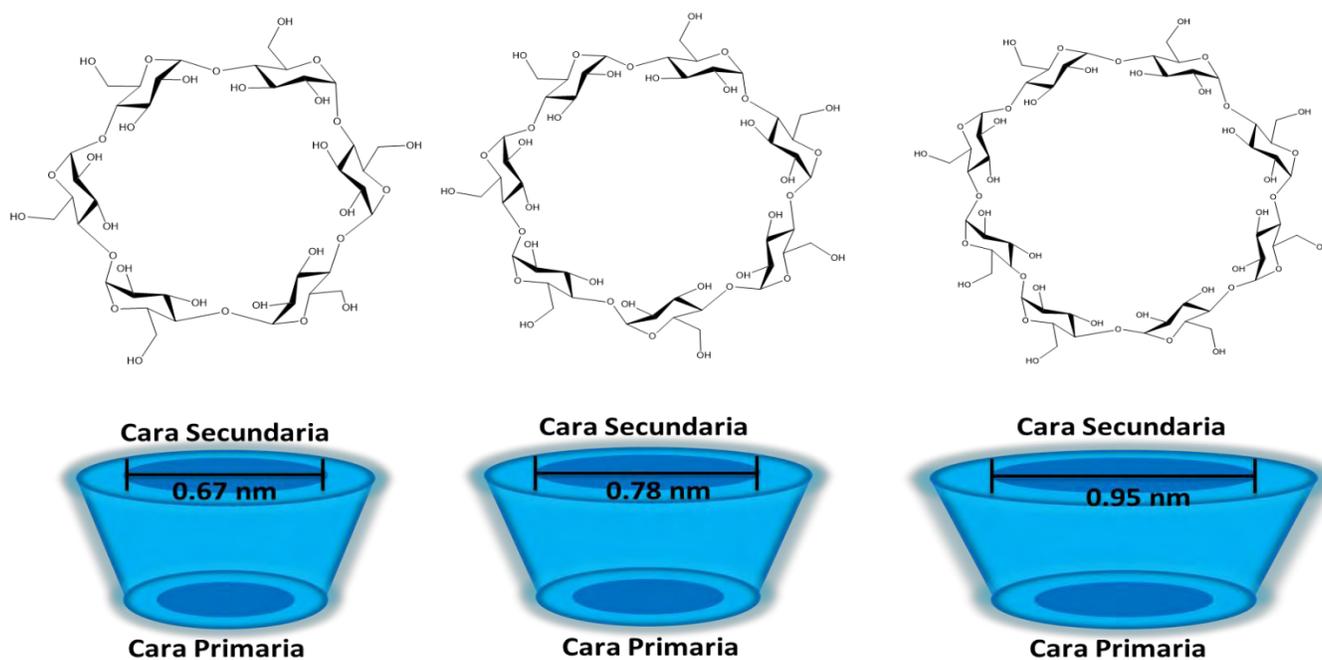


Figura 1. α , β y γ ciclodextrinas, estructura química, tridimensional y tamaño.

3.2.1 CI con CDs

En solución acuosa, la cavidad de las CDs está ocupada por moléculas de agua. Por lo tanto, la principal fuerza impulsora de la formación del complejo es la liberación de moléculas de agua de esta cavidad, con un valor alto de entalpía. Las moléculas de agua se desplazan por moléculas huésped más hidrofóbicas, presentes en la solución para favorecer una asociación apolar-apolar y una disminución de la tensión del anillo de las CDs, dando lugar a un estado de menor energía y más estable. La unión de moléculas huésped dentro de la CD anfitriona no es fija o permanente, sino más bien un equilibrio dinámico. Por lo tanto, la formación de un complejo de inclusión es el resultado de un equilibrio entre las moléculas huésped y las moléculas de CD y el CI (Figura 2). En general, existen cuatro interacciones energéticamente favorables que ayudan a desplazar el equilibrio para formar el complejo de inclusión: (i) sustitución de las moléculas de agua de la cavidad de la CD, (ii) un aumento del número de interacciones hidrofóbicas y de enlaces de hidrógeno formados, (iii) la liberación de la tensión del anillo, y (iv) fuerzas de van der Waals.

Por lo tanto, otros factores pueden influir en la formación de complejos de inclusión, tales como tipo de CD, tamaño de la cavidad, el pH y el estado de ionización de la molécula huésped, la temperatura y el método de preparación (Abarca, Rodríguez, Guarda, Galotto, & Bruna, 2016).

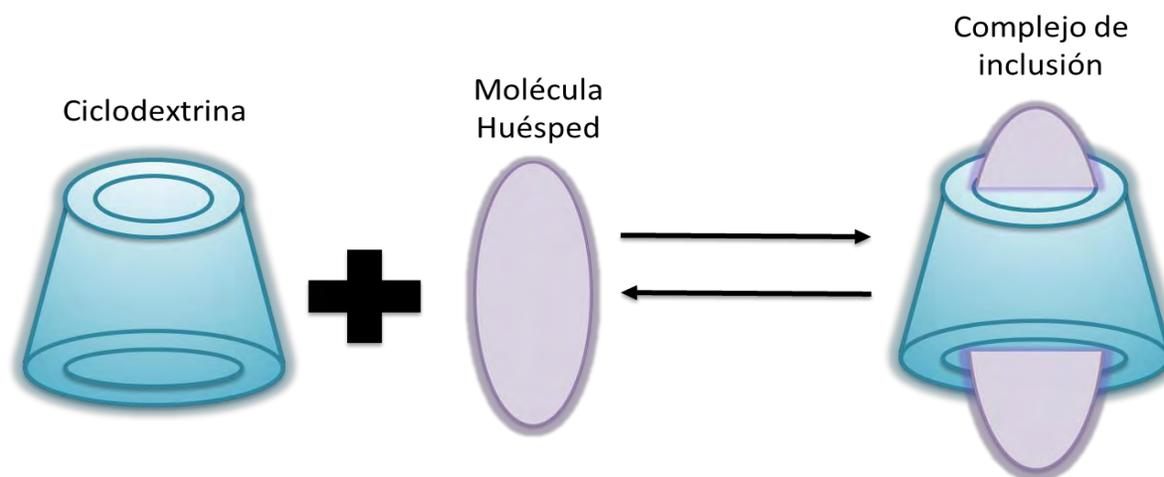


Figura 2. Esquema de la formación de los CI con ciclodextrina y una molécula huésped.

Cualquier metodología que pueda ser utilizada para observar los cambios en las propiedades fisicoquímicas de las moléculas huésped y/o de las moléculas anfitrionas (CDs), en teoría, se utilizará para determinar la estequiometría de los CI formados y los valores numéricos de sus constantes de formación (Messner, Kurkov, Jansook, & Loftsson, 2010). Las técnicas más utilizadas para demostrar la formación del CI se nombran a continuación:

En fase sólida

- ✓ **Microscopía electrónica de barrido (SEM).** Se evalúa un cambio en la morfología de las entidades individuales comparada con la del CI (D. Zhang et al., 2016).
- ✓ **Calorimetría diferencial de barrido (DSC).** Se evalúa un cambio en la estabilidad térmica de las entidades individuales comparada con la del CI, ya sea que los puntos de fusión, ebullición y de sublimación se desplazan o desaparecen (D. Zhang et al., 2016).
- ✓ **Análisis termogravimétrico (TGA).** Es una técnica eficaz para estudiar los cambios en las propiedades físicas y químicas de las entidades individuales, ya que se evalúa la pérdida de peso en función de la temperatura; las entidades individuales tendrán patrones diferentes que los CI (Abarca et al., 2016).

- ✓ **Difracción de rayos X (RXD).** Se informa de la formación de patrones de difracción difusos, la aparición de nuevos picos, y la desaparición de los picos característicos de las entidades individuales son todas las pruebas de la formación de CI (D. Zhang et al., 2016).
- ✓ **Espectroscopia de infrarrojo de transformada de Fourier (FT-IR).** Se utiliza para estimar la interacción entre la CD y las moléculas huésped en el estado sólido. De esta manera, los CI se demuestran mediante el estudio de la modificación de la forma del pico, la posición y la intensidad (Abarca et al., 2016).

En disolución

- ✓ **Espectroscopia ultravioleta (UV).** Se evalúa un cambio en el desplazamiento del pico máximo de absorción de las entidades individuales (Cannavà et al., 2008).
- ✓ **Dispersión de luz dinámica (DLS).** Es una técnica que se utiliza para estudiar los cambios en los índices de tamaño de partícula y la polidispersión promedio de las CDs, antes y después de la formación de los CI (Li et al., 2015).
- ✓ **Espectroscopia de masas (Ionización por Electrospray).** Esta técnica se utiliza para encontrar posibles correlaciones de la estabilidad de los CI en solución y gas (Jian-qiang Zhang et al., 2015).
- ✓ **Resonancia magnética nuclear de protón y bidimensional (ROESY) (RMN ¹H y 2D).** La técnica de RMN ¹H se utiliza para investigar los grupos funcionales que participan en la interacción y el mecanismo de la formación de CI. Después de la formación de los CI, los cambios en el entorno electrónico de los protones de las CDs y de la molécula huésped son reflejados por los cambios en el desplazamiento de los picos de señal RMN (Bulani et al., 2016). Los espectros de RMN ¹H se encuentran entre la evidencia más directa para la formación de los CI. Cuando una molécula huésped se incorpora en una cavidad de CD, los desplazamientos químicos de los protones de CDs dentro de la cavidad (H-3 y H-5) son sensibles al nuevo entorno. En contraste, los protones (H-1, H-2 y H-4) fuera de la cavidad no se ven influenciados (Jian-qiang Zhang et al., 2015). Los espectros de dos dimensiones (RMN 2D) proporcionan la evidencia más directa de la proximidad espacial entre los átomos del anfitrión y del huésped a partir de la observación de correlaciones intermoleculares dipolares cruzadas. Dos protones que están estrechamente ubicados en el espacio

pueden producir un Efecto Nuclear Overhauser (NOE) y la correlación cruzada en la espectroscopia del NOE es NOESY para moléculas pequeñas o ROESY para moléculas grandes. La presencia del NOE genera picos cruzados entre protones a partir de dos especies e indica contactos espaciales dentro de 0,4 nm, por lo que es una evidencia clara de que existe interacción entre el anfitrión y el huésped (Yang et al., 2013).

Existen muchas ventajas que se le otorgan a las moléculas huésped en la formación de CI, entre las cuales se pueden considerar, una protección contra el agua, el oxígeno, la radiación y por lo tanto la degradación, control de volatilidad y sublimación, el aislamiento físico de compuestos incompatibles, modificación de los sabores, olores desagradables y liberación controlada de fármacos y sabores. La formación de CI ha recibido gran atención en los últimos años y se utiliza para formar CI con una variedad de fármacos, agentes antibacterianos, en diferentes campos como la química analítica, de catálisis, las industrias alimentarias y el tratamiento de aguas residuales (Abarca et al., 2016). La formación de CI en el área de farmacia, proporciona propiedades distintas a los fármacos que cuando se encuentran solos, las cuales son (Tiwari, Tiwari, & Rai, 2010):

1. **Mejora de la solubilidad:** Las CDs aumentan la solubilidad acuosa de muchos fármacos poco solubles mediante la formación de CI con sus moléculas o grupos funcionales apolares. El complejo resultante oculta la mayor parte de la funcionalidad hidrofóbica en la cavidad interior de la CD, mientras que los grupos hidroxilo hidrófilos en la superficie externa permanecen expuestos al medio ambiente. El efecto neto es que se forma un complejo CD/fármaco soluble en agua.
2. **Mejora de la biodisponibilidad:** Cuando la pobre biodisponibilidad es debido a la baja solubilidad, las CDs son muy importantes. Las condiciones previas para la absorción de un fármaco administrado por vía oral es su liberación de la formulación en forma disuelta. Cuando el fármaco forma un complejo con la CD, la velocidad de disolución y, en consecuencia, la absorción mejora. La reducción de la hidrofobicidad de los fármacos por la formación de complejos con CD también mejora su absorción percutánea o rectal. Además de mejorar la solubilidad, la complejación con CDs también evita la cristalización de los principios activos de manera que ya no pueden autoensamblarse en una red cristalina.

3. **Mejora de la estabilidad:** La complejación con CDs es de gran aplicación en la mejora de la estabilidad química, física y térmica de los fármacos; cuando un fármaco se expone al oxígeno, el agua, la radiación o calor, y suceden reacciones químicas se degrada. Cuando una molécula está incluida dentro de la cavidad de la CD, es difícil que los reactivos se difundan en la cavidad y reaccionen con el huésped protegido.
4. **Reducción de la irritación:** Los fármacos que irritan el estómago, piel u ojos pueden ser encapsulados dentro de una cavidad de CD para reducir su irritación. La formación de CI con CDs reduce la concentración local del fármaco libre, por debajo del umbral de irritación. A medida que el complejo gradualmente se disocia y el fármaco se libera, se absorbe en el cuerpo y su concentración libre local, siempre permanece por debajo de los niveles que podrían ser irritantes para la mucosa.
5. **Prevención de la incompatibilidad:** Los fármacos pueden ser incompatibles entre sí o con los excipientes presentes en una formulación. La encapsulación de los fármacos incompatibles dentro de una molécula de CD estabiliza la formulación por la separación física de los componentes con el fin de evitar interacciones fármaco – fármaco o fármaco – excipiente.
6. **Enmascaramiento de olor y sabor:** El desagradable olor y sabor amargo de los fármacos se pueden enmascarar por la formación de complejos con las CD. Las moléculas o grupos funcionales que causan sabores u olores desagradables se ocultan de los receptores sensoriales encapsulándolos dentro de la cavidad de CD. Los complejos resultantes tienen poco o ningún sabor u olor y son mucho más aceptables para el paciente.
7. **Mejora de la manipulación de los fármacos:** Los fármacos que son líquidos a temperatura ambiente son difíciles de manejar y formular en formas de dosificación sólidas. La complejación con CDs convierte dichas sustancias en polvos microcristalinos o amorfos que son manejados convenientemente y formulados en formas de dosificación sólidas.

3.2.1.1 Métodos para preparar CI con CDs

Existen diversos métodos para preparar complejos de inclusión, dependiendo de las propiedades de la molécula huésped es el método que se utiliza:

- **Co-evaporación o evaporación del disolvente.** Se mezcla con agitación, la fase orgánica que contiene el fármaco y una solución acuosa de CD para conseguir una dispersión molecular. La suspensión resultante se centrifuga o se filtra para eliminar el fármaco no disuelto y se evapora el disolvente a presión reducida hasta que se seca el producto obtenido (Figura 3) (Gharib, Greige-Gerges, Fourmentin, Charcosset, & Auezova, 2015).
- **Preparación del complejo en fase acuosa.** La CD se disuelve en una fase acuosa y luego se añade el fármaco. Los CI solubles en agua se forman después de agitar la mezcla durante un período de tiempo específico a una temperatura específica (Figura 3) (Gharib et al., 2015).
- **Liofilización.** El fármaco y la CD se disuelven en una relación molar 1:1 en etanol o agua. La solución resultante se agita durante un tiempo específico a una cierta temperatura y luego se filtra, se congela y liofiliza a presión reducida (Figura 3) (Gharib et al., 2015).
- **Secado por atomización.** Esta técnica implica la mezcla de una fase orgánica de fármaco con una solución acuosa de CD en proporción molar 1:1. La mezcla resultante se agita a continuación a temperatura ambiente para alcanzar el equilibrio, seguido por eliminación del disolvente mediante secado por atomización (Figura 3) (Gharib et al., 2015).
- **Amasado.** Se mezclan la CD y una mínima cantidad de agua en un mortero para hacer una pasta homogénea; a continuación, se añade lentamente el fármaco, mientras se va mezclando para disolver el fármaco. Después se agrega un poco más de agua a la pasta y se sigue mezclando para mantener una consistencia adecuada. La preparación se dejar secar (Figura 3) (Gharib et al., 2015).

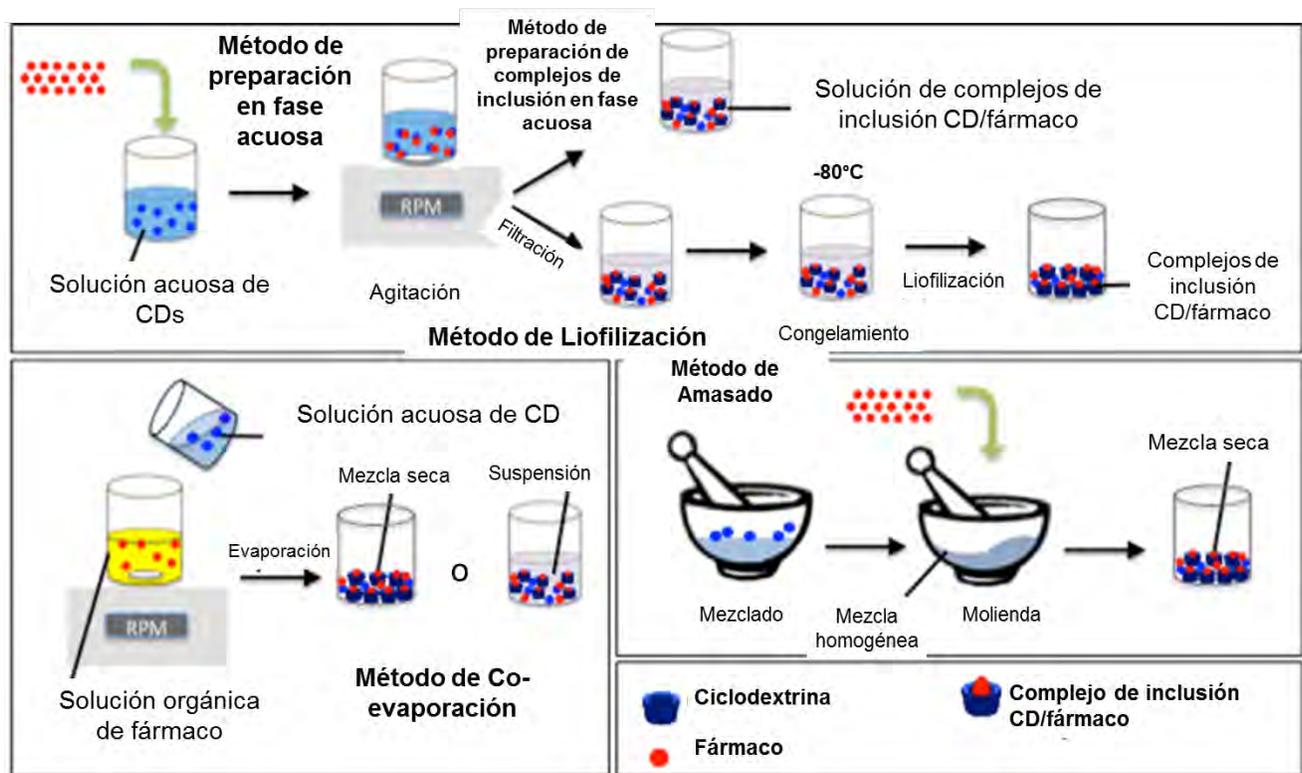


Figura 3. Métodos de preparación de CI fármaco/CD

Imagen tomada y adaptada de (Gharib et al., 2015)

3.2.2 La modificación química de las CDs y sus aplicaciones farmacéuticas

La CD más utilizada en la construcción de sistemas supramoleculares, es la β -ciclodextrina (β -CD) la cual se modifica para funcionalizarla y así originar nuevos materiales para dar lugar a estructuras supramoleculares con diversas aplicaciones. Recientemente, se han sintetizado una amplia gama de CDs que contienen polímeros con arquitecturas versátiles para dar lugar a plataformas supramoleculares multifuncionales. Estas plataformas han cobrado mucha importancia en el diseño y desarrollo de sistemas de liberación de fármacos avanzados con potencial aplicación en liberación no solo de moléculas pequeñas si no de ácidos nucleicos o plataformas de diagnóstico (imagenología) (Jianxiang Zhang & Ma, 2013b). Las CDs se modifican en los carbonos 6, y en los carbonos 2 y 3 de su cara primaria y secundaria, respectivamente. Otra razón para modificar químicamente a las CDs es aumentar la interacción con membranas biológicas, aumentar su biocompatibilidad y modificar la capacidad para formar CI (Del Valle, 2004).

3.2.2.1 Conjugación de CDs con polímeros

Las CDs se pueden modificar estructuralmente con diversos grupos cargados, segmentos hidrófilos, grupos hidrofóbicos, o ambas unidades hidrofílicas e hidrofóbicas para poder seguir explorando sus propiedades fisicoquímicas y su capacidad de reconocimiento molecular. Por otra parte, las CDs se han conjugado con diferentes polímeros para ofrecer materiales con características únicas y una excelente biocompatibilidad. Las CDs anfífilas se han sintetizado para aumentar las interacciones con las membranas biológicas y poder hacer el autoensamblaje en soluciones acuosas. De acuerdo con los grupos que se conjugan con las CDs, los derivados resultantes se clasifican en neutros, catiónicos, y anfífilos aniónicos. La modificación hidrofóbica de las CDs se ha utilizado para desarrollar sistemas de liberación modificada. Las modificaciones hidrofóbicas que más destacan son las acetilaciones, ya que se observó una hidrólisis dependiente del pH de los materiales construidos con CDs acetiladas, dependiendo del tipo de acetal y del grado de sustitución de éste, se puede conseguir fácilmente un control en la velocidad de degradación. Otra característica para destacar de las CDs acetiladas es que presentan mejor biocompatibilidad y pueden dar origen a nanoestructuras que se pueden administrar de forma sistémica. También se pueden construir polímeros de CDs para obtener materiales con múltiples sitios de reconocimiento para el autoensamblaje molecular y para mejorar la biocompatibilidad o para dirigir a las nanoestructuras a blancos terapéuticos. Estos polímeros poseen diferentes estructuras, ya que van desde lineales, injertados, en bloques o ramificados, y las unidades de CD se pueden unir covalentemente en las cadenas principales o conjugarse como grupos laterales (Figura 4) (Jianxiang Zhang & Ma, 2013b). La combinación de CDs con polímeros otorga propiedades únicas en el producto final, las cuales incluyen baja toxicidad, mayor especificidad, tolerancia y protección de la degradación en sistemas biológicos.

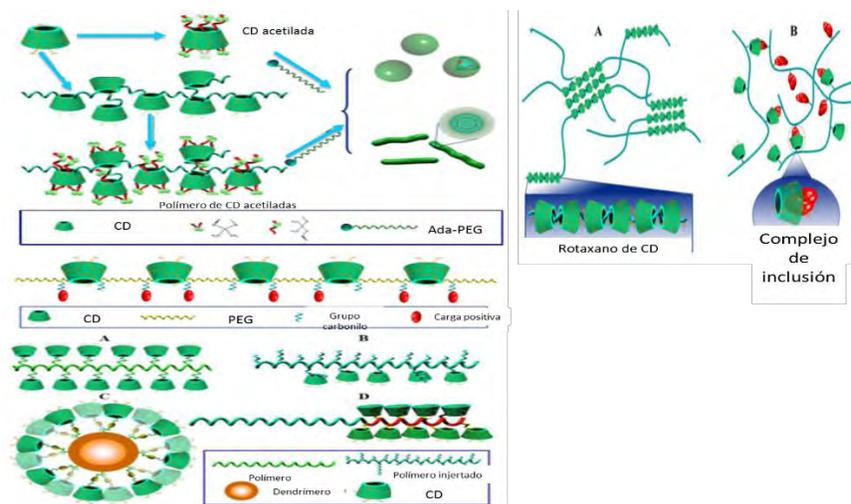


Figura 4. Ejemplos de sistemas autoensamblados de CDs anfífilas, hidrofóbicas, polímeros de CDs, e hidrogeles de CDs

Imagen tomada y adaptada de (Jianxiang Zhang & Ma, 2013a)

Los polímeros solubles en agua, tales como el polietilenglicol (PEG), hidroxipropilmetilcelulosa, y polivinilpirrolidona, han adquirido recientemente mayor atención en el diseño de sistemas para liberar fármacos. Los PEGs se utilizan ampliamente debido a sus propiedades favorables en solución, baja toxicidad, estabilidad, entre otros.

3.2.3 Polietilenglicol (PEG)

El polietilenglicol (PEG), está formado por unidades repetitivas de etilenglicol para dar lugar a polímeros con formas lineales o ramificadas de diferentes pesos moleculares que se utiliza en aplicaciones médicas y la FDA (Food and Drug Administration) lo reconoce como seguro para usarse como un vehículo o base en los alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos, incluyendo formulaciones inyectables, tópicas, rectales y nasales. El PEG es biocompatible y se elimina del cuerpo intacto por los riñones (PEGs <30 kDa) o en las heces (por PEGs > 20 kDa). A finales de 1970, Frank Davis y sus colegas de la Universidad de Rutgers fueron pioneros en las primeras etapas químicas de pegilación que permitieron proteger a las proteínas de la destrucción durante su administración en el cuerpo. Ellos demostraron que también mejoraba las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los fármacos mediante el aumento de la solubilidad en agua y reducía su aclaramiento renal aumentando el tiempo en circulación sistémica (Harris & Chess, 2003).

Además de brindar propiedades fisicoquímicas, el PEG también permite funcionalizar a los sistemas de liberación y dirigirlos a moléculas diana específicas. Existen diversas estrategias

para conjugar el PEG a los sistemas de liberación, es por eso que tiene distintos grupos terminales, si se tiene un grupo terminal para funcionalizarlo, el PEG se llama monofuncionalizado. Si contiene dos grupos iguales para funcionalizarlo, se llama homobifuncional y finalmente si contiene dos grupos diferentes para funcionalizarlo, se llama heterobifuncional (Figura 5) (CreativePEGWorks). Estos grupos funcionales permitirán, mediante reacciones de conjugación, “pegar” fármacos, proteínas u otros bloques copoliméricos.

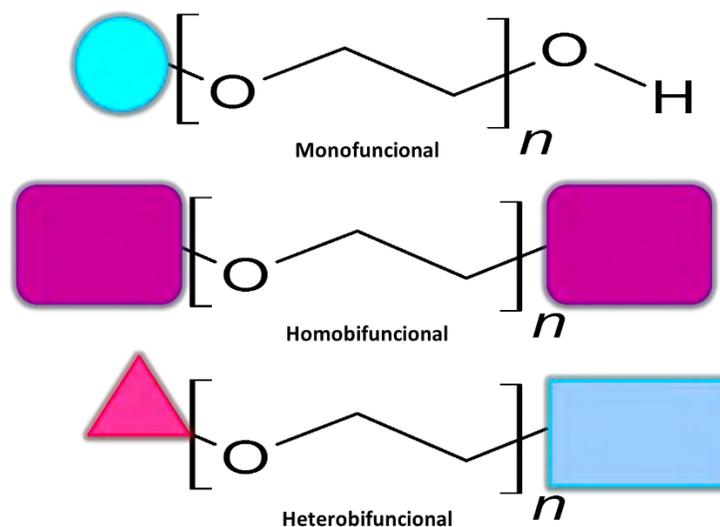


Figura 5. Tipos de PEG funcionalizados

3.2.4 Química Click

Una de las estrategias para conjugar PEG a otras moléculas es la llamada *Química Click*. La reacción de *Química Click* es una reacción catalizada por Cu (I) la cual produce 1,2,3-triazoles 1,4-disustituidos a partir de un grupo azido y un grupo alquino; es modular, específica y regioselectiva (Figura 6) y se considera de "química verde" ya que se puede llevar a cabo en un medio acuoso y ofrece altos rendimientos. (Le, Jeon, Lim, & Kim, 2014). A pesar del gran contenido energético que presentan los alquinos y las azidas, estos grupos funcionales son de los menos reactivos en química orgánica. Esta estabilidad cinética a temperatura ambiente es la responsable de la buena tolerancia frente a biomoléculas, oxígeno molecular, agua y a la mayoría de las condiciones experimentales encontradas en medio orgánico o biológico (Díaz, Finn, Sharpless, Fokin, & Hawker, 2008). Los triazoles son anillos heterocíclicos biocompatibles con propiedades importantes como grandes momentos

dipolares, buen carácter aromático, excelente capacidad de formar enlaces de hidrógeno y con gran estabilidad química (ser inerte a condiciones ácidas y básicas, así como oxidantes y reductoras) de manera que se pueden utilizar como “linkers” en el diseño de nanosistemas de liberación de fármacos y química farmacéutica (Xu, Li, & Li, 2014).

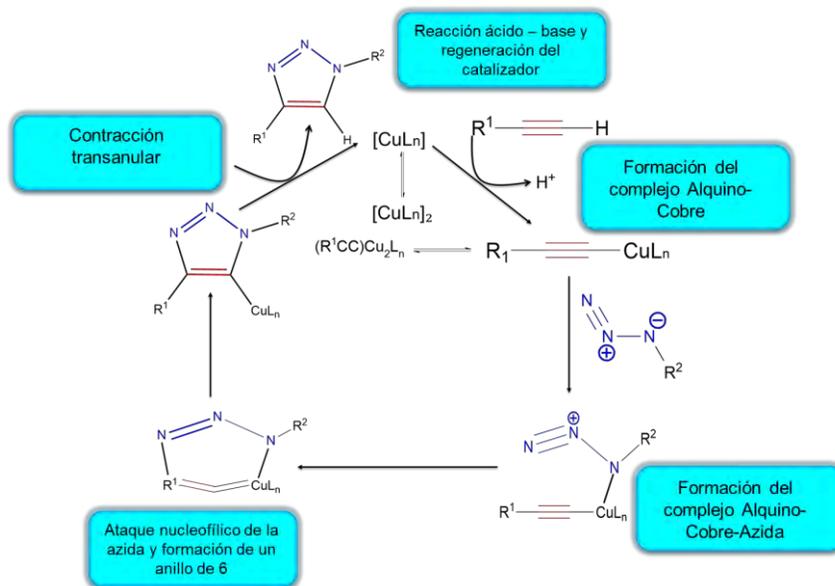


Figura 6. Mecanismo de reacción de la cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen

3.3 Nanomedicina y sistemas autoensamblables

El uso de nanosistemas para suministrar fármacos ofrece posibilidades para mejorar la eficacia y reducir los efectos secundarios de diversos tratamientos. En este enfoque, cuando un fármaco insoluble o sensible al agua, se carga dentro de un nanoacarreador este aumenta su solubilidad y estabilidad, se prolonga el tiempo en circulación, y aumenta la acumulación en las células blanco. Con la protección de los nanoacarreadores, los fármacos encapsulados no interactúan con los entornos biológicos antes de su liberación en sus dianas moleculares. Por lo tanto, la manipulación del tamaño, la forma y la superficie de los nanoacarreadores puede permitir el aumento del índice terapéutico del fármaco. Estos nanosistemas contienen múltiples componentes con estructuras bien definidas además de que pueden encapsular, uno o más principios activos. En algunos casos cada componente se desarrolla de forma individual, y después se combina para formar un nanosistema a través de una serie de métodos de conjugación y autoensamblaje (Su, Koo, & Cui, 2015).

La nanomedicina se refiere a la aplicación médica de la nanotecnología. Es un campo interdisciplinario que explota las características distintivas de los nanosistemas para satisfacer las necesidades de las investigaciones y futuras aplicaciones con fines clínicos. Hoy en día, se busca la integración de los nanosistemas con la biología para desarrollar nuevos dispositivos de diagnóstico, agentes de contraste, herramientas analíticas, y sistemas de liberación de fármacos (Wang & Huang, 2014).

Los nanosistemas de liberación de fármacos están cambiando gradualmente el paradigma de la industria farmacéutica tradicional a través de la administración dirigida y la liberación de agentes terapéuticos a células específicas con el fin de minimizar los efectos adversos no deseados. Además, algunos fármacos muy potentes con una baja biodisponibilidad debido a sus propiedades desfavorables físicas o químicas se pueden formular en nanosistemas, manifestándose su eficacia terapéutica real (Wang & Huang, 2014).

El uso médico de los nanosistemas está ganando terreno rápidamente en oncología, con diversos nanofármacos ya en el mercado y muchos progresando a través de las diferentes etapas del descubrimiento de nuevos medicamentos. Los nanosistemas que se han diseñado para la terapia contra el cáncer pueden ser muy diversos tales como micelas, liposomas, dendrímeros, nanopartículas inorgánicas, nanopartículas y nanotubos de carbono, los nanodiamantes, nanoemulsiones, nanoportadores virales, nanopartículas poliméricas o de péptidos, y nanopartículas lipídicas sólidas; que se pueden autoensamblar o sintetizarse directamente en los sistemas de componentes múltiples y multifuncionales (Bregoli et al., 2016).

Una de las aplicaciones más frecuentes de nanomateriales en oncología es para mejorar la biodisponibilidad, seguridad y especificidad, mediante el aprovechamiento de las propiedades de materiales en nanoescala. Los medicamentos quimioterapéuticos se cargan en los nanomateriales mediante atrapamiento físico, adsorción a través de interacciones no covalentes, o mediante unión covalente a la superficie del nanomaterial a través de enlaces degradables o no degradables. El tamaño, la forma y las características de la superficie de los nanomateriales permiten la producción de nanomedicamentos con alta estabilidad, solubilidad, y compatibilidad en fluidos biológicos, y la incorporación de ambas sustancias hidrófilas e hidrófobas (Bregoli et al., 2016).

Los ensamblajes supramoleculares basados en CDs constituyen plataformas importantes para el desarrollo de nanosistemas multifuncionales a través de las interacciones hospedador-huésped y pueden ser empleadas en el transporte de fármacos y genes. Recientemente, las CDs se han utilizado como componentes funcionales para la fabricación de nanosistemas que responden a estímulos biológicos para lograr el comportamiento deseado de liberación del fármaco en las células del cáncer y mejorar la eficacia terapéutica. Debido a que la formación de CI es un equilibrio dinámico, se han utilizado moléculas que permiten “anclar” al huésped a la cavidad de la CD, una de ellas es el adamantano (Ad) (Dan et al., 2015).

3.4 Adamantano

El Ad, es un alcano en forma de jaula con estructura simétrica y alta estabilidad. Su diámetro es de aproximadamente 7 Å y su volumen es de aproximadamente 180 Å³, propiedades que son muy parecidas a las de la cavidad hidrofóbica de la βCD (d = 7.8 Å, v = 270 Å³), por lo tanto, se puede formar un complejo de inclusión (1:1) entre Ad y βCD con una constante de estabilidad de 4x10⁵ M⁻¹ (Figura 7). Debido a la formación de CI tan estables entre la β-CD y el Ad se han construido nuevas macromoléculas funcionales con diferentes topologías y altamente sofisticadas utilizando estos componentes (Liu et al., 2015).

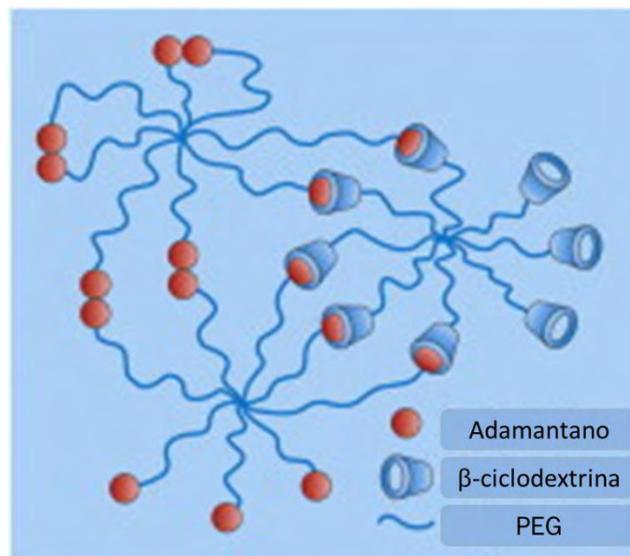


Figura 7. Ejemplos de sistema supramolecular β-CD/Ad

Imagen tomada y editada de (Osman, Brandl, Zayed, Teßmar, & Göpferich, 2011)

Sistemas cada vez más complejos y con múltiples componentes se han diseñado para entregar agentes quimioterapéuticos (Figura 8). Sin embargo, este tipo de sistemas dista de

llegar a la clínica y a producirse a nivel industrial debido a su complejidad. De manera que para que los nanosistemas puedan tener éxito es necesario realizar estudios sistemáticos de cada componente y de las interacciones supramoleculares que determinan su estructura y aplicaciones. Bajo este contexto, este trabajo consiste en la síntesis de β -CDs modificadas con cadenas de PEGs de distintos tamaños por la cara primaria de manera que la cara secundaria quede disponible para formar CI. Posteriormente se prepararán CI con moléculas modelo y se determinará si el tamaño del PEG influye en las interacciones huésped-anfitrión, de manera que estas estructuras se puedan aplicar de manera racional como acarreadores o como bloques de construcción de plataformas complejas.

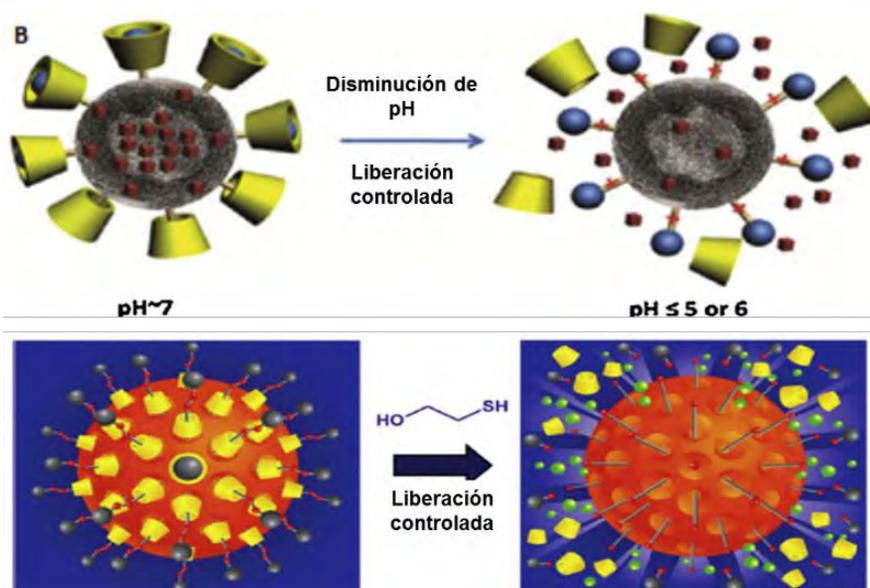


Figura 8. Sistemas con múltiples componentes

Imagen tomada y adaptada de (Zafar, Fessi, & Elaissari, 2014a).

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

Mediante la estrategia de *Química Click*, se funcionalizarán con PEG las 7 posiciones de la cara primaria de la β -CD, quedando disponible la cara secundaria para la formación de CI. El fenómeno de complejación no se verá afectado por la conjugación de las cadenas de PEG a la β -CD.

Objetivo general

Sintetizar conjugados β -CD-PEG, utilizando PEG de distintos tamaños y formar CI de los conjugados β -CD-PEG con moléculas Ad y fenolftaleína (FF) como moléculas modelo.

Objetivos particulares

1. Sintetizar y caracterizar los derivados de β -CD que permitan la conjugación con PEG
 - 1.1 Síntesis de per-yodo- β -CD
 - 1.2 Síntesis de per-azido- β -CD
2. Sintetizar y caracterizar los derivados de PEG (550, 2000 y 5000 Da) que permitan la conjugación con β -CD
 - 2.1 Síntesis de Alquínil-PEG (550, 2000 y 5000 Da)
3. Conjugar las 7 posiciones de la cara primaria de la β -CD con cadenas de PEG (550, 2000 y 5000 Da) mediante la estrategia de Química Click
4. Formar los CI β -CD/FF, β -CD-PEG₅₅₀/FF, β -CD-PEG₂₀₀₀/FF, β -CD-PEG₅₀₀₀/FF y caracterizarlos por RMN ¹H
5. Formar los CI β -CD/Ad β -CD-PEG₅₅₀/Ad, β -CD-PEG₂₀₀₀/Ad, β -CD-PEG₅₀₀₀/Ad y caracterizarlos por RMN ¹H
6. Evaluar la influencia del tamaño de PEG (550, 2000 y 5000 Da) en la formación de CI

Metodología

4. Parte experimental

La β -ciclodextrina (β -CD), el poli(etilen)glicol metileter 550, 2000 y 5000 Da, la trifenilfosfina (PPh_3), la N, N-Dimetilformamida (DMF), el metóxido de sodio (NaOMe), el ácido 4-pentinoico, la N,N'-diclohexilcarbodiimida (DCC), la 4-dimetilaminopiridina (DMAP), la fenoltaleína (FF), el ácido 1-adamantancarboxílico (Ad), el dimetilsulfoxido (DMSO), se adquirieron de Sigma-Aldrich; el yodo (I_2), la azida de sodio (NaN_3), el sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), el ácido ascórbico (H_2Asc), fueron donación del Dr. Eugene Bratoeff†; el sodio metálico (Na) de HCR, el hidróxido de sodio (NaOH) de Merck Millipore; el etanol (EtOH) de Analytyka; el diclorometano (CH_2Cl_2) de Honeywell; el metanol (MeOH) de Fermont; todos los disolventes y reactivos utilizados son de grado analítico.

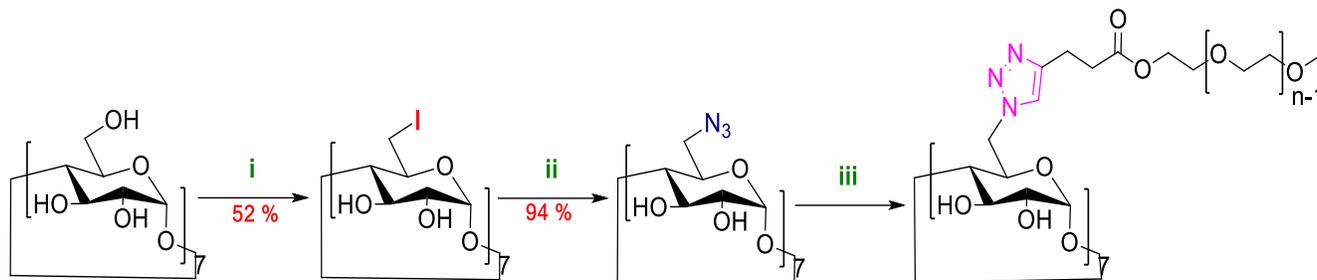
Para la evaporación de los disolventes empleados, se utilizó un rotaevaporador marca Heidolph. En la destilación a presión reducida se empleó una bomba para vacío marca Vacuubrand modelo PC 3001 VARIO PRO con capacidad máxima de 0.1 mm Hg.

Los espectros de RMN ^1H y la preparación de las muestras para el análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en solución, el ajuste del equipo y la adquisición del núcleo de Hidrógeno, se realizó en un aparato Varian VxR-300S (400 MHz), en el laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), de la Facultad de Química, UNAM. Los desplazamientos químicos se reportan en ppm (δ) y las constantes de acoplamiento (J) se reportan en Hertz (Hz). La multiplicidad de las señales se expresa como: s = señal simple; sa = señal amplia; c = señal cuádruple; d = señal doble; dd = señal doble de doble; t = señal triple y m = señal múltiple. Se utilizó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y como disolventes dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$) y cloroformo deuterado (CDCl_3).

Los espectros de infrarrojo (IR), se determinaron en un espectrofotómetro de FT-IR/FT-FIR *Spectrum 400* de Perkin Elmer mediante la técnica de Reflectancia totalmente atenuada (ATR) con un accesorio universal *ATR Sampling* de Perkin Elmer; las unidades se reportan en cm^{-1} .

4.1 Síntesis química

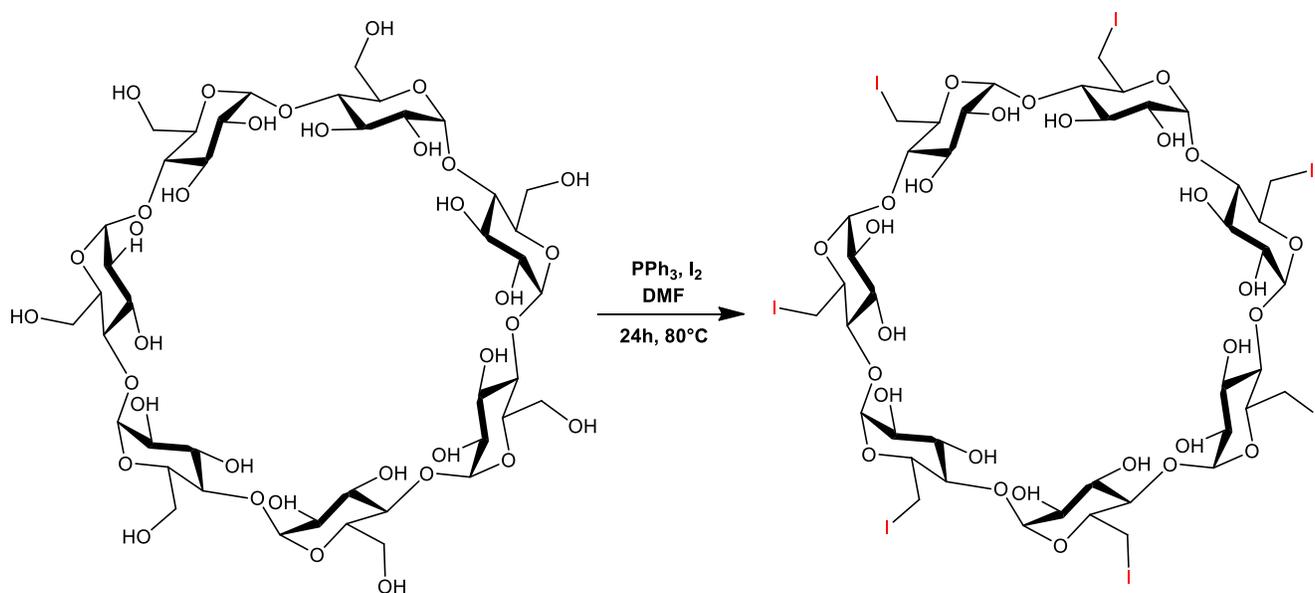
El Esquema 1 muestra la ruta general de síntesis donde se aplica la estrategia de Química Click, en donde se hace reaccionar una fuente de azida y una fuente de alquino.



Esquema 1. Condiciones de reacción: (i) PPh_3 , I_2/DMF , 24 h 80°C (ii) NaN_3/DMF , 24 h 70°C (iii) Alquiniil-PEG (550, 2000 y 5000 Da), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{H}_2\text{Asc}/\text{DMSO}:\text{H}_2\text{O}$, 24 h 70°C

4.1.1 Síntesis de per-6-yodo- β -CD (β -CDI)

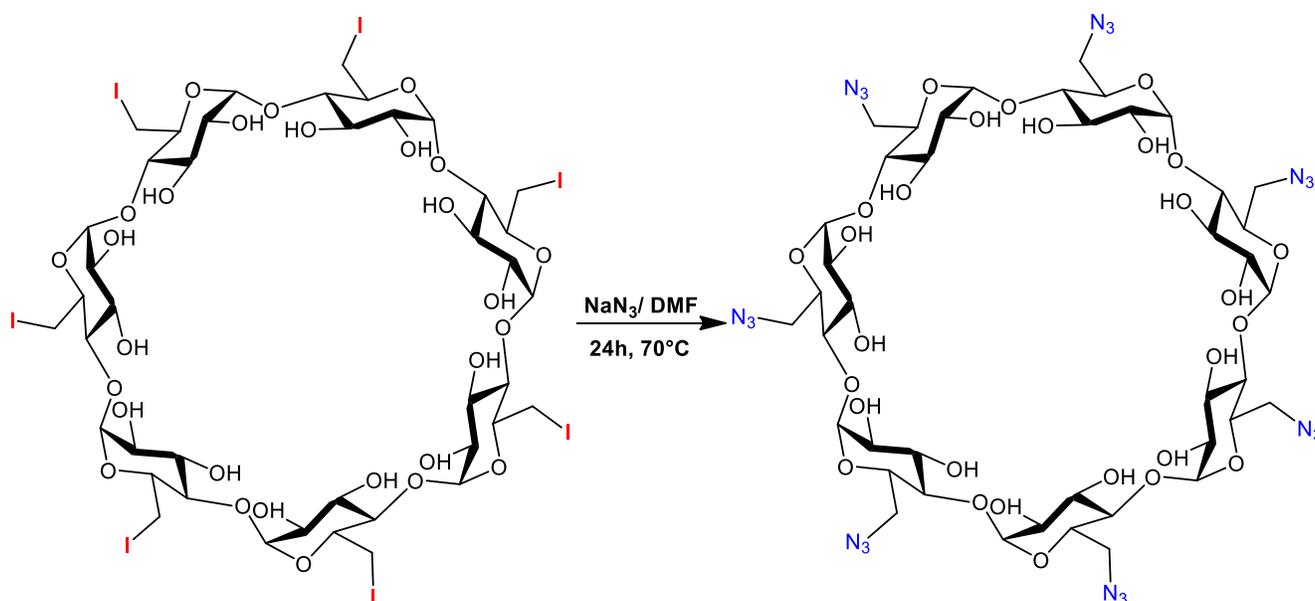
La síntesis de β -CDI se llevó a cabo de acuerdo al Esquema 2, en un matraz de fondo redondo de dos bocas, en condiciones anhidras y atmósfera de nitrógeno se disolvieron 14 mmol (3.45 g) de PPh_3 en 5 mL de DMF anhidra, a continuación, se transfirió por goteo a la solución anterior 3.55 g de iodo (14 mmol) en 10 mL de DMF anhidra, manteniendo la agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al término de este tiempo, a la solución color marrón oscuro se le adicionaron 1.0 g de β -CD (0.9 mmol). La mezcla formada se calentó a 80°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de reacción se retiró del calentamiento y se concentró a presión reducida hasta un tercio del volumen inicial, a este residuo se le añadió de una solución 3 M de NaOMe/MeOH manteniéndolo en baño de hielo y se dejó en agitación constante durante 30 minutos, a continuación, se adicionaron 200 mL de MeOH frío, formándose un precipitado, el cual se separó por filtración y se lavó con MeOH . El sólido naranja resultante se purificó mediante un equipo Soxhlet usando MeOH durante 24 horas, se retiró el producto del extractor Soxhlet y se secó al vacío.



Esquema 2. Obtención de per-yodo-6-β-CD

4.1.2 Síntesis de per-6-azido-β-CD (β-CDN₃)

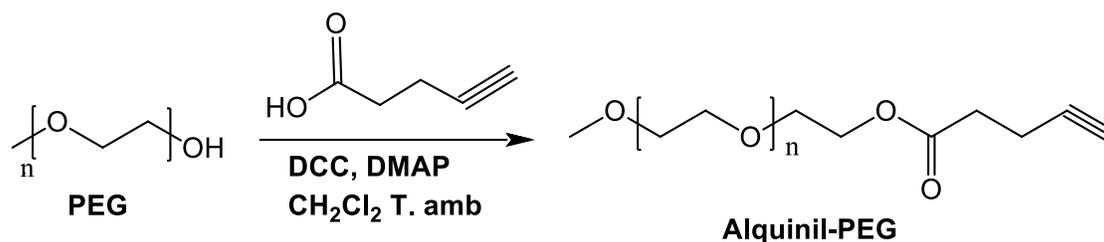
La síntesis de β-CDN₃ se llevó a cabo de acuerdo al Esquema 3, en un matraz de fondo redondo de una boca, en condiciones anhidras y atmósfera de nitrógeno se disolvieron 890 mg de β-CDI (0.47 mmol) en 6 mL de DMF anhidra, a continuación, se agregaron 298 mg de NaN₃ (4.6 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 70°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de reacción, la mezcla se retiró del calentamiento y se concentró a presión reducida hasta un tercio del volumen inicial (2 mL aprox.), a este residuo se le agregaron 100 mL de agua destilada, hasta observar la formación de un sólido color café, el cual se lavó con agua destilada y se secó al vacío.



Esquema 3. Obtención de per-azido-6- β -CD

4.1.3 Método general para la síntesis de Alquinil-PEG

La síntesis de los Alquinil-PEG (550, 2000 y 5000 Da) se llevó a cabo de acuerdo al Esquema 4, en un matraz de fondo redondo de una boca, en condiciones anhidras y atmosfera de nitrógeno se disolvieron 0.5 mmol de poli(etilen)glicol metileter (PEG) en 5 mL de CH_2Cl_2 seco, a continuación, se adicionaron 0.9 mmol de Ácido 4-pentinoico y 0.5 mmol de DMAP manteniendo la agitación durante 5 minutos a temperatura ambiente. Al término de este tiempo, a la solución anterior se le adicionó por goteo una solución de 0.9 mmol de DCC en 2 mL de CH_2Cl_2 . La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de reacción se filtró el sólido blanco formado y el residuo líquido se trató por triplicado con 50 mL de dietileter frío.



Esquema 4. Obtención de Alquinil-PEG (Esterificación de Steglich)

4.1.4 Síntesis de Alquinil-PEG₅₅₀

Siguiendo el procedimiento en la sección 4.1.3, se utilizaron 0.98 mL (1.8 mmol) de PEG₅₅₀, transcurrido el tiempo de reacción, se filtró el sólido blanco formado y el residuo líquido se extrajo por triplicado con CH₂Cl₂/H₂O, se separó la fase orgánica y se concentró a presión reducida.

4.1.5 Síntesis de Alquinil-PEG₂₀₀₀

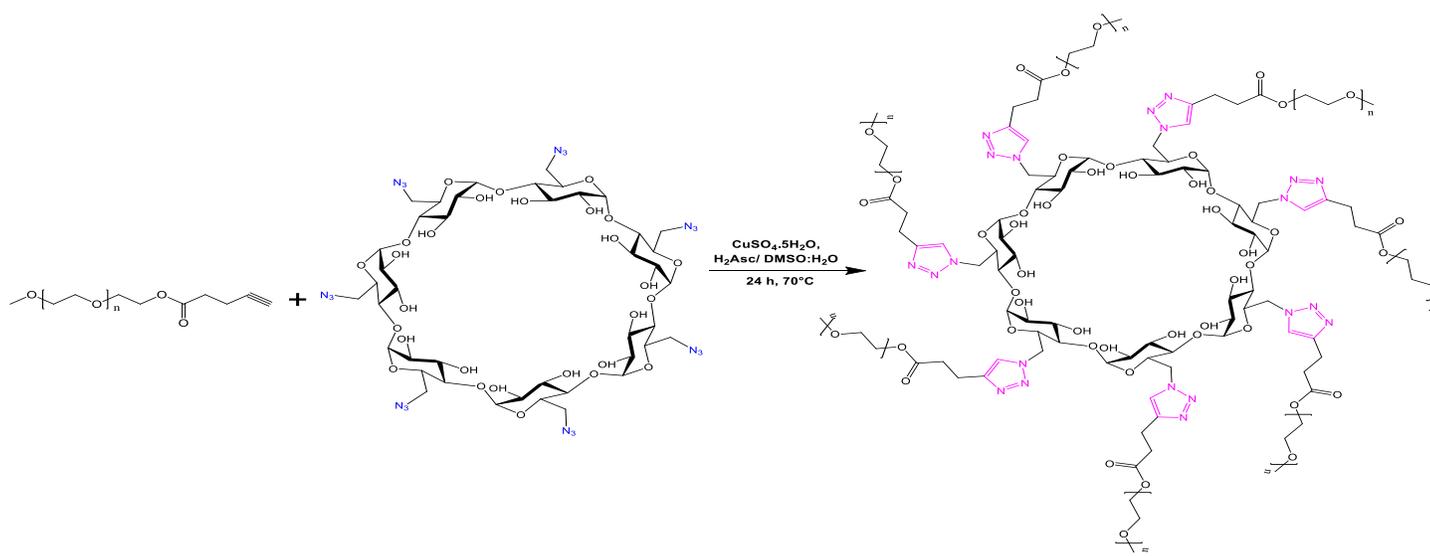
Siguiendo el procedimiento en la sección 4.1.3, se utilizó 1g (0.5 mmol) de PEG₂₀₀₀.

4.1.6 Síntesis de Alquinil-PEG₅₀₀₀

Siguiendo el procedimiento en la sección 4.1.3, se utilizó 1g (0.2 mmol) de PEG₅₀₀₀.

4.1.7 Formación de β-CD-PEG

La conjugación de las cadenas de PEG con la cara primaria de la β-CD se llevó a cabo por *Química Click* de acuerdo con el Esquema 5. En un matraz de fondo redondo de una boca, en condiciones anhidras y atmósfera de nitrógeno se disolvieron 0.24 mmol de Alquinil-PEG y 0.03 mmol de β-CDN₃ en 5 mL de DMSO, a continuación, se adicionó un 10% de CuSO₄·5H₂O y 30% de H₂Asc en 2 mL, manteniendo la agitación durante 24 horas a 70°C. Transcurrido el tiempo de reacción se concentró la mezcla a sequedad a presión reducida y el residuo se trató con dietileter frío.



Esquema 5. Obtención del conjugado β-CD-PEG a través de Química Click

4.1.8 Síntesis del conjugado β -CD-PEG₅₅₀

Siguiendo el procedimiento en la sección 4.1.7, se utilizaron 1.84 mL de Alquinil-PEG₅₅₀, transcurrido el tiempo de reacción, se concentró la mezcla a sequedad a presión reducida y el residuo se extrajo por triplicado con CH₂Cl₂/H₂O, se separó la fase orgánica y se concentró a presión reducida.

4.1.9 Síntesis del conjugado β -CD-PEG₂₀₀₀

Siguiendo el procedimiento en la sección 4.1.7, se utilizó 0.792 g de Alquinil-PEG₂₀₀₀.

4.1.10 Síntesis del conjugado β -CD-PEG₅₀₀₀

Siguiendo el procedimiento en la sección 4.1.7, se utilizó 1.060 g de Alquinil-PEG₅₀₀₀.

4.2 Preparación de CI

La preparación de los CI β -CD/FF, β -CD-PEG/FF, β -CD/Ada y β -CD-PEG/Ad se realizaron por el método de Co-evaporación o evaporación del disolvente.

4.2.1 Método general para la preparación de CI β -CD/FF y β -CD-PEG/FF

En un matraz Erlenmeyer, se disolvieron 0.00314 mmol del conjugado β -CD-PEG en 10 mL de agua destilada en agitación a temperatura ambiente. A continuación, se agregó una solución de 0.00314 mmol de FF a pH>9, manteniendo la agitación durante 48 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se concentró la mezcla a presión reducida y se dejó secar el producto al vacío.

4.2.2 Preparación de CI β -CD/FF (1:1)

Siguiendo el procedimiento en la sección 4.2.1, se utilizaron 0.250 g (0.220 mmol) de β -CD y 0.070 g de FF (0.220 mmol), obteniéndose 0.320 g de un semisólido café.

4.2.3 Preparación de CI β -CD-PEG₅₅₀/FF (1:1)

Siguiendo el procedimiento en la sección 4.2.1, se utilizaron 0.090 g (0.016 mmol) de β -CD-PEG₅₅₀ y 0.005 g de FF (0.016 mmol), obteniéndose 0.093 g de un sólido blanco.

4.2.4 Preparación de CI β -CD-PEG₂₀₀₀/FF (1:1)

Siguiendo el procedimiento en la sección 4.2.1, se utilizaron 0.050 g (0.003 mmol) de β -CD-PEG₅₅₀ y 0.001 g de FF (0.003 mmol), obteniéndose 0.050 g de un sólido color café.

4.2.5 Preparación de CI β -CD-PEG₅₀₀₀/FF (1:1)

Siguiendo el procedimiento en la sección 4.2.1, se utilizaron 0.116 g (0.003 mmol) de β -CD-PEG₅₅₀ y 0.001 g de FF (0.003 mmol), obteniéndose 0.050 g de un sólido color gris.

4.2.6 Método general para la preparación de CI β -CD/Ad y β -CD-PEG/Ad

En un matraz Erlenmeyer, se disolvieron 0.016 mmol del conjugado β -CD-PEG en 5 mL de DMSO en agitación a temperatura ambiente. A continuación, se agregó una solución de 0.016 mmol de Ad en metanol, manteniendo la agitación durante 48 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se concentró la mezcla a presión reducida y se dejó secar el producto al vacío.

4.2.7 Preparación de CI β -CD/Ad (1:1)

Siguiendo el procedimiento en la sección 4.2.6, se utilizaron 0.250 g (0.220 mmol) de β -CD y 0.040 g de Ad (0.220 mmol), obteniéndose 0.290 g de un semisólido café.

4.2.8 Preparación de CI β -CD-PEG₅₅₀/Ad (0.5:1)

Siguiendo el procedimiento en la sección 4.2.6, se utilizaron 0.314 g (0.056 mmol) de β -CD-PEG₅₅₀ y 0.005 g de Ad (0.028 mmol), obteniéndose 0.319 g de un semisólido café.

4.2.9 Preparación de CI β -CD-PEG₅₅₀/Ad (1:1)

Siguiendo el procedimiento en la sección 4.2.6, se utilizaron 0.157 g (0.028 mmol) de β -CD-PEG₅₅₀ y 0.005 g de Ad (0.028 mmol), obteniéndose 0.160 g de un semisólido café.

4.2.10 Preparación de CI β -CD-PEG₅₅₀/Ad (2:1)

Siguiendo el procedimiento en la sección 4.2.6, se utilizaron 0.079 g (0.014 mmol) de β -CD-PEG₅₅₀ y 0.005 g de Ad (0.028 mmol), obteniéndose 0.160 g de un semisólido café.

4.2.11 Preparación de CI β -CD-PEG₂₀₀₀/Ad (0.5:1)

Siguiendo el procedimiento en la sección 4.2.6, se utilizaron 0.180 g (0.034 mmol) de β -CD-PEG₅₅₀ y 0.001 g de Ad (0.017 mmol), obteniéndose 0.180 g de un sólido café claro.

4.2.12 Preparación de CI β -CD-PEG₂₀₀₀/Ad (1:1)

Siguiendo el procedimiento en la sección 4.2.6, se utilizaron 0.90 g (0.017 mmol) de β -CD-PEG₅₅₀ y 0.001 g de Ad (0.017 mmol), obteniéndose 0.90 g de un sólido café claro.

4.2.13 Preparación de CI β -CD-PEG₂₀₀₀/Ad (2:1)

Siguiendo el procedimiento en la sección 4.2.6, se utilizaron 0.45 g (0.009 mmol) de β -CD-PEG₅₅₀ y 0.001 g de Ad (0.017 mmol), obteniéndose 0.45 g de un sólido café claro.

4.2.14 Preparación de CI β -CD-PEG₅₀₀₀/Ad (0.5:1)

Siguiendo el procedimiento en la sección 4.2.6, se utilizaron 0.416 g (0.034 mmol) de β -CD-PEG₅₅₀ y 0.001 g de Ad (0.017 mmol), obteniéndose 0.416 g de un sólido gris.

4.2.15 Preparación de CI β -CD-PEG₅₀₀₀/Ad (1:1)

Siguiendo el procedimiento en la sección 4.2.6, se utilizaron 0.208 g (0.017 mmol) de β -CD-PEG₅₅₀ y 0.001 g de Ad (0.017 mmol), obteniéndose 0.416 g de un sólido gris.

4.2.15 Preparación de CI β -CD-PEG₅₀₀₀/Ad (2:1)

Siguiendo el procedimiento en la sección 4.2.6, se utilizaron 0.104 g (0.009 mmol) de β -CD-PEG₅₅₀ y 0.001 g de Ad (0.017 mmol), obteniéndose 0.104 g de un sólido gris.

Resultados y discusión

5. Resultados y discusión

5.1 Síntesis de β -CDI

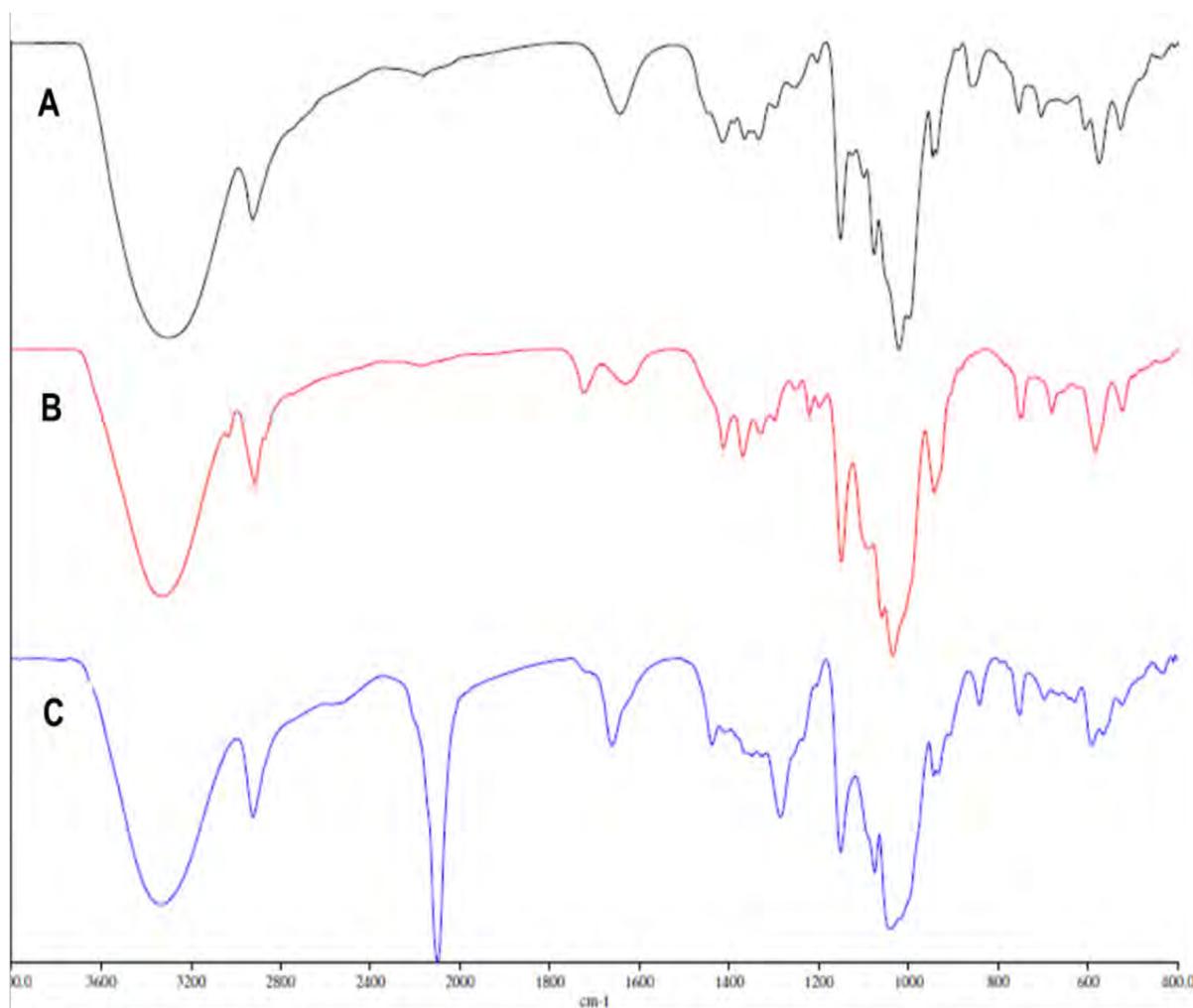
Para la modificación de la β -CD se realizó una sustitución de los hidroxilos primarios por átomos de yodo, por medio de una reacción de Vilsmeier-Haack modificada; en la cual, el mecanismo consiste en hacer reaccionar primeramente los hidroxilos de la cara primaria con un complejo de Ph_3P , el cual cumple con dos funciones, activar a los hidroxilos para que sean sustituidos en un ataque nucleofílico y por otra parte formar una especie activada de yodo que realice la modificación sobre los hidroxilos ya mencionados. Posteriormente, la mezcla de reacción se trata con una base, paso necesario para la destrucción de las sales de fosfonio. La base que se utiliza de acuerdo a lo reportado en la literatura es NaOMe/MeOH 3M (Ashton, Königer, Stoddart, Alker, & Harding, 1996). Es importante que la base tenga la concentración mencionada, ya que si se modifica habrá que modificar también el volumen que se adiciona de ella, pues es preciso que el número de moles de NaOMe reaccionen con el número de moles de las sales de fosfonio. Lo anterior se comprobó cuando se utilizó el mismo volumen de base, pero a diferentes concentraciones, que se traduce en rendimientos bajos (<20%) de reacción. Se obtuvo un rendimiento de 52% (0.47 mmol, 900 mg) de un sólido color beige.

5.2 Síntesis de β -CDN₃

Una vez obtenida la β -CDI, se procedió a realizar una reacción $\text{S}_\text{N}2$ para sustituir el átomo de yodo por un grupo azido. El producto obtenido tiene un trabajo de reacción sencillo ya que consistió en la evaporación a presión reducida y después la precipitación del producto en medio acuoso. El mecanismo por el que sucede esta reacción es por la sustitución del átomo de yodo, un buen grupo saliente que permite la modificación de la β -CD, por un grupo azido, para formar el intermediario de la *Química Click*. El rendimiento de esta reacción fue de 94% (0.44 mmol, 572 mg) de un sólido color café.

5.2.1 Caracterización de β -CD, β -CDI y β -CDN₃

Los espectros de IR y ^1H RMN de β -CD, β -CDI y β -CDN₃ se muestran en las Figuras 9 y 10 respectivamente.



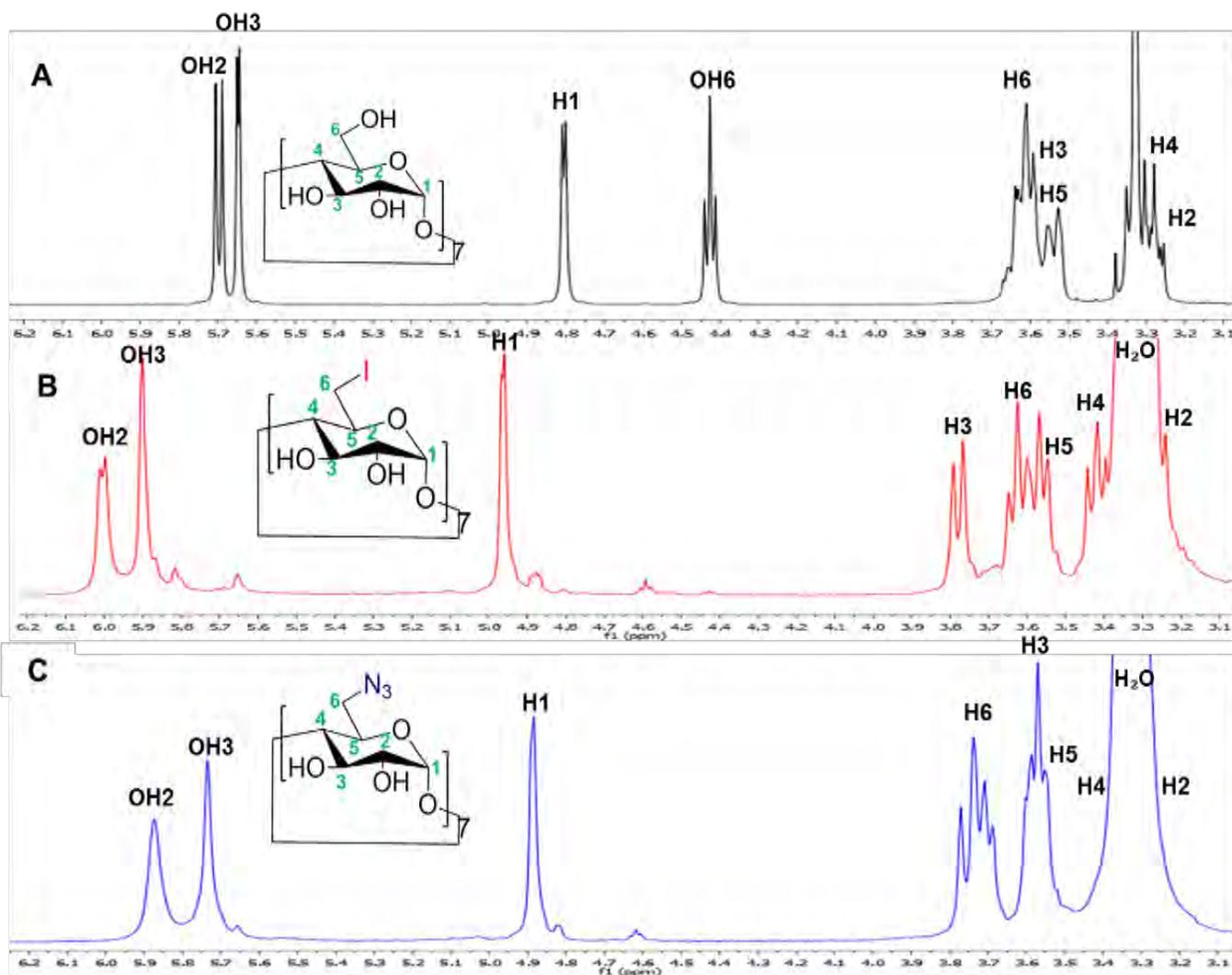
IR (ATR, cm^{-1}):

β -CD: 3306 (OH), 1644 (C-O-H), 1415, 1334, 1152, 1021 (C-H)

β -CDI: 3327 (OH), 1627 (C-O-H), 1412, 1331, 1149, 1035 (C-H)

β -CDN₃: 3331 (OH), 2099 (N₃), 1650 (C-O-H), 1438, 1285, 1152, 1041 (C-H)

Figura 9. Espectros de IR de β -CD (A), β -CDI (B) y β -CDN₃ (C)



RMN ^1H (400 MHz DMSO- d_6) δ (ppm):
 β -CD: 3.32 (m, 7H) H2, 3.36 (m, 7H) H4, 3.58 (m, 7H) H5, 3.63 (m, 7H) H3, 3.71 (m, 14 H) H6, 4.50 (t, $J=5.72$ Hz, 7H) OH6, 4.85 (d, $J=2.93$ Hz, 7H) H1, 5.71 (d, $J=1.91$ Hz, 7H) OH3, 5.77 (d, $J=6.74$ Hz, 7H) OH2.
 β -CDI: 3.26 (m, 7H) H2, 3.30 (m, 7H) H4, 3.42 (m, 7H) H5, 3.60 (m, 14 H) H6, 3.78 (m, 7H) H3, 4.96 (d, $J=2.74$ Hz, 7H) H1, 5.90 (m, 7H) OH3, 6.05 (d, $J=5.48$ Hz, 7H) OH2.
 β -CDN $_3$: 3.30 (m, 7H) H2, 3.30 (m, 7H) H4, 3.55 (m, 7H) H5, 3.59 (m, 7H) H3, 3.73 (m, 14 H) H6, 4.88 (d, 7H) H1, 5.74 (m, 7H) OH3, 5.87 (m, 7H) OH2.

Figura 10. Espectros de ^1H de β -CD (A), β -CDI (B) y β -CDN $_3$ (C)

En la Figura 9A se observa la señal a 3306 cm^{-1} correspondiente a los hidroxilos de la cara primaria y secundaria, en la Figura 9B se observa que esta misma señal, a 3327 cm^{-1} disminuye su intensidad debido a que los hidroxilos de la cara primaria son sustituidos por átomos yodo; en la Figura 9C se observa que la señal en 3331 cm^{-1} sigue disminuida en intensidad y aparece una señal a 2099 cm^{-1} que corresponde al grupo azido. En la Figura 10A, la cual corresponde al espectro de ^1H RMN de la β -CD, se observan las señales correspondientes a los átomos de hidrógeno de la molécula de glucopiranos y de los

hidroxilos. Debido a su estructura tridimensional que adopta, los átomos de hidrogeno de los hidroxilos que se encuentran unidos a los átomos de carbono 2 y 3 (OH2 y OH3) quedan en la cara secundaria y se encuentran interactuando es por eso que tienen un mayor desplazamiento. Los átomos de hidrogeno del hidroxilo que se encuentra unido al átomo de carbono 6 (OH6) quedan en la cara primaria mientras que los átomos de hidrogeno del carbono 1 (H1) se encuentran a campo bajo debido a que están interactuando con 3 átomos de oxígeno. Los átomos de hidrogeno que se encuentran unidos a los carbonos 3 y 5 (H3 y H5) quedan en el interior de la estructura tridimensional y son los responsables de interactuar con las moléculas huésped en la formación de CI. En la Figura 10B, se observa que la señal que corresponde a OH6 desaparece debido a la sustitución de estos por átomos de yodo, también se observa que los átomos de hidrogeno que están unidos al carbono 6 (H6) se desplazan a campo bajo, este fenómeno se debe a que el átomo de yodo ejerce sobre ellos un efecto resonante protegiendo así a los protones vecinos. En la Figura 10C se observa que la señal que corresponde a los H6 se desplaza a campo alto debido a que el grupo azido dona densidad electrónica a los protones vecinos quedando desprotegidos, en comparación con las señales de los átomos de la Figura 10A, los protones de la Figura 10C se encuentran desplazados a campo alto por el grupo azido.

5.3 Síntesis de Alquinil-PEG (550, 2000 y 5000 Da)

Antes de proceder a la conjugación de la β -CD por *Química Click*, se preparó la fuente de alquino a partir de PEG monofuncional para funcionalizarlo solo de un extremo de la cadena. Para ello, PEG se hizo reaccionar con ácido 4-pentinoico. La formación del alquino se llevó a cabo por una reacción conocida como esterificación de Steglich, la cual consiste en activar un ácido carboxílico con DCC, utilizando condiciones catalíticas de DMAP para la formación de dicitclohexilurea (DCU). En la reacción de Alquinil-PEG, la formación de DCU se observa al inicio de la reacción y es un indicio de que se está llevando a cabo. La reacción es muy cuantitativa ya que se obtienen rendimientos de 99.43% (1.176 g, 1.807 mmol), 70% (0.734 g, 0.350 mmol,) y 94% (0.960 g, 0.188 mmol,) para PEG 550, 2000 y 5000, respectivamente. La apariencia de los productos depende del tipo de PEG conjugado, siendo un semisólido incoloro para Alquinil-PEG₅₅₀, un sólido blanco fino para Alquinil-PEG₂₀₀₀ y un sólido blanco para Alquinil-PEG₅₀₀₀.

5.3.1 Caracterización de PEG y cálculo del peso molecular

Antes de las esterificaciones se caracterizaron los PEG por RMN ^1H para determinar el peso molecular promedio. Los espectros muestran las señales correspondientes a los protones del grupo etilenglicol y del grupo metilo del polímero. Se muestran en la Figura 12, 13 y 14 los espectros del PEG₅₅₀, PEG₂₀₀₀ y PEG₅₀₀₀, respectivamente.

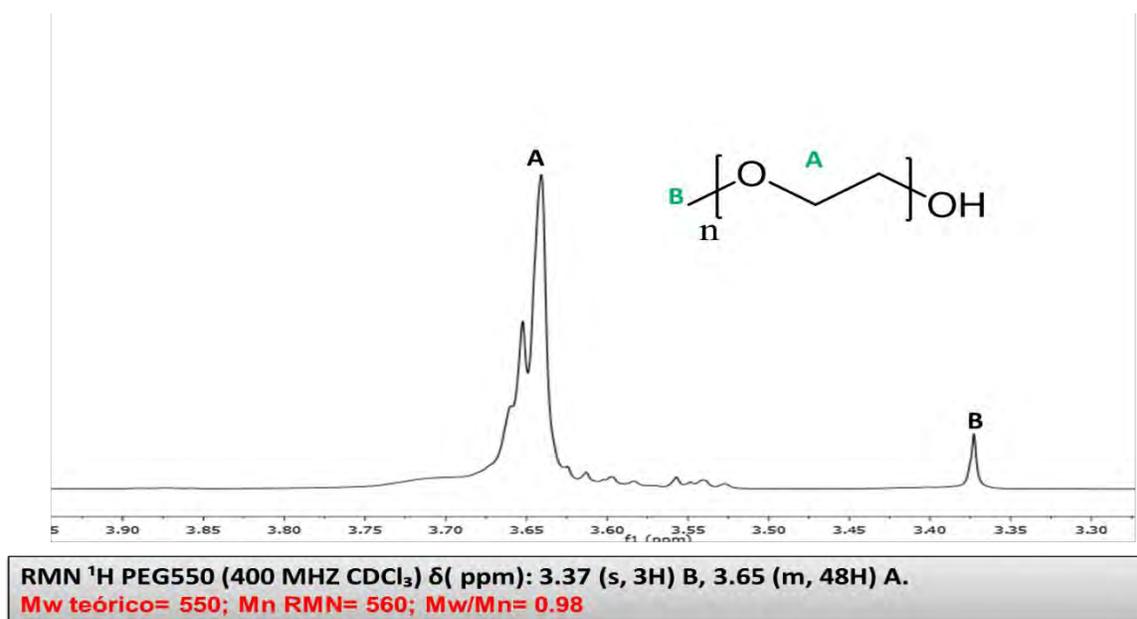


Figura 11. Espectro de RMN ^1H de PEG₅₅₀

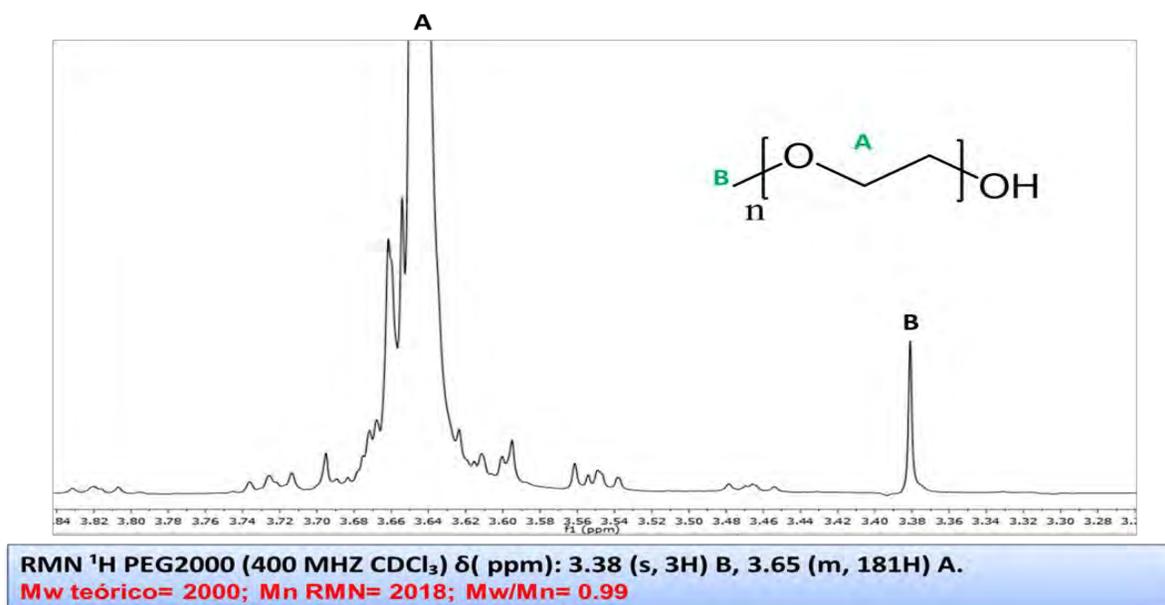


Figura 12. Espectro de RMN ^1H de PEG₂₀₀₀

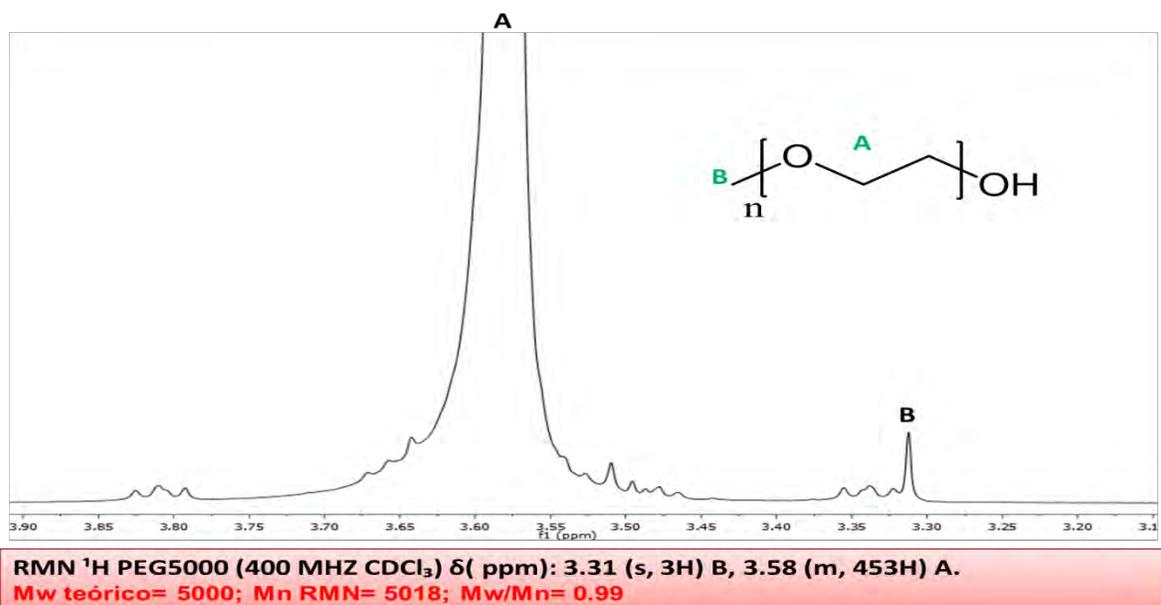


Figura 13. Espectro de RMN ¹H de PEG₅₀₀₀

Se calculó el peso promedio del polímero utilizando la técnica de RMN ¹H, ya que el área bajo los picos del espectro de resonancia es proporcional a la concentración molar de la molécula que se analiza. Para el cálculo del peso molecular de un polímero lineal, se debe comenzar por determinar el valor de n , que describe el número de repeticiones que componen a la molécula. De manera general para un polímero compuesto por X cantidad de protones en las unidades repetidas y considerando Y cantidad de protones en los extremos se deben tomar los siguientes parámetros y realizar el cociente (Figura 11), el cual da información exacta del número de repeticiones que componen a un polímero lineal (Izunobi & Higginbotham, 2011).

$$n_x = \frac{a_x m_y n_y}{a_y m_x}$$

Figura 14. Ecuación general para determinar el peso molecular de un polímero

a_x = integral en ¹H NMR de x

m_y = número de protones de y

n_y = número de unidades repetidas de y

a_y = integral en ¹H NMR de y

m_x = número de protones de x

- PEG₅₅₀

$$(-CH_3) = 15 \frac{g}{mol}, (-OH) = 17 \frac{g}{mol}, (CH_2CH_2O) = 44 \frac{g}{mol}$$

$$\frac{48.04H}{4H} = 12.01H \times 44 = 528.44 + 32 = 560.44 \frac{g}{mol}$$

- PEG₂₀₀₀

$$(-CH_3) = 15 \frac{g}{mol}, (-OH) = 17 \frac{g}{mol}, (CH_2CH_2O) = 44 \frac{g}{mol}$$

$$\frac{180.51H}{4H} = 45.13H \times 44 = 1985.72 + 32 = 2017.7 \frac{g}{mol}$$

- PEG₅₀₀₀

$$(-CH_3) = 15 \frac{g}{mol}, (-OH) = 17 \frac{g}{mol}, (CH_2CH_2O) = 44 \frac{g}{mol}$$

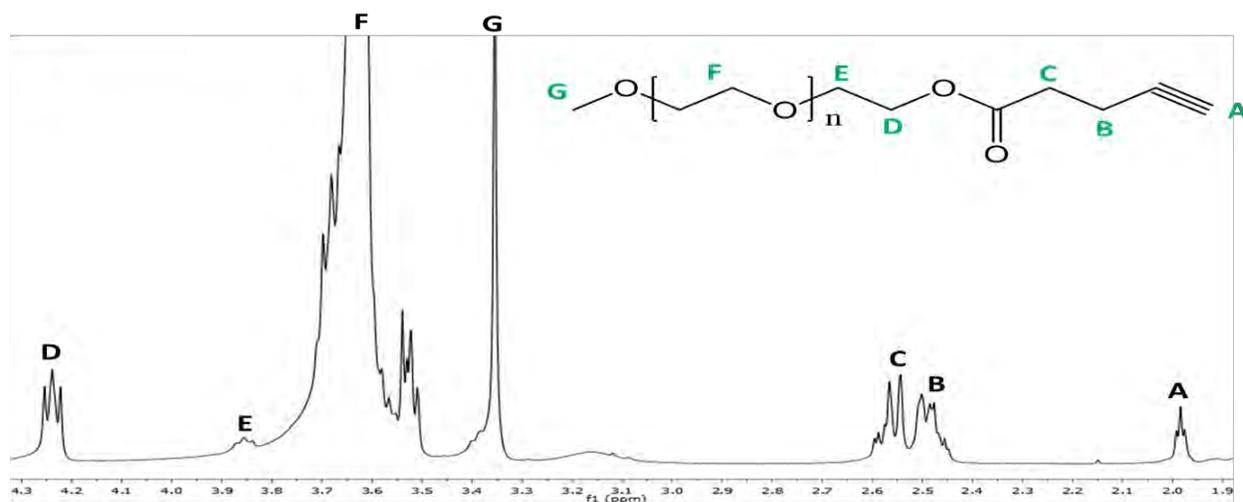
$$\frac{453.25H}{4H} = 113.31H \times 44 = 4985.64 + 32 = 5017.6 \frac{g}{mol}$$

En todos los casos se obtuvieron resultados muy cercanos al peso teórico (~550, ~2000 y ~5000). Se considera peso teórico el reportado en la etiqueta del producto (Sigma-Aldrich). El que no se obtenga exactamente el mismo valor esperado es por la polidispersión del polímero. En este sentido, cabe recordar que el peso de los polímeros es una distribución gaussiana de pesos moleculares de moléculas de varios pesos moleculares que comprenden una determinada muestra de polímero. Así la polidispersión es la variación de pesos de un polímero en función de su distribución.

5.3.2 Caracterización de Alquini-PEG y cálculo del peso molecular

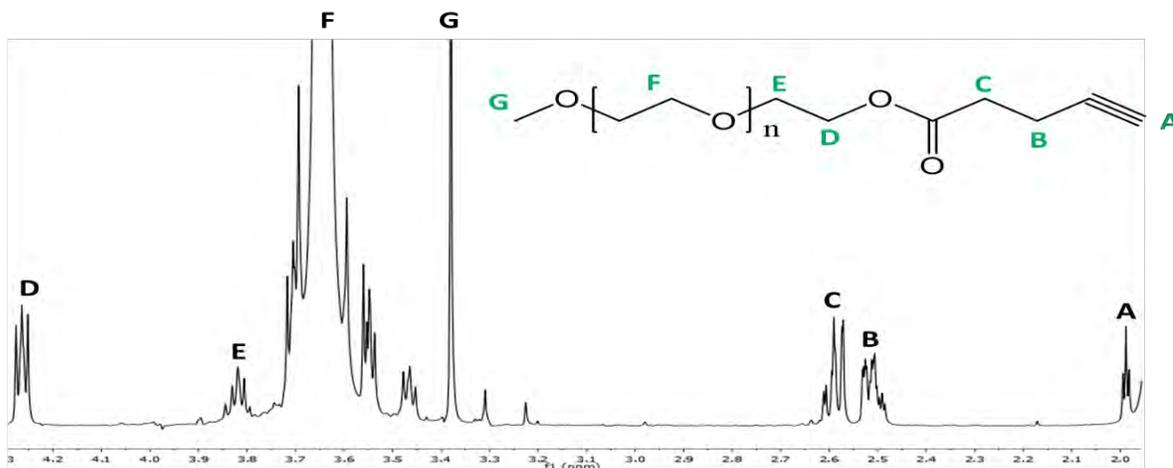
Una vez que se realizó la esterificación para la formación del Alquini-PEG (550, 2000 y 5000 Da), se caracterizaron los productos por RMN ¹H. La Figura 13 muestra el espectro de RMN ¹H de Alquini-PEG 550. Aquí se observan las señales de la esterificación del PEG con el ácido 4-pentinoico, una señal triple que corresponde al átomo de hidrogeno del grupo alquino terminal, dos señales múltiples que corresponden a los átomos de hidrogeno de los etilenos vecinos al carbonilo, dos señales triples a campo bajo correspondientes a los protones de los etilenos vecinos al éster, además de las correspondientes señales del PEG. Los espectros

del Alquinil-PEG₅₅₀, Alquinil-PEG₂₀₀₀ y Alquinil-PEG₅₀₀₀, se muestran en las Figuras 15, 16 y 17. También se calculó el peso molecular de los polímeros con la técnica y el fundamento mencionado anteriormente. Se obtuvieron resultados muy cercanos al teórico, en este caso el peso molecular teórico es el que se calculó por RMN ¹H del PEG mas el residuo que se le agrega en la esterificación, sin embargo, cabe recordar que, en este caso, el resultado también se ve influenciado por la polidispersión que se arrastra del PEG. A partir de estos resultados concluimos que se obtiene un porcentaje de funcionalización cercano a 1, esto indica que la mayoría de las cadenas de PEG se esterificaron.



RMN ¹H Alquinil-PEG550 (400 MHz CDCl₃) δ (ppm): 1.98 (t, J= 2.34 HZ, 1H) A, 2.49 (m, 2H) B, 2.55 (m, 2H) C, 3.35 (s, 3H) G, 3.64 (m, 48H) F, 3.86 (t, J= 5.13 Hz, 2H) E, 4.24 (t, J= 4.69 Hz) D.
Mw teórico= 660; Mn RMN= 681; Mw/Mn= 0.97

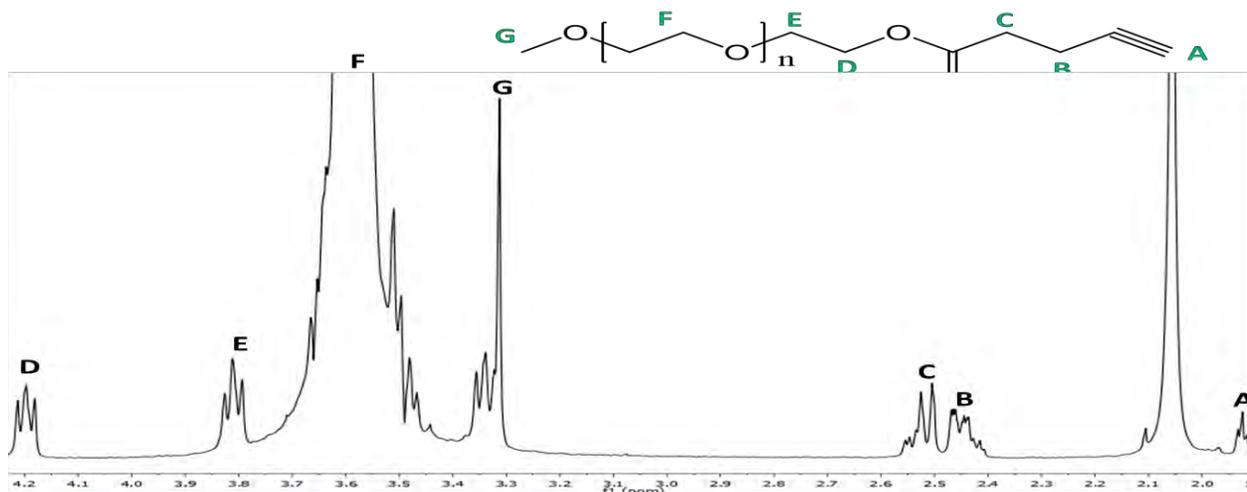
Figura 15. Espectro de RMN ¹H de Alquinil-PEG₅₅₀



RMN ^1H Alquinil-PEG2000 (400 MHz CDCl_3) δ (ppm): 1.99 (t, $J = 2.74$ Hz, 1H) A, 2.51 (m, 2H) B, 2.59 (m, 2H) C, 3.38 (s, 3H) G, 3.64 (m, 178H) F, 3.82 (t, $J = 4.70$ Hz, 2H) E, 4.26 (t, $J = 4.70$ Hz) D.

Mw teórico= 2118; Mn RMN= 2108; Mw/Mn= 1.00

Figura 16. Espectro de RMN ^1H de PEG₂₀₀₀



RMN ^1H Alquinil-PEG5000 (400 MHz CDCl_3) δ (ppm): 1.92 (t, $J = 2.49$ Hz, 1H) A, 2.45 (m, 2H) B, 2.52 (m, 2H) C, 3.31 (s, 3H) G, 3.58 (m, 449H) F, 3.81 (t, $J = 4.25$ Hz, 2H) E, 4.20 (t, $J = 4.69$ Hz) D.

Mw teórico= 5118; Mn RMN= 5138; Mw/Mn= 0.99

Figura 17. Espectro de RMN ^1H de PEG₅₀₀₀

- Alquinil-PEG₅₅₀

$$(-\text{CH}_3\text{O}) = 31 \frac{\text{g}}{\text{mol}}, (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}) = 44 \frac{\text{g}}{\text{mol}}, (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{CCH}) = 125 \text{ g/mol}$$

$$\frac{47.74\text{H}}{4\text{H}} = 11.93\text{H} \times 44 = 525.14 + 156 = 681.14 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

$$\% \text{ funcionalizacion} = 48.04 - 47.74 = \frac{0.3}{4} = 0.075; 100 - 0.075 = 99.925$$

- Alquini-PEG₂₀₀₀

$$(-CH_3O) = 31 \frac{g}{mol}, (CH_2CH_2O) = 44 \frac{g}{mol}, (CH_2CH_2OCOCH_2CH_2CCH) = 125 g/mol$$

$$\frac{177.46H}{4H} = 44.37H \times 44 = 1952 + 156 = 2108 \frac{g}{mol}$$

$$\% \text{ funcionalizacion} = 180.51 - 177.46 = \frac{3.05}{4} = 0.7625; 100 - 0.7625 = 99.2375$$

- Alquini-PEG₅₀₀₀

$$(-CH_3O) = 31 \frac{g}{mol}, (CH_2CH_2O) = 44 \frac{g}{mol}, (CH_2CH_2OCOCH_2CH_2CCH) = 125 g/mol$$

$$\frac{452.92H}{4H} = 113.23H \times 44 = 4982.12 + 156 = 5138.12 \frac{g}{mol}$$

$$\% \text{ funcionalizacion} = 453.25 - 452.92 = \frac{0.33}{4} = 0.0825; 100 - 0.0825 = 99.9175$$

5.4 Formación de los conjugados β -CD-PEG

La reacción click prototipo consiste en la formación de un 1,2,3-triazol 1,4-disustituido a partir de una fuente de azido y una fuente de alquino. Esta cicloadición se da a través de un ciclo catalítico en donde el ácido ascórbico reduce el Cu (II) a Cu (I); el ciclo comienza con la inserción del Cu en el alquino terminal, posteriormente un átomo de nitrógeno del grupo azido se coordina con el Cu formando un complejo de acetiluro de cobre-azida, dejando la triple ligadura disponible para un ataque nucleofílico intramolecular, esto da como resultado un metalociclo de 6 miembros el cual sufre una contracción anular favorecida energéticamente al formar un anillo de cinco miembros, el cual sufre una reacción ácido base para generar el 1,2,3-triazol 1,4-disustituido. Así mismo, la reacción se da en condiciones suaves, en medio acuoso y a temperaturas menores a 70°C. Por todo esto, se otorgó el premio nobel a K. Barry Sharpless en el año 2001 (Nobelprize). Sin embargo, no siempre se puede utilizar un medio acuoso, pues dependerá de la solubilidad de los reactivos, en nuestro caso, la reacción se llevó a cabo en una mezcla de DMSO:H₂O debido a la baja solubilidad acuosa de la per-6-azido- β -CD.

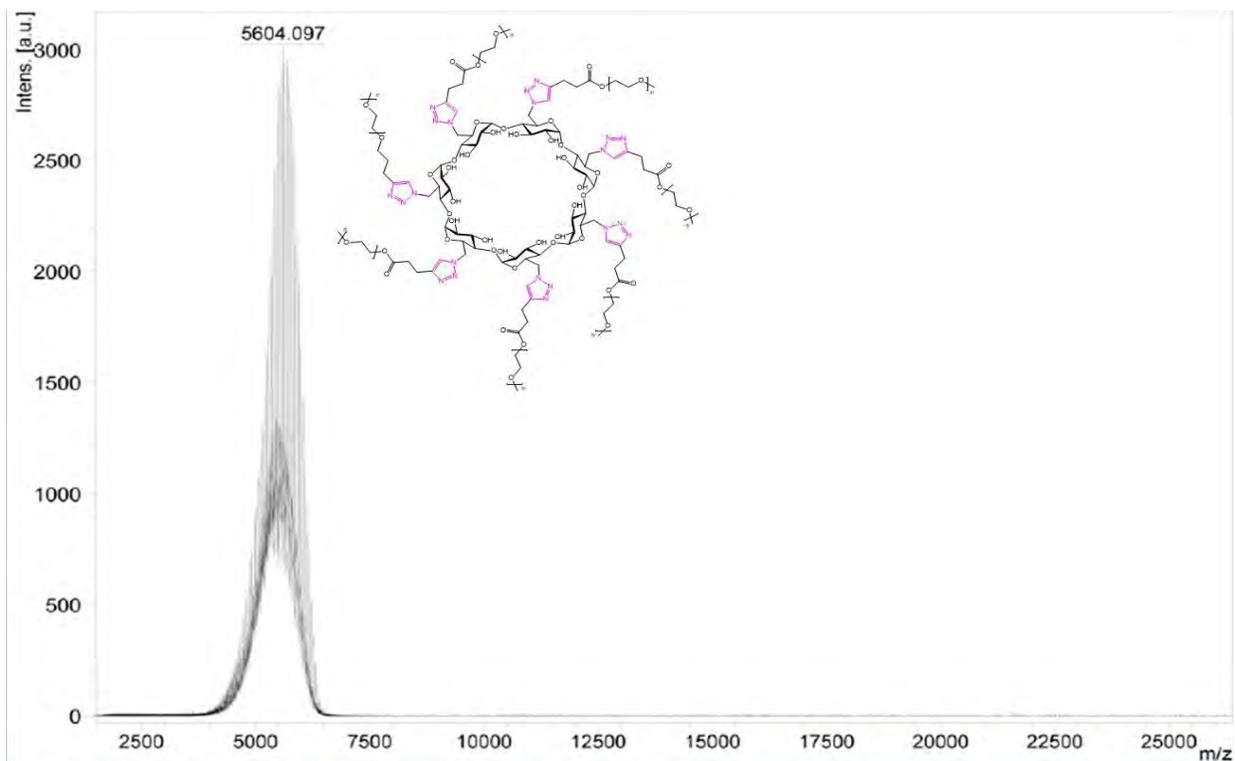
La Química Click es una reacción muy robusta que se da entre cualquier tipo de molécula mientras contenga grupos funcionales azida y alquino. En nuestro caso la β -CD fue la fuente de azida y el PEG fue la fuente de alquino. Una particularidad del sistema obtenido es que dados los 7 grupos azida, se tiene que realizar 7 reacciones "clicks" para lograr la

conjugación de todas las posiciones, esto se puede lograr a través del control de la estequiometría de la reacción, la temperatura y el volumen del disolvente pues de esto depende la conjugación de todos los grupos de la β -CD.

La reacción click se está convirtiendo hoy en día en una de las estrategias de conjugación más utilizadas, debido a la facilidad, bajo costo, y poca generación de residuos, etc; en el área de química medicinal y liberación de fármacos no es la excepción. Además, el triazol tiene ciertas características favorables como las mencionadas anteriormente y una excreción rápida.

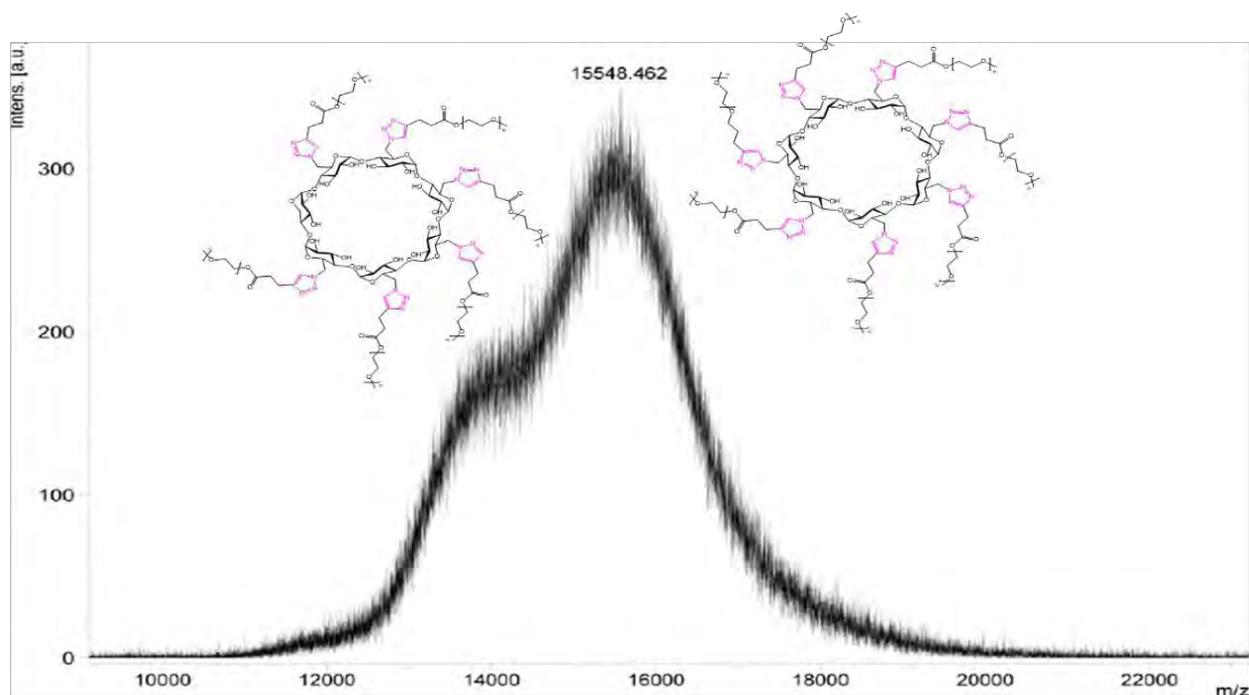
En este trabajo se logró la conjugación de manera selectiva de la cara primaria de la β -CD con tres distintos tamaños de PEG. Los productos se caracterizaron por espectrometría de masas por el método de MALDI-TOF, (desorción/ionización mediante láser asistida por una matriz) acoplada a un analizador TOF (tiempo de vuelo), es una técnica de ionización suave que permite el análisis de biomoléculas (biopolímeros, proteínas, péptidos y azúcares) y moléculas con alto peso molecular (como polímeros, dendrímeros y otras macromoléculas). En esta técnica la muestra se mezcla con la matriz en exceso sobre una superficie de metal de tal forma que ambas cocrystalizan cuando se evapora el disolvente. Esta preparación es sometida a pulsos cortos de láser en alto vacío lo que provoca que la absorción de energía por parte de la matriz sea convertida en energía de excitación y en transferencia de H^+ a la muestra (ionización) dando lugar, normalmente, a especies monocargadas que son analizadas mediante TOF. Este analizador permite la determinación de la masa en una región de alto vacío mediante una medida muy precisa del período de tiempo desde la aceleración de los iones en la fuente hasta que impactan con el detector (Servicios Técnicos de Investigación, Universidad de Alicante). El producto β -CD-PEG₅₅₀ se obtuvo como un semisólido color café (2.5 g), la Figura 18 muestra el espectro que indica que la reacción se dio con gran eficiencia ya que se funcionalizaron las siete posiciones de la β -CD y se obtiene un solo producto. El producto β -CD-PEG₂₀₀₀ se obtuvo como un sólido color café claro (0.820 g), su espectro muestra (Figura 19) que se obtienen dos productos, el producto mayoritario es el que contiene las siete posiciones funcionalizadas y un producto minoritario que contiene seis posiciones funcionalizadas, aun así, se considera que la reacción se dio con gran eficiencia. Finalmente, el producto β -CD-PEG₅₀₀₀ es un sólido gris (0.878 g), su espectro muestra (Figura 20) que se obtiene un solo producto el cual tiene las siete posiciones

funcionalizadas. Con esto confirmamos que la conjugación de PEG a β -CD por medio de *Química Click* es una estrategia adecuada que permite funcionalizar selectivamente las siete posiciones de la β -CD. Del mismo modo, esperamos que esta modificación selectiva deje la cavidad disponible para la formación de CI.



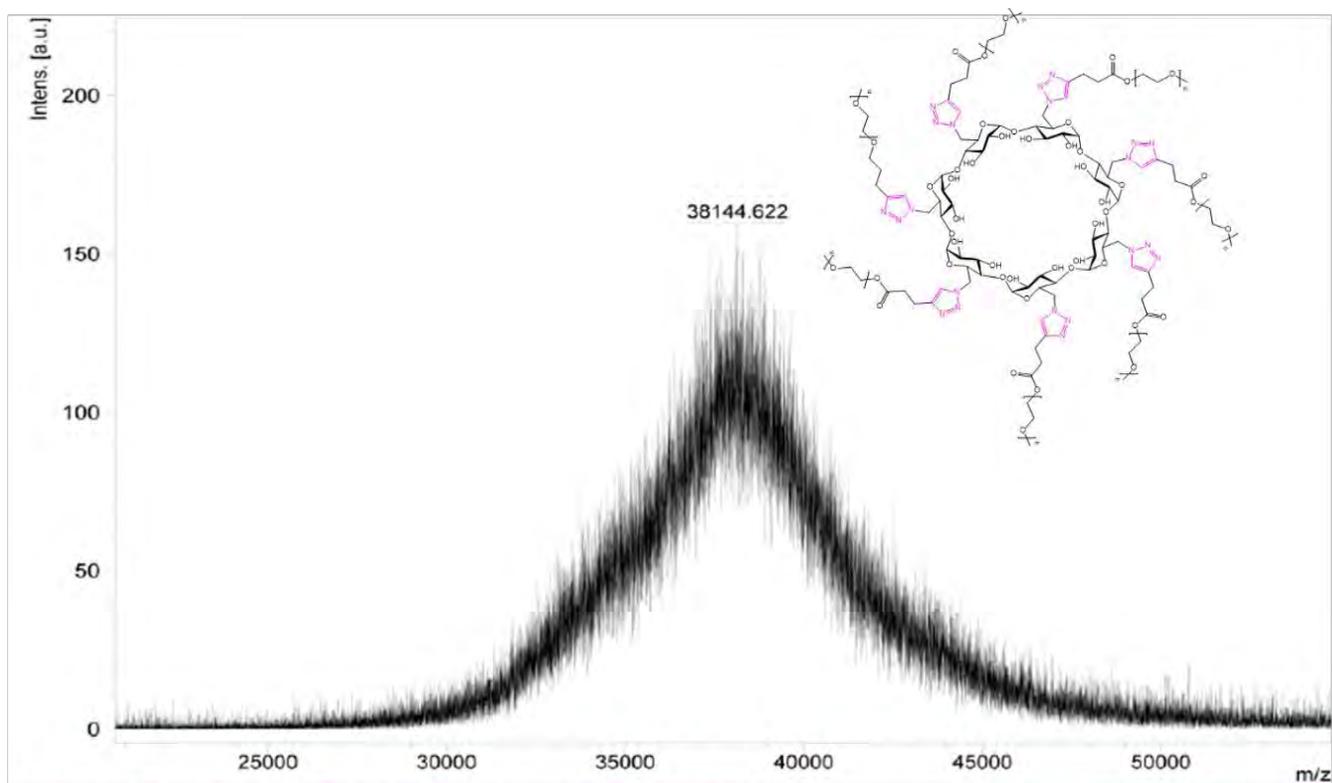
MALDI-TOFMS (m/z) β -CD-PEG₅₅₀: 5604 [M+H]⁺

Figura 18. Espectro de MALDI-TOF del conjugado β -CD-PEG₅₅₀



MALDI-TOFMS (m/z) β -CD-PEG₂₀₀₀: 38144 [M+H]⁺,

Figura 19. Espectro de MALDI-TOF del conjugado β -CD-PEG₂₀₀₀



MALDI-TOFMS (m/z) β -CD-PEG₅₀₀₀: 38145 [M+H]⁺,

Figura 20. Espectro de MALDI-TOF del conjugado β -CD-PEG₅₀₀₀

5.5 Formación de CI y caracterización

La β -CDs “pegiladas” constituyen un bloque de construcción importante en nanoplataformas de liberación de fármacos. Sistemas cada vez más complejos aparecen en la literatura, pero para lograr la sofisticación y el éxito de estos sistemas es necesario hacer estudios sistemáticos. Muy pocos nanosistemas han entrado con éxito a los ensayos clínicos debido a que no se realizan estudios sistemáticos de cada uno de sus componentes, por lo tanto, este factor es importante para hacer frente a los retos en el desarrollo de nanosistemas para uso clínico (Wicki, Witzigmann, Balasubramanian, & Huwyler, 2014). Bajo este contexto, fue de gran interés determinar la influencia de las cadenas de PEG en la formación de complejos de inclusión, de manera que se puedan aplicar para sistemas supramoleculares de liberación de fármacos. Para estudiar el fenómeno de complejación se utilizaron FF y Ad como moléculas modelo.

Los complejos de inclusión β -CD/FF (1:1) y β -CD-PEG/FF (1:1) se autoensamblaron en una mezcla de disolventes (EtOH:H₂O). La FF es un indicador ácido/base típico, que se utiliza como un indicador de pH el cual cambia de incoloro a rosa cuando una solución de carácter neutro cambia a carácter básico. La FF forma un complejo de inclusión estable con la β -CD en una relación molar 1:1; cuando se da la formación del complejo β -CD/FF la solución rosa de FF cambia a incolora, esto es debido a la estructura de la FF (Figura 21) (Abbehausen, Formiga, Sabadini, & Yoshida, 2010). El complejo de inclusión β -CD/FF se puede utilizar para la determinación de la formación de complejos de inclusión con otros compuestos a través de una reacción de complejación competitiva (Cadena et al., 2009).

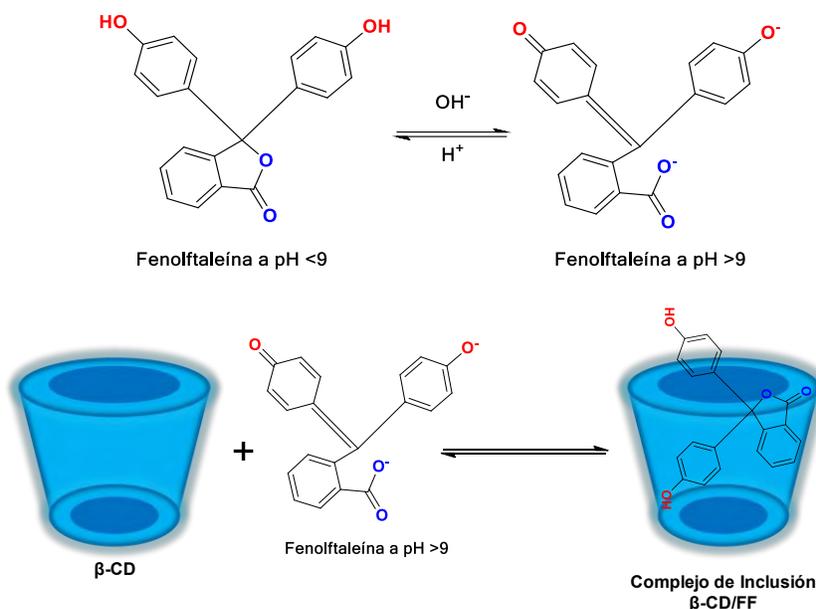


Figura 21. Equilibrio de la FF dependiente del pH y formación del complejo de inclusión β -CD/FF.

En el caso particular de la FF, una de las pruebas para confirmar la formación de complejos de inclusión es por la pérdida de color de una solución de FF a pH > 9 cuando se agrega a una solución de β -CD o de β -CD-PEG, esto es debido a que la FF a pH básico se encuentra con el grupo carboxílico ionizado y cuando se incluye en la β -CD se favorece la formación de la lactona debido a las interacciones huésped-anfitrión perdiendo así la conjugación del sistema electrónico que se manifiesta físicamente por la pérdida de color. En los tres casos se observó la formación de los CI, por una disminución del color de la solución rosa) y se comprobó a través de la solución por RMN ^1H , se determinó la diferencia de desplazamiento ($\Delta\delta$) de los átomos de hidrogeno de la FF. Otra manera de determinar la formación de CI es a través del cálculo $\Delta\delta$ de H3 y H5, sin embargo, en este sistema no fue posible determinarlos ya que estas señales se encuentran traslapadas con las señales del PEG.

La caracterización por RMN ^1H muestra, primeramente, el espectro de FF (Figura 22) en donde se observa a campo alto la señal del átomo de hidrogeno correspondiente al hidroxilo de los fenoles y a campo bajo las señales de los átomos de hidrogeno correspondientes a los fenilos para-sustituidos, también las señales correspondientes a los protones del anillo vecino a la lactona.

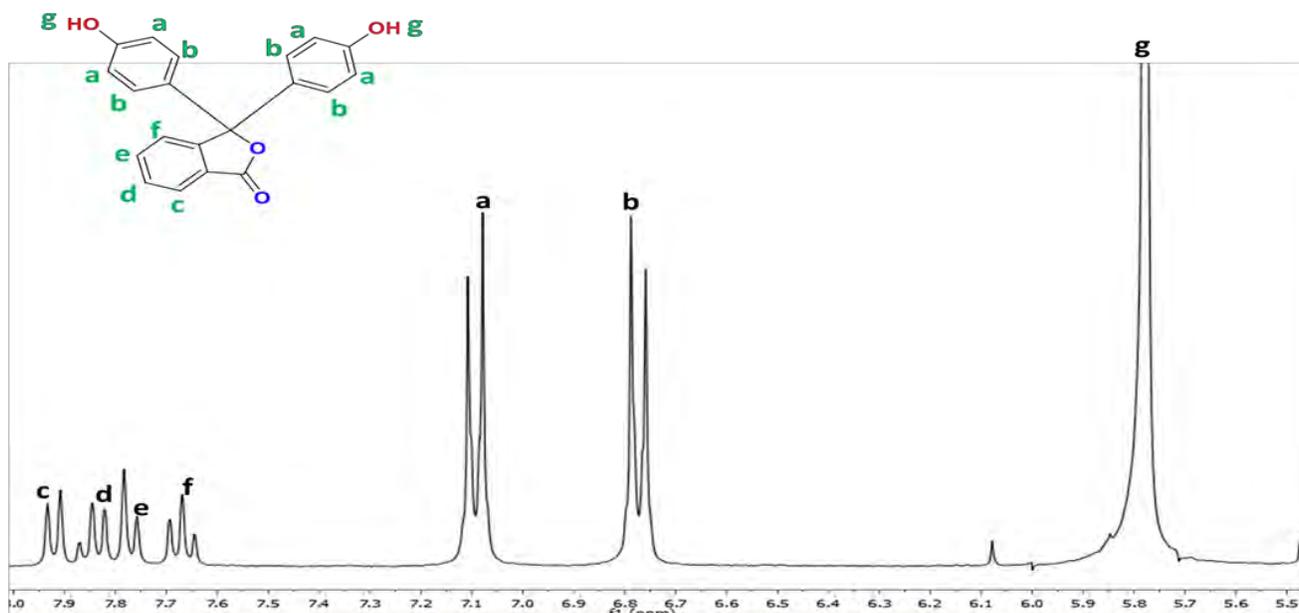


Figura 22. Espectro de ¹H de la FF

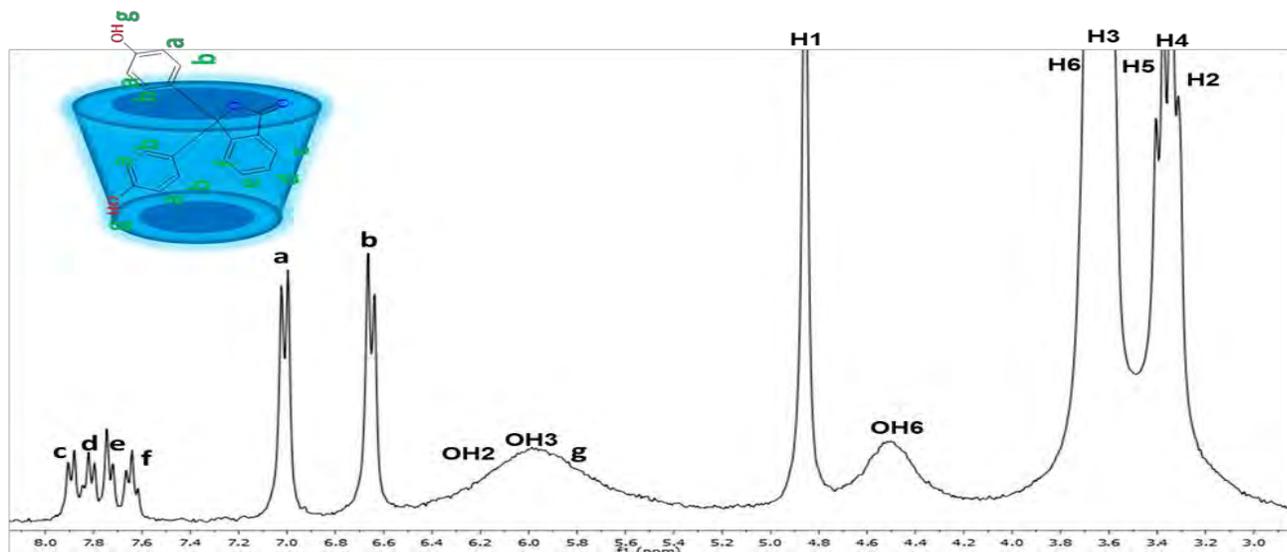


Figura 23. Espectro de ¹H β-CD/FF

En la Figura 23 se muestra el espectro del CI β -CD/FF (1:1). En este caso se observa un cambio considerable en las señales de los átomos de hidrogeno correspondientes a Hb, He, Hg y Ha, por lo que se puede decir que la forma en la que se incluye la FF es como se ilustra en la imagen de la Figura 23, lo que concuerda con la literatura (Taguchi, 1986). Para conocer el grado de desplazamiento, se calcularon los $\Delta\delta$ de los átomos de hidrogeno de la FF se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. $\Delta\delta$ de los CI β -CD/FF, β -CD-PEG₅₅₀/FF, β -CD-PEG₂₀₀₀/FF y β -CD-PEG₅₀₀₀/FF

Hidrógeno	$\Delta\delta$ (ppm) β -CD/FF (1:1)	$\Delta\delta$ (ppm) β -CD-PEG ₅₅₀ /FF (1:1)	$\Delta\delta$ (ppm) β -CD-PEG ₂₀₀₀ /FF (1:1)	$\Delta\delta$ (ppm) β -CD-PEG ₅₀₀₀ /FF (1:1)
a	0.08	0.09	0.02	0.03
b	0.12	0.07	0.00	0.03
c	0.04	0.04	0.00	0.01
d	0.05	0.05	0.00	0.07
e	0.14	0.06	0.05	0.00
f	0.06	0.04	0.04	0.01
g	0.08	-	-	-

A continuación, en los espectros de los conjugados β -CD-PEG₅₅₀, β -CD-PEG₂₀₀₀ y β -CD-PEG₅₀₀₀ (Figura 24, 25 y 26), se calcularon los $\Delta\delta$ de los CI de las β -CDs “pegiladas” (1:1). El modo de inclusión de la FF en el conjugado β -CD-PEG₅₅₀ es de la misma manera que en el caso de la β -CD, donde los átomos de hidrogeno que más se desplazan son Ha, Hb y He. En el caso de los conjugados β -CD-PEG₂₀₀₀ y β -CD-PEG₅₀₀₀, el $\Delta\delta$ de los átomos de hidrogeno no es contundente para afirmar que los CI se estén formando ya que el desplazamiento es pequeño respecto al observado en el caso de β -CD/FF. Esto se puede deber a que la FF se queda atrapada en las cadenas de PEG y estén interactuando provocando un pequeño cambio en el ambiente electrónico con el subsecuente desplazamiento de algunos átomos de hidrogeno; por lo que se puede decir que en este caso si está influyendo el tamaño de cadena de PEG para la formación de los CI. Esto se podría corroborar con un estudio en RMN de dos dimensiones para comprobar las interacciones de la FF a larga distancia.

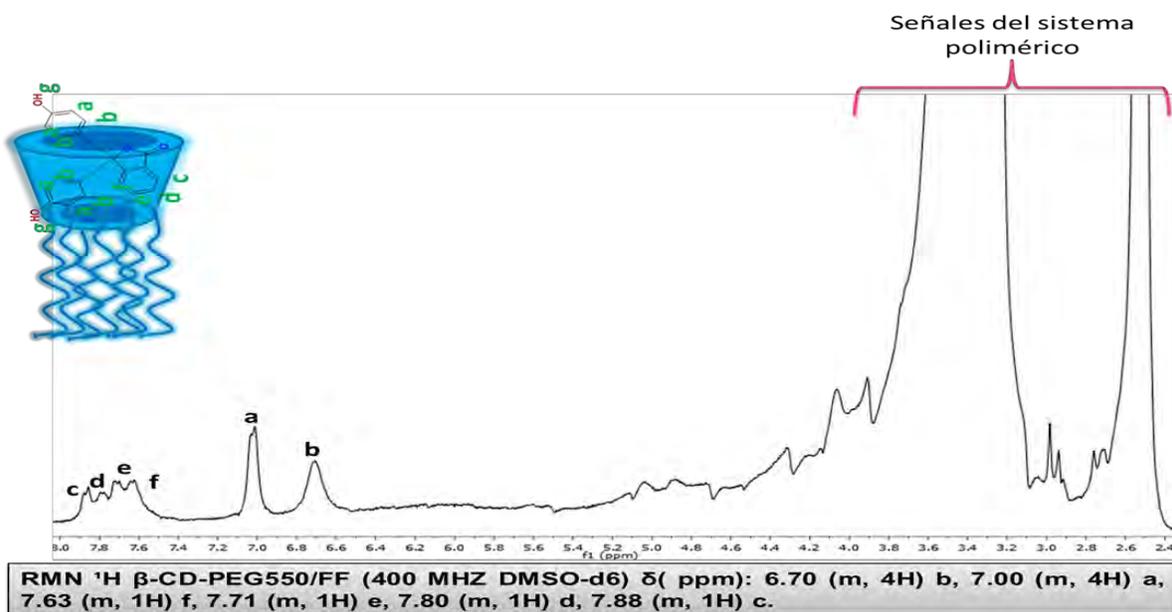


Figura 24. Espectro de RMN ^1H β -CD-PEG₅₅₀/FF

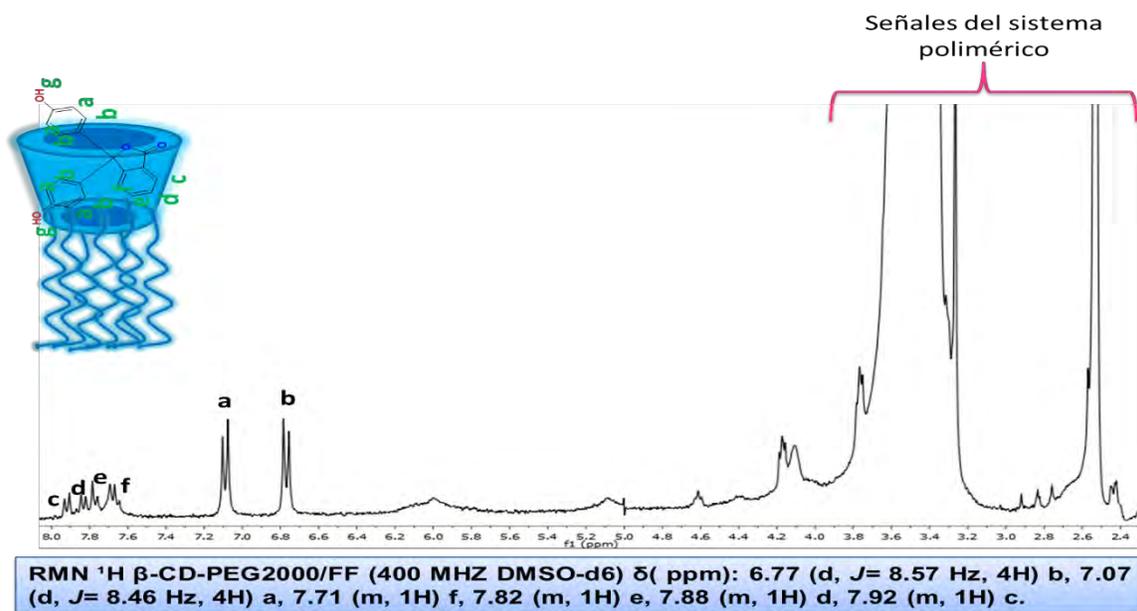


Figura 25. Espectro de RMN ^1H β -CD-PEG₂₀₀₀/FF

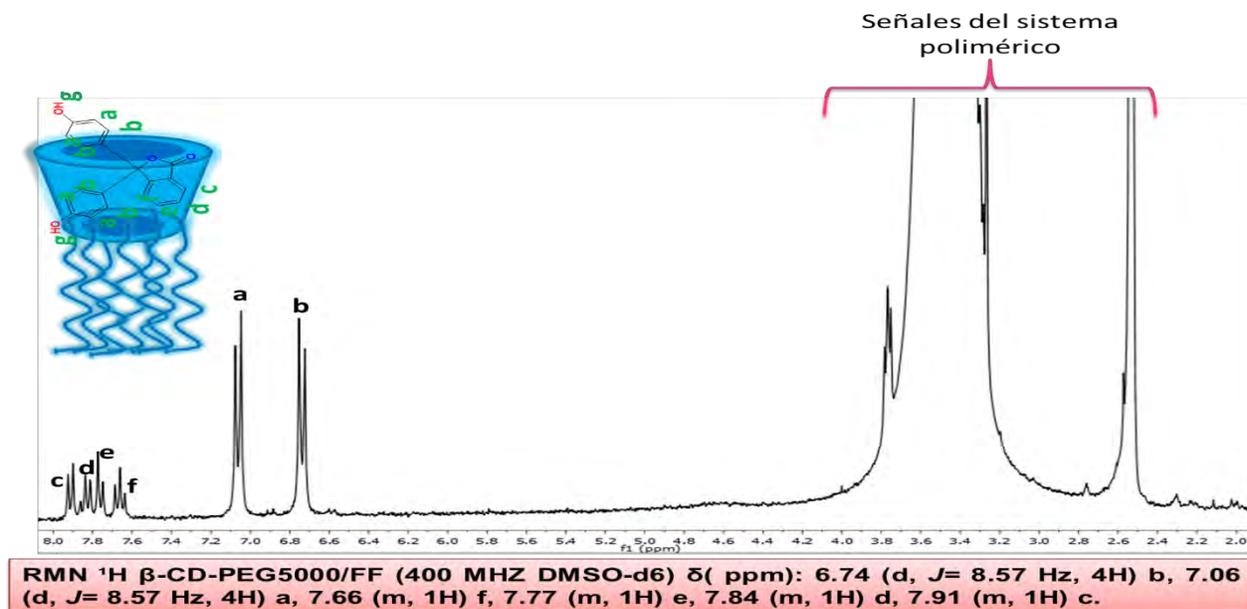


Figura 26. Espectro de RMN ^1H β -CD-PEG₅₀₀₀/FF

En el caso particular del anillo de Ad, este es una molécula muy afín a la cavidad de la β -CD, con una constante de $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ lo que indica que el Ad queda “anclado” fuertemente a la cavidad. En este caso la mezcla de disolventes que se utilizó para que los CI se autoensamblaran fue DMSO:MeOH. Debido a que el ensamble β -CD/Ad es común en las plataformas, se determinó la formación de CI a tres distintas estequiometrias (0.5:1, 1:1 y 2:1). Los diez CI que se prepararon se caracterizaron en solución por RMN ^1H y se determinó el $\Delta\delta$ de los átomos de hidrogeno del Ad, igual que en los CI de FF, las señales de los desplazamientos de H3 y H5 se encuentran traslapadas con las señales del PEG y por lo tanto no se utilizaron para determinar la complejación.

La caracterización por ^1H RMN muestra, primeramente, el espectro de Ad en donde se observa a campo alto la señal de los átomos de hidrogeno correspondientes a los grupos metilenos α y γ y a los grupos metinos β del anillo.

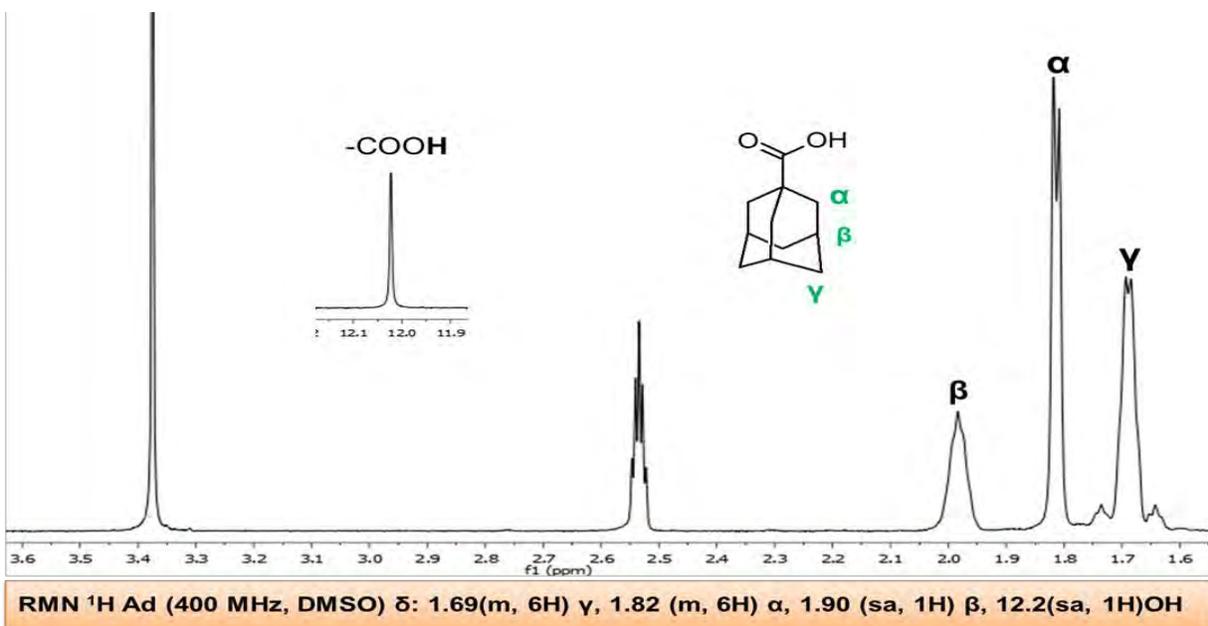


Figura 27. Espectro de RMN ^1H Ad

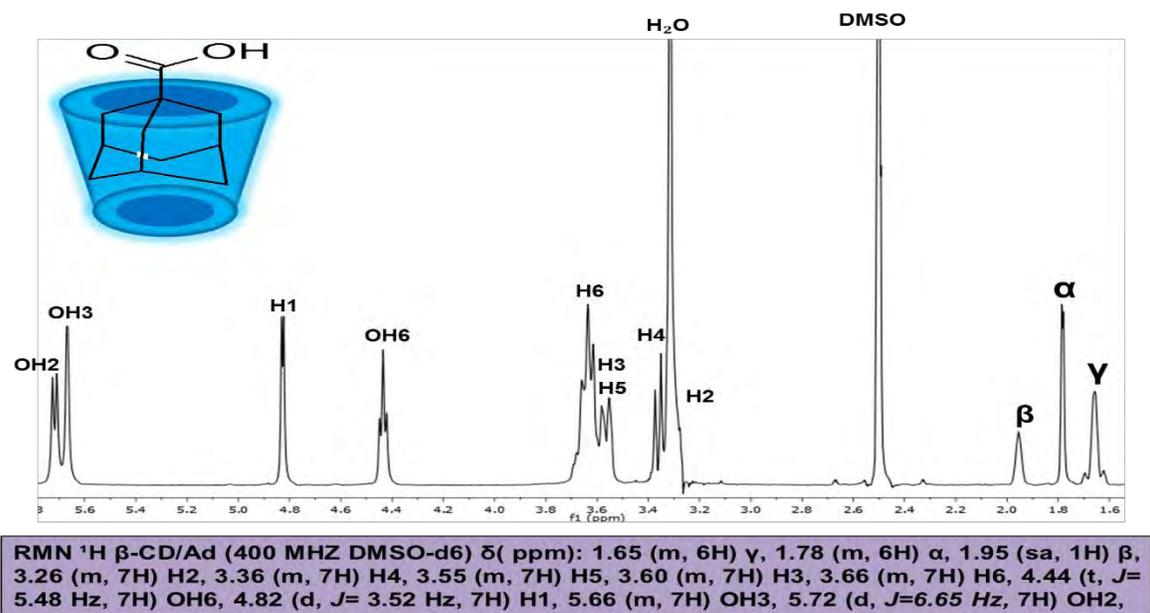


Figura 28. Espectro de RMN ^1H β -CD/Ad

En la Figura 28 se muestra el espectro del CI β -CD/Ad. En este caso se observa un cambio considerable en las señales de tres diferentes tipos de átomos de hidrogeno, los hidrógenos β son los que presentan mayor $\Delta\delta$, y estos son los que interactúan con los H3 y H5 de la β -CD (Tabla 2).

A continuación, se muestran los espectros de RMN ^1H de los complejos β -CD-PEG₅₅₀/Ad, β -CD-PEG₂₀₀₀/Ad y β -CD-PEG₅₀₀₀/Ad en relación (1:1).

Tabla 2. $\Delta\delta$ de los CI β -CD/Ad, β -CD-PEG₅₅₀/Ad, β -CD-PEG₂₀₀₀/Ad y β -CD-PEG₅₀₀₀/Ad

Hidrógeno	$\Delta\delta$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
	β -CD/Ad	β -CD-PEG ₅₅₀ /Ad (0.5:1)	β -CD-PEG ₅₅₀ /Ad (1:1)	β -CD-PEG ₅₅₀ /Ad (2:1)	β -CD-PEG ₂₀₀₀ /Ad (0.5:1)	β -CD-PEG ₂₀₀₀ /Ad (1:1)	β -CD-PEG ₂₀₀₀ /Ad (2:1)	β -CD-PEG ₅₀₀₀ /Ad (0.5:1)	β -CD-PEG ₅₀₀₀ /Ad (1:1)	β -CD-PEG ₅₀₀₀ /Ad (2:1)
α	0.04	0.30	0.30	0.30	0.12	0.03	0.03	0.05	0.03	0.17
β	0.05	0.08	0.08	0.08	0.11	0.00	0.00	0.01	0.00	0.18
γ	0.04	0.14	0.14	0.14	0.04	0.07	0.07	0.04	0.04	0.07

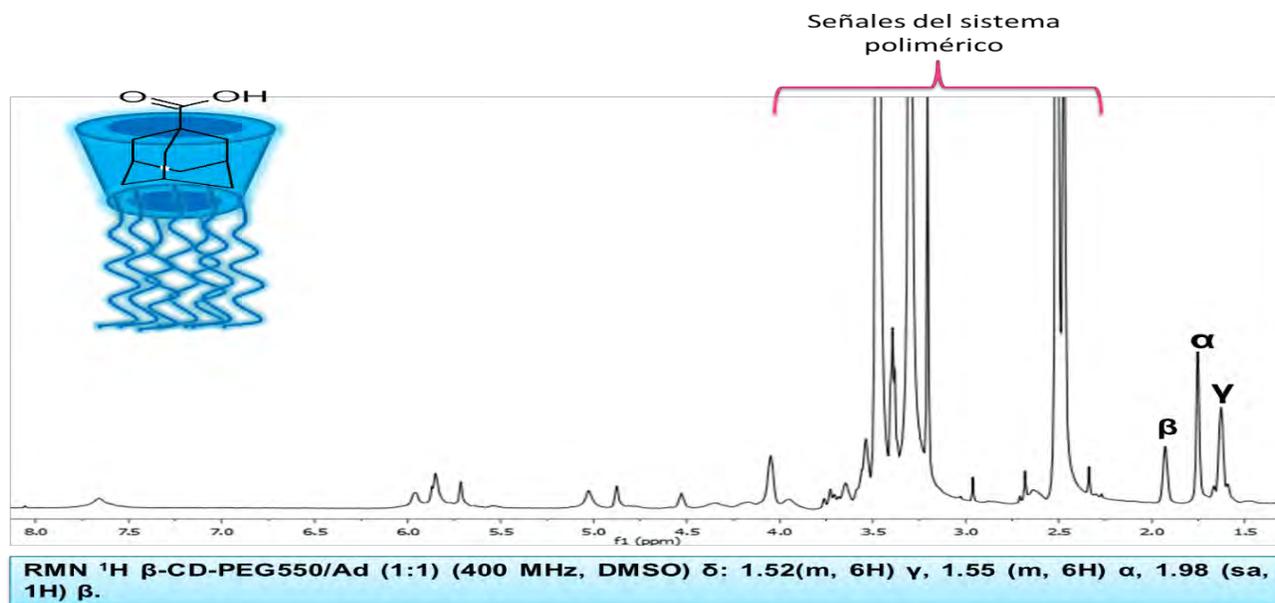


Figura 29. Espectro de RMN ¹H β -CD-PEG₅₅₀/Ad (1:1)

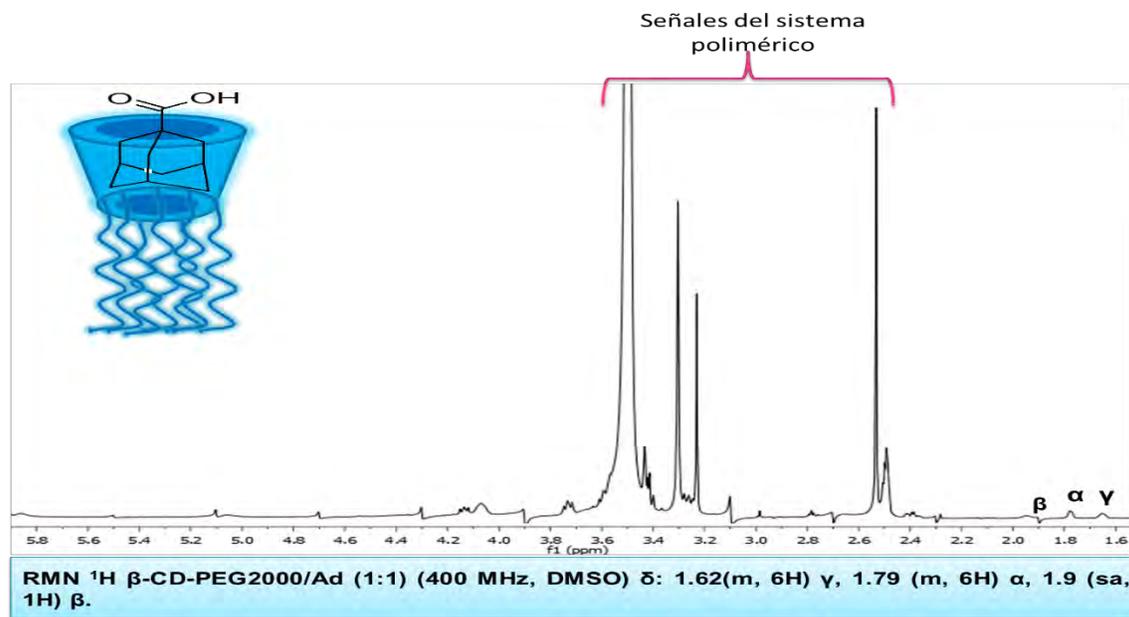


Figura 30. Espectro de RMN ¹H β -CD-PEG₂₀₀₀/Ad (1:1)

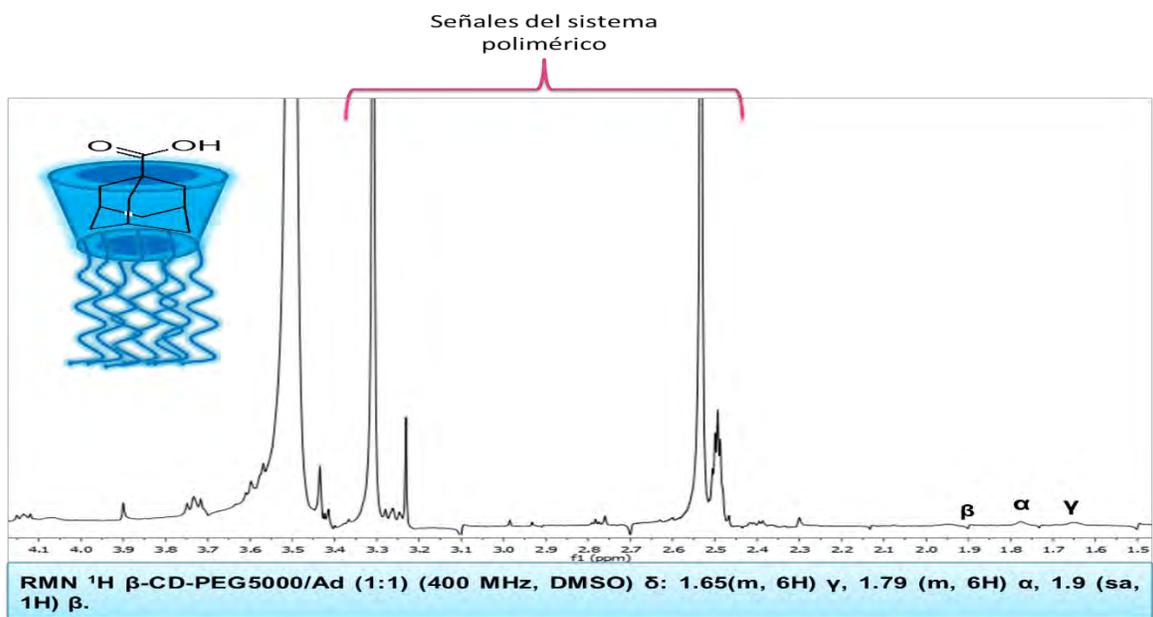


Figura 31. Espectro de RMN ¹H β-CD-PEG₅₀₀₀/Ad (1:1)

Para poder comparar los $\Delta\delta$ en función del tamaño del PEG y relación molar, se construyeron las Tablas 3, 4 y 5. En la Tabla 3 se observa que en la relación molar (0.5:1) (Ad:β-CD-PEG) existe un $\Delta\delta$ mayor en el caso del conjugado β-CD-PEG₅₅₀ y va disminuyendo conforme aumenta el tamaño de PEG, por lo que podemos decir que en este caso se está relación molar si existe una interferencia de las cadenas de PEG para que se dé la formación de CI.

Tabla 3. $\Delta\delta$ de los CI β-CD-PEG₅₅₀/Ad, β-CD-PEG₂₀₀₀/Ad y β-CD-PEG₅₀₀₀/Ad (0.5:1)

Hidrogeno	$\Delta\delta$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
	β-CD-PEG ₅₅₀ /Ad (0.5:1)	β-CD-PEG ₂₀₀₀ /Ad (0.5:1)	β-CD-PEG ₅₀₀₀ /Ad (0.5:1)
α	0.30	0.12	0.05
β	0.08	0.11	0.01
γ	0.14	0.04	0.04

En la Tabla 4 se observa que en la relación molar (1:1) (Ad:β-CD-PEG) existe un $\Delta\delta$ mayor en el caso del conjugado β-CD-PEG₅₅₀, en el resto de los conjugados existe un $\Delta\delta$ similar que se presentó en los CI con β-CD, esto puede ser debido a que, muy similar como el caso de la FF, el Ad se quede atrapado en las cadenas de PEG que al interactuar con este, modifica su ambiente electrónico provocando un cambio en el desplazamiento.

Tabla 4. $\Delta\delta$ de los CI β -CD/Ad y β -CD-PEG₅₅₀/Ad, β -CD-PEG₂₀₀₀/Ad y β -CD-PEG₅₀₀₀/Ad (1:1)

Hidrogeno	$\Delta\delta$ (ppm) β -CD/Ad (1:1)	$\Delta\delta$ (ppm) β -CD-PEG ₅₅₀ /Ad (1:1)	$\Delta\delta$ (ppm) β -CD- PEG ₂₀₀₀ /Ad (1:1)	$\Delta\delta$ (ppm) β -CD- PEG ₅₀₀₀ /Ad (1:1)
α	0.04	0.30	0.03	0.03
β	0.05	0.08	0.00	0.00
γ	0.04	0.14	0.07	0.04

En la Tabla 5 se observa que en la relación molar (2:1) (Ad: β -CD-PEG) existe un $\Delta\delta$ mayor en el caso del conjugado β -CD-PEG₅₅₀ seguido por el conjugado β -CD-PEG₅₀₀₀ y al final el conjugado β -CD-PE. Como se mencionó anteriormente, la formación de CI es un equilibrio dinámico en el que la molécula entra y sale de la cavidad de la β -CD, lo que está ocurriendo en esta relación molar es que estamos “saturando al sistema” provocando que algunas moléculas de Ad queden atrapadas y otras si entren a la cavidad, favoreciendo el desplazamiento hacia la formación de los CI.

Tabla 5. $\Delta\delta$ de los CI β -CD-PEG₅₅₀/Ad, β -CD-PEG₂₀₀₀/Ad y β -CD-PEG₅₀₀₀/Ad (2:1)

Hidrogeno	$\Delta\delta$ (ppm) β -CD-PEG ₅₅₀ /Ad (2:1)	$\Delta\delta$ (ppm) β -CD- PEG ₂₀₀₀ /Ad (2:1)	$\Delta\delta$ (ppm) β -CD- PEG ₅₀₀₀ /Ad (2:1)
α	0.30	0.03	0.17
β	0.08	0.00	0.18
γ	0.14	0.07	0.07

Conclusiones

6. Conclusiones

Se funcionalizaron las 7 posiciones de la cara primaria de la β -CD con cadenas de PEG de tres diferentes tamaños (550, 2000 y 5000 Da) por medio de *Química Click*. En donde las β -CDs quedan con la cavidad disponible para formar CI. Se prepararon CI con dos moléculas modelo, FF y Ad; En el caso de la FF, los espectros de RMN ^1H revelaron que la FF se acomoda de diversas formas en la cavidad de la β -CD, y la formación de los CI se da con mayor claridad con el conjugado β -CD-PEG₅₅₀. Sin embargo, con los otros dos conjugados se necesitan realizar más estudios para corroborar si hay interacciones de FF con H3 y H5. En el caso del Ad, aunque es una molécula muy afín a la cavidad, sí se observó influencia del tamaño de la cadena de PEG en la formación de complejos de inclusión, el tamaño ideal es PEG₅₅₀ obteniendo los mejores resultados. Para los complejos con el conjugado β -CD-PEG₅₀₀₀ será favorable modificar la proporción molar a 2:1 y así favorecer el equilibrio a la complejación.

Perspectivas

Caracterizar por RMN 2D los CI para verificar las interacciones anfitrión/huésped de los sistemas supramoleculares, ya que los cambios en el entorno electrónico de los protones de las CDs y de la molécula huésped son reflejados por los cambios en los picos de señal RMN, además de que se aprovecha el efecto NOE de las moléculas para verificar con quien están interactuando a una distancia establecida.

Utilizar a los conjugados β CD-PEG como acarreadores por sí mismos o como bloques de construcción para plataformas supramoleculares de liberación de fármacos.

7. Bibliografía

- Abarca, R. L., Rodríguez, F. J., Guarda, A., Galotto, M. J., & Bruna, J. E. (2016). Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. *Food Chemistry*, *196*, 968–75. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.023>
- Abbehausen, C., Formiga, A. L. B., Sabadini, E., & Yoshida, I. V. P. (2010). A b - Cyclodextrin/Siloxane Hybrid Polymer: Synthesis, Characterization and Inclusion Complexes. *Journal of Brazil Chemistry Society*, *21*(10), 1867–1876.
- Ashton, P. R., Königer, R., Stoddart, J. F., Alker, D., & Harding, V. D. (1996). Amino Acid Derivatives of β -Cyclodextrin. *The Journal of Organic Chemistry*, *61*(3), 903–908. <http://doi.org/10.1021/jo951396d>
- Bazzicalupi, C., Bianchi, A., García-España, E., & Delgado-Pinar, E. (2014). Metals in supramolecular chemistry. *Inorganica Chimica Acta*, *417*, 3–26. <http://doi.org/10.1016/j.ica.2014.03.001>
- Bregoli, L., Movia, D., Gavigan-Imedio, J. D., Lysaght, J., Reynolds, J., & Prina-Mello, A. (2016). Nanomedicine applied to translational oncology: A future perspective on cancer treatment. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *12*(1), 81–103. <http://doi.org/10.1016/j.nano.2015.08.006>
- Bulani, V. D., Kothavade, P. S., Kundaikar, H. S., Gawali, N. B., Chowdhury, A. A., Degani, M. S., & Juvekar, A. R. (2016). Inclusion complex of ellagic acid with beta-cyclodextrin: Characterization and in vitro anti-inflammatory evaluation. *Journal of Molecular Structure*, *1105*, 308–315. <http://doi.org/10.1016/j.molstruc.2015.08.054>
- Cadena, P. G., Oliveira, E. C., Arajo, A. N., Montenegro, M. C. B. S. M., Pimentel, M. C. B., Lima Filho, J. L., & Silva, V. L. (2009). Simple determination of deoxycholic and ursodeoxycholic acids by phenolphthalein- β -cyclodextrin inclusion complex. *Lipids*, *44*(11), 1063–1070. <http://doi.org/10.1007/s11745-009-3353-z>
- Cannavà, C., Crupi, V., Ficarra, P., Guardo, M., Majolino, D., Stancanelli, R., & Venuti, V. (2008). Physicochemical characterization of coumestrol/ β -cyclodextrins inclusion complexes by UV-vis and FTIR-ATR spectroscopies. *Vibrational Spectroscopy*, *48*(2),

172–178. <http://doi.org/10.1016/j.vibspec.2007.12.013>

CreativePEGWorks: Catalogue. <http://www.creativepegworks.com/catalog.pdf> (Consultado el 04 de abril de 2016)

Dan, Z., Cao, H., He, X., Zeng, L., Zou, L., Shen, Q., & Zhang, Z. (2015). Biological stimuli-responsive cyclodextrin-based host-guest nanosystems for cancer therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(1-2), 63–68. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.01.035>

Del Valle, E. M. M. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, 39(9), 1033–1046. [http://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00258-9](http://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00258-9)

Díaz, D. D., Finn, M. G., Sharpless, K. B., Fokin, V., & Hawker, J. (2008). Investigación Química Cicloadición 1, 3-dipolar de azidas y alquinos . I: Principales aspectos sintéticos. *Anales de Química*, 104(3), 173–180.

El-Bindary, A. A., El-Sonbati, A. Z., Diab, M. A., Ghoneim, M. M., & Serag, L. S. (2016). Polymeric complexes — LXII. Coordination chemistry of supramolecular Schiff base polymer complexes — A review. *Journal of Molecular Liquids*, 216, 318–329. <http://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.12.113>

Gharib, R., Greige-Gerges, H., Fourmentin, S., Charcosset, C., & Auezova, L. (2015). Liposomes incorporating cyclodextrin-drug inclusion complexes: Current state of knowledge. *Carbohydrate Polymers*, 129, 175–86. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.048>

Gómez-Galván, F., Pérez-Álvarez, L., Matas, J., Álvarez-Bautista, A., Poejo, J., Duarte, C. M., ... León, L. M. (2016). Preparation and Characterization of Soluble Branched ionic β -cyclodextrins and their Inclusion Complexes with Triclosan. *Carbohydrate Polymers*, 142, 149–157. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.01.046>

Harris, J. M., & Chess, R. B. (2003). Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 2(3), 214–221. <http://doi.org/10.1038/nrd1033>

Izunobi, J. U., & Higginbotham, C. L. (2011). Polymer Molecular Weight Analysis by ^1H NMR Spectroscopy. *Journal of Chemical Education*, 88(8), 1098–1104. <http://doi.org/10.1021/ed100461v>

- Le, H. T., Jeon, H. M., Lim, C. W., & Kim, T. W. (2014). Synthesis, cytotoxicity, and phase-solubility study of cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(10), 3183–3189. <http://doi.org/10.1002/jps.24107>
- Li, W., Liu, X., Yang, Q., Zhang, N., Du, Y., & Zhu, H. (2015). Preparation and characterization of inclusion complex of benzyl isothiocyanate extracted from papaya seed with β -cyclodextrin. *Food Chemistry*, 184, 99–104. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.091>
- Liu, B., Zhou, H., Zhou, S., & Yuan, J. (2015). Macromolecules based on recognition between cyclodextrin and guest molecules: Synthesis, properties and functions. *European Polymer Journal*, 65, 63–81. <http://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.01.017>
- Loftsson, T., & Brewster, M. E. (2012). Cyclodextrins as functional excipients: methods to enhance complexation efficiency. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101(9), 3019–32. <http://doi.org/10.1002/jps.23077>
- LOFTSSON, T., & DUCHENE, D. (2007). Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 329(1-2), 1–11. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.10.044>
- Messner, M., Kurkov, S. V, Jansook, P., & Loftsson, T. (2010). Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 387(1-2), 199–208. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.11.035>
- Nobelprize: K. Barry Sharpless.
https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2001/sharpless-facts.html
(Consultada el 07 de Mayo de 2016)
- Osman, S. K., Brandl, F. P., Zayed, G. M., Teßmar, J. K., & Göpferich, A. M. (2011). Cyclodextrin based hydrogels: Inclusion complex formation and micellization of adamantane and cholesterol grafted polymers. *Polymer*, 52(21), 4806–4812. <http://doi.org/10.1016/j.polymer.2011.07.059>
- Pastor, A., & Martínez-Viviente, E. (2008). NMR spectroscopy in coordination supramolecular chemistry: A unique and powerful methodology. *Coordination Chemistry Reviews*, 252(21-22), 2314–2345. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.01.025>

- Servicios Tecnicos de Investigacion: Universidad de Alicante:
<http://ssti.ua.es/es/instrumentacion-cientifica/unidad-de-genomica-y-proteomica/espectrometria-de-masas-maldi-tof.html> (Consultado el 07 de mayo de 2016)
- Singh, M., Sharma, R., & Banerjee, U. C. (2002). Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnology Advances*, 20(5-6), 341–359. [http://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00020-4](http://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00020-4)
- Su, H., Koo, J. M., & Cui, H. (2015). One-component nanomedicine. *Journal of Controlled Release*, 219, 383–395. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.09.056>
- Suárez-Cerda, J., Nuñez, G. A., Espinoza-Gómez, H., & Flores-López, L. Z. (2014). A comparative study of the effect of α -, β -, and γ -cyclodextrins as stabilizing agents in the synthesis of silver nanoparticles using a green chemistry method. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 43, 21–6. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2014.07.006>
- Taguchi, K. (1986). Transient binding of phenolphthalein- β -cyclodextrin complex: an example of induced geometrical distortion. *Journal of the American Chemical Society*, 108(1 1), 2705–2709. <http://doi.org/10.1021/ja00270a032>
- Tiwari, G., Tiwari, R., & Rai, A. K. (2010). Cyclodextrins in delivery systems: Applications. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2(2), 72–79. <http://doi.org/10.4103/0975-7406.67003>
- Wang, Y., & Huang, L. (2014). Composite nanoparticles for gene delivery. *Advances in Genetics*, 88, 111–37. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-800148-6.00005-5>
- Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian, V., & Huwyler, J. (2014). Nanomedicine in Cancer Therapy: Challenges, Opportunities, and Clinical Applications. *Journal of Controlled Release*, 200, 138–157. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.12.030>
- Xu, L., Li, Y., & Li, Y. (2014). Application of “Click” Chemistry to the Construction of Supramolecular Functional Systems. *Asian Journal of Organic Chemistry*, 3(5), 582–602. <http://doi.org/10.1002/ajoc.201300245>
- Yang, L. J., Ma, S. X., Zhou, S. Y., Chen, W., Yuan, M. W., Yin, Y. Q., & Yang, X. D. (2013).

Preparation and characterization of inclusion complexes of naringenin with β -cyclodextrin or its derivative. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 861–869. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.07.010>

Zafar, N., Fessi, H., & Elaissari, A. (2014a). Colloidal particles containing labeling agents and cyclodextrins for theranostic applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 472(1-2), 118–129. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.06.004>

Zafar, N., Fessi, H., & Elaissari, A. (2014b). Cyclodextrin containing biodegradable particles: from preparation to drug delivery applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 461(1-2), 351–66. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.12.004>

Zhang, D., Zhang, J., Jiang, K., Li, K., Cong, Y., Pu, S., ... Lin, J. (2016). Preparation, characterisation and antitumour activity of β -, γ - And HP- β -cyclodextrin inclusion complexes of oxaliplatin. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 152, 501–508. <http://doi.org/10.1016/j.saa.2015.07.088>

Zhang, J., Jiang, K., An, K., Ren, S.-H., Xie, X., Jin, Y., & Lin, J. (2015). Novel water-soluble fisetin/cyclodextrins inclusion complexes: preparation, characterization, molecular docking and bioavailability. *Carbohydrate Research*, 418, 20–28. <http://doi.org/10.1016/j.carres.2015.09.013>

Zhang, J., & Ma, P. X. (2013a). Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: Recent progress and future perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(9), 1215–1233. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2013.05.001>

Zhang, J., & Ma, P. X. (2013b). Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: recent progress and future perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(9), 1215–33. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2013.05.001>

8. Apéndice I

Se muestran los espectros de los complejos de inclusión β CD-PEG₅₅₀/Ad, β CD-PEG₂₀₀₀/Ad y β CD-PEG₅₀₀₀/Ad, en las proporciones molares (0.5:1) y (2:1).

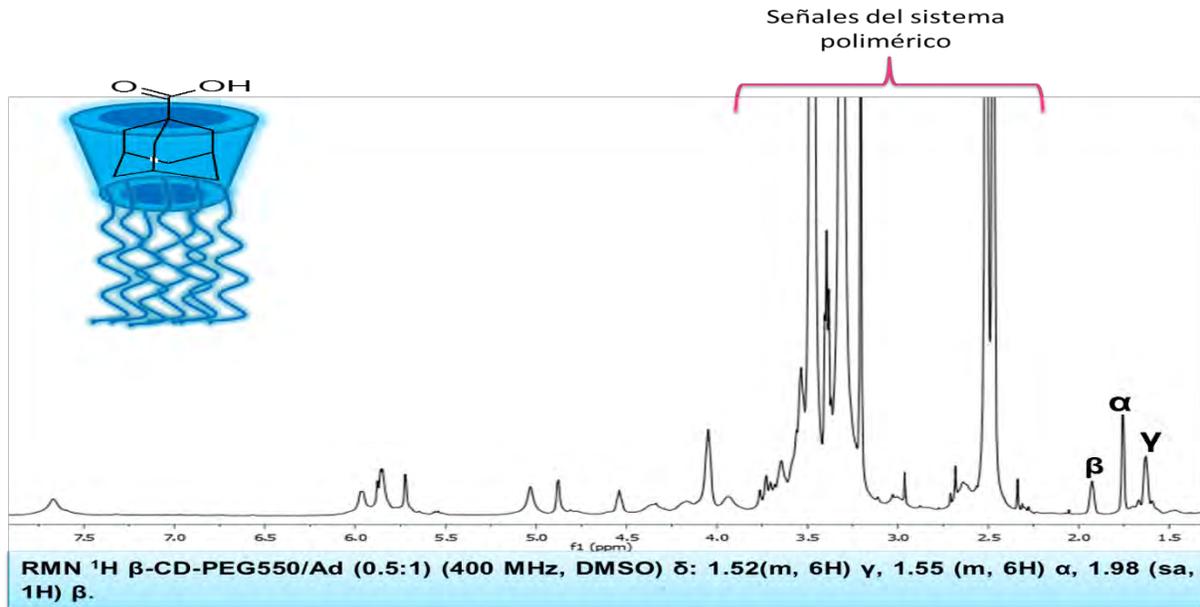


Figura 32. Espectro de RMN ¹H β -CD-PEG₅₅₀/Ad (0.5:1)

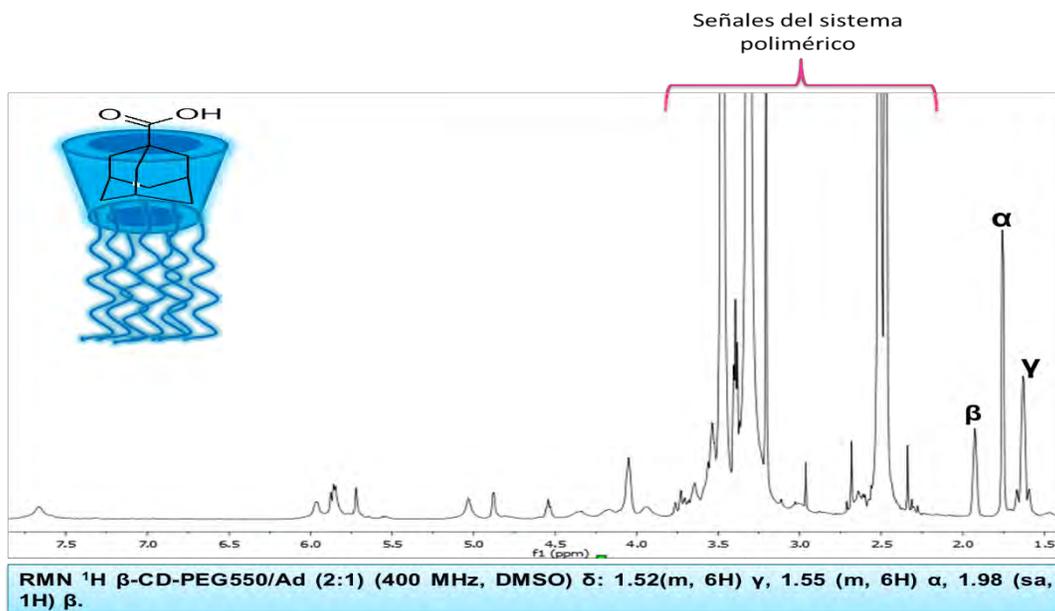


Figura 33. Espectro de RMN ¹H β -CD-PEG₅₅₀/Ad (2:1)

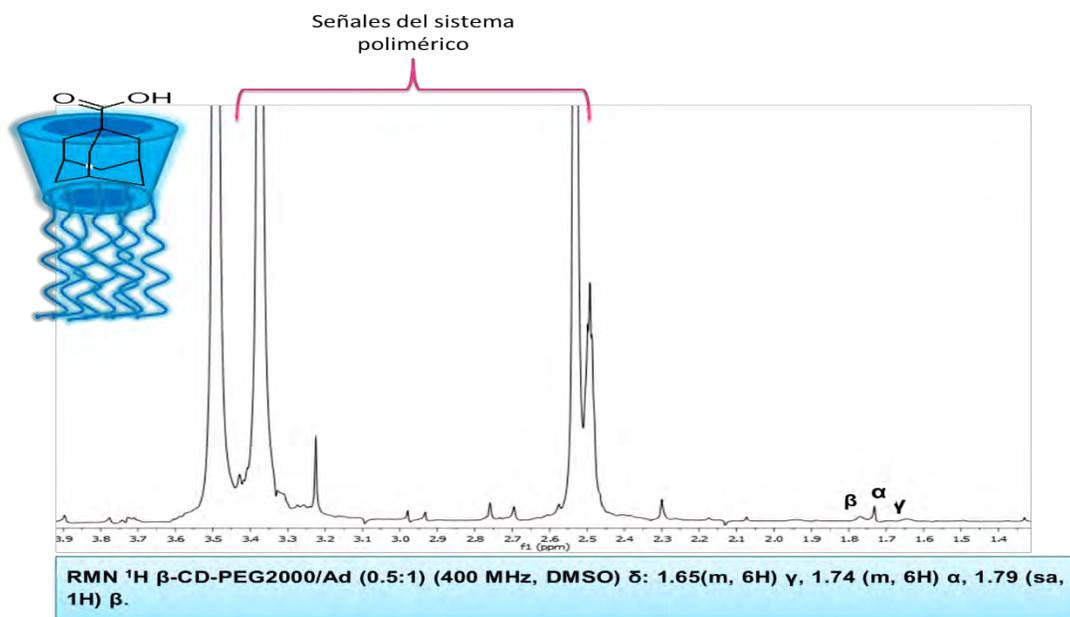


Figura 34. Espectro de RMN ¹H β-CD-PEG₂₀₀₀/Ad (0.5:1)

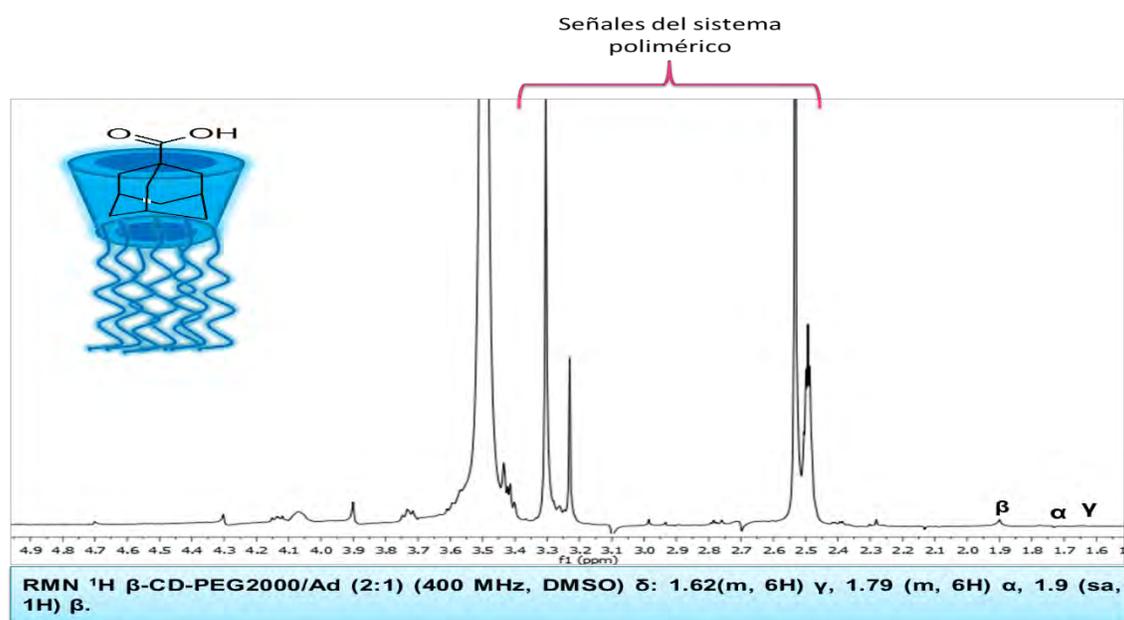


Figura 35. Espectro de RMN ¹H β-CD-PEG₂₀₀₀/Ad (2:1)

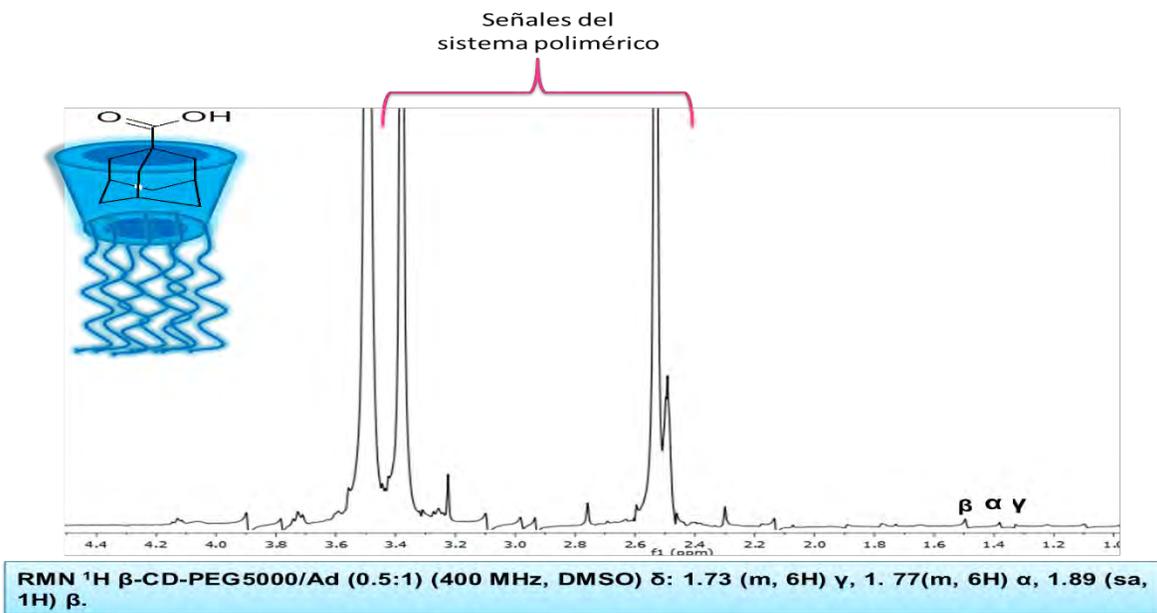


Figura 36. Espectro de RMN ^1H β -CD-PEG₅₀₀₀/Ad (0.5:1)

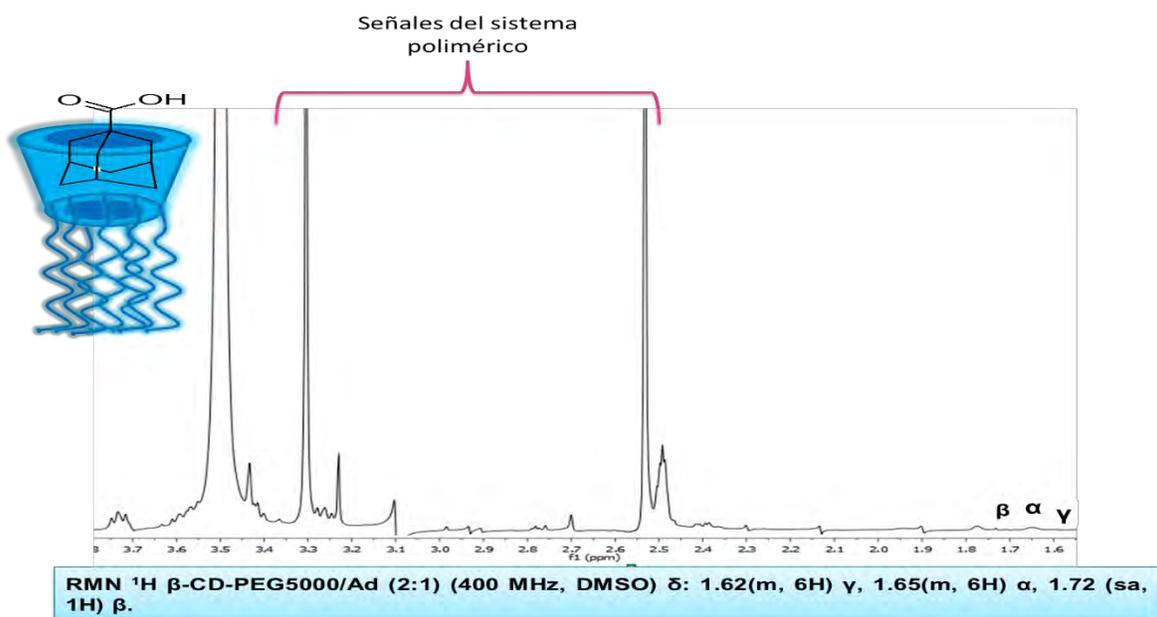


Figura 37. Espectro de RMN ^1H β -CD-PEG₅₀₀₀/Ad (2:1)