



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

TESIS

Polímeros tipo estrella de β -ciclodextrina:

explorando la formación y comportamiento de sus nanoensamblados

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

NORMA JASSEL RAMÍREZ RODRÍGUEZ



MÉXICO, D.F. a 10 de marzo de 2020.



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: Alma Miriam Novelo Torres

VOCAL: Profesor: María Josefa Bernad Bernad

SECRETARIO: Profesor: Yareli Rojas Aguirre

1er. SUPLENTE: Profesor: Carlos Juárez Osornio

2° SUPLENTE: Profesor: Aurora Anais Zurita Cruz

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES (IIM), UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Yareli Rojas Aguirre

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Salvador López Morales

SUSTENTANTE (S):

Norma Jassel Ramírez Rodríguez

Agradecimientos

Al Instituto de Investigaciones en Materiales y a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo con los proyectos 1306 y PAPIIT-IA200919 respectivamente.

Al M. en C. Salvador López Morales por la supervisión técnica de este trabajo, en particular en el manejo del equipo de Dispersión Dinámica de Luz.



Resumen

La β -ciclodextrina (β CD) y sus derivados han mostrado capacidad de auto ensamblarse en agua. Los autoensamblados resultantes pueden tener propiedades distintas y responder a estímulos del entorno. El tamaño y la forma de estas estructuras determinarán su toxicidad y la manera en cómo interactúen con el entorno biológico. Por consiguiente, el diseño de arquitecturas basadas en β CD con tamaño y forma predecibles sigue siendo un reto.

Nuestro grupo de investigación sintetizó un derivado de β CD, el cual consiste en la conjugación de 7 cadenas de Polietilenglicol de 5 kDa a los 7 primeros hidroxilos de β CD. Este derivado fue utilizado para investigar, mediante dispersión dinámica de luz (DLS), su capacidad para ensamblarse o auto asociarse. Los estudios de DLS se realizaron en agua a 25°C. Con la finalidad de investigar su aplicación en la nanomedicina, se procedió a medir el tamaño de partícula por medio de DLS (dispersión dinámica de luz) en condiciones que se encontrarán como en el medio fisiológico: medio acuoso a temperatura ambiente, a 37°C y a 42°C, así como, con variaciones del pH (7.4, 8.0 y 3.8).

Debido a lo antes mencionado, es de suma importancia estudiar el proceso de autoensamblaje, así como determinar el tamaño de las estructuras que se forman. De esta manera, este trabajo presenta el estudio de β CDPEG₅₀₀₀ (β CD conjugada con polietilenglicol de 5kDa) por medio de la técnica DLS en agua a 25°C, en diferentes condiciones de pH y temperatura, para determinar su efecto en el autoensamblaje de estas moléculas.

Los resultados indican que el sistema tiende a formar estructuras de 143.3 nm en agua a 25°C. El tamaño (diámetro hidrodinámico) de los ensamblados a 37°C es de 152.4 nm y a 42°C de 152.6 nm. El tamaño a pH 3.8 es de 140.3 nm, a pH 7.4 es de 130.5 nm, mientras que a pH 8.0 el tamaño es de 148.3 nm.

Los resultados indican β CDPEG₅₀₀₀ puede ensamblarse en agua generando estructuras con un tamaño en el intervalo de 130.5 nm a 172.5 nm. Estas

nanoestructuras responden a cambios del entorno ya que su tamaño disminuye o aumenta en función del medio. Sin embargo, los cambios son sutiles y el sistema permanece estable a través del tiempo.



ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
i. Índice de Figuras.....	8
ii. Índice de Tablas.....	10
I. Introducción	11
II. Marco teórico	15
2.1. Sistemas de liberación de fármacos	15
2.1.1. Ciclodextrinas (CDs)	15
2.1.2. Modificación química de β CDs	17
2.1.3. Agregados de β CD	17
2.1.4. Polietilenglicol (PEG)	19
2.2. Tamaño y forma de los nanosistemas de liberación	21
2.3. Determinación de tamaño y forma de las nanopartículas....	23
2.3.1. Dispersión dinámica de luz (DLS)	23
2.4. Planteamiento del problema	26
2.5. Justificación	26
2.6. Hipótesis	28
2.7. Objetivo general	28
2.8. Objetivos particulares	28
III. Desarrollo experimental (metodología)	29
3.1. Materiales y equipos	29
3.2. Preparación de muestras	29
3.3. Medición del tamaño de partícula mediante DLS	32
3.4. Calibración del equipo	34
IV. Resultados y discusión	35
4.1. Apariencia de las muestras	36
4.2. Determinación de la capacidad de ensamblaje de β CDPEG ₅₀₀₀ en agua a temperatura ambiente	37
4.2.1. Influencia de la concentración en la formación de ensamblados de β CDPEG ₅₀₀₀ en medio acuoso a temperatura ambiente	38
4.2.2. Resultados obtenidos de la medición por DLS de S ₁	38

4.2.3.	Resultados obtenidos de la medición por DLS de S ₂ ...	40
4.2.4.	Resultados obtenidos de la medición por DLS de S ₃ ...	41
4.2.4.1.	Estudio de S ₃ con respecto al tiempo	44
4.3.	Determinación del tamaño de los agregados de polietilenglicol 5000 (PEG ₅₀₀₀)	51
4.3.1.	Estudio de PEG ₅₀₀₀ con respecto al tiempo	52
4.4.	Determinación del tamaño de los agregados de β-ciclodextrina (βCD)	58
4.4.1.	Determinación del tamaño de los agregados de β- ciclodextrina (βCD)	59
4.5.	Determinación del tamaño de los ensamblados del sistema βCDPEG ₅₀₀₀ a 37°C y 42°C	64
4.5.1.	Resultados de los experimentos a 37°C	64
4.5.2.	Resultados de los experimentos a 42°C	66
4.6.	Determinación del tamaño de los ensamblados de βCDPEG ₅₀₀₀ en medio ácido, alcalino y neutro	69
4.6.1.	Resultados de los experimentos a pH= 7.4	70
4.6.2.	Resultados de los experimentos a pH= 8.0	72
4.6.3.	Resultados de los experimentos a pH= 3.8	74
V.	Perspectivas	77
VI.	Conclusiones	78
VII.	Referencias	80
VIII.	Anexos	85
	ANEXO 1. Determinación del D _h de S ₁ y S ₂ con respecto al tiempo a temperatura ambiente	85
	ANEXO 2. Determinación del D _h de la mezcla física de componentes y PEG ₅₀₀₀ a 37°C y 42°C	93
	ANEXO 3. DLS de disoluciones buffer y la mezcla física a pH 7.4, 8.0 y 3.8	99

i. Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Características de las CDs	16
Figura 2. Estructura química y forma cónica de la molécula de β -ciclodextrina	16
Figura 3. Nanosistemas formados por el autoensamblaje de CDs anfífilas	19
Figura 4. Estructura química de PEG	19
Figura 5. Estrategias de pegilación	20
Figura 6. Instrumentación de DLS	23
Figura 7. Representación del R_h en una partícula esférica	24
Figura 8. Estructura química y representación de β CDPEG ₅₀₀₀	27
Figura 9. Estándar de poliestireno de 100 nm, a) antes de la medición de la muestra y b) al final del ensayo	35
Figura 10. Representación del D_h en una partícula esférica	35
Figura 11. Ejemplo de una distribución bimodal con su respectiva clasificación en D_h	36
Figura 12. Distribución de D_h en S_1	39
Figura 13. Distribución de D_h en S_2	40
Figura 14. Distribución de D_h en S_3	42
Figura 15. Representación de las posibles estructuras de β CDPEG ₅₀₀₀ en medio acuoso observadas en DLS	43
Figura 16. Efecto del tiempo en el tamaño de P_{ob1} y P_{ob2} en S_3	46
Figura 17. Efecto del tiempo en el %Vol de P_{ob1} y P_{ob2} en S_3	47
Figura 18. Representación gráfica de S_3 a las 360 horas	48
Figura 19. Representación gráfica de S_3 a las 408 horas	48
Figura 20. Representación gráfica de S_3 a las 600 horas	49
Figura 21. Representación gráfica de S_3 a las 1344 horas	49
Figura 22. Cambio de D_h a diferente concentración	50
Figura 23. D_h en PEG ₅₀₀₀	51
Figura 24. D_h en PEG ₅₀₀₀ a los 7 días (168 h)	56
Figura 25. Cambio en los D_{h1} y D_{h2} de PEG ₅₀₀₀ en función del tiempo	57
Figura 26. Cambio en el %Vol de PEG ₅₀₀₀ con el tiempo	57
Figura 27. Distribución de D_h en β CD	59
Figura 28. Cambio en el D_{h1} de β CD en función del tiempo	63
Figura 29. Cambio en el %Vol de β CD con el tiempo	63
Figura 30. Distribución de D_h a 37.4°C	65
Figura 31. Representación de las distribuciones poblacionales presentes en la muestra a 37°C	66
Figura 32. Distribución de D_h a 42.4°C	66
Figura 33. Representación de las distribuciones poblacionales presentes en la muestra a 42°C	67
Figura 34. Cambio en el D_h a diferentes temperaturas	68
Figura 35. Distribución de D_h de β CPEG ₅₀₀₀ en medio neutro	70
Figura 36. Representación de las distribuciones poblacionales presentes en la muestra de β CPEG ₅₀₀₀ a pH= 7.4	71

Figura 37. Distribución de D_h de β CPEG ₅₀₀₀ en medio alcalino	72
Figura 38. Representación de las distribuciones poblacionales presentes en la muestra de β CDPEG ₅₀₀₀ a pH= 8.0	73
Figura 39. Distribución de D_h de β CDPEG ₅₀₀₀ en medio ácido	74
Figura 40. Representación de las distribuciones poblacionales presentes en la muestra de β CPEG ₅₀₀₀ a pH= 3.8	75
Figura 41. Cambio en el D_h de β CPEG ₅₀₀₀ en función del pH	76
Figura 42. Cambio en el %Vol de β CPEG ₅₀₀₀ en función del pH	77
Figura A1-1. D_h de S_1	86
Figura A1-2. D_h de S_2	87
Figura A1-3. Cambio en el %Vol de S_2 con el tiempo	88
Figura A1-4. Distribución de D_h en MF	89
Figura A1-5. Cambio en D_{h1} en función del tiempo de MF.....	91
Figura A1-6. Cambio en el %Vol de MF en función del tiempo	92
Figura A2-1. D_h de MFT a 37°C	94
Figura A2-2. D_h de MFT a 42°C	95
Figura A2-3. D_h de MFT a 37°C y 42°C	95
Figura A2-4. Distribución de D_h en PT a 37°C	96
Figura A2-5. Distribución de D_h en PT a 42°C	97
Figura A2-6. D_h de PEG ₅₀₀₀ a 37°C y 42°C	98
Figura A3-1. D_h en disoluciones buffer, donde a) pH=7.4, b) pH=8.0 y c) pH=3.8	99
Figura A3-2. D_h en MFpH7.4	100
Figura A3-3. D_h en MFpH8.0	101
Figura A3-4. D_h en MFpH3.8	102
Figura A3-5. D_h de MF en función del pH	103

ii. Índice de Tablas

Página

Tabla 1. Muestras preparadas de β CDPEG ₅₀₀₀	38
Tabla 2. Resultados de DLS en S ₁	39
Tabla 3. Resultados de DLS en S ₂	41
Tabla 4. Resultados de DLS en S ₃	42
Tabla 5. Comportamiento de D _{h1} de S ₃ en función del tiempo	45
Tabla 6. Comportamiento de D _{h2} de S ₃ en función del tiempo	45
Tabla 7. Análisis de PEG ₅₀₀₀	52
Tabla 8. D _{h1} de PEG ₅₀₀₀ en función del tiempo	54
Tabla 9. D _{h2} de PEG ₅₀₀₀ en función del tiempo	54
Tabla 10. D _{h3} de PEG ₅₀₀₀ en función del tiempo	55
Tabla 11. Resultados del análisis de β CD	59
Tabla 12. D _{h1} de β CD en función del tiempo	61
Tabla 13. D _{h2} de β CD en función del tiempo	61
Tabla 14. D _{h3} de β CD en función del tiempo	62
Tabla 15. β CDPEG ₅₀₀₀ en agua a 37.4°C	65
Tabla 16. β CDPEG ₅₀₀₀ en agua a 42.4°C	67
Tabla 17. D _h de β CDPEG ₅₀₀₀ en pH neutro	70
Tabla 18. Cambios en el D _h de β CDPEG ₅₀₀₀ en pH alcalino	72
Tabla 19. Cambios en el D _h de β CDPEG ₅₀₀₀ en pH ácido	74
Tabla A1-1. D _h de S ₁ en función del tiempo	85
Tabla A1-2. D _{h1} de S ₂ en función del tiempo	86
Tabla A1-3. D _{h2} de S ₂ en función del tiempo	87
Tabla A1-4. D _h de MF en el primer día de análisis	88
Tabla A1-5. D _{h1} de MF en función del tiempo	90
Tabla A1-6. D _{h2} de MF en función del tiempo	90
Tabla A1-7. D _{h3} de MF en función del tiempo	91
Tabla A2-1. D _h de MFT en agua a 37.4°C	93
Tabla A2-2. D _h de MFT en agua a 42.3°C	94
Tabla A2-3. D _h de PT en agua a 37.4°C	96
Tabla A2-4. D _h de PT en agua a 42.3°C	97
Tabla A3-1. D _h de soluciones buffer con distintos valores de pH	99
Tabla A3-2. D _h de MFpH7.4	100
Tabla A3-3. D _h de MFpH8.0	101
Tabla A3-4. D _h de MFpH3.8	102

I. Introducción.

Para entender el comportamiento de las nanopartículas primero es necesario definir la ciencia que las estudia, la nanotecnología, la cual trata del conjunto de disciplinas enfocadas al estudio, manipulación y control de átomos y moléculas para crear sistemas con propiedades únicas que se pueden aplicar en diversas áreas.

La nanomedicina se define como la aplicación de la nanotecnología en el área de la salud. Utiliza lo mejorado y, a menudo, novedoso de las propiedades físicas, químicas y biológicas de los materiales a escala nanométrica. La nanomedicina tiene un impacto potencial sobre la prevención, el diagnóstico temprano y confiable, además del tratamiento de enfermedades (Boisseau and Loubaton, 2011). Por lo tanto, la nanomedicina estudia a las nanopartículas, definiéndolas como partículas sólidas y coloidales con tamaños en el rango de 10 nm a <1000 nm; sin embargo, para aplicaciones prácticas, el tamaño preferencial es inferior a 200 nm (Rizvi and Saleh, 2018).

Algunos hallazgos indican que el tamaño a nanoescala sumado con el arreglo espacial y la naturaleza del material brindan propiedades únicas de diferentes índoles: ópticas, térmicas, mecánicas, magnéticas y catalíticas. El desarrollo a nanoescala permite aprovechar propiedades físicas diferentes a las observadas a microescala, como la relación volumen/superficie, debido al tamaño increíblemente pequeño de las partículas su superficie está más expuesta a ser reconocida por alguna molécula biológica.

Para el desarrollo de nanopartículas se necesitan nanomateriales y para que en conjunto formen un sistema funcional es necesario considerar algunos aspectos:

- 1) Para que un nanomaterial sea considerado como tal, al menos una de sus dimensiones debe encontrarse entre 1-100nm.
- 2) El arreglo y organización espacial de los átomos y moléculas al combinarse deben formar una estructura estable.

- 3) La composición y forma de los nanomateriales, puede ser: orgánica, inorgánica, derivada del carbono o una combinación de estas. Pueden tener forma de gusanos, hojuelas, alambres, esferas, etc.

Estos tres factores permiten desarrollar nanopartículas en áreas como la medicina, por ejemplo, los nanomateriales poliméricos que se usan como transportadores de fármacos muestran un buen potencial para la modificación de superficies mediante transformaciones químicas lo cual, proporciona un excelente control farmacocinético siendo adecuados para administrar y liberar de forma más eficiente una amplia gama de agentes terapéuticos que ya están siendo utilizados por sus buenos resultados en las formulaciones de medicamentos innovadores a nanoescala (Venditti, 2017).

Otras características importantes que se deben tomar en cuenta son: el tamaño y la forma de las nanopartículas, se ha observado que el tamaño influye en el rendimiento de las formulaciones, sin embargo, la manipulación de las características de la superficie brinda la oportunidad de generar sistemas ideales. Además, el tamaño de la partícula debe ser lo suficientemente “grande” para evitar fugas en los capilares sanguíneos y además “sigilosos” para no ser susceptibles a la depuración por los macrófagos (Rizvi and Saleh, 2018). Así, la nanomedicina pretende usar las propiedades y características físicas de los nanomateriales para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades a nivel molecular. Con base en lo anterior, se han dividido las áreas de investigación y desarrollo de estos sistemas. Existen cuatro principales áreas: terapia, diagnóstico, teranóstico y medicina regenerativa.

1. Terapia.

La terapia incluye esencialmente los sistemas de liberación de fármacos. Se propone que los sistemas de liberación se deben desarrollar para identificar el sitio blanco, el cual puede ser un órgano, una célula, un compartimento celular (núcleo, citoplasma) o incluso, un organelo, además existe un enfoque en el transporte y entrega de fármacos de manera controlada y en respuesta a un estímulo interno (pH, presencia de enzimas o un cambio del potencial redox) o externo (luz,

temperatura, campo magnético) y podrán transportar simultáneamente varios fármacos y/o biomacromoléculas (péptidos, proteínas y ácidos nucleicos) (Rojas-Aguirre et al., 2016).

2. Diagnóstico.

Esta rama de la nanomedicina se enfoca en el diseño de nano dispositivos con la finalidad de identificar una enfermedad a nivel celular o molecular por medio de nanosistemas de imagen o nano biosensores, los cuales pueden contener un componente biológico capaz de detectar en tiempo real y con una alta sensibilidad un analito determinado (Duncan y Gaspar, 2011).

El nanodiagnóstico tiene múltiples aplicaciones en análisis genómicos, proteómicos y de diagnóstico molecular. Algunas de la tecnologías con aplicaciones potenciales en el diagnóstico molecular son los nanochips, nano arreglos, nanopartículas (NP de oro), quantum dots (QD), nano poros, nanomáquinas de DNA, nanosensores, nano cables, resonancia de dispersión de luz (Mishra et al., 2017).

El diagnóstico puede ser *ex vivo*, dónde se utilizan herramientas o instrumentos para la detección de cualquier patología o padecimiento en donde no debe haber invasión al organismo y también existe el diagnóstico *in vivo* en dónde las nanopartículas capaces de reconocer estructuras o sustancias para emitir un diagnóstico deben ser administradas.

3. Terapia y diagnóstico (teranósticos).

En los teranósticos se busca diseñar y aplicar nanomateriales que identifiquen una patología y liberen moléculas terapéuticas simultáneamente y de manera controlada (Rojas-Aguirre et al., 2016).

Recientemente, las nanopartículas terapéuticas pueden usarse tanto para tratamientos como para diagnósticos. Esta estrategia se ha realizado en muchas clases de nanopartículas, incluyendo conjugados de fármacos, dendrímeros, micelas y vesículas, partículas de núcleo-coraza y nanotubos de carbono.

Combinando el fármaco y el agente de imagen en una formulación inteligente diferente, haciendo posible monitorear la ruta y la localización de estas nanopartículas en el sitio objetivo, así como la acción del fármaco para evaluar la respuesta terapéutica (Rizvi and Saleh, 2018).

4. Medicina regenerativa.

La medicina regenerativa es el proceso de creación de tejidos vivos y funcionales, para reparar o reemplazar la función del tejido u órgano perdida debido a la edad, enfermedad, daño o defectos congénitos. Este campo tiene busca regenerar tejidos y órganos dañados en el cuerpo estimulando órganos previamente irreparables para que se curen por sí solos.

Se conocen nanopatrones de superficie para obtener respuestas biológicas específicas en el tejido del huésped. Los biomateriales futuros deben mejorar simultáneamente la regeneración tisular mientras se minimizan las respuestas inmunes e inhiben la infección (Boisseau et al., 2011).

En la medicina regenerativa, existe una gran necesidad de desarrollar materiales que señalicen las células de manera efectiva, administren o se unan a agentes bioactivos in vivo a tasas controladas, tengan propiedades mecánicas altamente ajustables, pero al mismo tiempo, puedan biodegradarse de manera segura y rápida después de cumplir su función (Boekhoven and Stupp, 2014).

Las ciclodextrinas, que son macrociclos formados por unidades de glucopiranososa, han jugado un papel importante en la evolución de la nanomedicina, ya que se han explorado ampliamente para el desarrollo de nanosistemas de liberación de fármacos, de sistema de diagnóstico e incluso de nanosistemas para medicina regenerativa (Webber et al., 2015).

Este trabajo consistió en el estudio de β CDs modificadas con polietilenglicol (PEG) en cuanto a su capacidad de ensamblaje, como parte del estudio del potencial de las β CDs pegiladas en el campo de la nanomedicina.

II. Marco teórico.

2.1. Sistemas de liberación de fármacos.

2.1.1. Ciclodextrinas (CDs).

Cuando el almidón se degrada por la ciclo-maltodextrina-glucosil-transferasa, la hélice de amilosa es hidrolizada formando un oligosacárido cíclico llamado ciclodextrina (CD). Las unidades de glucosa están unidas por enlaces α -1,4-glucosídicos y la conformación de silla de las unidades de glucopiranosas hace que la molécula de CD tenga forma de cono truncado, en el que los grupos hidroxilo (OH) secundarios se extienden desde el borde más ancho, mientras que los grupos primarios quedan localizados en el borde estrecho. En soluciones acuosas estos grupos hidroxilo forman enlaces de hidrógeno con agua, lo que hace que los CD sean relativamente solubles en agua (Kurkov and Loftsson, 2013).

Los CD naturales más abundantes contienen seis (α CD), siete (β CD) u ocho (γ CD) unidades de glucopiranosas. Aunque las CDs naturales y sus complejos pueden ser hidrofílicos hasta cierto punto, es importante señalar que la solubilidad acuosa es un tanto limitada, especialmente la de β CD. Esto se debe a la unión relativamente fuerte de las moléculas de CD en el estado cristalino (es decir, por la alta energía de red cristalina), y el enlace de hidrógeno intramolecular dentro la molécula CD, evitando su formación de enlaces de hidrógeno con moléculas de agua circundantes.

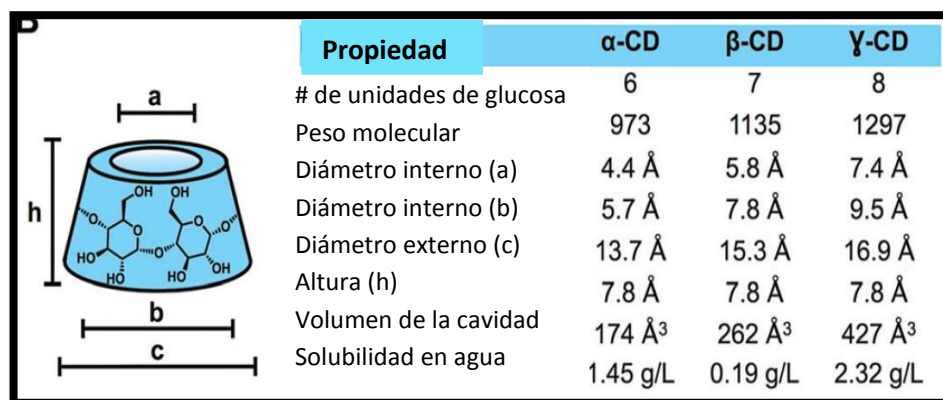


Fig. 1. Características de las CDs (Webber and Langer, 2017).

El análisis de la estructura cristalina ha demostrado que la estructura cíclica de la molécula CD se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno intramoleculares entre los grupos OH secundarios en la posición C (2) y C (3) (carbono 2 y 3) de las unidades de glucopiranosas adyacentes. Los grupos OH secundarios asumen orientaciones definidas, pero los grupos OH primarios son bastante flexibles y pueden girar alrededor del enlace C (5) –C (6).

Otra característica de la estructura de las CDs es la cavidad central lipofílica que les permite formar complejos de inclusión del tipo huésped/anfitrión. La cavidad central lipofílica es comparable con una solución etanólica acuosa.

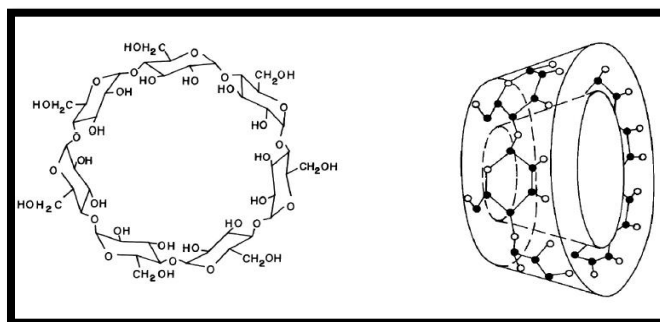


Fig. 2. Estructura química y forma cónica de la molécula de β -ciclodextrina (Loftsson, 2002).

Debido a la capacidad de formar complejos de inclusión, las CDs ya se utilizan exitosamente en formulaciones farmacéuticas, principalmente aprobadas por agencias regulatorias en los EUA, de EU y en Japón (Kurkov and Loftsson, 2013).

2.1.2. Modificación química de β CDs.

Como ya se mencionó, la limitada solubilidad acuosa de las ciclodextrinas se atribuye a la presencia de enlaces de hidrógeno intermoleculares relativamente fuertes en el estado cristalino de las moléculas. Debido a esto, se ha investigado la solubilidad de las CDs naturales, así como su toxicidad al ser administradas por vía parenteral. Para superar esta limitante, muchos investigadores han intentado identificar, preparar y evaluar derivados de ciclodextrinas con interés farmacéutico (Jambhekar and Breen, 2016).

Las ciclodextrinas naturales, en particular la β -ciclodextrina (β CD), tiene solubilidad limitada (18.5 mg/mL), esto es debido a los agregados formados en medio acuoso (Jambhekar and Breen, 2016). La sustitución de un hidrógeno proveniente del grupo hidroxilo resulta en una mejora dramática de su solubilidad acuosa. Además, se ha demostrado que muchos derivados de CD modificados hidrofóbicamente poseen actividad superficial y una tendencia débil o fuerte a la autoagregación dependiente tanto de la estructura de la CD como de la concentración de la muestra dando lugar a sistemas tipo micela (Kurkov and Loftsson, 2013).

La adición de pequeñas cantidades de polímeros solubles en agua al medio de complejación, incrementa la solubilidad de los agregados formados. De manera análoga, la adición de sales, como el acetato de sodio, pueden mejorar la solubilidad de complejos CD-fármaco (Jambhekar and Breen, 2016).

2.1.3. Agregados de β CD.

Las CDs son químicamente muy versátiles y se pueden modificar en la cara primaria o secundaria con diversos tipos de moléculas, para dar lugar a bloques de construcción o a sistemas supramoleculares auto ensamblables. A este respecto, una de las modificaciones que se ha explorado es la modificación de

CDs con componentes hidrofóbicos para dar lugar a sistemas anfífilicos basados en CDs que, bajo condiciones determinadas, se podrán auto ensamblar (Kurkov and Loftsson, 2013). Dependiendo del balance entre las características hidrofóbicas e hidrofílicas, los agregados supramoleculares pueden ensamblarse espontáneamente en un rango determinado de concentraciones en medio acuoso. El proceso de agregación en el autoensamblaje puede depender también del medio solvente, de la temperatura y de otros factores. Además, es posible dar lugar a diferentes tipos de nanoensamblados supramoleculares (Figura 3) (vesículas, micelas, nano esferas, y otros tipos de nanopartículas y estructuras líquidas cristalinas) (Zerkoune et al., 2014).

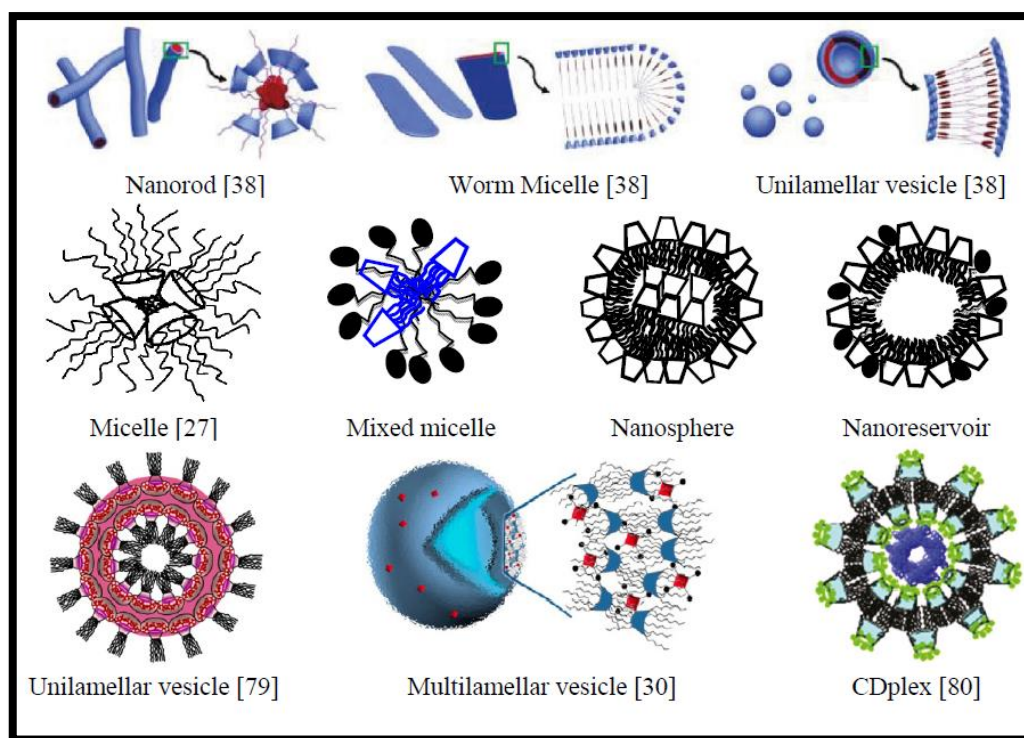


Fig. 3. Nanosistemas formados por el autoensamblaje de CDs anfífilicos (Zerkoune et al., 2014) .

El balance entre el equilibrio de cadenas hidrofóbicas e hidrofílicas conjugadas en uno o ambos lados del macrociclo de la ciclodextrina es crucial en la modulación

de lipofilicidad, en la eficiencia de la internalización celular y en la citotoxicidad. La combinación entre la habilidad de los derivados de ciclodextrina en la formación de suspensiones coloidales junto con la capacidad de formar complejos de inclusión con fármacos hidrofóbicos ha distinguido a estos sistemas como herramientas valiosas para la encapsulación de fármacos (Zerkoune et al., 2014).

El autoensamblaje de moléculas de CD puede ser usado a favor en el diseño de sistemas de liberación de fármacos con la finalidad de seleccionar un tamaño determinado de partícula, brindarle estabilidad al sistema y también brindarle una forma y estructura determinadas. Además de que los sistemas auto ensamblables pueden ser muy sensibles a pequeños cambios en el entorno, por lo que se consideran con gran potencial para diseñar sistemas de liberación controlada. Sin embargo, a pesar de la estabilidad de sus agregados las fuerzas de cohesión involucradas en el autoensamblaje sobre todo de derivados de CD son más débiles que las involucradas en las moléculas nativas de CD y los agregados podrían colapsar fácilmente bajo condiciones desfavorables como las altas temperaturas, agitación intensa y sonicación (Messner et al., 2010a). Por lo tanto, el diseño de derivados de CDs con capacidad de autoensamblaje adecuado para la liberación de un fármaco sigue siendo una necesidad.

2.1.4. Polietilenglicol (PEG)

El polietilenglicol (PEG) (Figura 4) ha sido ampliamente utilizado en el campo de la nanomedicina debido a sus propiedades excepcionales de biocompatibilidad, hidrofiliicidad, entre otras.

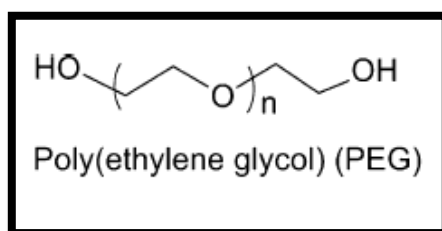


Fig. 4. Estructura química de PEG (Li et al., 2013).

La estrategia de conjugar cadenas de PEG a distintas entidades nanométricas (poliméricas, lipídicas, nanopartículas metálicas o nanomateriales de carbono) se

conoce como pegilación. Esta estrategia es ampliamente usada en la modificación de proteínas con PEG para aumentar la solubilidad en medio acuoso, el tiempo en circulación y evitar la degradación (Knop et al., 2010).

La pegilación (Figura 5) proporciona una estrategia factible para mejorar el índice terapéutico de fármacos (moléculas pequeñas) y de biomacromoléculas. Puede aumentar efectivamente la solubilidad de los compuestos insolubles en agua, disminuir la toxicidad, generar un perfil farmacocinético deseado y mejorar la acumulación en el sitio objetivo (Li et al., 2013).

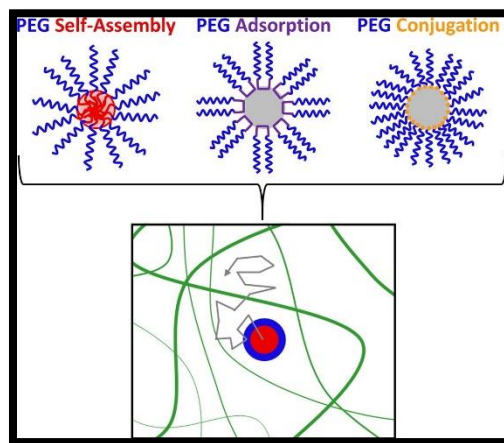


Fig. 5. Estrategias de pegilación (Huckaby and Lai, 2018).

La pegilación de los nano acarreadores de fármacos, es utilizada para (Knop et al., 2010) (Li et al., 2013):

1. Aumentar la solubilidad acuosa
2. Inhibir la opsonización, esto es el proceso de reconocimiento y marcaje de un patógeno para su ingestión y destrucción por un fagocito.
3. Favorecer la residencia prolongada en el cuerpo
4. Disminuir la degradación por enzimas metabólicas
5. Reducir o eliminar la inmunogenicidad de proteínas
6. Mejora de las funciones del nano acarreador

Al proveer de características que hacen funcionales a los nano acarreadores con cadenas de PEG como ligandos (linkers), en la conjugación con anticuerpos,

ligandos de reconocimiento, péptidos, ácidos nucleicos, marcadores fluorescentes, radio ligandos, etc., se pretende mejorar el diagnóstico, control y monitoreo de las nanoestructuras al interior del organismo (Rojas-Aguirre et al., 2016) así, la terapia estará más controlada y mejor dirigida.

El PEG muestra una alta solubilidad en disolventes orgánicos y, por lo tanto, las modificaciones a sus grupos funcionales finales son relativamente sencillas. Al mismo tiempo, PEG es soluble en agua y tiene una baja toxicidad intrínseca lo que lo hace un polímero ideal y adecuado en aplicaciones biológicas. Cuando se encuentra unido a fármacos hidrofóbicos o acarreadores, la hidrofilia de PEG aumenta su solubilidad en medio acuoso. Esto le proporciona al fármaco mejores propiedades físicas y estabilidad térmica, así como la prevención y reducción de la agregación de fármacos *in vivo* y durante su almacenamiento (Knop et al., 2010).

Los sistemas basados en polímeros, en este caso PEG, son prometedores en el campo de la nanotecnología, ya que se pueden producir con una variedad de funcionalidades químicas, fácilmente modificadas post-sintéticamente, a gran escala y procesadas en diferentes formas, tales como películas, soluciones, sólidos, entre otros. De hecho, estímulos externos tales como pH, temperatura, potencial redox, luz pueden inducir variaciones en la densidad, transparencia y conductividad, volumen (o grado de hinchamiento) o capacidad de absorción de disolvente de los materiales poliméricos adecuadamente funcionalizados (Venditti, 2017).

2.2. Tamaño y forma de los nanosistemas de liberación.

La característica esencial de los nanomateriales es que sus propiedades físicas y químicas dependen del tamaño, lo que hace posible diseñar las propiedades del material no sólo por su composición química, sino también adaptando el tamaño y la forma de las nanoestructuras, como la forma en que cada bloque (átomos o nanopartículas más pequeñas) se ensambla (de Mello Donegá, 2014).

En la nanoescala (≤ 100 nm), las propiedades intrínsecas de los materiales sólo dependen del tamaño y pueden ser sorprendentemente diferentes de las de sus contrapartes macroscópicas (en masa), por ejemplo, la relación superficie/volumen aumenta conforme decrece el tamaño de las nanopartículas (los átomos localizados en la superficie se ven incrementados) y las dimensiones limitadas conducen a efectos de confinamiento espacial que pueden afectar muchas de sus propiedades. El aumento en la relación de superficie a volumen tiene un impacto dramático en varias propiedades, ya que los átomos de superficie son significativamente diferentes de los del interior de la partícula. Como resultado, los átomos de la superficie tienen una mayor energía libre, mayor reactividad y movilidad. En consecuencia, a medida que el tamaño de la NP (nanopartícula) disminuye gradualmente, la contribución de los átomos de la superficie a la energía libre total y las propiedades de la NP aumentan progresivamente, lo que provoca un cambio en varias de sus propiedades: la disminución de la temperatura de fusión y evaporación, la reactividad, elasticidad y la plasticidad aumentan. Además, también incrementa la capacidad de las NPs para formar dispersiones coloidales estables, ya sea por carga o por estabilización estérica (de Mello Donegá, 2014).

Además, es importante saber que el tamaño y gran área de superficie, las nanopartículas de fármacos muestran un aumento de la solubilidad y, por lo tanto, una mayor biodisponibilidad, capacidad adicional para cruzar la barrera hematoencefálica (BBB), es decir, el tamaño y la forma de la nanopartícula determinan su destino biológico, porque estas características dictaminan como el cuerpo la identifica, orienta y distribuye (Rizvi and Saleh, 2018).

Entonces, si se controlan los materiales en la formulación, forma (estructura) y tamaño de las NPs, es muy probable que exista una terapia más dirigida, lo que lleva a la disminución de efectos secundarios (incluso tóxicos) y al aumento de la eficacia en el tratamiento de enfermedades.

2.3. Determinación de tamaño y forma de las nanopartículas.

Existen métodos directos e indirectos. Los primeros corresponden a la microscopía electrónica, básicamente, la microscopía electrónica de barrido (SEM) y la microscopía electrónica de transmisión (TEM). Dentro de los segundos se encuentra una técnica conocida como dispersión dinámica de luz (DLS).

2.3.1. Dispersión dinámica de luz (DLS).

DLS (Figura 6) es una técnica fisicoquímica empleada para la determinación de la distribución del tamaño de partícula en suspensión o macromoléculas en solución tales como proteínas o polímeros mediante luz láser que al alcanzar las numerosas partículas que hay en una suspensión, se dispersa en todas las direcciones posibles.

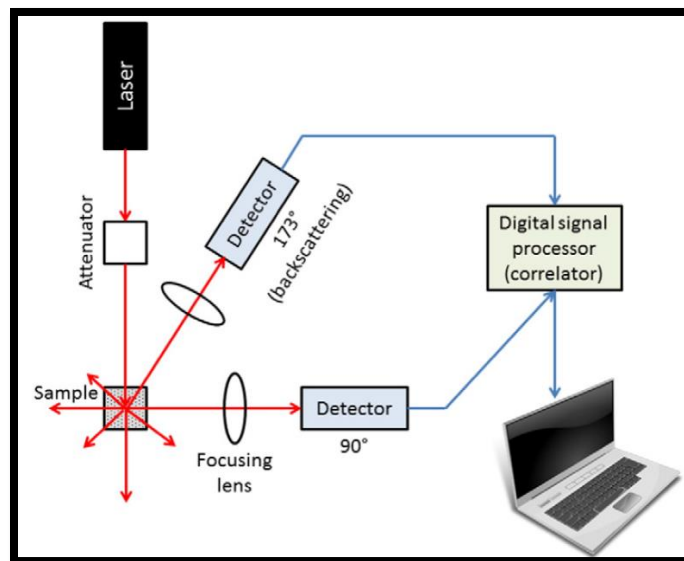


Fig. 6. Instrumentación de DLS (Bhattacharjee, 2016).

Los haces de luz dispersados por distintas partículas interfieren entre sí y se obtiene una intensidad de dispersión determinada (Pimentel and Martín-martínez, 2014). Como consecuencia del movimiento browniano las posiciones relativas de las partículas varían constantemente entre sí, cosa que también provoca cambios en las condiciones de interferencia y en la propia intensidad de dispersión. Si las partículas se mueven rápidamente (partículas pequeñas), también se acelera la variación de la intensidad de dispersión. Por el contrario, las partículas lentas (grandes) llevan a variaciones de menor movimiento. El término "dinámica" no se refiere al movimiento de la muestra como un conjunto, sino a la "vibración" de las partículas que la componen (Pimentel and Martín-martínez, 2014).

Aunque el tamaño de partícula es el determinante primario del coeficiente de difusión medido, otros parámetros pueden intervenir en estas mediciones e influir en el tamaño medido, por ejemplo, la temperatura, la concentración, viscosidad y el índice de refracción del medio de dispersión (Berthely Cardoso & Rojano, 2016).

La técnica DLS utiliza las propiedades de dispersiones coloidales con el fin de deducir el radio hidrodinámico (R_h). El R_h es el radio de una esfera rígida hipotética que se difunde con la misma velocidad que las partículas analizadas bajo DLS (Figura 7). Por lo tanto, es una medida hipotética ya que tales esferas rígidas rara vez existen en dispersiones coloidales. El cálculo del R_h se realiza mediante la ecuación de Stokes-Einstein la cual involucra parámetros como la constante de Boltzmann, la viscosidad y la temperatura (Bhattacharjee, 2016).

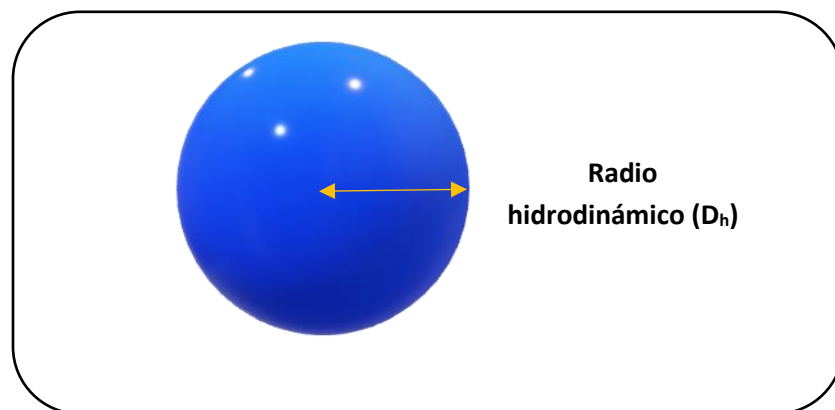


Fig. 7. Representación del R_h en una partícula esférica.

En los últimos años, dispersión de luz dinámica (DLS) se ha convertido en un método popular para abordar y comprender mejor el crecimiento de cristales, el inicio de la agregación o la nucleación de macromoléculas ya que es una técnica sensible para evaluar las interacciones macromoleculares y para detectar la formación de agregados en solución y caracterizar nanomateriales (Pimentel and Martín-martínez, 2014).

2.4. Planteamiento del problema.

Se ha demostrado que la β CD posee la capacidad de auto ensamblarse en agua. Por otra parte, la β CD, es muy versátil químicamente, lo cual le permite funcionar como bloque de construcción para formar estructuras supramoleculares de arquitecturas más complejas, lo anterior permite o no modificar la capacidad de formación de complejos de inclusión. Asimismo, estas arquitecturas pueden funcionar como plataformas de liberación de fármacos.

Entonces, ¿ β CDPEG₅₀₀₀ mantendrá la capacidad de autoensamblaje?. Si se ensambla, ¿de qué tamaño serán las estructuras? ¿las estructuras formadas serán influenciadas por un ambiente fisiológico?

2.5. Justificación.

Actualmente se encuentran disponibles poco más de 30 formulaciones farmacéuticas basadas en ciclodextrinas, en las que la β CD es la más empleada. Las modificaciones químicas a la β CD no solamente han generado derivados con una mejor solubilidad acuosa si no que han demostrado una capacidad de formación de complejos de inclusión optimizada. Además, han dado lugar a sistemas supramoleculares que pueden utilizarse para el desarrollo de nanosistemas de liberación controlada. De hecho, el sistema conocido como CALAA-01, fue el primero en llegar a evaluación clínica para tratamiento de cáncer. Este sistema consiste en β CD conjugada a un poli catión para liberar ARN en una célula cancerígena. Además, la cavidad de la β CD se encuentra formando un complejo de inclusión con un grupo adamantil (Ad) unido a una cadena de PEG para darle estabilidad coloidal al acarreador (Suzie and Davis, 2002). Otro ejemplo es CRLX101, una nanopartícula auto ensamblable construida a partir de β CD, Ad y PEG para la entrega localizada de camptotecina. CRLX101 es un nano agregado de aproximadamente 100 nm, tamaño que permite su acumulación de manera preferencial en células tumorales debido al efecto de permeabilidad aumentada, que se presenta en algunos procesos cancerígenos. Esta estructura

se encuentra en evaluación clínica fase II para cáncer renal, pulmonar, ovárico y leucemia (Clark et al., 2016) (Hare et al., 2017).

Como ya se mencionó, la pegilación es una estrategia que permite obtener nanosistemas sigilosos, con una mejor farmacocinética, una mejor solubilidad acuosa y además modificables. Es así, como en el grupo de investigación se sintetizan CDs pegiladas para estudiar su potencial como sistemas de liberación de fármacos. Uno de estos derivados es β CDPEG₅₀₀₀, compuesto de β CD enlazada a cadenas de PEG de 5 kDa conjugadas por medio de la modificación de los 7 hidroxilos primarios de la CD (Figura 8).

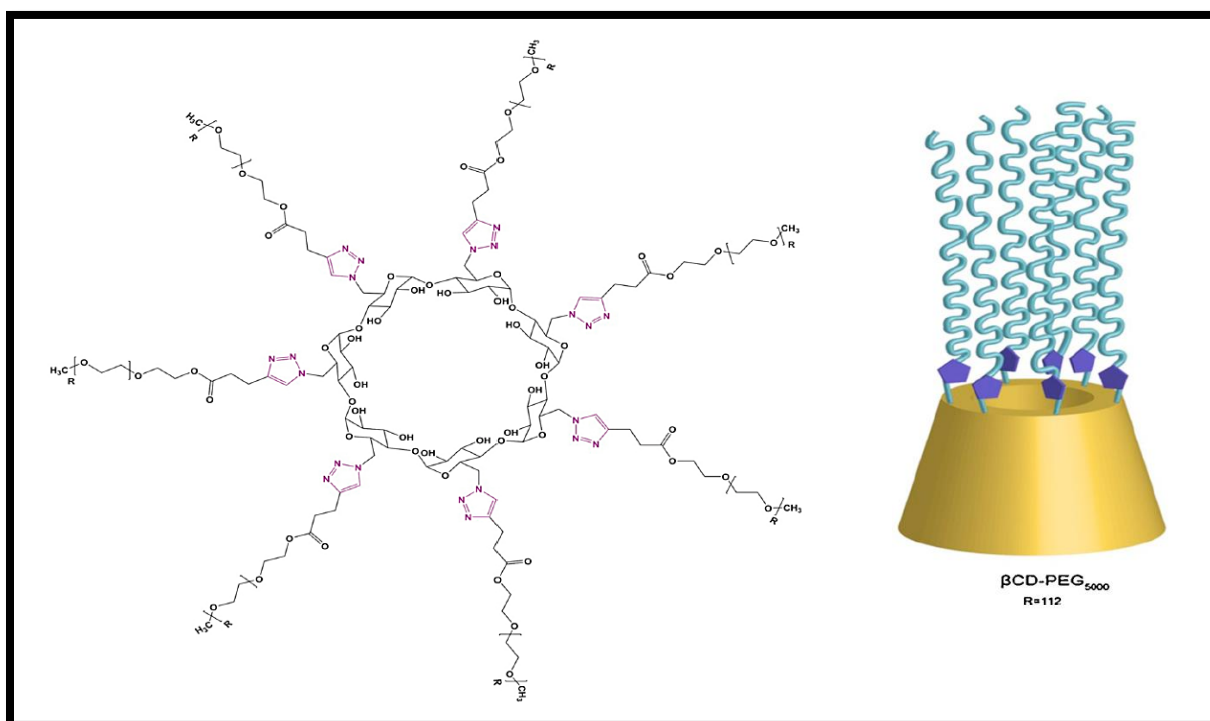


Fig. 8. Estructura química y representación de β CDPEG₅₀₀₀

(Rojas-Aguirre et al., 2019).

Pegilar la β CD tiene como finalidad aumentar su solubilidad acuosa y, en un futuro, funcionalizar el compuesto con ligandos de reconocimiento. Sin embargo, es preciso investigar el comportamiento de dicha estructura para determinar si efectivamente pudiera tener potencial como nano acarreador.

Uno de los aspectos a investigar es la capacidad de ensamblaje. Se mencionó que la β CD puede formar agregados en una arquitectura ordenada a determinadas concentraciones. Las modificaciones químicas de la β CD influirían de manera directa en el autoensamblaje, un proceso sumamente importante en el desarrollo de nanoacarreadores de liberación controlada. Por lo tanto, este trabajo se enfocó en la exploración de la capacidad de autoensamblaje de β CDPEG₅₀₀₀, como parte de un estudio sistemático de esta CD pegilada. Así mismo, en el tamaño de dichos ensamblados y en su estabilidad por medio de la técnica DLS.

2.6. Hipótesis.

Si la β CD forma ensamblados en disolución, entonces β CDPEG₅₀₀₀ también mostrará tendencia al ensamblaje, independientemente de su modificación con PEG.

Si existen asociaciones de β CDPEG₅₀₀₀ en medio acuoso, estas serán susceptibles a cambios en el entorno, como pH, temperatura y fuerza iónica.

2.7. Objetivo general.

Determinar la capacidad de ensamblaje de β CDPEG₅₀₀₀; investigar el tamaño de los agregados si es que se forman y evaluar la susceptibilidad de éstos a diferentes condiciones del medio.

2.8. Objetivos particulares.

Determinar por medio de DLS el tamaño de los agregados que forma β CDPEG₅₀₀₀ en medio acuoso a temperatura ambiente, en agua a 37°C y 42°C; a pH neutro, ácido y alcalino.

Correlacionar la información obtenida con la estabilidad del sistema β CDPEG₅₀₀₀ y su capacidad de ser utilizado como un sistema acarreador de fármacos.

III. Desarrollo experimental (metodología).

3.1. Materiales y equipos.

Equipos:

- Ultrasonic LC 20H
- Microtrac, Nanotrac Wave
Particle Size & Zeta Potential Analyzer (DLS)
- Potenciómetro 440 pH Meter, Corning (R)

Reactivos:

- β -ciclodextrina, polietilenglicol 5kDa de Sigma Aldrich (99% de pureza).
- PBS (Phosphate-Buffered Saline) Tablets de Thermo Fisher Scientific

3.2. Preparación de muestras.

Para la preparación de las disoluciones se utilizó agua destilada y desionizada proporcionada por el departamento de Polímeros del IIM.

Muestra 1: β CDPEG₅₀₀₀ (10 mM)

$$\frac{900\text{mg de } \beta\text{CDPEG}_{5000}}{2.5\text{ mL}} \times \frac{1\text{mmol de } \beta\text{CDPEG}_{5000}}{36946.51\text{mg de } \beta\text{CDPEG}_{5000}} = 9.74 \times 10^{-3} \text{ mmol/mL} \cong 1.0 \times 10^{-2} \text{ M}$$

Muestra 2: β CDPEG₅₀₀₀ (5 mM)

$$\frac{(1.25\text{mL de } \beta\text{CDPEG5000}) (9.74 \times 10^{-3} \text{ M})}{2.5 \text{ mL}} = 4.87 \times 10^{-3} \text{ mmol/mL} \cong 5.0 \times 10^{-3} \text{ M}$$

Muestra 3: βCDPEG_{5000} (0.5 mM)

$$\frac{93\text{mg de } \beta\text{CDPEG5000}}{5 \text{ mL}} \times \frac{1\text{mmol de } \beta\text{CDPEG5000}}{36946.51\text{mg de } \beta\text{CDPEG5000}} = 5.03 \times 10^{-4} \text{ mmol/mL} \cong 5.0 \times 10^{-4} \text{ M}$$

Muestra 4: PEG₅₀₀₀ (5 mM)

$$\frac{702\text{mg de PEG5000}}{4\text{mL}} \times \frac{1\text{mmol de PEG5000}}{(5010.83\text{mg})(7) \text{ de PEG5000}} = 5.0 \times 10^{-3} \text{ mmol/mL (M)}$$

Muestra 5: PEG₅₀₀₀ (0.5 mM)

$$\frac{70.2\text{mg de PEG5000}}{4\text{mL}} \times \frac{1\text{mmol de PEG5000}}{(5010.83\text{mg})(7) \text{ de PEG5000}} = 5.0 \times 10^{-4} \text{ mmol/mL (M)}$$

Muestra 6: β -ciclodextrina (βCD), 5 mM

$$\frac{22.3\text{mg de } \beta\text{CD}}{4\text{mL}} \times \frac{1\text{mmol de } \beta\text{CD}}{1134.98\text{mg de } \beta\text{CD}} = 4.91 \times 10^{-3} \text{ mmol/mL} \cong 5.0 \times 10^{-3} \text{ M}$$

Muestra 7: β -ciclodextrina (βCD), 0.5 mM

$$\frac{2.2\text{mg de } \beta\text{CD}}{4\text{mL}} \times \frac{1\text{mmol de } \beta\text{CD}}{1134.98\text{mg de } \beta\text{CD}} = 4.85 \times 10^{-4} \text{ mmol/mL} \cong 5.0 \times 10^{-4} \text{ M}$$

Muestra 8-Mezcla física: β -CD (0.5 mM) y PEG₅₀₀₀ (0.5 mM)

$$\frac{2.2\text{mg de } \beta\text{CD}}{4\text{mL}} \times \frac{1\text{mmol de } \beta\text{CD}}{1134.98\text{mg de } \beta\text{CD}} = 4.85 \times 10^{-4} \text{ mmol/mL} \cong 5.0 \times 10^{-4} \text{ M de } \beta\text{CD}$$

$$\frac{70.2\text{mg de PEG5000}}{4\text{mL}} \times \frac{1\text{mmol de PEG5000}}{(5010.83) (7)\text{mg de PEG5000}} = 5.0 \times 10^{-4} \text{ mmol/mL (M) de PEG}_{5000}$$

Muestra 15: Solución buffer de acetatos (SBA), pH= 3.75

$$\frac{1.0007\text{g de CH}_3\text{COONa}}{100\text{mL}} = 0.01007 \text{ g/mL}$$

Se ajustó el pH a 3.75 con 5mL de ácido acético glacial.

Para la medición del tamaño se utilizaron únicamente 4mL de la disolución anterior.

Muestra 16: Solución buffer de fosfatos (SBP), pH= 7.39

Se disolvió 1 tableta amortiguadora en 200mL de agua, el pH fue ajustado utilizando una disolución de NaOH (0.2M). Cada tableta contiene 0.01M de buffer de fosfatos, 0.0027M de KCl y 0.137M de NaCl, a 37°C.

Para la medición del tamaño se utilizaron únicamente 4mL de la disolución anterior.

Muestra 17: Solución buffer de fosfatos (SBP), pH=8.02

Se tomaron 100mL de la muestra 18 y se ajustó el valor de pH con una disolución 0.2M de NaOH previamente preparada.

Muestra 18: β CDPEG₅₀₀₀ en solución buffer de fosfatos (pH=7.39)

$$\frac{55.4\text{mg de } \beta\text{CDPEG5000}}{3\text{mL}} \times \frac{1\text{mmol de } \beta\text{CDPEG5000}}{36946.51 \text{ mg de } \beta\text{CDPEG5000}} \times \frac{1000\text{mL}}{1\text{L}} = 0.500 \text{ mmol/L (mM)} \cong$$

$$5.0 \times 10^{-4} \text{M}$$

Muestra 19: β CDPEG₅₀₀₀ en solución buffer de fosfatos (pH=8.02)

$$\frac{55.1\text{mg de } \beta\text{CDPEG5000}}{3\text{mL}} \times \frac{1\text{mmol de } \beta\text{CDPEG5000}}{36946.51 \text{ mg de } \beta\text{CDPEG5000}} \times \frac{1000\text{mL}}{1\text{L}} = 0.497 \text{ mmol/L (mM)} \cong 5.0 \times 10^{-4} \text{M}$$

Muestra 20: β CDPEG₅₀₀₀ en solución amortiguadora de acetatos (pH=3.75)

$$\frac{55.6\text{mg de } \beta\text{CDPEG5000}}{3\text{mL}} \times \frac{1\text{mmol de } \beta\text{CDPEG5000}}{36946.51\text{ mg de } \beta\text{CDPEG5000}} \times \frac{1000\text{mL}}{1\text{L}} = 0.502\text{ mmol/L (mM)} \cong 5.0 \times 10^{-4}\text{M}$$

- Preparación de la disolución de NaOH (0.2M)

$$0.1\text{ L} \times \frac{0.2\text{mol de NaOH}}{\text{L}} \times \frac{40\text{g de NaOH}}{1\text{mol de NaOH}} = 0.8\text{ g de NaOH,}$$

Se pesaron 0.794g de NaOH y se disolvieron en 100mL de agua destilada.

$$\frac{0.794\text{g de NaOH}}{100\text{mL}} \times \frac{1\text{mol de NaOH}}{40\text{g de NaOH}} \times \frac{1000\text{mL}}{1\text{L}} = 0.2\text{ M}$$

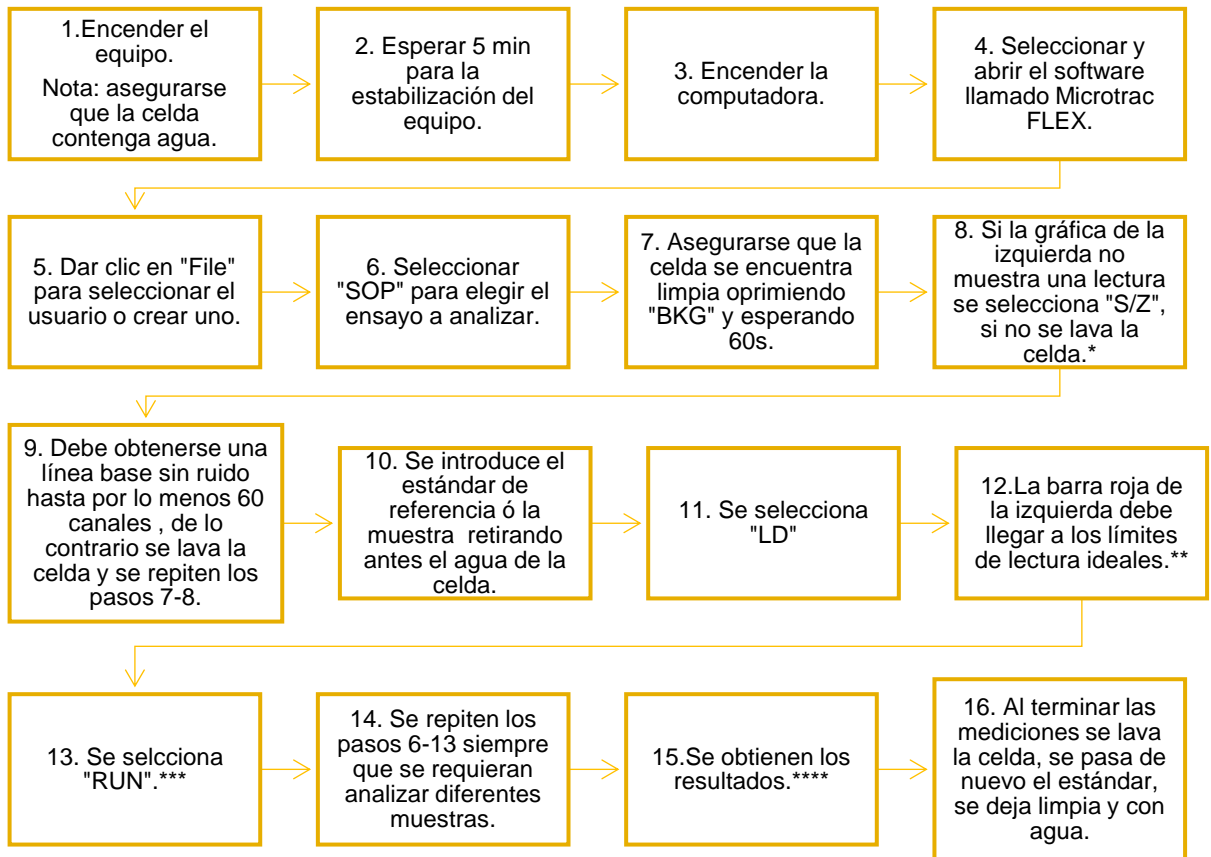
3.3. Medición del tamaño de partícula mediante DLS.

Instrumento:

Dispersión dinámica de luz (DLS).

Marca: Nanotracs Wave de Microtracs

Diagrama de flujo del procedimiento de medición.



*: Para la limpieza de la celda se retira el agua contenida con cuidado de no tocar los diodos, luego se agrega agua hasta la marca repitiendo lo anterior por lo menos 3 veces y se selecciona "S/Z" para asegurar la limpieza total.

** : Si no sucede lo anterior la celda debe lavarse y colocar de nuevo la muestra o preparar otra más o menos concentrada dependiendo el caso.

***: Se etiqueta el ensayo con las condiciones correspondientes.

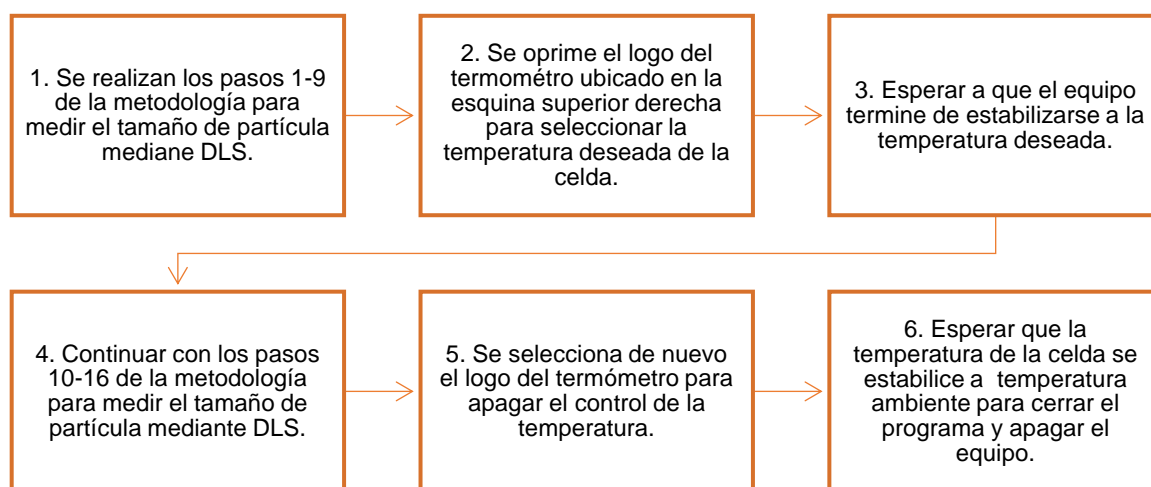
****: Se repiten los pasos 10-12 las veces que sean necesarias.

Para las mediciones realizadas se utilizó un estándar de referencia de Poliestireno (100 nm), cada muestra analizada se corrió por sextuplicado dejando transcurrir 7 min durante cada medición. Con el objetivo de obtener resultados más precisos

para cada muestra y obtener un margen más amplio de análisis, así como, para evitar errores durante las mediciones.

Todas las muestras medidas fueron filtradas 20 h, previas a su medición con un filtro de 0.45 μm (Chromafil Xtra). Para el caso de la β -ciclodextrina, antes de la filtración la muestra disuelta mediante sonicación durante 1 o 2 min utilizando el instrumento: Ultrasonic LC 20H.

Para las mediciones a las temperaturas de $37\pm 0.4^\circ\text{C}$ y $42\pm 0.4^\circ\text{C}$ fue necesario ajustar el equipo mediante una serie de pasos que siguen a continuación:



Para la medición del tamaño de las asociaciones de βCDPEG_{5000} a las distintas temperaturas se preparó una muestra con una concentración de 0.11mM, la cual fue medida a las 24 horas posteriores desde su preparación.

3.4. Calibración del equipo.

Para las mediciones realizadas se utilizó un estándar de referencia de Poliestireno, con una concentración de 0.1% y 100 nm de diámetro hidrodinámico (D_h). El estándar fue usado con la finalidad de conocer el estado del equipo y su

buen funcionamiento, antes y después de analizar una muestra se midió el estándar por sextuplicado. La Figura 9., muestra las distribuciones obtenidas de la medición del estándar de poliestireno de 100 nm (0.1%).

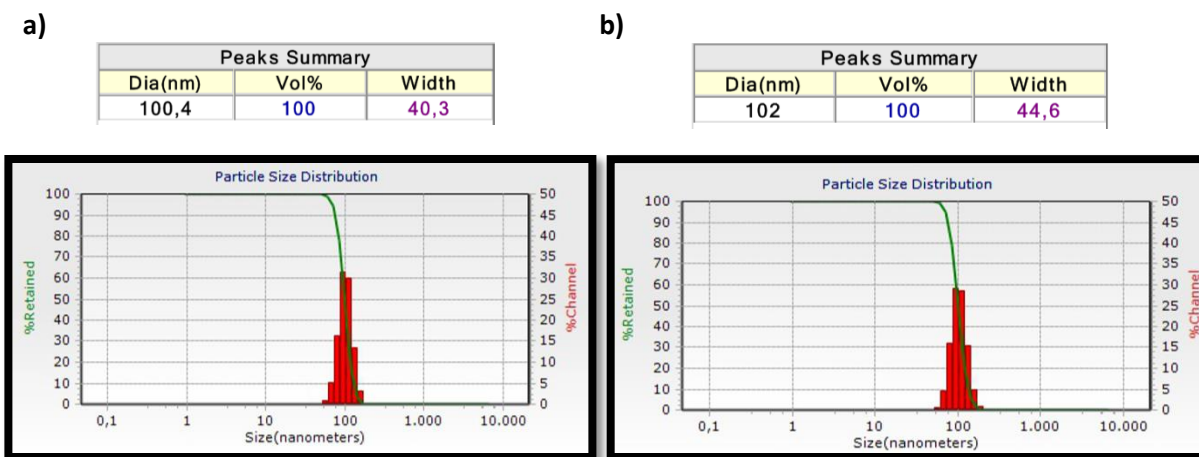


Fig. 9. Estándar de poliestireno de 100 nm.

a) antes de la medición de la muestra y b) al final del ensayo.

IV. Resultados y discusión.

Los resultados aquí presentados se expresan en términos del diámetro hidrodinámico (D_h), parámetro que arroja el equipo de DLS. Debido a que se asume que β CDPEG₅₀₀₀ adopta una forma esférica, el D_h se establece como el tamaño de dicha esfera. Por lo tanto, los términos D_h y tamaño se utilizarán de manera equivalente en este trabajo (Figura 10).

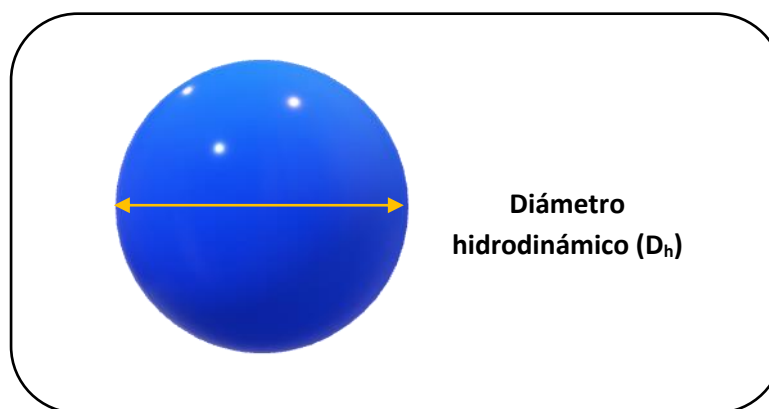


Fig. 10. Representación del D_h en una partícula esférica.

En la mayoría de las muestras se observaron distintas poblaciones, cada una con su respectivo valor de D_h . La proporción en que se presenta cada población se expresa cómo %Vol.

Para facilitar el análisis de los datos en este trabajo, la población que se encuentra en mayor proporción se nombrará como D_{h1} mientras que la población que se encuentra en menor proporción se identificará como D_{h2} y así sucesivamente (Figura 11).

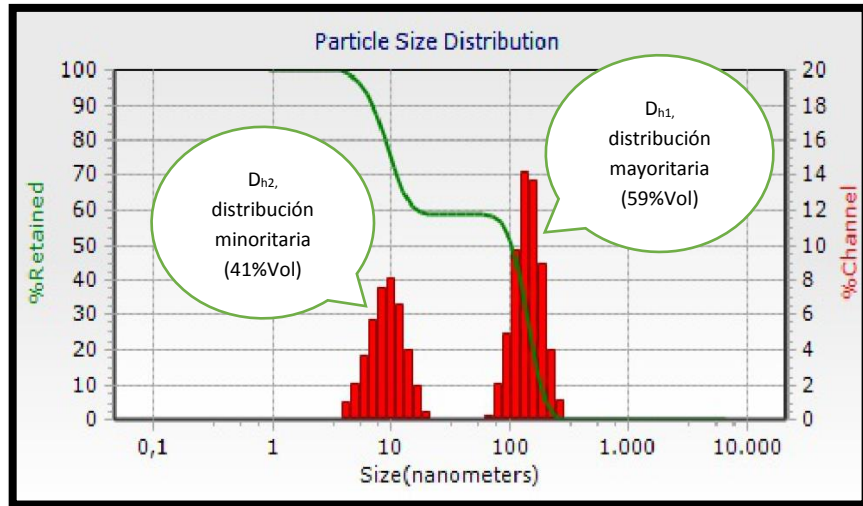


Fig. 11. Ejemplo de una distribución bimodal con su respectiva clasificación en D_h .

Cada una de las muestras se analizó por sextuplicado por cada día de medición y el resultado de cada experimento se reporta con su desviación estándar correspondiente (σ). En caso de alguna variación, se especifica en el respectivo texto.

4.1. Apariencia de las muestras.

Todas las muestras fueron translúcidas, incoloras y homogéneas.

4.2. Determinación de la capacidad de ensamblaje de β CDPEG₅₀₀₀ en agua a temperatura ambiente.

Como se mencionó en los antecedentes, la β CD tiende a formar autoensamblados en disolución debido a la atracción entre sus moléculas, resultado de la formación de puentes de hidrógeno por la interacción entre los grupos hidroxilo (OH^-) (Messner et al., 2011a). Los autoensamblados tienen lugar a concentraciones desde 3mM y hasta \sim 16 mM (Bonini et al., 2006) y su rango de tamaño se encuentra entre 90 nm (Bonini et al., 2006) y 300 nm (Jansook et al., 2018). Así mismo, el tamaño de éstos incrementa con el aumento de su concentración (Bonini et al., 2006) (Messner et al., 2010b)(Jansook et al., 2018). Sin embargo, la tendencia a formar autoensamblados por parte de la β CD disminuye al modificar químicamente sus grupos hidroxilo (OH^-) (Messner et al., 2011b) (Messner et al., 2011a) (Jansook et al., 2018) (Sá Couto et al., 2018).

Debido al impacto que tiene el autoensamblaje de la β CD en su desempeño como anfitrión y como sistema acarreador por sí mismo, es importante estudiar este fenómeno si es que la CD se ha modificado químicamente. Por ello, en este trabajo se exploró, primeramente, la capacidad de autoensamblaje de β CDPEG₅₀₀₀. Debido a que la concentración es un factor determinante en el autoensamblaje, se determinó la formación de ensamblados de β CDPEG₅₀₀₀ a 3 diferentes concentraciones. La elección de la primera y segunda concentración se realizó con base en la literatura, sin embargo, los resultados no fueron los esperados (se detalla más adelante). Por lo anterior, se procedió a investigar el fenómeno a una concentración menor, obteniendo resultados favorables, por lo que el estudio de β CDPEG₅₀₀₀ bajo diferentes condiciones se concretó bajo esta última concentración (se describe más adelante).

4.2.1. Influencia de la concentración en la formación de ensamblados de β CDPEG₅₀₀₀ en medio acuoso a temperatura ambiente.

La Tabla 1 exhibe las concentraciones seleccionadas para determinar la capacidad de autoensamblaje de β CDPEG₅₀₀₀.

Tabla 1. Muestras preparadas de β CDPEG₅₀₀₀

Muestra	Concentración (mM)	Etiqueta
1	10.0	S ₁
2	5.0	S ₂
3	0.5	S ₃

4.2.2. Resultados obtenidos de la medición por DLS de S₁.

Partiendo de las concentraciones a las cuales se observa un autoensamblaje de β CD (3.0-16.0 mM), se eligió arbitrariamente una concentración de 10.0 mM de β CDPEG₅₀₀₀. A esta concentración, la muestra presentó una viscosidad tal que dificultó su manipulación.

Durante todas las mediciones a esta concentración se obtuvieron distribuciones unimodales (una población) con agregados de un tamaño promedio de 4520 nm.

En la Figura 12, se observa un ejemplo de la distribución generada en un primer análisis, asimismo, en la Tabla 2, se presentan los resultados obtenidos.

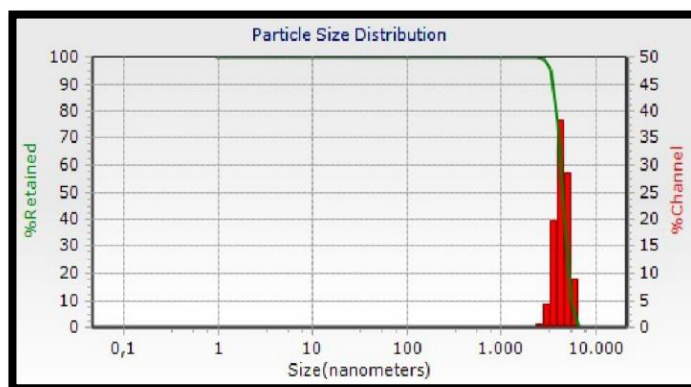


Fig. 12. Distribución de D_h en S_1 .

Tabla 2. Resultados de DLS en S_1 .

No. de repetición	D_h (nm)
1	4380
2	4520
3	4280
4	4390
5	5140
6	4410
Promedio	4520 ± 313.2

Para investigar si el comportamiento del sistema presentaba modificaciones en función del tiempo, se realizaron 5 mediciones más durante las 168 h (7 días) posteriores a la preparación de la muestra. A partir de éstas, se encontraron agregados con tamaños entre 3350-4632 nm, los cuales presentaron variaciones significativas durante cada medición. Dichos resultados se encuentran en el Anexo 1 del presente trabajo.

Se observó que el tamaño de los agregados disminuyó hasta los 3350 nm, con una diferencia de 1301.7 nm con relación a lo observado durante el primer día de análisis. De acuerdo con estos resultados, se podría considerar que el sistema es inestable y que los agregados sedimentan a través del tiempo (Anexo 1).

4.2.3. Resultados obtenidos de la medición por DLS de S₂.

Debido a la presencia de agregados de tamaños entre 3350-4632 nm obtenidos a partir de las mediciones de S₁ y a la viscosidad que la muestra presentó, se eligió trabajar a una concentración de 5.0 mM.

Las mediciones del sistema a esta concentración mostraron distribuciones bimodales (dos poblaciones) en un primer análisis. En la Figura 13, se observa un ejemplo de la distribución poblacional obtenida. Los agregados encontrados tuvieron un tamaño promedio de 1688.2 nm y 1582.5 nm, el resto de los resultados se muestran en la Tabla 3. La distribución poblacional predominante generó agregados con dimensiones mayores a 1000 nm.

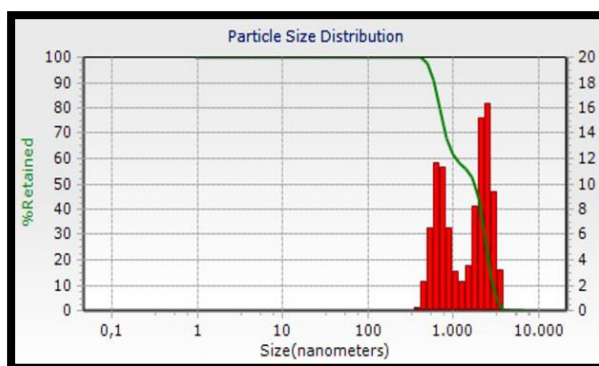


Fig. 13. Distribución de D_h en S₂.

Tabla 3. Resultados de DLS en S₂.

No. de repetición	D _{h1} (nm)	%Vol	D _{h2} (nm)	%Vol
1	2329	56.8	697	43.2
2	1082	100	--	--
3	1459	100	--	--
4	2220	49.1	736	50.9
5	1120	91	4430	9
6	1919	82	467	18
Promedio	1688.2± 545.8	79.8	1582.5± 1647.2	30.3

Con la finalidad de observar algún cambio por efecto del tiempo se realizaron 6 mediciones de la muestra por DLS durante un período total de 168 h (7 días), los resultados arrojaron distribuciones bimodales en todas las mediciones (Anexo 1).

Durante los 7 días la muestra S₂ produjo distribuciones bimodales. El tamaño de los agregados en la primera distribución osciló entre los 869.7-1702 nm y, la segunda, se encontró entre 637-4097.5 nm, sin embargo, ninguna se mantuvo constante durante las mediciones realizadas. Dado que los tamaños obtenidos fueron muy variables, no se continuó con el estudio del sistema a esta concentración (Anexo 1).

4.2.4. Resultados obtenidos de la medición por DLS de S₃.

Debido a los resultados obtenidos de S₁ y S₂, se procedió a trabajar con una muestra de β CDPEG₅₀₀₀ a una concentración de 0.50 mM (S₃).

En este caso se observó una distribución bimodal, en la cual las 2 poblaciones se encuentran alrededor de 50% cada una (Figura 14). El tamaño promedio de una de ellas fue de 174 nm, mientras que la otra presentó un tamaño de 8.9 nm (Tabla 4).

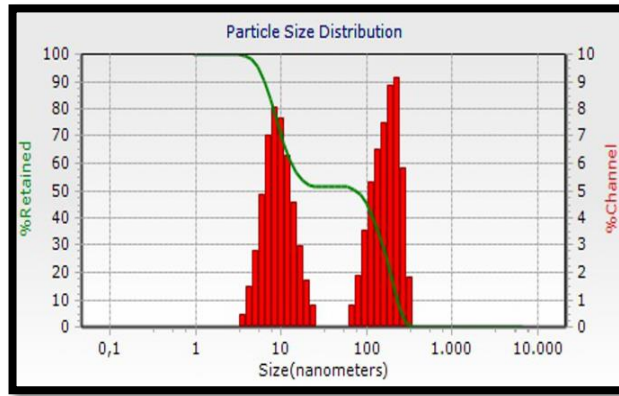


Fig. 14. Distribución de D_h en S_3 .

Tabla 4. Resultados de DLS en S_3 .

Número de repetición	D_{h1} (nm)	%Vol	D_{h2} (nm)	%Vol
1	173	50.8	9.0	49.2
2	163.5	51.7	8.9	48.3
3	201.2	69.8	8.9	30.2
4	150.6	55.9	8.7	44.1
5	208.3	58.9	8.9	41.1
6	150.5	46.7	8.8	53.3
Promedio	174.5 ± 25	55.6	8.9 ± 0.1	44.4

Los datos resultantes muestran que el tamaño de ambas poblaciones se mantuvo en un rango de tamaño más o menos constante, lo cual indica que existen 2 estructuras de tamaños distintos, pero ambas conservan sus respectivas dimensiones.

La población con tamaño mayor a 100 nm podría consistir en la asociación de varias moléculas de β CDPEG₅₀₀₀ que forman una estructura cuyo tamaño oscila entre 108.3-174.5 nm (Figura 15).

La distribución poblacional con tamaño promedio de 8.9 nm, podría corresponder a la formación de estructuras con un número menor de moléculas de β CDPEG₅₀₀₀ (Figura 15), es decir, el número de moléculas que conforman la asociación es menor que en el caso de la primera población mencionada.

Se pueden hacer conjeturas acerca del tamaño de una sola molécula de β CDPEG₅₀₀₀ porque se conoce que el diámetro externo de una molécula de β CD mide 1.5 nm (Messner et al., 2010b). Según los resultados obtenidos durante las mediciones de la muestra de PEG₅₀₀₀ a una concentración de 0.50 mM, las cadenas unitarias de polímero miden entre 1-4 nm (Anexo 1); si se toma el valor máximo, el diámetro hidrodinámico de una molécula de β CDPEG₅₀₀₀ mediría aproximadamente 6 nm. Con respecto a lo anterior, D_{h2} podría corresponder a la agrupación de 2 moléculas de β CDPEG₅₀₀₀ (Figura 15).

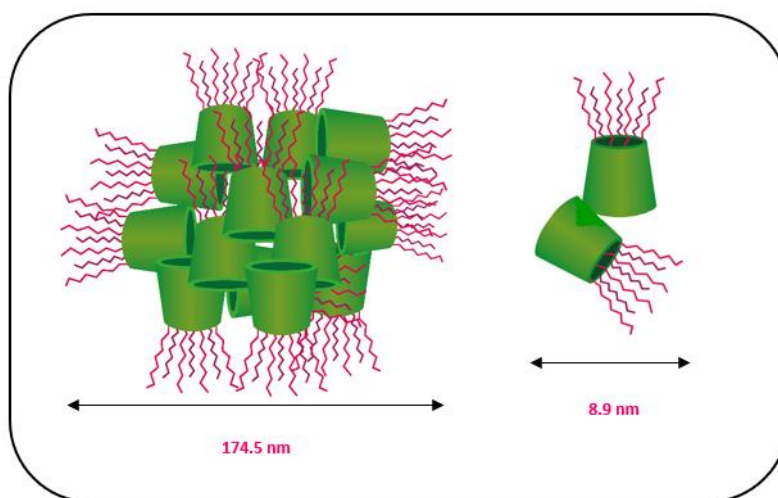


Fig. 15. Representación de las posibles estructuras de β CDPEG₅₀₀₀ en medio acuoso observadas en DLS.

Se descarta la idea de que esta distribución sea producto de asociaciones de cadenas de PEG₅₀₀₀, asociaciones de β CD sin pegilar o la mezcla física de las anteriores, debido a que tanto PEG₅₀₀₀ como β CD y la mezcla física de estos componentes fueron medidos mediante DLS y en ninguna de las distribuciones obtenidas se encontraron tamaños en el intervalo de los 8-10 nm (Anexo 1); con respecto a esta última, no presenta un patrón de comportamiento (Figura A1-5, pág. 91) a diferencia de lo observado en la muestra de PEG₅₀₀₀ y β CDPEG₅₀₀₀. La asociación de 2 moléculas del sistema podría compararse con los resultados obtenidos mediante espectrometría de masas, en dónde el análisis muestra la formación de dímeros (Rojas-Aguirre et al., 2019).

4.2.4.1. Estudio de S₃ con respecto al tiempo.

Los resultados obtenidos a esta concentración fueron de gran interés, por lo que, para conocer el comportamiento de S₃ a través del tiempo, se realizaron 11 análisis de la muestra en un período total de 1344 h (56 días). Durante todo el estudio, se obtuvieron distribuciones bimodales con la misma tendencia que aquella observada el primer día de medición: D_{h1} con tamaños en el rango de 108.3-176.5 nm y D_{h2} en el rango de 8.2-9.9 nm. Este comportamiento se mantuvo sin cambios significativos durante todo el análisis. La **Tabla 5** muestra los resultados de D_{h1}, mientras que la **Tabla 6** muestra los resultados de D_{h2}.

Debido a la obtención de resultados consistentes durante las mediciones de S₃ se decidió nombrar a D_{h1} como Pob1 (población 1) y a D_{h2} como Pob2 (población 2), con el fin de diferenciar a estas distribuciones del resto de las estudiadas en el presente trabajo.

Tabla 5. Comportamiento de D_{h1} de S_3 en función del tiempo.

Tiempo desde su preparación (h)	48		240		336		360		384		408		432		576		600		1344	
	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol
1	156.1	50.1	169	61.9	144.9	49.7	172.1	66.4	163.8	75.1	189.1	81.9	127.4	79.3	106.5	90.2	104	100	112.8	92.7
2	139	52.5	155.1	56.3	132.6	43.3	148.6	57.7	152.6	68.6	189.5	92.9	133.2	79.9	107.1	91.2	116.7	91.8	115.5	93.9
3	166.5	62.4	134.5	51.5	141.9	58.7	160	65.3	144.7	64.7	180.6	88.3	128.1	75.8	119.4	93.2	108.2	96.1	115.9	100
4	180.7	67	143.1	51	145.6	55.5	157.5	71.7	141.5	68.3	168.1	83.6	116.4	77.1	117.7	90.1	99.2	100	115.8	100
5	163	60.3	128	51.3	143.3	57.9	135.7	55.8	170.7	77.9	147.1	83.4	141.5	83.1	108	90.2	117.4	100	137	100
6	180.8	66.4	133.1	39.8	134.1	54.6	149.6	62.8	149.7	68.8	184.4	86.7	126.4	82.6	115.6	91.0	104.1	100	118.4	100
Promedio	164.4± 15.8	59.8	143.8± 15.6	52.0	140.4± 5.6	53.6	153.9± 12.3	63.3	153.8± 11.3	70.6	176.5± 27.0	86.1	128.8	79.6	112.4 ±5.8	91.0	108.3 ±7.4	98.0	119.2 ±8.9	97.8

Tabla 6. Comportamiento de D_{h2} de S_3 en función del tiempo.

Tiempo desde su preparación (h)	48		240		336		360		384		408		432		576		600		1344	
	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol
1	8.9	49.9	9.0	38.1	9.0	50.3	9.1	33.6	9.2	24.9	9.3	18.1	9.7	20.7	9.1	9.8	--	--	8.9	7.3
2	9.1	47.5	9.1	43.7	8.9	56.7	9.2	42.3	9.1	31.4	9.2	7.1	9.5	20.1	9.0	8.8	9.4	8.2	7.5	6.1
3	9.3	37.6	9.0	48.5	9.1	41.3	9.2	34.7	9.1	35.3	9.8	11.7	9.6	24.2	8.9	6.8	10.3	3.9	--	--
4	9.2	33	9.1	49	9.2	44.5	9.2	28.3	9.3	31.7	9.8	16.4	9.1	22.9	10.5	9.9	--	--	--	--
5	9.1	39.7	9.0	48.7	9.1	42.1	9.0	44.2	9.2	7.6	9.8	16.6	9.0	16.9	9.6	9.8	--	--	--	--
6	9.2	33.6	9.1	39.8	9.2	45.4	9.1	37.2	9.2	31.2	9.6	13.3	9.0	17.4	9.7	9.0	--	--	--	--
Promedio	9.1± 0.1	40.2	9.1± 0.1	44.6	9.1± 0.1	46.7	9.1± 0.1	36.7	9.2± 0.1	27.0	9.6± 0.3	13.9	9.3± 0.3	20.4	9.5± 0.6	9.0	9.9± 0.6	6.1	8.2± 1.0	6.7

Al inicio del análisis el tamaño promedio de Pob1 fue de 174.5 nm, el cual decreció 34.1 nm a los 14 días (336 h). Después, a los 17 días (408 h) el tamaño fue de 176.5 nm, muy cercano al tamaño inicial. Posteriormente, a los 25 días (600 h) el tamaño disminuyó hasta 108.3 nm y finalmente, durante el último día de análisis, el tamaño se encontró en 119.2 nm. Los cambios más significativos tuvieron lugar después de transcurridos los 17 días (408 h) de medición. La Figura 16 manifiesta lo descrito.

La mayor diferencia observada entre el valor mayor y el valor menor fue de 68.2 nm, lo cual no involucra un cambio significativo considerando los valores de desviación estándar, confirmando la existencia de entidades estables, ordenadas y con una posible arquitectura definida, a través del tiempo.

La Figura 16 también muestra la variación del tamaño de Pob2 a lo largo del tiempo. En el primer día de medición se obtuvo un tamaño promedio de 8.9 nm, el cual se mantuvo a lo largo del análisis. Además, los cambios en la desviación fueron constantes.

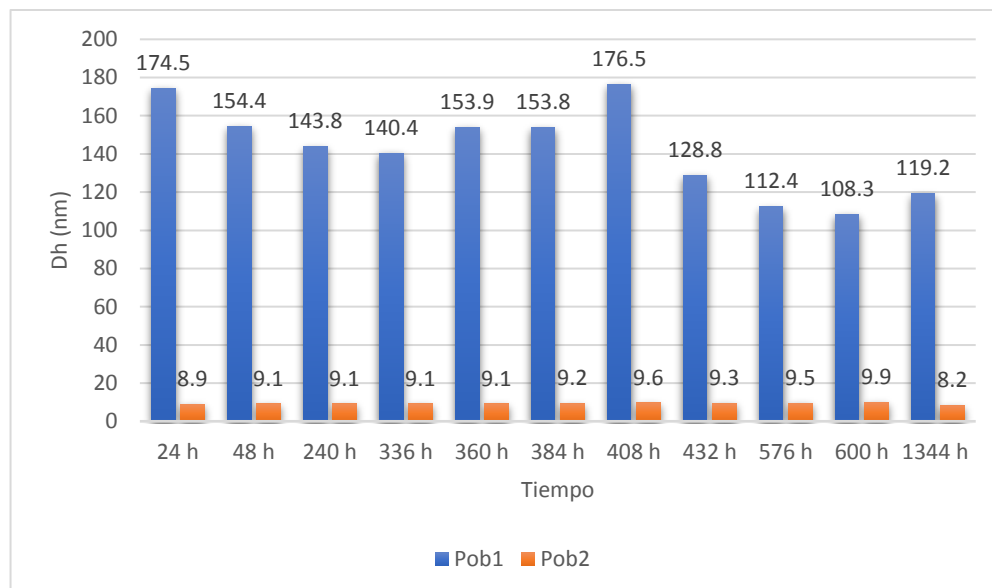


Fig. 16. Efecto del tiempo en el tamaño de Pob1 y Pob2 en S₃.

En resumen, el tamaño de Pob1 se encontró en el rango de 108-176 nm. El cambio en el tamaño no fue significativo durante el tiempo de medición.

Debido al comportamiento estable y a la poca variación de tamaño de las partículas, con respecto al tiempo, se podría pensar en un proceso de autoensamblaje, es decir, sistemas que se asocian mediante fuerzas de carácter no covalente, simplemente por su interacción con moléculas vecinas y bajo la influencia de las condiciones del medio.

Aunque no se observaron cambios de tamaño a través del tiempo, no sucedió lo mismo con el %Vol. A este respecto, al inicio del análisis, Pob1 se encontraba en un 55%Vol y Pob2 en un 44%Vol. Con base en lo anterior, es interesante observar que la Pob2 fue disminuyendo paulatinamente hasta evidenciar un cambio significativo a las 360 horas de análisis en donde se observa la disminución del 7.7%Vol mismo que aumentó para el caso de Pob1. El fenómeno continuó de la misma manera hasta que Pob1 se encontró casi en al 100%Vol a las 1344 horas (Figura 17).

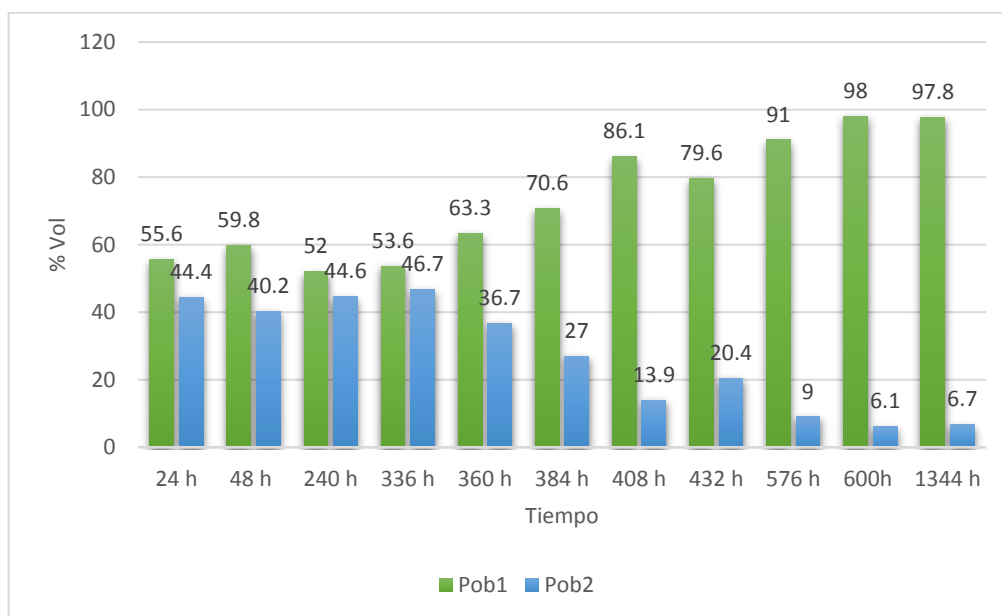


Fig. 17. Efecto del tiempo en el %Vol de Pob1 y Pob2 en S₃.

La Figura 18 ejemplifica una de las distribuciones poblacionales correspondientes al ensayo transcurridos 15 días (360 h) desde la preparación de la muestra.

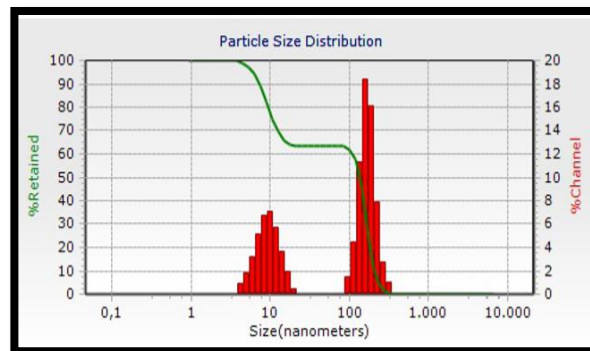


Fig. 18. Representación gráfica de S_3 a las 360 horas.

A los 17 días (408 h) la proporción de Pob_2 disminuyó hasta 13.9%Vol, es decir, disminuyó 30.5% con respecto al primer día de medición. En la **Figura 19** se muestra un ejemplo de las distribuciones bimodales obtenidas a las 408 h.

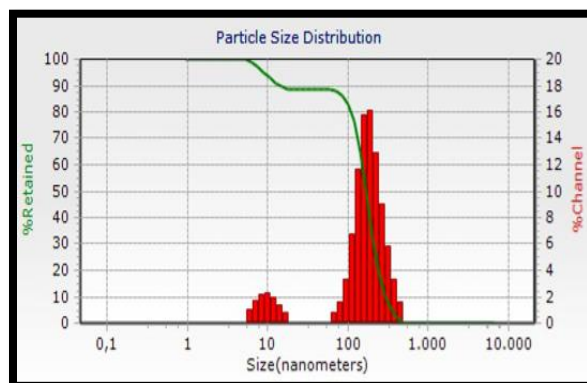


Fig. 19. Representación gráfica de S_3 a las 408 horas.

De acuerdo con la Figura 17, puede notarse que a los 25 días (600 h) de análisis la distribución minoritaria (Pob_2) se encuentra en un 6.1%Vol, la cual al inicio del ensayo se hallaba en una proporción del 44.4%Vol.

Por lo tanto, la proporción de Pob2 disminuyó un 38.3%Vol, casi la misma proporción que para Pob1 pero a la inversa. Se muestra en la Figura 20 un ejemplo de las distribuciones obtenidas a partir de la medición de la muestra a las 600 h.

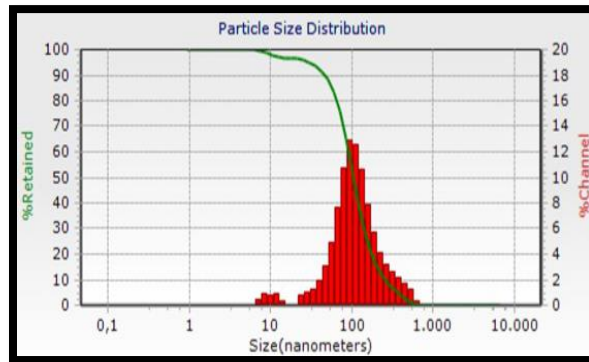


Fig. 20. Representación gráfica de S_3 a las 600 horas.

La proporción de Pob2 disminuyó gradualmente hasta el día 56 días de análisis. Cabe mencionar que en algunas mediciones realizadas este día la población de 8.9 nm no estaba presente en alguna de las réplicas (Figura 21). Se muestra en la Figura 21 un ejemplo de la distribución unimodal obtenida. El índice de polidispersión (PDI) de la distribución fue de 3, el cual se considera alto (Danaei et al., 2018).

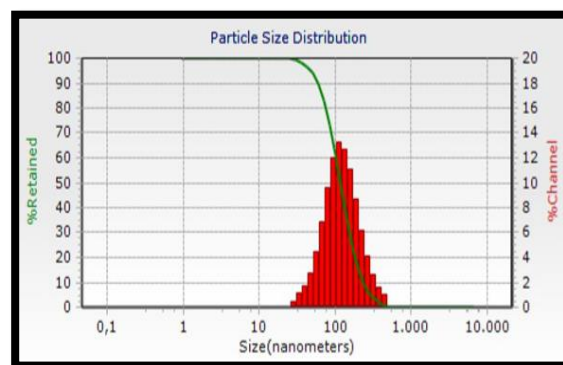


Fig. 21. Representación gráfica de S_3 a las 1344 horas.

Como se mencionó, las proporciones de las poblaciones de S_3 cambiaron a través del tiempo. Una posible explicación es que las asociaciones con menor cantidad

de moléculas se fueron incorporando a los ensamblados de mayor tamaño a través del tiempo. Es decir, los ensamblados de ambas distribuciones se asociaron para formar ensamblados de un sólo tipo.

Finalmente, después del análisis del efecto de la concentración y del tiempo en el tamaño de las asociaciones formadas por β CDPEG₅₀₀₀, se presenta a manera de resumen un gráfico comparativo del tamaño promedio de los ensamblados a las 3 concentraciones estudiadas. Para ello sólo se tomaron en cuenta los promedios de las distribuciones poblacionales que poseyeron el mayor %Vol durante el ensayo (Figura 22). Observando la gráfica puede notarse claramente que el tamaño es estrechamente dependiente de la concentración.

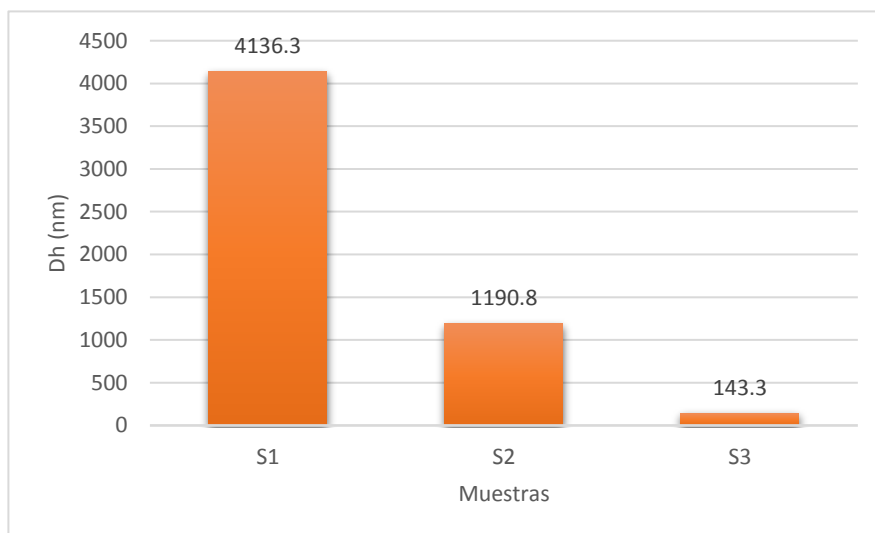


Fig. 22. Cambio de D_h a diferente concentración.

Con base en los resultados obtenidos durante las mediciones de S_3 se decidió continuar con los estudios del sistema a esta concentración, ya que los resultados fueron reproducibles a través del tiempo. Por otro lado, es interesante mencionar que la concentración elegida se encuentra por debajo del rango propuesto en trabajos anteriores dedicados al estudio de los autoensamblados que forma la β CD en disolución (Bonini et al., 2006), por lo cual se evidencia el efecto del PEG en el sistema.

4.3. Determinación del tamaño de los agregados de polietilenglicol 5000 (PEG₅₀₀₀).

Para explorar el comportamiento de PEG₅₀₀₀ sin β CD, se analizó el polímero mediante DLS, ya que es componente mayoritario del sistema β CDPEG₅₀₀₀, por esta condición, la influencia de las propiedades de PEG₅₀₀₀ sobre el sistema podría ser significativa.

Se analizó PEG₅₀₀₀ a una concentración de 0.5mM en medio acuoso a temperatura ambiente. La muestra se midió a las 24 horas posteriores a partir de su preparación. Los resultados obtenidos en el primer día de análisis muestran una distribución bimodal (Figura 23) en la que D_{h1} tiene un valor promedio de 148.8 nm (Tabla 7) que corresponde a asociaciones de cadenas de PEG₅₀₀₀ y la población de D_{h2} , posee un tamaño promedio de 3.6 (Tabla 7) conformada probablemente por cadenas libres de polímero.

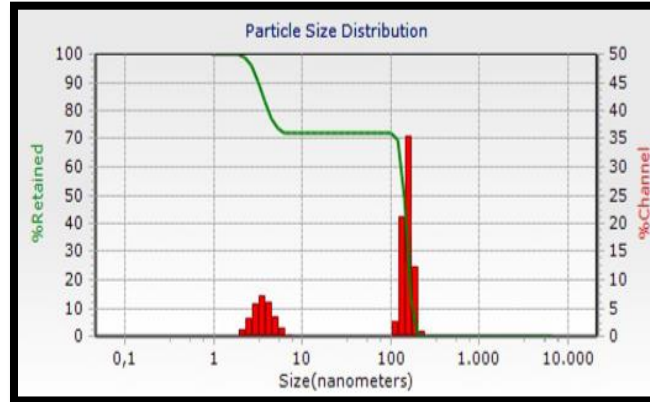


Fig. 23. D_h en PEG₅₀₀₀.

Tabla 7. Análisis de PEG₅₀₀₀.

Número de repetición	Dh (nm)	%Vol	Dh (nm)	%Vol
1	153.7	71	3.59	29
2	157.2	65.5	3.57	34.4
3	123	31.4	3.6	68.6
4	153.3	45.5	3.53	54.5
5	183.7	87.3	3.67	12.7
6	122.1	55.7	3.52	44.3
Promedio	148.8± 21.3	59.4	3.6± 0.1	40.6

Debido a la similitud en el tamaño y proporción de estructuras de PEG₅₀₀₀ se decidió analizar su comportamiento a través del tiempo, como lo realizado para el sistema β CDPEG₅₀₀₀.

4.3.1. Estudio de PEG₅₀₀₀ con respecto al tiempo.

Los resultados muestran que el tamaño de D_{h1} se mantiene en el intervalo de 131.5-207.2 nm (Tabla 8), las dimensiones de las estructuras cambiaron poco, por lo que las variaciones no fueron significativas, durante el análisis de la muestra, con respecto al tiempo. Los agregados poseen un tamaño tal que los sitúa 30.7 nm, por encima del valor máximo encontrado durante el análisis de β CDPEG₅₀₀₀ con respecto al tiempo. La diferencia entre los tamaños de los ensamblados del sistema y los agregados del polímero es pequeña, por lo que PEG₅₀₀₀ podría determinar las características estructurales del sistema de interés.

La proporción a la que se encontró D_{h1} fluctuó entre 58.9-88.4 %Vol, donde la proporción de D_{h1} fue mayoritaria en el último día de análisis. Si se relaciona el comportamiento de las proporciones de D_{h1} del polímero con las del sistema de

estudio con respecto al tiempo, se percibe que poseen un comportamiento similar, es decir, al inicio del análisis en ambos casos la proporción de D_{h1} se encuentra en un 50 %Vol y, al final de este la proporción, incrementa hasta un 89 %Vol aproximadamente. Contrario a lo que sucede con la β CD, el sistema β CDPEG₅₀₀₀ incrementó gradualmente las proporciones de su población mayoritaria (~100 nm), mientras que las proporciones de D_{h1} en β CD se mantuvieron dentro del mismo rango durante su análisis (estos resultados se presentan más adelante).

La segunda población (D_{h2}) mostró tamaños entre 3.0 y 5.0 nm (Tabla 9). Los tamaños podrían pertenecer a cadenas poliméricas libres en el medio. Esta distribución, aunque aparece a lo largo de todo el análisis desaparece a los 7 y 8 días (168 y 192 horas) de muestreo. La proporción a la que fue encontrada esta distribución poblacional se mantuvo entre el 11.6%Vol y el 40.6%Vol, donde el valor máximo obtenido se aprecia en el primer día de análisis y el mínimo encontrado, en el último.

Tabla 8. D_{h1} de PEG₅₀₀₀ en función del tiempo.

No. de medición	2		3		4		5		6		7		8	
Tiempo desde su preparación (h)	48		72		96		168		192		240		744	
No. de repetición	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	%Vol
1	167.8	76.1	151.4	73.8	200.5	78.3	178.3	76.7	151.8	64.2	176.6	82.4	172.6	87
2	176.4	89.2	152.8	70.4	172.7	86.1	183	85.7	211.8	57.4	236.7	76.1	140.9	86
3	135.5	84.2	172	86.7	136.9	77.9	169.4	69.6	157.3	63.3	184.7	87.9	123.7	86
4	137.5	89.2	133.4	80.1	154.7	90.7	168.1	78.3	160.1	55.7	173.4	82.1	116.5	91.3
5	134.1	83.5	143.2	81.9	216.8	82.5	171	76.6	141.9	58.4	232.2	62.3	118.7	90.5
6	141.3	90.2	149.4	85.5	131.4	37.6	214.8	80.3	159.2	54.2	239.3	82.9	116.5	89.4
Promedio	148.8± 16.8	85.4	150.4± 11.7	79.7	168.8± 31.5	75.5	180.8± 16.1	77.9	163.7± 22.4	58.9	207.2± 9.2	79	131.5± 20.2	88.4

Tabla 9. D_{h2} de PEG₅₀₀₀ en función del tiempo.

No. de medición	2		3		4		5		6		7		8	
Tiempo desde su preparación (h)	48		72		96		168		192		240		744	
No. de repetición	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	%Vol
1	4.2	23.9	3.3	26.2	3.4	21.7	4.09	23.3	--	--	3.6	17.6	3.8	13
2	4.4	10.8	4.0	29.6	3.5	13.9	6	8.3	5.04	22.5	3.5	23.9	3.8	14
3	4.1	15.8	4.5	13.3	3.5	22.1	--	--	4.81	18.7	4.1	9.3	3.9	14
4	3.8	10.8	4.6	19.9	4.2	9.3	--	--	5	14.4	4.1	13.2	4.0	8.7
5	4.3	16.5	4.4	18.1	2.7	17.5	--	--	--	--	4.4	20	3.8	9.5
6	4.5	9.8	4.1	14.5	3.0	5.5	--	--	--	--	4.0	9.8	3.8	10.6
Promedio	4.2± 0.2	14.6	4.2± 0.4	20.3	3.4± 0.5	15	5.0± 1.0	25.3	5.0± 0.1	18.5	4.0± 0.3	15.6	3.8± 0.1	11.6

Tabla 10. D_{h3} de PEG₅₀₀₀ en función del tiempo.

No. de medición	5		6		7	
Tiempo desde su preparación (h)	168		192		240	
No. de repetición	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol
1	--	--	0.99	35.8	--	--
2	0.96	6	1.02	20.1	--	--
3	1	30.4	1.02	18.0	1.0	2.8
4	1.02	21.7	1.0	15.9	1.0	4.7
5	1.01	23.4	1.01	41.6	1.0	17.7
6	1.02	19.7	1.01	45.8	1.1	7.3
Promedio	1.0± 0.02	20.2	1.0± 0.01	29.5	1.0± 0.03	8.1

La Figura 24 muestra la aparición de una tercera población (D_{h3}). La distribución se presentó a partir del día 7 (168 h) del análisis (Tabla 10). Por su presencia intermitente y el período transcurrido hasta su observación, es posible que la población de 1.0 nm pertenezca a partículas extrañas producto de impurezas presentes en la muestra, agua o filtros utilizados (los filtros fueron reutilizados durante el experimento). Debido a las conjeturas anteriores los resultados de D_{h3} no se consideraron como datos relevantes.

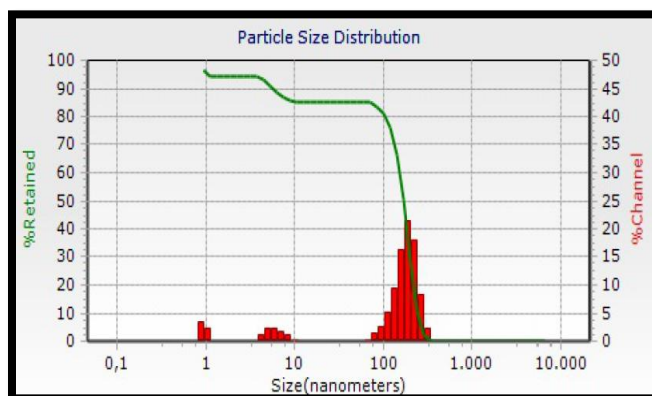


Fig. 24. D_h en PEG₅₀₀₀ a los 7 días (168 h).

Con el fin de representar visualmente el tamaño de las distribuciones obtenidas a partir de la muestra de PEG₅₀₀₀, se construyó un gráfico donde se integra el D_{h1} , el D_{h2} y los cambios de éstos a través del tiempo de análisis (Figura 25). Como se observa, los cambios son mínimos en ambas poblaciones.

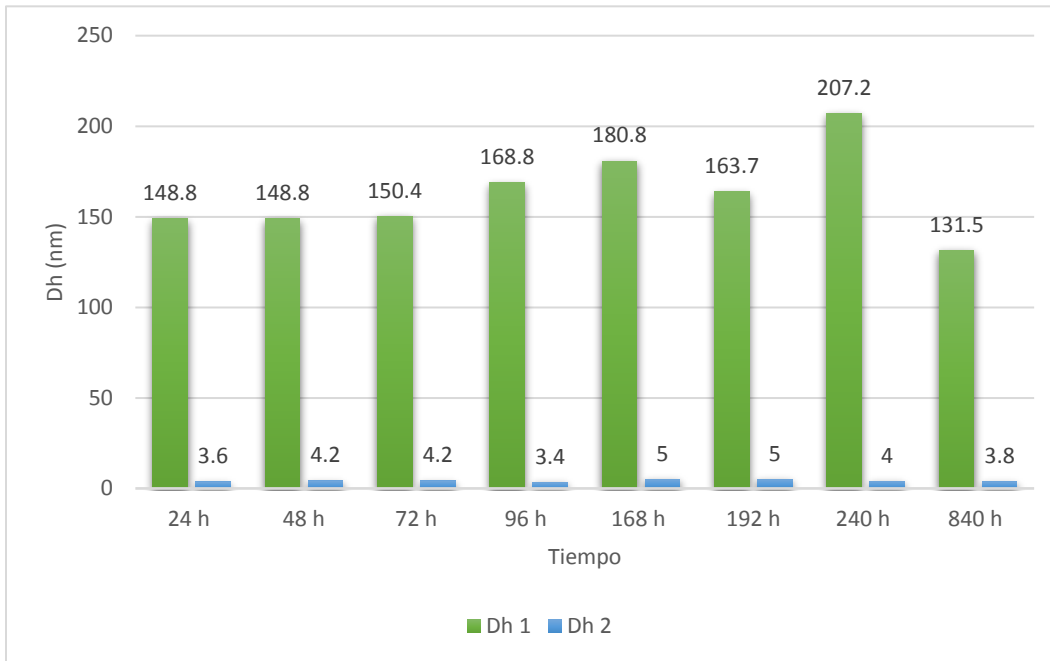


Fig. 25. Cambio en los D_{h1} y D_{h2} de PEG_{5000} en función del tiempo.

Como se observa en la Figura 26, las proporciones de D_{h1} y D_{h2} se mantuvieron sin cambios significativos. Los mayores cambios observables se presentaron el día 1 (24 h) y el día 8 (192 h) del análisis de la muestra.

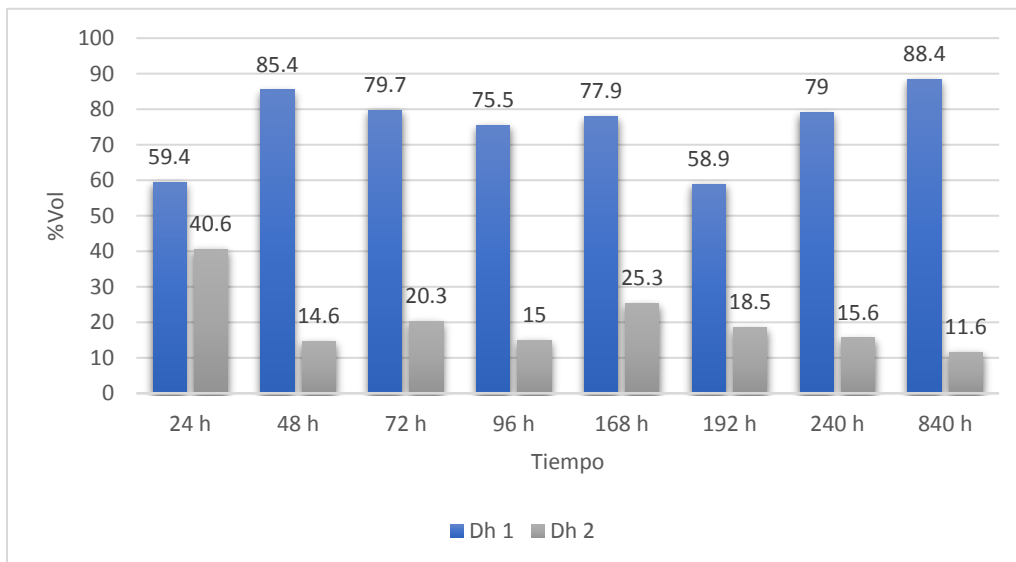


Fig. 26. Cambio en el %Vol de PEG_{5000} con el tiempo.

Con los resultados obtenidos de las mediciones de PEG₅₀₀₀ se puede distinguir que hay una relación muy estrecha entre el tamaño y la proporción de las distribuciones generadas por el polímero y el sistema de interés, en sus respectivos estudios a través del tiempo. Por lo tanto, la influencia de las características propias de PEG₅₀₀₀ parece determinar el tamaño de las estructuras que forma β CDPEG₅₀₀₀ en medio acuoso.

4.4. Determinación del tamaño de los agregados de β -ciclodextrina (β CD).

De la misma forma en que se analizó PEG₅₀₀₀, se procedió con la exploración de los agregados que forma la β CD. El análisis del polisacárido en medio acuoso tuvo como finalidad esclarecer su papel en la formación de los ensamblados de β CDPEG₅₀₀₀, dicho de otro modo, las propiedades de la β CD podrían influir en el tamaño de los ensamblados del sistema.

Lo anterior condujo al análisis de una muestra de β CD con una concentración de 0.5mM en medio acuoso a temperatura ambiente. La muestra se midió 24 horas posteriores al tiempo de su preparación. Los resultados obtenidos a partir del primer día de análisis muestran una distribución bimodal (Figura 27) en la que D_{h1} tiene un valor promedio de 148.4 nm pertenecientes a asociaciones de moléculas que forman agregados (Bonini et al., 2006) y la segunda distribución poblacional (D_{h2}) poseyó un tamaño promedio de 1.2 nm el cual podría pertenecer a impurezas presentes en la muestra (Tabla 11).

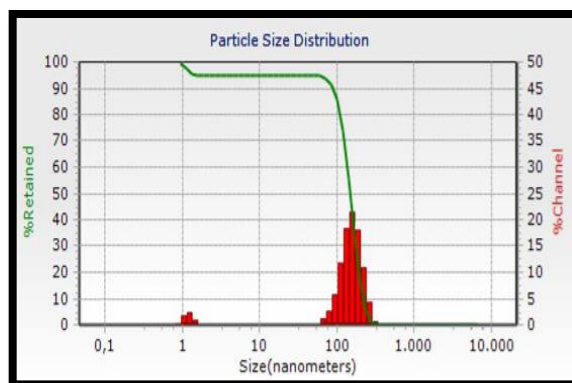


Fig. 27. Distribución de D_h en β CD.

Tabla 11. Resultados del análisis de β CD.

No. de repetición	D_h (nm)	%Vol	D_h (nm)	%Vol
1	154.6	94.1	1.21	5.9
2	114.9	25.6	1.2	74.4
3	221.2	97.9	1.27	2.1
4	179.6	74.6	1.17	25.4
5	112.1	25.6	1.17	74.4
6	107.9	10.7	1.1	89.3
Promedio	148.4± 41.6	54.8	1.2± 0.1	45.3

4.4.1. Estudio de β CD con respecto al tiempo.

Los resultados obtenidos mostraron distribuciones bimodales que se convirtieron en trimodales (3 poblaciones) a partir del día 7 (168 h) de medición.

La población mayoritaria (D_{h1}) mantuvo tamaños en el intervalo de 118.6-211.1 nm (**Tabla 12**). Si se comparan los tamaños con los obtenidos durante el análisis de β CDPEG₅₀₀₀ con respecto al tiempo, la dimensión de los agregados de β CD se encuentra por arriba del valor máximo en una magnitud de 34.6 nm con respecto al tamaño de los ensamblados del sistema. A pesar de la similitud encontrada

entre el tamaño de las estructuras del polisacárido y del sistema, los agregados de β CD presentan variabilidad significativa, además de una disminución de tamaño a través del tiempo. Las proporciones a las cuales se encontró D_{h1} están en un intervalo de 54.8-90.2 %Vol. La proporción de esta población permanece fija en 85 %Vol aproximadamente, con excepción de la proporción encontrada en el primer día de análisis la cual es de 54.8 %Vol. A pesar de que la proporción de D_{h1} es muy parecida a la observada durante los últimos días de análisis de la muestra de β CDPEG₅₀₀₀ a través del tiempo, las proporciones de β CD no se ven modificadas con respecto al tiempo.

A partir de los 7 días (168 h) de análisis, la muestra presenta una población con tamaños entre 480-3050 nm (Tabla 13). Esta población (D_{h2}) es muy inestable porque cambia de manera significativa con el tiempo e incluso, llega a desaparecer por ejemplo a los 35 días (840 h) de análisis. Los tamaños y proporciones de esta población son tan variables que no pueden ponderarse los valores obtenidos.

En el análisis también se observó una distribución poblacional de aproximadamente 1 nm (D_{h3}). Durante el primer día de medición esta población se presentó en un 45.3 %Vol, sin embargo, en los próximos días, aunque el tamaño se mantuvo constante la proporción decreció hasta encontrarse en un intervalo entre 2.0-18.9 %Vol (Tabla 14). Debido a que la población no se presenta en alta proporción y, además, no es observable en todas las réplicas y mediciones, los resultados obtenidos a partir de ésta no fueron tomados en consideración.

Tabla 12. D_{h1} de βCD en función del tiempo.

No. de medición	2		3		4		5		6		7		8		9	
Tiempo desde su preparación (h)	168		192		240		840		864		888		912		936	
No. de repetición	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol
1	178.2	74.8	148.5	84.4	217.5	100	135.3	34.9	122.6	87	147.1	93.2	129.8	98.1	186.2	100
2	239.2	98	186.1	100	229.1	96.3	156.6	86.6	152.1	88.6	107.3	79.7	112.2	96	134.2	100
3	186.8	45.7	158	87.3	201.9	78.4	160.5	90	121.5	64.9	130	87.3	109.7	92.8	128.3	100
4	222.7	87.1	136.1	85.7	167.5	94.4	157.6	98.2	132.8	98.4	116.9	96.9	104	93.6	131.7	92.9
5	103.1	100	132.9	52.1	223.6	88.5	156	81.9	97.6	90.8	122.9	84.5	105.5	100	118.2	86.5
6	234.6	55.3	140.2	100	226.7	73.8	239.1	100	196.4	100	224.9	100	150.1	51.1	123.1	56
Promedio	194.1± 46.7	76.8	150.3± 18.0	84.9	211.1± 21.4	88.6	167.5± 33.1	81.9	137.2± 31	88.3	141.5 ±39.2	90.2	118.6 ±16.4	88.6	137.0± 22.7	89.2

Tabla 13. D_{h2} de βCD en función del tiempo.

No. de medición	2		3		4		6		8		9	
Tiempo desde su preparación (h)	168		192		240		864		912		936	
No. de repetición	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol
1	590	25.2	--	--	--	--	553	13	--	--	--	--
2	--	--	--	--	4390	3.7	522	11.4	--	--	--	--
3	523	54.3	514	12.7	3410	21.6	270.9	35.1	--	--	--	--
4	756	12.9	963	14.3	1369	5.6	759	1.6	--	--	1907	7.1
5	--	--	402	46.4	--	--	763	9.2	--	--	1875	13.5
6	80	44.7	--	--	--	--	--	--	535	48.9	409	44
Promedio	487.3 ± 250	34.3	626.3	24.5	3056.3± 1258.4	10.3	573.6	14.1	--	--	1397 ±698.7	21.5

Tabla 14. D_{h3} de βCD en función del tiempo.

No. de medición	2		3		4		5		7		8	
Tiempo desde su preparación (h)	168		192		240		840		888		912	
No. de repetición	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol
1	-	--	1.1	10.6	--	--	1.0	2.1	1.0	6.8	1.0	1.9
2	1.0	2	--	--	--	--	1.0	13.4	1.0	20.3	1.0	4
3	--	--	--	--	--	--	1.0	10	1.0	12.7	1.0	7.2
4	--	--	--	--	--	--	1.0	1.8	1.0	3.1	1.0	6.4
5	--	--	--	--	1.0	11.5	1.0	1.7	1.0	15.5	--	--
6	--	--	--	--	1.0	26.2	--	--	--	--	--	--
Promedio	1.0	2	1.1	10.6	1.0	18.9	1.0 ±0.01	5.8	1.0 ±0.02	11.7	1.0 ±0.01	4.9

En la Figura 28, se representan los tamaños promedio obtenidos en el análisis de βCD con respecto al tiempo. Para la construcción del gráfico únicamente se utilizó la población de D_{h1}, los promedios de las otras 2 poblaciones no fueron graficados debido a la variabilidad y poca reproducibilidad de los datos. Como se observa, el tamaño de los agregados formados en la muestra disminuye con el tiempo.

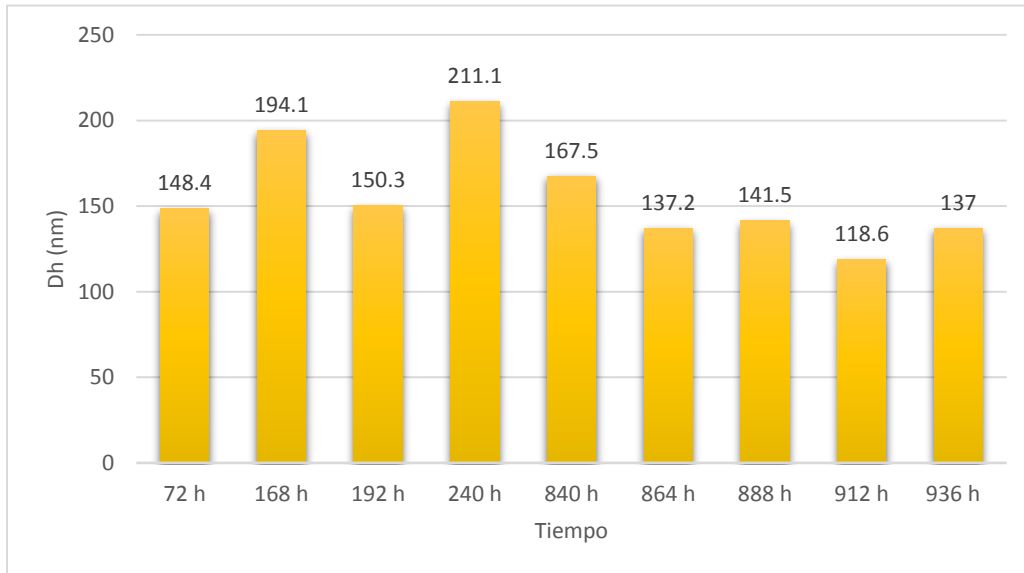


Fig. 28. Cambio en el D_{h1} de β CD en función del tiempo.

Las proporciones de D_{h1} a través del tiempo se observan en la Figura 29, en la mayoría de las mediciones es posible reconocer que la proporción se encuentra en el intervalo de 76.8-90.2 %Vol, es decir, permanece casi invariable. A excepción del primer día de análisis en el cual se observa una proporción del 54.8 %Vol.

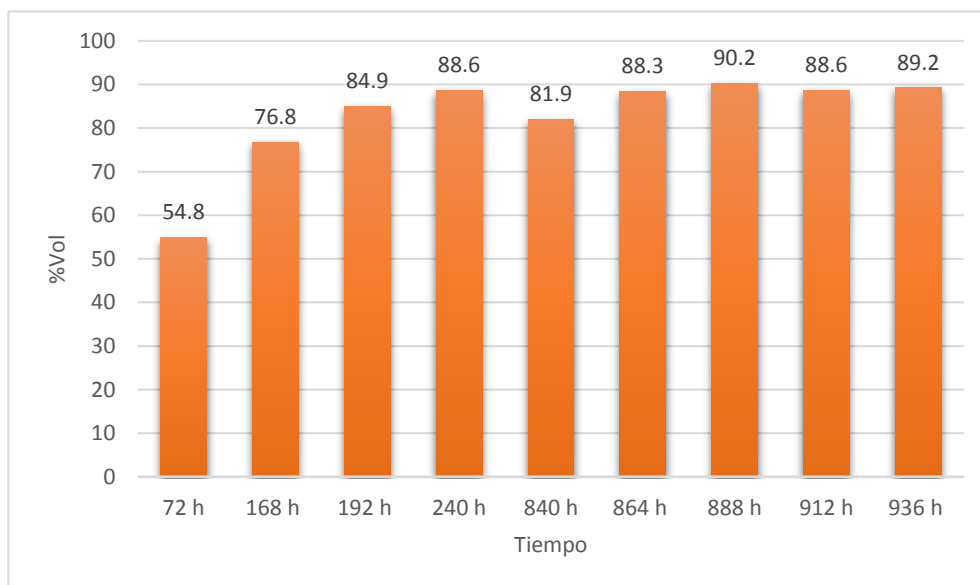


Fig. 29. Cambio en el %Vol de β CD con el tiempo.

Con base en la información anterior podría inferirse que PEG₅₀₀₀ influye sobre la capacidad de asociación de las moléculas de β CD, como se observó en las secciones anteriores las asociaciones de β CD dependen de la concentración y bajo las condiciones experimentales elegidas se encontraron asociaciones de β CDPEG₅₀₀₀ que permanecen sin cambio significativo a través del tiempo.

4.5. Determinación del tamaño de los ensamblados del sistema β CDPEG₅₀₀₀ a 37°C y 42°C.

Para conocer la influencia de la temperatura en la asociación de moléculas de β CDPEG₅₀₀₀, se realizaron mediciones a 37°C y 42°C. Se eligió la temperatura de 37°C por ser la temperatura corporal normal en los humanos; mientras que la temperatura de 42°C representa condiciones de hipertermia que se presenta durante ciertas patologías.

4.5.1. Resultados de los experimentos a 37°C.

En el análisis de la muestra correspondiente se obtuvo una sola población de agregados durante las 6 réplicas del experimento, el tamaño promedio de éstas es de 152.4 nm (Figura 30).

El tamaño promedio de la distribución, obtenido a 37°C, es similar a las mediciones de la muestra a temperatura ambiente a través del tiempo (108.3-176.5 nm). Por lo tanto, los resultados demuestran que el tamaño de los ensamblados de β CDPEG₅₀₀₀ no se altera a esta temperatura.

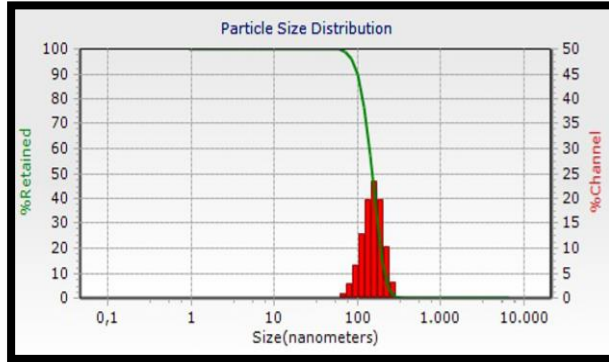


Fig. 30. Distribución de D_h a 37.4°C.

Tabla 15. β CDPEG₅₀₀₀ en agua a 37.4°C.

No. de repetición	D_h (nm)
1	155
2	151.1
3	152.3
4	151.2
5	157
6	147.7
Promedio	152.4 ± 3.0
PDI	0.7

El incremento de la temperatura pudo favorecer la obtención de distribuciones unimodales, con un PDI de 0.7. El incremento de la energía cinética quizá provocó la unión de las partículas unitarias del sistema con los ensamblados de tamaños entre 147.7-157 nm (Figura 31).

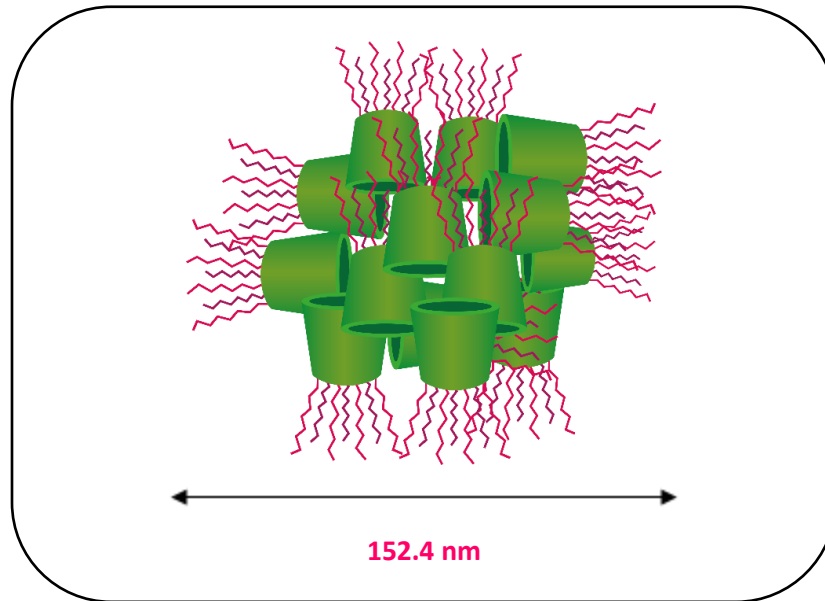


Fig. 31. Representación de las distribuciones poblacionales presentes en la muestra a 37°C.

4.5.2. Resultados de los experimentos a 42°C.

En este caso, se observaron distribuciones bimodales en las 6 réplicas del experimento, con tamaños promedios de 152.6 nm y de 1.6 nm para D_{h1} y D_{h2} , respectivamente (Figura 32).

El valor obtenido de D_{h1} se encuentra dentro del intervalo de tamaño encontrado en Pob1 (108.3-176.5nm). El tamaño de D_{h2} no corresponde con los resultados observados en los experimentos anteriores.

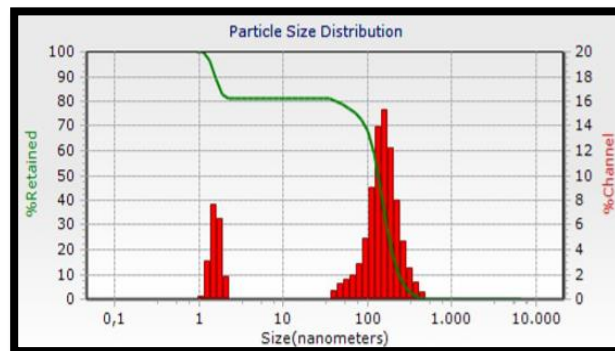


Fig. 32. Distribución de D_h a 42.4°C.

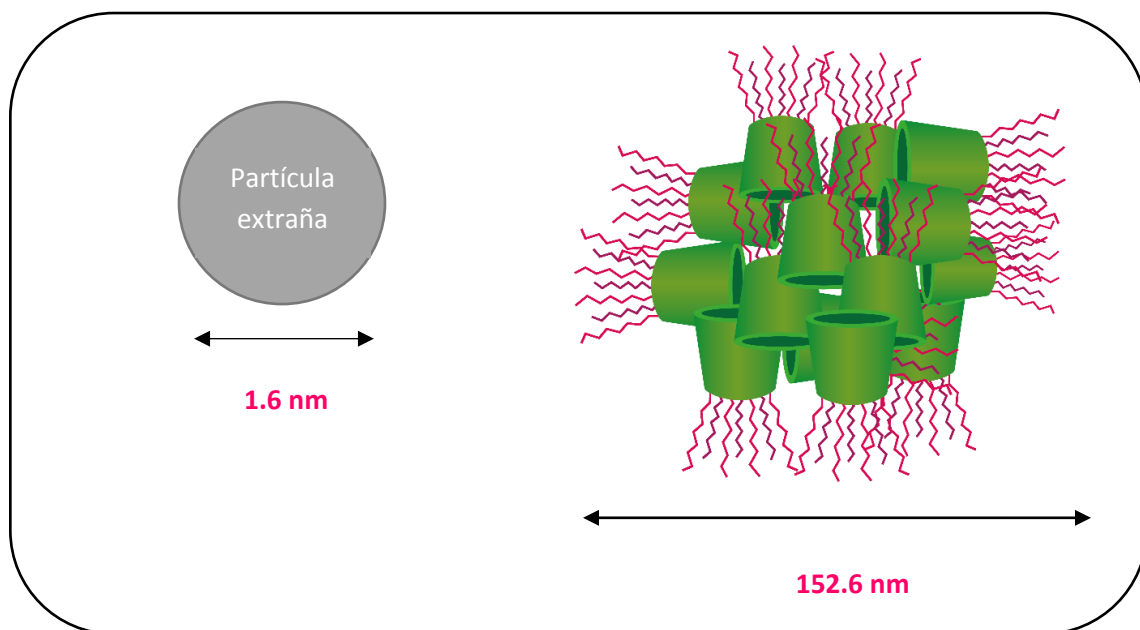


Fig. 33. Representación de las distribuciones poblacionales presentes en la muestra a 42°C.

Tabla 16. β CDPEG₅₀₀₀ en agua a 42.4°C.

Población	D _{h1}		D _{h2}	
	D _h (nm)	%Vol	D _h (nm)	%Vol
1	157	81.7	1.52	18.3
2	155.3	75.2	1.86	24.9
3	152	80.4	1.56	19.6
4	148.2	79.2	1.56	20.8
5	158.1	79.1	1.57	20.9
6	144.8	78.4	1.56	21.6
Promedio	152.6 ± 4.8	79	1.6 ± 0.1	21

La distribución con tamaños entre 1.52-1.86 nm, posiblemente sea producto de impurezas en la muestra, ya que son detectadas hasta cierto día de medición (1344 horas) posiblemente porque se trabajó con la misma muestra a través del tiempo, por lo tanto, los filtros utilizados pudieron causar interferencia en el análisis. Se puede pensar que estas entidades son producto de alguna impureza presente en el disolvente, en el vial o como resultado del proceso de filtración.

Con el fin de descartar o apoyar la hipótesis planteada se requiere repetir los experimentos, usando un lote nuevo de síntesis, cuidando que el proceso de purificación sea el adecuado y descartando cualquier entidad interferente en el disolvente, en los recipientes de contención y durante el proceso de filtración y, por supuesto, el tipo y limpieza de los filtros.

En la Figura 34, se resume los resultados promedio de los experimentos a 37°C y 42°C. Como se observa no existe diferencia significativa entre los valores de tamaño encontrados en Pob1.

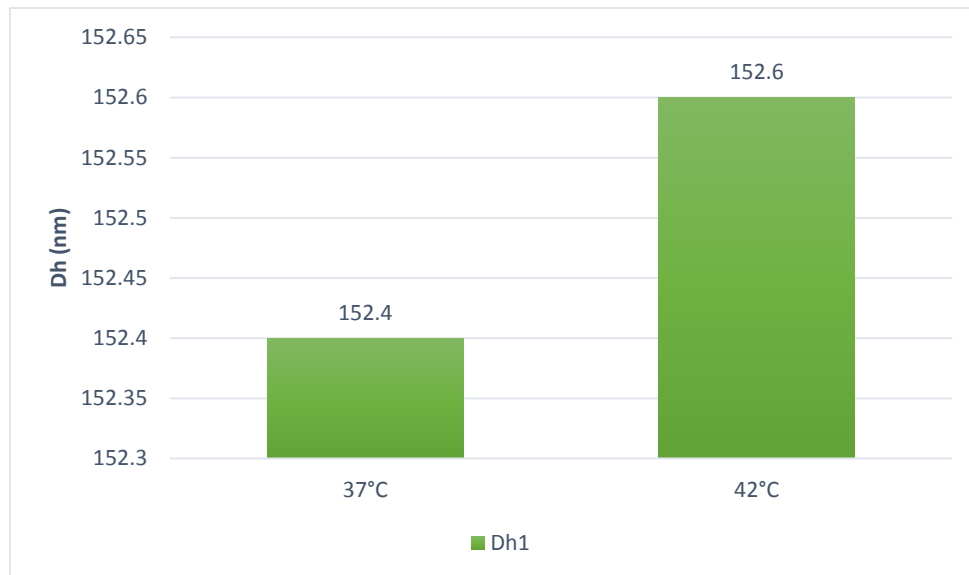


Fig. 34. Cambio en el D_h a diferentes temperaturas.

4.6. Determinación del tamaño de los ensamblados de β CDPEG₅₀₀₀ en medio ácido, alcalino y neutro.

La exploración del comportamiento de β CDPEG₅₀₀₀ mediante DLS, bajo diferentes condiciones de pH, confirmó que el sistema forma asociaciones de tamaño nanométrico, las cuales conservan su tamaño en medio acuoso a través del tiempo. Dado que β CDPEG₅₀₀₀ se ha diseñado como posible acarreador de fármacos, es preciso determinar su comportamiento en condiciones fisiológicas, las cuales podrían influir en el ensamblaje y, por lo tanto, impactar en su desempeño como sistema acarreador. El medio fisiológico involucra varias condiciones, como la temperatura de 37°C (la cual se evaluó), la presencia de sales y macromoléculas, cambios de pH, microambientes determinados, entre otros (Venditti, 2017) (Rizvi and Saleh, 2018). Por lo que, además de la evaluación del sistema a diferentes temperaturas, se realizaron experimentos para determinar el efecto del pH sobre el ensamblaje de β CDPEG₅₀₀₀. Para ello, se prepararon muestras del polímero en 3 diferentes buffers (ver sección de metodología, pág. 29) correspondiente a pH 7.4 que es el pH normal de la sangre (Dragani, 2020); pH 8.0, emulando el pH del intestino grueso (Fallingborg, 1999) y pH de 3.8, condición que se encuentra en los lisosomas (Yildirim et al., 2017). Los lisosomas son vesículas compuestas de fosfolípidos que se forman después del ingreso de un sistema acarreador polimérico al interior de la célula (previo proceso de endocitosis).

La captación celular comienza con la endocitosis. La endocitosis puede ocurrir por fagocitosis (es decir, cuando se internalizan partículas grandes) y por pinocitosis (es decir, cuando hay una captación de líquidos y solutos). La fagocitosis es muy común en células de mamíferos como los macrófagos, que tienen un receptor endocítico especializado en la superficie celular. El proceso comienza con la unión de macromoléculas al receptor celular en la membrana plasmática. Estas moléculas se transforman en vesículas levemente ácidas (pH 5.0–6.5), llamadas endosomas, que luego se fusionan con otros endosomas o lisosomas más maduros. Una vez dentro de los lisosomas, se enfrentan a un pH menor y,

posteriormente, a degradación enzimática. Se puede aprovechar la captación y acumulación de fármacos en los lisosomas para tratar los trastornos lisosomales metabólicos y las infecciones (Arun Kumar, Heidi M. Mansour, Adam Friedman, 2013).

Todos estos experimentos se realizaron a 25°C.

4.6.1. Resultados de los experimentos a pH= 7.4.

La muestra presentó distribuciones poblaciones bimodales (Figura 35). Por un lado, se observa una población (D_{h1}) con un tamaño promedio de 130.5 nm. Por el otro, una segunda población (D_{h2}) con tamaño promedio de 10.4 nm (Tabla 17).

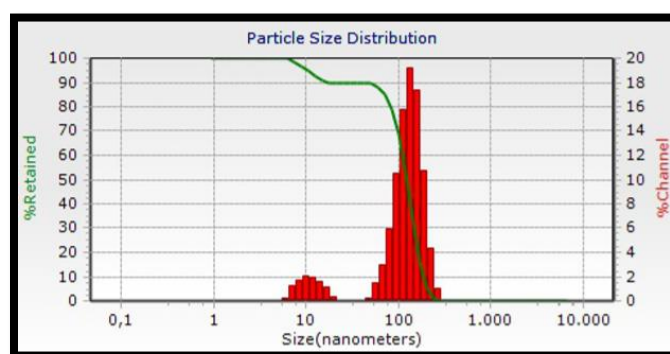


Fig. 35. Distribución de D_h de β CPEG₅₀₀₀ en medio neutro.

Tabla 17. D_h de β CDPEG₅₀₀₀ en pH neutro.

Población No. de repetición	D_{h1}		D_{h2}	
	D_h (nm)	%V ol	D_h (nm)	%V ol
1	137.4	90.1	10.94	9.9
2	130.8	89.5	10.69	10.5
3	145.5	91.3	10.85	8.7
4	142.6	88.9	10.76	11.1
5	104.5	79.9	7.52	20.1
6	121.9	87.9	11.72	12.1
Promedio	130.5	87.9	10.4	12.1
	± 14.0		± 1.3	

El tamaño promedio de las distribuciones poblacionales es semejante a los valores resultantes del análisis del sistema a través del tiempo (108.3-176.5 nm), por lo que no existe diferencia significativa en el tamaño a consecuencia del cambio generado en el medio.

Las distribuciones fueron de 130.5 nm para D_{h1} y 10.4 nm para D_{h2} . Estos valores son muy semejantes a los obtenidos del análisis en agua a 25°C. La distribución minoritaria (D_{h2}) presentó un tamaño promedio de 10.4 nm (Tabla 17), el cual incrementó 0.5 nm con respecto a las mediciones del sistema *versus* tiempo (8.2-9.9 nm). La proporción de D_{h2} se mantuvo en un 12.1%Vol, siendo similar a la encontrada en el análisis del sistema a través del tiempo.

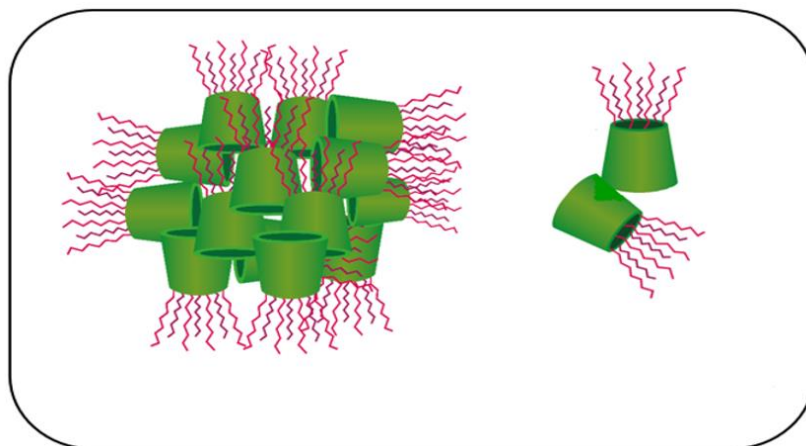


Fig. 36. Representación de las distribuciones poblacionales presentes en la muestra de β CPEG₅₀₀₀ a pH= 7.4.

A valores neutros de pH la estructura de la β CD no debería sufrir modificaciones debido a que bajo estas condiciones sus moléculas son estables (Schönberger et al., 1988). De la misma forma, para el caso de PEG la estabilidad de su estructura se mantiene a pH neutro, ya que el polímero se caracteriza por ser inerte y no

poseer carga (Emoto et al., 1998)(Zalipsky and Harris, 1997)(Eckband, 1997). Es decir, lo observado se encuentra acorde a los resultados esperados.

4.6.2. Resultados de los experimentos a pH= 8.0.

Los resultados obtenidos mediante el análisis de β CDPEG₅₀₀₀ en medio alcalino, muestran distribuciones bimodales (Figura 37). El tamaño promedio de D_{h1} es de 148.3 nm y el de D_{h2} de 11.4 nm (Tabla 18).

Los tamaños promedio obtenidos a partir de las mediciones de la muestra son equiparables a aquellos observados en los experimentos realizados en medio acuoso.

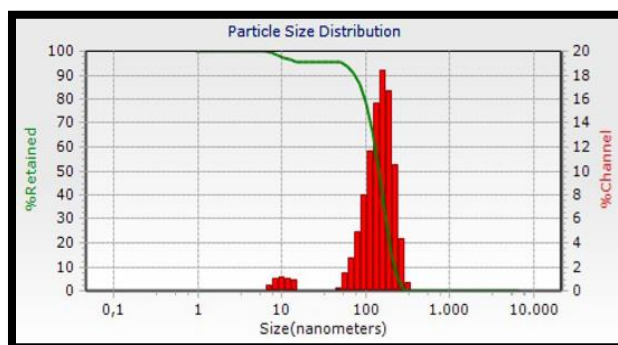


Fig. 37. Distribución de D_h de β CPEG₅₀₀₀ en medio alcalino.

Tabla 18. Cambios en el D_h de β CDPEG₅₀₀₀ en pH alcalino.

Población No. de repetición	D_{h1}		D_{h2}	
	D_h (nm)	%Vol	D_h (nm)	%Vol
1	150.1	96.8	10.4	3.2
2	160.2	97.7	12.27	2.3
3	145.9	96.2	11.21	3.8
4	148.8	95.4	10.29	4.6
5	143.2	95.7	12.88	4.3

6	141.3	100	--	--
Promedio	148.3 ± 6.1	97	11.4 ± 1.0	3.6

En cuanto a las proporciones de cada una de las poblaciones, el D_{h1} es de 97 %Vol, mientras que para D_{h2} , es de 3%Vol. Este comportamiento es similar al que mostró β CDPEG₅₀₀₀ en medio acuoso a través del tiempo, durante los 2 últimos días de análisis (600 h y 1344 h).

El intervalo de la distribución minoritaria (D_{h2}) es de 10.29-12.88 nm (Tabla 18), los tamaños aumentaron ligeramente (2 nm) con respecto a los hallados en el ensayo a pH neutro y también, con respecto a los obtenidos, en el análisis a través del tiempo. Los cambios que se produjeron durante el análisis a pH alcalino no son significativos.

Las variaciones en el aumento del tamaño para D_{h2} son mínimas, lo que era de esperarse porque la β CD se degrada sólo bajo condiciones de alta acidez (pH= 2) o de muy alta alcalinidad (pH= 12) (Schönberger et al., 1988)(Gaidamauskas et al., 2009). Por lo tanto, el comportamiento del sistema en medio alcalino es prácticamente el mismo al observado a pH neutro (Figura 38).

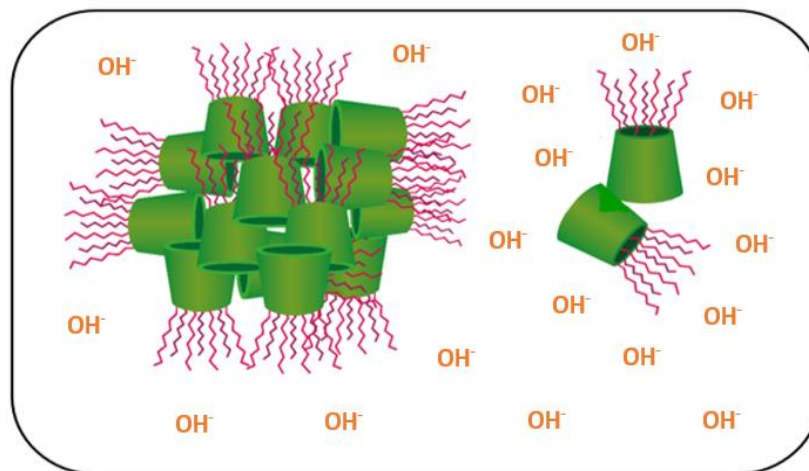


Fig. 38. Representación de las distribuciones poblacionales presentes en la muestra de β CDPEG₅₀₀₀ a pH= 8.0

4.6.3. Resultados de los experimentos a pH= 3.8.

El análisis de la muestra a pH= 3.8 generó distribuciones bimodales (Figura 39), dónde el tamaño promedio para D_{h1} resultó de 11.9 nm y de D_{h2} de 140.3 nm.

Al comparar con β CDPEG₅₀₀₀ en agua a temperatura ambiente, se observa que no hay diferencias significativas en cuanto al tamaño de las poblaciones, ya que una es de 140.3 nm y la otra es de 11.9 nm (Tabla 19). Sin embargo, la abundancia de estas poblaciones es distinta en el caso de pH ácido, ya que aquella de 11.9 nm es mayoritaria con un 55.5%Vol, mientras que el valor de 140 nm es de 44.5%Vol.

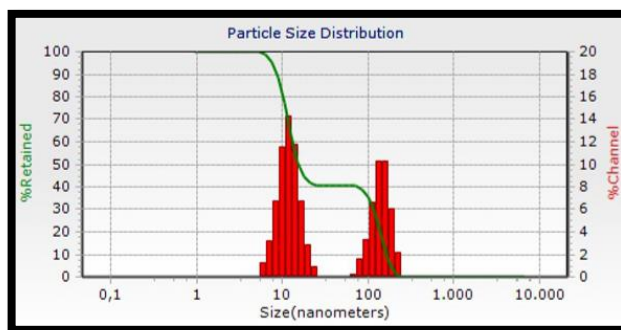


Fig. 39. Distribución de D_h de β CDPEG₅₀₀₀ en medio ácido.

Tabla 19. Cambios en el D_h de β CDPEG₅₀₀₀ en pH ácido.

Población No. de repetición	D_{h1}		D_{h2}	
	D_h (nm)	%Vol	D_h (nm)	%Vol
1	12.1	47.1	136.3	52.9
2	11.92	56	131.1	44
3	12.44	59.1	145.5	40.9
4	11.65	56.9	138.8	43.1
5	11.63	54.2	149.5	45.8
6	11.68	59.5	140.7	40.5
Promedio	11.9 ± 0.3	55.5	140.3 ± 6.0	44.5

Este aumento en la proporción de las estructuras, que se encuentran conformadas por la asociación de 2 moléculas de β CDPEG₅₀₀₀, sí tendría un efecto con el pH ácido ya que, a esta condición la población con un tamaño aproximado de 10 nm se volvió mayoritaria.

Este hecho no se asocia a la descomposición de las partes que conforman el sistema, ya que la β CD, a este valor de pH es estable, por lo que se infiere que el cambio observado en las poblaciones no se debe a una modificación química estructural de la β CD (Samuelsen et al., 2019). En el caso de PEG, tampoco se espera que su estructura sufra cambios a este valor de pH (Zalipsky and Harris, 1997)(Eckband, 1997)(Emoto et al., 1998). Inclusive, dicho cambio ocurriría como un producto de fenómenos de solvatación e interacciones intermoleculares de carácter débil, que se generan por el aumento de iones H^+ en el medio. Las cargas positivas podrían prevenir que las cadenas de PEG interactúen con ellas mismas, y se promovería la interacción de PEG con moléculas de agua (solvatación). En la Figura 40 puede observarse el fenómeno anterior.

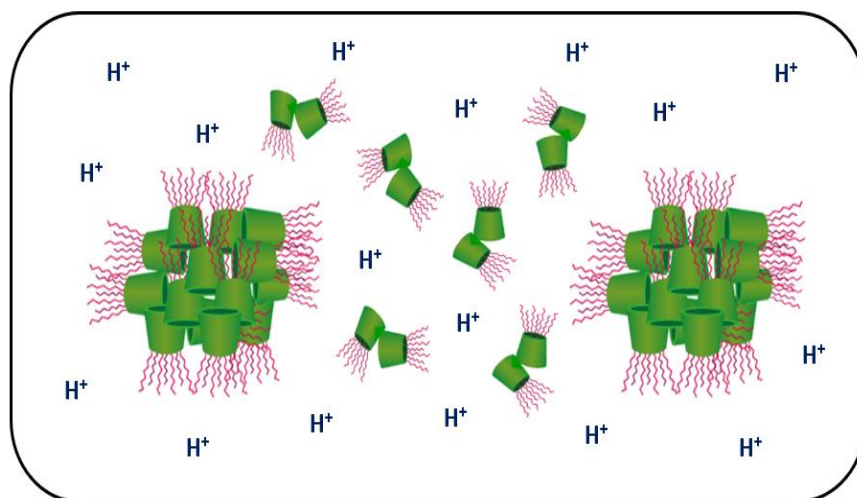


Fig. 40. Representación de las distribuciones poblacionales presentes en la muestra de β CPEG₅₀₀₀ a pH= 3.8.

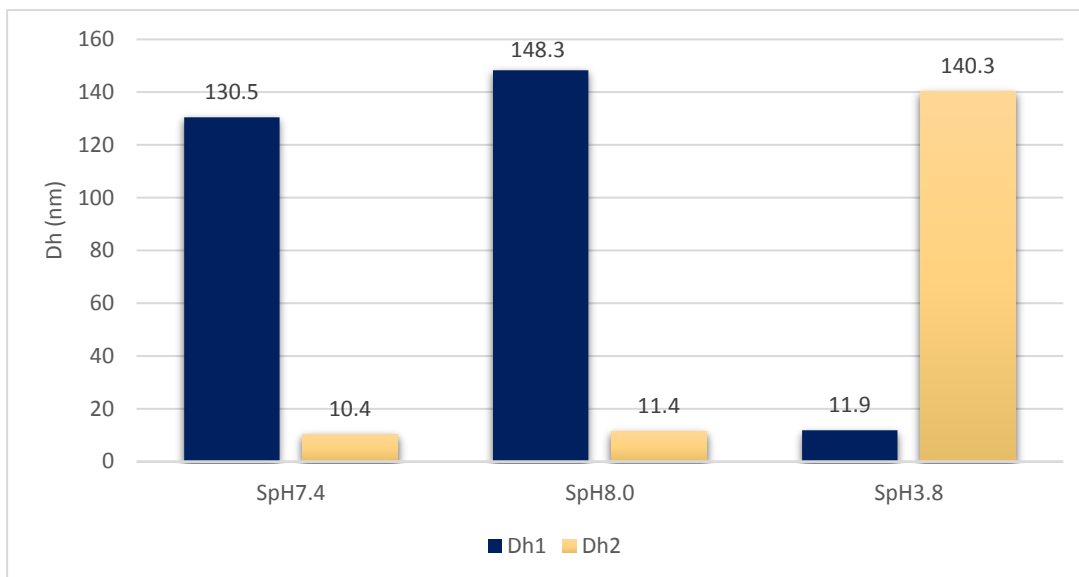


Fig. 41. Cambio en el D_h de β CPEG₅₀₀₀ en función del pH.

La Figura 41 muestra el tamaño de las distribuciones poblacionales obtenidas a partir de las mediciones del sistema β CPEG₅₀₀₀ en medio neutro, alcalino y ácido. Las poblaciones con tamaño mayor a 100 nm son semejantes entre sí, mientras que en las poblaciones con tamaño aproximado a 10 nm existen ligeros cambios. Sin embargo, las diferencias observadas no son significativas.

Así mismo, la Figura 42 permite comparar la abundancia de las distintas poblaciones en las 3 condiciones experimentales evaluadas. A pH= 3.8 se observa un comportamiento distinto, la proporción de las poblaciones cambia en comparación con lo obtenido en los medios neutro y alcalino, ya que en medio ácido las proporciones se encuentran en una relación 55.5:44.5%Vol.

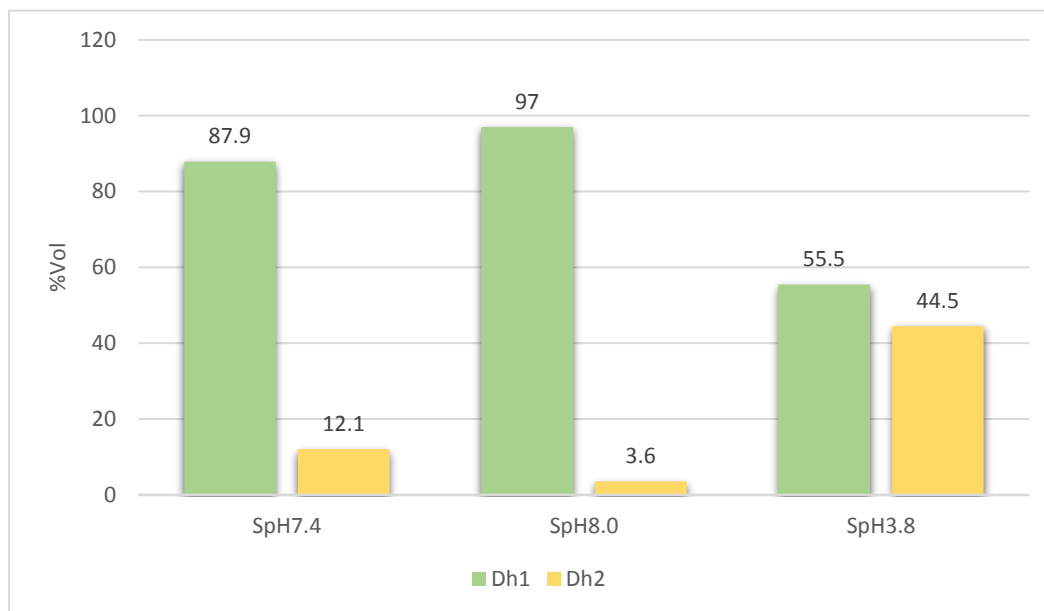


Fig. 42. Cambio en el %Vol de β CPEG₅₀₀₀ en función del pH.

También se realizaron evaluaciones con la mezcla física de componentes a distintos valores de pH. Sus comportamientos son completamente distintos a los que se presentan con β CPEG₅₀₀₀ (Anexo 3).

V. Perspectivas.

Con la finalidad de corroborar la cantidad de moléculas que forman los ensamblados de menor tamaño (8.9 nm), puede hacerse uso de técnicas de microscopía como la microscopía electrónica de transmisión (TEM), de fuerza atómica (AFM), etc. Estas herramientas ayudarán a identificar de una manera más precisa las características y conformación de las distribuciones poblacionales.

Algunas técnicas que podrían ser usadas para confirmar tamaño, forma y conformación de la diversidad de asociaciones del sistema β CDPEG₅₀₀₀, son la difracción de rayos X, la microscopía electrónica de transmisión (TEM), la microscopía de efecto túnel (STM) y la microscopía de fuerza atómica (AFM).

El incremento de la proporción de D_{h2} (Pob2) cuando el sistema se encuentra en medio ácido podría ser bastante útil para estudios posteriores ya que es posible que actúe como un factor promotor de la liberación del fármaco en el ambiente lisosomal, debido al ambiente ácido en su interior.

VI. Conclusiones.

En este trabajo se exploró la capacidad de ensamblaje de β CD modificada con 7 cadenas de PEG de 5 kDa en su cara primaria. También se determinó el tamaño de dichos ensamblados, así como su respuesta frente a diferentes condiciones del medio.

Se encontró que efectivamente, la β CD forma ensamblados en disolución acuosa y, por la técnica de DLS, se encontró que dichas entidades son de un tamaño promedio de 143.3 nm.

Con base en la información obtenida es probable que el PEG₅₀₀₀ influya en la capacidad de asociación de las moléculas de β CD. De hecho, el comportamiento del sistema se asemeja más al polímero que al de la β CD nativa y esto se puede deber a que el primero se encuentra en mayor proporción. De acuerdo con estudios realizados por otros grupos de investigación, se sabe que β CD se auto ensambla a concentraciones mayores a las reportadas en este trabajo y el tamaño de dichas entidades es muy variable (90-300 nm). Sin embargo, el caso de β CDPEG₅₀₀₀ resulta muy interesante ya que a una concentración de 0.5 mM se observan ensamblados de un tamaño que oscila en los 140 nm y que permanece constante no solamente a través del tiempo si no también frente a pH neutro, básico y a temperatura fisiológica.

Es también muy interesante que, a pH ácido, predominan las ciclodextrinas pegiladas como unidades. Su predominancia a una temperatura de 42 °C es menor que a pH ácido, sin embargo, es solo en estos casos en los que se

presenta este comportamiento. Aunque los ensamblados que permanecen en ambas situaciones mantienen el tamaño de ~140 nm.

Ya que las variaciones en el tamaño de los ensamblados no cambian de manera significativa, el sistema β CDPEG₅₀₀₀ podría ser utilizado con éxito como un acarreador de fármacos, sin embargo, es necesario seguir con la investigación para poder definirlo como tal.

VII. Referencias.

- Arun Kumar, Heidi M. Mansour, Adam Friedman, E.R.B., 2013. Nanomedicine in Drug Delivery.
- Berthely Cardoso, K.M., Rojano, N.G., n.d. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA PROMEDIO POR DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA PARA NANOPARTÍCULAS.
- Bhattacharjee, S., 2016. Review article DLS and zeta potential – What they are and what they are not ? J. Control. Release 235, 337–351.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Boekhoven, J., Stupp, S.I., 2014. 25th anniversary article: Supramolecular materials for regenerative medicine. Adv. Mater. 26, 1642–1659.
<https://doi.org/10.1002/adma.201304606>
- Boisseau, P., Loubaton, B., 2011. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. Comptes Rendus Phys. 12, 620–636.
<https://doi.org/10.1016/j.crhy.2011.06.001>
- Bonini, M., Rossi, S., Karlsson, G., Almgren, M., Nostro, P. Lo, Baglioni, P., 2006. Self-assembly of β -cyclodextrin in water. Part 1: Cryo-TEM and dynamic and static light scattering. Langmuir 22, 1478–1484.
<https://doi.org/10.1021/la052878f>
- Clark, A.J., Wiley, D.T., Zuckerman, J.E., Webster, P., Chao, J., Lin, J., Yen, Y., Davis, M.E., 2016. CRLX101 nanoparticles localize in human tumors and not in adjacent, nonneoplastic tissue after intravenous dosing. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 113, 3850–3854. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603018113>
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Davarani, F.H., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., Id, M.R.M., 2018. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems 1–17.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>

- de Mello Donegá, C., 2014. The Nanoscience Paradigm: “Size Matters!,” in: Nanoparticles. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1–12. https://doi.org/10.1007/978-3-662-44823-6_1
- Eckband, D.L., 1997. Measurements of attractive forces between proteins and end-grafted poly (ethylene glycol) chains 94, 8399–8404.
- Emoto, K., Van Alstine, J.M., Harris, J.M., 1998. Stability of poly(ethylene glycol) graft coatings. *Langmuir* 14, 2722–2729. <https://doi.org/10.1021/la971010p>
- Gaidamauskas, E., Norkus, E., Butkus, E., Crans, D.C., Grinciene, G., 2009. Deprotonation of β -cyclodextrin in alkaline solutions. *Carbohydr. Res.* 344, 250–254. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.10.025>
- Hare, J.I., Lammers, T., Ashford, M.B., Puri, S., Storm, G., Barry, S.T., 2017. Challenges and strategies in anti-cancer nanomedicine development: An industry perspective. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 108, 25–38. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.025>
- Huckaby, J.T., Lai, S.K., 2018. PEGylation for enhancing nanoparticle diffusion in mucus. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 124, 125–139. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.08.010>
- Jambhekar, S.S., Breen, P., 2016. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: Structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. *Drug Discov. Today* 21, 356–362. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.11.017>
- Jansook, P., Ogawa, N., Loftsson, T., 2018. Cyclodextrins : structure , physicochemical properties and pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.* 535, 272–284. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.11.018>
- Knop, K., Hoogenboom, R., Fischer, D., Schubert, U.S., 2010. Poly(ethylene glycol) in drug delivery: Pros and cons as well as potential alternatives. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 49, 6288–6308.

<https://doi.org/10.1002/anie.200902672>

Kurkov, S. V., Loftsson, T., 2013. Cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* 453, 167–180.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.055>

Li, W., Zhan, P., Clercq, E. De, Lou, H., Liu, X., 2013. Progress in Polymer Science
Current drug research on PEGylation with small molecular agents. *Prog.*

Polym. Sci. 38, 421–444. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2012.07.006>

Loftsson, T., 2002. *Cyclodextrins* 213–218.

Messner, M., Kurkov, S. V., Brewster, M.E., Jansook, P., Loftsson, T., 2011a. Self-assembly of cyclodextrin complexes: Aggregation of

hydrocortisone/cyclodextrin complexes. *Int. J. Pharm.* 407, 174–183.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.01.011>

Messner, M., Kurkov, S. V., Jansook, P., Loftsson, T., 2010a. Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 387, 199–208.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.11.035>

Messner, M., Kurkov, S. V., Jansook, P., Loftsson, T., 2010b. Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 387, 199–208.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.11.035>

Messner, M., Kurkov, S. V., Maraver, M., Álvarez, B., Brewster, M.E., Loftsson, T., 2011b. Self-assembly of cyclodextrin complexes : Effect of temperature ,

agitation and media composition on aggregation. *Int. J. Pharm.* 419, 322–328.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.07.041>

Mishra, V., Kesharwani, P., Mohd Cairul Iqbal Mohd Amin, Iye, A. (Eds.), 2017.

Nanotechnology-Based Approaches for Targeting and Delivery of Drugs and Genes.

Pimentel, R.C., Martín-martínez, E.S., 2014. Light scattering dynamics in

determining size of polymeric nanoparticles. *Lat. Am. J. Phys. Educ.* 8, 1–5.

- Rizvi, S.A.A., Saleh, A.M., 2018. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharm. J.* 26, 64–70.
<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.10.012>
- Rojas-Aguirre, Y., Aguado-Castrejón, K., González-Méndez, I., 2016. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? *Educ. Quim.* 27, 286–291.
<https://doi.org/10.1016/j.eq.2016.07.002>
- Rojas-Aguirre, Y., Torres-Mena, M.A., López-Méndez, L.J., Alcaraz-Estrada, S.L., Guadarrama, P., Urucha-Ortíz, J.M., 2019. PEGylated β -cyclodextrins: Click synthesis and in vitro biological insights. *Carbohydr. Polym.* 223, 115113.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115113>
- Sá Couto, A.R., Ryzhakov, A., Loftsson, T., 2018. Self-Assembly of α -Cyclodextrin and β -Cyclodextrin: Identification and Development of Analytical Techniques. *J. Pharm. Sci.* 107, 2208–2215. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.03.028>
- Samuelson, L., Holm, R., Lathuile, A., Schönbeck, C., 2019. Correlation between the stability constant and pH for β -cyclodextrin complexes. *Int. J. Pharm.* 568, 118523. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118523>
- Schönberger, B.P., Jansen, A.C.A., Janssen, L.H.M., 1988. The acid hydrolysis of Cyclodextrins and linear Oligosaccharides. *Proc. Fourth Int. Symp. Cyclodextrins* 61–63.
- Suzie, H.P., Davis, M.E., 2002. Development of a nonviral gene delivery vehicle for systemic application. *Bioconjug. Chem.* 13, 630–639.
<https://doi.org/10.1021/bc0155768>
- Venditti, I., 2017. Morphologies and functionalities of polymeric nanocarriers as chemical tools for drug delivery: A review. *J. King Saud Univ. - Sci.*
<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.10.004>
- Webber, M.J., Appel, E.A., Meijer, E.W., Langer, R., 2015. Supramolecular

biomaterials. *Nat. Mater.* 15, 13–26. <https://doi.org/10.1038/nmat4474>

Webber, M.J., Langer, R., 2017. Drug delivery by supramolecular design. *Chem. Soc. Rev.* 46, 6600–6620. <https://doi.org/10.1039/c7cs00391a>

Yildirim, T., Traeger, A., Sungur, P., Hoepfener, S., Kellner, C., Yildirim, I., Pretzel, D., Schubert, S., Schubert, U.S., 2017. Polymersomes with Endosomal pH-Induced Vesicle-to-Micelle Morphology Transition and a Potential Application for Controlled Doxorubicin Delivery. *Biomacromolecules* 18, 3280–3290. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00931>

Zalipsky, S., Harris, J.M., 1997. Introduction to Chemistry and Biological Applications of Poly(ethylene glycol). *ACS Symp. Ser.* 680, 1–13. <https://doi.org/10.1021/bk-1997-0680.ch001>

Zerkoune, L., Angelova, A., Lesieur, S., 2014. Nano-Assemblies of Modified Cyclodextrins and Their Complexes with Guest Molecules: Incorporation in Nanostructured Membranes and Amphiphile Nanoarchitectonics Design. *Nanomaterials* 4, 741–765. <https://doi.org/10.3390/nano4030741>

VIII. Anexos

ANEXO 1.

Determinación del D_h de S_1 y S_2 efectuada en función del tiempo, a temperatura ambiente.

1. S_1

Tabla A1-1. D_h de S_1 en función del tiempo.

No. de medición	2	3	4	5
Tiempo desde su preparación (h)	96	120	144	168
No. de repetición	D_h (nm)	D_h (nm)	D_h (nm)	D_h (nm)
1	4500	4740	3740	3220
2	4670	4290	3770	3390
3	4790	3990	3650	3220
4	4450	4380	4070	3390
5	4890	4360	3760	3380
6	4490	4500	3830	3500
Promedio	4631.7 ± 180.9	4376.7 ± 246.8	3803.3 ± 143.1	3350 ± 109.1

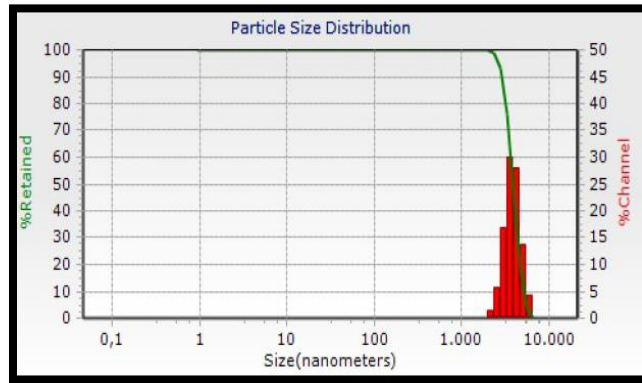


Fig. A1-1. D_h en S_1 .

2. S_2

Tabla A1-2. D_{h1} de S_2 en función del tiempo.

No. de medición	2		3		4		5	
Tiempo desde su preparación (h)	96		120		144		168	
No. de repetición	Dh (nm)	% Vol	Dh (nm)	% Vol	Dh (nm)	% Vol	Dh (nm)	% Vol
1	1039	62.6	2200	46.9	1325	100	836	53.2
2	1091	87	1265	100	852	84.7	854	86.4
3	1607	68	1284	84.5	887	100	1012	96.5
4	910	31.3	1390	100	781	81.2	777	65.5
5	1136	100	2230	32.4	703	54.3	923	81.5
6	1152	85.3	1843	67.5	1111	100	816	41.4
Promedio	1115.8±237.6	72.4	1702±449.4	71.9	943.2±232.1	86.7	869.7±84.8	70.8

Tabla A1-3. D_{h2} de S_2 en función del tiempo.

No. de medición	2		3		4		5	
Tiempo desde su preparación (h)	96		120		144		168	
No. de repetición	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol
1	3540	37.4	650	53.1	--	--	4020	46.8
2	4220	13	--	--	2599	15.3	2729	13.6
3	4220	17	435	15.5	--	--	5010	3.5
4	4410	68.7	--	--	2055	18.8	2756	34.5
5	--	--	898	67.6	1667	45.7	2473	18.5
6	372	14.7	567	32.5	--	--	4100	58.6
Promedio	4097.5±38.2.3	30.2	637±194.9	42.2	2107±468.2	26.6	3514.7±1011.1	29.3

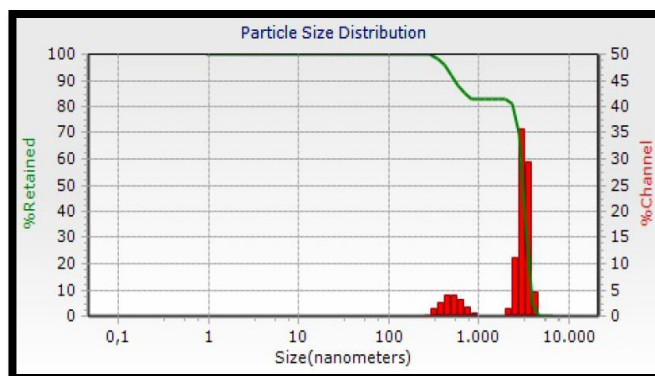


Fig. A1-2. D_h en S_2 .

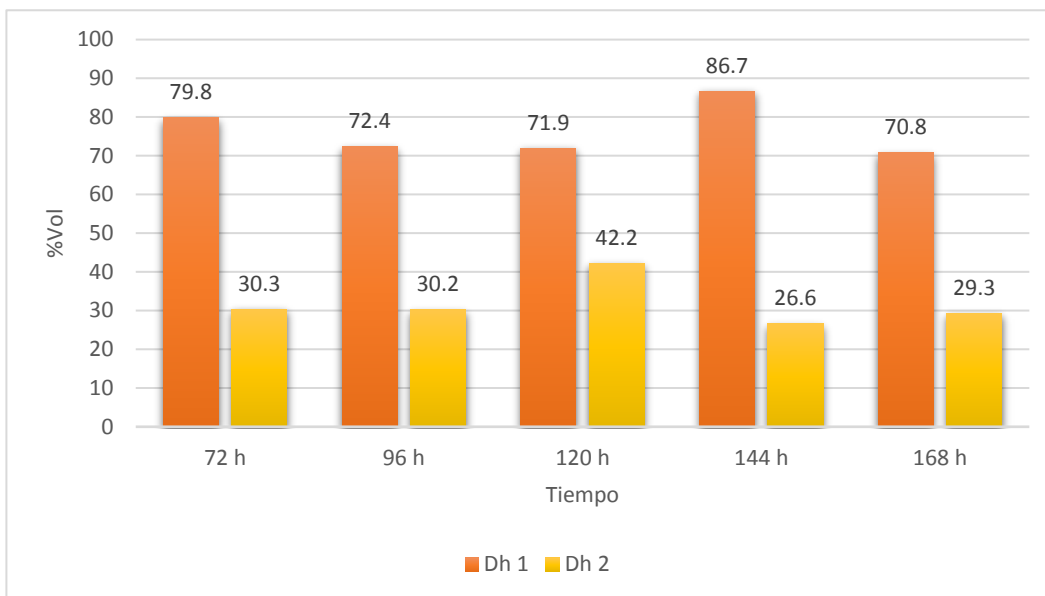


Fig. A1-3. Cambio del %Vol de S₂ con el tiempo.

3. βCD y PEG₅₀₀₀ como mezcla física (MF).

Tabla A1-4. D_h de MF en el primer día de análisis.

No. de repetición	D _{h1} (nm)	%Vol	D _{h2} (nm)	%Vol
1	3.6	100	--	--
2	3.6	46.5	4850	53.5
3	3.7	48.8	5080	51.2
4	3.7	75.2	4910	24.8
5	3.5	100	--	--
6	3.5	84.9	930	15.1
Promedio	3.6± 0.1	75.9	3942.5 ±1741.3	36.2

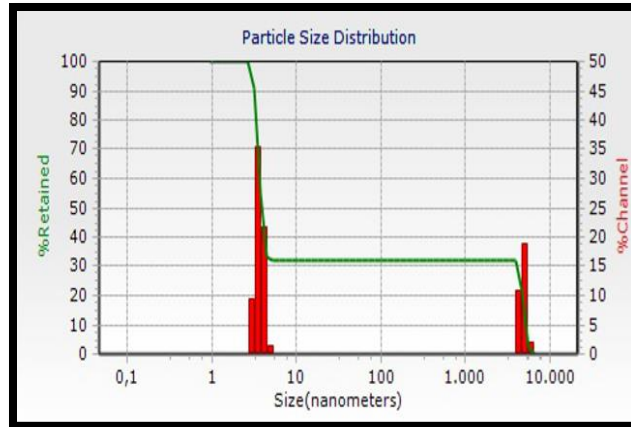


Fig. A1-4. Distribución de D_h en MF.

Tabla A1-5. D_{h1} de MF en función del tiempo.

No. de medición	2		3		4		5		6		7		8	
Tiempo desde su preparación (h)	24		72		672		696		720		744		768	
No. de repetición	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol
1	3.4	47.6	171.2	76.7	358	85.6	317	41.3	158.5	38.7	246	88.9	132.8	53.5
2	3.2	100	182.8	63.8	327	84.5	304	82.5	231.9	50.1	226.1	94.6	128.8	67.3
3	3.3	91.6	252.2	84.9	360	85	438	83.1	159.5	44.3	220.7	92.1	128.5	68.7
4	3.5	100	250.3	75.7	343	86	273.3	63	163.9	22.6	246.9	94.4	134.1	74.8
5	3.5	95.4	176.4	81.7	323	65.9	316	17.9	148.5	47.6	222.5	95.8	133.9	60.6
6	3.9	96.5	232.1	91.5	368	77	--	--	155.2	48.4	212.4	71.8	140.3	63.8
Promedio	3.5 ±0.2	88.5	210.8 ±34.8	79.1	346.5 ±16.9	80.7	329.7 ±56.4	57.6	169.6 ±28.3	42	229.1 ±12.9	89.6	133.1± 3.9	64.8

Tabla A1-6. D_{h2} de MF en función del tiempo.

No. de medición	2		3		4		5		6		7		8	
Tiempo desde su preparación (h)	24		72		600		624		648		672		696	
No. de repetición	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol
1	127.2	52.4	3.9	23.3	4860	14.4	4250	50.2	4.4	61.3	4.91	11.1	3.9	46.5
2	--	--	5.0	36.2	4920	15.5	3110	1.3	4.4	49.9	4.98	5.4	3.8	32.7
3	169.1	8.4	5.0	15.1	4960	12.7	116.1	1.9	4.4	55.7	5.03	7.9	3.8	31.3
4	--	--	5.0	24.3	4850	11.4	--	--	4.7	77.4	5.15	5.6	3.9	25.2
5	147.4	4.6	5.0	18.3	5200	30.5	4850	82.1	5.1	36.8	4.98	4.2	3.8	39.4
6	130.3	3.5	5.0	8.5	5560	18.7	5960	80.9	5.3	37	4.87	8.4	3.8	36.2
Promedio	143.5 ±16.7	17.2	4.8 ±0.4	21.0	5058. 3±25 2.7	17.2	4542. 5±10 29.7	43.3	4.7 ±0.4	53	5.0 ±0.1	7.1	3.8 ±0.1	35.2

Tabla A1-7. D_{h3} de MF en función del tiempo.

No. de medición	4		5		6		7	
Tiempo desde su preparación (h)	600		624		648		672	
No. de repetición	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol
1	--	--	4.9	8.5	--	--	--	--
2	--	--	4.3	16.2	--	--	--	--
3	1.1	2.3	4.6	15	--	--	--	--
4	1.0	2.6	5.5	37	--	--	--	--
5	1.0	3.6	--	--	1.0	15.6	--	--
6	1.0	4.3	1002	19.1	1.0	14.6	1.0	19.8
Promedio	1.0 ± 0.03	3.2	4.8 ± 0.4	19.2	1.0 ± 0.01	15.1	1.0	19.8

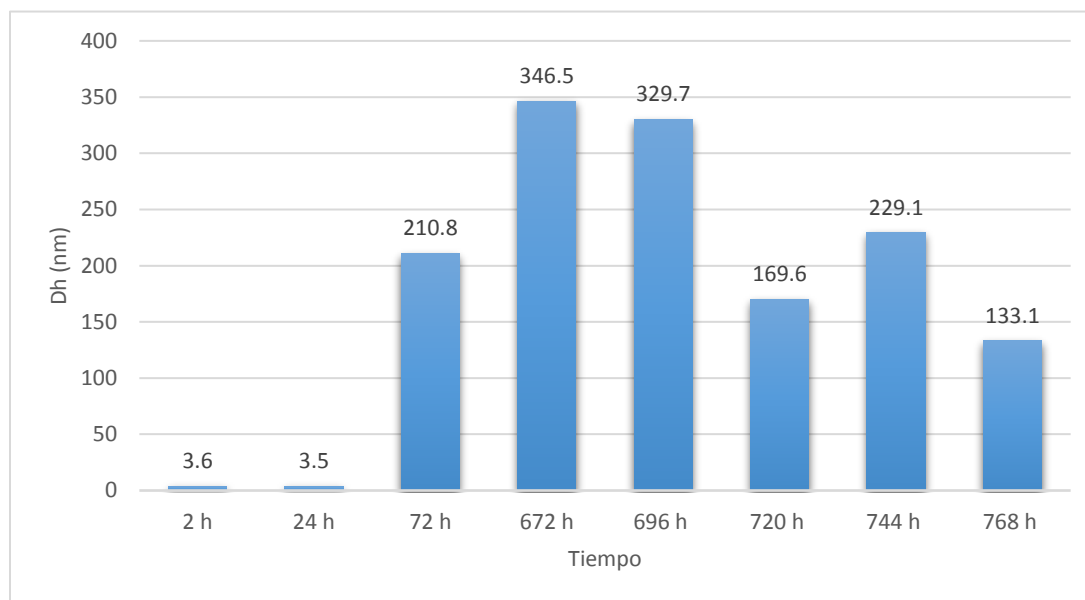


Fig. A1-5. Cambio en D_{h1} en función del tiempo de MF.

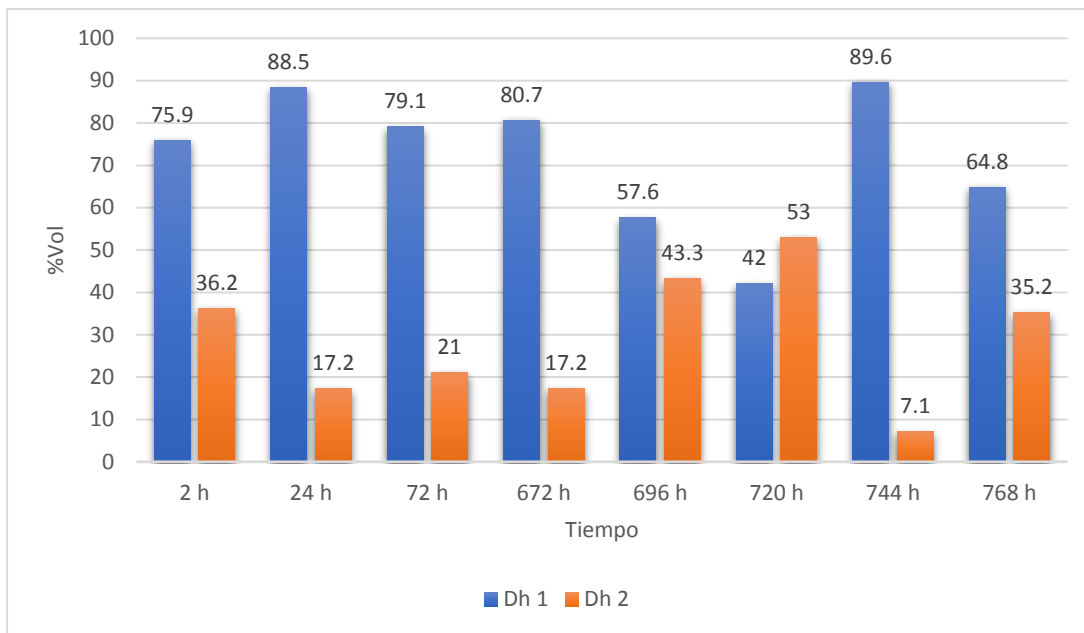


Fig. A1-6. Cambio del %Vol de MF en función del tiempo.

ANEXO 2.

Determinación del D_h en la mezcla física de componentes y PEG₅₀₀₀ a 37°C y 42°C.

1. β CD y PEG₅₀₀₀, como mezcla física a distintas temperaturas (MFT).

1.1. MFT a 37°C.

Tabla A2-1. D_h de MFT en agua a 37.4°C.

Población	D_{h1}		D_{h2}		D_{h3}	
	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol
1	4.08	87.1	--	--	248.4	12.9
2	3.75	86.2	1.15	3.8	176.3	10
3	4.15	53.3	1.07	41.5	174	5.2
4	4.43	38.7	1.08	50.9	188	10.4
5	5.14	23.7	1.2	58.8	842	17.5
6	5.07	21.7	1.07	72.3	213.2	6
Promedio	4.4 ± 0.5	51.8	1.1 ± 0.1	45.5	307 ± 240.6	10.3

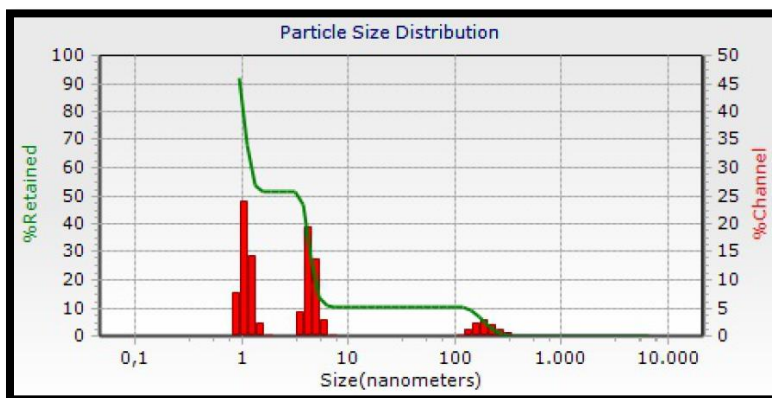


Fig. A2-1. D_h de MFT a 37°C.

1.2. MFT a 42°C.

Tabla A2-2. D_h de MFT en agua a 42.3°C.

No. de repetición	D_h (nm)
1	1.7
2	1.7
3	1.6
4	1.5
5	1.5
6	1.5
Promedio	1.6 ± 0.1

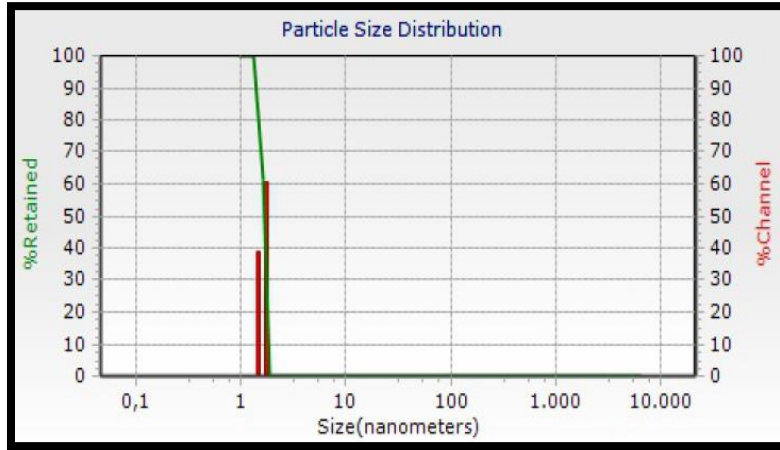


Fig. A2-2. D_h de MFT a 42°C.

1.3. Gráfico comparativo de los tamaños promedio de MFT a diferentes temperaturas.

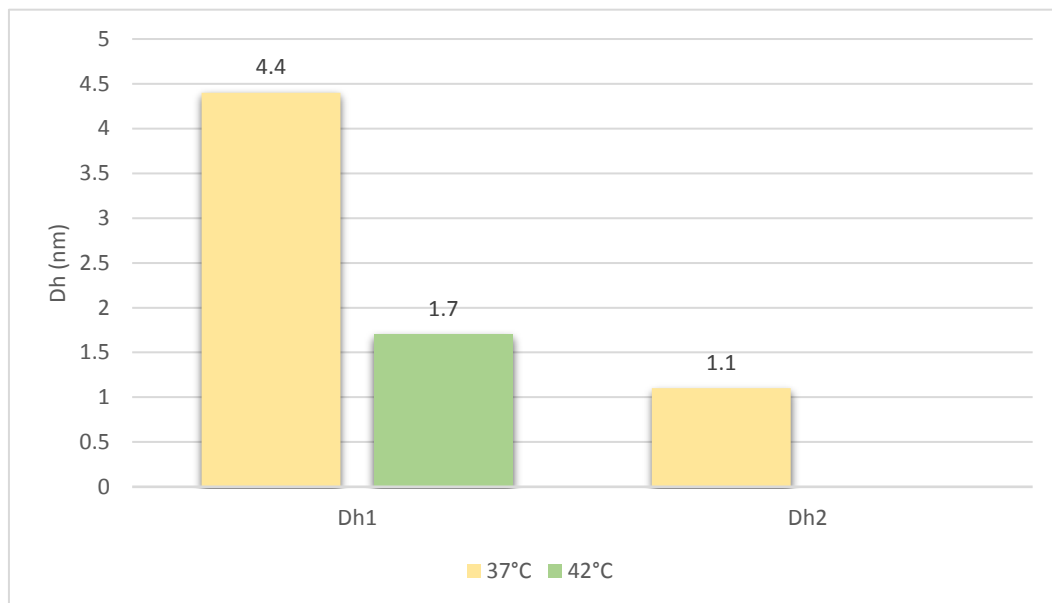


Fig. A2-3. D_h de MFT a 37°C y 42°C.

2. PEG₅₀₀₀ a distintas temperaturas (PT).

2.1. PT a 37°C.

Tabla A2-3. D_h de PT en agua a 37.4°C.

Población	Dh1		Dh2		
	No. de repetición	Dh (nm)	%Vol	Dh (nm)	%Vol
1	1	1.0	97.5	177.1	2.5
2	2	1.01	95.3	182.5	4.7
3	3	1.01	98.5	173.7	1.5
4	4	1.0	98.3	170.7	1.7
5	5	1.18	100	--	--
6	6	1.18	100	--	--
Promedio		1.1 ± 0.1	98.3	176 ± 4.4	2.6

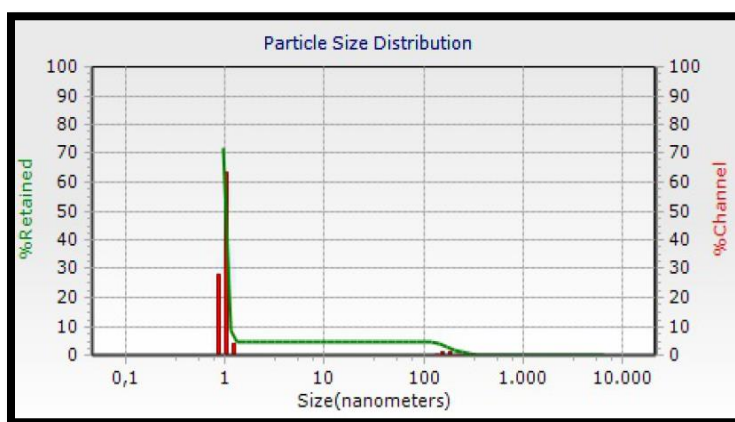


Fig. A2-4. Distribución de D_h en PT a 37°C.

2.2. PT a 42°C.

Tabla A2-4. D_h de PT en agua a 42.3°C.

Población	D_{h1}		D_{h2}	
	D_h (nm)	% Vol	D_h (nm)	% Vol
1	133.4	60.8	10.42	39.2
2	116.5	59	10.85	41
3	269.4	75.6	9.21	24.4
4	139.7	56.8	7.43	43.2
5	150.8	52.8	7.84	47.2
6	148	29.2	6.62	70.8
Promedio	159.6 ± 50.3	55.7	8.7 ± 1.6	44.3

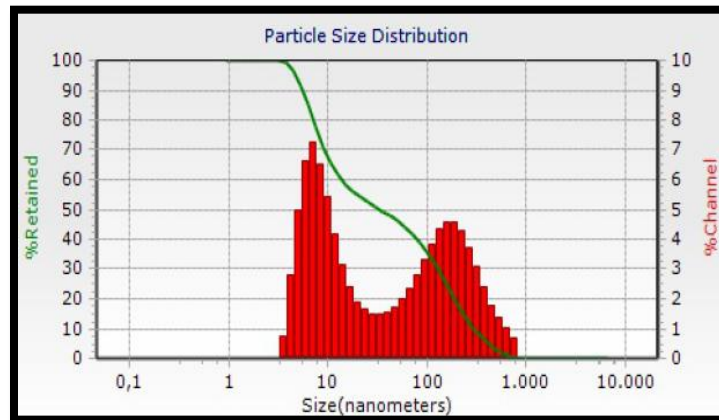


Fig. A2-5. Distribución de D_h en PT a 42°C.

2.3. Gráfico comparativo de los tamaños promedio de PT a diferentes temperaturas.

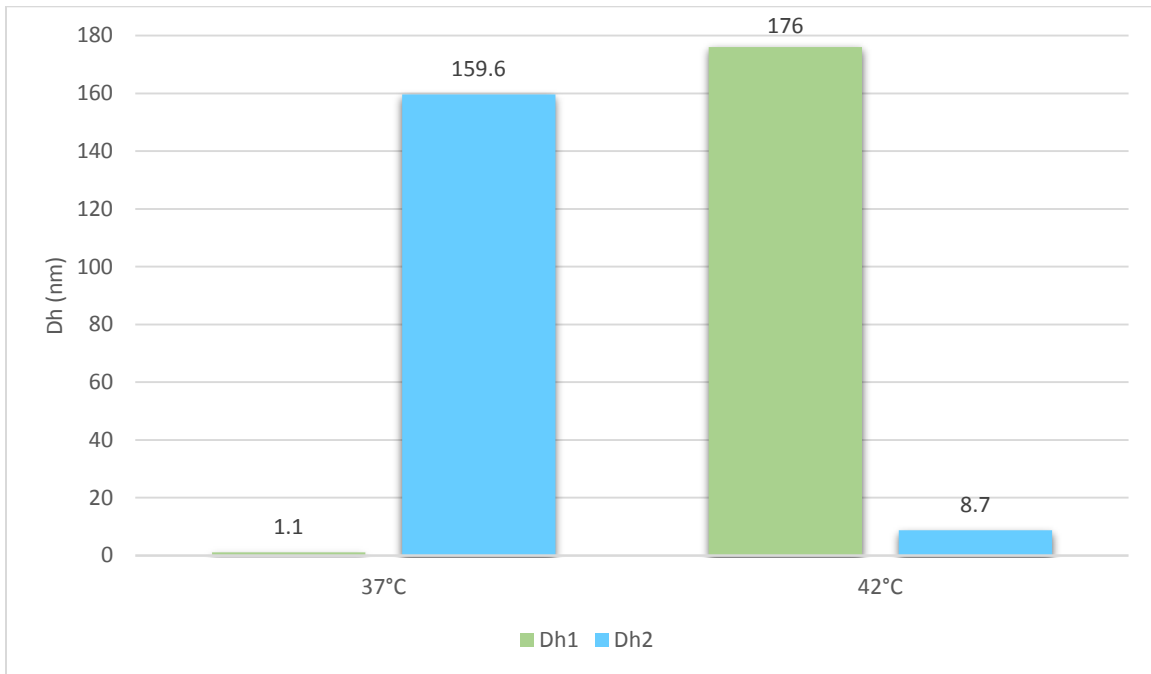


Fig. A2-6. Dh de PEG₅₀₀₀ a 37°C y 42°C.

ANEXO 3.

DLS de disoluciones buffer y la mezcla física a pH 7.4, 8.0 y 3.8.

1.1. Buffer de fosfatos a pH neutro y alcalino, buffer de acetatos a pH ácido.

Tabla A3-1. D_h de soluciones buffer con distintos valores de pH.

Muestra	pH7	pH8	pH3
No. de repetición	D_h (nm)	D_h (nm)	D_h (nm)
1	4.1	101.6	6000
2	4.7	123	5250
3	4.0	117.6	4550
4	4.6	139	4340
Promedio	4.3 ± 0.3	120.3 ± 13.4	5035 ± 652
PDI	0.05	0.4	0.03

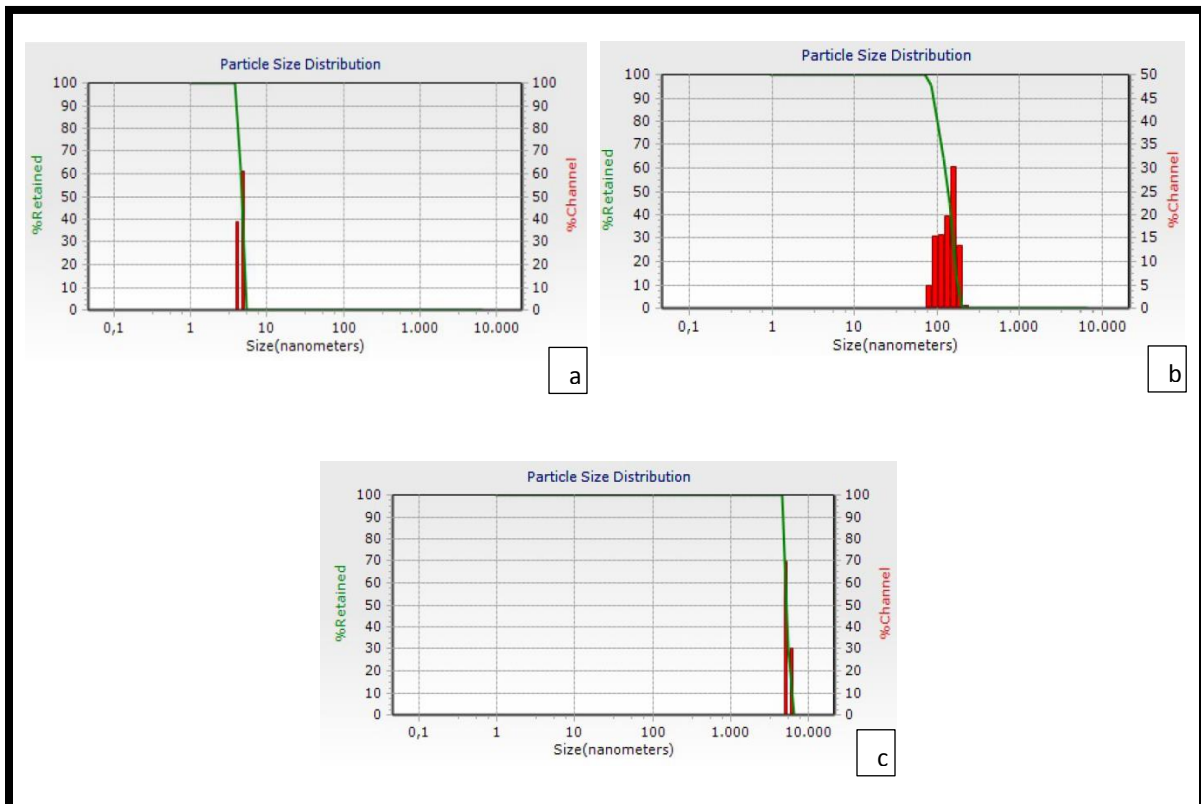


Fig. A3-1. D_h en disoluciones buffer, donde a) pH=7.4, b) pH=8.0 y c) pH=3.8.

Se efectuaron múltiples mediciones en buffer de fosfatos a pH 8 y en todos los casos se observó una población aproximadamente de 120 nm.

2. β CD y PEG₅₀₀₀ como mezcla física en medios con diferente pH (MFpH).

2.1. MFTpH a pH= 7.4.

Tabla A3-2. D_h de MFpH7.4.

Población No. de repetición	Dh1		Dh2		Dh3		Dh4		Dh5	
	Dh (nm)	% Vol	Dh (nm)	% Vol	Dh (nm)	% Vol	Dh (nm)	% Vol	Dh (nm)	% Vol
1	96.2	34.1	1532	39.1	4.1	12.8	332	14	--	--
2	181.9	49.3	1086	30.4	3.3	7.4	37.4	12.9	--	--
3	97.6	26.2	1341	37	4.8	22.1	331	14.7	--	--
4	178.7	27.5	1768	29.9	3.8	18.4	720	21.6	1.1	2.6
5	119.5	10.1	1401	40	3.9	19.8	477	25.7	1.1	4.4
6	164.8	38.6	1048	38.8	3.8	19.9	--	--	1.1	2.7
Promedio	139.8 ± 36.5	31	1362.7 ± 248.5	35.9	3.9 ± 0.4	16.7	--	17.8	1.1 ± 0.03	3.2

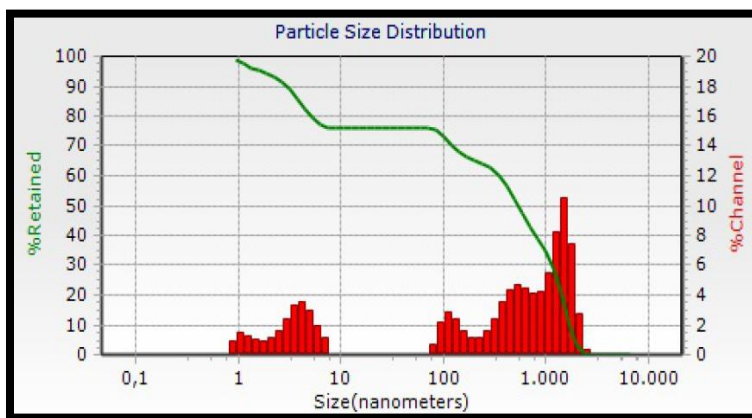


Fig. A3-2. D_h en MFpH7.4.

2.2. MFTpH a pH= 8.0.

Tabla A3-3. D_h de MFpH8.0.

Población	D _{h1}		D _{h2}		D _{h3}		D _{h4}		D _{h5}	
	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol
1	149.5	39.7	1066	32.1	4.0	19.1	4250	9.1	--	--
2	105.3	32.2	725	34.3	4.0	17.9	3180	12.8	1.1	2.8
3	127.7	14.4	874	59.4	4.0	22.3	--	--	1.1	3.9
4	115.8	15.4	468	25.4	4.0	19.6	1564	35.1	1.1	4.5
5	131.4	19.5	815	47.3	4.0	27	4500	6.2	--	--
6	124.3	9.7	835	61.5	4.1	22.5	--	--	1.1	6.4
Promedio	125.7 ± 13.7	21.8	797.2 ± 179.6	43.3	4.0 ± 0.1	21.4	3373.5 ± 1156.4	15.8	1.1 ± 0.01	4.4

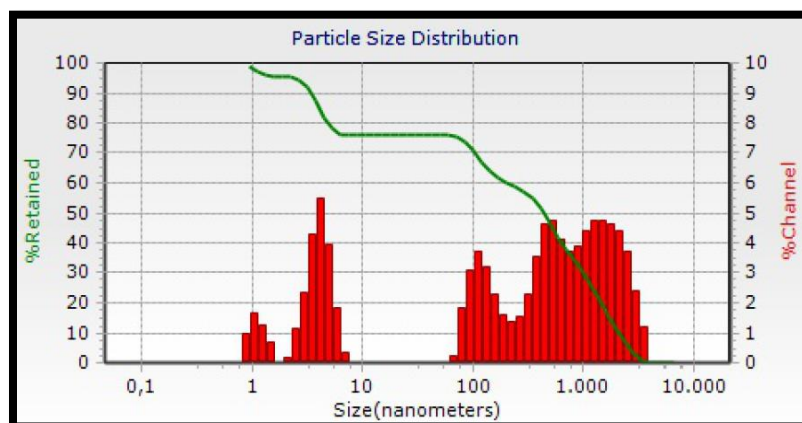


Fig. A3-3. D_h en MFpH8.0.

2.3. MFTpH a pH= 3.8.

Tabla A3-4. D_h de MFpH3.8.

Población	D _{h1}		D _{h2}		D _{h3}		D _{h4}	
	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol	D _h (nm)	% Vol
1	4.6	75.3	3780	6.3	527	18.4	--	--
2	4.5	87.6	4540	12.6	--	--	--	--
3	4.4	92.1	3530	7.9	--	--	--	--
4	4.3	88.2	3890	7.5	--	--	1.2	4.3
5	4.3	88.7	4460	7.1	--	--	1.2	4.2
6	4.3	91.6	4000	3	--	--	1.1	5.4
Promedio	4.4 ± 0.1	87.3	4033.3 ± 360.1	7.4	--	--	1.2 ± 0.03	4.6

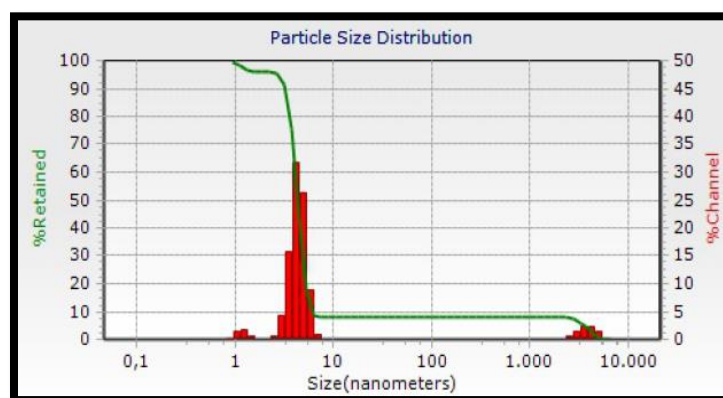


Fig. A3-4. D_h en MFpH3.8.

3. Gráfico comparativo de los tamaños promedio de los agregados de MF bajo la influencia del pH.

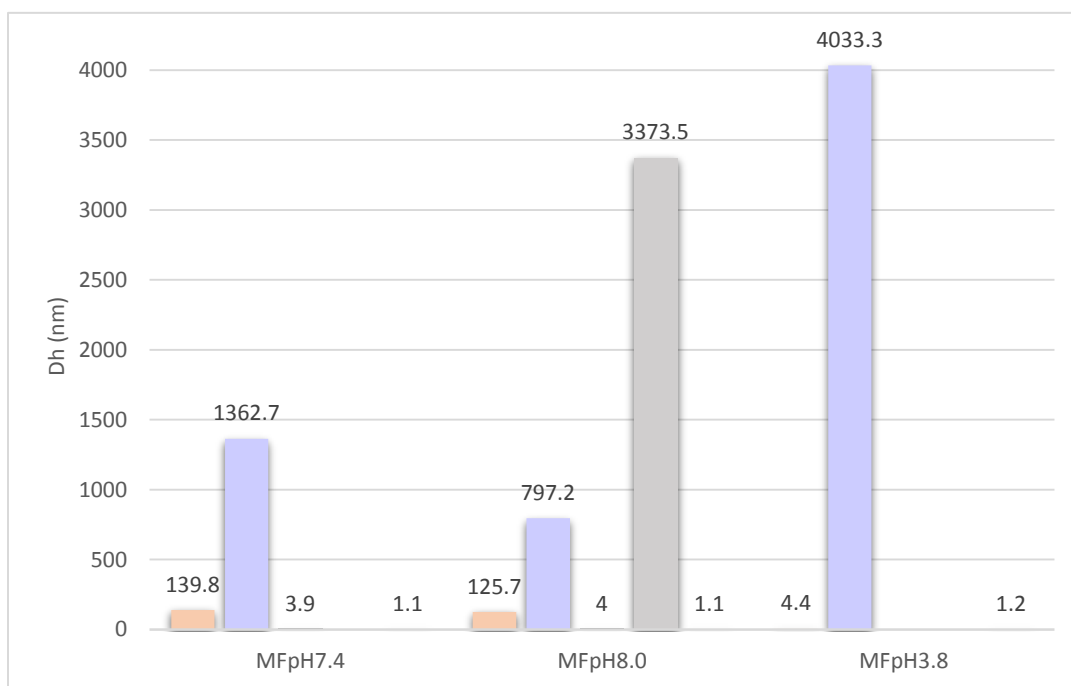


Fig. A3-5. Dh de MF en función del pH.