



76695

**DONACION**

Don: Dr. Nahir  
Autor: Dr. Nahir  
Exp:  
Inv N: 76695



CREER...CREAR...CRECER

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y  
NATURALES

Tesis para acceder al título de Doctora en Ciencias Químicas

**EVALUACIÓN DE DENDRÍMEROS COMO NANO-  
VEHÍCULOS DE COMPUESTOS BIOACTIVOS**

Lic. Nahir Dib

DIRECTOR: Dra. Marisa R. Santo

CODIRECTOR: Dr. Luis A. Otero



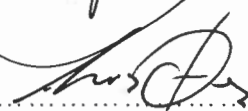
Río Cuarto, Marzo 2017

2005

76695

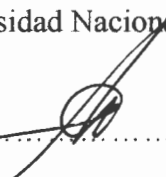
<b>MFN:</b>
<b>Clasif:</b>
T-1125

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO  
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales  
Departamento de Química

Lic. Nahir Dib Firma  Aclaración... Nahir Dib.....  
Dra. Marisa R. Santo Firma  Aclaración... M. SANTO.....  
Dr. Luis A. Otero Firma  Aclaración... L. OTERO.....

COMISIÓN ASESORA Y JURADO

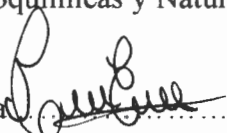
**Dr. Mario Roberto Reta.** Departamento de Química. Facultad de Ciencias Exactas.  
Universidad Nacional de La Plata.

Firma  Aclaración... Mario Reta

**Dr. Gabriel Ángel Planes.** Departamento de Química. Facultad de Ciencias Exactas,  
Físicoquímicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto.

Firma  Aclaración... GABRIEL PLANES

**Dra. María Elisa Milanesio.** Departamento de Química. Facultad de Ciencias Exactas,  
Físicoquímicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto.

Firma  Aclaración... M. Elisa Milanesio

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y fecha... Río Cuarto, 13 de Marzo de 2017. -

Calificación... 10 (diez) SOBRESALIENTE

*A mis padres*



## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Analía y Marcelo, por apoyarme en cada una de mis decisiones y proyectos y porque con su ejemplo me enseñaron a seguir adelante frente a las adversidades. Agradezco por tener unos padres como ustedes, a quienes admiro. Gracias por todo y por darme uno de los mejores regalos, mi hermana.

A mi hermana, Nayla, por ser mi amiga, mi compañera y estar siempre a mi lado. Te agradezco porque con tu forma de ser, a veces muy diferente a la mía, me enseñas muchas cosas valiosas. Gracias también por la confección de la tapa de la tesis.

A mi novio, Pablo, por ser mi compañero y hacer más lindo el camino de la vida. Gracias por contenerme, entenderme, apoyarme y respetarme. Por todo lo vivido y lo que vendrá.

A mis abuelos, mi tío, mi madrina y a todos mis familiares, a los que están y a los que me miran desde el cielo, les agradezco por estar a mi lado y por todo el cariño.

A mis directores, Marisa y Luis, les agradezco no sólo por sus enseñanzas, consejos, dedicación, optimismo y paciencia a lo largo de la tesis, sino también por su gran calidez humana, lo cual aprecio mucho.

A Luciana, porque siempre estuvo dispuesta a ayudarme cada vez que lo necesité. Gracias por tus aportes, consejos y todas las conversaciones que tuvimos con mate de por medio. Sos una gran persona y agradezco mucho haber podido compartir con vos todos estos años.

A los miembros del jurado, Elisa, Gabriel y Mario, por sus sugerencias y aportes, los cuales fueron muy enriquecedores para mi formación. Muchas gracias Mario por viajar para estar presente en cada defensa de informe y en la defensa de la tesis.

A mis amigos, los del secundario, los de la uni, los de la vida: Noe G., Euge, Noe S., Cintia, Celi, Belén M., Nathalie, Sole, Hugo, Belu, Naty, Dani y Bela. Con algunos he compartido muchas más cosas que con otros, pero todos son importantes para mí. Les agradezco por su amistad.

A mis compañeros del “Gran Becario” por todo lo compartido en estos 5 años: viajes, cursos, congresos, mates, almuerzos, y los “viernes de postre” en el “Becario 2”.

A Marisel y Cacho por ayudarme cada vez que lo necesité.

A Fabrisio y Cecilia, por los trabajos en colaboración y porque siempre estuvieron muy dispuestos a responder cada duda que se me presentó.

A la Universidad Nacional de Rio Cuarto por darme la oportunidad de formarme como Licenciada y como Doctora en Química.

A CONICET por otorgarme la beca que me permitió llevar a cabo esta tesis.

Finalmente, al pueblo argentino por permitirme tener una educación gratuita y de calidad. Espero poder retribuir a mi país todo lo recibido.

A todos los que de alguna u otra forma contribuyeron al desarrollo de esta tesis y aportaron algo lindo en mi vida para llegar a donde estoy hoy. Muchas gracias!

## RESUMEN

El objetivo general de la presente tesis doctoral consiste en evaluar diferentes polímeros dendriméricos como vehículos para el transporte, distribución y liberación controlada de compuestos terapéuticos. Se trabajó con dendrímeros comerciales PAMAM y PPI, y con un dendrímero no comercial (D). Como moléculas huésped se utilizaron tres drogas: Triazina, Fenazina y un derivado de benzocarbazol (CBZ), las cuales presentan baja solubilidad acuosa y/o inestabilidad, lo que limita su eficacia terapéutica. Se investigó la capacidad de los dendrímeros para asociarse con los compuestos activos, analizando las interacciones droga-dendrímero mediante diferentes técnicas experimentales y computacionales. Se encontró que los dendrímeros PAMAM-AT y PAMAM-CT provocan la hidrólisis de Triazina debido a la interacción de la droga con los microentornos periféricos de las estructuras dendriméricas. Sin embargo, el dendrímero PAMAM-OHT tiene la capacidad para actuar como potencial vehículo molecular de Triazina en solución, ya que se asocia a la droga sin provocar su hidrólisis y permite una liberación más lenta respecto de cuando la droga se encuentra en agua pura. Además, el complejo resultó estable en el tiempo y con la temperatura. Por otro lado, se pudo concluir que los dendrímeros PAMAM-AT y PPI (G=4) son adecuados para su potencial aplicación como nanovehículos del compuesto activo Fenazina, ya que permiten incrementar su solubilidad debido a la asociación mediante interacciones iónicas entre los grupos amino terminales de los dendrímeros y el grupo fenólico de la droga. Los complejos son estables en el tiempo y no mostraron efectos citotóxicos en células normales pero sí en células tumorales. A su vez, el dendrímero D sería un vehículo apropiado para la administración de CBZ ya que tiene el potencial para superar los obstáculos asociados a la administración del fármaco, como su baja solubilidad acuosa. Además, el complejo D-CBZ resultó estable con el tiempo y la temperatura y no presentó carácter hemolítico.

Por otro lado, se investigó la posibilidad de formar películas utilizando tres dendrones del tipo Newkome, para desarrollar sistemas con potencial aplicación en la administración de drogas mediada por superficie. Para ello, se generaron y caracterizaron películas de dendrones puros y películas mixtas, de los dendrones con un compuesto bioactivo, utilizando las técnicas de Langmuir y Langmuir-Blodgett. Además, las películas obtenidas se caracterizaron mediante AFM. Los resultados obtenidos indican que el grupo focal de los diferentes dendrones define las características de las monocapas generadas. Utilizando el dendrón que posee un grupo nitrobenzeno como punto focal, se obtuvieron películas de dendrón puro y películas mixtas droga-dendrón sobre sustratos sólidos con un alto porcentaje de recubrimiento y las películas depositadas resultaron biocompatibles.

## ABSTRACT

The general aim of this doctoral thesis is to evaluate different dendrimeric polymers as vehicles for the transport, distribution and controlled release of therapeutic compounds. Commercial dendrimers PAMAM and PPI and a non-commercial dendrimer (D) were used. Three drugs were used as host molecules: Triazine, Phenazine and a benzocarbazole derivative (CBZ), which have low aqueous solubility and/or instability, which limits their therapeutic efficacy. The ability of dendrimers to associate with active compounds was investigated, analyzing drug-dendrimer interactions by different experimental and computational techniques. It was found that the PAMAM-AT and PAMAM-CT dendrimers cause the hydrolysis of Triazine due to the interaction of the drug with the peripheral microenvironments of the dendrimeric structures. However, the PAMAM-OHT dendrimer has the ability to act as potential molecular carrier of Triazine in solution since it associates with the drug without causing its hydrolysis and allows a slower release than when the drug is in pure water. Furthermore, the complex was stable over time and temperature. On the other hand, it was possible to conclude that the PAMAM-AT and PPI (G = 4) dendrimers are suitable for their potential application as nanovehicles of the active compound Phenazine, since they increase its solubility due to the association by ionic interactions between the terminal amino groups of the dendrimers and the phenolic group of the drug. The complexes are stable over time and did not show cytotoxic effects in normal cells but yes in tumor cells. In turn, dendrimer D would be an appropriate vehicle for the administration of CBZ as it has the potential to overcome obstacles associated with drug administration, such as its low aqueous solubility. In addition, the D-CBZ complex was stable with time and temperature and had no hemolytic character.

On the other hand, the possibility of forming films using three Newkome type dendrons was investigated to develop systems with potential application in surface mediated drug delivery. To this end, pure dendron films and mixed films of the dendrons with a bioactive compound were generated and characterized using Langmuir and Langmuir-Blodgett techniques. Moreover, the obtained films were characterized by AFM. The results obtained indicate that the focal group of the different dendrons defines the characteristics of the monolayers generated. Using dendron having a nitrobenzene group as the focal point, pure dendron films and drug-dendron mixed films were obtained on solid substrates with a high percentage of coating and the deposited films were biocompatible.

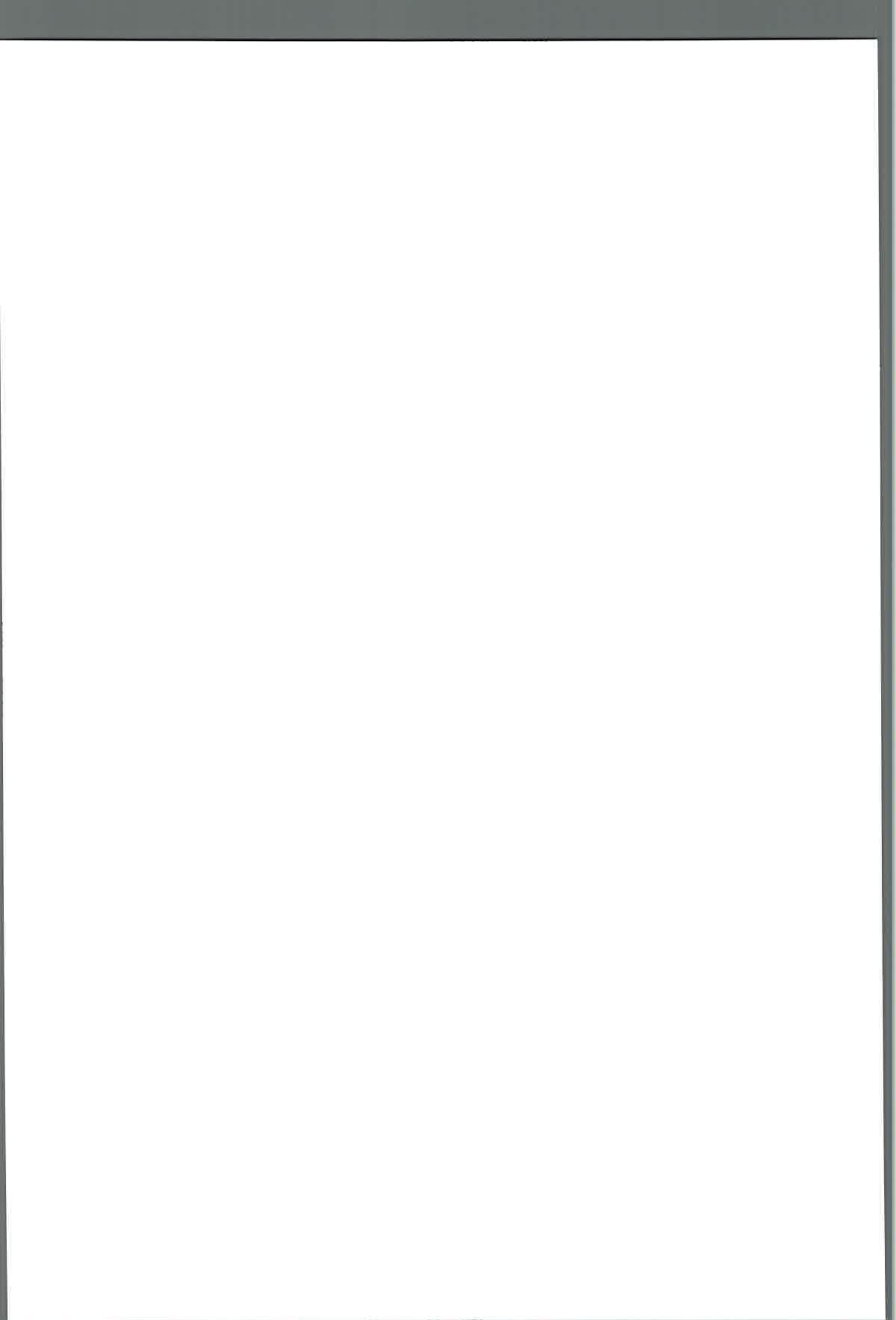


## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	xiii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	xiv
<b>ABREVIATURAS</b> .....	xix
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Problemáticas asociadas a la administración convencional de drogas: Necesidad del uso de sistemas de liberación controlada .....	1
1.2 Polímeros dendriméricos: Dendrímeros y dendrones .....	2
1.2.1 Definición .....	2
1.2.2 Estrategias para la síntesis de dendrímeros .....	4
1.2.3 Características estructurales de los dendrímeros .....	7
1.2.4 Efecto de las condiciones del medio sobre la estructura dendrímica .....	10
1.3 Aplicaciones biomédicas: Administración controlada de drogas .....	14
1.3.1 Dendrímeros como vehículos de drogas en solución .....	14
1.3.2 Tipos de asociación droga-dendrímero .....	17
1.3.3 Biocompatibilidad de los dendrímeros .....	18
1.3.4 Sistemas de administración de drogas mediada por superficie .....	20
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	23
2.1 Objetivo general .....	23
2.2 Objetivos específicos .....	23
<b>3. SISTEMAS ESTUDIADOS</b> .....	25
3.1 Dendrímeros y dendrones .....	25
3.1.1 Dendrímeros de poli(amidoamina) (PAMAM) .....	25
3.1.2 Dendrímeros de poli(propilenimina) (PPI) .....	27

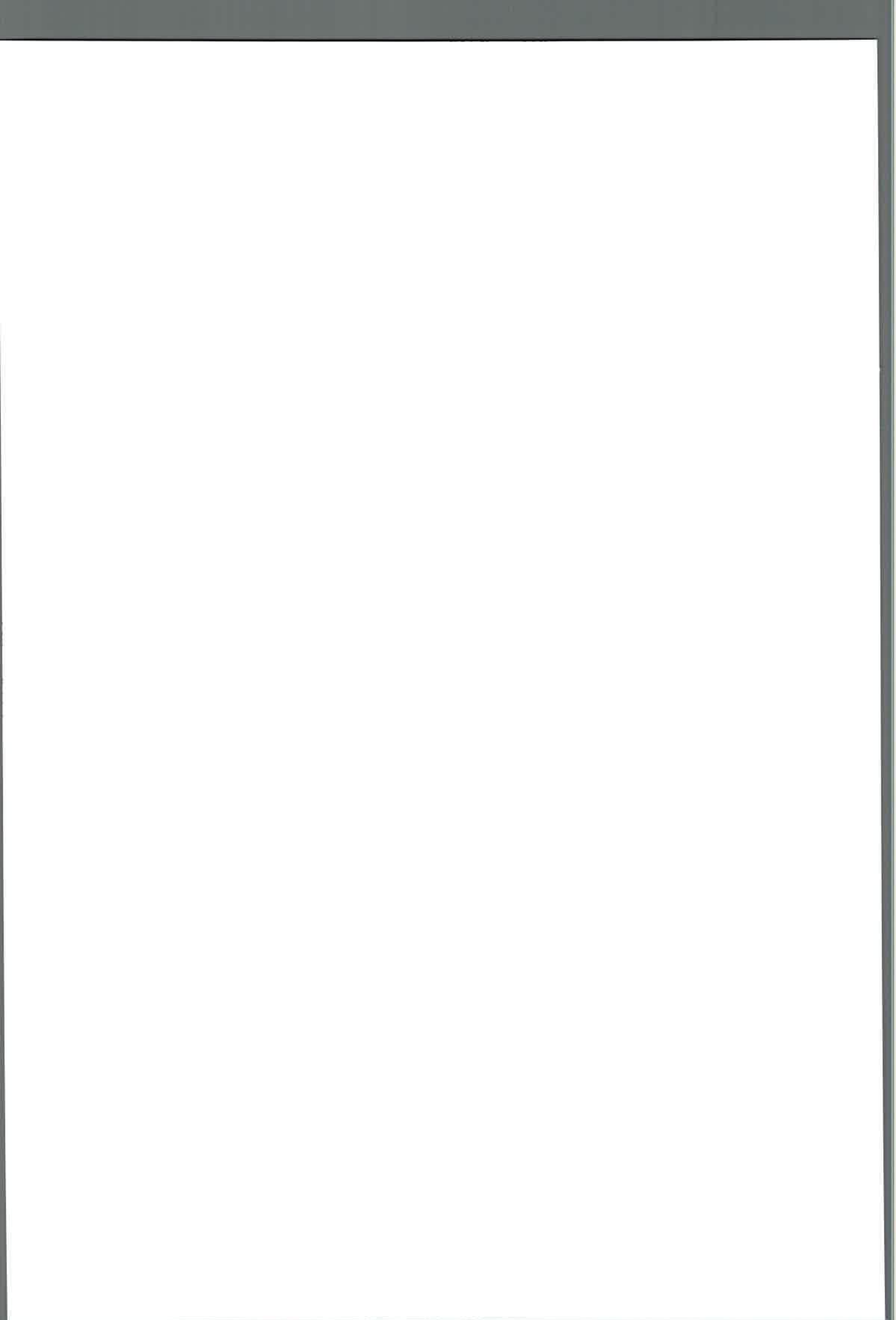
3.1.3 Dendrímero D.....	28
3.1.4 Dendrones del tipo Newkome .....	29
3.2 Compuestos con actividad terapéutica.....	30
3.2.1 <i>N</i> -óxido de (E)-2-feniletetil 1,2,4-triazina (Triazina).....	30
3.2.2 <i>N</i> <sup>5</sup> , <i>N</i> <sup>10</sup> -dióxido de 7-bromo-2-hidroxi fenazina (Fenazina).....	31
3.2.3 Metil (5-[propiltio]-1H-bencimidazol-2-il) carbamato (CBZ).....	32
<b>4. MÉTODOS Y TÉCNICAS .....</b>	<b>35</b>
4.1 Espectroscopía de Absorción Ultravioleta-visible.....	35
4.2 Método de comparación solvatocrómica de Kamlet y Taft .....	35
4.3 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de protón ( <sup>1</sup> H-RMN).....	38
4.4 Dispersión Dinámica de la Luz (DLS) .....	38
4.5 Química computacional .....	40
4.5.1 Métodos de cálculos.....	40
4.6 Técnicas de Langmuir y Langmuir-Blodgett.....	42
4.6.1 Monocapas de Langmuir en la interfase aire-agua.....	42
4.6.2 Isotermas presión superficial ( $\pi$ ) - área por molécula (A) .....	44
4.6.3 Monocapas mixtas.....	48
4.6.4 Estabilidad de monocapas de Langmuir.....	48
4.6.5 Películas de Langmuir-Blodgett (LB).....	49
4.6.6 Relación de transferencia .....	51
4.6.7 Sustratos y tipos de deposición .....	52
4.7 Microscopía de Fuerza Atómica .....	54
<b>5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>57</b>

5.1 Determinación de la solubilidad de Triazina .....	57
5.2 Estudio de Triazina en solventes de diferente polaridad y capacidad donora y aceptora de puente hidrógeno .....	57
5.3 Estudio de la asociación de Triazina y dendrímeros PAMAM .....	58
5.4 Estudio de Triazina en soluciones acuosas básicas .....	59
5.5 Análisis de la estabilidad del complejo Triazina-PAMAM-OHT (G=3) con el tiempo y la temperatura .....	59
5.6 Estudios de liberación <i>in vitro</i> de Triazina desde el conjugado droga-dendrímero... ..	59
5.7 Determinación del pK <sub>a</sub> de Fenazina en agua .....	60
5.8 Estudio de la asociación de Fenazina con dendrímeros PAMAM y PPI .....	60
5.9 Análisis de la asociación de Fenazina con los dendrímeros PAMAM mediante espectroscopía <sup>1</sup> H-NMR .....	61
5.10 Análisis de la estabilidad de los complejos Fenazina-dendrímero con el tiempo ... ..	61
5.11 Análisis de la biocompatibilidad y actividad biológica de los complejos Fenazina-dendrímero .....	61
5.12 Solubilización de CBZ en el dendrímero D .....	63
5.13 Análisis de las soluciones de CBZ y CBZ-dendrímero D mediante DLS .....	63
5.14 Análisis de la estabilidad del complejo CBZ-dendrímero D con el tiempo y la temperatura .....	63
5.15 Ensayo de hemólisis.....	64
5.16 Formación de monocapas de Langmuir de los dendrones y determinación de las isotermas ( $\pi$ -A) .....	65
5.17 Estudio de la reversibilidad y estabilidad de las monocapas de los dendrones en la interfase aire-agua.....	65
5.18 Estudio del efecto de la temperatura en las isotermas ( $\pi$ -A) de los dendrones .....	66
5.19 Formación de películas de LB de los dendrones estudiados .....	66
5.20 Estudio de la morfología superficial de las películas de LB por AFM.....	67





5.21 Generación de monocapas mixtas dendrón-CBZ en la interfase aire-agua y determinación de las isothermas ( $\pi$ -A) .....	67
5.22 Análisis de la reversibilidad y estabilidad de las monocapas mixtas de dendrón y CBZ.....	68
5.23 Transferencia de las monocapas mixtas de dendrón con CBZ sobre mica mediante la técnica de LB .....	68
5.24 Análisis de las películas de LB de dendrón con CBZ mediante AFM .....	69
5.25 Análisis de biocompatibilidad de la película de LB del dendrón BBN. Cultivo celular.....	69
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>71</b>
6.1 Dendrímeros como vehículos de drogas en solución.....	71
6.1.1 Estudio de la asociación de dendrímeros PAMAM y un derivado de <i>N</i> -óxido de 1,2,4 triazina con potencial actividad antitumoral .....	71
6.1.1.1 Análisis de las posibles interacciones entre el huésped a transportar y los dendrímeros .....	72
6.1.1.2 Estudio de la asociación de Triazina con dendrímeros PAMAM .....	75
6.1.2 Evaluación de dendrímeros PAMAM y PPI como vehículos moleculares de un derivado de <i>N, N'</i> -dióxido de fenazina con actividad antitumoral.....	87
6.1.2.1 Determinación del $pK_a$ de Fenazina en agua.....	88
6.1.2.2 Estudio de la asociación Fenazina-dendrímeros.....	90
6.1.3 Incremento de la solubilidad de un carbamato antihelmíntico y antitumoral mediante el uso de un dendrímero no comercial.....	106
6.1.3.1 Solubilización de CBZ en el dendrímero D.....	106
6.1.3.2 Análisis de la estabilidad del complejo CBZ-dendrímero D con el tiempo y la temperatura .....	110
6.1.3.3 Influencia del complejo CBZ-dendrímero D sobre glóbulos rojos: Ensayo de Hemólisis .....	111
6.2 Películas de moléculas dendriméricas como potenciales sistemas de administración de drogas mediada por superficie .....	113



6.2.1 Generación y caracterización de películas de dendrones del tipo Newkome y películas mixtas dendrón-CBZ.....	113
6.2.1.1 Formación de monocapas de Langmuir de los dendrones y obtención de las isotermas ( $\pi$ -A).....	114
6.2.1.2 Análisis de las isotermas ( $\pi$ -A) de los dendrones estudiados.....	116
6.2.1.3 Análisis de la reversibilidad y estabilidad de las monocapas de los dendrones en la interfase aire-agua.....	117
6.2.1.4 Estudio del efecto de la temperatura en las isotermas ( $\pi$ -A).....	120
6.2.1.5 Generación y caracterización de películas de Langmuir-Blodgett de los dendrones.....	122
6.2.1.6 Generación de monocapas mixtas dendrón-CBZ en la interfase aire-agua y determinación de las isotermas ( $\pi$ -A).....	125
6.2.1.7 Análisis de la reversibilidad y estabilidad de las monocapas mixtas de dendrón-CBZ.....	128
6.2.1.8 Transferencia de la monocapa mixta BBN-CBZ sobre mica y caracterización mediante AFM.....	130
6.2.1.9 Análisis de la biocompatibilidad de las películas de LB de dendrón BBN.....	131
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>135</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>139</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de pH a los cuales se protonan los grupos internos y externos de dendrímeros PAMAM de diferente tipo y generación. <sup>42</sup> .....	11
Tabla 2. Parámetros $\alpha$ , $\beta$ y $\pi^*$ de solventes <sup>129</sup> y número de onda del máximo de absorción correspondiente a la banda 2 del espectro de Triazina en los solventes usados .....	74
Tabla 3. Características de los dendrímeros PAMAM utilizados y aumento de solubilidad en agua de Fenazina producido por cada dendrímero .....	92
Tabla 4. Áreas límites ( $A_0$ ) obtenidas de las isotermas de las monocapas de dendrón puro y las monocapas mixtas de dendrón-CBZ, a 25°C. ....	126

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Las cuatro clases de arquitecturas poliméricas. ....	2
Figura 2. Representación esquemática de la estructura de un dendrímero y dendrón. ....	4
Figura 3. Estrategias de síntesis de dendrímeros: métodos divergente y convergente. ....	5
Figura 4. Esquema de síntesis de dendrímeros PAMAM, ruta divergente. ....	6
Figura 5. Componentes de la estructura dendrimérica y propiedades que definen. ....	9
Figura 6. Ilustración que muestra los cambios conformacionales de dendrímeros PAMAM como una función de la generación. (z: grupos terminales). ....	10
Figura 7. Configuración simulada de dendrímeros PAMAM G = 2 (superior) y G = 6 (inferior) usando dinámica molecular. ....	12
Figura 8. Esquema propuesto para la solvatación de un dendrímero polar en un solvente prótico (a) y en un solvente aprótico y no polar (b). ....	13
Figura 9. Conformación espacial de la estructura de un dendrímero PPI a baja y alta concentración de sal. ....	13
Figura 10. Ilustración que muestra la difusión de sistemas de administración de fármacos basados en dendrímeros (amarillo) a través de la vasculatura tumoral y su retención en el tumor (“efecto EPR”). ....	15
Figura 11. Comparación a escala dimensional de una serie de dendrímeros PAMAM con una variedad de proteínas. ....	17
Figura 12. Tipos de asociación droga-dendrimer. ....	17
Figura 13. Estructura química del dendrímero PAMAM-AT (G = 1). ....	26
Figura 14. Estructuras químicas de los dendrímeros PAMAM-AT (G = 3), PAMAM-OHT (G = 3), y PAMAM-CT (G = 2.5 y G = 4.5). ....	27
Figura 15. Dendrimer PPI (G = 4). ....	28
Figura 16. Estructura química del dendrímero D. ....	29
Figura 17. Estructura química de los dendrones del tipo Newkome. ....	29
Figura 18. Estructura química de N-óxido de (E)-2-feniletetil 1,2,4-triazina (Triazina) ...	31

Figura 19. Estructura química de $N^5, N^{10}$ -dióxido de 7-bromo-2-hidroxi fenazina (Fenazina).....	32
Figura 20. Estructura química de Metil (5-[propiltio]-1H-bencimidazol-2-il) carbamato (CBZ).....	32
Figura 21. Esquema de un equipo de dispersión dinámica de luz (DLS).....	39
Figura 22. Formación de una monocapa de Langmuir en la interfase aire-agua.....	43
Figura 23. Isoterma $\pi$ -A de una monocapa en la interfase aire-agua mostrando las fases que se encuentran comúnmente.....	45
Figura 24. Isotermas $\pi$ -A esquemáticas de ácidos grasos de cadena larga y de fosfolípidos, .....	47
Figura 25. Trasferencia de monocapa en la interfase aire-agua a un soporte sólido mediante la técnica de Langmuir-Blodgett. ....	50
Figura 26. Relación de transferencia ( $\tau$ ) para la transferencia de monocapas desde la interfase aire-agua a un sustrato sólido. ....	52
Figura 27. Tipos de transferencia de Langmuir-Blodgett .....	53
Figura 28. Diagrama de un Microscopio de Fuerza Atómica. ....	55
Figura 29. Espectro de absorción de Triazina en acetonitrilo (a), metanol (b) y agua (c). .	73
Figura 30. Densidades de carga de Triazina calculadas usando el método semiempírico AM1.....	75
Figura 31. Espectro de absorción de Triazina en solución acuosa de PAMAM-AT ( $G = 3$ ) $1 \times 10^{-4}$ M (a). Se muestra también el espectro de una solución saturada de Triazina en agua pura (b). ....	76
Figura 32. Espectros de absorción de Triazina en solución acuosa de dendrímero PAMAM-CT $G = 4.5$ (a) y $G = 2.5$ (b), $1 \times 10^{-4}$ M. Se muestra también el espectro de una solución saturada de Triazina en agua pura (c). ....	77
Figura 33. Esquema representativo del proceso de hidrólisis de Triazina en solución acuosa de dendrímeros PAMAM amino y carboxilato terminal. ....	78
Figura 34. Espectros de absorción de Triazina en solución acuosa de PAMAM-AT ( $G = 3$ ) $1 \times 10^{-4}$ M tomados a diferentes tiempos.....	79
Figura 35. Espectros de absorción de Triazina en solución acuosa de KOH (pH = 10) .....	80

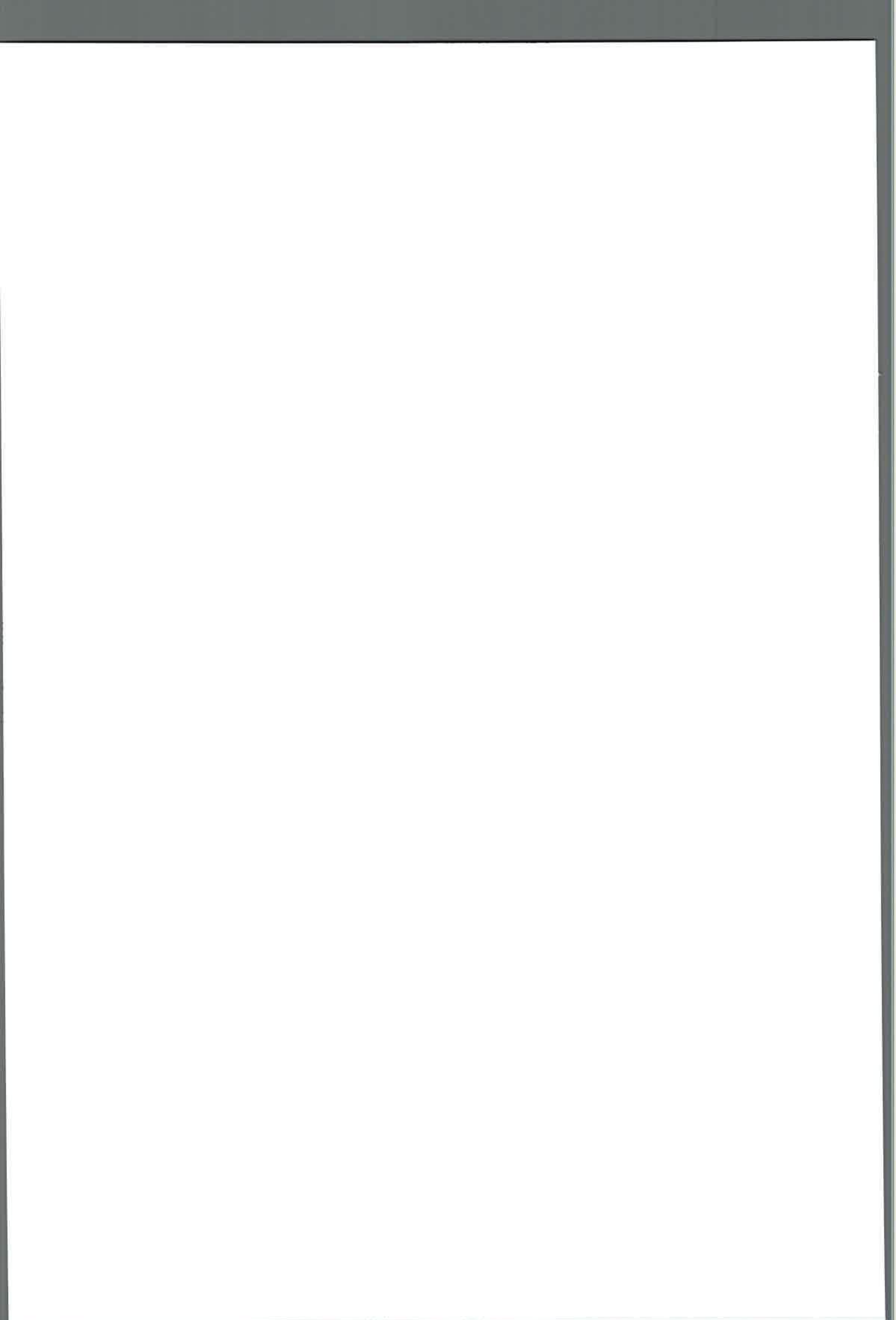


Figura 36. Espectros de absorción de Triazina en solución acuosa de butilamina $3.2 \times 10^{-3} \text{ M}$ .....	81
Figura 37. Espectros de absorción de Triazina en solución buffer (PBS) de dendrímero PAMAM-AT (G = 3) (a), PAMAM-CT G=4.5 (b) y PAMAM-CT G=2.5 (c), $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ . .. 82	
Figura 38. Representación de las estructuras de dendrímeros PAMAM-AT (a), PAMAM-CT (b) y PAMAM-OHT (c), mostrando los grupos que se encuentran cargados en agua desionizada y en buffer de pH 7.4 y que pueden promover la hidrólisis básica de Triazina. .... 83	
Figura 39. Espectro de absorción UV-vis de Triazina en solución acuosa de dendrímero PAMAM-OHT $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ (a) y en agua desionizada (b) .....	84
Figura 40. Porcentajes de liberación <i>in vitro</i> de Triazina desde solución acuosa de PAMAM-OHT $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ y desde agua pura. .... 86	
Figura 41. (a) Equilibrio ácido base de Fenazina. (b) Espectros de absorción UV-vis de Fenazina en solución acuosa a diferentes pH. .... 89	
Figura 42. (a) Absorción UV-vis de Fenazina a 558 nm en función del pH. Los puntos representan los datos experimentales. La línea continua corresponde al ajuste de los datos experimentales. (b) Derivada segunda del ajuste del gráfico (a) en función del pH. En línea punteada se indica el corte de la curva con el eje x, el cual corresponde a pH= 5.6. .... 90	
Figura 43. Espectros de absorción UV-vis de Fenazina en solución acuosa de dendrímero PAMAM-AT (G = 3) (a), PAMAM-AT (G = 1) (b) y PAMAM-OHT (G = 3) (c). .... 91	
Figura 44. Solubilidad acuosa de Fenazina en función de la concentración de dendrímero 93	
Figura 45. Solubilidad de Fenazina en función de la concentración de grupos amino terminales de los dendrímeros PAMAM-AT (G=1) (negro) y PAMAM-AT (G=3) (rojo). 94	
Figura 46. Estructuras químicas y asignación de los diferentes protones de: PAMAM-AT (G = 1) (a), PAMAM-OHT (G = 3) (b), y Fenazina (c). .... 95	
Figura 47. Espectros $^1\text{H-NMR}$ del dendrímero PAMAM-AT (G = 1) en ausencia a) y en presencia b) de Fenazina, en $\text{D}_2\text{O}$ . .... 96	
Figura 48. Espectros $^1\text{H-NMR}$ del dendrímero PAMAM-OHT (G = 3) en ausencia a) y en presencia b) de Fenazina, en $\text{D}_2\text{O}$ . .... 98	
Figura 49. Espectros de absorción UV-vis de Fenazina en presencia de dendrímero PAMAM-AT (G=3) (a) y PAMAM-OHT (G=3) (b) en PBS. .... 99	

Figura 50. Espectros de absorción UV-vis de Fenazina en solución acuosa de dendrímero PAMAM-AT (G = 3) (a) y PPI (G = 4) (b).....	101
Figura 51. Estabilidad de Fenazina en ausencia y presencia de los dendrímeros en agua durante dos meses.....	102
Figura 52. Viabilidad de células a) MDCK, b) MCF-7 y c) Hep G2 incubadas con Fenazina, PAMAM-AT (G=1), PAMAM-AT (G=3), PPI (G=4) y sus correspondientes complejos con Fenazina luego de 24 h de incubación.....	104
Figura 53. Espectros de absorción UV-visible de CBZ en agua (a) y en soluciones acuosas de dendrímero D.....	107
Figura 54. Espectros de absorción UV-vis normalizados de CBZ en solventes de diferente polaridad.....	108
Figura 55. Representación esquemática de la asociación CBZ-dendrímero D en solución acuosa.....	109
Figura 56. Absorbancia de CBZ a 298 nm en función de la temperatura, en solución acuosa de dendrímero.....	111
Figura 57. Espectros de absorción de hemoglobina liberada en el ensayo de hemólisis para la solución control positivo (100% de hemólisis) (rojo), y la solución control negativo (0% de hemólisis) (negro).....	112
Figura 58. Isotermas ( $\pi$ -A) de los dendrones BBN (rojo), BBA (negro) y BTA (azul), en la interfase aire-agua, a 25°C.....	115
Figura 59. Ciclos de compresión-expansión de las monocapas de los dendrones BBN (a y b), BBA (c y d) y BTA (e y f), a alta presión (izquierda) y a baja presión (derecha), a 25°C.....	119
Figura 60. Gráficos de ( $A/A_i$ ) vs el tiempo para las monocapas en la interfase aire-agua de (a) BBN, (b) BBA y (c) BTA, a 5 mN/m (negro) y 15 mN/m (rojo), a 25°C.....	120
Figura 61. Isotermas ( $\pi$ -A) de las monocapas de los dendrones (a) BBN, (b) BBA y (c) BTA, a diferentes temperaturas (rojo: 5°C, negro: 25°C y azul: 50°C).....	121
Figura 62. Imágenes AFM de topografía (arriba) y fase (abajo) de monocapas de Langmuir-Blodgett sobre mica: (a y b) BBN transferida a 4 mN/m. (c y d) BBN transferida a 10 mN/m. (e y f) BBA transferida a 10 mN/m.....	124
Figura 63. Isotermas ( $\pi$ -A) de las monocapas de los dendrones (negro) y de las monocapas mixtas dendrón-CBZ (rojo), a 25 °C.....	127



Figura 64. Ciclos de compresión-expansión de las monocapas mixtas BBN-CBZ (a y d), BBA-CBZ (b y e) y BTA-CBZ (c y f), a alta (izquierda) y baja (derecha) presión, a 25°C. .....	129
Figura 65. Gráficos de $(A/A_i)$ vs el tiempo de las monocapas de los dendrones puros (negro) y con CBZ (rojo), a 15 mN/m, a 25 °C.....	130
Figura 66. Imágenes AFM de topografía (a) y fase (b) de una monocapa de Langmuir-Blodgett de BBN-CBZ depositada sobre mica a 10 mN/m.....	131
Figura 67. Células NIH 3T3 luego de 24 h de cultivo sobre la superficie de mica (izquierda) o película de LB de dendrón BBN (derecha)......	133



## ABREVIATURAS

- <sup>1</sup>H-RMN: Resonancia Magnética Nuclear de protón
- A: área por molécula
- A<sub>0</sub>: área límite
- AFM: microscopía de fuerza atómica (Atomic Force Microscopy)
- AM1: Austin Model 1
- CBZ: Metil (5-[propiltio]-1H-bencimidazol-2-il) carbamato
- DLS: dispersión dinámica de luz (Dynamic Light Scattering)
- DMEM: Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco
- DMSO: dimetil sulfóxido
- EPR: efecto de aumento de la permeabilidad y la retención (Enhanced Permeability and Retention Effect)
- Fenazina: N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-dióxido de 7-bromo-2-hidroxi fenazina
- G: generación
- Gas: fase gas bidimensional
- Hep G2: célula derivada de hepatocarcinoma humano
- LB: Langmuir-Blodgett
- LC: fase líquido condensado bidimensional
- LE: fase líquido expandido bidimensional
- MCDFK: célula derivada de riñón canino
- MCF-7: célula derivada de carcinoma mamario humano
- MeOH: metanol
- MNDO: Modified Neglet of Diatomic Overlap
- MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
- MWCO: corte de peso molecular (Molecular Weight Cut-Off)
- NIH 3T3: célula derivada de fibroblastos fetales de ratón
- PAMAM: dendrímero de poli(amidoamina)
- PAMAM-AT: PAMAM amino terminal
- PAMAM-CT: PAMAM carboxilato terminal
- PAMAM-OHT: PAMAM hidroxilo terminal
- PBS: buffer fosfato salino
- PM3: Parametric Method Number 3

PPI: dendrímero de poli(propilenimina)

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

S: fase sólida bidimensional

SBE: número de sitios básicos equivalentes

S<sub>PBS</sub>: Solubilidad en PBS

SPM: microscopías de campo cercano (Scanning Probe Microscopes)

S<sub>w</sub>: Solubilidad acuosa

Triazina: *N*-óxido de (E)-2-feniletetil 1,2,4-triazina

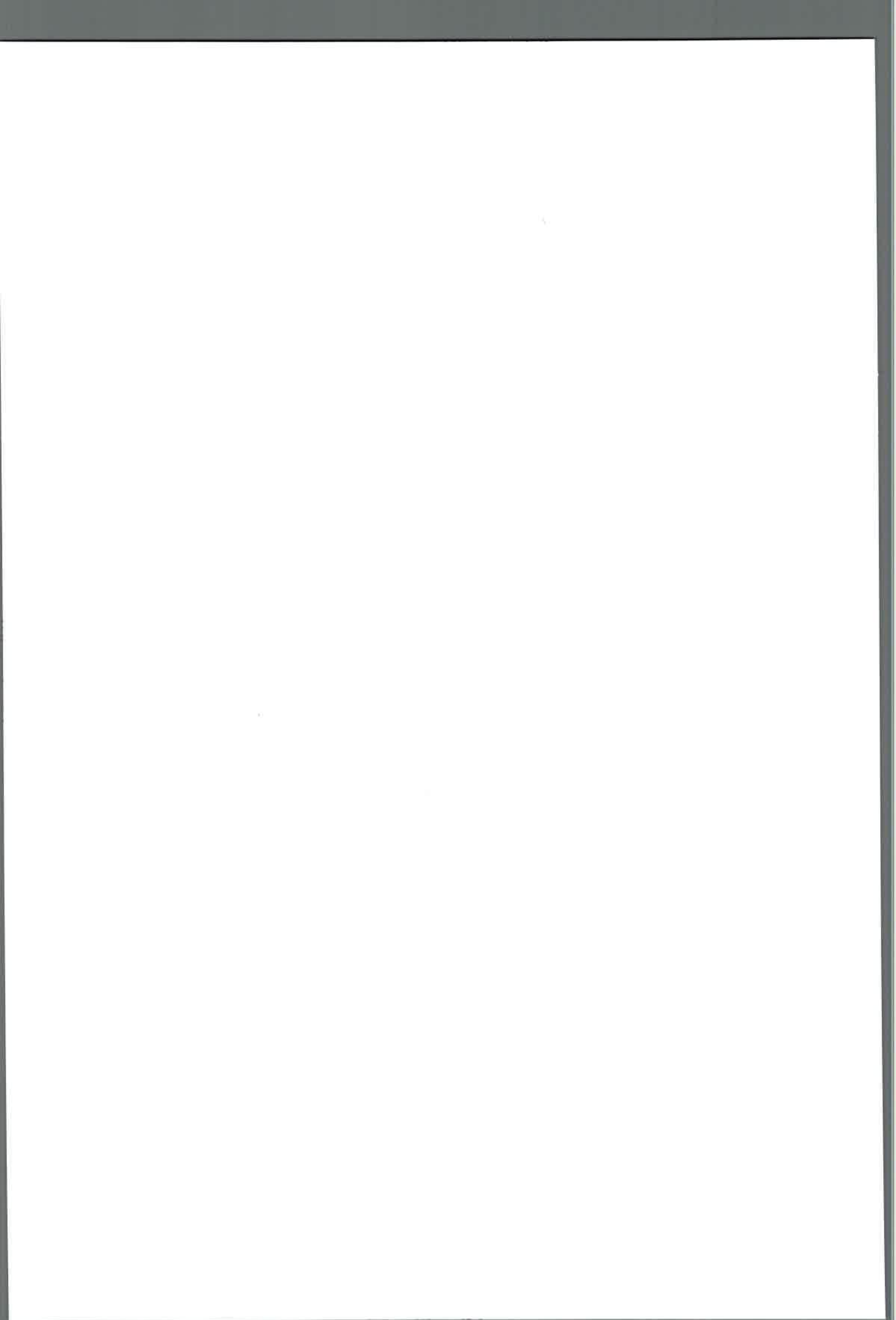
UV-vis: ultravioleta-visible

V79: célula pulmonar de hámster chino

$\pi$ : presión superficial

$\pi_c$ : presión de colapso

$\tau$ : relación de transferencia



## **Recursos financieros para la realización de la Tesis**

Fuentes de financiamiento que subsidiaron el desarrollo de la tesis:

- Beca Interna Doctoral otorgada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. (Becaria: Nahir Dib. Director: Luis Otero. Tema: “Evaluación de dendrímeros como nano-vehículos de compuestos bioactivos”. Desde el 1° de abril de 2012 hasta el 31 de marzo de 2017).
- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. CONICET-Argentina PIP 112-201201-00502 CO
- Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. FONCYT-Argentina PICT 0415-2014; PICT-0040-2011.
- Secretaría de Ciencia y Técnica. Universidad Nacional de Río Cuarto. SECYT-UNRC18/C297 y SECYTUNRC 18/C486.

# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1 Problemáticas asociadas a la administración convencional de drogas: Necesidad del uso de sistemas de liberación controlada

Aún en la actualidad, la eficacia de muchos medicamentos utilizados en el tratamiento de enfermedades está limitada por diversos factores. En primer lugar, muchas de las drogas empleadas son lipofílicas y poco solubles en agua; esto dificulta la preparación de formulaciones clínicas y disminuye la efectividad terapéutica de la droga debido a la imposibilidad de acceder al sitio de acción en una dosis apropiada. A su vez, el fármaco puede circular a la mayoría de los tejidos del cuerpo, acumulándose en áreas no específicas, por lo que siempre hay efectos secundarios negativos asociados. Estos factores, es decir, la escasa solubilidad y baja selectividad de los ingredientes activos en el cuerpo, son responsables del retiro de un alto porcentaje de fármacos candidatos antes de la fase I de ensayos clínicos.<sup>1</sup> Además, la rápida biotransformación de los fármacos de bajo peso molecular por las enzimas metabolizadoras de drogas en el hígado y la posterior eliminación por los sistemas excretores requiere administrar el fármaco con mayor frecuencia y/o en mayor concentración para el mantenimiento de una concentración efectiva, lo que provoca un empeoramiento adicional de los efectos secundarios y la toxicidad.<sup>2,3</sup> Por otro lado, el efecto terapéutico de muchos medicamentos es limitado o reducido debido a la desactivación o degradación enzimática que ocurre antes de que alcancen su objetivo específico en el cuerpo. A su vez, la circulación sistémica de la droga libre puede resultar en la unión no específica a proteínas plasmáticas, lo que afecta su perfil farmacocinético y biodisponibilidad.<sup>2</sup>

En este contexto, el diseño de sistemas, y en particular, nanosistemas de liberación controlada que actúen como nanovehículos de las drogas facilitando su transporte y permitiendo una liberación controlada de las mismas resulta fundamental para abordar la problemática. Un *sistema de liberación controlada* es aquel que permite liberar una droga a una velocidad y/o en una localización determinada. Las principales ventajas asociadas a su uso incluyen: a) incremento de la solubilidad de drogas poco solubles en agua, b) reducción de los efectos secundarios y aumento de la eficacia del fármaco debido a su direccionamiento y liberación específica en el sitio de acción, c) reducción de la frecuencia de administración gracias a una liberación lenta y controlada de la droga que permite tener

un cierto nivel de compuesto terapéutico en sangre por un período prolongado de tiempo, d) incremento de la estabilidad de la droga debido a que los sistemas de administración de fármacos pueden protegerla de la degradación y e) reducción del costo del tratamiento mediante el aumento de la eficacia y reducción de la dosis de fármaco necesaria para un efecto terapéutico.<sup>4,5</sup>

En las últimas décadas, se han investigado diversos sistemas para su aplicación en la liberación controlada de drogas, como liposomas, micelas, polímeros dendriméricos (principalmente dendrímeros y dendrones), polimerosomas, nanopartículas, nanocápsulas, ciclodextrinas, etc.<sup>6</sup> Entre ellos, los dendrímeros y dendrones, han recibido un gran interés debido a que presentan varias ventajas y propiedades interesantes para su aplicación como nanovehículos de drogas.<sup>7</sup>

## 1.2 Polímeros dendriméricos: Dendrímeros y dendrones

### 1.2.1 Definición

Los polímeros dendriméricos son una clase de macromoléculas de estructura controlada que representan la cuarta clase de arquitecturas poliméricas. Existen cuatro subclases de macromoléculas dendriméricas: (a) polímeros hiper-ramificados al azar, (b) polímeros dendrigraft, (c) dendrones, y (d) dendrímeros (Figura 1).<sup>8-11</sup> Estos pueden presentar una estructura muy simétrica y regular, como en el caso de los dendrímeros, o ser totalmente irregulares, como los polímeros hiper-ramificados al azar.

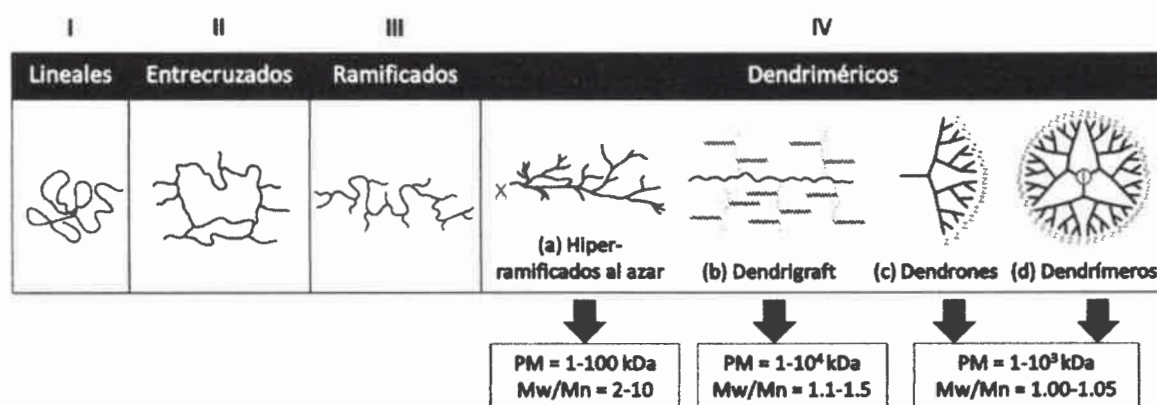


Figura 1. Las cuatro clases de arquitecturas poliméricas.

Adaptada de bibliografía (10) y (11).



De todas las estructuras dendriméricas, los polímeros hiper-ramificados al azar son los únicos sobre los cuales no se tiene un control estructural. Estos presentan una distribución estadística de pesos moleculares y un índice de polidispersión que abarca un rango de 2 a 10. Éste índice es una medida de la dispersión de pesos moleculares; se define como el cociente entre el peso molecular peso promedio ( $M_w$ ) y el peso molecular número promedio ( $M_n$ ) del polímero.<sup>12</sup> Valores próximos a la unidad representan una gran homogeneidad de pesos moleculares, mientras que valores mucho mayores a la unidad indican una gran dispersión de pesos moleculares. Cuando su valor es igual a la unidad se dice que el polímero es monodisperso o que todas las moléculas poseen el mismo peso molecular. Los dendrigraft son los polímeros dendriméricos de descubrimiento más reciente y los menos estudiados de todas las subclases; presentan una estructura semi-controlada y un índice de polidispersión de 1.1-1.5 dependiendo de su modo de preparación. Por otra parte, los dendrones y dendrímeros presentan un tamaño, forma y topología que pueden ser precisamente controlados en el proceso de síntesis, con un índice de polidispersión de 1.00-1.05.<sup>11</sup> Estas propiedades los convierte en materiales muy interesantes para aplicaciones en una gran variedad de campos que van desde la biología hasta la ciencia de los materiales.<sup>13</sup>

El término “*dendrímero*” fue propuesto a principios de 1985 por Tomalia<sup>14</sup> y proviene de las palabras griegas *dendri* que significa “ramificación” semejante a la de los árboles, y *meros* que significa “parte de”. Términos sinónimos son “arborol”, propuesto por Newkome<sup>15</sup>, derivado del término griego *arbor* que significa rama y “moléculas cascada” utilizado por Vögtle<sup>16</sup>. Los dendrímeros son moléculas que se caracterizan por su **estructura tridimensional ramificada bien definida, gran simetría y un peso molecular preciso**.<sup>14,17-19</sup> Como se muestra en la Figura 2, los dendrímeros contienen tres elementos estructurales: el núcleo o corazón central, la zona de ramificación (o puntos de ramificación) y los grupos terminales. El núcleo determina el tamaño, forma, dirección y multiplicidad. Cada capa de unidades de ramificación concéntricas entre el núcleo y la periferia constituye una **generación (G)** en la serie del dendrímero y se identifica con un número específico. Además, pueden definirse nanocavidades en el interior de la macromolécula que le confieren al dendrímero la posibilidad de encapsular moléculas huésped.<sup>20,21</sup>

Los *dendrones* son **moléculas monodispersas en forma de cuña que poseen un punto focal y múltiples grupos terminales** (Figura 2). Los dendrones se sintetizan paso a paso, lo que conlleva un aumento exponencial del número de grupos terminales. En el

último paso de la síntesis los dendrones se pueden unir desde su punto focal a un núcleo central dando lugar al dendrímero.<sup>22</sup>

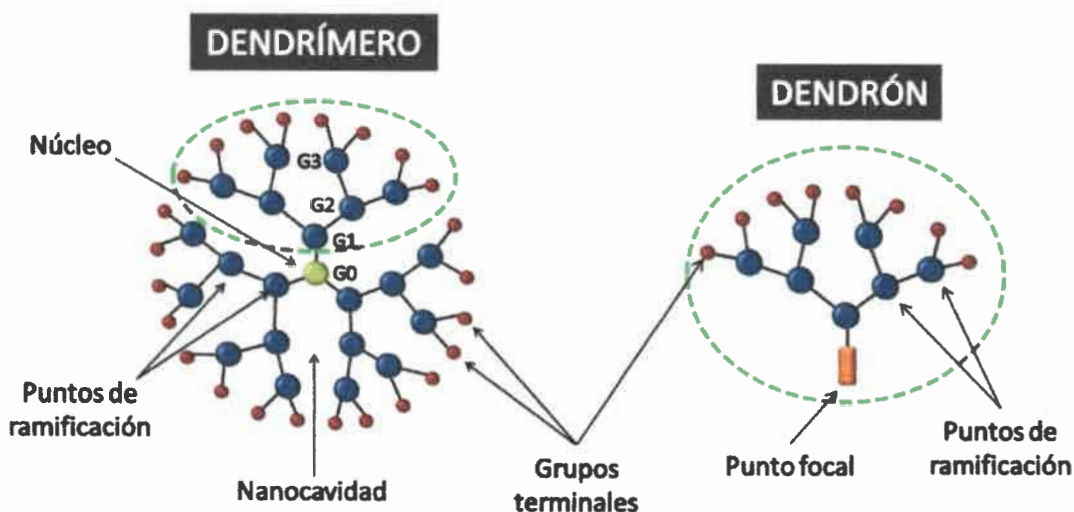


Figura 2. Representación esquemática de la estructura de un dendrímero y dendrón.

### 1.2.2 Estrategias para la síntesis de dendrímicos

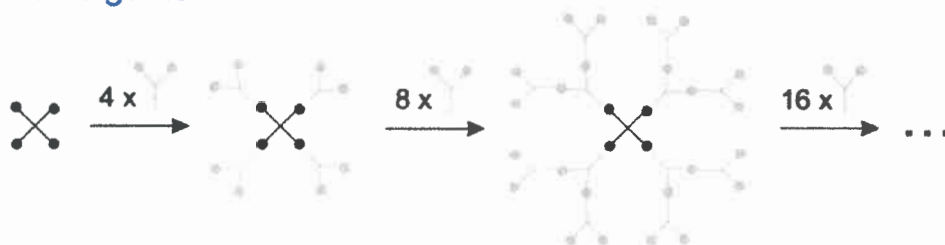
A diferencia de la síntesis de los polímeros convencionales que se obtienen principalmente por polimerización en cadena o condensación dando lugar a estructuras polidispersas, los métodos de síntesis de dendrímicos suponen un conjunto de reacciones químicas que permiten obtener una distribución monodispersa de pesos moleculares.

Los dendrímicos se pueden sintetizar a través de dos estrategias de síntesis principales: el método divergente o el convergente (Figura 3). El *método divergente*, desarrollado por Tomalia<sup>14</sup>, Vögtle<sup>16</sup> y Newkome<sup>15</sup>, involucra el crecimiento del dendrímico a partir de un núcleo central, generándose las ramificaciones mediante una serie de etapas repetitivas de adición y activación que multiplica rápidamente el número de ramas. Un núcleo polifuncional reacciona con unidades de monómero que poseen un sitio reactivo y varios grupos protegidos. Luego de la reacción con el núcleo los grupos protegidos son activados para reaccionar con unidades de monómero adicionales. De esta manera, el crecimiento del dendrímico se produce generación tras generación, desde adentro hacia afuera hasta que el efecto estérico impide la futura reacción de los grupos funcionales periféricos.

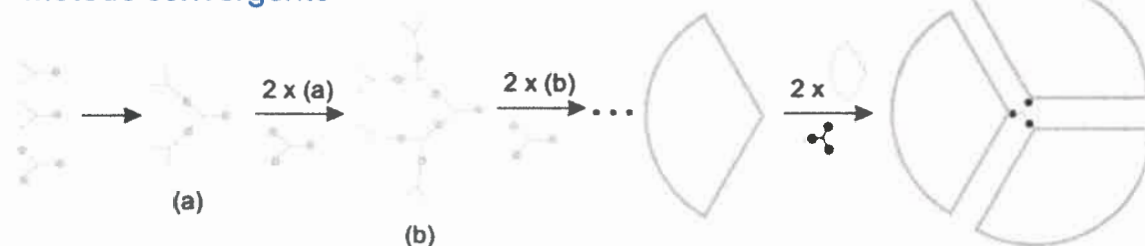
El método divergente puede usarse para sintetizar un amplio espectro de estructuras dendrímicas, pero está limitado por la reacción incompleta de los grupos terminales y

reacciones secundarias que conducen a defectos en la estructura. Para superar estas limitaciones, el monómero se suele adicionar en exceso, lo cual requiere realizar una purificación luego de cada paso. Sin embargo, estas purificaciones no pueden eliminar todos los subproductos incompletos.<sup>23</sup>

### Método divergente



### Método convergente



**Figura 3.** Estrategias de síntesis de dendrímeros: métodos divergente y convergente.

Adaptada de bibliografía (24).

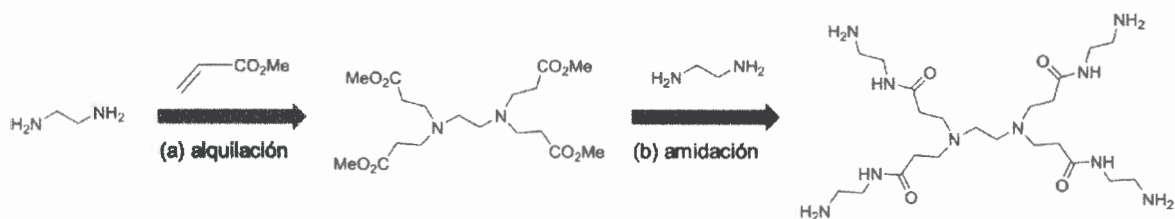
Por otro lado, el *método convergente* para la síntesis de dendrímeros, desarrollado por Fréchet<sup>25</sup>, Miller y Neenan<sup>26</sup>, fue propuesto para hacer frente a las deficiencias de la técnica divergente. En esta metodología primero se sintetizan los dendrones, comenzando desde la periferia y hacia el interior. Una vez obtenido los dendrones éstos se hacen reaccionar, a través de su punto focal, con una molécula que será el corazón central del dendrímero.

A diferencia del método divergente, los productos de las reacciones convergentes son fáciles de purificar ya que los dendrones son substancialmente diferentes de los subproductos de reacción, eliminando así la necesidad de reacciones altamente eficientes. Además, si bien el número de etapas de síntesis es similar tanto para la técnica divergente como la convergente, esta última tiene un menor número de eventos no ideales de crecimiento ya que solamente un pequeño número de sitios reactivos son funcionalizados en cada paso, lo que conduce a una mayor monodispersidad de los dendrímeros finales.<sup>27</sup> Sin embargo, las estrategias de síntesis convergente están limitadas a la construcción de



dendrimeros de bajas generaciones debido a la congestión estérica que se produce cuando se unen dendrones de generación alta al núcleo central.

Los dendrimeros de poli(amidoamina) (PAMAM) son la primera familia de dendrimeros sintetizada y comercializada. Estos dendrimeros fueron sintetizados por primera vez por Tomalia a través de una metodología divergente. La síntesis se inicia con un corazón central que por lo general es etilendiamina o amonio, los cuales sufren reiterativamente dos pasos de reacción que dan por resultado la obtención de cada capa o generación. Los dos pasos son: (a) alquilación exhaustiva de las aminas primarias por adición de Michael con metil acrilato y (b) amidación de los grupos éster con un exceso de etilendiamina, lo que conduce a la obtención de un dendrimer con grupos amina primaria como unidad terminal (Figura 4).<sup>8</sup> Repitiendo de manera iterativa estos pasos se producen capas adicionales que conduce a un aumento de la masa y de los grupos terminales que puede conocerse con exactitud.



**Figura 4.** Esquema de síntesis de dendrimeros PAMAM, ruta divergente.

Como se comentó anteriormente, el crecimiento de los dendrimeros alcanza un punto crítico en el que la congestión superficial limita su desarrollo en generaciones mayores y puede producir defectos estructurales. De Gennes<sup>28</sup> definió el límite de empaquetamiento denso como el punto en el que la superficie total del dendrimer no es suficiente para albergar la cantidad estequiométrica de monómero a incorporar en la siguiente etapa de crecimiento. La generación correspondiente al límite de empaquetamiento denso se denomina generación del empaquetamiento denso de Gennes. Así, el crecimiento del dendrimer sin defectos en su estructura se espera que se logre para las generaciones menores o iguales a la generación de Gennes. En el caso de los dendrimeros PAMAM este efecto se observa a partir de la generación 7, lo cual disminuye los rendimientos sintéticos de esta generación y de las generaciones superiores, hasta llegar a la 10, a partir de la cual la síntesis está impedida por factores estéricos.<sup>29</sup>

La síntesis de dendrimeros a través de los métodos divergente y convergente supone varias etapas de reacción y purificación, lo que limita la producción a gran escala e

incrementa los costos. Por lo tanto, con el objetivo de aumentar la producción y eficacia de la síntesis de dendrímeros y disminuir los costos, se han realizado diversas innovaciones y adaptaciones del método convergente.<sup>30</sup> Una de ellas es el método "double-stage"<sup>31</sup>, que consiste en unir grandes dendrones con alto grado de funcionalización ("hipermonómeros") a la superficie de pequeños dendrímeros ("hipernúcleos") dando lugar a un gran incremento del número de grupos terminales. Otra de las adaptaciones del método convergente se conoce como "double exponential growth"<sup>32</sup>; consiste en crecer un dendrón en dos direcciones, en la periferia y el punto focal, lo cual permite preparar rápidamente dendrímeros de alto peso molecular en sólo tres o cuatro pasos. Por otro lado, en el método llamado "orthogonal coupling strategy"<sup>33</sup>, se usan como monómeros dos tipos diferentes de dendrones que contienen grupos funcionales complementarios y dan lugar cada uno a una nueva generación.

Además de estas modificaciones del método convergente, en la búsqueda de un método sintético más simple, se han desarrollado nuevas estrategias para la síntesis de dendrímeros. Una de ellas, conocida como "lego chemistry"<sup>34,35</sup>, utiliza núcleos altamente funcionalizados y monómeros ramificados para preparar dendrímeros derivados de fósforo. La síntesis requiere sólo un paso por generación, por lo que la cuarta generación se obtiene sólo en cuatro pasos en lugar de ocho etapas que emplearía el método clásico. Además, requiere un volumen mínimo de solvente, fácil purificación, no necesita grupos protectores y genera subproductos ambientalmente benignos, como agua y nitrógeno. Otra estrategia, basada en la llamada "click chemistry"<sup>36,37</sup>, permite obtener dendrímeros con varias clases de grupos superficiales, con gran pureza y alto rendimiento a través de la síntesis de 1,2,3-triazoles por reacción de azidas y alquinos usando Cu (I) como catalizador. Una gran variedad de grupos funcionales son compatibles con este procedimiento y sólo se obtiene NaCl como subproducto mayoritario.

### 1.2.3 Características estructurales de los dendrímeros

Cada componente de la estructura dendrímica (núcleo, interior y grupos superficiales) posee una función específica, a la vez que define las propiedades de estas nanoestructuras a medida que crecen de una generación a otra.

El *núcleo o corazón central* puede ser pensado como el centro de información molecular ya que a través de la conectividad covalente a las capas externas se expresan el tamaño, la forma, la direccionalidad y la multiplicidad.

En el interior del dendrímero se encuentran las unidades de ramificación, las cuales definen el tipo y cantidad de espacio que podrá ser “cerrado” por los grupos terminales y al que llamamos *nanocavidades interiores* del dendrímero. La multiplicidad de las unidades de ramificación determina la densidad y grado de amplificación como una función exponencial de la generación. La composición del interior y el tamaño de las nanocavidades determinan las propiedades endoreceptoras de los dendrímeros fijando el alcance y naturaleza de las posibles interacciones huésped-dendrímero dentro de una familia y generación particular de dendrímeros.

Finalmente, la superficie se compone de múltiples *grupos terminales*. Si la funcionalidad es la apropiada estos grupos sirven como plantilla para continuar la polimerización obteniendo de esta manera las siguientes generaciones de dendrímero. Además, los grupos terminales pueden funcionar como puertas controlando así la entrada y salida de moléculas huésped del interior del dendrímero.

Los grupos terminales están directamente relacionados con la solubilidad de los dendrímeros como así también con su toxicidad e interacción con el medio en el que se encuentran. Debido a esto, la modificación química de los grupos superficiales es un procedimiento común para cambiar la solubilidad de la macromolécula, controlar su interacción con células y su biodistribución.<sup>38</sup>

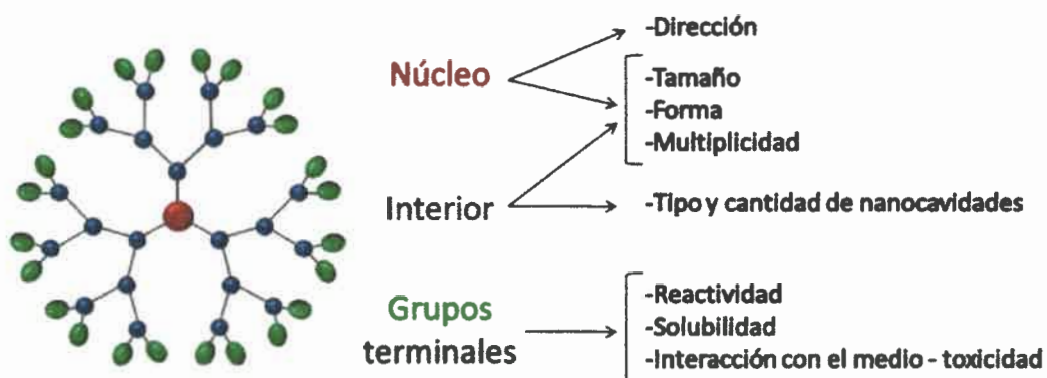
La presencia de múltiples grupos terminales en la superficie dendrímica (multivalencia), es una característica distintiva que los hace muy interesantes para aplicaciones biológicas, ya que en procesos de reconocimiento biológico la multivalencia de la estructura dendrímica da lugar a un incremento en la afinidad de unión debido a un efecto sinérgico.<sup>39,40</sup>

De esta manera, cada uno de los tres componentes de la arquitectura dendrímica posee una función específica y determina las propiedades físicas y químicas de estas nanoestructuras, así como el tamaño general, la forma, y la flexibilidad (Figura 5).

Sin embargo, el tamaño general, la forma y la flexibilidad de la estructura del dendrímero no sólo dependen de los componentes de la arquitectura molecular (núcleo, interior y grupos superficiales), sino también de la generación de la macromolécula dendrímica. El tamaño del dendrímero aumenta linealmente con cada capa adicionada o generación. Por ejemplo, en los dendrímeros PAMAM el diámetro aumenta aproximadamente 1 nm por generación, tal que de la generación 1 a la 12 incrementan su tamaño de 1.1 a 12.4 nm. A su vez, el número de grupos terminales aumenta exponencialmente con la generación. Este aumento exponencial genera congestión de los











grupos terminales a medida que la generación del dendrímero aumenta, lo cual produce cambios conformacionales importantes.<sup>28</sup> Así, como puede observarse en la Figura 6, las primeras generaciones presentan estructuras planas y abiertas que van evolucionando hasta alcanzar estructuras más robustas, menos deformables y semejantes a esferas, elipsoides o cilindros, dependiendo de la forma y direccionalidad del corazón central, para las generaciones más altas.<sup>8</sup> Las generaciones entre las cuales ocurren estos cambios dependen del tamaño y multiplicidad del corazón así como de las características estructurales de las ramificaciones. De este modo los dendrímeros PAMAM con un corazón de amonio cuya multiplicidad es igual a tres y la de la ramificación igual a dos, muestran un cambio morfológico importante volviéndose globulares en la generación 4.5 mientras que si el corazón de los mismos es de etilendiamina, cuya multiplicidad es cuatro, este cambio en la conformación se observa antes, entre la generación 3 y 4. De este modo puede verse cómo el incremento en la multiplicidad del corazón acelera la congestión y determina que la forma globular se adquiera en generaciones más tempranas.



**Figura 5.** Componentes de la estructura dendrímica y propiedades que definen.

Finalmente, las generaciones intermedias ( $G = 4-7$ ) presentan nanocavidades interiores más definidas que las generaciones tempranas ( $G = 0-3$ ) ya que los dendrímeros de generaciones más bajas poseen estructuras más abiertas. Además, la entrada y salida de moléculas al interior del dendrímero está determinada por el tamaño y propiedades de los grupos superficiales. A generaciones altas ( $G$  mayor a 7), donde se presenta empaquetamiento de Gennes, el acceso al interior del dendrímero sólo es posible para moléculas muy pequeñas.<sup>41</sup>

Estructura									
Flexible			Globular			Cerrada			
$d_{z-z}$ (Å)	10.71		10.25	9.52	8.46	7.12	5.62		
									
G=	1	2	4	5	6	7	8	9	
	Estructura abierta y flexible			Interior accesible			Interior inaccesible		
							Empaquetamiento de Genes		

**Figura 6.** Ilustración que muestra los cambios conformacionales de dendrímeros PAMAM como una función de la generación. (z: grupos terminales).

Adaptada de bibliografía (8).

#### 1.2.4 Efecto de las condiciones del medio sobre la estructura dendrimérica

La conformación espacial que presentan los dendrímeros es el resultado de múltiples interacciones que pueden ser modificadas cuando se cambian las condiciones del medio, como el pH, la polaridad del solvente o la fuerza iónica.

El *pH del medio* es un factor muy importante que afecta la conformación espacial que presentan los dendrímeros, como así también la polaridad de las nanocavidades y la capacidad de establecer interacciones específicas. Numerosos estudios teóricos y experimentales demuestran que los cambios conformacionales que se producen cuando las macromoléculas dendriméricas son protonadas dependen del tipo de dendrímtero, tamaño, generación y grupos terminales.<sup>42-44</sup> Ottavianni y col.<sup>42</sup> demostraron que a pH altos los dendrímeros PAMAM de generación completa (grupos amino terminales) se encuentran totalmente deprotonados y poseen una estructura globular producto de numerosas interacciones hidrofóbicas que provocan pliegues de las ramificaciones hacia el interior del dendrímtero (“back-folding”). Cuando se disminuye el pH las aminas primarias de la superficie comienzan a protonarse; alrededor de pH 7 todas las aminas superficiales se encuentran protonadas.<sup>45</sup> La presencia de unidades cargadas en la periferia provoca cambios conformacionales, las ramificaciones ya no se encuentran plegadas hacia el interior y, de este modo, se definen mejor las cavidades interiores tornándose más accesibles. Cuando la concentración de protones se incrementa aún más se comienzan a protonar las aminas terciarias de las cavidades interiores. Estas poseen diferente  $pK_a$  dependiendo de la generación del dendrímtero y su distancia del corazón central.



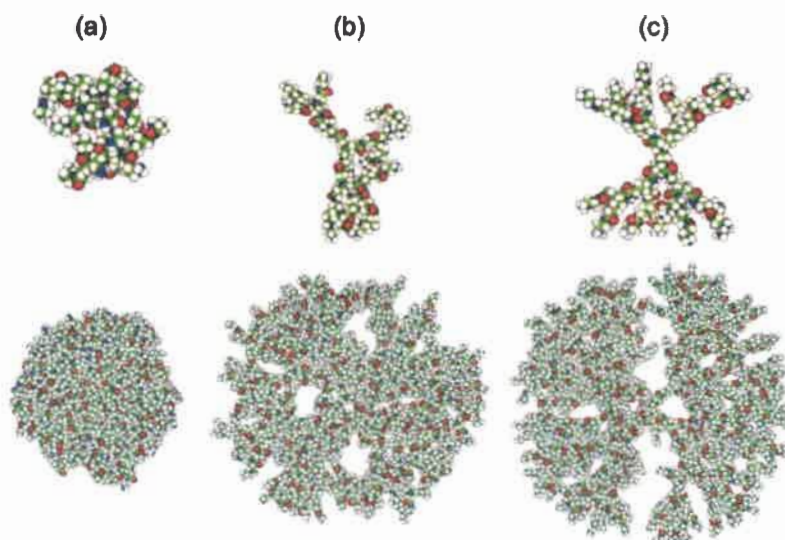
La Tabla 1 muestra los diferentes valores de pH a los cuales se protonan los grupos internos y externos de dendrímeros PAMAM de diferente tipo y generación.

**Tabla 1.** Valores de pH a los cuales se protonan los grupos internos y externos de dendrímeros PAMAM de diferente tipo y generación.<sup>42</sup>

G <sup>a</sup>	Sitios básicos	Nº de SBE <sup>b</sup>	pH <sup>c</sup>
3	NH <sub>2</sub> terminal	12	8.5
3	NR <sub>3</sub> a G = 2	6	5.5
3	NR <sub>3</sub> a G = 1 y corazón	4	3.0
5	NH <sub>2</sub> terminal	48	8.0
5	NR <sub>3</sub> a G = 4	24	5.0
5	NR <sub>3</sub> a G = 3, 2, 1 y corazón	22	2.0
5.5	NR <sub>2</sub> , R' a G = 5	48	7.0
5.5	NR <sub>3</sub> a G = 4	24	4.5
5.5	NR <sub>3</sub> a G = 3	12	3.5
5.5	NR <sub>3</sub> a G = 2, 1 y corazón	10	3.0
5.5	COO <sup>-</sup> terminal	48	1.5

<sup>a</sup> G = generación; <sup>b</sup> Nº de SBE = número de sitios básicos equivalentes; <sup>c</sup> pH = valor de pH al cual se protona cada set.

Cuando el interior de la macromolécula se encuentra protonada la polaridad de las cavidades aumenta y las ramificaciones se repelen adquiriendo el dendrímero una conformación totalmente abierta. Este efecto es mayor para dendrímeros de generaciones más pequeñas como puede apreciarse en la Figura 7. Por lo tanto, la acidificación del medio convierte el interior del dendrímero en una zona abierta y de polaridad semejante a la del seno de la solución.<sup>46</sup> Los dendrímeros PAMAM de generación intermedia (grupos carboxilato terminales) son menos sensibles a los cambios del pH debido a que el pK<sub>a</sub> de las aminas terciarias que se encuentran en el interior de los mismos es ligeramente menor cuando se los compara con los de generación completa. Esto hace que a un pH dado los dendrímeros de generación intermedia se encuentren menos protonados que los de generación completa, produciéndose menos cambios conformacionales.



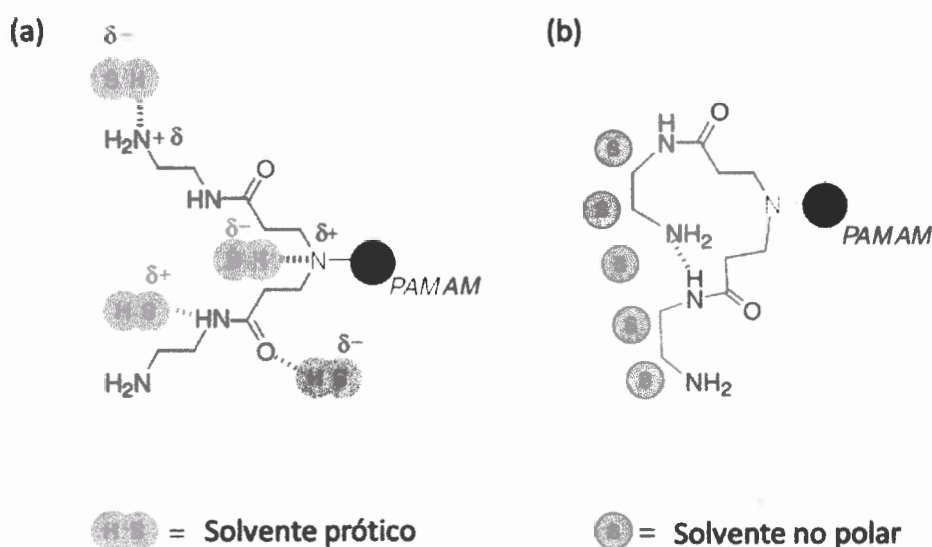
**Figura 7.** Configuración simulada de dendrímeros PAMAM G = 2 (superior) y G = 6 (inferior) usando dinámica molecular.

(a) a pH alto, ninguna amina está protonada; (b) a pH = 7, solo las aminas primarias están protonadas, y (c) a pH bajo, todas las aminas están protonadas.

Adaptada de bibliografía (44).

La *polaridad del solvente* es un parámetro muy importante a tener en cuenta cuando se analiza la conformación espacial del dendrímero. Murat y Grest<sup>47</sup> realizaron estudios de dinámica molecular sobre la conformación dendrímica en función de la generación en diferentes solventes, los cuales demostraron que, en general, todas las generaciones experimentan el pliegue de las ramificaciones hacia el interior del dendrímero al disminuir la habilidad del solvente para solvatar la estructura dendrímica. A su vez, estudios de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) llevados a cabo con dendrímeros de poli(propilenimina) (PPI) indican que un solvente apolar, como benceno, solvata pobremente la macromolécula, favoreciendo las interacciones intramoleculares entre segmentos de la estructura dendrímica y, por lo tanto, el pliegue de las ramificaciones hacia el interior del dendrímero. Por otro lado, un solvente débilmente ácido, como cloroformo, puede formar enlaces puente hidrógeno con las aminas interiores básicas del dendrímero PPI, lo que conduce a una conformación extendida.<sup>48</sup> En el caso de dendrímeros PAMAM se observa el mismo efecto que para los dendrímeros PPI; los solventes polares solvatan las ramificaciones de la estructura dendrímica haciendo que el dendrímero tenga una configuración extendida, mientras que en solventes apolares apróticos se produce el pliegue de las ramificaciones hacia el interior del dendrímero

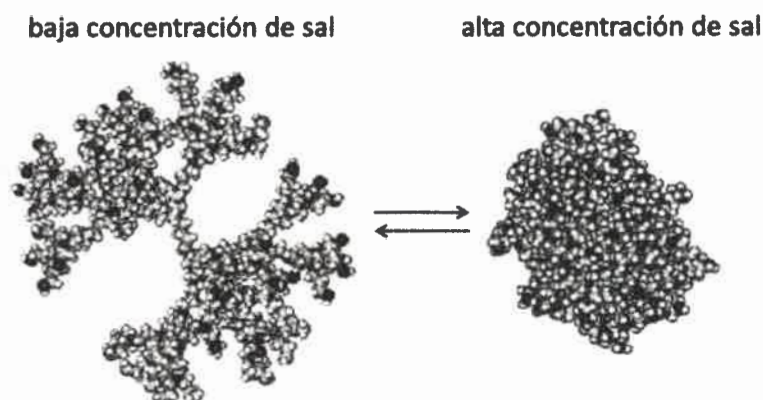
debido a una pobre solvatación y la existencia de interacciones intramoleculares (Figura 8).<sup>49</sup>



**Figura 8.** Esquema propuesto para la solvatación de un dendrímero polar en un solvente prótico (a) y en un solvente aprótico y no polar (b).

Adaptada de bibliografía (49).

Otro parámetro importante que influye en la conformación espacial de la estructura dendrímica es la *fuerza iónica* (Figura 9).



**Figura 9.** Conformación espacial de la estructura de un dendrímero PPI a baja y alta concentración de sal.

Adaptada de bibliografía (50).

Si el dendrímero presenta cargas, el incremento de la fuerza iónica favorece el pliegue de las ramificaciones hacia el interior del dendrímero, al igual que lo hace un

incremento del pH o la disminución de la capacidad de solvatación del solvente.<sup>51,52</sup> Sin embargo, a bajas concentraciones de sal, las fuerzas de repulsión entre los grupos cargados del dendrímero dan lugar a una configuración extendida de la estructura dendrímica en la cual se minimizan las fuerzas de repulsión (Figura 9).<sup>49</sup>

### **1.3 Aplicaciones biomédicas: Administración controlada de drogas**

#### **1.3.1 Dendrímeros como vehículos de drogas en solución**

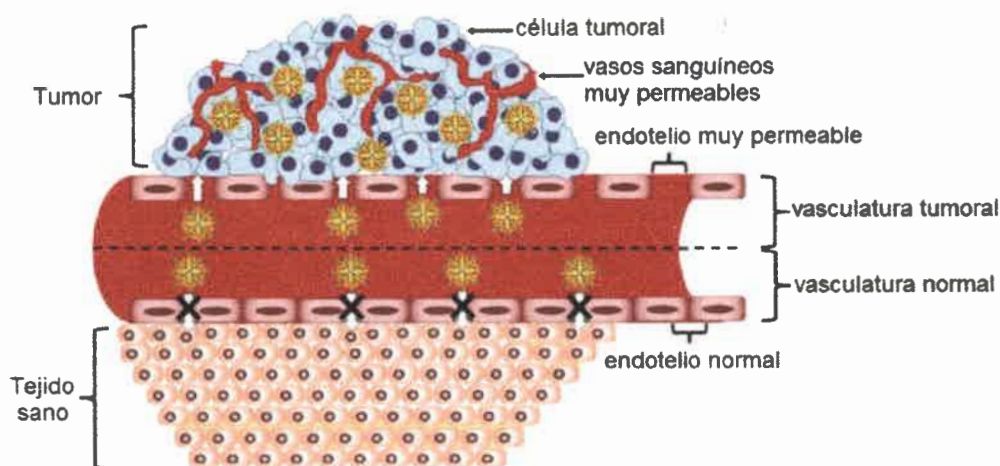
De los diversos sistemas que se investigan para ser aplicados como vehículos en la liberación controlada de drogas, los *dendrímeros* han suscitado un gran interés ya que tienen el potencial para superar las dificultades asociadas a la administración convencional de fármacos. En primer lugar, son *capaces de encapsular y solubilizar fármacos, aumentando su solubilidad en agua y facilitando su biodistribución.*<sup>7,20,21</sup> Además, *permiten incrementar el tiempo de vida en circulación de la droga, mejoran el tránsito a través de las barreras biológicas* y presentan un *lento metabolismo del fármaco.*<sup>1,53,54</sup> Todo esto los convierte en sistemas ideales para su aplicación como transportadores de drogas.<sup>40,55</sup>

En algunos casos, los dendrímeros no sólo permiten mejorar la solubilidad de fármacos poco solubles o prácticamente insolubles, sino que también *protegen a la droga hasta su llegada al sitio de acción.* La acción de enzimas y las condiciones del medio, muchas veces pueden provocar la hidrólisis del compuesto activo. Sin embargo, la incorporación de la molécula en las nanocavidades interiores del dendrímero, permite protegerla de agentes externos.<sup>20</sup>

Se han utilizado diversos polímeros dendrímicos para transportar una variedad de compuestos activos como anticancerígenos, anti-inflamatorios, bactericidas, etc., observándose en todos los casos incremento de la actividad terapéutica y reducción en la toxicidad comparada con la droga pura.<sup>21,56</sup> En la actualidad, algunos de estos sistemas droga-dendrímero ya se encuentran en alguna etapa de ensayos clínicos.<sup>57</sup> VivaGel® es el primer producto terapéutico basado en dendrímeros que ha sido comercializado. Este producto, desarrollado por la firma australiana Starpharma, se trata de un gel cuyo componente activo es un dendrímero de polilisina, el cual es un agente antiviral activo contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus del herpes simple (VHS) y el virus del papiloma humano (VPH). El dendrímero actúa fijándose a proteínas de los virus, impidiendo su fijación a los receptores de las células y por lo tanto la infección.



Los dendrímeros son especialmente adecuados para la distribución controlada de drogas antitumorales.<sup>58,59</sup> Las ventajas del uso de macromoléculas como los dendrímeros para este tipo de tratamiento derivan de la naturaleza de las células tumorales y del tejido vascular de las mismas. Las células tumorales poseen una elevada actividad metabólica debido a la rápida reproducción celular. De este modo, la vasculatura del tumor tiene tamaños de poro mayores y un drenaje linfático ineficaz en comparación con el tejido sano, lo cual da lugar a un aumento de la captación de macromoléculas por el tejido tumoral en comparación con el tejido normal. Este efecto, que se ha encontrado para diversos sistemas macromoleculares, genera un aumento de la permeabilidad y la retención, y se denomina efecto EPR por sus siglas en inglés Enhanced Permeability and Retention Effect (Figura 10).<sup>3,40,60,61</sup> Además, se ha observado que el volumen intersticial en los tumores es mayor que el del tejido sano. Esto también da lugar a un aumento de la captación de macromoléculas debido a que hay más espacio "de fluido libre".<sup>62</sup> De esta manera, la droga se acumula preferencialmente en la zona tumoral, aumentando la selectividad y eficacia terapéutica, y disminuyendo los efectos secundarios.



**Figura 10.** Ilustración que muestra la difusión de sistemas de administración de fármacos basados en dendrímeros (amarillo) a través de la vasculatura tumoral y su retención en el tumor ("efecto EPR").

Adaptada de bibliografía (27).

Además del efecto EPR, se puede hacer uso del cambio en el microambiente tumoral, como el pH, temperatura, y el potencial redox para controlar aún más la liberación de drogas antitumorales en el sitio blanco. Por ejemplo, debido a la rápida proliferación de

las células cancerígenas, en el tumor se lleva a cabo un metabolismo hipóxico para obtener energía adicional, lo que resulta en un microambiente ácido (pH zona tumoral  $\approx 6.5$ ).<sup>1</sup> De esta manera, se puede usar un sistema droga-dendrímico en el cual la droga esté asociada al dendrímico a través de un enlace sensible al pH, tal que al pH fisiológico normal (pH 7.4) no se vea afectado pero al pH ácido de la zona tumoral se rompa y libere el compuesto activo.<sup>63,64</sup>

Además del transporte pasivo del sistema droga-dendrímico a través del efecto EPR, se puede aumentar la captación selectiva de la droga en las células tumorales a través de un transporte activo. En éste, la droga antitumoral se asocia a dendrímeros que tengan en su superficie ligandos específicos de receptores que se encuentran sobreexpresados en las células tumorales debido a su elevada actividad metabólica, como por ejemplo, ácido fólico, biotina, proteínas como la transferrina, péptidos, entre otros.<sup>2</sup>

De esta manera, la utilización del microambiente del tumor junto con la ingeniería de la nanoestructura dendrímica es de gran importancia en el aumento de la acumulación específica de drogas anticancerígenas en el tejido tumoral.

*Los dendrímeros presentan varias ventajas frente a otros sistemas de liberación controlada.* Por ejemplo, a diferencia de los polímeros convencionales, los dendrímeros poseen una *estructura tridimensional bien definida* y pueden ser sintetizados de modo de reproducir un peso molecular preciso, lo cual es muy importante para lograr datos farmacocinéticos reproducibles. Además, la conectividad covalente de la estructura dendrímica da lugar a una *estructura más estable que resiste las condiciones fisiológicas*, a diferencia de otros sistemas coloidales también usados para vehicular drogas, como liposomas o nanopartículas lipídicas sólidas.<sup>6,27,55</sup>

Por otro lado, los dendrímeros se caracterizan por poseer tamaño y forma comparable a una gran variedad de biocomponentes<sup>41</sup> (Figura 11) y se ha observado que se incorporan fácilmente a las células por endocitosis, lo cual es muy importante en su aplicación como nanovehículos de drogas.<sup>65,66</sup>

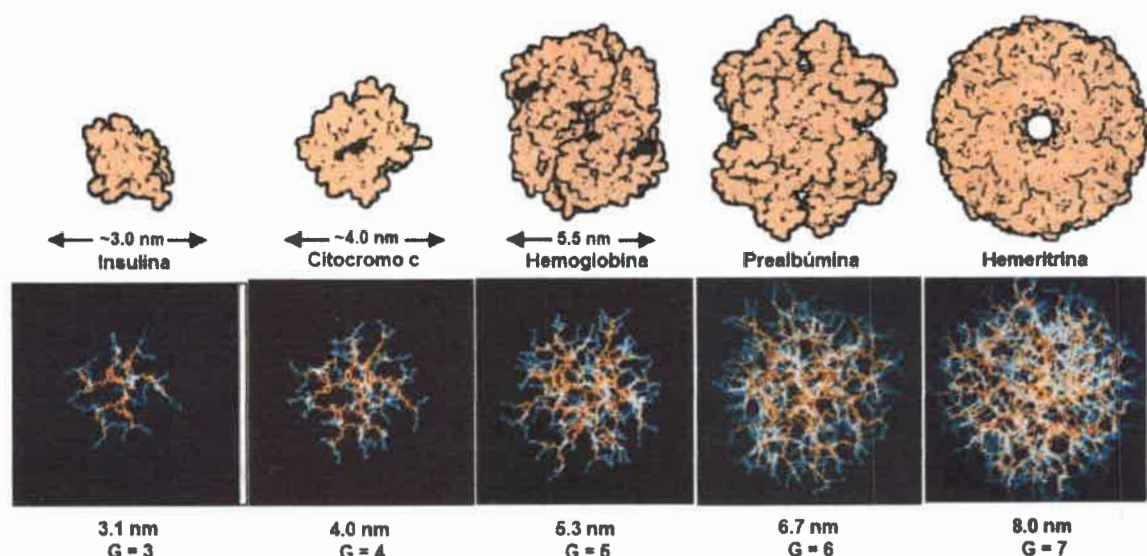


Figura 11. Comparación a escala dimensional de una serie de dendrímeros PAMAM con una variedad de proteínas.

Adaptada de bibliografía (11)

### 1.3.2 Tipos de asociación droga-dendrímero

La interacción del dendrímero con la droga puede tener lugar *en los nanoentornos interiores del dendrímero o en la superficie multivalente*; a su vez la asociación entre el dendrímero y las moléculas de droga puede ser *covalente o no covalente* (Figura 12).<sup>40</sup>

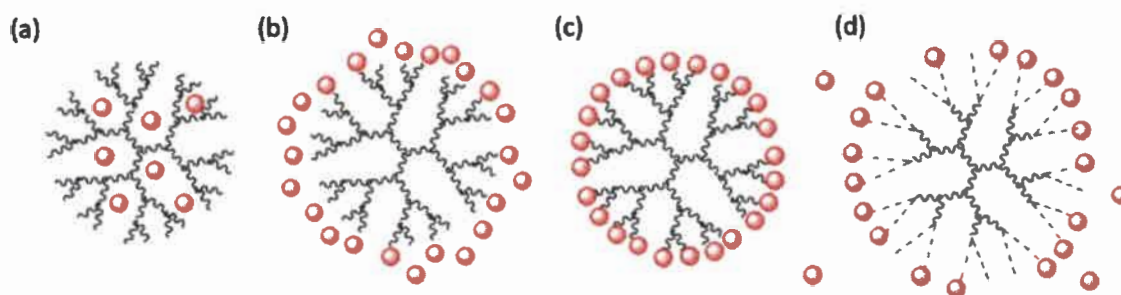


Figura 12. Tipos de asociación droga-dendrímero.

(a) no covalente en los nanoentornos interiores del dendrímero, (b) no covalente en la superficie dendrímica, (c) covalente y (d) escindible.

Adaptada de bibliografía (40)

En el caso de la *asociación no covalente* la droga interacciona con el dendrímero a través de interacciones electrostáticas, enlaces puente hidrógeno o interacciones hidrofóbicas. Este tipo de asociación se puede dar tanto en el interior de la estructura



dendrimérica como en la superficie (Figura 12 (a) y (b)). Debido a que no existe unión covalente entre la droga y el vehículo, la preparación de soluciones que contengan asociaciones de este tipo no involucra procedimientos engorrosos de síntesis. Además, la liberación del agente terapéutico puede concretarse con condiciones menos agresivas que las necesarias para lograr la ruptura de una unión química. Sin embargo, debido a que cualquiera de las interacciones que puedan establecerse es más débil que una unión propiamente dicha, estos sistemas son menos estables si se los compara con aquellos en los cuales la unión a la droga es covalente.

Por otra parte, la *asociación covalente* involucra la unión química del vehículo a la molécula a transportar. Como es de esperar, este tipo de asociación se produce mediante reacciones químicas y por ende tal proceso incluye etapas de aislamiento del producto asociado y purificación del mismo. Si bien tales procedimientos suelen ser complejos presentan la ventaja de proveer sistemas más estables. No obstante, la liberación del huésped en el sitio deseado se da únicamente si dicha unión se rompe. La asociación covalente se da en la superficie del dendrímero y puede ser del tipo covalente propiamente dicha o del tipo escindible (Figura 12 (c) y (d)). Los principales tipos de funcionalidades escindibles son ésteres, amidas y carbamatos. Tales sistemas son muy útiles para conducir compuestos activos hacia sitios muy específicos donde se den las condiciones que favorezcan la ruptura de la unión droga-transportador. Un ejemplo de esto último es una droga antitumoral unida al dendrímero a través de un enlace escindible al disminuir el pH, tal que la liberación de la droga es activada por la acidez extracelular de la zona tumoral; es decir, en condiciones fisiológicas el enlace droga-dendrímero no se ve alterado, pero al pH más bajo de la zona tumoral se rompe, permitiendo la liberación de la droga específicamente en el sitio blanco.<sup>63,64</sup>

### **1.3.3 Biocompatibilidad de los dendrímeros**

De acuerdo a lo expuesto hasta el momento, las propiedades de los dendrímeros que son importantes para su aplicación en la administración de drogas incluyen: monodispersidad, alta capacidad de alojar la droga o asociarse con ella, estabilidad química y capacidad de efectuar una liberación controlada de la droga. Sin embargo, además de los aspectos fisicoquímicos que influyen en las propiedades como vehículo es importante tener en cuenta que estos sistemas serán administrados a seres vivos y por lo tanto deben cumplir varias condiciones de importancia crucial.



Al hablar de una droga, la industria farmacéutica se refiere a *toxicidad* como una medida del daño no específico y no deseado que puede provocar hacia las células, los órganos o al paciente como un sistema multiorgánico. Sin embargo, en el campo de los materiales biomédicos, se adopta el término *biocompatibilidad*, el cual se define como la capacidad de un material para realizar una aplicación específica con una respuesta adecuada del huésped. Esta definición considera la idoneidad de un material no sólo con respecto a su posible efecto perjudicial en el cuerpo (toxicidad), sino también respecto al posible efecto perjudicial o beneficioso del entorno fisiológico sobre el rendimiento del material.<sup>67</sup>

***Para que un sistema sea adecuado para su aplicación como vehículo de drogas es esencial que no presente efectos tóxicos y sea biocompatible.*** Además, no debe generar respuesta inmune del organismo, o sea ***no debe ser inmunogénico***. A su vez, si se piensa en la administración intravenosa, se debe evaluar la interacción del sistema dendrímérico con los componentes de la sangre. De este modo, un vehículo apropiado será aquel que no perturbe, disminuya o anule las funciones que cada componente sanguíneo cumple, es decir, ***debe ser hemocompatible***.

Las propiedades biológicas como toxicidad, inmunogenicidad y hemocompatibilidad de un dendrímero están gobernadas en gran medida por su tamaño y naturaleza de los grupos funcionales de la superficie. El interior de la estructura dendrítica normalmente es de menor importancia ya que, en general, las interacciones entre el dendrímero y el entorno tienen lugar a través de los grupos expuestos en la superficie del dendrímero.

Diversos ensayos *in vitro* e *in vivo* demuestran que los dendrímeros catiónicos, tales como los dendrímeros PAMAM amino terminales (PAMAM-AT), pueden presentar cierta toxicidad, la cual depende de la concentración y de la generación.<sup>68-70</sup> La citotoxicidad de los polímeros con cargas positivas se da como consecuencia de la interacción electrostática de los mismos con las cargas negativas de la membrana celular; esto conduce a la formación de orificios en la membrana, la liberación de los componentes intracelulares y, por lo tanto, la muerte de la célula.<sup>71</sup> La toxicidad de los dendrímeros PAMAM catiónicos aumenta con cada generación; en general, los dendrímeros PAMAM-AT de generaciones bajas o medias ( $\leq 5$ ), no presentan problemas *in vivo* desde el punto de vista de la toxicidad, sin embargo, las generaciones más grandes no serían una buena opción para su uso como vehículos de drogas, ya que los efectos tóxicos son más marcados.<sup>72,73</sup>

Si bien los grupos amino superficiales de dendrímeros PAMAM-AT, en algunos casos, pueden provocar efectos tóxicos, estos grupos son esenciales para aumentar la liberación en el citoplasma de los compuestos terapéuticos asociados al vehículo a través del “mecanismo de esponja de protones”.<sup>64,74</sup> La acumulación de dendrímeros PAMAM-AT en los endosomas resulta en la protonación de los grupos amino de la superficie dendrímica, lo cual desencadena la difusión y acumulación de contraiones cloruro en dichos orgánulos. Esto provoca el incremento de la presión osmótica endosomal y, finalmente, la ruptura de la membrana del endosoma y liberación de su contenido, incluyendo los dendrímeros asociados a la droga, en el citoplasma de las células. Este efecto es un mecanismo de gran importancia ya que permite el acceso de los dendrímeros y la droga al citoplasma celular.

Los dendrímeros PAMAM que presentan grupos superficiales neutros o aniónicos han demostrado ser menos tóxicos y menos hemolíticos que los amino terminales.<sup>39</sup> En general, la toxicidad de dendrímeros PAMAM sigue el orden hidroxilo terminal < carboxilato terminal < amino terminal. Por ejemplo, los dendrímeros PAMAM carboxilato terminales (PAMAM-CT) de generaciones 3.5 y 4.5 son citotóxicos sólo a concentraciones altas (10.0 mM), mientras que los amino terminales de generaciones 3 y 4 son tóxicos a menores concentraciones (1.0 mM).<sup>75</sup> Por lo tanto, ya que los dendrímeros PAMAM hidroxilo terminales (PAMAM-OHT) y carboxilato terminales son mejor tolerados, se pueden usar en dosis más altas que los dendrímeros PAMAM-AT.<sup>73</sup>

La hemocompatibilidad de dendrímeros también depende de la generación y naturaleza de los grupos terminales. Por ejemplo, en el caso de dendrímeros PAMAM-AT se ha observado un incremento del efecto hemolítico al aumentar la generación.<sup>69</sup>

#### **1.3.4 Sistemas de administración de drogas mediada por superficie**

Varios estudios demuestran la aplicabilidad de los dendrímeros como vehículos de fármacos en solución.<sup>76,77</sup> Sin embargo, en la última década, una nueva oportunidad ha sido investigada en el campo de la administración de drogas, la cual implica el uso de superficies recubiertas de películas de polímeros.<sup>78</sup> En este tipo de sistemas, las películas de polímero depositado actúan como reservorio para la carga terapéutica activa y permiten la liberación controlada de moléculas de droga.<sup>78-81</sup> Estas películas han demostrado ser útiles en diversas aplicaciones biomédicas, como por ejemplo, el desarrollo de stents cardiovasculares con superficies capaces de liberar fármacos de manera controlada; el suministro de drogas desde la superficie del stent permite una mayor concentración local

de los fármacos a través de su liberación específica en el sitio de acción, lo cual resulta muy importante para el éxito de la cirugía cardiovascular. También se han empleado películas de polímeros depositados sobre superficies para la carga y liberación controlada de péptidos y proteínas, genes y en la administración transdérmica de vacunas.<sup>78</sup>

En la administración de drogas mediada por superficie la liberación de las moléculas de droga se produce de manera controlada a las células adherentes o en las proximidades de la película. De esta manera, en comparación con la administración de drogas en solución, se reducen los efectos secundarios y se aumenta la efectividad del tratamiento, ya que no ocurre una alta dispersión y dilución del fármaco en el organismo.<sup>81</sup>

Se han desarrollado sistemas de administración de drogas mediada por superficie a partir de la deposición de diferentes polímeros, tales como poli(dopamina), poli(N-isopropil acril amida), poli(L-lisina), poli(metil acrilato), etc.<sup>78</sup> Estas películas de polímero, en general, se forman a partir de la técnica de autoensamblado capa por capa (Layer by Layer) y luego se incorporan las moléculas de droga en la película polimérica. Otra posibilidad consiste en formar películas a partir de polímeros y sistemas supramoleculares como liposomas, micelas o ciclodextrinas, usados comúnmente como vehículos de drogas en solución.<sup>78</sup> En este caso, la droga se incorpora a la película asociada a los sistemas supramoleculares.

De los diversos sistemas poliméricos estudiados, los dendrones se presentan como candidatos muy prometedores para el desarrollo de sistemas de administración de fármacos mediada por superficie, debido a que sus estructuras tienen un punto focal que puede ser modificado con el fin de optimizar la unión al sustrato sólido, y además presentan ramificaciones funcionalizables capaces de interactuar con el compuesto activo.<sup>82</sup> A su vez, la presencia de numerosos grupos terminales funcionalizables da la posibilidad de que existan interacciones específicas con los tejidos y células circundantes. En este sentido, es muy importante estudiar cómo las propiedades estructurales de los dendrones influyen en la conformación y estabilidad de la película dendrímica. Las técnicas de Langmuir y Langmuir-Blodgett proporcionan herramientas versátiles para el estudio de estas características.<sup>83-85</sup> Estas técnicas permiten la generación y caracterización de películas monomoleculares en la interface aire-agua y su transferencia sobre sustratos sólidos.<sup>86-88</sup>

Varios autores han descrito la formación de películas de Langmuir y Langmuir-Blodgett de dendrímeros y dendrones.<sup>82,89-94</sup> Estos estudios están enfocados en el análisis de la influencia de varios factores, como la generación, corazón, punto focal y grupos terminales del sistema dendrímico, sobre la formación y estabilidad de las monocapas de

Langmuir y las películas transferidas.<sup>95-98</sup> Sin embargo, hay muy pocos estudios donde las monocapas de Langmuir de polímeros dendiméricos son analizados como reservorio de compuestos activos para el desarrollo de sistemas de administración de drogas mediado por superficie.<sup>84</sup>



## **2. OBJETIVOS**

---

### **2.1 Objetivo general**

El objetivo general de la presente tesis doctoral fue evaluar diferentes polímeros dendriméricos como vehículos para el transporte, distribución y liberación controlada de compuestos terapéuticos. Se propuso investigar las características estructurales de los sistemas dendriméricos que permitan optimizar la encapsulación de compuestos activos y su liberación controlada, con el propósito de desarrollar estructuras dendriméricas con capacidad para actuar como transportadores de drogas. Además, se propuso la generación y caracterización de películas de dendrones y películas mixtas droga-dendrón, con el propósito de desarrollar películas con potencial aplicación en la administración de fármacos mediado por superficie. A su vez, en vista del potencial uso de los sistemas dendriméricos estudiados en sistemas biológicos, se planteó evaluar su biocompatibilidad.

### **2.2 Objetivos específicos**

#### ***I) Dendrímeros como vehículos de drogas en solución***

1) Determinar las propiedades fisicoquímicas de compuestos activos que permitan analizar los procesos en los que estas moléculas se encuentren involucradas y determinar las características estructurales que optimizan su actividad.

2) Investigar la capacidad de los polímeros dendriméricos para asociarse con los compuestos activos y aumentar su solubilidad en medio fisiológico.

3) Estudiar el efecto del cambio de pH y temperatura del medio en la asociación de los compuestos activos con los dendrímeros estudiados.

4) Analizar la estabilidad en el tiempo de los diferentes conjugados droga-dendrímero y cuantificar la liberación del huésped en los sistemas droga dendrímeros analizados.

5) Evaluar la biocompatibilidad de los sistemas droga-dendrímero a través de ensayos de viabilidad celular y análisis del carácter hemolítico.

#### ***II) Películas de moléculas dendriméricas como potenciales sistemas de administración de drogas mediada por superficie***

- 1) Generar películas de dendrones mediante la técnica de Langmuir en la interfase aire-agua.
- 2) Caracterizar la organización adoptada en la interfase y las interacciones presentes en las monocapas dendriméricas formadas.
- 3) Generar películas de Langmuir mixtas de dendrones y un compuesto activo.
- 4) Evaluar la estabilidad y reversibilidad de las diversas monocapas dendriméricas generadas.
- 5) Transferir las películas obtenidas a sustratos sólidos, mediante la técnica de Langmuir-Blodgett y caracterizarlas mediante Microscopía de Fuerza Atómica.
- 6) Realizar ensayos preliminares de biocompatibilidad de las películas dendriméricas depositadas.

## 3. SISTEMAS ESTUDIADOS

---

En esta sección se detallan los diferentes dendrímeros y dendrones que se evaluaron como vehículos para el transporte, distribución y liberación controlada de compuestos terapéuticos en este trabajo de tesis doctoral, como así también los compuestos con actividad biológica utilizados.

### 3.1 Dendrímeros y dendrones

#### 3.1.1 Dendrímeros de poli(amidoamina) (PAMAM)

Los dendrímeros PAMAM son la primera clase de dendrímeros sintetizados y caracterizados.<sup>14,41</sup> Su corazón central es una unidad de etilendiamina a la cual se unen monómeros (unidades de amidoamina). Dado que la estructura del monómero posee grupos amida y amina terciaria, los dendrímeros PAMAM pueden establecer interacciones dipolo-dipolo y puente hidrógeno con el medio y con moléculas huésped. Además, las cadenas carbonadas que unen estos grupos funcionales le confieren carácter no polar a sus cavidades interiores.

El grupo terminal es un grupo amino si el dendrímero es de generación completa (PAMAM-AT) y un grupo carboxilato si es de generación intermedia (PAMAM-CT). Otro tipo de dendrímeros PAMAM de generación completa son los funcionalizados con grupos hidroxilo en la periferia (PAMAM-OHT).

Los dendrímeros PAMAM son solubles en muchos solventes orgánicos como cloroformo, metanol y dimetilformamida, como así también en agua. Sus propiedades fisicoquímicas y características estructurales los convierte en macromoléculas óptimas para ser usadas como vehículos para transportar compuestos activos poco solubles en medio acuoso.

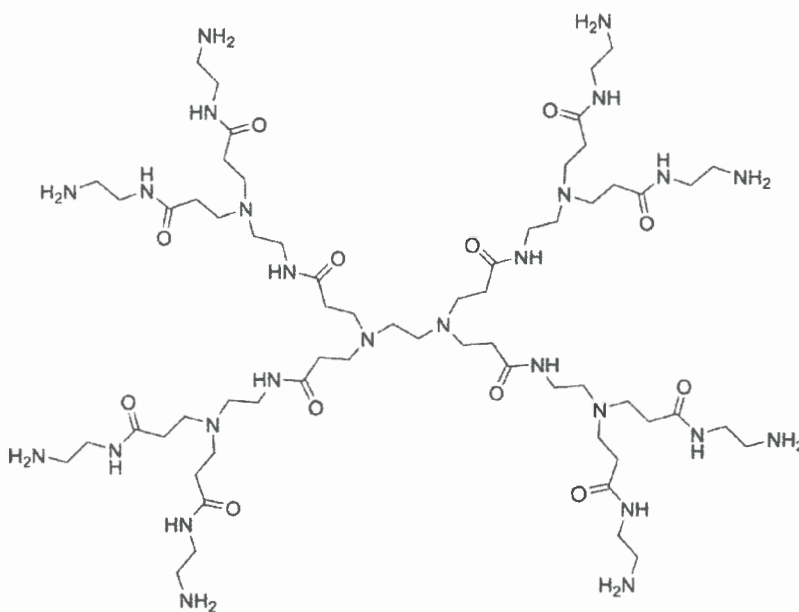
En esta tesis se describe el estudio de los siguientes dendrímeros PAMAM como nanovehículos de compuestos bioactivos:

- a. Dendrímero de poliamidoamina de generación 1 amino terminal (*PAMAM-AT G = 1*).
- b. Dendrímero de poliamidoamina de generación 3 amino terminal (*PAMAM-AT G = 3*).

- c. Dendrímero de poliamidoamina de generación 3 hidroxilo terminal (*PAMAM-OHT G = 3*).
- d. Dendrímero de poliamidoamina de generación 2.5 carboxilato terminal (*PAMAM-CT G = 2.5*).
- e. Dendrímero de poliamidoamina de generación 4.5 carboxilato terminal (*PAMAM-CT G = 4.5*).

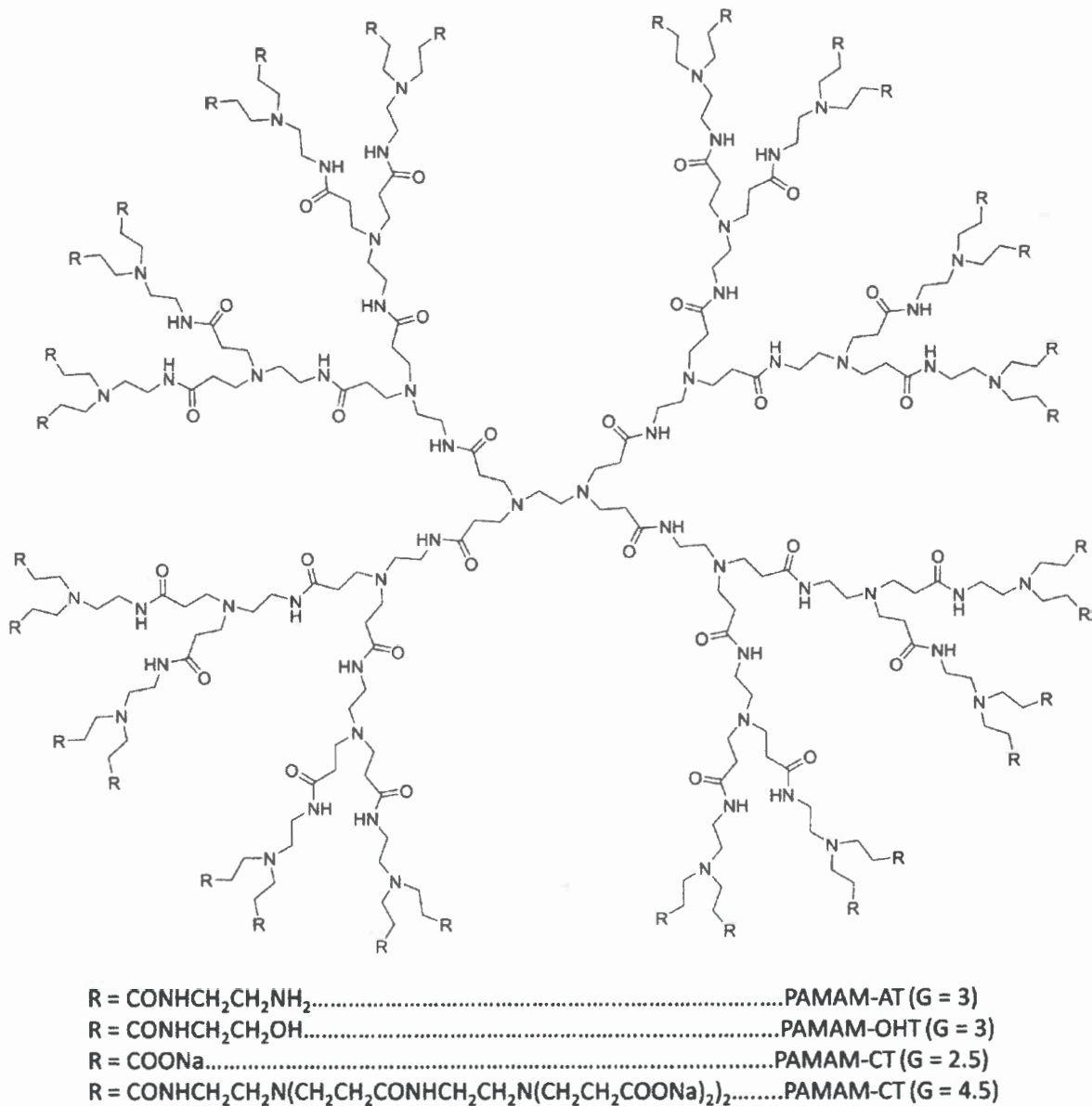
La estructura de los dendrímicos PAMAM estudiados se muestran en las Figuras 13 y 14.

Los dendrímicos PAMAM fueron adquiridos de Sigma-Aldrich en soluciones metanólicas y se mantuvieron a 4 °C, en un desecador y al vacío.



**Figura 13.** Estructura química del dendrímico PAMAM-AT ( $G = 1$ ).





**Figura 14.** Estructuras químicas de los dendrímeros PAMAM-AT (G = 3), PAMAM-OHT (G = 3), y PAMAM-CT (G = 2.5 y G = 4.5).

### **3.1.2 Dendrímeros de poli(propilenimina) (PPI)**

Los dendrímeros poli(propilenimina) (PPI), también conocidos como dendrímeros DAB, están formados por un corazón que es un grupo 1,4-diaminobutano (DAB) al cual se le unen unidades de propilenimina; los grupos terminales son grupos amina primaria. Son comerciales las generaciones 1 a 5, las cuales presentan 4, 8, 16, 32 y 64 grupos amino terminales respectivamente.

Al igual que los dendrímeros PAMAM, las características de los dendrímeros PPI los convierte en macromoléculas óptimas para ser usadas como vehículos para transportar

compuestos con actividad terapéutica poco solubles en agua. Debido a las propiedades de los monómeros que lo constituyen, el interior de los dendrímeros PPI es menos polar que el de los PAMAM. Además de las interacciones de Van der Waals, más fuertes que con los dendrímeros PAMAM, pueden participar en interacciones dipolares y formar enlaces puente hidrógeno actuando como aceptores debido a la presencia de las aminas terciarias en el interior de la estructura dendrímica. En el presente trabajo de tesis se utilizó el dendrímero *PPI* ( $G = 4$ ) (Figura 15), el cual se evaluó como vehículo de un compuesto con actividad antitumoral. Este dendrímero se obtuvo puro de Sigma-Aldrich y fue usado sin purificación adicional.

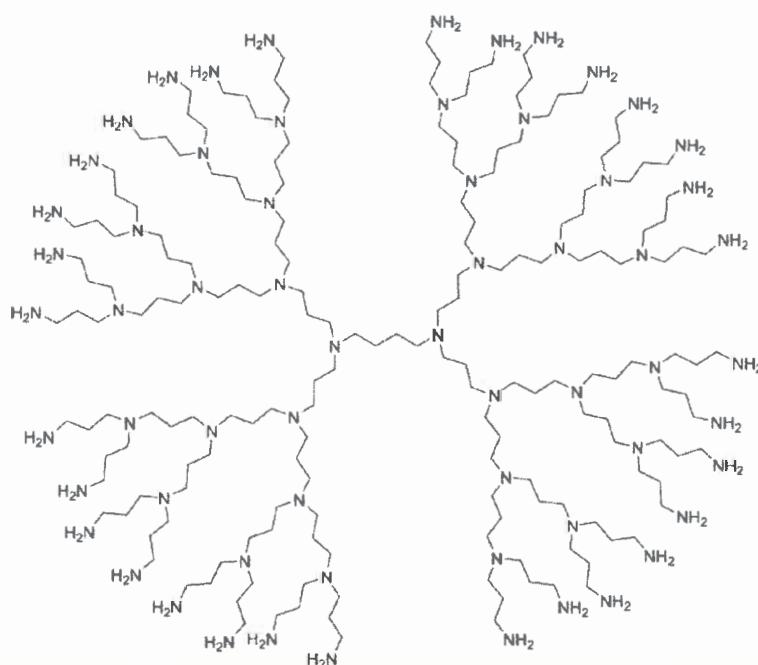


Figura 15. Dendrímoro PPI ( $G = 4$ )

### 3.1.3 Dendrímoro D

El *dendrímoro D* (Figura 16) es un polímero dendrímérico no comercial, sintetizado, purificado y caracterizado de acuerdo a la metodología descrita por Fernandez y col.<sup>99</sup> El corazón central de este dendrímero está formado por un grupo amina terciaria. Cada sustituyente del grupo amino es una ramificación del dendrímero. De este modo el polímero tiene tres grandes ramificaciones estructuralmente idénticas, que presentan un grupo amida y cadenas carbonadas, con ácidos carboxílicos como grupos terminales. Estos constituyen los grupos superficiales del dendrímero, responsables de su elevada solubilidad acuosa.

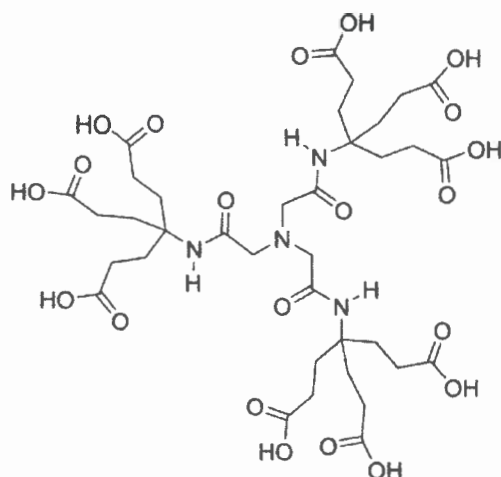


Figura 16. Estructura química del dendrimer D.

El dendrimer purificado fue almacenado en un desecador a 4°C y en oscuridad.

### 3.1.4 Dendrones del tipo Newkome

Los *dendrones del tipo Newkome* (Figura 17) son compuestos no comerciales cuya síntesis, purificación y caracterización ha sido descrita previamente en bibliografía.<sup>22,100,101</sup>

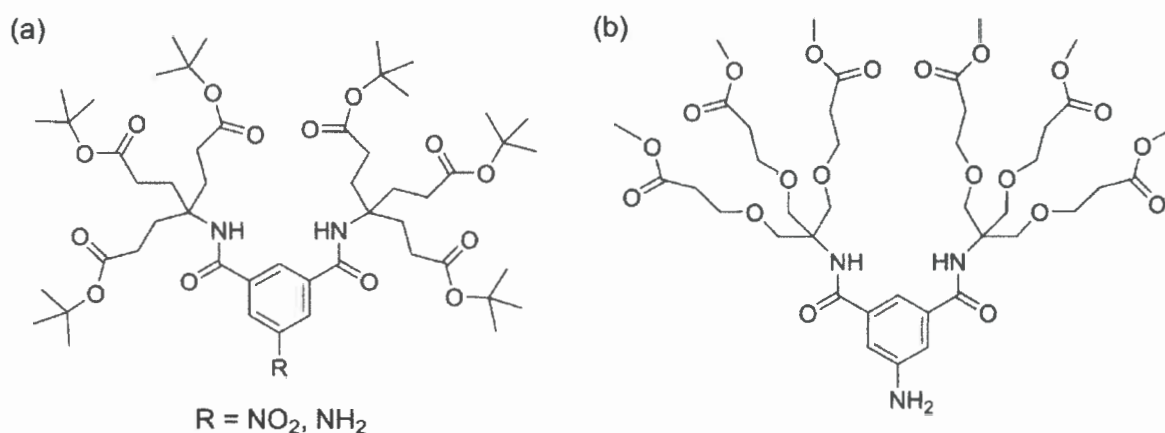


Figura 17. Estructura química de los dendrones del tipo Newkome.

(a) BBN (R=NO<sub>2</sub>), BBA (R=NH<sub>2</sub>), (b) BTA.

Estos sistemas presentan diversos grupos terminales, ramificaciones y punto focal. El dendrón **BBN** posee grupos terbutilo como unidades superficiales y un grupo nitrobenzilo como punto focal. Los dendrones **BBA** y **BTA** presentan un grupo anilina

como punto focal, pero, el primero tiene grupos terbutilo superficiales y el segundo posee grupos metilester como unidades superficiales.

Los dendrones fueron almacenados en un desecador a 4 °C y en oscuridad.

### **3.2 Compuestos con actividad terapéutica**

#### **3.2.1 N-óxido de (E)-2-feniletetil 1,2,4-triazina (Triazina)**

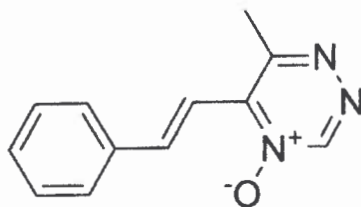
Los derivados de triazinas son muy estudiados en química medicinal debido a su alto potencial para el desarrollo de compuestos con actividad biológica.<sup>102</sup> En particular, los derivados de 1,2,4-triazinas presentan aplicaciones en muchos campos; han sido evaluados como colorantes, herbicidas, pesticidas y como fármacos.<sup>103</sup> Por ejemplo, se observó que derivados pirrólicos de 1,2,4-triazina poseen una pronunciada actividad inhibitoria del crecimiento frente a líneas celulares de leucemia.<sup>104</sup> También diversos derivados de 1,4-dióxidos de 1,2,4-triazina y 1,2,4-benzotriazina presentaron significativa citotoxicidad selectiva en condiciones de hipoxia, *in vitro*.<sup>105,106</sup> Por ejemplo, 3-amino-1,2,4-benzotriazina 1,4-di-óxido, también conocido como Tirapazamina, muestra una alta toxicidad selectiva hacia las células en condiciones hipóxicas, tanto *in vitro* como en tumores *in vivo*, y se encuentra actualmente en fase II y III de los ensayos clínicos como agente antitumoral.

Muchos potenciales fármacos anticancerígenos o antivirales han sido modelados con éxito a partir de derivados de 1,2,4-triazinas, sin embargo, estos agentes terapéuticos suelen ser poco solubles en agua y/o inestables. Además, al igual que la mayoría de los fármacos quimioterapéuticos, a menudo también matan a las células sanas causando efectos secundarios. Por consiguiente, es necesario desarrollar formulaciones que puedan proteger al agente activo y dirigirlo pasivamente a las células cancerosas utilizando nanovehículos.

En esta tesis se estudió el compuesto N-óxido de (E)-2-feniletetil 1,2,4-triazina (*Triazina*, Figura 18). Este derivado de 1,2,4-triazina, sintetizado con el fin de obtener un agente citotóxico selectivo en condiciones de hipoxia presenta actividad antitumoral *in vitro*, pero muestra baja selectividad contra células V79 en condiciones de hipoxia comparado con el compuesto de referencia Tirapazamina, probablemente debido a su baja solubilidad en agua y su inestabilidad.<sup>107,108</sup> En base a esto, surge como una alternativa viable para mejorar la eficiencia selectiva del compuesto, su asociación a vehículos moleculares apropiados, para aumentar su solubilidad y proteger su llegada al sitio activo.



Por lo tanto, en esta tesis se evaluaron diferentes dendrímeros PAMAM como vehículos moleculares de Triazina en solución, con el objetivo de seleccionar el dendrímero más adecuado para actuar como vehículo de este compuesto terapéutico.



**Figura 18.** Estructura química de *N*-óxido de (*E*)-2-feniletetil 1,2,4-triazina (Triazina)

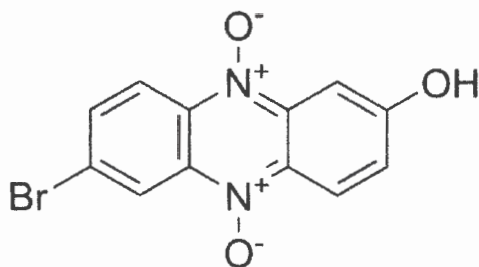
Triazina fue sintetizada por Cerecetto y col.<sup>107,108</sup> y fue almacenada en un desecador al vacío y a temperatura ambiente.

### 3.2.2 *N*<sup>5</sup>, *N*<sup>10</sup>-dióxido de 7-bromo-2-hidroxi fenazina (Fenazina)

Los tumores sólidos se caracterizan por la formación de una masa celular con insuficiente neovascularización, esto favorece el desarrollo de poblaciones celulares hipóxicas ubicadas en zonas distantes de los vasos sanguíneos. La investigación de este tipo de procesos permitió el desarrollo de un grupo especial de agentes citotóxicos selectivos en condiciones de hipoxia. Estos compuestos son profármacos bio reducibles, que resultan inactivos *per se* y que se reducen química o enzimáticamente *in vivo* generando un compuesto activo.<sup>109,110</sup>

Los estudios realizados hasta el presente muestran que algunos derivados de *N*, *N'*-dióxido de fenazina actúan como potenciales agentes citotóxicos selectivos en condiciones de hipoxia.<sup>111,112</sup> Estos compuestos combinan dos agrupamientos químicos bioactivos, por un lado, un sistema biorreducible, la función *N*-óxido, y por otro una estructura plana, el sistema fenazina, que potencialmente podría interactuar con el ADN. Además, se ha encontrado que presentan actividad antitripanosomal cuando se los ensaya (*in vitro*) frente a la especie *Trypanosoma cruzi*, microorganismo responsable de la enfermedad de Chagas. Entre estos derivados de *N*, *N'*-dióxido de fenazinas se encuentra el compuesto *N*<sup>5</sup>, *N*<sup>10</sup>-dióxido de 7-bromo-2-hidroxi fenazina (**Fenazina**), cuya estructura química se muestra en la Figura 19. Sin embargo, este compuesto presenta una solubilidad en agua insuficiente para su uso exitoso *in vivo*, disminuyendo su biodisponibilidad y efectividad. En esta tesis se estudió la asociación de este compuesto terapéutico a dendrímeros PAMAM y PPI, con

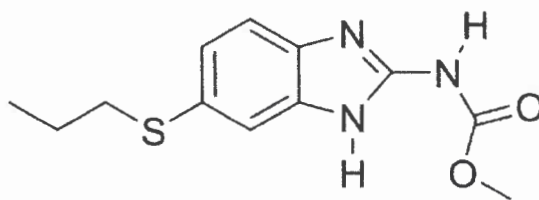
el objetivo de incrementar su solubilidad acuosa y facilitar el desarrollo de formulaciones clínicas que puedan ser utilizadas con éxito *in vivo*.



**Figura 19.** Estructura química de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de 7-bromo-2-hidroxi fenazina (Fenazina).

### 3.2.3 Metil (5-[propiltio]-1H-bencimidazol-2-il) carbamato (CBZ)

Los compuestos derivados de bencimidazol poseen muchas aplicaciones terapéuticas interesantes, incluyendo, capacidad antimicrobiana, actividad contra varios virus tales como el VIH, actividad antialérgica, antioxidante, antihistamínica, antituberculosa, antihelmíntica, anticoagulante y capacidad antiinflamatoria.<sup>113</sup> Investigaciones recientes<sup>114</sup> han demostrado que metil (5-[propiltio]-1H-bencimidazol-2-il) carbamato (**CBZ**, Figura 20), comúnmente utilizado como un agente antihelmíntico de amplio espectro<sup>115</sup>, también es un potencial agente antitumoral.<sup>116</sup> Este derivado de bencimidazol se caracteriza por un alto índice terapéutico, sin embargo, su baja solubilidad y problemas de adsorción limitan las aplicaciones clínicas de CBZ.<sup>117</sup>



**Figura 20.** Estructura química de Metil (5-[propiltio]-1H-bencimidazol-2-il) carbamato (CBZ).

Se ha reportado que la formación de complejos de CBZ con povidona, ciclodextrinas y cucurbit[*n*]urilo permite aumentar la solubilidad acuosa de la droga.<sup>118-120</sup> Además, en estudios previos, se investigó la asociación de CBZ a dendrímeros PAMAM, de diferentes generaciones y con diversos grupos terminales, encontrándose que estas

estructuras poliméricas tienen una buena capacidad para aumentar la solubilidad de CBZ.<sup>121</sup>

En esta tesis se presentan los resultados obtenidos del estudio de la asociación del carbamato CBZ al dendrímero D, con el propósito de aumentar su solubilidad en agua y optimizar su actividad terapéutica. Además, se investigó la formación de películas mixtas de Langmuir y Langmuir-Blodgett de CBZ con diferentes dendrones del tipo Newkome (Figura 17), con el objetivo de obtener películas con potencial aplicación en la administración controlada de agentes activos mediada por superficie.





## **4. MÉTODOS Y TÉCNICAS**

---

En esta sección se presentan los métodos y técnicas utilizadas en el marco de esta tesis para llevar a cabo el estudio de diferentes sistemas dendriméricos como nanovehículos de drogas.

### **4.1 Espectroscopía de Absorción Ultravioleta-visible**

La espectroscopía de absorción ultravioleta-visible (UV-vis) es una técnica instrumental de amplio uso en la que se estudia la absorción de la radiación comprendida en la zona UV-vis del espectro electromagnético por la materia. La absorción selectiva de radiación produce un espectro de absorción que proporciona información para la determinación de la composición química y la estructura y propiedades de la materia. A su vez, la espectroscopía de absorción UV-vis se puede aplicar en la cuantificación de especies en solución.<sup>122</sup>

En esta tesis se utilizó la técnica de espectroscopía de absorción UV-vis para el estudio de sistemas droga-dendrímero, como así también para cuantificar especies en solución, como por ejemplo, droga o hemoglobina. Los espectros de absorción se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro Shimadzu U.V. 2401PC y celdas de 0.1 o 1 cm de paso óptico.

### **4.2 Método de comparación solvatocrómica de Kamlet y Taft**

La posición e intensidad de las bandas de absorción de los espectros UV-visible de la mayoría de los compuestos sufren importantes cambios con la modificación del solvente o con la concentración. El efecto del solvente en el espectro electrónico de una molécula es denominado “solvatocromismo”. Los corrimientos solvatocrómicos permiten detectar, separar y cuantificar las interacciones en las que puede participar el compuesto estudiado.

Con el objetivo de cuantificar la dependencia del espectro de absorción UV-visible con el solvente muchos autores han desarrollado modelos a partir de los cuales surgen parámetros teóricos del solvente que son combinaciones de la constante dieléctrica, del índice de refracción y del momento dipolar. Sin embargo el uso de estas propiedades macroscópicas introduce aproximaciones inadecuadas ya que las mismas consideran al

solvente como un continuo no estructurado e ignoran la interacción solvente-solvente. Tampoco se tienen en cuenta las interacciones específicas soluto-solvente que por lo general son las dominantes.<sup>123</sup>

Por lo tanto, la falta de expresiones teóricas y la inadecuada definición de la polaridad de solvente en función de constantes físicas simples, ha derivado en el uso de *escalas empíricas de polaridad de solvente*. Éstas están basadas en un proceso de referencia bien conocido y sensible al efecto de solvente. El empleo de parámetros empíricos constituye una medida más completa de la polaridad de un solvente que cualquier otra constante física.<sup>123</sup> Sin embargo, la limitación de los parámetros empíricos radica en que hay muchos procesos sensibles al solvente que no dependen de una única propiedad de éste sino de varias a la vez. La capacidad de solvatación de un determinado solvente es el resultado de diferentes tipos de interacciones soluto-solvente presentes en un dado sistema. Con el empleo de ecuaciones multiparamétricas es posible tener en cuenta dos o más aspectos de la solvatación. Las mismas tienen la forma general dada por la ecuación (1).<sup>124</sup>

$$A = A_0 + bB + cC + dD + \dots \quad (1)$$

donde  $A$  es la propiedad fisicoquímica en estudio dependiente del solvente, como puede ser una constante de equilibrio, una constante cinética, una frecuencia del máximo de una banda de absorción o emisión, la solubilidad de un dado soluto etc.  $A_0$  es la propiedad estadística correspondiente en fase gaseosa o en un dado solvente de referencia.  $B$ ,  $C$  y  $D$  representan distintos parámetros de solvente, tienen en cuenta las diferentes interacciones soluto-solvente y  $b$ ,  $c$  y  $d$  son los respectivos coeficientes que miden la sensibilidad de  $A$  a las respectivas interacciones.

La separación de los distintos mecanismos de interacción soluto-solvente es puramente formal y puede que no tenga validez teórica, debido a que dichas interacciones podrían estar acopladas actuando en forma dependiente. De todas maneras, si la separación de los distintos mecanismos que intervienen se hace convenientemente, es posible que los parámetros obtenidos con estas correlaciones múltiples puedan utilizarse para interpretar el efecto de solvente, con información del tipo y de la magnitud de las interacciones.<sup>123</sup>

Una interesante y muy utilizada aproximación consiste en el "*método de comparación solvatocrómica de Kamlet y Taft*".<sup>125-129</sup> Estos autores consideran por separado a las interacciones no específicas y específicas, utilizando los parámetros

solvatocrómicos de solvente  $\pi^*$ ,  $\alpha$  y  $\beta$ . La escala  $\pi^*$  mide la *polaridad-polarizabilidad del solvente* y es denominada de esta manera debido a que fue derivada de los efectos de solvente sobre transiciones electrónicas  $\pi \rightarrow \pi^*$  de una variedad de compuestos nitroaromáticos.<sup>125-128</sup> El término  $\pi^*$  correlaciona la propiedad en estudio con la polaridad-polarizabilidad del solvente, siendo una medida de la habilidad del medio para estabilizar dipolos en virtud de sus efectos dieléctricos.<sup>127,130-133</sup> La escala  $\beta$  mide la *capacidad del solvente para aceptar puente de hidrógeno* y fue desarrollada tomando como soluto indicador la 4-nitroanilina que actúa como dador de hidrógeno a través del grupo  $\text{NH}_2$ .<sup>125</sup> La escala  $\alpha$  mide la *capacidad del solvente para dar hidrógeno* en la formación de un puente soluto-solvente y se desarrolló mediante el mismo procedimiento de comparación solvatocrómica que el utilizado para la escala  $\beta$ , tomando como solutos indicadores el 4-nitroanisol y la betaína  $\text{E}_T(30)$ .<sup>125</sup> Se eligió al metanol, un solvente fuertemente dador de hidrógeno, como punto de referencia fijo ( $\alpha = 1$ ) y se midieron, a partir de él todos los demás solventes.

La ecuación multiparamétrica que describe la propiedad medida en función de los parámetros empíricos de Kamlet y Taft es:

$$A = A_0 + s(\pi^* + d\delta) + a\alpha + b\beta + e\xi \quad (2)$$

donde  $A$  es la propiedad medida y  $A_0$  es el correspondiente valor en el estado de referencia. Por ejemplo, para medidas solvatocrómicas  $A$  es la frecuencia correspondiente al máximo de una banda de absorción en un dado solvente;  $A_0$  es el correspondiente valor en un solvente de referencia tal como el ciclohexano. Los parámetros  $\pi^*$ ,  $\alpha$  y  $\beta$  tienen el significado previamente descrito. El parámetro  $\delta$  es un término de corrección de la polaridad-polarizabilidad.  $\delta$  es igual a 0.0 para solventes alifáticos no cloro-sustituidos, 0.5 para solventes alifáticos poli-cloro-sustituidos y 1.0 para solventes aromáticos.  $\xi$ <sup>134</sup> es un parámetro adicional al  $\beta$  y se usa en correlaciones realizadas para ciertos tipos de familias de solventes. Dicho parámetro es interpretado como una medida de la valencia coordinada de la unión entre el soluto y el solvente. Por lo general se lo utiliza en el caso de que se empleen grupos de solventes con capacidades muy diferentes para aceptar puente hidrógeno. Los factores  $s$ ,  $a$  y  $b$  son los coeficientes de sensibilidad de la banda en estudio a los correspondientes parámetros de solvente. Como las escalas de  $\pi^*$ ,  $\alpha$  y  $\beta$  están

normalizadas, los cocientes entre los distintos coeficientes:  $a/s$ ,  $b/s$  y  $a/b$  dan una medida cuantitativa de la contribución relativa del parámetro escogido.

### **4.3 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN)**

La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) estudia el comportamiento de núcleos atómicos que poseen un spin nuclear distinto de cero (como  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  y  $^{31}\text{P}$ ) en presencia de un campo magnético externo. El campo magnético aplicado produce un desdoblamiento de los niveles degenerados de energía del spin nuclear, de modo que se pueden inducir transiciones entre ellos como consecuencia de la absorción de radiación electromagnética en la región de las radiofrecuencias (4 a 900 MHz).<sup>122</sup> La disposición de los niveles de energía es una propiedad tanto de los núcleos de una molécula como de su entorno electrónico, y de las interacciones entre ambos. Así, la intensidad, forma y posición de las señales en el espectro RMN de un núcleo determinado están íntimamente relacionadas con su estructura molecular. De esta manera, el análisis del espectro RMN de un compuesto proporciona información acerca de su estructura y el entorno químico en el que se encuentra.<sup>135</sup> Cuando el núcleo que se analiza es  $^1\text{H}$ , la técnica recibe el nombre de Resonancia Magnética Nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN).

Las técnicas RMN son una herramienta muy útil para caracterizar complejos huésped-dendrímico ya que brindan información sobre las interacciones intermoleculares presentes en el sistema.<sup>136</sup> Por lo tanto, en esta tesis se utilizó la técnica  $^1\text{H}$ -RMN para analizar algunos de los complejos droga-dendrímico estudiados. Las mediciones se realizaron en un espectrómetro NMR Bruker 400 MHz Advance II, con sonda BBI (Broad Band Inverse).

### **4.4 Dispersión Dinámica de la Luz (DLS)**

La dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés Dynamic Light Scattering) es una técnica muy eficaz para investigar la dinámica de soluciones y medir tamaños de partícula. Esta técnica permite obtener información de tamaño en pocos minutos para partículas con diámetros que van de algunos nanómetros hasta casi  $5\ \mu\text{m}$ .<sup>122</sup> En un experimento de DLS, la muestra se encuentra dispersa en un medio de suspensión y se irradia con un haz láser de una determinada longitud de onda. El movimiento browniano de las partículas en suspensión origina fluctuaciones temporales en la intensidad de la luz dispersada. Esas fluctuaciones temporales contienen información acerca del diámetro de

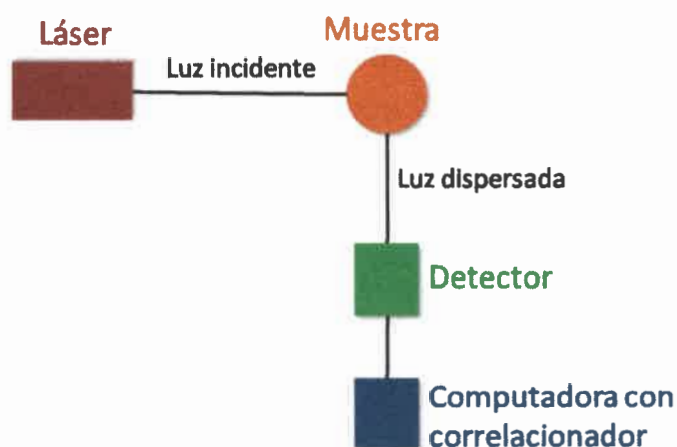


las partículas, de modo que, al conocer la intensidad de luz dispersada en función del tiempo se puede estimar el diámetro de las partículas.<sup>122</sup> La función que describe las fluctuaciones de la intensidad dispersada es una función de autocorrelación que es la transformada de Fourier del espectro de energía de la luz dispersada. A partir de esta función se calcula el coeficiente de difusión (D) de las partículas. Finalmente el diámetro hidrodinámico,  $d_h$ , de las partículas en solución puede ser determinado utilizando el valor de D, a partir de la ecuación de Stokes-Einstein, suponiendo partículas esféricas<sup>122</sup>:

$$d_h = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (3)$$

donde k es la constante de Boltzmann, T la temperatura,  $\eta$  la viscosidad del solvente y D el coeficiente de difusión de las partículas

En la Figura 21 se muestra un esquema de un equipo de DLS. Generalmente la lectura se realiza a  $90^\circ$ . La muestra se coloca en una celda de fluorescencia que se introduce en un líquido cuyo índice de refracción es conocido, como agua o decalina. Este líquido reduce la diferencia entre los índices de refracción entre el medio externo y las paredes de la celda. Como detectores se utilizan celdas fotomultiplicadoras de diodos fotosensitivos. Los correlacionadores son unidades de hardware que implementan una función de autocorrelación.



**Figura 21.** Esquema de un equipo de dispersión dinámica de luz (DLS)



#### **4.5 Química computacional**

El desarrollo de la química computacional y la gran popularidad que alcanzó esta nueva metodología de estudio está frecuentemente vinculado con el incremento de la capacidad de procesar datos de las computadoras en las últimas décadas. Al igual que otras ramas de la química, la química computacional es una herramienta que puede ser utilizada en combinación con otras técnicas para alcanzar una mayor comprensión de procesos y reacciones químicas.

El desarrollo de paquetes de software de fácil utilización ha permitido la caracterización y predicción de estructuras, el análisis de la estabilidad de sistemas químicos, calcular las diferencias de energías entre distintos estados, como así también explicar caminos de reacción y proponer mecanismos a escala atómica.

##### **4.5.1 Métodos de cálculos**

El principio básico de un simulador molecular es la búsqueda de mínimos en una superficie de energía potencial. Para construir una superficie de energía potencial es necesario conocer los valores de energía y sus manifestaciones, tales como la fuerza que actúa sobre un átomo. Actualmente la mayoría de los paquetes de software utilizan dos métodos de cálculos para obtener estos valores de energía: uno basado en mecánica molecular y otro en mecánica cuántica. Los basados en mecánica cuántica pueden ser clasificados en métodos cuánticos semiempíricos y *ab initio*.

En mecánica cuántica se pueden obtener los valores de energía y las funciones de onda de una molécula a partir de la ecuación de Schrödinger. Como se mencionó anteriormente existen en general dos métodos de resolución de la ecuación de Schrödinger, los cálculos *ab initio* y semiempíricos. A continuación se darán algunas características de estos métodos omitiendo el complejo tratamiento matemático que las soportan. Para mayor detalle se puede consultar el libro "Química Cuántica" de Levin, I. N.<sup>137</sup>

El método mecánico cuántico *ab initio* fue el primero en ser desarrollado y ha sido perfeccionado durante muchas décadas. Este método utiliza la aproximación de Hartree-Fock para expresar el hamiltoniano electrónico y supone que el hamiltoniano electrónico puede ser descrito por la sumatoria de hamiltonianos efectivos mono electrónicos. El operador de Fock depende implícitamente de la solución, además, éste considera la energía cinética electrónica, la energía potencial causada por la presencia del núcleo y fundamentalmente considera el efecto medio generado por los n-1 electrones presentes en

la molécula. En resumen, estos cálculos utilizan parámetros asociados con los orbitales atómicos, como por ejemplo el tipo de orbital (s o sp), o números atómicos. La exactitud alcanzada en la resolución por medio de este método puede igualar a la obtenida en resultados experimentales. Sin embargo, para alcanzar esta alta exactitud se necesita un enorme poder de procesamiento de cálculos por medio de la computadora. El desarrollo reciente de poderosas computadoras ha permitido extender la aplicación de este método a moléculas que contienen varios átomos. Sin embargo, los cálculos de moléculas grandes insumen una gran cantidad de tiempo. Esta última razón restringe el uso de cálculos *ab-initio* a sistemas moleculares de tamaño pequeño.

El método mecánico cuántico semiempírico, al igual que el método *ab-initio*, utiliza una rigurosa formulación mecánica cuántica. Pero a diferencia de los cálculos *ab-initio* éstos se resuelven sólo con los electrones de valencia de la molécula en estudio. Por otra parte, los cálculos semiempíricos introducen aproximaciones en la ecuación de Hartree Fock. Estas aproximaciones consideran la matriz de solapamiento igual a cero, si los orbitales involucrados son diferentes, e iguales a uno si los orbitales son iguales. Además, las integrales bielectrónicas se desprecian o se parametrizan.<sup>138</sup>

Las aproximaciones realizadas en los métodos semiempíricos permiten extender los cálculos a moléculas mayores que los *ab-initio*.<sup>139</sup> Por otra parte, la inexactitud introducida por estas aproximaciones es corregida en cierta forma al utilizar datos experimentales para definir los parámetros y en algunos casos puede ser tan exacto como el método *ab-initio*, el cual emplea mucho mayor tiempo de cálculo.

De acuerdo a las distintas aproximaciones realizadas surgen los diversos métodos que revisten diferente utilidad.<sup>138</sup> Entre los métodos semiempíricos podemos citar al MNDO<sup>140,141</sup> (Modified Neglect of Diatomic Overlap) que retiene integrales biatómicas bicéntricas y las integrales bielectrónicas monocéntricas son obtenidas de parámetros empíricos. Este método produce buenos resultados en compuestos de fósforo, pero no reproduce correctamente las interacciones por puente de hidrógeno y no sirven para sistemas biológicos. Los métodos AM1<sup>142</sup> (Austin Model 1) y PM3<sup>143,144</sup> (Parametric Method Number 3) son básicamente similares a MNDO pero corrigen la excesiva repulsión a distancia de Van der Waals, que impedía el tratamiento de enlaces hidrógeno. Estos métodos surgen simultáneamente y son los más adecuados para predecir geometrías, ya que están parametrizados con datos geométricos. Comparando estos dos métodos podemos decir que AM1 predice muy bien las geometrías, barreras de rotación, calores de formación, potenciales de ionización y densidad de cargas, sin embargo, suele generar

dificultades en la predicción del carácter angular de enlaces puente hidrógeno. PM3 por otra parte, es un método que da buenos resultados con nitro compuestos, pero no se obtienen buenos resultados en los cálculos de potenciales de ionización y densidad de carga.

En cuanto al uso de estos métodos para la obtención de parámetros moleculares que luego serán utilizados en la interpretación de resultados experimentales se debe tener un gran cuidado a la hora de elegir un método de cálculo. La primera elección es la utilización de un método basado en la mecánica molecular o en la mecánica cuántica. En muchos casos, en especial para moléculas de gran tamaño, es correcto realizar una primera optimización de geometría utilizando un método basado en la mecánica clásica y luego pasar a optimizaciones mecánico-cuánticas, así se ahorra tiempo de cómputo. Dentro de los métodos cuánticos se debe elegir entre las dos opciones presentadas anteriormente, los métodos *ab-initio* y semiempíricos. Esta elección está gobernada fundamentalmente por el tamaño de la molécula y por el tipo de estudio que se desea realizar. Si se elige la realización de cálculos semiempíricos debe tenerse especial cuidado en la selección del método. En primer lugar se deben conocer las virtudes y desventajas de cada método. De esta forma se puede elegir el método que mejor se desempeñe en el análisis de un problema particular. Además, la comparación de resultados calculados nunca debe hacerse con datos obtenidos con dos métodos diferentes.

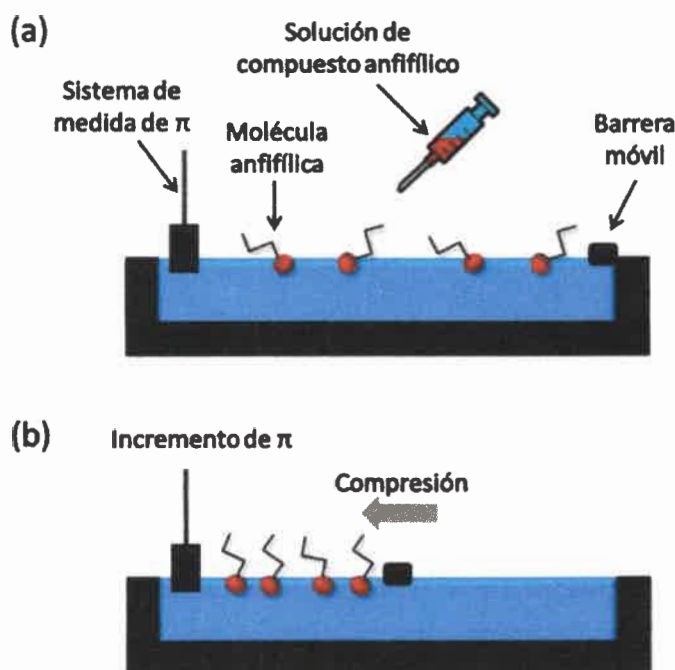
#### **4.6 Técnicas de Langmuir y Langmuir-Blodgett**

##### **4.6.1 Monocapas de Langmuir en la interfase aire-agua**

Una monocapa de Langmuir es una película delgada, de espesor molecular, que se forma en la interfase aire-agua y es insoluble en la fase acuosa. Las moléculas que forman estas monocapas se caracterizan por tener una parte apolar hidrofóbica, la cual generalmente está formada por cadenas hidrocarbonadas, y otra región polar hidrofílica, formada por grupos funcionales tipo ácido carboxílico, amina, sulfato, alcohol, entre otros.<sup>145</sup> Las moléculas que poseen estas características, es decir, una parte hidrofóbica y una parte hidrofílica, se conocen como moléculas anfifílicas.

Para preparar monocapas de Langmuir en la interfase aire-agua, se colocan, sobre la superficie acuosa, gotas de una solución diluida de un compuesto anfifílico, disuelto en un solvente volátil e inmiscible con el agua como cloroformo (Figura 22 (a)). En este proceso, la elección del solvente en el cual se va a preparar la solución del anfifilo es importante ya

que debe favorecer la máxima dispersión de las moléculas sobre el agua.<sup>146</sup> Las moléculas anfifílicas rápidamente se extienden sobre la interfase para cubrir toda el área disponible. Después de la evaporación del solvente, la disposición de las moléculas es aquella en la que su situación energética resulta más favorable, con los grupos polares en contacto o inmersos en la subfase acuosa y la parte hidrofóbica fuera de la misma. En esta situación inicial la distancia entre las moléculas es muy grande, ya que se encuentran dispersas cubriendo toda el área disponible, y las interacciones entre ellas son pequeñas. Bajo estas condiciones la monocapa tiene un efecto mínimo sobre la tensión superficial del agua. Al reducir el área de la superficie disponible de la monocapa con una barrera móvil, las moléculas comienzan a estar cada vez más cerca unas de otras, aumentando la densidad de moléculas en la interfase aire-agua. Como consecuencia de esto, la tensión superficial de la zona cubierta por la monocapa disminuye respecto a la tensión superficial de la superficie del agua limpia, y la *presión superficial* ( $\pi$ ) se incrementa (Figura 22 (b)).



**Figura 22.** Formación de una monocapa de Langmuir en la interfase aire-agua.

La presión superficial, es el análogo bidimensional de la presión y se define como:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (4)$$



donde  $\gamma_0$  es la tensión superficial del agua pura y  $\gamma$  es el valor de la tensión superficial en presencia de la monocapa a un área determinada. En general, existen dos tipos principales de sistemas para medir la presión superficial: el Wilhelmy y el Langmuir.

Los líquidos polares como el agua tienen interacciones intermoleculares fuertes y, por lo tanto, tensiones superficiales altas. La tensión superficial del agua es 72.8 mN/m a 25°C y presión atmosférica. Éste es un valor de tensión superficial excepcionalmente alto, comparado con la mayoría de los otros líquidos, por lo que el agua es el compuesto usado como subfase por excelencia para estudios de monocapas de Langmuir.

Es importante mencionar que las moléculas anfílicas con las cuales se desea formar una monocapa de Langmuir deben tener un buen balance hidrofílico-hidrofóbico.<sup>93,147</sup> La parte hidrofílica del anfifilo confiere solubilidad en agua, mientras que la parte hidrofóbica evita la solubilización en agua. La habilidad de un anfifilo para formar una monocapa en la interfase aire-agua depende del balance entre estas dos fuerzas opuestas, las cuales están determinadas por el tamaño de la parte hidrofóbica de la molécula y la fuerza del grupo hidrofílico (tamaño, polaridad, carga, capacidad de hidratación). Si la parte hidrofóbica es muy pequeña, o el grupo polar muy fuerte, las moléculas se disolverán en la fase acuosa, y no podrá formar una monocapa estable. Por otro lado, si la parte hidrofóbica es demasiado grande, las moléculas cristalizarán sobre la superficie acuosa y no formarán una monocapa en la interfase.

#### **4.6.2 Isotermas presión superficial ( $\pi$ ) - área por molécula (A)**

Una isoterma presión superficial ( $\pi$ ) - área (A) es un gráfico del cambio de presión superficial en función del área disponible para cada molécula en la superficie de la subfase acuosa.<sup>145</sup> Esta isoterma es el indicador más común de la formación de la monocapa y de las propiedades de la misma. La isoterma se mide a temperatura constante, por lo general bajo una condición de pseudo-equilibrio, comprimiendo de forma constante la monocapa, mientras se monitorea la presión superficial.

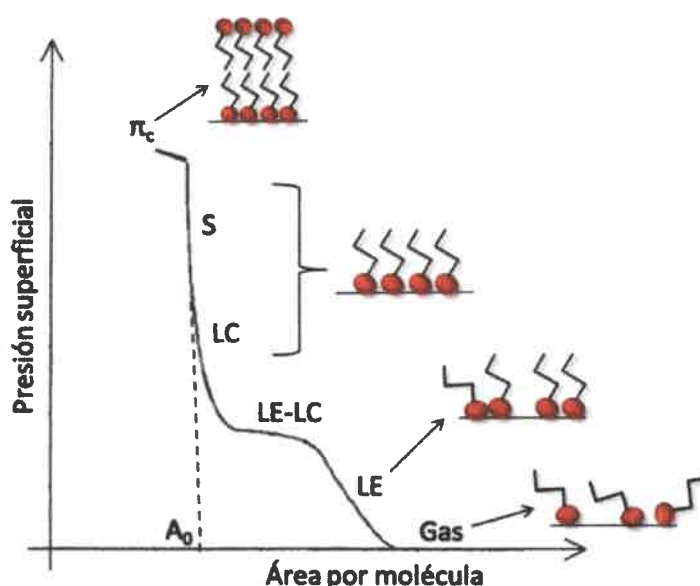
Como se comentó anteriormente, luego de añadir una cantidad determinada de la solución del anfifilo sobre la superficie acuosa, se espera un tiempo para que se evapore el solvente y se comienza a comprimir la monocapa. Al comprimir, el área superficial disponible se reduce, se incrementa la densidad superficial de las moléculas, disminuye la tensión superficial del agua y aumenta la presión superficial ( $\pi$ ) (de acuerdo a la ecuación (4)). De esta manera, al graficar la  $\pi$  frente al A, se obtienen gráficas del tipo mostrado en



la Figura 23, donde la presión superficial aumenta cuando el área disminuye. Las isoterma  $\pi$ -A son la analogía bidimensional de una isoterma presión-volumen.

La isoterma es un método fundamental para obtener información sobre el estado termodinámico que presenta una monocapa a una temperatura y presión superficial dada. En ella se pueden identificar transiciones de fase que indican cambios termodinámicos que ocurren en la monocapa y, además, se puede obtener información sobre el área aproximada que ocupan las moléculas.<sup>148</sup>

Las isoterma  $\pi$ -A muestran distintas regiones, denominadas fases, que son características de los diferentes estados de agregación que las moléculas adoptan en la monocapa durante la compresión. Estas fases, que corresponden a diversas organizaciones moleculares, son el resultado de las fuerzas de interacción entre las moléculas de la monocapa (fuerzas de Van der Waals e interacciones coulómbicas atractivas y repulsivas) y entre la película y la subfase.<sup>149</sup>



**Figura 23.** Isoterma  $\pi$ -A de una monocapa en la interfase aire-agua mostrando las fases que se encuentran comúnmente.

La Figura 23 muestra una isoterma generalizada para una sustancia anfifílica simple. A áreas grandes la monocapa se encuentra en la fase denominada **gas bidimensional (Gas)**; las moléculas se encuentran muy separadas unas de otras en el seno de la monocapa y las interacciones entre ellas son débiles. Las moléculas se encuentran con la parte polar en la subfase y la región hidrofóbica cerca de la interfase aire-agua. Al comprimir la monocapa en fase gaseosa, la parte hidrofóbica de la molécula comienza a

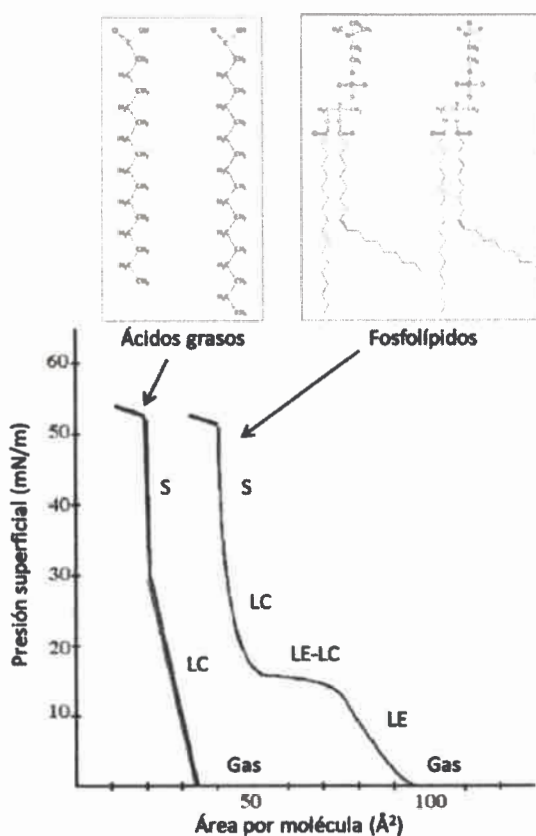
alejarse de la interfase y las moléculas comienzan a experimentar fuerzas atractivas entre ellas, alcanzándose la fase *líquido expandido (LE)*. Entre la fase Gas y LE ocurre una transición de fase, en la cual coexisten ambos estados. En general, esta transición está acompañada por una región de meseta constante, pero, debido a que las interacciones que operan entre las moléculas anfífilas en esta situación todavía son muy débiles, esta porción de la isoterma generalmente no puede ser resuelta. Aumentos posteriores de presión dan lugar a un estado más ordenado conocido como *líquido condensado (LC)*. En esta fase la organización de la monocapa es más compacta y la parte hidrofóbica de la molécula se orienta perpendicularmente a la interfase. De nuevo, ocurre una transición de fase entre LE y LC, que se observa como una meseta en la isoterma. Si se continúa comprimiendo la monocapa, se alcanza la *fase sólida bidimensional (S)*, en la cual las moléculas forman una película compacta, orientadas de manera uniforme, con la parte hidrofóbica bien perpendicular a la interfase.

Finalmente, si se continúa comprimiendo la monocapa, luego de la fase sólida ocurre el fenómeno de colapso. Cuando la presión superficial es demasiado alta, la monocapa se vuelve inestable y pierde su forma monomolecular. Algunas moléculas son expulsadas fuera del plano de la monocapa hacia la subfase o por encima de la monocapa formando multicapas. En base a esto, se puede definir la *presión de colapso ( $\pi_c$ )* como el valor máximo de presión superficial al cual la monocapa puede ser comprimida sin una expulsión detectable de moléculas desde la monocapa de Langmuir.<sup>145</sup> Este es un parámetro importante que puede obtenerse a partir de la isoterma  $\pi$ -A y está relacionado con la estabilidad de la monocapa. En general, a mayor presión de colapso más estable es la monocapa. Otro parámetro muy importante es el *área límite ( $A_0$ )*, obtenido por extrapolación del tramo de mayor pendiente de la isoterma a presión superficial cero, el cual corresponde al área ocupada por una molécula en una situación de máximo empaquetamiento (Figura 23).

Por lo tanto, de las isotermas  $\pi$ -A se puede obtener información acerca de la organización de las moléculas en la monocapa, las interacciones entre ellas, la estabilidad de la monocapa en la interfase aire-agua, la existencia de transiciones de fase, transformaciones conformacionales y el área aproximada que ocupan las moléculas.<sup>148</sup>

Es importante aclarar que el número y la complejidad de las regiones de una isoterma dependerán de las características del sistema estudiado y de las condiciones experimentales (temperatura, composición de la subfase, pH, etc).<sup>150</sup> Como se muestra en la Figura 24, en el caso de ácidos grasos con cadenas hidrocarbonadas largas, en general no

existe la fase LE, y ocurre una transición directa desde la fase Gas a la fase condensada. En este caso las fuerzas de van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas son las responsables de las transiciones de fase. Por otro lado, en las monocapas de fosfolípidos o glicolípidos, cuyas moléculas contienen dos cadenas hidrocarbonadas, el tamaño de la cabeza polar influye en el empaquetamiento de las cadenas, y en consecuencia, en el estado de agregación molecular de la monocapa condensada, observándose las fases Gas, LE, LC, S y la transición LE-LC. En general, debido a su polaridad, tamaño, forma, interacción con el agua y/o con grupos polares de moléculas vecinas, muchos grupos polares influyen fuertemente en la disposición de la parte hidrofóbica del anfífilo en la monocapa y por lo tanto en las características de la isoterma.<sup>149</sup>



**Figura 24.** Isotermas  $\pi$ -A esquemáticas de ácidos grasos de cadena larga y de fosfolípidos.

Adaptada de bibliografía (149).

La forma de una isoterma y las transiciones de fase que presenta dependen no sólo del sistema estudiado sino también de las condiciones experimentales. La temperatura de la subfase es un factor importante que debe controlarse ya que al variarse se observan diferentes transiciones de fase. Una disminución de la temperatura provoca un incremento

de las interacciones atractivas entre las moléculas que forman la monocapa, con lo cual la película resulta más ordenada, coherente y compacta. En la isoterma, esto provoca un corrimiento a menores áreas y una extensión de la fase LC.<sup>151</sup> Además, en general, al disminuir la temperatura se observa un incremento de la  $\pi_c$  en la isoterma.<sup>93</sup>

La velocidad a la cual se lleva a cabo la compresión es otro parámetro que modifica la forma de la isoterma. Mientras mayor sea la velocidad de compresión, el sistema se aleja más del equilibrio termodinámico, por eso es importante comprimir la monocapa a bajas velocidades.<sup>149</sup>

#### **4.6.3 Monocapas mixtas**

Como se ha mencionado anteriormente, uno de los requerimientos para formar monocapas de Langmuir de un determinado compuesto es que éste sea anfifílico. Debido a esto, la gama de moléculas que pueden formar monocapas estables es, en principio, limitada. Sin embargo, existen métodos, basados en la construcción de monocapas complejas, que permiten fabricar películas de Langmuir con componentes que por sí solos no pueden formar este tipo de películas. El primer método consiste en añadir moléculas solubles en la subfase acuosa, las cuales pueden adsorberse sobre la monocapa, y así ser retenidas en la interfase. El otro método, más efectivo, es el denominado *coesparcimiento*, en el cual se coloca sobre la superficie acuosa una mezcla de la molécula anfifílica y la molécula de interés que no forma monocapa por sí sola, en un solvente volátil e inmiscible con el agua.<sup>152-154</sup> De esta forma, la molécula de interés queda retenida en la interfase.

Con estos métodos, se amplía el rango de moléculas que pueden ser estudiadas mediante la técnica de Langmuir. Además, estas técnicas permiten estudiar los cambios introducidos en las monocapas de la molécula estudiada por interacción con otras moléculas.

#### **4.6.4 Estabilidad de monocapas de Langmuir**

La estabilidad de las monocapas de Langmuir en la interfase aire-agua es una propiedad muy importante que debe estudiarse si se desean transferir las monocapas sobre sustratos sólidos.<sup>82</sup> Cuando se generan películas de Langmuir-Blodgett, la estabilidad de la monocapa sobre la subfase acuosa es uno de los principales requisitos para obtener películas organizadas que presenten una alta calidad estructural sobre la superficie sólida.



El estudio de la estabilidad de una monocapa de Langmuir puede realizarse midiendo la disminución en la presión superficial cuando el área se mantiene constante, o registrando la disminución del área por molécula cuando la presión superficial es mantenida constante.<sup>82,93</sup> Otra forma de analizar la estabilidad de la monocapa es mediante experimentos de histéresis, en los cuales se realizan ciclos sucesivos de compresión y expansión. Es decir, la monocapa se comprime hasta una determinada presión superficial y luego se expande al estado original; esto se repite varias veces. Esto también permite analizar la reversibilidad de las monocapas. En el primer ciclo de compresión-expansión es normal observar cierta histéresis, incluso en monocapas estables. Esto se ha atribuido principalmente a una diferencia en los procesos de agregación (organización de las moléculas en la compresión) y relajación (desorganización de las moléculas en la descompresión), debido al no retorno de los dominios formados durante la compresión a su estado original luego de la descompresión.<sup>155,156</sup> Para monocapas poco estables, se observa un desplazamiento continuo de los ciclos de histéresis consecutivos hacia áreas menores, lo cual se debe a la pérdida de moléculas que forman la monocapa en la subfase (disolución de la monocapa) o a la formación de multicapas (colapso de la monocapa).<sup>157</sup>

La estabilidad de las monocapas depende principalmente de la disolución de la película en la subfase y de la estabilidad mecánica para resistir las sucesivas compresiones. Varios factores permiten aumentar la estabilidad de la monocapa antes de su transferencia. Estos factores incluyen la presencia de iones multivalentes en la fase acuosa, así como el pH de la subfase. También se ha observado que los tiempos de espera para la evaporación del solvente antes de la compresión y el tiempo de espera después de la compresión de la monocapa (tiempo de relajación) pueden influir en la estabilidad de la película.<sup>149</sup>

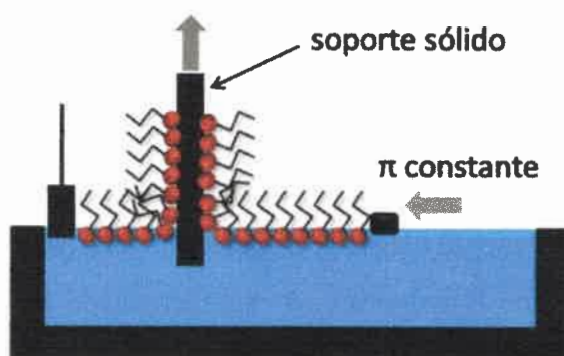
#### **4.6.5 Películas de Langmuir-Blodgett (LB)**

Cuando la presión superficial es lo suficientemente alta como para asegurar la cohesión lateral de las moléculas en la película de Langmuir, la monocapa puede ser transferida desde la superficie del agua a un sustrato sólido. Existen diferentes técnicas a través de las cuales puede transferirse la monocapa desde la interfase aire-agua, siendo una de las más difundidas la técnica de Langmuir-Blodgett (LB).<sup>158,159</sup>

La técnica de LB consiste en colocar un soporte sólido perpendicular a la interfase aire-agua cubierta por la monocapa que se va a transferir y, mediante inmersión y/o



emersión de dicho soporte, las moléculas se van depositando sobre el sustrato sólido (Figura 25). Durante el proceso de transferencia se hace avanzar la barrera móvil para compensar la pérdida de moléculas y mantener constante la presión superficial. La película formada se conoce como película de LB. Cuando todos los parámetros son optimizados, esta técnica es una de las más prometedoras para la preparación de películas delgadas de moléculas anfifílicas, ya que permite (i) un control preciso del espesor y de la organización molecular, (ii) un depósito homogéneo de la monocapa sobre áreas grandes (iii) la posibilidad de transferir monocapas en casi cualquier tipo de sustrato sólido y (iv) de elaborar estructuras de multicapa con composiciones de capa diferentes.<sup>149</sup>



**Figura 25.** Tránsito de monocapa en la interfase aire-agua a un soporte sólido mediante la técnica de Langmuir-Blodgett.

En la actualidad no se conocen todos los mecanismos por los que las monocapas en la interfase aire-agua se transfieren a los sustratos sólidos. Se sabe que las interacciones moleculares implicadas en la deposición de la primera capa pueden ser bastante diferentes de las responsables de la transferencia de las siguientes. Además, para algunos materiales, la deposición de la película parece estar asociada con un cambio de fase al cambiar de interfase. Sin embargo, no siempre pueden explicarse fenómenos como los diferentes modos de transferencia y la adecuada velocidad a la que los materiales pueden depositarse.<sup>149</sup>

La fabricación de películas LB de alta calidad requiere de un alto grado de experimentación, así como de un control cuidadoso de todas las variables experimentales, como son: estabilidad y homogeneidad de la monocapa, propiedades de la subfase (composición, fuerza iónica, pH y temperatura), naturaleza del sustrato (estructura y carácter hidrofóbico o hidrofílico), velocidad de inmersión y emersión del soporte, ángulo

de penetración del sustrato en la subfase, número de monocapas transferidas y presión de compresión durante el proceso de deposición.<sup>82</sup>

El valor óptimo de la presión superficial con el cual se obtienen los mejores resultados depende de la naturaleza de la monocapa y se debe determinar experimentalmente.<sup>149</sup> Sin embargo, por lo general, la transferencia se lleva a cabo en la fase condensada, donde la monocapa se encuentra en una situación de mayor empaquetamiento y la eficiencia de la transferencia suele ser mayor. En estas condiciones la presión superficial es lo suficientemente alta para asegurar una fuerte cohesión lateral en la monocapa, de manera que se mantenga íntegra durante el proceso de transferencia. Con el fin de obtener películas de LB homogéneas, la monocapa debe comprimirse lentamente para evitar el colapso local. Además, la presión superficial de transferencia debe corresponder al inicio de la fase condensada; de esta manera se logra una cohesión lateral de la monocapa suficiente para lograr una buena transferencia pero no demasiada alta como para provocar la aparición de defectos como la formación de multicapas o solubilización de moléculas en la subfase.

#### **4.6.6 Relación de transferencia**

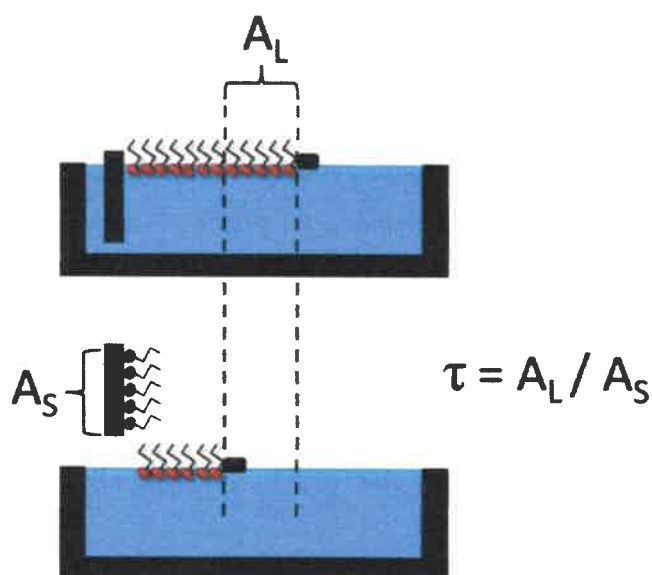
La transferencia de monocapas desde la interfase aire-agua a sustratos sólidos se puede cuantificar a través de la denominada relación de transferencia. Durante el proceso de deposición se hace avanzar la barrera móvil para compensar la pérdida de moléculas y mantener constante la presión superficial. Esto permite la determinación de la relación de transferencia, que se utiliza como un indicador de la calidad de la deposición.

La *relación de transferencia* ( $\tau$ ) se define como:

$$\tau = \frac{A_L}{A_S} \quad (5)$$

donde  $A_L$  es la disminución del área ocupada por la monocapa en la interfase aire-agua, a presión constante, y  $A_S$  es el área cubierta del sustrato sólido (Figura 26). Así, la transferencia es más eficiente cuando  $\tau$  es igual a uno. Hay que destacar que para la primera capa transferida,  $\tau$  a veces es mayor a uno, a causa de las heterogeneidades microscópicas de la superficie del sustrato. Sin embargo, un valor fuera del rango de 0.8 a 1.20 sugiere pobre homogeneidad de la película transferida.

Los defectos en la película transferida pueden ser muy perjudiciales para algunas aplicaciones tales como dispositivos electrónicos moleculares que tienen funciones específicas en el nivel molecular. Sin embargo, otras aplicaciones no se ven perjudicadas por la formación de películas de LB que no estén perfectamente estructuradas y homogéneas.



**Figura 26.** Relación de transferencia ( $\tau$ ) para la transferencia de monocapas desde la interfase aire-agua a un sustrato sólido.

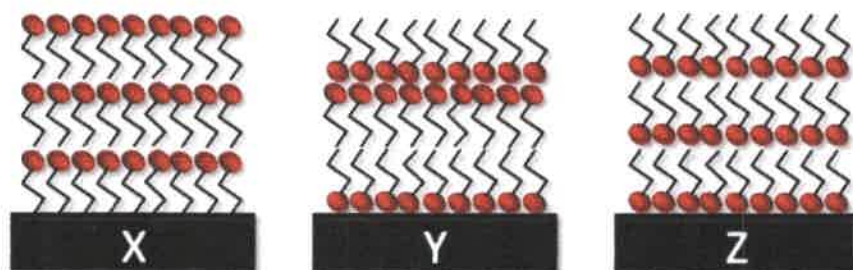
La organización molecular y la homogeneidad de las películas de LB dependen en gran medida de la calidad de la monocapa de Langmuir. Muchos defectos encontrados en las películas de LB pueden ocurrir antes de la transferencia. Tales defectos se deben a la pérdida de la integridad de la monocapa en la interfase aire-agua durante el tiempo transcurrido entre la dispersión de las moléculas sobre la superficie acuosa y la transferencia.<sup>160-162</sup> Por lo tanto, como se mencionó anteriormente, la homogeneidad y estabilidad de la monocapa de Langmuir son el primer factor crucial para obtener depósitos de buena calidad. Recién una vez que la estabilidad de la monocapa en la interfase aire-agua ha sido completamente estudiada puede abordarse el proceso de transferencia.

#### **4.6.7 Sustratos y tipos de deposición**

Dependiendo de la naturaleza del sustrato, la primera monocapa se transferirá durante la inmersión o emersión del soporte sólido a través de la película de Langmuir. Si

el sustrato es hidrofóbico la monocapa se transferirá durante la inmersión, cuando la región no polar de las moléculas que forman la monocapa interactúe con él. Por el contrario, si el sustrato es hidrofílico, la monocapa se transferirá durante la emersión, cuando las cabezas polares de las moléculas interactúen con la superficie. De esta forma, al usar un sustrato hidrofílico, éste se debe colocar sumergido en la subfase antes de formarse la monocapa de Langmuir. Luego de la transferencia de la primera monocapa, el sustrato hidrofílico se vuelve hidrofóbico y se puede transferir una segunda monocapa a través de la inmersión del mismo. De la misma forma, un sustrato hidrofóbico se vuelve hidrofílico al realizar la primera transferencia y una segunda monocapa puede ser transferida durante la emersión. Así, a través de la transferencia sucesiva de monocapas mediante inmersiones-emersiones se pueden obtener multicapas sobre el sustrato sólido.

En la Figura 27 se muestran diferentes tipos de transferencia de LB. En la denominada de tipo Y, el ordenamiento de la película es centro simétrico, estableciéndose una configuración cabeza-cabeza y cola-cola en sucesivas transferencias. En este caso el sustrato es hidrofílico y la primera monocapa se transfiere cuando el sustrato es sacado de la subfase. En la transferencia tipo X, la monocapa se transfiere únicamente durante la inmersión del soporte a través de la interfase y en la tipo Z, la monocapa se deposita solamente al emerger el sustrato de la subfase. En ambos casos se obtienen películas no centrosimétricas. Es importante tener en cuenta que puede ocurrir cierta reorganización en la película durante o un tiempo después del proceso de transferencia.<sup>163</sup>



**Figura 27.** Tipos de transferencia de Langmuir-Blodgett

Existe un gran número de materiales sobre los cuales se pueden depositar las monocapas, pero los más utilizados, para luego llevar a cabo la caracterización de las películas de LB utilizando Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) son: mica, vidrio pulido y cuarzo. La mica es el sustrato por excelencia sobre el cual se transfieren las monocapas de Langmuir, ya que tiene una superficie atómicamente plana y limpia. Los cristales que



forma la mica se encuentran ensamblados en estructuras de capas sobrepuestas que se pueden separar fácilmente. De esta manera, la superficie clivada de la mica es químicamente libre de impurezas evitándose una preparación del sustrato que requiera métodos laboriosos. Además, la mica mantiene carga negativa en soluciones, lo que la transforma en un sustrato altamente hidrofílico.

En esta tesis se formaron películas de Langmuir y Langmuir-Blodgett de dendrones utilizando una balanza NIMA 611 con un sistema Wilhelmy de medida de la presión superficial. Para las transferencias de Langmuir-Blodgett, la balanza contiene un brazo mecánico acoplado, que sostiene la superficie sobre la que se transfiere la monocapa, se mueve perpendicularmente a la interfase y es controlado por ordenador.

#### **4.7 Microscopía de Fuerza Atómica**

La Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, por sus siglas en inglés Atomic Force Microscopy)<sup>164</sup> pertenece al grupo de técnicas llamadas Microscopías de campo cercano (SPM, por sus siglas en inglés Scanning Probe Microscopes), las cuales se basan en medir cambios en la magnitud de la interacción entre una sonda o punta afilada y la superficie de la muestra. Dependiendo de la microscopía SPM es el tipo de interacción entre la punta y la muestra. Moviendo la punta sobre la superficie se obtiene un mapa de esta interacción y por lo tanto una imagen de la muestra en estudio. Los microscopios SPM son utilizados para estudiar propiedades de las superficies de los materiales desde el nivel atómico hasta las micras.

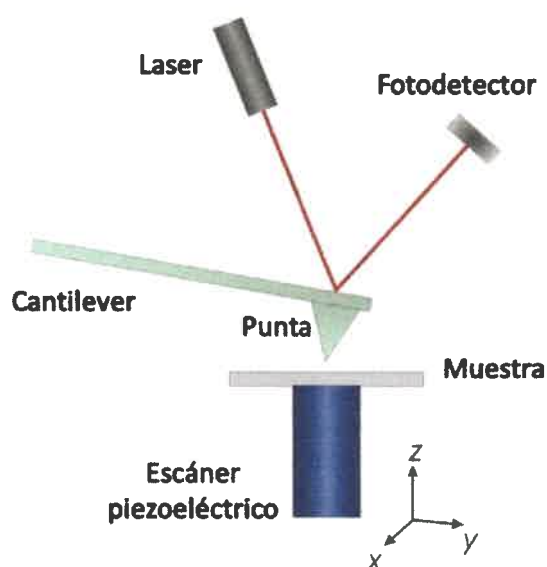
La Microscopía de Fuerza Atómica se basa en la detección de las fuerzas de interacción que existen entre átomos y moléculas. Estas fuerzas, que pueden ser tanto de largo como de corto alcance, así como atractivas o repulsivas, existen en todos los materiales, por lo que la Microscopía de Fuerza Atómica es en principio aplicable a cualquier tipo de material. Además, tiene la ventaja de que puede operar en ambientes variados, como ultra-alto vacío, aire y líquido.<sup>165</sup>

En la Figura 28 se muestra un diagrama simple de un microscopio de fuerza atómica, donde se indican los componentes principales del mismo.<sup>166</sup> El equipo posee una punta muy fina que se localiza en el extremo de un cantiléver, con la cual se barre de manera automática sobre la superficie de la muestra. Las fuerzas entre la punta y la superficie causan la deformación elástica del cantilever. Un haz de luz laser se hace incidir



sobre la superficie pulida de la parte posterior del cantiléver, donde se refleja y se dirige hacia la posición sensible de un fotodetector de cuatro cuadrantes. Una pequeña deflexión del cantiléver inclinará el haz reflejado y cambiará la posición del haz sobre el fotodetector. El fotodetector mide la diferencia en intensidad de luz entre los cuadrantes superiores y los inferiores así como entre los cuadrantes de la derecha y los de la izquierda.

Mediante un mecanismo de retroalimentación, los scanners piezoeléctricos pueden mantener la punta interaccionando con la superficie a fuerza constante, con lo cual se obtiene información de alturas, topográfica. Sino la punta se puede mantener a altura constante respecto de la superficie de la muestra para obtener información de fuerza. Con objeto de obtener buenos resultados con AFM, es necesario un aislamiento perfecto de vibraciones.



**Figura 28.** Diagrama de un Microscopio de Fuerza Atómica.

Adaptado de bibliografía (166).

Existen diferentes modos de operación del AFM de acuerdo a la dinámica del cantiléver y el tipo de interacción que se establece entre la punta y la muestra:

*Modo contacto:* En este modo de operación el extremo de la punta se encuentra permanentemente en contacto físico con la superficie de la muestra, de manera que existe una repulsión estérica. Las fuerzas de interacción existentes entre la superficie y la punta dan lugar a una deflexión vertical en el cantiléver, y al desplazarse sobre la superficie de la muestra, los accidentes topográficos de la misma producen variaciones de esta deflexión.

El contacto permanente entre la punta y la muestra hace que esta forma de operación del AFM sea muy invasiva, haciendo que muestras delicadas resulten fácilmente dañadas y/o arrastradas por la punta.

Modo de no contacto: En este modo de operación la distancia entre la punta y la muestra es lo suficientemente elevada como para que sólo se establezcan fuerzas atractivas. Se miden los cambios en la frecuencia de oscilación del cantiléver, inducidos por la interacción punta-muestra que se requieren para mantener la amplitud de oscilación constante en todo momento.

Modo de contacto intermitente o tapping: En este modo se hace oscilar un cantiléver rígido a una frecuencia cercana a su frecuencia natural de resonancia (50-500 KHz) y con una elevada amplitud (100-200 nm). Sólo existe contacto entre la punta y la muestra en el punto más bajo del recorrido oscilatorio. Con esto se consigue eliminar las fuerzas laterales, lo que produce un aumento de la resolución y además se reduce el daño sobre la muestra.

La interacción punta-muestra provoca por lo general un desfase entre la señal periódica que alimenta al cantiléver y la oscilación real de este. Este desfase depende en gran medida de ciertas propiedades de la muestra, de modo que en superficies heterogéneas (debido a que están compuestas de diferentes materiales o por que alguna de sus características varíe localmente), el contraste de las imágenes de fase refleja dicha heterogeneidad. Así, las imágenes de fase permiten detectar, por lo general de manera cualitativa, variaciones en la composición química, adhesión u otras propiedades de superficie de la muestra que no se manifiestan necesariamente en imágenes topográficas.

La Microscopía de Fuerza Atómica es una técnica muy utilizada para la caracterización de películas de LB sobre sustratos sólidos, ya que permite analizar la homogeneidad de las películas, la existencia y magnitud de defectos superficiales y el espesor de los films<sup>82,90,167</sup> Por lo tanto, en esta tesis se utilizó la técnica de Microscopía de Fuerza Atómica para caracterizar películas de Langmuir-Blodgett de dendrones puros y de dendrones con un compuesto activo. Se utilizó un equipo Agilent 5500 SPM (AFM, STM).

## **5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

---

### **5.1 Determinación de la solubilidad de Triazina**

Se preparó una solución patrón de Triazina en metanol (MeOH) de concentración  $2 \times 10^{-3}$  M. Un volumen adecuado de solución fue trasvasado a un matraz de 5 mL y se procedió a la evaporación del solvente con corriente de nitrógeno. Seguidamente se agregó agua desionizada hasta el enrase. Las soluciones fueron sonicadas durante 10 minutos y almacenadas a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Para obtener soluciones de mayor concentración de Triazina se trasvasó a un matraz de 5 mL la cantidad necesaria de solución patrón y se evaporó el solvente con corriente de nitrógeno. Seguidamente se transfirió al matraz la solución acuosa de menor concentración preparada según se detalló anteriormente.

Además, se preparó una solución saturada de Triazina en agua desionizada. Para esto se añadió un exceso de droga en agua pura, se sonicó durante 20 minutos y se almacenó durante 12 horas a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Luego, a través de una filtración con membrana Millipore de  $0.45 \mu\text{m}$  se removió el exceso de droga no solubilizada.

Se realizaron medidas de absorción UV-vis y se determinaron los valores de absorbancia de Triazina correspondientes al máximo de absorción. De la regresión obtenida a partir de la curva de calibración de absorbancia versus concentración de Triazina y el valor de absorbancia de la solución saturada, se calculó la solubilidad de la droga en agua desionizada.

Los espectros de absorción se obtuvieron utilizando una celda de 1 cm de paso óptico.

### **5.2 Estudio de Triazina en solventes de diferente polaridad y capacidad donora y aceptora de puente hidrógeno**

Un volumen adecuado de solución patrón de Triazina en MeOH de concentración  $2 \times 10^{-3}$  M fue trasvasado a un matraz de 5 mL y se procedió a la evaporación del solvente con corriente de nitrógeno. Seguidamente se agregó solvente hasta el enrase y las soluciones así preparadas fueron sonicadas durante 10 minutos y almacenadas a temperatura ambiente y en ausencia de luz.

Los solventes usados en estas determinaciones fueron: MeOH, acetato de etilo, dimetilformamida, butanol, benceno, isopropanol, acetonitrilo, tolueno, tetrahidrofurano, dimetilsulfóxido, cloroformo, etanol, dicloroetano, agua y tributilamina.

### **5.3 Estudio de la asociación de Triazina y dendrímeros PAMAM**

Las condiciones de preparación de las muestras compuesto activo-dendrímero impactan notablemente en la naturaleza de la asociación huésped-dendrímero. Estudios con diferentes sistemas dendriméricos<sup>168</sup> indican que si se preparan soluciones conteniendo huésped y dendrímero y se permite que alcancen el equilibrio agitando, el complejo huésped-dendrímero se forma dentro de una suspensión que contiene especies de alto orden; sin embargo, la sonicación previene la formación de estos agregados. De acuerdo a esto y en base a estudios realizados previamente sobre diferentes métodos de preparación de soluciones huésped-dendrímero,<sup>169</sup> se utilizaron los siguientes métodos para preparar las soluciones de Triazina en dendrímeros PAMAM:

#### *1) Método A:*

Un volumen adecuado de solución patrón metanólica de Triazina de concentración  $2 \times 10^{-3}$  M fue trasvasado a un matraz de 5 mL, se le adicionó un volumen adecuado de dendrímero comercial y se sonicó durante 30 minutos. Luego se evaporó el metanol con corriente de nitrógeno y se le agregó agua desionizada o buffer fosfato salino (PBS, pH = 7.4) hasta el enrase. La cantidad de Triazina en esta solución se encontraba en exceso respecto de su solubilidad en agua. Las soluciones preparadas fueron sonicadas durante 10 minutos y agitadas vigorosamente durante 12 horas; luego se almacenaron a temperatura ambiente y en ausencia de luz durante toda la noche. Finalmente, el exceso de droga no solubilizada se removió a través de una filtración con membrana Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$ .

#### *2) Método B:*

Un volumen adecuado de solución metanólica de Triazina de concentración  $2 \times 10^{-3}$  M fue trasvasado a un matraz de 5 mL y se evaporó el metanol con corriente de nitrógeno. Seguidamente se agregó solución acuosa de dendrímero y las soluciones así preparadas fueron sonicadas durante 10 minutos y agitadas vigorosamente durante 12 horas. La cantidad de Triazina en estas soluciones se encontraba en exceso respecto de su solubilidad en agua. Luego se almacenaron a temperatura ambiente y en ausencia de luz durante toda la noche. El exceso de droga no solubilizada se removió a través de una filtración con membrana Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$ .

Para cada sistema Triazina-PAMAM estudiado se prepararon las soluciones a través del Método A y se midieron los espectros de absorción utilizando una celda de 1 cm de paso óptico. En el caso del sistema Triazina-PAMAM-AT ( $G = 3$ ), también se preparó la solución a través del Método B.

#### **5.4 Estudio de Triazina en soluciones acuosas básicas**

Para analizar el proceso de hidrólisis de Triazina se añadieron alícuotas sucesivas de una solución acuosa diluida de KOH a una solución de Triazina en agua desionizada. El agregado de solución de hidróxido fue el necesario para alcanzar un valor de pH de 10. Se siguió la evolución de los espectros de absorción de la solución acuosa de droga luego de cada adición de base utilizando una celda de 1 cm de paso óptico.

Mediante el mismo procedimiento se realizó el estudio de la hidrólisis básica de Triazina inducida por amina, utilizando una solución acuosa de butilamina  $3.2 \times 10^{-3}$  M en lugar de solución de KOH.

#### **5.5 Análisis de la estabilidad del complejo Triazina-PAMAM-OHT (G=3) con el tiempo y la temperatura**

La solución del complejo Triazina-PAMAM-OHT ( $G=3$ ) en agua se mantuvo a temperatura ambiente y se analizó periódicamente por espectroscopía UV-vis, durante diez semanas. Además se controló la posible aparición de precipitado, turbidez, cristalización y cambio de color.

Por otro lado, para analizar la estabilidad del complejo Triazina-PAMAM-OHT ( $G=3$ ) con la temperatura, las soluciones de huésped-dendrímero recién preparadas se termostataron a diferentes temperaturas, cubriendo un rango entre 15 y 40 °C. Luego de alcanzar el equilibrio térmico, las soluciones se filtraron a través de una membrana Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  y se determinaron los espectros de absorción.

#### **5.6 Estudios de liberación *in vitro* de Triazina desde el conjugado droga-dendrímero**

Se estudió la liberación de Triazina desde el conjugado droga-dendrímero en agua desionizada mediante el siguiente procedimiento: 1 mL de solución acuosa de Triazina-dendrímero se transfiere a una bolsa de diálisis con un corte de peso molecular (MWCO, por sus siglas en inglés Molecular Weight Cut-Off) de 1000 Da. Luego, la bolsa de diálisis se sumerge en un recipiente con 10 mL de agua desionizada. Este sistema se agita



continuamente utilizando una pequeña barra de agitación magnética para evitar la formación de una capa de agua no agitada en la interfaz membrana/solución externa. A intervalos de tiempo específicos se retira una alícuota de 3 mL de la solución fuera de la bolsa de diálisis y se sustituye este volumen por agua desionizada. La concentración de Triazina en estas alícuotas se analizaron a través de medidas de absorción UV-vis.

### **5.7 Determinación del $pK_a$ de Fenazina en agua**

El  $pK_a$  de un compuesto se puede determinar a través de diferentes métodos; entre ellos, se destaca el de espectroscopía UV-vis<sup>170</sup> ya que requiere pequeñas cantidades del compuesto, por lo que se puede utilizar cuando la sustancia presenta baja solubilidad.<sup>171</sup> Este método requiere que las formas iónica y neutra tengan diferentes espectros. El  $pK_a$  de Fenazina se determinó a través del método por espectroscopía UV-vis. Inicialmente se preparó una solución acuosa ácida de Fenazina. Para esto se añadió la droga sólida a una solución de ácido clorhídrico en agua pura, se sonicó durante 30 minutos y luego, a través de una filtración con membrana Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$ , se removió el exceso de droga no solubilizada. El pH inicial de esta solución era igual a 2. Se determinó el espectro de absorción UV-vis de esta solución inicial y luego se agregaron cantidades conocidas de una solución acuosa de KOH, determinando el pH y el espectro de absorción UV-vis de la solución luego de cada adición, hasta llegar a pH=12. Los espectros de absorción se obtuvieron utilizando una celda de 1 cm de paso óptico, mientras que para la determinación del pH se utilizó un pH-metro digital previamente calibrado con soluciones buffer estándar. A partir de los espectros UV-vis obtenidos se construyó un gráfico de absorbancia a 558 nm (correspondiente al máximo de absorción de la forma aniónica de Fenazina) versus el pH; luego, del punto de inflexión de esta curva se obtuvo el valor del  $pK_a$  de la droga.

### **5.8 Estudio de la asociación de Fenazina con dendrímeros PAMAM y PPI**

Para el dendrímero PPI, se preparó inicialmente una solución en MeOH de concentración 0.01 M que fue usada como patrón. Cantidades deseadas de esta solución patrón de PPI o de las soluciones metanólicas comerciales de los dendrímeros PAMAM fueron transferidas a matraces de 5 mL y el MeOH fue evaporado bajo corriente de nitrógeno. Seguidamente se agregaron cantidades adecuadas de Fenazina sólida y se añadió agua o PBS, según correspondía, hasta el enlace. La cantidad de Fenazina en estas

soluciones se encontraba en exceso respecto de su solubilidad en agua o PBS. Las soluciones preparadas fueron sonicadas durante 30 minutos y agitadas vigorosamente durante 2 horas. Luego se almacenaron a temperatura ambiente y en ausencia de luz durante toda la noche. Al día siguiente se agitaron 2 horas y se almacenaron a temperatura ambiente y en ausencia de luz durante dos días. Finalmente, se sonicaron 10 minutos y se agitaron 2 horas. El exceso de droga no solubilizada se removió a través de una filtración con membrana Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$ .

Para evaluar el aumento de solubilidad de Fenazina en presencia de los dendrímeros PAMAM y PPI se midieron los espectros de absorción de las soluciones obtenidas utilizando una celda de 0.1 cm de paso óptico.

### **5.9 Análisis de la asociación de Fenazina con los dendrímeros PAMAM mediante espectroscopía $^1\text{H-NMR}$**

Se prepararon soluciones acuosas de Fenazina-dendrímero PAMAM de acuerdo a como se detalla en la sección 5.8. Se tomaron 0.6 mL de estas soluciones y se liofilizaron. Luego, se redisolvieron los sólidos obtenidos de la liofilización en 0.6 mL de agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) y se registraron los espectros  $^1\text{H-NMR}$  utilizando un espectrómetro NMR Bruker 400 MHz Advance II, con sonda BBI (Broad Band Inverse).

También se registraron los espectros  $^1\text{H-NMR}$  de los dendrímeros en ausencia de Fenazina. Para esto se prepararon soluciones acuosas de los dendrímeros PAMAM a partir de las soluciones comerciales metanólicas. Las soluciones de los dendrímeros en agua fueron liofilizadas y luego el sólido obtenido de la liofilización se disolvió en 0.6 mL de  $\text{D}_2\text{O}$ .

### **5.10 Análisis de la estabilidad de los complejos Fenazina-dendrímero con el tiempo**

Las soluciones de los complejos droga-dendrímero en agua se mantuvieron a temperatura ambiente y se analizaron periódicamente por espectroscopía UV-vis, durante dos meses. Además se controló la posible aparición de precipitado, turbidez, cristalización y cambio de color.

### **5.11 Análisis de la biocompatibilidad y actividad biológica de los complejos Fenazina-dendrímero**

Con el objetivo de realizar un análisis de la biocompatibilidad de los sistemas Fenazina-dendrímico estudiados, se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular mediante la técnica de MTT, la cual mide la conversión de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) en una sal insoluble de formazán. El formazán es luego solubilizado en dimetil sulfóxido (DMSO) y su concentración determinada mediante densidad óptica a 540 nm, registrada en un lector de microplacas (Bio-Rad®). Los ensayos MTT se hicieron de acuerdo a la metodología propuesta por Rivero y col.<sup>172</sup>

Se trabajó con líneas celulares tumorales Hep G2 (derivada de hepatocarcinoma humano) y MCF (derivada de carcinoma mamario humano); se utilizó también la línea celular normal MCFK (derivada de riñón canino). Las células fueron cultivadas, a partir de alicuotas (semillas) criopreservadas en N<sub>2</sub> líquido. Las células fueron descongeladas en baño termostático a 37 °C e inmediatamente sembradas en botellas tipo Flask T25 (1 botella por línea). Se utilizó Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco®), suplementado con 10% de suero fetal bovino libre de micoplasmas estéril (Natocor®) y antibiótico-antimicótico (Gibco®). Las condiciones de cultivo utilizadas fueron temperatura 37 °C, con atmósfera saturada de humedad 95% y 5% de CO<sub>2</sub>, en estufa (EscoCO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>incubator CLM-240B-8). Los ensayos se realizaron en placas para cultivos celulares multipocillos (de 96 pocillos - Biofil®).

Las células fueron sembradas en las placas multipocillos a una densidad de 5000 células/pocillo en 100 µL de DMEM completo/pocillo. Para favorecer la adhesión de las células a la superficie de las placas, se incubaron durante 24 hs en estufa con atmósfera controlada a 37 °C. Cada condición experimental, incluidos los controles positivos de viabilidad, fueron corridas por sextuplicado. En el control positivo se cultivaron las células en DMEM completo. Además, las células fueron cultivadas en presencia de Fenazina  $2 \times 10^{-5}$  M, dendrímeros ( $0.5 \times 10^{-5}$  M,  $1.25 \times 10^{-5}$  M y  $1.5 \times 10^{-5}$  M de PAMAM-AT (G=3),  $1.25 \times 10^{-5}$  M de PAMAM-AT (G=1) y  $1 \times 10^{-5}$  M PPI (G=4)) y los complejos Fenazina-dendrímico ( $0.5 \times 10^{-5}$  M PAMAM-AT (G=3) +  $1.8 \times 10^{-4}$  M Fenazina,  $1.25 \times 10^{-5}$  M PAMAM-AT (G=3) +  $3.8 \times 10^{-4}$  M Fenazina,  $1.5 \times 10^{-5}$  M PAMAM-AT (G=3) +  $5 \times 10^{-4}$  M Fenazina,  $1.25 \times 10^{-5}$  M PAMAM-AT (G=1) +  $1.27 \times 10^{-4}$  M Fenazina,  $1 \times 10^{-5}$  M PPI (G=4) +  $1.6 \times 10^{-4}$  M Fenazina). Luego de 24 hs de incubación las diluciones fueron removidas y las células fueron incubadas con el reactivo de MTT (5 mg/mL) durante 3 hs en las mismas condiciones de cultivo. Luego la mezcla de reacción fue cuidadosamente removida, evitando la redisolución del formazán precipitado, para agregarle a cada pocillo de la placa

100  $\mu$ L de DMSO. Se agito la placa suavemente para resuspender la sal y se efectuaron las lecturas a 540 nm de longitud de onda.

Además de las propias condiciones de cultivo de las células, en las que se evaluó la esterilidad, las soluciones de las moléculas en estudio fueron sembradas en caldo de cultivo Luria Bertani para controlar su esterilidad microbiológica.

Estos estudios fueron realizados en cooperación con los Dres. Fabrisio Alustiza, Ana Cecilia Liaudat y Pablo Bosch, miembros del Departamento de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

### **5.12 Solubilización de CBZ en el dendrímero D**

Se preparó una solución patrón del carbamato en MeOH de concentración  $1 \times 10^{-3}$  M. Volúmenes adecuados de esta solución metanólica de droga fueron trasvasados a matraces de 5 mL, luego se evaporó el solvente con corriente de nitrógeno y se agregó solución acuosa de dendrímero D. La cantidad de carbamato en estas soluciones se encontraba en exceso respecto de su solubilidad en agua. Las soluciones preparadas fueron sonicadas durante 2 horas y luego se almacenaron a temperatura ambiente y en ausencia de luz durante toda la noche. Finalmente, el exceso de droga no solubilizada se removió a través de una filtración con membrana Millipore de 0.45  $\mu$ m.

Se midieron los espectros de absorción UV-vis de las soluciones obtenidas y a partir de estos se evaluó el aumento de solubilidad de la droga en presencia de dendrímero para cada concentración de dendrímero.

### **5.13 Análisis de las soluciones de CBZ y CBZ-dendrímero D mediante DLS**

Para analizar la presencia de agregados en las soluciones acuosas de CBZ y CBZ-dendrímero D, la droga pura en su límite de solubilidad y el complejo droga-dendrímero fueron estudiados mediante DLS, utilizando un goniómetro Malvern 4700 y correlador 7132, con un láser de ión Argón, operando a 488 nm y a una temperatura de 25°C. Todas las mediciones se realizaron por triplicado, en el ángulo de dispersión de 90° y la distribución de tamaños de los agregados se obtuvo por análisis CONTIN.

### **5.14 Análisis de la estabilidad del complejo CBZ-dendrímero D con el tiempo y la temperatura**



Para evaluar la estabilidad de la asociación del complejo CBZ-dendrímico D con el tiempo, las soluciones del complejo se mantuvieron a temperatura ambiente y se analizaron periódicamente por espectroscopía UV-vis, durante dos meses. Además se controló la posible aparición de precipitado, turbidez, cristalización y cambio de color.

También se analizó la estabilidad del sistema con la temperatura. Para esto las soluciones de CBZ-dendrímico D recién preparadas se termostataron a diferentes temperaturas, cubriendo un rango entre 15 y 40 °C. Luego de alcanzar el equilibrio térmico, las soluciones se filtraron a través de una membrana Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  y se determinaron los espectros de absorción UV-vis.

### **5.15 Ensayo de hemólisis**

Para analizar las propiedades hemolíticas del sistemas CBZ-dendrímico D se utilizó la técnica descrita por Chen y col.<sup>173</sup> A partir de sangre humana otorgada por el Centro de Salud de la Universidad Nacional de Río Cuarto, se preparó una suspensión al 2% p/v de glóbulos rojos en PBS (a 4°C). Luego, esta suspensión fue centrifugada a 1500 rpm durante 10 minutos. El plasma sobrenadante fue eliminado y los eritrocitos fueron resuspendidos en PBS frío (a 4°C). Este procedimiento fue repetido dos veces más para asegurar que toda a hemoglobina libre fuera eliminada del sistema. Finalmente las células fueron resuspendidas en PBS de modo de obtener una suspensión al 2% p/v de glóbulos rojos en PBS. Por otra parte, se prepararon soluciones del complejo CBZ-dendrímico D en PBS de las siguientes concentraciones [dendrímico D]/[CBZ]:  $1.0 \times 10^{-5}/1.4 \times 10^{-5}$ ,  $5.0 \times 10^{-5}/2.4 \times 10^{-5}$  y  $1.0 \times 10^{-4}/4.2 \times 10^{-5}$ . Se trasvasaron 300  $\mu\text{L}$  de suspensión de glóbulos rojos al 2% y 300  $\mu\text{L}$  de cada una de las soluciones de CBZ-dendrímico a tubos eppendorf. Además se realizaron dos controles, uno positivo (hemólisis completa) y otro negativo (0% de hemólisis). El primero se llevó a cabo agregando 300  $\mu\text{L}$  de agua pura a los 300  $\mu\text{L}$  de suspensión de glóbulos rojos y el segundo adicionando 300  $\mu\text{L}$  de PBS a 300  $\mu\text{L}$  de suspensión de glóbulos rojos. Todos los preparados se hicieron por triplicado y se incubaron a 37 °C durante 1 y 24 hs. Luego de la incubación, las muestras fueron centrifugadas y se extrajeron 0.5 mL de sobrenadante de cada una. A este volumen se le adicionaron 2.5 mL de PBS y se determinaron los espectros de absorción analizando la banda de la hemoglobina cuyo máximo se encuentra a 414 nm.



### **5.16 Formación de monocapas de Langmuir de los dendrones y determinación de las isothermas ( $\pi$ -A)**

Se prepararon soluciones de cada dendrón utilizando cloroformo como solvente. Se eligió este solvente debido a que permite una adecuada solubilización de los dendrones, es inmisible con el agua y presenta una gran volatilidad. Las concentraciones de cada solución fueron: [BBN] =  $6.16 \times 10^{-4}$  M, [BBA] =  $6.55 \times 10^{-4}$  M y [BTA] =  $6.28 \times 10^{-4}$  M. Estas soluciones fueron almacenadas a 4°C.

Para formar las monocapas se utilizó una balanza NIMA 611, la cual cuenta con un sistema Wilhelmy de medida de la presión superficial. Como subfase se utilizó agua desionizada obtenida de un equipo Elga Classic (resistividad = 18 M $\Omega$ .cm). Con una microjeringa, se esparcieron sobre la superficie acuosa 50  $\mu$ L de solución de dendrón y se esperó 10 minutos para permitir la evaporación del solvente. Luego de este tiempo se inició la compresión a una velocidad de 50 cm<sup>2</sup>/min, registrando la isoterma ( $\pi$ -A). En todas las experiencias la temperatura de la subfase fue de 25°C, la cual fue controlada con un termostato.

Es importante aclarar que, al comenzar el estudio de estos dendrones a través de la técnica de Langmuir, se debieron determinar las condiciones más apropiadas para la formación de las películas en la interfase aire-agua. Para esto se emplearon diferentes condiciones experimentales: concentración de las soluciones de los dendrones, velocidad de compresión y tiempo de espera para la evaporación del solvente, escogiéndose aquellas con las que se obtuvieron mejores resultados, que son las que se nombraron anteriormente.

Además, todas las experiencias de formación de monocapas y determinación de isothermas ( $\pi$ -A) se realizaron al menos tres veces para asegurar la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

### **5.17 Estudio de la reversibilidad y estabilidad de las monocapas de los dendrones en la interfase aire-agua**

Se formaron las monocapas de los dendrones en la interfase aire-agua como se describe en la sección 5.16, bajo las mismas condiciones. Luego del tiempo necesario para que se evapore el solvente, se realizaron ciclos sucesivos de compresión y expansión, a una velocidad de 50 cm<sup>2</sup>/min, registrando las correspondientes isothermas. Es decir, se comprimió hasta una determinada presión superficial y luego se expandió al estado original; esto se repitió dos o tres veces. Se llevaron a cabo dos experiencias para cada

dendrón, en una los ciclos se realizaron hasta una presión cercana a la  $\pi_c$  (a una presión correspondiente a la fase condensada) y en la otra hasta una presión baja (correspondiente a la fase expandida).

También se estudió la estabilidad de las monocapas mediante la determinación del cambio del área de la monocapa cuando la presión superficial es mantenida constante. Para ello se formaron las monocapas de los dendrones en la interfase aire-agua como se describe en la sección 5.16, y luego de la evaporación del solvente se comprimió la película, a una velocidad de 50 cm<sup>2</sup>/min, hasta alcanzar una determinada presión superficial  $\pi_0$ . Una vez que se alcanzó dicha presión, se mantuvo fija, y se registró la deformación resultante  $A/A_i$ , con el tiempo, durante 1 hora.  $A_i$  es el área de la monocapa al tiempo  $t_0$ , es decir, el área inicial de la monocapa cuando se alcanza la presión superficial  $\pi_0$ , y  $A$  es el área de la monocapa a la presión  $\pi_0$  pero a un tiempo  $t$  ( $t > t_0$ ). De esta forma, se obtuvieron gráficos de  $A/A_i$  vs tiempo. Las presiones  $\pi_0$  a las cuales se analizó la estabilidad fueron 5 mN/m y 15 mN/m.

### **5.18 Estudio del efecto de la temperatura en las isotermas ( $\pi$ -A) de los dendrones**

Se formaron las monocapas de los dendrones en la interfase aire-agua como se describe en la sección 5.16 y se registraron las isotermas a diferentes temperaturas. Para esto se controló la temperatura de la subfase con un termostato. En el caso del dendrón BBA y BTA se trabajó a 5°C y 25°C, y con el BBN a 5°C, 25°C y 50°C. Todas las isotermas se registraron hasta la presión de colapso.

### **5.19 Formación de películas de LB de los dendrones estudiados**

Se transfirieron las monocapas de los dendrones desde la interfase aire-agua a sustratos sólidos mediante la técnica de LB. El sustrato sobre el cual se realizaron las transferencias de las monocapas de los dendrones fue mica, cuyas dimensiones eran: 40 mm de largo, 10 mm de ancho y 0.15 mm de espesor. Antes de ser utilizada, se le desprendieron algunas capas de cada lado para garantizar que esté libre de impurezas.

Se colocó la mica sumergida en la subfase, antes se esparcir la solución de dendrón sobre la superficie acuosa. Luego, se formó la monocapa de dendrón en la interfase aire-agua como se detalla en la sección 5.16. Una vez que se esparció la solución de dendrón en la interfase y se esperó 10 minutos para la evaporación del solvente se comprimió la monocapa a una velocidad de 50 cm<sup>2</sup>/min, hasta una presión superficial de 4 o 10 mN/m,

dependiendo el caso. Una vez que se alcanzó la presión deseada, se mantuvo fija durante 40 minutos, tiempo necesario para que la monocapa sea estable y pueda realizarse la transferencia con éxito. Luego de este tiempo se inició la transferencia haciendo emerger la mica desde la subfase a una velocidad de 5 mm/min. La velocidad de la mica durante emersión fue baja para que el proceso de transferencia afecte lo menos posible el arreglo molecular y la integridad de la monocapa cuando se transfiere al sustrato. Del programa que controla la balanza de Langmuir se obtuvo el porcentaje de transferencia correspondiente. Las películas depositadas sobre mica se almacenaron protegidas del polvo y la humedad atmosférica.

Es importante aclarar que, cuando se comenzó a efectuar la transferencia de las monocapas a través de la técnica de LB, se debieron determinar las condiciones más apropiadas para la deposición, que permitieran obtener la mejor relación de transferencia. Para esto se emplearon diferentes condiciones experimentales: presión superficial de transferencia, velocidad de emersión de la mica, tiempo de espera para la estabilización de la monocapa, escogiéndose aquellas con las que se obtuvieron mejores resultados, que son las que se nombraron anteriormente.

### **5.20 Estudio de la morfología superficial de las películas de LB por AFM**

Se caracterizaron las películas de LB de los dendrones depositados sobre mica mediante AFM, usando el modo “tapping”. Se obtuvieron las imágenes de topografía y fase para caracterizar la morfología y homogeneidad de estas películas. Para realizar esta caracterización se utilizó un equipo Agilent 5500 SPM (AFM, STM).

### **5.21 Generación de monocapas mixtas dendrón-CBZ en la interfase aire-agua y determinación de las isothermas ( $\pi$ -A)**

Para la formación de monocapas mixtas de cada dendrón con el compuesto activo, se prepararon soluciones que contenían el dendrón y el carbamato, disueltos en cloroformo. A continuación se detallan las concentraciones de cada solución y la relación CBZ/dendrón:

- Solución 1:

$$[\text{BBN}] = 6.16 \times 10^{-4} \text{ M}, [\text{CBZ}] = 2.84 \times 10^{-3} \text{ M. CBZ/dendrón} = 4.61$$

- Solución 2:

$$[\text{BBA}] = 6.55 \times 10^{-4} \text{ M}, [\text{CBZ}] = 2.84 \times 10^{-3} \text{ M. CBZ/dendrón} = 4.34$$

- Solución 3:

$$[\text{BTA}] = 6.28 \times 10^{-4} \text{ M}, [\text{CBZ}] = 2.91 \times 10^{-3} \text{ M}. \text{CBZ/dendrón} = 4.63$$

Se esparcieron sobre la superficie acuosa 50  $\mu\text{L}$  de la solución de dendrón y CBZ. Tras el coesparcimiento, se esperaron 10 minutos para que se evapore el solvente y se inició la compresión a una velocidad de 50  $\text{cm}^2/\text{min}$ , registrando la isoterma ( $\pi\text{-A}$ ).

### **5.22 Análisis de la reversibilidad y estabilidad de las monocapas mixtas de dendrón y CBZ**

Se formaron las monocapas mixtas en la interfase aire-agua como se describe en la sección 5.21, bajo las mismas condiciones. Al igual que con las monocapas de los dendrones solos, luego del tiempo necesario para que se evapore el solvente, se realizaron ciclos sucesivos de compresión y expansión, a una velocidad de 50  $\text{cm}^2/\text{min}$ , registrando las correspondientes isotermas. Los ciclos se realizaron hasta una presión cercana a la  $\pi_c$  (a una presión correspondiente a la fase condensada) y hasta una presión baja (correspondiente a la fase expandida).

De la misma forma que con las monocapas de los dendrones puros, se estudió la estabilidad de las monocapas, determinando la disminución del área de la monocapa cuando la presión superficial es mantenida constante. Se formaron las monocapas mixtas en la interfase aire-agua como se describe en la sección 5.21, y luego de la evaporación del solvente se comprimió la película, a una velocidad de 50  $\text{cm}^2/\text{min}$ , hasta alcanzar una determinada presión superficial  $\pi_0$ . Una vez que se alcanzó dicha presión, se mantuvo fija, y se registró la deformación resultante  $A/A_1$  durante una hora. La presión  $\pi_0$  a la cual se analizó la estabilidad fue 15  $\text{mN/m}$ .

### **5.23 Transferencia de las monocapas mixtas de dendrón con CBZ sobre mica mediante la técnica de LB**

Las monocapas de dendrón con CBZ se transfirieron desde la interfase aire-agua a un sustrato sólido mediante la técnica de LB. Como sustrato se utilizó el mismo tipo de mica que para las transferencias de las monocapas de los dendrones solos descrita en la sección 5.19. También antes de ser utilizada, se le desprendieron unas capas de cada lado para garantizar que esté libre de impurezas.



Se colocó la mica sumergida en la subfase, antes se esparcir la solución de dendrón con carbamato sobre la superficie acuosa. Luego, se formó la monocapa en la interfase aire-agua como se detalla en la sección 5.21. Una vez que se esparció la solución de dendrón con CBZ en la interfase y se esperó 10 minutos para la evaporación del solvente se comprimió la monocapa a una velocidad de 50 cm<sup>2</sup>/min, hasta la presión de transferencia deseada. Una vez que se alcanzó dicha presión, se mantuvo fija durante 40 minutos, tiempo necesario para que la monocapa sea estable y pueda realizarse la transferencia con éxito. Luego de este tiempo se inició la transferencia, haciendo emerger la mica desde la subfase a una velocidad de 5 mm/min y manteniendo constante la presión superficial. Del programa que controla la balanza de Langmuir se obtuvo el porcentaje de transferencia correspondiente. Las películas depositadas sobre mica se almacenaron protegidas del polvo y la humedad atmosférica.

#### **5.24 Análisis de las películas de LB de dendrón con CBZ mediante AFM**

Las películas de LB de dendrón con CBZ se caracterizaron mediante AFM, usando el modo “tapping”. Se obtuvieron las imágenes de topografía y fase para analizar la morfología y homogeneidad de estas películas.

#### **5.25 Análisis de biocompatibilidad de la película de LB del dendrón BBN. Cultivo celular**

Para analizar la biocompatibilidad de la película de dendrón BBN se utilizó la línea celular NIH 3T3, derivada de fibroblastos fetales de ratón. Antes de realizar el cultivo celular, el sustrato (mica) y la película de dendrón depositada sobre mica se sumergieron cuidadosamente tres veces (3 min cada vez), en una solución de antibiótico-antimicótico. Luego, las superficies se enjuagaron tres veces por inmersión en solución estéril de PBS y, finalmente, cada lado fue irradiado con luz-UV por 60 min. Las micas y películas de dendron se colocaron individualmente en el fondo de una placa de cultivo de 60 mm. Se sembraron las células NIH 3T3 en cada superficie a una densidad de  $5 \times 10^6$  células en una placa de 60 mm.<sup>174</sup>

El cultivo celular se llevó a cabo en Medio DMEM, con 10% de suero fetal bovino (SFB), antibiótico-antimicótico a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5% en aire. Después de 24 h de cultivo, se observó la morfología de las células unidas en cada superficie en un microscopio invertido (Nikon Ti-S 100, Nikon Corp., Tokio, Japón) y las



imágenes fueron tomadas con una cámara digital (Nikon Corp., Tokio, Japón). El experimento se repitió tres veces.

**Tinción de Hoechst.** Las células se cultivaron en las diferentes superficies como se describe anteriormente. Para la tinción de Hoechst, los portaobjetos se enjuagaron con PBS, se fijaron durante la noche en 100% de MeOH, se permeabilizaron durante 10 minutos con 0.1% Triton X-100, y finalmente se sumergieron en solución de Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich Ltd., St. Louis, MO, EE.UU.), 1 mg / ml en PBS. Se tomaron imágenes de las células teñidas con Hoechst (excitación  $360 \pm 40$  nm y emisión de fluorescencia  $460 \pm 50$  nm) con una cámara digital Nikon montada en un microscopio invertido Nikon Ti-S 100 equipado con epifluorescencia. Hoechst 33258 es un colorante fluorescente de ácido nucleico comúnmente utilizado para estudiar la morfología y estructura del núcleo celular e identificar células en mitosis. El porcentaje de células mitóticas se calculó como el número de núcleos mitóticos, multiplicado por 100 y dividido por el número total de núcleos contados.

**Tinción con naranja de acridina.** Las células fueron cultivadas en la película de dendron BBN durante 24 horas. Luego, se tiñeron las células con naranja de acridina (Sigma-Aldrich Ltd.), 1 mg/ml, en medio completo, durante 15 min. Las células se lavaron con PBS y se observaron con un microscopio de fluorescencia Nikon Ti-S 100; las imágenes fueron capturadas con una cámara digital (Nikon Corp., Tokio, Japón).<sup>175</sup> Naranja de acridina es un colorante catiónico que tiñe preferentemente estructuras celulares ácidas, tales como ADN, lisosomas y mitocondrias, por lo tanto, es útil para estudiar la morfología y la distribución de estas organelas.<sup>176</sup>

Los estudios de biocompatibilidad de la película de LB del dendrón BBN fueron realizados en colaboración con los Dres. Fabrisio Alustiza, Ana Cecilia Liaudat y Pablo Bosch, miembros del Departamento de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

En la primera parte de esta sección se presentan los resultados obtenidos del estudio de diferentes *dendrímeros como vehículos de drogas en solución*. Se trabajó con dendrímeros PAMAM (Figura 13 y Figura 14), PPI (Figura 15) y con el dendrímero D (Figura 16); además, se utilizaron tres drogas: Triazina (Figura 18), Fenazina (Figura 19) y CBZ (Figura 20).

En la segunda parte se generaron y caracterizaron películas de los dendrones del tipo Newkome (Figura 17) para su potencial aplicación como *sistemas de administración de drogas mediada por superficie*. Para ello se utilizó como droga modelo el carbamato CBZ.

### 6.1 Dendrímeros como vehículos de drogas en solución

En esta sección se informan los estudios experimentales y computacionales realizados con el propósito de evaluar diferentes dendrímeros como potenciales vehículos moleculares de drogas en solución. Los resultados obtenidos se presentan en tres partes: en primer lugar, en la sección 6.1.1, se muestran los resultados del estudio del compuesto Triazina con diferentes dendrímeros PAMAM. Luego, en la sección 6.1.2 se presentan los resultados del estudio de la droga Fenazina con dendrímeros PAMAM y PPI. Finalmente, en la sección 6.1.3 se muestran los estudios del carbamato CBZ con el dendrímero D.

#### 6.1.1 Estudio de la asociación de dendrímeros PAMAM y un derivado de N-óxido de 1,2,4 triazina con potencial actividad antitumoral

Se investigó la interacción entre diversos *dendrímeros PAMAM* y el compuesto N-óxido de (E)-2-feniletetil 1,2,4-triazina (*Triazina*, Figura 18), sintetizado con el fin de obtener un agente citotóxico selectivo en condiciones de hipoxia. Este derivado de triazina presenta actividad antitumoral *in vitro*, pero muestra baja selectividad citotóxica contra células V79 en condiciones de hipoxia comparado con el compuesto de referencia Tirapazamina, probablemente debido a su baja solubilidad en agua y su inestabilidad.<sup>107,108</sup> La asociación de este tipo de compuestos a vehículos moleculares apropiados podría aumentar su solubilidad y proteger su llegada al sitio activo, mejorando su eficacia. Por lo tanto, se evaluó la capacidad de los dendrímeros PAMAM-AT  $G = 3$ ,

PAMAM-OHT G = 3, PAMAM-CT G = 2.5 y PAMAM-CT G = 4.5 (Figura 14) para asociarse con Triazina, con el propósito de seleccionar el dendrímero más adecuado para actuar como vehículo.

#### 6.1.1.1 Análisis de las posibles interacciones entre el huésped a transportar y los dendrímeros

Los mecanismos por los cuales los dendrímeros se asocian a compuestos lipofílicos e incrementan su solubilidad dependen de la posibilidad de establecer interacciones iónicas o interacciones lipofílicas, como así también de la posibilidad del huésped y el dendrímero de formar puente hidrógeno.<sup>177</sup>

Antes de iniciar los estudios de Triazina con los dendrímeros, se analizó la capacidad de la droga para participar en diferentes interacciones utilizando el método de comparación solvatocrómica de Kamlet y Taft,<sup>125-129</sup> el cual permite separar y cuantificar las diferentes interacciones del compuesto estudiado con su entorno. La identificación y el análisis de la naturaleza de las potenciales interacciones droga-dendrímero permite entender las características del conjugado y diseñar estrategias para la encapsulación y liberación controlada de los compuestos activos.<sup>177-179</sup>

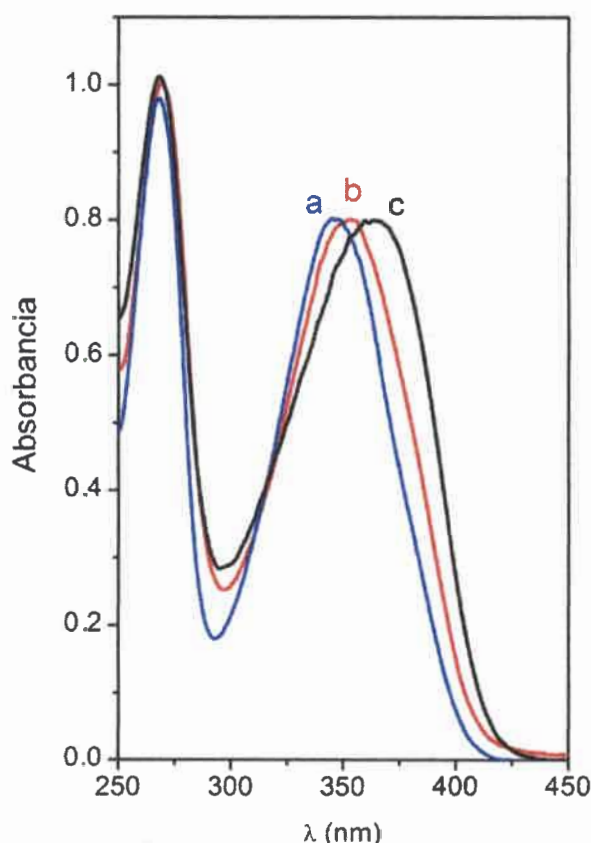
Por lo tanto, se registró el espectro de absorción de Triazina en solventes de diferente polaridad y capacidad donora y aceptora de puente hidrógeno. El espectro de absorción de este compuesto consiste en dos bandas UV características, una banda intensa, banda 1 ( $\lambda_{\max 1} = 267$  nm, agua) y una banda débil, banda 2 ( $\lambda_{\max 2} = 364$  nm, agua). Se encontró que el máximo de absorción a mayor longitud de onda, la banda 2, es fuertemente dependiente de las características del solvente.

En la Figura 29 se muestran algunos espectros representativos del compuesto estudiado en diferentes solventes. La absorción de Triazina exhibe un corrimiento batocrómico con el incremento de la polaridad del medio, consistente con una transición  $\pi \rightarrow \pi^*$ ,<sup>123</sup> similar al observado para compuestos Tirapazamina.<sup>180</sup>

En la Tabla 2 se muestran los valores de los parámetros  $\pi^*$ ,  $\alpha$  y  $\beta$  de los solventes utilizados en el método de comparación solvatocrómica de Kamlet y Taft, junto con el número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) del máximo de absorción correspondiente a la banda 2 del espectro de Triazina. Los resultados obtenidos a partir de la regresión multiparamétrica se muestran en la ecuación (6):

$$\nu_{\max} = (29.21 \pm 0.15) - (0.66 \pm 0.09)\alpha - (0.80 \pm 0.20)\pi^* \quad (6)$$

siendo el coeficiente de correlación al cuadrado  $R\text{-Square} = 0.8818$  y el ajustado  $Adj. R\text{-Square} = 0.855$  para un número de solventes correlacionados  $n = 12$ . El  $\nu_{\max}$  para Triazina muestra correlación sólo con los parámetros de solvente  $\pi^*$  y  $\alpha$ . No se observó correlación con el parámetro  $\beta$ . El valor obtenido para el parámetro  $b$  es menor que el error por lo que no tiene peso estadístico.<sup>129</sup> Si bien la regresión obtenida no es excelente, los resultados obtenidos indicarían que el corrimiento espectral observado puede deberse a la sensibilidad de Triazina a la polaridad y a la capacidad dadora de puente hidrogeno del solvente. Es decir que es posible suponer que el compuesto activo puede ser capaz de establecer interacciones puente hidrógeno, actuando como aceptor. Este resultado es consistente con el hecho de que las moléculas que poseen la función  $N$ -óxido son altamente polares, y forman fácilmente enlaces puente hidrógeno con especies dadoras de puente hidrógeno.<sup>181</sup>



**Figura 29.** Espectro de absorción de Triazina en acetoniitrilo (a), metanol (b) y agua (c).



**Tabla 2.** Parámetros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\pi^*$  de solventes<sup>129</sup> y número de onda del máximo de absorción correspondiente a la banda 2 del espectro de Triazina en los solventes usados

Solvente	Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Parámetros de solvente <sup>‡</sup>		
		$\alpha$	$\pi^*$	$\beta$
metanol	28.409	0.93	0.60	0.62
acetato de etilo	28.761	0.00	0.55	0.45
dimetil formamida	28.531	0.00	0.88	0.69
butanol	28.089	0.79	0.47	0.88
benceno	28.734	0.00	0.59	0.10
isopropanol	28.169	0.76	0.48	0.95
acetonitrilo	28.902	0.19	0.75	0.31
tolueno	28.768	0.00	0.54	0.11
tetrahidrofurano	28.728	0.00	0.58	0.55
dimetil sulfóxido	28.329	0.00	1.00	0.76
cloroformo	28.089	0.44	0.58	0.00
etanol	28.329	0.83	0.54	0.77
dicloro etano	28.582	0.00	0.81	0.00
agua	27.473	1.17	1.09	0.18
tributil amina	28.986	0.00	0.16	0.62

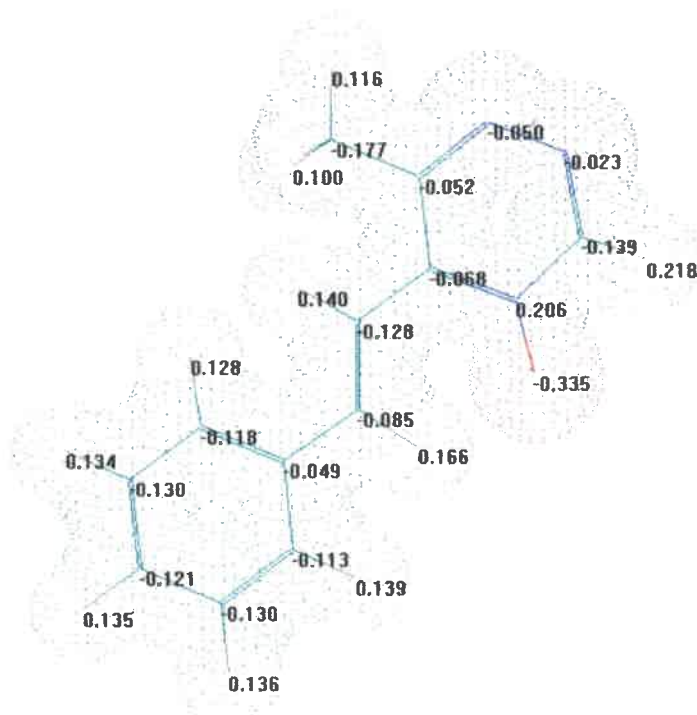
<sup>‡</sup>  $\alpha$  = parámetro que mide la capacidad del solvente como dador de hidrógeno,  $\pi^*$  = parámetro que mide la polaridad-polarizabilidad de solvente y  $\beta$  = capacidad del solvente como aceptor de hidrógeno.

Con el propósito de confirmar la localización de los sitios aceptores de puente hidrógeno en Triazina, se analizaron las densidades de carga locales sobre cada átomo presente en la molécula, obtenidas a partir de cálculos semiempíricos utilizando el método AM1 (Figura 30). Este método no describe los procesos de solvatación, pero puede proporcionar información sobre los sitios de interacción, las distancias de enlace y la distribución de carga en los diferentes átomos presentes en la estructura molecular. Los cálculos para Triazina se llevaron a cabo comenzando con ángulos y longitudes de enlace estándar. La geometría de la molécula fue optimizada minimizando la energía con respecto



a las variables geométricas, sin restricción de simetría, utilizando un gradiente de 0.01 kcal/mol y el algoritmo Polak-Ribierie como criterio de convergencia.<sup>142</sup>

El análisis de la Figura 30 revela que existe una alta densidad de carga negativa localizada en el oxígeno del grupo *N*-óxido.



**Figura 30.** Densidades de carga de Triazina calculadas usando el método semiempírico AM1.

Por lo tanto, en base a estos resultados obtenidos es posible predecir que el compuesto antitumoral podrá asociarse con dendrímeros PAMAM no sólo por interacciones lipofílicas, sino también a través de interacciones puente hidrógeno entre el grupo *N*-óxido del compuesto activo y grupos amina y/o amida de los dendrímeros. La existencia de estas interacciones específicas puede promover la asociación droga-dendrímero dando lugar a un aumento de la solubilidad del compuesto activo.

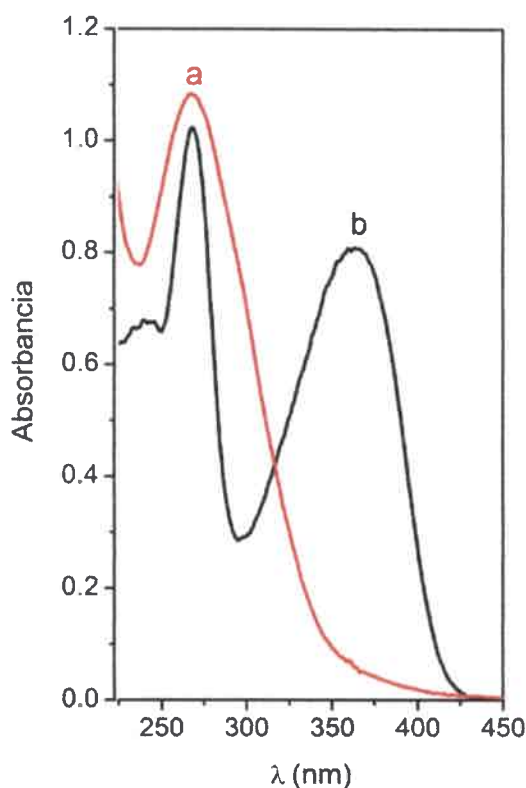
### 6.1.1.2 Estudio de la asociación de Triazina con dendrímeros PAMAM

#### 6.1.1.2a Triazina en soluciones acuosas de dendrímeros PAMAM

Con el propósito de evaluar a los dendrímeros PAMAM como vehículos para la distribución controlada de Triazina, se estudió la asociación de la droga a estas macromoléculas a través de espectroscopía UV-visible.

Es importante mencionar que se realizó la determinación de la solubilidad en agua de Triazina a través de la metodología descrita en la sección 5.1, obteniéndose un valor de  $4 \times 10^{-4}$  M.

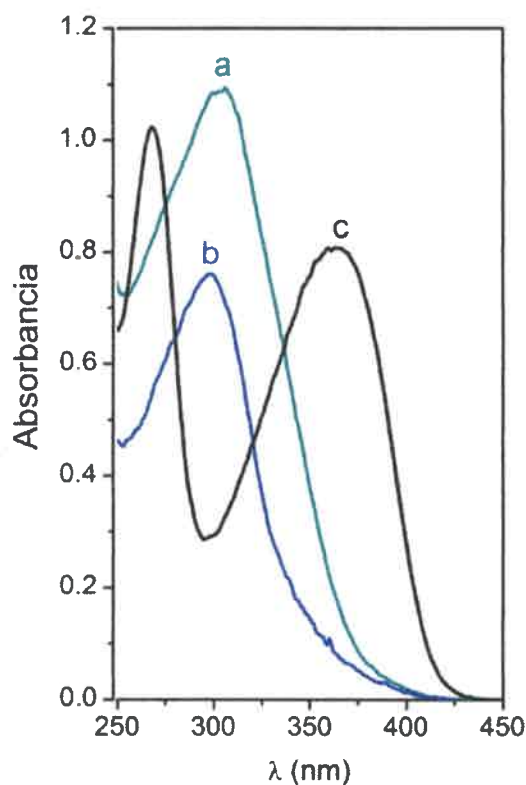
El espectro de absorción de Triazina en solución acuosa de PAMAM-AT (G=3) se muestra en la Figura 31, junto con el espectro obtenido para una solución saturada de Triazina en agua pura. La solución de droga en PAMAM-AT (G=3) se preparó de acuerdo al Método A descrito en la sección 5.3.



**Figura 31.** Espectro de absorción de Triazina en solución acuosa de PAMAM-AT (G = 3)  $1 \times 10^{-4}$  M (a). Se muestra también el espectro de una solución saturada de Triazina en agua pura (b).

Se puede observar que el espectro de Triazina en solución acuosa de dendrímero es diferente al espectro observado para el compuesto activo en agua pura. En solución acuosa de dendrímero no se observa la banda con máximo a 364 nm, mientras que la banda centrada a 267 nm es mucho más intensa y ancha. Este resultado sugiere que Triazina no es

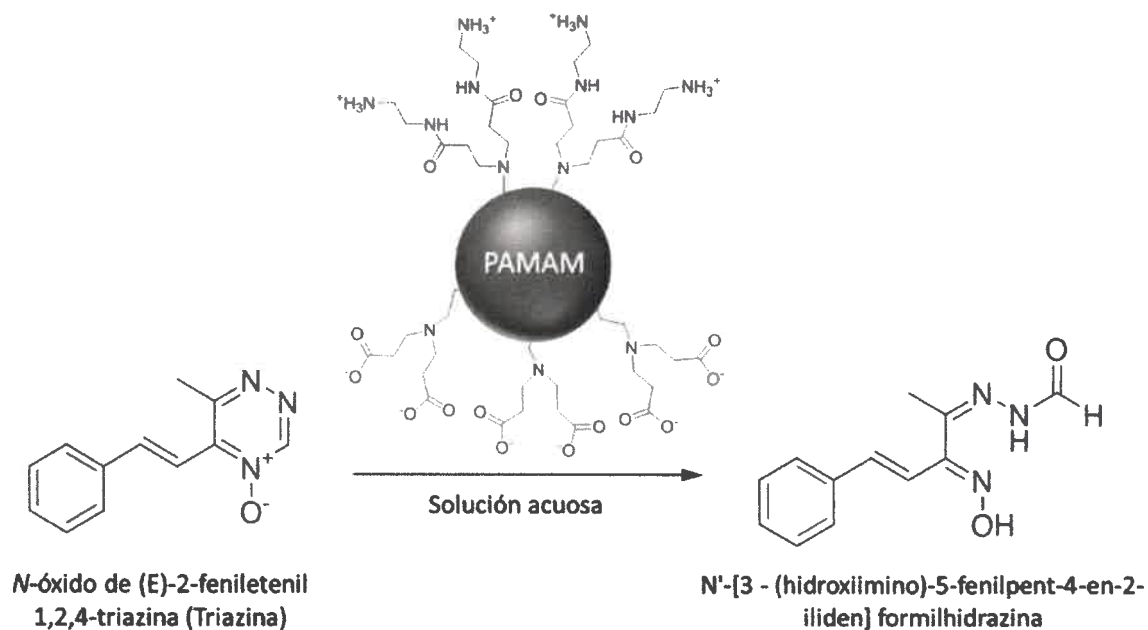
estable en soluciones acuosas de dendrímero PAMAM-AT ( $G = 3$ ) y que se produciría una degradación del compuesto activo. Cambios espectrales similares se observaron cuando se estudió la asociación de Triazina con dendrímeros PAMAM-CT ( $G = 2.5$  y  $G = 4.5$ ) en medio acuoso (Figura 32). Cabe destacar que los experimentos de control, realizados con soluciones de Triazina en agua desionizada, mostraron que el espectro de absorción no muestra ningún cambio a lo largo de varias semanas; esto indicaría que el compuesto es estable en solución acuosa, en ausencia de los dendrímeros.



**Figura 32.** Espectros de absorción de Triazina en solución acuosa de dendrímero PAMAM-CT  $G = 4.5$  (a) y  $G = 2.5$  (b),  $1 \times 10^{-4}$  M. Se muestra también el espectro de una solución saturada de Triazina en agua pura (c).

Chupakhin y col.<sup>182</sup> informaron que los compuestos derivados de *N*-óxidos 1,2,4-triazina experimentan hidrólisis tanto en medio ácido como básico. Por lo tanto, se midió el pH de las soluciones acuosas de los dendrímeros estudiados, obteniéndose los siguientes valores: pH= 9.13 para PAMAM-AT ( $G = 3$ ), pH= 9.8 para PAMAM-CT ( $G = 2.5$ ), y pH=10.02 para PAMAM-CT ( $G = 4.5$ ), lo cual está de acuerdo con otros estudios reportados.<sup>183</sup> Por lo tanto, podría ser posible que los dendrímeros amino y carboxilato terminales estén involucrados en un proceso de hidrólisis de Triazina, provocando la

formación de *N'*-[3-(hidroxiimino)-5-fenilpent-4-en-2-iliden] formilhidrazina<sup>184</sup> (Figura 33) y los cambios espectrales observados serían una evolución de las bandas de Triazina a las bandas del compuesto de Triazina hidrolizada.



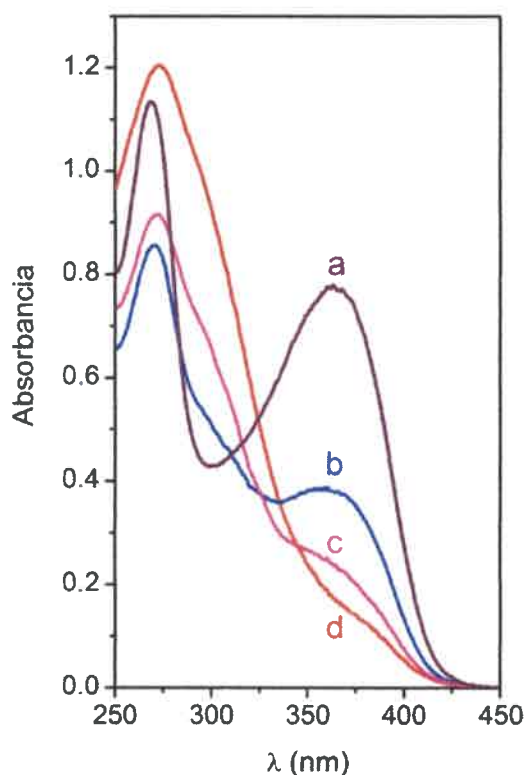
**Figura 33.** Esquema representativo del proceso de hidrólisis de Triazina en solución acuosa de dendrímeros PAMAM amino y carboxilato terminal.

### 6.1.1.2b Preparación del conjugado Triazina-dendrímico a través de una metodología diferente

Las soluciones de Triazina-dendrímico que muestran hidrólisis del compuesto terapéutico se prepararon mezclando cantidades adecuadas de Triazina y dendrímico en MeOH, luego se llevó a sequedad y finalmente se hidrató (Método A, sección 5.3). Al llevar a sequedad, la concentración de dendrímico aumenta gradualmente, y el pH de la solución también aumenta. Por lo tanto, la hidrólisis de la droga podría deberse a este paso en la metodología de preparación. Con el objetivo de determinar si esta hipótesis era cierta, se preparó el complejo Triazina-PAMAM-AT ( $G = 3$ ) a través de la metodología B, descrita en la sección 5.3. En este caso, a la droga llevada a sequedad para eliminar el MeOH se le agregó solución acuosa de dendrímico.

En la Figura 34 se muestran los espectros de absorción de la solución acuosa de Triazina en PAMAM-AT ( $G = 3$ ) preparada de acuerdo a esta metodología, tomados a diferentes tiempos luego de la preparación. Puede observarse que inicialmente, inmediatamente luego de la preparación de la solución, el espectro presenta las mismas

bandas que Triazina en agua pura. Sin embargo, con el tiempo, la banda con máximo a 364 nm decrece, mientras que el desarrollo de un hombro alrededor de 300 nm produce un ensanchamiento de la banda centrada a 267 nm. Por lo tanto, si bien a través de este método de preparación del conjugado droga-dendrímico no se produce una degradación inmediatamente luego de la preparación, como ocurre al prepararlo a través del Método A, tres días luego de la preparación es evidente que ha ocurrido la hidrólisis del compuesto. Por lo tanto, independientemente del método de preparación, se observa degradación de Triazina en presencia de estas soluciones dendrímicas.



**Figura 34.** Espectros de absorción de Triazina en solución acuosa de PAMAM-AT ( $G = 3$ )  $1 \times 10^{-4}$  M tomados a diferentes tiempos.

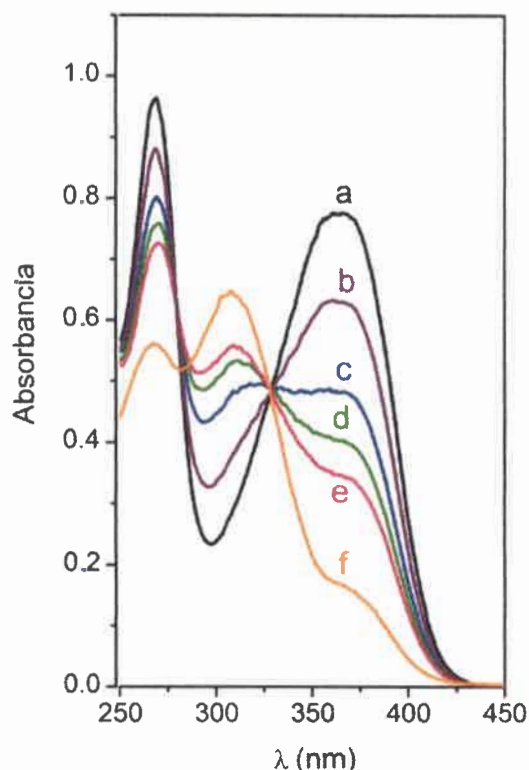
(a) Inmediatamente luego de la preparación de la solución, (b) luego de tres, (c) cinco y (d) diez días.

#### 6.1.1.2c Estudio de Triazina en soluciones acuosas básicas

Con el propósito de analizar el proceso de hidrólisis de Triazina, se siguió la evolución de los espectros de absorción de una solución acuosa de este compuesto después de la adición de una solución acuosa de KOH, en cantidad suficiente para alcanzar un valor

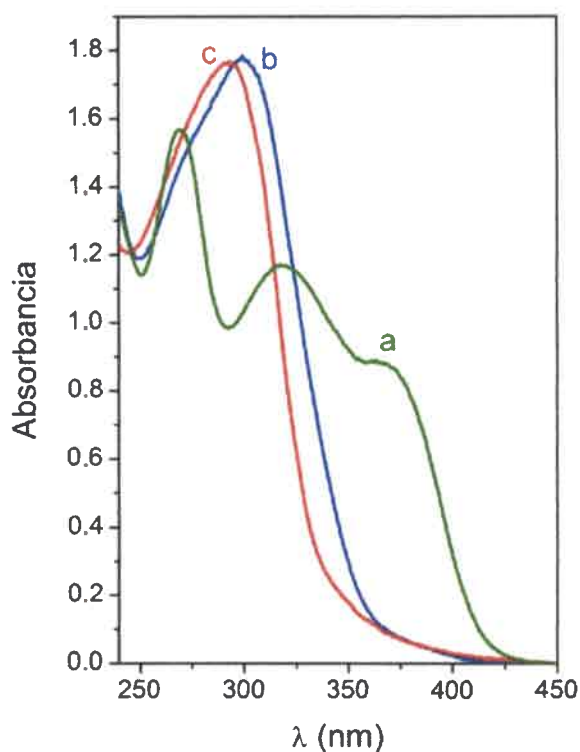


de pH igual a 10. Se pueden ver cambios claros en los espectros de absorción de la droga en la Figura 35, indicando la transformación (hidrólisis básica) sufrida por el compuesto. El espectro final, es muy similar a los obtenidos para Triazina en soluciones acuosas de los dendrímeros PAMAM-AT ( $G = 3$ ), PAMAM-CT ( $G = 2.5$ ) y PAMAM-CT ( $G = 4.5$ ); esto apoya la hipótesis de que en presencia de los polímeros dendriméricos PAMAM estudiados, Triazina sufre hidrólisis.



**Figura 35.** Espectros de absorción de Triazina en solución acuosa de KOH ( $\text{pH} = 10$ ) tomados 0 (a), 20 (b), 60 (c), 180 (d), 420 min (e) y un día (f) luego de la preparación de la solución.

Por otra parte, se realizaron estudios de estabilidad de Triazina en solución acuosa de butilamina, a una concentración equivalente a la cantidad de grupos terminales presentes en una solución de dendrímero PAMAM-AT ( $G = 3$ )  $1 \times 10^{-4}$  M (Figura 36). En este caso, Triazina también muestra una degradación similar a la observada cuando se encuentra en presencia de solución acuosa de dendrímero (Figura 31).

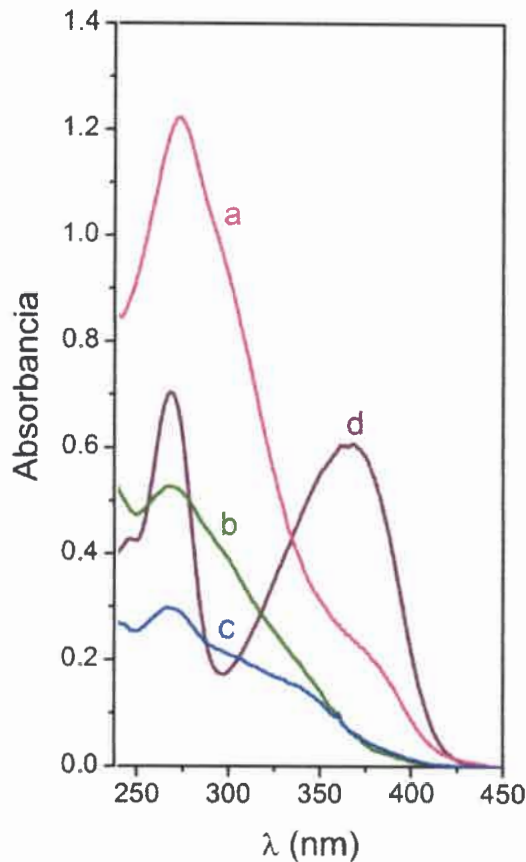


**Figura 36.** Espectros de absorción de Triazina en solución acuosa de butilamina  $3.2 \times 10^{-3} \text{M}$  tomados 0 (a), 2 (b) y 8 (c) días luego de la preparación de la solución.

#### 6.1.1.2d Estudio de la asociación de Triazina a dendrímeros PAMAM en solución buffer

De acuerdo a lo presentado hasta el momento, los estudios realizados indican que Triazina sufre hidrólisis básica en las soluciones acuosas de los dendrímeros seleccionados. Por lo tanto, con el objetivo de evitar esta transformación del compuesto terapéutico, se estudió la asociación droga-dendrímero en PBS (pH=7.4). En la Figura 37 se muestra el espectro de absorción de Triazina en solución de PBS, en presencia de dendrímero PAMAM-AT ( $G = 3$ ). Puede verse en la figura que, a pesar de la regulación del pH del medio, se produce la degradación de Triazina. El análisis espectroscópico muestra una degradación similar para el compuesto activo en solución de PBS, en presencia de dendrímeros PAMAM-CT ( $G = 2.5$  y  $G = 4.5$ ) (Figura 37).

En base a estos resultados, se puede afirmar que la degradación de Triazina no se debe al pH básico de la solución dendrímica, sino que estaría relacionada con una interacción específica de la droga con los diferentes microentornos que presenta la estructura dendrímica.



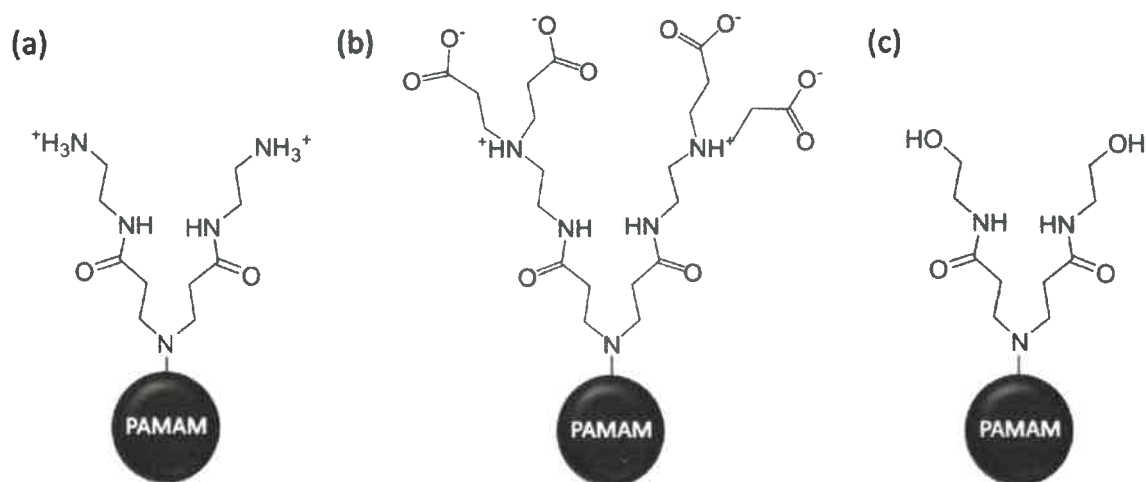
**Figura 37.** Espectros de absorción de Triazina en solución buffer (PBS) de dendrímero PAMAM-AT (G = 3) (a), PAMAM-CT G=4.5 (b) y PAMAM-CT G=2.5 (c),  $1 \times 10^{-4}$  M. Se muestra también el espectro de Triazina en solución buffer (d).

#### 6.1.1.2e Análisis del proceso de hidrólisis de Triazina

Los estudios realizados indican que a pesar de la regulación del pH de la solución, Triazina sufre hidrólisis en presencia de los dendrímeros PAMAM-CT y PAMAM-AT. Este hecho indica que los sitios periféricos cargados en estos dendrímeros podrían ser los responsables de la degradación de la droga. La alta concentración local de grupos periféricos que existe en los dendrímeros podría promover la generación de múltiples interacciones que ocurren simultáneamente en estos sitios generando comportamientos especiales.<sup>185</sup>

Klajnerta y colaboradores demostraron que, tanto los grupos terminales carboxilato como los amino, se encuentran ionizados en solución acuosa y en solución buffer de pH 7.4, y sólo los dendrímeros hidroxilo terminales no tienen ninguna carga en su superficie (Figura 38).<sup>186</sup> Además, los dendrímeros estudiados poseen grupos que pueden promover la hidrólisis catalizada por base. En los dendrímeros PAMAM la basicidad de los residuos

amina interiores, es fuertemente dependiente de la generación a la que pertenece la amina terciaria y de la naturaleza de los grupos terminales del dendrímico.<sup>42</sup> Los dendrímeros PAMAM-AT poseen aminas primarias como grupos terminales, con un  $pK_a$  alrededor de 8.5<sup>42,187</sup> que son capaces de promover la hidrólisis básica de Triazina. Además, en los dendrímeros PAMAM de generación completa, las aminas terciarias internas tienen un  $pK_a \approx 5.0$ ,<sup>42,187</sup> por lo que se puede suponer que en las condiciones experimentales de los estudios realizados, los grupos amina internos de dendrímeros PAMAM-OHT ( $G = 3$ ) y PAMAM-AT ( $G = 3$ ), permanecen neutros en solución acuosa. En los dendrímeros PAMAM-CT, los grupos carboxilato tienen baja basicidad pero las aminas terciarias adyacentes a los grupos terminales poseen una capacidad básica mayor ( $pK_a \approx 8.0$ )<sup>42</sup> que los dendrímeros de generación completa, haciendo posible la hidrólisis básica del compuesto activo (Figura 38).



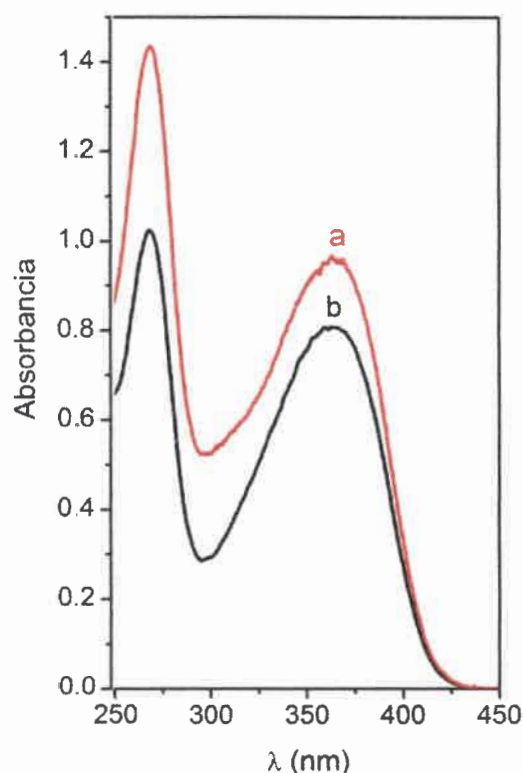
**Figura 38.** Representación de las estructuras de dendrímeros PAMAM-AT (a), PAMAM-CT (b) y PAMAM-OHT (c), mostrando los grupos que se encuentran cargados en agua desionizada y en buffer de pH 7.4 y que pueden promover la hidrólisis básica de Triazina.

Por lo tanto, los resultados obtenidos apoyan el hecho de que los microentornos heterogéneos en las soluciones dendriméricas pueden producir efectos no deseados cuando estas estructuras se utilizan como vehículos para la administración controlada de drogas. En el presente estudio, la interacción entre Triazina y los dendrímeros amino y carboxilato terminales, provoca la degradación del compuesto activo, por lo que estos dendrímeros no son adecuados para actuar como vehículos macromoleculares del compuesto antitumoral.

### 6.1.1.2f Estudio de la asociación de Triazina - PAMAM-OHT (G = 3)

Con el objetivo de encontrar un vehículo macromolecular adecuado para el derivado de Triazina estudiado, que no provoque su hidrólisis, se estudió la interacción entre Triazina y un dendrímero neutro, PAMAM-OHT (G=3) (Figura 14). Este dendrímero posee el mismo núcleo y ramificaciones que los dendrímeros PAMAM-CT y PAMAM-AT, pero no posee grupos terminales ionizados.

La Figura 39 muestra el espectro de absorción de Triazina en solución acuosa del dendrímero PAMAM-OHT (G = 3) ( $1 \times 10^{-4}$  M) y el de una solución saturada de Triazina en agua pura. El espectro de la droga en presencia del dendrímero hidroxilo terminal presenta las mismas bandas que el espectro de Triazina en agua, y permanece sin cambios con el tiempo (varias semanas), lo cual indica que no ocurren cambios estructurales ni la degradación química del compuesto activo.



**Figura 39.** Espectro de absorción UV-vis de Triazina en solución acuosa de dendrímero PAMAM-OHT  $1 \times 10^{-4}$  M (a) y en agua desionizada (b)

Además, el incremento de la absorbancia se puede atribuir a la solubilización adicional de Triazina en el interior del dendrímero. Estudios previos han demostrado que los microentornos interiores de la estructura de los dendrímeros PAMAM son menos



polares que el seno de la solución acuosa,<sup>188</sup> lo que favorece la incorporación de moléculas lipofílicas como Triazina en las nanocavidades de la macromolécula.

Tanto el tamaño de las cavidades del dendrímero como el volumen molecular del huésped son factores determinantes en la incorporación de compuestos en el interior de dendrímeros. El tamaño de la cavidad de la macromolécula está controlado por parámetros geométricos como el ángulo que determinan dos ramificaciones vecinas, el ángulo entre unidades de monómeros y la longitud del mismo.<sup>189</sup> El volumen molecular de la Triazina estudiada ( $V = 108.05 \text{ \AA}^3$ ), calculado a partir de la geometría optimizada utilizando el método semiempírico AM1, es adecuado para la incorporación de dicho compuesto en las cavidades interiores de dendrímeros PAMAM-OHT ( $G = 3$ ). Esto permite que el huésped pueda ser solubilizado en los nanoentornos de menor polaridad del sistema dendrímérico.

La incorporación de moléculas de compuesto activo en el interior de los dendrímeros podría ser reforzada por la formación de enlaces puente hidrógeno entre la Triazina y el dendrímero, estabilizando la asociación huésped-dendrímérico. PAMAM-OHT ( $G = 3$ ) posee grupos amida dadores de enlace puente hidrógeno en sus cavidades y grupos hidroxilo en la periferia, que pueden formar enlaces puente hidrógeno con los grupos *N*-óxido del compuesto activo.

#### 6.1.1.2g Análisis de la estabilidad del complejo Triazina - PAMAM-OHT ( $G=3$ )

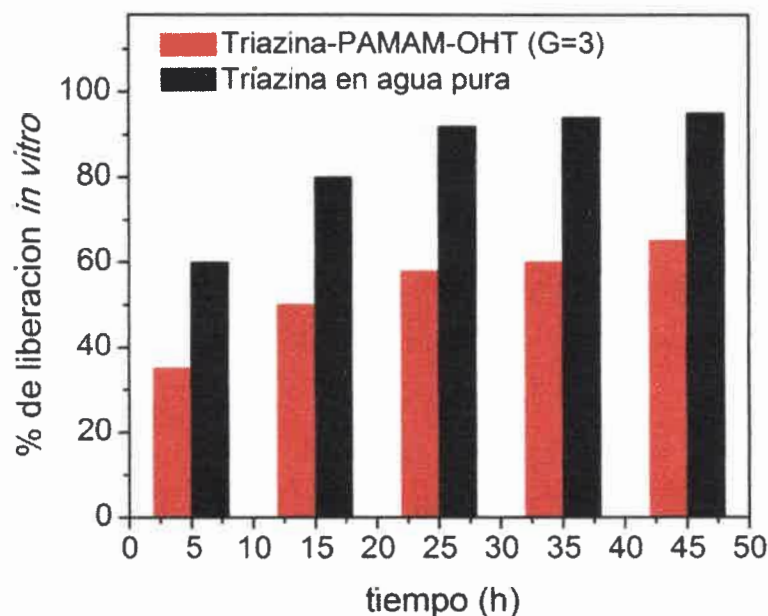
Con el objetivo de evaluar la estabilidad de la asociación Triazina - PAMAM-OHT ( $G=3$ ), las soluciones de compuesto activo y dendrímero se mantuvieron a temperatura ambiente y se analizaron periódicamente durante diez semanas. Se controló la posible aparición de precipitado, turbidez, cristalización, cambios espectrales y liberación de la droga. No se observaron cambios en las soluciones del conjugado droga-dendrímérico, resultando estables con el tiempo. Esto es muy importante si se considera que el estudio de dicho sistema tiene por objetivo la preparación de formulaciones para su futura aplicación farmacológica.

Para completar el análisis de la estabilidad del complejo Triazina - PAMAM-OHT se realizó el estudio del efecto de la temperatura en dicha asociación. Para ello se determinó el espectro de absorción de la solución acuosa del conjugado droga-dendrímérico a diferentes temperaturas, de acuerdo a como se detalla en la sección 5.5. Se encontró que el sistema es lo suficientemente estable con la temperatura, al menos en el rango estudiado.

### 6.1.1.2h Estudios de liberación *in vitro* de Triazina desde el conjugado droga-dendrímico

Se llevó a cabo el estudio de la liberación *in vitro* de Triazina mediante diálisis, tal como se detalla en la sección 5.6, con el fin de evaluar las características de liberación del complejo droga-dendrímico, lo cual es muy importante en el diseño y optimización de sistemas de administración de fármacos. Los vehículos macromoleculares que permiten una liberación lenta de la droga dan lugar a una mejora en la biodisponibilidad y disminución de los efectos secundarios del fármaco administrado, como así también una disminución en la frecuencia con la que se debe administrar.<sup>190</sup>

La Figura 40 muestra que cerca del 98% de las moléculas de Triazina fueron liberadas fuera del tubo de diálisis a las 45 horas, en ausencia de dendrímico en la solución dentro del tubo de diálisis. Luego del mismo período de tiempo, sólo el 65% del fármaco se liberó fuera del tubo de diálisis cuando el dendrímico PAMAM-OHT (G=3) está presente en la solución. Por otra parte, bajo las mismas condiciones experimentales, el 35% restante se liberó a una velocidad muy baja. Incluso luego de 24 horas no hubo cambios apreciables en la cantidad de Triazina liberada. La liberación más lenta de Triazina desde el complejo Triazina-PAMAM-OHT indica que la asociación puede prevenir la rápida liberación de la droga desde el complejo droga-dendrímico.<sup>190</sup>



**Figura 40.** Porcentajes de liberación *in vitro* de Triazina desde solución acuosa de PAMAM-OHT  $1 \times 10^{-4}$  M y desde agua pura.

Los estudios de liberación *in vitro* de Triazina muestran que las moléculas de droga asociadas al dendrímero permanecen como tales en la solución dentro del tubo de diálisis, y sólo las moléculas libres, no asociadas a moléculas de dendrímero, se transfieren fuera del tubo de diálisis en las condiciones experimentales. De esta manera, las interacciones Triazina-dendrímero, son capaces de producir una asociación estable en solución acuosa. Por lo tanto, en el caso de una aplicación médica de la formulación droga-dendrímero, el compuesto activo permanecería asociado al polímero dendrimérico.

Los resultados obtenidos a partir del estudio de la asociación Triazina y dendrímeros PAMAM con diferentes grupos terminales, indican que la presencia de dendrímeros PAMAM con grupos amino terminal ( $G = 3$ ) y grupos carboxilato terminal ( $G = 2.5$  y  $G = 4.5$ ) inducen la degradación del compuesto activo estudiado. Por lo tanto, estos polímeros no son adecuados para su aplicación como nanovehículos de Triazina. Sin embargo, el dendrímero PAMAM-OHT ( $G = 3$ ), con grupos neutros en su superficie, mostró asociación con el compuesto activo, sin provocar cambios estructurales en el mismo. La solución del dendrímero PAMAM-OHT asociado a Triazina resultó estable con el tiempo y con la temperatura; además, los estudios de liberación *in vitro* mostraron que la asociación de Triazina al dendrímero PAMAM-OHT da lugar a una liberación más lenta de la droga que cuando se encuentra sola en agua. Por lo tanto, el dendrímero neutro PAMAM-OHT tiene la capacidad para actuar como potencial vehículo molecular de Triazina.<sup>191</sup>

### **6.1.2 Evaluación de dendrímeros PAMAM y PPI como vehículos moleculares de un derivado de $N, N'$ -dióxido de fenazina con actividad antitumoral**

El compuesto  $N^5, N^{10}$ -dióxido de 7-bromo-2-hidroxi fenazina (*Fenazina*, Figura 15) es un agente citotóxico selectivo en condiciones de hipoxia, y además, presenta actividad anti *Trypanosoma cruzi*. Sin embargo, su solubilidad en agua es baja para su uso exitoso *in vivo*, reduciendo su biodisponibilidad y efectividad.<sup>111,112</sup> La asociación de este tipo de compuestos a vehículos moleculares apropiados podría aumentar su solubilidad acuosa. Por lo tanto, se evaluó la capacidad de los dendrímeros PAMAM-AT ( $G = 1$ ), PAMAM-AT ( $G = 3$ ), PAMAM-OHT ( $G = 3$ ) y PPI ( $G = 4$ ) (Figura 13, Figura 14 y Figura 15) para asociarse con Fenazina, con el propósito de seleccionar el dendrímero más adecuado para actuar como potencial vehículo.

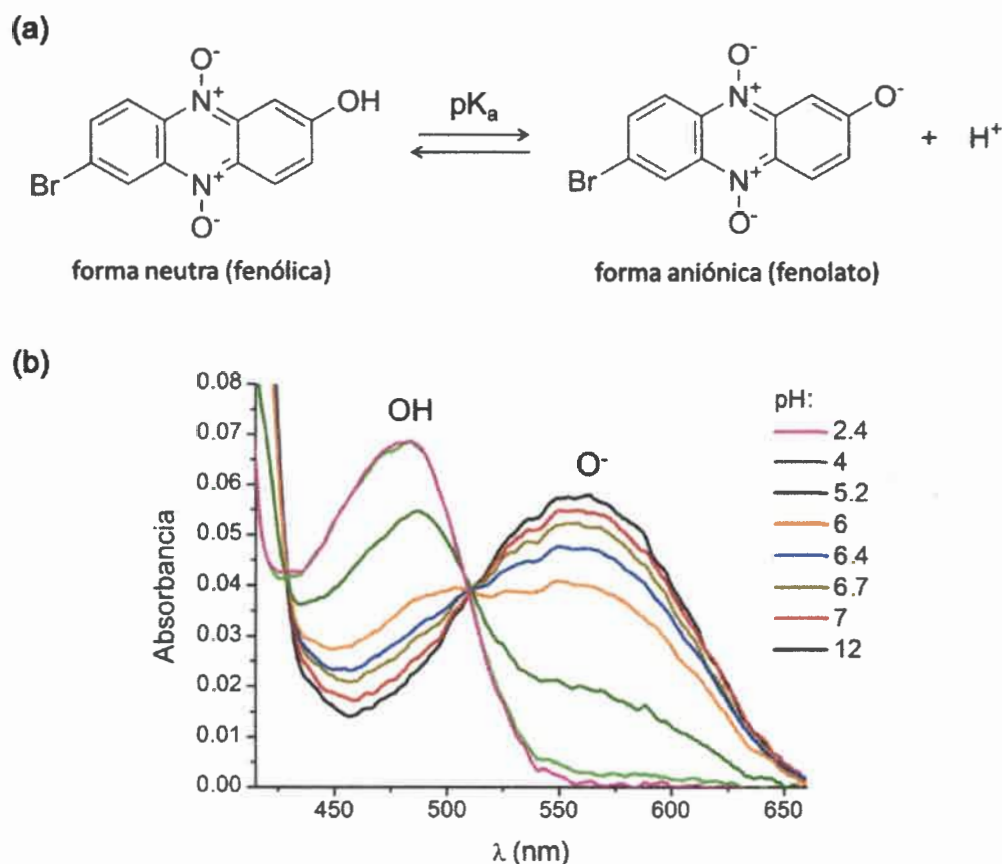
### 6.1.2.1 Determinación del pK<sub>a</sub> de Fenazina en agua

Cuando un compuesto presenta una funcionalidad ácida o básica su grado de ionización en solución acuosa está determinado por el pH de la solución y el valor de la constante de disociación ácida ( $K_a$ ). En el caso de fármacos, esta información es esencial ya que la solubilidad, como así también las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, pueden variar considerablemente cuando se comparan la forma ionizada y neutra de la molécula.<sup>192</sup> Además, si se estudia la asociación de dendrímeros con una droga ionizable, las interacciones droga-dendrímero dependerán en gran medida del estado de ionización de la droga. Por lo tanto, es importante conocer el valor de pK<sub>a</sub> de la molécula de droga estudiada.

Al analizar la estructura química de Fenazina (Figura 19) se puede ver que presenta un grupo fenol, por lo que la molécula puede ceder un protón y definirse como un ácido monoprótico. Es decir, la molécula puede encontrarse en estado fenólico neutro o como anión fenolato dependiendo del pH de la solución acuosa (Figura 41 (a)). Por lo tanto, antes de iniciar el estudio de la asociación de Fenazina a dendrímeros PAMAM y PPI, se analizaron soluciones de la droga en agua a diferentes pH por espectroscopía UV-vis y se determinó su pK<sub>a</sub>.

Para determinar el pK<sub>a</sub> de Fenazina se utilizó el método de espectroscopía UV-vis, tal como se describe en la sección 5.7. En la Figura 41(b) se muestran los espectros de absorción de una solución acuosa de Fenazina a diferentes pH. A pH 2.4 la droga presenta una banda con máximo a 482 nm; al aumentar el pH, la intensidad de esta banda disminuye y aparece una banda a 558 nm, la cual aumenta en intensidad al incrementarse el pH. De acuerdo a esto, la banda observada a 482 nm corresponde a la forma neutra de Fenazina, mientras que la banda a 558 nm se atribuye a la forma ionizada (anión fenolato). Este desplazamiento significativo al rojo del máximo de absorción con la desprotonación de la droga se debe a que en el estado anión fenolato se extiende la deslocalización de electrones  $\pi$ .<sup>193</sup>



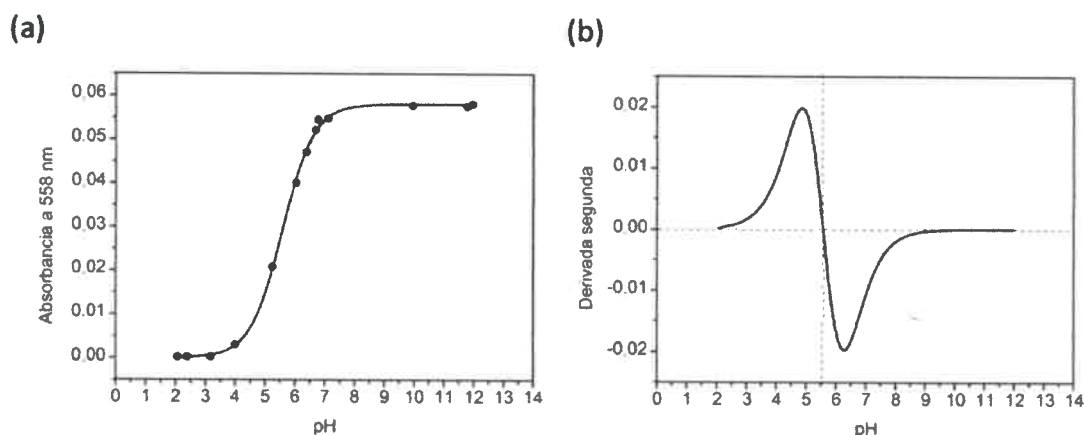


**Figura 41.** (a) Equilibrio ácido base de Fenazina. (b) Espectros de absorción UV-vis de Fenazina en solución acuosa a diferentes pH.

La banda a 482 nm corresponde a la forma neutra (fenólica) y la banda a 558 nm a la forma aniónica (fenolato).

A partir de los espectros de Fenazina en agua a diferentes pH se construyó un gráfico de Absorbancia en función del pH (Figura 42 (a)); el valor de pH del punto de inflexión de esta curva es igual al  $pK_a$  de la droga. Para obtener el valor del punto de inflexión se calculó la derivada segunda en función del pH, con lo cual se obtiene el valor del  $pK_a$  del corte de la curva con el eje x (Figura 42 (b)). Para Fenazina, el valor de  $pK_a$  determinado experimentalmente fue 5.6. Por lo tanto, a pH menores a 5.6 Fenazina se encuentra principalmente en forma neutra mientras que a pH mayores a 5.6 se encuentra principalmente como anión fenolato.



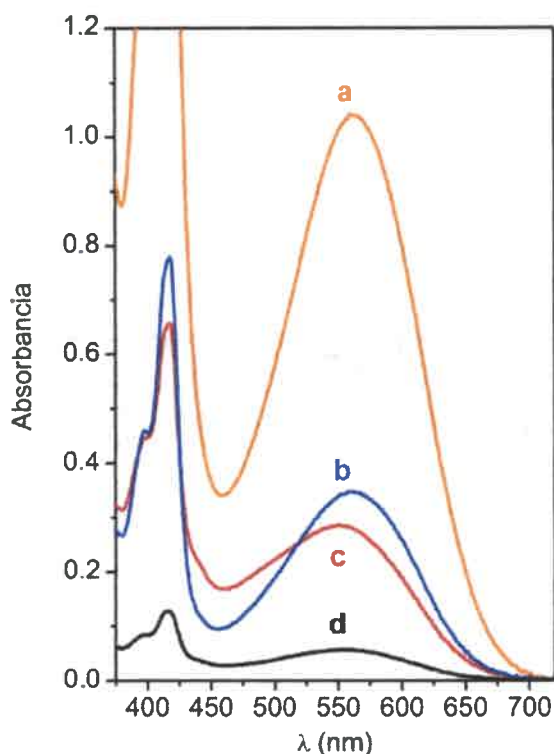


**Figura 42.** (a) Absorción UV-vis de Fenazina a 558 nm en función del pH. Los puntos representan los datos experimentales. La línea continua corresponde al ajuste de los datos experimentales. (b) Derivada segunda del ajuste del gráfico (a) en función del pH. En línea punteada se indica el corte de la curva con el eje x, el cual corresponde a pH= 5.6.

### 6.1.2.2 Estudio de la asociación Fenazina-dendrimeros

#### 6.1.2.2a Estudio de la asociación de Fenazina con dendrimeros PAMAM en agua

En la Figura 43, se muestran los espectros de absorción UV-vis de Fenazina en solución acuosa de PAMAM-AT (G=1), PAMAM-AT (G=3) y PAMAM-OHT (G=3). También se incluye el espectro obtenido para una solución saturada de la droga en agua pura. Las soluciones de Fenazina en los dendrimeros se prepararon de acuerdo al método descrito en la sección 5.8, colocando una cantidad de Fenazina que excede su límite de solubilidad acuosa ( $S_w = 2 \times 10^{-4}$  M). Como puede observarse en la figura, en presencia de los dendrimeros la absorbancia de Fenazina aumenta respecto de la solución saturada en agua pura, lo que indica que la solubilidad de la droga aumenta. En presencia de PAMAM-AT (G = 1) y (G = 3), el espectro de la droga muestra una banda bien definida a 560 nm, por lo que en las soluciones acuosas de los dendrimeros amino terminales Fenazina se encuentra principalmente como anión fenolato. En solución acuosa del dendrimero PAMAM-OHT (G = 3) el espectro de la droga también muestra una banda alrededor de 560 nm, pero en este caso la banda se ensancha en la zona de 482 nm. Por lo tanto, en presencia del dendrimero PAMAM-OHT (G = 3) hay una mayor proporción de moléculas de Fenazina en estado neutro que cuando se encuentra en presencia de los dendrimeros amino terminales.



**Figura 43.** Espectros de absorción UV-vis de Fenazina en solución acuosa de dendrímoro PAMAM-AT ( $G = 3$ ) (a), PAMAM-AT ( $G = 1$ ) (b) y PAMAM-OHT ( $G = 3$ ) (c). (Concentración de dendrímoro =  $1.25 \times 10^{-4}$  M). Se muestra también el espectro de una solución saturada de Fenazina en agua pura (d).

Del análisis de la Figura 43 se ve que, a pesar de que la concentración de dendrímoro es la misma en todos los casos, el aumento de solubilidad de la droga no fue el mismo para todos los dendrímoros. Al utilizar una solución de PAMAM-AT ( $G = 3$ )  $1.25 \times 10^{-4}$  M, se logró un aumento de 18.4 veces la solubilidad de Fenazina respecto de su solubilidad en agua, mientras que al usar el dendrímoro PAMAM-OHT ( $G = 3$ ) en una misma concentración la solubilidad se incrementó 5 veces (Tabla 3). Estos dos dendrímoros poseen igual tamaño y número de grupos terminales, sin embargo, se diferencian en el tipo de grupo terminal. Por otro lado, al utilizar los dendrímoros amino terminales ( $G = 3$  y  $G = 1$ ) en una misma concentración, los resultados indican un mayor aumento de la solubilidad de la droga respecto a su solubilidad en agua pura cuando se utiliza el dendrímoro de  $G = 3$  ( $18.4 S_w$ ) que cuando se utiliza el de  $G = 1$  ( $6.15 S_w$ ). Estos dos dendrímoros tienen el mismo tipo de grupo superficial pero se diferencian en el tamaño y número de grupos terminales. Por lo tanto, el incremento de solubilidad de la droga

estudiada depende tanto del tipo de grupos terminales que presenta el dendrímero PAMAM como de su generación (Tabla 3).

**Tabla 3.** Características de los dendrímeros PAMAM utilizados y aumento de solubilidad en agua de Fenazina producido por cada dendrímero (Concentración de dendrímero =  $1.25 \times 10^{-4}$  M).

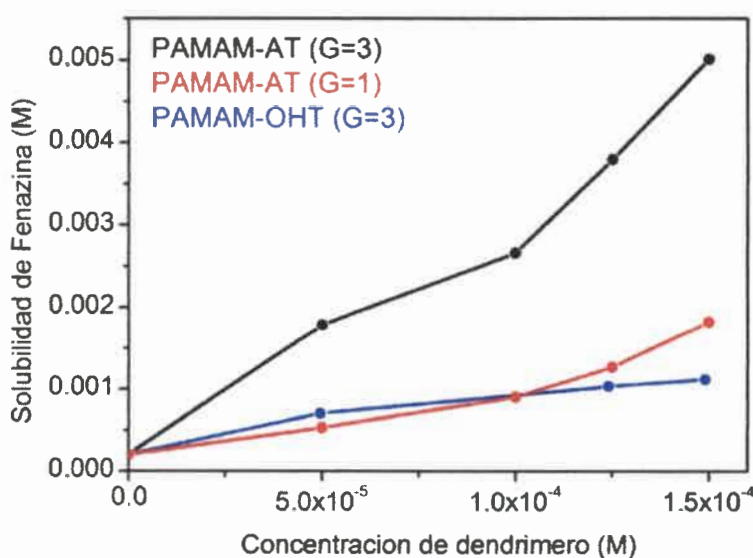
Dendrímero	Grupo	Carga	Peso molecular	Aumento de
PAMAM	terminal	superficial <sup>b</sup>	(g/mol)	solubilidad
G=1 AT	8 NH <sub>2</sub>	Catiónico	1430	6.15 S <sub>w</sub> <sup>a</sup>
G=3 AT	32 NH <sub>2</sub>	Catiónico	6909	18.4 S <sub>w</sub> <sup>a</sup>
G=3 OHT	32 OH	Neutro	6941	5 S <sub>w</sub> <sup>a</sup>

<sup>a</sup>S<sub>w</sub> =  $2 \times 10^{-4}$  M Solubilidad en agua. <sup>b</sup>de (Klajnert, 2003)<sup>186</sup>

El incremento de solubilidad de una droga en soluciones acuosas de dendrímeros PAMAM se puede atribuir a diferentes mecanismos de interacción entre el dendrímero y el fármaco. En primer lugar, la existencia de cavidades relativamente no polares en el interior de los dendrímeros les confiere la capacidad de encapsular huéspedes mediante interacciones lipofílicas.<sup>49,185,194</sup> Por otro lado, las aminas terciarias y los grupos amida en las nanocavidades de los dendrímeros pueden interactuar con las moléculas huéspedes por formación de enlaces puente hidrógeno.<sup>194,195</sup> Además, si el dendrímero presenta grupos terminales cargados, como los dendrímeros PAMAM-AT y PAMAM-CT, pueden asociarse a moléculas de droga cargadas a través de interacciones electrostáticas.<sup>194,196-199</sup> Como se comentó antes, Fenazina tiene dos formas que se encuentran en equilibrio: la forma fenólica neutra y la forma fenolato aniónica (Figura 41 (a)). En las soluciones acuosas de los dendrímeros PAMAM-AT (G = 3), PAMAM-AT (G = 1) y PAMAM-OHT (G = 3), Fenazina se encuentra principalmente en forma aniónica (pH soluciones dendriméricas > 7, pK<sub>a</sub> Fenazina = 5.6). Por lo tanto, en las soluciones de los dendrímeros PAMAM-AT, la droga puede asociarse a los dendrímeros a través de interacciones electrostáticas con los grupos terminales catiónicos de la macromolécula. En el caso del dendrímero PAMAM-OHT, este tipo de interacción no es posible, pero puede asociarse a la droga a través de interacción lipofílica y formación de enlaces puente hidrógeno en las nanocavidades, como así también por la formación de enlaces puente hidrógeno con los grupos OH terminales del dendrímero.

Varios estudios demuestran que la interacción electrostática de una droga ionizada con los grupos terminales cargados del dendrímico es el factor fundamental en el aumento de solubilidad, siendo más importante que otro tipo de interacciones, como la encapsulación lipofílica o interacciones puente hidrógeno.<sup>194,200</sup> Por lo tanto, si bien PAMAM-AT (G=3) y PAMAM-OHT (G=3) presentan el mismo tamaño e interior, la falta de grupos superficiales cargados positivamente en PAMAM-OHT (G=3) limita el aumento de solubilidad de Fenazina. A su vez, si bien tanto PAMAM-AT (G=3) como PAMAM-AT (G=1) presentan grupos superficiales cargados positivamente, capaces de asociarse a Fenazina a través de interacciones electrostáticas, el dendrímico de G=3 presenta un mayor número de grupos terminales catiónicos que el de G=1, por lo que es capaz de asociarse a un mayor número de moléculas de Fenazina y, por lo tanto, aumentar más su solubilidad en agua.

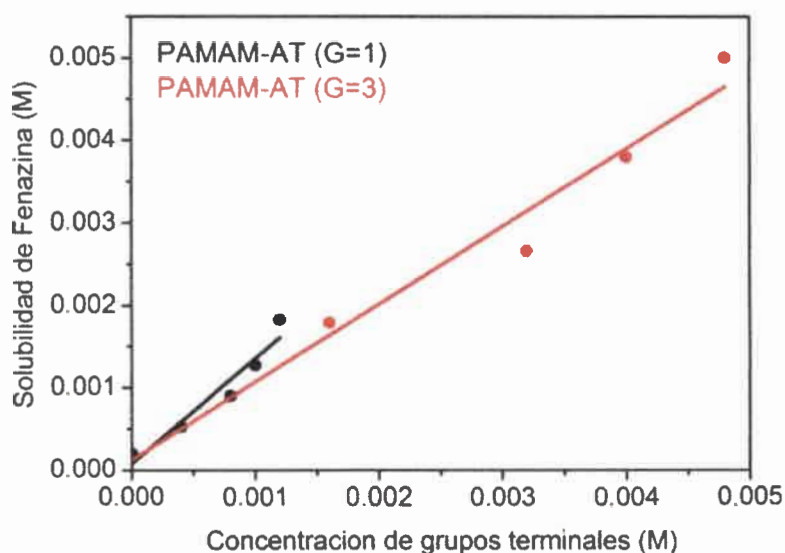
En la Figura 44 se observa la solubilidad de Fenazina obtenida al usar diferentes concentraciones de los dendrímeros PAMAM estudiados. Se puede ver que al aumentar la concentración de los dendrímeros aumenta la cantidad de Fenazina solubilizada. En el caso de los dendrímeros PAMAM-AT este incremento de la solubilidad de la droga es más notorio que para el dendrímico OH terminal. Para los dendrímeros amino terminales, una concentración más alta de dendrímico significa una mayor concentración de grupos catiónicos y por lo tanto, más oportunidades para la interacción electrostática con moléculas de droga cargadas negativamente.



**Figura 44.** Solubilidad acuosa de Fenazina en función de la concentración de dendrímico



Como se comentó antes, para una misma concentración de dendrímero, PAMAM-AT (G=3) es capaz de aumentar más la solubilidad de Fenazina que PAMAM-AT (G=1) ya que el dendrímero de G=3 presenta más grupos superficiales cargados que el de G=1. Sin embargo, si la comparación se hace para una misma concentración de grupos amino terminales se encuentra que el dendrímero PAMAM-AT de menor G es capaz de incrementar más la solubilidad de la droga que el de mayor G (Figura 45). Esto está de acuerdo con los estudios realizados por otros autores y se debe a que a medida que aumenta la G del dendrímero se produce una congestión de los grupos amino terminales en la superficie, con lo cual aumenta el impedimento estérico para la asociación electrostática de moléculas de droga.<sup>200,201</sup>



**Figura 45.** Solubilidad de Fenazina en función de la concentración de grupos amino terminales de los dendrímeros PAMAM-AT (G=1) (negro) y PAMAM-AT (G=3) (rojo).

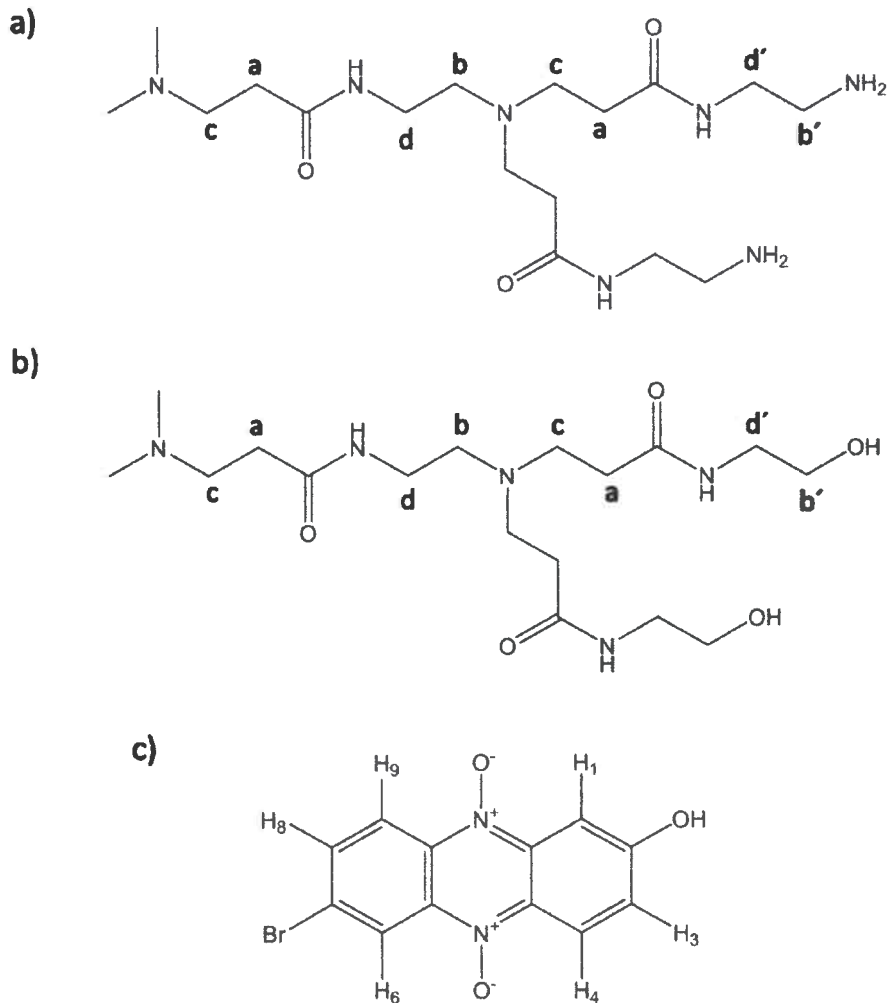
#### 6.1.2.2b Análisis de la asociación de Fenazina con dendrímeros PAMAM mediante espectroscopía $^1\text{H-NMR}$

La asociación de Fenazina a los dendrímeros PAMAM también se estudió a través de espectroscopía  $^1\text{H-NMR}$ . Las técnicas NMR son una herramienta muy útil para caracterizar complejos huésped-dendrímero, ya que brindan información sobre las interacciones intermoleculares presentes en el sistema.<sup>202</sup>

Tal como se muestra en la Figura 46, los dendrímeros PAMAM-AT (G = 1) y PAMAM-OHT (G = 3) presentan seis tipos de protones: cuatro que corresponden a los grupos metilénicos interiores (a-d) y dos correspondientes a los grupos metilénicos de la

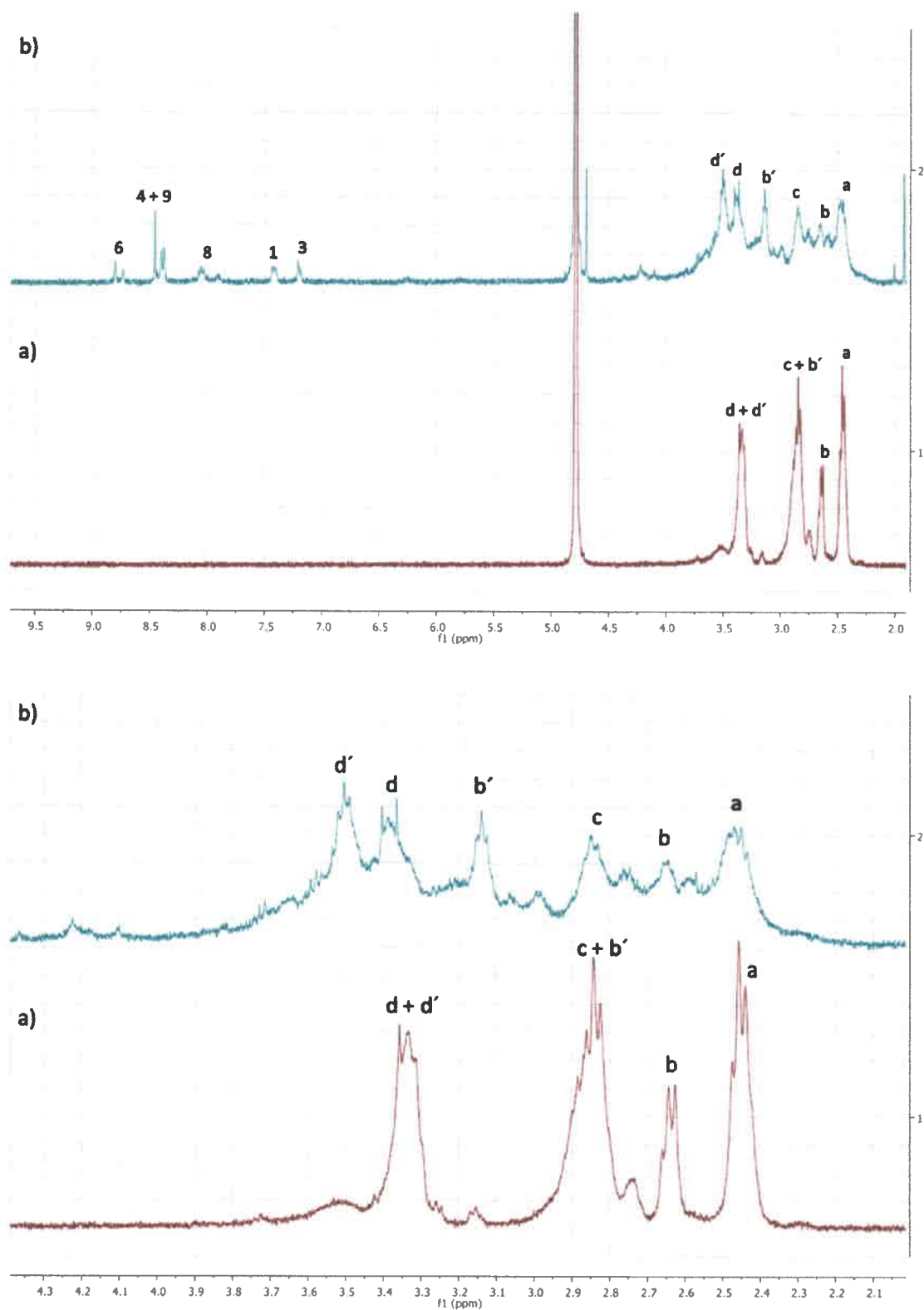


última capa del dendrímico (b' y d'), próximos a los grupos terminales (Figura 46 (a) y (b)).<sup>136,203</sup> En los espectros  $^1\text{H-NMR}$  de estos dendrímicos, el pico para los protones d' generalmente se solapa con el de los protones d, mientras que el de los protones b' se superpone con el de los protones c.<sup>202</sup> Por otro lado, Fenazina presenta 6 tipos de protones en su estructura (Figura 46 (c)).



**Figura 46.** Estructuras químicas y asignación de los diferentes protones de: PAMAM-AT (G = 1) (a), PAMAM-OHT (G = 3) (b), y Fenazina (c)

En la Figura 47 se muestran los espectros  $^1\text{H-NMR}$  del dendrímico PAMAM-AT (G = 1) en ausencia y en presencia de Fenazina, en  $\text{D}_2\text{O}$ , con la correspondiente asignación de picos, de acuerdo a las estructuras de la Figura 46 (a) y (c).



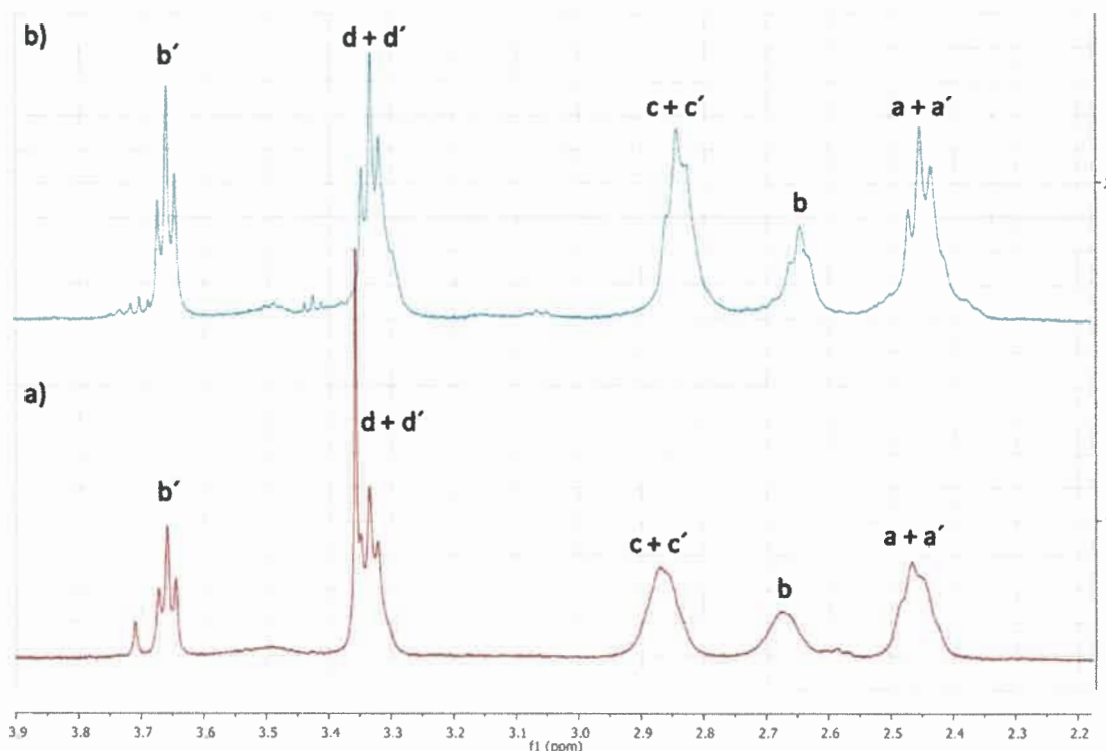
**Figura 47.** Espectros  $^1\text{H-NMR}$  del dendrímoro PAMAM-AT (G = 1) en ausencia a) y en presencia b) de Fenazina, en  $\text{D}_2\text{O}$ .

Se muestra el espectro completo (arriba) y la zona de las señales del dendrímoro ampliada (abajo).

En los espectros  $^1\text{H-NMR}$  de PAMAM-AT ( $G = 1$ ) en ausencia y presencia de la droga (Figura 47 (a) y (b)), las señales de los protones del dendrímero aparecen en la zona de los hidrógenos alifáticos, entre 2 y 4 ppm. A su vez, las señales de los protones de Fenazina aparecen entre 7 y 9 ppm,<sup>111,112</sup> tal como se puede ver en la Figura 47 (b) superior. Al analizar las señales de los protones del dendrímero en ausencia y en presencia de la droga (Figura 47 (a) y (b) inferiores), se observa un corrimiento significativo a campo bajo de las señales de los protones metilénicos ubicados en la última capa del dendrímero (Hb' y Hd') cuando está en presencia de Fenazina. Esto indica la existencia de interacciones iónicas entre los grupos amino terminales del dendrímero y el grupo fenólico de Fenazina.<sup>200,202,204,205</sup> Por otro lado, numerosos estudios indican que la encapsulación del huésped en el interior del dendrímero corre las señales de los protones internos del dendrímero a campo alto.<sup>200</sup> Sin embargo, en el caso del sistema Fenazina - PAMAM-AT ( $G = 1$ ) no se observa corrimiento de las señales de los protones internos del dendrímero a campo alto en presencia de la droga. Por lo tanto, tal como se ha demostrado en estudios previos,<sup>194</sup> los grupos amino terminales son el factor predominante en la solubilización de un fármaco aniónico por dendrímeros catiónicos.

Por otro lado, en la Figura 48 se muestra el espectro  $^1\text{H-NMR}$  del dendrímero PAMAM-OHT ( $G = 3$ ) en ausencia y en presencia de Fenazina, en  $\text{D}_2\text{O}$ . Se muestra la zona de los protones alifáticos, donde aparecen las señales de los protones del dendrímero, con la correspondiente asignación de picos, de acuerdo a la estructura de la Figura 46 (b).<sup>202</sup> El espectro del dendrímero prácticamente no cambia cuando está en presencia de la droga. Esto permite inferir que Fenazina no se asocia al dendrímero PAMAM-OHT ( $G = 3$ ) ya que no hay evidencias de interacciones iónicas, lipofílicas o puente hidrógeno entre la droga y la macromolécula. Sin embargo, en los estudios por espectroscopía UV-vis se observó un incremento de la solubilidad de la droga en solución acuosa de PAMAM-OHT ( $G = 3$ ) respecto de la solución saturada en agua pura (Figura 43). Este incremento de solubilidad se puede atribuir a que las soluciones acuosas de dendrímero PAMAM-OHT tienen un pH más básico que el agua pura. Por lo tanto, en presencia del dendrímero PAMAM-OHT, Fenazina se encuentra más ionizada que en agua pura; como la droga ionizada es más soluble en agua que cuando se encuentra en estado neutro, su solubilidad aumenta en presencia del dendrímero. En el caso de los dendrímeros PAMAM-AT, cuyas soluciones acuosas también son más básicas que el agua pura, el incremento de solubilidad de Fenazina también se debería, en parte, a un incremento del pH de la solución, pero a diferencia del dendrímero OHT, en los dendrímeros amino terminales la solubilidad de la

droga también se debería a la asociación con la macromolécula, de acuerdo a la evidencia encontrada por espectroscopia  $^1\text{H-NMR}$ . Para corroborar estas hipótesis se analizó la solubilidad de Fenazina en PBS y en soluciones de los dendrímeros PAMAM-AT y OHT en PBS.



**Figura 48.** Espectros  $^1\text{H-NMR}$  del dendrímero PAMAM-OHT ( $G = 3$ ) en ausencia a) y en presencia b) de Fenazina, en  $\text{D}_2\text{O}$ .

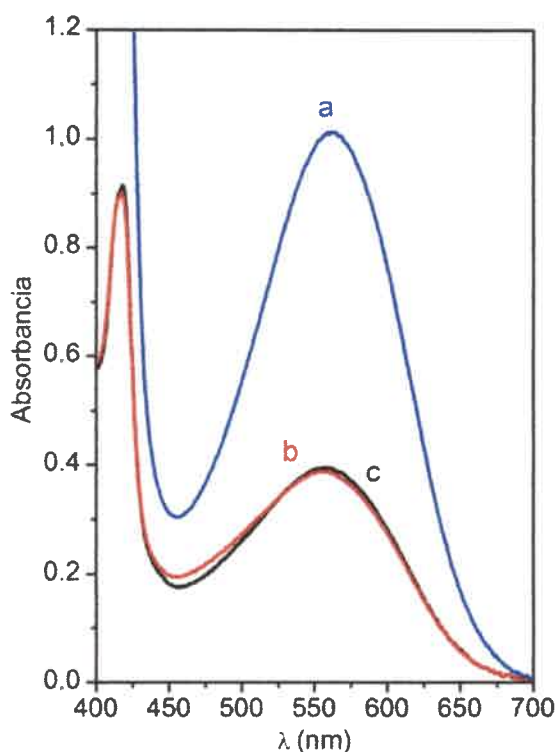
Se muestra la zona de las señales del dendrímero.

### 6.1.2.2c Estudio de la asociación de Fenazina con dendrímeros PAMAM en PBS

Dependiendo del pH, Fenazina puede encontrarse en estado fenólico neutro o como anión fenolato, por lo tanto, además del estudio de la asociación de Fenazina con los dendrímeros PAMAM en agua, se investigó la asociación droga-dendrímero controlando el pH de la solución. Para esto, se utilizó PBS ( $\text{pH} = 7.4$ ); en estas condiciones Fenazina se encuentra principalmente como anión fenolato ( $\text{pK}_a = 5.6$ ).

En la Figura 49 se muestran los espectros de absorción UV-vis de Fenazina en presencia de dendrímeros PAMAM-AT ( $G=3$ ) y PAMAM-OHT ( $G=3$ ) en PBS. Además se muestra el espectro de una solución saturada de la droga en PBS para su comparación. Las soluciones de Fenazina en los dendrímeros se prepararon colocando una cantidad de droga

que excede su solubilidad en PBS ( $S_{\text{PBS}} = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$ ), de acuerdo al método descrito en la sección 5.8.



**Figura 49.** Espectros de absorción UV-vis de Fenazina en presencia de dendrímero PAMAM-AT (G=3) (a) y PAMAM-OHT (G=3) (b) en PBS. (Concentración de dendrímero =  $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ ). Se muestra también el espectro de una solución saturada de Fenazina en PBS (c) ( $S_{\text{PBS}} = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$ )

Debido a que las soluciones de Fenazina en ausencia y presencia de dendrímero se prepararon en buffer PBS, el pH de las soluciones es el mismo en todos los casos; por lo tanto, un incremento en la solubilidad de la droga se puede atribuir exclusivamente a la asociación de la misma con la macromolécula dendrímica y no a un incremento del pH de la solución debido a la presencia del dendrímero. En solución de PAMAM-AT (G=3) la absorbancia de Fenazina aumenta respecto de la solución saturada de droga en PBS, indicando que la solubilidad de la droga aumenta (Figura 49). En las condiciones de trabajo (pH = 7.4), los grupos amino terminales del dendrímero PAMAM-AT (G=3) se encuentran ionizados,<sup>186</sup> al igual que el grupo fenol de la droga. Por lo tanto, el incremento de solubilidad de Fenazina se puede atribuir a la asociación de la droga al dendrímero a través de las interacciones iónicas entre los grupos terminales del dendrímero y el grupo fenolato del compuesto terapéutico. Sin embargo, en el caso de PAMAM-OHT (G = 3) la

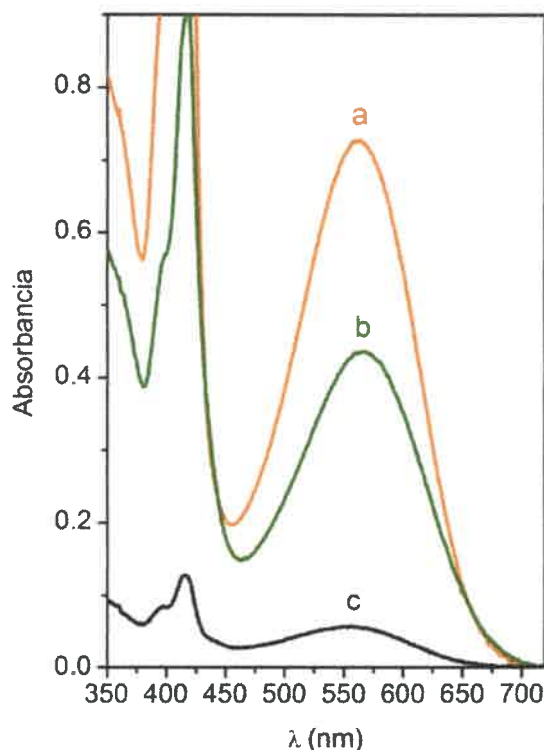


absorbancia de Fenazina en presencia del dendrímero en PBS no aumenta respecto de la solución saturada de la droga en PBS, indicando que la solubilidad de Fenazina no aumenta en presencia del dendrímero. Por lo tanto, tal como se comentó antes, Fenazina no se asociaría al dendrímero PAMAM-OHT, y el incremento de solubilidad que se observa al comparar la solución de Fenazina en agua pura respecto de la solución acuosa de Fenazina en PAMAM-OHT (Figura 43) se debería sólo al incremento del pH de la solución debido a la presencia del dendrímero.

#### 6.1.2.2d Estudio de la asociación de Fenazina con el dendrímero PPI (G=4)

Varios autores que han estudiado la asociación de drogas aniónicas, como Fenazina, a dendrímeros PAMAM-AT (G=3) y PPI (G=4), encontraron que el dendrímero PPI tiene mayor capacidad para aumentar la solubilidad de la droga que PAMAM. Tanto PAMAM-AT (G=3) como PPI (G=4) presentan 32 grupos amina primaria en su superficie capaces de interactuar con la droga aniónica a través de interacciones electrostáticas. Sin embargo, el interior del dendrímero PPI es más hidrofóbico que el del dendrímero PAMAM; por lo tanto, además de las interacciones electrostáticas con los grupos superficiales, PPI tiene mayor capacidad que PAMAM de asociarse a la droga a través de interacciones lipofílicas en las nanocavidades de la estructura dendrímica. Entonces, teniendo en cuenta esto, se propuso la asociación de Fenazina al dendrímero PPI (G=4) como una estrategia para obtener un incremento de solubilidad mayor que con PAMAM-AT (G=3). Teniendo en cuenta que PPI (G=4) presenta el mismo número de grupos amino terminales catiónicos que PAMAM-AT (G=3) y que tiene mayor capacidad de encapsular moléculas de droga, se esperaba que PPI fuera capaz de incrementar más la solubilidad de Fenazina que PAMAM para una misma concentración de dendrímero.

Se prepararon soluciones de Fenazina en los dendrímeros PAMAM-AT (G=3) y PPI (G=4) de acuerdo al método descrito en la sección 5.8. En la Figura 50 se observan los espectros de absorción UV-vis de Fenazina en presencia de los dendrímeros en agua junto con el espectro de una solución saturada de la droga en agua pura. Se puede ver que los dos dendrímeros aumentan la solubilidad de Fenazina, sin embargo, contrario a lo esperado, PAMAM-AT (G=3) aumenta más la solubilidad de la droga que PPI (G=4) para una misma concentración de dendrímero ( $1 \times 10^{-4}$  M).



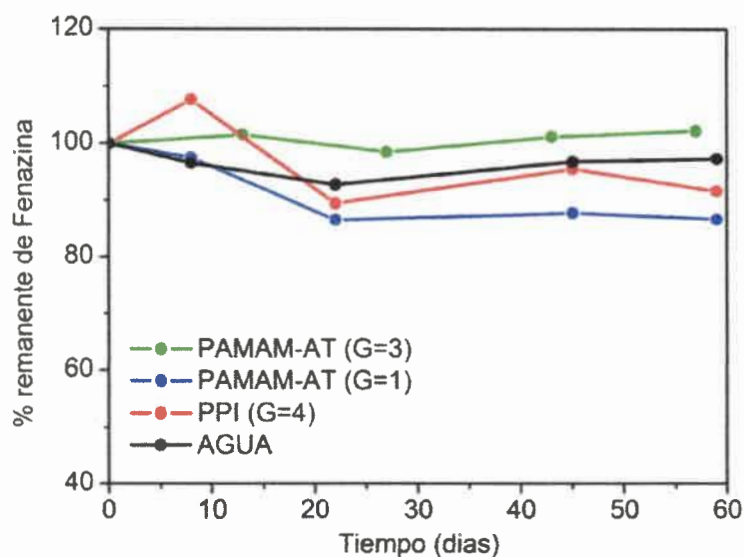
**Figura 50.** Espectros de absorción UV-vis de Fenazina en solución acuosa de dendrímoro PAMAM-AT (G = 3) (a) y PPI (G = 4) (b). (Concentración de dendrímoro =  $1 \times 10^{-4}$  M). Se muestra también el espectro de una solución saturada de Fenazina en agua pura (c).

Como se comentó antes, ambos dendrímoros presentan el mismo número de grupos amina primaria en su superficie. Los valores de  $pK_a$  para estos grupos amina son 9.75 para PPI<sup>206</sup> y alrededor de 8.5-9.9 para PAMAM<sup>42,45,187</sup>; además, el valor de pH de las soluciones de dendrímoro-droga son menores a estos valores de  $pK_a$ , por lo que el número de grupos amino terminales catiónicos es el mismo en los dos tipos de dendrímoros.<sup>207</sup> Por lo tanto, las diferentes capacidades de solubilización de Fenazina de los dendrímoros PAMAM y PPI no se pueden atribuir a una diferencia en el número de cargas superficiales. Respecto al interior de las macromoléculas, PPI (G=4) tiene un interior mucho más lipofílico que PAMAM-AT (G=3), lo que sugiere que el dendrímoro PPI debería ser capaz de encapsular más moléculas de droga que PAMAM,<sup>207</sup> sin embargo, esto es opuesto a los resultados encontrados. Las unidades de ramificación de los dendrímoros PPI son mucho más cortas que las de los dendrímoros PAMAM (4 versus 7 enlaces), por lo que PPI (G=4) es mucho más pequeño que PAMAM-AT (G=3) ( $PM_{PPI} = 3513$  Da frente a  $PM_{PAMAM} = 6909$  Da, diámetro PPI =  $2.3 \text{ nm}$ <sup>208</sup> frente a diámetro PAMAM =  $3.0 \text{ nm}$ <sup>11</sup>). Por lo tanto, en

el dendrímero PPI, la densidad de grupos superficiales es mayor. Esto da lugar a un mayor impedimento estérico en la unión de moléculas de Fenazina, con lo cual disminuye la cantidad de fármaco unido a la superficie del dendrímero respecto del dendrímero PAMAM. Teniendo en cuenta esto último y que en este tipo de sistemas droga-dendrímero las interacciones iónicas superficiales contribuyen mucho más al aumento de la solubilidad del fármaco que la encapsulación en las nanocavidades mediante interacciones lipofílicas y enlaces puente hidrógeno,<sup>194</sup> se puede explicar porque el dendrímero PAMAM-AT (G=3) aumenta más la solubilidad de Fenazina que PPI (G=4). Resultados similares fueron encontrados por Shao y colaboradores<sup>207</sup> al comparar la capacidad de PAMAM-AT (G=3) y PPI (G=4) para encapsular el fármaco aniónico fenilbutazona.

#### 6.1.2.2e Análisis de la estabilidad de los complejos Fenazina-dendrímero

Con el objetivo de evaluar la estabilidad de la asociación entre Fenazina y los dendrímeros utilizados, las soluciones de los complejos droga-dendrímero se mantuvieron a temperatura ambiente y se analizaron periódicamente por espectroscopía UV-vis. En la Figura 51 se muestra la estabilidad de Fenazina en ausencia y presencia de los dendrímeros en agua con el tiempo.



**Figura 51.** Estabilidad de Fenazina en ausencia y presencia de los dendrímeros en agua durante dos meses.

(Concentración de dendrímero =  $1.0 \times 10^{-4}$  M)

Se puede ver que no hubo variaciones significativas en el porcentaje remanente de Fenazina en solución en función del tiempo, ya sea que la droga se encuentre en agua pura o en solución acuosa de los dendrímeros PAMAM-AT (G=1), PAMAM-AT (G=3) o PPI (G=4), indicando que las asociaciones droga-dendrímero son estables con el tiempo.

Además, se controló la posible aparición de precipitado, turbidez, cristalización y cambio de color, pero no se observaron cambios. Esto es muy importante si se considera que el estudio de dichos sistemas tiene por objetivo la preparación de formulaciones para su futura aplicación farmacológica.

#### **6.1.2.2f Análisis de la biocompatibilidad y actividad biológica de los complejos Fenazina-dendrímero**

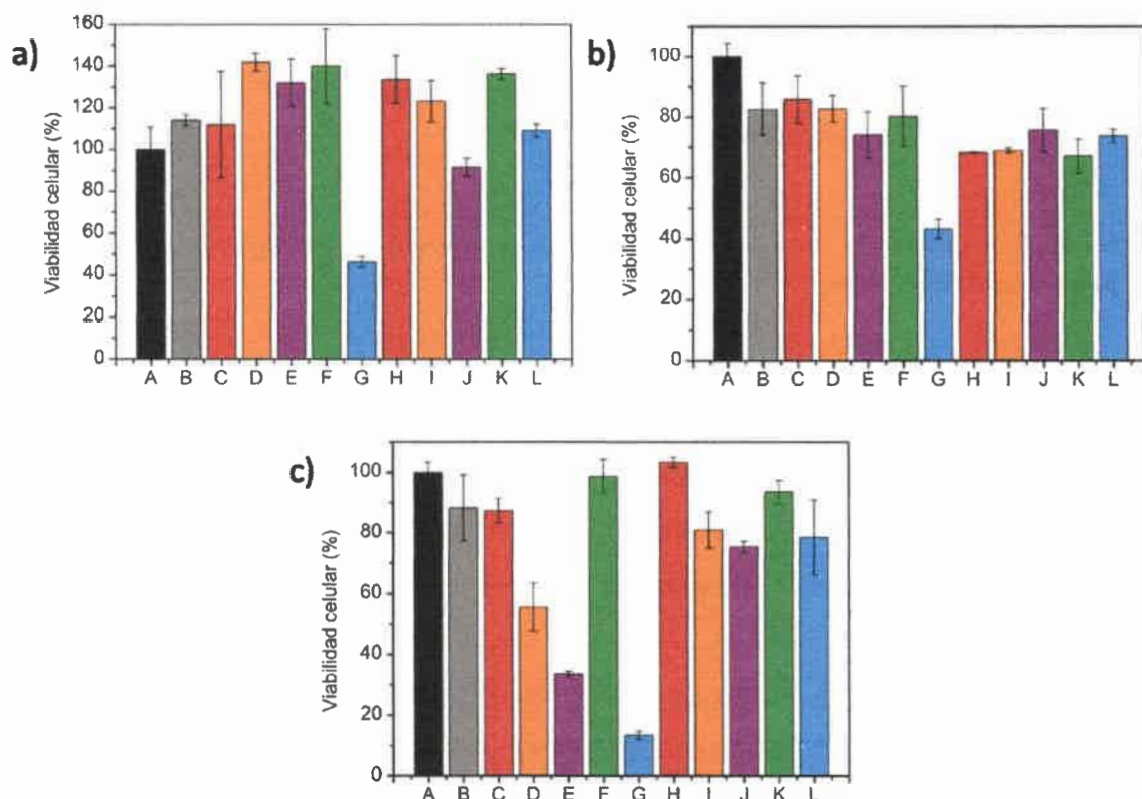
Teniendo en cuenta que los sistemas Fenazina-dendrímero se investigan para su potencial aplicación en el desarrollo de formulaciones de uso clínico, es importante que, una vez llevados a cabo los estudios fisicoquímicos, se analice la biocompatibilidad de dichos sistemas. Por lo tanto, en el marco de esta tesis doctoral, se inició el análisis de la biocompatibilidad de los complejos Fenazina-dendrímero a través de ensayos de citotoxicidad.

Se determinaron los efectos citotóxicos de Fenazina, de los dendrímeros PAMAM-AT (G=1), PAMAM-AT (G=3) y PPI (G=4) y de sus correspondientes complejos con Fenazina, en células normales MDCK (derivada de riñón canino) y en células tumorales MCF-7 (adenocarcinoma de mama) y Hep G2 (hepatocarcinoma), mediante ensayos MTT, de acuerdo a como se detalla en la sección 5.11. En la Figura 52 se muestran los porcentajes de viabilidad celular obtenidos en cada caso.

Al analizar la viabilidad de las células normales MDCK (Figura 52 a), se puede ver que, en general, tanto la droga sola, como los dendrímeros y complejos Fenazina-dendrímero no presentan efecto citotóxico (o el mismo es muy bajo). Sin embargo, en el caso de las células MDCK tratadas con PPI (G=4), el porcentaje de viabilidad fue sólo del 46.4%, mucho menor que el observado para las células tratadas con los dendrímeros PAMAM-AT. Para dendrímeros catiónicos, como los PAMAM-AT y PPI, se conoce que la carga superficial es el factor predominante en la citotoxicidad del polímero.<sup>67</sup> Tanto PAMAM-AT (G=3) como PPI (G=4) tienen 32 grupos amina primaria en la superficie, por lo que se esperaría que ambos dendrímeros presenten una citotoxicidad similar. Sin embargo, el dendrímero PPI (G=4) tiene un interior más lipofílico que PAMAM-AT,



siendo capaz de encapsular la región lipofílica de los fosfolípidos que forman la membrana celular.<sup>207</sup> De esta manera, el dendrímero PPI (G=4) tienen una mayor capacidad de perturbación de la estabilidad de la membrana celular que el dendrímero PAMAM-AT (G=3), y muestra una citotoxicidad mayor.<sup>200</sup>



**Figura 52.** Viabilidad de células **a)** MDCK, **b)** MCF-7 y **c)** Hep G2 incubadas con Fenazina, PAMAM-AT (G=1), PAMAM-AT (G=3), PPI (G=4) y sus correspondientes complejos con Fenazina luego de 24 h de incubación.

**A)** Control, **B)**  $2 \times 10^{-5}$  M Fenazina, **C)**  $0.5 \times 10^{-5}$  M PAMAM-AT (G=3), **D)**  $1.25 \times 10^{-5}$  M PAMAM-AT (G=3), **E)**  $1.5 \times 10^{-5}$  M PAMAM-AT (G=3), **F)**  $1.25 \times 10^{-5}$  M PAMAM-AT (G=1), **G)**  $1 \times 10^{-5}$  M PPI (G=4), **H)**  $0.5 \times 10^{-5}$  M PAMAM-AT (G=3) +  $1.8 \times 10^{-4}$  M Fenazina, **I)**  $1.25 \times 10^{-5}$  M PAMAM-AT (G=3) +  $3.8 \times 10^{-4}$  M Fenazina, **J)**  $1.5 \times 10^{-5}$  M PAMAM-AT (G=3) +  $5 \times 10^{-4}$  M Fenazina, **K)**  $1.25 \times 10^{-5}$  M PAMAM-AT (G=1) +  $1.27 \times 10^{-4}$  M Fenazina, **L)**  $1 \times 10^{-5}$  M PPI (G=4) +  $1.6 \times 10^{-4}$  M Fenazina.  $\pm$  Desviación estándar (n=3)

En relación a la línea celular MDCK, es de notar que en algunas de las condiciones ensayadas se evidencian valores de viabilidad superiores al control. Estos resultados podrían sugerir un efecto proliferativo de los compuestos ensayados sobre las células.



Hallazgos similares, relacionados a un efecto proliferativo, han sido reportados por otros autores.<sup>172,209,210</sup>

A diferencia de lo observado en las células normales MDCK, en las células tumorales MCF-7 y Hep G2 (Figura 52 b y c), Fenazina y casi todos los dendrímeros y complejos Fenazina-dendrímero presentaron efecto citotóxico, en mayor o menor grado. Además, en las células tumorales Hep G2, el incremento de la concentración de dendrímero PAMAM-AT (G=3) afecta la viabilidad celular de modo dosis-dependiente. Esto está de acuerdo con estudios *in vitro* e *in vivo* llevados a cabo por otros autores, quienes demostraron que los dendrímeros catiónicos, tales como los dendrímeros PAMAM-AT, pueden presentar cierta toxicidad, la cual depende de la concentración del dendrímero (a mayor concentración de dendrímero mayor citotoxicidad).<sup>68-70</sup>

Por otro lado, se observa que cuando el dendrímero PAMAM-AT (G=3) se asocia a las moléculas de droga, la viabilidad de las células Hep G2 es mayor que para el dendrímero sólo. De esta manera, la asociación de fármacos aniónicos, como Fenazina, a dendrímeros con grupos terminales catiónicos, a través de interacciones iónicas, es una buena estrategia no sólo para aumentar la solubilidad de la droga en agua, sino también para reducir significativamente los efectos citotóxicos del vehículo policationico por enmascaramiento de la carga superficial.<sup>53,211</sup>

Al igual que para las células normales MDCK, en las células tumorales el dendrímero PPI (G=4) reduce significativamente la viabilidad celular (viabilidad observada: 13.49 % para Hep G2 y 43.25 % para MCF-7). Sin embargo, cuando la molécula de polímero se asocia a las moléculas de droga la viabilidad celular aumenta significativamente (viabilidad observada: 78.64 % para Hep G2 y 73.84 %, para MCF-7), debido al enmascaramiento de la carga superficial.<sup>53,211</sup>

Algo importante de notar es que, al comparar los dos tipos de células tumorales, se puede ver que las células MCF-7 son más sensibles a los complejos Fenazina-dendrímero que las Hep G2. Por lo que este resultado permite inferir que, en principio, los complejos Fenazina-dendrímero serían más efectivos en el tratamiento de un adenocarcinoma de mama que un hepatocarcinoma.

Si bien es necesario profundizar en los estudios de citotoxicidad y de capacidad antitumoral de los complejos Fenazina-dendrímero, estos resultados muestran algunas tendencias importantes. Por un lado, que la mayoría de los complejos Fenazina-PAMAM ensayados no son citotóxicos en las células normales MDCK pero sí en las células tumorales Hep G2 y MCF-7. Además, existe mayor susceptibilidad celular por parte de las

células MCF-7 a los complejos Fenazina-dendrímico, por lo que la evaluación de los efectos citotóxicos sobre líneas celulares tumorales de orígenes distintos mejora el espectro de posibles blancos a aplicar una eventual terapia basada en estos complejos Fenazina-dendrímico.

De acuerdo a los resultados obtenidos del estudio de la asociación de Fenazina con los dendrímeros PAMAM y PPI, los dendrímeros PAMAM-AT y el dendrímico PPI son los que presentan mayor capacidad para asociarse a Fenazina e incrementar su solubilidad acuosa. Los grupos amino de la superficie dendrímica son esenciales en el proceso de solubilización, ya que la asociación Fenazina/PAMAM-AT y Fenazina/PPI se debe a interacciones iónicas entre los grupos amino terminales del dendrímico y el grupo fenólico de la droga. Además, las soluciones de los complejos Fenazina-dendrímico resultaron estables en el tiempo. Por otro lado, los estudios de biocompatibilidad demostraron que los complejos droga dendrímico no son citotóxicos en células normales MDCK pero sí en las células tumorales ensayadas. A su vez, se demostró que la asociación de Fenazina a la superficie dendrímica no sólo permite aumentar la solubilidad de la droga, sino también disminuir la citotoxicidad del vehículo. Por lo tanto, los dendrímeros PAMAM-AT (G=1) y (G=3) y PPI (G=4) serían adecuados para su potencial aplicación como nanovehículos de Fenazina.

### **6.1.3 Incremento de la solubilidad de un carbamato antihelmíntico y antitumoral mediante el uso de un dendrímico no comercial**

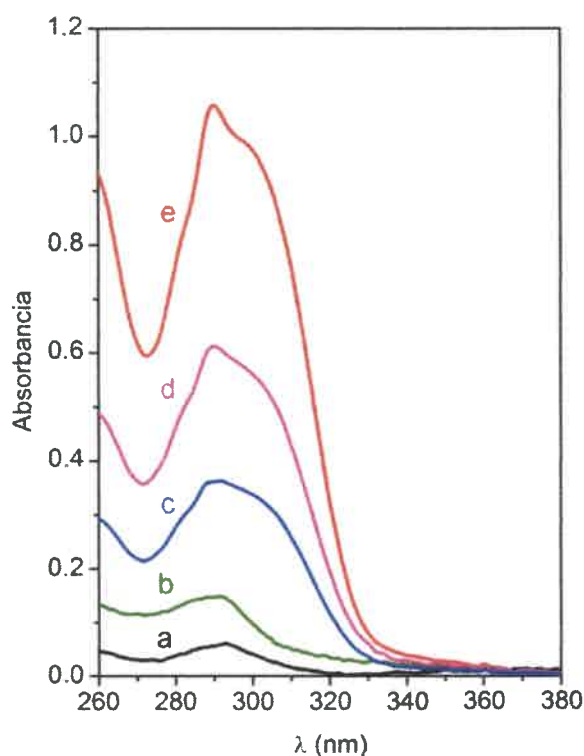
El compuesto metil (5-[propiltio]-1H-bencimidazol-2-il) carbamato (CBZ) (Figura 20), es un agente antihelmíntico y un potencial agente antitumoral.<sup>115,116</sup> Sin embargo, un problema importante asociado con la formulación y la eficacia de este compuesto es su escasa solubilidad acuosa.<sup>117</sup> La asociación de esta droga a un vehículo soluble en agua podría optimizar su aplicación. Por lo tanto, se propuso la asociación de **CBZ** a un dendrímico no comercial, el **dendrímico D** (Figura 16), con el objetivo de aumentar su solubilidad en agua y lograr un incremento en su biodisponibilidad y eficacia.

A continuación se presentan los resultados obtenidos del estudio de la asociación del carbamato CBZ con el dendrímico D en solución acuosa.

#### **6.1.3.1 Solubilización de CBZ en el dendrímico D**

La capacidad del dendrímero D para aumentar la solubilidad de CBZ en medio acuoso fue estudiada mediante métodos espectroscópicos. En la Figura 53 se muestran los espectros de absorción UV-visible de CBZ en presencia de diferentes concentraciones del dendrímero D. También se incluye el espectro de absorción de una solución acuosa saturada de CBZ, que corresponde a la solubilidad de la droga en agua ( $S_w=2.4 \times 10^{-6}$  M).<sup>117</sup> Las soluciones de CBZ en dendrímero se prepararon de acuerdo al método descrito en la sección 5.12, colocando una cantidad de CBZ que excede su límite de solubilidad acuosa, y variando la concentración de dendrímero entre  $5.0 \times 10^{-6}$  y  $1.0 \times 10^{-4}$  M.

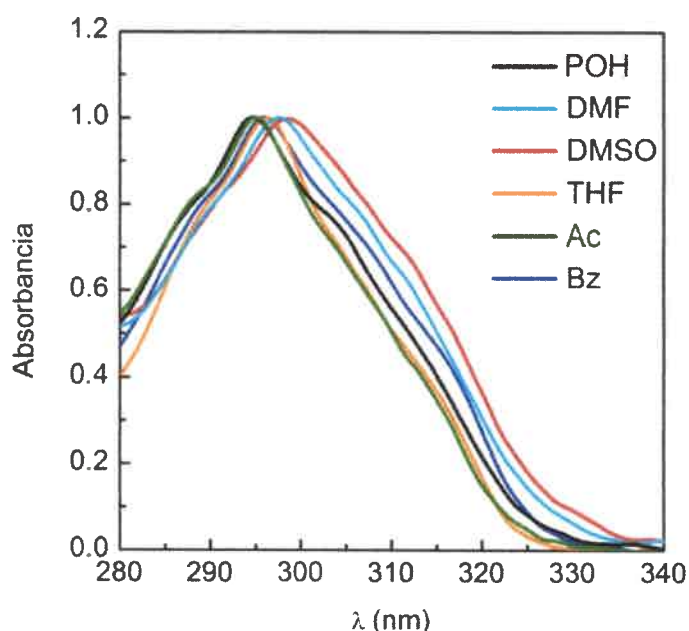
Como puede verse en la Figura 53, en presencia del dendrímero D la absorbancia del carbamato aumenta respecto de cuando se encuentra en agua pura. Además, la absorbancia de CBZ es mayor a medida que se incrementa la concentración de dendrímero. Estos aumentos de la absorbancia de CBZ ocurren como consecuencia del incremento de su solubilidad, lo cual se podría atribuir a su asociación con el dendrímero. Para una concentración de dendrímero igual a  $1 \times 10^{-4}$  M se observa un incremento de 20 veces la solubilidad de la droga.



**Figura 53.** Espectros de absorción UV-visible de CBZ en agua (a) y en soluciones acuosas de dendrímero D.

Concentración dendrímero:  $5.0 \times 10^{-6}$  M (b);  $1.0 \times 10^{-5}$  M (c);  $5.0 \times 10^{-5}$  M (d) y  $1.0 \times 10^{-4}$  M (e).

Estudios previos realizados con moléculas prueba y el dendrímero D indican que, en solución acuosa, el dendrímero genera microentornos de baja polaridad donde las moléculas lipofílicas pueden alojarse.<sup>212</sup> Esto permite proponer que el incremento de solubilidad de CBZ en presencia del dendrímero D se debería a la incorporación de las moléculas de droga en los microentornos de baja polaridad del dendrímero. Esta hipótesis también está de acuerdo al análisis de los espectros de absorción de CBZ en diferentes solventes (Figura 54).



**Figura 54.** Espectros de absorción UV-vis normalizados de CBZ en solventes de diferente polaridad.

(propanol (POH), dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), tetrahidrofurano (THF), acetonitrilo (Ac) y benceno (Bz))<sup>‡</sup>

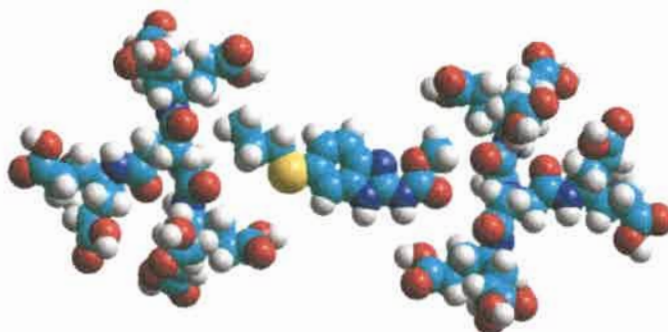
La Figura 54 muestra los espectros UV-vis de CBZ en solventes de diferente polaridad. Se puede ver que la disminución de la polaridad del solvente provoca un corrimiento al azul de la banda de CBZ analizada. Por lo tanto, el corrimiento a menor longitud de onda de la banda de absorción de la droga en presencia de dendrímero, respecto de cuando se encuentra en agua pura (Figura 53), indica una disminución en la polaridad del microentorno alrededor de la molécula de CBZ. Estos resultados permiten

<sup>‡</sup> Parámetro  $\pi^*$  de solvente: 0.48 para POH, 0.58 para THF, 0.59 para Bz, 0.75 para Ac, 0.88 para DMF y 1 para DMSO.<sup>128</sup>



suponer que el incremento de la solubilidad de CBZ podría deberse a su asociación con los microentornos lipofílicos definidos dentro de la estructura del dendrímero. La asociación de la droga a las ramificaciones del sistema dendrimérico hace que la molécula se localice en un entorno menos polar que el que existe en el seno de la solución acuosa; esto explicaría por qué la banda de CBZ se corre al azul en presencia de dendrímero, tal como lo hace al pasar de solventes polares a no polares.

Para una concentración de dendrímero D igual a  $1 \times 10^{-4}$  M la concentración de CBZ obtenida es  $4.2 \times 10^{-5}$  M. Teniendo en cuenta lo anterior, y la solubilidad de CBZ en agua pura ( $2.4 \times 10^{-6}$  M), el número de dendrímeros por molécula de CBZ es igual a dos. Por lo tanto, se puede representar de manera esquemática la asociación CBZ-dendrímero D en solución acuosa tal como se muestra en la Figura 55.



**Figura 55.** Representación esquemática de la asociación CBZ-dendrímero D en solución acuosa.

Además de las interacciones lipofílicas en los microentornos del dendrímero, también es posible la existencia de interacciones específicas droga-dendrímero, como enlaces puente hidrógeno, que faciliten la asociación. Tanto la droga como el dendrímero poseen grupos dadores y aceptores de enlace puente hidrógeno,<sup>77,121</sup> por lo tanto, la formación de enlaces puente hidrógeno entre las moléculas de CBZ y el dendrímero D podría contribuir a facilitar la asociación en este sistema huésped-dendrímero y sería un mecanismo que podría contribuir al incremento de la solubilidad de la droga estudiada.

Los compuestos que presentan escasa solubilidad acuosa, como CBZ, tienden a auto-asociarse o formar agregados cuyo tamaño es ampliamente superior al de la droga pura. Este hecho es de suma importancia cuando la droga estudiada presenta actividad biológica debido a que su farmacodinamia y su farmacocinética podrían verse drásticamente alteradas si se las compara con la droga libre.<sup>213</sup> Para monitorear la presencia

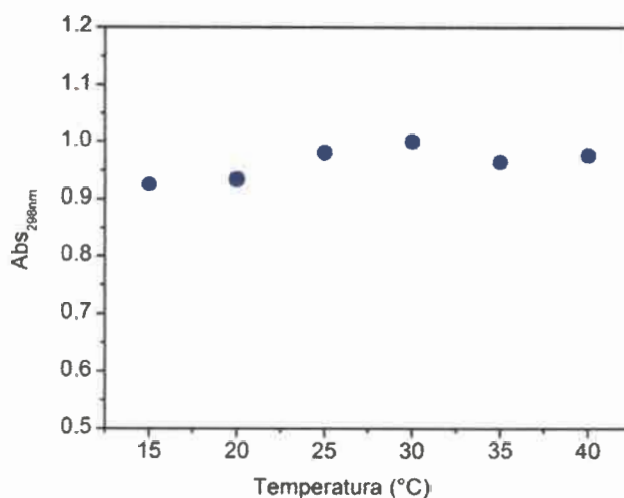


de agregados, la droga pura en su límite de solubilidad y el complejo droga-dendrímico se estudiaron mediante DLS. Los resultados mostraron la ausencia de partículas o agregados dispersores de luz cuando la droga se encuentra asociada con el dendrímico. Por otra parte, la solución de CBZ en agua pura muestra la presencia de agregados de tamaño promedio de 300 nm y un índice de polidispersión de 0,46. Esto indica que CBZ se encuentra auto-asociado cuando se satura la solución acuosa, aún luego de ser sometida a ultrasonido y filtrado. En presencia de dendrímico, en cambio, se elimina la agregación y se observa un incremento de la solubilidad de CBZ en agua debido a la asociación droga-dendrímico.

#### **6.1.3.2 Análisis de la estabilidad del complejo CBZ-dendrímico D con el tiempo y la temperatura**

Con el objetivo de evaluar la estabilidad de la asociación CBZ-dendrímico con el tiempo, las soluciones de droga y el polímero se mantuvieron a temperatura ambiente y se analizaron periódicamente, durante dos meses, controlando la posible aparición de precipitado, turbidez, cristalización, cambio de color y liberación de la droga. Las muestras resultaron estables y no se observaron cambios de color, turbidez, ni precipitado. Tampoco se registraron cambios en los espectros de absorción UV-vis. Por lo tanto, la asociación CBZ-dendrímico D es estable en el tiempo, lo cual es importante para su aplicación en la preparación de formulaciones clínicas.

Por otro lado, para completar el análisis de la estabilidad del complejo CBZ-dendrímico D, y considerando que el estudio de dicho sistema tiene por objetivo su futura aplicación en sistemas vivos, se realizó el estudio del efecto de la temperatura en dicha asociación. Para ello se determinó el espectro de absorción de la solución acuosa de CBZ-dendrímico D a diferentes temperaturas. Como se muestra en la Figura 56, la absorbancia a 298 nm de CBZ en solución acuosa del dendrímico D no presenta variaciones significativas con el aumento de la temperatura, indicando que la asociación droga-dendrímico es estable con la temperatura en el rango estudiado.



**Figura 56.** Absorbancia de CBZ a 298 nm en función de la temperatura, en solución acuosa de dendrímero.

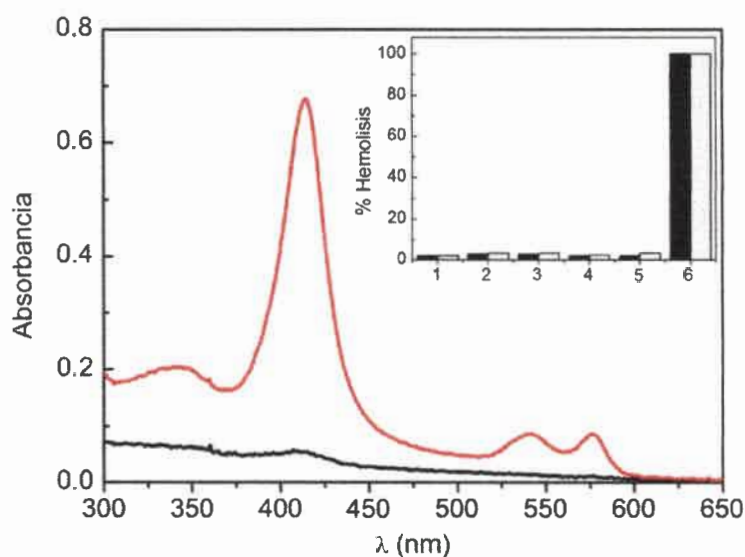
(Concentración dendrímero D =  $1.0 \times 10^{-4}$  M)

### 6.1.3.3 Influencia del complejo CBZ-dendrímero D sobre glóbulos rojos: Ensayo de Hemólisis

El ensayo de hemólisis es un método simple y ampliamente utilizado para estudiar la interacción de un compuesto con la membrana celular. El término hemólisis se refiere al fenómeno de ruptura o lisis de la membrana del eritrocito o glóbulo rojo que provoca la liberación de la hemoglobina. La relativa simplicidad estructural y funcional del glóbulo rojo y la presencia de una bicapa lipídica semejante al resto de las células del organismo, permiten inferir que un daño en su membrana se correlacionaría con una alta probabilidad de que otras células más complejas, puedan responder de igual forma o con mayor intensidad que los glóbulos rojos. Debido a esto, esta célula constituye un buen modelo para estudiar la actividad de diversas sustancias sobre membranas biológicas.<sup>214</sup>

Estudios previos mostraron que el dendrímero D, en ausencia de CBZ, no presenta actividad hemolítica.<sup>99</sup> Sin embargo, también es importante analizar la influencia del complejo CBZ-dendrímero D sobre los glóbulos rojos. Para ello se llevaron a cabo ensayos de hemólisis, de acuerdo a como se detalla en la sección 5.15. La hemoglobina liberada fue determinada por espectroscopía UV-visible. En la Figura 57 se muestran los espectros de absorción correspondientes a las soluciones control (0% y 100% de hemólisis). Además, en el gráfico insertado de la Figura 57 se detallan los porcentajes de hemólisis obtenidos para las diferentes soluciones ensayadas. Los espectros obtenidos para todas las soluciones preparadas a partir del sobrenadante de los tubos de incubación de eritrocitos en solución

del complejo droga-dendrímico resultaron similares, independientemente del período de incubación, y además se superponen a los obtenidos para los controles negativos (0% de hemólisis). Estos resultados indican que el complejo CBZ-dendrímico D no es hemolítico, ya que no rompe la membrana de los glóbulos rojos y por lo tanto la liberación de hemoglobina no es posible, aún para una relación de concentración  $[\text{dendrímico D}] / [\text{CBZ}] = 1.0 \times 10^{-4} / 4.8 \times 10^{-5}$  y con tiempo prolongado de incubación (24hs).



**Figura 57.** Espectros de absorción de hemoglobina liberada en el ensayo de hemólisis para la solución control positivo (100% de hemólisis) (rojo), y la solución control negativo (0% de hemólisis) (negro).

En la Figura insertada se muestra el porcentaje de hemólisis a un tiempo de incubación de 1 h (barras negras) y 24 hs (barras rayadas), para glóbulos rojos tratados con: **1)** PBS; **2)** CBZ en PBS; **3)**  $1.0 \times 10^{-5}$  M dendrímico D +  $1.4 \times 10^{-5}$  M CBZ; **4)**  $5.0 \times 10^{-5}$  M dendrímico D +  $2.4 \times 10^{-5}$  M CBZ; **5)**  $1.0 \times 10^{-4}$  M dendrímico D +  $4.2 \times 10^{-5}$  M CBZ; **6)** agua destilada.

Los resultados obtenidos del estudio de la asociación de CBZ con el dendrímico D, permiten concluir que este sistema dendrimérico tiene la capacidad de aumentar la solubilidad de la droga. Este aumento de solubilidad se daría como consecuencia de interacciones lipofílicas de CBZ con el interior del dendrímico y, además, es posible que existan enlaces puente hidrógeno que estabilicen la asociación. Además, el complejo resultó estable con el tiempo y la temperatura, lo cual es importante para su futura aplicación en la preparación de formulaciones clínicas. Por otro lado, los estudios

preliminares para ensayar la citotoxicidad del complejo CBZ-dendrímico D mostraron que el sistema no presenta propiedades hemolíticas, indicando que el complejo no interacciona con la membrana de los glóbulos rojos. En base a todo esto, el dendrímico D sería un vehículo apropiado para la administración de CBZ ya que tiene el potencial para superar los obstáculos asociados a la administración del fármaco como su baja solubilidad, y, además, no presenta propiedades hemolíticas.<sup>212</sup>

## **6.2 Películas de moléculas dendriméricas como potenciales sistemas de administración de drogas mediada por superficie**

Las propiedades fisicoquímicas y características estructurales de dendrímeros y dendrones los convierte en buenos candidatos para el desarrollo de sistemas de administración de fármacos tanto en solución como mediado por superficie. En el primer caso, la macromolécula actúa como un vehículo de la droga en solución, permitiendo una liberación controlada de la misma.<sup>76,77</sup> En el segundo caso, se forman películas del polímero dendrimérico sobre superficies, y en dichas películas se incluyen las moléculas de fármaco que luego se liberan de manera controlada.<sup>78-81</sup> Por lo tanto, además de los estudios de dendrímeros como vehículos de drogas en solución, se generaron y caracterizaron películas de moléculas dendriméricas para su potencial aplicación como sistemas de administración de drogas mediada por superficie.

Para generar las películas dendriméricas se utilizaron las técnicas de Langmuir y Langmuir-Blodgett.<sup>86-88</sup> Un requisito para poder formar monocapas mediante estas técnicas es que la molécula posea cierto carácter anfifílico.<sup>145,147</sup> De acuerdo a esto, los dendrímeros PAMAM, PPI y el dendrímico D utilizados en los estudios en solución, no son adecuados para los estudios mediante las técnicas de Langmuir y Langmuir-Blodgett. Por lo tanto, se utilizaron dendrones del tipo Newkome, los cuales presentan una estructura más anfifílica (Figura 17).

### **6.2.1 Generación y caracterización de películas de dendrones del tipo Newkome y películas mixtas dendrón-CBZ**

A continuación se informan los estudios experimentales y computacionales realizados con el propósito de formar y caracterizar películas de dendrones del tipo Newkome y estudiar su asociación a compuestos activos. El objetivo de este estudio es comprender el mecanismo de ensamblaje molecular de estructuras dendriméricas en la



interfase aire-agua, lo cual es relevante para optimizar el desarrollo de películas con potencial aplicación en la encapsulación y liberación controlada de agentes activos.

Inicialmente se realizó el estudio de los *dendrones BBN, BBA y BTA* (Figura 17) en la interfase aire-agua mediante la técnica de Langmuir. Además se abordó la transferencia de las películas a sustratos sólidos mediante la técnica de Langmuir-Blodgett y se realizó su caracterización mediante AFM. Luego se realizó el estudio de monocapas mixtas, sobre la superficie acuosa, de los dendrones con un compuesto activo, (Metil (5-[propiltio]-1H-bencimidazol-2-il) carbamato, *CBZ*, (Figura 20). Además, se obtuvo la película de Langmuir-Blodgett del dendrón BBN con CBZ y se caracterizó mediante AFM. Finalmente, se evaluó la biocompatibilidad de las superficies modificadas con película de dendrón.

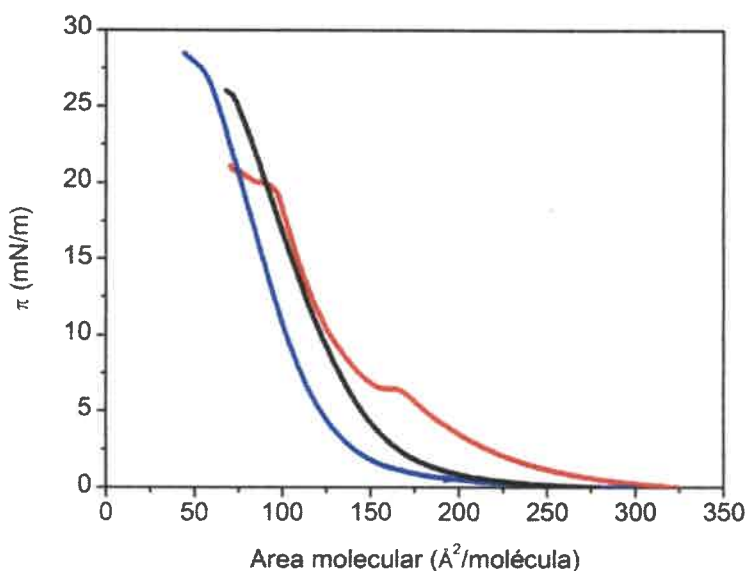
#### 6.2.1.1 Formación de monocapas de Langmuir de los dendrones y obtención de las isothermas ( $\pi$ -A)

Mediante la técnica de Langmuir se generaron monocapas de los dendrones estudiados, sobre la interfase aire-agua, partiendo de soluciones de las moléculas dendriméricas en cloroformo, según se detalla en la sección 5.16. Estas estructuras dendriméricas presentan diversos grupos terminales, ramificaciones y punto focal (Figura 17). El dendrón BBN posee un grupo nitrobenceno como punto focal mientras que los dendrones BBA y BTA presentan un grupo anilina. Además, BBN y BBA tienen como grupos terminales unidades de *terbutilo* y BTA unidades de *metilester*. La utilización de dendrones con diferentes características estructurales permite evaluar la incidencia de los diversos grupos estructurales en la generación de monocapas y su interacción con el agente terapéutico. Esto permitirá seleccionar el mejor dendrón para el desarrollo de películas con potencial aplicación en la administración de drogas mediada por superficie.

La Figura 58 muestra las isothermas ( $\pi$ -A) de los tres dendrones. La compresión de las monocapas produce un aumento de la presión superficial que indica la presencia de los dendrones en la interfase aire-agua.<sup>82</sup> Además, al examinar las isothermas ( $\pi$ -A) es evidente que el punto focal de los dendrones tiene un efecto significativo en la forma de la isoterma. El dendrón BBN muestra, a bajas presiones, una región correspondiente a las fases Gas y LE, seguida de una pequeña meseta a  $\sim 6.5$  mN/m, debido a la coexistencia de las fases LE y LC en la monocapa.<sup>215</sup> Luego de la meseta, a mayor presión, la isoterma presenta una región que corresponde a la fase condensada. A diferencia de este dendrón que posee un



grupo focal nitrobenceno, las isothermas de los dendrones BBA y BTA, con un grupo anilina como punto focal, no presentan ninguna meseta; la compresión de las monocapas produce un aumento continuo de la presión superficial, similar al comportamiento clásico obtenido para otros sistemas dendriméricos anfífilicos.<sup>83</sup>



**Figura 58.** Isothermas ( $\pi$ -A) de los dendrones BBN (rojo), BBA (negro) y BTA (azul), en la interfase aire-agua, a 25°C.

A partir de las isothermas ( $\pi$ -A), se estimó el área límite ( $A_0$ ) de los dendrones, mediante la extrapolación de la región de mayor pendiente (correspondiente a la fase condensada) a presión superficial cero; éste valor corresponde al área ocupada por una molécula en una situación de máximo empaquetamiento.<sup>92,216</sup> Los valores obtenidos para cada dendrón fueron: 161 Å<sup>2</sup> para BBN, 150 Å<sup>2</sup> para BBA y 126 Å<sup>2</sup> para BTA. Por otra parte, se llevó a cabo el modelado de los sistemas dendriméricos utilizando el método semiempírico AM1<sup>142</sup> y a partir de estos cálculos se obtuvieron descriptores que permitieron calcular el área molecular ocupada por los dendrones. La comparación de estos parámetros con el área por molécula obtenida experimentalmente desde las isothermas ( $\pi$ -A) permite alcanzar una mejor comprensión de la organización adoptada en la interfase por los constituyentes de la monocapa. Los valores de área molecular de cada dendrón, calculados por el método semiempírico AM1 fueron: 178 Å<sup>2</sup> para BBN, 193 Å<sup>2</sup> para BBA y 136 Å<sup>2</sup> para BTA, los cuales son un poco mayores a las áreas experimentales. Estas diferencias entre el área teórica y experimental podrían deberse a que en los cálculos teóricos se considera una molécula aislada en el vacío, con una configuración totalmente

extendida, mientras que el área límite obtenida de la isoterma corresponde al área ocupada por una molécula en la monocapa, en una situación de máximo empaquetamiento. En esta situación de máximo empaquetamiento, es muy probable que exista cierta interpenetración entre las ramificaciones dendriméricas. Esto podría explicar la diferencia entre los valores teóricos y experimentales.

Finalmente, a partir de las isothermas se obtuvieron los valores de  $\pi_c$  para cada dendrón, es decir, el valor máximo de presión superficial al cual la monocapa puede ser comprimida sin una expulsión detectable de moléculas desde la monocapa de Langmuir.<sup>145</sup> Este es un parámetro importante que está relacionado con la estabilidad de la monocapa. Las presiones de colapso de cada dendrón fueron: 20 mN/m para BBN, 25.5 mN/m para BBA y 27 mN/m para BTA. Estos valores de  $\pi_c$  indican que las moléculas en suspensión en la interfase son estables.<sup>217</sup>

### 6.2.1.2 Análisis de las isothermas ( $\pi$ -A) de los dendrones estudiados

Entre los dendrones BBN y BBA la única diferencia estructural reside en el punto focal (grupos nitrobenceno y anilina, respectivamente). Por lo tanto, las marcadas diferencias en el comportamiento de las moléculas dendriméricas en la interfase aire-agua (Figura 58) se pueden atribuir a las diferentes propiedades fisicoquímicas de los grupos nitrobenceno y anilina.

Debido a la presencia del grupo nitrobenceno, a bajas presiones (regiones Gas y LE), los dendrones BBN serían capaces de formar dominios en la interface aire-agua, en los cuales, los grupos nitrobenceno de diferentes moléculas interactúan fuertemente entre sí.<sup>218,219</sup> Al aumentar la presión, las moléculas de BBN adoptarían una disposición más ordenada y compacta, con el grupo polar nitro en la subfase y los grupos no polares hacia la fase aire. De esta manera, la transición entre el estado expandido, donde se forman los dominios, y el estado condensado, donde las moléculas adoptan una disposición más ordenada y compacta, se observa en la isoterma ( $\pi$ -A) como una meseta. Resultados similares fueron encontrados por Lee y col.<sup>83</sup>, quienes estudiaron el ensamblaje molecular de estructuras dendriméricas anfifílicas en la interfase aire-agua.

Para BBA y BTA la interacción entre el grupo anilina y la subfase acuosa, a través de la formación de enlaces puente hidrógeno, está muy favorecida en comparación con el grupo nitrobenceno (parámetros de solvente  $\alpha$  y  $\beta$  de Kamlet-Taft: 0.26 y 0.50 para anilina, y 0.05 y 0.30 para nitrobenceno). A su vez, los dendrones con punto focal anilina tienen

menos posibilidad de formar dominios a bajas presiones en la interface aire-agua que BBN. Por lo tanto, a bajas presiones las moléculas de BBA y BTA estarían dispersas en la superficie acuosa ocupando toda el área disponible, con el punto focal anilina en la subfase formando enlace puente hidrógeno con el agua, y las ramificaciones en el aire, cerca del agua; luego, al aumentar la presión superficial las moléculas comienzan a acercarse, adoptando una configuración más compacta, con las ramificaciones apuntando hacia la fase aire. De esta manera, los dendrones BBA y BTA muestran un incremento continuo de la presión superficial sin presentar una meseta que sugiera una transición de fase del tipo observada para el dendrón BBN.

Los dendrones que tienen grupo focal anilina presentan una presión de colapso mayor que el dendrón con grupo nitrobenzeno (Figura 58). Esta diferencia en la  $\pi_c$  de las monocapas puede explicarse también en base al grupo focal del dendrón y las interacciones en las que interviene. En el caso de los dendrones con grupo anilina, la formación de enlaces puente hidrógeno con la subfase acuosa le confiere mayor estabilidad a la monocapa, pudiendo ser sometida a mayores presiones sin que se produzca el colapso. Por el contrario, la monocapa de BBN resiste menores presiones superficiales debido a que el anclaje de las moléculas a la subfase acuosa, a través del grupo nitrobenzeno, es más débil; en este caso la formación de puente hidrógeno con el agua no está tan favorecida como con el grupo anilina que posee hidrógenos disponibles para formar este tipo de enlace.

### 6.2.1.3 Análisis de la reversibilidad y estabilidad de las monocapas de los dendrones en la interfase aire-agua

Una vez que se logró la formación de las monocapas de Langmuir de los dendrones y se estudiaron sus isotermas, se continuó con el estudio de la reversibilidad y estabilidad de las monocapas mediante ciclos de compresión-expansión sucesivos y mediciones isobáricas de la deformación de las películas. La metodología y condiciones experimentales con las que se llevaron a cabo estos estudios se describen en la sección 5.17. La estabilidad de las monocapas en la interfase aire-agua es una propiedad muy importante que debe estudiarse ya que si se desean transferir sobre sustratos sólidos, la estabilidad de la película de Langmuir es uno de los principales requisitos para conseguir buenos porcentajes de transferencia y obtener películas organizadas y con alta calidad estructural sobre el sustrato sólido.<sup>82</sup> Además, el estudio de la estabilidad y reversibilidad

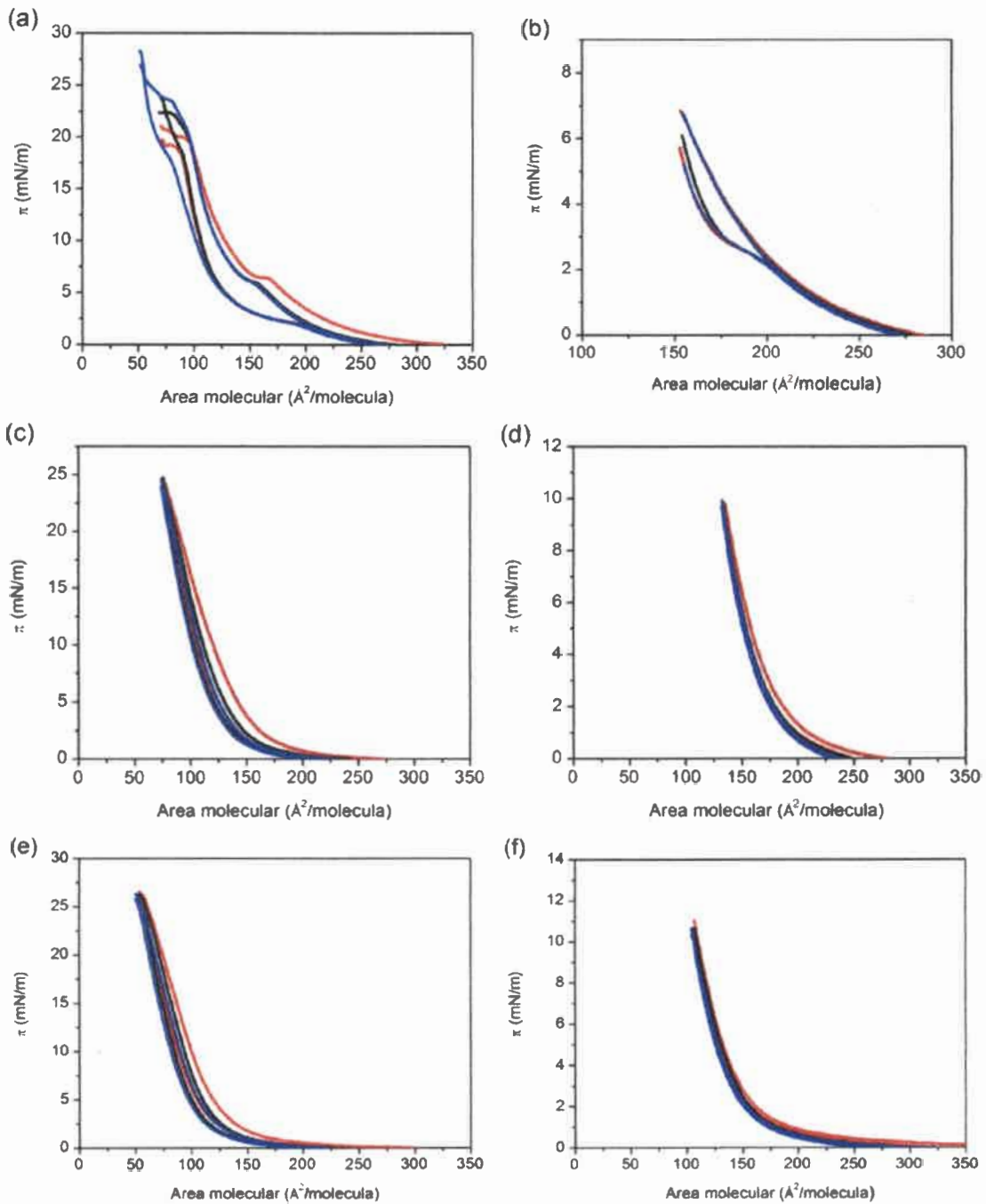
de las monocapas proporciona información adicional acerca de las interacciones entre las moléculas de dendrones.

En la Figura 59 se pueden observar los ciclos de compresión y expansión sucesivos para los diferentes dendrones al comprimir la monocapa hasta presiones bajas (correspondientes a la fase expandida) y hasta presiones cercanas a la presión de colapso (correspondientes a la fase condensada). En general, todas las monocapas presentan un comportamiento reversible a presiones superficiales bajas, debido a que en esta región las interacciones entre las moléculas son muy débiles y la capacidad de compresión es alta.<sup>220</sup> En el caso del dendrón BBA se observa cierta histéresis en el primer ciclo de compresión-expansión (Figura 59 d), sin embargo, en el primer ciclo es normal observar histéresis, incluso en monocapas estables. Esto se atribuye a una diferencia en los procesos de agregación y relajación, debido al no retorno de los agregados formados durante la compresión a su estado original luego de la descompresión. Por otro lado, el dendrón BBN muestra cierta histéresis entre las isothermas de compresión y expansión a baja presión, no sólo en el primer ciclo, sino también en el segundo y tercero. Este efecto ha sido observado también por Kampf y col.<sup>93</sup> y se atribuye a que la relajación al estado inicial está más impedida cinéticamente. A pesar de esto, la monocapa es muy reversible a bajas presiones.

A presiones superficiales más altas, antes del punto de colapso, la histéresis es más apreciable tanto para el dendrón BBN, como para el BBA y BTA (Figura 59 a, c y e). Esto puede deberse a que, cuando se alcanzan presiones superficiales altas, las interacciones intermoleculares entre los dendrones son más fuertes y se forman agregados de las moléculas de dendrón en la interface aire-agua, los cuales quedan como tales al expandir la monocapa, es decir, las moléculas no vuelven al estado original.

Además, a presiones superficiales altas se observa un desplazamiento del segundo ciclo a menores áreas respecto del primer ciclo de compresión-expansión. Esto puede deberse a la pérdida de material durante la compresión debido a la disolución de algunas moléculas en la subfase, a la adhesión de moléculas al sistema Wilhelmy o la presencia de una multicapa residual en el film luego de la expansión.<sup>82</sup> Sin embargo, para la tercera isoterma de compresión este efecto prácticamente es despreciable, lo cual indica que a altas presiones las monocapas son reversibles luego del primer ciclo.



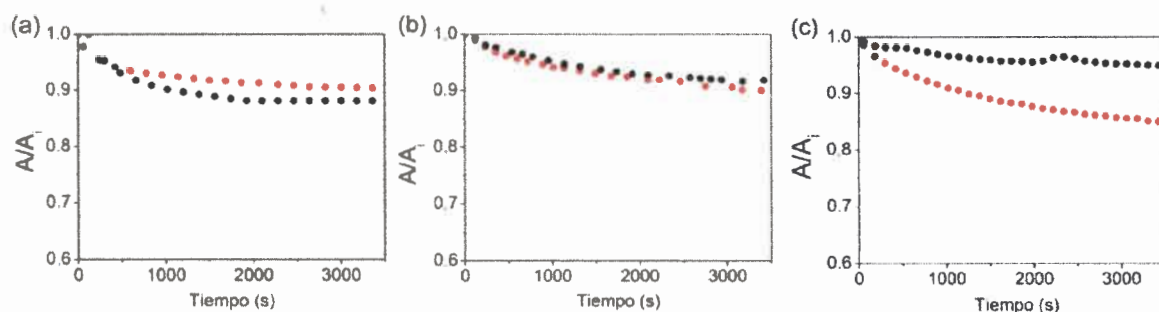


**Figura 59.** Ciclos de compresión-expansión de las monocapas de los dendrones BBN (a y b), BBA (c y d) y BTA (e y f), a alta presión (izquierda) y a baja presión (derecha), a 25°C. En rojo se muestra el primer ciclo, en negro el segundo y en azul el tercer ciclo.

Para analizar la estabilidad de las monocapas en la interface aire-agua, se realizaron mediciones isobáricas a dos presiones superficiales, 5 mN/m y 15 mN/m. Los experimentos se llevaron a cabo supervisando la deformación resultante ( $A/A_i$ ) con el tiempo a una presión constante ( $\pi_0$ ), de acuerdo a como se describe en la sección 5.17. La



Figura 60 muestra los gráficos obtenidos de  $(A/A_i)$  vs el tiempo para las monocapas de los tres dendrones.



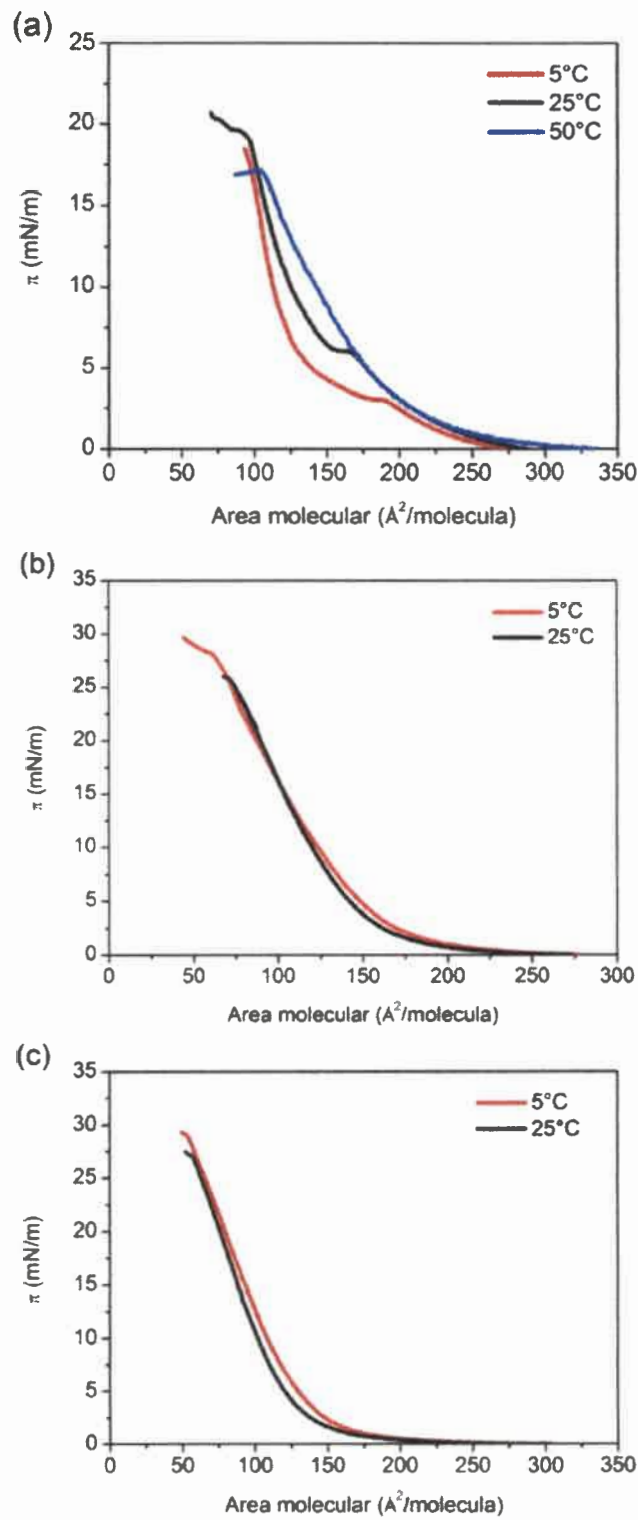
**Figura 60.** Gráficos de  $(A/A_i)$  vs el tiempo para las monocapas en la interfase aire-agua de (a) BBN, (b) BBA y (c) BTA, a 5 mN/m (negro) y 15 mN/m (rojo), a 25°C.

A baja presión, la disminución en el área ocupada por las monocapas de los tres dendrones no supera el 10% luego de una hora. A presiones superficiales mayores, correspondientes a la fase condensada, la estabilidad de la monocapa de BTA se reduce, mientras que las monocapas de BBN y BBA exhiben un comportamiento similar al observado a baja presión. Sin embargo, es importante notar que aún a 15 mN/m, la deformación resultante en la monocapa de BTA es menor al 15% luego de una hora.

Estos estudios indican que el balance hidrofílico/lipofílico de las moléculas dendriméricas estudiadas permite obtener una disposición estable y reproducible en la interfase aire-agua. Por lo tanto, sería factible realizar la transferencia de las monocapas sobre sustratos sólidos mediante la técnica de Langmuir-Blodgett.

#### 6.2.1.4 Estudio del efecto de la temperatura en las isothermas ( $\pi$ -A)

Con el objetivo de alcanzar una mejor comprensión de la organización de las moléculas en la interfase aire-agua, se determinaron las isothermas ( $\pi$ -A) de las monocapas de los dendrones a diferentes temperaturas. En la Figura 61 se muestran las isothermas obtenidas. En todos los casos, se puede observar que el incremento de la temperatura produce una disminución de la presión de colapso, y por lo tanto, una disminución de la estabilidad de la monocapa. Existe una barrera de energía que las moléculas de la monocapa deben superar para dejar la superficie acuosa y formar una multicapa. La existencia de esta barrera energética implica que la presión de colapso debe disminuir cuando se aumenta la temperatura,<sup>93</sup> y de hecho se observa este comportamiento.



**Figura 61.** Isotermas ( $\pi$ -A) de las monocapas de los dendrones (a) BBN, (b) BBA y (c) BTA, a diferentes temperaturas (rojo: 5°C, negro: 25°C y azul: 50°C).

Generalmente, para aquellos compuestos que presentan una transición de fase caracterizada por la existencia de una región de presión constante en las isothermas de compresión, se encuentra que la forma de la isoterma está afectada por cambios en la temperatura. Se sabe que una disminución en la temperatura de la subfase beneficia la coexistencia de fases, que se evidencia como un incremento en la longitud de la meseta.<sup>149</sup> Además, a menores temperaturas se observa la meseta a presiones más bajas. Todas estas características se observan para las isothermas de BBN en la Figura 61 (a), donde se muestran las isothermas para este dendrón a 5, 25 y 50°C. A 5 y 25°C las isothermas de BBN presentan una meseta, la cual es más extensa y aparece a menores presiones superficiales a 5°C. En cambio, a 50°C la meseta desaparece, indicando que a esta temperatura la energía cinética de las moléculas es lo suficientemente alta como para evitar la formación de dominios y, por consiguiente, no se observa ninguna meseta debido a la transición de fase. Por otro lado, en el caso de los dendrones BBA y BTA, al aumentar la temperatura de 5 a 25°C, la forma de la isoterma permanece prácticamente igual, de acuerdo con la falta de formación de dominios propuesta para estos dendrones.

#### 6.2.1.5 Generación y caracterización de películas de Langmuir-Blodgett de los dendrones

Una vez que se caracterizaron las monocapas de los dendrones en la interface aire-agua, se procedió a realizar la transferencia de las películas sobre mica, mediante la técnica de LB. La posibilidad de formar películas de moléculas dendriméricas sobre sustratos sólidos abre un abanico de posibilidades para la construcción de estructuras supramoleculares con varias aplicaciones.<sup>83,89,221,222</sup>

La morfología de las monocapas de Langmuir de materiales orgánicos anfífilicos generalmente se preserva durante la transferencia si ésta se realiza en óptimas condiciones.<sup>223</sup> Por lo tanto, la transferencia de las monocapas a un sustrato sólido y su caracterización mediante técnicas como AFM permite una caracterización detallada de la morfología y homogeneidad de las películas, obteniéndose una mejor comprensión de la organización de las moléculas en la monocapa de Langmuir.

En la sección 5.19 se detallan las condiciones y metodología llevadas a cabo para transferir las películas. La presión a la cual se realizaron las transferencias fue 10 mN/m, ya que esta presión corresponde a la fase condensada. De esta manera, la presión superficial sería lo suficientemente alta para lograr una cohesión lateral de la monocapa, y

lograr una buena transferencia, pero no demasiada alta como para provocar la aparición de defectos como la formación de multicapas o solubilización de moléculas en la subfase. Para el dendrón BBN también se realizó la transferencia a una presión antes de la transición de fase (4 mN/m) para su comparación.

Las relaciones de transferencia ( $\tau$ ) obtenidas en las deposiciones de las monocapas de los dendrones fueron: 1.1 para BBN, 1.3 para BTA y 1.4 para BBA. Para la primera capa transferida,  $\tau$  a veces es mayor a uno, a causa de las heterogeneidades microscópicas de la superficie del sustrato.<sup>149</sup> Sin embargo, un valor fuera del rango de 0.8 a 1.2 sugiere pobre homogeneidad de la película transferida. Por lo tanto, estas relaciones de transferencia indicarían que la película de Langmuir-Blodgett del dendrón BBN es muy homogénea y que se logra un buen recubrimiento de la superficie, mientras que en el caso de los dendrones BBA y BTA, se obtendrían películas poco homogéneas.

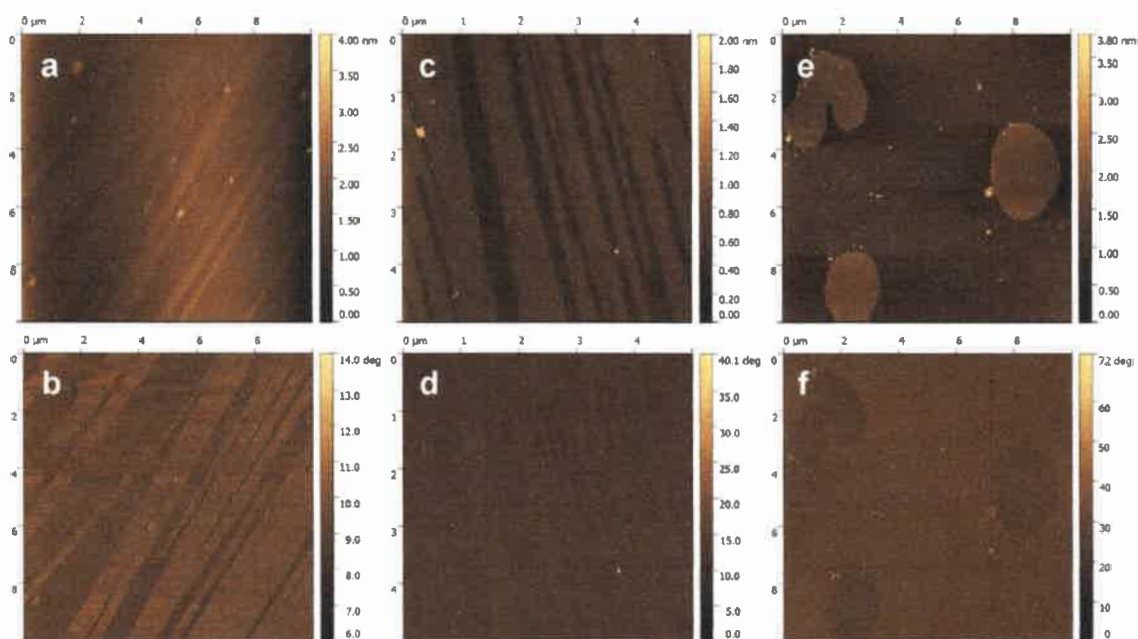
Es importante remarcar que, teniendo en cuenta los estudios de estabilidad, las transferencias se realizaron luego de esperar 40 minutos desde que se formó la monocapa para permitir que se estabilizara el sistema. En estos casos las relaciones de transferencia obtenidas fueron iguales a 1.1-1.4, como se comentó anteriormente. Sin embargo, en otra serie de experiencias previas, se realizaron las deposiciones inmediatamente luego de formar la monocapa, sin esperar 40 minutos, y se obtuvieron relaciones de transferencia significativamente mayores, de entre 2 a 2.4. Esto permitió concluir que el tiempo de espera para que se estabilice la monocapa es un factor muy importante para obtener buenos resultados en las deposiciones.

Las películas de LB de los dendrones fueron caracterizadas a través de AFM. Esto permite conocer la homogeneidad de las películas, la existencia y magnitud de defectos superficiales, y el grado de recubrimiento de la superficie.

En la Figura 62 se muestran las imágenes AFM de topografía y de fase de monocapas de BBN y BBA depositadas sobre mica. En el caso del dendrón BBN, las imágenes de topografía muestran claramente un patrón de tiras. Este arreglo se obtiene cuando la transferencia se realiza tanto a 4 mN/m (Figura 62 a), como a 10 mN/m (Figura 62 c). Además, el mismo patrón de tiras se puede ver en las imágenes de fase. Las diferencias de fase observadas se pueden explicar en términos de variación de energía disipada y/o composición.<sup>224</sup> Un análisis de las alturas y rugosidad de la superficie de las imágenes de topografía sugieren que las regiones más altas corresponden a la película de dendrón BBN, mientras que las tiras de menor altura corresponden al sustrato de mica. Duan y col.<sup>95</sup> propusieron, para estructuras moleculares similares, que la presencia de un



arreglo de tiras en la película de LB sugiere un empaquetamiento muy ordenado de las moléculas en la interfase, donde interacciones del tipo  $\pi$ - $\pi$  y enlaces puente hidrógeno son las responsables. En el caso de la monocapa de dendrón BBN, estos dos tipos de interacciones pueden tener lugar entre grupos nitrobenzono de puntos focales de moléculas de dendrón vecinas. Estas interacciones intermoleculares darían lugar al desarrollo de la monocapa preferentemente en un eje dado, generando filas de dendrones, de manera que cuando se analiza mediante AFM se observa una película anisotrópica, con un arreglo de tiras. Por lo tanto, la monocapa de BBN se transfiere sobre mica cubriendo un alto porcentaje de la superficie y la película de dendrón depositada presenta un patrón de tiras, que indica un empaquetamiento muy ordenado.



**Figura 62.** Imágenes AFM de topografía (arriba) y fase (abajo) de monocapas de Langmuir-Blodgett sobre mica: (a y b) BBN transferida a 4 mN/m. (c y d) BBN transferida a 10 mN/m. (e y f) BBA transferida a 10 mN/m.

Para el dendrón BBA, las imágenes AFM de las películas fueron muy diferentes a las obtenidas para el dendrón BBN (Figura 62 e y f). En el caso de la película de BBA, en la imagen de topografía se observan tres zonas claras redondeadas sobre el fondo oscuro; además el fondo presenta pequeños puntos claros. La comparación de las imágenes de topografía y fase indican que las zonas claras redondeadas y los puntos claros son dendrones sobre la mica, con una altura similar a la calculada para el dendrón BBA mediante el método AM1. Estos resultados son consistentes con la falta de interacciones



específicas fuertes entre moléculas de dendrón BBA. A diferencia del dendrón BBN, BBA posee un grupo anilina como punto focal y no presenta una orientación preferencial de una molécula respecto a otra en la monocapa. En consecuencia, al analizar los depósitos mediante AFM se observan islas densas redondeadas de material sobre el sustrato, sin presentar un crecimiento en una dirección preferencial, como en el caso de BBN. Este hecho refuerza la hipótesis sobre el papel desempeñado por el grupo nitrobenzeno en la disposición molecular adoptada por los dendrones BBN en la monocapa.

Es importante aclarar que las imágenes AFM de las monocapas depositadas son representativas de toda la muestra ya que todos los depósitos se realizaron varias veces y se analizaron tomando imágenes de varias zonas de la muestra, observándose en todos los casos lo mismo.

En el caso del dendrón BTA, no se lograron obtener transferencias aceptables. Al analizar las imágenes AFM se encontró que no se obtuvo una película sobre el sustrato; ni siquiera se logró el recubrimiento de algunas zonas como se observó en el caso de BBA. Sin embargo, se produjo una reducción efectiva del área de la monocapa de Langmuir cuando se realizó la transferencia, lo que indicaría la solubilización de las moléculas de dendrón en la subfase. Claramente, esto es debido a la presencia de grupos éter en las ramificaciones del dendrón, y a la ausencia de grupos terminales *ter*butilo, lo cual hace que el dendrón BTA tenga un balance hidrofílico/lipofílico más pobre en comparación con los otros dos dendrones.

De acuerdo a estos resultados se puede concluir que tanto las interacciones dendrón-dendrón como las interacciones dendrón-subfase juegan un papel crucial en la formación de las películas de LB, determinando la organización de las monocapas. Sólo con el dendrón BBN se logró un buen recubrimiento de la superficie, obteniéndose un ordenamiento regular, por lo que, en principio, este dendrón sería el mejor candidato para el estudio de sistemas de administración de fármacos mediada por superficie.

#### **6.2.1.6 Generación de monocapas mixtas dendrón-CBZ en la interfase aire-agua y determinación de las isothermas ( $\pi$ -A)**

Luego de la generación y caracterización de películas de Langmuir de los dendrones, su transferencia a sustratos sólidos y caracterización mediante AFM, se procedió a realizar el estudio de monocapas mixtas de los dendrones con un compuesto activo, CBZ. Esto se hizo con el fin de evaluar la potencial aplicación de las monocapas de

los dendrones estudiados en la administración de fármacos mediada por superficie. En estos dispositivos el dendrón podría actuar como un andamio capaz de interactuar con fármacos incapaces de formar por sí solos monocapas estables, y permitiendo su liberación controlada.

Las monocapas complejas de los dendrones con CBZ en la interfase aire-agua se formaron de acuerdo a como se describe en la sección 5.21, mediante el método de coesparcimiento. Es importante aclarar que antes de esto se estudió la droga sola en la interfase aire-agua, en ausencia de dendrón, para determinar si el compuesto terapéutico era capaz de formar una monocapa por sí solo. Se encontró que CBZ no forma monocapas de Langmuir sobre la superficie acuosa en ausencia de dendrón.

En la Figura 63 se pueden observar las isotermas obtenidas para las monocapas de dendrón-CBZ, junto con las isotermas correspondientes a las monocapas de dendrón puro para su comparación. Las isotermas están expresadas por molécula de dendrón, por lo tanto, cualquier expansión de la isoterma dendrón-CBZ con respecto a la isoterma de dendrón puro evidencia la presencia de las moléculas de CBZ en la interfase, junto con las moléculas de dendrón.<sup>225</sup> Efectivamente, en las figuras se observa un desplazamiento de las isotermas de las películas mixtas hacia áreas más grandes, sin cambiar prácticamente la forma de la curva ni el valor de la presión de colapso.

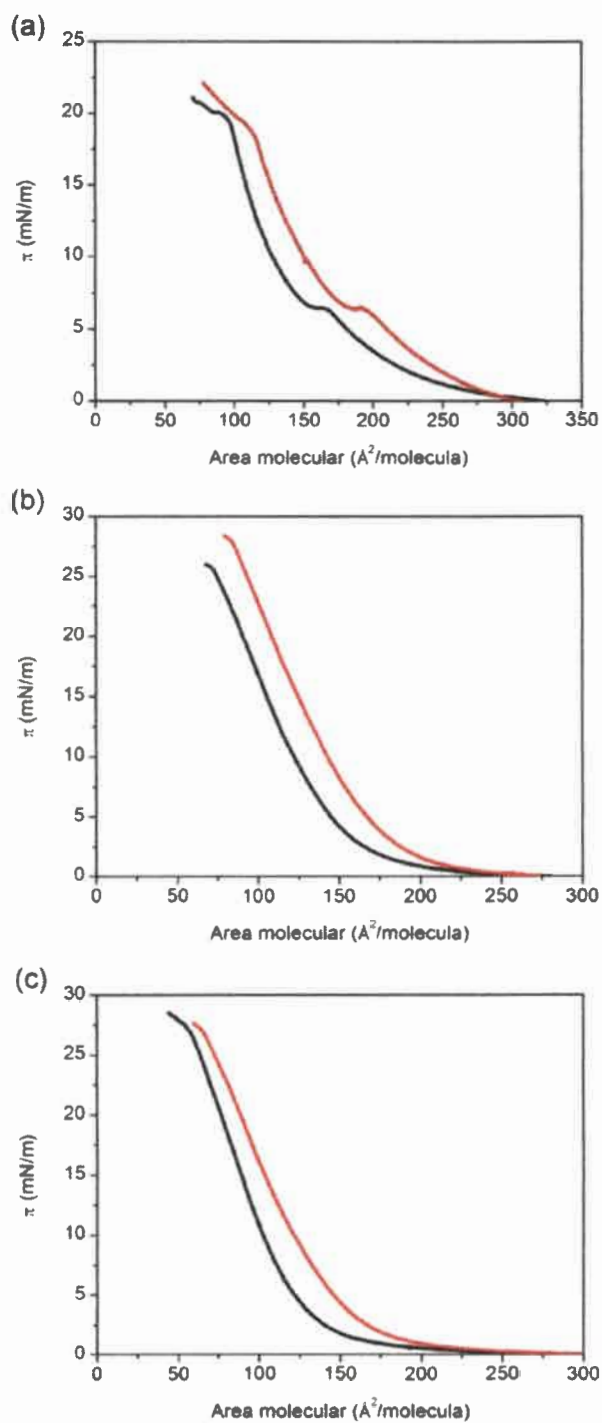
En la Tabla 4 se muestran los valores de área límite ( $A_0$ ) de cada dendrón determinados para el sistema mixto y los obtenidos en la sección 6.2.1.1 al analizar las monocapas de dendrón sólo.

**Tabla 4.** Áreas límites ( $A_0$ ) obtenidas de las isotermas de las monocapas de dendrón puro y las monocapas mixtas de dendrón-CBZ, a 25°C.

	Dendrón		
	BBN	BBA	BTA
$A_0$ monocapa pura ( $\text{Å}^2$ )	161	150	126
$A_0$ monocapa mixta ( $\text{Å}^2$ )	184	170	151.6

Los valores de área límite de los dendrones en presencia de CBZ son superiores a los obtenidos en las isotermas de dendrones puros. Estos resultados indican que en presencia de CBZ los dendrones conservan su capacidad de formar monocapas y que las

moléculas de droga se ubicarían en la interfase aire-agua junto con las moléculas de dendrón formando la película.



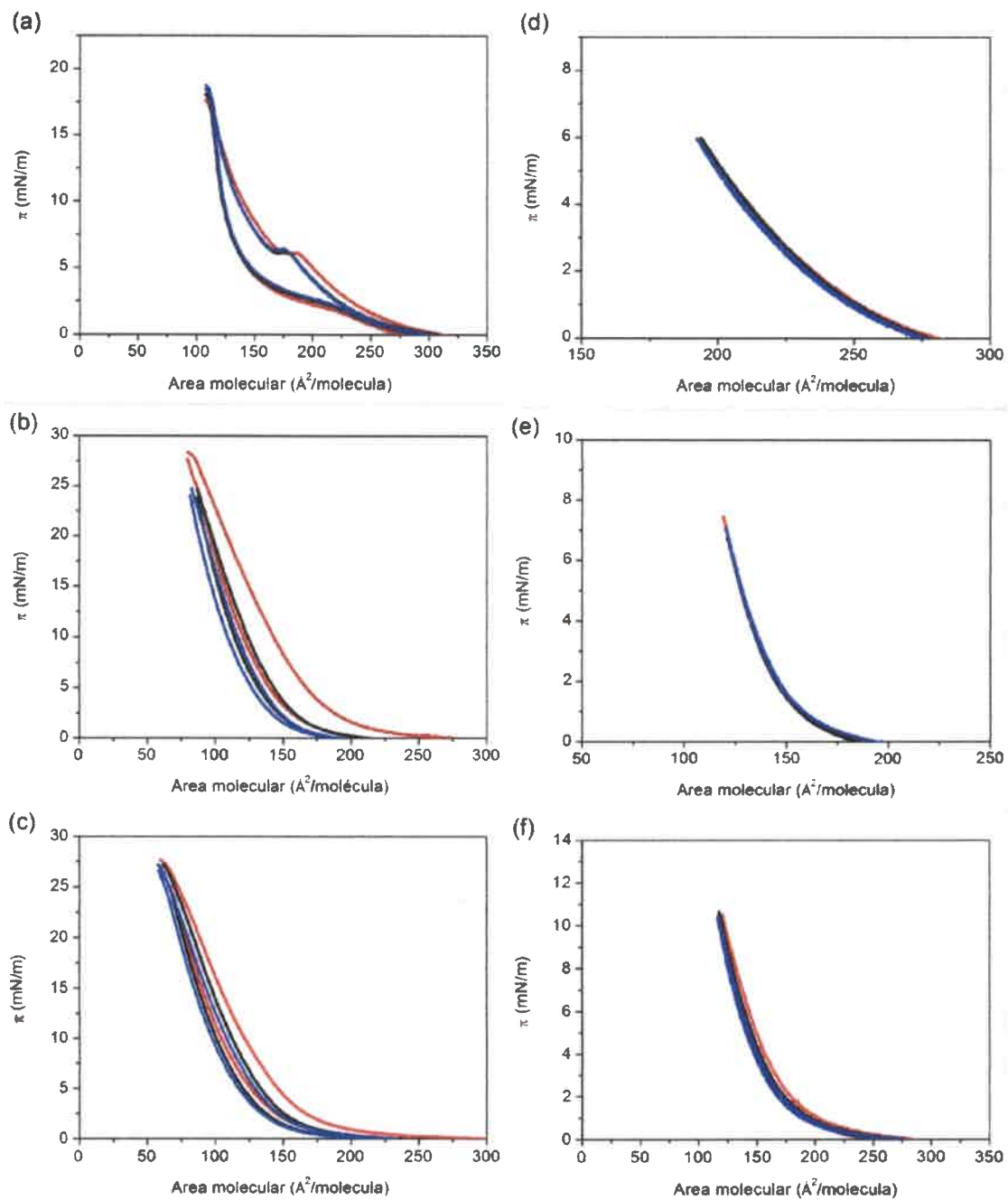
**Figura 63.** Isotermas ( $\pi$ -A) de las monocapas de los dendrones (negro) y de las monocapas mixtas dendrón-CBZ (rojo), a 25 °C.  
(a) BBN, (b) BBA y (c) BTA).

Teniendo en cuenta las áreas moleculares obtenidas de las monocapas puras y mixtas, y la relación [CBZ]/[dendrón] de las soluciones con la que se formaron las películas complejas, se calculó el área por molécula de CBZ en cada caso, suponiendo que todas las moléculas de droga se ubican en la interfase. Los valores obtenidos fueron:  $5 \text{ \AA}^2$  para el sistema BBN-CBZ,  $4.7 \text{ \AA}^2$  para BBA-CBZ y  $5.5 \text{ \AA}^2$  para el sistema BTA-CBZ. El área por molécula de CBZ prácticamente es la misma en todos los casos, alrededor de  $5 \text{ \AA}^2$ , lo que permite inferir que, en todas las películas de dendrón, el compuesto activo se incorpora en una misma proporción, provocando un mismo incremento del área ocupada por la monocapa. Además, los valores de área por molécula de CBZ obtenidos están de acuerdo al área estimada por el método AM1 para una molécula de CBZ ( $4-7 \text{ \AA}^2$ , según la proyección de la molécula en el plano que se considere).

#### 6.2.1.7 Análisis de la reversibilidad y estabilidad de las monocapas mixtas de dendrón-CBZ

Con el fin de evaluar la reversibilidad y estabilidad de las monocapas mixtas en la superficie acuosa se realizaron estudios de compresión-expansión y mediciones de estabilidad en condiciones isobáricas. La metodología y condiciones experimentales de estos experimentos se describen en la sección 5.22. Estos estudios se llevan a cabo para analizar si la presencia de la droga tiene algún efecto en la reversibilidad y estabilidad de las monocapas y determinar las condiciones más adecuadas para la preparación de las películas de LB.

Los resultados de los experimentos que producen ciclos sucesivos de compresión-expansión se muestran en la Figura 64. Los gráficos de la izquierda muestran los ciclos obtenidos al comprimir las monocapas hasta presiones cercanas a la presión de colapso, mientras que en los gráficos de la derecha se presentan los ciclos obtenidos al comprimir hasta presiones bajas. Las isotermas son muy reversibles a presiones bajas y no se observa histéresis. En el caso del dendrón BBN, las isotermas de la monocapa del compuesto puro presentaban cierta histéresis a baja presión (Figura 59 b), sin embargo, en presencia de CBZ los ciclos a presiones bajas no muestran histéresis. Por otro lado, a presiones altas, cercanas a la presión de colapso, las monocapas mixtas muestran menor reversibilidad que a bajas presiones, presentando un comportamiento similar al de las monocapas de los dendrones puros.



**Figura 64.** Ciclos de compresión-expansión de las monocapas mixtas BBN-CBZ (a y d), BBA-CBZ (b y e) y BTA-CBZ (c y f), a alta (izquierda) y baja (derecha) presión, a 25°C.

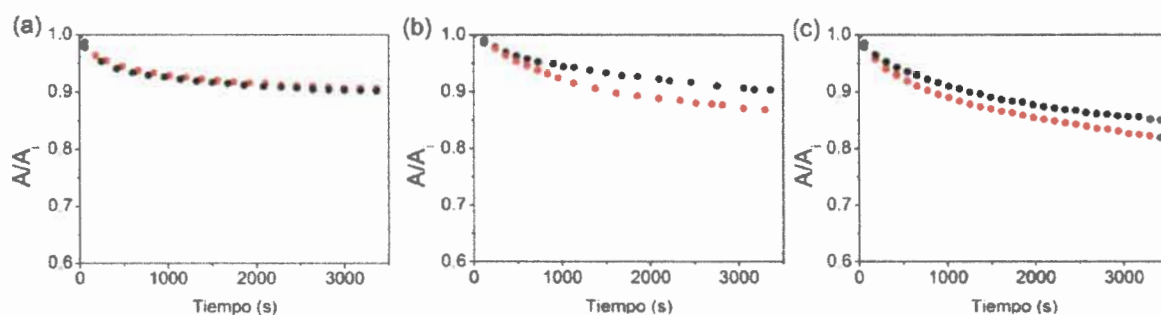
En rojo se muestra el primer ciclo, en negro el segundo y en azul el tercero.

Para determinar la estabilidad de las monocapas de CBZ-dendrón se supervisó la deformación resultante ( $A/A_i$ ) con el tiempo a una presión constante ( $\pi_0$ ), de acuerdo a como se describe en la sección 5.22. La Figura 65 muestra los gráficos de ( $A/A_i$ ) vs tiempo para las monocapas mixtas junto con los gráficos correspondientes a los dendrones puros, a la misma presión, para su comparación. En comparación con las monocapas de dendrón



sólo, la estabilidad de las películas de BBA y BTA disminuye en presencia de la droga, sin embargo, las monocapas siguen siendo muy estables, observándose poca pérdida en el área luego de una hora. En el caso del dendrón BBN, la estabilidad de la monocapa no se ve afectada por la presencia de CBZ.

Estos estudios indican que la presencia de la droga no tiene un efecto significativo en la reversibilidad y estabilidad de las monocapas de los dendrones. Sobre la base de estos resultados se puede concluir que será conveniente generar las películas mixtas de LB en condiciones similares a las usadas al realizar las transferencias de las películas de dendrón sólo.



**Figura 65.** Gráficos de  $(A/A_i)$  vs el tiempo de las monocapas de los dendrones puros (negro) y con CBZ (rojo), a 15 mN/m, a 25 °C.

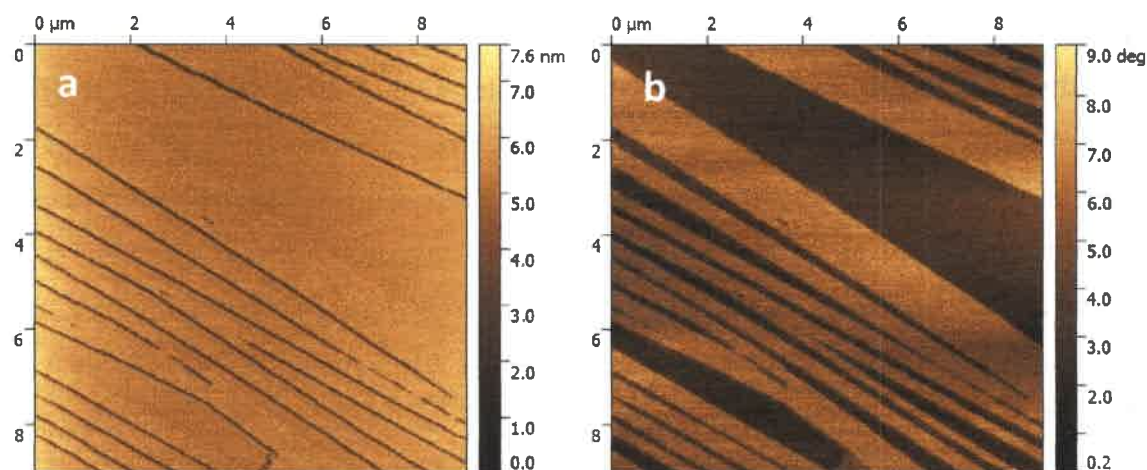
(a) BBN y BBN-CBZ, (b) BBA y BBA-CBZ y (c) BTA y BTA-CBZ.

#### 6.2.1.8 Transferencia de la monocapa mixta BBN-CBZ sobre mica y caracterización mediante AFM

Se llevaron a cabo las transferencias de las monocapas de Langmuir de los dendrones con CBZ de acuerdo a como se detalla en la sección 5.23. Sólo se obtuvieron radios de transferencia aceptables ( $1.0 \pm 0.2$ ) y reproducibles para la monocapa de BBN-CBZ. Esto indica una vez más la importancia de la presencia de un grupo nitrobenzeno como punto focal del dendron en la formación de las películas de LB, tal como se observó anteriormente en la formación de las películas de LB de los dendrones puros.

En la Figura 66 se muestran las imágenes AFM de topografía y fase de una monocapa mixta de BBN-CBZ sobre mica transferida a 10 mN/m. Se puede observar el mismo patrón de tiras que el obtenido para una monocapa de BBN sobre mica (Figura 62 a-d), lo que sugiere que la presencia de la droga no altera el empaquetamiento de las moléculas de dendrón en la monocapa. Además, se puede observar que la monocapa cubre

un alto porcentaje de la superficie del sustrato, lo cual está de acuerdo con la relación de transferencia obtenida en la formación de la película de LB ( $1.0 \pm 0.2$ ).



**Figura 66.** Imágenes AFM de topografía (a) y fase (b) de una monocapa de Langmuir-Blodgett de BBN-CBZ depositada sobre mica a 10 mN/m

Estos resultados demuestran que, en el caso del dendrón BBN, es posible la generación de películas compuestas de fármaco-dendrímico homogéneas y ordenadas sobre un sustrato sólido, donde el compuesto activo se incorpora como huésped en la película dendrimérica. Por lo tanto, esto permite proponer a las películas de LB de BBN-CBZ como un modelo interesante en el estudio de la administración de drogas mediado por superficie. Con este fin, se evaluó la biocompatibilidad de la película de LB de dendrón a través un ensayo *in vitro* de cultivo celular sobre la película.

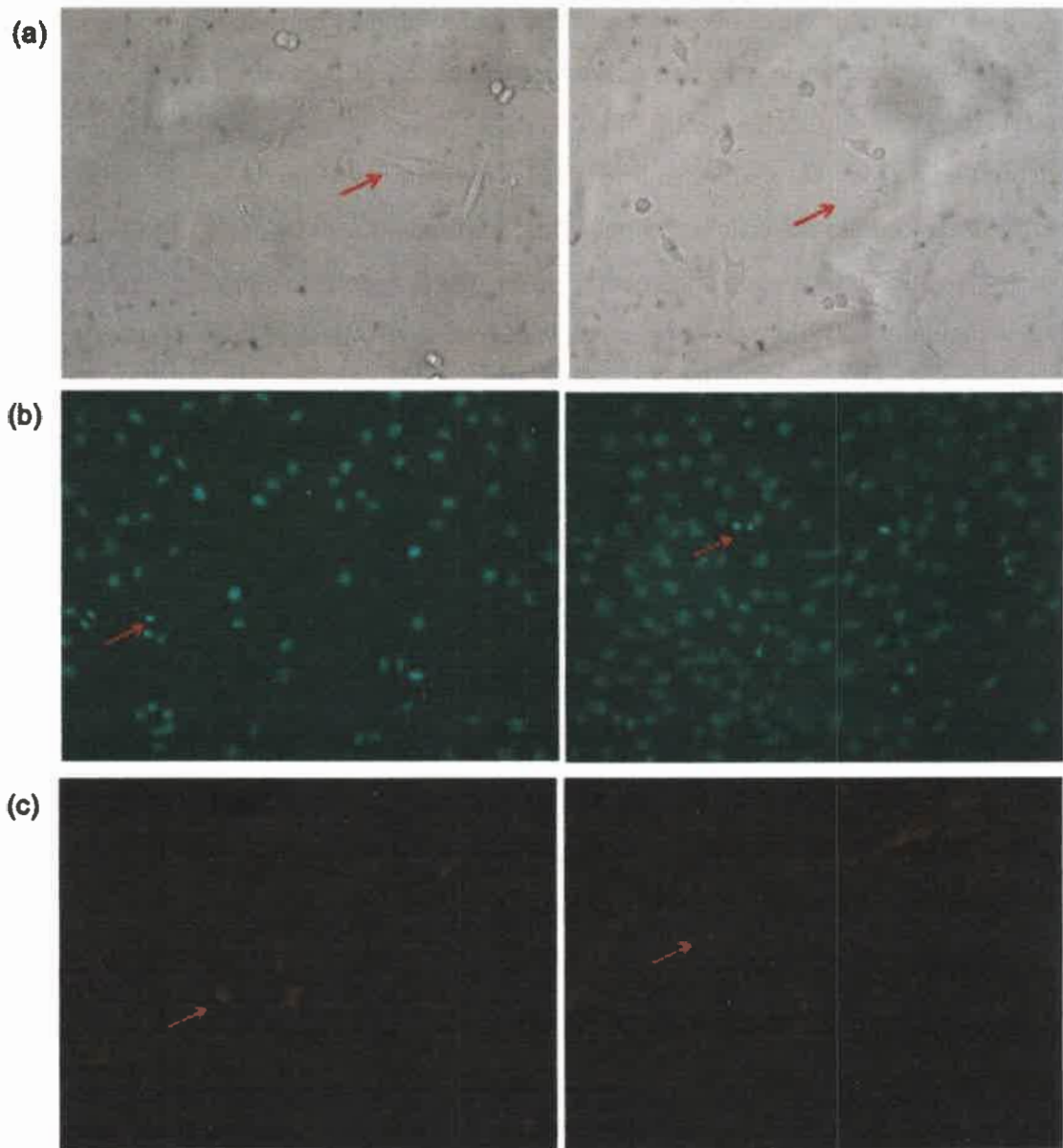
#### 6.2.1.9 Análisis de la biocompatibilidad de las películas de LB de dendrón BBN.

Antes de la aplicación *in vivo* de las películas de dendrón como sistemas de administración de drogas mediado por superficie, se deben realizar numerosos ensayos de biocompatibilidad y bioseguridad. Por lo tanto, con el objetivo de realizar una prueba preliminar de la biocompatibilidad de las películas de dendrón BBN, se ensayó si dichas películas permiten la unión y crecimiento normal de células NIH 3T3. Para esto, las células se sembraron sobre una placa de cultivo (control), sobre mica y sobre la película de dendrón, de acuerdo a la metodología experimental detallada en la sección 5.25.

Los resultados obtenidos indicaron que las células se unen normalmente tanto a la superficie de mica como a la película de dendrón, demostrando que la presencia de los

dendrones BBN no interfieren en el proceso de adhesión celular. Además, las células unidas mostraron la morfología típica de fibroblastos cuando se observaron con un aumento de 400X bajo el microscopio de campo brillante (Figura 67 a). Por otro lado, la morfología de las organelas ácidas, teñidas con el colorante fluorescente naranja de acridina, fue similar a la observada en las células control (Figura 67 c). Al analizar las muestras en el microscopio, se observaron células mitóticas (mica: 6%, película de dendrón: 4.8%; Figura 67 b) y el cubrimiento progresivo en el tiempo con células. Esto indica que las células no sólo se adhieren a la mica y la película de dendrón, sino que también sufren mitosis. La tinción nuclear (Hoechst) revela una morfología nuclear normal, con cromatina laxa y mitosis (Figura 67 b). Durante el cultivo celular no se evidenció contaminación microbiana ni fúngica, lo que indica que estos materiales pueden ser adecuadamente preparados para soportar el cultivo de células *in vitro*.

Por lo tanto, de acuerdo a estos resultados preliminares de biocompatibilidad, la película de dendrón BBN es biocompatible, lo cual es muy importante para su potencial aplicación como sistema de administración de droga mediado por superficie.



**Figura 67.** Células NIH 3T3 luego de 24 h de cultivo sobre la superficie de mica (izquierda) o película de LB de dendrón BBN (derecha).

(a) Imágenes de contraste de fase (magnificación x200). Las flechas indican células con morfología típica de fibroblasto. (b) Imágenes de fluorescencia (magnificación x200) de células teñidas con Hoechst. Las flechas indican células en proceso de división mitótica. (c) Imágenes de fluorescencia (magnificación x200) de células teñidas con el colorante fluorescente naranja de acridina. Las flechas indican células con morfología típica de fibroblastos y tinción normal de organelas ácidas. La contaminación bacteriana y/o micótica no es evidente.



De esta manera, se obtuvieron monocapas estables y reproducibles de los dendrones de tipo Newkome en la interfase aire-agua, las cuales se lograron transferir a un sustrato sólido mediante la técnica de LB. Las películas transferidas se caracterizaron por AFM, encontrando que sólo el dendrón BBN permite obtener buenos porcentajes de recubrimiento de la superficie. La película depositada de este dendrón presenta un patrón de tiras, que indica un empaquetamiento muy ordenado de las moléculas. Esta organización se atribuye a la presencia de grupos nitrobenceno en el punto focal del dendrón; las interacciones intermoleculares entre los grupos focales nitrobenceno inducen el desarrollo de monocapas con una orientación preferencial en un eje dado, generando películas anisotrópicas. Cuando se incorpora el compuesto activo CBZ en la monocapa de dendrón BBN la película sigue siendo estable y reproducible. Además, al transferirla sobre un sustrato sólido mediante la técnica de LB y caracterizarla mediante AFM presenta el mismo patrón de tiras que la película de dendrón sólo. Finalmente, se evaluó la biocompatibilidad de la película de LB de BBN mediante el análisis de la unión y crecimiento celular sobre la misma, encontrándose que no posee efectos citotóxicos. Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos, las películas de dendrón BBN resultan sistemas prometedores para futuros desarrollos en el área de la administración de drogas mediada por superficie y otras aplicaciones biológicas.<sup>174</sup>



## 7. CONCLUSIONES

---

En el estudio de dendrímeros como vehículos de drogas en solución, en primer lugar se realizó el estudio de la asociación de un derivado *N*-óxido de 1,2,4 triazina (Triazina) y dendrímeros de generación completa PAMAM-AT y de generación intermedia PAMAM-CT. Los resultados obtenidos indicaron que los dendrímeros con grupos amino terminales y grupos carboxilato terminales inducen la degradación del compuesto activo, a pesar de la regulación del pH de la solución. Los estudios realizados permitieron establecer que la degradación de Triazina estaría relacionada con una interacción de la droga con los microentornos periféricos que presenta la estructura dendrímica, los cuales serían capaces de promover la hidrólisis básica de la droga. Por lo tanto, los dendrímeros amino terminales y carboxilato terminales no son adecuados para su aplicación como nanovehículos para la administración controlada de Triazina. Sin embargo, el dendrímero PAMAM-OHT ( $G = 3$ ), con grupos neutros en su superficie, mostró asociación con el compuesto activo, sin provocar cambios estructurales en el mismo. Los resultados encontrados revelan que las propiedades lipofílicas de las cavidades interiores del dendrímero dominarían la asociación. Además, se observó que las interacciones droga-dendrímtero son lo suficientemente fuertes como para producir una asociación estable en solución acuosa, permitiendo que la solución de Triazina-PAMAM-OHT resulte estable con el tiempo y la temperatura. A su vez, los estudios de liberación *in vitro* mostraron que la asociación de Triazina al dendrímero PAMAM-OHT da lugar a una liberación más lenta de la droga que cuando se encuentra sola en agua. Por lo tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos, de los sistemas dendríméricos ensayados, el dendrímero PAMAM-OHT es el único que tiene la capacidad para actuar como potencial vehículo molecular de Triazina ya que no produce la hidrólisis de la droga. Con el objetivo de que en un futuro este sistema droga-dendrímtero se pueda aplicar en sistemas biológicos, será necesario continuar con estudios biológicos *in vitro* e *in vivo* para analizar su biocompatibilidad.

Por otro lado, se evaluó la capacidad de los dendrímeros PAMAM-AT ( $G = 1$ ), PAMAM-AT ( $G = 3$ ), PAMAM-OHT ( $G = 3$ ) y PPI ( $G=4$ ) para asociarse con Fenazina, con el propósito de seleccionar el dendrímero más adecuado para incrementar la solubilidad acuosa de la droga y actuar como potencial vehículo en solución. Los

resultados obtenidos indicaron que los dendrímeros PAMAM-AT tienen la capacidad de incrementar la solubilidad acuosa de Fenazina, dando lugar a soluciones estables en el tiempo. El incremento de solubilidad se da como consecuencia de la presencia de interacciones iónicas entre los grupos amino terminales de los dendrímeros PAMAM-AT y el grupo fenólico de la droga. En cambio, Fenazina no se asocia al dendrímero PAMAM-OHT ( $G = 3$ ); en este caso, el incremento de solubilidad de la droga sólo se debe al aumento del pH de la solución en presencia del dendrímero y no a la asociación de Fenazina con el polímero. También se estudió la asociación de Fenazina al dendrímero PPI ( $G=4$ ) como una estrategia para obtener un incremento de solubilidad mayor que con los dendrímeros PAMAM-AT. Sin embargo, se encontró que el dendrímero PAMAM-AT ( $G=3$ ) aumenta más la solubilidad de la droga que PPI ( $G=4$ ) para una misma concentración de dendrímero; esto se debe a que para PPI ( $G=4$ ) existe un mayor impedimento estérico en la unión de moléculas de Fenazina a través de interacciones electrostáticas con los grupos terminales. Las soluciones del complejo Fenazina-PPI ( $G=4$ ) también resultaron estables con el tiempo. Además, se analizó la biocompatibilidad y actividad biológica de los complejos Fenazina-dendrímero a través de ensayos de citotoxicidad; se encontró que los complejos no son citotóxicos en células normales pero sí en las células tumorales ensayadas. A su vez, se demostró que la asociación de la droga a los dendrímeros permite disminuir la citotoxicidad de las macromoléculas. Por lo tanto, de los polímeros dendriméricos ensayados, los dendrímeros PAMAM-AT y PPI son vehículos moleculares apropiados para Fenazina; la asociación de la droga a estos dendrímeros permite aumentar su solubilidad acuosa y además disminuye la citotoxicidad del vehículo. La asociación de Fenazina a los dendrímeros PAMAM-AT y PPI a través de interacciones iónicas entre los grupos amino terminales de los dendrímeros y el grupo fenolato de la droga es un factor muy importante que convierte a estos complejos droga-dendrímero en sistemas prometedores para el diseño de sistemas de liberación controlada sensibles al pH. Por lo tanto, este es un aspecto importante para continuar con el estudio de estos sistemas.

Luego se continuó con el estudio de la asociación del carbamato CBZ a un dendrímero no comercial, el dendrímero D, con el objetivo de aumentar su solubilidad en agua y lograr un incremento en su biodisponibilidad y eficacia. Los resultados obtenidos indicaron que el sistema dendrimérico estudiado tiene la capacidad de aumentar la solubilidad de la droga en agua. Este incremento de solubilidad se daría como consecuencia de la incorporación de las moléculas de droga en los microentornos de baja polaridad del dendrímero. Además, se encontró que CBZ se encuentra auto-asociado en

solución acuosa, pero en presencia de dendrímero se elimina la agregación debido a la asociación droga-dendrímero. El análisis de estabilidad del complejo CBZ-dendrímero D mostró que es estable con el tiempo y la temperatura, lo cual es importante para su futura aplicación en la preparación de formulaciones clínicas. Por otro lado, los estudios para ensayar la citotoxicidad del complejo CBZ-dendrímero D, mostraron que el sistema no presenta propiedades hemolíticas. De acuerdo a los resultados obtenidos, el dendrímero D sería un vehículo apropiado para la administración de CBZ ya que tiene el potencial para superar los obstáculos asociados a la administración del fármaco como su baja solubilidad, y, además, no presenta propiedades hemolíticas.

Además de los estudios de polímeros dendriméricos como vehículos de drogas en solución, se generaron y caracterizaron películas de tres dendrones del tipo Newkome para su potencial aplicación como sistemas de administración de drogas mediada por superficie. El estudio se inició con la formación y caracterización de las monocapas de Langmuir de los tres dendrones sobre la interfase aire-agua. La utilización de estos dendrones con diferentes características estructurales permitió evaluar la incidencia de los diversos grupos estructurales en la generación de las monocapas. Se encontró que las propiedades fisicoquímicas del grupo focal tienen un rol muy importante en el comportamiento de los dendrones en la interfase aire-agua. A diferencia de los dendrones BBA y BTA, el dendrón BBN forma dominios a bajas presiones superficiales, debido a interacciones entre los grupos nitrobenzenceno de diferentes moléculas. Además, todas las monocapas de los dendrones resultaron estables a bajas y altas presiones, lo que indica que el balance hidrofílico/lipofílico de las moléculas dendriméricas estudiadas permite obtener una disposición estable y reproducible en la interface aire-agua.

De acuerdo a los experimentos de generación y caracterización de películas de Langmuir-Blodgett de los dendrones se puede concluir que sólo con el dendrón BBN se logró un buen recubrimiento de la superficie. Además, la caracterización mediante AFM mostró que las películas de dendrón BBN depositadas presentan un patrón de tiras, lo cual indica un empaquetamiento muy ordenado de las moléculas.

Se estudió la formación de monocapas mixtas de los dendrones con el compuesto activo CBZ. En presencia de CBZ los dendrones conservan su capacidad de formar monocapas y las moléculas de droga se ubicarían en la interfase aire-agua junto con las moléculas de dendrones. Además, la presencia de compuesto activo no tiene un efecto significativo en la reversibilidad y estabilidad de las monocapas de los dendrones.



Luego se investigó la transferencia de las películas de Langmuir mixtas droga-dendróon mediante la técnica de Langmuir-Blodgett, lográndose una transferencia exitosa sólo de la monocapa de BBN-CBZ. En este caso, al igual que para la monocapa de Langmuir-Blodgett del dendróon puro BBN, se observó un ordenamiento del tipo tiras al analizarla mediante AFM.

Los resultados encontrados demostraron la importancia del grupo focal nitrobenceno del dendróon BBN en la formación de las películas de Langmuir-Blodgett y el papel crucial que juegan tanto las interacciones dendróon-dendróon como las interacciones dendróon-subfase en la formación de las películas de Langmuir y Langmuir-Blodgett, determinando la organización de las monocapas.

Finalmente se evaluó la biocompatibilidad de la película de Langmuir-Blodgett del dendróon BBN a través de un ensayo de cultivo celular sobre la misma. De acuerdo a los resultados obtenidos se pudo concluir que la película de dendróon BBN no presenta efectos citotóxicos, lo cual es muy importante para su potencial aplicación como sistema de administración de droga mediado por superficie.

Por lo tanto, los estudios de los dendrones de tipo Newkome permiten concluir que el dendróon BBN es el más adecuado para el desarrollo de películas con potencial aplicación en la administración de fármacos mediada por superficie ya que forma películas de Langmuir estables y reproducibles y permite obtener películas de Langmuir-Blodgett con buenos porcentajes de recubrimiento de la superficie. Además, es posible la generación de películas compuestas de fármaco-dendróon BBN homogéneas y ordenadas sobre un sustrato sólido, donde el compuesto activo se incorpora como huésped en la película dendrímica. A su vez, los estudios de biocompatibilidad indicaron que la película de BBN es biocompatible. Todo esto permite proponer a las películas de dendróon BBN como un modelo interesante para continuar con el estudio de la administración de drogas mediado por superficie. De esta manera, en un futuro se debería abordar el estudio de otros aspectos, como la liberación de la droga desde la película.

Finalmente, los estudios realizados en este trabajo de tesis doctoral representan una base importante para continuar con el estudio de dendrímeros como vehículos de drogas en solución y el diseño de películas dendrímicas con potencial aplicación en el desarrollo de sistemas de administración de drogas mediado por superficie.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- <sup>1</sup> Turrin, C. O. y Caminade, A. M., *Dendrimer Conjugates for Drug Delivery, Dendrimers: Towards Catalytic, Material and Biomedical Uses*, eds A. M. Caminade, C. O. Turrin, R. Laurent, A. Ouali y B. Delavaux Nicot, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. 2011. DOI: 10.1002/9781119976530.ch18
- <sup>2</sup> Quadir, M. A.; Calderón, M. y Haag, R., *Dendritic Polymers in Oncology: Facts, Features, and Applications, in Drug Delivery in Oncology: From Basic Research to Cancer Therapy*, eds F. Kratz, P. Senter y H. Steinhagen, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. 2011. DOI: 10.1002/9783527634057.ch18
- <sup>3</sup> Kumari, P.; Ghosh, B. y Biswas, S., *Journal of drug targeting*, **2016**, 24(3), 179-191. DOI: 10.3109/1061186X.2015.1051049
- <sup>4</sup> Yang, W. W. y Pierstorff, E., *Journal of laboratory automation*, **2012**, 17(1), 50-58. DOI: 10.1177/2211068211428189
- <sup>5</sup> Yan, L. y Chen, X., 7 - Nanomaterials for Drug Delivery, *Nanocrystalline Materials: Their synthesis-structure-property relationships and applications*, 2013. DOI: 10.1016/B978-0-12-407796-6.00007-5
- <sup>6</sup> Beija, M.; Salvayre, R.; Lauth-de Viguierie, N. y Marty, J. D., *Trends in biotechnology*, **2012**, 30(9), 485-496. DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.04.008
- <sup>7</sup> He, X.; Alves, C. S.; Oliveira, N.; Rodrigues, J.; Zhu, J.; Bányai, I.; Tomás, H. y Shi, X., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2015**, 125, 82-89. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.11.004
- <sup>8</sup> Tomalia, D. A. y Fréchet, J. M. J., *Dendrimers and Other Dendritic Polymers*, J. M. and D. Tomalia (eds), John Wiley & Sons, Chichester. 2001
- <sup>9</sup> Tomalia, D. A., *Materials Today*, **2005**, 8(3), 34-46. DOI: 10.1016/S1369-7021(05)00746-7
- <sup>10</sup> Tomalia, D. A. y Fréchet, J. M., *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **2002**, 40(16), 2719-2728. DOI: 10.1002/pola.10301
- <sup>11</sup> Tomalia, D. A., *Progress in Polymer Science*, **2005**, 30(3), 294-324. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2005.01.007
- <sup>12</sup> Rogošić, M., Mencer, H. J. y Gomzi, Z., *Eur. Polym. J.*, 1996, 32(11), 1337-1344. DOI: 10.1016/S0014-3057(96)00091-2
- <sup>13</sup> Patel, H. N. y Patel, P. M., *Int. J. Pharm. Bio. Sci.*, **2013**, 4(2), 454-463.
- <sup>14</sup> Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J. y Smith, P., *Polym. J.*, **1985**, 17(1), 117-132.
- <sup>15</sup> Newkome, G. R.; Yao, Z.; Baker, G. R. y Gupta, V. K., *J. Org. Chem.*, **1985**, 50(11), 2004-2006.
- <sup>16</sup> Buhleier, E.; Wehner, W. y Vögtle, F., *Synthesis*, **1978**, 55-158.



- <sup>17</sup> Astruc, D.; Boisselier, E. y Ornelas, C., *Chem. Rev.*, **2010**, *110*(4), 1857-1959. DOI: 10.1021/cr900327d
- <sup>18</sup> Matai, I.; Sachdev, A. y Packirisamy, G., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2015**, *7*(21), 11423-11435. DOI: 10.1021/acsami.5b02095
- <sup>19</sup> Wu, L.; Ficker, M.; Christensen, J. B.; Trohopoulos, P. N. y Moghimi, S. M., *Bioconjugate Chem.*, **2015**, *26*(7), 1198-1211. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00031
- <sup>20</sup> Svenson, S. y Chauhan, A. S., *Nanomedicine*, **2008**, *3*(5), 679-702. DOI: 10.2217/17435889.3.5.679
- <sup>21</sup> Kalomiraki, M.; Thermos, K. y Chaniotakis, N. A., *International journal of nanomedicine*, **2016**, *11*, 1-12. DOI: 10.2147/IJN.S93069
- <sup>22</sup> Paez, J. I.; Martinelli, M.; Brunetti, V. y Strumia, M. C., *Polymers*, **2012**, *4*(1), 355-395. DOI: 10.3390/polym4010355
- <sup>23</sup> Mintzer, M. A. y Grinstaff, M. W., *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 173-190. DOI: 10.1039/b901839p
- <sup>24</sup> Klajnert, B., y Bryszewska, M., *Acta biochimica polonica*, **2000**, *48*(1), 199-208.
- <sup>25</sup> Hawker, C. J. y Fréchet, J. M. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*(21), 7638-7647. DOI: 10.1021/ja00177a027
- <sup>26</sup> Miller, T. M.; Kwock, E. W.; Neenan, T. X., *Macromolecules*, **1992**, *25*(12), 3143-3148. DOI: 10.1021/ma00038a019
- <sup>27</sup> Medina, S. H. y El-Sayed, M. E. H., *Chem. Rev.*, **2009**, *109*(7), 3141-3157. DOI: 10.1021/cr900174j
- <sup>28</sup> De Gennes, P. G. y Hervet, H., *J. Phys. Lett.*, **1983**, *44*(9), 351-360. DOI: 10.1051/jphyslet:01983004409035100
- <sup>29</sup> Eichman, J. D.; Bielinska, A. U.; Kukowska-Latallo, J. F. y Baker, J. R., *Pharm. Sci. Technol. Today*, **2000**, *3*(7), 232-245. DOI: 10.1016/S1461-5347(00)00273-X
- <sup>30</sup> Marcos, M. y Serrano, J. L., *An. Quím.*, **2009**, *105*(2), 103-110.
- <sup>31</sup> Wooley, K. L.; Hawker, C. J., y Fréchet, J. M. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*(11), 4252-4261. DOI: 10.1021/ja00011a031
- <sup>32</sup> Kawaguchi, T., Walker, K. L., Wilkins, C. L., y Moore, J. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*(8), 2159-2165. DOI: 10.1021/ja00113a005
- <sup>33</sup> Spindler, R. y Fréchet, J. M., *J. Chem. Soc., Perkin Transactions*, **1993**, *1*(8), 913-918. DOI: 10.1039/P19930000913
- <sup>34</sup> Maraval, V., Pyzowski, J., Caminade, A. M. y Majoral, J. P., *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*(15), 6043-6046. DOI: 10.1021/jo0344438
- <sup>35</sup> Maraval, V., Laurent, R., Marchand, P., Caminade, A. M. y Majoral, J. P., *J. Organomet. Chem.*, **2005**, *690*(10), 2458-2471. DOI: 10.1016/j.jorganchem.2004.10.021

- <sup>36</sup> Wu, P.; Feldman, A. K.; Nugent, A. K.; Hawker, C. J.; Scheel, A.; Voit, B.; Pyun, J.; Fréchet, J. M. J.; Sharpless, K. B. y Fokin, V. V., *Angew. Chem.*, **2004**, *116*(30), 4018-4022. DOI: 10.1002/ange.200454078
- <sup>37</sup> Nandivada, H.; Jiang, X. y Lahann, J., *Adv. Mater.*, **2007**, *19*(17), 2197-2208. DOI: 10.1002/adma.200602739
- <sup>38</sup> Hsu, H. J.; Bugno, J.; Lee, S. R. y Hong, S., *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.*, **2016**. DOI: 10.1002/wnan.1409
- <sup>39</sup> Lee, C. C.; MacKay, J. A.; Fréchet, J. M. y Szoka, F. C., *Nature biotechnology*, **2005**, *23*(12), 1517-1526. DOI: 10.1038/nbt1171
- <sup>40</sup> Caminade, A. M. y Turrin, C. O., *J. Mater. Chem. B*, **2014**, *2*(26), 4055-4066. DOI: 10.1039/c4tb00171k
- <sup>41</sup> Esfand, R. y Tomalia, D. A., *Drug Discov. Today*, **2001**, *6*(8), 427-436. DOI: 10.1016/S1359-6446(01)01757-3
- <sup>42</sup> Ottaviani, M. F.; Montalti, F.; Romanelli, M.; Turro, N. J. y Tomalia, D. A., *J. Phys. Chem.*, **1996**, *100*(26), 11033-11042. DOI: 10.1021/jp953261h
- <sup>43</sup> Chen, W.; Tomalia, D. y Thomas, J., *Macromolecules*, **2000**, *33*(25), 9169-9172. DOI: 10.1021/ma000791p
- <sup>44</sup> Lee, I.; Athey, B. D.; Wetzell, A. W.; Meixner, W. y Baker, J. Jr, *Macromolecules*, **2002**, *35*(11), 4510-4520. DOI: 10.1021/ma010354q
- <sup>45</sup> Diallo, M. S.; Christie, S.; Swaminathan, P.; Balogh, L.; Shi, X.; Um, W.; Papelis, C.; Goddard, W. A. y Johnson, J. H., *Langmuir*, **2004**, *20*(7), 2640-2651. DOI: 10.1021/la036108k
- <sup>46</sup> Devarakonda, B.; Hill, R. A. y de Villers, M. M., *Int. J. Pharm.*, **2004**, *284*(1), 133-140. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2004.07.006
- <sup>47</sup> Murat, M. y Grest, G. S., *Macromolecules*, **1996**, *29*(4), 1278-1285. DOI: 10.1021/ma951219e
- <sup>48</sup> Chai, M., Niu, Y., Youngs, W. J. y Rinaldi, P. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*(20), 4670-4678. DOI: 10.1021/ja002824m
- <sup>49</sup> Boas, U., Christensen, J. B., y Heegaard, P. M., *J. Mater. Chem.*, **2006**, *16*(38), 3785-3798. DOI: 10.1039/b611813p
- <sup>50</sup> Bosman, A. W.; Janssen, H. M. y Meijer, E. W., *Chem. Rev.*, **1999**, *99*(7), 1665-1688. DOI: 10.1021/cr970069y
- <sup>51</sup> Welch, P., y Muthukumar, M., *Macromolecules*, **1998**, *31*(17), 5892-5897. DOI: 10.1021/ma980198w
- <sup>52</sup> Ramzi, A., Scherrenberg, R., Joosten, J., Lemstra, P. y Mortensen, K., *Macromolecules*, **2002**, *35*(3), 827-833. DOI: 10.1021/ma011057o

- <sup>53</sup> Turrin, C. O. y Caminade, A. M., *Encapsulation of Drugs Inside Dendrimers*, in *Dendrimers: Towards Catalytic, Material and Biomedical Uses*, eds A. M. Caminade, C. O. Turrin, R. Laurent, A. Ouali and B. Delavaux Nicot, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. 2011. DOI: 10.1002/9781119976530.ch19
- <sup>54</sup> Quadir, M. A. y Haag, R., *J. Control. Release*, **2012**, 161(2), 484-495. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.12.040
- <sup>55</sup> Svenson, S. y Tomalia, D. A., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2012**, 64, 102-115. DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.030
- <sup>56</sup> Kalhapure, R. S.; Kathiravan, M. K.; Akamanchi, K. G. y Govender, T.; *Pharm. Dev. Technol.*, **2015**, 20(1), 22-40. DOI: 10.3109/10837450.2013.862264
- <sup>57</sup> Kannan, R. M.; Nance, E.; Kannan, S. y Tomalia, D. A., *J. Intern. Med.*, **2014**, 276(6), 579-617. DOI: 10.1111/joim.12280
- <sup>58</sup> Gillies, E. R. y Frechet, J. M. J., *Drug Discov. Today*, **2005**, 10(1), 35-43. DOI: 10.1016/S1359-6446(04)03276-3
- <sup>59</sup> Qiao, W.; Wang, B.; Wang, Y.; Yang, L.; Zhang, Y. y Shao, P., *J. Nanomater.*, **2010**, 2010, 7. DOI:10.1155/2010/796303
- <sup>60</sup> Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; Farokhzad, O. C.; Margalit, R. y Langer, R., *Nat. Nanotechnol.*, **2007**, 2(12), 751-760. DOI: 10.1038/nnano.2007.387
- <sup>61</sup> Kesharwani, P. y Iyer, A. K., *Drug Discov. Today*, **2015**, 20(5), 536-547. DOI: 10.1016/j.drudis.2014.12.012
- <sup>62</sup> Fox, M. E.; Skoza, F. C. y Frechet, J. M. J., *Accounts Chem. Res.*, **2009**, 42(8), 1141-1151. DOI: 10.1021/ar900035f
- <sup>63</sup> Wang, M.; Wang, Y.; Hu, K.; Shao, N. y Cheng, Y., *Biomater. Sci.*, **2015**, 3(3), 480-489. DOI: 10.1039/c4bm00365a
- <sup>64</sup> Wang, H., Huang, Q., Chang, H., Xiao, J., & Cheng, Y., *Biomater. Sci.*, **2016**, 4(3), 375-390. DOI: 10.1039/c5bm00532a
- <sup>65</sup> Albertazzi, L.; Serresi, M.; Albanese, A. y Beltram, F., *Mol. Pharmaceutics*, **2010**, 7(3), 680-688. DOI: 10.1021/mp9002464
- <sup>66</sup> Seib, F. P.; Jones, A. T. y Duncan, R., *J. Control. Release*, **2007**, 117(3), 291-300. DOI: 10.1016/j.jconrel.2006.10.020
- <sup>67</sup> Duncan, R.; Izzo, L., *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2005**, 57(15), 2215-2237. DOI: 10.1016/j.addr.2005.09.019
- <sup>68</sup> Roberts, J. C.; Bhalgat, M. K. y Zera, R. T., *J. Biomed. Mater. Res.*, **1996**, 30(1), 53-65.

- <sup>69</sup> Malik, N.; Wiwattanapatapee, R.; Klopsch, R.; Lorenz, K.; Frey, H.; Weener, J. W.; Meijer, E. W.; Paulus, W. y Duncan, R., *J. Control. Release*, **2000**, *65*(1), 133-148. DOI: 10.1016/S0168-3659(99)00246-1
- <sup>70</sup> Jevprasesphant, R.; Penny, J.; Jalal, R.; Attwood, D.; McKeown, N. B. y D'emanuele, A., *Int. J. Pharm.*, **2003**, *252*(1), 263-266. DOI: 10.1016/S0378-5173(02)00623-3
- <sup>71</sup> Murugan, E.; Rani, D. G. y Yogaraj, V., *Colloids Surf. B*, **2014**, *114*, 121-129. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2013.10.002
- <sup>72</sup> Shcharbin, D.; Janaszewska, A.; Klajnert-Maculewicz, B.; Ziembra, B.; Dzmirutk, V.; Halets, I.; Loznikova, S., Shcharbina, N., Milowska, K., Ionov M. y Shakhbazau, A., *J. Control. Release*, **2014**, *181*, 40-52. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.02.021
- <sup>73</sup> Mekuria, S. L.; Debele, T. A. y Tsai, H. C., *RSC Adv.*, **2016**, *6*(68), 63761-63772. DOI: 10.1039/C6RA12895E
- <sup>74</sup> Sonawane, N. D.; Szoka, F. C. y Verkman, A. S., *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*(45), 44826-44831. DOI: 10.1074/jbc.M308643200
- <sup>75</sup> Hubbard, D.; Enda, M.; Bond, T.; Moghaddam, S. P. H.; Conarton, J.; Scaife, C.; Volckmann, E. y Ghandehari, H., *Mol. Pharmaceutics*, **2015**, *12*(11), 4099-4107. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00541
- <sup>76</sup> Kesharwani, P.; Jain, K. y Jain, N. K., *Prog. Polym. Sci.*, **2014**, *39*(2), 268-307. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2013.07.005
- <sup>77</sup> Mignani, S.; El Kazzouli, S.; Bousmina, M. y Majoral, J. P., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2013**, *65*(10), 1316-1330. DOI: 10.1016/j.addr.2013.01.001
- <sup>78</sup> Zelikin, A. N., *ACS nano*, **2010**, *4*, 2494-2509. DOI: 10.1021/nn100634r
- <sup>79</sup> Panneerselvam, K.; Mena-Hernando, S.; Teo, B. M.; Goldie, K. N. y Städler, B., *RSC Adv.*, **2014**, *4*, 44769-44776. DOI: 10.1039/c4ra07720b
- <sup>80</sup> Lyngge, M. E.; Schattling, P. y Städler, B., *Nanomedicine*, **2015**, *10*, 2725-2742. DOI: 10.2217/nnm.15.89
- <sup>81</sup> Hayward, S. L.; Francis, D. M.; Sis, M. J. y Kidambi, S., *Sci. Rep.*, **2015**, *5*. DOI: 10.1038/srep14683
- <sup>82</sup> Felipe, M. J.; Estillore, N.; Pernites, R. B.; Nguyen, T.; Ponnampati, R. y Advincula, R. C., *Langmuir*, **2011**, *27*, 9327-9336. DOI: 10.1021/la200916n
- <sup>83</sup> Lee, J.; Kim, K.; Lee, S.; Kim, H. K. y Sohn, D., *Langmuir*, **2008**, *24*, 12426-12430. DOI: 10.1021/la802438n
- <sup>84</sup> Degen, P.; Wyszogrodzka, M. y Strötges, C., *Langmuir*, **2012**, *28*, 12438-12442. DOI: 10.1021/la302090k
- <sup>85</sup> Zhao, L.; Lin, Z., *Soft Matter*, **2011**, *7*, 10520-10535. DOI: 10.1039/c1sm05745f



- <sup>86</sup> Greene, J. E., *Appl. Phys. Rev.*, **2015**, *2*, 011101. DOI: 10.1063/1.4907770
- <sup>87</sup> Ariga, K.; Yamauchi, Y.; Mori, T. y Hill, J. P., *Adv. Mat.*, **2013**, *25*, 6477-6512. DOI: 10.1002/adma.201302283
- <sup>88</sup> Wang, X.; Ma, X. y Zang, D., *Soft Matter*, **2013**, *9*, 443-453. DOI: 10.1039/c2sm26797g
- <sup>89</sup> Sui, G.; Mabrouki, M.; Ma, Y.; Micic, M. y Leblanc, R. M., *J. Colloid Interface Sci.*, **2002**, *250*, 364-370. DOI: 10.1006/jcis.2002.8351
- <sup>90</sup> Su, A.; Tan, S.; Thapa, P.; Flanders, B. N. y Ford, W. T., *J. Phys. Chem. C*, **2007**, *111*, 4695-4701. DOI: 10.1021/jp0683566
- <sup>91</sup> Kirton, G.; Brown, A.; Hawker, C.; Reynolds, P. y White, J., *Physica B.*, **1998**, *248*, 184-190. DOI: 10.1016/S0921-4526(98)00229-4
- <sup>92</sup> Saville, P.; Reynolds, P.; White, J.; Hawker, C.; Fréchet, J.; Wooley, K.; Penfold, J. y Webster, J., *J. Phys. Chem.*, **1995**, *99*, 8283-8289. DOI: 10.1021/j100020a062
- <sup>93</sup> Kampf, J. P.; Frank, C. W.; Malmström, E. E. y Hawker, C. J., *Langmuir*, **1999**, *15*, 227-233. DOI: 10.1021/la980808l
- <sup>94</sup> Park, J. Y.; Ponnampati, R.; Taraneekar, P. y Advincula, R. C., *Langmuir*, **2009**, *26*, 6167-6176. DOI: 10.1021/la902404b
- <sup>95</sup> Duan, P. y Liu, M., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2010**, *12*, 4383-4389. DOI: 10.1039/b923595g
- <sup>96</sup> Tully, D. C. y Fréchet, J. M., *Chem. Commun.*, **2001**, 1229-1239. DOI: 10.1039/b104290b
- <sup>97</sup> Ahmad, F. y Shin, K., *Int. J. Nanotechnol.*, **2006**, *3*, 353-371. DOI: 10.1504/IJNT.2006.009588
- <sup>98</sup> Park, J. Y. y Advincula, R. C., *Soft Matter*, **2011**, *7*, 9829-9843. DOI: 10.1039/c1sm05750b
- <sup>99</sup> Fernandez, L.; Calderón, M.; Martinelli, M.; Strumia, M.; Cerecetto, H.; González, M.; Silber, J. J. y Santo, M., *J. Phys. Org. Chem.*, **2008**, *21*(12), 1079-1085. DOI: 10.1002/poc.1448
- <sup>100</sup> Martinelli, M.; Calderón, M.; Rodríguez, E.; Freire, J. J. y Strumia, M. C., *Eur. Polym. J.*, **2007**, *43*(5), 1978-1985. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2007.02.005
- <sup>101</sup> Martinelli, M.; Calderón, M.; Alvarez, C. I. y Strumia, M. C., *React. Funct. Polym.*, **2007**, *67*(10), 1018-1026. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2007.06.005
- <sup>102</sup> Sztanke, K.; Pasternak, K.; Rajtar, B.; Sztanke, M.; Majek, M. y Polz-Dacewicz, M., *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*(16), 5480-5486. DOI: 10.1016/j.bmc.2007.05.048
- <sup>103</sup> Diana, P.; Barraja, P.; Lauria, A.; Montalbano, A.; Almerico, A. M.; Dattolo, G. y Cirrincione, G., *Eur. J. Med. Chem.*, **2002**, *37*(3), 267-272. DOI: 10.1016/S0223-5234(02)01339-9
- <sup>104</sup> Patil, S. A.; Otter, B. A. y Klein, R. S., *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*(30), 5339-5342. DOI: 10.1016/S0040-4039(00)73494-0
- <sup>105</sup> Hay, M. P.; Hicks, K. O.; Pchalek, K.; Lee, H. H.; Blaser, A.; Pruijn, F. B.; Anderson, R. F.; Shinde, S. S.; Wilson, W. R. y Denny, W. A., *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*(21), 6853-6865. DOI: 10.1021/jm800967h

- <sup>106</sup> Hay, M. P.; Pchalek, K.; Pruijn, F. B.; Hicks, K. O.; Siim, B. G.; Anderson, R. F.; Shinde, S. S.; Phillips, V.; Denny, W. A. y Wilson, W. R., *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*(26), 6654-6664. DOI: 10.1021/jm701037w
- <sup>107</sup> Cerecetto, H.; González, M.; Onetto, S.; Saenz, P.; Ezpeleta, O.; De Cerain, A. L. y Monge, A., *Arch. Pharm.*, **2004**, *337*(5), 247-258. DOI: 10.1002/ardp.200300782
- <sup>108</sup> Cerecetto, H.; González, M.; Risso, M.; Saenz, P.; Olea-Azar, C.; Bruno, A. M.; Azqueta, A.; De Cerain, A. L. y Monge, A., *Arch. Pharm.*, **2004**, *337*(5), 271-280. DOI: 10.1002/ardp.200300839
- <sup>109</sup> Brown, J. M., *Cancer Res.*, **1999**, *59*(23), 5863-5870.
- <sup>110</sup> Brown, J. M.; *Mol. Med. Today*, **2000**, *6*, 157-162. DOI: 10.1016/S1357-4310(00)01677-4
- <sup>111</sup> Cerecetto, H.; González, M.; Lavaggi, M. L.; Azqueta, A.; López de Cerain, A. y Monge, A., *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*(1), 21-23. DOI: 10.1021/jm0492150
- <sup>112</sup> Cerecetto, H.; González, M. y Lavaggi, M. L.; *Med. Chem.*, **2006**, *2*(3), 315-327. DOI: 10.2174/157340606776930808
- <sup>113</sup> El Rashedy, A. y Aboul-Enein, H. Y.; *Curr. Drug Ther.*, **2013**, *8*(1), 1-14. DOI: 10.2174/1574885511308010001
- <sup>114</sup> Pourgholami, M. H.; Szwajcer, M.; Chin, M.; Liauw, W.; Seef, J.; Galettis, P.; Morris, D. L. y Links, M.; *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **2010**, *65*(3), 597-605. DOI: 10.1007/s00280-009-1157-8
- <sup>115</sup> Casulli, A.; Gomez Morales, M. A.; Gallinella, B.; Turchetto, L. y Pozio, E.; *J. Antimicrob. Chemother.*, **2006**, *58*, 886-890. DOI: 10.1093/jac/dkl329
- <sup>116</sup> Ehteda, A.; Galettis, P.; Pillai, K.; Morris, D.; *BMC Cancer*, **2013**, *13*(1). DOI: 10.1186/1471-2407-13-86.
- <sup>117</sup> Wu, Z.; Medlicott, N.; Razzak, M. y Tucker, I.; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2005**, *39*(1), 225-232. DOI: 10.1016/j.jpba.2005.03.010
- <sup>118</sup> Moriwaki, C.; Costa, G. L.; Ferracini, C.; Moraes, F.; Zanin, G.; Pineda, E. y Matioli, G.; *Braz. J. Chem. Eng.*, **2008**, *25*(2), 255-267. DOI: 10.1590/S0104-66322008000200005
- <sup>119</sup> Pacioni, N. L.; Sueldo Ocelllo, V.; Lazzarotto, M. y Veglia, A.; *Anal. Chim. Acta.*, **2008**, *624*(1), 133-140. DOI: 10.1016/j.aca.2008.06.022
- <sup>120</sup> Zhao, Y.; Pourgholami, M. H.; Morris, D. L.; Collins, J. G. y Day, A. I., *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, *8*(14), 3328-3337. DOI: 10.1039/C003732J
- <sup>121</sup> Fernández, L.; Sigal, E.; Otero, L.; Silber, J. J. y Santo, M.; *Braz. J. Chem. Eng.*, **2011**, *28*(4), 679-689. DOI: 10.1590/S0104-66322011000400013
- <sup>122</sup> Skoog, D. A.; Holler, J. y Nieman, T. *Principios de Análisis Instrumental*. Cengage Learning. 2008

- <sup>123</sup> Reichardt, C. y Welton, T. *Solvents and solvent effects in organic chemistry*. John Wiley & Sons. 2011
- <sup>124</sup> Shorter, J., *Correlation Analysis in organic Chemistry - An introduction to linear Free Energy Relationships*, Clarendon Press Oxford. 1973
- <sup>125</sup> Kamlet, M. J. y Taft, R. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, *98*, 377-383. DOI: 10.1021/ja00418a009
- <sup>126</sup> Kamlet, M. J.; Abboud, J. L. M. y Taft, R.W., *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, *99*, 6027-6038. DOI: 10.1021/ja00460a031
- <sup>127</sup> Taft, R.W.; Abboud, J. L. M.; Kamlet, M. J. y Abraham, M. H., *J. Solution Chem.*, **1985**, *14*, 153. DOI: 10.1007/BF00647061
- <sup>128</sup> Kamlet, M. J.; Doherty, R. M.; Abraham, M. H.; Marcus, Y. y Taft, R.W., *J. Phys. Chem.*, **1988**, *92*, 5244-5255. DOI: 10.1021/j100329a035
- <sup>129</sup> Kamlet, M. J.; Abboud, J. L. M.; Abraham, M. H. y Taft, R.W., *J. Org. Chem.*, **1983**, *48*, 2877-2887. DOI: 10.1021/jo00165a018
- <sup>130</sup> Krygowski, T. M.; Fawcet, W. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, *97*, 2143-2148. DOI: 10.1021/ja00841a026
- <sup>131</sup> Dougherty, R. C., *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 385. DOI: 10.1016/S0040-4039(00)71873-9
- <sup>132</sup> Koppel, I. A.; Palm, I. A., *Organic Reactivity*, **1971**, *8*, 296.
- <sup>133</sup> Swain, C. G.; Swain, M. S.; Powel, A. L.; Aluni, S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, *105*, 502-513. DOI: 10.1021/ja00341a033
- <sup>134</sup> Taft, R. W.; Gramstad, T. y Kamlet, M. J., *J. Org. Chem.*, **1982**, *47*, 4557-4563. DOI: 10.1021/jo00144a030
- <sup>135</sup> Silverstein. R. M.; Webster. F. y Kiemle. D. J. *Spectrometric identification of organic compounds*. John Wiley & Sons. 2005
- <sup>136</sup> Hu, J.; Xu, T. y Cheng, Y.; *Chem. Rev.*, **2012**, *112*, 3856-3891. DOI: 10.1021/cr200333h
- <sup>137</sup> Levine, I. N., *Química cuántica*, Pearson Educación. 2001.
- <sup>138</sup> Stewart, J. J. P., *Semiempirical Molecular orbital methods. History of semiempirical method, Reviews in Computational Chemistry*, K. B. Lipkowitz and D. B. Boyd, Eds., VCH Publishers, New York, *1*, 45-81, 1996.
- <sup>139</sup> Reynolds, C. H., *J. Mol. Struct.: THEOCHEM*, **1997**, *401(3)*, 267-277. DOI: 10.1016/S0166-1280(97)00028-6
- <sup>140</sup> Dewar, M. J. y Thiel, W., *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, *99(15)*, 4899-4907. DOI: 10.1021/ja00457a004
- <sup>141</sup> Dewar, M. J. y Rzepa, H. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *100*, 58-67.
- <sup>142</sup> Dewar, M. J.; Zoebisch, E. G.; Healy, E. F. y Stewart, J. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107(13)*, 3902-3909. DOI: 10.1021/ja00299a024

- <sup>143</sup> Stewart, J. J. P., *J. Comp. Chem.*, **1992**, *10*, 209.
- <sup>144</sup> Collins, J. B.; Schleyer, P. V. y Binkley, J. S., *J. Chem. Phys.*, **1986**, *64*, 5142.
- <sup>145</sup> Martin, P.; Szablewski, M.; *Langmuir-Blodgett Troughs. Operating Manual*, 6th Edition. Nima Technology LTD. 2001
- <sup>146</sup> Ishii, T.; *Thin Solid Films*, **1989**, *178*(1-2), 47-52. DOI: 10.1016/0040-6090(89)90284-8
- <sup>147</sup> Nierengarten, J. F.; Eckert, J. F.; Rio, Y.; Carreon, M. P.; Gallani, J. L. y Guillon, D., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*(40), 9743-9748. DOI: 10.1021/ja010155m
- <sup>148</sup> Kita-Tokarczyk, K.; Junginger, M.; Belegirinou, S. y Taubert, A.; *Adv Polym Sci.*, **2011**, *242*, 151-201. DOI: 10.1007/12\_2010\_58
- <sup>149</sup> Martin, D. K., *Nanobiotechnology of Biomimetic Membranes*, Springer Science & Business Media, LLC. 2007
- <sup>150</sup> Albrecht, O.; Gruler, H. y Sackmann, E.; *Journal de Physique*, **1978**, *39*(3), 301-313. DOI: 10.1051/jphys:01978003903030100
- <sup>151</sup> Baret J. F.; Hasmonay H.; Firpo J. L.; Dupin J. J. y Dupeyrat M.; *Chem. Phys. Lipids*, **1982**, *30*(2-3), 177-187. DOI: 10.1016/0009-3084(82)90051-2
- <sup>152</sup> Cordroch, W. y Möbius, D., *Thin Solid Films*, **1992**, *210*,135-137. DOI: 10.1016/0040-6090(92)90190-M
- <sup>153</sup> Ahuja, R. C.; Caruso, P.-L.; Möbius, D.; Wildburg, G.; Ringsdorf, H.; Philp, D.; Preece, J. A. y Stoddart, J. F., *Langmuir*, **1993**, *9*(6), 1534-1544. DOI: 10.1021/la00030a019
- <sup>154</sup> Martín, M. T.; Prieto, I.; Camacho, L. y Möbius, D., *Langmuir*, **1996**, *12*(26), 6554-6560. DOI: 10.1021/la960695a
- <sup>155</sup> Taneva, S. G. y Keough, K. M. W., *Biochemistry*, **1994**, *33*(49), 14660-14670. DOI: 10.1021/bi00253a003
- <sup>156</sup> Ivanova, T.; Panaiotov I.; Georgiev, G.; Launois-Surpas, M. A.; Proust, J. E. y Puisieux, F., *Colloid Surf.*, **1991**, *60*, 263-273. DOI: 10.1016/0166-6622(91)80281-R
- <sup>157</sup> Dynarowicz-Latka, P.; Dhanabalan, A. y Oliveira, O. N.; *Adv. Coll. Int. Sci.*, **2001**, *91*(2), 221-293. DOI: 10.1016/S0001-8686(99)00034-2
- <sup>158</sup> Blodgett, K. B.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1935**, *57*(6), 1007-1022. DOI: 10.1021/ja01309a011
- <sup>159</sup> Blodgett K. B. y Langmuir I.; *Phys. Rev.*, **1937**, *51*(11), 964-982. DOI: 10.1103/PhysRev.51.964
- <sup>160</sup> Barraud, A.; Leloup, J.; Maire, P. y Ruaudel-Texier, A., *Thin Solid Films*, **1985**, *133*(1-4), 133-139. DOI: 10.1016/0040-6090(85)90433-X
- <sup>161</sup> Iriyama, K. y Araki, T.; *Chem. Lett.*, **1990**, (7), 1189-1192. DOI: 10.1246/cl.1990.1189
- <sup>162</sup> Yamada, S.; Ishino, F.; Matsushita, K.; Nakadaira, T. y Kitao, M., *Thin Solid Films*, **1992**, *208*(1), 145-148. DOI: 10.1016/0040-6090(92)90960-J



- <sup>163</sup> Grundy, M. J.; Musgrove, R. J.; Richardson, R. M. y Roser, S. J.; *Langmuir*, **1990**, *6*(2), 519-521. DOI: 10.1021/la00092a040
- <sup>164</sup> Binnig, G.; Quate, C.F. y Gerber, C.; *Phys. Rev. Lett.*, **1986**, *56*(9), 930-933. DOI: 10.1103/PhysRevLett.56.930
- <sup>165</sup> Midgley, P.A. y Durkan, C.; *Mater. Today*, 2008, *11*, 8-11. DOI: 10.1016/S1369-7021(09)70002-1
- <sup>166</sup> Baclayon, M.; Wuite, G. J. L. y Roos, W. H.; *Soft Matter*, **2010**, *6*(21), 5273-5285. DOI: 10.1039/B923992H
- <sup>167</sup> Torrent-Burgués, J.; Pla, M.; Escriche, L.; Casabó, J.; Errachid, A. y Sanz, F.; *J. Colloid Interface Sci.*, **2006**, *301*(2), 585-593. DOI: 10.1016/j.jcis.2006.05.047
- <sup>168</sup> Richter-Egger, D.; Landry, J.; Tesfai, A. y Tucker, S.; *J. Phys. Chem. A*, **2001**, *105*(28), 6826-6833. DOI: 10.1021/jp0100396
- <sup>169</sup> Fernández, L., *Estudio fisicoquímico de compuestos de interés biológico. Utilización de dendrímeros en la distribución controlada de drogas*. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Río Cuarto. Río cuarto, Córdoba, Argentina. 2008
- <sup>170</sup> Duran, M. y Canbaz, M. C.; *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2013**, *52*, 8355-8360. DOI: 10.1021/ie400316r
- <sup>171</sup> Nan, G.; Shi, J.; Huang, Y.; Sun, J.; Lv, J.; Yang, G. y Li, Y.; *J. Chem. Eng. Data*, **2014**, *59*, 1304-1311. DOI: 10.1021/je4010905
- <sup>172</sup> Rivero, R.; Alustiza, F.; Rodriguez, N.; Bosch, P.; Miras, M. C.; Rivarola, C.; Barbero, C. *React. Funct. Polym.*, **2015**, *97*, 77-85. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2015.10.011
- <sup>173</sup> Chen, H. T.; Neerman, M. F.; Parrish, A. R. y Simanek, E. E.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*(32), 10044-10048. DOI: 10.1021/ja048548j
- <sup>174</sup> Dib, N.; Reviglio, A. L.; Fernández, L.; Otero, L.; Morales, G.; Santo, M.; Alustiza, F.; Liaudat, A. C.; Bosch, P.; Calderón, M.; Martinelli, M.; Strumia, M. *J. Colloid Interface Sci.*, **2017**, *496*, 243-253. DOI: 10.1016/j.jcis.2017.02.036
- <sup>175</sup> Sándor, N.; Schilling-Tóth, B.; Kis, E.; Fodor, L.; Mucsányi, F.; Sáfrány, G. y Hegyesi, H.; *Int. J. Mol. Sci.*, **2015**, *16*(10), 25450-25465. DOI: 10.3390/ijms161025450
- <sup>176</sup> Stone, A. L. y Bradley, D. F.; *BBA-General Subjects*, **1967**, *148*(1), 172-192. DOI: 10.1016/0304-4165(67)90293-0
- <sup>177</sup> Gupta, U.; Agasshe, H. y Jain, N.; *Biomacromolecules*, **2006**, *7*(3), 649-658. DOI: 10.1021/bm050802s
- <sup>178</sup> Avila-Salas, F.; Sandoval, C.; Caballero, J.; Guíñez-Molinos, S.; Santos, L. S.; Cachau, R. E. y González-Nilo, F. D.; *J. Phys. Chem. B*, **2012**, *116*(7), 2031-2039. DOI: 10.1021/jp2069122

- <sup>179</sup> Maingi, V.; Kumar, M. V. S. y Maiti, P. K., *J. Phys. Chem. B*, **2012**, *116*(14), 4370-4376. DOI: 10.1021/jp211515g
- <sup>180</sup> Poole, J. S.; Hadad, C. M.; Platz, M. S.; Fredin, Z. P.; Pickard, L.; Guerrero, E. L.; Kessler, M.; Chowdhury, G.; Kotandeniya, D. y Gates, K. S., *Photochem. Photobiol.*, **2002**, *75*(4), 339-345. DOI: 10.1562/0031-8655(2002)0750339PETROT2.0.CO2
- <sup>181</sup> Taft, R. W.; Shuely, W. J.; Doherty, R. M. y Kamlet, M. J., *J. Org. Chem.*, **1988**, *53*, 1737.
- <sup>182</sup> Chupakhin, O. N.; Kozhevnikov, V. N.; Prokhorov, A. M.; Kozhevnikov, D. N. y Rusinov, V. L., *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*(38), 7379-7382 DOI: 10.1016/S0040-4039(00)01245-4
- <sup>183</sup> Chelmecka, M., *Complexes of polyelectrolytes with defined charge distance and different dendrimer counterions*. Tesis Doctoral. Mainz. 2004
- <sup>184</sup> Kozhevnikov, D. N.; Rusinov, V. L. y Chupakhin, O. N., *Russ. Chem. Rev.*, **1998**, *67*(8), 633-648. DOI: 10.1070/RC1998v067n08ABEH000437
- <sup>185</sup> D'Emanuele, A. y Attwood, D., *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2005**, *57*(15), 2147-2162. DOI: 10.1016/j.addr.2005.09.012
- <sup>186</sup> Klajnert, B.; Stniślauska, L.; Bryszewska, M. y Pałecz, B., *Biochim. et Biophys. Acta*, **2003**, *1648*(1), 115-126. DOI: 10.1016/S1570-9639(03)00117-1
- <sup>187</sup> Kleinman, M. H.; Flory, J. H.; Tomalia, D. A. y Turro, N. J., *J. Phys. Chem.*, **2000**, *104*(48), 11472-11479. DOI: 10.1021/jp001882r
- <sup>188</sup> Fernández, L.; Santo, M.; Silber, J. J.; Cerecetto, H. y Gonzalez, M., *Supramol. Chem.*, **2006**, *18*(8), 633-643. DOI: 10.1080/10610270601012776
- <sup>189</sup> Tomalia, D.; Huang, B.; Swanson, D.; Brothers II, H. y Klimash, J., *Tetrahedron*, **2003**, *59*(22), 3799-3813. DOI: 10.1016/S0040-4020(03)00430-7
- <sup>190</sup> Hu, J.; Su, Y.; Zhang, H.; Xu, T. y Cheng, Y., *Biomaterials*, **2011**, *32*(36), 9950-9959. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.016
- <sup>191</sup> Dib, N.; Fernández, L.; Gonzalez, M.; Cerecetto, H.; Durantini, E.; Otero, L.; Santo, M. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **2014**, *79*, 65-73. DOI: 10.1007/s10847-013-0324-z.
- <sup>192</sup> Nan, G.; Shi, J.; Huang, Y.; Sun, J.; Lv, J.; Yang, G. y Li, Y., *J. Chem. Eng. Data*, **2014**, *59*(4), 1304-1311. DOI: 10.1021/je4010905
- <sup>193</sup> Okamoto, K.; Hamada, N.; Okamura, T.; Ueyama, N. y Yamamoto, H.; *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*(18), 3782-3791. DOI: 10.1039/B905835D
- <sup>194</sup> Cheng, Y.; Wu, Q.; Li, Y. y Xu, T.; *J. Phys. Chem. B*, **2008**, *112*, 8884-8890. DOI: 10.1021/jp801742t
- <sup>195</sup> Devarakonda, B.; Hill, R. A.; de Villiers, M. M. *Int. J. Pharm.* **2004**, *284*, 133. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2004.07.006

- <sup>196</sup> Milhem, O. M.; Myles, C.; McKeown, N. B.; Attwood, D.; D'Emanuele, A. *Int. J. Pharm.* **2000**, *197*, 239. DOI: 10.1016/S0378-5173(99)00463-9
- <sup>197</sup> Cheng, Y. Y.; Xu, T. W. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 1384.
- <sup>198</sup> Ma, M. L.; Cheng, Y. Y.; Xu, Z. H.; Xu, P.; Qu, H. O.; Fang, Y. J.; Xu, T. W.; Wen, L. P. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 93. DOI: 10.1016/j.ejmech.2006.07.015
- <sup>199</sup> Devarakonda, B.; Hill, R. A.; Liebenberg, W.; Brits, M.; De Villiers, M. M. *Int. J. Pharm.* **2005**, *304*, 193. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2005.07.023
- <sup>200</sup> Zhao, C.; Wang, Y.; Su, Y.; Zhang, H.; Ding, L.; Yan, X.; Naimin Shao, Z.; Ye, X. y Cheng, Y.; *Int. J. Pharm.*, **2011**, *421*, 301-309. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.09.044
- <sup>201</sup> Cheng, Y.; Li, Y.; Wu, Q.; Zhang, J. y Xu, T., *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**, *44*, 2219-2223. DOI: 10.1016/j.ejmech.2008.05.031
- <sup>202</sup> Wang, F.; Shao, N.; Cheng, Y.; *PLoS One*, **2013**, *8*(6), e64722. DOI: 10.1371/journal.pone.0064722
- <sup>203</sup> Santo, M. y Fox, M. A.; *J. Phys. Org. Chem.*, **1999**, *12*, 293-307. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1395(199904)12:4<293::AID-POC88>3.0.CO;2-Q
- <sup>204</sup> Hu, J.; Cheng, Y.; Ma, Y.; Wu, Q. y Xu, T.; *J. Phys. Chem. B*, **2009**, *113*, 64-74. DOI: 10.1021/jp8078919
- <sup>205</sup> Hu, J.; Fang, M.; Cheng, Y.; Zhang, J.; Wu, Q y Xu, T.; *J. Phys. Chem. B*, **2010**, *114*, 7148-7157. DOI: 10.1021/jp1007889
- <sup>206</sup> Kabanov, V. A.; Zezin, A. B.; Rogacheva, V. B.; Gulyaeva, Z. G.; Zansochova, M. F.; Joosten, J. G. H. y Brackman, J., *Macromolecules*, **1998**, *31*(15), 5142-5144. DOI: 10.1021/ma971643a
- <sup>207</sup> Shao, N.; Su, Y.; Hu, J.; Zhang, J.; Zhang, H. y Cheng, Y., *Int. J. Nanomedicine*, **2011**, *6*, 3361-3372. DOI: 10.2147/IJN.S27028
- <sup>208</sup> Vohs, J. K.; Brege, J. J.; Raymond, J. E.; Brown, A. E.; Williams, G. L. y Fahlman, B. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 9936-9937. DOI: 10.1021/ja0478227
- <sup>209</sup> Stagnoli, S.; Luna, M. A.; Villa, C. C.; Alustiza, F.; Niebylski, A.; Moyano, F.; Correa, N. M.; Falcone, R. D. *RSC Adv.*, **2017**, *7*, 5372-5380. DOI: 10.1039/c6ra27020d
- <sup>210</sup> Weyermann, J.; Lochmann, D.; Zimmer, A. *Int. J. Pharm.*, **2005**, *288*, 369-376. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2004.09.018
- <sup>211</sup> Kolhatkar, R. B.; Swaan, P. y Ghandehari, H., *Pharmaceut. Res.*, **2008**, *25*(7), 1723-1729. DOI: 10.1007/s11095-008-9572-9
- <sup>212</sup> Dib, N.; Fernández, L.; Otero, L.; Santo, M.; Calderón, M.; Martinelli, M. y Strumia, M.; *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **2015**, *82*, 351-359. DOI: 10.1007/s10847-015-0497-8
- <sup>213</sup> Owen, S. C.; Doak, A. K.; Ganesh, A. N.; Nedyalkova, L.; McLaughlin, C. K.; Shoichet, B. K. y Shoichet, M. S.; *ACS Chem. Biol.*, **2014**, *9*(3), 777-784. DOI: 10.1021/cb4007584

- <sup>214</sup> González Madariaga, Y.; Boffill Cárdenas, M.; Bermúdez Toledo, D.; Castillo Alfonso, O. y Sánchez Álvarez, C.; *Medicentro*, **2009**, *13*(1)
- <sup>215</sup> Yoon, D. K. y Jung, H. T., *Langmuir*, **2003**, *19*(4), 1154-1158. DOI: 10.1021/la026564t
- <sup>216</sup> Zhai, X.; Peleshanko, S.; Klimentenko, N. S.; Genson, K. L.; Vaknin, D.; Vortman, M. Y.; Shevchenko, V. V. y Tsukruk, V. V., *Macromolecules*, **2003**, *36*(9), 3101-3110. DOI: 10.1021/ma021383j
- <sup>217</sup> Sanders, T. A.; Saucedo, M. N. y Dahl, J. A.; *Mater. Lett.*, **2014**, *120*, 159-162. DOI: 10.1016/j.matlet.2014.01.056
- <sup>218</sup> Shikata, T.; Sakai, Y. y Watanabe, J.; *AIP Adv.*, **2014**, *4*, 067130. DOI: 10.1063/1.4884393
- <sup>219</sup> Sikorski, A. y Trzybiński, D.; *J. Mol. Struct.*, **2013**, *1049*, 90-98. DOI: 10.1016/j.molstruc.2013.06.031
- <sup>220</sup> Njikang, G.; Cao, L. y Gauthier, M.; *Langmuir*, **2008**, *24*, 12919-12927. DOI: 10.1021/la802163k
- <sup>221</sup> Redón, R.; Carreón-Castro, M. P. y Mendoza-Martínez., F. J.; *ISRN Org. Chem.*, **2012**, *2012*. DOI: 10.5402/2012/906839
- <sup>222</sup> Giner, I.; Haro, M.; Gascón, I.; del Barrio, J. y López, M. C.; *J. Colloid Interface Sci.*, **2011**, *359*, 389-398. DOI: 10.1016/j.jcis.2011.03.091
- <sup>223</sup> Peleshanko, S.; Jeong, J.; Gunawidjaja, R. y Tsukruk, V.; *Macromolecules*, **2004**, *37*, 6511-6522. DOI: 10.1021/ma0493170
- <sup>224</sup> García, R. *Amplitude Modulation Atomic Force Microscopy*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 2010
- <sup>225</sup> Quiroga, M. C.; Monzón, L. M. A. y Yudi, L. M.; *Electrochim. Acta*, **2011**, *56*, 7022-7028. DOI: 10.1016/j.electacta.2011.06.005





76695

(62)