

# Sistemas organizados formados por ciclodextrinas anfílicas que revisten interés biomédico o farmacéutico

Lic. en Química John Jairo Pinzón Barrantes

Tesis para optar el grado de:  
**Doctor en Ciencias Químicas**

Directora de tesis :  
Dra. Raquel Viviana Vico

Universidad Nacional de Córdoba  
Facultad de Ciencias Químicas  
Departamento Química Orgánica.

Instituto de investigaciones en Fisicoquímica de Córdoba (INFIQC-CONICET)

Córdoba, Argentina

Año 2019



Universidad  
Nacional  
de Córdoba





El presente trabajo de Tesis Doctoral fue realizado en el Instituto de Investigaciones en Fisicoquímica de Córdoba, en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, bajo la dirección de la Dra. Raquel V. Vico y se presenta en consideración de dicha facultad para optar el título de Dr. en Ciencias Químicas.

Directora de tesis:

\_\_\_\_\_ Dra. Raquel Viviana Vico

Comisión Evaluadora

\_\_\_\_\_ Dra. Rita Hoyos de Rossi

\_\_\_\_\_ Dra. Marcela R. Longhi

\_\_\_\_\_ Dra. M. Laura Fanani

Evaluador Externo

\_\_\_\_\_ Dr. Néstor Mariano Correa





A mis padres

“Hay hombres que luchan un día y son buenos.  
Hay otros que luchan un año y son mejores.  
Hay quienes luchan muchos años, y son muy  
buenos. Pero los hay que luchan toda la vida:  
esos son los imprescindibles.”

Bertolt Brecht



# Agradecimientos

Apretujar nuestra vida en una maleta y mudarnos a otro país no es fácil, pero fue una de las mejores decisiones que he tomado. Al salir de mi casa me di cuenta que la vida se me convirtió en un viaje lleno de incertidumbre, frotar mis manos en mi boleto para entrar con energía, sin importar la tormenta a mi alrededor. Pero aún más importante la respuesta al “como esta” y sin dudar siempre fue “muy bien, muy bien” por que como Jorge Manrique decía *“nuestras vidas son los ríos que van a dar a la mar”* solo falta motivación. Muchas gracias a ustedes amigos compañeros y a los que no son tan amigos.

Quisiera agradecer a mi directora de Tesis Dra. Raquel Vico, por comunicarme sus conocimientos y experiencias, por el tiempo empleado en la dirección de tesis. Igualmente, agradecer a las personas de mi comisión de Tesis, a las Doctoras Rita, Marcela, y la Laura, gracias por el acompañamiento todos estos años, por su colaboración para la realización de esta tesis, aportando ideas enriquecedoras que me han ayudado para la culminación de este trabajo.

Agradezco al Dr. Mariano Correa, quién aceptó ser parte de mi comisión evaluadora, y se tomó la molestia de evaluar esta tesis. Gracias por leerla, gracias por dedicarme su tiempo y por todos los comentarios los cuales le aportaron un gran enriquecimiento a mi trabajo.

**Gracias a mi familia**, gracias por acompañarme en estos inhóspitos caminos de alegría y tristezas. ¡A ustedes les dedico esto! Nana, Dilan, Walfer, Daniel, Viviana, Nanci, Elena, Adriano y al señor Pinzón. Agradecer a las mujeres combatientes que me acompañaron en este proceso. Mi mama, la señora Gloria la mujer que me enseñó a luchar por lo que se quiere, que la alegría es una enfermedad altamente contagiosa que te hace vivir mucho y mejor, además de tantas y tantas cosas que ha hecho por mí. A Cata, por ser esa compañera soñadora y cómplice en cada una de mis locuras en esta travesía y aunque *“algunos cantaron victoria porque el pueblo pago vidas, pero esas muertes queridas van escribiendo la historia,*

*como la nuestra.*” Mario Benedetti.

Gracias familia Colombo Paraguaya: Cyn, Meli, Diana, Patricia(guarichis) y todos los demás que seguro me olvido, gracias por cada cumpleaños, cada almuerzo, y cada merienda compartida. En especial por acompañarme y hacerme sentir en casa, gracias.

Gracias a la Dra. Veglia y Veglios (Hugo, Guada, Andre y Juanes) porque desde el primer momento me brindaron y me brindan todo el apoyo, colaboración y cariño sin ningún interés, gracias por haber estado a mi lado cada día durante estos años.

Gracias a Nohe, Tinchin, y Vir por compartir y por regalarme su INCONDICIONAL apoyo en todo momento. Gracias por estar ahí siempre. Gracias a todas las personas que hacen parte del departamento de química orgánica. A los secretarios Kike y Gloria, quienes siempre me colaboraron en todo. A los todos los miembros del grupo Sunalab, gracias por sus aportes, por acompañarme durante todo este arduo camino. Gracias totales.

## Resumen

Durante la administración de medicamentos se presentan dificultades por la interacción del fármaco con actores indeseados durante su recorrido al sitio de acción. Para evitar estos inconvenientes las industrias farmacéuticas están en constante búsqueda de sistemas de transporte y liberación de fármacos en los que se pretende una liberación selectiva a nivel del órgano, tejidos o células diana en los cuales el fármaco actuará. Los sistemas transportadores ayudan a reducir la aparición de efectos secundarios y la biodisponibilidad de los principios activos.

El desarrollo de nuevas moléculas capaces de formar sistemas idóneos el transporte de fármacos es un reto que hoy incluye diferentes áreas de la ciencia, como la química orgánica, la biofísicoquímica, la química farmacéutica, las nanociencias y la medicina. Las moléculas que pueden auto-ensamblarse representan una alternativa novedosa para el desarrollo de nuevos sistemas funcionales de suministro de fármacos, que podrían superar muchas más desventajas de los sistemas actualmente disponibles. El diseño de estos sistemas exige un conocimiento profundo de las interacciones entre los sistemas supramoleculares y los fármacos que conlleva a la necesidad de conocer su capacidad de carga, estabilidad, miscibilidad/ segregación de los componentes y su distribución espacial.

En esta tesis se estudió las propiedades de un glicolípido sintético, al que llamaremos  $\beta$ CD-C16, en cuanto a la capacidad de transportar y liberar fármacos hidrofóbicos mediante la formación de sistemas auto-ensamblados mixtos.  $\beta$ CD-C16 es un anfífilo constituido por un macrociclo formado por unidades de  $\alpha$ -D-glucosa conocido como  $\beta$  ciclodextrina, al cual se conjugó una cadena hidrocarbonada. El fármaco hidrofóbico seleccionado fue Anfotericina B (AmB) debido al interés actual que hay en mejorar su desempeño. La AmB es un fármaco que actúa a nivel de membranas y que es utilizado para el tratamiento de micosis sistémica y parasitosis como la leishmaniasis. Debido al resurgimiento de la leishmaniasis, considerada una enfermedad desatendida, se reactivó la búsqueda de nuevos y más eficientes transportadores para AmB. En el primer capítulo se presenta una introducción general que

hace un recuento de los principales aportes de principios y técnicas que tienen relación con los tópicos abordados en la tesis. En el segundo capítulo se caracterizó la interacción de  $\beta$ CD-C16 con un sistema modelo de biomembranas. Estos estudios permitieron corroborar el potencial de  $\beta$ CD-C16 para transporte de fármacos cuyos sitios de acción sean membranas celulares. Como modelo de biomembranas se utilizaron monocapas de Langmuir y de Gibbs. La topografía del sistema se estudió mediante microscopia de ángulo de Brewster.

En el capítulo tres se describe la optimización del diseño del sistema transportador formado por  $\beta$ CD-C16. Se seleccionó la concentración óptima de este anfifilo y se evaluó la capacidad de carga de AmB. Posteriormente, se estudió la morfología de los sistemas auto-ensamblados mixtos de  $\beta$ CD-C16:AmB y se los caracterizó por diferentes técnicas como espectroscopia de UV-Visible, difracción de rayos X en polvo, FT-IR y RMN. Se puso especial énfasis en conocer cuál es el estado de agregación de AmB en el sistema transportador. La AmB también presenta propiedades anfifílicas pudiendo interactuar consigo misma formando agregados; la actividad y la toxicidad de AmB son dependientes de su estado de agregación. Posteriormente, se valoró la citotoxicidad de  $\beta$ CD-C16:AmB mediante ensayos de hemólisis, comprobándose que el sistema es inocuo. Finalmente, se evaluó la actividad frente a *Cándida Albicans* obteniéndose excelentes resultados cuando se le comparó con una formulación comercial que resulta citotóxica e induce lisis de glóbulos rojos. En el capítulo cuatro se presenta el estudio de la interacción del sistema transportador de  $\beta$ CD-C16 con modelos de biomembranas a fin de conocer si la AmB transportada podría alcanzar su sitio diana. Las metodologías empleadas para abordar este aspecto fueron similares a las empleadas en el capítulo dos. En el anexo de la tesis se detalla cómo se sintetizó y caracterizó el anfifilo  $\beta$ CD-C16 para construir el sistema transportador.

Los resultados obtenidos permitieron concluir que la  $\beta$ CD-C16 presenta excelentes características para formar sistemas auto-ensamblados capaces de transportar fármacos hidrofóbicos. También se determinó que la AmB es cargada eficientemente en concentraciones que alcanzan dosis terapéutica. Finalmente, el sistema mixto  $\beta$ CD-C16:AmB no presentó citotoxicidad a glóbulos rojos y presentó una óptima actividad frente a patógenos diana.

Índice de contenido

# Contenido

<b>Agradecimientos</b>	<b>VII</b>
<b>Resumen</b>	<b>IX</b>
<b>Índice general</b>	<b>XI</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>XVII</b>
<b>Lista de tablas</b>	<b>XXIX</b>
<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>XXXI</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Química supramolecular y sistemas auto-organizados . . . . .	2
1.2. Sistemas de transporte y liberación de fármacos . . . . .	5
1.3. Principales interacciones no covalentes . . . . .	7
1.3.1. Interacción hidrofóbica de moléculas anfifílicas. . . . .	7
1.3.2. Enlaces puente hidrógeno . . . . .	8
1.3.3. Interacciones de van der Waals . . . . .	10
1.3.4. Interacción electrostática . . . . .	10
1.3.5. Interacciones $\pi$ - $\pi$ . . . . .	11
1.4. Interacciones huésped-receptor . . . . .	12
1.5. Cooperatividad: sinergia de interacciones no covalentes . . . . .	14
1.6. Surfactantes . . . . .	14
1.7. Sistemas coloidales utilizados para el transporte de fármacos . . . . .	16



1.8. Ciclodextrinas como sistemas transportadores. . . . .	20
1.9. Fármaco hidrofóbico que busca transportador: la Anfotericina B . . . . .	24
1.9.1. Características y propiedades físicas y químicas de AmB . . . . .	26
1.9.2. Mecanismo de acción de AmB . . . . .	29
1.10. Modelos de biomembranas . . . . .	31
1.11. Monocapas de Langmuir . . . . .	32
1.11.1. Registro de isotermas de Langmuir . . . . .	34
1.12. Monocapas de Gibbs . . . . .	36
1.13. Caracterización de Películas de Langmuir . . . . .	38
1.14. Microscopía de ángulo de Brewster . . . . .	39
1.14.1. Microscopio de ángulo de Brewster . . . . .	41
1.15. Espectroscopía UV-Vis de reflexión . . . . .	43
<b>2. Caracterización de la interacción de la ciclodextrina anfifílica</b> . . . . .	<b>47</b>
2.1. Introducción . . . . .	48
2.1.1. Objetivos . . . . .	51
2.2. Materiales y Métodos . . . . .	52
2.2.1. Materiales . . . . .	52
2.2.2. Cuantificación de $\beta$ CD-C16 por el método de antrona . . . . .	53
2.2.3. Cuantificación de $\beta$ CD-C16 y POPC a partir de isotermas de Langmuir . . . . .	54
2.2.4. Obtención de monocapas de Langmuir en la interfase aire-agua . . . . .	55
2.2.5. Determinación de la Concentración de Agregación Crítica de $\beta$ CD-C16 . . . . .	59
2.2.6. Adsorción de $\beta$ CD-C16 a la interfase aire-agua y penetración en monocapas de POPC . . . . .	59
2.2.7. Estudio topográfico de los films . . . . .	62
2.3. Resultados y Discusión . . . . .	63
2.3.1. Propiedades de films mixtos formados por $\beta$ CD-C16 y POPC. . . . .	63
2.3.2. Adsorción de $\beta$ CD-C16 a la interfase aire-agua y penetración en monocapas de POPC . . . . .	76
2.4. Conclusiones . . . . .	83

<b>3. Agregados auto-ensamblados de <math>\beta</math>CD-C16:AmB</b>	<b>85</b>
3.1. Introducción . . . . .	86
3.1.1. Preparación de soluciones de AmB en formulaciones de AmBisome <sup>®</sup> y Fungizone <sup>®</sup> . . . . .	88
3.1.2. Estado de agregación de Anfotericina B. . . . .	89
3.1.3. Propiedades espectroscópicas de la Anfotericina B. . . . .	90
3.2. Objetivos. . . . .	91
3.3. Materiales y métodos. . . . .	91
3.3.1. Soluciones de AmB. . . . .	91
3.3.2. Determinación del coeficiente de extinción de AmB . . . . .	91
3.3.3. Soluciones de $\beta$ CD-C16 . . . . .	93
3.3.4. Elaboración de agregados auto-ensamblados de $\beta$ CD-C16:AmB . . . . .	94
3.3.5. Cuantificación de AmB incorporada en los agregados auto-ensamblados mixtos $\beta$ CD-C16:AmB . . . . .	95
3.3.6. Determinación del estado de agregación de AmB en los agregados auto- ensamblados $\beta$ CD-C16:AmB por espectrofotometría UV-Vis . . . . .	97
3.3.7. Determinación del estado de asociación de AmB en los agregados auto- ensamblados $\beta$ CD-C16:AmB por dicroísmo circular . . . . .	98
3.3.8. Estudio del efecto de la temperatura en el estado de asociación de AmB en los agregados auto-ensamblados $\beta$ CD-C16:AmB . . . . .	99
3.3.9. Espectroscopia infrarroja de AmB, $\beta$ CD-C16, AmB, y $\beta$ CD-C16:AmB. . . . .	99
3.3.10. Resonancia magnética nuclear de los agregados formados por $\beta$ CD- C16:AmB . . . . .	100
3.3.11. Difracción de Rayos X en polvo . . . . .	101
3.3.12. Tamaño de partícula de los agregados . . . . .	101
3.3.13. Caracterización morfológica de los agregados de $\beta$ CD-C16:AmB por microscopia de transmisión electrónica . . . . .	102
3.3.14. Liofilización y reconstitución de las formulaciones $\beta$ CD-C16:AmB . . . . .	102
3.3.15. Ensayo de hemólisis <i>in vitro</i> de los agregados $\beta$ CD-C16:AmB . . . . .	102

---

3.3.16. Liberación <i>in vitro</i> de AmB desde agregados auto-ensamblados de $\beta$ CD-C16:AmB . . . . .	104
3.4. Resultados . . . . .	104
3.4.1. Determinación de la eficiencia de encapsulamiento de AmB en los agregados formados por $\beta$ CD-C16. . . . .	104
3.4.2. Estado de agregación de AmB en las formulaciones $\beta$ CD-C16:AmB por espectroscopia de absorción electrónica . . . . .	107
3.4.3. Estado de agregación de AmB en las formulaciones $\beta$ CD-C16:AmB por dicroísmo circular . . . . .	115
3.4.4. Caracterización de los agregados $\beta$ CD-C16:AmB por dispersión dinámica de luz y microscopía de transmisión electrónica . . . . .	118
3.4.5. Caracterización de los agregados de $\beta$ CD-C16:AmB por difracción de rayos X en polvo . . . . .	122
3.4.6. Caracterización de los agregados de $\beta$ CD-C16:AmB por espectroscopia FT-IR . . . . .	123
3.4.7. Caracterización de los agregados de $\beta$ CD-C16:AmB por resonancia magnética nuclear . . . . .	125
3.4.8. Liofilización y reconstitución de los agregados de $\beta$ CD-C16:AmB . . . . .	129
3.4.9. Ensayos de liberación de AmB <i>in vitro</i> de los agregados de $\beta$ CD-C16:AmB . . . . .	131
3.4.10. Ensayo de hemólisis <i>in vitro</i> de agregados de $\beta$ CD-C16:AmB . . . . .	132
3.4.11. Ensayo de inhibición de <i>Cándida albicans</i> para agregados de $\beta$ CD-C16:AmB . . . . .	133
3.4.12. Efecto del calentamiento de los agregados de $\beta$ CD-C16:AmB . . . . .	135
3.4.13. Conclusiones . . . . .	142
<b>4. Interacciones de la ciclodextrina anfífilica <math>\beta</math>CD-C16 y Anfotericina B</b>	<b>143</b>
4.1. Introducción . . . . .	144
4.1.1. Espectroscopia UV-Vis de reflexión . . . . .	145
4.1.2. Monocapas de Langmuir de AmB . . . . .	145

4.1.3.	Penetraciones de AmB en monocapas preformadas . . . . .	147
4.2.	Objetivos . . . . .	149
4.3.	Materiales y Métodos . . . . .	149
4.3.1.	Monocapas de Langmuir de AmB o $\beta CD-C16:AmB$ (0,62:0,38) en la interfase aire-agua. . . . .	149
4.3.2.	Estudios de la adsorción de AmB y agregados de $\beta CD-C16:AmB$ en interfases lipídicas de POPC . . . . .	150
4.3.3.	Estudio topográfico de los films . . . . .	151
4.3.4.	Espectroscopía de Reflexión UV-Vis en la Interfase Aire-Agua . . . . .	152
4.4.	Resultados y discusión . . . . .	153
4.4.1.	Monocapas de Langmuir de AmB . . . . .	153
4.4.2.	Formación de monocapas de AmB y mezcla de $\beta CD-C16:AmB$ (0,62:0,38) . . . . .	157
4.4.3.	Microscopía de ángulo Brewster (BAM) de monocapas de AmB y $\beta CD-C16:AmB$ . . . . .	159
4.4.4.	Espectroscopía UV-Visible de reflexión de monocapas de AmB y $\beta CD-C16: AmB$ (0,68:38) . . . . .	161
4.4.5.	Adsorción de AmB en la interfase aire-agua y en una interfase de POPC . . . . .	164
4.4.6.	Adsorción de agregados auto-ensamblados de $\beta CD-C16:AmB$ en la interfase agua-aire y en una interfase de POPC . . . . .	166
4.5.	Conclusiones . . . . .	170
<b>5.</b>	<b>Conclusiones Generales</b>	<b>172</b>
<b>A.</b>	<b>Anexo</b>	<b>175</b>
A.1.	Síntesis y caracterización de $\beta CD-C16$ . . . . .	175
A.2.	Caracterización de $\beta CD-C16$ por RMN . . . . .	178
	<b>Bibliografía</b>	<b>181</b>

# Lista de Figuras

1-1. Diferentes tipos de macrociclos. (a) ciclodextrina; (b) calix[n]areno, (c) cucurbit[n]urilo; (d) pilarenos. Figura adaptada de la referencia <sup>9</sup> . . . . .	4
1-2. Ilustración esquemática del efecto hidrofóbico. La agregación de las regiones hidrofóbicas de las moléculas reduce el número de moléculas de agua que debe rodear la superficie hidrofóbica. Figura adaptada de la referencia <sup>22</sup> . . . . .	9
1-3. Representación gráfica de un enlace puente hidrógeno. D átomo donador de H y A átomo aceptor (O, N, S) Figura adaptada de la referencia <sup>1</sup> . . . . .	10
1-4. Geometrías de las interacciones $\pi$ - $\pi$ . a) Eclipsada cara-cara b) Desplazamiento paralelo y c) Borde-cara o forma de T. Figura tomada de la referencia <sup>19</sup> . . . . .	11
1-5. Representación gráfica de la formación de estructuras por interacción huésped-receptor. A) Complejos de inclusión huésped-receptor. B) Inclusión de moléculas huésped en cavidades formadas entre moléculas (clartratos). C) Síntesis y auto-ensamblaje de un agregado supramolecular que no corresponde a la descripción clásica de huésped-receptor.)Figura adaptada de la referencia <sup>1</sup> . . . . .	13
1-6. Representación esquemática de un anfifilo. . . . .	15
1-7. Auto-ensablados formados por un anfifilo después de superar la concentración de agregación crítica. . . . .	17
1-8. Representación gráfica de estructuras utilizadas para el transporte de principios activos. Figura adaptada de la referencia <sup>5</sup> . . . . .	19
1-9. Gangliósido GM1 . . . . .	20
1-10.A) Representación esquemática de una ciclodextrina en forma de cono truncado B) Glucopiranososa con la numeración de los átomos de carbono. . . . .	21

1-11. Estructura química de ciclodextrinas nativas. . . . .	22
1-12. Esquema de los dos isómeros obtenidos la ciclodextrina anfífilica utilizada en este trabajo denominada $\beta CD-C16$ . . . . .	24
1-13. Estructura química de AmB. . . . .	26
1-14. Mecanismo de acción de AmB a través de la formación de poros en la membrana. Figura adaptada de la referencia <sup>88</sup> . . . . .	30
1-15. Mecanismo de acción de AmB conocido como esponja de adsorción de esteroides ( <i>sterol sponge model</i> Figura adaptada de la referencia <sup>88</sup> . . . . .	31
1-16. Balanza de Langmuir. . . . .	34
1-17. Representación gráfica de la reorganización de las moléculas durante la compresión en una monocapa de Langmuir. . . . .	35
1-18. Isoterma de adsorción de moléculas anfífilicas. . . . .	37
1-19. Representación gráfica del ángulo de Brewster. . . . .	41
1-20. Micrografías obtenidas por BAM en la isoterma de compresión de DPPC. . . . .	42
1-21. Representación esquemática de la espectroscopía de UV-Vis de Reflexión en una interfase aire-agua. . . . .	44
2-1. Representación esquemática de ciclodextrinas anfífilicas mono- y persustituidas. . . . .	49
2-2. A) Estructura química de los dos isómeros obtenidos de $\beta CD-C16$ B) representación esquemática de esta molécula anfífilica y C) orientación de la cavidad de $\beta CD-C16$ respecto a una interfase con el plano de la cavidad paralelo y perpendicular a la misma. . . . .	50
2-3. A) Curva de calibración de $\beta CD$ obtenida por el método colorimétrico de antrona. Pendiente: $(4,1 \pm 0,2) \times 10^{-3} \mu g^{-1}$ , $r^2 = 0,992$ . B) Estructura química de la antrona. . . . .	54
2-4. Tensión superficial vs. Concentración de $\beta CD-C16$ a 25 °C, agua/2% DMSO. La concentración de agregación crítica se obtuvo a partir del punto de intersección de las rectas y tiene un valor de 63 $\mu M$ . Las barras de error corresponden al de desviación estándar cuadrática media de los triplicados. . . . .	60

- 2-5.** Fotografía de la cuba utilizada para hacer las transferencia de los films conteniendo  $\beta$ CD-C16 que penetró en una monocapa de POPC. . . . . 61
- 2-6.** Representación esquemática de la transferencia de un film desde el compartimento I al II mediante el empleo de una barrera móvil. Anfifilo rosa:  $\beta$ CD-C16, Anfifilo verde: POPC. . . . . 62
- 2-7.** Isoterma de Langmuir de  $\beta$ CD-C16 (línea azul ) y POPC (línea negra) obtenidas a 25 °C y subfase NaCl 145 mM. . . . . 64
- 2-8.** Imágenes de microscopia de ángulo de Brewster de (a)  $\beta$ CD-C16 y b)POPC a las presiones de superficie indicadas. Barra de escala 30  $\mu$ m, 25 °C y subfase NaCl 145 mM. . . . . 64
- 2-9.** Presión superficie vs. AMM (A, C, E ) y módulo de compresión vs. MMA (B, D, F) para mezclas de  $\beta$ CD-C16:POPC a las fracciones molares indicadas en cada gráfico.  $\beta$ CD-C16: azul; POPC: negro; mezclas ideales: línea discontinua gris – –; mezcla experimental  $X^{\beta CD-C16} = 0,90$  rojo 0,75 naranja; 0,60 rosado; Subfase NaCl 145 mM (temperatura =  $23 \pm 2$  °C). . . . . 65
- 2-10.**( Presión superficie vs. AMM (G, I, K) y módulo de compresión vs. AMM ( H, J, L) para mezclas de  $\beta$ CD-C16:POPC a las fracciones molares indicadas en cada gráfico.  $\beta$ CD-C16: azul; POPC: –negro; mezclas ideales: línea discontinua gris; mezcla experimental  $X^{\beta CD-C16} = 0,45$  verde; 0,30 violeta; 0,10 morado. Subfase NaCl 145 mM (Temperatura =  $23 \pm 2$  °C). . . . . 66
- 2-11.**Desviación del área molecular promedio respecto al área ideal para las mezclas de  $\beta$ CD-C16:POPC a diferentes presiones de superficie. El área ideal para la mezcla es la señalada con la linea discontinua. . . . . 67
- 2-12.**Área en exceso calculada en función de la composición  $\beta$ CD – C16 de films mezcla de  $\beta$ CD-C16:POPC a diferentes presiones de superficie. . . . . 68

- 2-13.** Imágenes de microscopía en ángulo en Brewster de una película mixta que contiene  $\beta$ CD-C16: POPC en fracciones molares 0,10: 0,90 a diferentes presiones de superficie. Las imágenes son representativas de 5-10 imágenes de dos experimentos independientes. Subfase empleada NaCl 145 mM, temperatura  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ . . . . . 70
- 2-14.** Imágenes de microscopía de ángulo de Brewster de una película mixta que contiene  $\beta$ CD-C16: POPC en fracciones molares 0,48: 0,52 a diferentes presiones de superficie. Las imágenes son representativas de 5-10 imágenes de dos experimentos independientes. Subfase empleada NaCl 145 mM, temperatura  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ . . . . . 70
- 2-15.** Imágenes de microscopía en ángulo de Brewster de una película mixta que contiene  $\beta$ CD-C16: POPC en fracciones molares 0,90: 0,10 a diferentes presiones de superficie. Las imágenes son representativas de 5-10 imágenes de dos experimentos independientes. Subfase empleada NaCl 145 mM, temperatura  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ . . . . . 71
- 2-16.** Isotermas de compresión-expansión de films mixtos de  $\beta$ CD-C16:POPC a fracciones molares iguales a 0,10:0,90 (–), 0,45:0,55 (–) y 0,90:0,10 (–). Las isotermas de compresión se muestran en líneas cortadas y las de expansión en líneas llenas. . . . . 72
- 2-17.** Orientación molecular adoptada por  $\beta$ CD-C16 respecto a la interfase en un film mixto  $\beta$ CD-C16:POPC cuando se encuentra en baja (A) y alta (B) fracción molar. . . . . 76
- 2-18.** Isoterma de adsorción de  $\beta$ CD-C16 en la interfase aire-agua. Subfase NaCl 145 mM, temperatura  $23^\circ\text{C}$ . . . . . 77
- 2-19.** Imágenes de BAM de la adsorción de  $\beta$ CD-C16 en una interfase aire-agua (NaCl 145 mM, temperatura  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ). En A se muestra la superficie de la solución de NaCl 145 mM. Los paneles B-G muestran a  $\beta$ CD-C16 adsorbida a diferentes tiempos, C-G son imágenes obtenidas a  $\pi_{eq}$ . . . . . 78



- 2-20.**A) Curvas de adsorción de  $\beta$ CD-C16 a través del tiempo en una interfase aire/agua (—) y penetración de  $\beta$ CD-C16 en monocapas de POPC empaquetadas inicialmente a diferentes presiones superficiales  $\pi_0^{POPC}$ : 5 mN/m (—), 10 mN/m (—), 15 m m (—), 20 mN/m (—), 30 mN/m (—), 35 mN/m (—), 40 mN/m (—). B) Curva de corte para la penetración de  $\beta$ CD-C16 en films de POPC. La concentración de  $\beta$ CD-C16 en la subfase se mantuvo por encima de la CAC en todos los casos. Subfase: NaCl 145 mM, temperatura  $23\pm 2$  °C. 79
- 2-21.** Imágenes BAM obtenidas durante la penetración de  $\beta$ CD-C16 en monocapas de POPC preformadas en la interfase aire-agua (NaCl 145 mM) en función del tiempo. Las imágenes D-G se adquirieron a una presión de superficie igual a  $\pi_f$ , a)  $\pi_0^{POPC}$  : 5 mN/m, b)  $\pi_0^{POPC}$  : 35 mN/m. Los paneles A muestran la superficie de una solución de NaCl 145 mM y los paneles B de POPC a 5 mN/m (a) y 35 mN/m (b). Todas las imágenes se obtuvieron utilizando una ganancia del microscopio del 100 %, excepto en las imágenes E-G del panel b que se tomaron con una ganancia del 40 % para evitar una alta reflectancia. 82
- 2-22.** Esquema que representa la organización y orientación propuesta para  $\beta$ CD-C16 cuando a) penetra en una monocapa de POPC presente en la interfase y b) cuando se siembra una solución mezcla de  $\beta$ CD-C16:POPC que contienen una alta y baja proporción de la ciclodextrina anfífila. . . . . 82
- 3-1.** Representación gráfica de la formación de agregados de AmB. . . . . 89
- 3-2.** Espectro de absorción UV-Vis de diferentes estados de agregación de AmB : Monómero ( $\Delta$ ), agregado.(— —) y supergregado (—). . . . . 90
- 3-3.** Espectros de absorción de AmB en metanol 5 % DMSO. . . . . 92
- 3-4.** Curva de calibración de AmB en metanol 5 % de DMSO.  $\epsilon^{405} = 0,148 \pm 0,003$  ( $\mu\text{g}/\text{mL cm}$ ) $^{-1}$ ,  $(1,37\pm 0,03)\times 10^5$  M $^{-1}$  cm $^{-1}$ , ( $r^2=0,996$ ). . . . . 93
- 3-5.** Representación esquemática del procedimiento seguido para la obtención de agregados auto-ensamblados  $\beta$ CD-C16:AmB. . . . . 95

- 3-6.** Espectros de absorción UV-Vis de agregados auto-ensamblados  $\beta$ CD-C16:AmB de formulaciones conteniendo AmB en concentraciones  $4,20 \times 10^{-2}$ ;  $9,17 \times 10^{-2}$ ;  $18,5 \times 10^{-2}$  mg/mL. La concentración de  $\beta$ CD-C16 es igual a 3,8 mg/mL (2,37 mM). Los espectros corresponden a formulaciones sin diluir y fueron obtenidos empleando una celda de paso óptico =1 mm. . . . . 108
- 3-7.** Espectros de absorción UV-Vis de agregados auto-ensamblados  $\beta$ CD-C16:AmB con concentraciones de AmB iguales a  $3,51 \times 10^{-2}$ ;  $5,70 \times 10^{-2}$ ;  $7,46 \times 10^{-2}$ ;  $9,93 \times 10^{-2}$  mg/mL. La concentración de  $\beta$ CD-C16 igual a 0,38 mg/mL (0,237 mM). Los espectros mostrados corresponden a diluciones de las formulaciones que contenían  $35,1 \times 10^{-2}$ ;  $57,0 \times 10^{-2}$ ;  $74,6 \times 10^{-2}$ ;  $99,3 \times 10^{-2}$  mg/mL de AmB. Paso óptico=1 mm. . . . . 109
- 3-8.** Espectros de absorción UV-Vis de agregados auto-ensamblados  $\beta$ CD-C16:AmB con concentraciones de AmB iguales a  $0,26 \times 10^{-2}$ ;  $0,13 \times 10^{-2}$ ;  $0,06 \times 10^{-2}$  mg/mL. La concentración de  $\beta$ CD-C16 igual a 0,0532 mg/mL (33,2  $\mu$ M). Los espectros mostrados corresponden a diluciones de las formulaciones que contenían  $4,20 \times 10^{-2}$ ;  $9,17 \times 10^{-2}$ ;  $18,5 \times 10^{-2}$  mg/mL de AmB. Paso óptico=1 cm. . . . 111
- 3-9.** Espectros de absorción UV-Vis de agregados auto-ensamblados  $\beta$ CD-C16:AmB con concentraciones de AmB iguales a  $0,245 \times 10^{-2}$ ;  $0,40 \times 10^{-2}$ ;  $0,52 \times 10^{-2}$  y  $0,70 \times 10^{-2}$  mg/mL. La concentración de  $\beta$ CD-C16 igual a 0,0266 mg/mL (16,6  $\mu$ M). Los espectros mostrados corresponden a diluciones de las formulaciones que contenían  $35,1 \times 10^{-2}$ ;  $57,0 \times 10^{-2}$ ;  $74,5 \times 10^{-2}$ ;  $99,3 \times 10^{-2}$  mg/mL de AmB. Paso óptico=1 cm. . . . . 111
- 3-10.** Espectro de absorción UV-Vis de AmB presente en formulaciones de Fungizone® (···), Heated-Fungizone® (- - -), y AmBisome® (-). Figura adaptada de referencia.<sup>85</sup> . . . . . 114

- 3-11.** Espectros de absorción UV-Vis (línea llena) y de dicroísmo circular (línea de punto) de AmB 9,6  $\mu\text{M}$  en (a) DMSO, (b) agua pH=12 y (c) buffer PBS pH=7,4. AmB se encuentra en forma monomérica en DMSO y en forma agregada en buffer PBS. En agua a pH=12 el espectro UV-Vis muestra sólo contribuciones de la especie monomérica en tanto que el espectro de dicroísmo circular muestra contribuciones de la especie monomérica y agregada de AmB. Figura adaptada de referencia.<sup>168</sup> . . . . . 116
- 3-12.** Espectros de dicroísmo circular de AmB en metanol (...), en agua (-.-) y en agregados  $\beta\text{CD-C16:AmB}$  con  $X^{\beta\text{CD-C16}}:X^{\text{AmB}}$  iguales a 0,62:0,38 (- - -), 0,65:0,35 (-.-) y 0,67:0,33 (-) con las concentraciones de AmB indicadas en la Figura a 25°C. . . . . 118
- 3-13.** Imagen de TEM de los agregados autoensamblados  $X^{\beta\text{CD-C16}}:X^{\text{AmB}}$  conteniendo 1,5 mg/mL de AmB y  $X^{\beta\text{CD-C16}}:X^{\text{AmB}}$  0,62:0,38. . . . . 121
- 3-14.** Patrones de difracción de rayos X en polvo de AmB (*violeta*),  $\beta\text{CD-C16-AmB}$  (0,6:0,4) (*azul*),  $\beta\text{CD-C16}$  (*rojo*)  $\beta\text{CD}$  (*negro*). . . . . 122
- 3-15.** Espectros de absorción FT-IR (A) del agregado  $\beta\text{CD-C16:AmB}$  suspendido en  $\text{D}_2\text{O}$  (*azul*), agregado  $\beta\text{CD-C16:AmB}$  suspendido en  $\text{D}_2\text{O}$  y posteriormente deshidratado (*negro*), mezcla mecánica  $\beta\text{CD-C16:AmB}$  (*celestes*), AmB (*rojo*) y  $\beta\text{CD-C16}$  (*verde*). (B) se muestra una región ampliada de los espectros. Los agregados auto-ensamblados y la mezcla mecánica tienen una composición igual a  $X^{\beta\text{CD-C16}}:X^{\text{AmB}}$  0,62:0,38. . . . . 125
- 3-16.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de AmB 9 mg/mL en  $\text{DMSO-d}_6$  (400,13 MHz). . . . . 126
- 3-17.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de  $\beta\text{CD-C16}$  en  $\text{DMSO-d}_6$  (400,13 MHz). . . . . 126
- 3-18.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de A)  $\beta\text{CD-C16:AmB}$  en fracciones molares 0,62:0,32 en  $\text{D}_2\text{O}$ , B) AmB en  $\text{DMSO-d}_6$  y C)  $\beta\text{CD-C16}$  en  $\text{DMSO-d}_6$  (400,13 MHz). . . . . 127
- 3-19.** Espectro ROESY de los agregados autoensamblados de  $\beta\text{CD-C16:AmB}$  (0,62:0,38) (A) ampliación en los protones de la cavidad de  $\beta\text{CD-C16}$  a 400 MHz en  $\text{D}_2\text{O}$  (B). . . . . 128

<b>3-20.</b> Imagen de TEM de los agregados autoensamblados $\beta$ CD-C16:AmB liofilizados. conteniendo 1,5 mg/mL de AmB y $X^{\beta CD-C16}:X^{AmB}$ 0,62:0,38. . . . .	130
<b>3-21.</b> Perfil de liberación de AmB del agregado auto-ensamblado de $\beta$ CD-C16:AmB con concentración de AmB de 1,5 mg/mL en PBS con un pH 7,4. . . . .	132
<b>3-22.</b> Ensayo de inhibición de crecimiento de <i>C. albicans</i> A) inhibición de crecimiento de <i>C. albicans</i> 0-33 $\mu$ M B) inhibición de crecimiento de <i>C albicans</i> 0-2,1 $\mu$ M. . . . .	134
<b>3-23.</b> Ensayo de inhibición de crecimiento de <i>Cándida albicans</i> por $\beta$ CD-C16:AmB (0,62:38) y la formulación comercial Anfostat. . . . .	134
<b>3-24.</b> Espectros de absorción del agregado de $\beta$ CD-C16:AmB con concentración de $98,83 \times 10^{-3}$ mg/mL. Temperatura de incubación: 25°C (1), 50°C(2), 60 °C(3), 70°C (4), 80°C(5). . . . .	136
<b>3-25.</b> Espectros de absorción de $\beta$ CD-C16:AmB con concentración de $7,31 \times 10^{-3}$ mg/mL. Temperatura de incubación: 25°C (1), 50°C(2), 60 °C(3), 70°C (4), 80°C(5). . . . .	137
<b>3-26.</b> Espectros de absorción de $\beta$ CD-C16:AmB con concentración de $5,17 \times 10^{-3}$ . Temperatura de incubación: 25°C (1), 50°C(2), 60 °C(3), 70°C (4), 80°C(5). . . . .	137
<b>3-27.</b> Espectros de dicroísmo circular de $\beta$ CD-C16:AmB con concentración de 9,00 (—) (A), 7,31 (—) (B) y 6,88 $\mu$ g/mL (C), incubadas a temperaturas de 50 °C (rojo), 60 °C (verde), 70°C(azul) y 80 °C(rosa), AmB en metanol (1) y AmB en agua (2).) . . . . .	139
<b>3-28.</b> Espectros $^1$ H RMN a 25°C y 70°C del agregado auto-ensamblado de $\beta$ CD-C16:AmB en D <sub>2</sub> O (400 MHz). . . . .	141
<b>4-1.</b> Isoterma de compresión de AmB A) Numero de moléculas en interfase • $4,25 \times 10^{16}$ , $5 \times 10^{16}$ , $6 \times 10^{16}$ , $1 \times 10^{17}$ B) Influencia de la velocidad de compresión 10 mm/min, • 20 mm/min, * 30 mm/min $\Delta$ 40 mm/min, 50 mm/min. Figura adaptada de referencia <sup>229</sup> . . . . .	146

4-2. Influencia de la fuerza iónica (A), valor de pH de la subfase (B) y temperatura (C) en las isothermas de compresión de la anfotericina B en monocapas. Figura adaptada de referencia <sup>229</sup> . . . . .	147
4-3. Grafica $\Delta\pi$ vs tiempo en las películas de DOPC después de la inyección de AmB a concentraciones: (A) $1 \times 10^{-7}$ M y (D) $2 \times 10^{-5}$ M. Para DPPC las concentraciones de AmB fueron (B) $1 \times 10^{-7}$ y (C) $2 \times 10^{-5}$ M. Figura adaptada de referencia <sup>94</sup> . . . . .	148
4-4. Representación esquemática de la transferencia de un film desde el compartimento I al II mediante el empleo de una barrera móvil. (Anfifilo verde: AmB). 151	
4-5. Isothermas de compresion de AmB a diferentes concentraciones en una subafse de NaCl 145 mM y 20 °C. . . . .	154
4-6. Módulo de compresión de AmB a diferentes concentraciones A) $7,3 \times 10^{15}$ , B) $8,37 \times 10^{15}$ , C) $1,04 \times 10^{16}$ , D) $1,25 \times 10^{16}$ y E) $1,36 \times 10^{16}$ moléculas y en una subafse de NaCl 145 mM y 20 °C . . . . .	155
4-7. Isothermas de compresión de AmB de concentración $1,04 \times 10^{16}$ moléculas en una subfase de NaCl(145mM) 20 y 25°C. . . . .	156
4-8. Orientación de las moléculas de AmB en la interfase aire agua en función de presión de superficie. . . . .	158
4-9. Isothermas de compresión de $\beta CD$ -C16, AmB Y $\beta CD$ -C16:AmB en NaCl (145mM) y 20°C. . . . .	159
4-10. Imágenes BAM de la monocapa de Anfotericina B tomadas durante la compresión. La escala es equivalente a 30 $\mu$ m. . . . .	160
4-11. Imágenes BAM de la monocapa de la mezcla $\beta CD$ -CD-C16: AmB (0,62:0,38) tomadas durante la compresión. Subfase NaCl 145mM. La escala es equivalente a 30 $\mu$ m. . . . .	161
4-12. A) Espectro UV-Vis de reflexión de la monocapa de la AmB y B) Espectro normalizado en una subfase 145 mM de NaCl, 25°C. . . . .	163
4-13. Espectros de reflexión UV-Vis de monocapas de la mezcla de $\beta CD$ -C16:AmB (0,62:0,38) y B) Espectro normalizado en una subfase 145 mM de NaCl, 25°C. 164	

<b>4-14.</b> Curva de adsorción de AmB en la interfase aire-agua(–) y penetración de AmB en monocapas de POPC a diferentes presiones :5 mN/m (–), 10 mN/m (–), 20 mN/m (–), 30 mN / m (–). Subfase NaCl 45mM, B) $\Delta\pi$ generada por la penetración de AmB en la monocapas de POPC. . . . .	165
<b>4-15.</b> Imágenes BAM de adsorción de AmB en una interfase aire-agua. La escala es equivalente a 30 $\mu\text{m}$ la imagen 13 mN/m se tomó con 60% de ganancia a fin de evitar la alta reflectividad del film. . . . .	166
<b>4-16.</b> Curvas de adsorción de agregados de $\beta\text{CD-C16:AmB}$ en una interfase aire/NaCl 145 mM (–) y penetración de $\beta\text{CD-C16:AmB}$ en monocapas de POPC empaquetadas a diferentes presión superficial: 5 mN / m (–), 10 mn / m (–), 20 mn / m (–), 30 mN/m (–). B) Cut off de $\beta\text{CD-C16:AmB}$ en una interfase de POPC. . . . .	167
<b>4-17.</b> Imágenes BAM de adsorción del agregado $\beta\text{CD-C16: AmB}$ en una interfase aire-agua. La escala es equivalente a 30 $\mu\text{m}$ . . . . .	168
<b>4-18.</b> Penetración del agregado auto ensamblado de $\beta\text{CD-C16: AmB}$ en una monocapa de POPC altamente empaquetada (30mn/m) . . . . .	168
<b>A-1.</b> Obtención de anhídrido 2-hexadecenilsuccínico. . . . .	175
<b>A-2.</b> Espectro FT-IR de anhídrido 2-hexadecenilsuccínico. . . . .	176
<b>A-3.</b> Espectro $^1\text{H}$ RMN de anhídrido 2-hexadecenilsuccínico. $\delta_{+H}$ (400,13 MHz, $\text{CDCl}_3$ ): 0,82 (t, 3H), 1,21 (s, 10H), 2 (m, H), 2,5 (m, H), 2,7 (m, 2H), 3,0 (m, 2H) 3,18 ( 1H), 5,29 (m, H), 5,60 (m, H). . . . .	177
<b>A-4.</b> Comparación de los espectros de FT-IR del anhídrido (– –) ácido(–)2-hexadecenilsuccínico . . . . .	178
<b>A-5.</b> $^1\text{H}$ RMN de $\beta\text{CD-C16}$ en DMSO. . . . .	179
<b>A-6.</b> $^{13}\text{C}$ RMN de $\beta\text{CD-C16}$ en DMSO . . . . .	179

# Lista de Tablas

1-1. Interacciones supramoleculares <sup>I</sup> . . . . .	8
1-2. Propiedades estructurales y fisicoquímicas de CDs nativas. . . . .	22
1-3. Solubilidad de AmB. * . . . .	27
1-4. Características y sinónimos utilizados para designar los diferentes estados de agregación de AmB en soluciones acuosas.* . . . .	28
1-5. Caracterización de Películas de Langmuir. . . . .	38
2-1. Energía libre de compresión, expansión y de histeresis para películas mixtas $\beta$ C16: POPC obtenidas en una subfase de NaCl 145 mM a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ . . . . .	73
2-2. Área molecular parcial media ( $\bar{A}$ ) en función de la composición para películas mixtas $\beta$ C16: POPC. . . . .	74
3-1. Características de los productos comerciales Fungizone <sup>®</sup> y AmBisome <sup>®</sup> * . . . . .	88
3-2. Condiciones ensayadas para obtener agregados estables de $\beta$ CD-C16 . . . . .	94
3-3. Cuantificación de AmB incorporada en los agregados auto ensamblados $\beta$ CD-C16:AmB. . . . .	96
3-4. Muestras utilizadas en el ensayo de hemólisis . . . . .	103
3-5. Porcentaje de eficiencia de encapsulamiento (%EE) y de contenido de fármaco (%CF) en los agregados auto-ensamblados $\beta$ CD-C16:AmB. . . . .	106
3-6. Máximos de absorción de agregados auto-ensamblados $\beta$ CD-C16:AmB de preparaciones sin diluir mostrados en la Figura <b>3-6</b> . . . . .	108
3-7. Máximos de absorción de agregados auto-ensamblados $\beta$ CD-C16:AmB de preparaciones diluidas mostradas en la Figura <b>3-8</b> . . . . .	110

<b>3-8.</b> Máximos de absorción de agregados auto-ensamblados $\beta$ CD-C16:AmB de preparaciones diluidas mostradas en la Figura <b>3-8</b> . . . . .	110
<b>3-9.</b> Máximos de absorción de agregados auto-ensamblados $\beta$ CD-C16:AmB de preparaciones diluidas mostradas en la Figura <b>3-9</b> . . . . .	112
<b>3-10.</b> Diámetros hidrodinámicos promedios obtenidos por DLS para diferentes agregados auto-ensamblados $\beta$ CD – C16:AmB. . . . .	120
<b>3-11.</b> Número de onda de las señales de deformación correspondientes al grupo amino de AmB presente en diferentes muestras. . . . .	124
<b>3-12.</b> Resuspensión de agregados liofilizados de $\beta$ CD-C16 en diferentes medios <sup>a</sup> . . .	130
<b>3-13.</b> Ensayos de liberación de AmB <i>in vitro</i> en diferentes medios . . . . .	131
<b>3-14.</b> Actividad hemolítica de las formulaciones $\beta$ CD-C16-AmB . . . . .	133
<b>3-15.</b> Diámetros promedios obtenidos por DLS para diferentes agregados auto-ensamblados $\beta$ CD-C16:AmB. . . . .	140
<b>4-1.</b> Presiones asignadas para la toma de los espectros UV-Vis de reflexión para AmB . . . . .	162
<b>4-2.</b> Presiones asignadas para la toma de los espectros UV-Vis de reflexión para la mezcla $\beta$ CD-C16:AmB (0,68:0,32). . . . .	163
<b>4-3.</b> Cuantificación de AmB en interfase limpia y en una monocapa de POPC, los datos obtenidos son por duplicado. . . . .	169
<b>A-1.</b> Señales de anhídrido 2-hexadecenilsuccínico obtenidos por FT-IR. . . . .	176



# Listado de abreviaturas

AmB	Anfotericina B
AMM	Área molecular media
BAM	Microscopia de ángulo Brewster
$\beta$ CD	Beta ciclodextrina
$\beta$ CDC-16:AmB	Beta ciclodextrina C-16 : Anfotericina B
CD	Ciclodextrina
$\alpha$ CD	Ciclodextrina nativa con 6 moléculas de glucosa
$\beta$ CD	Ciclodextrina nativa con 7 moléculas de glucosa
$\gamma$ CD	Ciclodextrina nativa con 8 moléculas de glucosa
$\delta$ CD	Ciclodextrina nativa con 9 moléculas de glucosa
CAC	Concentración de agregación crítica
CMC	Concentración micelar crítica
$C_s^{-1}$	Modulo de compresión
DC	Dicroísmo circular
DDS	Drug delivery systems
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMF	Dimetilformida
ECJ	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
FT-IR	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier
$\epsilon$	Constante dieléctrica
$\Delta G_{comp}$	Energía libre de compresión o trabajo realizado durante la compresión de una monocapa de Langmuir

---

$\Delta G_{exp}$	Energía Libre de expansión o trabajo realizado durante la expansión de una monocapa de Langmuir
$\Delta G_{hys}$	energía libre de histeresis. se obtiene a partir de la diferencia entre $\Delta G_{exp} - \Delta G_{comp}$
$\Delta R_{norm}$	Reflexión normalizada por área/molécula
$F_0$	Factor de orientación
LbL	ensamblado capa por capa. ( <i>Layer by layer</i> )
LC	Fase líquido condensado
LE	Fase líquido expandido
F	Fluorescencia
Fap	Fuerza de oscilación aparente
GM1	Gangliosido GM1
HMQC	Heteronuclear multiple quantum correlation
$\pi - \pi$	Interacciones $\pi - \pi$
TEM	Microscopio de transmisión electrónico
nm	Nanómetro
Osm	Osmolaridad
$\pi$	Presión de superficie
$\pi_{equi}$	Presión de equilibrio
$\pi_0$	Presión de superficie inicial
$\pi_f$	Presión de superficie final
POPC	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfolina
PEG	Polietilenglicol
PM-IRRAS	Polarized modulated infrared reflection adsorption spectroscopy
ROESY	Rotating frame overhauser spectroscopy
$\lambda_{em}$	Longitud de onda de emisión de fluorescencia
$\lambda_{ex}$	Longitud de onda de excitación de fluorescencia
$\lambda_{max}$	Longitud de onda del máximo de absorbancia
Rd	Luz reflejada

---

Rs	Luz adsorbida
MeOH	Metanol
$N_A$	Número de avogadro
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
SDDS	Supramolecular Drug Delivery Systems
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
UV-RAS	Espectroscopia UV- visible de reflexión
$X^{\beta CD-C16}$	Fracción molar de $\beta$ CD-C16
$X^{POPC}$	Fracción molar de POPC

# 1. Introducción

## 1.1. Química supramolecular, sistemas auto-ensamblados y sistemas auto-organizados

La química supramolecular se define como la química más allá de la molécula.<sup>1</sup> En contraste con la química molecular, que se basa en el estudio del enlace covalente de los átomos, la química supramolecular se cimenta en el estudio de las interacciones intermoleculares, es decir, en la asociación de dos o más moléculas o bloques de construcción que se mantienen unidos por interacciones no covalentes.<sup>1,2</sup> La naturaleza dinámica y reversible de las interacciones no covalentes permite la creación de estructuras supramoleculares que poseen excelentes propiedades y características del tipo estímulo-respuesta abriendo infinitas posibilidades para su utilización en diversas áreas de la ciencia y tecnología.<sup>3,4</sup>

El inicio de la química supramolecular se remonta al año 1967 con el descubrimiento de los éteres corona por Pedersen.<sup>1,5</sup> Luego de dos décadas Lehn, Cram y Pedersen fueron reconocidos con el Premio Nobel de 1987 por sus trabajos en el área de la química supramolecular. Más recientemente, como resultado de sus estudios en esta área, Sauvage, Stoddart y Feringa obtuvieron el Premio Nobel en 2016 por sus esfuerzos pioneros en el diseño y síntesis de máquinas moleculares.<sup>5</sup> La química supramolecular desde sus inicios se ha convertido en un campo altamente interdisciplinario, que ha promovido el desarrollo de numerosos sistemas supramoleculares para aplicaciones en materiales funcionales, nanomedicina, dispositivos electrónicos, sensores, catálisis, etc.

Entre las diversas interacciones no covalentes que permiten la formación de estructuras supramoleculares, se encuentran las interacciones de van der Waals, los enlaces puente hidrógeno, las interacciones de tipo  $\pi$ - $\pi$ , las interacciones electrostáticas y las interacciones de transferencia de carga.

El auto-ensamblaje (*self-assembly*) de componentes moleculares se ha convertido en una estrategia muy útil en el diseño y síntesis de nanomateriales para aplicaciones biomédicas.<sup>1,6,7</sup> El auto-ensamblaje es un proceso mediante el cual moléculas, iones o macromoléculas se organizan espontáneamente (o en respuesta a estímulos específicos) en estructuras supramoleculares a través de interacciones no covalentes.<sup>7</sup> El auto-ensamblaje generalmente se asocia

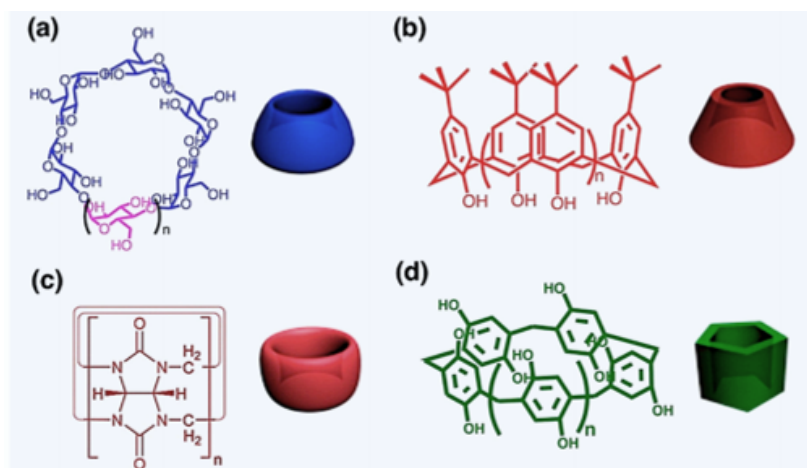
con procesos espontáneos de minimización de energía y equilibrio termodinámico, y requiere la estabilidad de las entidades individuales durante todo el proceso de ensamblaje.<sup>1,7</sup> El producto formado es una estructura bien definida, que puede permanecer en equilibrio termodinámico con los componentes pre-existentes (o monómeros). El término auto-ensamblaje se usa con frecuencia en química supramolecular para indicar la formación espontánea de estructuras con un enfoque *bottom-up*.<sup>1,7</sup>

La auto-organización (*self-organization*) es un proceso mediante el cual las estructuras o entidades supramoleculares en solución o estado sólido se organizan en estructuras periódicas bidimensionales (2D) o tridimensionales (3D) o en conjuntos con una dada simetría o periodicidad.<sup>7,8</sup>

Mientras que el auto-ensamblaje implica la unión no covalente, la auto-organización involucra además la traducción de esa información hacia la formación de estructuras más sofisticadas. Esta información es necesaria para que la auto-organización ocurra, y el algoritmo (eventos de reconocimiento molecular) que sigue el proceso debe estar pre-programado en los componentes individuales y ser operado a través de interacciones moleculares selectivas.<sup>7,8</sup> El auto-ensamblaje ocurre espontáneamente para llevar a un sistema hacia el equilibrio sin ningún algoritmo molecular predefinido. La auto-organización en tanto ocurre como una etapa posterior y es un proceso que lleva al sistema a un estado fuera del equilibrio. Debido a ello, el término auto-organización se asocia con sistemas biológicos.<sup>7,8</sup>

Las interacciones del tipo huésped-receptor se logran generalmente mediante la introducción de receptores macrocíclicos en sistemas supramoleculares. Las moléculas macrocíclicas (receptores), como los éteres corona, ciclodextrinas, calixarenos, cucurbiturilos y pillarenos tienen cavidades hidrofóbicas en las que se pueden incluir moléculas que son denominadas huéspedes o ligandos.<sup>1,3</sup> Ejemplos de receptores macrociclicos se muestran en la Figura 1-1.

La introducción de macrociclos en sistemas auto-ensamblados proporciona plataformas ideales para la fabricación de nuevos materiales y derivados para su uso como agentes quimioterapéuticos a través del reconocimiento molecular huésped-receptor. Esto permite que algunas limitaciones que tiene la quimioterapia tradicional para aplicaciones clínicas puedan resolverse de manera efectiva.<sup>3</sup> Por ejemplo, la solubilidad/estabilidad de algunos fármacos



**Figura 1-1.:** Diferentes tipos de macrociclos. (a) ciclodextrina; (b) calix[n]areno, (c) cucurbit[n]urilo; (d) pilarenos. Figura adaptada de la referencia <sup>9</sup>

poco solubles puede mejorarse significativamente en entornos fisiológicos tras la formación de complejos huésped-receptor.<sup>3,9</sup> Estos complejos permiten lograr una alta acumulación de fármaco beneficiándose del auto-ensamblaje supramolecular, mejorando notablemente la eficacia de los agentes quimioterapéuticos y reduciendo los efectos secundarios. La naturaleza dinámica de las interacciones no covalentes hace que la quimioterapia supramolecular sea más versátil que la quimioterapia tradicional.<sup>10,11</sup> Si bien la utilización de macrociclos, principalmente de las ciclodextrinas, ha permitido optimizar la administración de muchos y variados tipos de agentes quimioterapéuticos actualmente se requiere de sistemas de administración de fármacos más eficientes.<sup>11</sup>

La búsqueda de nuevos vehículos o sistemas para la administración de fármacos es un área de investigación sumamente activa dado que permite revalorizar fármacos ya existentes que presentan problemas como baja solubilidad, excreción temprana o toxicidad. Muchos medicamentos empleados actualmente pueden beneficiarse de tecnologías nuevas e innovadoras para mejorar su administración y eficiencia terapéutica.<sup>12</sup>

## 1.2. Sistemas de transporte y liberación de fármacos y sistemas supramoleculares de transporte y liberación de fármacos.

La quimioterapia es actualmente una de las formas más efectivas de tratar diversas enfermedades e implica el uso terapéutico de compuestos químicos para tratar una afección en particular. La quimioterapia tradicional enfrenta varios obstáculos que dificultan la administración efectiva y sin efectos secundarios de los fármacos. Entre los problemas más comunes se encuentran la escasa solubilidad o estabilidad de los fármacos, la falta de direccionamiento del fármaco hacia el sitio de acción y la liberación no controlada de los mismos. Estos factores limitan considerablemente la eficiencia de los fármacos sumado a los efectos secundarios graves que muchos de ellos producen en los tejidos normales y en el organismo.<sup>10</sup>

Como se mencionó anteriormente la revalorización de fármacos que se emplean de hace tiempo, y que tienen asociados problemas de administración y toxicidad, es una alternativa muy atractiva para el tratamiento de diversas afecciones. La revalorización de fármacos se potencia aún más debido al hecho de que el desarrollo de nuevas moléculas bioactivas es sumamente costoso y el proceso, hasta su puesta en el mercado, lleva años. En muchos casos, por ejemplo en infecciones microbianas y cáncer,<sup>10</sup> contar con fármacos eficientes es una necesidad urgente.<sup>12</sup>

Una forma de revalorizar fármacos y potenciar sus propiedades evitando los obstáculos antes mencionados es a través del desarrollo de sistemas de transporte y liberación de fármacos o DDS (por sus siglas en inglés *Drug Delivery Systems*). Un DDS es un método o proceso para administrar un compuesto farmacéutico a fin de que éste alcance su efecto terapéutico en los seres humanos y animales.<sup>5</sup>

Entre los diversos DDS, están los sistemas supramoleculares de administración de fármacos o SDDS (por sus siglas en inglés *Supramolecular Drug Delivery Systems*)<sup>5,13</sup> que se construyen utilizando moléculas anfifílicas y ofrecen una plataforma flexible y robusta para diseñar y desarrollar nuevos sistemas de transporte y liberación. También, muchos SDDS abren la posibilidad de optimizar el direccionamiento del fármaco hacia el lugar donde éste



debe actuar (*targeting*).<sup>5</sup>

En comparación con los sistemas de administración de fármacos convencionales, los SDDS tienen ventajas únicas debido a la naturaleza dinámica de las interacciones no covalentes, que otorgan a los transportadores una capacidad de respuesta frente a diversos estímulos externos o internos y, por lo tanto, ofrecen un enfoque atractivo para la fabricación de nano-fármacos inteligentes. En los SDDS, según el diseño y características de los bloques de construcción (anfífilos, polímeros, etc.)<sup>5</sup> se abre la posibilidad de manipular las morfologías y tamaños de los portadores supramoleculares resultantes que, por lo general, tienen tamaños en la nanoescala. La construcción de SDDS inteligentes y funcionales basados en interacciones no covalentes no sólo son una herramienta poderosa para que los químicos revolucionen el suministro de medicamentos, sino también son una forma potencial de crear materiales funcionales inteligentes.

A pesar de todas estas características y potencialidad, los SDDS están aún en su infancia y deben superarse muchos desafíos y limitaciones prácticas.<sup>5</sup> Dentro de los diferentes SDDS, las micelas formadas por anfífilos o bloques poliméricos son las que están cobrando mayor importancia debido a su capacidad de auto-ensamblarse. El auto-ensamblaje de un transportador de fármacos evita varias etapas en su producción y desarrollos tecnológicos,<sup>5</sup> tal como ocurre con los sistemas vesiculares como los liposomas. Uno de los principales problemas relacionados con los SDDS es su estabilidad (*in vivo*) en el sistema circulatorio. En este sentido, el estudio de los sistemas supramoleculares desde las ciencias básicas es de gran relevancia para poder realizar diseños que permitan evadir estos obstáculos. El diseño de nuevas moléculas anfipáticas, que presenten propiedades mejoradas respecto a los anfífilos convencionales y que permitan dirigir la estructura de los sistemas auto-ensamblados, en cuanto a su tamaño y estabilidad, es una etapa fundamental para el desarrollo de SDDS. Otro desafío importante es cómo lograr la traducción exitosa de SDDS desde el laboratorio hasta aplicaciones clínicas. Esta no es una tarea fácil y es necesario responder muchas preguntas abiertas para futuras aplicaciones prácticas.

## **1.3. Principales interacciones no covalentes en sistemas auto-ensamblados.**

El auto-ensamblaje de módulos moleculares puede formar estructuras generalmente de tamaño nanométrico y termodinámicamente estables. A través de interacciones multivalentes, las moléculas o grupos de moléculas se asocian en estructuras organizadas con una complejidad creciente. Una característica distintiva de estas estructuras y arquitecturas es la cooperatividad positiva, que surge de la interacción sutil de dos o más tipos de interacciones no covalentes.<sup>5,14</sup>

La longitud de un enlace covalente es pequeño (en comparación con las interacciones no covalentes), con una distancia promedio de menos de 0,2 nm entre los átomos unidos. Las interacciones no covalentes ocurren con distancias más largas que los enlaces covalentes. La interacción de superficies hidrófobas o las interacciones electrostáticas pueden suceder sobre decenas de nanómetros. Por otro lado, los enlaces no covalentes son 10-100 veces más débiles en comparación con los enlaces covalentes. Las interacciones multivalentes que involucran múltiples tipos de enlaces no covalentes, a través del contacto de grandes superficies, compensan las fuerzas de interacción más débiles y al mismo tiempo permiten la formación, desintegración y reestructuración de estructuras a gran escala que no son fácilmente alcanzables mediante la química covalente.

### **1.3.1. Interacción hidrofóbica de moléculas anfifílicas.**

Una de las principales interacciones no covalentes responsable de la agregación, es el efecto hidrofóbico. (Tabla1-1). Las interacciones hidrofóbicas tienden a minimizar el costo energético para insertar una molécula no polar en el agua. La presencia de sustancias no polares en el agua, tales como cadenas hidrocarbonadas, interrumpe la red de enlaces puente de hidrógeno del agua con la cual el agua se ordena.

La presencia de un soluto hidrofóbico fuerza a que el agua se acomode a su alrededor para intentar solvatarlo, haciendo que el agua se ordene a su alrededor. Esto facilita las interacciones de los enlaces puente de hidrógeno y aumenta la entalpía. Simultáneamente,

**Tabla 1-1.:** Interacciones supramoleculares <sup>I</sup>

<b>Interacción</b>	<b>Energía (kJ/mol)</b>
<b>Ion-ion</b>	200-300
<b>Ion-dipolo</b>	50-200
<b>dipolo-dipolo</b>	5-50
<b>Puente hidrógeno</b>	4-120
<b>Catión-<math>\pi</math></b>	5-50
$\pi - \pi$	0-50
<b>van der Waals</b>	<5 kJ/mol es variable dependiendo del area de la superficie hidrofóbica
<b>Hidrofobica</b>	Depende de la energía de la interacción con el solvente

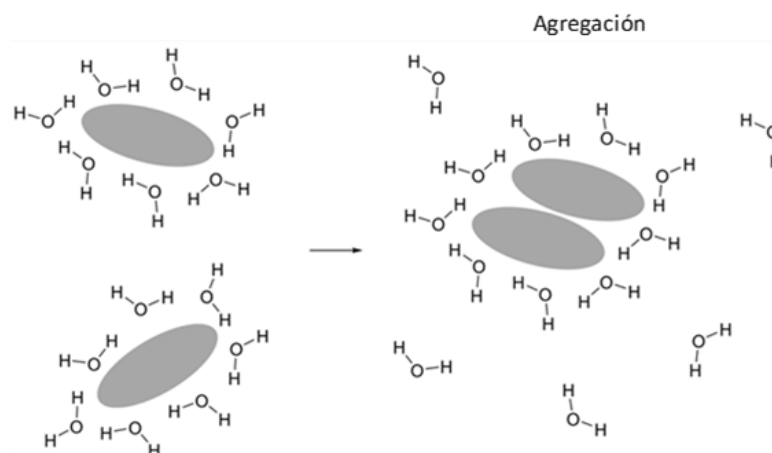
<sup>I</sup> Tabla adaptada de la referencia<sup>1</sup>.

la aleatoriedad (entropía) de las moléculas de agua disminuye y causa una situación desfavorable en cuanto a la energía libre del sistema. Para minimizar dicho costo energético, las moléculas no polares tienden a unirse y agregarse en solución acuosa para excluir las moléculas de agua (Figura 1-2). La interacción hidrofóbica contribuye a la formación de una multitud de estructuras y procesos biológicos, como la formación de las membranas celulares, el plegamiento de proteínas, la formación de vesículas subcelulares y la inserción de proteínas de membrana en el entorno lipídico no polar.<sup>14</sup>

Los investigadores han logrado usar el efecto hidrofóbico como una estrategia para generar estructuras bien definidas. Se han desarrollado numerosos transportadores de fármacos, como liposomas, micelas, nanopartículas basadas en lípidos o en polímeros con el objetivo de mejorar las propiedades de fármacos encapsulados.<sup>15</sup>

### 1.3.2. Enlaces puente hidrógeno

Un enlace puente hidrógeno se establece por las interacciones atractivas entre un donador de hidrógeno y un aceptor de hidrógeno. Aunque la interacción es relativamente débil,

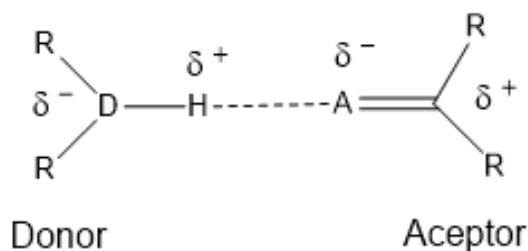


**Figura 1-2.:** Ilustración esquemática del efecto hidrofóbico. La agregación de las regiones hidrofóbicas de las moléculas reduce el número de moléculas de agua que debe rodear la superficie hidrofóbica. Figura adaptada de la referencia <sup>22</sup>

la formación de múltiples enlaces de puente hidrógeno puede conducir a estructuras autoensambladas fuertes y bien definidas.<sup>3,14,15</sup> Los enlaces puente hidrógeno pueden ser muy débiles en algunos casos o bastantes fuertes y direccionados en otros. Por ejemplo para especies neutras la fuerza del enlace está en el orden de 5-60 kJ/mol, mientras que si participan iones la fuerza de interacción es mucho mayor. Una de las principales interacciones que se presentan en los sistemas supramoleculares son los puente hidrógeno los cuales dan estabilidad a las estructuras formadas.<sup>1,16</sup>

La entalpía del enlace puente hidrogeno suele ser mucho más débil que el cambio de entalpía involucrado en la formación de un enlace covalente, pero es mucho mayor que el cambio de entalpía implícito en la formación de las interacciones de van der Waals.<sup>17</sup>

Como las interacciones de los enlaces puente hidrógeno son más fuertes que la interacción asociada con el movimiento browniano, los efectos cooperativos permiten la formación de estructuras muy robustas. La naturaleza dinámica de los enlaces puente hidrógeno en el agua es una de las maneras más razonables para explicar la naturaleza de las interacciones hidrofóbicas.



**Figura 1-3.:** Representación gráfica de un enlace puente hidrógeno. D átomo donador de H y A átomo aceptor (O, N, S) Figura adaptada de la referencia <sup>1</sup>

### 1.3.3. Interacciones de van der Waals

Las interacciones de van der Waals se generan a partir de fluctuaciones en la distribución electrónica de especies que se encuentran próximas entre sí. El movimiento de la distribución electrónica (dipolo) entre dos especies adyacentes direcciona las moléculas de manera tal que la región positiva del dipolo de una molécula sea atraída por la región negativa del dipolo de la otra. De esta manera, los dipolos instantáneos se atraen mutuamente y producen una interacción de tipo London, cuya fuerza de interacción es dependiente de la polarizabilidad de la molécula. Lo contrario ocurre cuando los dipolos se ubican con la carga en el mismo sentido generando efectos repulsivos.<sup>1,18</sup>

### 1.3.4. Interacción electrostática

En los sistemas biológicos, las interacciones electrostáticas entre macromoléculas cargadas son muy importantes, como por ejemplo en la condensación de ácidos nucleicos, la unión del tipo ligando-receptor y las interacciones célula-célula. Actualmente el empleo de interacciones electrostáticas para construir nanoestructuras auto-ensambladas capa por capa (LbL) representa una estrategia muy utilizada. La ruptura de los enlaces iónicos en el vacío requiere de mayor energía (por ejemplo, 788 kJ/mol para separar los pares de iones  $\text{Na}^+\text{Cl}^-$ ) que la ruptura de enlaces covalentes (por ejemplo, 411 kJ/mol para los enlaces C-H).

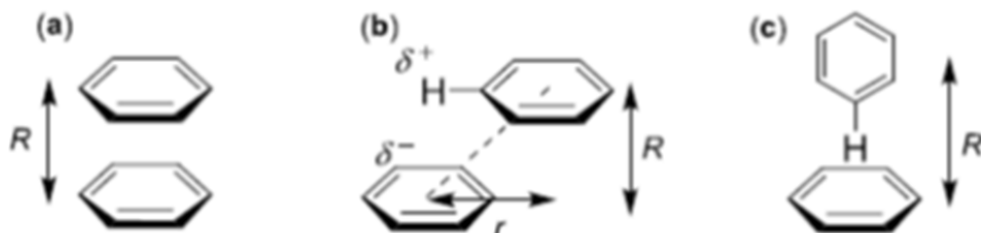
En soluciones acuosas, la solvatación de los iones por parte de las moléculas de agua reduce drásticamente el costo energético para separar especies con carga opuesta. Las interacciones de Coulomb entre dos cargas puntuales están condicionadas por un factor de permitividad

relativa del medio ( $\epsilon$ , también conocida como constante dieléctrica).

### 1.3.5. Interacciones $\pi$ - $\pi$

Las interacciones de tipo  $\pi$ - $\pi$  son interacciones no covalentes, atractivas que ocurren entre residuos aromáticos vecinos. Estas interacciones son importantes en múltiples procesos biológicos, como el plegamiento de proteínas, el reconocimiento molecular y la síntesis dirigida.<sup>14</sup>

De acuerdo con la geometría de las interacciones aromáticas, las interacciones  $\pi$ - $\pi$  son representadas por tres posibles orientaciones de sistemas aromáticos. El primer tipo es la interacción Eclipsada cara-cara o sándwich; la segunda interacción es desplazamiento paralelo y la última es borde-cara o forma de T siendo las formación **Eclipsada cara-cara** menos estable frente a las dos últimas (Figura 1-4).



**Figura 1-4.:** Geometrías de las interacciones  $\pi$ - $\pi$ . a) Eclipsada cara-cara b) Desplazamiento paralelo y c) Borde-cara o forma de T. Figura tomada de la referencia <sup>19</sup>

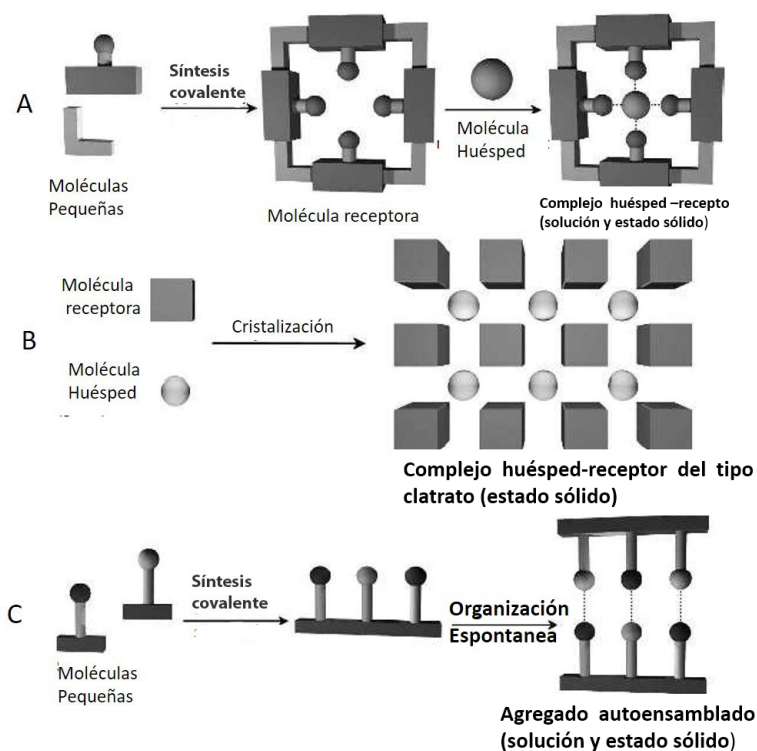
La formación denominada **desplazamiento paralelo** es en la cual dos sistemas de anillos aromáticos paralelos, separados por una distancia 3,5 Å, se encuentran desplazadas uno del otro de tal manera que la interacción se da entre el centro de un anillo y la esquina del otro (Figura 1-4 b). El tipo **borde-cara o forma de T** es en donde un átomo de hidrógeno de uno de los anillos interactúa en orientación perpendicular con respecto al centro del otro anillo (Figura 1-4 c).

## 1.4. Interacciones huésped-receptor

Las interacciones del tipo huésped-receptor se logran mediante la introducción de receptores macrocíclicos en sistemas supramoleculares. Las moléculas macrocíclicas (receptores), como los éteres corona, ciclodextrinas, calixarenos, cucurbiturilos y pillarenos, tienen cavidades hidrófobas en las que pueden incluirse moléculas que son denominadas huéspedes o ligandos.<sup>1,3</sup> Estos huéspedes o ligandos interactúan con el receptor a través de una o más de las interacciones no covalentes antes descritas generando un complejo de inclusión o supramolécula. Los huéspedes pueden ser moléculas simples y pequeñas o bien moléculas complejas que poseen sitios que interactúan con el receptor de manera no covalente. En las interacciones huésped-receptor el sitio de unión de la molécula debe tener el tamaño, geometría y funcionalidad complementaria con la otra molécula tal como ocurre en los sistemas enzima-sustrato.<sup>19</sup>

Los principales receptores de acuerdo a la interacción con la molécula huésped, se dividen en cavitandos y clatratos. Los primeros pueden describirse como receptores que poseen cavidades intramoleculares permanentes, en el cual la cavidad de la molécula existe tanto en solución como en estado sólido. A la inversa, los clatratos que son receptores con cavidades extramoleculares<sup>20</sup> son relevantes sólo en el estado cristalino o sólido. También podemos distinguir una tercera situación en la que dos moléculas se asocian utilizando fuerzas no covalentes, pero no se ajusta a las descripciones de "huésped-receptor". En estas circunstancias, se habla del auto-ensamblaje de moléculas mutuamente complementarias. En la Figura 1-5 se muestran las diferentes formaciones estructurales en las que intervienen las interacciones huésped-receptor.<sup>19</sup>

Las moléculas macrocíclicas en sistemas huésped-receptor se han utilizado por ejemplo para formar complejos que mejoran la solubilidad o estabilidad en agua de las moléculas huésped. A través de la funcionalización química las moléculas macrocíclicas pueden ser provistas de nuevas propiedades, tales como alta solubilidad en agua, biocompatibilidad y propiedades anfífilas. En la formulación de variados medicamentos la utilización de macrociclos permitió aumentar la solubilidad del fármaco, además de modificar la liberación y biodisponibilidad del mismo.<sup>21</sup>



**Figura 1-5.:** Representación gráfica de la formación de estructuras por interacción huésped-receptor. A) Complejos de inclusión huésped-receptor. B) Inclusión de moléculas huésped en cavidades formadas entre moléculas (clartratos). C) Síntesis y auto-ensamblaje de un agregado supramolecular que no corresponde a la descripción clásica de huésped-receptor.) Figura adaptada de la referencia <sup>1</sup>



## 1.5. Cooperatividad: sinergia de interacciones no covalentes

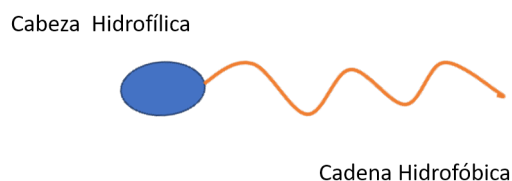
En los sistemas constituidos por macromoléculas auto-ensambladas ocurren simultáneamente múltiples tipos de interacciones no covalentes con energías compensatorias que conducen a arquitecturas altamente complejas y dinámicas. La morfología de los auto-ensamblados se establece cuando las diferentes fuerzas o interacciones alcanzan un equilibrio. Por ejemplo, la estructura de una micela refleja el balance entre fuerzas atractivas hidrofóbicas de las cadenas hidrocarbonadas y fuerzas repulsivas entre los grupos polares.<sup>15</sup> La geometría de la molécula también adquiere relevancia y condiciona el tipo de auto-ensamblado que se forma.<sup>18</sup>

## 1.6. Surfactantes

La palabra surfactante deriva del inglés *surfactant* que es un acrónimo que hace referencia a un compuesto que presenta actividad de superficie (*surface active agent*) el cual posee capacidad para reducir la energía interfacial denominados también tensioactivos.<sup>22</sup> La existencia de superficies es termodinámicamente desfavorable y su creación requiere cantidades sustanciales de energía y más aún cuanto más difieren las fases involucradas. La minimización de la energía interfacial y la maximización del área interfacial pueden ser manejadas por sustancias con propiedades anfífilas.

Los anfífilos son compuestos orgánicos, que contienen grupos o regiones hidrofóbicas como cadenas hidrocarbonadas largas, y grupos hidrofílicos que tienen naturaleza polar (Figura 1-6). Estas sustancias son compatibles con fases o solventes inmiscibles y pueden mediar entre ellas. Además, debido a sus propiedades anfífilas tienen la propiedad de auto-ensamblarse dando como resultado micelas, vesículas o cristales líquidos liotrópicos, entre otros. La dispersión de estas moléculas en una interfase aire-agua disminuye el valor de la tensión superficial, aumentando la presión de superficie.<sup>22</sup>

Los surfactantes o compuestos tensioactivos son ubicuos en la naturaleza y se utilizan



**Figura 1-6.:** Representación esquemática de un anfifilo.

activamente en diferentes aplicaciones tecnológicas como detergentes o como agentes emulsionantes. La industria farmacéutica los utiliza asiduamente para la formación de estructuras auto-ensambladas debido a su versatilidad ya que permiten la solubilización y transporte de fármacos hidrofóbicos. Estas moléculas se utilizan como excipientes para el suministro de principios activos en diversas formulaciones (soluciones, emulsiones, dispersiones, cápsulas).<sup>22</sup>

Los surfactantes permiten mejorar el paso de los principios activos a través de membranas biológicas, manteniendo la concentración adecuada y permitiendo que el principio activo alcance su punto de acción. Además, en algunos casos pueden tener un efecto farmacológico. Estas moléculas deben presentar características biológicas muy específicas para que la industria farmacéutica las tenga en cuenta, como por ejemplo, estándares de toxicidad, alergenicidad, efectos secundarios, etc.<sup>22</sup>

Los surfactantes se pueden clasificar de acuerdo a su estructura molecular como surfactantes iónicos (aniónicos o catiónicos), surfactantes zwitteriónicos que portan una carga negativa y otra positiva resultando en una especie neutra, y surfactantes no iónicos. En los últimos años, se han desarrollado surfactantes que tienen propiedades mejoradas o que presentan valor agregado en su estructura molecular, tales como los surfactantes gémmini, surfactantes que contienen macrociclos que otorgan al sistema propiedades de reconocimiento, surfactantes con regiones que pueden responder a estímulos lumínicos o a cambios de pH o bien que tengan un grupo con actividad catalítica, etc.<sup>23</sup>

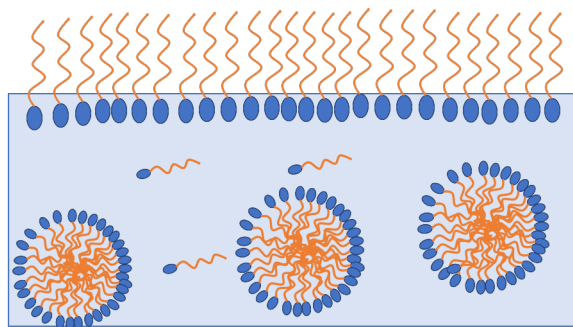
Una de las propiedades más importantes de los anfífilos es la capacidad de formar coloides a través de la auto-organización de un conjunto de moléculas cuando se ponen en contacto con el agua. El coloide más pequeño es la micela y al aumentar la concentración de surfactante, es posible formar cada vez más micelas. Debido a que todas las micelas tienen aproximadamente el mismo tamaño, pueden eventualmente agruparse en estructuras organizadas más complejas con simetría diferente, conocidas como fases de cristal líquido liotrópico (LLC). Además, las micelas pueden organizarse en cilindros adoptando una disposición hexagonal, seguida de la formación de fases lamelares.<sup>23</sup>

La forma más simple de una micela es la de un agregado con aproximadamente el doble del diámetro de una sola molécula de surfactante.<sup>22</sup> En agua, los tensioactivos se disponen con sus cabezas polares apuntando hacia la fase acuosa en tanto que el dominio interno hidrófobo queda en el corazón o interior de la micela (Figura 2-4). La concentración micelar crítica (CMC) es la concentración de surfactante a partir de la cual las primeras micelas pueden observarse en solución estando en equilibrio con sus monómeros. Antes de alcanzar la CMC, la interfase aire-agua va siendo ocupada por moléculas de surfactante con su cola hidrocarbonada dirigida hacia la fase gaseosa (aire) tal como se muestra en la Figura 2-4. Este proceso dependiente de la concentración, puede conocerse mediante mediciones de la tensión superficial ( $\gamma$ ), conductividad, presión de superficie  $\pi$ , etc.<sup>22</sup>

En los casos donde no se conoce con certeza si la estructura auto-ensamblada formada por un surfactante es una micela clásica, se puede utilizar el término concentración de agregación crítica (CAC) para definir el fenómeno antes descrito.<sup>24</sup>

## 1.7. Sistemas coloidales utilizados para el transporte de fármacos

La administración de medicamentos debe realizarse de tal forma que el fármaco se encuentre en una determinada concentración constante en el tiempo (dosis terapéutica efectiva). Esta característica es importante en el momento de administrar el medicamento debido a que existen algunas dificultades como la desviación del fármaco del órgano diana y la in-



**Figura 1-7.:** Auto-ensablados formados por un anfífilo después de superar la concentración de agregación crítica.

capacidad del fármaco para penetrar en las células o tejidos deseados. Habitualmente, para compensar la pérdida del fármaco durante su recorrido por ejemplo por interacción con otros órganos, lo que produce una disminución de la concentración efectiva, se aumenta la dosis del fármaco ocasionando efectos adversos.

La tendencia creciente en el desarrollo de nuevos medicamentos, han suscitado el desarrollo de fármacos centrados en la potencia y la alta actividad, que a menudo conducen a moléculas lipofílicas y poco solubles en agua, estas características conducen a problemas en la estabilidad y en la capacidad de administrar el fármaco de forma amigable para el paciente.<sup>25</sup>

Los fármacos pueden presentar problemas en la solubilidad y por lo tanto en la disolución, la estabilidad y la falta de especificidad para los tejidos. Para mejorar estos inconvenientes algunos autores recomiendan trabajar en la optimización de la estructura molecular del fármaco,<sup>26</sup> sin embargo, esta optimización no es aplicable para todas las moléculas.<sup>25</sup>

En la actualidad, se han desarrollado estrategias para el tratamiento de diversas enfermedades, cuya finalidad es la búsqueda de transportadores de fármacos, especialmente de fármacos hidrofóbicos con muy baja solubilidad en medios acuosos,<sup>27</sup> para que alcancen el lugar de actuación con una concentración adecuada que permanezca constante durante el tiempo necesario. Estas moléculas hidrofóbicas, al tener baja solubilidad en agua, se eliminan por vía renal lo que generalmente produce una elevada toxicidad sistémica que representa la principal barrera que limita su uso terapéutico (especialmente para fármacos oncológicos o

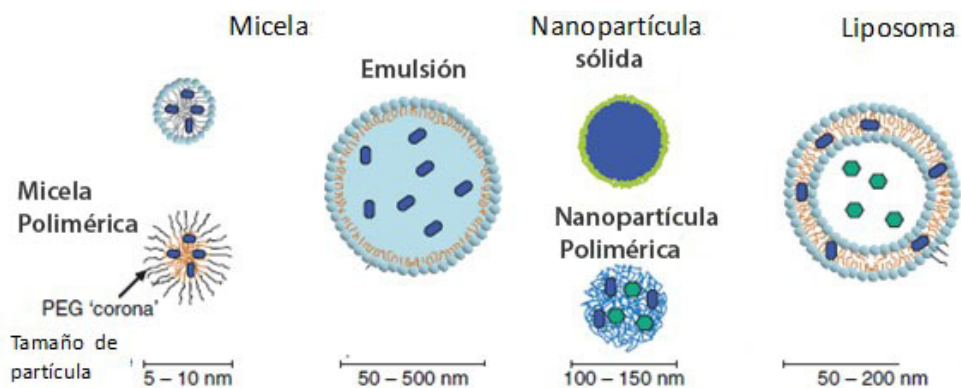
micóticos).<sup>27</sup>

El desarrollo de nuevos fármacos representa un largo camino con grandes costos y pocas posibilidades de éxito, debido a las etapas que se deben cumplir para llegar a la comercialización. El proceso que conlleva la investigación y desarrollo de nuevos fármacos requiere de un grupo interdisciplinario, lo que en parte justifica los enormes costos involucrados.<sup>28</sup> Debido a estas limitaciones, gran parte de los desarrollos y proyectos de investigación se han enfocado en la mejora de la eficacia y seguridad de los medicamentos tradicionales innovando en la formulación. Además, la formulación mejorada de los medicamentos existentes representa un negocio lucrativo para la industria farmacéutica que enfrenta un déficit de innovación de nuevas moléculas.<sup>29</sup>

Los sistemas coloidales, son utilizados como transportadores de fármacos y son útiles para disminuir los problemas de compuestos terapéuticos existentes y sus efectos secundarios.<sup>30</sup> Estos sistemas buscan estrategias para mejorar el suministro sistémico de fármacos insolubles en agua.

Entre los sistemas transportadores más utilizados se encuentran los liposomas (Figura 1-8), que son compuestos formados por una o más bicapas lipídicas que limitan un interior acuoso,<sup>31,32</sup> y por lo tanto poseen la capacidad de encapsular fármacos<sup>33</sup> tanto hidrofóbicos como hidrofílicos.

Las micelas son otro tipo de transportador ampliamente utilizado, su principal ventaja es la capacidad de auto-ensamblaje y su tamaño pequeño en comparación con los liposomas (dentro de un rango de 5-100 nm),<sup>34-36</sup> lo que evita que el sistema inmunológico las detecte fácilmente. La mayor desventaja de los sistemas micelares surge principalmente de su alta inestabilidad a la dilución. El fenómeno de micelización se origina por el auto-ensamblaje que es un fenómeno reversible<sup>30</sup> que consiste en un equilibrio termodinámico entre el monómero y el agregado, determinado por la concentración de agregación crítica (CAC).<sup>37</sup> Para las micelas clásicas, el valor de la CMC depende del balance hidrofílico-lipofílico de la molécula anfipática y esta en el orden de concentración mM.<sup>22,36</sup> Debido a la naturaleza dinámica de las micelas la búsqueda de anfifilos que posean CMC muy bajas (en el orden de  $\mu\text{M}$  o menor) se ha convertido en un objetivo importante para el diseño de SDDS, para que las



**Figura 1-8.:** Representación gráfica de estructuras utilizadas para el transporte de principios activos. Figura adaptada de la referencia <sup>5</sup>

micelas puedan resistir mejor el efecto de la dilución cuando son administradas al torrente sanguíneo.<sup>36</sup>

Por ejemplo los gangliósidos, que son moléculas de origen natural, presentan propiedades promisorias como anfifilos para generar SDDS. Los gangliósidos son glicolípidos complejos con características anfífilas debido que poseen un grupo sacárido y una ceramida. En la Figura 1-9 se muestra como ejemplo al gangliósido GM1. En soluciones acuosas, la mayoría de gangliósidos se auto-ensamblan espontáneamente formando micelas con un CAC muy baja ( $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4} M$ )<sup>34,38</sup> y número de agregación en el orden de cientos. Muchos gangliósidos tienen una CAC más baja que la mayoría de los anfifilos probablemente debido a la presencia de un grupo polar voluminoso y a la posibilidad de entablar numerosos puentes de hidrógenos entre los sacáridos de las diferentes moléculas. A diferencia de GM1, los gangliósidos con grupos polares pequeños como GM3 y GM4 presentan la capacidad de formar vesículas espontaneas sin suministro de energía externa y, por lo tanto, en equilibrio termodinámico.<sup>39</sup> Partiendo de las propiedades de los gangliósidos y otros compuestos conteniendo sacáridos se han direccionado diferentes investigaciones para el desarrollo de nuevos transportadores basados en estructuras que contienen carbohidratos.<sup>40-43</sup> Este tipo de transportadores se denominan glicotransportadores.<sup>40-42</sup>

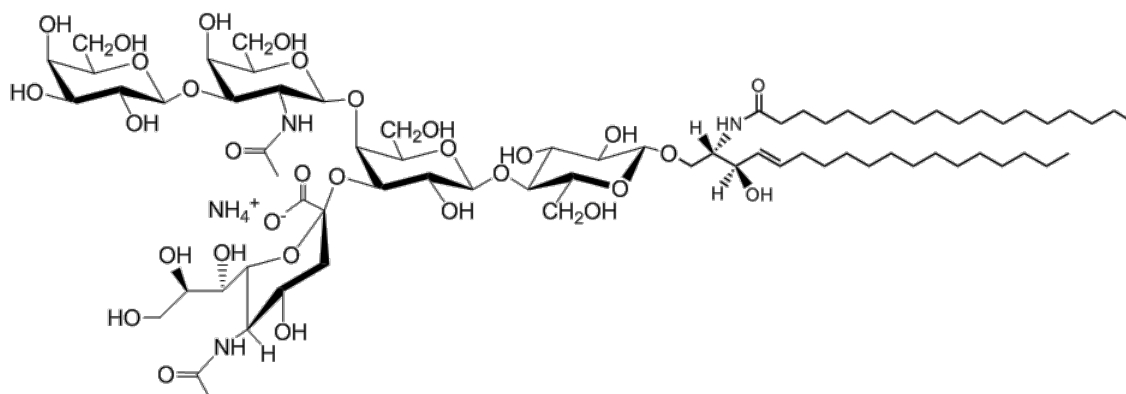


Figura 1-9.: Gangliósido GM1

## 1.8. Ciclodextrinas como sistemas transportadores.

Las ciclodextrinas (CDs) han abierto nuevas perspectivas en varios procesos orientados a la entrega y liberación de fármacos. Las ciclodextrinas, también son conocidas como maltodextrinas o cicloglucanos, presentan gran importancia para la industria por su versatilidad, además de sus costos razonables de producción. La utilidad de las ciclodextrinas se debe entre otros a la capacidad de formar complejos de inclusión, y de modificar las características fisicoquímicas del huésped que se incluye, de ser soluble en agua y presentar baja toxicidad. Por ello la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica las utilizan frecuentemente.<sup>19</sup>

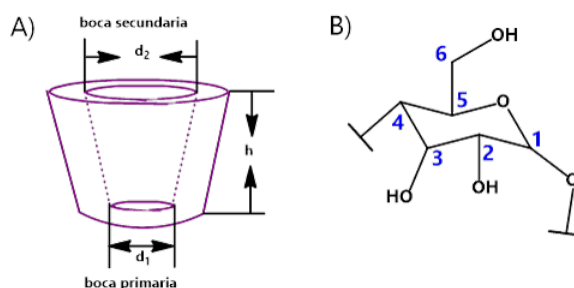
Las CDs se clasifican como nativas y derivadas. Las primeras se obtienen a través de la degradación enzimática del almidón. Las ciclodextrinas nativas más comunes son  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  que consisten en 6, 7 y 8 unidades de D-glucopiranosas<sup>44</sup> unidas por enlaces  $\alpha$ -(1-4) que forman una estructura de cono truncado.<sup>44</sup> Su estructura presenta una cavidad hidrófoba bastante rígida y bien definida, esto les permite formar complejos de inclusión por interacciones no covalentes con diversos compuestos orgánicos (incluidos los fármacos) e inorgánicos. En los bordes tienen grupos hidroxilos (OH) primarios y secundarios que le otorgan un revestimiento externo de naturaleza hidrofílica.<sup>45,46</sup> En la tabla 1-2 se muestran algunas propiedades y dimensiones de las CDs y en la Figuras 1-10 y 1-11 la estructura química de las CDs nativas.

En la disposición estructural de la glucosa (forma de silla), los grupos hidroxilos secundarios ubicados en el C-2 y el C-3 están localizados en la cavidad de mayor diámetro, mientras

los hidroxilos primarios (del C-6) quedan dispuestos en la boca de menor diámetro. Los hidroxilos primarios pueden rotar y bloquear parcialmente la cavidad en tanto que los hidroxilos secundarios son relativamente rígidos.<sup>47-49</sup> Los hidroxilos secundarios tienen rigidez porque forman un cinturón de enlaces puente hidrógeno intramoleculares entre grupos hidroxilo en las posiciones C-2 y C-3 en unidades de glucosa adyacentes.<sup>50</sup> Por medio de técnicas como la cristalografía de rayos X se pudo conocer en detalle la estructura tridimensional de las ciclodextrinas así como también la estructura de los complejos de inclusión que en ellas se forman.<sup>51</sup> La magnitud de la interacción entre la ciclodextrina y el huésped que se incluye se caracteriza mediante la constante de asociación ( $K_a$ ) la cual está representada en las ecuaciones 1-1 y 1-2



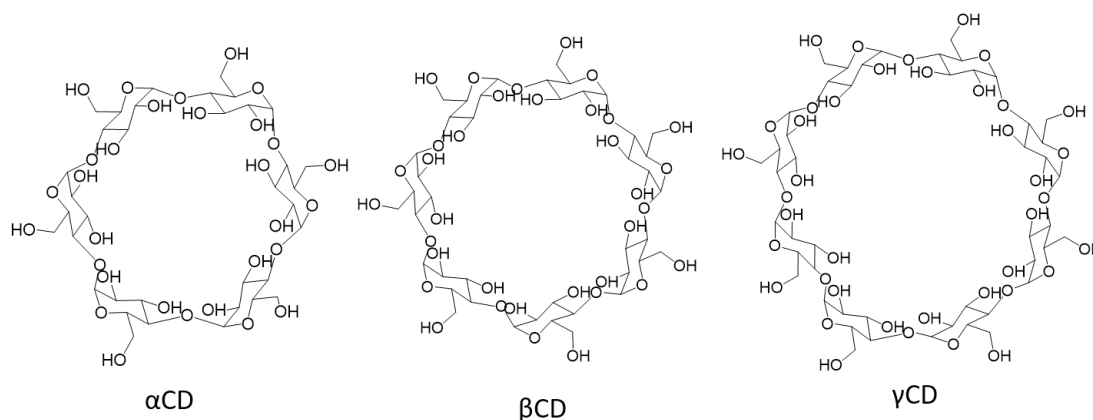
$$K_a = \frac{[CD - Huésped]}{[CD][Huésped]} \quad (1-2)$$



**Figura 1-10.:** A) Representación esquemática de una ciclodextrina en forma de cono truncado B) Glucopiranososa con la numeración de los átomos de carbono.

La mayoría de los estudios de formación de complejos de inclusión con CDs se han realizados en soluciones acuosas, pero también puede ocurrir en estado sólido.<sup>51</sup> Este fenómeno dinámico, implica un equilibrio entre las especies libres y complejadas.<sup>52</sup> La formación de complejos con CDs está dada por la suma de múltiples interacciones débiles. El complejo se origina a partir de la introducción de la parte menos polar del huésped dentro de la cavidad,





**Figura 1-11.:** Estructura química de ciclodextrinas nativas.

**Tabla 1-2.:** Propiedades estructurales y fisicoquímicas de CDs nativas.

Tipo de CD	Diámetro de la cavidad, Å	Peso Molecular	Solubilidad <sup>1</sup>
$\alpha$ CD	4,7 <sup>d1</sup> - 5,3 <sup>d2</sup>	972	14,5
$\beta$ CD	6,0 <sup>d1</sup> - 6,5 <sup>d2</sup>	1135	1,85
$\gamma$ CD	7,5 <sup>d1</sup> - 8,3 <sup>d2</sup>	1297	23,2
$\delta$ CD	10,3 <sup>d1</sup> - 11,2 <sup>d2</sup>	1459	8,19

<sup>d1</sup>Cavidad inferior.

<sup>d2</sup>Cavidad superior.

<sup>1</sup>g/100 mL en agua.

lo que conlleva a la deshidratación del huésped y receptor.<sup>53</sup> Los enlaces puente hidrógeno en los complejos de inclusión contribuyen a la estabilidad, la liberación de moléculas de agua incluidas en la cavidad y liberación de tensión de la molécula de ciclodextrina luego de la formación del complejo. Además de las interacciones débiles entre el huésped y el receptor se conoce que la cavidad del receptor se acomoda para generar interacciones más fuertes con la molécula huésped. Esto ocurre porque existe la libertad del receptor para acomodar su cavidad a la forma del huésped, sin dejar de lado la compatibilidad geométrica.<sup>53</sup>

Las ciclodextrinas pueden ser modificadas con diferentes grupos funcionales, otorgándoles propiedades adicionales frente a las ciclodextrinas nativas. La modificación química de las

ciclodextrinas nativas pueden aumentar por ejemplo la solubilidad de estas moléculas en diferentes solventes, o bien permitir que se generen estructuras robustas útiles para la entrega y liberación de fármacos.<sup>54</sup> Un tipo de ciclodextrinas modificadas son las metiladas o acetiladas; las propiedades de estas ciclodextrinas modificadas son significativamente diferentes a sus análogas nativas. Los derivados metilados presentan una mayor solubilidad en agua, (dependiendo del grado de metilación), mientras que conservan la capacidad de proteger a las moléculas huésped de varios procesos no deseados.<sup>55</sup> Además, en muchos casos pueden formar complejos más fuertes que las CDs nativas.

Las CDs nativas, en particular la  $\beta$ CD, tienen una solubilidad acuosa limitada, lo que significa que los complejos resultantes de la interacción con moléculas apolares con  $\beta$ CD también pueden ser insolubles en sistemas acuosos. Si se compara con una ciclodextrina modificada se observa una diferencia en la solubilidad. Esto se debe a que la  $\beta$ ciclodextrina forma puentes de hidrógeno intra e intermolecular (OH-2, OH-3 y OH-6) relativamente fuertes en la red cristalina, la sustitución de cualquiera de los grupos hidroxilos formadores de puentes de hidrógeno, da como resultado una mejora importante en la solubilidad acuosa.<sup>56</sup>

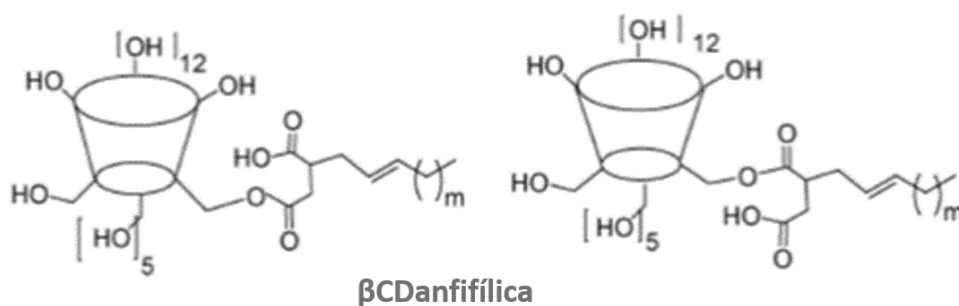
Las ciclodextrinas nativas, sus derivados hidrófilos y las  $\beta$ -ciclodextrinas metiladas muestran una capacidad limitada para permear las membranas biológicas lipofílicas tales como la córnea.<sup>48</sup> Los estudios de toxicidad han demostrado que las ciclodextrinas administradas por vía oral no son tóxicas, debido a la falta de absorción en el tracto gastrointestinal e incluso algunas son seguras cuando se administran por vía parenteral. Sin embargo, los estudios toxicológicos demostraron que la  $\beta$ CD y las ciclodextrinas metiladas no son adecuadas para la administración parenteral en altas concentraciones.<sup>48,57</sup> Entre las ciclodextrinas, la  $\beta$ CD es la más utilizada para la formación de complejos de inclusión con numerosos compuestos, dentro de ellos fármacos. La inclusión y carga eficaz de fármacos además del costo relativamente bajo han hecho que se use extensamente en la industria farmacéutica.

Las  $\beta$ CD modificadas comerciales son las más económicas y menos tóxicas<sup>58</sup>, demostrando capacidad de solubilización y formar complejos estables.<sup>27 59</sup>

Dentro de las CDs modificadas, las CDs anfífilas son importantes para el transporte de fármacos debido a que pueden generar interacciones con las membranas biológicas y además

presentan la capacidad de auto-ensamblaje en soluciones acuosas.

En nuestro grupo se sintetizaron diversas ciclodextrinas anfifílicas monosustituidas con un grupo acilo<sup>56,60-62</sup> que se tomaron como base para el desarrollo de esta tesis. En la Figura 1-12 se muestra la estructura general de estos anfifilos y en el apéndice A se describe su síntesis, purificación y caracterización. Estas CD anfifílicas presentan la propiedad de formar agregados auto-ensamblados con alto potencial para su empleo como SDDS debido a que presentan dos sitios de reconocimiento, el corazón hidrofóbico del agregado y la cavidad de la ciclodextrina.



**Figura 1-12.:** Esquema de los dos isómeros obtenidos la ciclodextrina anfifílica utilizada en este trabajo denominada  $\beta$ CD-C16

## 1.9. Fármaco hidrofóbico que busca transportador: la Anfotericina B

La Anfotericina B (AmB)( $C_{47}H_{73}NO_{17}$ ) es un antibiótico poliénico que fue descubierto en 1955, aislado de *Strptomyces nodosus* en Venezuela. Este fármaco mostrado en la Figura 1-13, sumamente hidrofóbico, se utiliza para el tratamiento de infecciones fúngicas y parasitarias y, a pesar de que presenta serios problemas de toxicidad, sigue siendo un fármaco de elección debido a que no se ha desarrollado resistencia microbiana.<sup>63-69</sup>

La AmB es un antifúngico de amplio espectro que se utiliza en el tratamiento de infecciones sistémicas provocadas por *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus*, principalmente. Estas micosis son frecuentes en pacientes con inmunodeficiencias, en aquellos que han recibido trasplantes o bien, que reciben quimioterapias para el tratamiento de cáncer.<sup>63-68</sup>

La AmB también es un fármaco de elección para el tratamiento de leishmaniasis, una enfermedad parasitaria.<sup>63-65,68-70</sup> La leishmaniasis es una enfermedad producida por protozoarios del género *Leishmania* y transmitida en la naturaleza por dípteros hematófagos (mosquitos).<sup>64,65</sup> Dicha enfermedad está caracterizada por presentarse clínicamente con lesiones mucocutáneas o viscerales con evolución a la cronicidad en la mayoría de los casos.<sup>69</sup> Esta es una de las enfermedades más desatendidas en todo el mundo, y afecta predominantemente a los más pobres, sobre todo en los países en desarrollo; se considera que hay 350 millones de personas en riesgo de contraerla, y cada año se producen 2 millones de casos nuevos. Está presente en 98 países entre el nuevo y el viejo mundo y su prevalencia mundial se calcula en 14 millones de afectados.<sup>71</sup> En Argentina los primeros casos de leishmaniasis cutánea se registraron en la década de 1910. Desde 1985 la enfermedad re-emergió generando focos epidémicos con más de 900 casos, fenómeno que abarcó toda el área endémica: Salta, Jujuy, Tucumán, Catamarca, Santiago del Estero, Chaco, Formosa, Misiones, Corrientes.<sup>72</sup> Esta situación de alto riesgo implica la necesidad de profundizar el conocimiento para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas y herramientas para evitar la progresión de esta enfermedad.<sup>71,72</sup>

El uso clínico de AmB para el tratamiento de estas afecciones se encuentra sin embargo limitado por los severos efectos adversos que produce, principalmente asociados a nefrotoxicidad que conllevan a una falla renal severa. Debido a esto, y a la falta de otras alternativas terapéuticas, desde la década del 90 se han desarrollado diferentes formulaciones que buscan reducir la toxicidad y mejorar la biodisponibilidad de este fármaco.<sup>67,68,73-81</sup> También se ha intentado obtener derivados biológicamente activos de AmB sin demasiado éxito debido a la complejidad de esta molécula.<sup>82,83</sup>

### 1.9.1. Características y propiedades físicas y químicas de AmB

AmB es un producto natural de color amarillo/anaranjado cuyo peso molecular es 924,08 g/mol. Es un macrólido poliénico que exhibe dos propiedades fisicoquímicas que condicionan su comportamiento: es un anfifilo y un anfótero. La estructura química de AmB se muestra en la Figura 1-13.

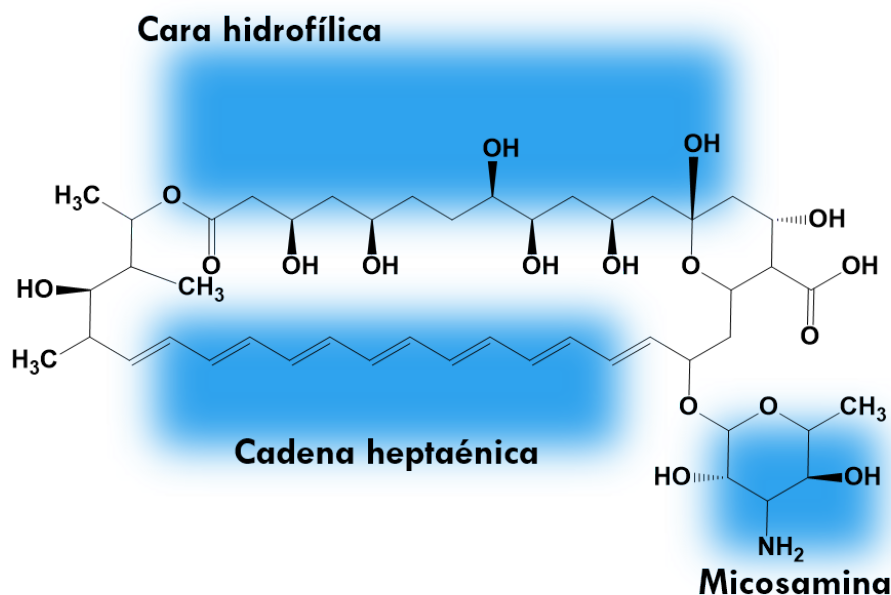


Figura 1-13.: Estructura química de AmB.

AmB presenta comportamiento anfifílico debido a que posee una región o cara polar con presencia de grupos hidroxilos y una región o cara apolar dada por una cadena heptaénica. AmB es un anfótero, en su estructura hay un grupo ácido carboxílico y un amino cuyos  $pK_a$  son 5,7 y 10, respectivamente;<sup>84</sup> a pH fisiológico tanto el grupo ácido como el amino se encuentran ionizados. AmB también posee una lactona interna y un amino-azúcar, la micosamina. Como consecuencia de su naturaleza anfifílica y zwitteriónica AmB es muy poco soluble en agua y en muchos solventes orgánicos. Su solubilidad en agua a pH fisiológico (pH= 6-7) es menor a 1 mg/L; su solubilidad a pH < 2 o pH > 11 es bastante más alta y en estas condiciones forma sales, estas sales desafortunadamente presentan actividad antimicrobiana reducida y además en estas condiciones de pH extremo AmB no es estable.<sup>68</sup> En la tabla

**Tabla 1-3.:** Solubilidad de AmB. \*

Solvente	Solubilidad mg/mL
Agua	<1 a pH 6-7
Metanol	2000
Etanol	500
Cloroformo	100
DMSO	32
Ciclohexano	20
Éter de petróleo	10
Dimetil formamida	2
Propilenglicol	1

\* Tabla adaptada de referencia<sup>68</sup>

**1-3** se muestra la solubilidad de AmB en diferentes solventes.<sup>68,73</sup>

Debido a la naturaleza anfipática de AmB, cuando se encuentra en solución, esta molécula se auto-asocia y posteriormente se agrega al superar ciertos límites de concentración;<sup>68,78,85-88</sup> la totalidad de los autores coinciden en este aspecto, pero los valores informados a los cuales ocurren la auto-asociación y posterior agregación son muy diferentes aunque están aproximadamente en el mismo orden de concentración. La presencia del heptaeno en AmB, que es un cromóforo, le otorga características espectrales únicas que han permitido estudiar y conocer su estado de agregación; nuevamente a lo largo de la bibliografía surgen algunas discrepancias respecto a la interpretación de este fenómeno que han llevado a interesantes discusiones entre investigadores abocados al estudio de AmB.<sup>87,89-91</sup>

En agua coexisten diferentes especies de AmB, encontrándose una mezcla de monómeros y agregados solubles junto a agregados menos solubles o insolubles.<sup>68,85,92,93</sup> También, a lo largo de la literatura se encuentra diferente nomenclatura para designar las formas agregadas de AmB tornándose difícil la correlación de datos provenientes de diferentes fuentes.

En agua las formas auto-asociadas (dímeros, tetrameros) de AmB comienzan a observarse alrededor de una concentración de 0,22-1  $\mu\text{M}$  (0,20-0,92  $\mu\text{g/mL}$ ) de AmB, valores que se

**Tabla 1-4.:** Características y sinónimos utilizados para designar los diferentes estados de agregación de AmB en soluciones acuosas.\*

<b>Estado de Agregación de AmB</b>	<b>Aspecto de la solución</b>	<b>Sinónimos</b>
<b>Monómero</b>	Amarillo, translúcido	
<b>Oligómero</b>	Amarillo, translúcido	Dímeros, Tetrámeros auto-agregados pequeños y solubles
<b>Agregación de oligómeros</b>	Amarillo, opaco	Poli-agregados, super-agregados o auto-agregados insolubles
		Super-agregados formados por calentamiento o bien presentes en nanoestructuras <sup>75,78</sup>

\* Tabla adaptada de referencia.<sup>68,78</sup>

encuentran por debajo de la concentración micelar crítica (CMC).<sup>68,78</sup> Por su parte, se han informado valores de CMC para AmB que varían entre 0,60-3,25  $\mu\text{M}$  (0,55-3  $\mu\text{g/mL}$ ).<sup>68,94</sup>

La forma monomérica de AmB en agua ocurre cuando esta se encuentra en muy baja concentración, por debajo de 0,1  $\mu\text{M}$ .<sup>95</sup> Al aumentar la concentración se forman agregados diméricos que algunos autores llaman oligómeros, dímeros, o auto-agregados pequeños-solubles de AmB. Si la concentración en agua aumenta, se produce la agregación de los oligómeros originando multi-agregados también llamados poli-agregados, auto-agregados insolubles, o super-agregados de AmB.<sup>96,97</sup> El término super-agregado también se ha utilizado para hacer referencia a formas asociadas de AmB formadas por efecto del calentamiento o bien presentes en ciertas nanoestructuras.<sup>75,78</sup> Cada una de estas especies presenta espectros de absorción UV-Vis, de fluorescencia y dicroísmo circular característicos.<sup>68</sup> En la tabla 1-4 se resume el nombre de los agregados formados por AmB en agua cuyas propiedades espectroscópicas se detallan en el capítulo 3.

El estado de agregación de AmB condiciona su actividad y toxicidad así como también la capacidad o modo en que AmB interacciona con membranas celulares, su sitio de acción, tanto en hongos, parásitos y mamíferos. En la bibliografía de los últimos años parece consensuarse la idea de que la forma monomérica de AmB es la menos tóxica, pero la más difícil de lograr en una formulación farmacéutica.<sup>68,78,98</sup> Por otra parte, se ha visto que las formulaciones que presentan formas poli-agregadas o super-agregadas tienen un mejoramiento del índice terapéutico con disminución de la toxicidad hacia mamíferos manteniendo la actividad antifúngica.<sup>68,75</sup> Estas formas super-agregadas son las que se obtienen mediante formulaciones que han sido sometidas a calentamiento o bien son DDS basados en nanoestructuras. Estudios espectroscópicos sugieren una estructura altamente organizada en los super-agregados de AmB en donde la región poliénica está secuestrada o presente en un entorno no polar.<sup>75</sup> Por lo antes expuesto, es evidente que son dos las estrategias que permiten reducir la toxicidad de AmB en formulaciones farmacéuticas: la separación molecular completa para contar con monómeros o la formación de especies auto-asociadas con características similares a las presentes en los super-agregados.

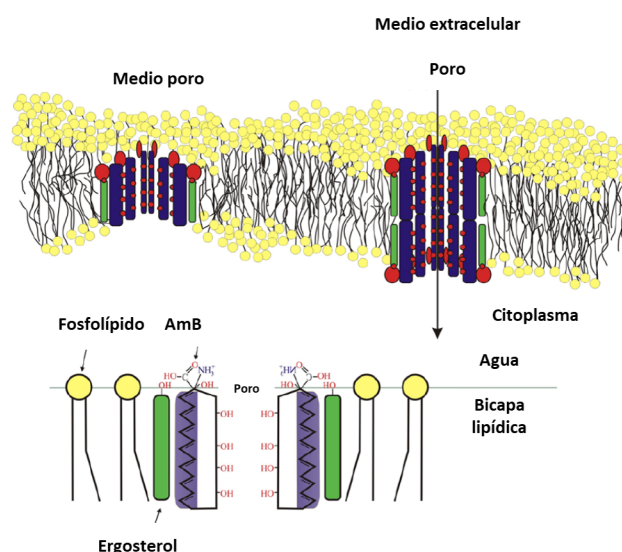
### 1.9.2. Mecanismo de acción de AmB

Desde su descubrimiento diversos mecanismos de acción han sido propuestos para AmB, cabe mencionar que aún no hay un consenso al respecto, pero tres mecanismos son los más aceptados.<sup>68</sup> En todos ellos la membrana celular es el sitio de acción de AmB. Los esteroides están involucrados de alguna manera, se propone que AmB tiene mayor afinidad o mejor complementariedad espacial con ergosterol que con colesterol;<sup>99</sup> esta diferencia es generalmente la que se ha utilizado para explicar la mayor selectividad de AmB hacia hongos respecto a las células de mamíferos.<sup>99,100</sup>

El mecanismo de acción más antiguo y estudiado propone un modelo de canal iónico. Este modelo fue propuesto por Finkelstein en 1973.<sup>68,101</sup> El modelo propone que AmB forma poros en la membrana celular los cuales son responsables de la pérdida de  $K^+$  y otras moléculas pequeñas esenciales para la función celular.<sup>99</sup> Actualmente se propone que la formación de poros depende de la concentración de AmB y que la presencia de esteroides no es necesaria



para que estos poros ocurran.<sup>100,102</sup> Sin embargo en presencia de colesterol la formación de los poros lleva más tiempo que cuando las membranas tienen ergosterol y además en presencia de colesterol los iones que traspasan el poro los bloquean en mayor medida.<sup>68</sup> En la Figura 1-14 se esquematiza este mecanismo de acción.

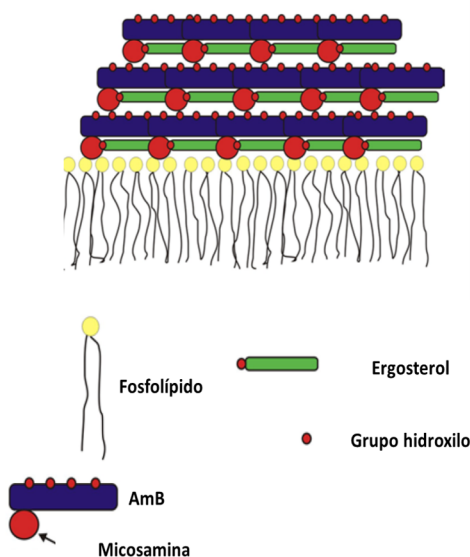


**Figura 1-14.:** Mecanismo de acción de AmB a través de la formación de poros en la membrana. Figura adaptada de la referencia <sup>88</sup>.

El segundo mecanismo de acción propuesto para AmB se basa en el daño oxidativo producido a nivel celular, esto sería lo que causa por ejemplo la lisis de los hongos y la lisis de glóbulos rojos observada en mamíferos. En este mecanismo se propone la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) que oxidan las membranas lipídicas produciendo cambios en la permeabilidad celular además de afectar muchas otras funciones celulares.<sup>68</sup>

El tercer modelo que describe el mecanismo de acción de AmB se basa en la adsorción de esta molécula a la superficie celular. Se ha propuesto que AmB se adsorbe de manera paralela al plano de la membrana lipídica desestabilizándola y secuestrando esteroides hacia la superficie de la bicapa. Este modelo se denomina *sterol sponge model* en donde AmB forma grandes agregados en la proximidad de las células fúngicas, de donde extraería ergosterol; este proceso requiere de una muy fuerte interacción entre ergosterol y AmB. Este mecanismo

ha sido propuesto más recientemente y se apoya en la observación de grandes agregados de AmB que rodean células fúngicas.<sup>68,102-104</sup> En la Figura 1-15 se esquematiza este mecanismo de acción.



**Figura 1-15.:** Mecanismo de acción de AmB conocido como esponja de adsorción de esteroides (*sterol sponge model* Figura adaptada de la referencia<sup>88</sup>).

## 1.10. Modelos de biomembranas

La composición química de las membranas biológicas esta dada por diversas moléculas tales como lípidos, proteínas y glúcidos. En ellos los lípidos se encuentran dispuestos en forma de bicapa, mientras que las proteínas se disponen en forma irregular y asimétrica entre la doble capa de los lípidos. Los componentes de la membrana otorgan un cierto grado de movilidad a la membrana.<sup>105</sup>

El estudio de las membranas biológicas parte de la organización lateral y las funciones específicas de los componentes. Existen diversos sistemas artificiales que pueden simular membranas biológicas, los cuales dan la posibilidad de controlar la composición y organización de sus componentes, lo que permite utilizarlas como membranas modelo. Los modelos de biomenbranas más conocidos son las monocapas, las vesículas (liposomas) y las bica-

pas soportadas. Los cuales presentan ventajas y desventajas frente en la simulación de las membranas celulares.

El modelo de monocapas de Langmuir presenta grandes ventajas sobre los otros modelos de biomembranas, debido a que la composición de la monocapa y las áreas moleculares de los componentes se pueden controlar con gran precisión, lo que permite el estudio sistemático del comportamiento e interacciones intermoleculares o el efecto de un componente particular en las membranas.<sup>106</sup>

Las vesículas lipídicas o liposomas son modelos de membrana utilizados para el estudio de fusión, reconocimiento molecular, adhesión celular e intercambio a través de la membrana, entre otros. Son estructuras con un compartimento acuoso interno confinado por una bicapa lipídica. Las vesículas lipídicas se pueden clasificar en función del tamaño y del número de lamelas. Una desventaja de las vesículas lipídicas es que no reflejan la asimetría de las membranas biológicas.<sup>107,108</sup>

Por último, las bicapas lipídicas soportadas (*SLB*, por sus siglas en inglés) son modelos de membrana constituidas por una bicapa lipídica plana, soportada sobre una superficie sólida tal como mica, vidrio u óxido de silicio. En este modelo, los grupos de la cabeza polar de la primera monocapa lipídica están orientados hacia el soporte, mientras que las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos están en contacto con las cadenas lipídicas de la segunda monocapa. Los SLB presentan ventajas sobre las vesículas lipídicas debido a que estas se pueden preparar con mayor facilidad y son mucho más estables que las vesículas lipídicas. Además, tanto la composición general como la asimetría lipídica de los SLB pueden ser controladas.<sup>109</sup> La desventaja es debido a la interacción con el soporte se pierde la componente dinámica del sistema.

En el desarrollo de este trabajo el modelo de membrana utilizado fue el de monocapas de Langmuir el cual se describe a continuación:

## 1.11. Monocapas de Langmuir

Una monocapa de Langmuir es una película monomolecular formada por moléculas anfífilas en la interfase aire-agua. Para la formación de una monocapa se deposita en la

interfase aire-agua una solución de moléculas anfífilas disueltas en un solvente volátil. Una vez evaporado el solvente, las moléculas anfífilas ocupan toda la superficie disponible y forman la monocapa. La parte hidrofóbica, que suele ser la cadena hidrocarbonada, se orienta hacia el aire, mientras que la parte hidrofílica, que suele ser un grupo polar con o sin cargas, se orienta hacia el agua.

Los solventes que se utilizan en la preparación de soluciones de las moléculas anfífilas deben presentar buenas propiedades para esparcirse y tener temperatura de ebullición baja, para que se pueda evaporar rápidamente de la interfase quedando sólo en la interfase los anfífilos.<sup>110</sup>

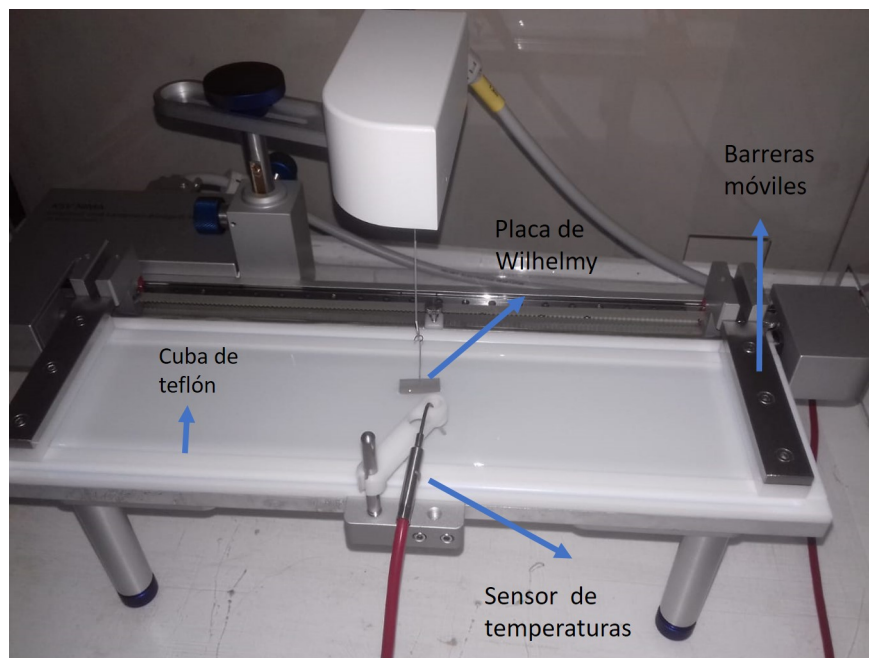
### **Balanza de Langmuir**

Para estudiar las monocapas en una interfase aire-agua se emplea una balanza de Langmuir. Este instrumento consiste de una cuba de Teflón donde se aloja el líquido que constituye la subfase acuosa. Sobre la interfase aire-agua que se encuentra en la cuba se deposita una solución que contiene los anfífilos para la formación de la película; adicionalmente se le anejan a la cuba barreras móviles que permiten disminuir el área de trabajo (donde se esparce la película) y se puede comprimir la monocapa a diferentes velocidades de manera controlada. Además la balanza presenta una placa de Wilhelmy para sensar los cambios de presión superficial ( $\pi$ ) durante la compresión. (Figura 1-16)

### **Medición de la presión de superficie**

En el seno de un solvente las moléculas son atraídas entre sí por una fuerza igualmente atractiva en todas las direcciones (cohesión), pero esto no ocurre si la molécula se encuentra en la región de la interfase aire-agua. Las moléculas en la interfase presentan más energía que las que se encuentran en la subfase.<sup>111</sup> Este efecto también llamado tensión superficial es dependiente de las propiedades del solvente.

Los anfífilos depositados en la interfase establecen interacciones con el solvente (generalmente agua) y hay un reordenamiento tanto del solvente como los anfífilos en la superficie. Las moléculas esparcidas en la interfase se distribuyen formando una monocapa generando la



**Figura 1-16.:** Balanza de Langmuir.

disminución de la tensión superficial, ( $\gamma$ ) comparada con la tensión superficial del agua pura ( $\gamma_0$ ).<sup>112</sup> Este cambio se expresa en función de la presión superficial ( $\pi$ ), como se describe en la ecuación 1-3

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (1-3)$$

Una forma de medir la presión de superficie y la utilizada en la balanza de Langmuir es mediante el uso de la placa de Wilhelmy que se acopla a una balanza de torsión.

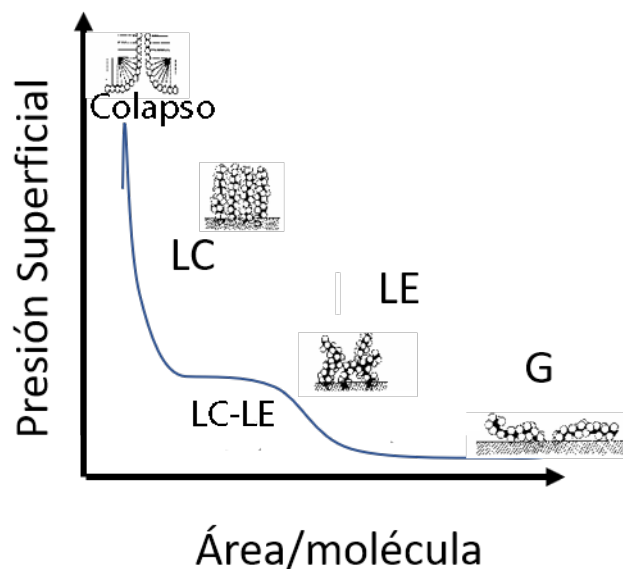
### 1.11.1. Registro de isotermas de Langmuir

Luego de sembrar las moléculas anfífilas y esperar que se evapore el solvente orgánico en el que estaban disueltas, se inicia la compresión de las moléculas, reduciendo el área disponible. Esta reducción lleva a una reorganización de las moléculas en interfase que produce la variación de  $\pi$ . El cambio de  $\pi$  y el área se registran y la correlación de  $\pi$  vs el área permite obtener la isoterma de compresión  $\pi$ -A, siendo el área molecular promedio (AMM), estas

representaciones nos dan información sobre la estabilidad y la organización de las moléculas en la monocapa, además de las interacciones que se producen entre ellas.<sup>113</sup>

Un ejemplo de isoterma de compresión se muestra en la Figura 1-17, donde se representa la organización de una sustancia anfifílica. Se debe destacar que no todas las moléculas anfifílicas presentan este mismo perfil. Las fases que aparecen en una isoterma son características de cada sistema estudiado y de las condiciones experimentales en que se realizó el experimento como la temperatura, pH y concentración de sales en la subfase.

En la Figura 1-17 se observa una isoterma que presenta una la fase gaseosa(G), una fase expandida (LE), una región con coexistencia de fases (LE-LC), una fase condensada (LC) y el colapso de la monocapa. En las isotermas de Langmuir los anfifílos pueden adoptar diferentes estados de fases cuyas características mas relevantes se destacan a continuación



**Figura 1-17.:** Representación gráfica de la reorganización de las moléculas durante la compresión en una monocapa de Langmuir.

**Fase gaseosa(G):** Las moléculas anfifílicas en esta fase se encuentran con un área disponible por molécula en exceso (no existe interacción entre las moléculas), constituyendo una fase denominada gas bidimensional.<sup>114</sup>

**Líquido expandido, (LE):** en la compresión de la monocapa se llega a una fase fluida

muy compresible, en la que las moléculas experimentan fuerzas atractivas lo suficientemente intensas como para que empiecen a adoptar una estructura mas compacta, formándose lo que se llama líquido expandido (LE). Entre las dos fases descritas, G y LE, ocurre un proceso parecido a la condensación de un gas, es decir, una zona de coexistencia de ambos estados, en la que tiene lugar una transición de fase.<sup>115</sup>

En este ejemplo luego de la formación de la fase LE se manifiesta la aparición de un plateau en la isoterma. Este plateau determina una región en la que se produce la transición de fase LE a LC, mostrando a lo largo del plateau una coexistencia de fases. El trabajo realizado durante la compresión origina un mayor empaquetamiento y condensación de los anfifilos, sin que ello genere un incremento de la presión lateral.

**Líquido condensado, (LC):** La presión aumenta formando una monocapa con un estado menos compresible y más ordenado y la organización es compacta: La parte hidrófoba de las moléculas se orienta casi perpendicularmente a la interfase.

**Fase sólida, (S):** Esta fase no se encuentra en el ejemplo pero suelen aparecer en algunas isotermas de compresión.

**Fase colapsada, (C):** Cuando el área por molécula alcanzo un área critica igual al área seccional que ocupa cada molécula, si se continua con la compresión de la monocapa se genera la ruptura y la liberación de material fuera del plano de la monocapa (material de volumen) y esto se denomina punto de colapso de la monocapa.<sup>115</sup>

## 1.12. Monocapas de Gibbs

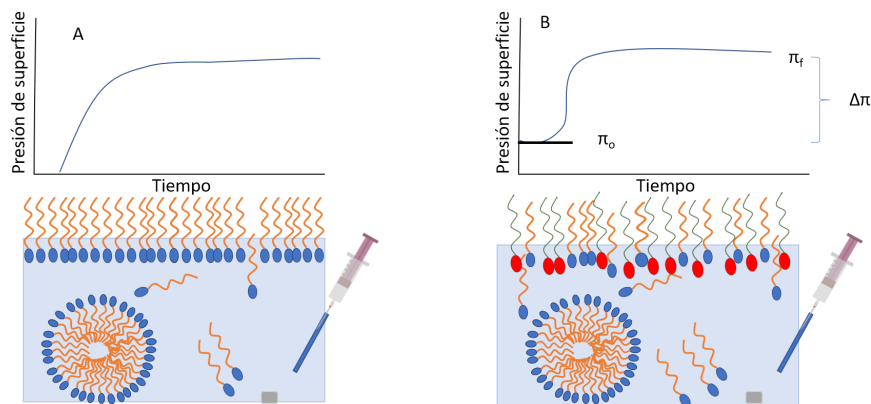
La adsorción espontánea de una molécula anfífilica desde la subfase a la interfase aire-agua lleva a la formación de una monocapa de Gibbs. Para estudiar monocapas de Gibbs es conveniente trabajar con concentraciones de moléculas anfífilicas (disueltas en la subfase) que se encuentran por encima de su valor de C.A.C asegurando de esta manera la saturación de la interfase con anfifilos, los cuales quedan en equilibrio con los agregados y monómeros presentes en en la subfase.

La adsorción de los anfífilos a la interfase aire-agua produce cambios en la presión de superficie ( $\pi$ ). Durante la formación de la monocapas de Gibbs puede registrarse la variación

de ( $\pi$ ), a área constante, en función del tiempo. El gráfico donde se correlaciona la  $\pi$  vs el tiempo representa la isoterma de Gibbs la cual se muestra en la Figura 1-18A

Si en la interfase aire-agua se encuentra una monocapa pre-formada por ejemplo de un fosfolípido y en una subfase se incorpora un anfífilo puede estudiarse la capacidad o propiedad de ese anfífilo para penetrar a una monocapa que se encuentra presente en la interfase. Para ello se registra cómo varía la  $\pi$ . en función del tiempo a un área constante.

Dependiendo de la presión de superficie a la que se encuentre la monocapa presente en la interfase, ésta ofrecerá menor o mayor resistencia para la incorporación del anfífilo. Una monocapa que se encuentre a baja presión de superficie (es decir con menor grado de empaquetamiento o densidad superficial) ofrecerá menor resistencia a la incorporación del anfífilo respecto a una que se encuentre con mayor grado de empaquetamiento lateral. Si se llama ( $\pi_0$ ) a la presión de superficie a la cual se pre-formó la monocapas en la interfase aire-agua y ( $\pi_f$ ) a la presión de superficie alcanzada luego de que se incorporó el anfífilo, se puede obtener un  $\Delta\pi$  que nos muestra la variación de presión producida por la incorporación del mismo. Figura 1-18B



**Figura 1-18.:** Isotherma de adsorción de moléculas anfífilicas.



### 1.13. Caracterización de Películas de Langmuir

La medida de  $\pi$  vs. AMM (área molecular media) de una monocapa de Langmuir, no es la única medida que puede realizarse, existen una gran variedad de técnicas que permiten caracterizar las monocapas en la interfase aire-agua. Estas técnicas se describen a continuación en la tabla 1-5.

Tabla 1-5.: Caracterización de Películas de Langmuir.

Películas de Langmuir y Langmuir-Blodgett		
Técnicas	Parámetro medido	Información
Presión superficial	$\pi$ vs AMM	Área por molécula presión de colapso, compresibilidad
Potencial superficial	$\Delta V$ vs AMM	Dipolos superficiales, orientación de los grupos
Reflexión UV-vis	$\Delta R$	Densidad, orientación y agregación de moléculas que portan un cromóforo
Viscosidad superficial Elipsometría	$\eta_s$	Cambios de viscosidad
Elipsometría	Polarización de la radiación reflejada	Índice de refracción y espesor de la monocapa
Difracción de rayos X / neutrones	Reflectividad	Espaciado y estructura de capas empaquetadas
Generación de segundos armónicos	Polarización de la susceptibilidad del segundo armónico	Valor medio del ángulo entre el eje de la molécula y la normal a la interfase
PM-IRRAS	Radiación IR	Orientación de las cadenas alifáticas y otros grupos funcionales interacción entre moléculas
Microscopía de fluorescencia	Fluorescencia de una molécula sonda	Estructura de la monocapa y topografía
Microscopía de ángulo Brewster (BAM)	Reflectividad	Morfología de la monocapa y orientación de las moléculas

## 1.14. Microscopía de ángulo de Brewster

La microscopía de ángulo de Brewster (o BAM, por sus siglas en inglés) es una técnica óptica que permite la observación de películas formadas sobre la superficie de un líquido o de un sólido, aún siendo de dimensiones nanométricas. Su uso es frecuente en el estudio de las películas de Langmuir, formadas por la extensión de las moléculas de una sustancia anfífilica sobre agua.

Las moléculas de una sustancia anfífilica insoluble en agua se extienden y disponen en la superficie del líquido, generalmente agua, formando una capa molecular o monocapa. Puesto que el grosor de la película tiene como máximo, el espesor de la longitud de la molécula, se obtiene una película de grosor nanométrico.

Cuando un haz de luz polarizada-p, es decir polarizada paralelamente al plano de incidencia, incide sobre un substrato dieléctrico en una interfase de Fresnel, hay un ángulo de incidencia específico donde no se produce reflexión alguna. Toda la luz se refracta en el substrato. Un detector que observa la luz reflejada producirá una señal de salida de mínima intensidad (idealmente cero) para este ángulo, encontrado por David Brewster en 1815. El ángulo de Brewster está relacionado con los índices de refracción de los dos medios ópticos mediante la relación:

$$\tan\alpha = \frac{n_{\text{substrato}}}{n_{\text{aire}}} \quad (1-4)$$

En la interfase aire-agua siempre se presenta reflexión de la luz incidente. Si sobre la interfase se encuentra una película delgada (tercer medio) con un índice de refracción distinto a la interfase, entonces no se cumple la condición del ángulo de Brewster, ni en la interfase aire/película ni en la interfase película/agua, lo que genera el aumento de la reflexión de la luz en función a su espesor. Sin embargo, algunas reflexiones ocurren en ambas interfaces, y también puede haber reflexiones múltiples en la película. Todas estas reflexiones se superponen coherentemente y producen una señal que puede ser detectada con un sensor (por ejemplo, con una cámara CCD).<sup>116</sup>

La intensidad reflejada depende del espesor de la película y de sus parámetros ópticos.

En el caso de una típica monocapa orgánica (espesor  $\sim 2$  nm) ésta es del orden de una millonésima parte de la intensidad incidente. Esto no es mucho pero es aún suficiente para producir, mediante un objetivo de microscopio, imágenes bien contrastadas y con una buena resolución espacial.<sup>117</sup>

En los sistemas de monocapas en una interfase aire-agua, el haz de luz incide con el ángulo de Brewster del agua y el contraste se adquiere por las diferencias de las propiedades ópticas y espesor entre las distintas regiones de una monocapa. Una propiedad interesante es que, en este ángulo de incidencia, y siempre que el índice de refracción se mantenga constante, la reflectividad de una interfase se hace proporcional al cuadrado de su espesor, Ecuación 1-5

$$R_p \propto l^2 \quad (1-5)$$

donde  $R_p$  es la reflectividad, definida como el cociente entre la intensidad de luz reflejada e incidente, y  $l$  es el espesor. Los cambios de espesor relativos se pueden determinar por medio de la variación de reflectividad. En una interfase ideal o de Fresnel aire-agua, en los cuales cada medio presenta un índice de refracción diferente ( $n_{aire} = 1$  y  $n_{agua} = 1,3$ ), se hace incidir linealmente un haz de luz polarizado, su vibración se desglosa en dos componentes ortogonales, la reflectividad para la luz polarizada en dirección paralela y perpendicular (p y s) al plano de incidencia, estas componentes se describen por las Ecuaciones 1-6 y 1-7

$$R_p^F = \frac{\tan(\theta_i - \theta_r)^2}{\tan(\theta_i + \theta_r)^2} \quad (1-6)$$

$$R_s^F = \frac{\sin(\theta_i - \theta_r)^2}{\sin(\theta_i + \theta_r)^2} \quad (1-7)$$

Donde  $\theta_i$  y  $\theta_r$  representan los ángulos incidente y de refracción, respectivamente.  $R_p^F$  es la reflectividad para el haz incidencia en p y  $R_s^F$  la reflectividad para el haz polarizado en s. La  $R_s^F$  se encuentra en un intervalo de hasta 1 con el ángulo de incidencia.  $R_p^F$  inicialmente decae a 0 y luego se incrementa hasta 1 como se observa en la Figura **1-19**, el ángulo en el cual  $R_p^F$  se anula se denomina ángulo de Brewster.<sup>118</sup>

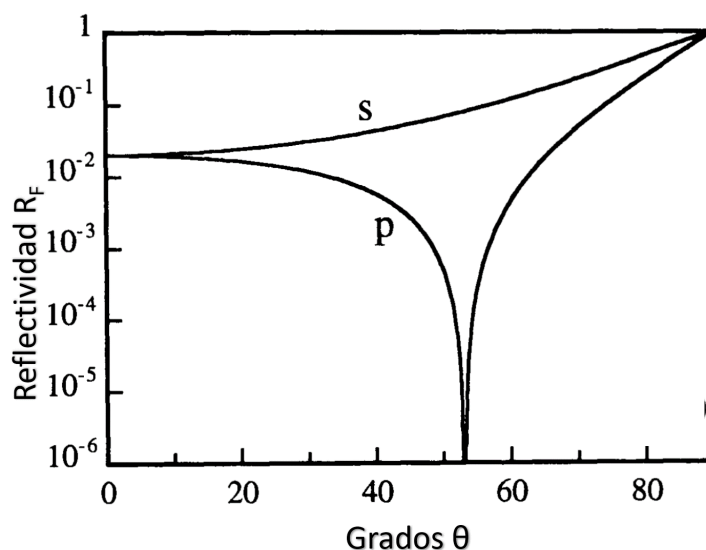


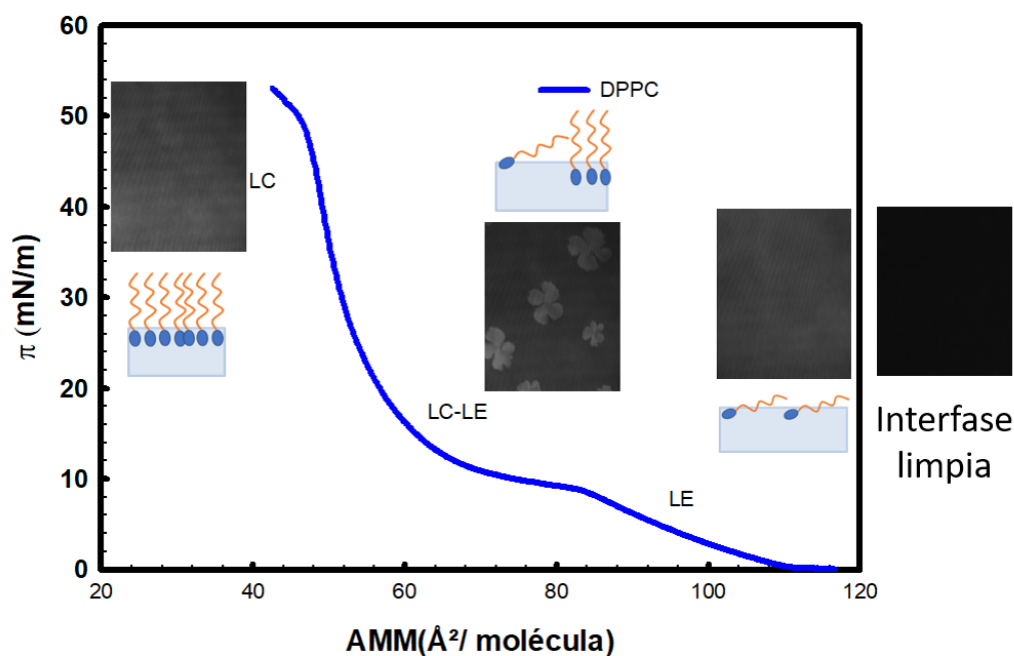
Figura 1-19.: Representación gráfica del ángulo de Brewster.

### 1.14.1. Microscopio de ángulo de Brewster

El sistema BAM comprende un elipsómetro el cual está situado sobre una balanza de Langmuir. El elipsómetro presenta dos sistemas ópticos que forman un ángulo de Brewster con la normal a la superficie y por medio de una cámara (CCD) se captan las imágenes que se producen en la superficie del agua, esta cámara permite captar la luz reflejada especularmente en la muestra.

La observación de las monocapas en una interfase aire-agua, se realiza calibrando el cero de reflexión, este se establece con un láser polarizado ( $\lambda$  532 nm), el cual incide sobre la superficie acuosa limpia (interfase sin monocapas) en el ángulo de Brewster ( $\sim 53,1^\circ$ ). Después de la formación de la monocapa y durante la compresión, aumenta la luz reflejada y se recoge mediante un detector (objetivo 20X). El nivel de gris de cada píxel de las imágenes de BAM está directamente relacionado con el cuadrado del espesor de la película(1-5) y el índice de refracción, en películas que no muestran actividad óptica.<sup>117</sup> Esto indica que a menor altura del film menor será la reflexión y las imágenes serán más oscuras. Por el contrario, cuando las imágenes muestran más brillo es un indicativo del aumento del espesor del film.<sup>60</sup>

En el siguiente ejemplo a modo ilustrativo (Figura 1-20) se muestra las imágenes de BAM obtenidas al comprimir la monocapa del fosfolípido DPPC en una interfase agua-aire. En la isoterma mostrada para DPPC se observa la fase G, la LE, una región (plateau) que muestra coexistencia de fases de LE-LC y final la fase LC.



**Figura 1-20.:** Micrografías obtenidas por BAM en la isoterma de compresión de DPPC.

La interfase limpia observada por BAM muestra escasa reflexión de la luz. Una vez presente la monocapa en la interfase la intensidad de la luz que llega a la cámara se acrecienta (en comparación a la interfase limpia) y va aumentando a medida que la monocapa se comprime y se reduce el área disponible por molécula. Este incremento está relacionado con el aumento de la densidad molecular (empaquetamiento) y con el cambio de orientación de las moléculas respecto a la interfase. Es por ello que la fase LE se observa más clara que la interfase limpia. En la transición LE-LC se observa la formación de dominios condensados con fase LC coexistiendo con la fase LE. En la fase LC las moléculas están más empaquetadas y la

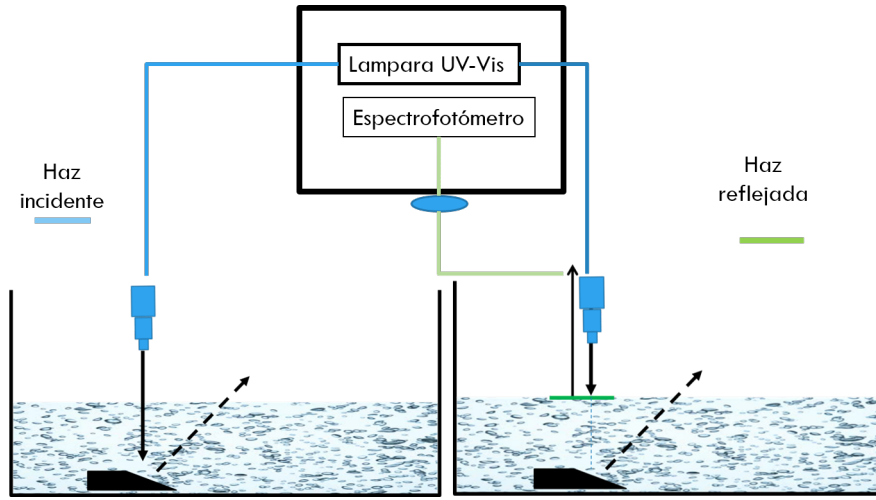
orientación de las cadenas hidrocarbonadas es más vertical (perpendicular a la interfase) que en la fase LE. La intensidad de la luz reflejada por las moléculas en fase LC es mayor y esta fase se corresponde con la región más clara de la imagen. La región más oscura corresponde a moléculas que aún están en fase LE, menos empaquetada y con sus cadenas hidrocarbonadas menos extendidas. Cuando se continúa con la compresión, toda la monocapa adquiere fase LC y por ello la reflexión es uniforme en toda la superficie. De esta manera la microscopia de ángulo de Brewster permite obtener información acerca de la topografía de un ensamblado supramolecular en una interfase fluida sin el agregado de sondas que influyan en el arreglo adquirido.

Durante la compresión de la monocapa, la reflectividad aumenta, la cual está asociada a la dirección del eje de las moléculas y se determina por análisis de imágenes de BAM a partir de los niveles de grises. El contraste de los niveles de gris partiendo de la fase gaseosa (0 mN/m) y comparado en distintas regiones de la monocapa permite determinar la orientación de las moléculas.

## 1.15. Espectroscopía UV-Vis de reflexión

El análisis espectroscópico UV-Vis de reflexión permite determinar el aumento de la concentración de moléculas en la superficie en un área determinada, lo que permite ser comparada con las isotermas de compresión.<sup>119</sup> En la espectroscopia UV-Vis de reflexión se hace incidir luz no polarizada en una interfase aire-agua. El haz absorbido es cuantificado mediante la comparación de la absorción del haz de luz en una interfase limpia y cuando está en presencia de una monocapa en la interfase (Figura 1-21). La absorción del haz de luz es mínima cuando la película se ubica en la interfase, con valores menores al 0,05 % de la radiación incidente.<sup>120,121</sup> Esta mínima absorción, genera el aumento de la reflexión total de la radiación incidente y durante la compresión, la orientación y la inclinación de las moléculas, provoca un cambio en la reflexión.

Tanto la luz reflejada ( $R_D$ ), como la luz absorbida ( $R_S$ ) se encuentran determinadas por las características químicas de cada monocapa y se expresan como en la ecuación 1-8, donde el término ( $\sqrt{R_s}$ ) representa la amplificación de la luz reflejada en consecuencia de



**Figura 1-21.:** Representación esquemática de la espectroscopía de UV-Vis de Reflexión en una interfase aire-agua.

la absorción. Por otro lado, el aumento de la reflexión se encuentra determinado por la ecuación 1-9.

$$R_{S,D} = R_S + R_D + A\sqrt{R_s} \quad (1-8)$$

$$R_{S,D} - R_S \approx \sqrt{R_s} \times A_S \quad \Delta R_n = R_{S,D} - R_S \quad (1-9)$$

Debido a que la absorción y absorbancia está relacionadas mediante un factor numérico igual a 2,303, la relación anterior puede expresarse como:

$$\Delta R_n = 2,303 \times 10^3 f_0 \varepsilon \Gamma \approx \sqrt{R_s} \quad (1-10)$$

Esta ecuación permite identificar el comportamiento de los cromóforos en la interfase, en la misma la absorptividad molar de la molécula está representada por  $\varepsilon(M^{-1}cm^{-1})$ ,  $\Gamma$  es la concentración superficial ( $mol \cdot cm^{-2}$ ) y  $f_0$  es un factor de orientación (Ec 1-11).

$$f_0 = \frac{3}{2} \text{sen}^2 \theta \quad (1-11)$$

En esta ecuación  $\theta$  es el ángulo formado entre el plano normal de la subfase y el momento dipolar de transición de la molécula. Es posible, mediante el factor  $f_{orien}$ , comparar las orientaciones promedio del dipolo de transición en disolución y en la interfase aire-agua.

La agregación molecular de los cromóforos en la interfase aire-agua genera variaciones significativas de  $\varepsilon$  y  $\lambda$  que pueden ser evaluadas con los valores de la fuerza del oscilador en la interfase aire-agua y en solución, teniendo en cuenta que la intensidad de una banda de absorción electrónica depende de la fuerza del oscilador, como se muestra en la ecuación 1-12.<sup>122</sup>

La fuerza del oscilador es definida como:

$$f_0 = \frac{4\epsilon_0 2,303 m_e C_0}{N_A e^{-2}} \int_{banda} \varepsilon dv = 1,44 \times 10^{-19} \int_{banda} \varepsilon dv \quad (1-12)$$

Donde,  $\epsilon_0$  representa la permitividad en el vacío,  $m_e$  es la masa del electrón,  $e^-$  es la carga del electrón,  $c_0$  la velocidad de la luz en el vacío, y  $N_A$  es la constante de Avogadro y el factor  $1,44 \times 10^{-19}$  es un factor de conversión expresado en unidades de mol L<sup>-1</sup>.cm.s.

Para calcular la fuerza aparente del oscilador es posible usar el método de la integral de la banda de reflexión normalizada combinando las ecuaciones 1-11 y 1-12.<sup>123,124</sup>

$$f_{ap} = f_0 \times f = \frac{3}{2} f(\theta) = 2,66 \times 10^{-12} \int_{banda} \Delta R_n dv \quad (1-13)$$

Donde el factor  $2,66 \times 10^{-12}$  tiene unidades de nm<sup>2</sup> s y donde  $f$  es la fuerza del oscilador en solución en condiciones isotrópicas. Según Davidov, cuando las moléculas interaccionan débilmente en un agregado, la fuerza del oscilador se conserva entre las diferentes formas agregadas.<sup>120</sup> Las variaciones de  $f_{ap}$  proporcionan una medida directa del orden que tiene los cromóforos en la interfase aire-agua.

La comparación entre la fuerza del oscilador de la solución y la fuerza aparente del oscilador se puede realizar a partir de determinaciones de la reflexión del espectro, obteniendo la orientación promedio de los dipolos de la transición electrónica en la interfase, tal como se expresa en la ecuación 1-14.



$$f_0 = \frac{f_{ap}}{f} = \frac{3}{2} \cdot \sin^2 \theta \quad (1-14)$$

**2.**

**Caracterización de la interacción de la  
ciclodextrina anfifílica  $\beta$ CD-C16 con  
interfases lipídicas**

## 2.1. Introducción

Las estructuras supramoleculares-jerárquicas artificiales que emulan la naturaleza representan una alternativa para el desarrollo de nuevos sistemas funcionales de suministro de fármacos que podrían superar muchas desventajas de los sistemas actualmente disponibles con estos fines. El diseño de estos sistemas exige un conocimiento profundo de las interacciones entre moléculas o supramoléculas, su miscibilidad, segregación, agrupamiento y distribución espacial de los componentes.

Las ciclodextrinas (CD) son compuestos versátiles que actualmente encuentran numerosas aplicaciones en el diseño de nuevos materiales, con especial interés en el campo de la nanomedicina.<sup>41,59,125–128</sup>

Las ciclodextrinas nativas se han empleado durante años en la industria farmacéutica para mejorar las propiedades fisicoquímicas de compuestos bioactivos.<sup>96</sup> Sin embargo, la necesidad de sistemas funcionales biocompatibles para el transporte, la entrega y la liberación de fármacos sigue representando un desafío.<sup>129</sup>

Los derivados de ciclodextrinas ofrecen una amplia gama de posibilidades para cumplir estos propósitos, que parecen estar limitados solo por la imaginación del químico. Para lograr estos propósitos, las ciclodextrinas se han incorporado o unido sobre la superficie de nanopartículas,<sup>130–132</sup> materiales mesoporosos<sup>133,134</sup> y polímeros,<sup>126,135</sup> entre otros. Otra estrategia importante para el diseño de sistemas de administración de fármacos está basado en el uso de ciclodextrinas anfífilas.<sup>136,137</sup> Cualquiera sea el diseño, la cavidad de ciclodextrina juega un papel importante y ubicuo para alcanzar los objetivos. La cavidad puede estar involucrada en la formación de complejos de inclusión con la molécula bioactiva a administrar, o bien, en el caso de sistemas supramoleculares, pueden unir algún ligando que permita la llegada y permanencia del transportador a un sitio *target*.<sup>126,127,138</sup>

Las ciclodextrinas anfífilas pueden obtenerse por unión de cadenas de alquilo u otras contrapartes hidrofóbicas a la ciclodextrina nativa.<sup>60,136,139,140</sup> Las ciclodextrinas anfífilas son capaces de formar estructuras supramoleculares jerárquicas tales como micelas, liposomas o monocapas, cuyas propiedades y estructura dependen principalmente de la geometría y del balance hidrofílico/hidrofóbico de la molécula.<sup>141</sup> Dependiendo del procedimiento de

síntesis, es posible obtener compuestos persustituidos (con más de una cadena hidrocarbonada por ciclodextrina<sup>141</sup>) o monosustituidos, con una amplia variedad de contrapartes hidrofóbicas.<sup>140</sup> En la Figura 2-1 se muestra la estructura esquemática de una ciclodextrina anfifílica mono- y persustituida.

En general, las ciclodextrinas anfifílicas persustituidas son moléculas con escasa flexibilidad conformacional, y debido a su geometría molecular, pueden formar vesículas (constituidas por una bicapa del anfifilo de manera similar a los liposomas) donde la cavidad de las ciclodextrinas se localiza en la superficie de la bicapa y se expone a los medios acuosos.<sup>142,143</sup> Por el contrario, las ciclodextrinas monosustituidas con cadenas de acilo son compuestos que poseen una gran flexibilidad conformacional<sup>1,60,136,141</sup> lo que les permite regular la orientación de la cavidad bajo condiciones o estímulos apropiados; esta característica abre la posibilidad de manipular la accesibilidad, o no, de la cavidad hacia un compuesto que en ella pueda incluirse, otorgándole al sistema un punto de regulación adicional frente a un estímulo externo adecuado.<sup>141</sup>



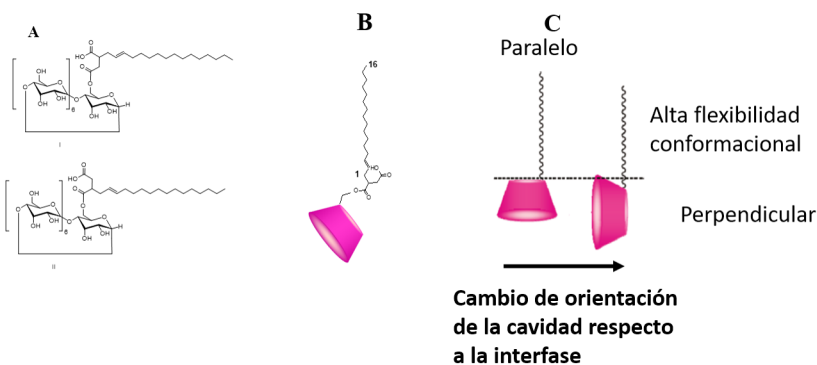
**Figura 2-1.:** Representación esquemática de ciclodextrinas anfifílicas mono- y persustituidas.

El desarrollo de nuevas moléculas para el transporte y liberación de principios activos ha presentado gran importancia en la industria farmacéutica y de alimentos. Como se mencionó anteriormente, la síntesis de nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades conlleva grandes costos además de tiempo para su implementación, y por esta razón la búsqueda de moléculas transportadoras, que permitan revalorizar fármacos existentes, ha adquirido una gran importancia. Gracias al carácter anfifílico que presentan algunas moléculas utilizadas en el desarrollo de transportadores, estas tienden a auto-ensamblarse en diferentes estructuras cuando se encuentran en disolución acuosa. Además, las moléculas anfifílicas, cuando se encuentran por ejemplo frente a una biomembrana, pueden interactuar con ella, lo que puede

llevar a su incorporación en la misma. Debido a ello, el estudio de cómo interaccionan anfifilos con biomembranas es de vital importancia para luego comprender, y en lo posible predecir, su comportamiento y efectos.

Como se mencionó en el capítulo anterior para estudiar el comportamiento de moléculas anfipáticas en interfases, las monocapas de Langmuir y de Gibbs representan excelentes modelos. El estudio de los anfifilos en una monocapa permite investigar e inferir su organización en la nano- y mesoescala, su orientación respecto a la interfase, sus interacciones con otras moléculas y los cambios en propiedades tales como su estado de fase, bajo condiciones experimentales conocidas y controladas.

En nuestro laboratorio se estudiaron las propiedades de la  $\beta$ -ciclodextrina monoacilada  $\beta$ CD-C16 en la interfase aire-agua.<sup>60,141,144</sup> La estructura química de  $\beta$ CD-C16 se muestra en la Figura 2-2. El procedimiento para su síntesis y caracterización se detalla en el Anexo de esta tesis.



**Figura 2-2.:** A) Estructura química de los dos isómeros obtenidos de  $\beta$ CD-C16 B) representación esquemática de esta molécula anfifílica y C) orientación de la cavidad de  $\beta$ CD-C16 respecto a una interfase con el plano de la cavidad paralelo y perpendicular a la misma.

Las propiedades interfaciales de  $\beta$ CD-C16 se estudiaron empleando monocapas de Langmuir en la interfase aire-agua y una amplia variedad de técnicas de caracterización tales

como presión de superficie vs. área molecular media ( $\pi$ -AMM), elasticidad en el plano de las películas o módulo de compresión ( $C_s^{-1}$ ), diferencia de potencial de superficie vs. AMM ( $\Delta V$ -AMM), el momento dipolar perpendicular por unidad de área vs. AMM ( $\mu_{\perp}$  vs. AMM), la topografía de la superficie por microscopia de ángulo de Brewster, y las interacciones moleculares mediante PM-IRRAS (Polarized Modulated-Infrared Reflection Absorption Spectroscopy).<sup>60,141</sup> En estos trabajos se concluyó que el anillo oligosacárido de  $\beta$ CD-C16 es capaz de adoptar un gran número de diferentes orientaciones en relación con el plano interfacial. El oligosacárido modifica la posición de la cavidad a medida que se comprime el film presente en la interfase aire-agua. A presiones de superficie bajas, la boca mayor de la cavidad de  $\beta$ CD-C16 reside en la interfase casi paralela a la misma, es decir, con la cavidad de  $\beta$ CD expuesta hacia la subfase acuosa. A medida que la monocapa se comprime la cavidad de  $\beta$ CD se reorienta y a presiones altas la cavidad reside perpendicular a la interfase.<sup>141</sup> La reorientación del oligosacárido se ve favorecida por el establecimiento de una red intermolecular de puentes de hidrógeno, la cual desempeña un papel fundamental en las propiedades dinámicas del film y en las propiedades de las estructuras supramoleculares formadas por  $\beta$ CD-C16 tal como se demostrará en los resultados que se presentan en esta tesis.

### 2.1.1. Objetivos

El objetivo de este capítulo es determinar las propiedades de  $\beta$ CD-C16 para interactuar con interfases lipídicas, para lo cual se utilizó como modelo al fosfolípido 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC).

Indagar sobre este tópico permitirá por ejemplo, conocer la afinidad del anfifilo  $\beta$ CD-C16 por un modelo de biomembrana. También, permitirá conocer las interacciones que se establecen entre este anfifilo y un fosfolípido. La información brindada por este tipo de experimentos es relevante para una molécula que desea emplearse como un transportador de fármacos o de otras moléculas bioactivas.

Para estos fines, los objetivos específicos planteados fueron:

- Evaluar las monocapas de Langmuir obtenidas por la deposición de mezclas de  $\beta$ CD-C16 y POPC a diferentes fracciones molares en la interfase aire-agua.
- Determinar la capacidad de  $\beta$ CD-C16 para absorberse a una interfase aire-agua.
- Evaluar la capacidad de  $\beta$ CD-C16 para penetrar en una interfase lipídica formada por el fosfolípido POPC con alto y bajo grado de empaquetamiento en la interfase (presiones de superficie bajas y altas).

## 2.2. Materiales y Métodos

### 2.2.1. Materiales

La  $\beta$ -ciclodextrina anfífilica  $\beta$ CD-C16 se sintetizó y caracterizó como se informa en el Anexo I de esta tesis.<sup>60</sup> El grado promedio de sustitución del anillo de  $\beta$ CD con el resto acilo fue igual a 1,5-1,6 determinado por  $^1\text{H}$  RMN. El fosfolípido 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC) se adquirió a Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabama, EE. UU.). Los solventes orgánicos empleados para preparar las soluciones stock de  $\beta$ CD-C16, POPC o las mezclas  $\beta$ CD-C16:POPC fueron dimetilsulfóxido-metanol-cloroformo en una proporción 1: 1: 1 (calidad HPLC, Merck o J.T Baker).

Se prepararon soluciones madre de  $\beta$ CD-C16 y POPC de concentración conocida, y se mezclaron volúmenes adecuados para obtener mezclas con diferente composición en cada uno de los componentes. Las fracciones molares estudiadas para las mezclas  $\beta$ CD-C16:POPC ( $X^{\beta\text{CD-C16}} : X^{\text{POPC}}$ ) fueron: 0,90:0,10; 0,75:0,25; 0,60:0,40; 0,45:0,25; 0,30:0,70; 0,10:0,90, respectivamente. La concentración de las soluciones madre POPC y de  $\beta$ CD-C16 se determinó rutinariamente a partir de su isoterma de Langmuir, tal como se explica en el ítem 2.2.3 de este capítulo. Además, se utilizó el método colorimétrico de antrona para determinar la concentración de  $\beta$ CD-C16 en las soluciones madre. Esta reacción colorimétrica, que se detalla más adelante, permite cuantificar la cantidad total de carbohidratos presentes en una muestra.<sup>60,145</sup>

La subfase empleada en todos los experimentos consiste en una solución de NaCl 145 mM. El NaCl utilizado fue calentado a 400 °C durante 5 horas a fin de eliminar toda la materia orgánica que pudiese estar presente en la sal, esto es importante para evitar la presencia de compuestos tensioactivos que actuarían como contaminantes. Las mediciones se realizaron a  $23 \pm 2$  °C. En estos ensayos se utilizó agua de calidad Milli-Q, purificada en un sistema Milli-Q (Millipore, Billerica, MA) con una resistividad de 18,2  $\Omega$ M.cm.

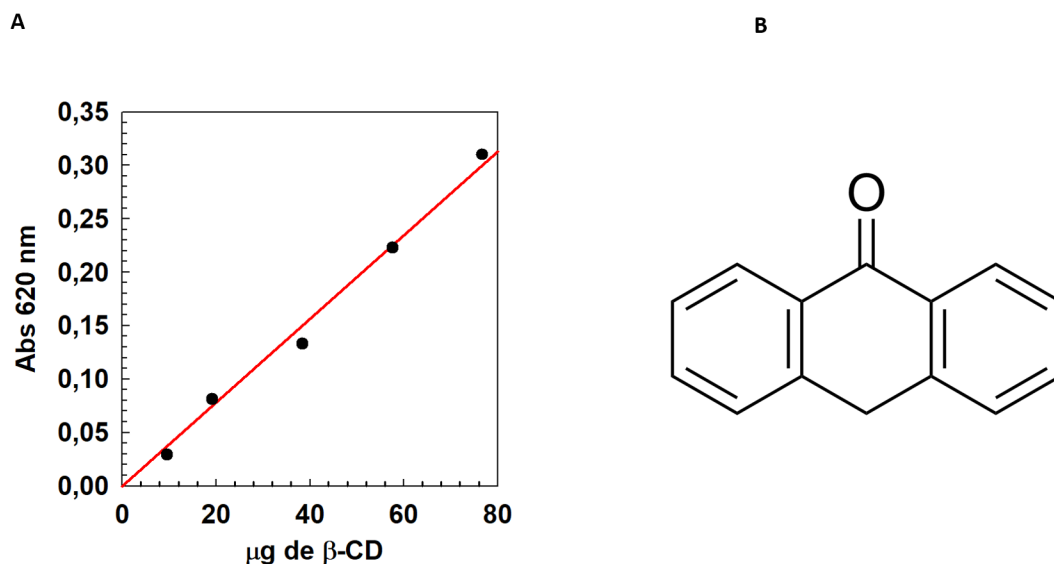
### 2.2.2. Cuantificación de $\beta$ CD-C16 por el método de antrona

El método de antrona se utiliza para cuantificar azúcares reductores y no reductores.<sup>145,146</sup> La cuantificación colorimétrica de carbohidratos por este método es ampliamente utilizada y se basa en la reacción que tienen los carbohidratos con antrona cuando se calientan en un medio ácido. En esta tesis, esta metodología se utilizó para cuantificar la  $\beta$ CD que forma parte de  $\beta$ CD-C16 y de esta manera, contar con un método adicional a la pesada para determinar la concentración de las soluciones empleadas.

Para ello se procedió a preparar el reactivo de antrona ( $C_{14}H_{10}O$ ) con una concentración de 2 mg de antrona/mL de  $H_2SO_4/H_2O$  (5:2). Este reactivo debe prepararse en el momento de ser usado y debe protegerse de la luz. Para la curva de calibración se utilizó  $\beta$ CD nativa en un intervalo de masas de 10-80  $\mu$ g. Para ello se preparó una solución madre de  $\beta$ CD 100  $\mu$ g/mL y se agregó el volumen necesario de esta solución a tubos de ensayo (0,1-0,8 mL) para obtener la curva de calibración en el intervalo indicado anteriormente. Posteriormente, se agregó agua a cada tubo hasta alcanzar un volumen de 0,8 mL. Para el blanco sólo se adicionaron 0,8 mL de agua. Paso seguido se agregó a cada tubo 4,0 mL del reactivo de antrona, se homogeneizó y se llevó a un baño de agua en ebullición durante 10 minutos con agitación constante desarrollándose una coloración verde. Transcurrido este período los tubos se colocaron en hielo para frenar la reacción y se leyó la absorbancia a 620 nm. En la Figura 2-3 se muestra una curva de calibración realizada con  $\beta$ CD.

Debido a que la  $\beta$ CD-C16 que se desea cuantificar se encuentra disuelta en una mezcla de dimetilsulfóxido-metanol-cloroformo 1:1:1 y en ocasiones en presencia de POPC, se hicieron controles de la interferencia de estos compuestos en el método de cuantificación





**Figura 2-3.:** A) Curva de calibración de  $\beta$ CD obtenida por el método colorimétrico de antrona. Pendiente:  $(4,1 \pm 0,2) \times 10^{-3} \mu\text{g}^{-1}$ ,  $r^2 = 0,992$ . B) Estructura química de la antrona.

no observándose ningún efecto en la coloración desarrollada durante la reacción respecto al blanco. Para estos controles se utilizaron 0,8 mL de dimetilsulfóxido-metanol-cloroformo 1:1:1 o POPC en una concentración final de  $80 \mu\text{M}$ .

### 2.2.3. Cuantificación de $\beta$ CD-C16 y POPC a partir de isothermas de Langmuir

De los ensayos de monocapas de Langmuir se obtienen isothermas de compresión las cuales correlacionan el área promedio que ocupa una molécula a una determinada presión de superficie, en una interfase. Las isothermas de Langmuir de un compuesto puro son características de dicho compuesto, al igual que lo son por ejemplo espectros de RMN o de IR. Dado que se puede conocer a partir de la isoterma de Langmuir el área que ocupa en promedio una molécula a una dada presión de superficie, temperatura y subfase, es posible extrapolar y conocer cuantas moléculas fueron depositadas en la interfase de la cuba usada teniendo en

cuenta el área total de la interfase y el volumen de la solución utilizada. Por ejemplo, es conocido que POPC a una presión de 40 mN/m ocupa en promedio un área de 53,5 nm<sup>2</sup>. Si por ejemplo se cuenta con una balanza de Langmuir que tiene 247 cm<sup>2</sup> y en esta superficie se depositan 20  $\mu$ L de una solución de POPC podremos estimar la concentración de la misma.

Para ello se averigua desde la isoterma experimental cual es el área que ocupan todas las moléculas depositadas en la superficie a dicha presión. Siguiendo el ejemplo, se averigua que área ocupan todas las moléculas que provienen de los 20  $\mu$ L sembrados. Conociendo esa área podremos estimar entonces cuantas moléculas había en los 20  $\mu$ L que fueron depositados. Luego teniendo en cuenta el número de Avogadro se calculan las moles y teniendo en cuenta el volumen en el que estaban esos moles se estima la concentración de la solución. Este procedimiento se utiliza de manera rutinaria para calcular la concentración de soluciones de anfífilos bien conocidos y permite contar con otra metodología, además del de la masa pesada, para calcular la concentración. Este detalle es importante dado que generalmente se trabaja con masas pequeñas y el error en la pesada puede ser importante. Cabe destacar que este procedimiento se puede aplicar sin inconvenientes a anfífilos cuyos isotermas han sido ampliamente estudiadas y son conocidas como es el caso de los fosfolípidos.

En el caso de compuestos anfífilicos nuevos, como  $\beta$ CD-C16, además es conveniente verificar la concentración de las soluciones con métodos complementarios hasta que se demuestre probado que a partir de sus isotermas de compresión es correcto calcular la concentración. Por ello en esta tesis también se utilizó el método colorimétrico de antrona para cuantificar las soluciones de  $\beta$ CD-C16.

#### 2.2.4. Obtención de monocapas de Langmuir en la interfase aire-agua

Las monocapas Langmuir se prepararon sembrando las soluciones stock de  $\beta$ CD-C16, POPC o  $\beta$ CD-C16:POPC en la interfase aire-agua (NaCl 145 mM) en un equipo KSV mini through (KSV Nima, Helsinki, Finlandia). La velocidad de compresión-descompresión utilizada fue de 10 mm/min, se ensayaron velocidades de compresión inferiores obteniéndose las mismas isotermas. Típicamente, se sembraron entre 10-20  $\mu$ l de la solución madre con una microjeringa (Hamilton) sobre la superficie de la cuba (área 247 cm<sup>2</sup>). La compresión

comenzó 15 minutos después de la dispersión. La ausencia de impurezas con actividad superficial en la subfase acuosa o solventes dispersantes fue verificada diariamente. Las isothermas de compresión-descompresión se informan como gráficos de presión superficial ( $\pi$ ) frente al área molecular media (AMM). La  $\pi$  se tomó como se muestra en la Ecuación 1-1.

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (2-1)$$

El área molecular media (AMM) se calculó como el área total de la monocapa dividida por el número de moléculas presentes en la interfase. La presión superficial ( $\pi$ ) se midió usando el método de Wilhelmy con una placa de Pt que se quemó a la llama antes de cada experiencia realizada. Para cada muestra se obtuvieron isothermas por triplicado y se promediaron. Las isothermas mostradas corresponden a la isoterma promediada. La reproducibilidad estuvo dentro de un error estándar máximo de la media (SEM) de  $\pm 1$  mN/m para  $\pi$  y  $\pm 0,5 \text{ \AA}^2$  para MMA.

A fin de comparar las isothermas obtenidas para las mezclas  $\beta$ CD-C16:POPC, respecto al comportamiento ideal, se calcularon las isothermas ideales de acuerdo con la Ecuación 2-2, donde A representa el área y X la fracción molar de cada compuesto.<sup>147</sup>

$$A_{ideal} = [X^{\beta CD-C16} A^{\beta CD-C16} + X^{POPC} A^{POPC}]_{\pi} \quad (2-2)$$

El módulo de compresibilidad o elasticidad del film en el plano ( $C_s^{-1}$ ), se calculó como se muestra en la Ecuación 2-3 a partir de las isothermas experimentales, donde  $C_s$  es la compresibilidad,  $\pi$  es la presión superficial en el área correspondiente A.<sup>147</sup>

$$C_s^{-1} = -A \left( \frac{\partial \pi}{\partial A} \right) \quad (2-3)$$

La elasticidad en el plano obtenida para las mezclas  $\beta$ CD-C16:POPC se comparó con la de las películas mixtas ideales. Para calcular  $C_s^{-1}$  ideal de cada mezcla se tuvo en cuenta ( $C_s^{-1}$ ) de los componentes puros, la fracción molar de cada uno de ellos ( $X^{\beta CD-C16} : X^{POPC}$ ), y el

área molecular media de los componentes puros ( $A^{\beta CD-C16}$ ,  $A^{POPC}$ ) a la  $\pi$  correspondiente como se muestra en la Ecuación 2-4.<sup>148,149</sup>

$$C_s^{-1} = (X^{\beta CD-C16} (\frac{C_s^{-1} \beta CD-C16}{A_{\beta CD-C16}})_{\pi} + X^{POPC} (\frac{C_s^{-1} POPC}{A_{POPC}})_{\pi}) (X^{\beta CD-C16} A^{\beta CD-C16} + X^{POPC} A^{POPC})_{\pi} \quad (2-4)$$

También se determinaron las funciones exceso de las mezclas estudiadas. Las funciones exceso aportan una valiosa información sobre las propiedades del sistema y permiten evaluar de una forma cuantitativa las desviaciones del sistema respecto del comportamiento ideal. Entre las funciones exceso encontramos el área en exceso ( $A_{exc}$ ) que describe la existencia de interacciones entre los componentes de la mezcla de la monocapa y permite observar la diferencia existente entre el área molecular promedio ocupada por la monocapa mixta a una presión determinada y el área que ocuparían los componentes de la mezcla si se comportaran de forma ideal a esa presión. El área en exceso se calculó como se muestra en la Ecuación 2-5 en donde,  $A_{mezcla}$  es el área ocupada por las moléculas en la mezcla, esta área es determinada a partir de la isoterma experimental, mientras que  $A_{ideal}$  es el área promedio calculada para la mezcla ideal(ec 2-2) donde se asume que las áreas de los componentes individuales son aditivas a una determinada presión de superficie y fracción molar.<sup>150</sup>

$$A_{exc} = (A_{mezcla} - A_{ideal}) \quad (2-5)$$

Cuando se comprime o descomprime una monocapa, a temperatura constante, se produce una variación de la presión de superficie, lo que implica una modificación de la energía libre o trabajo en el sistema. La energía libre o trabajo de compresión ( $\Delta G_{comp}$ ) y expansión ( $\Delta G_{exp}$ ) se calcularon como lo indican las Ecuaciones 2-6 y 2-7.

$$\Delta G_{comp} = - \int_{A_0}^{A_i} \pi \partial A \quad (2-6)$$

$$\Delta G_{exp} = - \int_{A_0}^{A_i} \pi \partial A \quad (2-7)$$

El área ( $A$ ) corresponde a la AMM de la película mixta. Los  $\Delta G_{comp}$  o  $\Delta G_{exp}$  se calcularon como el área debajo de la curva de la isoterma de compresión o expansión, respectivamente, entre ciertos límites de presión superficial. La integral se calculó para áreas comprendidas entre 1 mN/m ( $A_0$ ) y el área ( $A_i$ ) correspondiente a una presión de superficie máxima 43 mN/m inferior a la presión de colapso ( $\pi_i$ ). Se tomaron estos límites de integración porque de esta manera se excluyen posibles errores que provienen de las fluctuaciones de las isotermas a altas presiones de superficie, cercanas al colapso ( $\pi_c$ ), y aquellas de la fase gaseosa de la monocapa ( $\pi < 1$  mN/m) que es dependiente de la sensibilidad del equipo. De esta manera los resultados obtenidos excluyen las contribuciones de la fase gaseosa y de una monocapa colapsada.<sup>60</sup>

Para evaluar la presencia de interacciones entre las moléculas de POPC y  $\beta$ CD-C16 en la monocapa se calculó la histéresis ( $\Delta G_{hys}$ ) como se muestra en la Ecuación 2-8

$$\Delta G_{hys} = \Delta G_{exp} - \Delta G_{comp} \quad (2-8)$$

Experimentos de ciclos consecutivos de compresión-descompresión además permitieron conocer que las monocapas de las diferentes mezclas  $\beta$ CD-C16:POPC son estables y que no se pierdan moléculas desde la interfase a la subfase (desorción) dado que en cada ciclo las AMM y  $\pi$  obtenidas son equivalentes.

El área molecular parcial promedio ( $\bar{A}$ ) ocupada por cada componente en la mezcla se calculó utilizando el método de los interceptos.<sup>151</sup> Se calculó  $\bar{A}$  para presiones de superficie iguales a 5 y 20 mN/m. Para ello se gráfico para cada mezcla estudiada el área obtenida en función de la fracción molar de uno de los componentes, en este caso  $X^{\beta CD-C16}$ , a cada una de las presiones mencionadas. Los datos de  $A^{5mN/m}$  vs.  $X^{\beta CD-C16}$  y  $A^{20mN/m}$  vs.  $X^{\beta CD-C16}$  se ajustaron a un polinomio utilizando el software Table Curve 2D v5.01 y luego se derivaron para obtener  $\bar{A}$  para  $\beta$ CD-C16 y POPC en función de la composición según las Ecuaciones 2.9 y 2.10.

$$\bar{A}_{\beta CD-C16} = A_{ideal} + \left( \frac{\partial A}{\partial X_{\beta CD-C16}} \right) \cdot (1 - X_{\beta CD-C16}) \quad (2-9)$$

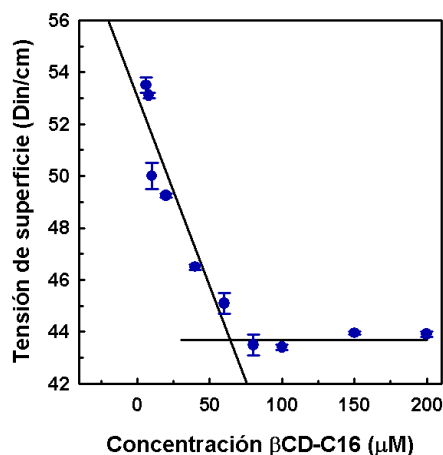
$$\bar{A}_{POPC} = A_{ideal} + \left( \frac{\partial A}{\partial X_{\beta CD-C16}} \right) \cdot X_{\beta CD-C16} \quad (2-10)$$

### 2.2.5. Determinación de la Concentración de Agregación Crítica de $\beta$ CD-C16

La concentración de agregación crítica (CAC) de  $\beta$ CD-C16 se determinó usando un tensiómetro Fisher Surface Model 21 (Fisher Scientific, Iowa, USA.). Se prepararon soluciones de  $\beta$ CD-C16 en agua Milli-Q con 2 % V/V de DMSO en un intervalo de concentraciones de 6  $\mu$ M a 200  $\mu$ M y se dejaron estabilizar 24 horas a 4 °C antes de la medición. En el laboratorio se ha establecido que éste período de tiempo es adecuado para que los agregados de ciclodextrinas anfífilas alcancen el equilibrio asegurando la reproducibilidad en los resultados obtenidos. Por su parte, se utilizó 4°C dado que es la temperatura a la que normalmente se almacenan compuestos de interés farmacéutico además que se retarda el crecimiento de microorganismos. Las determinaciones se hicieron a 25,0  $\pm$  0,1 °C. Se realizaron determinaciones por triplicado de cada solución. El valor determinado de CAC para  $\beta$ CD-C16 fue de 63  $\mu$ M. En la Figura 2-4 se muestran los datos obtenidos.

### 2.2.6. Adsorción de $\beta$ CD-C16 a la interfase aire-agua y penetración en monocapas de POPC

Para evaluar la tendencia o afección de  $\beta$ CD-C16 para adsorberse en una interfase aire-agua se realizaron isotermas de adsorción (monocapas de Gibbs). Para estos experimentos se utilizó una cuba de teflón circular. El volumen de subfase empleada (NaCl 145 mM) y el área de la cuba fueron de 17 mL y 28 cm<sup>2</sup>, respectivamente. A la subfase se añadieron 400  $\mu$ L de una solución stock de  $\beta$ CD-C16 ( 9 mM disuelta en DMSO:HCCl<sub>3</sub>:MeOH 1:1:1). Todo el experimento se realizó bajo agitación continua y temperatura constante. Mientras la monocapa de Gibbs se formó en la interfase, se registraron los cambios en  $\pi$  en función del tiempo a área constante. Se realizaron los controles pertinentes para conocer si el solvente utilizado produce cambios en la presión de superficie, para ello se inyectaron 400  $\mu$ L de



**Figura 2-4.:** Tensión superficial vs. Concentración de  $\beta$ CD-C16 a 25 °C, agua/2% DMSO. La concentración de agregación crítica se obtuvo a partir del punto de intersección de las rectas y tiene un valor de 63  $\mu$ M. Las barras de error corresponden al de desviación estándar cuadrática media de los triplicados.

DMSO:HCCl<sub>3</sub>:MeOH 1:1:1 en la subfase lo que no condujo a cambios en la presión.

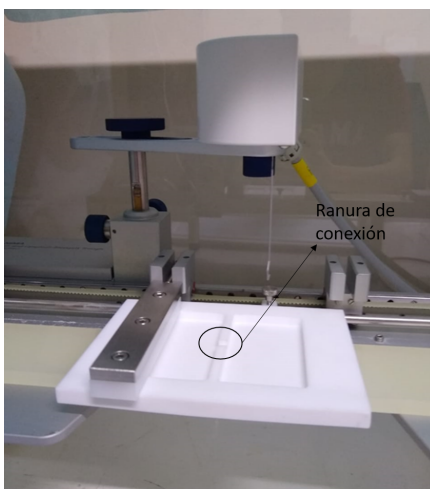
La concentración alcanzada por  $\beta$ CD-C16 en la subfase ( $\sim 0,2$  mM) se mantuvo muy por encima de la CAC (63  $\mu$ M) asegurando de esta manera que en el seno de la solución haya siempre un exceso del anfifilo. Para ello se hizo la siguiente estimación: si se considera que  $\beta$ CD-C16 se adsorbe a la interfase cubriéndola completamente (28 cm<sup>2</sup>), con una orientación tal que cada molécula ocupe el área a su máximo empaquetamiento, la concentración de la subfase podría disminuir como máximo en un 5%.

Los experimentos de penetración de  $\beta$ CD-C16 en interfases de POPC se realizaron de la siguiente manera. Previo a la inyección de  $\beta$ CD-C16 en la subfase acuosa de la cuba, en la interfase aire-agua se dispersó una solución madre de POPC hasta lograr la presión de superficie deseada. A esta presión inicial, dada por el film de POPC, la llamaremos  $\pi_0$ . Después de 10 minutos de estabilización del film de POPC a  $\pi_0$ , se inyectó la solución de  $\beta$ CD-C16 en la subfase y se mantuvo bajo agitación continua (volumen de subfase: 17 ml NaCl 145 mM, área: 28 cm<sup>2</sup>). Se registró la  $\pi$  en función del tiempo hasta que esta se mantuvo constante ( $\pi_f$ ). Posteriormente se calculó la variación en la presión de superficie

( $\Delta\pi$ ) producida por la inserción de  $\beta$ CD-C16 en el film de POPC como lo indica la Ecuación 2-11. Las  $\pi_0$  de los films de POPC que se evaluaron fueron 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 mN/m.

$$\Delta\pi = \pi_f - \pi_0 \quad (2-11)$$

Para conocer la cantidad  $\beta$ CD-C16 que penetró en la película de POPC, se utilizó el método de la antrona descrito anteriormente y una cuba de teflón que posee dos compartimentos de igual sección (área) y volumen. Ambos compartimentos están separados por una pared delgada de teflón que cuenta con una ranura en la parte superior que permite interconectarlos. Esta ranura durante la penetración de  $\beta$ CD-C16 en el film de POPC se mantiene tapada con dispositivo de teflón que calza en ella. En la Figura 2-5 se muestra la cuba utilizada.

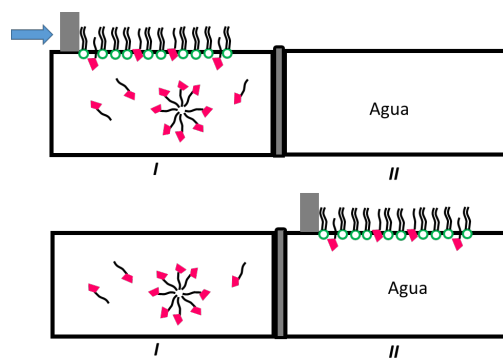


**Figura 2-5.:** Fotografía de la cuba utilizada para hacer las transferencias de los films conteniendo  $\beta$ CD-C16 que penetró en una monocapa de POPC.

La cuantificación de  $\beta$ CD-C16 se hizo para  $\pi_0$  de POPC de 5 y 35 mN/m. A estas presiones el fosfolípido posee un bajo y un alto grado de empaquetamiento, respectivamente, ofreciendo a  $\beta$ CD-C16 diferente dificultad para su penetración o inserción. Una vez finalizada la penetración de  $\beta$ CD-C16 y habiendo alcanzado  $\pi_f$ , la película presente en la interfase aire-agua se trasladó a la sección adyacente de la cuba (previamente llena con agua) mediante



el empleo de una barrera de la balanza de Langmuir a una velocidad de 10 mm/min.<sup>152</sup> La película se barrió a los 80-90 minutos aproximadamente desde la inyección de  $\beta$ CD-C16 en la subfase. La Figura 2-6 muestra una representación esquemática de este procedimiento. El contenido total en la nueva sección (la película transferida y el agua) se colocó en un vial, la muestra se liofilizó y posteriormente se re-suspendió en agua hasta un volumen de 5 mL. Posteriormente se utilizó un volumen de 250  $\mu$ L de esta solución para la cuantificación de  $\beta$ CD-C16 utilizando el método de la antrona.<sup>60,145</sup> La transferencia de la película se realizó dos veces a cada presión de superficie (5 y 35 mN/m) y de cada experimento se midió la concentración de  $\beta$ CD-C16 por duplicado. La curva de calibración se realizó usando una solución estándar de  $\beta$ -ciclodextrina entre 1-18  $\mu$ M, se añadió POPC (80  $\mu$ M) a la curva de calibración y al blanco para tener en cuenta la interferencia que esta pudiera causar. La absorbancia se determinó a 620 nm.



**Figura 2-6.:** Representación esquemática de la transferencia de un film desde el compartimento I al II mediante el empleo de una barrera móvil. Anfifilo rosa:  $\beta$ CD-C16, Anfifilo verde: POPC.

### 2.2.7. Estudio topográfico de los films

Para los estudios de topografía de los films se utilizó un elipsómetro empleado en el modo de microscopio de ángulo de Brewster (Nanofilm EP<sup>3</sup> Imaging Ellipsometer, Accurion, Goettingen, Germany) que cuenta con un láser de 532 nm. El objetivo utilizado fue de 20X. Con este microscopio se pueden observar estructuras en la mesoescala directamente en la interfase aire-agua.<sup>118,153</sup>

La topografía de las monocapas de Langmuir se estudió a lo largo de toda la isoterma de compresión, tanto de los componentes puros como de las mezclas  $\beta$ CD-C16:POPC a tres fracciones molares seleccionadas ( $X^{\beta CD-C16} : X^{POPC}$ ) = (0,10:0,90, 0,48:0,52 y 0,90:0,10). Las isotermas se obtuvieron utilizando una balanza de Langmuir (KSV Minitrough, KSV-Nima-Biolin Scientific, Finlandia) montada debajo del microscopio. Para adquirir las imágenes a diferentes presiones de superficie la compresión del film se detuvo a diferentes presiones y se sacó en promedio entre 5-10 imágenes a cada presión para tener una muestra representativa. Cada experimento se realizó por triplicado.

Para estudiar los films obtenidos por adsorción de  $\beta$ CD-C16 en la interfase aire-agua pura o de penetración en interfases con POPC se utilizó una cuba de teflón circular (Área: 63,6 cm<sup>2</sup>, volumen: 28 mL) que se montó debajo del microscopio. En estos experimentos se registraron imágenes a diferentes tiempos así como también la presión de superficie correspondiente. El sistema se mantuvo bajo agitación a lo largo de todo el experimento la cual se detuvo para adquirir las imágenes.

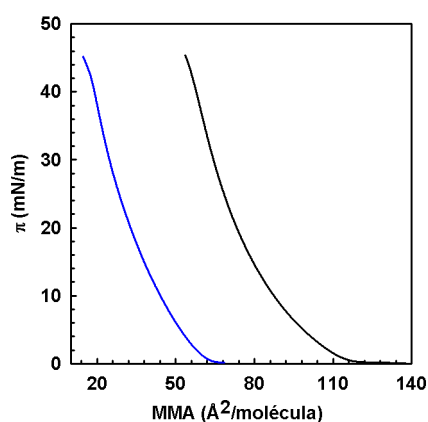
## 2.3. Resultados y Discusión

### 2.3.1. Propiedades de films mixtos formados por $\beta$ CD-C16 y POPC.

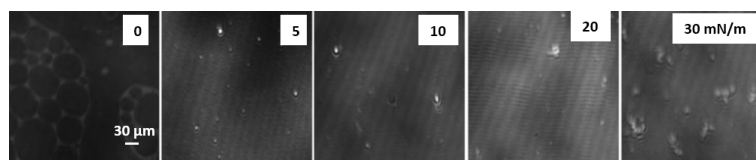
Tal como se mencionó en la introducción de este capítulo, la monocapa de Langmuir de  $\beta$ CD-C16 presenta una gran variedad de orientaciones del anillo oligosacárido,<sup>60,141</sup> y de la cadena hidrocarbonada, respecto al plano interfacial. La monocapa de  $\beta$ CD-C16 presenta un estado de fase líquido condensado (LC). La topografía de los films de  $\beta$ CD-C16 muestra desde presiones de superficie bajas la existencia de dominios brillantes formados por *clusters* de  $\beta$ CD-C16, los cuales se incrementan en cantidad y en tamaño a medida que la presión de superficie aumenta, en concordancia con las reorganizaciones que tiene la molécula en la interfase.<sup>60,141</sup> La formación de estos clusters se ve favorecida por el establecimiento de puentes de hidrógeno entre las moléculas de  $\beta$ CD-C16.<sup>141</sup>

Por su parte, POPC posee un estado de fase líquido-expandido (LE) a la temperatura de trabajo (25°C) y una textura homogénea a lo largo de toda la isoterma. En la Figura

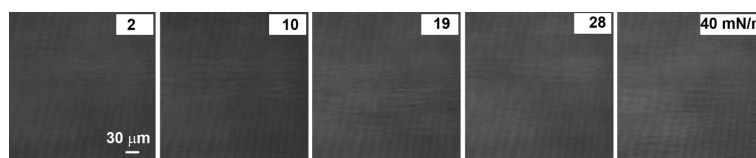
2-7 se muestran las isoterma de compresión de  $\beta$ CD-C16 y POPC y en la Figura 2-8 imágenes de BAM obtenidas a diferentes presiones de superficie para ambos compuestos. Para corroborar que la velocidad de compresión, utilizada para obtener las monocapas a partir de soluciones mezcla de  $\beta$ CD-C16:POPC, no afecta la topografía adquirida, se hizo un ensayo disminuyendo 5 veces la velocidad de compresión, pero no se encontraron diferencias en el patrón topográfico adquirido.



**Figura 2-7.:** Isotherma de Langmuir de  $\beta$ CD-C16 (línea azul ) y POPC (línea negra) obtenidas a 25 °C y subfase NaCl 145 mM.



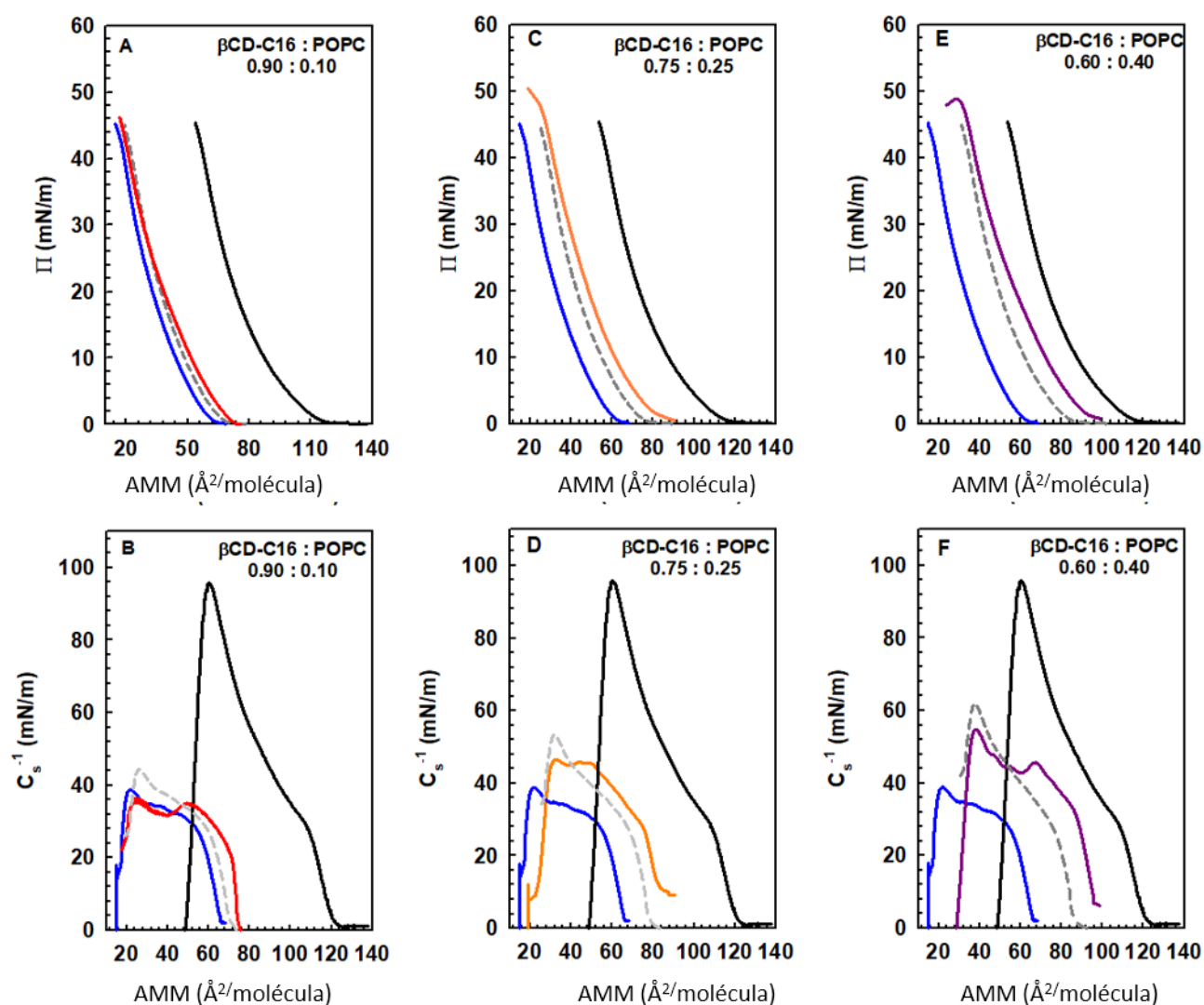
(a)



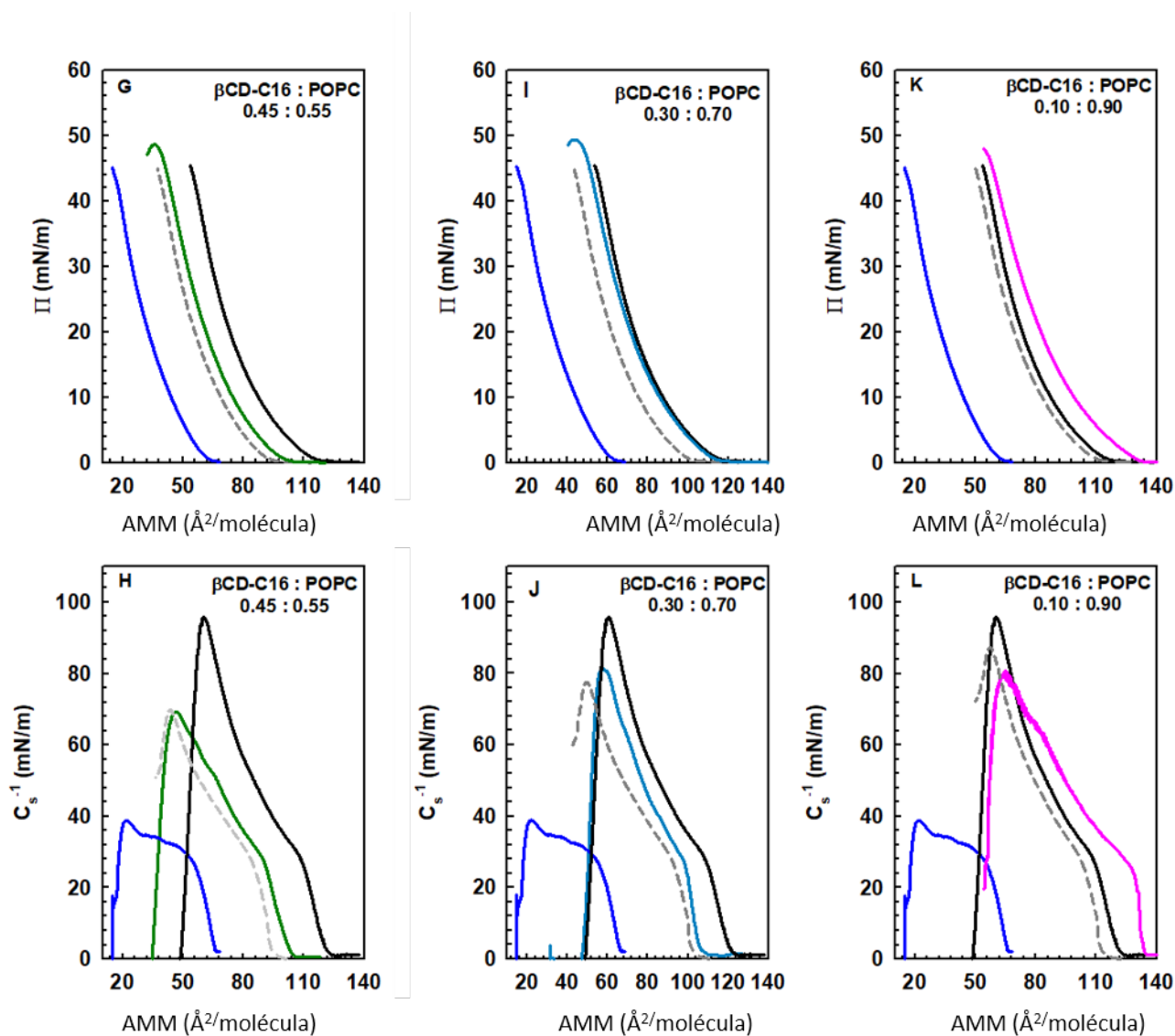
(b)

**Figura 2-8.:** Imágenes de microscopia de ángulo de Brewster de (a)  $\beta$ CD-C16 y b)POPC a las presiones de superficie indicadas. Barra de escala 30  $\mu$ m, 25 °C y subfase NaCl 145 mM.

Las isothermas de compresión ( $\pi$  vs. AMM) y los módulos de compresión ( $C_s^{-1}$  vs. AMM) para diferentes mezclas de  $\beta$ CD-C16:POPC se muestran en las Figuras 2-9 y 2-10 y los datos experimentales son comparados con las isothermas y  $C_s^{-1}$  ideales calculados de acuerdo a las Ecuaciones 2-2 y 2-4.



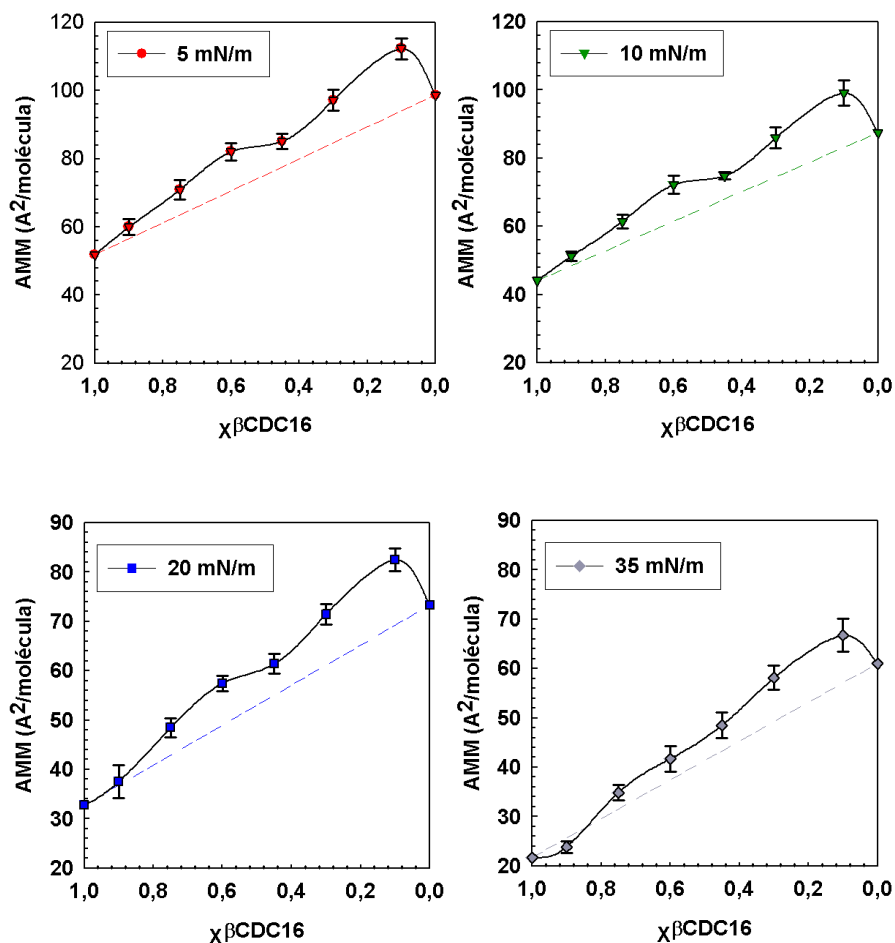
**Figura 2-9.:** Presión superficie vs. AMM (A, C, E) y módulo de compresión vs. MMA (B, D, F) para mezclas de  $\beta$ CD-C16:POPC a las fracciones molares indicadas en cada gráfico.  $\beta$ CD-C16: azul; POPC: negro; mezclas ideales: línea discontinua gris --; mezcla experimental  $X^{\beta CD-C16} = 0,90$  rojo 0,75 naranja; 0,60 rosado; Subfase NaCl 145 mM (temperatura =  $23 \pm 2$  °C).



**Figura 2-10.:** ( Presión superficie vs. AMM (G, I, K) y módulo de compresión vs. AMM ( H, J, L) para mezclas de  $\beta$ CD-C16:POPC a las fracciones molares indicadas en cada gráfico.  $\beta$ CD-C16: *azul*; POPC: *negro*; mezclas ideales: línea discontinua *gris*; mezcla experimental  $X^{\beta CD-C16} = 0,45$  *verde*; 0,30 *violeta*; 0,10 *morado*. Subfase NaCl 145 mM (Temperatura =  $23 \pm 2$  °C).

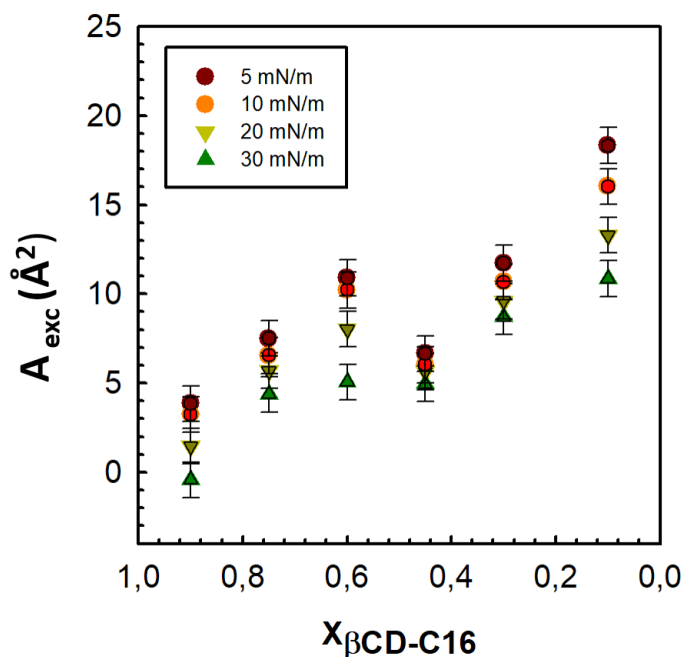
En las Figuras 2-9 y 2-10 se puede observar que para todas las mezclas, se produce una desviación positiva del área de las isothermas respecto a la situación ideal (expansión de área). Relativo a los módulos de compresión o elasticidad en el plano de los films mixtos, estos no

difieren con respecto a lo predicho para un comportamiento ideal, indicando que no hay un cambio de fase respecto al film ideal. Para los valores máximos observados de módulo de compresión experimental, respecto al ideal, las variaciones son inferiores a 10 mN/m.



**Figura 2-11.:** Desviación del área molecular promedio respecto al área ideal para las mezclas de  $\beta$ CD-C16:POPC a diferentes presiones de superficie. El área ideal para la mezcla es la señalada con la línea discontinua.

En la Figura 2-11 se compara el área experimental obtenida para las mezclas de  $\beta$ CD-C16:POPC respecto al área ideal en función de la composición de  $\beta$ CD - C16 ( $X^{\beta CD - C16}$ ) a diferentes presiones de superficie y en la Figura 2-12 se muestra el  $A_{exc}$ , calculada de acuerdo a la Ecuación 2-5, en función de la composición.



**Figura 2-12.:** Área en exceso calculada en función de la composición  $\beta CD - C16$  de films mezcla de  $\beta CD-C16:POPC$  a diferentes presiones de superficie.

El  $A_{exc}$  para las  $X^{\beta CD-C16}$  mayores que 0,30, a todas las presiones evaluadas, no excede los  $10-12 \text{ \AA}^2$ , pero se observa una desviación positiva mayor para la mezclas que contienen menor cantidad de  $\beta CD-C16$  ( $X^{\beta CD-C16} = 0,10$ ).

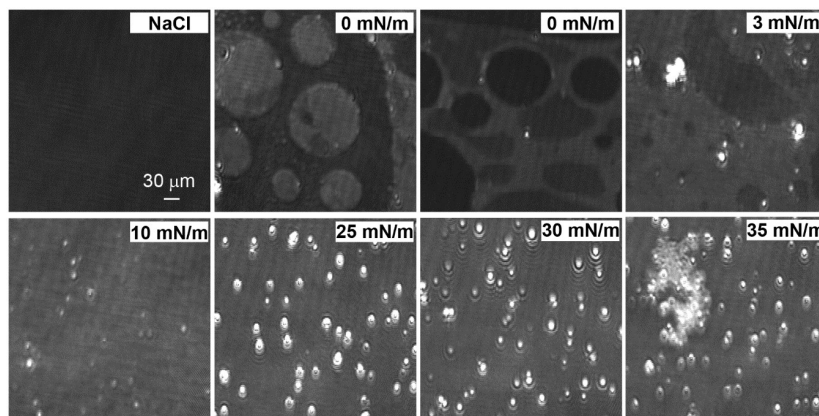
Cuando se estudian monocapas mixtas, una pregunta recurrente es si los componentes utilizados son miscibles o inmiscibles. Con respecto a la miscibilidad en monocapas de dos componentes, son considerados inmiscibles, en la superficie de un film bidimensional, cuando las propiedades de la película mixta reflejan aquellas de los componentes individuales, por lo que el área ocupada por el film mixto será la suma ponderada del área de los componentes individuales (Ecuación 2-2).<sup>153</sup> Además, cabe señalar que la miscibilidad-inmiscibilidad puede ser un concepto ambiguo, si no se detalla la escala particular a la que se realiza el análisis.<sup>151</sup> En la escala nanométrica, a nivel molecular, la inmiscibilidad de una mezcla binaria en una monocapa puede ser juzgada por la variación aditiva de sus propiedades y puede estar acompañada o no por separación macroscópica de fases.<sup>154</sup> En sistemas binarios, la

inmiscibilidad lateral puede ser observada como dominios segregados de un componente en el otro en la escala micrométrica. Algunas veces estos dominios pueden ser muy pequeños y contener sólo algunas moléculas, lo que hace difícil su detección por microscopias. En sistemas más complejos, respecto a su composición o topografía de superficie, la cooperatividad a nivel molecular (nm) puede ser disminuida debido a la emergencia de tensiones laterales y a la energía interfacial. Esto tiene como consecuencia que el film mixto pueda exhibir comportamiento aditivo con isothermas de compresión sin cambios de fase evidentes y una topografía de superficie con coexistencia de dominios que revelan inmiscibilidad.<sup>155</sup> La presencia de una superficie heterogénea (coexistencia de dominios), en la escala micrométrica, implica interacciones locales que conducen a un mezclado intermolecular favorable o desfavorable de los diferentes componentes, a lo largo del plano lateral, en el rango de la escala nanométrica.<sup>151</sup>

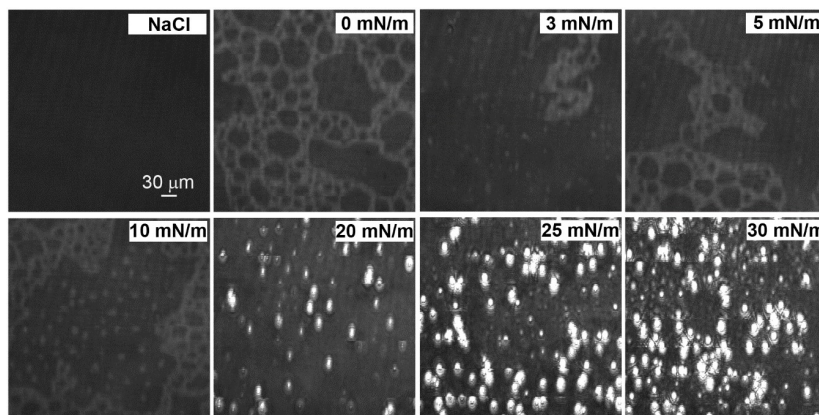
A fin de conocer si hay segregación o no de los componentes de los films formados por  $\beta$ CD-C16:POPC, se estudió la topografía de las películas mixtas mediante microscopía de ángulo Brewster (BAM) a lo largo de la isoterma de compresión. Esta información resulta relevante para conocer por ejemplo si  $\beta$ CD-C16 se segrega, formando dominios enriquecidos en ella misma. Esta información puede resultar esencial si a este anfililo se lo emplea, por ejemplo, como un transportador de moléculas bioactivas que llegue a membranas. Las imágenes obtenidas para mezclas representativas ( $X^{\beta CD-C16} = 0,10, 0,48$  y  $0,90$ ) a diferentes presiones superficiales se muestran en las Figuras **2-13,2-14** y **2-15**.

Estos experimentos muestran microheterogeneidad de la superficie con segregación de la  $\beta$ -CD anfífilica y el fosfolípido, a todas las presiones de superficie y las composiciones estudiadas. La inspección de las imágenes muestra claramente la inmiscibilidad de los componentes en el rango de la mesoescala, que fue evidente a partir de la región gaseosa ( $\pi < 1$  mN/m) y se mantuvo a lo largo de toda la isoterma. La aparición de dominios altamente birrefringentes, tras la compresión, puede atribuirse a la formación de conglomerados de moléculas de  $\beta$ CD-C16, los que se observaron también en las películas de  $\beta$ CD-C16 pura tal como se mostró en la Figura **2-8**.<sup>60</sup>

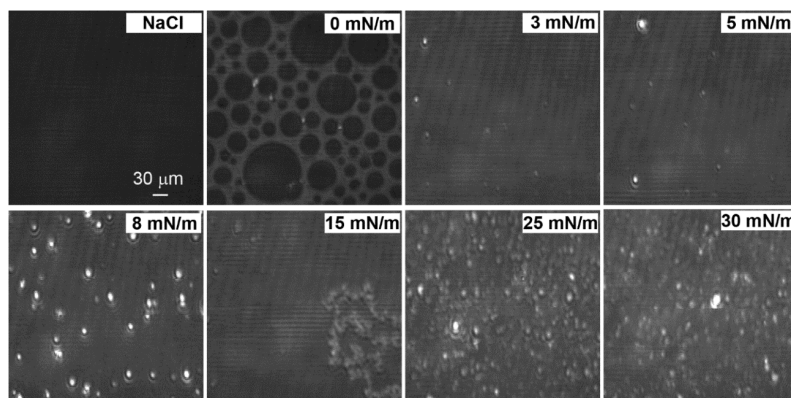




**Figura 2-13.:** Imágenes de microscopía en ángulo en Brewster de una película mixta que contiene  $\beta$ CD-C16: POPC en fracciones molares 0,10: 0,90 a diferentes presiones de superficie. Las imágenes son representativas de 5-10 imágenes de dos experimentos independientes. Subfase empleada NaCl 145 mM, temperatura  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ .



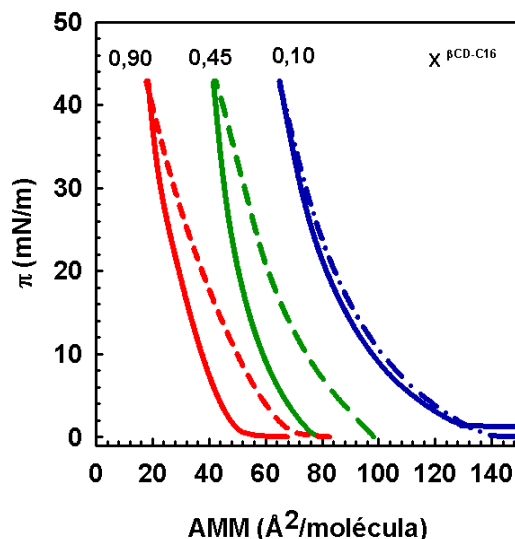
**Figura 2-14.:** Imágenes de microscopía de ángulo de Brewster de una película mixta que contiene  $\beta$ CD-C16: POPC en fracciones molares 0,48: 0,52 a diferentes presiones de superficie. Las imágenes son representativas de 5-10 imágenes de dos experimentos independientes. Subfase empleada NaCl 145 mM, temperatura  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ .



**Figura 2-15.:** Imágenes de microscopía en ángulo de Brewster de una película mixta que contiene  $\beta$ CD-C16:POPC en fracciones molares 0,90: 0,10 a diferentes presiones de superficie. Las imágenes son representativas de 5-10 imágenes de dos experimentos independientes. Subfase empleada NaCl 145 mM, temperatura  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ .

También se determinó el trabajo bidimensional que se necesita para comprimir o expandir un film mixto de  $\beta$ CD-C16, POPC desde un estado poco compacto ( $\pi \sim 1$  mN/m) a uno de mayor empaquetamiento intermolecular y viceversa. Estos valores se compararon con los que se requieren para comprimir o expandir a los componentes puros. Esto se hizo evaluando la energía libre de compresión ( $\Delta G_{comp}$ ) y de expansión ( $\Delta G_{exp}$ ) calculadas través de las Ecuaciones 2-6 y 2-7. El  $\Delta G_{comp}$  es una cantidad que refleja el balance de energía entre las interacciones intermoleculares y la pérdida de entropía tras la compresión de una película.  $\Delta G_{exp}$ , en tanto refleja si el sistema retuvo, o no, energía u orden respecto a su condición inicial, es decir antes de haber sido comprimido. Para películas termodinámicamente en equilibrio idealmente fluidas, la energía que se le da al sistema durante el proceso de compresión ( $\Delta G_{comp}$ ) es igual a la energía devuelta por el sistema en el proceso de expansión ( $\Delta G_{exp}$ ). Cuando estas energías no son iguales, y  $\Delta G_{comp} > \Delta G_{exp}$ , significa que el sistema almacena cierta cantidad de energía que no se restaura después de la expansión, por ejemplo en forma de interacciones intermoleculares. La diferencia entre la  $\Delta G_{exp}$  y  $\Delta G_{comp}$  permite obtener la energía libre de histéresis ( $\Delta G_{hys}$ ). La Figura 2-16 muestra las isotermas de compresión-expansión de films mixtos  $\beta$ CD-C16:POPC a tres fracciones molares seleccio-

nadas con  $X^{\beta CD-C16} = 0,10, 0,45, 0,90$ . En la Tabla **2-1** se resumen los valores de  $\Delta G_{comp}$ ,  $\Delta G_{exp}$  y  $\Delta G_{hys}$  para las mezclas de  $\beta CD-C16:POPC$  así como los de  $\beta CD-C16$  pura. Estos parámetros fueron calculados de acuerdo a las Ecuaciones. 2-6, 2-7, 2-8



**Figura 2-16.:** Isotermas de compresión-expansión de films mixtos de  $\beta CD-C16:POPC$  a fracciones molares iguales a 0,10:0,90 (—), 0,45:0,55 (---) y 0,90:0,10 (—). Las isotermas de compresión se muestran en líneas cortadas y las de expansión en líneas llenas.

Todas las monocapas mixtas de  $\beta CD-C16:POPC$  tienen valores de  $\Delta G_{comp}$  comparables a los encontrados para  $\beta CD-C16$  pura, sin embargo  $\Delta G_{exp}$  difiere dependiendo de la composición de la mezcla. Del análisis de la histéresis surgen conclusiones importantes respecto al comportamiento de estos anfífilos en mezclas con diferente composición. Se observa que las películas que contienen mayores cantidades de  $\beta CD-C16$  ( $X^{\beta CD-C16} > 0,45$ ) tienen  $\Delta G_{hys}$  más grande que las que tienen una cantidad menor de la  $\beta CD$  anfífilica. Las isotermas de la Figura **2-16** correspondientes a la mezcla con  $X^{\beta CD-C16} = 0,10$  que evidencian claramente que el sistema con esta composición no almacena energía dado que los caminos seguidos durante la compresión y expansión son prácticamente iguales. Por otra parte, los films con  $X^{\beta CD-C16} > 0,45$  poseen casi el mismo  $\Delta G_{hys}$  que el calculado para  $\beta CD-C16$  pura.

**Tabla 2-1.:** Energía libre de compresión, expansión y de histéresis para películas mixtas  $\beta$ CD-C16:POPC obtenidas en una subfase de NaCl 145 mM a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ .

<b>Fracción molar</b> $\beta$ CD-C16:POPC	$\Delta G_{comp}$ (kcal/mol)	$\Delta G_{expan}$ (kcal/mol)	$\Delta G_{hys}$ (kcal/mol)
<b>0,10 : 0,90</b>	$1,44 \pm 0,04$	$1,35 \pm 0,01$	$-0,09 \pm 0,05$
<b>0,45 : 0,55</b>	$1,28 \pm 0,03$	$0,67 \pm 0,04$	$-0,61 \pm 0,07$
<b>0,90 : 0,10</b>	$1,26 \pm 0,09$	$0,71 \pm 0,07$	$-0,55 \pm 0,17$
<b>1,0 : 0,00</b>	$1,34 \pm 0,01$	$0,72 \pm 0,03$	$-0,62 \pm 0,04$

Estos resultados se interpretan en función de la capacidad que tiene  $\beta$ CD-C16 para formar puentes de hidrógeno entre las unidades de oligosacáridos de moléculas adyacentes o cercanas.<sup>141</sup> Resulta evidente que el establecimiento de la red de enlaces hidrógeno es dependiente de la densidad de moléculas de  $\beta$ CD-C16 en la superficie, lo cual condiciona la posibilidad de encontrarse e interactuar.

Los resultados obtenidos por las diferentes metodologías aquí empleadas indican que estas ciclodextrinas anfífilas parecen ser las principales responsables en determinar las propiedades de las películas mixtas, tales como la segregación y agrupamiento en clusters enriquecidos en  $\beta$ CD-C16. La presencia de histéresis indica que por encima de cierta densidad de moléculas de  $\beta$ CD-C16 se establecen interacciones que requiere energía extra para romperse una vez formadas.

Por otro lado, la mayor desviación de la idealidad observada para la película mixta que contiene una baja proporción de  $\beta$ CD-C16 ( $X^{\beta CD-C16} = 0,10$ ), ver Figura **2-11** y **2-12**, se puede atribuir a la dificultad de  $\beta$ CD-C16 para establecer eficientemente enlaces de hidrógeno en la matriz del fosfolípido, lo cual probablemente introduce desorden en el sistema, si se compara con el film ideal.

La divergencia que se encuentra entre el área molecular promedio de un film binario con respecto a la mezcla ideal puede ser atribuida a la modificación de parámetros moleculares en el film bidimensional de uno o ambos componentes. Ejemplos de lo anterior podrían ser

cambios en la orientación de las moléculas respecto a la interfase (condicionadas por el otro componente de la mezcla), establecimiento de interacciones o impedimento para que éstas ocurran, lo que conduce a modificaciones en el área efectiva que ocupan.

**Tabla 2-2:** Área molecular parcial media ( $\bar{A}$ ) en función de la composición para películas mixtas  $\beta$ C16: POPC.

$X_{\beta CD-C16}$	$\bar{A}_{ideal}^a$ ( $\text{\AA}^2/\text{molécula}$ )	$\bar{A}_{\beta CD-C16}$ ( $\text{\AA}^2/\text{molécula}$ )	$\bar{A}_{POPC}$ ( $\text{\AA}^2/\text{molécula}$ )
<b>5 mN/m</b>			
<b>1,0</b>	-	51,8 <sup>b</sup>	-
<b>0,90</b>	56,5	48,2	130,7
<b>0,45</b>	78,4	53,5	98,8
<b>0,10</b>	93,9	94,3	93,4
<b>0</b>	-	-	98,7 <sup>c</sup>
<b>20 mN/m</b>			
<b>1,0</b>	-	32,7 <sup>d</sup>	-
<b>0,90</b>	36,8	29,5	102,8
<b>0,45</b>	55,8	32,0	75,4
<b>0,10</b>	69,3	74,1	68,7
<b>0</b>	-	-	73,3; <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Obtenido de la isoterma ideal en la fracción molar y la presión superficial indicada.

<sup>b</sup> Corresponde al área molecular media de  $\beta$ CD-C16 pura a 5 mN/m.

<sup>c</sup> Corresponde al área molecular media de POPC pura a 5 mN/m.

<sup>d</sup> Corresponde al área molecular media de  $\beta$ CD-C16 pura a 20 mN/m.

<sup>e</sup> Corresponde al área molecular media del POPC pura a 20 mN/m.

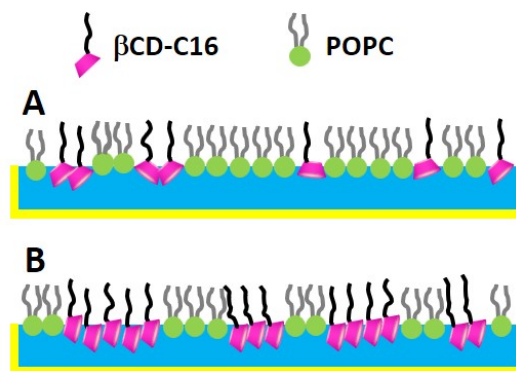
Para determinar cuál es la contribución de cada componente al área ocupada en el film mixto de  $\beta$ CD-C16:POPC, se calculó el área molecular parcial promedio ( $\bar{A}$ ) de acuerdo a las Ecuaciones 2-9 y 2-10. Los resultados obtenidos para mezclas con  $X_{\beta CD-C16} = 0,10, 0,45$

y 0,90 a 5 y 20 mN/m se presentan en la Tabla **2-2**.

A partir del análisis de estos datos, se puede concluir que tanto a presiones de superficies baja o alta (5 o 20 mN/m), para las fracciones molares de  $\beta$ CD-C16 iguales a 0,90 y 0,45, la contribución de  $\beta$ CD-C16 al área de la mezcla es similar al área que ocupa este anfifilo cuando está solo. Por el contrario, para la fracción molar más baja de  $\beta$ CD-C16, la contribución de  $\beta$ CD-C16 al área de la mezcla es casi el doble respecto a la esperada para el compuesto puro en ambas presiones. Estos resultados coinciden con la idea de que una pequeña cantidad de  $\beta$ CD-C16, inmersa en la matriz de fosfolípidos, se encuentra impedida para establecer la red de enlaces de hidrógeno entre unidades de oligosacáridos, lo cual también se refleja en el  $\Delta G_{hys}$  más pequeño para esta mezcla.

Las conclusiones obtenidas, a partir de este análisis, nos brindan información muy importante, dado que, regulando la cantidad de  $\beta$ CD-C16 presente en la mezcla, es posible regular la orientación de la cavidad de su oligosacárido con respecto al plano interfacial. Esta idea se esquematiza en la Figura **2-17**. Esto permitiría concomitantemente hacer que la cavidad de  $\beta$ CD-C16 sea accesible, o no, a un ligando que en ella se pueda incluir. Cuando tenemos mezclas con bajas fracciones molares de  $\beta$ CD-C16, el oligosacárido se encuentra con la cavidad mas paralela y más expuesta hacia al plano interfacial, situación que podría ser favorable para permitir la formación de complejos de inclusión con un ligando adecuado. Por el contrario, a mayores fracciones molares de  $\beta$ CD-C16, la mayoría de las unidades de oligosacáridos están involucradas en la formación de puentes de hidrógeno, y como consecuencia de esto, la cavidad está orientada más perpendicularmente respecto del plano interfacial, con menos posibilidades de ser accesible para que un compuesto se incluya en ella.

Estos resultados, más allá de nuestro interés particular en el estudio del sistema constituido por  $\beta$ CD-C16:POPC, reflejan un mecanismo general de como los carbohidratos participan en regular y transmitir información a nivel de la mesoescala en una (bio)interfase u otros sistemas supramoleculares. El rol vital de los carbohidratos presentes en membranas celulares para la señalización es bien conocido, probablemente la densidad de moléculas en la superficie y el establecimiento de interacciones como enlaces hidrógeno sean los responsables en la regulación de su actividad.



**Figura 2-17.:** Orientación molecular adoptada por  $\beta$ CD-C16 respecto a la interfase en un film mixto  $\beta$ CD-C16:POPC cuando se encuentra en baja (A) y alta (B) fracción molar.

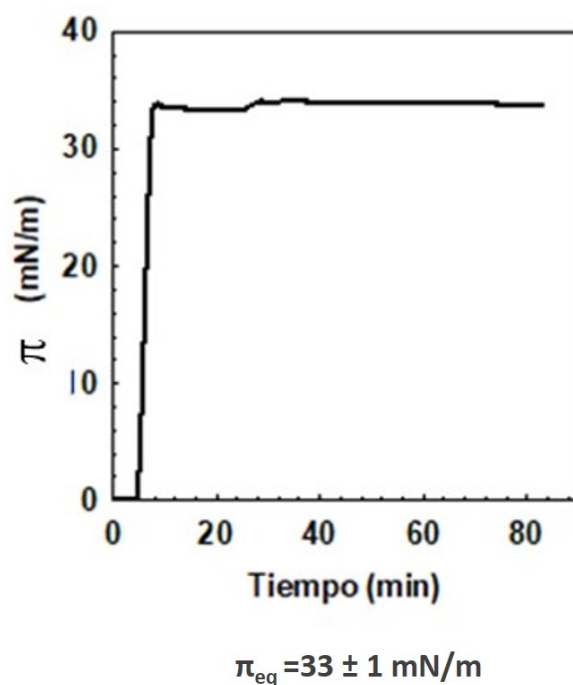
### 2.3.2. Adsorción de $\beta$ CD-C16 a la interfase aire-agua y penetración en monocapas de POPC

Cuando se coloca en agua una solución concentrada de un anfífilo, de modo que alcance una concentración superior a la CAC, la adsorción de los anfífilos a la interfase aire-agua da como resultado la formación de una monocapa de Gibbs, que se evidencia por un aumento de la presión de superficie (o disminución en la tensión superficial). Una monocapa de Gibbs surge del equilibrio entre el anfífilo en solución y la monocapa formada en la interfase.<sup>24,156</sup> Además, los agregados del anfífilo, en el seno de la solución, proporcionan un reservorio para el reemplazo de los monómeros integrados a la superficie, manteniendo de esta manera la concentración de monómero prácticamente constante en la solución.

Se estudió el comportamiento y avidéz de  $\beta$ CD-C16 para adsorberse a la interfase aire-agua y para penetrar a interfases donde estaba presente POPC con diferente grado de empaquetamiento. En este caso POPC, fue utilizada como un modelo de biomembrana.

A fin de conocer la capacidad de  $\beta$ CD-C16, para adsorberse a una interfase limpia, se inyectó una solución concentrada de  $\beta$ CD-C16 en una solución de NaCl 145 mM, tal como se explica en la sección experimental apartado 2.2.6. La medición se realizó en una cuba de teflón y se registró la presión de superficie en función del tiempo, hasta que ésta se mantuvo constante. La concentración final de  $\beta$ CD-C16 obtenida en la subfase fue de 0,2

mM siendo su CAC igual a  $63 \mu\text{M}$ . La Figura 2-18 muestra la isoterma de adsorción de  $\beta\text{CD-C16}$ . La presión de equilibrio ( $\pi_{eq}$ ) alcanzada por  $\beta\text{CD-C16}$  es igual a  $33 \pm 1 \text{ mN/m}$ . Asumiendo que la  $\beta\text{CD-C16}$  adsorbida en la interfase adopta una organización lateral, similar a la que tiene en las monocapas Langmuir se puede estimar, por extrapolación, usando la isoterma de Langmuir, como es la organización adoptada por  $\beta\text{CD-C16}$  cuando se adsorbe en una interfase aire-agua. Se estimó que el área ocupada por una molécula  $\beta\text{CD-C16}$  en la monocapa de Gibbs a la  $\pi_{eq}$  es de aproximadamente  $22 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ , lo que implica que la  $\beta$ -ciclodextrina anfifílica se adsorbe a una interfase con un alto grado de empaquetamiento y que tiene el plano de la cavidad perpendicular a la interfase, cómo se muestra en la Figura 2-2C.

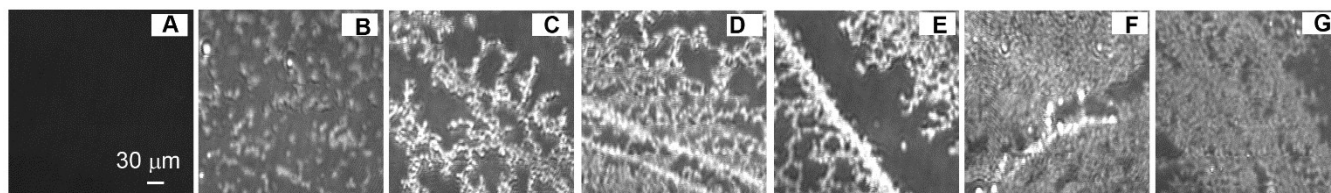


**Figura 2-18.:** Isoterma de adsorción de  $\beta\text{CD-C16}$  en la interfase aire-agua. Subfase NaCl 145 mM, temperatura  $23 \text{ }^\circ\text{C}$ .

La topografía de  $\beta\text{CD-C16}$  adsorbida en la interfase de una solución acuosa de NaCl 145 mM fue inspeccionada por BAM, Figura 2-19. La topografía adquirida por la autoincorporación de  $\beta\text{CD-C16}$  en la interfase aire-agua muestra estructuras altamente ordenadas



y refringentes que exhiben un crecimiento anisotrópico, preferencialmente a lo largo de una línea. El proceso de adsorción espontánea de  $\beta$ CD-C16 conduce a características topográficas que difieren de las observadas a partir de su compresión en una isoterma de Langmuir (ver Figura 2-8). Por compresión de  $\beta$ CD-C16 no se forman estructuras alargadas, sino mas bien núcleos con crecimiento de tipo circular.

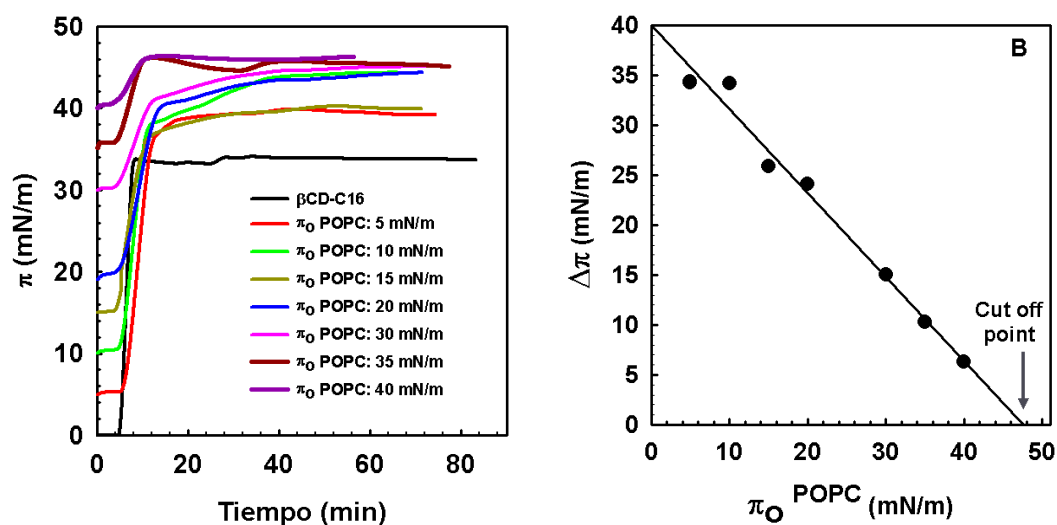


**Figura 2-19.:** Imágenes de BAM de la adsorción de  $\beta$ CD-C16 en una interfase aire-agua (NaCl 145 mM, temperatura  $23 \pm 2$  °C). En A se muestra la superficie de la solución de NaCl 145 mM. Los paneles B-G muestran a  $\beta$ CD-C16 adsorbida a diferentes tiempos, C-G son imágenes obtenidas a  $\pi_{eq}$ .

Posteriormente, se estudió la capacidad de  $\beta$ CD-C16 para penetrar o insertarse en monocapas del fosfolípido POPC. Para el estudio de la penetración de  $\beta$ CD-C16 en monocapas de POPC, las monocapas del fosfolípido se pre-formaron inicialmente en la interfase aire-agua a diferentes presiones de superficie, inicial ( $\pi_0$ ). Luego se inyectó una solución concentrada de  $\beta$ CD-C16 en la subfase alcanzándose una concentración final muy por encima de la CAC. Los cambios de  $\pi$ , en función del tiempo, se registraron hasta que la presión de superficie fuera estable, a esta presión se la llama presión de superficie final ( $\pi_f$ ). Posteriormente, se calculó el cambio en la presión de superficie como  $\Delta\pi = \pi_f - \pi_0$ . Cualquier incremento en la presión de superficie, respecto a la  $\pi_0$  a la que se encontraba POPC, refleja la penetración de  $\beta$ CD-C16 en la monocapa de POPC. En la Figura 2-20 se muestran las isotermas de penetración de  $\beta$ CD-C16 en films de POPC. Cómo se observa en el gráfico, el  $\Delta\pi$ , después de la adición de  $\beta$ CD-C16, depende de la  $\pi_0$  de POPC.

En todos los casos la  $\pi_f$  muestra un valor mayor que el alcanzado por  $\beta$ CD-C16 cuando se adsorbe a la interfase limpia ( $33 \pm 1$  mN/m). Cuando se grafica  $\Delta\pi$  vs.  $\pi_0$  de POPC se puede observar que hay una dependencia lineal con la  $\pi_0$  tal como se muestra en la Figura

**2-20.** Este gráfico permite estimar hasta qué presión de superficie  $\beta$ CD-C16 sería capaz de incorporarse en un film de POPC (punto de corte o *cut off*), este valor oscila entre  $46 \pm 1$  mN/m, es decir que  $\beta$ CD-C16 es capaz de penetrar monocapas de POPC altamente empaquetadas, indicando una alta afinidad por esta interfase lipídica.



**Figura 2-20.:** A) Curvas de adsorción de  $\beta$ CD-C16 a través del tiempo en una interfase aire/agua (—) y penetración de  $\beta$ CD-C16 en monocapas de POPC empaquetadas inicialmente a diferentes presiones superficiales  $\pi_0^{POPC}$ : 5 mN/m (—), 10 mN/m (—), 15 m m (—), 20 mN/m (—), 30 mN/m (—), 35 mN/m (—), 40 mN/m (—). B) Curva de corte para la penetración de  $\beta$ CD-C16 en films de POPC. La concentración de  $\beta$ CD-C16 en la subfase se mantuvo por encima de la CAC en todos los casos. Subfase: NaCl 145 mM, temperatura  $23 \pm 2$  °C.

Se ha propuesto que la presión de superficie promedio en la bicapa de una biomembrana es de aproximadamente 30-35 mN/m.<sup>158-160</sup> Es de señalar que el valor de corte encontrado para  $\beta$ CD-C16 en monocapas de POPC, es mucho mayor que la presión de superficie asignada a las bicapas. Estos resultados sugieren que  $\beta$ CD-C16 tendría la capacidad para penetrar bicapas de membranas naturales y estructuras densamente empaquetadas, lo que les confiere relevancia para aplicaciones biológicas. Estos resultados también son prometedores para el uso de  $\beta$ CD-C16 como constituyente de transportadores de fármacos que deban llegar a

membranas celulares para ejercer allí su actividad. También podrían resultar útiles en casos donde las membranas celulares representen una barrera para que el fármaco pueda ingresar a la célula y ejercer su acción.<sup>152,161</sup>

La magnitud y signo de la pendiente de la gráfica  $\Delta\pi$  vs.  $\pi_0$  permite explicar el tipo de interacciones existentes entre los anfífilos.<sup>162</sup> Una pendiente igual a -1 representa una situación ideal sin interacción entre los componentes. Una pendiente más pronunciada, con valores absolutos mayores que 1, indica interacciones repulsivas, mientras que una pendiente con valor absoluto inferior a 1, interacciones atractivas. El valor de pendiente para el sistema  $\beta$ CD-C16/POPC es  $-0,83 \pm 0,06$ , lo que indica interacciones atractivas entre los componentes.<sup>163</sup>

La textura de las películas obtenidas debido a la penetración de  $\beta$ CD-C16 en monocapas de POPC se evaluó por BAM a  $\pi_0$  iguales a 5 y 35 mN/m, los resultados se muestran en la Figura **2-21**. La textura y topografía superficial, que se obtiene debido a la penetración de  $\beta$ CD-C16 en las monocapas POPC, presenta patrones similares a los mostrados por  $\beta$ CD-C16 cuando se absorbe en la interfase limpia (Figura **2-19**). Sin embargo, las estructuras con forma de hilos, debidas a la penetración de  $\beta$ CD-C16 en la película de fosfolípidos, son más refringentes y muestran menos orden que las observadas para la adsorción de  $\beta$ CD-C16 en la interfase de agua, especialmente cuando POPC se empaquetó a 35 mN/m. Por ejemplo, en la Figura **2-21b** obtenida a 35 mN/m, las imágenes E-F de BAM se adquirieron con una ganancia inferior en el microscopio a fin de evitar el blanqueamiento de la imagen. En BAM, la reflectancia relativa es proporcional al grosor de la región de la película observada. La elevada reflectancia observada conduce a suponer que se forman estructuras en multicapas o ensamblados de algún tipo de la ciclodextrina anfífilica en la interfase.

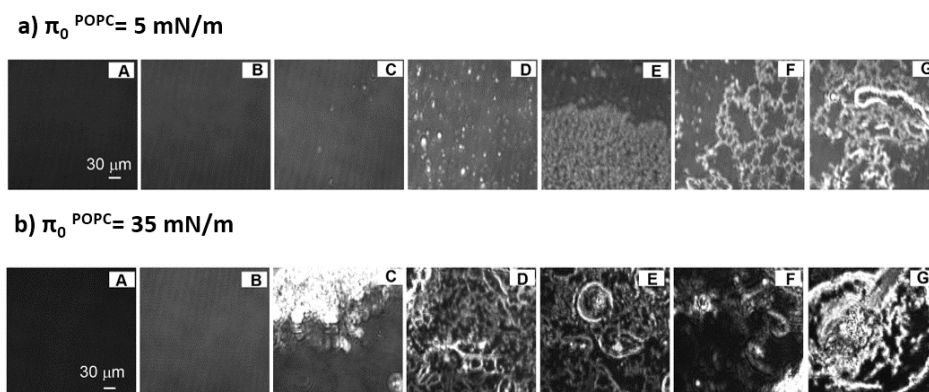
Para estimar la cantidad de  $\beta$ -ciclodextrina anfífilica que penetró en la película de POPC, una vez alcanzada  $\pi_f$ , se transfirió la película a una cuba conteniendo una subfase de agua limpia y se cuantificó  $\beta$ CD-C16 (ver sección experimental 2.2.6). La cantidad de  $\beta$ CD-C16 presente en la película transferida, proveniente de la monocapa de POPC a 5 mN/m y 35 mN/m, excede en 6 y 9 veces, respectivamente, la cantidad de  $\beta$ -ciclodextrina que podría estar presente si se considerara que toda la superficie estuviese cubierta solamente por  $\beta$ CD-

C16 con una orientación relativa a la interfase, tal que la  $\beta$ -ciclodextrina modificada ocupase  $22 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$  (área mínima que puede ser ocupada por  $\beta\text{CD-C16}$  antes del colapso en una monocapa de Langmuir). La cantidad cuantificada de  $\beta\text{CD-C16}$ , junto con las imágenes BAM, respaldan la idea de la formación de estructuras multi-ensambladas de  $\beta\text{CD-C16}$  que se forman probablemente por la inserción de la cadena hidrocarbonada de una  $\beta\text{CD-C16}$  en la cavidad de otra  $\beta\text{CD-C16}$  que se insertó previamente en la interfase. Este tipo de interacción fue informada en micelas de una ciclodextrina anfifílica de estructura similar.<sup>56</sup> Estas estructuras multi-ensambladas son más importantes cuando POPC está más densamente empaquetada; bajo esta condición, lo más probable es que  $\beta\text{CD-C16}$  no pueda insertarse tan profundamente en la película de POPC, quedando la cavidad de la ciclodextrina más expuesta o dislocada respecto del plano interfacial, favoreciendo la accesibilidad de su cavidad para la inclusión de otra ciclodextrina anfifílica y conduciendo a estructuras con un grosor mayor que el observado para una sola molécula  $\beta\text{CD-C16}$ .

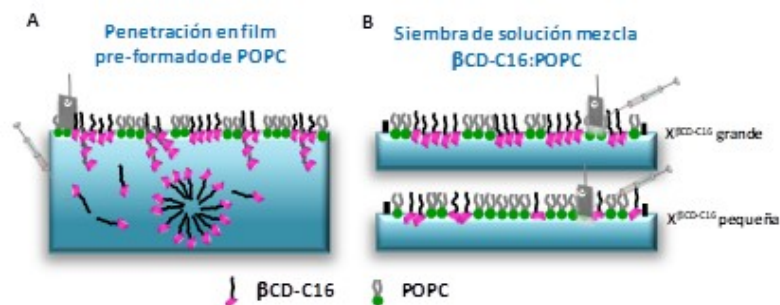
Nuevamente, las características topográficas observadas en la Figura **2-21** difieren de aquella mostrada por las películas mixtas obtenidas a partir de la compresión de una solución mezcla de  $\beta\text{CD-C16}:\text{POPC}$  sembrada en la interfase. Sin embargo, tanto las monocapas de Langmuir, provenientes de la siembra de una solución mezcla, así como las películas obtenidas por la penetración de  $\beta\text{CD-C16}$  en un film de POPC, mostraron segregación y agrupamiento de  $\beta\text{CD-C16}$  en la matriz del fosfolípido. La mayor diferencia encontrada reside en el orden alcanzado cuando  $\beta\text{CD-C16}$  penetra los films de POPC, que se atribuye a la auto-inclusión o apilamiento de  $\beta\text{CD-C16}$ . Las diferentes conformaciones adoptadas por  $\beta\text{CD-C16}$  en monocapas de Langmuir y por penetración en films de POPC se esquematizan en la Figura **2-22**

También, las monocapas comprimidas hasta una presión de  $30 \text{ mN/m}$  se dejaron por un período de tiempo, aproximadamente 1 hora, y se evaluó si había cambios en la topografía.

Durante este período no se observó la aparición de estructuras de tipo hilo o similares a las obtenidas por la penetración de  $\beta\text{CD-C16}$  en films de POPC. Estos resultados reflejan la importancia del camino o procedimiento a través del cual se obtienen estructuras supra-moleculares, permitiendo una gran versatilidad en el diseño de los ensamblados obtenidos.



**Figura 2-21.:** Imágenes BAM obtenidas durante la penetración de  $\beta\text{CD-C16}$  en monocapas de POPC preformadas en la interfase aire-agua ( $\text{NaCl } 145 \text{ mM}$ ) en función del tiempo. Las imágenes D-G se adquirieron a una presión de superficie igual a  $\pi_f$ , a)  $\pi_0^{\text{POPC}} : 5 \text{ mN/m}$ , b)  $\pi_0^{\text{POPC}} : 35 \text{ mN/m}$ . Los paneles A muestran la superficie de una solución de  $\text{NaCl } 145 \text{ mM}$  y los paneles B de POPC a  $5 \text{ mN/m}$  (a) y  $35 \text{ mN/m}$  (b). Todas las imágenes se obtuvieron utilizando una ganancia del microscopio del 100 %, excepto en las imágenes E-G del panel b que se tomaron con una ganancia del 40 % para evitar una alta reflectancia.



**Figura 2-22.:** Esquema que representa la organización y orientación propuesta para  $\beta\text{CD-C16}$  cuando a) penetra en una monocapa de POPC presente en la interfase y b) cuando se siembra una solución mezcla de  $\beta\text{CD-C16:POPC}$  que contienen una alta y baja proporción de la ciclodextrina anfifílica.

## 2.4. Conclusiones

Los estudios presentados permitieron conocer que las monocapas de Langmuir de  $\beta$ CD-C16:POPC, con diferente composición, muestran inmiscibilidad de sus componentes y expansión del área con respecto al comportamiento ideal. El exceso de área, respecto al comportamiento ideal, es notablemente mayor cuando la fracción molar de  $\beta$ CD-C16 es pequeña. Además, la presencia de una pequeña cantidad de  $\beta$ CD-C16 en la mezcla  $\beta$ CD-C16:POPC no induce la histéresis en los films, la cual si ocurre para fracciones molares de  $\beta$ CD-C16 mayores.

El análisis del área molecular parcial promedio en función de la composición de las monocapas mixtas  $\beta$ CD-C16:POPC revela que, a altas o bajas presiones de superficie y fracciones molares altas de  $\beta$ CD-C16 ( $X^{\beta CD-C16} > 0,30$ ), la contribución al área de la mezcla por parte de  $\beta$ CD-C16 es comparable al área ocupada por el anfifilo puro.

Por el contrario, cuando la fracción molar de  $\beta$ CD-C16 es pequeña ( $X^{\beta CD-C16} = 0,10$ ), la contribución al área de la mezcla por parte de  $\beta$ CD-C16 es casi el doble de la esperada para el compuesto puro. Estos resultados sugieren que una pequeña cantidad de  $\beta$ CD-C16, inmersa en una matriz de fosfolípido, está impedida para formar eficientemente la red de puentes de hidrógeno entre los anillos de oligosacárido de los anfifilos vecinos. Este hecho también se refleja por la ausencia de histéresis. El pequeño valor obtenido para  $\Delta G_{hys}$  en esta mezcla, refleja que no se han establecido interacciones entre los anillos oligosacaridos, tal como ocurre a fracciones molares mas grandes de  $\beta$ CD-C16. Esto tiene una consecuencia importante en las propiedades impartidas al film, porque controlando la cantidad de  $\beta$ CD-C16 es posible regular la orientación de la cavidad con respecto al plano interfacial y esto permitiría controlar la unión, o no, de un ligando en la cavidad de la ciclodextrina anfifílica.

Los resultados también revelan que  $\beta$ CD-C16 tiene una gran tendencia a auto-organizarse en ensamblados ordenados, cuando se le ofrece la posibilidad de adsorberse a una interfase limpia (agua) o una interfase lipídica tal como POPC. También,  $\beta$ CD-C16 puede penetrar monocapas del fosfolípido cuando este se encuentre altamente empaquetado a presiones superiores a las propuestas para una biomembrana. En el último caso,  $\beta$ CD-C16 es capaz de formar dominios o clusters guiados probablemente por interacciones intermoleculares sucesi-

vas. Las estructuras altamente reflectivas, observadas por BAM, son atribuidas a  $\beta$ CD-C16, muy probablemente estas estructuras están fuera del plano (dislocadas respecto al plano interfacial) y formadas por un apilamiento sucesivo de ciclodextrinas enhebradas por la cadena hidrocarbonada de una en la cavidad de otra. Todos estos eventos pueden favorecerse por la formación de puentes de hidrógeno y la complejación de la cadena de acilo desde un  $\beta$ CD-C16 en la cavidad de otra  $\beta$ CD-C16.

**3. Agregados auto-ensamblados de  $\beta CD$ -C16:AmB como sistemas de transporte y liberación de AmB**



### 3.1. Introducción

El diseño de sistemas de entrega y liberación de fármacos para enfermedades parasitarias y micóticas, se enfrenta a un gran desafío, el desarrollo de moléculas con alta eficiencia para la eliminación de las células fúngicas y parásitos, que no alteren las células de los mamíferos, siendo ambas eucariotas y con vías metabólicas comunes. Las necesidades terapéuticas de pacientes oncológicos, hematológicos, sometidos a trasplantes o con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), generan la búsqueda de nuevas formulaciones para tratamientos anti-micóticos. Entre los fármacos más utilizados para uso sistémico se encuentran Polienos (Nistatin y Anfotericina), Azoles (Imidazoles y Triazoles), Alilaminas, (naftifina, terbinafin) Morfolinas (amorofilina).<sup>164</sup>

Uno de los fármacos más utilizados es la Anfotericina B (AmB). La AmB es un antibiótico polienico que exhibe una alta actividad fúngica y antiparasitaria, muy utilizado en pacientes inmunocomprometidos (cáncer, trasplantes o sida)<sup>73</sup>. La poca incidencia en el desarrollo de resistencia a permitido su utilización por décadas, aunque su utilidad está limitada por su toxicidad, principalmente nefrotoxicidad y hemólisis.<sup>80,165,166</sup>

Diversas investigaciones indican que la toxicidad del fármaco está relacionada con su baja solubilidad acuosa.<sup>68</sup> Debido a su naturaleza anfipática, la AmB en el agua forma una mezcla de monómeros solubles y agregados. El monómero soluble está relacionado generalmente como la forma menos tóxica de la AmB<sup>98,167</sup> lo cual ha conducido a buscar estrategias para obtener formulaciones de fármacos con AmB predominantemente en su forma monomérica.<sup>85,168</sup> Las formas agregadas de AmB son oligómeros solubles en agua e insolubles, los cuales se asocian a forma tóxica de AmB.<sup>165,169</sup> Para mejorar la eficacia de este fármaco y reducir su toxicidad aguda y crónica, se han desarrollado formulaciones lipídicas como AmBisome<sup>®</sup>, micelares como Fungizone<sup>®</sup> y formulaciones que fueron tratadas térmicamente como la heated-Fungizone con muy buenos resultados.

El AmBisome<sup>®</sup> es una formulación liposomal de anfotericina B que está compuesta por fosfolípidos y colesterol, diseñados para incorporar la anfotericina B en la bicapa del liposoma.<sup>68</sup>

En los ensayos realizados con AmBisome<sup>®</sup> se demostró su eficiencia en el tratamiento de

infecciones sistémicas tanto intracelulares (leishmaniasis e histoplasmosis) como extracelulares (candidiasis y aspergilosis). Además, debido a su baja toxicidad, la administración de AmBisome<sup>®</sup> por vía intravenosa se realiza en dosis altas de anfotericina B (1–30 mg / kg) para el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas.<sup>67</sup>

La Fungizone<sup>®</sup> es la forma de AmB más utilizada clínicamente, en la cual el desoxicolato de sodio solubiliza la AmB. Esta formulación consiste en agregados mixtos de AmB-desoxicolato que coexisten con micelas de desoxicolato puro.

Cuando se compara la toxicidad renal y la eficacia de las formulaciones de AmBisome<sup>®</sup> y Fungizone<sup>®</sup>, los resultados obtenidos mostraron que sólo el 14,2 % de los pacientes tratados con AmBisome<sup>®</sup> desarrollaron complicaciones renales, en comparación con el 42,3 % de los pacientes tratados con Fungizone<sup>®</sup>. Además, la tasa de mortalidad del primer grupo fue tres veces menor. La dosis inicial recomendada de AmB es de 1 mg/ kg día que puede aumentarse hasta a 3–5 mg/kg día.<sup>68,170</sup>

La formulación de AmBisome<sup>®</sup> presenta una toxicidad menor que Fungizone<sup>®</sup>, pero su alto costo y dificultad de fabricación representan limitaciones para su uso generalizado, por lo cual la Fungizone<sup>®</sup> sigue vigente. Como se muestra en la Tabla **3-1**, el costo del tratamiento diario para un paciente de 70 Kg tiene un valor 945 dolares con AmBisome<sup>®</sup>, comparado con el precio de la Fungizone<sup>®</sup> que tiene un valor de entre 17 dólares, por esta razón, los pacientes se siguen tratando con Fungizone<sup>®</sup> o mezclas de Fungizone<sup>®</sup>: AmBisome<sup>®</sup>, aunque presente mayores efectos secundarios. Por lo tanto, el diseño de transportadores que permiten administrar AmB sigue siendo una necesidad.<sup>171,172</sup>

Fungizone<sup>®</sup> es la formulación de referencia y fue la única formulación de AmB en el mercado durante aproximadamente 35 años y es la más económica del mercado, por esta razón han surgido diferentes estrategias para disminuir su toxicidad. Recientes investigaciones demostraron que cuando la AmB en desoxicolato se calienta durante 20 minutos a 70 °C se reduce la toxicidad considerablemente, sin ningún efecto sobre la actividad antifúngica.<sup>173 78 174</sup> Este tratamiento realizado en Fungizone<sup>®</sup> produce cambios en la formación de monómeros y genera nuevas estructuras (superagregados). El cambio en la conformación de AmB produce un aumento de tamaño y la condensación de la AmB monomérica,<sup>95</sup> lo que

**Tabla 3-1.:** Características de los productos comerciales Fungizone<sup>®</sup> y AmBisome<sup>®</sup> \*

<b>Fármaco</b>	<b>Fungizone<sup>®</sup></b>	<b>AmBisome<sup>®</sup></b>
<b>Compañía</b>	Bristol-Myers-Squibb	Astellas Pharma US, Inc.,
<b>Clase</b>	Micelas	Liposomas unilamelares
<b>Diámetro de partícula (nm)</b>	80- 100	60-80
<b>Dosis recomendada mg/kg diario</b>	0,6-1	5
<b>Valor del producto</b>	U\$ 12 por cada 50 mg	U\$ 135 por cada 50 mg
<b>Precio estimado diario para pacientes de 70 Kg</b>	U\$ 17	U\$ 945

\* Tabla tomada de la referencia <sup>67</sup>

resulta en una disminución en su toxicidad comparado con el fármaco tradicional.<sup>168</sup>

### 3.1.1. Preparación de soluciones de AmB en formulaciones de AmBisome<sup>®</sup> y Fungizone<sup>®</sup>.

AmBisome<sup>®</sup> es un medicamento liofilizado que se encuentra en frascos que contienen 50 mg de AmB, la cual es reconstituida con 12 mL de agua estéril, hasta una concentración de 4 mg/mL de AmB. Para la perfusión, se debe obtener una concentración final en un intervalo recomendado de 0,2 mg/mL a 2 mg/mL de AmB.<sup>175</sup>

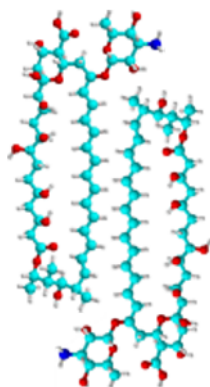
De la misma manera Fungizone<sup>®</sup> es preparada en una concentración inicial de 5 mg/mL de AmB añadiendo agua estéril. El líquido para perfusión, se prepara de la dilución (1:50) en solución de dextrosa U.S.P al 5%. La concentración final de AmB es de 0,1 mg/mL, la cual debe estar en un pH por encima de 4,2.<sup>176</sup>

### 3.1.2. Estado de agregación de Anfotericina B.

La AmB presenta estados de agregación que condicionan no sólo la toxicidad sino también la actividad y la farmacocinética de la misma.<sup>68</sup> Cuando la AmB se encuentra en soluciones acuosas las diferentes especies (monómero, dímero y poliagregado) se encuentran en equilibrio dependiendo de la concentración del fármaco.<sup>177</sup> Por ejemplo, la AmB está en estado monomérico en medios acuosos cuando su concentración es inferior a  $0,6-3,25\mu\text{M}$ .

Los agregados de AmB se forman por la interacción hidrofóbica de la cadena heptaénica de las diferentes moléculas en el medio, lo que sugiere que el aumento de las moléculas no sólo genera el incremento del número de agregados, sino también el tamaño de los mismos.<sup>37,93,178</sup>

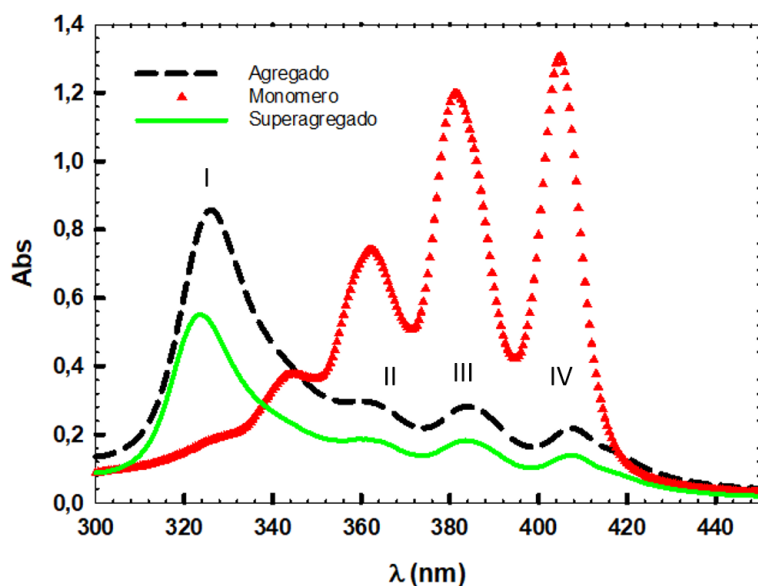
Por otro lado, las moléculas de AmB se disponen antiparalelamente una a la otra, estabilizadas por interacciones de Van Der Waals en solución acuosa formando agregados diméricos,<sup>179</sup> este hecho fue corroborado por Mazerski,<sup>180</sup> informando que el dímero de AmB se obtiene cuando ambas moléculas poseen un ángulo de  $170^\circ$  (estructura “cabeza-cola”).<sup>181,182</sup> La formación de dímeros de AmB sugiere una interacción hidrofóbica por parte del hepteno en las moléculas, como se muestra en la Figura 3-1, lo que permite que el agregado sea más estable. A su vez, la parte hidrofílica del AmB se encuentra expuesta al solvente, favoreciendo posibles interacciones con moléculas del solvente y con sus grupos cromóforos a una distancia de  $0,48\text{ nm}$  entre sí permitiendo la interacción.<sup>180</sup>



**Figura 3-1.:** Representación gráfica de la formación de agregados de AmB.

### 3.1.3. Propiedades espectroscópicas de la Anfotericina B.

Las propiedades espectroscópicas de la AmB se atribuyen a los siete enlaces dobles conjugados de su estructura (Figura 1-12). En la Figura 3-2 se muestran los espectros UV-Vis de las formas monoméricas agregadas y superagregada de AmB.



**Figura 3-2.:** Espectro de absorción UV-Vis de diferentes estados de agregación de AmB : Monómero ( $\Delta$ ), agregado. (— — —) y superagregado (—).

Las moléculas de AmB se ubican con los grupos cromóforos interaccionando entre sí por medio de fuerzas hidrofóbicas. Por ello, cuando aumenta la cantidad de moléculas se incrementan las interacciones y los niveles de energía se ven alterados.<sup>89,183</sup> El aumento de las interacciones trae consigo un efecto hipocrómico notable en las bandas con máximas de absorción localizados en 360-363 nm, 383-385 nm y 406-420 nm y provoca la aparición de una banda con máximo de absorción muy intenso entre los 328-340 nm.<sup>184</sup> Las bandas del espectro de absorción de AmB se denominan I-IV tal como se muestra la Figura 3-2<sup>166</sup>

## 3.2. Objetivos.

El objetivo principal de este capítulo es evaluar el potencial que tiene la molécula anfifílica  $\beta$ CD-C16 para transportar el fármaco hidrofóbico AmB mediante la formación de estructuras supramoleculares auto-ensambladas.

Los puntos específicos abordados son:

- Estudiar la formación y caracterización de agregados supramoleculares formados por la  $\beta$ CD-C16
- Caracterizar las interacciones de Anfotericina B con  $\beta$ CD-C16 en sistemas coloidales empleando técnicas espectroscópicas (FT-IR, RMN, UV-Vis y DC).
- Evaluar la capacidad de la  $\beta$ CD-C16 para el transporte y liberación de fármacos hidrofóbicos (ensayos *in vitro*).
- Evaluar la actividad hemolítica y antifúngica de los agregados de  $\beta$ CD-C16:AmB frente a *Candida albicans*.

## 3.3. Materiales y métodos.

### 3.3.1. Soluciones de AmB.

Se prepararon soluciones madre de AmB en DMSO con una concentración de 30 mg/mL (32,46 mM). Las soluciones madre se conservaron a -20 °C protegidas de la luz. La solubilidad de AmB en DMSO es de 30-40 mg/mL.<sup>185</sup>

### 3.3.2. Determinación del coeficiente de extinción de AmB

Para cuantificar la AmB presente en las diferentes soluciones empleadas en este trabajo se utilizó espectrofotometría UV-Vis. Los espectros se adquirieron en un espectrofotómetro Shimadzu 1501-Multispect en el intervalo de 300-450 nm. Las cuantificaciones se realizaron en soluciones de metanol con 5 % de DMSO, metanol fue elegido como solvente dado que en él AmB se encuentra en su forma monomérica.<sup>78,98,186</sup> La forma monomérica de este compuesto

permite cuantificarlo sin las ambigüedades que son dadas por la presencia de otros estados de agregación.

Para obtener la curva de calibración se prepararon soluciones de AmB en un intervalo de concentraciones de 0,5 a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en metanol con 5% de DMSO; las mediciones se realizaron por duplicado utilizando diferentes soluciones madres de AmB y una celda de 1 cm de paso óptico. Los espectros obtenidos presentan las señales características de AmB en su forma monomérica mostrando máximos de absorción a 405, 382, 363, y 343 nm (Figura 3-3).<sup>68,187</sup> El coeficiente de extinción obtenido en estas condiciones a 405 nm fue de  $\varepsilon^{405} = 0,148 \pm 0,003 (\mu\text{g}/\text{mL cm})^{-1}$  o  $\varepsilon^{405} = (1,37 \pm 0,03) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  el cual es similar a los informados en la literatura ( $\varepsilon^{416} = 1,21 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  en DMSO;<sup>188,189</sup>  $\varepsilon^{409} = 1,153 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  en DMSO<sup>78</sup>). En la Figura 3-4 se muestra la curva de calibración obtenida.

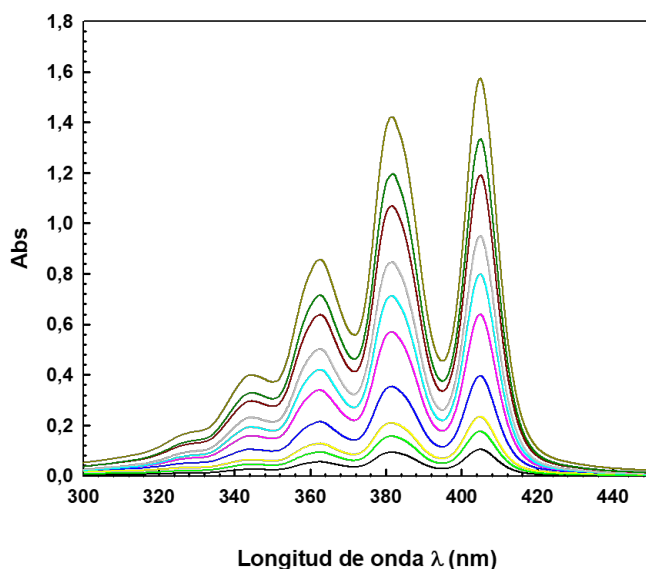
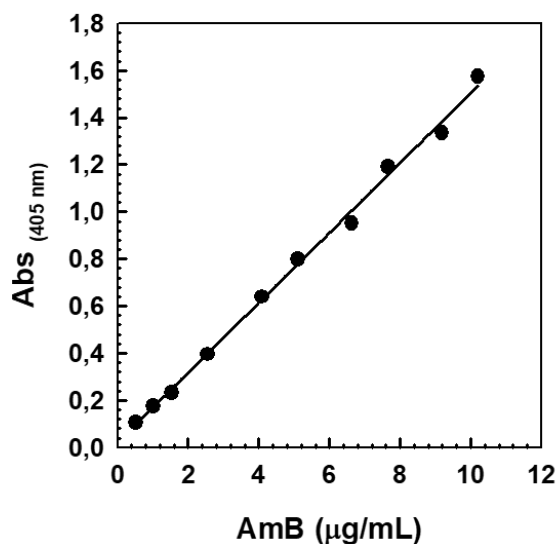


Figura 3-3.: Espectros de absorción de AmB en metanol 5% DMSO.



**Figura 3-4.:** Curva de calibración de AmB en metanol 5 % de DMSO.  $\epsilon^{405} = 0,148 \pm 0,003$   $(\mu\text{g}/\text{mL cm})^{-1}$ ,  $(1,37 \pm 0,03) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , ( $r^2=0,996$ ).

### 3.3.3. Soluciones de $\beta$ CD-C16

Se prepararon soluciones de  $\beta$ CD-C16 en agua Milli Q con diferentes concentraciones (1, 2, 3, 4, 5, 6 mg/mL) a fin de determinar la concentración adecuada para la formación de agregados auto-ensamblados estables que se desean utilizar en este trabajo. A las soluciones preparadas de  $\beta$ CD-C16 se les adicionó una cantidad equimolar de NaOH, lo que causa que el grupo ácido carboxílico de la cadena de  $\beta$ CD-C16 quede desprotonado, lo que aumenta su solubilidad (ver Figura 2-24 y Anexo ). También fue necesario agregar DMSO para facilitar la disolución de  $\beta$ CD-C16; se ensayaron diferentes porcentajes de co-solvente para encontrar la menor proporción del mismo que permita la correcta disolución del anfifilo (Tabla 3-2). Las soluciones se incubaron por 12 h a 4 °C para favorecer la formación de los agregados de  $\beta$ CD-C16.

Se observó que la máxima concentración estable de  $\beta$ CD-C16 en solución, sin presencia de precipitados o turbidez, fue la de 4 mg/mL con 4 % de DMSO, por esta razón, en este trabajo



**Tabla 3-2.:** Condiciones ensayadas para obtener agregados estables de  $\beta CD$ -C16

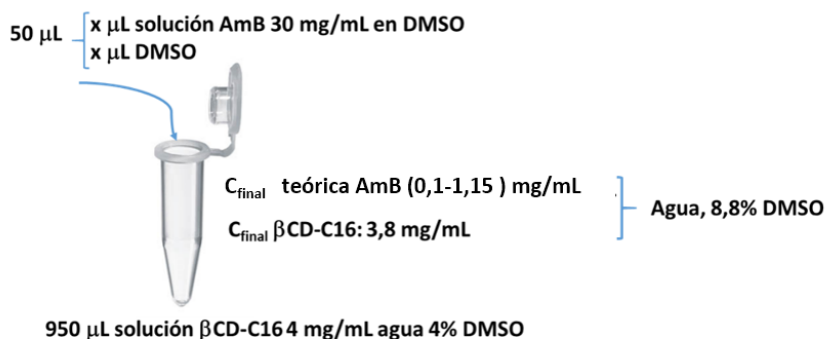
$\beta CD$ -C16 (mg/mL)	$\beta CD$ -C16 (mM)	1 % DMSO	2 %DMSO	4 % DMSO
1	0,56	Homogénea	Homogénea	Homogénea
2	1,13	Precipitado	Homogénea	Homogénea
3	1,69	Precipitado	Precipitado	Homogénea
4	2,26	Precipitado	Precipitado	<b>Homogénea</b>
5	2,82	Precipitado	Precipitado	Precipitado
6	3,39	Precipitado	Precipitado	Precipitado

se utilizó esta solución para la posterior formación de los agregados mixtos conteniendo  $\beta CD$ -C16 y AmB.

### 3.3.4. Elaboración de agregados auto-ensamblados de $\beta CD$ -C16:AmB

Para obtener los agregados auto-ensamblados  $\beta CD$ -C16:AmB a 950  $\mu L$  de una solución de  $\beta CD$ -C16 4 mg/mL con 4 % DMSO se le agregó el volumen necesario de la solución madre de AmB (30 mg/mL = 32,46 mM en DMSO) para alcanzar concentraciones de entre 0,1-1,7 mg/mL de AmB. A fin de tener en todas las preparaciones un volumen final de 1 mL, y mantener constante el porcentaje de DMSO, se agregó el volumen necesario de co-solvente. La concentración final de  $\beta CD$ -C16 luego de la adición de DMSO (puro y/o proveniente de la solución madre) se modifica a 3,8 mg/mL (2,15 mM) quedando también un 8,8 % de DMSO en la preparación. En la Figura 3-5 se representa esquemáticamente este procedimiento.

Posteriormente, las soluciones con  $\beta CD$ -C16:AmB fueron incubadas por 12 h a 4 °C y se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos para separar la AmB sin incorporar, que se presenta en forma de cristales amarillos. Finalmente, los sobrenadantes de las preparaciones se dializaron en agua utilizando una membrana de celulosa benzoilada de 2000 Da MWCO (Sigma-Aldrich). Para la diálisis se utilizó un volumen de 800 mL de agua que fue repartido en dos porciones de 400 mL cada 12 h; el proceso de diálisis se realizó durante 24 h con el objetivo de eliminar el DMSO. Luego, las preparaciones dializadas se almacenaron a 4 °C hasta su uso.



**Figura 3-5.:** Representación esquemática del procedimiento seguido para la obtención de agregados auto-ensamblados  $\beta\text{CD-C16:AmB}$ .

### 3.3.5. Cuantificación de AmB incorporada en los agregados auto-ensamblados mixtos $\beta\text{CD-C16:AmB}$

Para conocer la concentración de AmB incorporada en cada uno de los agregados preparados, se tomó una alícuota de cada agregado, se diluyó en metanol y se ajustó el volumen de DMSO hasta un 5%. El volumen final de las diluciones fue de 1 mL. Luego se midió la absorbancia de las soluciones metanólicas a 405 nm utilizando celdas de 1 cm de paso óptico y se procedió a cuantificar empleando la Ley de Lambert-Beer y el coeficiente de extinción informado previamente. La cuantificación de AmB se realizó en metanol a fin de tener la especie monomérica del macrólido.<sup>78,98,186</sup> En la Tabla **3-3** se muestran las soluciones preparadas.

Las fracciones molares de  $\beta\text{CD-C16}$  ( $X^{\beta\text{CD-C16}}$ ) y AmB ( $X^{\text{AmB}}$ ) se calcularon de acuerdo a las ecuaciones 3-1 y 3-2

$$X^{\beta\text{CD-C16}} = \frac{\text{moles de } \beta\text{CD-C16}}{\text{moles } \beta\text{CD-C16} + \text{moles de AmB}} \quad (3-1)$$

$$X^{\text{AmB}} = \frac{\text{moles de AmB}}{\text{moles } \beta\text{CD-C16} + \text{moles de AmB}} \quad (3-2)$$

**Tabla 3-3.:** Cuantificación de AmB incorporada en los agregados auto ensamblados  $\beta$ CD-C16:AmB.

Formulación	Volumen de solución stock AmB	Concentración teórica de AmB en los agregados $\beta$ CD-C16:AmB		Abs 405 nm <sup>e</sup>	Concentración experimental de AmB en los agregados $\beta$ CD-C16:AmB			
		$\mu$ L	mg/mL		mM	mg/mL		mM
<b>A</b>	0,8 <sup>a</sup>	$4,8 \times 10^{-2}$	0,052	0,091	$4,39 \times 10^{-2}$	$(4,6 \pm 0,5) \times 10^{-2}$	0,047	$0,049 \pm 0,005$
				0,087	$4,20 \times 10^{-2}$		0,045	
				0,105	$5,07 \times 10^{-2}$		0,055	
<b>B</b>	1,5 <sup>a</sup>	$9,0 \times 10^{-2}$	0,098	0,19	$9,17 \times 10^{-2}$		0,099	
<b>C</b>	3,3 <sup>a</sup>	$19,8 \times 10^{-2}$	0,215	0,383	$18,5 \times 10^{-2}$	$(19,5 \pm 0,1) \times 10^{-2}$	0,2	$0,21 \pm 0,02$
				0,425	$20,5 \times 10^{-2}$		0,222	
<b>D</b>	6,7 <sup>a</sup>	$40,2 \times 10^{-2}$	0,437	0,364	$35,1 \times 10^{-2}$	$(36 \pm 1) \times 10^{-2}$	0,38	$0,39 \pm 0,01$
				0,384	$37,1 \times 10^{-2}$		0,4	
<b>E</b>	10,0 <sup>a</sup>	$60,0 \times 10^{-2}$	0,653	0,591	$57,0 \times 10^{-2}$	$(60 \pm 4) \times 10^{-2}$	0,616	$0,65 \pm 0,05$
				0,657	$63,4 \times 10^{-2}$		0,685	
<b>F</b>	13,5 <sup>a</sup>	$81,0 \times 10^{-2}$	0,881	0,772	$74,5 \times 10^{-2}$	$(0,77 \pm 0,04) \times 10^{-2}$	0,805	$0,84 \pm 0,04$
				0,831	$80,2 \times 10^{-2}$		0,867	
<b>G</b>	18,5 <sup>a</sup>	$111,0 \times 10^{-2}$	1,21	1,03	$99,4 \times 10^{-2}$	$(103 \pm 6) \times 10^{-2}$	1,074	$1,12 \pm 0,07$
				1,153	$111,3 \times 10^{-2}$		1,202	
				1,029	$99,3 \times 10^{-2}$		1,073	
<b>H</b>	25 <sup>b</sup>	$150,5 \times 10^{-2}$	1,63	1,495	$144,3 \times 10^{-2}$	$(137 \pm 7) \times 10^{-2}$	1,56	$1,48 \pm 0,08$
				1,411	$136,2 \times 10^{-2}$		1,47	
				1,349	$130,2 \times 10^{-2}$		1,41	
<b>I</b>	27 <sup>c</sup>	$158,8 \times 10^{-2}$	1,72	1,306	$147,0 \times 10^{-2}$	$(145 \pm 3) \times 10^{-2}$	1,59	$1,57 \pm 0,04$
				1,262	$142,1 \times 10^{-2}$		1,54	
<b>J</b>	25 <sup>d</sup>	$160,5 \times 10^{-2}$	1,74	1,497	$144,5 \times 10^{-2}$	$(139 \pm 8) \times 10^{-2}$	1,56	$1,50 \pm 0,09$
				1,373	$132,5 \times 10^{-2}$		1,43	

<sup>a</sup> AmB=30,0 mg/mL en DMSO. Los volúmenes indicados en la Tabla se añadieron a 475  $\mu$ L de una solución de  $\beta$ CD-C16 4 mg/mL, 4% DMSO.

<sup>b</sup> AmB=30,1 mg/mL en DMSO. Los volúmenes indicados en la Tabla se añadieron a 475  $\mu$ L de una solución de  $\beta$ CD-C16 4 mg/mL, 4% DMSO

<sup>c</sup> AmB=29,4 mg/mL en DMSO. Los volúmenes indicados en la Tabla se añadieron a 475  $\mu$ L de una solución de  $\beta$ CD-C16 4 mg/mL, 4% DMSO.

<sup>d</sup> AmB=32,1 mg/mL en DMSO. Los volúmenes indicados en la Tabla se añadieron a 475  $\mu$ L de una solución de  $\beta$ CD-C16 4 mg/mL, 4% DMSO.

<sup>e</sup> Absorbancia de soluciones obtenidas a partir de agregar 14  $\mu$ L (entradas A-C), 7  $\mu$ L (entradas D-G, H, J) o 6  $\mu$ L (entrada I) de cada preparación dializada  $\beta$ CD-C16:AmB en un volumen final de 1 mL de metanol 5% DMSO, paso óptico= 1 cm.

### 3.3.6. Determinación del estado de agregación de AmB en los agregados auto-ensamblados $\beta$ CD-C16:AmB por espectrofotometría UV-Vis

Para conocer el estado de agregación o auto-asociación de AmB (monómero, agregado, super-agregado) en los auto-ensamblados mixtos  $\beta$ CD-C16:AmB, se utilizó espectrofotometría UV-Vis. Los espectros UV-Vis se midieron en un espectrofotómetro Shimadzu 1501-Multispect en un intervalo de longitudes de onda de 300 a 450 nm.

En este punto es importante destacar que la concentración de AmB, alcanzada en las diferentes preparaciones de  $\beta$ CD-C16:AmB, varía en el orden de los  $10^{-2}$ - $10^1$  mg/mL; estas cantidades, sumado al alto coeficiente de extinción de AmB, hacen que la medición directa de la absorbancia en la mayoría de las preparaciones no sea posible porque se produce la saturación de los espectros de absorción. Debido a ello fue necesario reducir el paso óptico o bien diluir con agua algunas de las preparaciones para medir el espectro de absorción. Aquí debe considerarse que la dilución de los agregados de  $\beta$ CD-C16:AmB puede cambiar la forma en que AmB se encuentra asociada debido a que los agregados  $\beta$ CD-C16:AmB son sistemas auto-ensamblados. Además, al hacer las diluciones  $\beta$ CD-C16 puede quedar por debajo de su CAC.

En los casos en que fue posible (muestras con concentraciones pequeñas de AmB), se utilizó una celda con paso óptico de 1 mm y se registró el espectro del agregado auto-ensamblado sin diluirlo. Esto se pudo realizar con las formulaciones que contenían una concentración de AmB (experimental) de  $4,20 \times 10^{-2}$ ,  $9,17 \times 10^{-2}$  y  $18,5 \times 10^{-2}$  mg/mL siendo la concentración de  $\beta$ CD-C16 igual a 3,8 mg/mL (2,37 mM).

Con las formulaciones, en las cuales se saturaba el espectro de absorción, se hicieron diluciones en agua que condujeran a soluciones conteniendo  $\beta$ CD-C16 por encima o por debajo de su CAC.

Las diluciones realizadas para obtener agregados  $\beta$ CD-C16:AmB con  $\beta$ CD-C16, en concentraciones por encima de su CAC, se hicieron de la siguiente manera: se tomaron 100  $\mu$ L de las formulaciones que contenían AmB con concentraciones (experimentales) de  $35,1 \times 10^{-2}$ ;  $57,0 \times 10^{-2}$ ;  $74,6 \times 10^{-2}$ ;  $99,3 \times 10^{-2}$  mg/mL y se llevaron a un volumen final de 1 mL de agua.

El espectro de absorción se registró con una celda de 1 mm de paso óptico. La concentración de  $\beta$ CD-C16, luego de la dilución, fue igual a 0,38 mg/mL (0,237 mM). En esta solución la concentración de  $\beta$ CD-C16 es 4 veces superior a su CAC.

Las diluciones, en las cuales  $\beta$ CD-C16 queda por debajo de su CAC, se realizaron como se describe a continuación. Se tomó 14  $\mu$ L de las preparaciones conteniendo concentraciones (experimentales) de AmB iguales a  $4,20 \times 10^{-2}$ ;  $9,17 \times 10^{-2}$ ;  $18,5 \times 10^{-2}$  mg/mL y se diluyó a un volumen final de 1 mL con agua; la absorbancia se registró empleando cubetas con 1 cm de paso óptico. La concentración de  $\beta$ CD-C16 luego de la dilución es igual a 0,0532 mg/mL (33,2  $\mu$ M). En este ensayo la concentración de  $\beta$ CD-C16 obtenida es aproximadamente la mitad de la CAC.

También se tomaron 7  $\mu$ L de las preparaciones conteniendo concentraciones (experimentales) de AmB iguales a  $35, \times 10^{-2}$ ,  $57, \times 10^{-2}$ ,  $74,5 \times 10^{-2}$ ,  $99,3 \times 10^{-2}$  mg/mL y se diluyó a un volumen final de 1 mL con agua; la absorbancia se registró empleando cubetas con 1 cm de paso óptico. La concentración de  $\beta$ CD-C16 luego de la dilución es 0,0266 mg/mL (16,6  $\mu$ M). En esta condición, la concentración de  $\beta$ CD-C16 obtenida es cuatro veces inferior a la CAC.

### **3.3.7. Determinación del estado de asociación de AmB en los agregados auto-ensamblados $\beta$ CD-C16:AmB por dicroísmo circular**

Las formulaciones conteniendo concentraciones de AmB determinadas experimentalmente, de 1,47; 1,22 y 0,86 mg/mL fueron evaluadas por dicroísmo circular utilizando un espectropolarímetro Jasco J-810. A fin de evitar la saturación de los espectros, las soluciones fueron diluidas en agua hasta concentraciones de  $8,83 \times 10^{-3}$  mg/mL;  $7,31 \times 10^{-3}$  mg/mL y  $5,17 \times 10^{-3}$  mg/mL. Los espectros se registraron entre 300-450 nm.

### 3.3.8. Estudio del efecto de la temperatura en el estado de asociación de AmB en los agregados auto-ensamblados $\beta$ CD-C16:AmB

Para evaluar si el calentamiento modifica el estado de auto-asociación de AmB en los agregados  $\beta$ CD-C16:AmB, las formulaciones fueron sometidas a calentamiento de entre 25-80 °C.

Para los estudios, por espectrofotometría UV-Vis y de dicroísmo circular, las preparaciones estudiadas tenían concentraciones de AmB determinadas experimentalmente de 1,47; 1,22 y 0,86 mg/mL. Cada preparación se fraccionó en 5 partes y cada alícuota fue incubada a una temperatura determinada. Las alícuotas se incubaron durante 1 h a 25 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C u 80 °C. En el caso de las determinaciones por UV-Vis y dicroísmo circular, fue necesario diluir las muestras sometidas a calentamiento previo a la medición. Para ello se tomaron 6  $\mu$ L de cada preparación original y se diluyó en agua (que estaba a temperatura ambiente) hasta un volumen final de 1 mL obteniéndose diluciones con concentraciones  $8,83 \times 10^{-3}$  mg/mL;  $7,31 \times 10^{-3}$  mg/mL y  $5,17 \times 10^{-3}$  mg/mL. Luego se registraron los espectros de absorción UV-Vis y de dicroísmo circular. En ambos casos se utilizó una celda de 1 cm de paso óptico.

### 3.3.9. Espectroscopia infrarroja de AmB, $\beta$ CD-C16, AmB, y $\beta$ CD-C16:AmB.

El espectro de  $\beta$ CD-C16 se adquirió en un espectrofotómetro infrarrojo Nicolet 360 Avatar empleando pastillas de KBr. El espectro de AmB y de los agregados auto-ensamblados de  $\beta$ CD-C16:AmB se midieron en un microscopio infrarrojo Nicolet iN10. El espectro de AmB se adquirió depositando una gota de una solución de AmB disuelta en DMSO sobre un sustrato de oro. En el caso de los agregados de  $\beta$ CD-C16:AmB se preparó una muestra de  $\beta$ CD-C16:AmB con concentración 1,42 mg/mL de AmB ( $X^{\beta CD-C16}:X^{AmB} 0,62:0,38$ ) en D<sub>2</sub>O; se utilizó D<sub>2</sub>O para evitar la superposición ocasionada por las señales del H<sub>2</sub>O con las señales de los compuestos a ser analizados. La muestra se depositó sobre un sustrato de oro y se midió el espectro de reflexión. Posteriormente se evaporó el D<sub>2</sub>O y se adquirió el espectro del agregado  $\beta$ CD-C16:AmB seco.

A fines comparativos se midió el espectro de la mezcla mecánica formada por iguales cantidades de  $\beta$ CD-C16 y AmB que las utilizas en la formulación. En este caso los sólidos de AmB y  $\beta$ CD-C16, en las cantidades correspondiente a la formulación de 1,5 mg/mL de AmB (4 mg de  $\beta$ CD-C16), se mezclaron hasta quedar de forma homogénea. Luego, se preparó una pastilla de KBr en una relación en peso 10/100  $\beta$ CD-C16:AmB /KBr, esta mezcla se malaxó y por medio de una prensa manual se obtuvieron los discos. Los espectros se adquirieron con un promedio de 32 barridos en el intervalo entre  $500\text{ cm}^{-1}$  y  $4000\text{ cm}^{-1}$  con una resolución de  $2\text{ cm}^{-1}$ .

### 3.3.10. Resonancia magnética nuclear de los agregados formados por $\beta$ CD-C16:AmB

Se realizaron estudios de resonancia magnética nuclear (RMN), mono y bidimensionales, para caracterizar los compuestos puros y también las interacciones de AmB con  $\beta$ CD-C16 en los sistemas coloidales.

Los espectros de RMN ( $400\text{ MHz } ^1\text{H}$  y  $100,2\text{ MHz } ^{13}\text{C}$ ) se registraron en un espectrómetro Bruker Advance II 400 a temperatura ambiente usando DMSO- $d_6$ ,  $\text{CD}_3\text{OH}$  o  $\text{D}_2\text{O}$  como solvente, dependiendo del experimento en particular. Se midieron espectros de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN de AmB empleando una solución 9 mg/mL en DMSO- $d_6$ . Debido a la baja solubilidad en agua, y a la sensibilidad del equipo, el espectro de  $^1\text{H}$  RMN o  $^{13}\text{C}$  RMN de AmB en  $\text{D}_2\text{O}$  no pudo medirse. El espectro de  $\beta$ CD-C16 en DMSO- $d_6$  y en  $\text{D}_2\text{O}$  se adquirió empleando soluciones con concentraciones 3,8 mM, aproximadamente. Los ensayos con los agregados auto-ensamblados de  $\beta$ CD-C16:AmB se hicieron usando una preparación cuya concentración en AmB fue de 1,42 mg/mL. Una vez obtenida la formulación se liofilizó y re-suspendió en  $\text{D}_2\text{O}$ . Para evaluar el efecto de la temperatura sobre el estado de asociación de AmB en los agregados  $\beta$ CD-C16:AmB, la muestra antes descripta en  $\text{D}_2\text{O}$  se calentó a  $70\text{ }^\circ\text{C}$ , se dejó enfriar a temperatura ambiente, y se adquirieron los espectros de RMN.

### 3.3.11. Difracción de Rayos X en polvo

Se analizó el patrón de Rayos X en polvo de  $\beta$ CD-C16, AmB y una formulación  $\beta$ CD-C16:AmB. La formulación de  $\beta$ CD-C16:AmB fue liofilizada previo a la medición. También, para fines comparativos, se estudió la mezcla mecánica de  $\beta$ CD-C16 y AmB conteniendo la misma proporción de componentes que la formulación liofilizada. Los espectros de Rayos X se obtuvieron en un difractómetro de Rayos X en polvo PANalytical X-Pert Pro, que utiliza radiación proveniente de una lámpara de Cu  $K\alpha$  ( $\lambda=0.15406$  nm) y fue operado con un voltaje de 40 kV y una corriente de 30 mA en el intervalo de 20-80 ° ( $2\theta$ ).

### 3.3.12. Tamaño de partícula de los agregados

El diámetro hidrodinámico medio de los agregados auto-ensamblados de  $\beta$ CD-C16 y  $\beta$ CD-C16:AmB fue determinado por dispersión dinámica de luz (DLS) en un equipo NICOMP 380. Los datos se informan en función del % de número de partícula. El índice de polidispersidad (PDI) fue calculado como se describe en la ecuación 3-3 donde SD corresponde a la desviación estándar de la señal.<sup>190</sup>

$$PDI = \left( \frac{SD}{\text{Diámetro promedio del pico}} \right)^2 \quad (3-3)$$

En las mediciones en DLS se evaluó el agregado formado por  $\beta$ CD-C16 en concentración 3,8 mg/mL y diluciones provenientes de diferentes formulaciones  $\beta$ CD-C16:AmB.

En los casos donde se evaluó el efecto del calentamiento sobre las formulaciones se procedió de la siguiente manera: cada formulación conteniendo AmB entre 1,3-1,5 mg/mL y 3,8 mg/mL de  $\beta$ CD-C16 fue fraccionada y cada alícuota se llevó a una temperatura determinada durante 1 h. Posteriormente, se hicieron diluciones de cada alícuota las cuales fueron evaluadas por DLS. Las diluciones realizadas fueron las mismas que las empleadas en los estudios por espectroscopia UV-Vis.



### 3.3.13. Caracterización morfológica de los agregados de $\beta$ CD-C16:AmB por microscopia de transmisión electrónica

La morfología de los agregados se evaluó por medio de microscopia de transmisión electrónica (TEM). Las muestras se prepararon depositando 2  $\mu$ L de una dispersión acuosa de los agregados de  $\beta$ CD-C16:AmB (concentración de AmB igual a 1,42 mg/mL) sobre rejillas de cobre recubiertas con una película de carbono, dejando que se sequen a temperatura ambiente. Para la observación de los agregados se utilizó una tinción negativa con acetato de uranilo 2% p/v en agua. Para ello se colocó una gota del agente de contraste sobre la grilla con las muestras ya secas. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio electrónico TEM-Jeol 1120 operado con un voltaje de aceleración de 80 kV.

### 3.3.14. Liofilización y reconstitución de las formulaciones $\beta$ CD-C16:AmB

Las formulaciones de  $\beta$ CD-C16:AmB fueron liofilizadas durante 78 h utilizando un equipo marca RIFICOR RT-8. La reconstitución de las formulaciones se realizó luego de 24 h de haber concluido con la liofilización. Las muestras liofilizadas fueron almacenadas a 4 °C. Posteriormente, el polvo fue reconstituido en diferentes medios tales como agua Milli Q, buffer PBS pH=7,4, solución de sacarosa 300 mOsm y NaCl 145 mM. La reconstitución se realizó mediante agitación manual. Para cuantificar la cantidad de  $\beta$ CD-C16:AmB presente en cada medio, se centrifugó y posteriormente, se tomaron 7  $\mu$ L del sobrenadante y se llevó a un volumen final de 1 mL con metanol.

### 3.3.15. Ensayo de hemólisis *in vitro* de los agregados $\beta$ CD-C16:AmB

La prueba de hemólisis *in vitro* se realizó con eritrocitos obtenidos de un voluntario sano en instalaciones de CEPROCOR. La sangre entera anticoagulada con K<sub>3</sub>EDTA se centrifugó durante 15 min a 2500 rpm desechando el sobrenadante (plasma y capa leucocitaria). A continuación, se tomaron 2 mL de eritrocitos a los cuales se les realizaron 3 lavados con 6 mL de una solución isotónica de NaCl 145 mM. Luego de cada lavado, se centrifugó la

solución obtenida a 1500 rpm durante 15 min. Posteriormente, se tomó 1 mL de los glóbulos rojos del pellet resultante y se lo llevó a un volumen final de 10 mL con la solución de NaCl 145 mM.

Posteriormente, se prepararon soluciones con un volumen de 0,2 mL de la suspensión de eritrocitos y 0,2 mL de las muestras a analizar y se incubaron a 37 °C en un baño termostático (Grant OLS 200) por una hora con una velocidad de agitación de 100 movimientos/min. Luego, las muestras se llevaron a 4 °C por 5 min para detener la hemólisis. Las muestras obtenidas, se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min, y el sobrenadante se diluyó 10 veces con una solución de NaCl 145 mM (tomando 100  $\mu$ L en un volumen final de 1000  $\mu$ L). Por último, se analizó la absorbancia de las soluciones a una longitud de onda de 576 nm donde absorbe la hemoglobina.

Además de analizar muestras de  $\beta$ CD-C16:AmB con diferentes concentraciones, se utilizó una solución de NaCl 145 mM como blanco donde no hay hemólisis, soluciones de  $\beta$ CD y  $\beta$ CD-C16 con concentración de 4 mg/mL en NaCl 145 mM y una muestra con H<sub>2</sub>O MilliQ donde se produce la hemólisis total. A partir de esta última muestra fue posible conocer el valor de absorbancia cuando se produce el 100% de la hemólisis. En la tabla 3-4 se resumen las muestras ensayadas.

**Tabla 3-4.:** Muestras utilizadas en el ensayo de hemólisis

<b>Muestra</b>	<b>Concentración</b>
<b>NaCl 145 mM</b>	
<b>H<sub>2</sub>O Milli-Q</b>	
<b><math>\beta</math>CD nativa</b>	4 mg/mL (3,5 mM)
<b><math>\beta</math>CD-C16</b>	4 mg/mL (4,3 mM)
<b><math>\beta</math> CD-C16 3,8 mg/mL</b>	AmB 0,5 mg/mL (0,54mM)
	AmB 0,8 mg/mL (0,86mM)
	AmB 1,0 mg/mL (1,08 mM)
	AmB 1,5 mg/mL (1,62 mM)

### **3.3.16. Liberación in vitro de AmB desde agregados auto-ensamblados de $\beta$ CD-C16:AmB**

Para el estudio de liberación *in vitro* de AmB se emplearon membranas de diálisis de celulosa benzoilada de 2000 Da MWCO activadas en un buffer de fosfato pH= 7,4 por 12 h. Luego de la activación las membranas se lavaron con agua Milli-Q. Se utilizaron celdas de Franz con un compartimento receptor de 20 mL que se llenó con diferentes soluciones (buffer PBS pH=7,4, agua Milli-Q, NaCl 145 mM y soluciones de albumina 300 mOsm) para actuar como medios receptores; el compartimento receptor se mantuvo con agitación constante. En el compartimiento donador se agregó 1 mL de los agregados auto-ensamblados  $\beta$ CD-C16:AmB con diferentes concentraciones, previamente incubados a 25°C o 60 °C. La temperatura utilizada durante el ensayo de liberación fue de 37 °C. Luego, en intervalos de tiempo específicos de 1, 2, 4, 6, 8, 24 y 48 h, se extrajeron 3 mL del medio de liberación y se analizó la concentración del fármaco mediante espectroscopia UV-Vis, donde 1 mL de la alícuota extraída se diluyó con 1 mL de metanol, esta solución se utilizó para cuantificar la AmB liberada. El volumen del medio receptor se mantuvo constante reemplazando la cantidad extraída en cada uno de los intervalos por medio fresco.

## **3.4. Resultados**

### **3.4.1. Determinación de la eficiencia de encapsulamiento de AmB en los agregados formados por $\beta$ CD-C16.**

Se procedió a evaluar la eficiencia con la que AmB se incorpora en los agregados de  $\beta$ CD-C16. Para ello se calculó el porcentaje de eficiencia de encapsulamiento (% EE) y el porcentaje de contenido de fármaco (%CF). Se debe destacar que las dispersiones coloidales obtenidas de  $\beta$ CD-C16:AmB son estables en el tiempo por al menos 2 semanas.

El %EE se expresa como la relación porcentual de la concentración de AmB (mg/mL o mM) que efectivamente quedó en la preparación (concentración experimental) con respecto a la concentración inicialmente agregada (concentración teórica) tal como se describe en la

ecuación 3-4. En la Tabla 3.4.1 se muestran los %EE obtenidos.

$$\%EE = \frac{\text{Concentración AmB determinada experimentalmente}}{\text{Concentración AmB teórica}} \times 100 \quad (3-4)$$

El %CF se calculó como la relación porcentual entre la concentración de AmB determinada experimentalmente respecto a la concentración de  $\beta$ CD-C16 empleada en la formulación. En todas las formulaciones la concentración de  $\beta$ CD-C16 fue igual a 3,8 mg/mL (2,37 mM). Este cálculo se realizó según se describe en la Ecuación 3-5. En la Tabla **3-5** se muestran los %CF obtenidos.

$$\%CF = \frac{\text{Concentración AmB determinada experimentalmente}}{\text{Concentración } \beta CD - C16} \times 100 \quad (3-5)$$

Como puede analizarse de la Tabla **3-5** el %EE es, en promedio, superior al 90 % lo cual indica una alta eficiencia de los agregados constituidos por  $\beta$ CD-C16 para incorporar AmB. Estos resultados son prometedores debido a que durante la preparación de la formulación sólo se pierde un pequeño porcentaje de la AmB añadida originalmente al sistema. Por ejemplo, para AmBisome<sup>®</sup> se ha informado que el porcentaje de incorporación a los liposomas es de 85-87 %.<sup>79</sup>

**Tabla 3-5.:** Porcentaje de eficiencia de encapsulamiento (%EE) y de contenido de fármaco (%CF) en los agregados auto-ensamblados  $\beta$ CD-C16:AmB.

	Concentración teórica de AmB en los agregados $\beta$ CD-C16:AmB		Concentración experimental de AmB en los agregados $\beta$ CD-C16:AmB		%EE		%CF				$X^{\beta CD-C16}$	$X^{AmB}$
	mg/mL	mM	mg/mL	mM								
<b>A</b>	$4,80 \times 10^{-2}$	0,052	$4,39 \times 10^{-2}$	0,047	91	$94 \pm 9$	1,2	$1,2 \pm 0,1$	2	$2,1 \pm 0,2$	0,98	0,02
			$4,20 \times 10^{-2}$	0,045	87		1,1		1,9		0,98	0,02
			$5,07 \times 10^{-2}$	0,055	105		1,3		2,3		0,97	0,03
<b>B</b>	$9,00 \times 10^{-2}$	0,098	$9,17 \times 10^{-2}$	0,099	101	101	2,4	2,4	4,2	4,2	0,96	0,04
<b>C</b>	$19,8 \times 10^{-2}$	0,215	$18,5 \times 10^{-2}$	0,2	93	$98 \pm 7$	4,9	$5,2 \pm 0,3$	8,4	$8,9 \pm 0,6$	0,93	0,07
			$20,5 \times 10^{-2}$	0,222	103		5,4		9,3		0,92	0,08
<b>D</b>	$40,2 \times 10^{-2}$	0,437	$35,1 \times 10^{-2}$	0,38	87	$89 \pm 3$	9,2	$9,5 \pm 0,4$	16	$16,5 \pm 0,6$	0,87	0,13
			$37,1 \times 10^{-2}$	0,4	92		9,8		16,9		0,87	0,13
<b>E</b>	$60,0 \times 10^{-2}$	0,653	$57,0 \times 10^{-2}$	0,616	95	$100 \pm 7$	15	$16 \pm 1$	26	$27 \pm 2$	0,81	0,19
			$63,4 \times 10^{-2}$	0,685	105		16,7		28,9		0,79	0,21
<b>F</b>	$81,0 \times 10^{-2}$	0,881	$74,5 \times 10^{-2}$	0,805	92	$95 \pm 4$	19,6	$20 \pm 1$	33,9	$35 \pm 2$	0,76	0,24
			$80,2 \times 10^{-2}$	0,867	98		21,1		36,6		0,75	0,25
<b>G</b>	$111,0 \times 10^{-2}$	1,21	$99,4 \times 10^{-2}$	1,074	89	$93 \pm 5$	26,1	$27 \pm 2$	45,3	$47 \pm 3$	0,71	0,29
			$111,3 \times 10^{-2}$	1,202	100		29,3		50,7		0,69	0,31
			$99,3 \times 10^{-2}$	1,073	89		26,1		45,3		0,71	0,29
<b>H</b>	$150,5 \times 10^{-2}$	1,63	$144,3 \times 10^{-2}$	1,56	96	$91 \pm 5$	38	$36 \pm 2$	65,8	$62 \pm 3$	0,6	0,4
			$136,2 \times 10^{-2}$	1,47	90		35,8		62,1		0,62	0,38
			$130,2 \times 10^{-2}$	1,41	86		34,2		59,3		0,63	0,37
<b>I</b>	$158,8 \times 10^{-2}$	1,72	$147,0 \times 10^{-2}$	1,59	92	$91 \pm 2$	38,7	$38 \pm 1$	67	$66 \pm 2$	0,6	0,4
			$142,1 \times 10^{-2}$	1,54	89		37,4		64,8		0,6	0,4
<b>J</b>	$160,5 \times 10^{-2}$	1,74	$144,5 \times 10^{-2}$	1,56	90	$86 \pm 6$	38	$36 \pm 2$	59,6	$60,0 \pm 0,6$	0,6	0,4

<sup>a</sup>Concentración de  $\beta$ CD-C16 3,8 mg/mL.

<sup>b</sup>Concentración de  $\beta$ CD-C16 2,37 mM.

Cuando se analiza el %CF, que contempla la relación entre los dos componentes del sistema, puede observarse que los agregados auto-ensamblados formados por  $\beta$ CD-C16 y AmB son capaces de incorporar y mantener de manera estable en dispersión coloidal a AmB en muy diferentes porcentajes relativos. En la Tabla **3-5** puede verse que la relación molar de AmB respecto a  $\beta$ CD-C16 varía desde un 2% a un 60%, es decir, los agregados de  $\beta$ CD-C16 pueden solubilizar AmB cuando  $\beta$ CD-C16 esta muy por encima de la cantidad de AmB, o cuando están en una proporción prácticamente 1:1. En la Tabla **3-5** se han incluido las fracciones molares de  $\beta$ CD-C16 ( $X^{\beta CD-C16}$ ) y de AmB ( $X^{AmB}$ ) de cada formulación para facilitar la interpretación de los datos.

### 3.4.2. Estado de agregación de AmB en las formulaciones

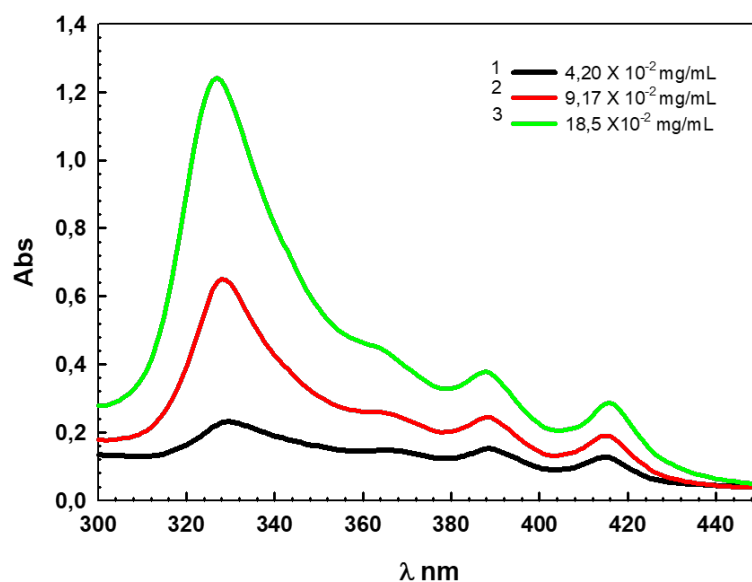
#### $\beta$ CD-C16:AmB por espectroscopia de absorción electrónica

La forma en que AmB se encuentra auto-asociada condiciona su toxicidad y eficiencia terapéutica.<sup>68,78,98,189</sup> A fin de conocer como es el estado de auto-asociación de AmB en los agregados  $\beta$ CD-C16:AmB, y compararlo con las formulaciones disponibles comercialmente, se analizaron los espectros de absorción UV-Vis. La concentración de AmB informada en los resultados corresponde a aquella determinada experimentalmente. Como se mencionó en la sección de Materiales y Métodos, debido a la alta concentración de AmB incorporada en los agregados  $\beta$ CD-C16:AmB y a su alto coeficiente de extinción, la medición directa de la absorbancia en la mayoría de las preparaciones no fue posible. Debido a ello fue necesario reducir el paso óptico o bien diluir con agua algunas de las preparaciones. En la Figura **3-6** se muestran los espectros de absorción de las formulaciones  $\beta$ CD-C16:AmB con concentraciones pequeñas de AmB que pudieron ser analizados sin diluirlos. También, en la Tabla **3-6** se muestran los máximos de absorción que presenta AmB en cada uno de ellos.

**Tabla 3-6.:** Máximos de absorción de agregados auto-ensamblados  $\beta$ CD-C16:AmB de preparaciones sin diluir mostrados en la Figura 3-6

Concentración AmB (mg/mL) <sup>a</sup>	$\lambda^I$	$\lambda^{II}$	$\lambda^{III}$	$\lambda^{IV}$
$4,20 \times 10^{-2}$	330	365	388	415
$9,17 \times 10^{-2}$	328	363	388	415
$18,5 \times 10^{-2}$	327	363	388	416

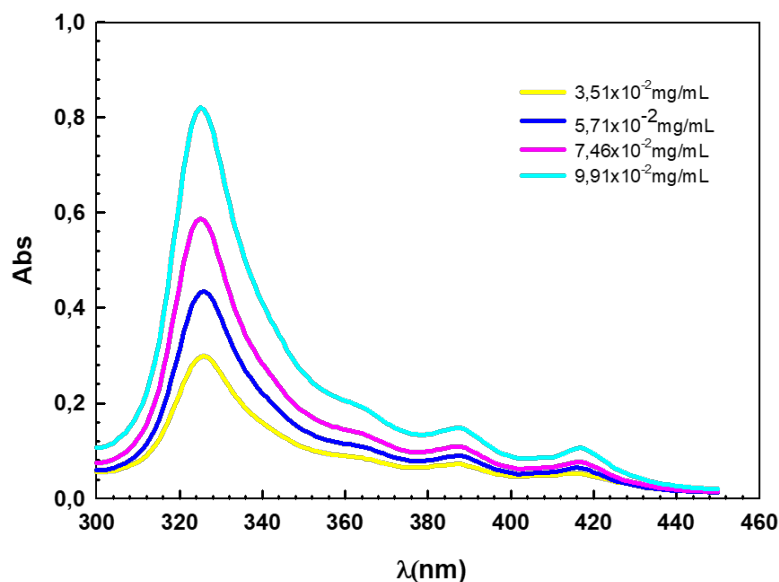
<sup>a</sup>La concentración de  $\beta$ CD-C16 igual a 3,8 mg/mL (2,37 mM).



**Figura 3-6.:** Espectros de absorción UV-Vis de agregados auto-ensamblados  $\beta$ CD-C16:AmB de formulaciones conteniendo AmB en concentraciones  $4,20 \times 10^{-2}$ ;  $9,17 \times 10^{-2}$ ;  $18,5 \times 10^{-2}$  mg/mL. La concentración de  $\beta$ CD-C16 es igual a 3,8 mg/mL (2,37 mM). Los espectros corresponden a formulaciones sin diluir y fueron obtenidos empleando una celda de paso óptico =1 mm.

En la Figura 3-7 se muestran los espectros de absorción de formulaciones  $\beta$ CD-C16:AmB que fueron diluidas dejando a  $\beta$ CD-C16 por encima de su CAC; en estos casos se tomaron 100  $\mu$ L de las formulaciones que contenían AmB con concentraciones experimentales de

$35,1 \times 10^{-2}$ ;  $57,0 \times 10^{-2}$ ;  $74,6 \times 10^{-2}$ ;  $99,3 \times 10^{-2}$  mg/mL y se llevaron a un volumen final de 1 mL de agua. Las concentraciones de AmB obtenidas luego de la dilución fueron  $3,51 \times 10^{-2}$ ;  $5,70 \times 10^{-2}$ ;  $7,46 \times 10^{-2}$ ;  $9,93 \times 10^{-2}$  mg/mL y la de  $\beta$ CD-C16 0,38 mg/mL (0,237 mM). En esta condición la concentración de  $\beta$ CD-C16 es 4 veces superior a su CAC. En la Tabla 3-7 se muestran los máximos de absorción que presenta AmB en estas diluciones.



**Figura 3-7.:** Espectros de absorción UV-Vis de agregados auto-ensamblados  $\beta$ CD-C16:AmB con concentraciones de AmB iguales a  $3,51 \times 10^{-2}$ ;  $5,70 \times 10^{-2}$ ;  $7,46 \times 10^{-2}$ ;  $9,93 \times 10^{-2}$  mg/mL. La concentración de  $\beta$ CD-C16 igual a 0,38 mg/mL (0,237 mM). Los espectros mostrados corresponden a diluciones de las formulaciones que contenían  $35,1 \times 10^{-2}$ ;  $57,0 \times 10^{-2}$ ;  $74,6 \times 10^{-2}$ ;  $99,3 \times 10^{-2}$  mg/mL de AmB. Paso óptico=1 mm.

En la Figura 3-8 se presentan los espectros de absorción correspondientes a las formulaciones  $\beta$ CD-C16:AmB que fueron diluidos dejando a  $\beta$ CD-C16 por debajo de su CAC; en estos casos se tomaron 14  $\mu$ L de las soluciones que contenían AmB en concentraciones iguales a  $4,20 \times 10^{-2}$ ;  $9,17 \times 10^{-2}$ ;  $18,5 \times 10^{-2}$  mg/mL y se diluyeron a un volumen final de 1 mL con agua. La concentración de  $\beta$ CD-C16 luego de la dilución es igual a 0,0532 mg/mL (33,2  $\mu$ M). En esta condición la relación de concentración de  $\beta$ CD-C16 es 0,53 respecto a



**Tabla 3-7.:** Máximos de absorción de agregados auto-ensamblados  $\beta$ CD-C16:AmB de preparaciones diluidas mostradas en la Figura 3-8

Concentración AmB (mg/mL) <sup>a</sup>	$\lambda^I$	$\lambda^{II}$	$\lambda^{III}$	$\lambda^{IV}$
$3,51 \times 10^{-2}$	326	363	387	416
$5,70 \times 10^{-2}$	326	363	388	416
$7,46 \times 10^{-2}$	325	363	387	417
$9,93 \times 10^{-2}$	326	363	387	417

<sup>a</sup>La concentración de  $\beta$ CD-C16 es igual a 0,38 mg/mL (0,237 mM).

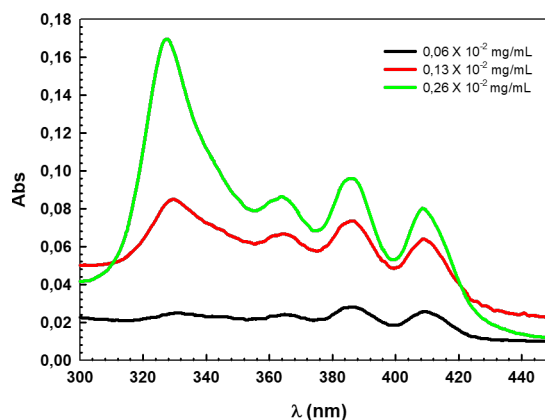
**Tabla 3-8.:** Máximos de absorción de agregados auto-ensamblados  $\beta$ CD-C16:AmB de preparaciones diluidas mostradas en la Figura 3-8.

Concentración AmB (mg/mL) <sup>a</sup>	$\lambda^I$	$\lambda^{II}$	$\lambda^{III}$	$\lambda^{IV}$
$0,26 \times 10^{-2}$	328	364	386	408
$0,13 \times 10^{-2}$	329	364	386	409
$0,06 \times 10^{-2}$	330	364	387	409

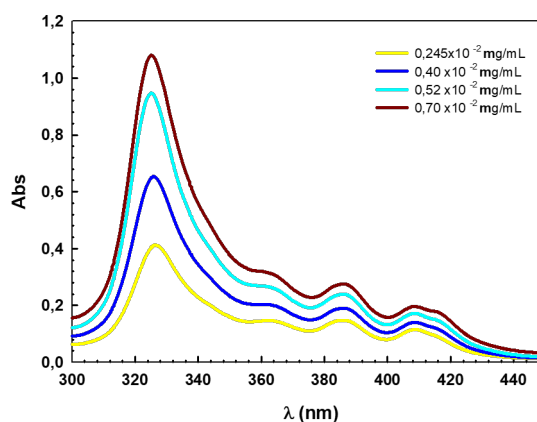
<sup>a</sup>La concentración de  $\beta$ CD-C16 es igual a 0,0532 mg/mL (33,2  $\mu$ M).

la CAC. En la Tabla 3-8 se muestran los máximos de absorción que presenta AmB en estas diluciones.

En la Figura 3-9 se presentan espectros de absorción correspondientes a las formulaciones de  $\beta$ CD-C16:AmB que también fueron diluidos por debajo de la CAC de  $\beta$ CD-C16. En esta oportunidad la concentración de  $\beta$ CD-C16, luego de la dilución, fue de 0,0266 mg/mL (16,6  $\mu$ M), donde la relación de concentración de  $\beta$ CD-C16 obtenida respecto a la CAC es de 0,25. Para estas diluciones se tomaron 7  $\mu$ L de las formulaciones que contenían concentraciones de AmB iguales a  $35,1 \times 10^{-2}$ ;  $74,5 \times 10^{-2}$ ;  $99,3 \times 10^{-2}$  mg/mL y se llevó a un volumen final de 1 mL con agua; la concentración de AmB en las diluciones realizadas fue de  $0,245 \times 10^{-2}$ ;  $0,40 \times 10^{-2}$ ;  $0,52 \times 10^{-2}$ ;  $0,70 \times 10^{-2}$  mg/mL. En la Tabla 3-9 se muestran los máximos de absorción que presenta AmB en estas diluciones.



**Figura 3-8.:** Espectros de absorción UV-Vis de agregados auto-ensamblados  $\beta$ CD-C16:AmB con concentraciones de AmB iguales a  $0,26 \times 10^{-2}$ ;  $0,13 \times 10^{-2}$ ;  $0,06 \times 10^{-2}$  mg/mL. La concentración de  $\beta$ CD-C16 igual a  $0,0532$  mg/mL ( $33,2 \mu\text{M}$ ). Los espectros mostrados corresponden a diluciones de las formulaciones que contenían  $4,20 \times 10^{-2}$ ;  $9,17 \times 10^{-2}$ ;  $18,5 \times 10^{-2}$  mg/mL de AmB. Paso óptico=1 cm.



**Figura 3-9.:** Espectros de absorción UV-Vis de agregados auto-ensamblados  $\beta$ CD-C16:AmB con concentraciones de AmB iguales a  $0,245 \times 10^{-2}$ ;  $0,40 \times 10^{-2}$ ;  $0,52 \times 10^{-2}$  y  $0,70 \times 10^{-2}$  mg/mL. La concentración de  $\beta$ CD-C16 igual a  $0,0266$  mg/mL ( $16,6 \mu\text{M}$ ). Los espectros mostrados corresponden a diluciones de las formulaciones que contenían  $35,1 \times 10^{-2}$ ;  $57,0 \times 10^{-2}$ ;  $74,5 \times 10^{-2}$ ;  $99,3 \times 10^{-2}$  mg/mL de AmB. Paso óptico=1 cm.

**Tabla 3-9.:** Máximos de absorción de agregados auto-ensamblados  $\beta CD$ -C16:AmB de preparaciones diluidas mostradas en la Figura 3-9.

Concentración AmB (mg/mL) <sup>a</sup>	$\lambda^I$	$\lambda^{II}$	$\lambda^{III}$	$\lambda^{IV}$	
$0,245 \times 10^{-2}$	326	360	385	408	416
$0,40 \times 10^{-2}$	325	360	386	408	416
$0,52 \times 10^{-2}$	325	360	385	408	416
$0,70 \times 10^{-2}$	325	360	386	408	416

<sup>a</sup>La concentración de  $\beta CD$ -C16 igual a 0,0266 mg/mL (16,6  $\mu M$ ).

Cuando se mide la absorbancia, en función del tiempo, de las formulaciones  $\beta CD$ -C16:AmB de soluciones que fueron diluidas y sin diluir no varía, lo cual es indicativo de que la concentración de AmB en la dispersión se mantiene constante. También, de los datos presentados puede deducirse que las preparaciones  $\beta CD$ -C16:AmB son muy estables al efecto de la dilución. La dilución de estas formulaciones entre 10 y 150 veces no induce la precipitación o pérdida de AmB, así como tampoco cambios en el estado de la auto-asociación del fármaco, lo cual se refleja en el espectro de absorción que se mantiene constante para todas las condiciones ensayadas.

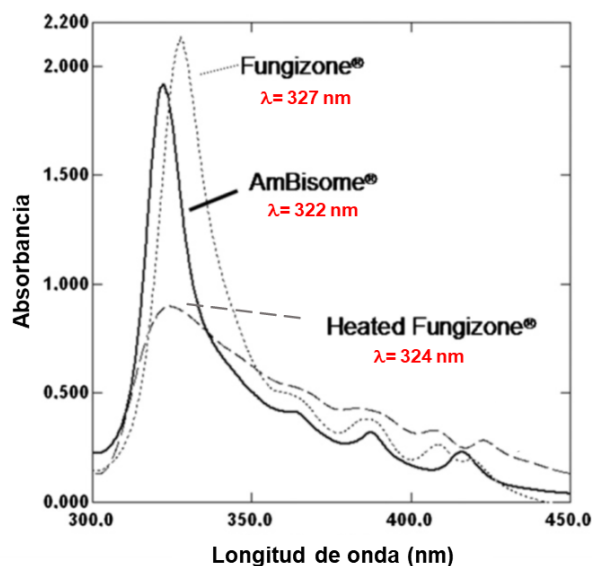
Estas propiedades de los agregados auto-ensamblados  $\beta CD$ -C16:AmB es sumamente interesante y la distingue de la forma comercial de referencia utilizada desde el año 1958, Fungizone<sup>®</sup>.<sup>68,78,81,85</sup> A pesar de la toxicidad aguda y crónica que genera Fungizone<sup>®</sup>, tal como se comentó anteriormente, éste se continua utilizando fundamentalmente por dos motivos, uno económico y porque además presenta una actividad óptima contra los microorganismos permitiendo tratamientos eficientes y relativamente cortos.<sup>68,81</sup> Fungizone<sup>®</sup> es una dispersión micelar que se administra por vía parenteral, está formada por la sal de sodio de deoxicolato (DOC) y AmB en una relación AmB:DOC 1:2.<sup>68,177</sup> Los valores informados para la concentración micelar crítica de DOC varían entre 2,4-6,5 mM.<sup>191,192</sup> Cuando Fungizone<sup>®</sup> es administrado, la dilución lleva a la disgregación de las micelas y a la continua pérdida de DOC desde las micelas AmB:DOC, lo cual conduce a la precipitación o a la aparición de formas insolubles de AmB en el organismo;<sup>97</sup> este efecto es uno de los principales responsables

de la nefrotoxicidad observada en pacientes tratados con esta formulación comercial.<sup>68,97,176</sup> Por otra parte, Fungizone<sup>®</sup> produce una alta toxicidad hemolítica asociada también al efecto de la disgregación de las micelas; diferentes autores han informado que AmB proveniente de Fungizone<sup>®</sup> en concentraciones de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  provoca un 90 % de hemólisis.<sup>78,79,81</sup> Se ha determinado que la velocidad de agregación de AmB se incrementa en tres órdenes de magnitud cuando la concentración de DOC se reduce de 20 mM a 1 mM, es decir frente a un factor de dilución de 20.<sup>68</sup>

Cuando se compara  $\beta\text{CD-C16:AmB}$  con formulaciones comerciales conteniendo AmB liposomal, tal como AmBisome<sup>®</sup> (vesículas unilamelares pequeñas), se encuentran diferencias y similitudes. En AmBisome<sup>®</sup> la AmB se integra en la bicapa lipídica del liposoma.<sup>67,68,79,84,177</sup> En los liposomas, a diferencia de lo que ocurre con las micelas, los monómeros (lípidos) no están en un equilibrio tan dinámico con la estructura supramolecular; esto hace que la estructura de los liposomas no se irrumpa o disgregue por efecto de la dilución. De esta manera AmB está continuamente solubilizada o contenida en la bicapa lipídica y así se evita su pérdida desde el transportador y, por lo tanto, la aparición de formas insolubles de AmB. La ganancia de estabilidad frente a la pérdida del fármaco desde el transportador es el factor clave responsable de la reducida toxicidad que presenta AmBisome<sup>®</sup>.<sup>67,77,79</sup> Respecto a la toxicidad hemolítica, AmBisome<sup>®</sup> produce un 5 % de hemólisis cuando se administra en una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; los autores de este trabajo atribuyen esta notable reducción en la hemólisis (respecto a Fungizone<sup>®</sup>) al hecho de que menos del 1 % del fármaco es liberado desde la formulación.<sup>67,79</sup> Es de destacar que en AmBisome<sup>®</sup> la forma predominante de AmB es la auto-asociada. En este sentido las formulaciones de  $\beta\text{CD-C16:AmB}$  se comportan de manera similar a AmBisome<sup>®</sup>.

En la Figura **3-10** se muestran los espectros de absorción UV-Vis de AmB presente en Fungizone<sup>®</sup>, Heated- Fungizone<sup>®</sup> (obtenido a partir de Fungizone<sup>®</sup> tratado a 70°C durante una hora) y AmBisome<sup>®</sup> así como sus máximos de absorción.<sup>85,97,193</sup>

Cuando se comparan los espectros de absorción de las formulaciones comerciales con los obtenidos para  $\beta\text{CD-C16:AmB}$  (ver Figuras **3-6** a **3-9**), se observa que el estado de auto-asociación de AmB en  $\beta\text{CD-C16:AmB}$  presenta máximos de absorción comparables a los



**Figura 3-10.:** Espectro de absorción UV-Vis de AmB presente en formulaciones de Fungizone® (···), Heated-Fungizone® (- - -), y AmBisome® (-). Figura adaptada de referencia.<sup>85</sup>

que muestra Fungizone® y Heated-Fungizone®. En el caso de las preparaciones de  $\beta$ CD-C16:AmB con la mayor dilución ( $\sim 1/150$ ) el máximo de absorción se desplaza ligeramente a longitudes de onda inferiores, respecto a las menos diluidas o sin diluir, siendo comparables a lo observado en Heated-Fungizone®.

Respecto a Heated-Fungizone, algunos autores han informado que el máximo de absorción de los super-agregados se encuentra ligeramente más desplazado hacia el azul llegando a 322-323 nm.<sup>78,97</sup> Se conoce que esta formulación resulta menos tóxica que Fungizone® lo cual es atribuido a la auto-asociación de AmB en super-agregados.<sup>78,85,97</sup> A la formulación de Heated-Fungizone se le atribuye una mejor estabilidad que la formulación sin calentar, lo que probablemente mejora la permanencia de AmB en las micelas y evita la pérdida del fármaco, lo que redundaría en una menor toxicidad conservando la actividad antimicrobiana.

En Fungizone® la formulación conteniendo 50 mg de AmB en una relación AmB:DOC 1:2 (50 mg (54  $\mu$ mol) de AmB y 100 mg (241  $\mu$ mol) de DOC) se diluye en 500 mL de solución de dextrosa al 5% y eso es lo que se utiliza como infusión intravenosa;<sup>176</sup> esa infusión contiene

0,1 mg/mL (0,22  $\mu$ M) de AmB y 0,2 mg/mL (0,4 mM) de DOC; es de notar que DOC se transfunde ya estando muy por debajo de su CMC.<sup>191,192</sup>

En AmBisome<sup>®</sup> la formulación conteniendo 50 mg de AmB posee también 213 mg de fosfatidilcolina de soja hidrogenada, 52 mg de colesterol, 84 mg de diestearoilfosfatidilglicerol y 0,64 mg de  $\alpha$ -tocoferol. El vial conteniendo los 50 mg de AmB se reconstituye con una solución de dextrosa al 5% para obtener una dilución con 0,5-2,0 mg/mL de AmB; esta infusión se administra en un período de 1-2 h.<sup>84</sup>

Haciendo una equivalencia con las condiciones en que se utiliza Fungizone<sup>®</sup> y AmBisome<sup>®</sup>, en nuestro caso 50 mg de AmB provenientes de la preparación que contiene 1,4 mg/mL irían acompañados de 137 mg (85  $\mu$ mol) de  $\beta$ CD-C16, si esto se diluyera en 500 mL quedaría 0,1 mg/mL (0,22  $\mu$ M) de AmB y 0,274 mg/mL (0,166 mM) de  $\beta$ CD-C16 situación en la cual  $\beta$ CD-C16 está en una concentración casi 3 veces superior a su CAC.

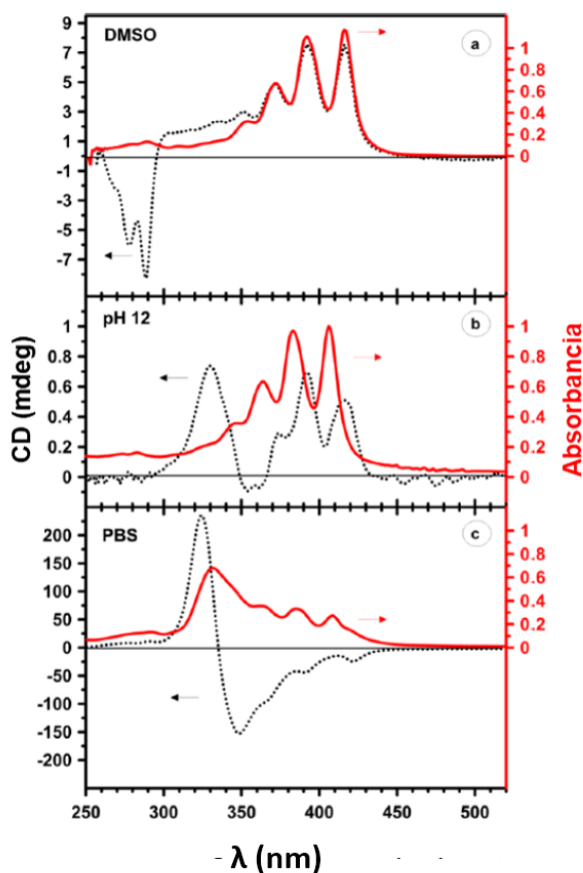
Los resultados hasta aquí obtenidos, con las formulaciones de  $\beta$ CD-C16:AmB, son prometedores considerando que los agregados auto-ensamblados  $\beta$ CD-C16:AmB pueden incorporar cantidades comparables o mayores de AmB que las utilizadas en las formulaciones comerciales,<sup>84,176</sup> son estables, en cuanto a que no se modifica su contenido de AmB en el tiempo, resisten el efecto de la dilución hasta diluciones de  $\sim 1/150$  sin la generación de formas insolubles de AmB y, además el fármaco se presenta en una forma auto-asociada comparable a la de Fungizone<sup>®</sup> que posee una muy buena bioactividad, y por ello sigue siendo la formulación de referencia de AmB; al presente Fungizone<sup>®</sup> continua siendo el mejor antifúngico disponible para el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas.<sup>97,194-196</sup> Por otra parte, contrario a Fungizone<sup>®</sup> en  $\beta$ CD-C16:AmB no se produce la liberación del fármaco desde el transportador supramolecular lo cual se sabe que conlleva a efectos tóxicos severos, por la formación de agregados insolubles de AmB.

### 3.4.3. Estado de agregación de AmB en las formulaciones

#### $\beta$ CD-C16:AmB por dicroísmo circular

Otra manera de estudiar la forma en que AmB se auto-asocia o auto-organiza, además de la espectroscopia de absorción electrónica, es mediante dicroísmo circular. La especie

monomérica de AmB y las diversas formas auto-asociadas originan muy diferentes espectros de dicroísmo circular (Figura 3-11), los cuales pueden utilizarse para inferir el estado de auto-asociación del fármaco.<sup>90,92,92,182,184,197-203</sup>



**Figura 3-11.:** Espectros de absorción UV-Vis (línea llena) y de dicroísmo circular (línea de punto) de AmB  $9,6 \mu\text{M}$  en (a) DMSO, (b) agua pH=12 y (c) buffer PBS pH=7,4. AmB se encuentra en forma monomérica en DMSO y en forma agregada en buffer PBS. En agua a pH=12 el espectro UV-Vis muestra sólo contribuciones de la especie monomérica en tanto que el espectro de dicroísmo circular muestra contribuciones de la especie monomérica y agregada de AmB. Figura adaptada de referencia.<sup>168</sup>

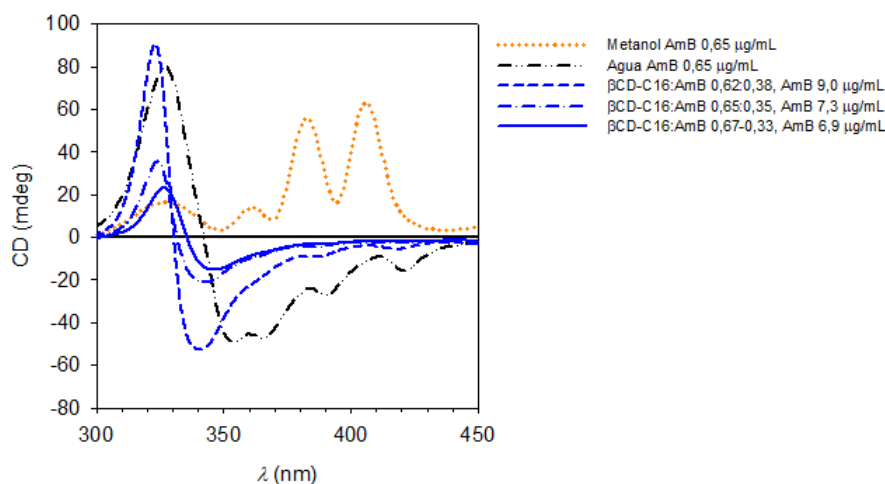
Así por ejemplo, Gruszecki y colaboradores pudieron determinar que AmB en agua a pH=12, en una concentración ( $9,6 \mu\text{M}$ ) tal que el espectro de absorción UV-Vis muestra

claramente la forma monomérica del fármaco, cuando se evalúa por dicroísmo circular AmB se presenta como una mezcla de las formas monomérica y auto-asociadas.<sup>92</sup> Por otra parte, el espectro de dicroísmo circular obtenido para AmB en DMSO muestra claramente a la especie monomérica y cuando el medio es agua a pH=7 (buffer PBS), se observa la forma auto-asociada de AmB en coincidencia con los espectros de absorción UV-Vis.<sup>92</sup> En la Figura **3-11** se muestran estos espectros.

En la Figura **3-12** se muestran los espectros de dicroísmo circular de AmB medidos en metanol, en agua y en agregados mixtos  $\beta$ CD-C16:AmB. Al igual que con los espectros de absorción UV-Vis fue necesario diluir las formulaciones  $\beta$ CD-C16:AmB obtenidas para evitar la saturación de las señales. En la Figura puede observarse que en agua (pH=6) AmB se encuentra agregada y el centro del doblete dicroico se presenta en 342 nm en acuerdo con lo informado en literatura. Por otra parte, en los agregados auto-ensamblados  $\beta$ CD-C16:AmB se observa un marcado corrimiento hacia el azul del centro del doblete dicroico localizándose en 331 nm para las formulaciones que contienen  $\beta$ CD-C16:AmB en fracciones molares iguales a 0,62:0,38 y 0,65:0,35 y en 336 nm para la que contiene 0,67:0,33. De acuerdo a lo mencionado anteriormente esto es un indicio, de que AmB en los agregados  $\beta$ CD-C16:AmB se encuentra auto-asociada en ensamblados pequeños, o bien que los cromóforos (polienos) en los auto-ensamblados mixtos se encuentran distanciados unos de otros.<sup>92</sup> Como se presentará en las siguientes secciones estas dos aseveraciones fueron puestas en evidencia por diferentes metodologías, como dispersión dinámica de luz, microscopia de transmisión electrónica y resonancia magnética nuclear.

En base a evidencia experimental y a cálculos computacionales en los que Czub y colaboradores han propuesto que la oligomerización, que conduce a formas auto-asociadas grandes de AmB, hace que se pierda la selectividad hacia la membrana de las células fúngicas. En agregados grandes de AmB la hidrofobicidad se incrementa y esto sería el principal factor que conlleva al aumento de interacciones no específicas con células de mamíferos.<sup>197</sup> Como se mencionó anteriormente, la selectividad de AmB depende del estado de agregación del fármaco. A bajas concentraciones, cuando sólo existe la forma monomérica, el fármaco tiene mayor tendencia a interactuar con membranas ricas en ergosterol (hongos), mientras que la





**Figura 3-12.:** Espectros de dicroísmo circular de AmB en metanol (...), en agua (-.-) y en agregados  $\beta CD-C16:AmB$  con  $X^{\beta CD-C16}:X^{AmB}$  iguales a 0,62-0,38 (- - -), 0,65:0,35 (-.-) y 0,67:0,33 (-) con las concentraciones de AmB indicadas en la Figura a 25°C.

penetración en membranas ricas en colesterol (mamíferos) ocurre a concentraciones mayores del fármaco cuando éste se encuentra en formas agregadas grandes (insolubles) como las encontradas en Fungizone<sup>®</sup> (agregados insolubles) En bibliografía se especula con que la oligomerización que lleva a formas altamente hidrofóbicas hace perder la selectividad entre membranas fúngicas y de mamíferos llevando a la generación de efectos tóxicos.<sup>197</sup>

#### 3.4.4. Caracterización de los agregados $\beta CD-C16:AmB$ por dispersión dinámica de luz y microscopía de transmisión electrónica

El diámetro promedio de los agregados  $\beta CD-C16:AmB$  fue determinado por dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés). Esta metodología, a través del cálculo de un diámetro hidrodinámico, provee información acerca del tamaño promedio de partícula y la distribución de tamaños, pero no brinda datos sobre la morfología. Por su parte, la microscopía de transmisión electrónica (TEM, por sus siglas en inglés) permite realizar una caracterización morfológica de las dispersiones coloidales proveyendo valiosa información complementaria a la obtenida por DLS.

El diámetro hidrodinámico de los agregados de  $\beta$ CD-C16 y  $\beta$ CD-C16:AmB en solución acuosa se muestra en la Tabla **3-10**. Los agregados formados por  $\beta$ CD-C16, con una concentración de 3,8 mg/mL (2,37 mM), presentan una población mayoritaria cuyo diámetro hidrodinámico medio es de 11,6 nm y una abundancia relativa del 95 %; también se observa otra población de 66 nm cuya abundancia es de aproximadamente el 5 %. La longitud de la molécula de  $\beta$ CD-C16 completamente extendida es de  $\sim$ 3,6 nm (estimado con Chem3D Ultra). En nuestro laboratorio se estudiaron los agregados formados por una ciclodextrina anfílica análoga a  $\beta$ CD-C16, pero que contiene una cadena hidrocarbonada más corta (con 6 grupos metileno menos,  $\beta$ CD-C10). La CAC de  $\beta$ CD-C10 es igual a 0,17 mM y el diámetro hidrodinámico de sus agregados fue de 49 nm siendo la concentración usada en la determinación 3 mM a un pH= 10,6.<sup>56</sup>

Respecto a las formulaciones conteniendo  $\beta$ CD-C16:AmB, se observó también una población mayoritaria con diámetros de entre 13 y 49 nm junto a otras dos poblaciones de mayor tamaño  $\sim$ 65-95 nm y  $\sim$ 150-300 nm cuyos porcentajes son inferiores al 5 %, ver Tabla **3-10**. Aquí se debe recordar que las dispersiones de  $\beta$ CD-C16:AmB, medidas por DLS, corresponden a diluciones de las formulaciones en donde  $\beta$ CD-C16 se encuentra por debajo de su CAC. Se midieron las diluciones por dos motivos fundamentalmente: uno fue para conocer cómo se encuentran los agregados mixtos  $\beta$ CD-C16:AmB en una situación representativa respecto a la concentración que debería ser administrada por vía parenteral; el otro fue evitar el uso excesivo de AmB debido a su alto costo. A partir de estos resultados se puede concluir que la dilución de las dispersiones no conduce a la desagregación de los sistemas auto-ensamblados  $\beta$ CD-C16:AmB tal como ocurre con Fungizone<sup>®</sup>; esto también fue puesto de manifiesto mediante los estudios realizados por espectroscopia UV-Vis y de dicroísmo circular que muestran que AmB permanece solubilizada en medio acuoso luego de diluir los agregados auto-ensamblados. Además, los datos obtenidos por DLS muestran que la presencia de AmB en los agregados mixtos no modifica substancialmente el tamaño respecto de aquellos formados sólo por la ciclodextrina anfílica. También, el aumento en la concentración del fármaco, frente a una cantidad constante de  $\beta$ CD-C16, no ocasiona una modificación considerable en el tamaño o en la distribución de las poblaciones observadas.

**Tabla 3-10.:** Diámetros hidrodinámicos promedios obtenidos por DLS para diferentes agregados auto-ensamblados  $\beta$ CD – C16:AmB.

$X_{\beta CD-C16} : X_{AmB}$	AmB	$\beta CD - C16$		Diámetro promedio de los agregados (nm), porcentaje en número (%) e índice de polidispersidad (PDI) <sup>a</sup>								
	mg/mL	mg/mL	mM	nm	%	PDI	nm	%	PDI	nm	%	PDI
1,00:0,00	-	0,38	2,37	11,6 ± 0,7	95,2	0,004	66 ± 9	4,4	0,02	247 ± 24	0,4	0,009
0,98 : 0,02 <sup>b</sup>	0,058 × 10 <sup>-2</sup>	5,32 × 10 <sup>-2</sup>	3,32 × 10 <sup>-2</sup>	20 ± 3	79,2	0,02	65 ± 8	19,4	0,02	231 ± 27	1,3	0,01
0,96 : 0,04 <sup>b</sup>	0,124 × 10 <sup>-2</sup>	5,32 × 10 <sup>-2</sup>	3,32 × 10 <sup>-2</sup>	22 ± 2	90,2	0,008	83 ± 12	9,2	0,02	277 ± 28	0,6	0,01
0,91 : 0,09 <sup>b</sup>	0,124 × 10 <sup>-2</sup>	5,32 × 10 <sup>-2</sup>	3,32 × 10 <sup>-2</sup>	49 ± 7	93,6	0,02				202 ± 22	6,4	0,01
0,84:0,16 <sup>c</sup>	0,245 × 10 <sup>-2</sup>	2,66 × 10 <sup>-2</sup>	1,66 × 10 <sup>-2</sup>	13 ± 1	94,8	0,006	74 ± 11	4,9	0,02	312 ± 27	0,3	0,007
0,80:0,20 <sup>c</sup>	0,399 × 10 <sup>-2</sup>	2,66 × 10 <sup>-2</sup>	1,66 × 10 <sup>-2</sup>	14 ± 2	96,9	0,02	80 ± 9	2,9	0,01	298 ± 25	0,2	0,007
0,74:0,26 <sup>c</sup>	0,521 × 10 <sup>-2</sup>	2,66 × 10 <sup>-2</sup>	1,66 × 10 <sup>-2</sup>	36 ± 5	95,8	0,02				185 ± 20	4,2	0,01
0,67:0,33 <sup>c</sup>	0,693 × 10 <sup>-2</sup>	2,66 × 10 <sup>-2</sup>	1,66 × 10 <sup>-2</sup>	24 ± 3	99,7	0,02	95 ± 8	0,3	0,007			
0,65:0,35 <sup>c</sup>	0,914 × 10 <sup>-2</sup>	2,66 × 10 <sup>-2</sup>	1,66 × 10 <sup>-2</sup>	10,9 ± 0,8	99,8	0,005				147 ± 13	0,2	0,008
0,62:0,38 <sup>c</sup>	1,01 × 10 <sup>-2</sup>	2,66 × 10 <sup>-2</sup>	1,66 × 10 <sup>-2</sup>	17 ± 2	99,6	0,01				239 ± 29	0,4	0,01

<sup>a</sup>  $PDI = \left( \frac{SD}{\text{Diámetro promedio}} \right)^2$  donde SD: es la desviación estándar. Ulf Nobbmann, PDI from an individual peak in DLS, Malvern Panalytical 2015.

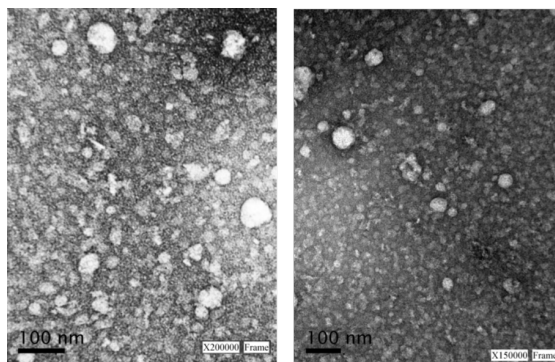
<sup>b</sup> Las concentraciones de AmB y  $\beta$ CD-C16 corresponden a la de la solución obtenida a partir de agregar 14  $\mu$ L de la formulación resultante de la diálisis en un volumen final de 1 mL de agua. En esta dilución la relación de concentración de  $\beta$ CD-C16 respecto a su CAC es 0,53.

<sup>c</sup> Las concentraciones de AmB y  $\beta$ CD-C16 corresponden a la de la solución obtenida a partir de agregar 7  $\mu$ L de la formulación resultante de la diálisis en un volumen final de 1 mL de agua. En esta dilución la relación de concentración de  $\beta$ CD-C16 respecto a su CAC es 0,25.

De acuerdo a lo informado en la literatura, para capitalizar el efecto conocido como EPR (*Enhanced Permeability and Retention effect*) un transportador de fármacos debe estar dentro de un estrecho intervalo de tamaños comprendido aproximadamente entre los 10 nm y 100 nm. Las entidades más pequeñas a 10 nm son rápidamente eliminadas por riñón o por extravasación, en tanto aquellas entidades mayores a  $\sim 100$ -200 nm son eliminadas por el sistema retículo endotelial.<sup>204</sup> El diámetro promedio que poseen los agregados auto-ensamblados  $\beta$ CD-C16:AmB está dentro de lo que es considerado deseable para un transportador de fármacos.

Cuando se compara el tamaño de los agregados de  $\beta$ CD-C16:AmB con los de Fungizone<sup>®</sup>, Heated-Fungizone<sup>®</sup> y AmBisome<sup>®</sup> se observa que son más pequeños que los de estas formulaciones comerciales. Para Fungizone<sup>®</sup> se han informado diámetros hidrodinámicos muy variados de 0,035 nm<sup>205</sup>, 139 nm,<sup>85</sup> 80-100 nm<sup>68</sup>,  $< 0,4 \mu\text{m}$ ,<sup>177</sup> para Heated-Fungizone<sup>®</sup> de 1,9  $\mu\text{m}$  o mayores<sup>85,97</sup> (el gran tamaño de los agregados formados en Heated-Fungizone<sup>®</sup> es lo que originó el nombre de super-agregados para la forma auto-asociada de AmB que se observa en esta formulación), en tanto que AmBisome<sup>®</sup> tiene tamaños de entre 80-100 nm.<sup>79,177,205,206</sup>

En la Figura 3-13 se muestran micrografías obtenidas por TEM correspondientes a la formulación sin diluir que contiene 1,5 mg/mL de AmB y  $X^{\beta\text{CD}-\text{C16}}:X^{\text{AmB}}$  0,62:0,38. En la micrografía pueden observarse estructuras mayormente esféricas de pequeño tamaño así como también estructuras cuyos diámetros son mayores.

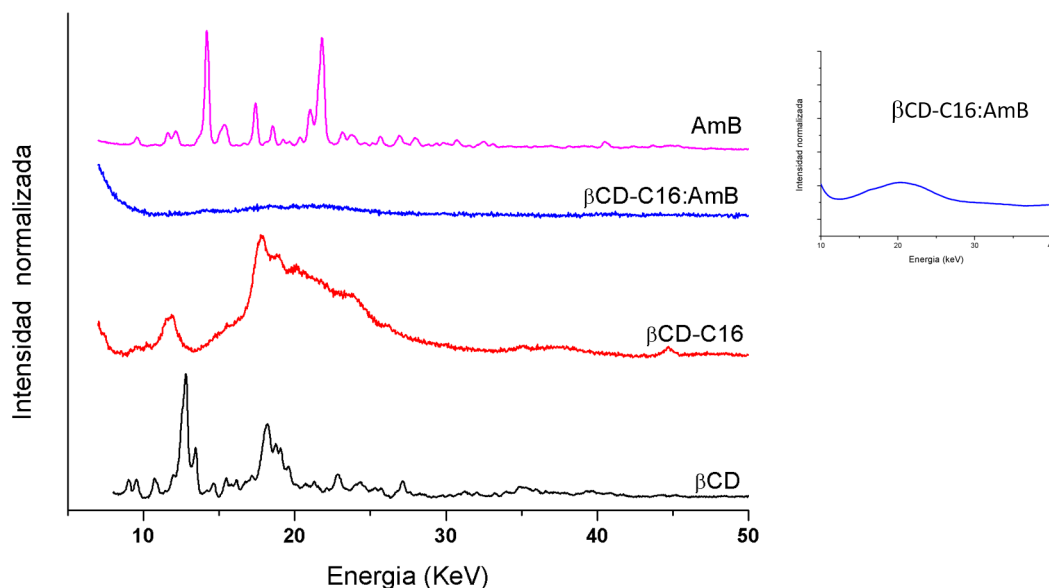


**Figura 3-13.:** Imagen de TEM de los agregados autoensamblados  $X^{\beta\text{CD}-\text{C16}}:X^{\text{AmB}}$  conteniendo 1,5 mg/mL de AmB y  $X^{\beta\text{CD}-\text{C16}}:X^{\text{AmB}}$  0,62:0,38.

Las imágenes de TEM, al igual que los datos obtenidos por DLS, muestran un predominio de las estructuras pequeñas siendo los diámetros observados por TEM próximos a los obtenidos por DLS.

### 3.4.5. Caracterización de los agregados de $\beta$ CD-C16:AmB por difracción de rayos X en polvo

Se analizó el patrón de rayos X en polvo (PXRD, por sus siglas en inglés) de muestras sólidas de  $\beta$ CD-C16, de AmB,  $\beta$ CD nativa y del agregado auto-ensamblado  $\beta$ CD-C16:AmB que contiene 1,5 mg/mL de AmB y  $X^{\beta CD-C16}:X^{AmB}$  0,62:0,38. En esta oportunidad una vez obtenida la formulación  $\beta$ CD-C16:AmB fue liofilizada a fin de obtener un sólido que permita realizar el análisis. Más adelante en este capítulo se aborda con mayor detalle la liofilización de los agregados de  $\beta$ CD-C16:AmB. En la Figura 3-14 se muestran los patrones de difracción de rayos X obtenidos.



**Figura 3-14.:** Patrones de difracción de rayos X en polvo de AmB (*violeta*),  $\beta$ CD-C16-AmB (0,6:0,4) (*azul*),  $\beta$ CD-C16 (*rojo*)  $\beta$ CD (*negro*).

A partir del difractograma se observa que AmB posee un gran porcentaje de cristalini-

dad. Las principales señales se observan en ángulos  $2\theta$  iguales a  $14,16^\circ$ ,  $17,41^\circ$  y  $21,78^\circ$ ; el patrón observado coincide con los valores informados en la literatura.<sup>207</sup> A fines comparativos también se incluyó el patrón de difracción de  $\beta$ CD-C16 y de  $\beta$ CD. La formulación  $\beta$ CD-C16:AmB (liofilizada) no muestra las señales características de sus componentes individuales, indicando que la AmB ya no está presente como material cristalino sino que se encuentra en estado amorfo.<sup>208</sup>

### 3.4.6. Caracterización de los agregados de $\beta$ CD-C16:AmB por espectroscopia FT-IR

Se caracterizó mediante espectroscopia infrarroja a AmB, a  $\beta$ CD-C16, al agregado  $\beta$ CD-C16:AmB con composición  $X^{\beta CD-C16}:X^{AmB}$  0,68:0,32 y a la mezcla mecánica formada por  $\beta$ CD-C16 y AmB en igual proporción que la formulación anterior. Para este análisis se utilizó un agregado de  $\beta$ CD-C16:AmB que fue liofilizado y se resuspendió en  $D_2O$  a fin de evitar que las señales del  $H_2O$  interfirieran en las regiones de  $3000-3600\text{ cm}^{-1}$  y  $1500-1650\text{ cm}^{-1}$  que es donde se encuentran las bandas de estiramiento ( $\nu$ ) y de deformación ( $\delta$ ) de los grupos  $-OH$  y  $-NH_2$ .<sup>209,210</sup>

Las moléculas de  $\beta$ CD-C16 y AmB tienen en común numerosos grupos funcionales tales como hidroxilos, carbonilos, enlaces glicosídicos C-O-C (de  $\beta$ CD y micosamina), metinos, metilenos, metilos, entre otros, en tanto que el grupo  $-NH_2$  se encuentra presente sólo en AmB. Las diferencias encontradas para el agregado  $\beta$ CD-C16:AmB, respecto a los componentes individuales, en la mayoría de las regiones del espectro IR son pequeñas (cerca de la resolución del equipo FT-IR utilizado) o bien difíciles de atribuir de manera certera, a excepción de las correspondientes al grupo amino. Debido a ello el análisis presentado se centra mayormente en las diferencias encontradas en las señales de este grupo funcional presente en la micosamina del fármaco. La asignación completa de las señales obtenidas en los espectros se corresponde con la informada en bibliografía para AmB<sup>211</sup> y  $\beta$ CD-C16<sup>141</sup>.

En la Figura **3-15** se muestran los espectros obtenidos y en la Tabla **3-11** se detallan las frecuencias en las que aparecen las señales correspondientes al grupo amino de AmB en las diferentes muestras analizadas.

Las señales debidas a la deformación simétrica ( $\delta_s$ ) del grupo  $-\text{NH}_2$  que se superpone con la del estiramiento asimétrico ( $\nu_{as}$ ) del grupo  $-\text{COO}^-$  en AmB como en la mezcla mecánica  $\beta$ CD-C16 y AmB se observan a la misma frecuencia. Lo mismo sucede para la deformación asimétrica ( $\delta_{as}$ ) del grupo  $-\text{NH}_2$ , ver Tabla **3-11**. Cuando se comparan las señales del grupo  $-\text{NH}_2$  de AmB presente en los agregados  $\beta$ CD-C16:AmB con los de AmB pura o la mezcla mecánica se observa que la señal correspondiente a la  $\delta_s$  del grupo  $-\text{NH}_2$  presenta un desplazamiento de  $12 \text{ cm}^{-1}$  para la muestra suspendida en  $\text{D}_2\text{O}$ , y de  $11 \text{ cm}^{-1}$  para la muestra suspendida en  $\text{D}_2\text{O}$  que posteriormente fue deshidratada. Respecto a la  $\delta_{as}$  del grupo  $-\text{NH}_2$  ésta se encuentra muy disminuida y desplazada en  $20 \text{ cm}^{-1}$  en el agregado suspendido en  $\text{D}_2\text{O}$  y no se observa en el agregado deshidratado. Estos hallazgos son una clara evidencia de que el entorno en el que se encuentra la micosamina es diferente en los agregados auto-ensamblados respecto a la mezcla mecánica sugiriendo que esta región está implicada de alguna manera en el establecimiento de interacciones en la estructura supramolecular formada muy probablemente por enlaces puentes hidrógenos entre los carbohidratos de  $\beta$ CD-C16 y AmB.

**Tabla 3-11.**: Número de onda de las señales de deformación correspondientes al grupo amino de AmB presente en diferentes muestras.

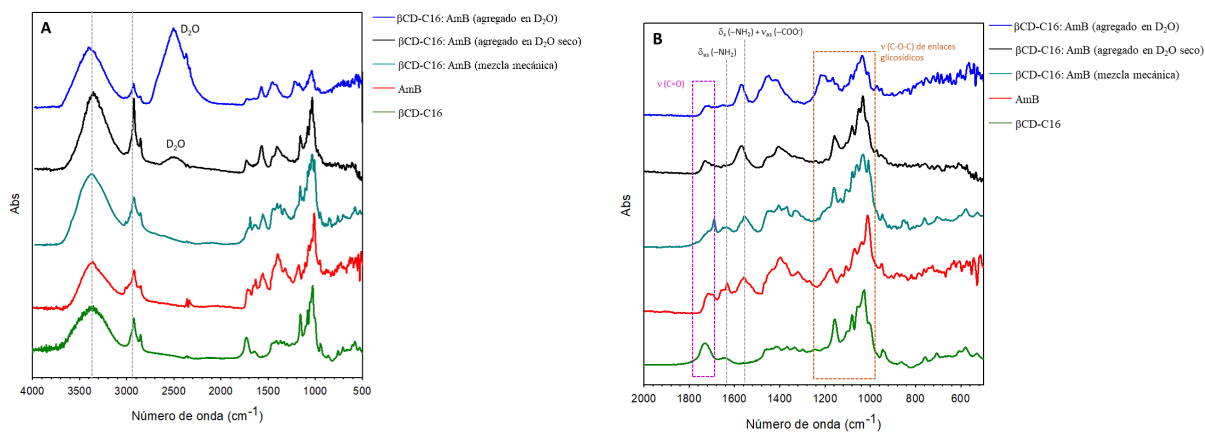
Muestra	Número de Onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	
	$\delta_s$ ( $-\text{NH}_2$ ) + $\nu_{as}$ ( $-\text{COO}^-$ )	$\delta_{as}$ ( $-\text{NH}_2$ )
<b>AmB</b>	1557	1632
$\beta$ CD-C16:AmB mezcla mecánica	1558	1635
$\beta$ CD-C16:AmB en $\text{D}_2\text{O}$	1569	1652
$\beta$ CD-C16:AmB en $\text{D}_2\text{O}$ (muestra en polvo) <sup>a</sup>	1568	<sup>b</sup>

<sup>a</sup>La muestra resuspendida en  $\text{D}_2\text{O}$  se dejó secar y posteriormente se adquirió el espectro FT-IR.

<sup>b</sup> No se observa señal.

Otras regiones en donde se observan cambios en el espectro de los agregados, respecto a los componentes puros, son aquellas de los grupos carbonilos y enlaces glicosídicos (C-O-C).

El  $\nu(\text{C}=\text{O})$  de  $\beta\text{CD-C16}$  se encuentra en  $1726\text{ cm}^{-1}$  y el de AmB en  $1715\text{ cm}^{-1}$  (esta señal corresponde a los carbonilos del éster y cetona),<sup>211</sup> en tanto que en el agregado suspendido en  $\text{D}_2\text{O}$  y deshidratado se observan en aproximadamente  $1730\text{ cm}^{-1}$ . La región de los enlaces glicosídicos ubicada en  $\sim 1000\text{-}1180\text{ cm}^{-1}$  presenta cambios notables en el perfil del espectro, especialmente en el de la muestra que se encuentra suspendida en  $\text{D}_2\text{O}$ .



**Figura 3-15.:** Espectros de absorción FT-IR (A) del agregado  $\beta\text{CD-C16:AmB}$  suspendido en  $\text{D}_2\text{O}$  (*azul*), agregado  $\beta\text{CD-C16:AmB}$  suspendido en  $\text{D}_2\text{O}$  y posteriormente deshidratado (*negro*), mezcla mecánica  $\beta\text{CD-C16:AmB}$  (*celeste*), AmB (*rojo*) y  $\beta\text{CD-C16}$  (*verde*). (B) se muestra una región ampliada de los espectros. Los agregados auto-ensamblados y la mezcla mecánica tienen una composición igual a  $X^{\beta\text{CD-C16}}:X^{\text{AmB}}$  0,62:0,38.

### 3.4.7. Caracterización de los agregados de $\beta\text{CD-C16:AmB}$ por resonancia magnética nuclear

Los agregados auto-ensamblados  $\beta\text{CD-C16:AmB}$  y los componentes individuales fueron estudiados por resonancia magnética nuclear (RMN). En la Figura 3-16 se muestra el espectro de  $^1\text{H}$  RMN de AmB disuelta en  $\text{DMSO-d}_6$  así como también la asignación de las principales señales, las cuales se corresponden con lo informado en bibliografía.<sup>83,212</sup> El espectro en  $\text{D}_2\text{O}$  no pudo obtenerse debido a la baja solubilidad del fármaco en este medio. El espectro de  $^1\text{H}$  RMN de  $\beta\text{CD-C16}$  y su asignación se encuentra en la Figura 3-17.



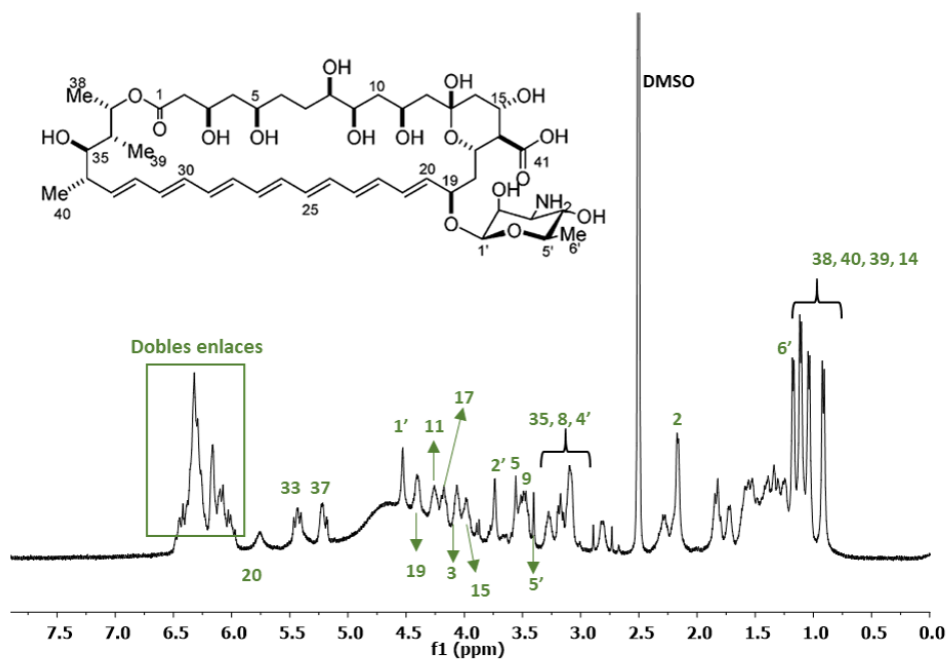


Figura 3-16.: Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de AmB 9 mg/mL en  $\text{DMSO-d}_6$  (400,13 MHz).

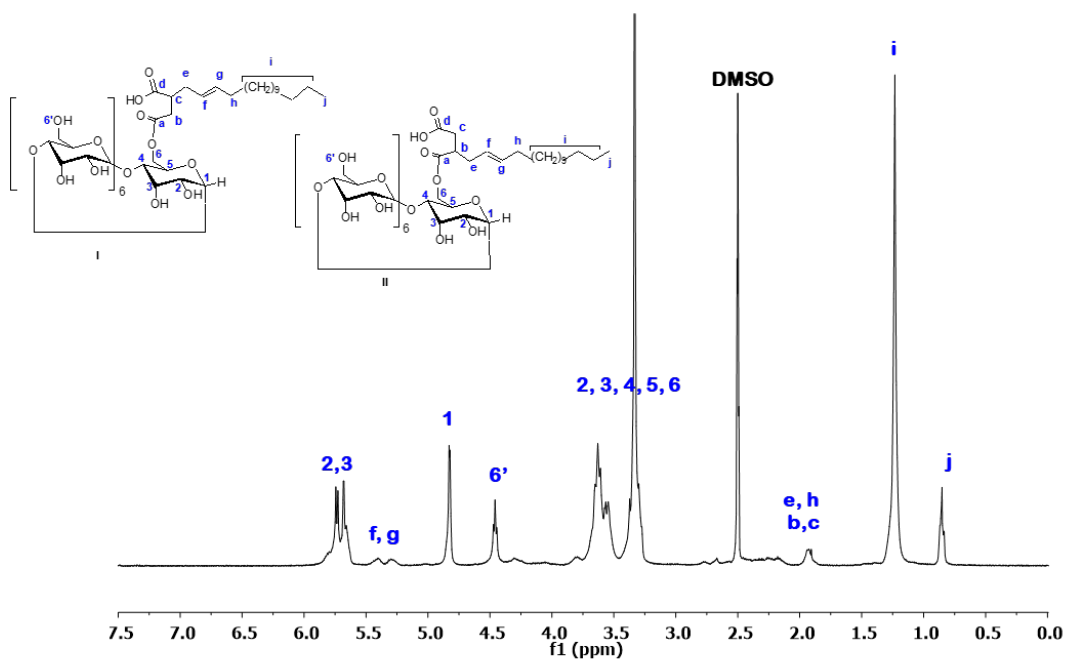
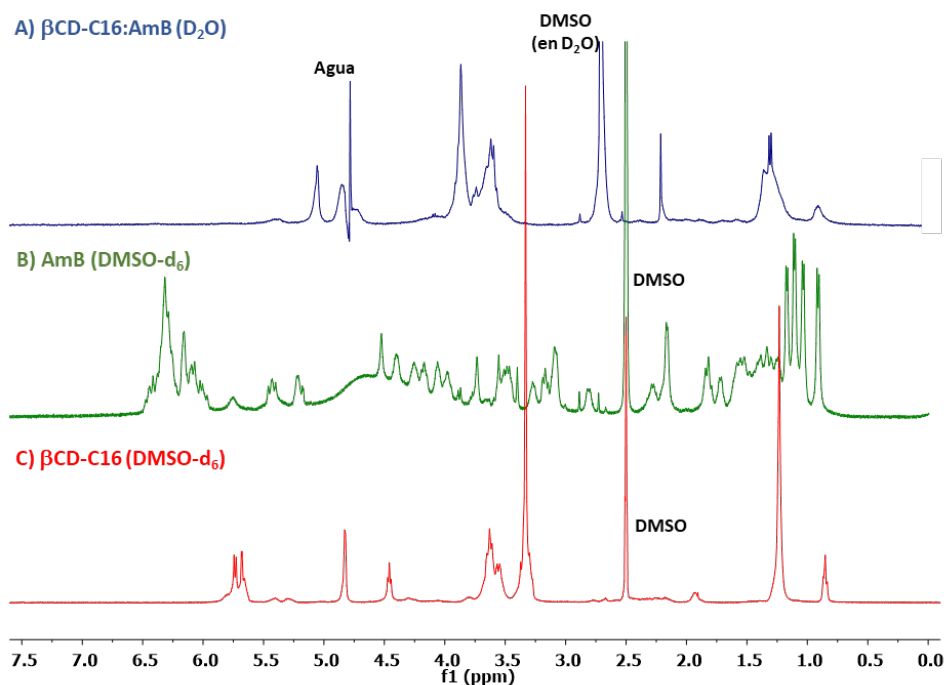


Figura 3-17.: Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de  $\beta$ CD-C16 en  $\text{DMSO-d}_6$  (400,13 MHz).

En la Figura 3-18 se compara el espectro de  $^1\text{H}$  RMN obtenido para el agregado  $\text{X}^{\beta\text{CD}-\text{C16}}:\text{X}^{\text{AmB}}$  0,62:0,38 en agua deuterada con el de los constituyentes individuales obtenidos en  $\text{DMSO-d}_6$ . El espectro del agregado fue obtenido suprimiendo la señal del  $\text{H}_2\text{O}$  en  $\text{D}_2\text{O}$  para evitar el solapamiento de señales y mejorar la relación señal/ruido. Debido a la baja concentración de AmB en la muestra del agregado ( $\sim 1,4$  mg/mL) la resolución del espectro no es la óptima, sin embargo permite obtener información relevante.

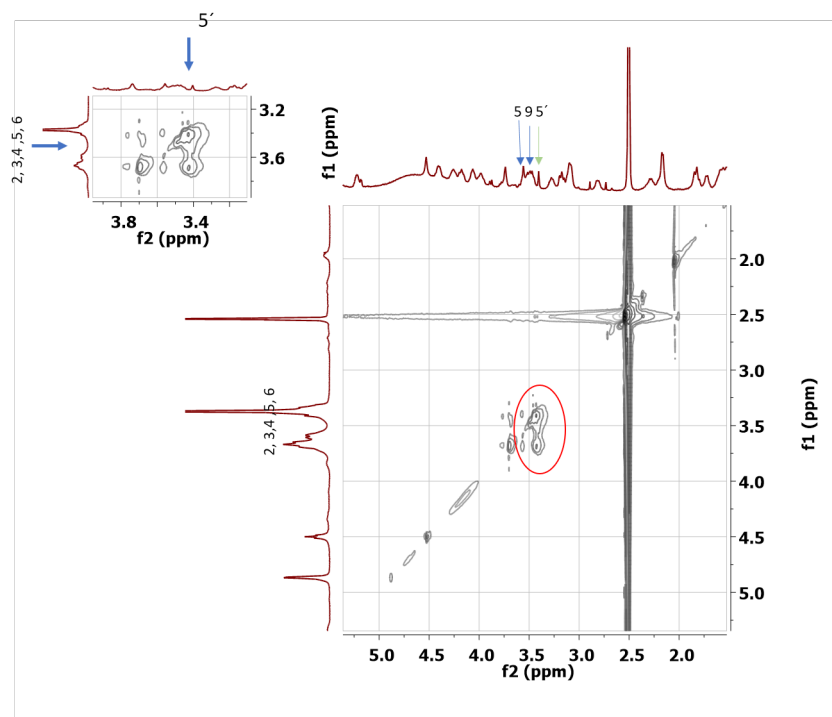


**Figura 3-18.:** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de A)  $\beta\text{CD-C16}:\text{AmB}$  en fracciones molares 0,62:0,32 en  $\text{D}_2\text{O}$ , B) AmB en  $\text{DMSO-d}_6$  y C)  $\beta\text{CD-C16}$  en  $\text{DMSO-d}_6$  (400,13 MHz).

En la Figura 3-18 se observa que en el espectro del agregado  $\beta\text{CD-C16}:\text{AmB}$  no están presentes los protones correspondientes a los grupos hidroxilo y amino debido a que éstos se intercambian con el solvente. Por otra parte, es de notar que en el agregado están ausentes las señales correspondientes a los protones dobles enlaces de AmB, que se observan en  $\sim 6,0-6,5$  ppm cuando AmB está disuelta en  $\text{DMSO-d}_6$ . Es conocido que en micelas y otros sistemas supramoleculares las señales de los protones que se encuentran en el corazón hidrofóbico de la estructura experimentan diferentes formas de relajación; esto tiene como consecuencia la desaparición o gran disminución en la intensidad de las señales de los protones que

se encuentran en esa región. Estas señales no pueden ser detectadas por RMN en estado líquido debido a que se encuentran en un estado más bien del tipo sólido (solid-like).<sup>213,214</sup> Este resultado es un indicio de que los dobles enlaces de AmB se encuentran en el corazón hidrofóbico del agregado y que éste presenta características del tipo solid-like.

A fin de conocer como interaccionan en el espacio  $\beta CD$ -C16 y AmB se realizaron espectros 2D RMN del tipo ROESY (Rotating-Frame Nuclear Overhauser Effect Correlation Spectroscopy). Los espectros ROESY son sumamente útiles para indagar cómo interaccionan protones que se encuentran próximos espacialmente.<sup>215</sup> Este tipo de experimento es frecuentemente utilizado para elucidar interacciones supramoleculares, en especial interacciones de complejos del tipo huésped-receptor tales como los formados por ciclodextrinas.<sup>216-218</sup> En la Figura 3-19 se muestra el espectro ROESY de  $\beta CD$ -C16:AmB en fracciones molares 0,62:0,32.



**Figura 3-19.:** Espectro ROESY de los agregados autoensamblados de  $\beta CD$ -C16:AmB (0,62:0,38) (A) ampliación en los protones de la cavidad de  $\beta CD$ -C16 a 400 MHz en  $D_2O$  (B).

El espectro del agregado  $\beta CD$ -C16:AmB (0,62:0,38) presenta una señal de cruce corres-

pondientes al proton del carbono 5 de la molécula de la micosamina que aparece a 3,45 ppm y los protones de la cavidad  $\beta CD$ -C16 (H 3 y H 5 a 3,63 - 4,06 ppm) mostrando una posible inclusión de la micosamina en la cavidad de la ciclodextrina. La interacción entre micosamida y  $\beta CD$ -C16 proporcionaría estabilidad a la estructura del agregado.<sup>219</sup>

Para confirmar fehacientemente las interacciones observadas por ROESY se deberían realizar estos ensayos con un equipo más sensible, para desestimar las interacciones de los protones de la cavidad  $\beta CD$ .

### **3.4.8. Liofilización y reconstitución de los agregados de $\beta CD$ -C16:AmB**

Una de las principales limitaciones que presentan los sistemas coloidales de administración de fármacos es su inestabilidad a mediano y corto plazo. Debido a ello, desde un punto de vista tecnológico, la liofilización y reconstitución de formulaciones ofrece una alternativa para la conservación.

A fines de evaluar si los agregados  $\beta CD$ -C16:AmB se pueden liofilizar y posteriormente reconstituir en diferentes medios se liofilizaron agregados  $\beta CD$ -C16:AmB conteniendo 1,5 mg/mL de AmB. Las muestras una vez liofilizadas se almacenaron durante 24 h y se reconstituyeron en diferentes medios como agua Milli Q (pH=6,3), buffer PBS pH=7,4, solución de sacarosa 300 mOsm y NaCl 145 mM. Posteriormente, se evaluó el aspecto, color, homogeneidad, presencia de partículas precipitadas y la solubilidad de  $\beta CD$ -C16:AmB. Los datos obtenidos se presentan en la Tabla **3-12**.

Puede observarse que la presencia de sales o sacarosa desfavorece notablemente la solubilización de AmB proveniente de los agregados  $\beta CD$ -C16:AmB; la solubilidad de AmB en estos medios es entre 5 y 10 veces inferior que en agua.

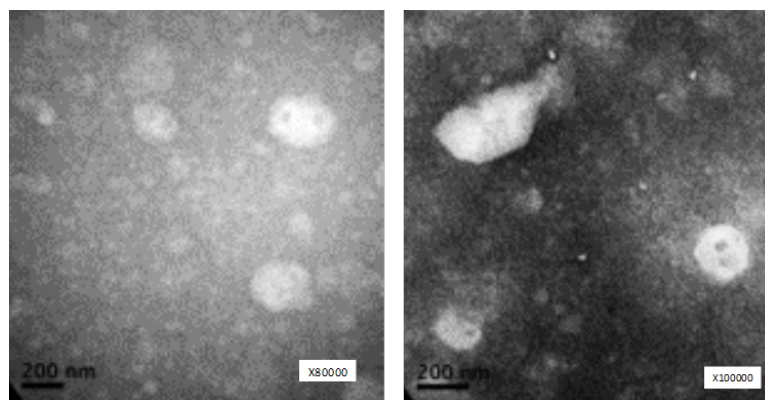
**Tabla 3-12.:** Resuspensión de agregados liofilizados de  $\beta$ CD-C16 en diferentes medios<sup>a</sup>

Medio	Color	Precipitado	Solubilidad (mg/mL)
Agua Milli Q	Amarillo	No	1,5 $\pm$ 0,1
PBS pH=7,4	Amarillo	Si	0,16 $\pm$ 0,02
Sacarosa 300 mOsm	Amarillo	Si	0,158 $\pm$ 0,007
NaCl 145 mM	Amarillo	Si	0,286 $\pm$ 0,004

<sup>a</sup>La muestra resuspendida en los diferentes medios tenia una concentración de 1,5 mg/mL de AmB .

Sin embargo, cómo se describió anteriormente, para los medicamentos comerciales, el sólido es resuspendido en agua, y luego se lleva a una concentración de AmB que oscila entre 0,1 -0,2 mg/mL para Fungizone o AmBisome<sup>®</sup>. Los agregados sólidos de  $\beta$ CD-C16:AmB al ser disueltos en buffer PBS pH=7,4, solución de sacarosa 300 mOsm, muestran una concentración intermedia de 0,16 mg/mL. Este resultado es importante porque es similar a los utilizados en los tratamientos médicos.

Cuando se liofiliza y se resuspende esta formulación y se analiza por TEM, (Figura 3-20) se encuentran estructuras de mayor tamaño respecto a la muestra no liofilizado. La formación de estas partículas de mayor tamaño es atribuida por algunos autores como sistemas agregados generados por asociaciones de las diferentes partículas.<sup>220</sup>



**Figura 3-20.:** Imagen de TEM de los agregados autoensamblados  $\beta$ CD-C16:AmB liofilizados. conteniendo 1,5 mg/mL de AmB y  $X^{\beta CD-C16}:X^{AmB}$  0,62:0,38.

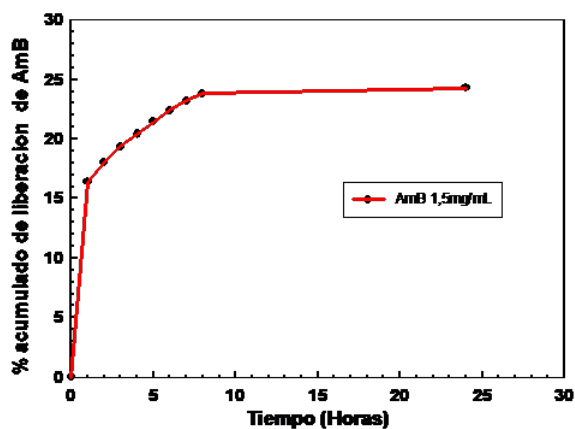
### 3.4.9. Ensayos de liberación de AmB *in vitro* de los agregados de $\beta$ CD-C16:AmB

Se realizaron diferentes ensayos de liberación *in vitro* en celdas de Franz, evaluando la cinética de liberación de la AmB de los agregados. En la Tabla **3-13** se presentan los resultados de la liberación de AmB de los agregados de  $\beta$ CD-C16:AmB en diferentes medios. El medio en el cual se tuvo mayor porcentaje de liberación (23%) fue el buffer PBS con un pH 7,4, en tanto que la liberación a un medio receptor constituido por agua, NaCl 145 mM o solución de albumina sérica humana (HSA 0,4%) fue despreciable. La cuantificación de AmB se realizó por medio de espectroscopia UV-Vis como se describe en el apartado de Materiales y Métodos.

**Tabla 3-13.:** Ensayos de liberación de AmB *in vitro* en diferentes medios

Medio de Liberación	% de Liberación
H <sub>2</sub> O	1
NaCl 145 mM	0
PBS pH: 7,4	23
HSA solución 0,4%	0

En el Figura **3-21** se muestra el perfil de liberación de AmB del agregado  $\beta$ CD-C16-AmB en buffer PBS a una temperatura de 37°C. Estos resultados indican que la liberación de AmB del agregado auto-ensamblado  $\beta$ CD-C16:AmB en los distintos medios es relativamente baja o nula. Estos son resultado muy prometedores y no representan una limitación en el uso de la formulación propuesta, ya que, como se demostrará en los siguientes capítulos, el agregado auto-ensamblado  $\beta$ CD-C16:AmB tiene la capacidad de penetrar modelos de biomembranas altamente empaquetadas de manera muy eficiente. La poca liberación de AmB desde los agregados y su pequeño tamaño da como resultado una circulación prolongada que permitiría la distribución en muchos órganos. La estructura adoptada por el agregado asegura que AmB permanezca asociada con la  $\beta$ CD-C16 hasta que entre en contacto con una biomembrana, minimizando los efectos adversos de AmB en los tejidos del huésped.



**Figura 3-21.:** Perfil de liberación de AmB del agregado auto-ensamblado de  $\beta$ CD-C16:AmB con concentración de AmB de 1,5 mg/mL en PBS con un pH 7,4.

### 3.4.10. Ensayo de hemólisis *in vitro* de agregados de $\beta$ CD-C16:AmB

El ensayo *in vitro* de hemólisis es un método que permite evaluar el potencial efecto tóxico de formulaciones.

Los resultados obtenidos, cuando se tienen agregados de  $\beta$ CD-C16:AmB de concentraciones de 0,5 0,8, 1,0 y 1,5 mg/mL (Tabla 3-14) muestran que la formulación y los reactivos usados se caracterizaron por presentar una baja toxicidad hemolítica. Los agregados mostraron un porcentaje de 2 a 3% de hemólisis, lo que indica la inocuidad de la formulación. Al comparar estos resultados con los obtenidos por otros autores con formulaciones comerciales de AmBisome<sup>®</sup> y Fungizone<sup>®</sup> que muestran 4% y 85%, respectivamente, de toxicidad hemolítica.<sup>221,222</sup> Se concluye que la toxicidad hemolítica de los agregados de  $\beta$  CD-C16:AmB es baja. AmB libre a concentraciones de 1  $\mu$ g/mL muestra una hemólisis de 100%.<sup>223</sup>

**Tabla 3-14.:** Actividad hemolítica de las formulaciones  $\beta$ CD-C16-AmB

Muestra		Absorbancia 576 nm	% de Hemolisis
NaCl 145 mM		0,02	0
H <sub>2</sub> O Milli-Q		1,84	100
$\beta$ CD nativa 4 mg/mL (3,5 mM)		0	0
$\beta$ CD-C16 4 mg/mL (4,3 mM)		0,06	2
$\beta$ CD-C16 3,8 mg/mL	AmB 0,5 mg/mL (0,54 mM)	0,06	2
	AmB 0,8 mg/mL (0,86 mM)	0,05	2
	AmB 1,0 mg/mL (1,10 mM)	0,08	3
	AmB 1,5 mg/mL(1,63 mM)	0,06	2

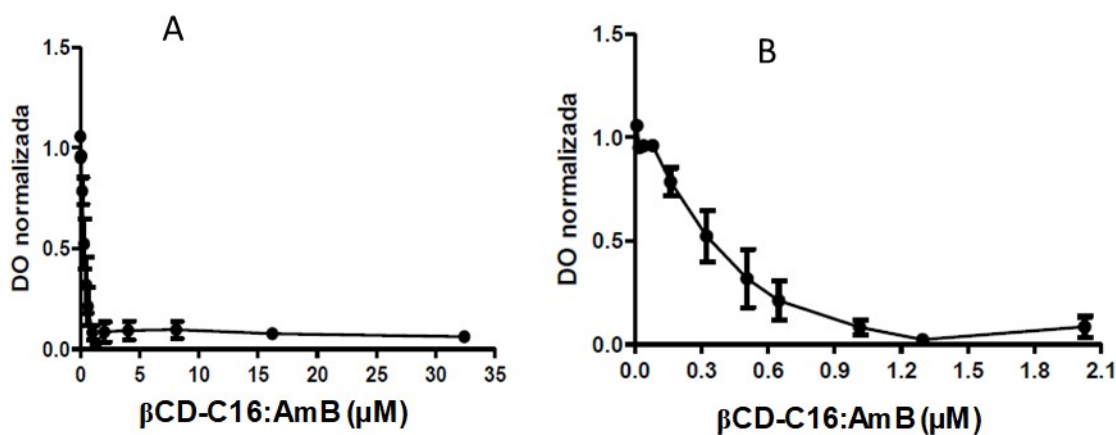
Las formulaciones utilizadas en este ensayo demostraron la baja toxicidad de los agregados formados por  $\beta$ CD-C16:AmB, indicando la poca interacción de la AmB con las membranas de los glóbulos rojos.

### 3.4.11. Ensayo de inhibición de *Cándida albicans* para agregados de $\beta$ CD-C16:AmB

La *Cándida albicans* es un hongo polimórfico, que se puede presentar como levadura o bien crecer como un hongo filamentoso.<sup>222</sup> Es una de las mayores amenazas para pacientes inmunodeprimidos, donde entre el 35 %-60 % de la mortalidad se encuentra asociada al hongo.<sup>224</sup>

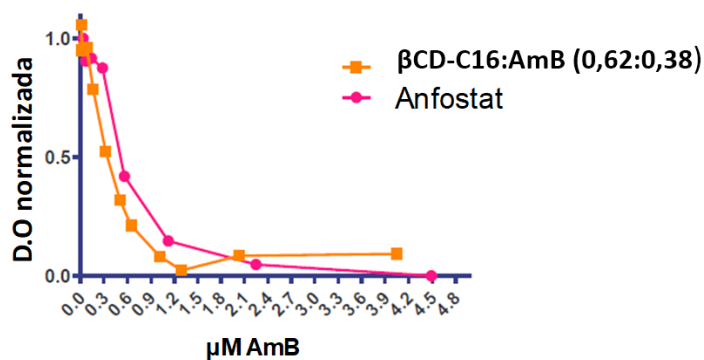
Se realizaron ensayos de inhibición de crecimiento de *Cándida albican* con  $\beta$ CD-C16, agua, y DMSO/NaOH, observando que no generaron cambios en el crecimiento con respecto a la muestra control de *Cándida albicans*. Luego se realizaron ensayos con la formulación 0,62:0,38 de los agregados de  $\beta$ CD-C16;AmB, mostrando la capacidad de inhibir el crecimiento de la *Cándida albican*. La concentración inhibitorias mínima fue de 0,300  $\mu$ M de AmB. Figura 3-22.





**Figura 3-22.:** Ensayo de inhibición de crecimiento de *C. albicans* A) inhibición de crecimiento de *C. albicans* 0-33  $\mu$ M B) inhibición de crecimiento de *C. albicans* 0-2,1  $\mu$ M.

Se realizaron pruebas de inhibición con una AmB comercial (Anfostat, nombre genérico para la Fungizone<sup>®</sup> en América latina) y se muestra en la Figura 3-23.



**Figura 3-23.:** Ensayo de inhibición de crecimiento de *Cándida albicans* por  $\beta$ CD-C16:AmB (0,62:38) y la formulación comercial Anfostat.

El Anfostat es un medicamento muy empleado en América latina en el cual presenta riesgos para la salud, como disfunciones renales, distribuido comercialmente en frasco ampolla que

contiene un liofilizado de 50 mg de AmB, 41 mg de desoxicolato y 20 mg de Buffer de fosfatos de sodio.

El Anfostat (Fungizone<sup>®</sup>), como se mencionó, presenta hemólisis de 85 % y se encuentran formulaciones alternativas (heat-fungizone) que presentan hasta 50 % menos de hemólisis, pero disminuyen la capacidad de inhibir el crecimiento de *Cándida albicans*. A diferencia, la formulación  $\beta$ CD-C16:AmB (0,62:0,38) presenta un 3 % de hemólisis y exhibe un perfil similar al de Anfostat en la inhibición de crecimiento de *C albicans* cómo se observa en la Figura 3-23. La formulación  $\beta$ CD-C16:AmB (0,62:38) se puede plantear como una nueva alternativa de entrega y liberación de AmB.

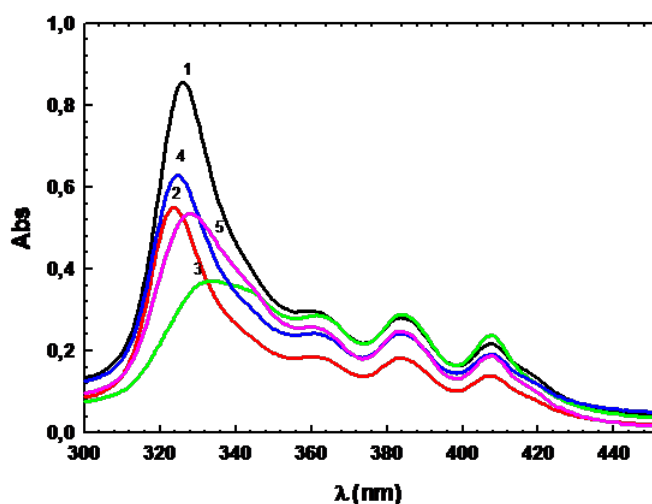
#### 3.4.12. Efecto del calentamiento de los agregados de $\beta$ CD-C16:AmB

Las medicinas comerciales como la Fungizone<sup>®</sup> son altamente hemolíticas ya que en su formulación se utiliza como excipiente, el desoxicolato de sodio, un tensioactivo aniónico que causa hemólisis.<sup>200</sup> A diferencia, la AmBisome<sup>®</sup> muestra una baja actividad hemolítica que se atribuye a la forma super-agregada de AmB. Esta forma agregada se puede obtener al calentar una solución de Fungizone<sup>®</sup>, esto se ve reflejado en un cambio espectral UV-Vis en la banda de absorción máxima de 328 nm que se desplaza a 322 nm.<sup>191</sup>

A partir de los resultados presentados anteriormente se puede concluir que los agregados auto-ensamblados de  $\beta$ CD-C16 tienen la capacidad de incorporar más de 90 % de AmB. Además, todas las formulaciones presentaron un mayor cantidad de AmB en estado agregado que monomérico, por esta razón se tomaron las tres formulaciones con mayor cantidad de fármaco ( $8,83 \times 10^{-3}$ ,  $7,31 \times 10^{-3}$ ,  $5,17 \times 10^{-3}$  mg/mL de AmB) y se los trató térmicamente.

La muestra del agregado auto-ensamblado de  $\beta$ CD-C16:AmB con una fracción molar de 0,62:0,38 y concentración de AmB de  $8,83 \times 10^{-3}$  mg/mL presenta su mayor absorción a 327 nm, a una temperatura de 25°C (Figura 3-24). El calentamiento de las muestras a 50 y 70°C produce un desplazamiento de la absorción máxima inicial (327nm) a longitudes de onda menores. Por el contrario, las muestras incubadas a 60 y 80 °C, presentaron un desplazamiento de la banda de máxima absorción a longitudes de onda mayores a las presentadas por la formulación original (Figura 3-24). Por otro lado, se observó una disminución de la

intensidad de la banda de mayor absorción (comparada con muestra a 25°C) en todas las muestras independientemente de la temperatura de incubación.



**Figura 3-24.:** Espectros de absorción del agregado de  $\beta CD$ -C16:AmB con concentración de  $98,83 \times 10^{-3}$  mg/mL. Temperatura de incubación: 25°C (1), 50°C(2), 60 °C(3), 70°C (4), 80°C(5).

La formulación de  $\beta CD$ -C16:AmB con una fracción molar de 0,65:0,35 y concentración de AmB de  $7,31 \times 10^{-3}$  mg/mL (Figura 3-25) presenta una disminución en la intensidad de la banda de mayor absorción para todas las temperaturas de incubación.

Por último, la formulación  $\beta CD$ -C16:AmB con concentración de AmB de  $5,17 \times 10^{-3}$  mg/mL (Figura 3-26) muestra una disminución de la banda ubicada a 328 nm y aparece como mayor absorción las bandas la ubicadas a 380-411 nm pero sin un aumento representativo de la señal monomérica de la AmB.

Nuestros resultados demuestran que el calentamiento de las distintas formulaciones puede producir, como en el caso de la Fungizone<sup>®</sup>, un efecto hipsocrómico en la banda de mayor absorción en sus espectros UV-Vis. Esta banda ubicada por algunos autores a una longitud de onda de 323 nm.<sup>85,173</sup>

Durante el proceso de incubación de las formulaciones de  $\beta CD$ -C16:AmB en las diferentes temperaturas, los cambios espectroscópicos de AmB sugieren la aparición de agregados de

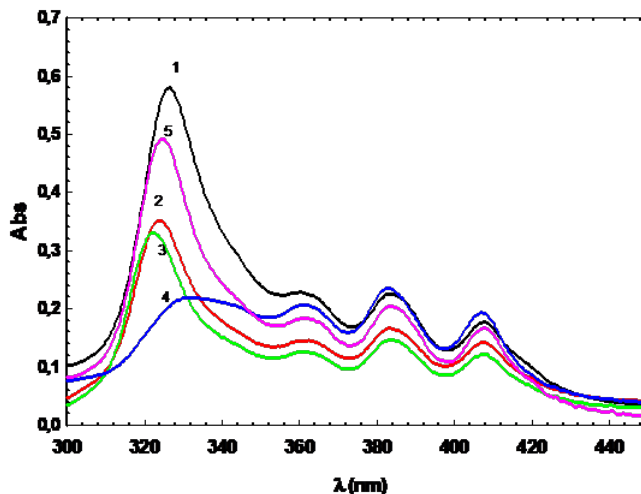


Figura 3-25.: Espectros de absorción de  $\beta CD$ -C16:AmB con concentración de  $7,31 \times 10^{-3}$  mg/mL. Temperatura de incubación: 25°C (1), 50°C(2), 60 °C(3), 70°C (4), 80°C(5).

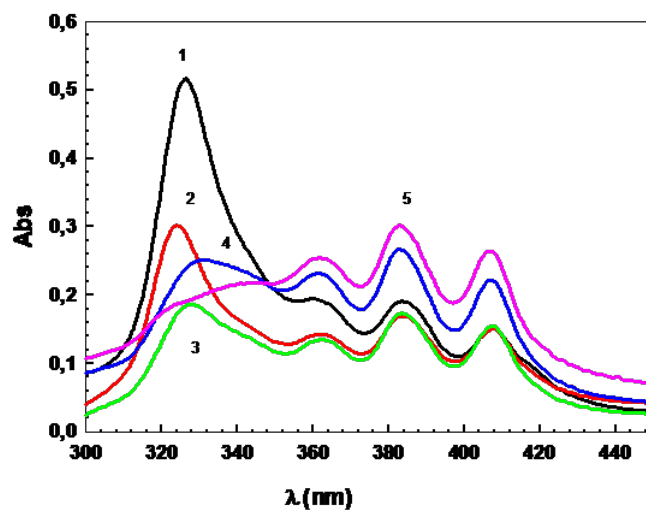


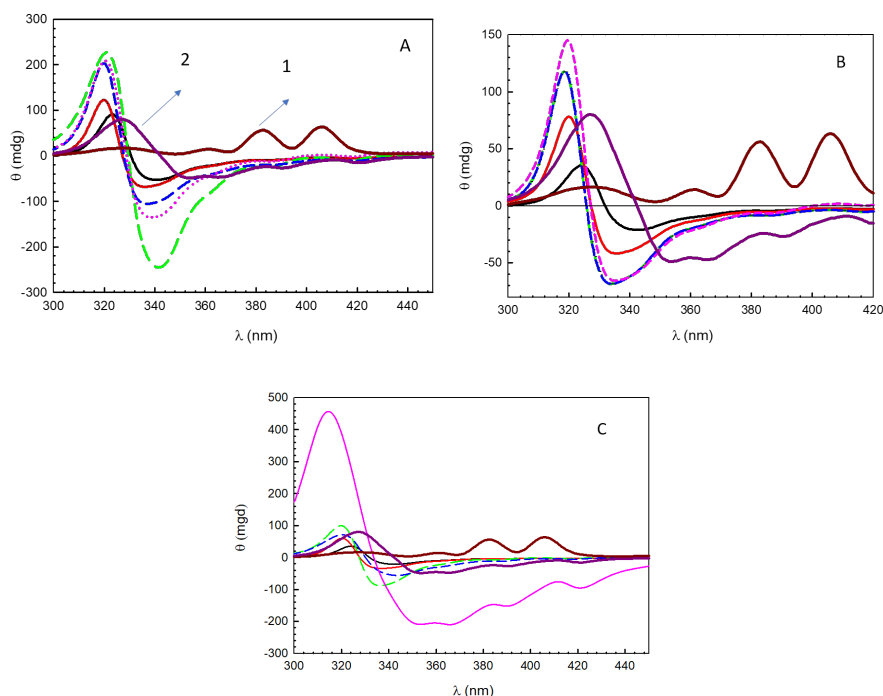
Figura 3-26.: Espectros de absorción de  $\beta CD$ -C16:AmB con concentración de  $5,17 \times 10^{-3}$ . Temperatura de incubación: 25°C (1), 50°C(2), 60 °C(3), 70°C (4), 80°C(5).

mayor tamaño (poliagregados), lo que se ve reflejado en la disminución de la absorción o el desplazamiento a longitudes de onda menores. La banda ubicada a 326 nm (banda de agregación), después del calentamiento se encuentran a longitudes de onda menores, además se observan las bandas localizadas a los 360-363, 383-385 y 406-420 nm características de la AmB.<sup>68</sup> Se verificó el contenido de AmB de los agregados  $\beta CD$ -C16:AmB (0,62:0,38) después de los ensayos de calentamiento y se corroboró por medio de UV-Vis que la concentración permanece constante durante la incubación a las diferentes temperaturas.

### **Dicroísmo circular de los agregados auto-ensamblados de $\beta CD$ -C16:AmB encubados a temperatura de 25-70°C**

En la Figura 3-27 se observan los espectros de las muestras incubadas las cuales presentan cambios durante el tratamiento térmico. En las soluciones de los agregados, al incrementarse la temperatura de 50 a 80 °C, se observa la formación de una nueva especie de agregación en las tres formulaciones. Esto es reflejado por el desplazamiento del doblete dicroico a una longitud de onda de 327 nm con una banda positiva a 319 nm y negativa a 340nm resultado similar al descrito por Gabariou.<sup>95</sup> También la absorción positiva en el espectro DC se desplaza a longitudes de onda más bajas, indicando la formación de una nueva forma agregada o superagregada.<sup>81,225</sup>

Los espectros de DC de las muestras incubadas no presentan puntos isobéuticos cercanos a 355 nm, los cuales indicarían una transición de las especies monoméricas a agregados<sup>201</sup>. La falta de estos puntos isobéuticos podría deberse a cierta heterogeneidad de los agregados de AmB. Por otro lado, la intensidad de la transición del doblete aumentó con el aumento de temperatura, lo que sugiere un aumento apreciable de la concentración de oligómeros de AmB.<sup>167</sup> A partir del análisis por espectroscopía de DC, se puede corroborar que al incubar las muestras el calentamiento produce un aumento en las interacciones de las moléculas, lo que origina agregados con mayor tamaño o con mayor número de moléculas, que se ve evidenciado por el desplazamiento de una señal a longitudes de onda más bajas.<sup>184</sup>



**Figura 3-27.:** Espectros de dicroísmo circular de  $\beta CD$ -C16:AmB con concentración de 9,00 (—) (A), 7,31 (—) (B) y 6,88  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (C), incubadas a temperaturas de 50 °C (rojo), 60 °C (verde), 70°C(azul) y 80 °C(rosa), AmB en metanol (1) y AmB en agua (2.)

### Tamaño de partícula del agregado de AmB encapsulada en $\beta CD$ -C16:AmB después de tratamiento térmico

Por medio de DLS se determinó la distribución de tamaños de partícula en % número de las muestras con concentraciones de  $0,914 \times 10^{-2}$  mg/mL y  $1,01 \times 10^{-2}$  incubadas a 50, 60, 70 y 80 °C durante una hora y estabilizadas luego a temperatura ambiente. Se observaron, en los agregados auto-ensamblados de  $\beta CD$ -C16:AmB, tamaños en un intervalo entre 11 y 99 nm en una población mayoritaria como se observa en las Tabla **3-15**

No se observó una variación significativa en el tamaño de los agregados estudiados a temperatura ambiente o a diferentes temperaturas de incubación, lo cual puede ser favorable al querer utilizar este transportador a nivel sistémico, dado que el sistema retículo endotelial elimina de circulación objetos de tamaño de inferiores 10 nm o superiores a 200 nm.<sup>35,161</sup>.

**Tabla 3-15.:** Diámetros promedios obtenidos por DLS para diferentes agregados auto-ensamblados  $\beta$ CD-C16:AmB.

$X^{\beta CD-C16}:X^{AmB}$	Temperatura (°C)	Diámetro promedio de los agregados (nm), porcentaje en número (%) e índice de polidispersidad (PDI) <sup>a</sup>								
		nm	%	PDI	nm	%	PDI	nm	%	PDI
0,65:0,35 <sup>b</sup> 0,914 $\times 10^{-2}$ AmB mg/mL	25	10,9 $\pm$ 0,8	99,8	0,005				147 $\pm$ 13	0,2	0,008
	50	16 $\pm$ 2	99,6	0,02				187 $\pm$ 20	0,4	0,01
		11 $\pm$ 1	99,8	0,008				139 $\pm$ 13	0,2	0,009
	60	10,9 $\pm$ 0,8	97,2	0,07	54 $\pm$ 7	2,7	0,02	426 $\pm$ 13	0,1	0,001
		10,9 $\pm$ 0,8	99,3	0,07	77 $\pm$ 11	0,7	0,02			
	70	13,4 $\pm$ 0,9	96,1	0,07	90 $\pm$ 9	3,9	0,01			
		13,3 $\pm$ 0,9	97,4	0,005	65 $\pm$ 7	2,4	0,01	258 $\pm$ 23	0,2	0,008
0,62:0,38 <sup>c</sup> 1,01 $\times 10^{-2}$ AmB mg/mL	25	17 $\pm$ 2	99,6	0,01				239 $\pm$ 29	0,4	0,01
	50	11,0 $\pm$ 0,7	89,8	0,04	36 $\pm$ 5	10,2	0,02	348 $\pm$ 8	0,1	0,001
		10,9 $\pm$ 0,8	99,6	0,005	98 $\pm$ 6	0,3	0,003	150 $\pm$ 11	0,1	0,005
	60	11,0 $\pm$ 0,7	98,1	0,004	72 $\pm$ 5	1,9	0,005			
		11,0 $\pm$ 0,7	94,6	0,004	58 $\pm$ 8	5,4	0,02			
	70	19 $\pm$ 2	97,1	0,01	88 $\pm$ 10	2,9	0,01			
	80	10,9 $\pm$ 0,8	92,9	0,005	43 $\pm$ 5	6,9	0,01	175 $\pm$ 17	0,2	0,009
		15 $\pm$ 2	98,9	0,02	90 $\pm$ 9	1,1	0,01			

<sup>a</sup>  $PDI = \frac{SD}{\text{Diámetro promedio}}$  donde SD: es la desviación estándar. Ulf Nobbmann, PDI from an individual peak in DLS, Malvern Panalytical 2015.

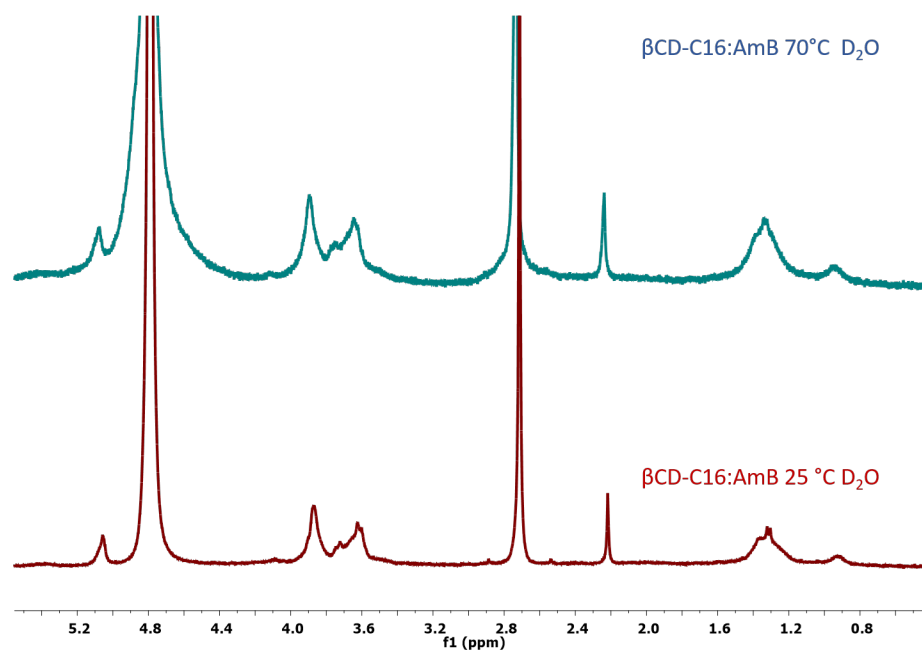
<sup>b</sup> La concentración de AmB es  $0,914 \times 10^{-2}$  mg/mL y la de  $\beta$ CD-C16,  $1,66 \times 10^{-2}$  mg/mL. La formulación obtenida luego de la diálisis fue calentada a la temperatura indicada, posteriormente se tomaron 7  $\mu$ L de la formulación y se llevó a un volumen final de 1 mL de agua. En esta dilución la relación de concentración de  $\beta$ CD-C16 respecto a su CAC es 0,25.

<sup>c</sup> La concentración de AmB es  $1,01 \times 10^{-2}$  mg/mL y la de  $\beta$ CD-C16  $1,66 \times 10^{-2}$ . La formulación obtenida luego de la diálisis fue calentada a la temperatura indicada, posteriormente se tomaron 7  $\mu$ L de la formulación y se llevó a un volumen final de 1 mL de agua. En esta dilución la relación de concentración de  $\beta$ CD-C16 respecto a su CAC es 0,25.

### Resonancia magnética nuclear de los agregados formados por $\beta$ CD-C16:AmB luego del calentamiento

Es importante probar que el calentamiento de los agregados de  $\beta$ CD-C16:AmB no produce cambios químicos en las moléculas de AmB o  $\beta$ CD-C16, como también verificar si hay cambios en las interacciones supramoleculares de estas dos moléculas.

En la Figura 3-28 se comparan los espectros de  $^1\text{H}$  RMN a  $25^\circ\text{C}$  y  $70^\circ\text{C}$  de la formulación de  $\beta$ CD-C16:AmB (0,62:0,38) con concentración de AmB de 1,5 mg/mL, sólo observando la disminución de la señal en 1,25 ppm que corresponde al  $\text{CH}_3$  (C6) de la micosamina, y que se origina por la deshidratación de los grupos polares. Por otro lado, el perfil y los corrimientos de los espectros de  $^1\text{H}$  RMN de los agregados auto-ensamblados a  $25^\circ\text{C}$  y  $70^\circ\text{C}$  son coincidentes, lo que indica que el calentamiento no produce cambios químicos significativos en las moléculas que forman parte del agregado tal como se describe en la literatura.



**Figura 3-28.:** Espectros  $^1\text{H}$  RMN a  $25^\circ\text{C}$  y  $70^\circ\text{C}$  del agregado auto-ensamblado de  $\beta$ CD-C16:AmB en  $\text{D}_2\text{O}$  (400 MHz).



### 3.4.13. Conclusiones

El empleo de  $\beta CD$ -C16 permite solubilizar AmB obteniendo soluciones que pueden ser liofilizadas y reconstituidas manteniendo sus características. Además, se forma un agregado  $\beta CD$ -C16:AmB estable en medio acuoso que presenta la capacidad de incorporar AmB hasta un máximo en concentración 1,5 mg/mL ( dosis terapéutica). El auto-ensamblaje de las moléculas que integran el agregado le confiere estabilidad frente a la dilución.

Las formulaciones de  $\beta CD$ -C16:AmB desarrolladas en este trabajo, pueden incubarse a diferentes temperaturas, sin producir degradación del agregado ni de sus constituyentes. El calentamiento de las formulaciones no genera cambios en su tamaño, aunque si presenta desplazamiento hipsocromicos en la banda de mayor absorción, lo cual podría deberse a la restucturación de agregado.

La formulación de  $\beta CD$ -C16:AmB permite la inhibición del crecimiento de *C. albicans*. Además, el auto-ensamblado de las formulaciones y sus excipientes no generan hemólisis Por ello, esta formulación presenta mejores características que los productos comerciales como el Anfostat que tiene un 85 % de hemólisis y un perfil de inhibición en el crecimiento de *C. albicans* similar al obtenido las formulaciones presentadas en la presente tesis.

Los estudios de  $^1H$  - RMN demuestran que la micosamina de la AmB posiblemente se incluye en la cavidad de la  $\beta CD$ -C16 que ayuda a la estabilización de los agregados.

**4. Interacciones de la ciclodextrina  
anfifílica  $\beta CD$ -C16 y Anfotericina B  
en monocapas y con modelos de  
biomembranas**

## 4.1. Introducción

En este capítulo se presenta el estudio de las interacciones de AmB y del agregado  $\beta CD$ -C16:AmB en una interfase agua-aire y con un modelo de biomembrana, usando para ello monocapas del fosfolípido POPC. Se diseñaron dos tipos de experimentos, iniciamos con el estudio de las monocapas de Langmuir de los componentes puros, y de la mezcla. Asimismo, se estudió la capacidad que tiene la AmB y el agregado autoensamblado de  $\beta CD$ -C16:AmB para penetrar en una interfase que emula una biomembrana.

Se ha estudiado la formación de sistemas moleculares y nanoscópicos autoensamblados con propiedades físicas específicas que están determinadas por las relaciones entre la composición química, la estructura y la organización de dichos materiales.<sup>226</sup> Los cambios más importantes, con respecto a la agregación molecular, son los que ocurren en las propiedades ópticas de los cromóforos que interactúan.

La autoasociación de moléculas anfílicas en solución o en la interfase aire-agua es debido a las interacciones intermoleculares. Los agregados en solución de AmB exhiben distintos cambios en la banda de adsorción en comparación con las especies monoméricas. A partir de los cambios espectrales, se han propuesto varios patrones de agregación en los diferentes medios. Las moléculas que presentan cromóforos y se encuentran ensambladas, a menudo forman agregados de tipo H o tipo J, dependiendo de la alineación relativa de los momentos del dipolo de transición en las moléculas adyacentes. En un agregado H, las moléculas se apilan predominantemente cara a cara, mientras que los agregados J se forman cuando las moléculas se apilan principalmente en una disposición de cabeza a cola.<sup>181,227</sup>

Las bandas de los agregados J son desplazadas batocrómicamente (J por Jelly) y las bandas H desplazadas de manera hiposocrómica (H por hipsocrómica). Estos agregados se han explicado en términos de la teoría del acoplamiento del excitón molecular, es decir, el acoplamiento de los momentos de transición de las moléculas constituyentes, lo que indica que la formación de los agregados tiene como consecuencia la modificación de los espectros UV-Vis, fluorescencia. etc

### 4.1.1. Espectroscopia UV-Vis de reflexión

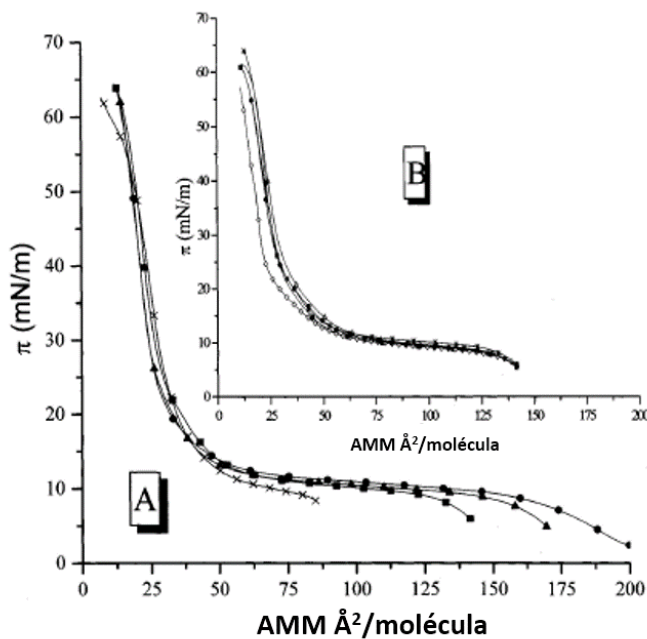
Un método experimental con el cual se puede conocer la organización de las moléculas en una superficie es la espectroscopia UV-Vis de reflexión. Esta técnica presenta la ventaja que se realiza *in situ*, y se aplica a la interfase aire-agua, proporcionando un estudio de la monocapa y la detección de procesos físicos o químicos como la adsorción o penetración de moléculas de la solución a la interfase.<sup>120,122</sup>

Los sistemas autoensamblados de  $\beta CD$ -C16:AmB estudiados en el capítulo anterior presentaron señales de adsorción en el espectro UV-Vis en solución acuosa diferentes con respecto a la AmB en estado monomérico, confirmando que la AmB se encuentra agregada. El desplazamiento hipsocrómico, la aparición de un banda intensa en longitudes de onda más bajas se toma como evidencia de la agregación de la AmB interaccionando con la  $\beta CD$ -C16, su comportamiento es similar a la AmB en solución acuosa.<sup>179,180,228</sup>

### 4.1.2. Monocapas de Langmuir de AmB

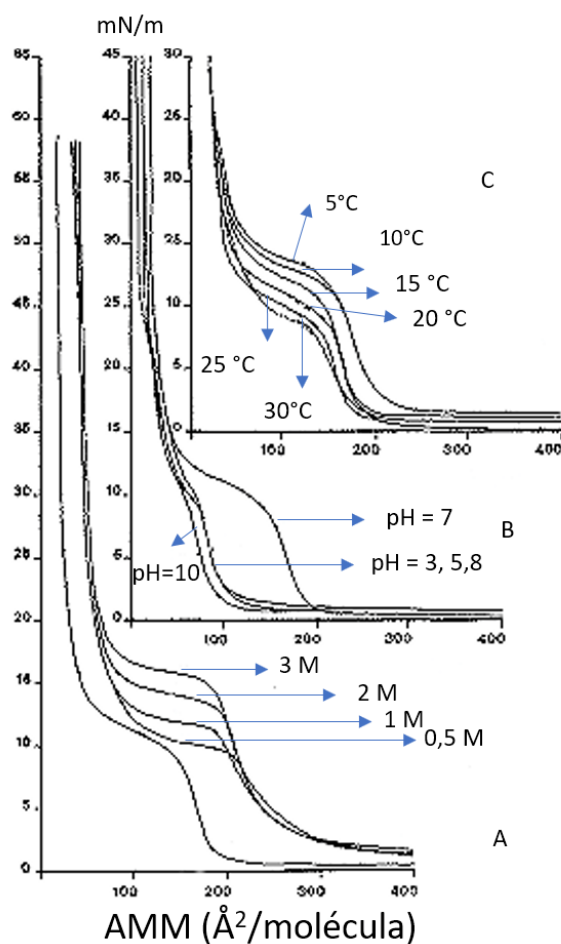
Es conocido que el comportamiento de la AmB extendida en una interface aire-agua es determinada por las condiciones del ensayo como el número de moléculas de AmB depositadas en la interfase, la velocidad de compresión, la temperatura y fuerza iónica de la subfase.

En los estudios de monocapas realizados por Gomez-Serranillos<sup>229</sup>, en la cual utilizo número creciente de moléculas de AmB esparcidas en la interfase aire-agua, determino que el área molecular ocupada inicialmente por la monocapa de AmB disminuye al incrementarse el número de moléculas en interfase. En sus experimentos al aumentar la concentración de moléculas, tomó  $1 \times 10^{17}$  moléculas de AmB y la comparó con una isoterma obtenida con una cantidad de  $4,25 \times 10^{16}$  moléculas. Observó que la región líquida-expandida se desplaza en el eje del área al aumentar la concentración de moléculas (Figura 4-1). Adicionalmente, al variar la velocidad de compresión se observó que a velocidades bajas el área de la isoterma es menor y no alcanza el colapso.<sup>229</sup>



**Figura 4-1.:** Isotherma de compresión de AmB A) Numero de moléculas en interfase  $\bullet$   $4,25 \times 10^{16}$ ,  $5 \times 10^{16}$ ,  $6 \times 10^{16}$ ,  $1 \times 10^{17}$  B) Influencia de la velocidad de compresión 10 mm/min,  $\bullet$  20 mm/min, \* 30 mm/min  $\Delta$  40 mm/min, 50 mm/min. Figura adaptada de referencia <sup>229</sup>.

El aumento de la temperatura en la subfase, también genera cambios en la isoterma de compresión de la AmB, como lo describe J.R. Seoane, la variación de la temperatura produce la disminución del área de la monocapa, debido a un aumento de la solubilidad de la AmB. Por otro lado, la subfase en estos ensayos también puede generar cambios en la isoterma de AmB resultante, si se tiene una subfase de NaCl (o se aumenta su fuerza iónica)<sup>229</sup> se incrementa el área ocupada por la monocapa de AmB. Esto ocurre por la formación de capas de hidratación que rodean los iones de NaCl.<sup>229,230</sup> La Figura 4-2 muestra algunos resultados de J.R. Seoane, al variar algunas condiciones en la obtención de la monocapa de AmB.



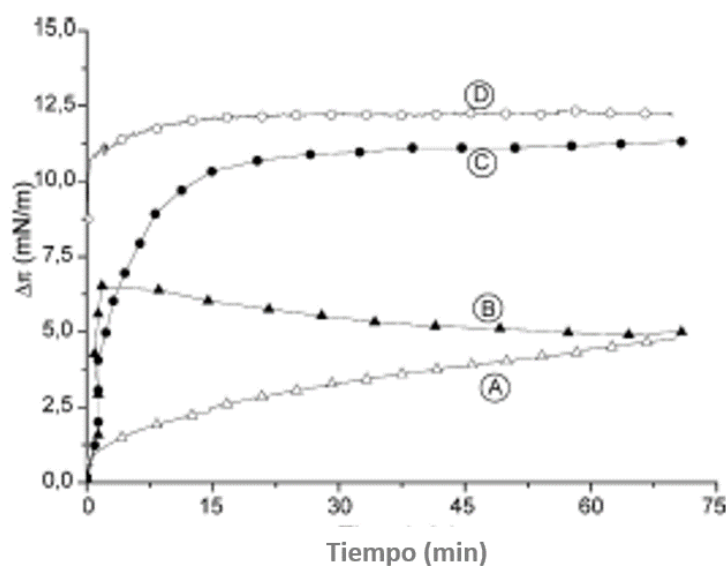
**Figura 4-2.:** Influencia de la fuerza iónica (A), valor de pH de la subfase (B) y temperatura (C) en las isothermas de compresión de la anfotericina B en monocapas. Figura adaptada de referencia <sup>229</sup>.

Como se mencionó, las isothermas de AmB dependen de la temperatura, concentración, velocidad de compresión y subfase, en este capítulo se determinaron las condiciones experimentales óptimas para la obtención de la isoterma de AmB

#### 4.1.3. Penetraciones de AmB en monocapas preformadas

Diversos ensayos se han realizado para determinar la capacidad que tiene la AmB para penetrar una membrana. Los ensayos realizados por J Miñones<sup>94</sup> en la penetración de AmB

en un modelo de biomembrana, específicamente en monocapas preformadas de DPPC y DOPC a 5 mN/m, demostraron que es muy baja la capacidad de la AmB para incorporarse en la monocapa de los dos fosfolípidos, alcanzando una presión de superficie final de 17 mN/m. Adicionalmente, se demostró que la incorporación de las moléculas de AmB procede muy lentamente en las monocapas de DOPC.



**Figura 4-3.:** Gráfica  $\Delta\pi$  vs tiempo en las películas de DOPC después de la inyección de AmB a concentraciones: (A)  $1 \times 10^{-7}$  M y (D)  $2 \times 10^{-5}$  M. Para DPPC las concentraciones de AmB fueron (B)  $1 \times 10^{-7}$  y (C)  $2 \times 10^{-5}$  M. Figura adaptada de referencia <sup>94</sup>.

Por el contrario, en la monocapa de DPPC, la penetración se observa con un rápido aumento de la  $\pi$  después de la adsorción inicial de AmB, seguido de una disminución progresiva de una sobrepresión hasta que se alcanza el equilibrio (Figura 4-3). Miñones sugiere que este fenómeno es por la existencia de interacciones débiles entre DPPC y AmB, que desaparecen con el tiempo. El ensayo de penetración de AmB en la monocapa de DOPC es progresiva con el tiempo porque la monocapa de DOPC es más expandida.

En este capítulo se realizaran ensayos de adsorción y penetración de AmB y  $\beta CD$ -

C16:AmB (0,62:0,38) en una monocapa preformada de POPC.

## 4.2. Objetivos

Los objetivos planteados en esta sección de la presente tesis doctoral se pueden resumir en:

- Estudiar las interacciones y la topografía de mezclas de  $\beta CD$ -C16 y AmB con una relación molar de 0,62:0,38 en monocapas de Langmuir.
- Comparar las interacciones de la AmB y de la mezcla de  $\beta CD$ -C16:AmB en modelos de biomembranas.
- Estudiar la formación de monocapas de Gibbs de los compuestos puros, sus mezclas y del agregado auto-ensamblado con fracción molar 0,62:0,38 mediante diferentes técnicas de caracterización.

## 4.3. Materiales y Métodos

### 4.3.1. Monocapas de Langmuir de AmB o $\beta CD$ -C16:AmB (0,62:0,38) en la interfase aire-agua.

En el presente capítulo se utilizó una balanza de Langmuir como método de caracterización para la AmB y la mezcla de  $\beta CD$ -C16:AmB en interfase. Para la obtención de las isothermas de compresión ( $\pi$  vs  $A$ ), se agregaron 140 mL de una subfase de NaCl 145 mM en una cuba de teflón en una balanza de Langmuir *KSV mini trough (KSV Nima, Helsinki, Finlandia)*.

Para la deposición de las disoluciones en la interfase aire-agua se utilizó una jeringa graduada tipo Hamilton, con un intervalo de volumen entre 10  $\mu L$  y 200  $\mu L$ . Las soluciones de AmB se prepararon en una mezcla de solventes MeOH:CCl<sub>3</sub>H; 2:1 y  $\beta CD$ -C16 en



MeOH:CCl<sub>3</sub>H:DMSO; 1:1:1. La mezcla de  $\beta CD$ -C16:AmB se preparó mezclando los volúmenes necesarios de cada una para obtener la fracción molar deseada. Las soluciones preparadas se colocaron esparciendo pequeñas gotas sobre la interfase y se esperó durante 10 minutos la evaporación del solvente. Pasado este tiempo se procede a la compresión con una velocidad de 10 mm/min. La presión superficial ( $\pi$ ) se midió usando el método de Wihelmy con una placa de Pt (Método descrito en el capítulo 2) .

Se preparó una mezcla de  $\beta CD$ -C16:AmB (0,62:0,38) a partir de soluciones madre de  $\beta CD$ -C16 (3,00 mM) y AmB (0,12 mM) en solvente organico.

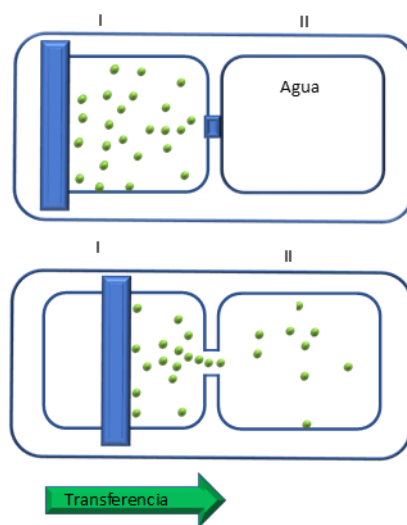
### 4.3.2. Estudios de la adsorción de AmB y agregados de $\beta CD$ -C16:AmB en interfases lipídicas de POPC

Para evaluar la tendencia de AmB y los agregados auto-ensamblados de  $\beta CD$ -C16:AmB para adsorberse en una interfase aire-agua, se midieron las isotermas de adsorción. Para ello, se utilizó una cuba de teflón cuadrada con un área de 28 cm<sup>2</sup> con un volumen de subfase (NaCl 145 mM) de 16,5 mL. Se evaluó el efecto del solvente utilizado sobre la presión de superficie, inyectando 100  $\mu$ L de DMSO (solvente usado para la solución de AmB) y 200  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O (solvente empleado con los agregados de  $\beta CD$ -C16:AmB) en la subfase, sin encontrar cambios significativos. Por este motivo, se añadieron 21  $\mu$ L de una solución AmB en DMSO o 100  $\mu$ L de la solución de  $\beta CD$ -C16:AmB (0,62:0,38) a la subfase obteniendo concentraciones finales de AmB cercanas a 40  $\mu$ M y el mezcla 8  $\mu$ M para AmB y 13  $\mu$ M de  $\beta CD$ -C16. Los cambios en la presión superficial fueron registrados en un área constante y en función del tiempo, estableciendo una monocapa de Gibbs para AmB y el agregado  $\beta CD$ -C16:AmB.

Para los ensayos de penetración de AmB y  $\beta CD$ -C16:AmB en interfases lipídicas, se desarrolló inicialmente en la interfase aire-agua una monocapa de POPC hasta llegar a una presión de superficie deseada ( $\pi_0$ ). Después de 10 minutos de estabilización del film de POPC a cada  $\pi_0$ , se inyectó la solución de AmB o  $\beta CD$ -C16:AmB en la subfase y se mantuvo bajo agitación continua (sin perturbar la monocapa de POPC). Se registró la  $\pi$  en función del tiempo hasta que esta se mantuvo constante ( $\pi_f$ ). Posteriormente se calculó la variación en la presión de superficie ( $\Delta\pi$ ) como lo indica la Ecuación 2-11. Las  $\pi_0$  de los films de POPC

que se evaluaron fueron 5, 10, 20, y 30 mN/m.

La determinación de la cantidad de AmB que penetró en la interfase de POPC a las diferentes  $\pi_0$  se realizó transfiriendo la película formada en la interfase hacia un compartimento contiguo que contenía agua (Figura 4-6) mediante el movimiento de barreras a una velocidad de 1 mm/min.<sup>152</sup> La transferencia de la película se realizó en el intervalo de tiempo 60 - 90 min después de la inyección de AmB o  $\beta CD$ -C16:AmB en la subfase. Luego de transferir el film al compartimento adyacente, todo el volumen presente en esta sección de la cuba se liofilizó y el sólido obtenido se suspendió en metanol para cuantificar la AmB que logró penetrar. La cuantificación se realiza por medio de espectrofotometría UV-Vis.



**Figura 4-4.:** Representación esquemática de la transferencia de un film desde el compartimento I al II mediante el empleo de una barrera móvil. (Anfifilo verde: AmB).

### 4.3.3. Estudio topográfico de los films

La microscopía de ángulo de Brewster (BAM) es la técnica que nos permite visualizar durante la compresión *in situ* la topografía de una monocapa, e identificar los cambios en la organización 2D que se producen en la monocapa con los cambios de presión superficial.<sup>231,232</sup>

En el estudio topográfico de las monocapas se utilizó un elipsómetro en modo de microscopio de ángulo de Brewster (Nanofilm EP3 Imaging Ellipsometer, Accurion, Goettingen, Germany). Con este equipo, se estudió la topografía de las monocapas de Langmuir a lo largo de toda la isoterma de compresión, tanto de los componentes puros como para la mezclas  $\beta$ CD-C16:AmB con fracción molar 0,62:0,38. Las condiciones experimentales utilizadas son las mismas a las empleadas en el Capítulo 2.

#### **4.3.4. Espectroscopía de Reflexión UV-Vis en la Interfase Aire-Agua**

La espectroscopía UV-Vis de reflexión se empleó para identificar las estructuras moleculares formadas por AmB, es decir su estado de agregación, en una interfase.

Las soluciones de AmB se prepararon en una mezcla de cloroformo (grado HPLC, Sigma Aldrich) y metanol (grado HPLC, Sigma Aldrich) con relación 2:1. Luego se realizó el procedimiento de formación de monocapas a partir de la mezcla de  $\beta$ CD-C16:AmB (0,62:0,38), en el cual se esparcieron 140  $\mu$ L de la solución en una subfase de NaCl 145 mM y luego de 10 minutos se realizó la compresión.

Durante este experimento, la compresión de las barreras se detuvo en presiones de 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, mN y se determinó el espectro UV-Vis de reflexión. Los espectros se registraron al menos por duplicado para garantizar la reproducibilidad de los resultados obtenidos a una temperatura constante de 20°C.

En este ensayo se utilizó un espectrofotómetro (Nanofilm Technologie) con una fuente de luz FiberLight DTM 6/50 que consiste en una lámpara de deuterio y una lámpara de tungsteno instaladas dentro de una celda de cerámica. El obturador interno de la lámpara se controló electrónicamente para producir luz blanca en el rango espectral de 240 a 1000 nm. Además, se cuenta con un espectrómetro multicanal, que utiliza una rejilla y una matriz de diodos CCD como detector, para el análisis en el mismo rango espectral.

## 4.4. Resultados y discusión

### 4.4.1. Monocapas de Langmuir de AmB

#### Influencia del número de moléculas y de la temperatura en las monocapas de AmB

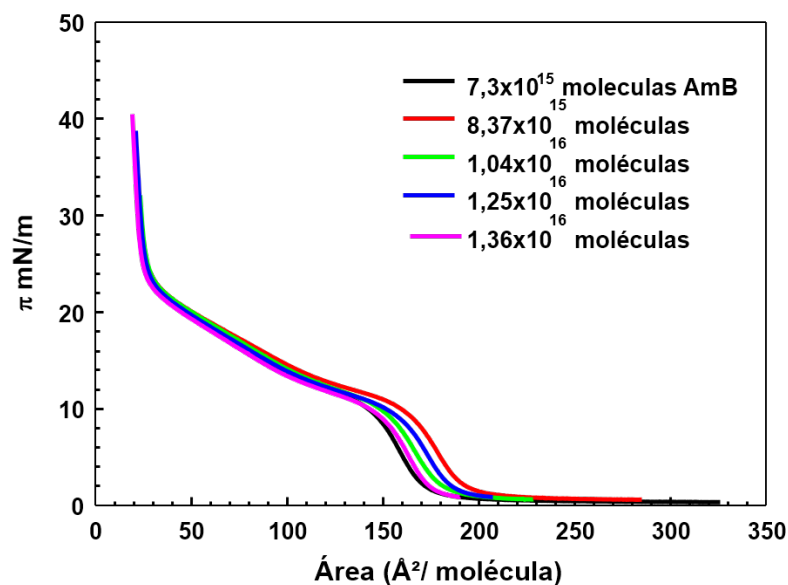
Los ensayos realizados incluyeron el estudio del aumento de la densidad de moléculas de AmB en la interfase y la variación de la temperatura para la obtención de las monocapas de AmB estables en la interfase aire-agua. En todos los ensayos se obtuvieron isotermas desde la fase gaseosa hasta la fase líquido condensado (LC).

En este ensayo se aumentó la cantidad de moléculas de AmB, sembrando diferentes volúmenes de la solución stock de AmB (MeOH:CCl<sub>3</sub>H; 2:1) en la interfase. Se depositaron  $7,3 \times 10^{15}$ ;  $8,37 \times 10^{15}$ ;  $1,04 \times 10^{16}$ ;  $1,25 \times 10^{16}$  y  $1,36 \times 10^{16}$  moléculas y se realizó la compresión. Las isotermas se muestran en la Figura 4-5. La forma de la isoterma de compresión de AmB es similar a las isotermas informadas por otros autores<sup>233-235</sup> y se identifican tres regiones: una por debajo de 10 mN/m donde la monocapa estaba en un estado líquido-expandido (LE) con módulo de compresión de 60 mN/m; la segunda región identificada como una transición de fase líquida expandida a líquida condensada LE-LC, que se observa a una presión superficial entre 10 y 20 mN/m; y por último la tercera región donde la presión superficie aumentó rápidamente con la disminución del área<sup>232,233,236</sup> la fase líquida condensada (LC).

Los resultados obtenidos de las isotermas de compresión muestran cambios en el área molecular; específicamente, en la fase de LE y la transición de LE-LC con el aumento de la cantidad de moléculas sembradas. El valor del área aumentó cuando se tenía una concentración de hasta  $1,25 \times 10^{16}$  moléculas y a partir de esta concentración el área disminuyó con el aumento del número de moléculas depositadas en la interfase.

Los módulos de compresión de las isotermas de la Figura 4-5 se muestran en la figura 4-6.

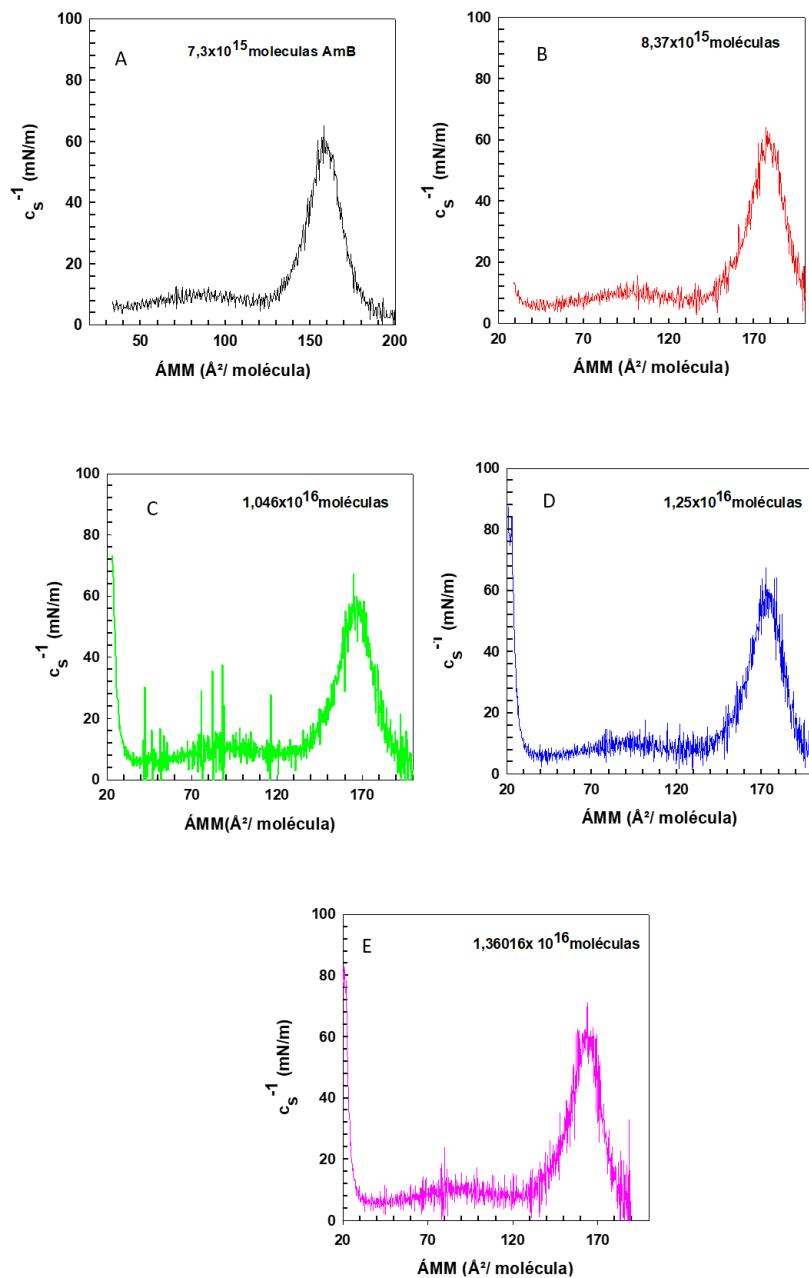
Los valores del módulo de compresión correspondientes a la fase de LE son muy similares, manteniéndose el mismo perfil de la isoterma para las diferentes concentraciones moleculares. La disminución del área molecular con el aumento de la cantidad de moléculas depositadas



**Figura 4-5.:** Isotermas de compresión de AmB a diferentes concentraciones en una subfase de NaCl 145 mM y 20 °C.

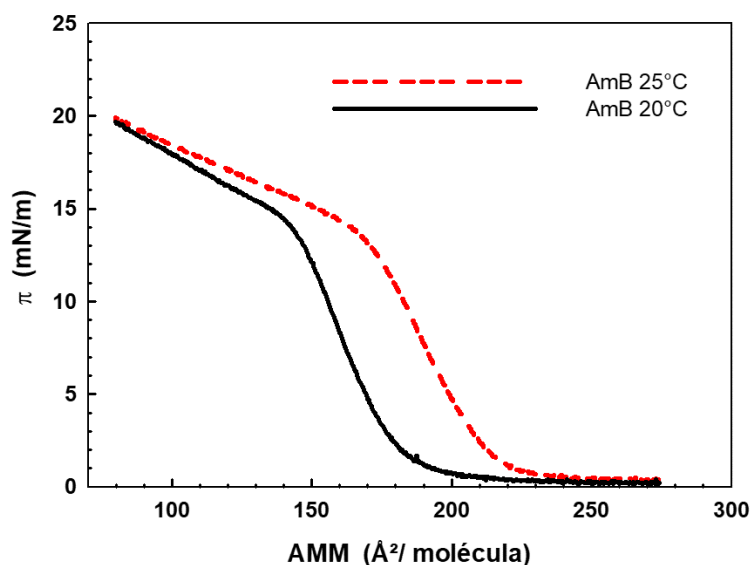
podría ser ocasionada por la expulsión de moléculas hacia la subfase como consecuencia de una saturación de la monocapa. Las moléculas de AmB, en el estado expandido son más estables ya que están fuertemente ancladas a la interfase por enlaces hidrógeno con las moléculas de agua. En la posición vertical, la interacción de la AmB con el agua se reduce considerablemente y la parte de la molécula dirigida al aire tiene mayor movilidad lo que podría ocasionar la liberación hacia la subfase.

A fin de determinar la temperatura de trabajo se estudiaron las isotermas a 20 y 25 °C. Las isotermas muestran un aumento en el área y en la presión de superficie durante la compresión cuando se aumenta la temperatura (Figura 4-7). Los ensayos realizados a 25 °C mostraron que las isotermas de compresión de AmB son menos reproducibles que a 20 °C. Razón por la cual se continuó trabajando a 20 °C.



**Figura 4-6.:** Módulo de compresión de AmB a diferentes concentraciones A)  $7,3 \times 10^{15}$ , B)  $8,37 \times 10^{15}$ , C)  $1,04 \times 10^{16}$ , D)  $1,25 \times 10^{16}$  y E)  $1,36 \times 10^{16}$  moléculas y en una subfase de NaCl 145 mM y  $20^\circ\text{C}$

Diversos autores consideran,<sup>229,235</sup> que el aumento de la temperatura en la subfase provocaría un incremento del área que ocupan las moléculas esparcidas en la interfase aire-agua generadas por el aumento de la vibración de las cadenas apolares de las moléculas (disminución de la interacción hidrofóbica entre las cadenas apolares). J Miñones describe un comportamiento diferente de la anfotericina en monocapas. Cuando las moléculas de AmB se encuentran en una interfase aire-agua y se aumenta la temperatura, el área ocupada por las moléculas de AmB en la superficie y la presión disminuyen en el intervalo de la fase gaseosa hasta la transición de fase LE-LC.<sup>233,235</sup> en contraposición a nuestros resultados. (Figura. 4-7.)



**Figura 4-7.:** Isotermas de compresión de AmB de concentración  $1,04 \times 10^{16}$  moléculas en una subfase de NaCl(145mM) 20 y 25°C.

Por las anteriores razones, en nuestro trabajo tomamos como condiciones para el desarrollo de los ensayos de monocapas de AmB una concentración de  $1,04 \times 10^{16}$  moléculas máxima y a una temperatura de 20°C.

#### 4.4.2. Formación de monocapas de AmB y mezcla de $\beta CD$ -C16:AmB (0,62:0,38)

Las isothermas obtenidas de AmB mostraron, durante su compresión, los estados líquido-expandido (LE), región de transición LE + líquido condensado (LC) y líquido condensado (LC)<sup>233</sup> (Figura 4-8).

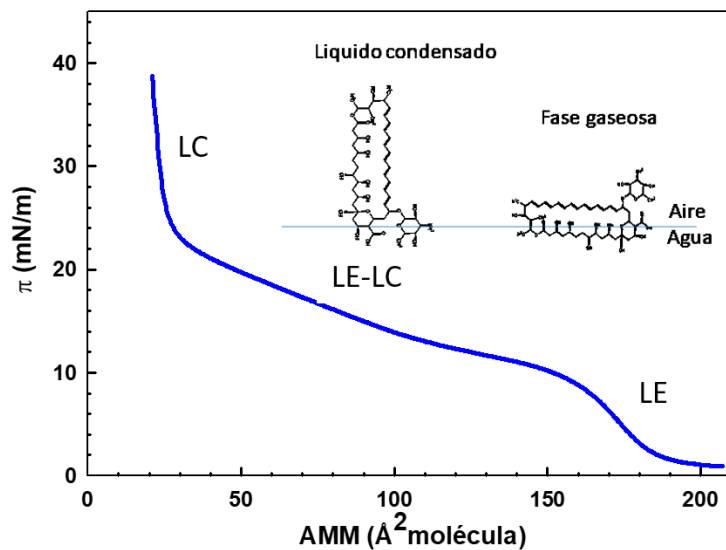
En la isoterma de compresión de AmB se observan cuatro regiones, la primera se estableció en un intervalo de presiones de 0 mN/m hasta 2 mN/m, luego aumenta levemente la presión y se inicia la región LE, ésta se estableció partir del área de 190,2 Å<sup>2</sup>/molécula. Posteriormente, se observó un plateau que corresponde a una región de transición de fases LE -LC que es atribuida a un cambio en la orientación de las moléculas de AmB de una manera horizontal a una posición vertical y a una desorción de las moléculas en la subfase,<sup>237</sup> y por último el estado LC se encuentra a partir del área de 25 Å<sup>2</sup>/molécula. Esta isoterma de compresión es similar a las isothermas informadas en diferentes trabajos.<sup>183</sup>

La compresión de la monocapa de AmB muestra las fases de LE y LC representado por dos áreas medias moleculares específicas de 194 Å<sup>2</sup> y 37 Å<sup>2</sup> (Figura 4-8). Estas áreas específicas corresponden a diferentes disposiciones moleculares de AmB. Los grupos polares (grupos hidroxilos y el grupo carbonilo) de la AmB se ubican de tal forma que interactúan con la subfase, esta disposición de la molécula se observa a valores de presión superficial baja (Área 194 Å<sup>2</sup>). La orientación de la molécula de AmB en áreas de 37 Å<sup>2</sup>, corresponde a la interacción de la interfase con la micosamida (azúcar de AmB)<sup>165,183</sup> y el grupo carbonilo.

La monocapa obtenida es similar a la descrita por diversos autores<sup>165,183,236</sup> en el cual la parte polar de la AmB se encuentra en contacto con la interfase (forma horizontal) ocupando un área con un valor de aproximadamente 180-194 Å<sup>2</sup>, y 35-40 Å<sup>2</sup> cuando la molécula de AmB esta perpendicular a la interfase aire-agua. Otra característica es que si se comprime hasta el límite, el área determinada en la isoterma de compresión es menor, más pequeña que la sección transversal mínima de molécula de AmB, lo que estaría indicando que existe desorción a la subfase,<sup>236,238</sup> o bien algún tipo de ordenamiento entre las moléculas que maximizan su organización, como se conoce para gangliósidos y  $\beta CD$ -C16.<sup>141,183</sup>

En conclusión, la compresión de AmB es un proceso de dos fases representado por dos





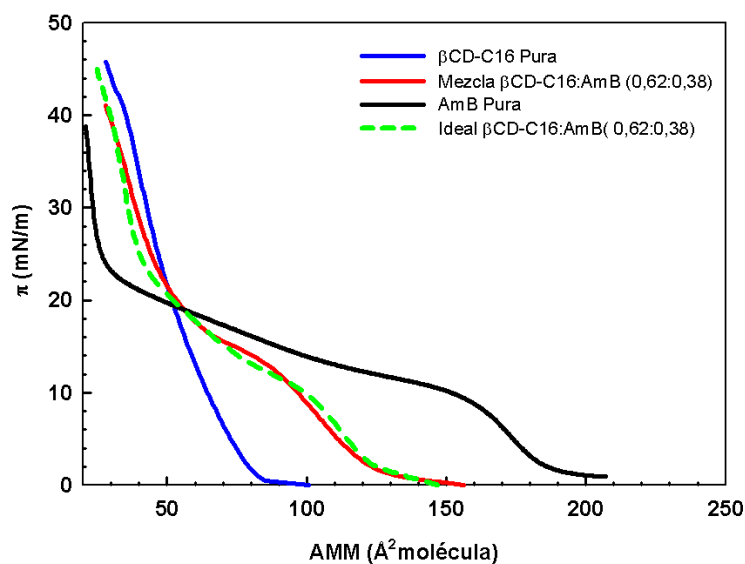
**Figura 4-8.:** Orientación de las moléculas de AmB en la interfase aire agua en función de presión de superficie.

distintos fragmentos lineales que muestran una transición entre las áreas moleculares de 180-190  $\text{\AA}^2$  y 37  $\text{\AA}^2$ . Estas áreas específicas de AmB corresponden a arreglos moleculares diferentes. Cuando la isoterma de AmB se encuentra a presiones altas (se encuentra en forma vertical, el azúcar está anclado en la subfase) tiene valores cercanos de la sección transversal teórica de AmB que ocupará un área de  $42\text{\AA}^2$ .<sup>183</sup>

En la Figura 4-9 se muestra la isoterma de compresión de la mezcla  $\beta CD$ -C16:AmB en la fracción molar 0,62:0,38.

La isoterma de compresión de la mezcla  $\beta CD$ -C16:AmB muestra un aumento del área molecular a altas presiones comparado con la isoterma característica de la  $\beta CD$ -C16. También se muestra que la isoterma de la mezcla tiene una transición de LE-LC menor comparada con la isoterma de AmB.

La monocapa de la mezcla  $\beta CD$ -C16:AmB (0,62:0,38) tiene un comportamiento superficial compatible con el ideal; la mezcla muestra un empaquetamiento molecular que confirma la regla de aditividad. Lo expresado anteriormente se confirma en la Figura 4-9 en donde se



**Figura 4-9.:** Isotermas de compresión de  $\beta CD$ -C16, AmB Y  $\beta CD$ -C16:AmB en NaCl (145mM) y 20°C.

comparan la isoterma experimental e ideal obtenidas para la mezcla de  $\beta CD$ -C16: AmB en fracciones molares 0,62:0,38. La isoterma ideal se obtuvo de acuerdo a la ecuación 2.2 .

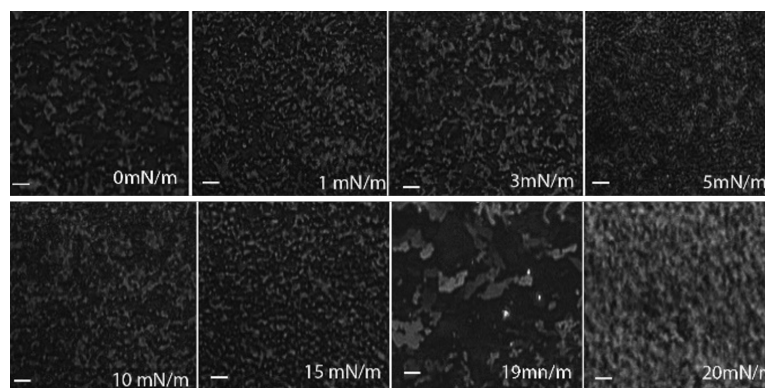
#### 4.4.3. Microscopía de ángulo Brewster (BAM) de monocapas de AmB y $\beta CD$ -C16:AmB

La microscopía de Angulo de Brewster (BAM) fue utilizada para conocer la topografía y textura en una interfase de la mezcla de  $\beta CD$ -C16:AmB en fracciones molares 0,62:0,38, así como también de los componentes puros. Con estos estudios se pudo determinar si la mezcla presenta la formación de dominios, segregación de los componentes, o conduce a la formación de una superficie homogénea como consecuencia de la compresión de la monocapas. Las monocapas fueron obtenidas al esparcir una solución que contiene AmB o mezclas  $\beta CD$ -C16:AmB. Los experimentos se realizaron utilizando una subfase de NaCl 145 mM y se muestran en las Figuras 4-10.

La Figura 4-10, muestra la existencia de pequeños dominios, rodeados de zonas oscuras (subfase) en la fase gaseosa a presiones de 0 mN/m. Al iniciar la compresión de la monocapa

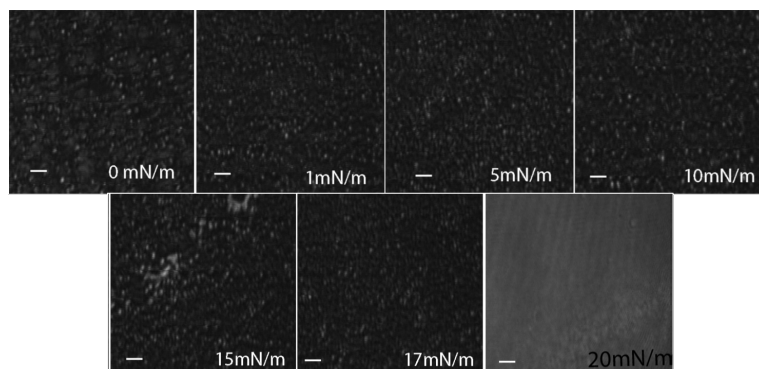
(1 mN/m - 10 mN/m), los dominios aumentan de tamaño y disminuyen las regiones oscuras. Al inicio de la transición LE-LC (10 mN/m – 20 mN/m), aumentó la reflectividad y desaparecieron las zonas oscuras, formando agregados de mayor tamaño con estructuras definidas. El aumento de la compresión de la monocapa de AmB generó una mayor reflectividad no pudiéndose identificar ninguna estructura definida.

El cambio de posición de las moléculas de AmB de horizontal a la posición vertical cuando las moléculas están en el estado líquido condensado, es confirmado por el aumento de la reflectividad que AmB en el intervalo 10 mN/m – 20 mN/m.<sup>239</sup>



**Figura 4-10.:** Imágenes BAM de la monocapa de Anfotericina B tomadas durante la compresión. La escala es equivalente a 30  $\mu$ m.

En la monocapa formada por la mezcla de  $\beta CD$ -C16:AmB (0,62:0,38) (Figura 4-11) se presentan la formación de pequeños agregados, poca reflectividad en la fase gaseosa. La compresión de la monocapa en la transición de fase LE-LC (10 mN/m –20 mN/m) genera el aumento exiguo de reflectividad y no se exhibe inhomogeneidades, lo que indicaría que  $\beta CD$ -C16 inhibe la interacción entre las moléculas de la AmB a presiones de 20 mN/m (cuando la isoterma nos indica el fin de la transición LE-LC).



**Figura 4-11.:** Imágenes BAM de la monocapa de la mezcla  $\beta CD$ -CD-C16: AmB (0,62:0,38) tomadas durante la compresión. Subfase NaCl 145mM. La escala es equivalente a  $30\mu m$ .

#### 4.4.4. Espectroscopía UV-Visible de reflexión de monocapas de AmB y $\beta CD$ -C16: AmB (0,68:38)

Los espectros UV-Vis de AmB disuelta en metanol, muestran cuatro señales características, siendo la señal de mayor adsorción la de 405 nm. Este espectro corresponde a la forma monomérica de la molécula de AmB.

Los espectros de reflexión ( $\Delta R$ ) de la monocapa de AmB en una subfase de NaCl 145 mM, fueron adquiridos a diferentes presiones de superficie (tabla 4-1), además, fueron normalizados de acuerdo con la ecuación 4-1 (Figura 4-12). El valor adimensional de  $\Delta R_n$  representa el espectro de reflexión normalizado por el área ocupada por la molécula.<sup>121</sup> A partir de la isoterma de la AmB y de la mezcla de  $\beta CD$ -C16:AmB obtenida anteriormente se determinaron en qué áreas y presiones (Tabla 4-2) se tomaron los espectros (Figura 4-12 y Figura 4-13).

$$\Delta R_n = \Delta R \times A \quad (4-1)$$

Las soluciones de AmB esparcidas en una interfase de NaCl 145 mM, a un área de  $230 \text{ \AA}^2$  y a una presión de  $\pi=0 \text{ mN/m}$  (fase gaseosa) mostraron un perfil similar al del estado

**Tabla 4-1.:** Presiones asignadas para la toma de los espectros UV-Vis de reflexión para AmB

Presiones mN/m	AmB nm <sup>2</sup> /molécula
0	2,5
1	2
3	1,8
5	1,51
10	0,9
15	0,7
20	0,51
25	0,3

monomérico, observándose la señal de mayor absorción en 412 nm, otra señal a 389 nm y por último una señal a 370 nm.<sup>87,230,240</sup> (Figura 4-12B).

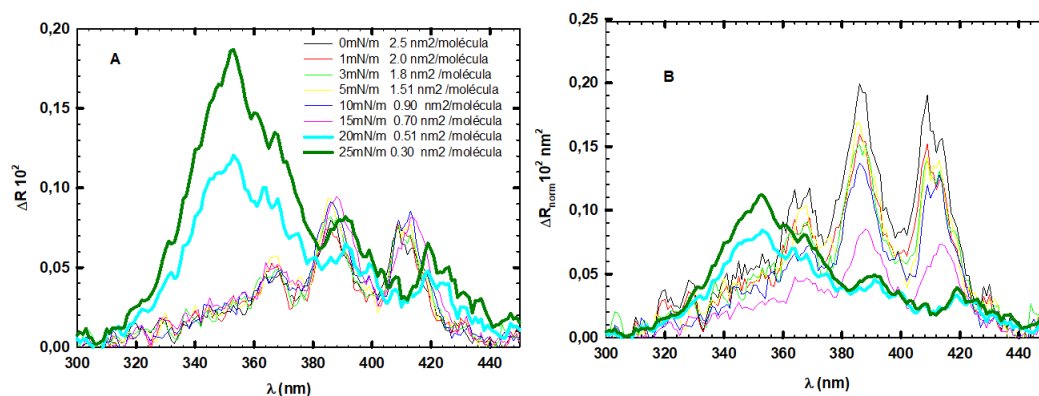
Por otra parte, a presiones de 1–15 mN/m, durante la compresión no aparece ninguna banda nueva en los espectros normalizados, se observa una reducción de la intensidad de las bandas iniciales.

Como se ha indicado anteriormente, la AmB en solución metanólica presenta una señal de mayor adsorción a 405 nm y su forma asociada tiene una señal característica de 350 nm, (especialmente dímeros).<sup>183,240</sup> En la Figura 4-12 se observa que a presiones de superficie altas (>20 mN/m)  $\Delta R_n$  tiene una reducción en la absorbancia de las bandas originales entre 420-360 nm y la aparición de una nueva banda a 350 nm característica de agregados de AmB. De acuerdo a lo descrito en la literatura y basándonos en la teoría del exciton, este espectro es característico de la formación de estructuras moleculares agregadas de tipo H, en los cuales los momentos dipolares de transición de las moléculas están orientados en paralelo y fuera del plano del agregado.<sup>227</sup>

El espectro UV-Vis de reflexión de la mezcla  $\beta CD$ -C16:AmB (0,62:0,38) Figura4-13b, se normalizó (ecuacion 4-1 ), mostrando que al aumentar la presión desde 0 N/m hasta

**Tabla 4-2.:** Presiones asignadas para la toma de los espectros UV-Vis de reflexión para la mezcla  $\beta CD$ -C16:AmB (0,68:0,32).

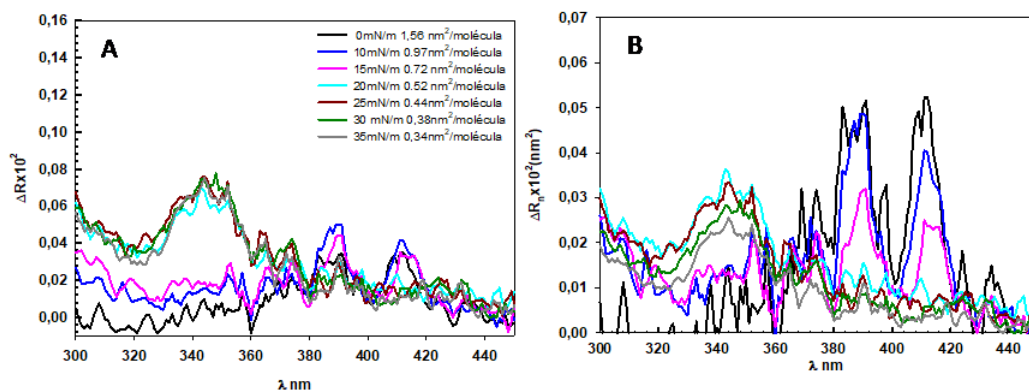
Presiones mN/m	$\beta CD$ -C16:AmB nm <sup>2</sup> /molécula
0	1,56
10	0,97
15	0,72
20	0,52
25	0,44



**Figura 4-12.:** A) Espectro UV-Vis de reflexión de la monocapa de la AmB y B) Espectro normalizado en una subfase 145 mM de NaCl, 25°C.

15 mN/m. La forma de este espectro de reflexión es casi coincidente con el de la especie monomérica de AmB.

A presiones superiores a los 15 mN/m, la monocapa mixta de  $\beta CD$ -C16:AmB muestra también la forma agregada del fármaco. Estos resultados muestran un perfil similar en cuanto al estado de agregación de AmB que el observado para AmB cuando está sola en interfase.



**Figura 4-13.:** Espectros de reflexión UV-Vis de monocapas de la mezcla de  $\beta CD$ -C16:AmB (0,62:0,38 ) y B) Espectro normalizado en una subfase 145 mM de NaCl, 25°C.

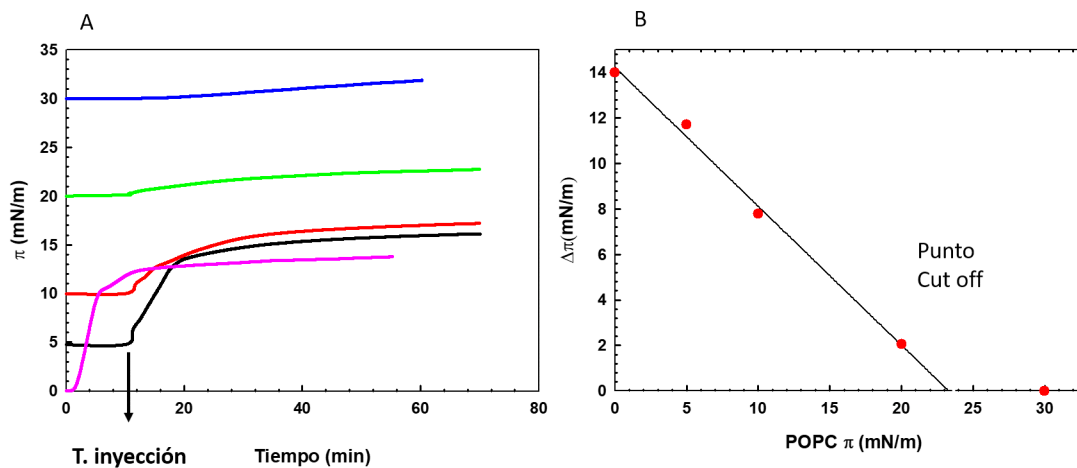
#### 4.4.5. Adsorción de AmB en la interfase aire-agua y en una interfase de POPC

La AmB muestra una estructura anfifílica la cual le permite adsorberse en una interfase aire-agua,<sup>230</sup> este fenómeno se evidenció tras la inyección de diferentes cantidades de AmB en una subfase acuosa de NaCl 145 mM, y tiene como resultado el aumento en la presión de la superficie. Se utilizaron concentraciones de AmB en DMSO superiores a la concentración de agregación crítica CAC de AmB (0,5 a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).<sup>80,95</sup>

En este ensayo se observó la penetración de las moléculas de AmB en la interfase agua-aire, el valor de equilibrio se alcanzó después de aproximadamente 2 h, como se muestra en la Figura 4-14. La presión superficial de equilibrio fue 12-14 mN/m. Los resultados obtenidos presentan perfiles similares con lo reportado por algunos autores.<sup>86,237</sup>

Con el objetivo de conocer cuál es la tendencia de AmB para penetrar en biomembranas se realizaron ensayos de adsorción a una monocapa preformada de POPC, la cual estaba empaquetada a diferentes presiones de superficie. La monocapa de POPC se extendió en la interfase a presiones de superficie de 5, 10, 20 y 30 mN/m. Luego de estabilizada la monocapa de POPC, se incorporó AmB en la subfase en una concentración final de 39  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Los resultados se muestran en la gráfica 4-14.

La presión de 30 mN/m en particular corresponde a una monocapa de POPC altamente



**Figura 4-14.:** Curva de adsorción de AmB en la interfase aire-agua(—) y penetración de AmB en monocapas de POPC a diferentes presiones :5 mN/m (—), 10 mN/m (—), 20 mN/m (—), 30 mN / m (—). Subfase NaCl 45mM, B)  $\Delta\pi$  generada por la penetración de AmB en la monocapas de POPC.

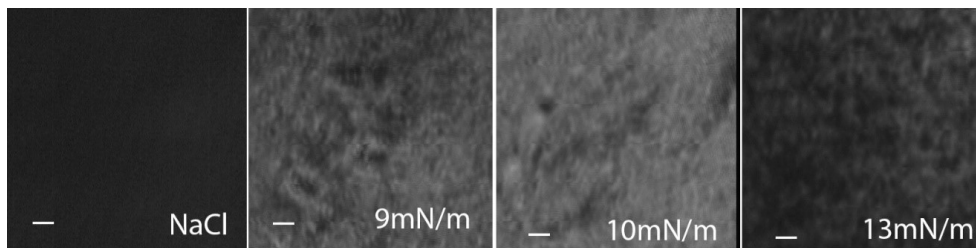
empaquetado, que tiene un alto ordenamiento molecular (Esta presión de 30mN/m se propone que tiene una organización similar a la que poseen los lípidos en una bicapa). A esta presión inicial de POPC, la AmB no produce cambios en la presión de superficie indicando que no es capaz de insertarse o penetrar una monocapa densamente empaquetada.

La gráfica de *cut off* mostrada en la Figura 4-14 B permitió determinar la máxima presión de superficie a la cual AmB podría penetrar una monocapa de POPC. Este valor oscila entre  $23 \pm 1$  mN/m, el cual es menor a 30 mN/m, mostrando la dificultad que tiene AmB de penetrar una bicapa densamente organizada.<sup>152</sup>

Las imágenes adquiridas por BAM, para los film formados por la adsorción de moléculas de AmB en una interfase limpia (Figura 4-15), muestra una topografía bastante similar a las imágenes de AmB cuando se encuentra en una monocapa de Langmuir en la interfase agua-aire.<sup>86</sup> El  $\Delta\pi$  confirma la adsorción de la AmB y que es corroborado por el aumento de la reflectividad al pasar el tiempo. Cuando se alcanza la estabilidad de la monocapa, las imágenes muestran una superficie heterogénea indicando que la altura de la monocapa



no es constante, observando en ciertos lugares una fase condensada que genera una mayor reflectancia (dominios brillantes).



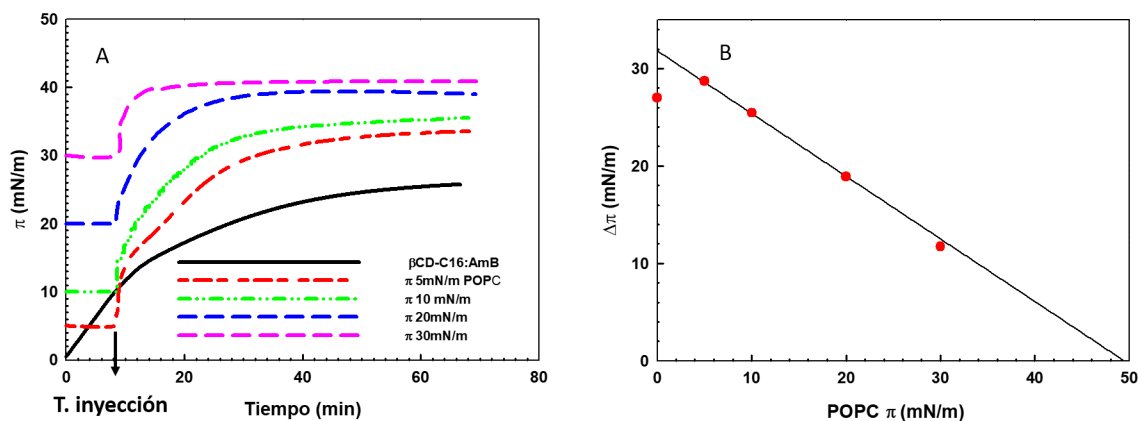
**Figura 4-15.:** Imágenes BAM de adsorción de AmB en una interfase aire-agua. La escala es equivalente a  $30 \mu\text{m}$  la imagen  $13 \text{ mN/m}$  se tomó con 60 % de ganancia a fin de evitar la alta reflectividad del film.

#### 4.4.6. Adsorción de agregados auto-ensamblados de $\beta CD$ -C16:AmB en la interfase agua-aire y en una interfase de POPC

A fin de conocer la capacidad que tienen los agregados auto-ensamblados de  $\beta CD$ -C16:AmB para interactuar con un modelo de biomenbrana se estudió la penetración de ellos en monocapas de POPC empaquetadas a diferentes presiones superficiales.

Los agregados auto-ensamblados de  $\beta CD$ -C16:AmB (0,62:38) forman películas de Gibbs estables que alcanzan valores de presión superficial entre  $27 \pm 2 \text{ mN/m}$ , y presentan cinéticas de adsorción diferentes que la AmB sola o  $\beta CD$ -C16. La Figura 2-20 muestra la isoterma de adsorción de  $\beta CD$ -C16 la cual presenta la presión de equilibrio de  $33 \text{ mN/m}$ . Estos resultados indican que los agregados de  $\beta CD$ -C16:AmB producen un menor incremento en la presión que el que se produce con  $\beta CD$ -C16 pura y un mayor incremento en la presión que el ocasionado por AmB.

La penetración del agregado auto-ensamblado de  $\beta CD$ -C16:AmB en monocapas compuestas por POPC se ilustra en la Figura 4-16. Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo el mismo procedimiento que se aplicó para la penetración de AmB sola. El tiempo que requirió para que la presión se estabilizara es mínimo, cuando tenemos monocapas altamente empaquetadas ( $\pi_0 30 \text{ mN/m}$ ), y de mayor tiempo para cuando tenemos el agregado



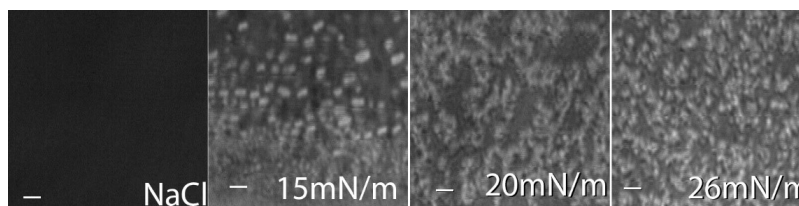
**Figura 4-16.:** Curvas de adsorción de agregados de  $\beta CD-C16:AmB$  en una interfase aire/ $NaCl$  145 mM (—) y penetración de  $\beta CD-C16:AmB$  en monocapas de POPC empaquetadas a diferentes presión superficial: 5 mN / m (---), 10 mn / m (---), 20 mn / m (---), 30 mN/m (---). B) Cut off de  $\beta CD-C16:AmB$  en una interfase de POPC.

autoensamblado  $\beta CD-C16:AmB$  incorporándose a una interfase limpia. En los ensayos de penetración o de monocapas preformadas de POPC (5, 10, 15, 20 30 mN/m) los agregados auto-ensamblado  $\beta CD-C16:AmB$  tienen la capacidad de penetrar esta interfase lipídica, lo cual es observado por la sobrepresión alcanzada en todos los ensayos (Figura 4-16)

En el diagrama de *cut off* ( $\Delta\pi$  vs  $\pi_0$ POPC) que se muestra en la Figura 4-16B se observa el máximo de  $\pi$  al cual los agregados de  $\beta CD-C16: AmB$  podrían penetrar una monocapa de POPC. El punto de corte se encuentra en un intervalo de  $49 \pm 1$  mN/m. A diferencia de la moléculas de AmB sola, el agregado autoensamblado  $\beta CD-C16:AmB$  puede penetrar el modelo de biomembranas altamente empaquetado. El anterior valor de presión superficial es mayor al asignado a las membranas formadas por bicapas que se encuentra entre 30-35 mN/m indicando que el agregado tendría la posibilidad de penetrar bicapas. También se puede observar que el valor de cut off mostrado por los agregados  $\beta CD-C16:AmB$  es similar al de  $\beta CD-C16$  cuando está sola. Este resultado posiblemente indica que la ciclodextrina anfifílica es quien mayormente guía o facilita la penetración en la monocapa de POPC. Sin embargo, tal como se muestra más adelante, AmB también penetra la monocapa junto a

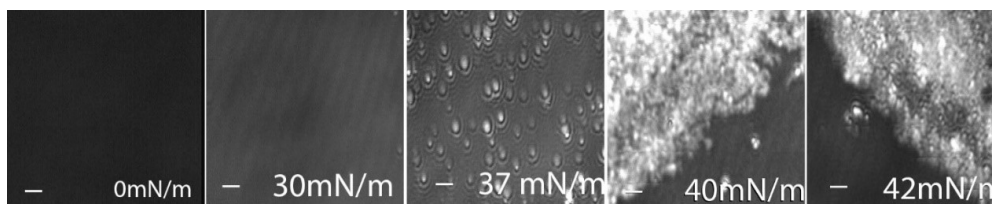
$\beta CD$ -C16. Esto fue confirmado cuantificando la AmB presente en la interfase.

La topografía fue determinada por BAM para los agregados auto ensamblado de  $\beta CD$ -C16:AmB adsorbidos en una interfase de NaCl 145 mM. En la interfase se muestran estructuras ramificadas que cambian a núcleos al aumentar la densidad molecular con el tiempo. La estructura formada por el agregado autoensamblado de  $\beta CD$ -C16:AmB es diferente al que presenta la  $\beta CD$ -C16 el cual formaba estructuras tipo hilo (Figura 2-34).



**Figura 4-17.:** Imágenes BAM de adsorción del agregado  $\beta CD$ -C16: AmB en una interfase aire-agua. La escala es equivalente a  $30 \mu m$

Las imágenes adquiridas por BAM de la Figura 4-18 muestran la topografía de la monocapa formada por la penetración de los agregados autoensamblado de  $\beta CD$ -C16:AmB en una monocapa preformada POPC, las imágenes son similares a las imágenes de monocapa de Langmuir formada por la  $\beta CD$ -C16:POPC (Figura 2-36). Se observan aparición de conglomerados birrefringente después de la adición de los agregados auto-ensamblados de  $\beta CD$ -C16:AmB en la subfase, en la cual la monocapa preformada de POPC (zonas oscuras) coexisten con una dominios brillantes de la formulación  $\beta CD$ -C16:AmB. Estos resultados confirman la capacidad de los agregados auto-ensamblados  $\beta CD$ -C16:AmB de penetrar monocapas altamente empaquetadas.



**Figura 4-18.:** Penetración del agregado auto ensamblado de  $\beta CD$ -C16: AmB en una monocapa de POPC altamente empaquetada ( $30 mN/m$ )

Los ensayos de penetración de monocapas altamente empaquetadas de POPC con AmB

**Tabla 4-3.:** Cuantificación de AmB en interfase limpia y en una monocapa de POPC, los datos obtenidos son por duplicado.

Presión de POPC mN/m	Adsorción y penetración de AmB en interfase de POPC		Adsorción y penetración de los agregados de $\beta$ CD-C16:AmB	
	Concentración de AmB ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) en interfase	Porcentaje de AmB en interfase	Concentración AmB ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) en interfase	Porcentaje de AmB en interfase
0 <sup>a</sup>	3,00 $\pm$ 0,5	100	0,64 $\pm$ 0,5	100
5	0,17 $\pm$ 0,03	5,7	0,45 $\pm$ 0,04	70
10	0,07 $\pm$ 0,03	2,5	0,38 $\pm$ 0,08	60
20	—	—	0,20 $\pm$ 0,03	30
30	—	—	0,14 $\pm$ 0,05	21
35	—	—	0,11 $\pm$ 0,05	16

<sup>a</sup> Interfase agua-aire sin POPC.

sola, se realizaron inyectando concentraciones de 0,038 mg/mL de AmB disuelto en DMSO. Esto es debido a que en los ensayos de control se determinó que el volumen máximo del solvente (este caso DMSO) que se pudo inyectar en la subfase sin perturbar la presión de superficie fue de 21  $\mu\text{L}$ . Por el contrario, para los ensayos de los agregados  $\beta$ CD-C16: AmB en agua se agregó un máximo de 100  $\mu\text{L}$  con una concentración final de 0,009 mg/mL de AmB. Las diferencias de concentración en los dos ensayos hacen más evidente la capacidad de penetración de la formulación  $\beta$ CD-C16: AmB (0,68:0,32) que con una concentración 4 veces menor presenta la capacidad de penetrar monocapas altamente empaquetadas con un  $\Delta\pi$  de 10 mN/m.

Para identificar la cantidad de AmB, que penetró la monocapa de POPC, se realizó el ensayo de transferencia de la monocapa a una nueva interfase. Se analizaron las monocapas luego de la penetración monocapas preformadas de POPC a 5, 10, 20 y 35 mN/m (Figura 4-14). Después de la transferencia de la monocapa formada AmB se toma todo el volumen de la sección de la cuba, se liofilizó y se resuspendió en metanol para su cuantificación por medio de espectroscopia UV-Vis.

Los resultados de la Tabla 4-9 muestran que la incorporación de la AmB a una interfase

limpia y la penetración a monocapas de POPC se vuelve menos eficiente, mientras que cuando AmB está en el sistema  $\beta CD$ -C16:AmB puede penetrar en monocapas altamente empaquetadas.

Estos resultados son similares a los obtenidos por J Miñones,<sup>94</sup> quien determinó que la adsorción de AmB no solo se depende del empaquetamiento de la monocapa preformada, sino también de las interacciones de las moléculas de la monocapa con las del fármaco las cuales limitan la penetración del fármaco. Por lo tanto, es posible concluir que el sistema de transporte de AmB en la solución acuosa es un factor importante que influye en la penetración de AmB hacia la monocapa de POPC altamente empaquetada.

## 4.5. Conclusiones

La AmB forma películas de Langmuir estables sobre una subfase de NaCl, además, el comportamiento de la película depende de la concentración, temperatura y subfase utilizada.

La mezcla de AmB y  $\beta CD$ -C16 mostró interacciones en monocapas de Langmuir a bajas presiones de superficie, dando como resultado que a presiones de hasta 15 mN/m no existe la formación de agregados de AmB en la interfase tal como se observa en la monocapa sola de AmB. Después de 20 mN/m la tendencia cambia, se observan cambios en el espectro y por ende la formación de agregados de AmB.

Las imágenes BAM obtenidas en la mezcla  $\beta CD$ -C16:AmB (0,62:0,38) muestran la existencia de dominios y las formaciones no aumentan de tamaño durante la compresión hasta (20 mN/m), mientras que las imágenes de las monocapas de AmB mostraron un aumento de la reflectividad durante la compresión indicando que la  $\beta CD$ -C16 en la mezcla no permite la formación de agregados de mayor tamaño.

Los agregados auto-ensamblados de  $\beta CD$ -C16:AmB se absorben eficientemente en una interfase limpia. También fueron capaces de penetrar en una biomembrana altamente empaquetada. A diferencia, la AmB fue incapaz de penetrar en una biomembrana altamente empaquetada. Estos resultados son promisorios para la potencial utilización de  $\beta CD$ -C16 en el control de la translocación de otras moléculas a través de membranas lipídicas.



## **5. Conclusiones Generales**

En el presente trabajo de Tesis se estudiaron las propiedades de las ciclodextrinas anfifílicas al interactuar con interfases lipídicas y como medio de transporte de fármacos hidrófobos.

Se determinó la capacidad de  $\beta$ CD-C16 de interactuar con un modelo de biomembrana, utilizando el fosfolípido POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina).

La  $\beta$ CD-C16 presenta la capacidad de formar monocapas estables en una interfase agua-aire. Adicionalmente las monocapas de Langmuir de  $\beta$ CD-C16: POPC, con diferente composición, muestran inmiscibilidad de sus componentes y expansión del área con respecto al comportamiento ideal.

La  $\beta$ CD-C16 inmersa en una matriz de fosfolípido (POPC), está impedida para formar eficientemente la red de puentes de hidrógeno entre los OH de las ciclodextrinas vecinas. Lo anterior es confirmado por la ausencia de histéresis.

La  $\beta$ CD-C16 tiene una gran tendencia a auto-organizarse en ensamblados ordenados cuando se le ofrece la posibilidad de adsorberse a una interfase limpia o una interfase lipídica tal como POPC. También presenta agregados estables en medios acuosos y con la capacidad de incorporar AmB hasta un máximo en concentración 1,5 mg/mL (dosis terapéutica). Los agregados de  $\beta$ CD-C16:AmB se pueden liofilizar, reconstituir e incubarse a diferentes temperaturas sin que se genere degradación del agregado ni de sus constituyentes.

Los agregados obtenidos de  $\beta$ CD-C16:AmB inhiben el crecimiento de *Cándida albicans*. Además, el auto-ensamblado de las formulaciones y sus excipientes no generan hemólisis, mientras que las formulaciones comerciales sí la producen. El perfil de inhibición en el crecimiento de *C. albicans* de Anfostat es similar al obtenido en las formulaciones de  $\beta$ CD-C16:AmB presentadas en la presente tesis. Por ello, la formulación de  $\beta$ CD-C16:AmB presenta mejores características que los productos comerciales como el Anfostat.

Se determinó el comportamiento de la AmB y de la mezcla de  $\beta$ CD-C16:AmB en monocapas de Langmuir. La estabilidad de la monocapa de AmB es determinada por la concentración, temperatura y subfase utilizada. La mezcla de  $\beta$ CD-C16:AmB formó monocapas estables presentando interacciones a bajas presiones de superficie, presentando características espectrales de la especie monomérica, a presiones altas la tendencia en los espectros



UV-Vis de reflexión cambia demostrando la formación de agregados de AmB.

Los agregados auto-ensamblados de  $\beta CD$ -C16:AmB muestran absorción en una interfase agua-aire. Los mismos también presentan la capacidad de penetrar en una biomembrana altamente empaquetada. Por el contrario, la AmB fue incapaz de penetrar en una biomembrana empaquetada de POPC.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis son promisorios para futuras investigaciones, ya que proveen información valiosa aportando con ellos nuevos conocimientos, que podrían posteriormente ser utilizados en relación al estudio de las propiedades de  $\beta CD$ -C16 en el control de la translocación de otras moléculas a través de membranas lipídicas.

# A. Anexo

## A.1. Síntesis y caracterización de $\beta$ CD-C16

La obtención de la  $\beta$ CD-C16 se desarrolla en 2 etapas la primera es la síntesis y purificación del anhídrido 2-hexadecenilsuccínico y la segunda es la esterificación de la  $\beta$ -ciclodextrina con el anhídrido y su posterior purificación.

### Obtención del anhídrido 2-hexadecenilsuccínico

En un reactor de acero se agregó 2,672 g (27 mmol) de anhídrido maleico, 11,63 g (52 mmol) de 1-hexadeceno y 50 mg de hidroquinona, dejándose reaccionar por 24 horas a una temperatura de 180 °C. Transcurrido este tiempo se deja enfriar hasta temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 40 mL de  $\eta$ -hexano, se dejó decantar por una hora y se filtró en papel. La reacción se muestra en la Figura A-1

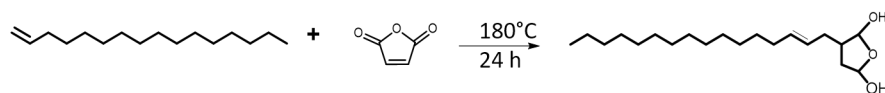
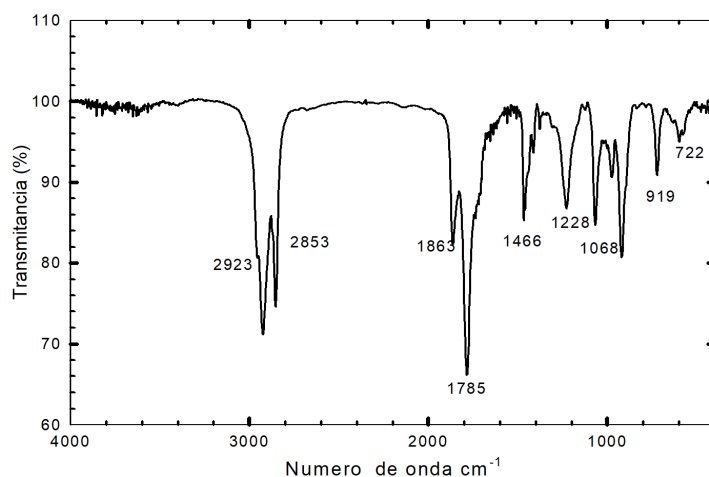


Figura A-1.: Obtención de anhídrido 2-hexadecenilsuccínico.

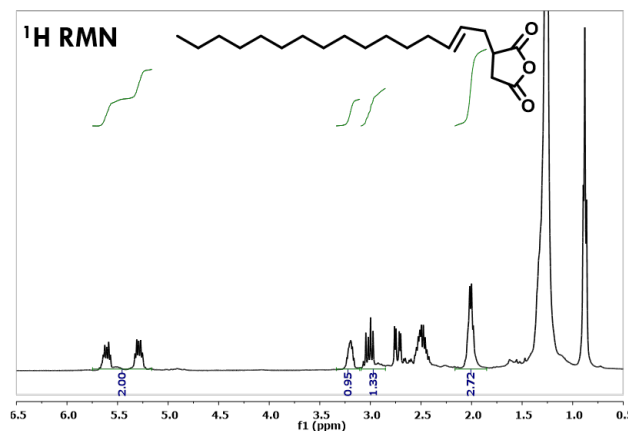
El líquido filtrado, que presenta una coloración marrón, fue destilado a presión reducida para la separación del remanente de los reactivos empleando un microdestilador Büchi a una temperatura de 270 °C. El producto fue caracterizado por espectroscopia FT-IR y RMN. Los espectros se muestran en las Figuras A-2 y A-3

**Tabla A-1.:** Señales de anhídrido 2-hexadecenilsuccínico obtenidos por FT-IR.

Numero de onda (cm-1)	Grupo funcional
2923, 2853	CH <sub>2</sub>
1863, 1785	Carbonilo anhídrido
1466	CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub>
919	C=C

**Figura A-2.:** Espectro FT-IR de anhídrido 2-hexadecenilsuccínico.

La figura **A-3** se muestra el espectro <sup>1</sup>H RMN de anhídrido 2-hexadecenilsuccínico. La alta reactividad del anhídrido 2-hexadecenilsuccínico hace que se convierta fácilmente en ácido 2-hexadecenilsuccínico. Para recuperar el anhídrido 2-hexadecenilsuccínico desde el ácido, se hizo reaccionar el ácido 2-hexadecenilsuccínico con anhídrido acético en un balón de 2 bocas. Para ello se agregaron 1 g de la mezcla del ácido 2-hexadecenilsuccínico y 3 mL de anhídrido acético y se puso a reflujo durante 1 una hora. Posteriormente la mezcla alcanza temperatura ambiente, se le agregan 10 mL de  $\eta$ -hexano y se filtra por medio de papel. Por ultimo se destila con un microdestilador Büchi a presión reducida y se obtiene el anhídrido 2-hexadecenilsuccínico que se verifica por FT-IR. En la Figura **A-4** se muestra el espectro



**Figura A-3.:** Espectro  $^1\text{H}$  RMN de anhídrido 2-hexadecenilsuccínico.  $\delta_{+H}$  (400,13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0,82 (t, 3H), 1,21 (s, 10H), 2 (m, H), 2,5 (m, H), 2,7 (m, 2H), 3,0 (m, 2H) 3,18 (1H), 5,29 (m, H), 5,60 (m, H).

del anhídrido y se le compara con el ácido 2-hexadecenilsuccínico.

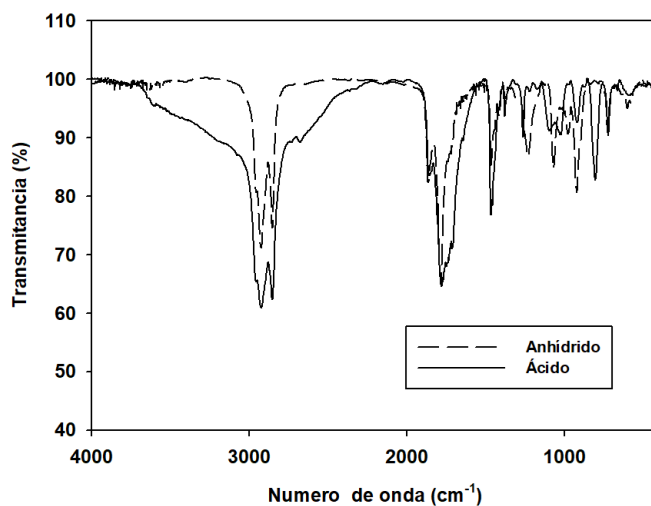
### Obtención de la ciclodextrina anfifílica ( $\beta$ CD-C16)

Previo a la síntesis de la  $\beta$ CD-C16 se debe secar (anhidrar) a  $\beta$ CD. Para ello se utilizó un equipo que trabaja a presión reducida a una temperatura de  $110^\circ\text{C}$  durante 4 horas. Luego se tomaron 951 mg (0,83 mmol) de  $\beta$ CD anhidra y se agregaron en un balón de dos bocas que contenía 30 mL de piridina anhidra. La mezcla se agitó por 2 horas a una temperatura de  $90^\circ\text{C}$  hasta encontrar una suspensión de coloración blanca.

Al término de las dos horas de agitación y por medio de un embudo de compensación se agregaron gota a gota 265 mg (0,83mmol) de anhídrido 2-hexadecenilsuccínico disuelto en 10 mL de piridina anhidra y luego de dos horas a partir de la última gota de piridina / anhídrido 2 hexadecenilsuccínico se dejó reaccionar por 12 horas a una temperatura de  $90^\circ\text{C}$ .

Después de haber transcurrido las 12 horas de reacción se dejó que la solución llegue a temperatura ambiente y se agregaron 5 mL de agua. Para eliminar el solvente se utilizó un evaporador rotatorio quedando un sólido blanquecino.

El sólido obtenido (1,2 g) es lavado en un equipo de soxhlet con 150 mL de acetona por

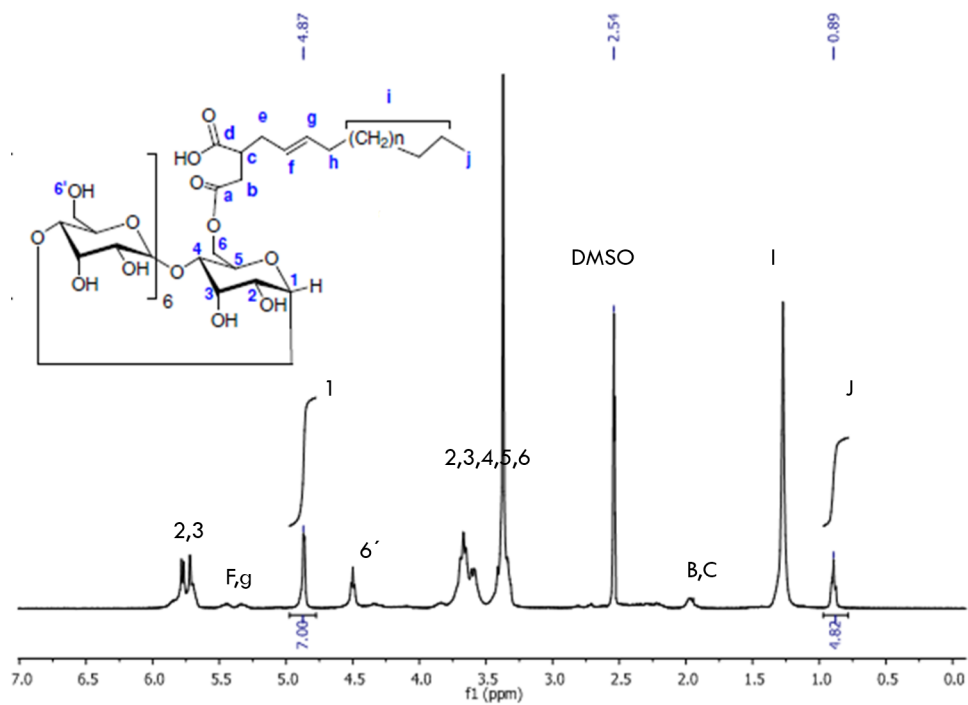
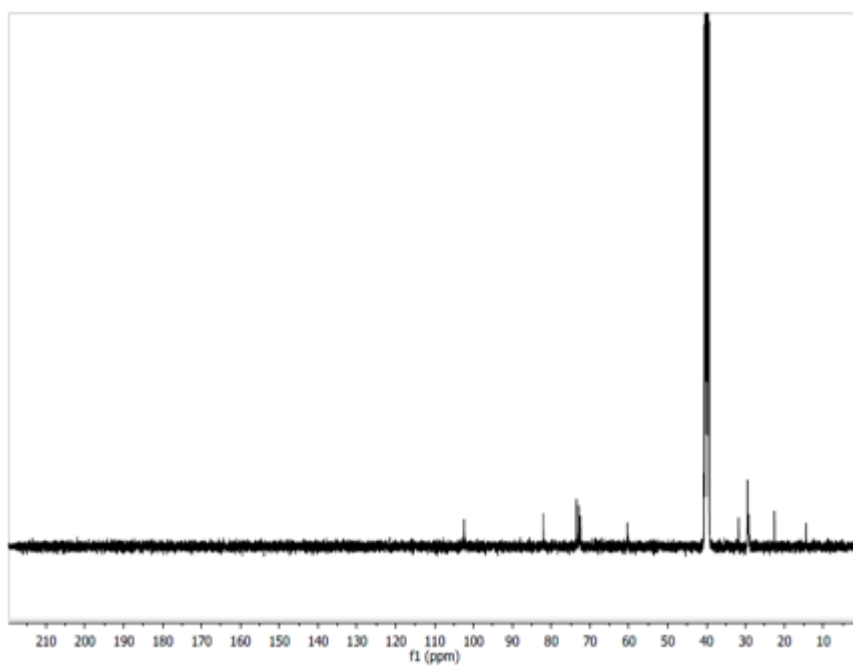


**Figura A-4.:** Comparación de los espectros de FT-IR del anhídrido (- - -) ácido(-)2-hexadecenilsuccínico

8 horas y luego fue secado en una bomba de vacío por 3 horas. El sólido de color blanco, posteriormente se disuelve en 50 mL de una solución acuosa pH 9 (NaOH) que contribuye a la eliminación de  $\beta$ CD nativa (cuya disolución en medio acuoso alcalino se ve favorecida). Luego se llevó a pH 3.5 agregando 1 mL de HCl 2N, y dejó decantar por 12 horas en la heladera a 4<sup>o</sup>C. Por último se obtiene la ciclodextrina modificada separando el sólido por medio de centrifugación a 7500 rpm por 10 minutos. Este procedimiento se repite hasta observar la ausencia de  $\beta$ CD mediante el análisis de RMN. Finalmente la muestra es liofilizada por 24 horas.

## A.2. Caracterización de $\beta$ CD-C16 por RMN

En la Figura A-5 se presenta el espectro de <sup>1</sup>H RMN obtenido para  $\beta$ CD-C16 así como la asignación de las señales y en la Figura A-6 el espectro de <sup>13</sup>C RMN

Figura A-5.:  $^1\text{H}$  RMN de  $\beta$ CD-C16 en DMSO.Figura A-6.:  $^{13}\text{C}$  RMN de  $\beta$ CD-C16 en DMSO

El grado de sustitución de  $\beta$ CD-C16 se determinó a partir de la relación de las integrales obtenidas para los protones anoméricos (4,82 ppm) y del metilo (0,89 ppm) de la cadena hidrocarbonada. Para ello, a la señal dada por los protones anoméricos se le asigna un valor de 7 (que corresponde a los protones anoméricos presentes en las 7 glucosas que corresponden a  $\beta$ CD-C16 nativa). Si el grado de sustitución de  $\beta$ CD-C16 por parte del anhídrido 2 hexadecilsuccinico es igual a 1 se debe esperar la presencia de un único grupo metilo en  $\beta$ CD-C16 y una integral para el metilo cuyo valor sea de 3 (que responden a tres hidrógenos). En la síntesis realizada de  $\beta$ CD-C16 el valor de la integral para el grupo metilo arrojó un valor de 4,82, indicando que el grado de sustitución promedio de  $\beta$ CD-C16 es igual a 1,60.

# Bibliografía

- [1] Jonathan W. Steed, David R. Turner and Karl Wallace. *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.*, volumen 129. 2007.
- [2] Kohsaku Kawakami, Mitsuhiro Ebara, Hironori Izawa, Nohelia M. Sanchez-Ballester, J. P. Hill, and K. Ariga. Supramolecular Approaches for Drug Development. *Current Medicinal Chemistry*, 19:2388–2398, 2012.
- [3] Matthew J. Webber and Robert Langer. Drug delivery by supramolecular design. *Chemical Society Reviews*, 46:6600–6620, 2017.
- [4] Lingyun Zhou, Tian Qiu, Fengting Lv, Libing Liu, Jianming Ying, and Shu Wang. Self-assembled nanomedicines for anticancer and antibacterial applications. *Advanced Healthcare Materials*, 7:1800670, 2018.
- [5] Xiao Yu Hu and Leyong Wang. Two sides to supramolecular drug delivery systems. *Supramolecular Chemistry*, 30:664–666, 2018.
- [6] Iurii Antoniuk and Catherine Amiel. Cyclodextrin-Mediated Hierarchical Self-Assembly and Its Potential in Drug Delivery Applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105:2570–2588, 2016.
- [7] Yingfeng Tu, Fei Peng, Alaa Adawy, Yongjun Men, Loai KEA Abdelmohsen, and Daniela A Wilson. Mimicking the cell: bio-inspired functions of supramolecular assemblies. *Chemical reviews*, 116:2023–2078, 2015.



- 
- [8] Jean Marie Lehn. Supramolecular chemistry: From molecular information towards self-organization and complex matter. *Reports on Progress in Physics*, 67:249–265, 2004.
- [9] Daham Jeong, Sang Woo Joo, Vijay Vilas Shinde, Eunae Cho, and Seunho Jung. Carbohydrate-based host-guest complexation of hydrophobic antibiotics for the enhancement of antibacterial activity. *Molecules*, 22:1–15, 2017
- [10] Dongjing Zhang, Pin Lv, Cheng Zhou, Yulin Zhao, Xiali Liao, and Bo Yang. Cyclodextrin-based delivery systems for cancer treatment. *Materials Science and Engineering C*, 1:1–14, 2018.
- [11] Chutimon Muankaew and Thorsteinn Loftsson. Cyclodextrin-Based Formulations: A Non-Invasive Platform for Targeted Drug Delivery. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 122:46–55, 2018.
- [12] Luis Rivas and Carmen Gil, *Drug Discovery for Leishmaniasis*. Drug Discovery. The Royal Society of Chemistry, 2018.
- [13] Hidetoshi Arima, Keiichi Motoyama, and Taishi Higashi. Potential Use of Cyclodextrins as Drug Carriers and Active Pharmaceutical Ingredients. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 65:341–348, 2017.
- [14] Leonard F Lindoy and Ian M Atkinson. *Self-assembly in supramolecular systems*. Editors Royal Society of Chemistry, 2000.
- [15] Yang Li, Yiguang Wang, Gang Huang, and Jinming Gao. Cooperativity principles in self-assembled nanomedicine. *Chemical Reviews*, 118:5359–5391, 2018.
- [16] Zhan-Ting Li and Li-Zhu Wu. *Hydrogen bonded supramolecular structures*. Editors: Springer, 2015.
- [17] Guiting Liu, Qijuan Yuan, Geoffrey Hollett, Wei Zhao, Yang Kang, and Jun Wu. Cyclodextrin-based host-guest supramolecular hydrogel and its application in biomedical fields. *Polymer Chemistry*, 9:3436–3449, 2018.

- [18] Jacob N Israelachvili. *Intermolecular and surface forces*. Academic press, 2011.
- [19] Jonathan W. Steed Jerry L. Atwood. *Supramolecular chemistry*. Editors: John Wiley & Sons 2013
- [20] J. J. McKendrick David. MacNicol and D. R. Wilson. Clathrates and molecular inclusion phenomena. *Chemical Society Reviews*, 7:65–87, 1978.
- [21] Jean-Marie Lehn. Supramolecular chemistry. *Science*, 260:1762–1764, 1993.
- [22] Drew Myers. *Surfactant science and technology*. Editor: John Wiley & Sons, Inc, 3 edition, 2006.
- [23] Sebastian Polarz, Marius Kunkel, Adrian Donner, and Moritz Schlötter. Added-value surfactants. *Chemistry A European Journal*, 24:18842–18856, 2018.
- [24] Milagro Mottola, Raquel V. Vico, Martín E. Villanueva, and María Laura Fanani. Alkyl esters of l-ascorbic acid: Stability, surface behaviour and interaction with phospholipid monolayers. *Journal of Colloid and Interface Science*, 457:232–242, 2015.
- [25] Sandeep Kalepu and Vijaykumar Nekkanti. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5:442–453, 2015.
- [26] Abu T M Serajuddin. Salt formation to improve drug solubility . *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59:603–616, 2007.
- [27] Bina Gidwani and Amber Vyas. A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs. *BioMed Research International*, 2015:1–15, 2015.
- [28] Nazila Yousefi, Gholamhossein Mehralian, Hamid Reza Rasekh, and Mina Yousefi. New product development in the pharmaceutical industry: Evidence from a generic market. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 16:834, 2017.

- [29] Sandeep Kalepu and Vijaykumar Nekkanti. Improved delivery of poorly soluble compounds using nanoparticle technology : a review. *Drug Delivery and Translational Research*, 6:319—332, 2016.
- [30] Frederico W. Tavares Maria S. Santos and E. C. Biscaia. Molecular thermodynamics of micellization: Micelle size distributions and geometry transitions. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 33:515–523, 2016.
- [31] Abolfazl Akbarzadeh, Rogaie Rezaei-Sadabady, Soodabeh Davaran, Sang Woo Joo, Nosratollah Zarghami, Younes Hanifehpour, Mohammad Samiei, Mohammad Kouhi, and Kazem Nejati-Koshki. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8:102–111, 2013.
- [32] Weiwei Gao, Che-Ming J Hu, Ronnie H Fang, and Liangfang Zhang. Liposome-like nanostructures for drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B*, 1:6569–6585, 2013.
- [33] Shravan Kumar Sriraman and Vladimir P. Torchilin. Recent Advances with Liposomes as Drug Carriers. *Advanced Biomaterials and Biodevices*, 4:79–119, 2014.
- [34] Victoria Leonhard, Roxana V Alasino, Ismael D Bianco, and Dante M Beltramo. Selective Binding of Albumin to Gm1 Ganglioside Micelles Containing Paclitaxel. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 04:1–7, 2013.
- [35] Srinivas Ganta, Harikrishna Devalapally, Aliasgar Shahiwala, and Mansoor Amiji. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 126:187–204, 2008.
- [36] Marie Christine Jones and Jean Christophe Leroux. Polymeric micelles - A new generation of colloidal drug carriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 48:101–111, 1999.
- [37] Alejandro Cifuentes, Jose L. Bernal, and Jose C. Diez-Masa. Determination of Critical Micelle Concentration Values Using Capillary Electrophoresis Instrumentation. *Analytical Chemistry*, 69:4271–4274, 1997.

- [38] Silvestro Formisano, Michael L. Johnson, Harold Edelhoich, George Lee, and Salvatore M. Aloj. Critical Micelle Concentrations of Gangliosides. *Biochemistry*, 18:1119–1124, 1979.
- [39] Reinhard Lipowsky, Dieter Richter, and Kurt Kremer. *The Structure and Conformation of Amphiphilic Membranes: Proceedings of the International Workshop on Amphiphilic Membranes*, Springer Science & Business Media, 66:16–18, 1991.
- [40] Marco Marradi, Fabrizio Chiodo, Isabel García, and Soledad Penadés. Glyconanoparticles as multifunctional and multimodal carbohydrate systems. *Chemical Society Reviews*, 42:4728–4745, 2013.
- [41] Álvaro Martínez, Carmen Ortiz Mellet, and José M. García Fernández. Cyclodextrin-based multivalent glycodisplays: Covalent and supramolecular conjugates to assess carbohydrate-protein interactions. *Chemical Society Reviews*, 42:4746–4773, 2013.
- [42] Olivier Renaudet and Rene Roy. Multivalent scaffolds in glycoscience: An overview. *Chemical Society Reviews*, 42:4515–4517, 2013.
- [43] Tyler D. Moeller, Kevin B. Weyant and Matthew P. DeLisa. Interplay of Carbohydrate and Carrier in Antibacterial Glycoconjugate Vaccines. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 20:237–247, 2018.
- [44] Grégorio Crini. Review: A history of cyclodextrins. *Chemical Reviews*, 114:10940–10975, 2014.
- [45] Subhadeep Saha, Aditi Roy, Kanak Roy, and Mahendra Nath Roy. Study to explore the mechanism to form inclusion complexes of  $\beta$ -cyclodextrin with vitamin molecules. *Scientific Reports*, 6:1–12, 2016.
- [46] Brahmaiah Bonthagarala Sreekanth Nama Ashwini R. Kumar, Malik K. Ashok and Chandu Baburao. The cyclodextrins: a review. *International Journal of Pharmaceutical Research and Bio-Science*, 2:291–304, 2013.

- [47] Myron L Bender and Makoto Komiyama. *Cyclodextrin chemistry*, volume 6. Springer Science & Business Media, 2012.
- [48] Eva Martin del Valle. Cyclodextrins and their uses: A review. *Process Biochemistry*, 39:1033–1046, 2004.
- [49] Helena Dodziuk. *Cyclodextrins and their complexes: chemistry, analytical methods, applications*. John Wiley & Sons, 2006
- [50] Abdul Rauf Khan, Peter Forgo, Keith J Stine, and Valerian T D’Souza. Methods for selective modifications of cyclodextrins. *Chemical Reviews*, 98:1977–1996, 1998.
- [51] Kazuaki Harata. Structural aspects of stereodifferentiation in the solid state. *Chemical Reviews*, 98:1803–1828, 1998.
- [52] Kenneth A Connors. The stability of cyclodextrin complexes in solution. *Chemical Reviews*, 97:1325–1358, 1997.
- [53] Mikhail V Rekharsky and Yoshihisa Inoue. Complexation thermodynamics of cyclodextrins. *Chemical Reviews*, 98:1875–1918, 1998.
- [54] Milo Malanga, Julianna Szemán, Éva Fenyvesi, István Puskás, Katalin Csabai, Gyöngyi Gyémánt, Ferenc Fenyvesi, and Lajos Szenté. “back to the future”: a new look at hydroxypropyl beta-cyclodextrins. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105:2921–2931, 2016.
- [55] Lorenzo Angiolini, Marco Agnes, Boiko Cohen, Konstantina Yannakopoulou, and Abderrazzak Douhal. Formation, characterization and ph dependence of rifampicin: heptakis (2, 6-di-o-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin complexes. *International Journal of Pharmaceutics*, 531:668–675, 2017.
- [56] O Fernando Silva, Mariana a Fernández, Sarah L Pennie, Roberto R Gil, and Rita H de Rossi. Synthesis and characterization of an amphiphilic cyclodextrin, a micelle with two recognition sites. *Langmuir*, 24:3718–26, 2008.

- [57] Mark E. Davis and Marcus E. Brewster. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: Past, present and future. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3:1023–1035, 2004.
- [58] KP Bhusari Nidhi P. Sapkal, VA Kilor and Anwar S Daud. Evaluation of some Methods for Preparing Gliclazide- $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complexes. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 6:833–840, 2007.
- [59] Jianxiang Zhang and Peter X. Ma. Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: Recent progress and future perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65:1215–1233, 2013.
- [60] Raquel V Vico, O Fernando Silva, Rita H de Rossi, and Bruno Maggio. Molecular organization, structural orientation, and surface topography of monoacylated beta-cyclodextrins in monolayers at the air-aqueous interface. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 24:7867–74, 2008.
- [61] Carlos J Gonzalez and Rita H de Rossi. Synthesis and complexation properties of an amphiphilic cyclodextrin. *Arkivoc*, 12:87–99, 2001.
- [62] Rita H de Rossi, O Fernando Silva, Raquel V Vico, and Carlos J Gonzalez. Molecular organization and recognition properties of amphiphilic cyclodextrins. *Pure and Applied Chemistry*, 81:755–765, 2009.
- [63] Mary Baginsky and Jacek Czub. Amphotericin b and its new derivatives - mode of action. *Current Drug Metabolism*, 10, 2009.
- [64] Nisha Singh, Manish Kumar, and Rakesh Kumar Singh. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5:485–497, 2012.
- [65] Richard William Ashford. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 30:1269–1281, 2000.
- [66] Bhavna Chawla and Rentala Madhubala. Drug targets in leishmania. *Journal of Parasitic Diseases*, 34:1–13, 2010.

- [67] Jill Adler-Moore and Richard T. Pro tt. AmBisome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49:21–30, 2002.
- [68] Santiago Torrado, Juan Jose Torrado, Raquel Espada, Maria.P. Ballesteros. Amphotericin B Formulations and Drug Targeting *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97:2405–2425, 2008.
- [69] Steven L. Cobb. *Drug Discovery for Leishmaniasis*. Editors: John Wiley and Sons, 2018.
- [70] Janina Brajtburg, William G Powderly, George S Kobayashi, and Gerald Medoff. Amphotericin b: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34:183, 1990.
- [71] World Health Organization (WHO) /Department of Control of Neglected Tropical Diseases. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. *Weekly epidemiological record*, 22:285–296, 2016.
- [72] Organizacion Mundial de la Salud Organizacion Panamericana de la Salud. *Consulta de expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis visceral en las Américas*. 2005.
- [73] Malika Larabi, Annette Gulik, Jean Paul Dedieu, Philippe Legrand, Gillian Barratt, and Monique Cheron. New lipid formulation of amphotericin B: Spectral and microscopic analysis. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1664:172–181, 2004.
- [74] Keith G. Nelson, Jeanette V. Bishop, Robert O. Ryan, and Richard Titus. Nanodisk-associated amphotericin b clears leishmania major cutaneous infection in susceptible balb/c mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50:1238–1244, 2006.
- [75] Mandie M Baker Bing Luo Stephen F Carroll Trudy M Forte Braydon L Burgess, Yumin He and Michael N Oda1. Nanodisk containing super aggregated Amphotericin B: a high therapeutic index antifungal formulation with enhanced potency. *International Journal of Nanomedicine*, 8:4733–4743, 2013.

- [76] Juan Pablo Botero Aguirre and Alejandra Maria Restrepo Hamid. Amphotericin B deoxycholate versus liposomal amphotericin B: effects on kidney function. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 11, 2015.
- [77] Marit D. Moen, Katherine A. Lyseng-Williamson, and Lesley J. Scott. Liposomal amphotericin b. *Drugs*, 69:361–392, 2009.
- [78] Francois Gaboriau, Monique Cheron, Caroline Petit, Jacques Bolard. Heat-induced superaggregation of amphotericin b reduces its in vitro toxicity: a new way to improve its therapeutic index. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41:2345–2351, 1997.
- [79] Jill P. Adler-moore and Richard T. Pro tt. Development, characterization, efficacy and mode of action of ambisome, a unilamellar liposomal formulation of Amphotericin B. *Journal of Liposome Research*,3:429-450 1993.
- [80] Qamar Zia, Owais Mohammad, Mohd Ahmar Rauf, Wasi Khan, and Swaleha Zubair. Biomimetically engineered Amphotericin B nano-aggregates circumvent toxicity constraints and treat systemic fungal infection in experimental animals. *Scientific Reports*, 7:1–19, 2017.
- [81] Qamar Zia, Asim Azhar, Mohammad Amjad Kamal, Gjumrakch Aliev, Mohammad Owais, and Ghulam Md Ashraf. Super aggregated form of Amphotericin B: a novel way to increase its therapeutic index. *Current Pharmaceutical Design*, 22:792–803, 2016.
- [82] Astrid A. Volmer, Alex M. Szpilman, and Erick M. Carreira. Synthesis and biological evaluation of amphotericin b derivatives. *Natural Product Reports*, 27:1329–1349, 2010.
- [83] Barry Murphy, Katie Anderson, Charles Borissow, Patrick Caffrey, Gerald Griffith, Jessica Hearn, Odubunmi Ibrahim, Naseem Khan, Natalie Lamburn, Michael Lee, Katherine Pugh, and Bernard Rawlings. Isolation and characterisation of amphotericin b analogues and truncated polyketide intermediates produced by genetic engineering of streptomyces nodosus. *Organic and Biomolecular Chemistry.*, 8:3758–3770, 2010.



- [84] Hoffmann-La Roche Ltd. Product monograph-AmBisome®), 2006.
- [85] Raquel Espada, Suriñe Valdespina, Carlos Alfonso, German Rivas, M. Paloma Ballesteros, and Juan J. Torrado. Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. *International Journal of Pharmaceutics*, 361:64–69, 2008.
- [86] P. Dynarowicz-Latka, R. Seoane, J. Miñones, M. Velo, and J. Miñones. Study of penetration of amphotericin B into cholesterol or ergosterol containing dipalmitoyl phosphatidylcholine Langmuir monolayers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 27:249–263, 2003.
- [87] Wiesław I. Gruszecki, Mariusz Gagoś, and Monika Hereć. Dimers of polyene antibiotic amphotericin B detected by means of fluorescence spectroscopy: Molecular organization in solution and in lipid membranes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 69:49–57, 2003.
- [88] Daniel M. Kamiński. Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments. *European biophysics journal*, 43:453–467, 2014.
- [89] C. Ernst and J. Grange. Structure of Amphotericin B Aggregates as Revealed by UV and CD Spectroscopies. *Biopolymers*, 20:1575–1588, 1981.
- [90] R. P. Hemenger, Theodore Kaplan, and L. J. Gray. Structure of amphotericin b aggregates based on calculations of optical spectra. *Biopolymers*, 22:911–918, 1983.
- [91] Jacques Bolard and Monique Chéron. Does fluorescence spectroscopy detect dimers of the polyene antibiotic Amphotericin B?. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 72:101- 102, 2003.
- [92] Krzysztof Tutaj Rafal Luchowski Radoslaw Szlajak Piotr Wasko Wojciech Grudzinski Jacek Czub Joanna Starzyk, Marcin Gruszecki and Wieslaw I. Gruszecki. Self-association of amphotericin b: Spontaneous formation of molecular structures respon-

- sible for the toxic side effects of the antibiotic. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118:13821–13832, 2014.
- [93] Kishor M. Wasan Robin Stoodley and Dan Bizzotto. Fluorescence of amphotericin B-deoxycholate (Fungizone) monomers and aggregates and the effect of heat-treatment. *Langmuir*, 23:8718–8725, 2007.
- [94] Patrycja Dynarowicz-Latkatka Jose Miñones jr, Olga. Conde and Matilde Casas Parada. Penetration of amphotericin B into DOPC monolayers containing sterols of cellular membranes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 270-271:129–137, 2005.
- [95] Caroline Petit-Jacques Bolard. Francois Gaboriau, Monique Cheron. Physico-chemical properties of the heat-induced of amphotericin B . *Biophysical Chemistry*, 66:1–12, 1997.
- [96] Thorsteinn Loftsson and Marcus E. Brewster. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: Basic science and product development. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 62:1607–1621, 2010.
- [97] Miguel Adelino da Silva-Filho, Scheyla Daniela Vieira da Silva Siqueira, Larissa Bandeira Freire, Ivonete Batista de Araújo, Káttya Gyselle de Holanda e Silva, Aldo Cunha da Medeiros, Irami Araújo-Filho, Anselmo Gomes de Oliveira, and Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito. How can micelle systems be rebuilt by a heating process? *International Journal of Nanomedicine*, 7:141–150, 2012.
- [98] Eleazar Cohen Philippe Legrand, Eneida a. Romero and Jacques Bolard. Effects of aggregation and solvent on the toxicity of Amphotericin B to human erythrocytes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36:2518–2522, 1992.
- [99] Josephine D. Readio; Robert Bittman. Equilibrium binding of amphotericin b and its methyl ester and borate complex to sterols. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2:219-224,1982

- [100] Anna Neumann, Maciej Baginski, Jacek Czub. How do sterols determine the antifungal activity of amphotericin b? free energy of binding between the drug and its membrane targets. *Journal of the American Chemical Society*, 132:18266-18272, 2010
- [101] B. A. Callingham. *Drugs and Transport Processes: A Symposium*. Biological Council. Macmillan Education UK, 1973.
- [102] Matthew M Uno Brice E Burke Martin D. Wilcock Brandon C, Endo. C2-OH of Amphotericin B plays an important role in binding the primary sterol of human cells but not yeast cells. *Journal of the American Chemical Society*, 135:8488-8491, 2013.
- [103] Mary C; Cioffi Alexander G; Diaz Katrina A; Hisao Grant S; Tuttle Marcus D; Nieuwkoop Andrew J; Comellas Gemma; Maryum Nashrah; Wang Shu; Uno Brice E; Wildeman Erin L; Gonen Tamir; Rienstra Chad M; Burke Martin D Anderson, Thomas M; Clay. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nature Chemical Biology*, 10:400-416, 2014.
- [104] Lisa A.; Hu Lingbowei; Cioffi Alexander G.; Pogorelov Taras V.; Rienstra Chad M.; Burke Martin D. Davis, Stephen A.; Della Ripa. C3-OH of Amphotericin B plays an important role in ion conductance. *Journal of the American Chemical Society*, 11:15102-15104. 2015.
- [105] Donald M Engelman. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature*, 438:578, 2005.
- [106] Minh D Phan, Oak Ridge, and Kwanwoo Shin. A Langmuir Monolayer: Ideal Model Membrane to Study Cell. *Chemical and Biological Interfaces*, 2:1-5, 2014.
- [107] Marcel Mulder. *Basic principles of membrane technology*. Editors: Springer Science & Business Media, 2012.
- [108] Marc Eeman and Magali Deleu. From biological membranes to biomimetic model membranes. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 14:719-736, 2010..
- [109] Martin Loose and Petra Schulle. Biomimetic membrane systems to study cellular organization. *Journal of Structural Biology*, 168:143 – 151, 2009.

- [110] Toshio Ishii. Effects of additive spreading solutions to make stable monolayers. *Thin solid films*, 178:47–52, 1989.
- [111] Juan J Giner-Casares, Gerald Brezesinski, and Helmuth Möhwald. Langmuir monolayers as unique physical models. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 19:176–182, 2014.
- [112] Vladimir M Kaganer, Helmuth Möhwald, and Pulak Dutta. Structure and phase transitions in Langmuir monolayers. *Reviews of Modern Physics*, 71:779–819, 1999.
- [113] Abraham Ulman. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chemical Reviews*, 96:1533–1554, 1996.
- [114] Luciano Caseli, Thatyane Morimoto Nobre, Ana Paula Ramos, Douglas Santos Monteiro, Maria Elisabete Darbello Zaniquelli. The role of langmuir monolayers to understand biological events. In *ACS Symposium Series*, 1215:65–88, 2015.
- [115] Alex M. Dopico. *Methods in Membrane Lipids* Science Business Media 400:2007.
- [116] Ka Yee C Lee. Collapse mechanisms of langmuir monolayers. *Annual Review of Physical Chemistry.*, 59:771–791, 2008.
- [117] Weiam Daear, Mark Mahadeo, and Elmar J Prenner. Applications of brewster angle microscopy from biological materials to biological systems. *Biochimica et Biophysica Acta -Biomembranes*, 1859:1749–1766, 2017.
- [118] Yuka Tabe and Hiroshi Yokoyama. Fresnel Formula for Optically Anisotropic Langmuir Monolayers: An Application to Brewster Angle Microscopy. *Langmuir*, 11:699–704, 1995.
- [119] Patrycja Dynarowicz-Latka, Anantharaman Dhanabalan, and Osvaldo N. Oliveira. Modern physicochemical research on langmuir monolayers. *Advances in Colloid and Interface Science*, 91:221 – 293, 2001.

- [120] Carlos Rubia-Payá, Gustavo De Miguel, María T. Martín-Romero, Juan J. Giner-Casares, and Luis Camacho. UV-Vis Reflection-Absorption Spectroscopy at air-liquid interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 225:134–145, 2015.
- [121] H Gruniger, D Mobius and H Meyer. Enhanced light reflection by dye monolayers at the air-water interface. *The Journal of Chemical Physics*, 79:3701–3710, 1983.
- [122] Cristina Roldán-Carmona, Carlos Rubia-Payá, Marta Pérez-Morales, María T. Martín-Romero, Juan J. Giner-Casares, and Luis Camacho. UV-Vis reflection spectroscopy under variable angle incidence at the air-liquid interface. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16:4012, 2014.
- [123] Pilar Cea, Santiago Martín, Ana Villares, Dietmar Möbius, and M.ópez@. Use of UV-vis reflection spectroscopy for determining the organization of viologen and viologen tetracyanoquinodimethanide monolayers. *Journal of Physical Chemistry B*, 110:963–970, 2006.
- [124] José María Pedrosa, María Teresa Martín Romero, Luis Camacho, and Dietmar Möbius. Organization of an amphiphilic azobenzene derivative in monolayers at the air-water interface. *Journal of Physical Chemistry B*, 106:2583–2591, 2002.
- [125] Narayanaswamy Jayaraman, Krishnagopal Maiti, and Kottari Naresh. Multivalent glycoliposomes and micelles to study carbohydrate-protein and carbohydrate-carbohydrate interactions. *Chemical Society Reviews*, 42:4640–4656, 2013.
- [126] Jing Jing, Anna Szarpak-Jankowska, Raphael Guillot, Isabelle Pignot-Paintrand, Catherine Picart, and Rachel Auzly-Velty. Cyclodextrin/paclitaxel complex in biodegradable capsules for breast cancer treatment. *Chemistry of Materials*, 25:3867–3873, 2013.
- [127] Rongqiang Liao, Yulin Zhao, Xiali Liao, Manshuo Liu, Chuanzhu Gao, Jian Yang, and Bo Yang. Folic acid-polyamine- $\beta$ -cyclodextrin for targeted delivery of scutellarin to cancer cells. *Polymers for Advanced Technologies*, 26:487–494, 2015.

- [128] Ran Namgung, Yeong Mi Lee, Jihoon Kim, Yuna Jang, Byung Heon Lee, In San Kim, Pandian Sokkar, Young Min Rhee, Allan S. Hoffman, and Won Jong Kim. Polycyclodextrin and poly-paclitaxel nano-assembly for anticancer therapy. *Nature Communications*, 5:1–12, 2014.
- [129] Koen Raemdonck, Kevin Braeckmans, Jo Demeester, and Stefaan C. De Smedt. Merging the best of both worlds: Hybrid lipid-enveloped matrix nanocomposites in drug delivery. *Chemical Society Reviews*, 43:444–472, 2014.
- [130] Lakkakula Jaya Raju; Macedo Krause Rui Werner. A vision for cyclodextrin nanoparticles in drug delivery systems and pharmaceutical applications. *Nanomedicine (London, England)*, 9:877–94, 2014.
- [131] Swarna Jaiswal, Brendan Duffy, Amit Kumar Jaiswal, Niall Stobie, and Patrick McHale. Enhancement of the antibacterial properties of silver nanoparticles using  $\beta$ -cyclodextrin as a capping agent. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36:280–283, 2010.
- [132] Raquel Mejia-Ariza, Gavin A. Kronig, and Jurriaan Huskens. Size-controlled and redox-responsive supramolecular nanoparticles. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 11:2388–2399, 2015.
- [133] Chiyong Park, Hyehyeon Kim, Saehee Kim, and Chulhee Kim. Enzyme responsive nanocontainers with cyclodextrin gatekeepers and synergistic effects in release of guests. *Journal of the American Chemical Society*, 131:16614–16615, 2009.
- [134] Peter Nadrah, Uros Maver, Anita Jemec, Tatjana Tišler, Marjan Bele, Goran Dražić, Mojca Bencina, Albin Pintar, Odon Planinsek, and M Gaberscek. Hindered disulfide bonds to regulate release rate of model drug from mesoporous silica. *ACS Applied materials & Interfaces*, 5:3908–3915, 2013.
- [135] Francesco Trotta, Fabrizio Caldera, Roberta Cavalli, Andrea Mele, Carlo Punta, Lucio Melone, Franca Castiglione, Barbara Rossi, Monica Ferro, Vincenza Crupi, Domenico

- Majolino, Valentina Venuti, and Dominique Scarlone. Synthesis and characterization of a hyper-branched water-soluble  $\beta$ -cyclodextrin polymer. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 10:2586–2593, 2014.
- [136] Michel Roux, Edward Sternin, Véronique Bonnet, Christophe Fajolles, and Florence Djedaïni-Pilard. Dynamic lipid lateral segregation driven by lauryl cyclodextrin interactions at the membrane surface. *Langmuir*, 29:3677–3687, 2013.
- [137] Frank Versluis, Jens Voskuhl, Jan Vos, Heiner Friedrich, Bart Jan Ravoo, Paul H.H. Bomans, Marc C.A. Stuart, Nico A.J.M. Sommerdijk, and Alexander Kros. Coiled coil driven membrane fusion between cyclodextrin vesicles and liposomes. *Soft Matter*, 10:9746–9751, 2014.
- [138] Jens Voskuhl, Ulrike Kauscher, Malte Gruener, Hendrik Frisch, Birgit Wibbeling, Christian A. Strassert, and Bart Jan Ravoo. A soft supramolecular carrier with enhanced singlet oxygen photosensitizing properties. *Soft Matter*, 9:2453–2457, 2013.
- [139] Jens Voskuhl and Bart Jan Ravoo. Molecular recognition of bilayer vesicles. *Chemical Society Reviews*, 38:495–505, 2009.
- [140] Michel Roux, Bruno Perly, and Florence Djedaïni-Pilard. Self-assemblies of amphiphilic cyclodextrins. *European Biophysics Journal*, 36:861–867, 2007.
- [141] Raquel V Vico, Rita H de Rossi, and Bruno Maggio. PM-IRRAS assessment of the compression-mediated orientation of the nanocavity of a monoacylated beta-cyclodextrin in monolayers at the air-water interface. *Langmuir*, 26:8407–13, 2010.
- [142] Pierre Tchorelo, Marie Martine Boissonnade, Anthony W. Coleman and Adan Baszkin. Amphiphilic Monolayers of Insoluble Cyclodextrins at the Water / Air Interface. Surface Pressure and Surface Potential Studies. *Langmuir*, 11:191–196, 1995.
- [143] Bart Jan Ravoo and Darcy Raphael. Cyclodextrin Bilayer Vesicles. *Chemical Communications*, 39:4324–4326, 2000.

- [144] John Pinzon B, Bruno Maggio, Rita H De Rossi, and Raquel V Vico. Cavity Orientation Regulated by Mixture Composition and Clustering of Amphiphilic Cyclodextrins in Phospholipid Monolayers. *Physical Chemistry B*, 121:4482–4491, 2017.
- [145] John Willis, Yemm EW. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical Journal*, 57:508–514, 1954.
- [146] Ro W Bailey. The Reaction of Pentoses with Anthrone. 68:669–672, 1957.
- [147] George L Gaines Jr. Thermodynamic relationships for mixed insoluble monolayers. *Journal of Colloid and Interface Science*, 21:315—319, 1966.
- [148] Shaukat Ali, Janice M Smaby, Howard L Brockman, and Rhoderick E Brown. Cholesterol 's Interfacial Interactions with Galactosylceramidest. *Society*, 33:2900–2906, 1994.
- [149] Fernando Dupuy and Bruno Maggio. The hydrophobic mismatch determines the miscibility of ceramides in lipid monolayers. *Chemistry and Physics of Lipids*, 165:615–629, 2012.
- [150] Jayasree Nath, Ranendu Kumar Nath, West Bengal, and Syed Arshad Husain. Monolayer characteristics of chitosan assembled in langmuir films mixed with arachidic acid. *Surface Review and Letters*, 21:1–8, 2014.
- [151] Bruno Maggio. Favorable and unfavorable lateral interactions of ceramide, neutral glycosphingolipids and gangliosides in mixed monolayers. *Chemistry and Physics of Lipids*, 132:209–224, 2004.
- [152] D. Vollhardt and V. B. Fainerman. Penetration of dissolved amphiphiles into two-dimensional aggregating lipid monolayers. *Advances in Colloid and Interface Science*, 86:103–151, 2000.
- [153] D. Vollhardt. Brewster angle microscopy: A preferential method for mesoscopic characterization of monolayers at the air/water interface. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 19:183–197, 2014.



- [154] George L. Gaines. *Insoluble Monolayers at Liquid-gas Interfaces*. Interscience monographs on physical chemistry. Interscience Publisher, 1966.
- [155] Rafael G. Oliveira and Bruno Maggio. Compositional domain immiscibility in whole myelin monolayers at the air-water interface and Langmuir-Blodgett films. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1561:238–250, 2002.
- [156] Fredric M. Menger, Ashley L. Galloway, and Mary E. Chlebowski. Surface tension of aqueous amphiphiles. *Langmuir*, 21:9010–9012, 2005.
- [157]
- [158] Natalia Wilke. *Lipid Monolayers at the Air – Water Interface : A Tool for Understanding Electrostatic Interactions and Rheology in Biomembranes*, 20:51-81, 2014.
- [159] Derek Marsh. Lateral pressure in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes*, 1286:183–223, 1996.
- [160] Rudolf A. Demel, Wouter S.M. Geurts van K, Robert F.A. Zwaal, Ben Roelofsen, and Laurens L.M. van Deenen. Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta- Biomembranes*, 406:97 – 107, 1975.
- [161] Hervé Hillaireau and Patrick Couvreur. Nanocarriers' entry into the cell: Relevance to drug delivery. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66:2873–2896, 2009.
- [162] André Hädicke and Alfred Blume. Interactions of Pluronic block copolymers with lipid monolayers studied by epi-fluorescence microscopy and by adsorption experiments. *Journal of Colloid and Interface Science*, 407:327–338, 2013.
- [163] Annegret Hildebrand, Katja Beyer, Reinhard Neubert, Patrick Garidel, and Alfred Blume. Solubilization of negatively charged DPPC/DPPG liposomes by bile salts. *Journal of Colloid and Interface Science*, 279:559 – 571, 2004.

- [164] Mahmoud A. Ghannoum and Louis B. Rice. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12:501–517, 1999.
- [165] Krzysztof Wójtowicz, Wiesław I Gruszecki, Magdalena Walicka, and Joanna Barwicz. Effect of amphotericin B on dipalmitoylphosphatidylcholine membranes: Calorimetry, ultrasound absorption and monolayer technique studies. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1373:220–226, 1998.
- [166] Gaelle Vandermeulen, Laurence Rouxhet, Albertina Arien, Marcus Eli Brewster, and Veronique Preat. Encapsulation of amphotericin B in poly(ethylene glycol)-block-poly( $\epsilon$ - caprolactone-co-trimethylenecarbonate) polymeric micelles. *International Journal of Pharmaceutics*, 309:234–240, 2006.
- [167] Joanna Barwicz and Pierre Tancrède. The effect of aggregation state of amphotericin-B on its interactions with cholesterol- or ergo sterol-containing phosphatidylcholine monolayers. *Chemistry and Physics of Lipids*, 85:145–155, 1997.
- [168] Mercedes Toledo Grijalba, Monique Chéron, Edward Borowski, Jacques Bolard, and Shirley Schreier. Modulation of polyene antibiotics self-association by ions from the Hofmeister series. *Biochimica et Biophysica Acta* , 1760:973–979, 2006.
- [169] Joanna Barwick, Sylvie Christian, and Ilona Gruda. Effects of the aggregation state of amphotericin B on its toxicity to mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36:2310–2315, 1992.
- [170] Rajesh Chopra, Ernst Blair, John Strang, Paul Cervi, Keith G. Patterson, and Anthony H. Goldstone. Liposomal amphotericin B (AmBisome) in the treatment of fungal infections in neutropenic patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 28:93–104, 1991.
- [171] E. Socrates Egito, Hatem Fessi, Martine Appel, Gillian M. Barratt, Philippe Legrand, Jacques Bolard, and Jean Philippe Devissaguet. A morphological study of an amp-

- hotericin B emulsion-based delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, 145:17-27, 1996.
- [172] Rainer H. Muller and Cornelia M. Keck. Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs - A review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. *Journal of Biotechnology*, 113:151–170, 2004.
- [173] Els W.M. Van Etten, Wim Van Vianen, Patty Roovers, and Peter Frederik. Mild heating of amphotericin B-desoxycholate: Effects on ultrastructure, in vitro activity and toxicity, and therapeutic efficacy in severe candidiasis in leukopenic mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44:1598–1603, 2000.
- [174] Raquel Espada, Suri ne Valdespina, Maria A. Dea, Gloria Molero, Maria P. Ballesteros, Francisco Bolas, and Juan Jose Torrado. In vivo distribution and therapeutic efficacy of a novel amphotericin B poly-aggregated formulation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61:1125–1131, 2008.
- [175] Gilead Sciences. AmBisome<sup>R</sup> Anfotericina B En Liposomas 50 mg Inyectable liofilizado. Technical report, ANMAT, Buenos Aires, 2016.
- [176] Bristol-Myers Squibb Co Canada. FUNGIZONE® amphotericin B for Injection, BMS Std. For intravenous infusion 50 mg/vial Antifungal. Technical report, Montreal, Canada, 2018.
- [177] Janina Brajtburg and Jacques Bolard. Carrier effects on biological activity of amphotericin B. *Clinical Microbiology Reviews*, 9:512–531, 1996.
- [178] Wiesław I. Gruszecki, Mariusz Gagoś, and Monika Hereć. Dimers of polyene antibiotic amphotericin B detected by means of fluorescence spectroscopy : molecular organization in solution and in lipid membranes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 69:49–57, 2003.
- [179] Wieslaw I. Gruszecki, Mariusz Gagos, and Monika Herec. Organization of antibiotic

- amphotericin B in model lipid membranes. A mini review. *Cellular Molecular Biology Letters*, 8:161–170, 2003.
- [180] Jan Mazerski and Edward Borowski. Molecular dynamics of amphotericin B. II. Dimer in water. *Biophysical Chemistry*, 57:205–217, 1996.
- [181] Jacqueline Caillet, Jacqueline Berg, and Jacqueline Langlet. Theoretical study of the self-association of amphotericin B. *Biochimica et Biophysica*, 1240:179–195, 1995.
- [182] A. Rajini Balakrishnan and K. R.K. Easwaran. CD and NMR studies on the aggregation of Amphotericin-B in solution. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes - Journal* , 1148:269–277, 1993.
- [183] Wieslaw I. Gruszecki, Mariusz Gagos, and Peter Kernen. Polyene antibiotic amphotericin B in monomolecular layers: Spectrophotometric and scanning force microscopic analysis. *FEBS Letters*, 524:92–96, 2002.
- [184] Joanna Barwicz, Marc Beauregard, and Pierre Tancrède. Circular dichroism study of interactions of Fungizone or AmBisome forms of amphotericin B with human low density lipoproteins. *Biopolymers - Biospectroscopy Section*, 67:49–55, 2002.
- [185] Sigma-Aldrich. Amphotericin B - Product Information. Technical report, Sigma-Aldrich, San Luis USA, 2014.
- [186] Tiago R Oliveira, Carlos R Benatti, and M Teresa Lamy. Structural characterization of the interaction of the polyene antibiotic Amphotericin B with DODAB bicelles and vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808:2629–2637, 2011.
- [187] Marcus Eli Brewster, Albertina Arien, Laurence Rouxhet, Veronique Preat, and Gaelle Vandermeulen. Encapsulation of amphotericin B in poly(ethylene glycol)-block-poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-trimethylenecarbonate) polymeric micelles. *International Journal of Pharmaceutics*, 309:234–240, 2006.

- [188] Keith G. Nelson, Jeanette V. Bishop, Robert O. Ryan, and Richard Titus. Nanodisk-associated amphotericin B clears *Leishmania major* cutaneous infection in susceptible BALB/c mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50:1238–1244, 2006.
- [189] Braydon L. Burgess, Yumin He, Mandie M. Baker, Bing Luo, Stephen F. Carroll, Trudy M. Forte, and Michael N. Oda. NanoDisk containing super aggregated amphotericin B: A high therapeutic index antifungal formulation with enhanced potency. *International Journal of Nanomedicine*, 8:4733–4742, 2013.
- [190] Ulf Nobbmann. PDI from an individual peak in DLS, 2015.
- [191] Keisuke Matsuoka and Yoshikiyo Moroi. Micelle formation of sodium deoxycholate and sodium ursodeoxycholate. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1580:189–199, 2002.
- [192] Jasmeet Singh, Zuleyha Unlu, Radha Ranganathan, and Peter Griffiths. Aggregate properties of sodium deoxycholate and dimyristoylphosphatidylcholine mixed micelles. *Journal of Physical Chemistry B*, 112:3997–4008, 2008.
- [193] Mohammed Owais, Aijaz Ahmed Khan, Swaleha Zubair, and Qamar Zia. Self-assembled amphotericin B-loaded polyglutamic acid nanoparticles: preparation, characterization and in vitro potential against *Candida albicans*. *International Journal of Nanomedicine*, 10:1769-1790, 2015
- [194] Bertrand Dupont. Overview of lipid formulations of amphotericin B. 49:31–36, 2002.
- [195] Leila Rodrigues Caldeira, Flaviana Ribeiro Fernandes, Daniel Ferreira Costa, Frédéric Frézard, Luis Carlos Crocco Afonso, and Lucas Antonio Miranda Ferreira. Nanoemulsions loaded with amphotericin B: A new approach for the treatment of leishmaniasis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70:125–131, 2015.
- [196] Délia Chaves Moreira dos Santos, Marselle Leite Silvério de Souza, Eliane Morais Teixeira, Líndicy Leidicy Alves, José Mário Carneiro Vilela, Margareth Andrade, Maria das Graças Carvalho, Ana Paula Fernandes, Lucas Antônio Miranda Ferreira, and

- Marta Marques Gontijo Aguiar. A new nanoemulsion formulation improves antileishmanial activity and reduces toxicity of amphotericin B. *Journal of Drug Targeting*, 26:357–364, 2018.
- [197] Joanna Zielińska, Miłosz Wieczór, Tomasz Baczek, Marcin Gruszecki, and Jacek Czub. Thermodynamics and kinetics of amphotericin B self-association in aqueous solution characterized in molecular detail. *Scientific Reports*, 6:1–10, 2016.
- [198] Leila Rodrigues, Flaviana Ribeiro, Daniel Ferreira, Frédéric Frézard, Luís Carlos, Crocco Afonso, Lucas Antônio, and Miranda Ferreira. Nanoemulsions loaded with amphotericin B : A new approach for the treatment of leishmaniasis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70:125–131, 2015.
- [199] Jacques Bolard, Philippe Legrand, Frederic Heitz, and Barbara Cybulska. One-Sided Action of Amphotericin B on Cholesterol-Containing Membranes is Determined by Its Self-Association in the Medium. *Biochemistry*, 30:5707–5715, 1991.
- [200] Diana Romanini, Gabriela Avalle, Bibiana Nerli, and Guillermo Picó. Thermodynamic and spectroscopic features of the behavior of amphotericin B in aqueous medium. *Biophysical Chemistry*, 77:69–77, 1999.
- [201] Claramie P. Jameson and Sergei V. Dzyuba. Circular Dichroism Studies on Intermolecular Interactions of Amphotericin B in Ionic Liquid-Rich Environments. *Chirality*, 25:427–432, 2013.
- [202] Yusuke Kasai, Nobuaki Matsumori, Yuichi Umegawa, Shigeru Matsuoka, Hiroyuki Ueno, Hiroki Ikeuchi, Tohru Oishi, and Michio Murata. Self-assembled amphotericin B is probably surrounded by ergosterol: Bimolecular interactions as evidenced by solid-state NMR and CD spectra. *Chemistry*, 14:1178–1185, 2008.
- [203] Scott C Hartsel, Emily Bauer, Evan H Kwong, and Kishor M Wasan. The Effect of Serum Albumin on Amphotericin B Aggregate Structure and Activity. *Pharmaceutical Research*, 18:1305–1309, 2001.

- [204] Robby A. Petros and Joseph M. Desimone. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9:615–627, 2010.
- [205] Richard J Hamill. Amphotericin B Formulations : A Comparative Review of Efficacy and Toxicity. *Drugs*, 73:919–934, 2013.
- [206] Jill Adler-Moore and Richard T. Pro tt. Amphotericin B lipid preparations: What are the differences? *Clinical Microbiology and Infection*, 14:25–36, 2008.
- [207] Chang Shu, Tengfei Li, Wen Yang, Duo Li, Shunli Ji, and Li Ding. Amphotericin B-conjugated polypeptide hydrogels as a novel innovative strategy for fungal infections. *Royal Society Open Science*, 5:: 1–7, 2018.
- [208] Ye Tae Kim, Baek Ki Shin, Vivek Kumar Garripelli, Jin Ki Kim, Enkhzaya Davaa, Seongbong Jo, and Jeong Sook Park. A thermosensitive vaginal gel formulation with HP $\gamma$ CD for the pH-dependent release and solubilization of amphotericin B. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41:399–406, 2010.
- [209] Koji Nakanishi and Philippa H. Solomon. *Infrared Absorption Spectroscopy*. Holden-Day Inc., Oakland, 2nd edition, 1977.
- [210] Hamza Belhadj, Amer Hakki, Peter K. J. Robertson, and Detlef W. Bahnemann. In situ ATR-FTIR study of H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O adsorption on TiO<sub>2</sub> under UV irradiation . *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17:22940–22946, 2015.
- [211] Mariusz Gagoś and Marta Arczewska. Influence of K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> ions on the aggregation processes of antibiotic amphotericin B: Electronic absorption and FTIR spectroscopic studies. *Journal of Physical Chemistry B*, 115:3185–3192, 2011.
- [212] Nobuaki Matsumori, Yuri Sawada, and Michio Murata. Mycosamine orientation of amphotericin B controlling interaction with ergosterol: Sterol-dependent activity of conformation-restricted derivatives with an amino-carbonyl bridge. *Journal of the American Chemical Society*, 127:10667–10675, 2005.

- [213] Charles Richard Heald, Snjezana Stolnik, K. S. Kujawinski, Corinna Matteis, Martin C Garnett, Lisbeth Illum, Stanley Stewart Davis, S. C. Purkiss, Roger John Barlow, Paul Gellert. Poly(lactic acid)-poly(ethylene oxide) (PLA-PEG) nanoparticles: NMR studies of the central solidlike PLA core and the liquid PEG corona. *Langmuir*, 18:3669–3675, 2002.
- [214] Marcos Garcia-Fuentes, Dolores Torres, Manuel Martín-Pastor, and Maria J. Alonso. Application of NMR Spectroscopy to the Characterization of PEG-Stabilized Lipid Nanoparticles. *Langmuir*, 20:8839–8845, 2004.
- [215] Timothy D.W. Claridge and Timothy D.W. Claridge. Correlations Through Space: The Nuclear Overhauser Effect. In *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, 27:315–380. 2016.
- [216] Hans-Jörg Schneider, Frank Hacket, Volker Rüdiger, and Hiroshi Ikeda. NMR Studies of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes. *Chemical Reviews*, 98:1755–1786, 1998.
- [217] Raquel V. Vico, Rita H. de Rossi, and Elba I. Buján. Reactivity of the insecticide chlorpyrifos-methyl toward hydroxyl and perhydroxyl ion. Effect of cyclodextrins. *Journal of Physical Organic Chemistry.*, 22:691–702, 2009.
- [218] Peter Forgo and Valerian T . D’Souza. The Use of High-Resolution NMR Spectroscopy in Supramolecular Systems. *Organic Letters*, 1:1543–1545, 1999.
- [219] Syed Mashhood Ali and Sughra Muzaffar. Validating strategy of quantitative ROESY analysis for structure determination of cyclodextrin inclusion complexes. *Journal of Molecular Structure*, 1176:461–469, 2019.
- [220] Cuifang Cai Chengjun Chen, Dandan Han and Xing Tang. An overview of liposome lyophilization and its future potential. *Journal of Controlled Release*, 142:299–311, 2010.
- [221] Mahasen A. Radwan, Bushra T. AlQuadeib, Lidija Šiller, Matthew C. Wright, and



- Benjamin Horrocks. Oral administration of amphotericin B nanoparticles: Antifungal activity, bioavailability and toxicity in rats. *Drug Delivery*, 24:40–50, 2017.
- [222] Peter E. Sudbery. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature Reviews Microbiology*, 9:737–748, 2011.
- [223] Afsaneh Lavasanifar, John Samuel, Saeed Sattari, Kwon, and Glen S. Block copolymer micelles for the encapsulation and delivery of amphotericin B. *Pharmaceutical Research*, 19:418–422, 2002.
- [224] Joon Kim and Peter Sudbery. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *Journal of Microbiology*, 49:171–177, 2011.
- [225] Claudia Luengo-Alonso, Juan José Torrado, Maria Paloma Ballesteros, Alessio Malfanti, Sara Bersani, Stefano Salmaso, and Paolo Caliceti. A novel performing PEG-cholane nanoformulation for Amphotericin B delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 495:41–51, 2015.
- [226] Vladimir M. Kaganer, Helmuth Möhwald, and Pulak Dutta. Structure and phase transitions in langmuir monolayers. *Reviews of Modern Physics*, 71:779–819, 1999.
- [227] Bahri Gür and Kadem Meral. Preparation and characterization of mixed monolayers and Langmuir-Blodgett films of merocyanine 540/octadecylamine mixture. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 414:281–288, 2012.
- [228] Krzysztof Tutaj, Radoslaw Szluzak, Joanna Starzyk, Piotr Wasko, Wojciech Grudzinski, Wieslaw I. Gruszecki, and Rafal Luchowski. The orientation of the transition dipole moments of a polyene antibiotic Amphotericin B under UV-VIS studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 151:83–88, 2015.
- [229] Rey Gómez-Serranillos, Raquel Seoane Jose Miñones Jr. A study of the stability of Amphotericin B monolayers. *Progress in Colloid and Polymer Science*, 112:29–33. 2001.

- [230] Marta Arczewska and Mariusz Gagoś. Molecular organization of antibiotic amphotericin B in dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers induced by  $K^+$  and  $Na^+$  ions: The Langmuir technique study. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1808:2706–2713, 2011.
- [231] Carlos Rubia-Payá, Juan J. Giner-Casares, María T. Martín-Romero, Dietmar Möbius, and Luis Camacho. 2D chiral structures in quinoline mixed langmuir monolayers. *Journal of Physical Chemistry C*, 118:10844–10854, 2014.
- [232] Jose Miñones, C. Carrera, Patrycja Dynarowicz-Latka, Jose Miñones, Olga Conde, Raquel Seoane, and Juan m. Rodríguez Patino Orientational changes of amphotericin B in Langmuir monolayers observed by Brewster angle microscopy. *Langmuir*, 17:1477–1482, 2001.
- [233] Jennifer Cannon Sykora, William C. Neely, and Vitaly Vodyanoy. Solvent effects on amphotericin B monolayers. *Journal of Colloid and Interface Science*, 269:499–502, 2004.
- [234] Jerome Daen. Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces. . *Journal of Colloid and Interface Science*, 22:309, 1966.
- [235] Jose R. Seoane, Nuria Vila Romeu, Jose Miñones, Olga Conde, Patrycja. Dynarowicz, and Matilde Casas The behavior of amphotericin B monolayers at the air/water interface. *Progress in Colloid and Polymer Science*, 105:173–179, 1997.
- [236] Michele Saint-Pierre-Chazalet, Carl L. Thomas, Monique Dupeyrat, and Claude Michel M. Gary-Bobo. Amphotericin B-sterol complex formation and competition with egg phosphatidylcholine: a monolayer study. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 944:477–486, 1988.
- [237] J. Miñones, Patrycja Dynarowicz-Latka, O. Conde, J. Miñones, E. Iribarnegaray, and M. Casas. Interactions of amphotericin B with saturated and unsaturated phosphatidylcholines at the air/water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 29:205–215, 2003.

- 
- [238] Jose R. Seoane, Nuria Vila Romeu, Jose Minones, Olga Conde, Patrycja Dynarowicz, and Matilde Casas. The behavior of amphotericin B monolayers at the air/water interface. *Progress in Colloid and Polymer Science*, 105:173–179, 1997.
- [239] Jose Minones, Jr Minones, Olga Conde, Juan M. Rodriguez Patino, and Patrycja Dynarowicz-Latka. Mixed monolayers of Amphotericin B- dipalmitoyl phosphatidyl choline: Study of complex formation. *Langmuir*, 18:2817–2827, 2002.
- [240] Mariusz Gagoś, Monika Hereć, Marta Arczewska, Grzegorz Czernel, Mauro Dalla Serra, and Wiesław I. Gruszecki. Anomalously high aggregation level of the polyene antibiotic amphotericin B in acidic medium: Implications for the biological action. *Biophysical Chemistry*, 136:44–49, 2008.