



UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO

Facultad de Ciencias Exactas

Departamento de Ciencias Químicas

**“LIBERACIÓN DE CARBOXIFLUORESCÉINA UNIDA A NANOPARTÍCULAS  
DE ORO POR IRRADIACIÓN LÀSER”**

**Unidad de Investigación para optar al grado académico de  
Licenciado en Química**

**Autor de la Unidad de Investigación  
Maite Victoria Goñi Fuentes**

**Director de Unidad de Investigación  
Dra. Eyleen Ariasna Araya Fuentes  
Santiago de Chile, 2017**



UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO

Facultad de Ciencias Exactas

Departamento de Ciencias Químicas

**“LIBERACIÓN DE CARBOXIFLUORESCÉINA UNIDA A NANOPARTÍCULAS  
DE ORO POR IRRADIACIÓN LÀSER”**

**Maite Victoria Goñi Fuentes**

**Comisión Evaluadora:**

**Dra. Verónica Romero Pawluk**

**Dra. Nancy Pizarro Urzúa**

**Santiago de Chile, 2017**



## ACTA DE CALIFICACIONES

### NOTA DE ESCRITO DE UNIDAD DE INVESTIGACION

Con fecha 6 de marzo de 2017, se entregó el escrito de la Unidad de Investigación realizada por el alumno **MAITE GOÑI FUENTES**, RUT: 18.467.654-0 titulada **“Liberación de Carboxifluoresceína Unida a Nanopartículas de Oro por Irradiación Láser”**.

Las calificaciones obtenidas por la Sra. Maite Goñi Fuentes en esta etapa son las siguientes:

#### **Comisión Evaluadora:**

Prof. Dra. Verónica Romero Pawluk .....

Prof. Dra. Nancy Pizarro Urzúa .....

**Nota Final Escrito: .....**

Doy fe de la veracidad de esta información.

Dra. Verónica Paredes García

Directora  
Programa de Licenciatura en Química



## ACTA DE CALIFICACIONES

### NOTA DE PRESENTACIÓN ORAL Y DEFENSA DE UNIDAD DE INVESTIGACION

Con fecha 02 de mayo de 2017, se realizó la presentación y defensa de la Unidad de Investigación del alumno **MAITE GOÑI FUENTES**, RUT: 18.467.654-0 titulada **“Liberación de carboxifluoresceína unida a nanopartículas de oro por irradiación láser”**.

Las calificaciones obtenidas por el Sra. Maite Goñi Fuentes en esta etapa son las siguientes:

<b>Comisión Evaluadora:</b>	<b>Exposición Oral</b>	<b>Defensa</b>
Prof. Dra. Verónica Romero Pawluk	.....	.....
Prof. Dra. Nancy Pizarro Urzúa	.....	.....

**Nota Final Presentación y Defensa: .....**

Doy fe de la veracidad de esta información.

Dra. Verónica Paredes García

Directora  
Programa de Licenciatura en Química

*En el transcurso de esta travesía denominada unidad de investigación he tenido muchos ángeles cuidándome la espalda... Unos de los ángeles más fundamentales han sido mi familia, sin ellos no podría haber hecho nada de esto, mayormente agradecerle a la mujer más importante de mi vida, mi madre, gracias mamita hermosa has sido el mejor ejemplo de mi existencia, me has enseñado desde como caminar a cómo afrontar todos mis problemas de la manera más sana posible, sin ti yo no sería nada ni nadie, te amo por sobre todas las cosas. Agradecer de igual manera a mi abuela, mi segunda madre que me ha acompañado en todas y siempre me ha visto como la mujer más inteligente de la vida, te amo viejita mía y gracias por aguantar todo lo malo y seguir viendo lo bueno en mí. Y por supuesto agradecer a mis tías, que me empujaron para seguir el camino de lo que más amo que es la química, las adoro muchísimo.*

*Otro de los ángeles de mi camino han sido mis amigos, mis zukosos, mis amigos aquí en la universidad, en momentos ya sean totalmente distintos como tocatas o amigos de mis amigos jajaja, los que siempre me esperan con una sonrisa a pesar de todo lo que haya sucedido, los que siempre pero siempre tienen una palabra de aliento para subirme el ánimo, nos encontramos en distintos lugares pero aun así, aunque sea por muchísimo tiempo o por poco, ustedes tienen claro que esta amistad es la más pura que pudiese existir, los amo mucho amigos míos y espero que nuestra amistad dure por él pasar de todos los años.*

*Además, tengo a mis queridos compañeros de laboratorio... quizá alguno más cercano que otro, pero aun así los considero mi familia, han sabido enseñarme cosas que por lo que más me costaba entender ustedes supieron internalizarlo en mi cabeza... Además, encontramos a mi querida profesora Eyleen, ha sabido aguantarme mejor que nadie y también ha estado ahí para sostenerme en mis flaquezas, gracias por todos los conocimientos que me ha transmitido, las risas, los buenos momentos jamás los olvidaré.*

*Y no por ultimo menos importante, quisiera agradecerle a una persona que ha sabido ser fundamental en mi paso por la universidad, que ha sido mi pilar en estos cinco años y que jamás en la vida lo voy a olvidar. Ha sido mi novio, mi amigo, mi confidente, mi partner y por sobre todas las cosas el hombre con el que he compartido los mejores años de mi vida. José, mi amor, te agradezco por el aguante, por haber sabido llevarme en mis minutos de locura, gracias por haberme tirado para arriba en momentos malos, por ser mi paño de lágrimas cuando lo necesité, y por sobre todas las cosas por amarme y entenderme por como soy yo, por eso y muchísimo más te amo mucho mi amor.*

## **DIVULGACIÓN DE RESULTADOS Y FINANCIAMIENTO**

El avance de esta unidad de investigación ha sido presentado en el IV Congreso Nacional de Nanotecnología(CNN), realizado los días 5 al 7 de septiembre del 2016, en la ciudad de Olmué, Chile.

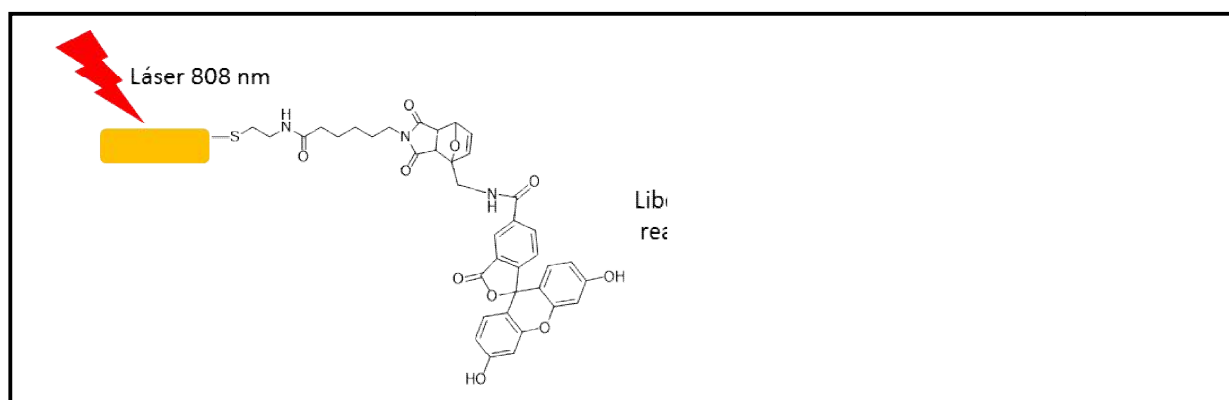
Financiado por FONDECYT bajo el proyecto11130494 y UNAB DI 1309-16/R.

## Resumen

La nanotecnología ha contribuido al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento del cáncer y enfermedades infecciosas, entre otras. Por ejemplo, las nanopartículas (NP) se utilizan como vehículos para la entrega eficaz de los compuestos bioactivos a sitios deseados de acción. En particular, las nanopartículas de oro (NPAu) se han utilizado para la liberación de fármacos espacio-temporalmente controlada, ya que aumentan la selectividad para los objetivos deseados y previenen los efectos secundarios adversos. NPAu tienen la capacidad de absorber la radiación electromagnética y disipar la energía a nivel local (nanométricamente). Esto facilita la llamada "cirugía molecular", en el que las células malignas se destruyen selectivamente, y también permiten la liberación de un compuesto antitumoral en un sitio específico en el cuerpo. Esta alta absorción de energía resulta de la interacción de NPAu con la radiación electromagnética que causa la oscilación coherente de electrones en la superficie de la NP, que es un fenómeno conocido como resonancia de plasmón superficial (SPR). La SPR se produce a diferentes longitudes de onda y es dependiente de la forma, tamaño y composición de los AuNP. Nanobarras de oro (NPAu-b) presentan bandas SPR en longitudes de onda de infrarrojo cercano (NIR). Los tejidos son transparentes a la radiación en esta región del espectro, y la extensa penetración resultante de la radiación produce efectos en los tejidos profundos. Algunas de las ventajas del oro incluyen su baja toxicidad y facilidad de funcionalización con moléculas que contienen tiolque se adsorben espontáneamente a la superficie de oro. Aunque el uso de NPAu en conjunción con la radiación NIR se ha demostrado para el control espacial y temporal de la liberación de una molécula activa, una limitante importante es que los fármacos usados no se unen covalentemente a la NP y por lo tanto podrían ser liberados abruptamente en cualquier parte del cuerpo y causar efectos indeseables (por ejemplo, los efectos secundarios de la terapia antitumoral). Para evitar este efecto el compuesto activo puede unirse covalentemente a la NPAu a través de un espaciador formado por un aducto de Diels-Alder. Así en un extremo del espaciador está unido a la NP y por el otro

extremo a la Carboxifluoresceína (CF) de manera que al ser irradiado con radiación láser, el mismo se degrade por medio de una reacción retro Diels-Alder liberándose así el compuesto. De esta manera puede controlarse la entrega del mismo con el fin de hacer más selectiva su acción, pudiendo evitarse los efectos secundarios.

El objetivo de esta unidad de investigación es evaluar la liberación de la CF de la superficie de la NP. La irradiación con láser producirá la absorción y disipación de energía por parte de la NPAu conduciendo a una reacción retroDiels-Alder liberando así la CF.





## Abreviaturas

NP	:Nanopartícula
NPAu	:Nanopartícula de oro
NPAu-b	:Nanobarra de oro
DCM	:Diclorometano
DMF	:Dimetilformamida
DIEA	:Diisopropiletilamina
DLS	: <i>Dynamic light scattering</i> ; Dispersión dinámica de la luz
MS	: del inglés " <i>Massspectrometry</i> "
UV-Vis	:espectroscopía UV-Visible
Vis-IRC	:espectroscopía UV-Visible/Infrarrojo Cercano
RPS	:Resonancia de plasmón superficial
RFU	:Unidades de fluorescencia relativa
CF-FAM	:Carboxifluoresceina unida a la furfurilamina
diSHA	:N,N'-(disulfanediy)bis(ethane-2,1-diyl))bis(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanamide)

D/A	:Abreviatura para Reacción de Diels-Alder
HBTU	:2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminiumhexafluorophosphate.
CTAB	:Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio
STEM	:Del inglés " <i>Scanningtransmitionelectronic microscopy</i> ";Microscopía de barrido y transmisión electrónica.

## Tabla de Contenidos

	Página
Agradecimientos.....	v
Divulgación de resultados.....	vi
Resumen.....	vii
Abreviaturas.....	viii
1. Introducción.....	01
1.1 Nanopartículas.....	01
1.2 Síntesis de nanopartículas de oro.....	04
1.3 Estabilidad de las nanopartículas de oro .....	07
1.4 Plasmón de superficie.....	09
1.5 Plasmón superficial y espectroscopía UV-VIS.....	10
1.6 DLS para caracterización de nanopartículas.....	11
1.7 Fluorescencia.....	12
1.8 Reacciones Diels-Alder.....	13
1.9 Moléculas capaces de liberar fármacos.....	14
2. Hipótesis.....	16
3. Objetivos.....	17
3.1. Objetivos generales.....	17
3.2. Objetivos específicos.....	17
4. Parte experimental.....	13
4.1. Reactivos.....	13
4.2. Materiales.....	14
4.3. Equipos.....	15

5. Procedimiento experimental.....	21
5.1. Síntesis de las nano-barras de oro (NPAu-b).....	21
5.2. Síntesis del espaciador N,N'-(disulfanediylobis(ethane-2,1-diyl))bis(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanamide) (diSHA).....	23
5.3. Síntesis de N-(furan-2-ylmethyl)-3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthene]-5-carboxamide (CF-FAM).....	23
5.4. Unión de la CF-FAM al espaciador diSHA mediante una reacción de Diels-alder.....	24
5.5. Funcionalización de las NPAu-b al compuesto (diSHA) - (CF-FAM).....	25
5.6 Irradiación del complejo (NPAu-b)-(diSHA)-(CF-FAM).....	26
6.Resultados.....	27
6.Síntesis y caracterización de nanobarras de oro .....	27
6.Síntesis del espaciador y caracterización N,N'-(disulfanediylobis(ethane-2,1-diyl))bis(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanamide) (diSHA).....	30
6.3 Síntesis y caracterización de N-(furan-2-ylmethyl)-3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthene]-5-carboxamide (CF-FAM).....	32
6.4. Unión de la CF-FAM al espaciador diSHA.....	34
6.5. Funcionalización de las NPAu-b con la CF-FAM-diSHA .....	36
6.6. Irradiación del nanocompuesto (NPAu-b)-(CF-FAM)-(diSHA)....	38
7.0. Conclusiones.....	41
8.0. Bibliografía.....	42

## Índice de tablas

<b>Tabla 1:</b> Adición aducto Diels-Alder en un tiempo determinado al volumen de nano partículas para su funcionalización.....	25
---	----

## Índice de figuras

<b>Figura 1:</b> Esquema de la representación de una escala nanométrica.....	02
<b>Figura 2:</b> Nanopartículas típicamente utilizadas en DrugDelivery controlado mediante efecto fototérmico.....	03
:	
<b>Figura 3:</b> Esquema de síntesis de NPAu-b.....	05
<b>Figura 4:</b> Mecanismo de crecimiento de las semillas de oro.....	07
<b>Figura 5:</b> Potencial Zeta.....	08
<b>Figura 6:</b> Ejemplo de los distintos colores de nanoparticulas de oro según su tamaño nanométrico.....	09
<b>Figura7:</b> Esquema de la interacción de la radiación electromagnética con las NPAu.....	10
<b>Figura 8:</b> Representación del diámetro de una nanopartícula metálica.....	12
<b>Figura 9:</b> Esquema del diagrama de Jablonski sobre la fluorescencia y fosforecencia.....	12
<b>Figura 10:</b> Imagen de una solución de Carboxifluoresceina en metanol.....	13

<b>Figura 11:</b> Reacción de Diels-Alder entre benzoxazina orientada al grupo furano (GF) y la N-fenilmaleimida (PMI) formando el aducto Diels-Alder.....	13
<b>Figura 12:</b> Reacción de Retro Diels-Alder de la figura 9, entre la benzoxazina orientada al grupo furano (GF) y la N-fenilmaleimida (PMI).....	14
<b>Figura 13:</b> Esquema de la síntesis de semillas de oro.....	22
<b>Figura 14:</b> a) Etapas de crecimiento b) solución resultante de la síntesis de NPAu-b's.....	22
<b>Figura 15:</b> Esquema de la estructura del espaciador N,N'-(disulfanediylobis(ethane-2,1-diyl))bis(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanamide) .....	23
<b>Figura 16:</b> Estructura del compuesto CF-FAM.....	24
<b>Figura 17:</b> Estructura del compuesto de CF-FAM-diSHA.....	24
<b>Figura 18:</b> Representación del montaje de irradiación .....	26
<b>Figura 19:</b> Espectroscopía Vis-IRC de las NPAu-b.....	27
<b>Figura 20:</b> a)Imagen de TEM de NPAu-b (la barra representa 50 nm) b) Histograma de relación de aspecto.....	28
<b>Figura 21:</b> DLS (Dynamic light scattering) de las NPAu-b.....	28
<b>Figura 22:</b> Potencial Zeta de las NPAu-b.....	29

<b>Figura 23:</b> Cromatograma HPLC correspondiente al espaciador (diSHA) y el espectro de masas (Electrospray, modo positivo).....	30
<b>Figura 24:</b> Espectro de 1H RMN del espaciador (diSHA).....	31
<b>Figura 25:</b> Mecanismo de reacción de la amida furfúrica (CF-FAM).....	32
<b>Figura 26:</b> Espectro de masas (electrospray, modo positivo) obtenido para la amida furfúrica de carboxifluoresceína.....	33
<b>Figura 27:</b> Mecanismo de la reacción Diels-Alder entre la CF-FAM y el espaciador diSHA.....	34
<b>Figura 28:</b> Espectro de masas (electrospray, modo positivo) obtenido para el aducto Diels-Alder CF-FAM-diSHA.....	35
<b>Figura 29:</b> Esquema de la funcionalización.....	36
<b>Figura 30:</b> UV de las NPAu-b's conjugados con el aducto dielsalder.....	37
<b>Figura 31:</b> Superposición de los espectros UV-Visible de las NPAu-b's no conjugados vs. los NPAu-b's conjugados .....	37
<b>Figura 32:</b> Espectro de fluorescencia basal del complejo (NPAu-b) - (diSHA) - (CF-FAM) con un RFU máximo de 680.....	38
<b>Figura 33:</b> Representación de una nanopartícula-barras de oro funcionalizada con CF antes y después de la irradiación con láser.....	39
<b>Figura 34:</b> Superposición de las mediciones de fluorescencia en los tiempos determinada.....	40

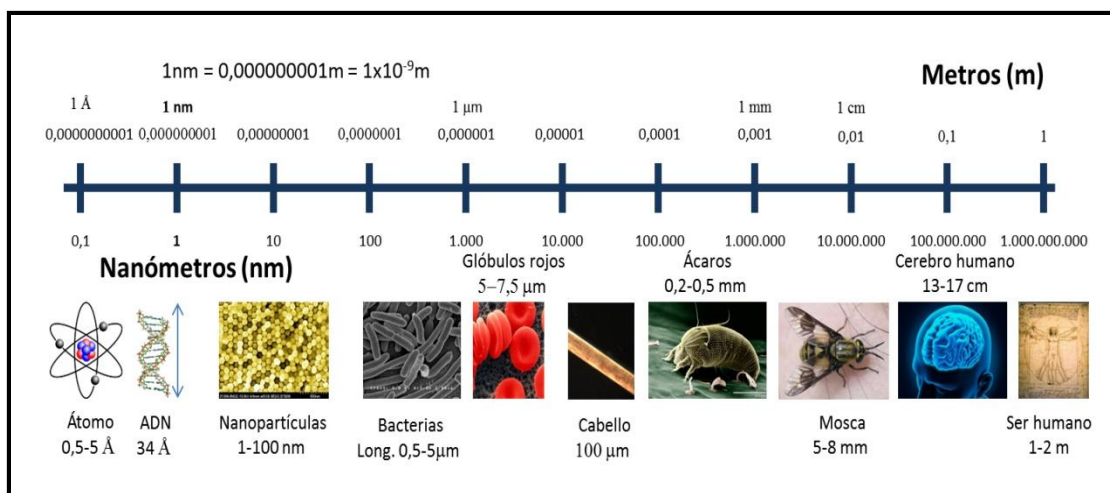
## I Introducción.

### 1.1 Nanopartículas

El oro, es el elemento considerado “noble” por excelencia, lo cual se explica dada su naturaleza: es altamente no reactivo y, como tal, objetos históricos de oro han sido capaces de conservarse durante miles de años sin la pérdida de su brillo permaneciendo libres de deterioro. En su forma molecular, los compuestos de oro pueden cumplir diversas funciones, que van desde su uso en catálisis<sup>1-3</sup> hasta en medicamentos para la artritis.<sup>4</sup>

El término *nano*, derivado del griego “nanos” y que significa enano, se utiliza para describir cualquier material o propiedad que ocurre con las dimensiones de la escala del nanómetro (1-100 nm).

Las NP ofrecen una serie de aplicaciones de gran interés para la biomedicina debido a que el tamaño de éstas puede variar desde uno a decenas de nanómetros, lo que las ubica en dimensiones inferiores o comparables a los de una célula (10-100 micras), a un virus (20-450 nm), una proteína (5-50 nm) o un gen (2 nm de ancho y 10-100 nm de largo) (figura 1). La ventaja de los tamaños de las NPs es que podrían acercarse a un objetivo biológico de interés y traspasar las diversas barreras celulares a través de mecanismos como la endocitosis.<sup>57,58</sup>



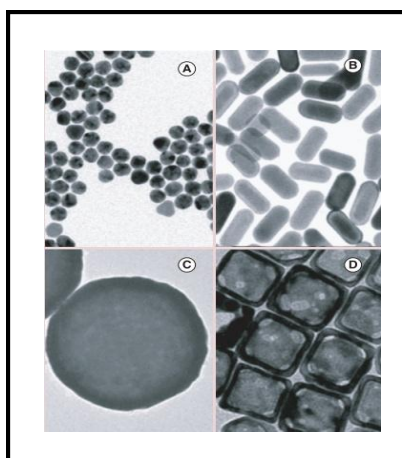
**Figura 1:** Esquema comparativo del tamaño de NPAu de 10 nm con respecto a átomos, moléculas, agregados de NPAu, virus, bacterias y células.



A diferencia del oro a granel, el oro a escala nanométrica puede presentar colores muy llamativos, según sus formas y tamaños. Debido a esta característica, surge el interés de estudiar estos agregados ya sea para aplicaciones en química, en física, y particularmente en biomedicina. Pero más allá de su belleza, las nanopartículas de oro (AuNP) tienen propiedades que son fundamentalmente diferentes a las de otros metales.<sup>5</sup>

Debido a su tamaño, estas nanopartículas (NP) pueden acumularse preferentemente en sitios de crecimiento o inflamación en un tumor y son capaces de penetrar en las células mediante mecanismos muy diferentes y mucho más eficientemente que muchas moléculas pequeñas, por lo cual, pueden emplearse para dirigir fármacos hacia tumores de una manera efectiva.<sup>8,9</sup> Por otra parte, debido a la reactividad que presenta su superficie, las hace muy versátiles para unirse a diferentes moléculas activas, por ejemplo, a anticuerpos u otras moléculas con una actividad determinada y de esta manera conseguir que selectivamente interaccionen a objetivos terapéuticos. Las AuNP poseen la capacidad de absorber energía en forma de luz, disipándola localmente como calor, produciendo así la denominada ablación térmica altamente específica para tejidos tumorales o infectados.<sup>10</sup> Además, las AuNP tienen la capacidad de absorber cantidades copiosas de radiación de rayos X pudiendo ser usadas para mejorar la radioterapia en tratamientos contra el cáncer o mejorar el contraste de imagen de una tomografía computarizada.<sup>11</sup>

Las AuNP debido a sus tamaños comparables a las de otras macromoléculas, como las proteínas, pueden selectivamente perturbar y modificar los procesos celulares. Por todas las características mencionadas, las AuNP son especies interesantes para ser empleadas en aplicaciones biomédicas, por lo cual, su uso ha sido cada vez más creciente en los últimos años debido al gran interés por el desarrollo de la nanotecnología en este campo (figura 2).



**Figura 2:** Nanopartículas de oro utilizadas en DrugDelivery (A) nanoesferas de oro (~ 15 nm); (B) nanobarras oro (~ 20 × 45 nm); (C) nanocápsulas de oro (~ 100 nm); (D) nanocajas de oro (~ 60 nm).

Otra propiedad importante es que también pueden absorber radiación electromagnética y disiparla localmente en forma de calor a través del denominado efecto fototérmico, permitiendo así la destrucción selectiva de las células malignas o agregados tóxicos proteicos, esto sin afectar tejidos sanos de la vecindad. Asimismo, mediante la absorción y disipación de la energía es posible producir la liberación de compuestos con actividad farmacológica en un sitio y en un momento determinado controlándose así la entrega del fármaco de manera tal de evitar efectos inespecíficos en el organismo. Por ejemplo, la absorbancia y fluorescencia de NPAu es mucho mayor en comparación con las sales de oro, y se pueden visualizar desde la región visible hasta la del infrarrojo cercano (NIR) cambiando el tamaño, morfología y funcionalización de la nanoestructura.

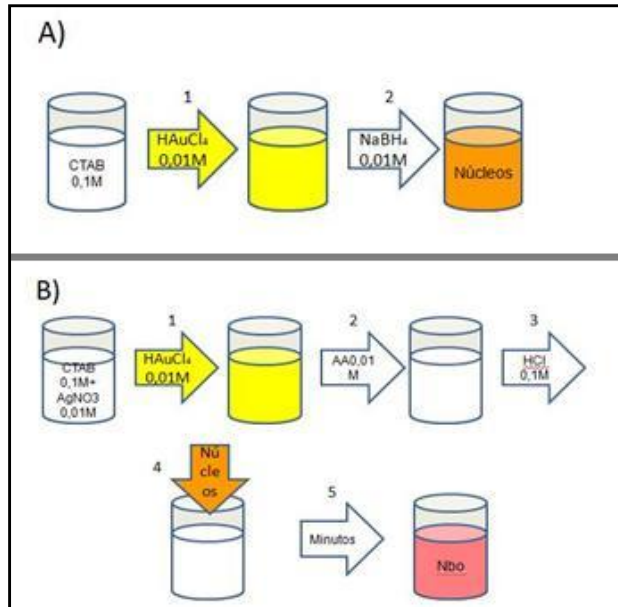
Las NPAu presentan la ventaja de tener una baja toxicidad, así como también pueden ser fácilmente funcionalizadas con moléculas que contengan un grupo tiol debido al proceso de quimisorción que se produce entre éstos y la superficie de oro. A través de la funcionalización de nanopartículas con biomoléculas es posible producir el reconocimiento de células tumorales y así lograr selectividad en la acción, lo que se denomina "targeting" activo.

## 1.2 Síntesis de Nanopartículas de oro (NPAu)

Si bien la síntesis de NPAu-e se encuentra descrita desde 1857 por Faraday<sup>33</sup>, la síntesis de NPAu-b sólo ha emergido en la última década. El actual concepto de crecimiento espontáneo mediante núcleos proviene del trabajo descrito por Jana y cols<sup>34</sup> quienes obtuvieron una dispersión coloidal de NPAu-b mediante la adición de NPAu-e recubiertas con citrato (a modo de centros de nucleación) a una disolución de crecimiento obtenida mediante la reducción de  $\text{HAuCl}_4$ . De esta manera se forman NPAu-b de una relación de aspecto largo:ancho de entre 3 y 18. Este mismo grupo introduce la idea de agregar  $\text{AgNO}_3$  para modular la relación de aspecto de estos materiales<sup>35</sup> consiguiendo menor contaminación con AuNP-e y una distribución de tamaño de AuNP-b más angosta. Posteriormente, se introdujeron dos modificaciones por parte de Nikoobakht y El-Sayed obteniendo aún mejores resultados.<sup>36</sup> Se reemplazó el citrato por CTAB como estabilizador en el proceso de la formación de los núcleos y se varió la cantidad de iones de plata para controlar la relación de aspecto. De esta forma se consiguió disminuir casi en su totalidad la aparición de otras formas en la síntesis. El protocolo de síntesis de NPAu-b empleado en esta memoria tuvo en cuenta estas publicaciones y la publicación de Alice McQueen<sup>37</sup> donde se incorpora HCl de 0,1M a la solución de crecimiento, obteniendo mayor reproducibilidad para la síntesis de NPAu-b de relación de aspecto cercana a 4.

La síntesis realizada considera dos pasos (figura 3):

- i) Obtención de una solución de núcleos mediante la reducción de  $\text{HAuCl}_4$  con  $\text{NaBH}_4$  en presencia de CTAB, generando así núcleos de oro de un tamaño de 4 nm.
- ii) Adición de estas semillas de oro a una solución de crecimiento con iones  $\text{Au}^+$  en CTAB, la cual es obtenida por la reducción de  $\text{HAuCl}_4$  con ácido ascórbico.



**Figura 3:** Esquema representativo de la síntesis de NPAu-b. A) Obtención de núcleos de oro, B) Obtención de la solución de crecimiento y NPAu-b.

Se han propuesto dos mecanismos a través de los cuales se produce el crecimiento de las NPAu-b una vez que son agregadas las semillas a la solución de crecimiento. Uno de ellos propone un crecimiento preferencial direccionado por el surfactante<sup>38,39</sup> debido a una unión preferencial del CTAB en las caras del núcleo cristalino y el otro mecanismo consiste en el crecimiento dirigido por campo eléctrico<sup>40</sup> donde el complejo CTAB-AuCl<sub>2</sub><sup>-</sup> se une a las semillas cubiertas por CTAB mediante colisiones que son controladas por la doble capa eléctrica dando origen a la forma asimétrica. Sin embargo, estas teorías no introducen el rol que juegan los iones Ag<sup>+</sup> en el crecimiento cristalino de una NPAu-b. Varios estudios se realizaron para determinar su rol, en base a esto Jana y cols.<sup>36</sup> han propuesto que al introducir AgNO<sub>3</sub> a una solución de CTAB se produce la formación de un par Ag-Br, lo que finalmente produce una deposición de la plata en la superficie de la NPAu-b produciendo una restricción en su crecimiento. Liu y cols.<sup>41</sup> sugirieron que la deposición de Ag mediante reducción sobre la superficie de la NPAu-b, se produce por un proceso denominado deposición bajo-potencial (UDP) pues si bien Ag<sup>+</sup> no puede ser llevada a Ag<sup>0</sup> por el ácido ascórbico a pH ácido, es posible que

esto suceda en presencia de un sustrato metálico formando así una monocapa metálica a un potencial mucho más bajo que el necesario para la reducción.

Combinando estos antecedentes y varias técnicas se propuso un mecanismo de crecimiento basado en la deposición bajo-potencial de Ag y el crecimiento dirigido por campo eléctrico (figura 4).<sup>42</sup> En este mecanismo  $\text{AuCl}_4^-$  es unido a CTAB mediante micelas y luego de esto, reducido formando micelas CTAB-  $\text{AuCl}_2^-$ , el  $\text{AuCl}_2^-$  en las micelas de CTAB migra hacia las semillas esféricas recubiertas con CTAB por interacciones con el campo eléctrico. La simetría de la esfera es eliminada en las diferentes caras por una unión preferencial del CTAB a la cara  $\{110\}$ . Los iones de  $\text{Ag}^+$  se depositan en la cara  $\{110\}$  más rápidamente que en la cara  $\{100\}$ , lo que resulta en un crecimiento en forma de barra a lo largo de la dirección  $\{100\}$ . Una vez finalizada la deposición de los iones de  $\text{Ag}^+$  sobre la cara  $\{100\}$  se completaría el crecimiento de la NPAu-b.<sup>43</sup>

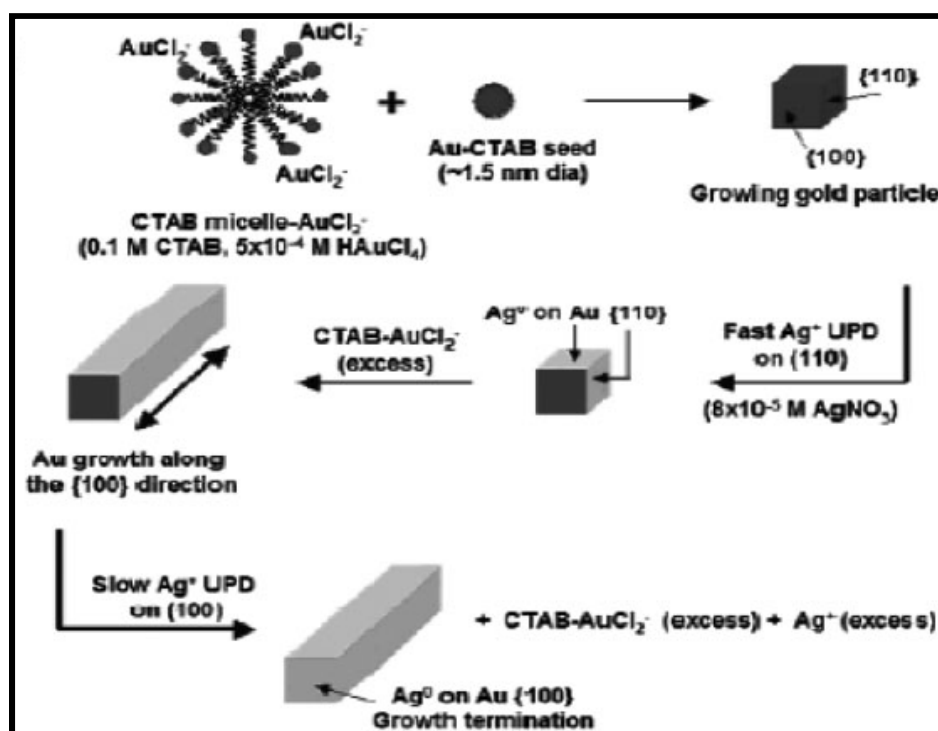


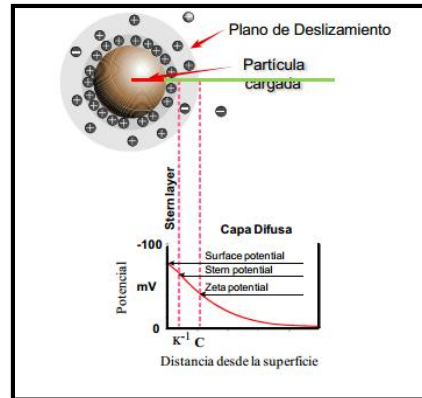
Figura 4: Mecanismo de crecimiento de las partículas en forma de barras mediante el método de crecimiento mediado por semillas.<sup>42</sup>

### 1.3 Estabilidad de las NPAu

Las dispersiones de NPAu son un sistema coloidal donde la fase dispersa corresponde a las nanopartículas y el medio líquido, en las que se mantienen, es la fase dispersante. Las características de las dispersiones de las NPAu son las de un coloide liófilo o liofílico.

Esto significa que la dispersión es termodinámicamente inestable, a diferencia de lo que ocurre en un coloide liofílico donde la dispersión es más estable que los componentes. Esto significa que eventualmente, se observará separación de las fases, es decir, las NPAu se agregarán o coagularán. Sin embargo, la velocidad de separación de las fases puede ser infinitamente lenta.

En general, las partículas dispersas en un sistema acuoso adquieren una carga superficial. La carga intrínseca de la partícula más los iones fijos adsorbidos conforman lo que se conoce como la doble capa eléctrica. El espesor de esta capa es la longitud de apantallamiento de Debye ( $\kappa^{-1}$ ). Las cargas que quedan por dentro de esta longitud no ejercen fuerza efectiva, fenómeno denominado apantallamiento. Las cargas superficiales modifican la distribución de los iones circundantes, lo que resulta en una zona alrededor de la partícula que es eléctricamente diferente al seno de la solución (figura 5). Esta zona puede dividirse en dos partes: la capa interior adherida fuertemente a la partícula, y que se desplaza junto con la partícula, llamada capa de Stern, y una región exterior, que se hace difusa a medida que aumenta la distancia desde la superficie. El potencial zeta ( $\zeta$ ) es la diferencia de potencial entre la capa difusa y el seno de la solución, y por lo general se expresa en milivoltios (mV). Es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción eléctrica entre las partículas que componen el coloide.

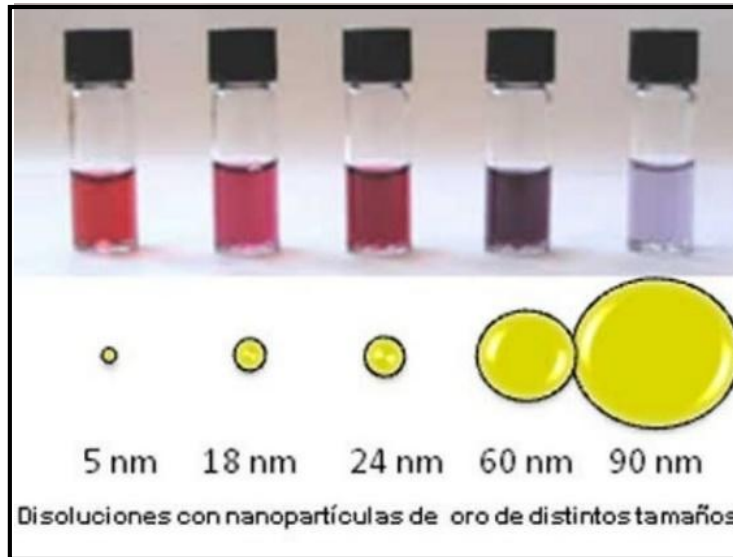


**Figura 5:**Potencial Zeta. El plano de corte está representado por el círculo gris, y la letra C. La línea roja representa el radio de la partícula. La línea verde,  $K^{-1}$  es la longitud de Debye, y el potencial zeta es el potencial eléctrico a la distancia C.

Su medición confirma el mecanismo de estabilización de un coloide, sea electrostático o estérico, al tiempo que es clave para el control electrostático de una dispersión coloidal. Un potencial zeta de gran magnitud se correlaciona con una alta estabilidad coloidal; las partículas con un alto potencial zeta, ya sea positivo o negativo, se repelerán unas con otras.

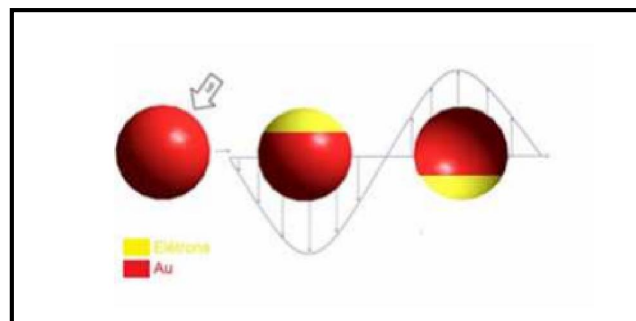
#### 1.4 Plasmón de superficie

Las dispersiones coloidales de NPs principalmente de oro, plata y cobre han llamado la atención desde hace muchos siglos debido al intenso color que éstas presentan. Esta propiedad ha sido estudiada por muchos científicos y fue Gustav Mie quien resolviendo las ecuaciones de Maxwell, con las adecuadas condiciones límites para esferas, atribuyó éste color (figura6) a la interacción de éstas NPs con la radiación electromagnética.<sup>14</sup>



**Figura 6:** Dispersiones de nanopartículas de oro. Los distintos colores de nanopartículas de oro varían según el tamaño de las nanopartículas.

Al interactuar las nanopartículas metálicas con un campo electromagnético se genera una oscilación (misma frecuencia) entre los electrones de la banda de conducción del metal y la radiación electromagnética incidente. Esta oscilación es conocida como resonancia de plasmón de superficie (RPS) y genera una intensa banda de absorción detectable mediante espectroscopia UV-visible, en la zona del visible (figura 7).



**Figura 7:** Esquema de la interacción de la radiación electromagnética con las NPAu. Un dipolo oscila en fase con el campo eléctrico de la luz incidente.



Como se observa en la figura 7, al interactuar un campo electromagnético con una nanopartícula, esta última se polariza generando oscilaciones del tipo dipolar y/o multipolar. El máximo de absorbancia del RPS es dependiente del tamaño de la nanopartícula. Así, en nanopartículas con diámetros mayores a 20 nm la contribución de modos de mayor orden (dipolo, cuadrupolo, etc.) generan un desplazamiento batocrómico de la banda de absorción, esto debido a que las nanopartículas de mayor tamaño no pueden polarizarse homogéneamente. Para este tipo de nanopartículas el fenómeno de dispersión comienza a ser importante dentro del fenómeno global de extinción de la luz.<sup>10</sup> Para las AuNP de diámetro menor a 20 nm sólo las contribuciones de los modos dipolares afectan al fenómeno de extinción.<sup>10</sup> En este caso, el máximo de absorbancia también se ve afectado por el tamaño de la nanopartícula. A medida que disminuye el tamaño de la nanopartícula la absorción de la RPS sufre un desplazamiento hipsocrómico. Es importante destacar que la dispersión en el tamaño de las partículas reales produce un ensanchamiento en la banda de absorción al visible.

### **1.5 Plasmón superficial y Espectroscopia UV-Vis**

Entre las técnicas más utilizadas para caracterizar a las NPAu se encuentra la Espectrofotometría UV-Visible, la cual brinda información sobre la concentración, el tamaño y homogeneidad del tamaño de las nanopartículas, comparando la radiación luminosa absorbida o transmitida por una solución de NPAu respecto de un blanco. De este modo la concentración se relaciona con la absorbancia en el pico máximo de absorción, el tamaño con la posición del pico respecto al eje X correspondiente a la longitud de onda mientras que la homogeneidad (tamaño de las NP) con el ancho de la señal. Los coloides de oro, los cuales se caracterizan por su intenso color rojo, absorben luz en la región verde-azul del espectro.<sup>11</sup> Esta absorción depende de ciertos factores como el tamaño de las NPAu, su estado de agregación y de la frecuencia de RPS, característico de las partículas metálicas.<sup>12</sup> De esta manera las NPAu de 40 a 50 nm absorben a los 808 nm de longitud de onda.<sup>13</sup>

## 1.6 Dispersión dinámica de la luz para caracterización de nanopartículas.

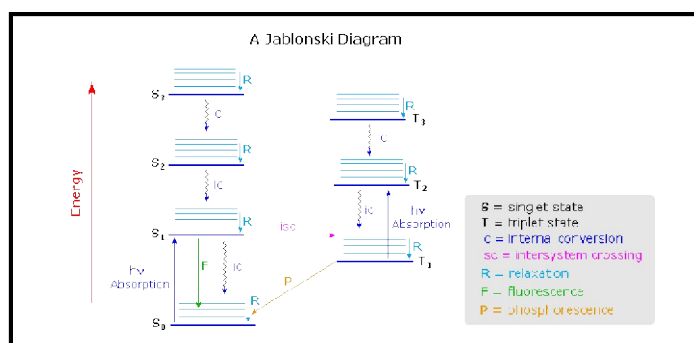
La dispersión dinámica de la luz (DLS) (DLS; del inglés Dynamic light scattering) es una técnica utilizada para medir el radio hidrodinámico de las partículas (figura 8), por lo general, en la región sub-micrométrica. La DLS mide el movimiento browniano relacionándose el mismo con el radio hidrodinámico de las partículas determinándose la dispersión de la luz por la interacción de la misma con las partículas. El movimiento browniano, es el movimiento aleatorio de las partículas debido a los choques dados por las moléculas del solvente que las rodean. Normalmente, la DLS tiene que ver con la medición de las partículas suspendidas en un líquido. Cuanto más grande sea la partícula, más lento será el movimiento browniano. Las partículas más pequeñas son “chocadas” por las moléculas de disolvente y se mueven con mayor rapidez. La velocidad del movimiento browniano se define por una propiedad conocida como el coeficiente de difusión ( $D$ ) siendo necesario conocer la viscosidad de la muestra.



**Figura 8:** Representación del diámetro de una nanopartícula metálica.

## 1.7 Fluorescencia

La fluorescencia se define como la emisión de fotones que se producen durante los procesos de relajación molecular de estados electrónicos excitados. Estos procesos fotónico implican las transiciones entre estados electrónicos y vibracionales de moléculas fluorescentes (figura 9). La fluorescencia es medida mediante un "espectrofluorímetro" en unidades de fluorescencia relativa (R.F.U.), o cuentas por segundo (C.P.S.).



**Figura 9:** Esquema del diagrama de Jablonski sobre la fluorescencia y fosforescencia

La carboxifluoresceína (CF) tiene la propiedad de poseer un grupo fluoróforo, componente de la molécula hace que ésta sea fluorescente (figura 10).

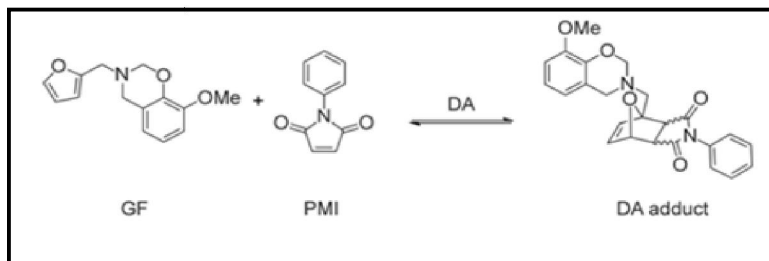
En la presente unidad de investigación la CF será desprendida de la superficie de una nanopartícula como modelo de un prototipo de utilización biológica, el cual será utilizado como indicador de la liberación de moléculas bioactivas.



**Figura 10:** Imagen de una solución de 5(6)-Carboxifluoresceína en metanol

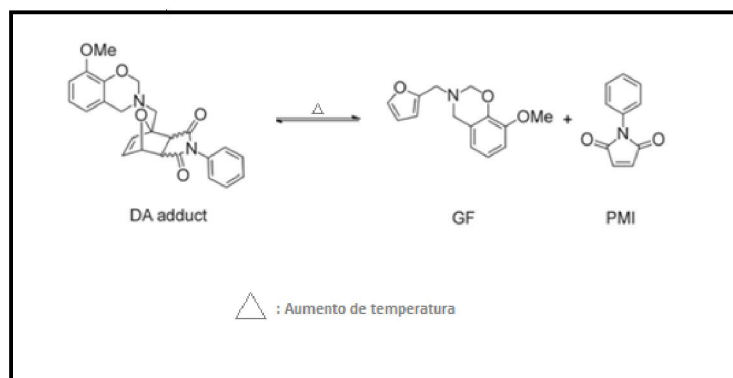
## 1.8 Reacciones Diels-Alder

La reacción de Diels-Alder, es conocida también como reacción de ciclo adición (4 + 2) entre dieno y dienófilo (figura 11). La reacción de Diels-Alder pertenece al grupo de las reacciones "clic" conocida como versátil, eficiente y selectiva.



**Figura 11:** Reacción de Diels-Alder entre benzoxazina orientada al grupo furano (GF) y la N-fenilmaleimida (PMI) formando el aducto Diels-Alder<sup>3</sup>.

Por otra parte, las reacciones de Diels-Alder, en el rango de temperatura apropiada, tienen una reacción inversa llamada reacción de retro-Diels-Alder<sup>15</sup>(figura 12).



**Figura 12:** Reacción de Retro Diels-Alder de la figura 11, entre la benzoxazina orientada al grupo furano (GF) y la N-fenilmaleimida (PMI).

En esta unidad de investigación se estudiará la liberación de la carboxifluoresceína desde una nanopartícula de oro mediante una reacción retro Diels-Alder producida por el efecto de la irradiación.

## 1.9 Moléculas capaces de liberar fármacos

La literatura muestra un desarrollo en los estudios de nuevos métodos para la entrega de especies químicas, mediante control espacial y temporal, utilizando luz visible de baja energía la cual ofrece ventajas en terapias fotodinámicas.<sup>59</sup> El hecho de que las NP absorben luz de frecuencias específicas (en su resonancia de plasmones) y que éstas, en forma eficiente, puedan ser convertidas en calor (a través del efecto fototérmico), es un fenómeno particularmente atractivo que ha sido utilizado con eficacia para producir muerte celular.<sup>60</sup> Sin embargo, hasta la fecha, el calor que se genera cuando la luz visible es absorbida por este tipo de nanomateriales no se ha utilizado para iniciar eventos de entrega de moléculas bioactivas. Esta técnica proporcionaría un novedoso método para romper enlaces químicos y liberar así compuestos bioactivos que se encuentran unidos a la superficie de las NP dentro de una célula sin dañar al resto de células.

Recientemente, se ha desarrollado un nuevo método para aprovechar el calor local que disipan las NP cuando que se estimulan con luz visible, con el fin de desencadenar reacciones térmicas sobre la superficie de las NP sin aumentar significativamente la temperatura del medio ambiente circundante. Este enfoque tiene una ventaja sobre los demás en que los agentes específicos pueden ser entregados a una célula sin dañarla. Así Branda y cols., describieron un sistema que desencadena la liberación de un colorante fluorescente unido a una AuNP-*coreshell*.<sup>61</sup>

En esta unidad de investigación se conjugaron NPAu-b con carboxifluoresceína unidas un aducto de Diels-Alder de manera que al irradiar el conjugado de nanopartículas, con radiación láser, se produzca la liberación la carboxifluoresceína por medio de la reacción retro-Diels-Alder.

## **II Hipótesis.**

Con la irradiación láser y una reacción retro Diels-Alder es posible producir la liberación de la carboxifluoresceína que se encuentra funcionalizada a la superficie de una nanopartícula de oro.

### III Objetivos.

#### 3.1 Objetivos Generales.

Por efecto de la irradiación, producir la liberación de la carboxifluoresceína, que se encuentra funcionalizada a la superficie de una nanopartícula de oro del tipo barra, mediante una reacción de retro Diels-Alder.

#### 3.2 Objetivos Específicos.

- 1.- Síntesis y caracterización de las Nano-Barras de oro(**NPAu-b**).
- 2.- Síntesis y caracterización de *espaciador* N,N'-(disulfanediy)bis(ethane-2,1-diyl))bis(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanamide) (**diSHA**).
- 3.- Síntesis de N-(furan-2-ylmethyl)-3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H piro[isobenzofuran-1,9'-xanthene]-5-carboxamide (**CF-FAM**).
- 4.- Unión de la CF-FAM al *espaciador* diSHA.
- 5.- Funcionalización de las NPAu-b con el compuesto CF-FAM-diSHA.
- 6.- Irradiación de las NPAu-b funcionalizadas con CF-FAM-diSHA para producir la liberación de la carboxifluoresceína.

## IV Parte Experimental.

### 4.1 Reactivos.

- Ácido 6-maleimidohexanoico,  $C_{10}H_{13}NO_4$ , 90%, MM:211.21g/mol, Sigma-Aldrich
- Maleimida,  $C_4H_3NO_2$ , 99%, MM: 97.07 g/mol, Sigma-Aldrich.
- 5(6)-Carboxifluoresceína,  $C_{21}H_{12}O_7$ , MM: 376.32 g/mol, Merck.
- HBTU,  $C_{11}H_{16}N_5O^*F_6P$ ,  $\geq 99.0\%$ , MM: 379.25 g/mol, Merck.
- DIEA,  $C_8H_{19}N$ , 99.5%, MM: 129.24 g/mol, Sigma-Aldrich.
- Cistamina,  $C_4H_{12}N_2S_2 \times HCl$ , 98%, MM:225.2 g/mol, Sigma-Aldrich.
- Ácido tetracloroáurico,  $HAuCl_4$ , 99.99%, MM: 339.79 g/mol, Sigma-Aldrich.
- Nitrato de plata,  $AgNO_3$ , 99.999%, MM:169.87 g/mol, Sigma-Aldrich.
- Borohidruro de sodio,  $H_4BNa$ , 99%, MM:37.83 g/mol, Sigma-Aldrich.
- CTAB,  $CH_3(CH_2)_{15}N(Br)(CH_3)_3$ , 99.98%, MM:364.45 g/mol, Sigma- Aldrich.
- Ácido ascorbico,  $C_6H_8O_6$ , 99%, MM: 176.12 g/mol, Sigma- Aldrich.
- 2-Furfurilamina,  $C_5H_7NO$ ,  $\geq 99\%$ , MM:97.12 g/mol, Sigma-Aldrich.
- DMF,  $HCON(CH_3)_2$ , 99.8%, MM: 73.09 g/mol, Merck.
- Diclorometano,  $CH_2Cl_2$ , 99.8%, MM: 84.93 g/mol, Merck.
- Hexano,  $C_6H_{14}$ , 95%, MM: 86.18 g/mol, Merck.
- Metanol,  $CH_3OH$ , 99.9%, MM: 32.04 g/mol, Merck
- Acetato de etilo técnico
- Hexano técnico.
- Diclorometano técnico.
- Sílica gel, Merck.
- Nitrógeno gaseoso extra puro.



## 4.2 Materiales.

- Manto calefactor.
- Balón de fondo redondo de 50, 100 y 250 ml.
- Embudo de decantación de 60,100 y 250 ml.
- Placa calefactora y agitadora.
- Barra de agitación magnética.
- Pinza de 3 dedos.
- Nuez.
- Soporte universal.
- Argolla para embudo.
- Balanza analítica.
- Pesa sales.
- Espátula.
- Matraces aforados de 250 ml.
- Columna cromatográfica.
- Probeta de 10 ml.
- Viales de 5 y 50 ml.
- Vasos de precipitado de 100 ml.
- Cánula.
- Tubos de ensayo.
- Tubos de Schlenk.
- Línea Schlenk.

### 4.3 Equipos.

- RMN Bruker 400 Ultrashield, Avance 400.
- Espectrofotómetro UV/VIS specord S600
- Centrifuga z326K, Hermle
- Rotaevaporador Vacuubrand PC 510 NT
- MALDI-TOF Microflex, BrukerDaltonics Inc. (Matrix - assisted laser desorption/ ionization time of flight)
- Hplc-MS Esquire 4000 ,BrukerDaltonics GMBH
- Fluorímetro de placas Biotek, Synergy 2 Multi-Mode Microplate Readers
- Láser de diodos 808 nm, 350 mW, modelo IQ1A350(808-500), Powertechnology inc.

## **V Procedimiento Experimental.**

### **5.1 Síntesis de las nanobarras de oro (NPAu-b)**

Todo el material utilizado para la síntesis de las nanopartículas de oro fue lavado minuciosamente, para evitar contaminación, con agua regia (ácido nítrico y ácido clorhídrico en proporciones 1:3).

Las nanopartículas de oro, en forma de barras, se prepararon en tres etapas:

#### **a) Primera etapa: Preparación de las disoluciones.**

Se prepararon las distintas soluciones que serían utilizadas para sintetizar las nanobarras de oro.

Las soluciones fueron preparadas en diferentes viales ámbar de 50 ml y su preparación se expone a continuación:

- Solución de tetracloroáurico 0.01M (3.4ml en 10 ml agua mili Q).
- Solución de ácido ascórbico al 0.1M (0.1761 g en 10 ml agua mili Q).
- Solución de borohidruro de sodio al 0.01M (0.0039 g en 10 ml agua mili Q).
- Solución de  $\text{AgNO}_3$  al 0.01M (0.0169 g en 10 ml agua mili Q).
- Solución de CTAB al 0.1M (1.82g en 50 ml agua mili Q).
- Solución de HCl 0.1M (0.414 ml de ácido en 50 ml de agua mili Q).

#### **b) Segunda etapa: Síntesis de las semillas de oro.**

En un vial ámbar de 50 ml se agregaron 9.75 ml de CTAB 0.1M, luego 250  $\mu\text{l}$  de tetracloroáurico 0.01M. A esta disolución se le agregaron 600  $\mu\text{l}$  de borohidruro de sodio al 0.01M, para luego dejar agitando destapado el vial por 30 minutos. Pasado este tiempo se tapa el vial y se sigue agitando por 90 minutos más. Posteriormente, se guarda la disolución en la estufa a 27°C por 90 minutos (figura 13).

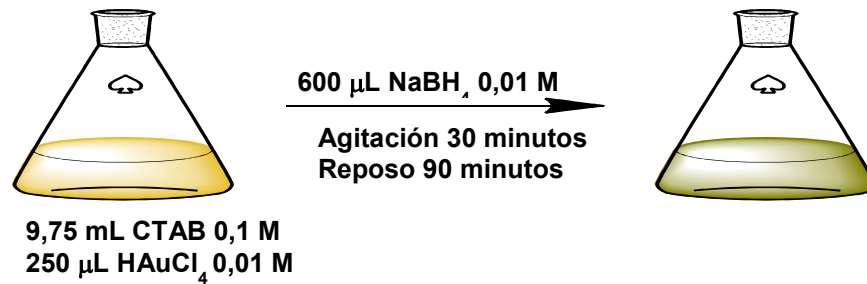
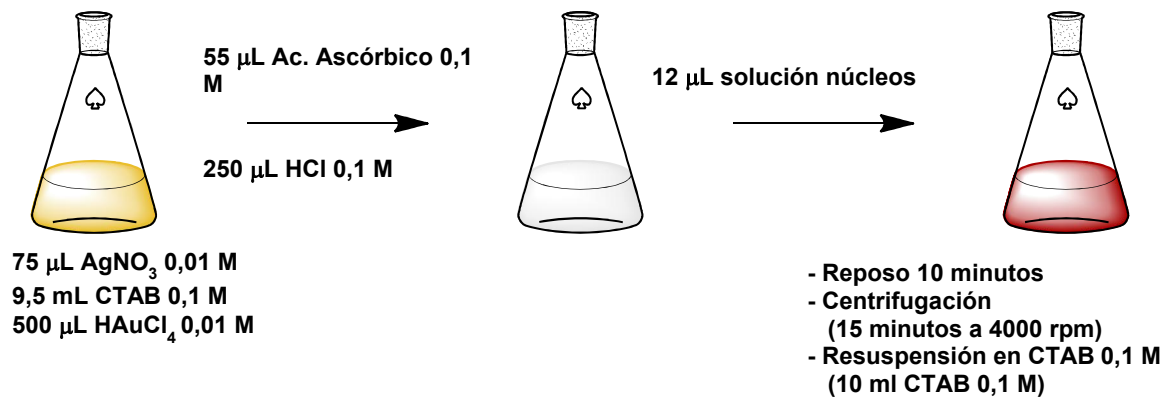


Figura 13: Esquema síntesis de las semillas de oro.

### c) Tercera etapa: Crecimiento de las semillas de oro.

En un vial ámbar de 50 ml se agregaron 9.5 ml de CTAB 0.1M, 75 µl de nitrato de plata 0.01M, 500 µl de tetracloroáurico 0.01M, 55 µl de ácido ascórbico 0.1M y 250 µl de ácido clorhídrico 0.1M. Esta disolución se deja agitar vigorosamente por un 1 minuto. Finalmente, se le agregaron 12 µl de las semillas previamente sintetizadas en la segunda etapa. Luego de esto se dejan en reposo sin agitación hasta la aparición del color (figura 14).

a)



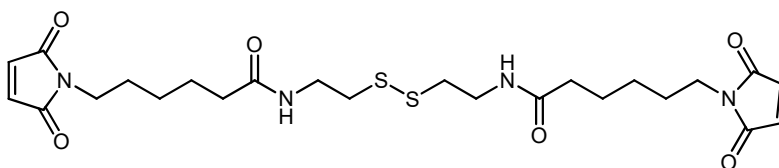
b)



Figura 14:a) Esquema de etapa de crecimiento de AuNP-b. b) La imagen muestra solución resultante de nanobarras de oro.

## 5.2 Síntesis del espaciador N,N'-(disulfanediylobis(ethane-2,1-diyl))bis(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanamide) (diSHA)

En un balón de 50 mL se disolvieron 556 mg (2,37 mmol) de ácido 6-maleimidohehexanoico 90% y 273 mg (1,19 mmol) de cistamina clorhidrato 98% en 3 mL de DMF seca. La mezcla se enfrió a 0°C y se mantuvo con agitación constante. A la mezcla se le agregaron 917 mg (2,37 mmol) de HBTU 98% y luego 0,5 mL (2,98 mmol) de DIEA. La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego, se agregó agua destilada fría a la mezcla. Se purificó el producto mediante cromatografía en columna (sílica gel, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: CH<sub>3</sub>OH 10:1). Se obtuvo un porcentaje de rendimiento del 52%. El producto diSHA (figura 15) fue caracterizado mediante HPLC-MS y RMN <sup>1</sup>H.

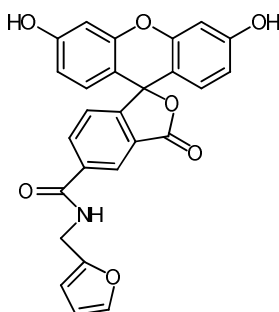


**Figura 15:** Esquema de la estructura del espaciador N,N'-(disulfanediylobis(ethane-2,1-diyl))bis(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanamide) (diSHA).

## 5.3 Síntesis de N-(furan-2-ylmethyl)-3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthene]-5-carboxamide (CF-FAM)

En un vial ámbar de 50 ml se agregaron 376 mg (1,00 mmol) de carboxifluoresceína (CF), junto con 379,3 mg (1,00 mmol) de HBTU en aproximadamente 4 ml de 2,5-dimetilfurano seco, esto se dejó a 0°C. La mezcla resultante se dejó bajo agitación constante hasta que estuvo completamente disuelto. Posteriormente, se agregaron 332 µl (2,00 mmol) de N,N-Diisopropilamina (DIEA) y se dejó activar durante 15 minutos. Luego se agregaron 88,4 µl (1,00 mmol) de 2-furfurilamina (FAM). La mezcla resultante se dejó reaccionar 72 horas. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en

columna de silica-gel utilizando acetato de etilo. Después de esta columna, el producto aún impuro, se separó mediante una placa de silica-gel preparativa con una mezcla de acetato de etilo: ácido acético 99:1. El porcentaje de rendimiento obtenido fue del 62%. El producto puro fue caracterizado mediante HPLC-MS (figura 16).

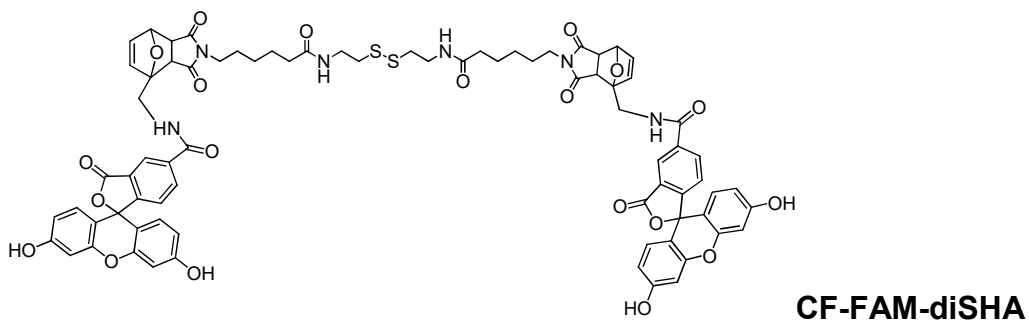


**Figura 16:** Esquema de la estructura N-(furan-2-ylmethyl)-3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthene]-5-carboxamide (CF-FAM).

#### 5.4 Unión de la CF-FAM al espaciador diSHA mediante una reacción de Diels-Alder.

En un vial ámbar se agregaron 2 eq de CF-FAM, 12,6 mg y 1 eq de espaciador diSHA, 6,3 mg en una mezcla 2:1 de diclorometano-metanol 3 ml. Dejándose la reacción *over-night* con agitación constante.

Posterior a esto, se eliminó toda la mezcla de solvente por medio de alto vacío utilizando la línea *ashlenk*. Una vez finalizado el proceso, el producto fue guardado a 4 °C y el vial envuelto en papel de aluminio.



**Figura 17:** Esquema de la estructura N-(furan-2-ylmethyl)-3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthene]-5-carboxamide (CF-FAM).

### 5.5 Funcionalización de las NPAu-b con el compuesto CF-FAM-diSHA.

En un vial color ámbar de 50 ml se añadieron 10 ml de solución de NPAu-b de concentración 5nM. Posteriormente, a las NPAu-b se les fue adicionando la disolución de CF-FAM-diSHA, de concentración 0,5mg en 1 ml de DMF, previamente sintetizado en el punto 5.4, con agitación constante, siguiendo el esquema de la siguiente tabla:

Tiempo transcurrido (minutos)	Volumen añadido de CF-FAM-diSHA (µl)
0	50
15	50
30	100
60	125
90	125

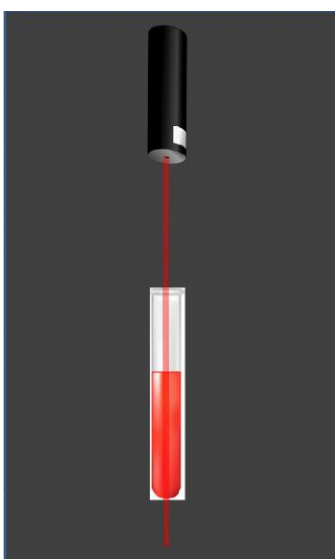
**Tabla 1:** Adición de CF-FAM-diSHA a las NPAu-b para su funcionalización.

Una vez adicionado un volumen total de 450 µl se dejó en agitación constante y a temperatura ambiente durante 24 horas para completar la funcionalización.

Finalmente, para eliminar el exceso de compuesto que no quedó funcionalizado a la superficie de la NPAu-b, la disolución fue centrifugada a 4000 rpm por 60 minutos. El sobrenadante fue eliminado y el pellet fue resuspendido en agua Milli-Q. La solución fue guardada a 4 °C y protegida de la luz.

## 5.6 Irradiación de las NPAu-b funcionalizadas con CF-FAM-diSHA para producir la liberación de la carboxifluoresceína (CF).

Una muestra de 250  $\mu\text{l}$  de NPAu-b funcionalizadas con CF-FAM-diSHA fue irradiada con un láser de 808 nm y con una potencia de 350 mW en una cámara cerrada, donde el láser fue puesto sobre la muestra de tal manera que el haz de luz atravesase el seno de toda la solución (figura 18). La muestra fue irradiada durante 30, 90 y 160 minutos.



**Figura 18:** Representación del montaje de irradiación. La muestra, que se encuentra en el tubo, fue irradiada longitudinalmente con un láser de 808 nm.

Una vez terminada cada irradiación se midió la emisión de fluorescencia en R.F.U. (unidades de fluorescencia relativas). Se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  de la muestra NPAu-b-CF-FAM-diSHA recién irradiada y se puso en una placa de 96 pocillos opaca. La muestra fue puesta en el fluorímetro de placas y se excitó la muestra a una longitud de onda de 475 nm y se midió la emisión fluorescencia entre 500 y 650 nm.

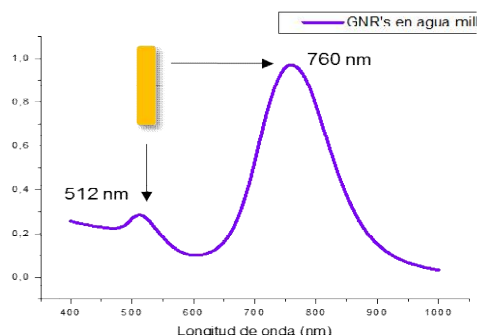


## VI Resultados.

### 6.1 Síntesis y caracterización de las Nano-Barras de oro (NPAu-b).

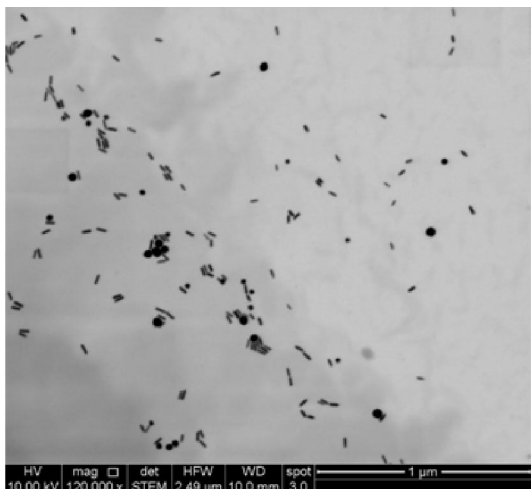
Las AuNP-b fueron obtenidas siguiendo el protocolo de síntesis mediada por semillas reportada por Nikoobakht y El-Sayed y modificadas por McQueen<sup>37</sup>. Fueron caracterizadas por diferentes técnicas como espectrofotometría UV-Vis-Nir, STEM y dispersión dinámica de la luz (DLS).

El espectro de absorción de las NPAu-b desnudas (figura 19) presenta las dos bandas características para las NPAu-b, la longitudinal y la transversal. Con un máximo de absorción para la banda longitudinal de 760 nm, lo cual concuerda con relaciones de aspecto reportadas en la literatura. El pico es angosto lo que estaría indicando una distribución de tamaño de las nanopartículas uniformes. La banda de absorción transversal en 512 nm no presenta ningún hombro lo que indica la ausencia de formas esféricas, ya que justamente a esa longitud de onda se ubica el máximo de absorción característico de las NPAu-e. En la imagen de STEM (figura 20-a) no se observa agregación visible de las NPAu-b y la relación de aspecto de la gran mayoría fluctúa en 3, como se indica en el histograma de relación de aspecto de la figura 20-b, el cual fue realizado con una población de 200 NPAu-b, y es lo que se esperaba según lo observado en los espectros de absorción.

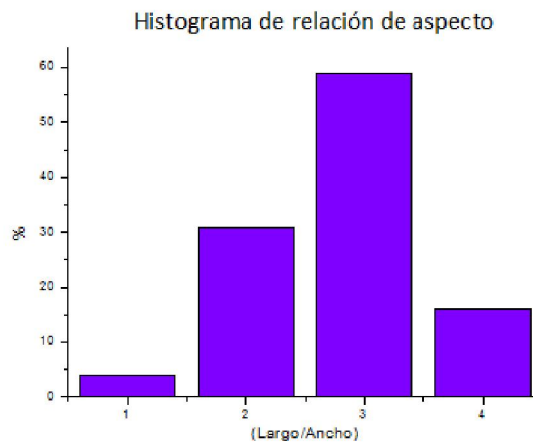


**Figura 19:** Espectroscopia Vis-IRC de las NPAu-b. Se observan dos bandas plasmónicas a 512 nm y a 760nm (transversal y longitudinal, respectivamente).

a)

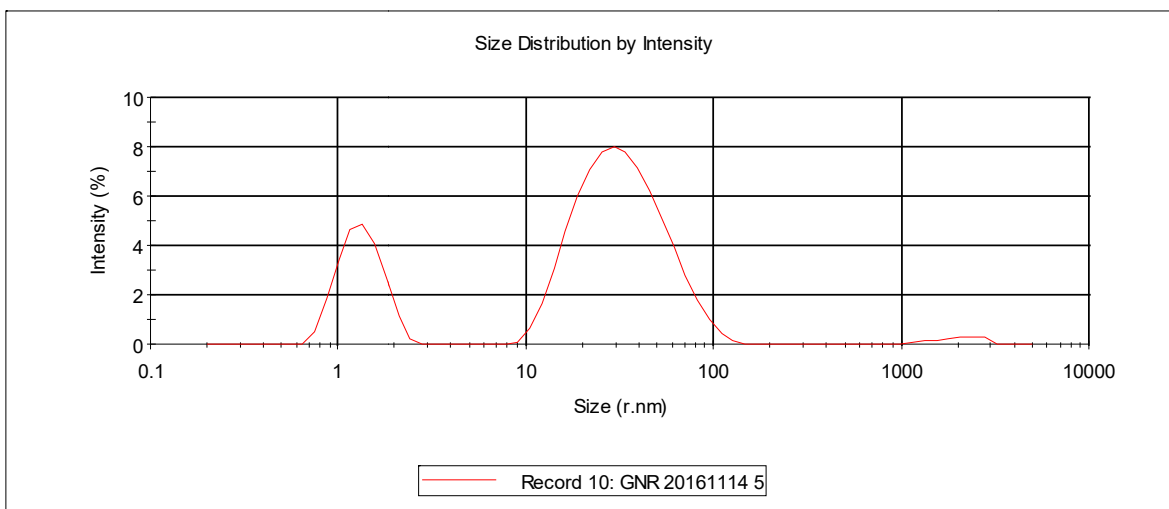


b)



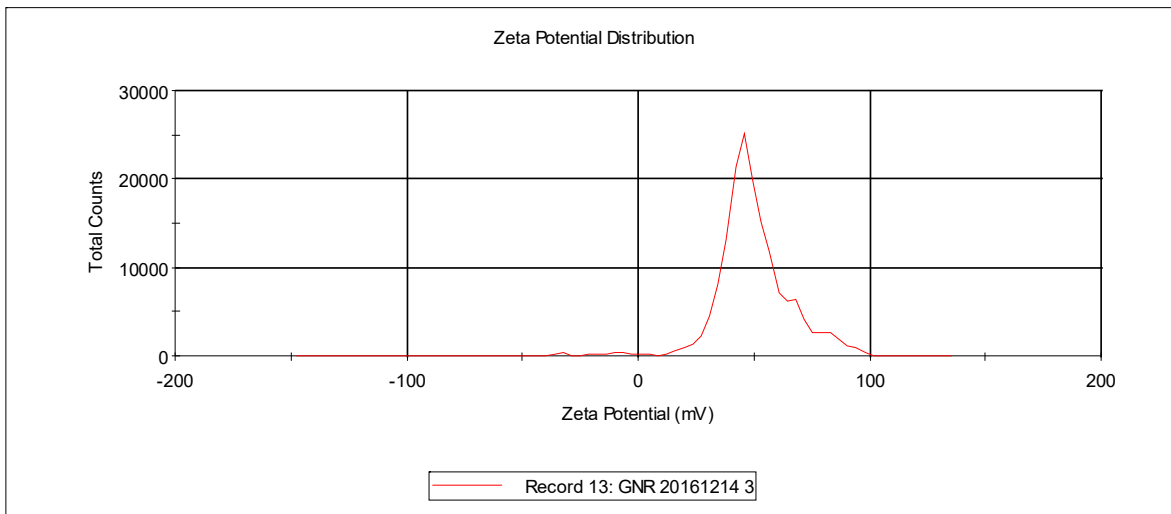
**Figura 20:** a) Imagen de STEM de NPAu-b (la barra representa 40 nm) b) Histograma de relaciones de aspecto (largo/ancho) de las NPAu-b obtenido de las imágenes de STEM.

En la figura 22 se muestra las mediciones de radio hidrodinámico de las NPAu-b en suspensión mediante fluctuaciones de la luz dispersadas por el coloide. En este caso se obtuvo un radio hidrodinámico de la NPAu-b de 9.79nm y un largo de 35.77nm con un Pdl (índice de polidispersidad) de 0.811.



**Figura 21:** Histograma de radio hidrodinámico por DLS (Dynamic light scattering) de las NPAu-b.

En la figura23 se observa el potencial zeta para las NPAu-b con un valor de +43,4 mV característico para este tipo de nanopartículas debido que su agente estabilizante es el CTAB.



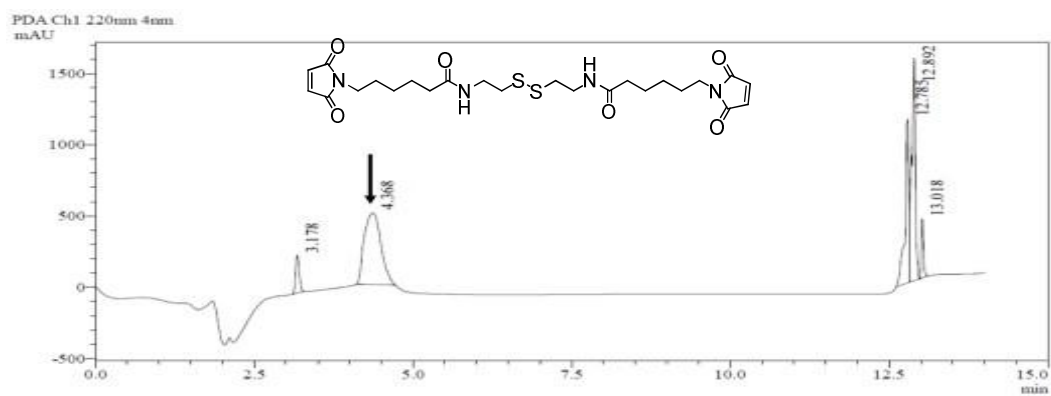
**Figura 22:** Histograma de potencial Z de las NPAu-b.

## 6.2 Síntesis y caracterización del espaciador N,N'-(disulfanediylobis(ethane-2,1-diyl))bis(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanamide) (diSHA).

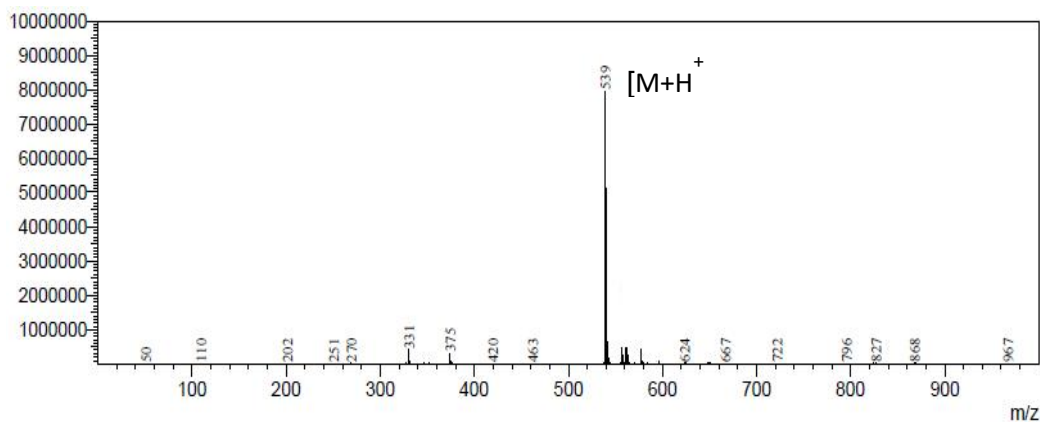
Este producto se obtuvo mediante la reacción del ácido 6-maleimido-hexanoico y la cistamina clorhidrato mediante la activación del ácido carboxílico con el activador HBTU para formar el enlace amida. El producto obtenido fue purificado mediante cromatografía en columna (CH<sub>2</sub>Cl:CH<sub>3</sub>OH 10:3). El producto puro fue caracterizado mediante HPLC/MS y <sup>1</sup>H RMN.

En el espectro la figura 24-a se muestra el cromatograma de alta resolución (HPLC: H<sub>2</sub>O/ACN 0-100% en 15 minutos) con un tiempo de retención de 4,368 min correspondiente al producto sintetizado. En la figura 24-b se observa el ion quasimolecular correspondiente a (M+H)<sup>+</sup>=m/z 539.

a)

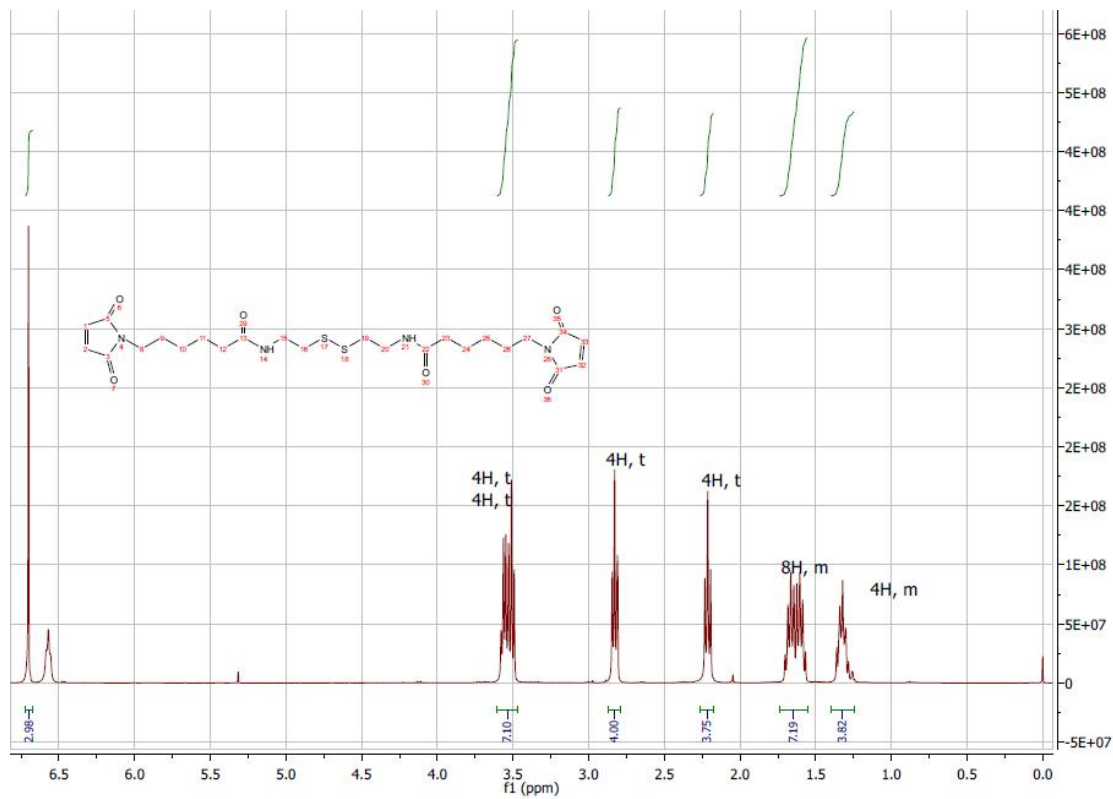


b)



**Figura 23:** Caracterización de diSHA a) HPLC: H<sub>2</sub>O/ACN; 0-100% en 15 minutos. Columna Waterpeptide-separation C18 3,5 μm 4,6x100 mm. b) Espectro de masas (Electrospray, modo positivo) del espaciador diSHA. Se observa el ion quasimolecular correspondiente a (M+H)<sup>+</sup>=m/z 539.

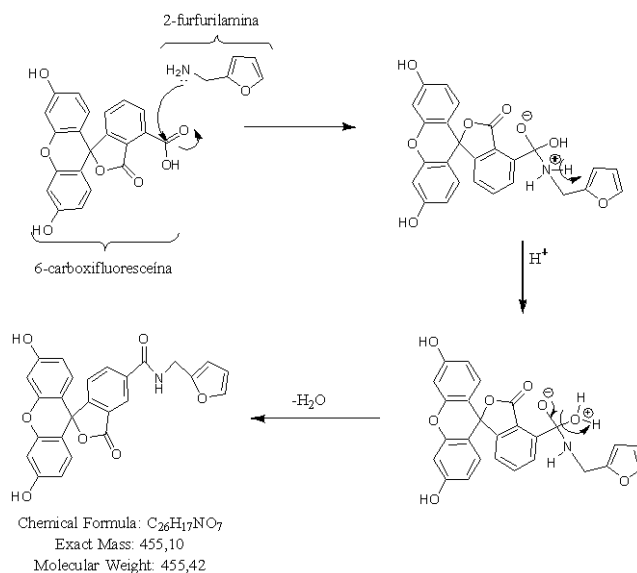
En la figura 25 se muestra el espectro de resonancia magnética nuclear de protones correspondiente al producto diSHA. En él se puede observar las señales  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DCCl}_3$ ):  $\delta$ : 7.26 (s, 4H), 4.09 (t, 4H; t, 4H),  $\delta$ 3.37 (t, 4H),  $\delta$ 2.26 (t, 4H),  $\delta$ 2.13 (m, 8H),  $\delta$ 1.90 (m, 4H).



**Figura 24:** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN diSHA (400 MHz  $\text{CDCl}_3$ ).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DCCl}_3$ ):  $\delta$ : 7.26 (s, 4H), 4.09 (t, 4H; t, 4H),  $\delta$ 3.37 (t, 4H),  $\delta$ 2.26 (t, 4H),  $\delta$ 2.13 (m, 8H),  $\delta$ 1.90 (m, 4H).

### 6.3 Caracterización de N-(furan-2-ylmethyl)-3',6'-dihydroxy-3-oxo-3Hspiro[isobenzofuran-1,9'-xanthene]-5-carboxamide (CF-FAM).

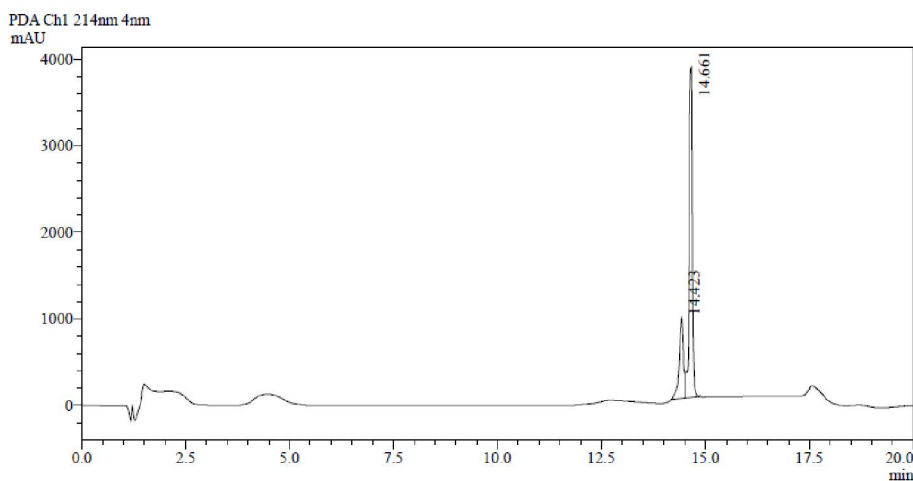
La síntesis de la CF-FAM se llevó a cabo mediante la reacción de la carboxifluoresceína (CF) activando su grupo carboxílico con HBTU y posterior reacción con la 2-furfurilamina (FAM). El mecanismo de la reacción propuesto se observa en la figura 26. La mezcla resultante se dejó reaccionar por 72 horas. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna de silica-gel. El producto fue purificado mediante una placa de silica-gel preparativa como solvente acetato de etilo. El producto puro fue caracterizado mediante HPLC-MS (figura 26).



**Figura 25:** Mecanismo de reacción de N-(furan-2-ylmethyl)-3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthene]-5-carboxamide.

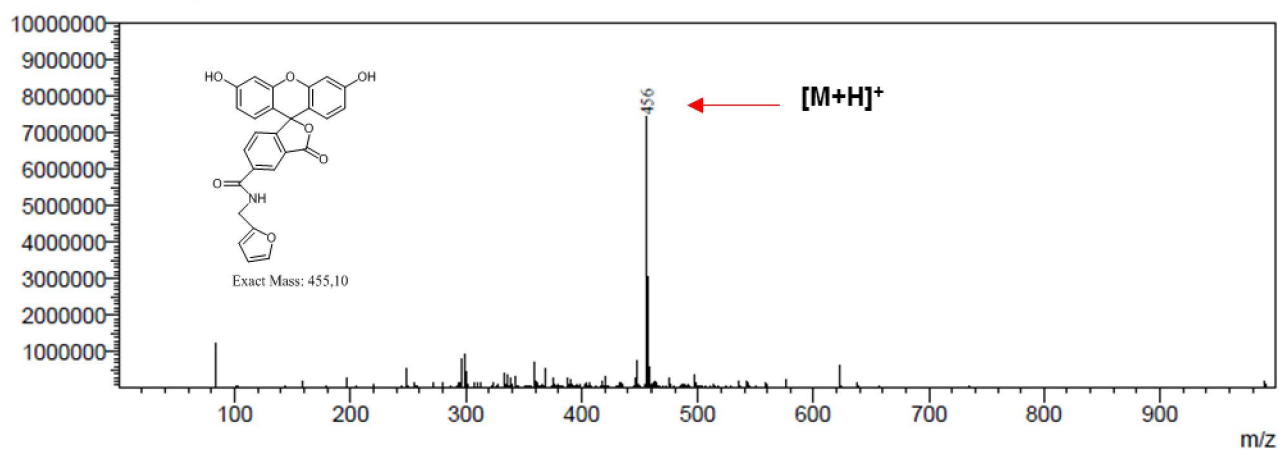
En el espectro la figura 27-a se muestra el cromatograma de alta resolución (HPLC: H<sub>2</sub>O/ACN 0-100% en 15 minutos) con un tiempo de retención de 14.661 min correspondiente al producto sintetizado. En la figura 27-b se observa el ion quasimolecular correspondiente a  $(M+H)^+ = m/z$  456.

a)



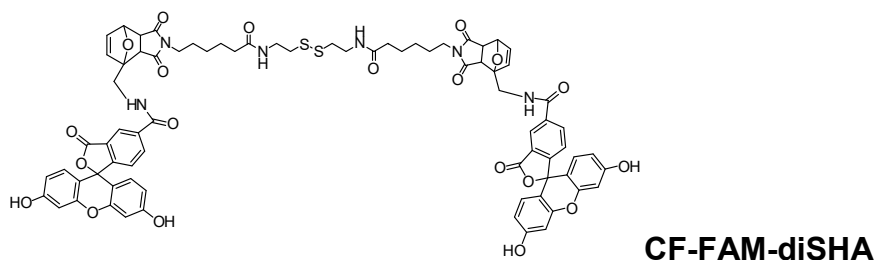
b)

Peak#:1 R.Time:14.727(Scan#:) MassPeaks:1726 BasePeak:456(7459692)  
Spectrum Mode:Averaged 14.717-14.750(884-886)  
BG Mode:Calc Segment 1 - Event 1

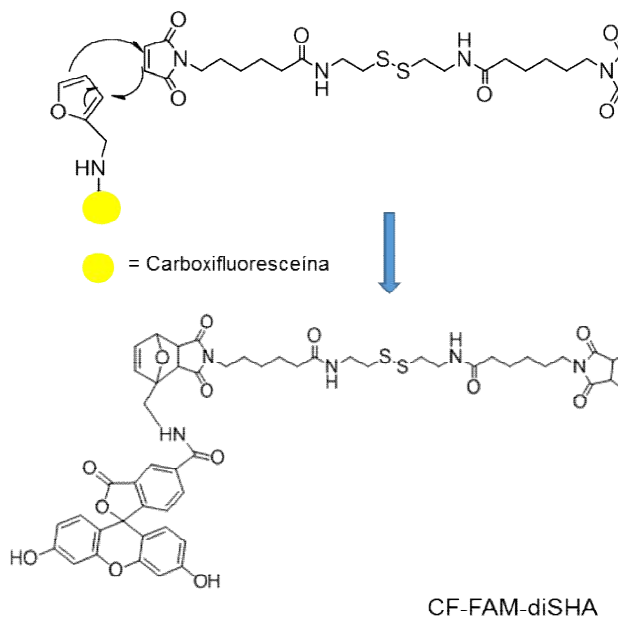


**Figura 26:** Espectro de masas (electrospray, modo positivo) obtenido para N-(furan-2-ylmethyl)-3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H spiro [isobenzofuran-1,9'-xantheno]-5-carboxamide (**CF-FAM**). La flecha señala el ion quasimolecular correspondiente a  $(M+H)^+ = m/z$  456.

#### 6.4 Unión de la CF-FAM al espaciador diSHA.



Este compuesto se obtuvo por reacción de cicloadición entre la CF-FAM y el compuesto diSHA dando mayoritariamente el aducto *endo*, respecto al aducto *exo*. En el proceso de formación de enlaces el dieno y el dienófilo se aproximan en planos paralelos y a medida que se van formando los enlaces, los carbonos terminales del dieno y del dienófilo se rehibridizan desde  $sp^2$  a  $sp^3$  en un proceso concertado (figura 28). El producto *endo* es el producto de control cinético: es menos estable que el *exo*, pero se forma más rápidamente. Por el contrario, el producto *exo* es el producto de control termodinámico: es más estable que el *endo* pero se forma más lentamente.

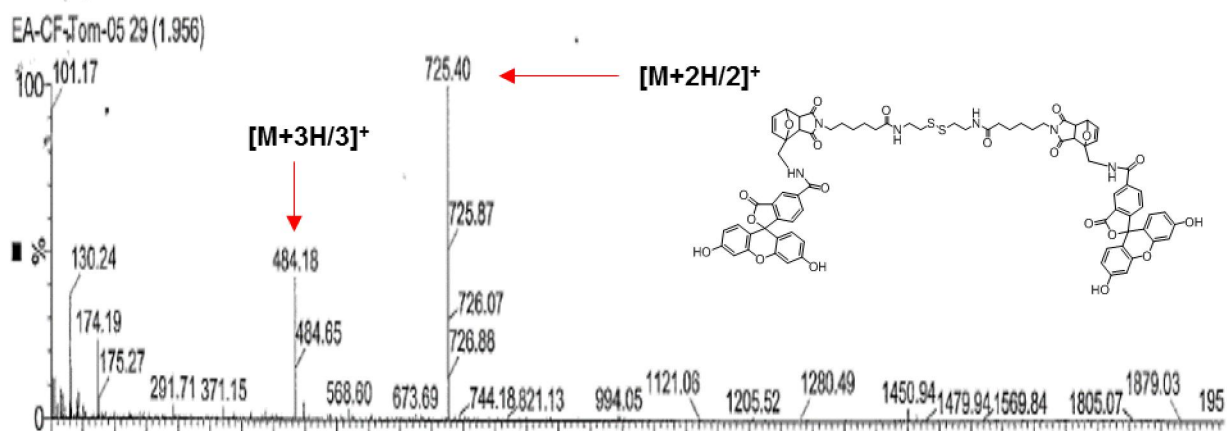


**Figura 27:** Mecanismo de la reacción de Diels-Alder entre la CF-FAM y el espaciador diSHA.



Esta reacción de cicloadición resulta adecuada dado que a temperatura ambiente la ruptura de enlaces en el compuesto CF-FAM-diSHA apenas se produce. Sin embargo, el equilibrio involucrado en esta reacción es fuertemente dependiente de la temperatura, y procede fácilmente a temperaturas superiores a 60 °C.

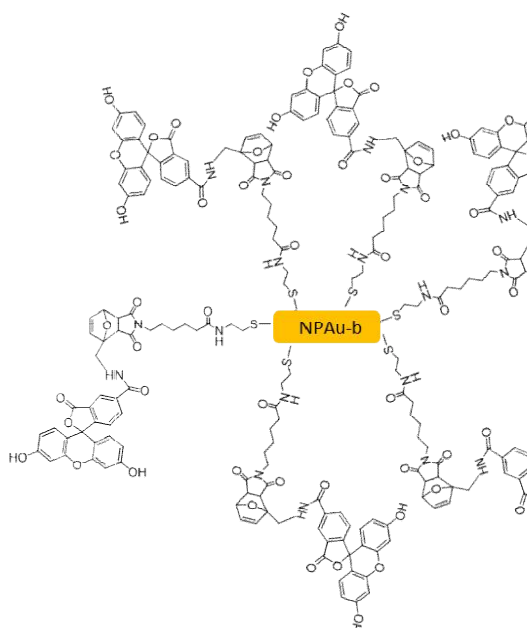
En el espectro se observa claramente los fragmentos  $[M+2H/2]^+ = m/z 725$  y el  $[M+3H/3]^+ = m/z 484$  (figura 29)



**Figura 28:** Espectro de masas del aducto Diels-Alder CF-FAM-diSHA. Las flechas señalan los iones correspondiente al  $[M+2H/2]^+ = m/z 725$  y al  $[M+3H/3]^+ = m/z 484$ .

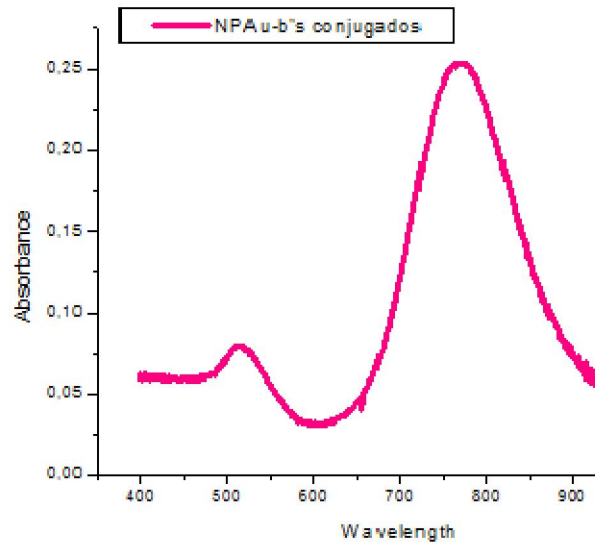
## 6.5 Funcionalización de las NPAu-b con el compuesto CF-FAM-diSHA.

Se funcionalizaron las nanopartículas de oro (NPAu-b) en medio acuoso por incubación de una mezcla de NPAu con el compuesto CF-FAM-diSHA. La unión de estas moléculas a la superficie de oro se da a través de un proceso de quimisorción del grupo tiol o del puente disulfuro sobre la superficie del oro (figura 30).



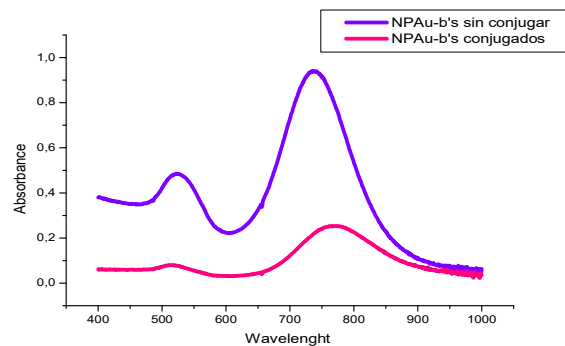
**Figura 29:**Esquema de la funcionalización de las NPAu-b con CF-FAM-diSHA.

Para eliminar la fracción de compuesto CF-FAM-diSHA no unido a la superficie de las NPAu-b se centrifugó y posteriormente el precipitado fue resuspendido en agua Milli-Q. Las nanopartículas fueron caracterizadas mediante espectroscopía UV-Vis (figura 31).



**Figura 30:** Espectro de UV-Visible de las NPAu-b conjugadas al cicloaducto de Diels-Alder

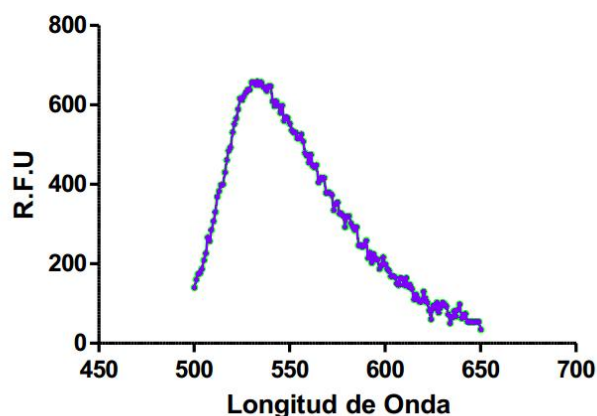
En la figura 32 se pueden observar los espectros UV visible de una solución de NPAu-b sin conjugar y uno de NPAu-b conjugadas con CF-FAM-diSHA. En los espectros se observa un corrimiento batocrómico, de ambos peaks, cuando las NPAu-b se encuentran conjugadas pasando de 512nm a 526nm y de 760 nm a 779 nm, respectivamente.



**Figura 31:** Superposición de los espectros UV-visible de las NPAu-b no conjugados versus las NPAu-b conjugados con el CF-FAM-diSHA.

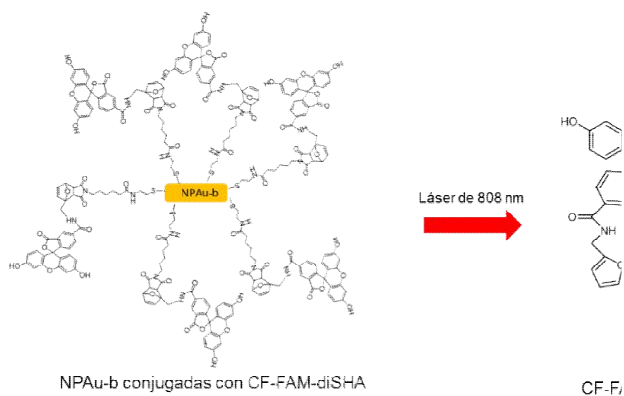
## 6.6 Irradiación del nanocompuesto NPAu-b-CF-FAM-diSHA con un láser de 808 nm.

Previo a la irradiación de la solución de NPAu-b funcionalizadas con CF-FAM-diSHA fueron centrifugadas, con el fin de eliminar todo el exceso de compuesto no funcionalizado sobre la superficie de la NPAu-b. El pellet obtenido después de la centrifugación fue resuspendido en agua Milli-Q. A esta solución, aún sin irradiar, se le midió la fluorescencia, obteniéndose el espectro indicado en la figura 33. Los niveles de fluorescencia en la solución fueron de 680 R.F.U. La señal de fluorescencia de la CF se encuentra apagada (*quenching*) cuando se encuentra unida a través del *linker* a la nanopartícula de oro.



**Figura 32:** Espectros de fluorescencia de una solución de NPAu-b-CF-FAM-diSHA sin irradiar con un valor máximo de 680 R.F.U

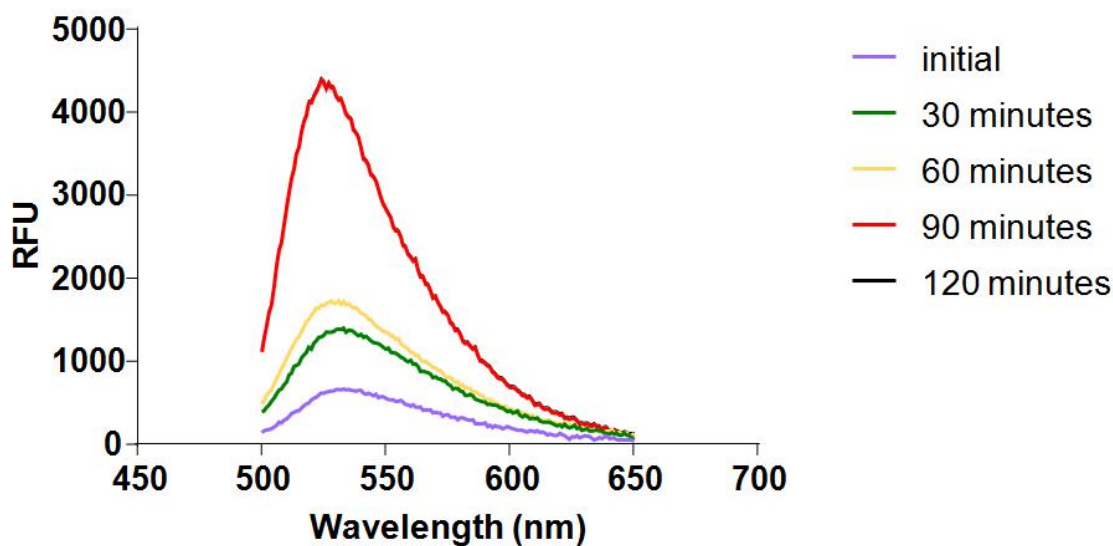
Una vez obtenida la fluorescencia basal de la solución se procedió a irradiar la solución de NPAu-b funcionalizadas con CF con un láser de 808 nm y 350 mW de potencia como se representa en la figura 34, a diferentes intervalos de tiempo como se indicó en la parte experimental.



**Figura 33.** Representación de una nanopartícula-barras de oro funcionalizada con CF antes y después de la irradiación con láser.

La liberación de la CF desde la superficie de la NPAu-b, por efecto fototérmico, debido a la reacción de retro-Diels-Alder fue seguida mediante la medición de los niveles de carboxifluoresceína liberados a la solución.

Así entonces, para evaluar la liberación de la CF, luego de la irradiación, se obtuvieron los espectros de emisión de la fluorescencia para los diferentes tiempos. En la Figura 35, se aprecia el aumento de la intensidad de fluorescencia en la solución hasta llegar a un valor máximo de 4500 correspondiente a la liberación de CF desde la superficie de la nanopartícula de oro mediante la reacción retro Diels-Alder.



**Figura 34:** El histograma muestra la variación de la fluorescencia respecto a los tiempos de irradiación. Se aprecia el aumento de la fluorescencia en la solución a medida que aumenta el tiempo de exposición de la muestra a la irradiación alcanzando los 4.500 R.F.U.

Los resultados expuestos muestran que las nanopartículas de oro funcionalizadas con CF, unidas covalentemente a un espaciador del tipo Diels-Alder, han sido liberadas de la superficie de la nanopartícula de oro después de irradiarlas con un láser de 808 nm. Estos resultados podrían permitir hacer una liberación controlada espacial y temporal de una molécula activa logrando así un mejor efecto sobre el tratamiento de ciertas patologías.

## VII Conclusiones.

- Se sintetizaron las NPAu-b siguiendo la metodología descrita caracterizándolas mediante STEM, UV-Visible, DLS y potencial zeta. Se obtuvieron las AuNP-b con relación de aspecto largo/ancho 3:1 las que son adecuadas para aplicaciones biomédicas, debido a su plasmón superficial centrado en la región del NIR.
- Se sintetizó el espaciador derivado del ácido 6-maleimidohexanoico diSHA, logrando obtener un porcentaje de rendimiento del 52 % y fue caracterizado mediante HPLC-MS y  $^1\text{H}$  RMN.
- Se sintetizó la amida furfúrica de carboxifluoresceína CF-FAM obteniendo un porcentaje de rendimiento del 62 %. Fue caracterizada mediante HPLC-MS.
- Se obtuvo el compuesto formado por la amida furfúrica de carboxifluoresceína (CF-FAM) y espaciador (diSHA) mediante una reacción de Diels-Alder.
- Se funcionalizaron las NPAu-b al aducto de Diels-Alder (CF-FAM-diSHA) mediante el procedimiento descrito obteniéndose el conjugado que conserva la banda plasmónica y presenta estabilidad coloidal.
- Se irradió el complejo de NPAu-b-CF-FAM-diSHA con un láser de 808nm y a 350 mW, lográndose la liberación de la carboxifluoresceína desde la superficie de la nanopartícula de oro.
- Las proyecciones de este trabajo de investigación serán irradiar compuestos con actividad antitumoral.

## VIII Bibliografía.

1. M.S. Chen and D.W. Goodman : The Structure of Catalytically Active Gold on Titania. *Science*. 306, 252–255, (2004).
2. M. Valden, X. Lai and D. Goodman: Onset of Catalytic Activity of Gold Clusters on Titania with the Appearance of Nonmetallic Properties. *Science*. 281, 1647–1650, (1998).
3. X. Green, W. Tang, M. Neurock and J. Yates: Spectroscopic Observation of Dual Catalytic Sites During Oxidation of CO on a Au/TiO<sub>2</sub> Catalyst. *Science*, 333, 736–739, (2011).
4. C. Shaw : Gold-based therapeutic agents. *Chem. Rev.* 99, 2589–2600, (1999).
5. S. Dufort, L. Sancey, J.-L. Coll, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 179–89, (2012).
6. S. Parveen, R. Misra, S. K. Sahoo, *Nanomedicine* 8, 147–66, (2012).
7. E. Dreaden, M. Mackey, X. Huang, B. Kang and M. El-Sayed: Beating cancer in multiple ways using nanogold. *Chem. Soc. Rev.* 40, 3391–3404, (2011).
8. A. Grande : Nanotecnología y nanopartículas magnéticas: La física actual en lucha contra la enfermedad. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (Esp)* 101, N<sup>o</sup>. 2, 321-327, (2007).
9. E. Dreaden, A. Alkilany, X. Huang, J. Murphy and M. El-Sayed : The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem. Soc. Rev.* 41, 2740-2779, (2012).
10. M. Kogan, I. Olmedo, L. Hosta, A. Guerrero, L. Cruz & F. Albericio. Peptides and metallic nanoparticles for biomedical applications. *Nanomed* 2, 287–306, (2007).
11. Z. Zhan *J. Phys. Chem. Lett.* 1, 686-695, (2010)
12. E. Araya y cols. “Gold Nanoparticles and Microwave Irradiation Inhibit Beta-Amyloid Amyloidogenesis”, *Nanoscale research letters* 3-11, (2008).



13. Guerrero, E., et al., Gold nanoparticles for photothermally-controlled drug release. *Nanomedicine (Lond)*, (2014).
14. A. K. Iyer, G. Khaled, J. Fang & H. Maeda, Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov. Today* 11, 812–818, (2006).
15. D. Peer et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. Nanotechnol.* 2, 751–760, (2007).
16. J. Sudimack & R. Lee Targeted drug delivery via the folate receptor. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 41, 147–162, (2000).
17. J. Qiao, X. Mu, L. Qi, J. Deng & L. Mao Folic acid-functionalized fluorescent gold nanoclusters with polymers as linkers for cancer cell imaging. *Chem. Commun.* 49, 8030–8032, (2013).
18. A. B. S. Bakhtiari, D. Hsiao, G. Jin, B. D. Gates & N. R. Branda An efficient method based on the photothermal effect for the release of molecules from metal nanoparticles surfaces. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 48, 4166–4169, (2009).
19. M. C. Daniel, D. Astruc Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem Rev.* 104(1):293–346, (2004).
20. M. Faraday, Experimental Relations of Gold (and other Metals) to Light. *Philos trans R Soc London*, 147, 145 – 181, (1857).
21. N. Jana, L. Gearheart, C. Murphy Wet Chemical Synthesis of High Aspect Ratio Cylindrical Gold Nanorods. *Phys Chem B.* 105 (19): 4065-4067, (2001).
22. N. Jana, L. Gearheart, C. Murphy Seed-Mediated Growth Approach for Shape-Controlled Synthesis of Spheroidal and Rod-like Gold Nanoparticles Using a Surfactant Template. *Adv Mater*, 13 (18): 1389-1392, (2000).

23. B. Nikoobakht , M. El-Sayed Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method. *Chem Mater*, 15 (10): 195-1962, (2003).
24. N. McQueen Factors that Affect the Synthesis of Gold Nanorods. En: NNIN REU Research Accomplishments. pp 32-34,(2007).
25. C. Burda , X. Chen , R. Narayanan , M. El-Sayed Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. *Chem Rev*,105 (4): 1025-1102, (2005).
26. C. Johnson , E. Dujardin , S. Davis , C. Murphy , S. Mann Growth and form of gold nanorods prepared by seed-mediated, surfactant-directed synthesis. *J Mater Chem*, 12: 1765-1770, (2002).
27. X. Huang , S. Neretina , M. El-Sayed Gold Nanorods: From Synthesis and Properties to Biological and Biomedical Applications. *Adv. Mater*, 21(48), 4880–4910, (2009).
28. C. Orendorff, C. Murphy Quantitation of Metal Content in the Silver-Assisted Growth of Gold Nanorods. *J Phys Chem*, 110 (9): 3990-3994, (2006).
29. A. Shipway , M. Lahav , R. Gabai , L. Willner :Investigations into the electrostatically induced aggregation of Au nanoparticles. *Langmuir*. 16, 8789-8795, (2000).
30. M. Sartor : Dynamic light scattering to determine the radius of small beads in Brownian motion in a solution. University of California San Diego. 1-21, (2003).
31. D. Skoog , F. Holler , T. Nieman .:High-performance liquid chromatography. Crawfordsville : Thomson Learning. Principles of instrumental analysis. 725–767, (1998).
32. Aroca RF. The interaction of light with nanoscopic metal particles and molecules 'n smooth reflecting surfaces. En: Surface-enhanced vibrational spectroscopy. Chichester, Inglaterra.; p. 35–71, (2006).

33. Z. Stirn, A. Rucigaj, M. Krajnc. Characterization and kinetic study of Diels-Alder reaction: Detailed study on N-phenylmaleimide and furan based benzoxazine with potential self-healing application. *Express Polymer Letters*, 10(7), 537–547, (2016).
34. Medina ED. Obtención de nanopartículas metálicas como posible estrategia terapéutica para la enfermedad de Alzheimer [Memoria para optar al título de Químico-Farmacéutico]. Universidad de Chile. Santiago, Chile; Mayo, (2006).
35. R. Zsigmondy *Colloids and the Ultramicroscope*. 1<sup>a</sup> ed. New York: John Wiley & Sons, Ltd., (1914).
36. A. B. S. Bakhtiari, D. Hsiao, G. Jin, B. D. Gates, N. R. Branda, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 48, 4166–9, (2009).