



Universidad de Panamá

Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología

Escuela de Química

**Proyecto de tesis titulado “Evaluación de la Encapsulación Supramolecular del
Fármaco Antichagásico Nifurtimox en Cucurbit[7]urilo y Cucurbit[8]urilo” para
optar por el título de Licenciado en Química.**

Director de tesis:

Dr. José Luis Robinson Duggon

Codirector de tesis:

Dr. Mario Luis Miranda Montenegro

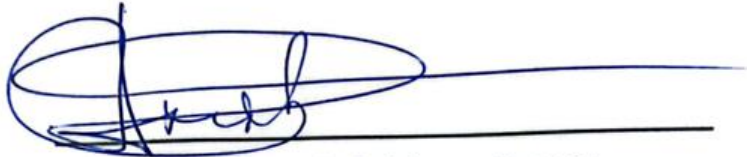
Elaborado por:

Jean Carlos Araúz Miranda

8-975-1990

Panamá, Abril 2024

Aprobado por:

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized initial 'J' followed by 'Luis Robinson-Duggon', written over a horizontal line.

Dr. José Luis Robinson-Duggon

A handwritten signature in blue ink, 'Mario Luis Miranda', written over a horizontal line.

Dr. Mario Luis Miranda Montenegro

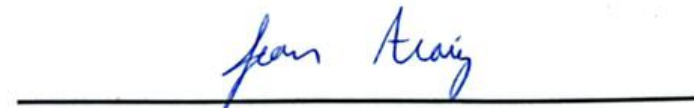
A handwritten signature in blue ink, 'Carlos Hernan Ríos Martínez', written over a horizontal line.

Dr. Carlos Hernan Ríos Martínez

A handwritten signature in blue ink, 'Marcos H. Salazar', written over a horizontal line.

Dr. Marcos H. Salazar

Realizado por

A handwritten signature in blue ink, 'Jean Carlos Araúz', written over a horizontal line.

Jean Carlos Araúz Miranda

Dedicatoria

El tiempo, el esfuerzo y la dedicación de este proyecto son el reflejo del apoyo, cariño y confianza que me brindan mis padres, que son los pilares más importantes y por lo tanto les dedico el trabajo a ellos.

Agradecimientos

A la Universidad de Panamá por ser la entidad encargada de formar a los profesionales.

Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT) por financiar el proyecto y la carrera.

Sistema Nacional de Investigación (SNI) por financiar el proyecto.

Departamento de Bioquímica donde se realizaron los experimentos.

Laboratorio de Bioorgánica Tropical por el trabajo en conjunto.

Departamento de Química Analítica por el trabajo en conjunto.

Laboratorio de la calidad del agua y el aire (LACAYA) por el trabajo en conjunto.

Ph.D Nory Mariño-Ocampo del Departamento de Química Biológica de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Dr. Daniel Guerra-Díaz de la Universidad Tecnológica Metropolitana Santiago, Chile.

El Centro de Investigación e Información de Medicamentos y Tóxicos (CIIMET) por el trabajo en conjunto.

OriginLab por tener una versión gratuita para estudiantes de su Software.

ACD/Labs por la versión de prueba de su software Spectrus Processor.

A supramolecular.org por su calculadora de constantes de asociación.

Índice de contenido

Capítulo 1: Introducción.....	13
1.1. Hipótesis.....	18
1.2. Objetivos.....	18
1.2.1. Generales.....	18
1.2.2. Específicos.....	18
1.3. Justificación.....	19
Capítulo 2: Metodología.....	20
2.1 Preparación de disolución de Hexafluorofosfato de bis(ciclopentadienil)cobalto(III) (Cob ⁺).20	
2.2. Titulación Espectrofotométrica de Cucurbit[7]urilo (CB[7]).	21
2.3. Titulación Espectrofotométrica de Cucurbit[8]urilo (CB[8]).	21
2.4 Preparación de buffer de fosfato.....	22
2.5 Preparación de disolución de Albúmina Sérica Humana (HSA).	22
2.6 Preparación de disolución de Benznidazol (BNZ).	23
2.7 Preparación de disolución de Azul de Metileno (MB).	23
2.8 Preparación de disolución de Nifurtimox (NFX) en dimetilsulfóxido (DMSO).....	23
2.8.1 Mediciones de NFX por Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis).....	24
2.8.2 Efecto solvatocrómico de NFX en diferentes disolventes orgánicos.	24
2.8.3 Evaluación Espectroscópica de NFX encapsulado en CB[7] y CB[8].	25
2.8.4 Evaluación por Espectrometría de Masas de NFX encapsulado en CB[7] y CB[8].	25

2.9	Preparación de disolución de NFX en agua.	26
2.9.1	Evaluación Espectroscópica de NFX encapsulado en CB[7] y CB[8].	26
2.9.2	Evaluación por Espectrometría de Masas de NFX encapsulado en CB[7] (NFX@CB[7]) y NFX encapsulado en CB[8] (NFX@CB[8]).	26
2.9.3	Estudios de fotodegradación NFX con respecto a NFX@CB[7] y NFX@CB[8].	27
2.10	Preparación de disolución de NFX en acetonitrilo (ACN).	28
2.10.1	Estudios de interacciones entre NFX y NFX@CB[n] (n = 7, 8) con la HSA {HSA:NFX y HSA:NFX@CB[n] (n = 7, 8)} por Espectroscopia de Fluorescencia.	28
2.10.2	Estudios de fotoproductos generados en la irradiación de NFX por Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC).	29
2.10.3	Ensayo del Desplazamiento Competitivo (GDA).	29
2.11	Estudios de Acoplamiento Molecular Inducido (Docking).	31
Capítulo 3: Resultados y discusión.		33
3.1	Titulación Espectrofotométrica de CB[7] y CB[8].	33
3.2	Disolución de NFX en DMSO.	35
3.2.1	Mediciones de NFX por Espectroscopia UV-Vis.	35
3.2.2	Efecto solvato crómico de NFX en disolventes de diferentes polaridades.	36
3.2.3	Evaluación Espectroscópica de NFX encapsulado en CB[7] y CB[8].	38
3.2.4	Evaluación por Espectrometría de Masas de NFX@CB[7] y NFX@CB[8].	39
3.3	Disolución de NFX en Agua	47
3.3.1	Evaluación Espectroscópica de NFX encapsulado en CB[7] y CB[8]	47

3.3.2	Evaluación por Espectrometría de NFX encapsulado en CB[7] y CB[8].....	48
3.3.3	Estudios de fotodegradación de NFX con respecto a NFX@CB[7] Y NFX@CB[8]. .	54
3.4	Disolución de NFX en Acetonitrilo (ACN).	59
3.4.1	Estudios de interacciones entre NFX@CB[n] (n = 7, 8) y HSA. Sistema Ternario HSA:NFX@CB[n] (n = 7, 8) y Binario HSA:NFX.	59
3.4.2	Estudios de fotoproductos generados en la irradiación de NFX por HPLC.	64
3.4.3	Ensayo de desplazamiento competitivo.	71
3.5	Estudios de acoplamiento molecular de NFX con CB[n] (n = 7, 8).	77
	Conclusión.....	83
	Recomendaciones	84
	Referencias	85
	Anexos	94
	Apéndice A: Abreviaciones	94
	Apéndice B: Espectros de masas de la sección 4.1.4.....	95

Índice de Figuras

Figura 1.1 Ciclo vital de T. Cruzi. (modificado de Bern, C., 2015).....	14
Figura 1.2 (A) Descripción clásica del mecanismo de bioactivación de Nifurtimox y (B) mecanismo alternativo de bioactivación de Nifurtimox descrito recientemente (C) Resultados de Hall et al (Hall, B. S.,2011).	15
Figura 1.3 Principales ramas de la química del Cucurbit[n]urilo (Yao, Y. Q., Chen, K., Hua, Z. Y., 2017)	16
Figura 1.4 Interacciones propuestas en sistemas CB[6]-THF-A+(Yao, Y. Q., Chen, K., Hua, Z. Y., 2017).	16
Figura 3.1 Espectro UV-Vis de NFX a diferentes concentraciones.	35
Figura 3.2 Estructura molecular de NFX.	36
Figura 3.3 A) NFX en agua B) NFX en acetonitrilo C) NFX en metanol D) NFX en etanol E) NFX en acetona F) NFX en n-hexano.	37
Figura 3.4 Complejo NFX@CB[7] y NFX@CB[8] por Espectroscopia UV-Vis.	39
Figura 3.5 Espectro UV-Vis de NFX@CB[7] y NFX@CB[8] usando disolución de NFX en agua.....	48
Figura 3.6 Estudios de fotodegradación de NFX, NFX@CB[7] y NFX@CB[8] con luz UV-A a 100 Lux (A, B, C).	55
Figura 3.7 Estudios de fotodegradación de NFX, NFX@CB[7] y NFX@CB[8] con luz blanca (A, B, C) y luz azul (D, E, F).....	57
Figura 3.8 Apagamiento de la fluorescencia de HSA por NFX(A) y NFX@CB[n], n = 7(B), 8(C).....	62
Figura 3.9 Cromatogramas de NFX monitoreado a 400 (A.1), 399 (B.1), 277 (C.1) y 274 nm (D.1) y NFX irradiado con luz UV-A monitoreado a 400 (A.2), 399 (B.2), 277 (C.2) y 274 nm (D.2).	66
Figura 3.10 Cromatogramas de NFX monitoreado a 400 (A.1), 393 (B.1), 319 (C.1) y 231 nm (D.1) y NFX irradiado con luz azul monitoreado a 400 (A.2), 393 (B.2), 319 (C.2) y 231 nm (D.2).	68
Figura 3.11 A) Energías de enlace aproximadas de NFX (Huheey, pps., 1958) B) Longitudes de onda que son usadas en la irradiación con luz blanca, azul y UV-A, C) NFX@CB[n] (n = 7, 8) bajo irradiación con luz blanca, azul y UV-A.	69
Figura 3.12 Ensayo de desplazamiento competitivo de BNZ frente a NFX@CB[n], n = 7(A), 8(B).	72
Figura 3.13 Ensayo de desplazamiento competitivo de MB frente a NFX@CB[n], n = 7(A), 8(B).	74
Figura 3.14 20 conformaciones posibles para NFX@CB[n] n = 7(A), 8(B).	78

Figura 3.15 Histogramas de las 20 conformaciones posibles para NFX@CB[n], n = 7(Arriba), 8(Abajo).	79
Figura 3.16 Diferentes grupos obtenidos en el histograma [grupo 1(G1) mayor afinidad, menor energía; grupo 9(G9) menor afinidad, mayor energía] para NFX@CB[7].	80
Figura 3.17 Diferentes grupos obtenidos en el histograma [grupo 1(G1) mayor afinidad, menor energía; grupo 9(G9) menor afinidad, mayor energía].	81
Figura 3.18 Conformación más estable para NFX@CB[n], n = 7(A), 8(B).	82

Índice de Gráficas

Gráfica 3.1 Titulación de Cucurbit[7]urilo.	33
Gráfica 3.2 Titulación de Cucurbit[8]urilo.	34
Gráfica 3.3 Estudios de fotodegradación de NFX, NFX@CB[7] y NFX@CB[8] usando luz blanca.	58
Gráfica 3.4 Estudios de fotodegradación de NFX, NFX@CB[7] y NFX@CB[8] usando luz azul.	59
Gráfica 3.5 Apagamiento de la fluorescencia de HSA por NFX y NFX@CB[n] (n = 7, 8). ...	64

Índice de Cuadros

Cuadro 3.1 Comportamiento solvatochrómico de NFX en diferentes solventes orgánicos.	37
Cuadro 3.2 Complejo NFX@CB[7] Y NFX@CB[8] por espectroscopía UV-Vis.....	38
Cuadro 3.3 Cuadro comparativo de señales del blanco, NFX y CB[7] con respecto a NFX@CB[7].	44
Cuadro 3.4 Señales más características en el espectro MS/MS de NFX@CB[7].	45
Cuadro 3.5 Máximos de absorción de NFX@CB[7] Y NFX @CB[8] usando disolución de NFX en agua.	48
Cuadro 3.6 Ecuaciones y coeficiente de correlación polinomial (r^2) del apagamiento de la fluorescencia de HSA por NFX y NFX@CB[n] (n = 7, 8).	63
Cuadro 3.7 Constantes de asociación de BNZ frente a NFX@CB[n] (n = 7, 8).	73
Cuadro 3.8 Constantes de asociación de MB frente a NFX@CB[n] (n = 7, 8).	75
Cuadro 3.9 comparación de las constantes de asociación de BNZ, NFX y MB con CB[7] y CB[8].	75

Índice de Tablas

Tabla 3.1 Datos de la titulación de Cucurbit[7]urilo	33
Tabla 3.2 Datos de la titulación de Cucurbit[8]urilo.	34
Tabla 3.3 Datos de fluorescencia de HSA:NFX, HSA:NFX@CB[n] (n= 7, 8).	60
Tabla 3.4 Tabla de datos de afinidad y RMSD para 20 conformaciones de NFX@CB[n] n=7 (Izquierda), 8(Derecha).	77

Índice de espectros

Espectro 3.1 Espectro de masas de CB[7].	40
Espectro 3.2 Espectro de masas de CB[8].	41
Espectro 3.3 Espectro de masas de NFX con interferencia.	42
Espectro 3.4 Espectro de NFX@CB[7] con DMSO como posible interferencia.	43
Espectro 3.5 Espectro de masas del DMSO.	46
Espectro 3.6 Espectro de masas de DMSO@CB[7].	47
Espectro 3.7 Espectro de masas de NFX (Disolución en agua).	49
Espectro 3.8 Espectro de masas MS/MS de NFX.	50
Espectro 3.9 Espectro de masas de NFX@CB[7] (Stock en agua).	51
Espectro 3.10 Espectro de masas MS/MS de m/z 737.	52
Espectro 3.11 Espectro de masas de NFX@CB[8].	53
Espectro 3.12 Espectro de masas MS/MS de m/z 847.	54
Espectro 0.1 Espectro de masas (MS/MS) de m/z 660.	95
Espectro 0.2 Espectro de masas (MS/MS) de m/z 632.	96
Espectro 0.3 Espectro de masas MS/MS de m/z 630.	96
Espectro 0.4 Espectro de masas (MS/MS) de m/z 599.	97
Espectro 0.5 Espectro de masas MS/MS de m/z 1203.	97
Espectro 0.6 Espectro de masas (MS/MS) de m/z 1241.	98
Espectro 0.7 Espectro de masas del agua	98

RESUMEN

Este estudio está enfocado en evaluar el complejo de inclusión del medicamento conocido como Nifurtimox con el macrociclo Cucurbit[7]urilo y Cucurbit[8]urilo. Se realizaron estudios por Espectroscopia Ultravioleta-Visible (UV-Vis) y Espectrometría de Masas (MS). Con el ensayo del desplazamiento competitivo se obtuvo las constantes de asociación de Nifurtimox con Cucurbit[7]urilo y Cucurbit[8]urilo haciendo uso de azul de metileno como molécula competitiva por su elevada constante de asociación. Con estos datos se plantea un aumento de la solubilidad del Nifurtimox en agua gracias a la formación de un complejo de inclusión con Cucurbit[7]urilo y Cucurbit[8]urilo. Además presentamos estudios de acoplamiento molecular inducido que corroboran la viabilidad de la formación del complejo de inclusión entre Nifurtimox con Cucurbit[7]urilo y con Cucurbit[8]urilo que aunados a los resultados experimentales justifican seguir trabajando en esta línea de investigación. Se puso a prueba los beneficios que otorga el encapsulamiento supramolecular de Nifurtimox en Cucurbit[7]urilo y Cucurbit[8]urilo irradiándolos con luz blanca, azul y UV-A, donde los fotoproductos generados producto de la irradiación disminuyen en presencia de Cucurbit[7]urilo y Cucurbit[8]urilo, de esta manera, la encapsulación de Nifurtimox podría prolongar su vida útil en el tiempo.

Capítulo 1: Introducción.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce la Tripanosomiasis Americana, o Enfermedad de Chagas, como una de las 17 enfermedades tropicales desatendidas, que han persistido en las sociedades más pobres y marginadas (Kowalska, A et al., 2011). La mayoría de las infecciones se encuentran en América Latina, donde la enfermedad representa un problema importante con respecto a la morbilidad y mortalidad de la población general, y se ha convertido en una carga que agota los recursos económicos de la región y afecta el entorno social y laboral de quienes la padecen (Haberland, A et al., 2013). La migración internacional ha provocado la afluencia de sujetos infectados desde América Latina al resto del mundo, convirtiendo así la enfermedad en un problema para los sistemas de salud a escala global (Manne, J. M et al., 2013; Álvarez-Hernández, D. A et al.,2018). En este contexto, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) impulsó diferentes iniciativas para implementar y desarrollar medidas para controlar la transmisión de la Enfermedad de Chagas por vector, por transfusión y de madre a feto, dependiendo de las características epidemiológicas de cada región (Merino, F. J et al.,2013). El ciclo vital de *T. cruzi* comienza cuando el vector triatomino ingiere tripomastigotes circulantes en una comida de sangre de un hospedador mamífero infectado (**Figura 1.1**) (Bern, C., 2015).

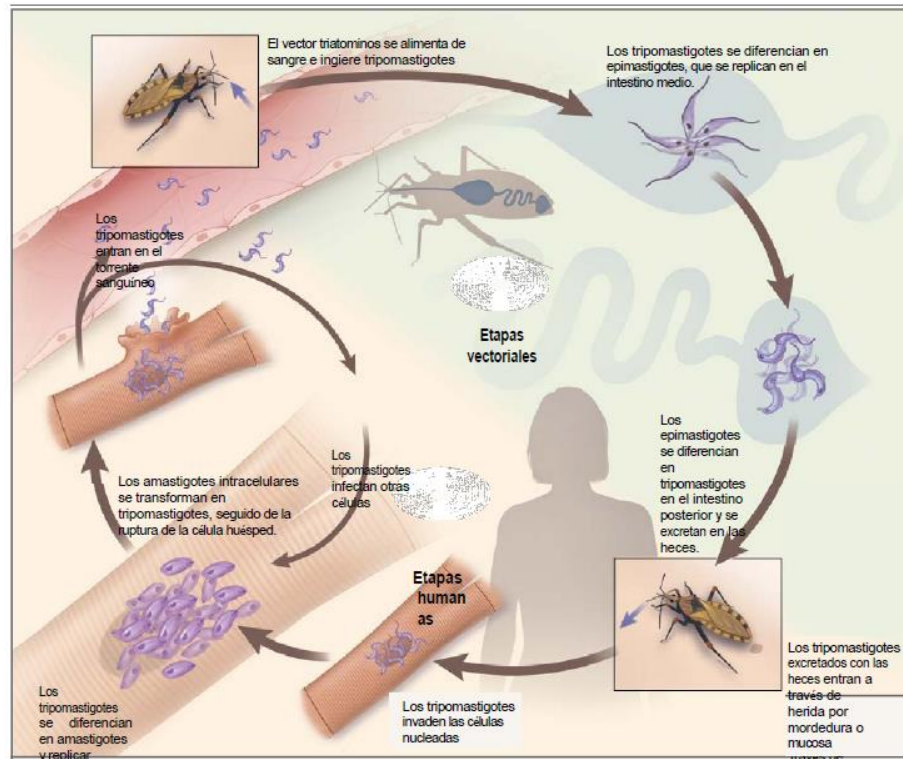


Figura 1.1 Ciclo vital de *T. Cruzi*. (modificado de Bern, C., 2015)

Actualmente, existen dos fármacos antitripanocidas disponibles que se utilizan para tratar la infección por *T. cruzi*: Benznidazol y Nifurtimox. Ambos tienen una actividad tripanocida muy alta durante la fase aguda de la enfermedad: hasta el 100% en recién nacidos y hasta el 80-90% en niños y adultos identificados y tratados oportunamente. Sin embargo, tienen una actividad tripanocida muy baja durante la fase crónica de la enfermedad (Ventura-Garcia, L et al., 2013; Manne, J. M et al., 2013). El Benznidazol es un tripanocida derivado del nitroimidazol que se absorbe rápidamente en el tracto gastro intestinal y actúa mediante modificación covalente de macromoléculas por nitroreducción de intermediarios. Durante las 2 primeras semanas de tratamiento se producen erupciones cutáneas debidas a la fotosensibilización (Carabarin Lima, A et

al.,2011). Nifurtimox es un compuesto nitrofurano que se absorbe adecuadamente en el tracto gastrointestinal y actúa mediante la reducción del grupo nitroso para formar radicales inestables como el nitroanión, que es altamente reactivo y produce metabolitos de O_2 reducidos altamente tóxicos (**Figura 1.2**) (Hall, B. S.,2011). Inhibe la síntesis de ácido pirúvico e interrumpe el metabolismo de los carbohidratos de *T. cruzi* (Paço, J., & Vilhena de Mendonça, F., 2011).

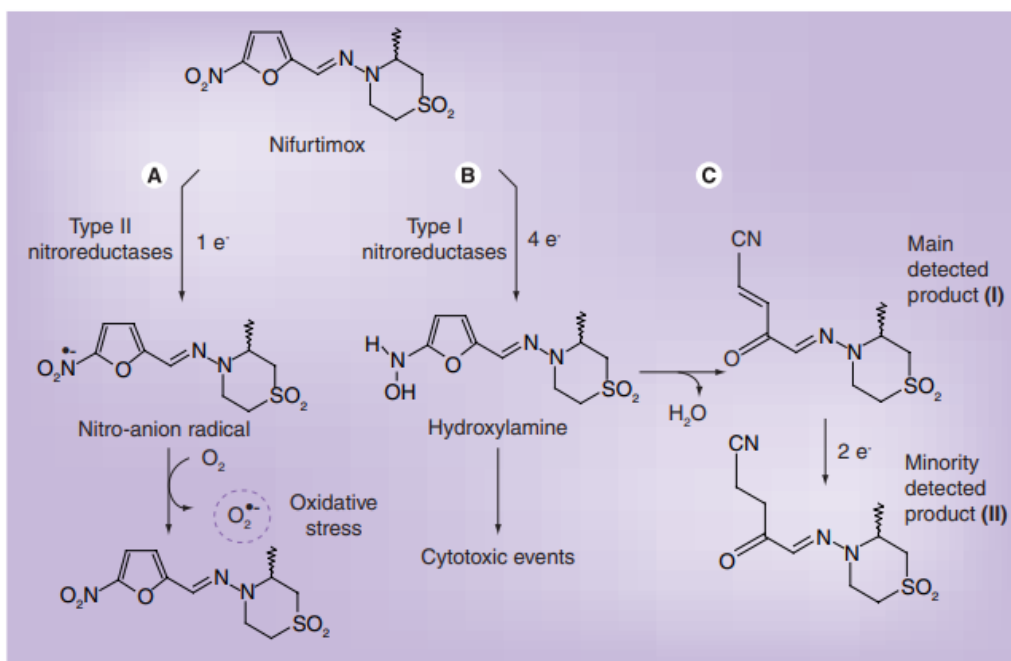


Figura 1.2 (A) Descripción clásica del mecanismo de bioactivación de Nifurtimox y (B) mecanismo alternativo de bioactivación de Nifurtimox descrito recientemente (C) Resultados de Hall et al (Hall, B. S.,2011).

Las características estructurales de los Cucurbit[n]urilos (CB[n]) es decir, sus cavidades hidrofóbicas rígidas, dos portales idénticos bordeados de carbonilo y sus características de potencial electrostático de regiones cargadas negativamente alrededor de los grupos carbonilo del portal pueden coordinar varios iones metálicos y formar los correspondientes complejos de coordinación, dando lugar a la química de coordinación basada en CB[n] (**Figura 1.3**) (Yao, Y. Q., Chen, K., Hua, Z. Y., 2017).

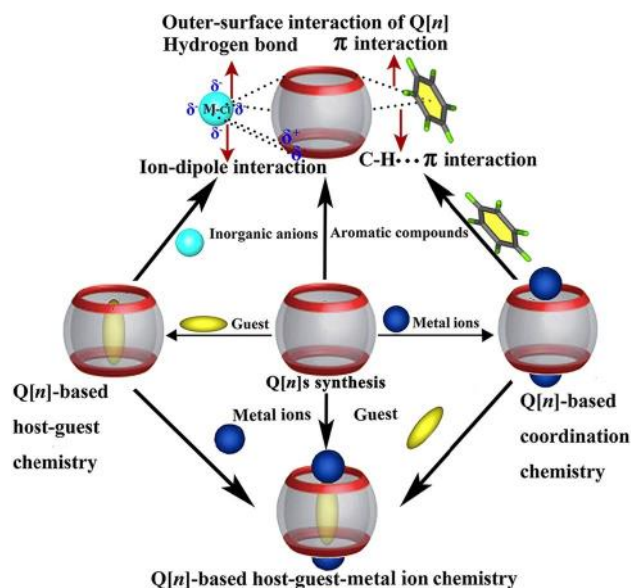


Figura 1.3 Principales ramas de la química del Cucurbit[n]urilo (Yao, Y. Q., Chen, K., Hua, Z. Y., 2017)

Los CB[n] son utilizados para la liberación controlada de fármacos, similar al caso de Cucurbit[6]urilo (CB[6]) y tetrahidrofurano (THF) que pueden asociarse y disociarse controlando la concentración de iones Na^+ en los portales de la molécula huésped simplemente ajustando el pH (**Figura 1.4**) (Yao, Y. Q., Chen, K., Hua, Z. Y., 2017).

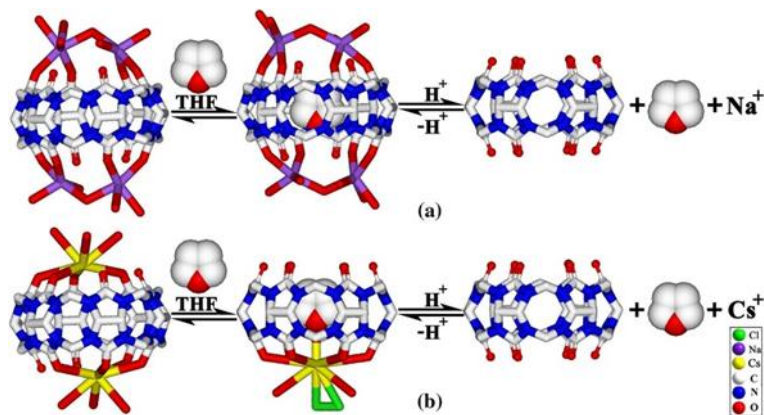


Figura 1.4 Interacciones propuestas en sistemas CB[6]-THF-A⁺ (Yao, Y. Q., Chen, K., Hua, Z. Y., 2017).

Uno de los beneficios que obtienen los fármacos encapsulados en CB[7], es que presentan una mayor estabilidad química y térmica gracias a la cavidad protectora que ofrece el CB[7] a los huéspedes incluidos (Dong, N., 2010). Muchas moléculas de fármacos y principios activos son poco solubles en medios acuosos, lo que a menudo limita su eficacia en aplicaciones biomédicas **como es el caso de Nifurtimox**. El CB[7] se ha estudiado recientemente por su capacidad para solubilizar compuestos hidrófobos en medios acuosos (Liu, Q., 2015). La biotransferencia eficaz es esencial para que las moléculas de cualquier fármaco ejerzan sus efectos terapéuticos. Al mejorar la estabilidad y solubilidad de un fármaco tras su acomplejación en CB[7], el fármaco acomplejado también puede atravesar las membranas celulares u otras barreras biológicas de forma más eficaz, lo que se traduce en una mayor biotransferencia (Hettiarachchi, G., 2010; Miao, X., 2015; Gomez-Roman, N., 2015; Ma, W. J., 2013)(Plumb, J. A., 2012). Tras la encapsulación del CB[7], las moléculas de fármaco suelen estabilizarse en condiciones fisiológicas antes de alcanzar su lugar de destino, minimizando así los efectos no deseados causados por interacciones en lugares que no son objetivos terapéuticos (Kuok, K. I., 2017). Estudios *in vitro* previos han demostrado que el CB[7] no causó una disminución excesiva de la viabilidad celular en diversas líneas celulares cuando se expusieron a este macrociclo en concentraciones inferiores a 500 μM (Kuok, K. I., 2017). Utilizando los beneficios otorgados por la química supramolecular del Cucurbit[n]urilo se puede conseguir que la solubilidad y la estabilidad de Nifurtimox en medio acuoso mejore y así mejorar sus efectos terapéuticos.

1.1. Hipótesis.

La encapsulación supramolecular del Nifurtimox en el Cucurbit[7]urilo y Cucurbit[8]urilo modificaran las propiedades fotofísicas y acuosas, permitiendo mejorar su solubilidad y con esto potenciar la actividad terapéutica del fármaco.

1.2. Objetivos.

1.2.1. Generales.

Evaluar el efecto de la encapsulación supramolecular del Nifurtimox en Cucurbit[7]urilo y Cucurbit[8]urilo.

1.2.2. Específicos.

1. Caracterizar fotofísicamente el Nifurtimox y sus respectivos complejos de inclusión con el Cucurbit[7]urilo y Cucurbit[8]urilo.
2. Determinar las constantes de asociación del Nifurtimox con el Cucurbit[7]urilo y Cucurbit[8]urilo.
3. Observar el efecto de la encapsulación supramolecular del Nifurtimox en el Cucurbit[7]urilo y Cucurbit[8]urilo en sus propiedades acuosas.
4. Determinar la estructura de los complejos de inclusión del Nifurtimox con el Cucurbit[7]urilo y Cucurbit[8]urilo por estudios de Acoplamiento Molecular.
5. Observar el efecto de la encapsulación supramolecular del Nifurtimox en el Cucurbit[7]urilo y Cucurbit[8]urilo en la fotoestabilidad.

1.3. Justificación.

El Nifurtimox (NFX) es un derivado del nitrofurano que se usa para tratar la enfermedad de Chagas, una enfermedad desatendida causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*. El fármaco es muy poco soluble en medios acuosos, estudios de la encapsulación supramolecular de Nifurtimox con β -ciclodextrinas sugieren un aumento en la solubilidad en agua (Moroni, A., 2023) y estudios recientes de la encapsulación supramolecular de Benznidazol con Cucurbit[7]urilo y Cucurbit[8]urilo sugieren un aumento en la solubilidad en agua (Dominguez G., Robinson J., 2023). Este estudio busca evaluar si las propiedades fisicoquímicas del fármaco mejoran cuando se acompleja con Cucurbit[7]urilo y Cucurbit[8]urilo, de esta manera NFX podría tener una mejor bioadsorción que se traduce a una dosis menor pero con los mismos resultados tripanocidas y con menores efectos secundarios como la anorexia, problemas gastrointestinales, mialgia, anomalías neurológicas, insomnio, temblores entre otros (Paço, J., & Vilhena de Mendonça, F., 2011). Con los resultados de esta investigación se pretende establecer las bases que justifiquen las siguientes etapas del proyecto de investigación, lo que permitiría a largo plazo incluir una nueva línea de ataque contra la enfermedad sin necesidad de hacer la síntesis de un nuevo fármaco, es decir potenciar sus efectos positivos y minimizar los efectos negativos.

Capítulo 2: Metodología.

Todos los insumos y reactivos utilizados: (Nifurtimox \geq 98% HPLC; SIGMA-ALDRICH), (Agua LC-MS; SIGMA-ALDRICH), (Metanol; ACS/MERCK), (Metanol; LC-MS/MERCK), (Dimetilsulfoxido; ACS/Tedia), (n-Hexano; 95% / Tedia), (Etanol; ACS / MERCK); (Acetonitrilo; LC-MS/ MERCK), (Acetona; LC-MS/ MERCK), (Cucurbit[7]urilo; 99% / SIGMA-ALDRICH), (Cucurbit[8]urilo; 99% / SIGMA-ALDRICH), (Hexafluorofosfato de bis(ciclopentadienil)cobalto(III); 98%/ SIGMA-ALDRICH), (Azul de metileno 98% ; SIGMA-ALDRICH), ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 98%/ SIGMA-ALDRICH), ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; ACS98%/SIGMA-ALDRICH), (Benznidazol; 97%/SIGMA-ALDRICH), (HSA; \geq 99%/SIGMA-ALDRICH), (Azul de metileno; 98% / SIGMA-ALDRICH) (Filtro circular de membrana; 0.22 μm , 47 mm (hidrofílica) MF-Milipore), (Ácido trifluoroacético; 95% / Tedia), (Viales de masas; PTFE/ Φ 13 mm/0.22 μm), (Eppendorf; 1.5 mL). Todos los insumos y reactivos fueron usados en su estado de origen y no se le realizó ningún tipo de tratamiento o procedimiento previo a su uso.

2.1 Preparación de disolución de Hexafluorofosfato de bis(ciclopentadienil)cobalto(III) (Cob^+).

En un vial ámbar de 5 mL pesar 0.0036 g de Cob^+ usando una balanza analítica, disolver en 4 mL de agua y sónicar 3 veces para obtener una concentración de 2.0 mM. Los cálculos se realizaron usando la Ecuación 2.1. La concentración de Cob^+ en

disolución se determinó con precisión utilizando su coeficiente de absorptividad molar $34200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 261 nm obtenido de Yi & Kaifer (Yi, S., & Kaifer, A. E., 2011).

Ecuación 2.1

$g = P.M \times V \times []$ donde: g es gramos, P.M es peso molecular, V es volumen y [] es concentración.

2.2. Titulación Espectrofotométrica de Cucurbit[7]urilo (CB[7]).

En un vial ámbar de 5 mL pesar 0.0045 g de CB[7] usando una balanza analítica. Disolver en 3 mL de agua y dejar agitando la disolución durante 1 día aproximadamente. Sonicar la solución durante 1 minuto y repetir 2 o 3 veces. Preparar solución de Cob^+ a partir de la disolución preparada en la **sección 2.1** y ajustar espectrofotométricamente a 0.60 de absorbancia a 261 nm. Tomar la absorbancia en adiciones de 0, 8, 16 hasta llegar a 120 μL de CB[7]. La metodología se adaptó de Yi & Kaifer (Yi, S., & Kaifer, A. E., 2011).

2.3. Titulación Espectrofotométrica de Cucurbit[8]urilo (CB[8]).

En un vial ámbar de 10 mL pesar 0.0015 g de CB[8] usando una balanza analítica. Disolver en 10 mL de agua y dejar agitando la disolución durante 1 día aproximadamente. Sonicar la disolución durante 1 minuto y repetir 2 o 3 veces. Preparar disolución de Cob^+ a partir de la disolución preparada en la **sección 2.1** y ajustar espectrofotométricamente a 0.15 de absorbancia a 261 nm. Tomar la

absorbancia en adiciones de 0, 30, 60 hasta llegar a 390 μL de CB[8]. La metodología se adaptó según Yi & Kaifer (Yi, S., & Kaifer, A. E., 2011).

2.4 Preparación de buffer de fosfato.

Pesar 1.3799 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 2.6807 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, disolver por separado usando dos matraces aforados de 100 mL, sonicar y luego aforar. Ambas disoluciones están a 100 mM, tomar alícuota 12,3 mL de la disolución $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y alícuota de 7.7 mL de la disolución de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; ambas se combinan en un matraz aforado de 200 mL, sonicar y aforar. Medir pH con un potenciómetro y asegurar que esté a pH de 7.4 o si no ajustar con gotas de NaOH 0.1 M. El pKa es de 7.2 y usar la Ecuación 2.1 y Ecuación 2.2 para realizar los cálculos.

Ecuación 2.2

$$pH = pKa + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

2.5 Preparación de disolución de Albúmina Sérica Humana (HSA).

En un eppendorf de 1.5 mL pesar 0.0035 g de HSA usando una balanza analítica. Disolver en 351 μL de agua. Usar un agitador de tubos eléctrico para asegurar la homogenización de la disolución. Esta disolución está a una concentración de 150 μM (usar Ecuación 2.1) y se conserva en la nevera a 8°C.

2.6 Preparación de disolución de Benznidazol (BNZ).

En un vial ámbar de 5 mL pesar 0.0010 g de BNZ usando una balanza analítica, disolver en 4 mL de agua grado LC-MS y sonicar 3 veces para obtener una concentración de 3.8 mM (usar Ecuación 2.1). La concentración de BNZ en solución se ajustó con precisión utilizando su coeficiente de absorptividad molar (ϵ) de 14920 L mol⁻¹cm⁻¹ a 324 nm obtenido de Petravicius *et al* (Petravicius, P. O *et al.*, 2019).

2.7 Preparación de disolución de Azul de Metileno (MB).

En un vial ámbar de 5 mL pesar 0.0010 g de MB usando una balanza analítica, disolver en 3 mL de metanol y sonicar 3 veces para obtener una concentración de 3.0 mM (usar Ecuación 2.1). La concentración de MB en disolución se ajustó con precisión utilizando su coeficiente de absorptividad molar (ϵ) de 84300 L mol⁻¹ cm⁻¹ a 664 nm obtenido de Ozdemir (Ozdemir, F. A., 2009).

2.8 Preparación de disolución de Nifurtimox (NFX) en dimetilsulfóxido (DMSO).

En un vial ámbar de 5 mL pesar 0.0010 g de NFX usando una balanza analítica, disolver en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) y sonicar 3 veces para obtener una concentración de 3.5 mM (usar Ecuación 2.1). El disolvente que es recomendado por el fabricante para trabajar NFX debido a que presenta una buena solubilidad en DMSO: ≥ 13 mg/mL según Sigma-aldrich empresa proveedora de NFX. Como el DMSO se congela a bajas temperaturas guardar a temperatura de habitación.

2.8.1 Mediciones de NFX por Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis).

A partir de la disolución preparada en la **sección 2.8** preparar disoluciones de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 μM , usando agua como disolvente. Los cálculos se realizaron usando la Ecuación 2.3. El equipo usado es un Cary 60 UV-Vis Spectrophotometer modelo G6860A.

Ecuación 2.3

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Donde:

C_1 , es la concentración de inicio

C_2 , es la concentración final

V_1 , es el volumen de inicio

V_2 , es el volumen final

2.8.2 Efecto solvatocrómico de NFX en diferentes disolventes orgánicos.

A partir de la disolución preparada en la **sección 2.8**, preparar en disolventes de diferentes polaridades. Utilizar la Ecuación 2.3 para los cálculos: NFX 40 μM en acetonitrilo, NFX 40 μM en acetona, NFX 40 μM en n-hexano, NFX 40 μM en metanol y NFX 40 μM en etanol. Usar como blanco el mismo disolvente asignado en cada disolución. El equipo usado es un Cary 60 UV-Vis Spectrophotometer modelo G6860A.

2.8.3 Evaluación Espectroscópica de NFX encapsulado en CB[7] y CB[8].

A partir de la disolución preparada en la **sección 2.8**, preparar las siguientes disoluciones en agua. Utilizar la Ecuación 2.3 para los cálculos: NFX 26 μM , NFX 26 μM en CB[7] 200 μM y NFX 26 μM en CB[8] 110 μM . Además, usar como blanco agua. El equipo usado es un Cary 60 UV-Vis Spectrophotometer modelo G6860A.

2.8.4 Evaluación por Espectrometría de Masas de NFX encapsulado en CB[7] y CB[8].

A partir de la disolución preparada en la **sección 2.8**, preparar las siguientes disoluciones en agua. Utilizar la Ecuación 2.3 para los cálculos: NFX 20 μM ; NFX 20 μM en CB[7] 200 μM y NFX 20 μM en CB[8] 110 μM . Filtrar las disoluciones con filtros de 0.22 μm para jeringas y depositar en viales ámbar para masas de 1.5 mL. El equipo usado es un UPLC ACQUITY Clase H con un detector espectrómetro Waters XEVO TQD. Modo de ionización electrospray (ESI^+), temperatura de la sonda 150°C, voltaje del cono entre 15 y 30 voltios, Voltaje del capilar corona de 3.50kV, flujo de gas de desolvatación 400L/h y flujo de gas del cono 20L/h.

2.8.4.1 Comprobación de la competencia del DMSO por la cavidad del CB[7].

A partir disolución preparada en la **sección 2.8**, preparar las siguientes disoluciones en agua. Utilizar la Ecuación 2.3 para los cálculos: DMSO 0.1%, DMSO 0.1% en CB[7] 200 μM . Filtrar las disoluciones con filtros de 0.22 μm para jeringas y depositar en viales ámbar para masas de 1.5 mL. El equipo usado es un UPLC ACQUITY Clase H

con un detector espectrómetro Waters XEVO TQD. Modo de ionización electrospray (ESI⁺).

2.9 Preparación de disolución de NFX en agua.

En un vial ámbar de 10 mL pesar 0.0010 g de NFX usando una balanza analítica, disolver en 10 mL de agua grado LC-MS y sonicar 3 veces para obtener una concentración de 348 μM (usar Ecuación 2.1). La concentración de NFX en disolución se ajustó con precisión utilizando su coeficiente de absortividad molar ($\epsilon = 15000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) obtenido de Moroni (Moroni, A. B., 2023).

2.9.1 Evaluación Espectroscópica de NFX encapsulado en CB[7] y CB[8].

A partir de la disolución preparada en la **sección 2.9**, preparar las siguientes disoluciones en agua. Utilizar la Ecuación 2.3 para los cálculos: NFX 26 μM , NFX 26 μM en CB[7] 200 μM y NFX 26 μM en CB[8] 110 μM . Además, usar como blanco agua. El equipo usado es un Cary 60 UV-Vis Spectrophotometer modelo G6860A.

2.9.2 Evaluación por Espectrometría de Masas de NFX encapsulado en CB[7] (NFX@CB[7]) y NFX encapsulado en CB[8] (NFX@CB[8]).

A partir de la disolución preparada en la **sección 2.9**, preparar las siguientes disoluciones en agua. Utilizar la Ecuación 2.3 para los cálculos: NFX 26 μM , NFX 50 μM en CB[7] 200 μM y NFX 50 μM en CB[8] 110 μM Filtrar las disoluciones con filtros

de 0.22 μ m para jeringas y depositar en viales ámbar para masas de 1.5 mL. El equipo usado es un UPLC ACQUITY Clase H con un detector espectrómetro Waters XEVO TQD. Modo de ionización electroespray (ESI⁺), temperatura de la sonda 150°C, voltaje del cono entre 15 y 30 voltios, Voltaje del capilar corona de 3.50KV, flujo de gas de desolvatación 400L/h y flujo de gas del cono 20L/h.

2.9.3 Estudios de fotodegradación NFX con respecto a NFX@CB[7] y NFX@CB[8].

2.9.3.1 Luz UV-A.

A partir de la disolución preparada en la **sección 2.9**, preparar las siguientes disoluciones en agua. Utilizar la Ecuación 2.3 para los cálculos: NFX 26 μ M, NFX 26 μ M en CB[7] 200 μ M y NFX 26 μ M en CB[8] 110 μ M. Usar fotoreactor con luz UV-A con iluminancia de 100 Lux para irradiar durante 1 hora, hacer las lecturas de absorbancia antes de la irradiación y después de la irradiación, usar como blanco agua. El equipo usado es un Cary 60 UV-Vis Spectrophotometer modelo G6860A y fotoreactor luzchem LZC-ICH2.

2.9.3.2 Luz Azul y Luz Blanca.

A partir de la disolución preparada en la **sección 2.9**, preparar las siguientes disoluciones en agua. Utilizar la Ecuación 2.3 para los cálculos: NFX 16 μ M, NFX 16 μ M en CB[7] 200 μ M y NFX 16 μ M en CB[8] 110 μ M. Con iluminador LED (Luzchem's

LED-illuminator (LEDi)) a 50 mm de distancia de la celda con corriente de salida de ~0.91 y agitación magnética, irradiar durante 30 minutos y tomar absorbancia a los 0, 5, 10 hasta llegar a 30 minutos. Es el mismo procedimiento para la luz azul y la luz blanca. Graficar los valores obtenidos de absorbancia en absorbancia normalizada vs tiempo de irradiación (Usar Ecuación 2.4.)

Ecuación 2.4

$$A_N = \frac{A_{\text{irradiado}}}{A_{\text{sin irradiar}}}$$

2.10 Preparación de disolución de NFX en acetonitrilo (ACN).

En un vial ámbar de 5 mL pesar 0.0010 g de NFX usando una balanza analítica, disolver en 1 mL de ACN grado LC-MS y sonicar 3 veces para obtener una concentración de 3.5 mM (usar Ecuación 2.1). La concentración de NFX en disolución se determinó con precisión utilizando su coeficiente de absortividad molar.

2.10.1 Estudios de interacciones entre NFX y NFX@CB[n] (n = 7, 8) con la HSA {HSA:NFX y HSA:NFX@CB[n] (n = 7, 8)} por Espectroscopia de Fluorescencia.

Preparar las siguientes disoluciones en buffer de fosfato. Utilizar la Ecuación 2.3 para los cálculos: HSA 5 μM , HSA 5 μM en CB[7] 50 μM y HSA 5 μM en CB[8] 30 μM . A partir de la disolución preparada en la **sección 2.10**, realizar las lecturas a 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 μM de NFX. El equipo es un Fluoromax®-4 de HORIBA, ajustar con los

siguientes parámetros: Excitación en 295 nm, emisión en 295 nm + 10 nm. El barrido es de 0 hasta 500 nm con ranura de emisión de 2 y ranura de excitación de 2. Los datos obtenidos se graficaron F_0/F vs Molaridad, donde F_0 es la fluorescencia del fluoroforo sin el extintor y F es la fluorescencia del fluoroforo con el extintor. El método se ajustó según Chaves *et al* (Chaves, O. A *et al.*, 2018).

2.10.2 Estudios de fotoproductos generados en la irradiación de NFX por Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC).

El método para HPLC contempla un gradiente de 10-60% de ACN con un flujo de 1 mL/min con una columna C18 (5 μ M) 250x4.6 mm marca Restek y Lot 150713B. Los disolventes son agua y ACN, ambos con 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) y filtrados con filtros de membrana hidrofílicos. El método se adecuó según Hall *et al* (Hall, B. S., *et al* 2011). A partir de la disolución preparada en la **sección 2.10**, preparar: NFX 16 μ M, NFX 16 μ M Irradiado con luz azul y NFX 16 μ M Irradiado con luz UV-A. Todas las diluciones se hicieron en agua grado LC-MS, la Ecuación 2.3 fue usada para realizar los cálculos de las diluciones pertinentes. El equipo usado fue un cromatógrafo líquido de alta presión FS-HPLC (Shimadzu).

2.10.3 Ensayo del Desplazamiento Competitivo (GDA).

2.10.3.1 BNZ frente a NFX@CB[n] (n = 7, 8).

A partir de la disolución preparada en la **sección 2.10**, preparar las siguientes disoluciones en agua. Utilizar la Ecuación 2.3 para los cálculos: NFX 10 μ M en CB[7]

50 μM ; NFX 10 μM en CB[8] 30 μM . A partir de la disolución preparada en la **sección 2.6**, realizar las lecturas a 0, 1, 2, 3, 4, 5 hasta llegar a 25 μM de BNZ, usar como blanco agua. El equipo es un Cary 60 UV-Vis Spectrophotometer modelo G6860A. La metodología se ajustó según Sinn *et al* (Sinn, S., *et al.*, 2020). Los datos obtenidos por UV-Vis fueron introducidos en el sitio web supramolecular.org en formato Excel siguiendo sus indicaciones, una vez ingresados la calculadora realiza una regresión no lineal sobre estos datos utilizando la ecuación de enlace exacta implementada a través de un programa con servidores en Python.

Enlaces:

Data generada para NFX@CB[7] + BNZ:

<http://app.supramolecular.org/bindfit/view/0688e1ae-dcb6-4f54-ae85-c944e89d39c5>

Data generada para NFX@CB[8] + BNZ:

<http://app.supramolecular.org/bindfit/view/10033e62-523e-421c-b966-fb6bce081e63>

2.10.3.2 MB frente a NFX@CB[n] (n = 7, 8).

A partir de la disolución preparada en la **sección 2.10**, preparar las siguientes disoluciones en agua. Utilizar la Ecuación 2.3 para los cálculos: NFX 10 μM en CB[7] 50 μM , NFX 10 μM en CB[8] 30 μM . A partir de la disolución preparada en la **sección 2.7**, realizar las lecturas a 0, 1, 2, 3,4 hasta llegar a 25 μM de MB, usar como blanco agua. El equipo es un Cary 60 UV-Vis Spectrophotometer modelo G6860A. La metodología se ajustó según Sinn *et al* (Sinn, S *et al.*, 2020). Con los datos obtenidos

por UV-Vis fueron introducidos en el sitio web supramolecular.org en formato Excel siguiendo sus indicaciones, una vez ingresados la calculadora realiza una regresión no lineal sobre estos datos utilizando la ecuación de enlace exacta implementada a través de un programa con servidores en Python.

Enlaces:

Data generada para NFX@CB[7] + MB:

<http://app.supramolecular.org/bindfit/view/474c6a66-6ab5-4fb5-b348-610d23f0a3c6>

Data generada para NFX@CB[8] + MB:

<http://app.supramolecular.org/bindfit/view/bb16bd55-ebf8-41fd-b4a4-06964a7c7d34>

2.11 Estudios de Acoplamiento Molecular Inducido (Docking).

La estructura del NFX fue optimizada geoméricamente usando el programa Spartan 10 y las cargas parciales fueron recogidas usando la metodología ESP de Shao *et al* (Shao *et al.*, 2006). La estructura del macrociclo del CB[7] fue optimizada utilizando el programa Gaussian09 (Frisch *et al.*, 2009). Los cálculos fueron realizados utilizando la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT-Density Functional Theory), usando la funcional híbrida B3LYP y el conjunto de base 6-311G*. Los estudios de acomplamien-ton molecular o docking fueron realizados utilizando los programas AutoDock 4.2 y AutoDock Tools (Goodsell *et al.*, 2009; Morris *et al.*, 200). Los mapas de cuadrícula fueron calculados utilizando la opción autogrid4, con un espacio entre puntos de 0.375 Å. Las coordenadas del centro de la caja se fijaron en el centro de

CB[7], la opción autotors fue utilizada para determinar los enlaces rotables del ligando. En el acoplamiento molecular se emplea los siguientes parámetros para el algoritmo genético lamarckiano (LGA-Lamarckian Genetic Algorithm); una población de 150 individuos aleatorios, 100 ciclos de evaluaciones, un número máximo de 2.5×10^6 de evaluaciones energéticas, un número máximo de generaciones de 27000, una tasa de mutaciones de 0.02 y una velocidad de cruce de 0.80. Las mejores conformeros obtenidas fueron escogidas con respecto a una menor energía de acoplamiento y un número alto de representaciones conformacionales. El programa PyMol™ fue empleado para visualización de estructuras, análisis de datos y generaciones de imágenes (Schrödinger., 2015).

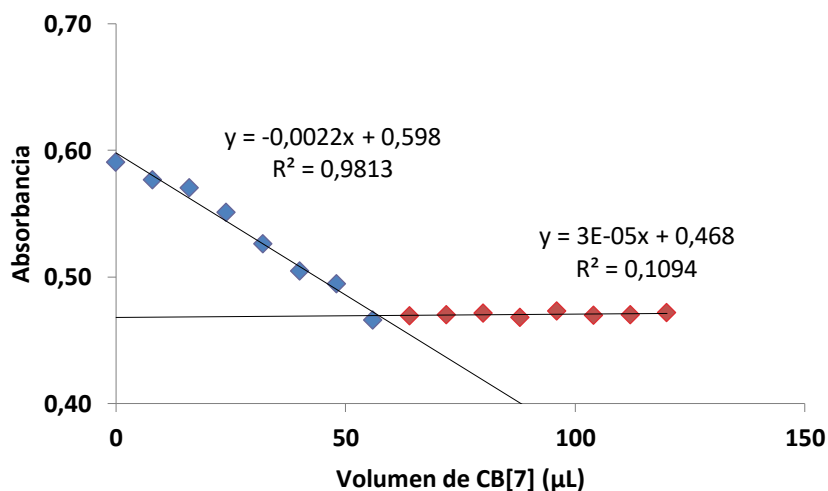
Capítulo 3: Resultados y discusión.

3.1 Titulación Espectrofotométrica de CB[7] y CB[8].

Los datos obtenidos para CB[7] (Tabla 3.1) se graficaron en Absorbancia vs Volumen de CB[7] en una hoja de Excel (Gráfica 3.1). De esta manera se calcula la concentración real de la disolución de CB[7] usando las ecuaciones obtenidas en la titulación que representan la formación del complejo estable del Co^{2+} encapsulado en CB[7]. Esto es debido a que CB[7] puede albergar hasta 7 moléculas de agua en su cavidad producto del proceso de recristalización.

Tabla 3.1 Datos de la titulación de Cucurbit[7]urilo.

CB[7] (μL)	Abs (261 nm)
0	0,59088
8	0,57685
16	0,57065
24	0,55120
32	0,52621
40	0,50476
48	0,49466
56	0,46580
64	0,46926
72	0,47028
80	0,47125
88	0,46815
96	0,47297
104	0,46962
112	0,47000
120	0,47199



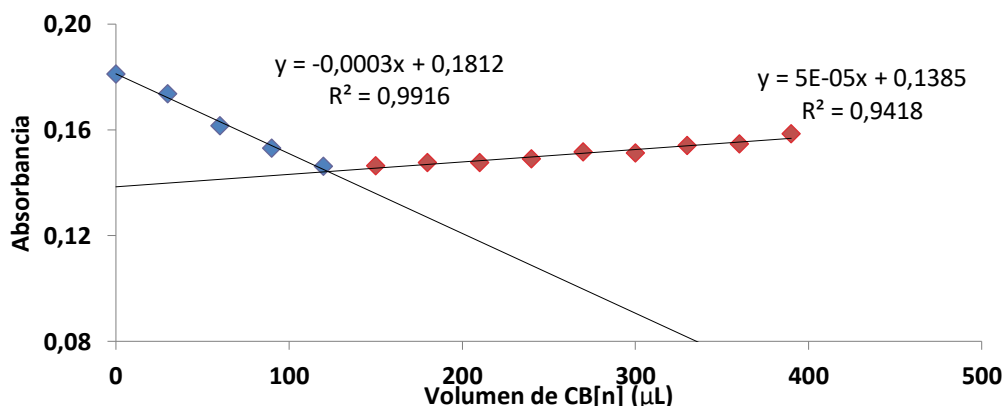
Gráfica 3.1 Titulación de Cucurbit[7]urilo.

Los datos obtenidos para CB[8] (**Tabla 3.2**) se graficaron en Absorbancia vs Volumen de CB[8] en una hoja de Excel (**Gráfica 3.2**). De esta manera se calcula la concentración real de la disolución de CB[8] usando las ecuaciones obtenidas en la titulación que representan la formación del complejo estable del Cob⁺ encapsulado en CB[8]. Esto es debido a que CB[8] puede albergar hasta 10 moléculas de agua en su cavidad producto del proceso de recristalización.

Tabla 3.2 Datos de la titulación de Cucurbit[8]urilo.

CB[8] (μL)	Abs (261 nm)	Abs (corregida)
0	0,18109	0,18109
30	0,17193	0,17365
60	0,15837	0,16154
90	0,14859	0,15305
120	0,14049	0,14611
150	0,13942	0,14639
180	0,13917	0,14752
210	0,13794	0,14760
240	0,13802	0,14906
270	0,13903	0,15154
300	0,13748	0,15123
330	0,13870	0,15396
360	0,13809	0,15467
390	0,14024	0,15847

Gráfica 3.2 Titulación de Cucurbit[8]urilo.



3.2 Disolución de NFX en DMSO.

3.2.1 Mediciones de NFX por Espectroscopia UV-Vis.

Se encontraron dos máximos de absorción, uno de 273.0 nm en la región ultravioleta y otro de 402.0 nm en la región visible (**Figura 3.1**), tiene color amarillo en fase sólida y en fase líquida. El color amarillo usualmente lo presentan los compuestos que contienen el grupo nitro. Este barrido espectral a diferentes concentraciones también proporciona información de posibles agregados que puedan formarse entre moléculas de NFX, sin embargo, no se observan agregaciones.

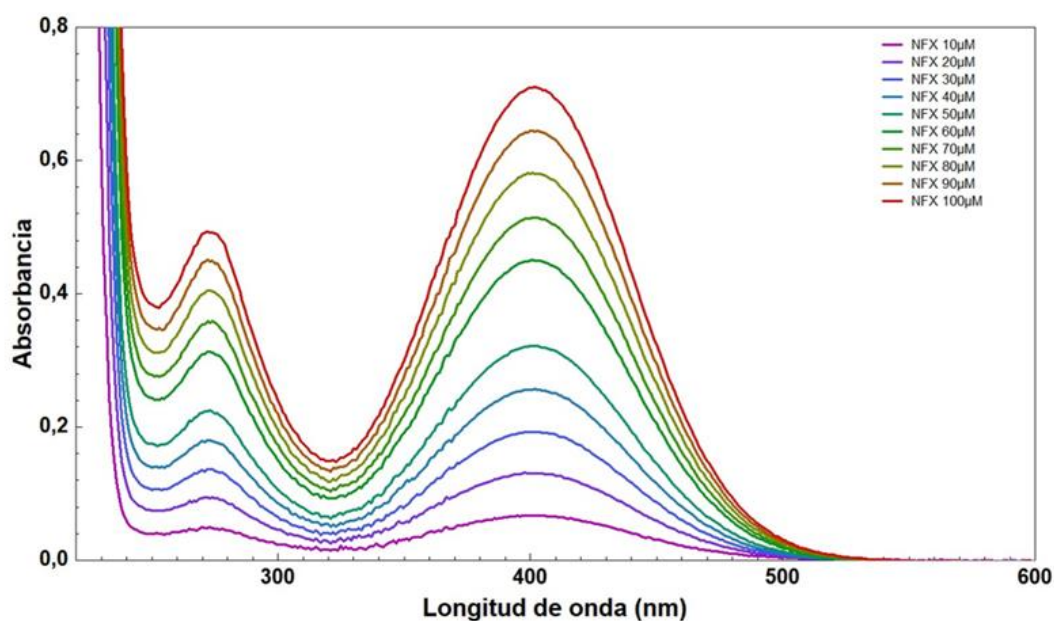


Figura 3.1 Espectro UV-Vis de NFX a diferentes concentraciones.

3.2.2 Efecto solvato crómico de NFX en disolventes de diferentes polaridades.

Dado que la polaridad de una molécula suele cambiar cuando se dan transiciones electrónicas del estado basal al estado excitado, la posición y la intensidad de los máximos de absorción pueden desplazarse, disminuir o aumentar cuando se cambia la polaridad del disolvente.

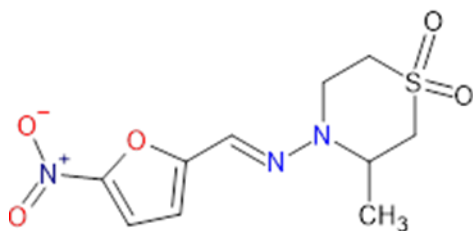


Figura 3.2 Estructura molecular de NFX.

Nifurtimox (**Figura 3.2**) es una molécula con polaridad media atribuida por el grupo nitro, el anillo furano, hidrazona y sulfona. Las energías de las transiciones electrónicas de orbitales $\pi \rightarrow \pi^*$ o de $n \rightarrow \pi^*$ pueden aumentar o disminuir si la estabilidad se ve favorecida o no. En disolventes no polares como el n-hexano no se pueden apreciar los máximos de absorción por que la molécula no está solvatada (**Cuadro 3.1**). En disolventes polares como acetona, etanol, metanol, acetonitrilo y agua, las moléculas se encuentran solvatadas y presentan dos máximos de absorción (

Figura 3.3), la excepción es la acetona que presentó interferencias por debajo de 200 nm y solo se distingue un solo máximo de absorción.

Cuadro 3.1 Comportamiento solvatocrómico de NFX en diferentes solventes orgánicos.

Solvente	Constante dieléctrica	Figura 3.3	$\lambda_{max}(nm)$	$\lambda_{max}(nm)$
Agua	78.54	A	273.0	402.0
Acetonitrilo	36.64	B	274.0	398.0
Metanol	32.6(25°)	C	273.0	393.0
Etanol	24.6	D	273.0	393.0
Acetona	21.01	E	-	395.0
n-Hexano	1.89	F	-	-

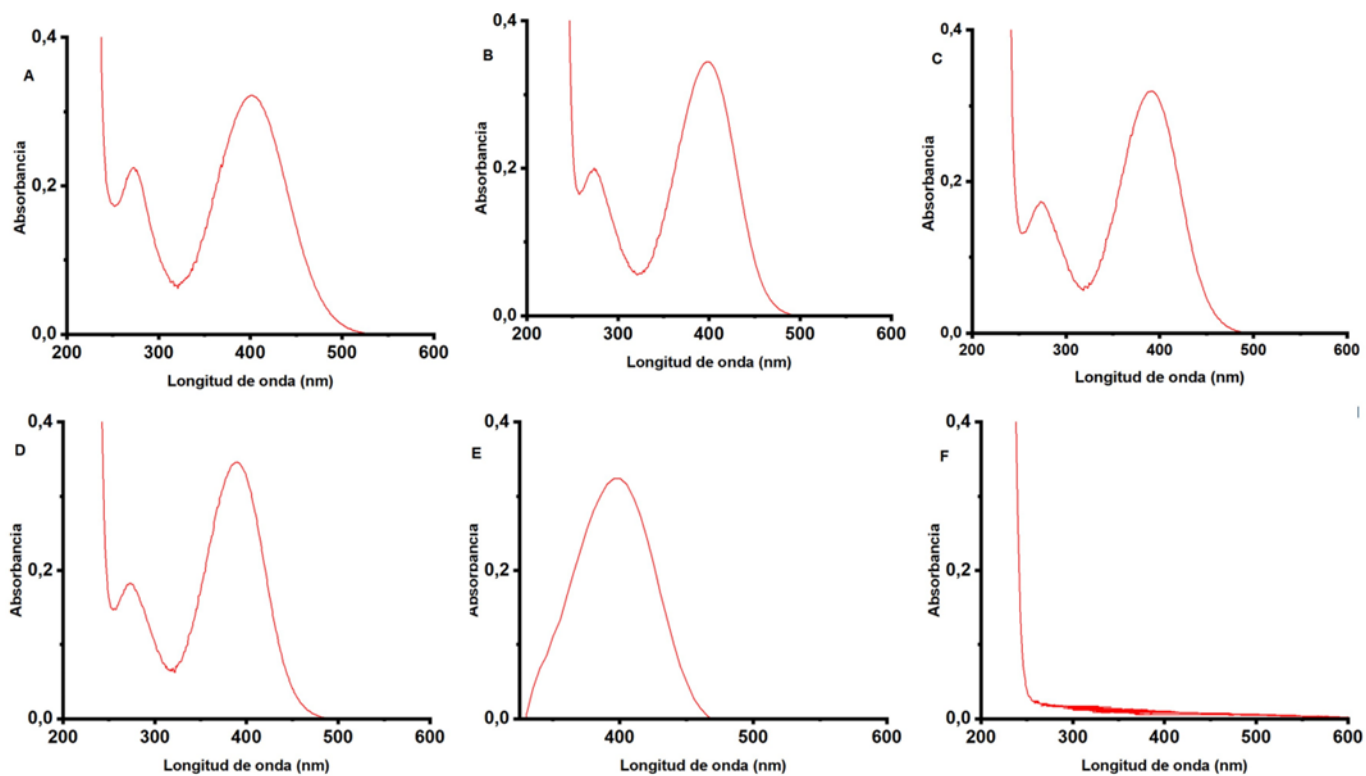


Figura 3.3 A) NFX en agua B) NFX en acetonitrilo C) NFX en metanol D) NFX en etanol E) NFX en acetona F) NFX en n-hexano.

3.2.3 Evaluación Espectroscópica de NFX encapsulado en CB[7] y CB[8].

La encapsulación supramolecular de NFX en complejos de inclusión como CB[7] y CB[8] se puede observar a través de la Espectroscopía UV-Vis por medio del desplazamiento de los máximos de absorbancia que presenta la molécula cuando se acompleja. Esto sucede gracias al desplazamiento de las moléculas de agua de alta energía que están confinadas dentro de la cavidad de los macrociclos. Se puede evidenciar un desplazamiento de los máximos en 263 nm y 393 nm hacia el rojo (**Cuadro 3.2**). El desplazamiento fue de al menos unos 13 nm en NFX@CB[7] y de unos 17 nm para NFX@CB[8] (**Figura 3.4**). No se observó un aumento en la intensidad de los máximos. También, se confirma que CB[7] y CB[8] no presentan máximos de absorción debido a que no presentan grupos cromóforos en su estructura.

Cuadro 3.2 Complejo NFX@CB[7] Y NFX@CB[8] por espectroscopía UV-Vis.

	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$
NFX	263.0	393.0
NFX@CB[7]	274.0	406.0
NFX@CB[8]	275.0	410.0

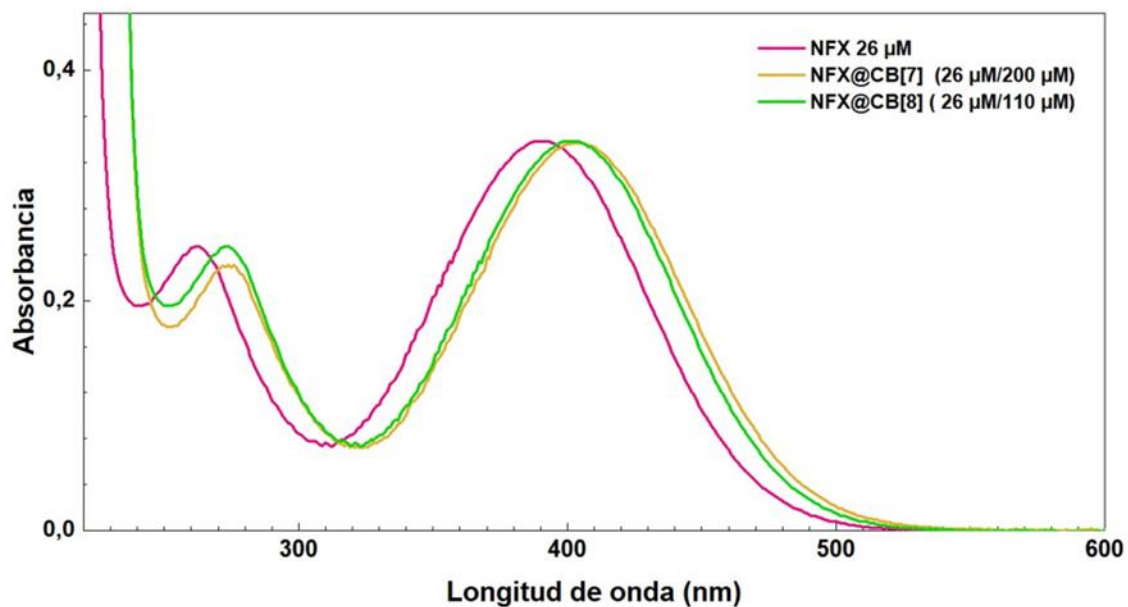
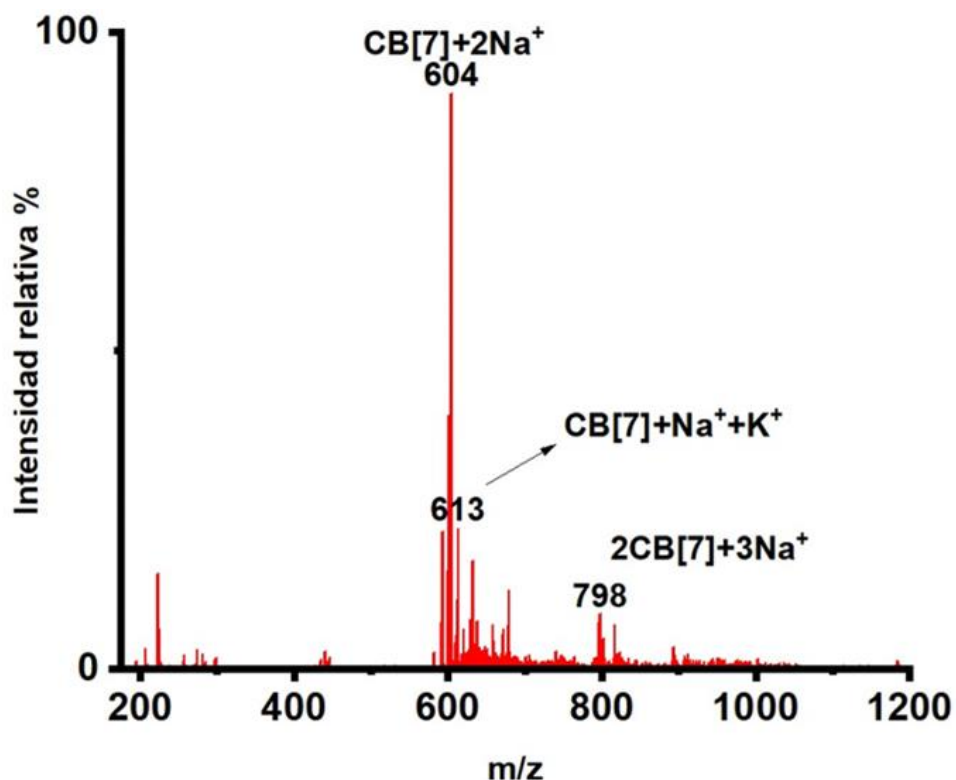


Figura 3.4 Complejo NFX@CB[7] y NFX@CB[8] por Espectroscopia UV-Vis.

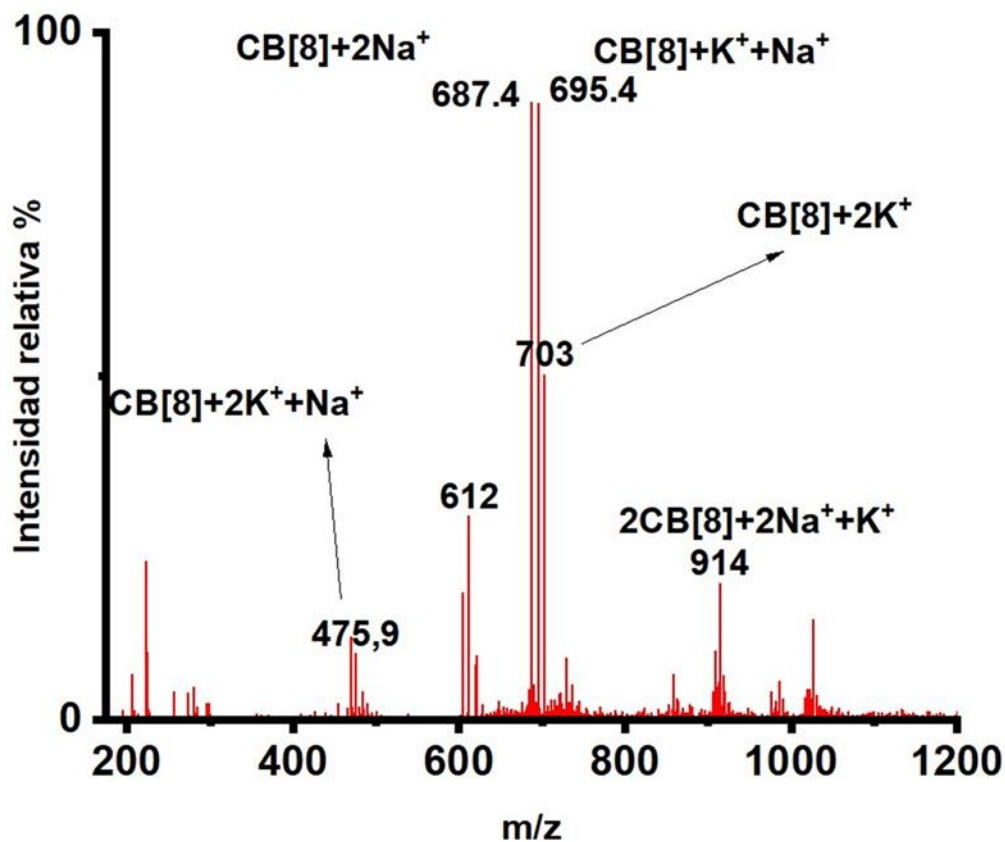
3.2.4 Evaluación por Espectrometría de Masas de NFX@CB[7] y NFX@CB[8].

El CB[7] tiene un peso molecular de 1162 g/mol, el ion sodio (Na^+) tiene un peso molecular de 23 g/mol y el ion potasio (K^+) tiene un peso molecular de 39 g/mol. En el **Espectro 3.1**, la señal de m/z de 604 corresponde a la molécula dicargada de CB[7] con dos Na^+ , la señal de m/z de 613 corresponde a la molécula dicargada de CB[7] con Na^+ y K^+ . La señal de m/z de 798 corresponde al dímero de CB[7] tricargado con tres Na^+ .



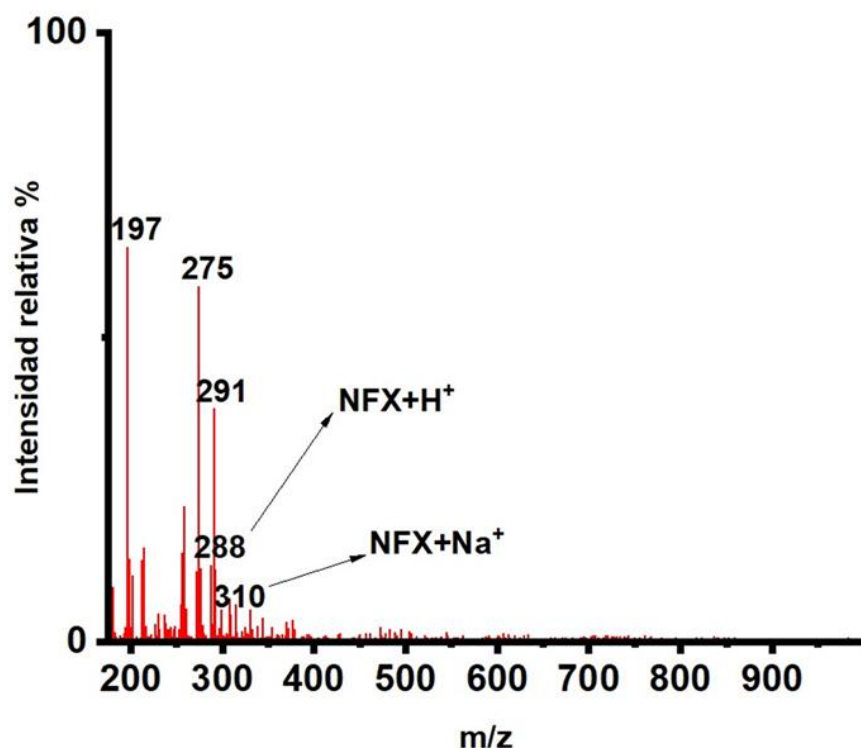
Espectro 3.1 Espectro de masas de CB[7].

El CB[8] tiene un peso molecular de 1328 g/mol, el ion sodio (Na^+) tiene un peso molecular de 23 g/mol y el ion potasio (K^+) tiene un peso molecular de 39 g/mol. En el **Espectro 3.2** la señal de $m/2z$ de 687 corresponde a la molécula de CB[8] dicargada con dos Na^+ . La señal de $m/2z$ de 695 corresponde a la molécula de CB[8] dicargada con Na^+ y K^+ . La señal de $m/2z$ de 703 corresponde a la molécula de CB[8] dicargada con dos K^+ . La señal de $m/3z$ de 914 corresponde al dímero tricargado de CB[8] con dos Na^+ y un K^+ . La señal de $m/3z$ de 476 corresponde a la molécula tricargada de CB[8] con dos K^+ y un Na^+ .



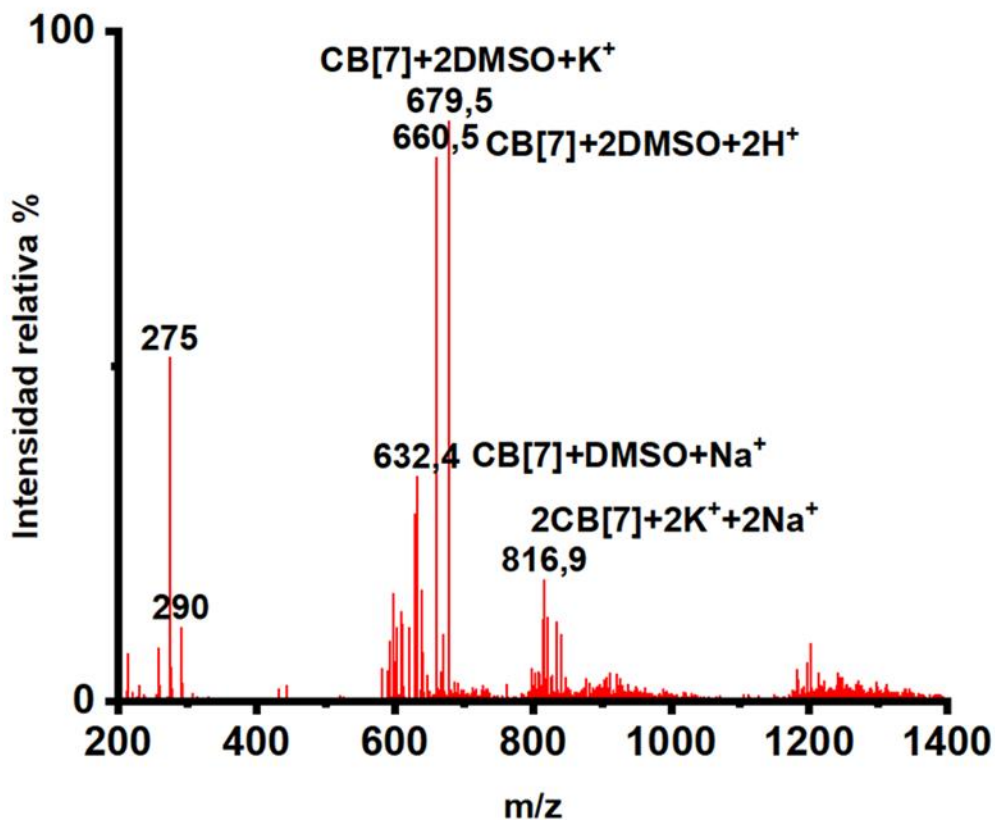
Espectro 3.2 Espectro de masas de CB[8].

El NFX tiene un peso molecular de 287 g/mol, el protón (H^+) tiene un peso molecular de 1 g/mol y el DMSO tiene un peso molecular de 78 g/mol. En el **Espectro 3.3** se muestra el NFX con señal de m/z de 288 corresponde a la molécula de NFX cargada con un H^+ y la señal de m/z de 310 corresponde a la molécula de NFX cargada con Na^+ . La señal de m/z de 197, 275 y 291 son posiblemente interferencias que aparecen debido al uso de DMSO para solubilizar el NFX.



Espectro 3.3 Espectro de masas de NFX con interferencia.

En el **Espectro 3.4** aparecen señales que no coinciden con el complejo de inclusión de NFX y CB[7], pero sí coinciden con señales que indicarían que el DMSO está encapsulado en CB[7]. Es decir que probablemente el DMSO este interfiriendo. La señal de m/z de 679 corresponde a dos moléculas de DMSO encapsuladas en CB[7] cargada con un K^+ , la señal de m/z de 660 corresponde a dos moléculas de DMSO encapsuladas en CB[7] **dicargada** con dos H^+ , la señal de m/z de 817 corresponde al dímero de CB[7] **tretracargada** con K^+ y Na^+ . La señal de m/z de 632 corresponde a la molécula de DMSO encapsulado en CB[7] **dicargada** con Na^+ y H^+ . La señal de m/z de 290 y 275 son procedentes del DMSO.



Espectro 3.4 Espectro de NFX@CB[7] con DMSO como posible interferencia.

Para poder evidenciar la posible interferencia del DMSO frente a la formación del complejo de inclusión NFX@CB[7], en el **Cuadro 3.3** se enlistaron las señales *m/z* más características del agua usada como blanco, del NFX y del NFX@CB[7]. Con esto se hizo una comparación de todas las señales y se seleccionaron (color rojo) las nuevas señales que solamente aparecen en NFX@CB[7].

Cuadro 3.3 Cuadro comparativo de señales del blanco, NFX y CB[7] con respecto a NFX@CB[7].

m/z Agua*	m/z NFX	m/z CB[7]		m/z NFX@CB[7]	
223.1	197.0	257.3	740.3	259.0	835.6
225.1	275.0	435.1	798.2	433.3	907.8
281.1	291.0	440.6	822.3	599.4	923.1
299.1	293.0	446.6	893.7	629.9	956.8
300.2	330.9	582.4	909.3	632.4	1182.4
355.1	270.9	590.9	1185.6	660.5	1202.7
	488.8	593.4		687.3	1241.4
	520.9	601.9		803.6	1243.5
	606.9	604.4		815.1	
	724.8	613.2		816.9	
	288.1	679.5		822.3	

*Espectro del agua en el apéndice B

En el **Cuadro 3.4** se muestra que a cada señal seleccionada se le realizó Espectrometría de Masas Masas (MS/MS) para comprobar si estas pertenecen a la formación del complejo DMSO@CB[7]. Tres de cada cinco señales muestran la señal *m/z* de 79 que corresponde a la molécula de DMSO cargada con H⁺ (color azul).

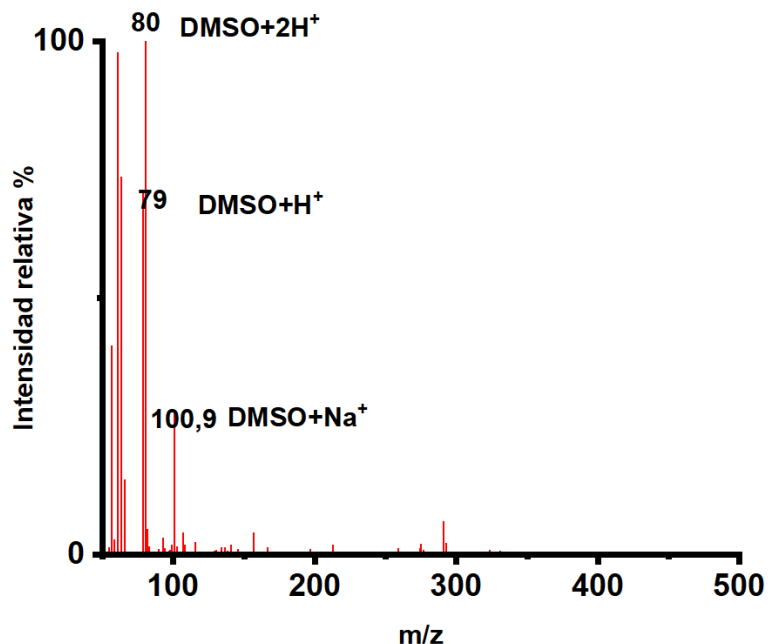
Cuadro 3.4 Señales más características en el espectro MS/MS de NFX@CB[7].

NFX/@CB[7]	m/z	NFX/@CB[7]	m/z		
599.4*	582.2	835*	79.0	632.1	809.3
	590.7		582.5	754.6	835.1
			593.2	796.5	835.9
629.9*	79.0	1203*	1171.1	1204.6	
	582.3		1176.9		
	590.0		1202.8		
632.4*	593.2	1241*	1213.1	1242.0	
			1240.6	1242.6	
			1241.3		
660.5*	78.9				
	582.2				
	621.2				

* Espectros en el Apéndice B

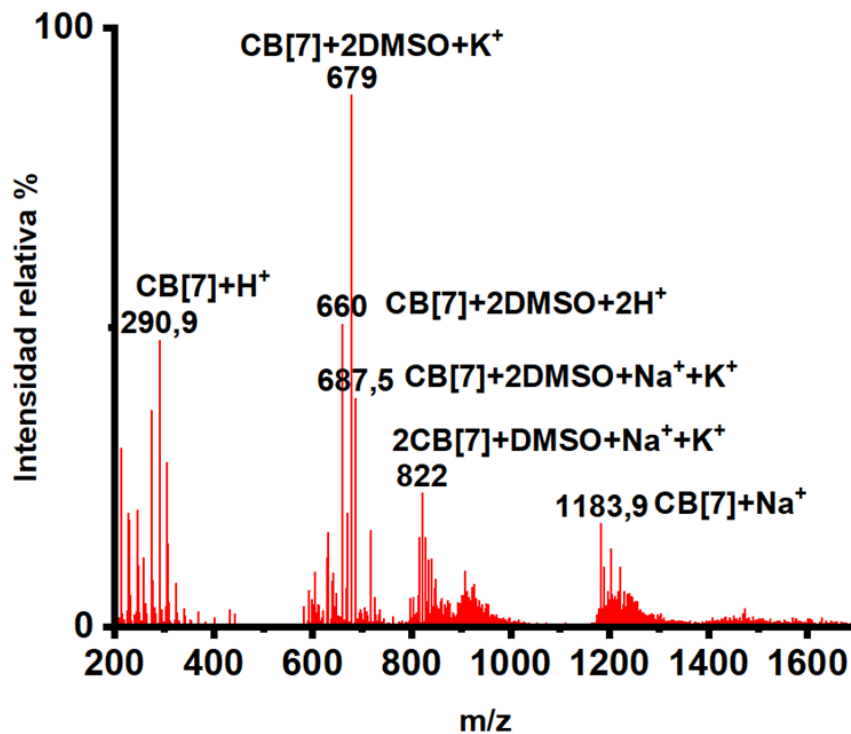
3.2.4.1 Comprobación de la competencia del DMSO por la cavidad del CB[7] y CB[8].

En el **Espectro 3.5** se muestra la señal de m/z de 79 correspondiente a la molécula de DMSO cargada con H^+ , la señal de m/z de 80 correspondiente a la molécula de DMSO cargada con dos H^+ y la señal de m/z 101 corresponde a la molécula de DMSO cargada con Na^+ .



Espectro 3.5 Espectro de masas del DMSO.

En el **Espectro 3.6** se muestra la señal de $m/2z$ de 679 que corresponde a dos moléculas de DMSO encapsuladas en CB[7] cargada con dos K^+ . La señal de $m/2z$ 660 corresponde a dos moléculas de DMSO encapsuladas en CB[7] **dicargada** con $2H^+$. La señal de m/z 867 que corresponde a dos moléculas de DMSO encapsuladas en CB[7] cargada con un K^+ y dos Na^+ . La señal de m/z 822 que corresponde a la moléculas de DMSO encapsuladas en dos CB[7] cargada con Na^+ y con K^+ y la señal de $m/4z$ 290 que corresponde a la moléculas de CB[7] tetra cargada con 4 H^+ . De esta manera, se confirma que el DMSO ocasiona interferencia dentro de nuestras condiciones experimentales.



Espectro 3.6 Espectro de masas de DMSO@CB[7].

3.3 Disolución de NFX en Agua

3.3.1 Evaluación Espectroscópica de NFX encapsulado en CB[7] y CB[8]

Con la disolución en agua de NFX se aprecia un cambio tanto en el desplazamiento de los máximos de absorción como en sus intensidades cuando se forma el complejo de inclusión NFX@CB[7] y NFX@CB[8] (**Figura 3.5**). Los máximos se presentan en el **Cuadro 3.5**. Esto sucede debido a que NFX pasa de un medio totalmente hidrofílico a un medio hidrofóbico, ocasionando que la molécula se establezca mejor en la cavidad hidrofóbica que es compatible con la polaridad media de NFX.

Cuadro 3.5 Máximos de absorción de NFX@CB[7] Y NFX @CB[8] usando disolución de NFX en agua.

	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$
NFX	274.0	402.0
NFX@CB[7]	278.0	417.0
NFX@CB[8]	278.0	420.0

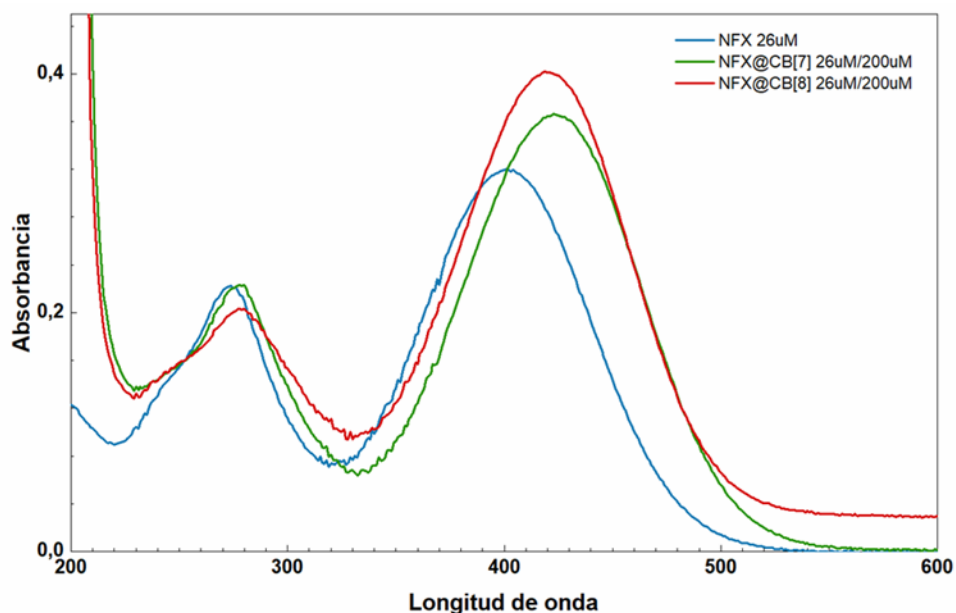
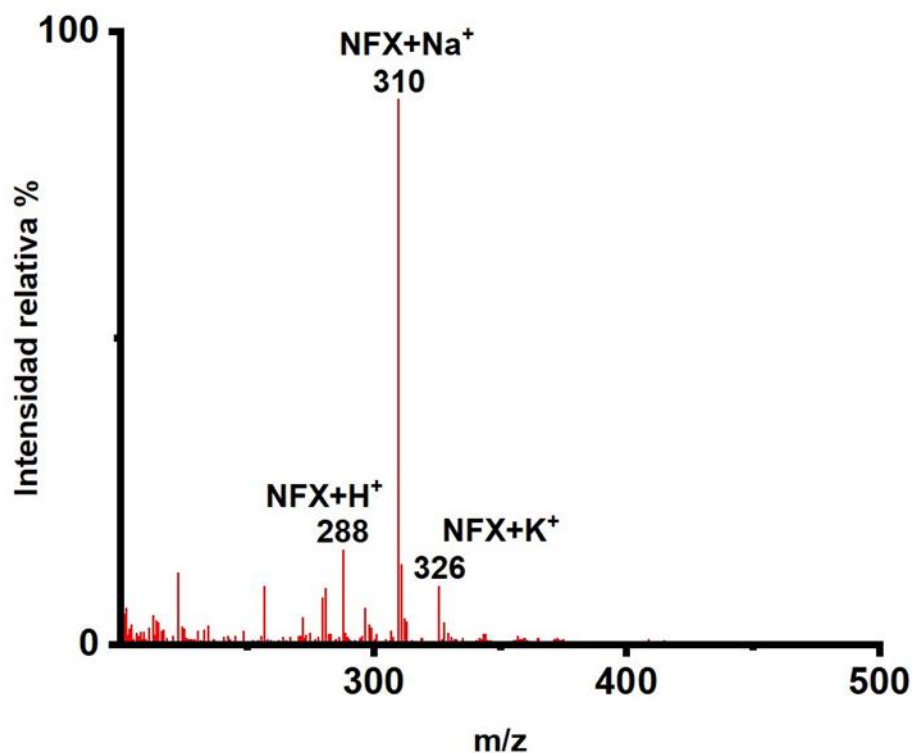


Figura 3.5 Espectro UV-Vis de NFX@CB[7] y NFX@CB[8] usando disolución de NFX en agua.

3.3.2 Evaluación por Espectrometría de NFX encapsulado en CB[7] y CB[8]

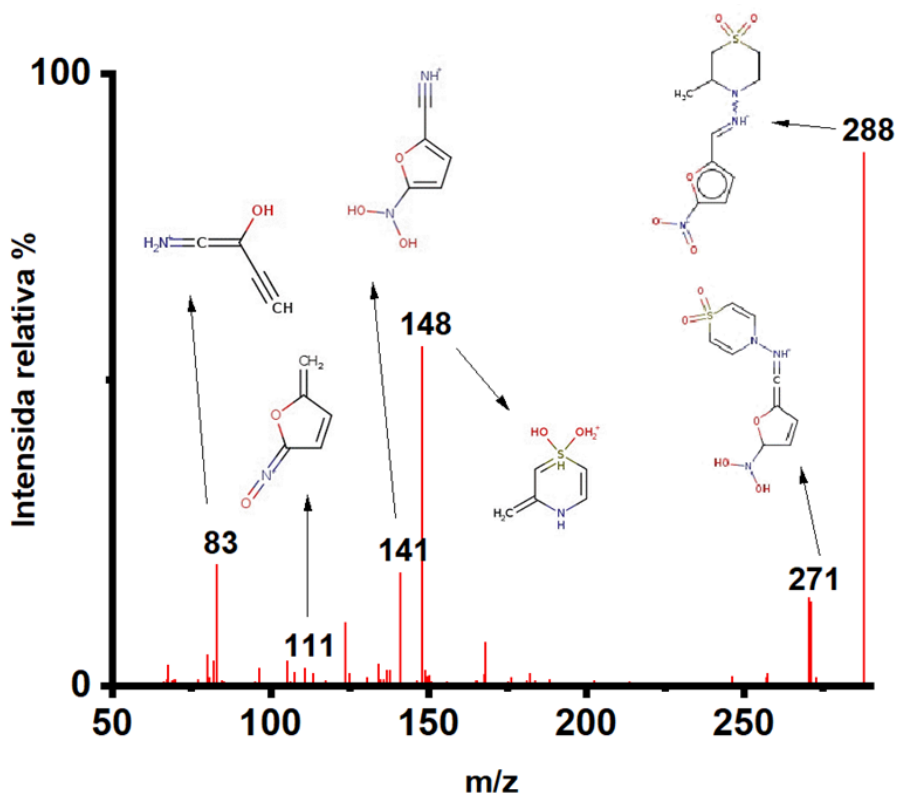
Con la disolución preparada en agua se repitió la Espectrometría de Masas para evaluar la formación del complejo de inclusión NFX@CB[7]. En el **Espectro 3.7** la señal de m/z 310 corresponde a la molécula de NFX cargada con Na^+ , la señal de m/z 288 corresponde a la molécula de NFX cargada con H^+ y la señal de m/z 326

corresponde a la molécula de NFX cargada con K^+ . Al usar agua se nota una diferencia muy importante, ahora el NFX es la señal más intensa de todas y de esta manera se comprueba que no existe ningún tipo de interferencia.



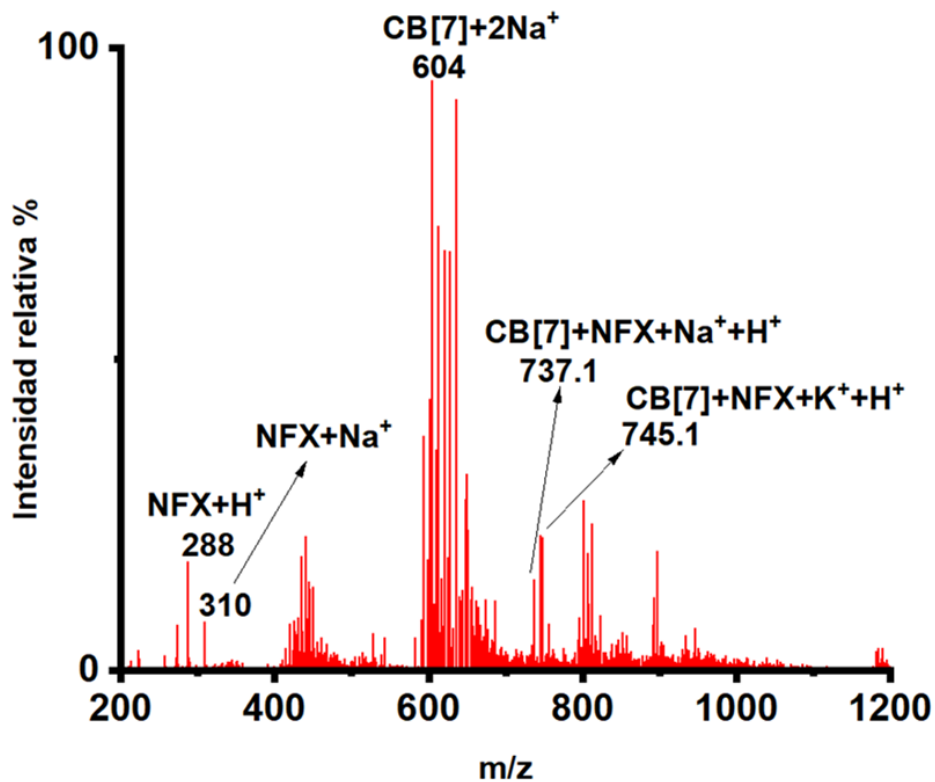
Espectro 3.7 Espectro de masas de NFX (Disolución en agua).

Solamente para corroborar que la señal m/z 288 proviene de NFX se realizó Espectrometría de Masas Masas y se obtuvo el **Espectro 3.8** donde están identificados los fragmentos característicos de NFX. Se utilizó un software que predice espectros de masas <https://cfmid.wishartlab.com/predict>.



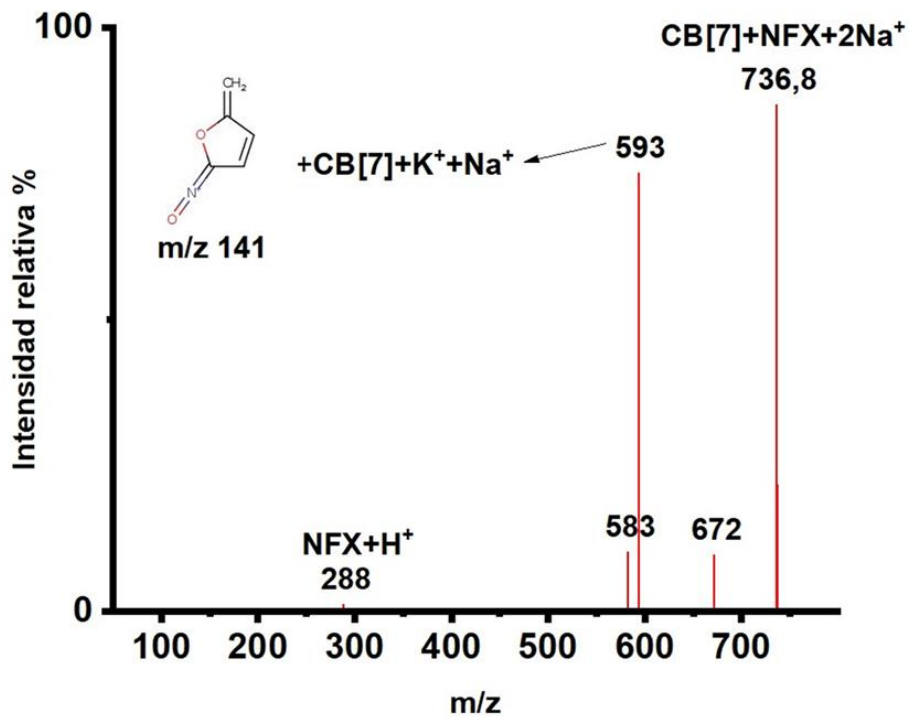
Espectro 3.8 Espectro de masas MS/MS de NFX.

En el **Espectro 3.9** la señal de m/z 737 corresponde a la molécula de NFX encapsulada en CB[7] **dicargada** con un H⁺ y un Na⁺. La señal de m/z 745 corresponde a la molécula de NFX encapsulada en CB[7] **dicargada** con un H⁺ y un K⁺. Con estas 2 señales se corrobora nuevamente que el DMSO era una interferencia y también que se está formando el complejo de inclusión de NFX@CB[7].



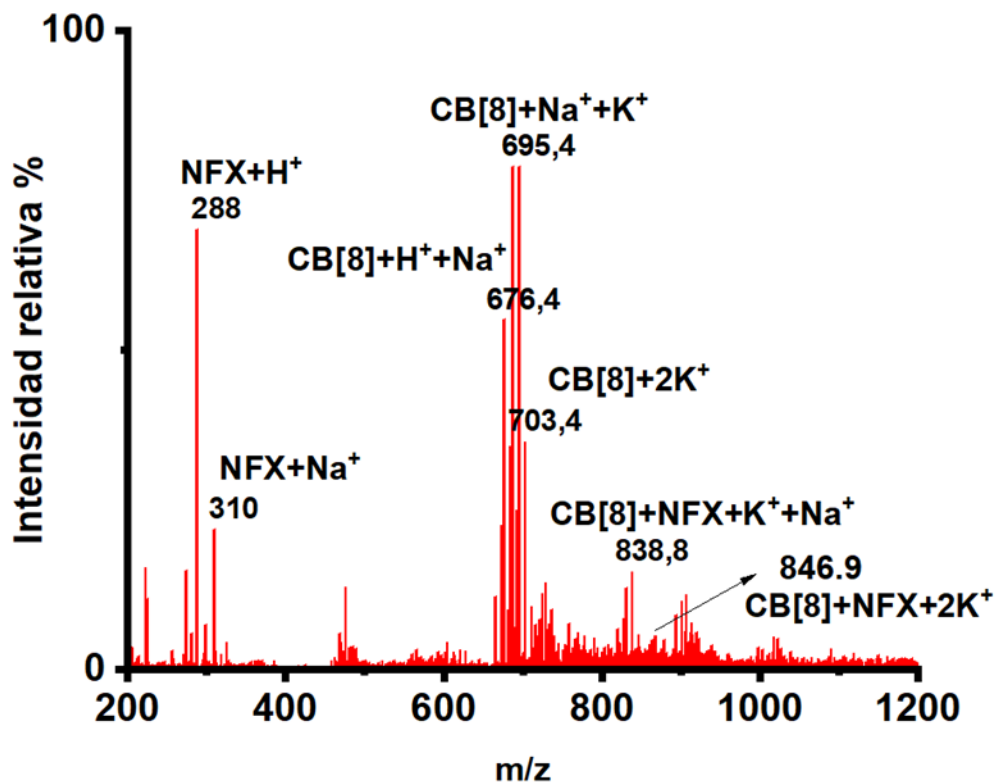
Espectro 3.9 Espectro de masas de NFX@CB[7] (Stock en agua).

En el **Espectro 3.10** se muestra la señal m/z 737 a la cual se le realizo Espectrometría de Masas (MS/MS) y se aprecia la señal m/z 288 que efectivamente es NFX cargada con Na^+ . Además, la señal de m/z de 593 corresponde a la molécula de CB[7] con un fragmento de NFX de m/z 141 (**ver Espectro 3.8**), esta señal esta dicargada con Na^+ y K^+ .



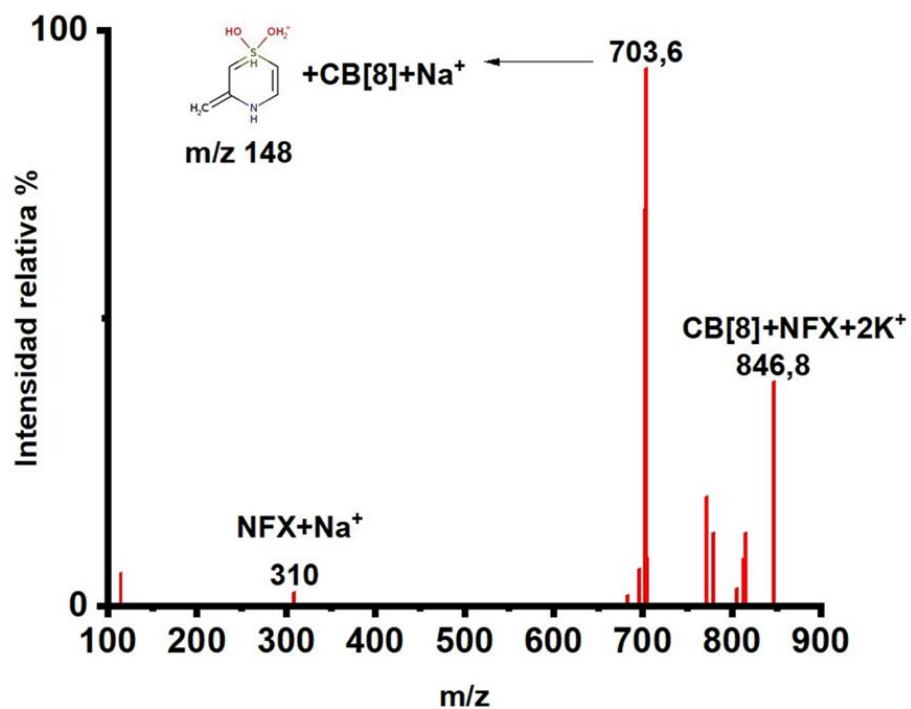
Espectro 3.10 Espectro de masas MS/MS de m/2z 737.

En el **Espectro 3.11** la señal de $m/2z$ 838 corresponde a la molécula de NFX encapsulada en CB[8] dicargada con Na⁺ y con K⁺. La señal de $m/2z$ 847 corresponde a la molécula de NFX encapsulada en CB[8] dicargada con dos K⁺. De esta manera se comprueba la formación del complejo de inclusión de NFX@CB[8].



Espectro 3.11 Espectro de masas de NFX@CB[8].

En el **Espectro 3.12** se muestra la señal m/z 847 a la cual se le hizo Espectrometría de Masas (MS/MS) y se aprecia la señal m/z 310 que efectivamente es NFX cargado con Na⁺. Además, la señal de m/z de 703 corresponde a la molécula de CB[8] con el fragmento de NFX de m/z 148 (**ver Espectro 3.8**), esta señal está cargada con Na⁺.



Espectro 3.12 Espectro de masas MS/MS de m/2z 847.

3.3.3 Estudios de fotodegradación de NFX con respecto a NFX@CB[7] Y NFX@CB[8].

3.3.3.1 Luz UV-A.

Se observó que la irradiación de NFX con la luz UV-A a 100 Lux de iluminancia durante 1 hora, provoca que se fotodegrade (**Figura 3.6 A**). El complejo de inclusión NFX@CB[7] también es fotodegradado producto de la irradiación (**Figura 3.6 B**), sin embargo, en menor medida que NFX. Lo mismo sucede con NFX@CB[8] (**Figura 3.6 C**). La fotodegradación de NFX posiblemente presenta uno o más fotoproductos generados por la irradiación identificados con máximos de 277 y 399 nm (**Figura 3.6 A**).

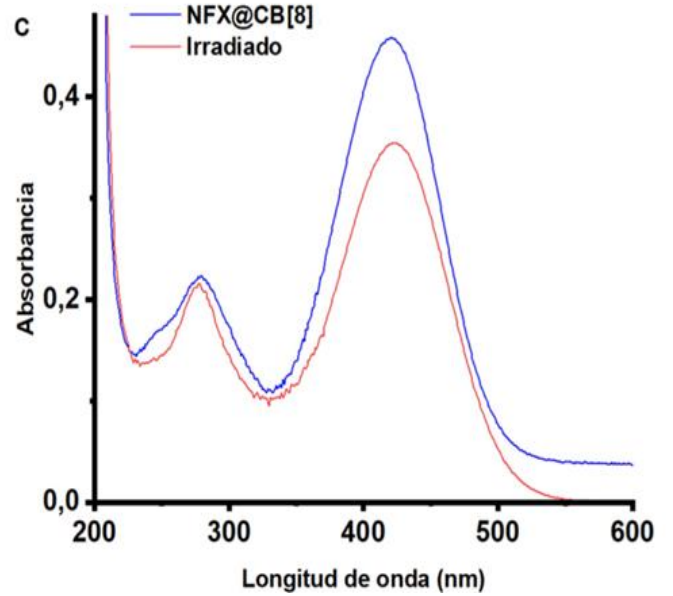
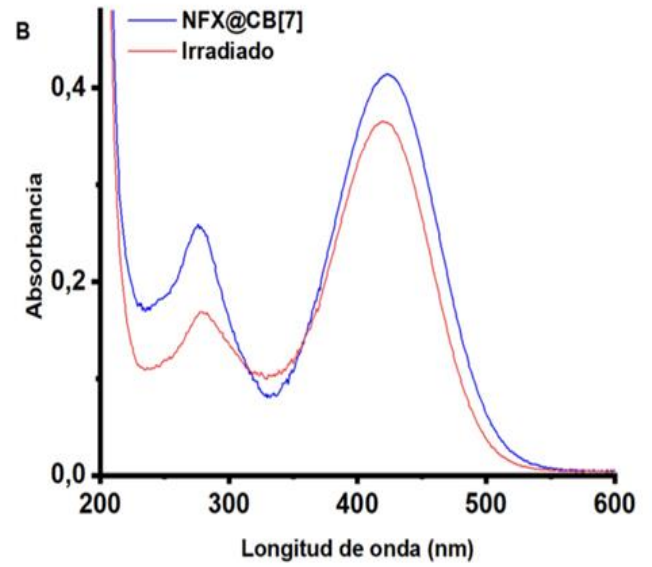
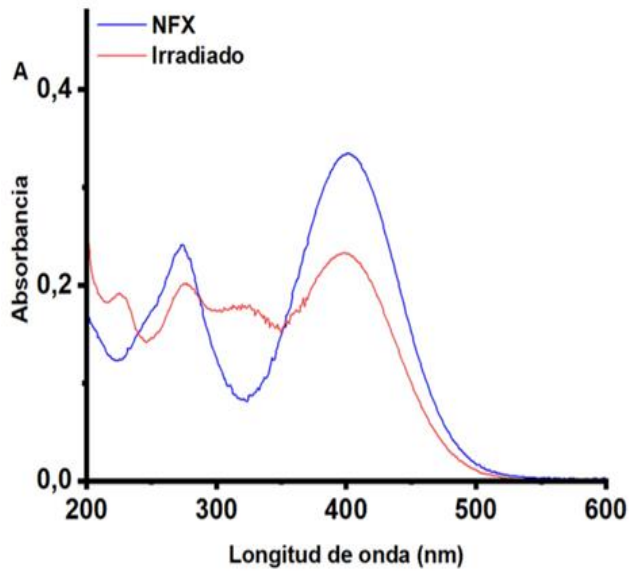


Figura 3.6 Estudios de fotodegradación de NFX, NFX@CB[7] y NFX@CB[8] con luz UV-A a 100 Lux (A, B, C).

3.3.3.2 Luz Azul y Luz blanca.

La luz blanca tiene un máximo de absorptividad que está en 450 y 600 nm, según los resultados, esta luz tiene la energía necesaria para fotodegradar a NFX (**Figura 3.7 A**), sin embargo, no presenta ningún fotoproducto detectable por espectroscopia UV-Vis. Con NFX@CB[7] prácticamente no fotohubo degradación (**Figura 3.7 B**) y con NFX@CB[8] si hubo fotodegradación (**Figura 3.7 C**). Por otro lado, la luz azul tiene un máximo de absorptividad que oscila alrededor de los 450 nm, de mayor intensidad que la luz blanca y produce una fotodegradación abrupta de NFX (**Figura 3.7 D**) que genera máximos en 293, 219 y 231 nm que posiblemente sean fotoproductos de la irradiación. El complejo de inclusión NFX@CB[7] presentó mayor fotoestabilidad frente a la irradiación (**Figura 3.7 E**) y NFX@CB[8] también sufrió fotodegradación por la irradiación (**Figura 3.7 F**). Esto se puede tomar como evidencia de lo siguiente; la encapsulación supramolecular de NFX previene la fotodegradación por efectos de la luz blanca, azul y UV-A.

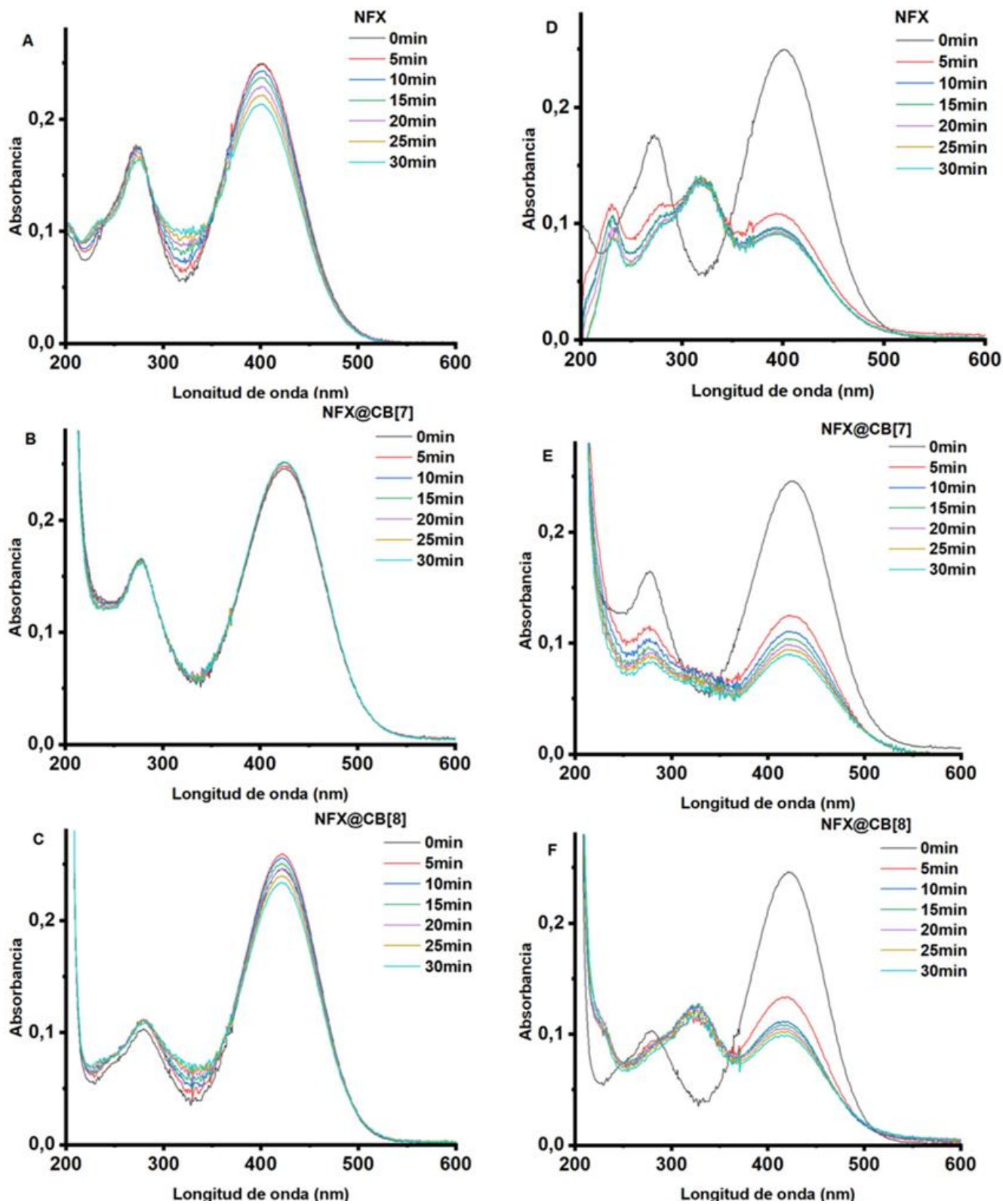
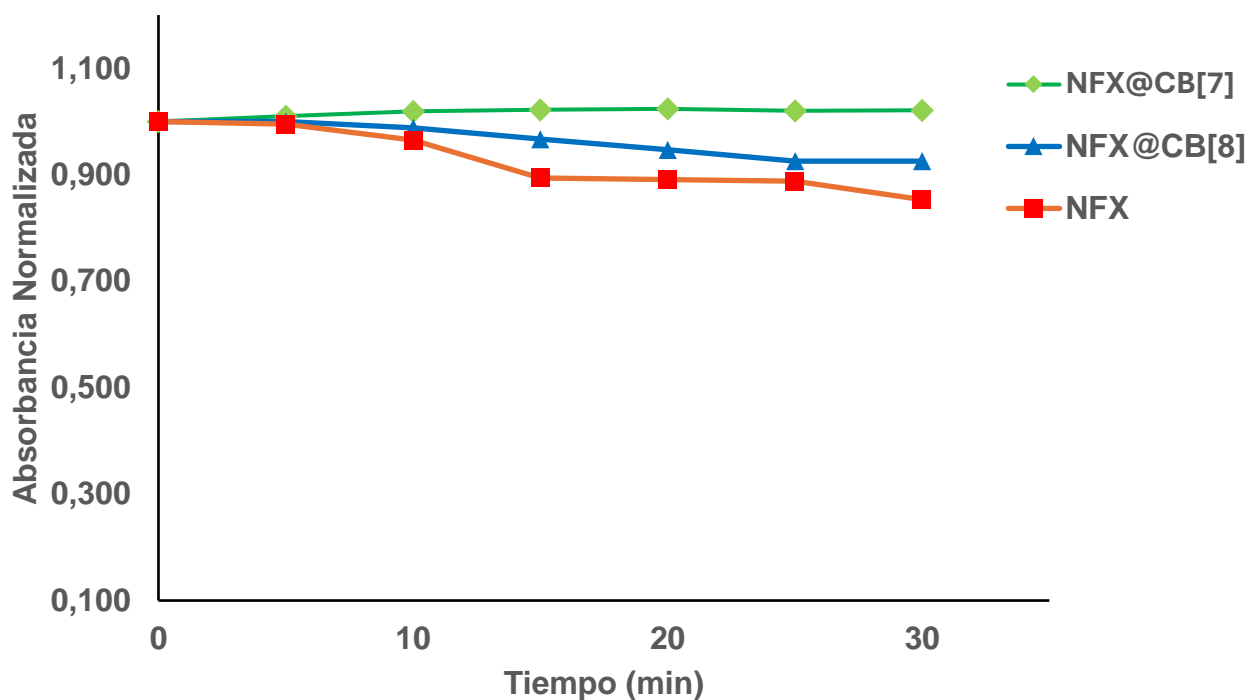
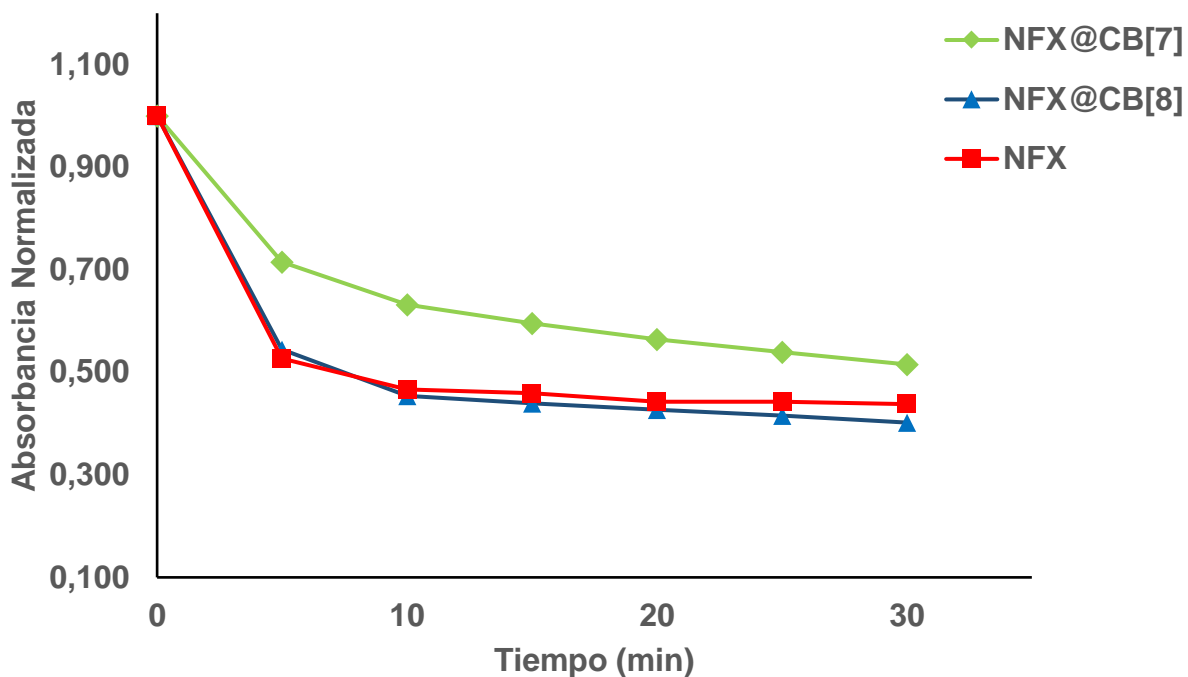


Figura 3.7 Estudios de fotodegradación de NFX, NFX@CB[7] y NFX@CB[8] con luz blanca (A, B, C) y luz azul (D, E, F).

Los datos obtenidos fueron graficados para observar la conducta que presenta NFX, NFX@CB[7] y NFX@CB[8] frente a la energía suministrada por la luz blanca y la luz azul. En la **Gráfica 3.3** se observa que el complejo de inclusión NFX@CB[7] es más fotoestable frente a la irradiación con luz blanca que NFX y NFX@CB[8]. En la **Gráfica 3.4** se puede observar de igual manera que el complejo de inclusión NFX@CB[7] fue mas fotoestable frente a la irradiación con luz azul que NFX y NFX@CB[8]. Esto quiere decir que NFX@CB[7] es más resistente a ser fotodegradado, posiblemente el CB[7] forma un complejo con NFX más estable que lo protege mejor antes los efectos de la luz.



Gráfica 3.3 Estudios de fotodegradación de NFX, NFX@CB[7] y NFX@CB[8] usando luz blanca.



Gráfica 3.4 Estudios de fotodegradación de NFX, NFX@CB[7] y NFX@CB[8] usando luz azul.

3.4 Disolución de NFX en Acetonitrilo (ACN).

3.4.1 Estudios de interacciones entre NFX@CB[n] (n = 7, 8) y HSA. Sistema Ternario HSA:NFX@CB[n] (n = 7, 8) y Binario HSA:NFX.

La extinción de la fluorescencia de HSA por parte de NFX, NFX@CB[7] y NFX@CB[8] (**Figura 3.8**) implican un mecanismo estático donde se da la formación de un complejo entre el fluoróforo (HSA) y el extintor (NFX o NFX@CB[n]). Si este estado fundamental no es fluorescente, entonces decimos que el fluoróforo se ha apagado estáticamente. Un mecanismo dinámico ocurre cuando el fluoróforo en estado excitado se desactiva

por contacto con el extintor. En la **Tabla 3.3** están los datos de los sistemas obtenidos por fluorescencia.

Tabla 3.3 Datos de fluorescencia de HSA:NFX, HSA:NFX@CB[n] (n= 7, 8).

	HSA:NFX		HSA:NFX	
[NFX]	Intensidad	F₀/F	Intensidad	F₀/F
0,0E+00	310087,1983	1	321867,0885	1
2,00E-06	233855,3167	1,325978826	239566,5452	1,343539384
4,00E-06	164507,1063	1,884947133	179346,7482	1,794663643
6,00E-06	128540,3869	2,412371752	126657,6998	2,541235859
8,00E-06	88333,7698	3,510403767	92455,03664	3,481336444
1,00E-05	68417,65151	4,53226896	74048,76564	4,346690802
1,20E-05	52918,60687	5,859700711	53878,43836	5,973949845
1,40E-05	43514,41518	7,126079875	43742,41948	7,358236977
	HSA:NFX@CB[7]		HSA:NFX@CB[7]	
0,00E+00	232214,5133	1	247103,4564	1
2,00E-06	176639,8077	1,314621638	230059,1292	1,074086724
4,00E-06	173702	1,314621638	183036,6301	1,350021885
6,00E-06	128623,5826	1,805380543	139389,7181	1,772752393
8,00E-06	85466,60061	2,717020586	101179,7971	2,442221309
1,00E-05	66157,50255	3,510025384	73316,9519	3,370345465
1,20E-05	49905,07493	4,653124228	58247,75154	4,242283175

1,40E-05	45674,4212	5,08412602	45489,54194	5,432093748
	HSA:NFX@CB[8]		HSA:NFX@CB[8]	
0,00E+00	111255,7167	1	308651,3027	1
2,00E-06	92136,11991	1,207514673	229197,9	1,346658511
4,00E-06	67462,442	1,649150452	168267,8586	1,834285557
6,00E-06	52251,50088	2,129234852	129067,2928	2,391398286
8,00E-06	39262,1922	2,833660335	99568,26617	3,099896328
1,00E-05	26621,07279	4,179234909	73281,51671	4,211857458
1,20E-05	20638,68807	5,390638995	58620,59138	5,265236932
1,40E-05	16924,1556	6,57378243	42466,76604	7,268067043

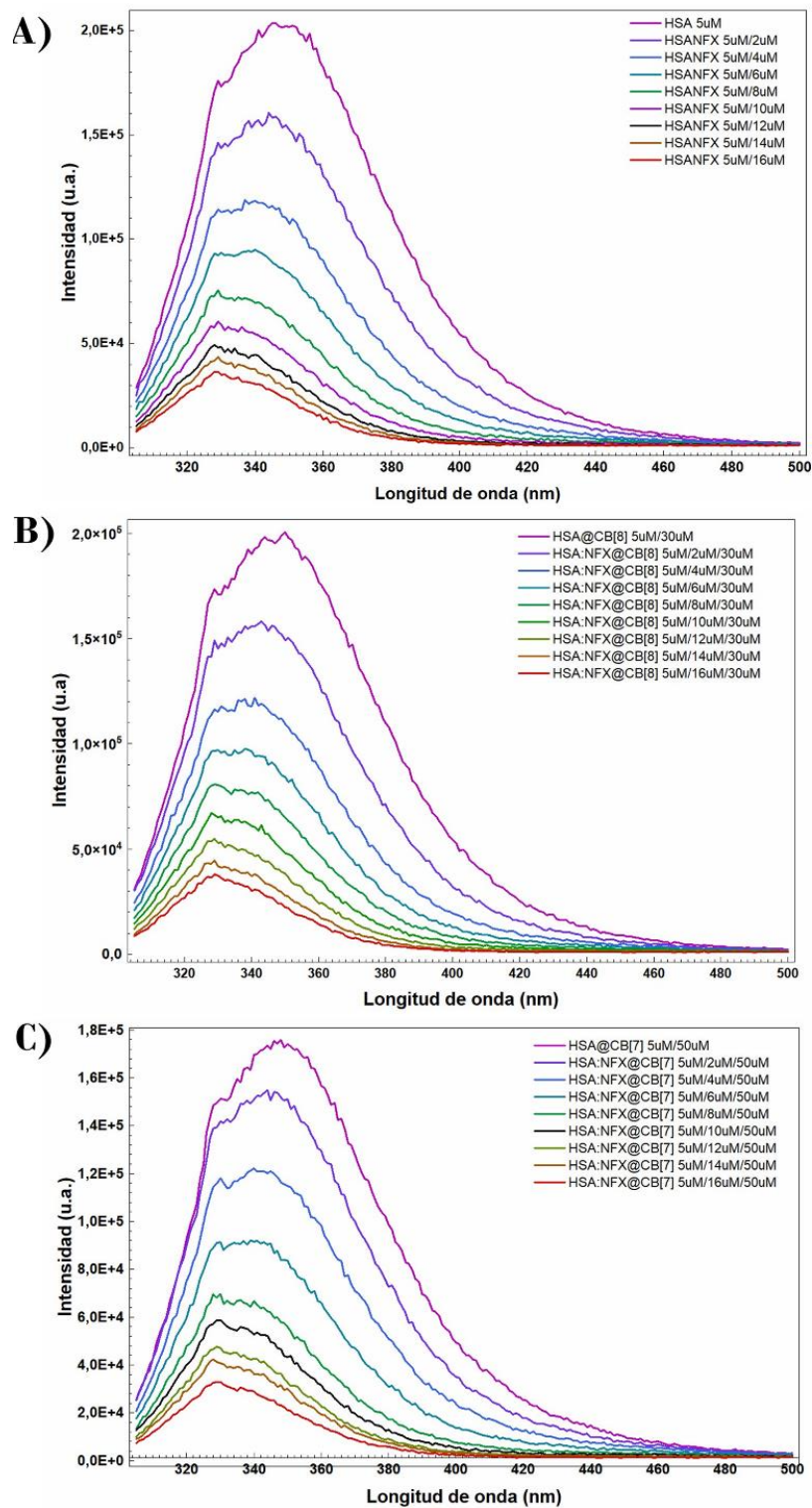
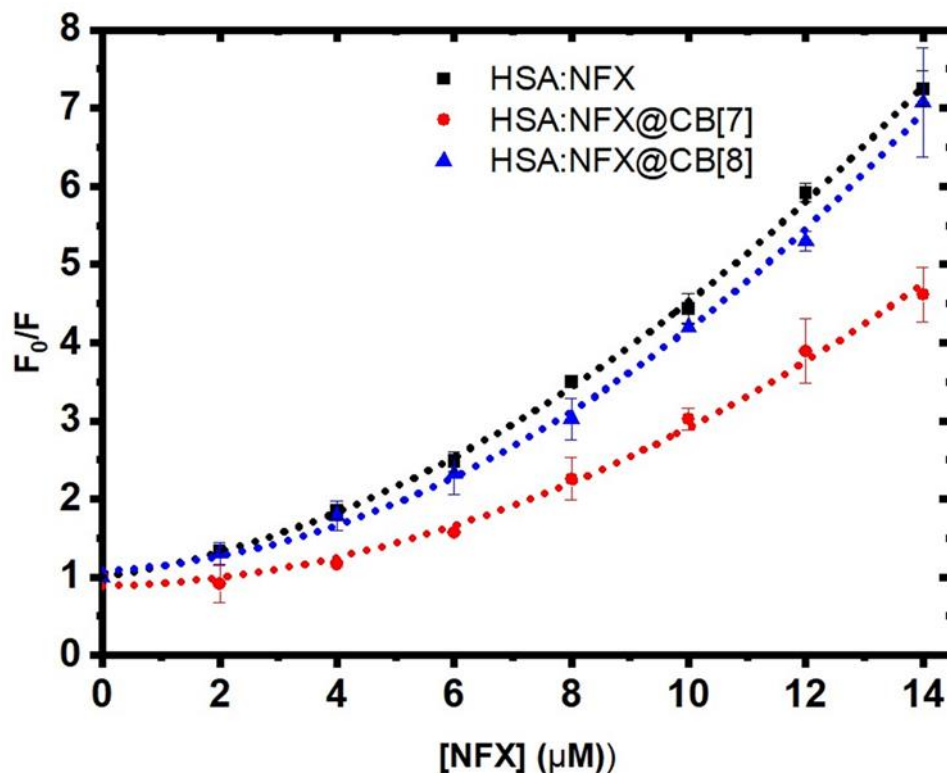


Figura 3.8 Apagamiento de la fluorescencia de HSA por NFX(A) y NFX@CB[n], n = 7(B), 8(C).

La curvatura hacia arriba tanto en NFX, NFX@CB[7] y NFX@CB[8] es indicio de que están ocurriendo ambos mecanismos (estático y dinámico) (**Gráfica 3.5**), en el **Cuadro 3.6** se presentan las ecuaciones de cada una y su coeficiente de correlación. Con vistas a que NFX es un profármaco que es biodistribuido en el cuerpo gracias a la unión con la HSA, los estudios de interacciones del complejo ternario del encapsulado de NFX unido a la HSA muestran que su biodistribución probablemente no se vea afectada por los macrociclos. Las interacciones que predominan en el complejo ternario del encapsulado de NFX con la HSA son de tipo estáticos, donde se comprueba la formación de un complejo ternario y dinámicos donde el complejo de inclusión entra y sale de la HSA, lo cual también es importante porque es necesario que se libere el complejo de inclusión en el cuerpo y tenga su actividad terapéutica.

Cuadro 3.6 Ecuaciones y coeficiente de correlación polinomial (r^2) del apagamiento de la fluorescencia de HSA por NFX y NFX@CB[n] (n = 7, 8).

	Ecuación	r^2
HSA:NFX	$y = 2,42E+10x^2 + 1,10E+05x + 1,00E+00$	0,9992
HSA:NFX@CB[7]	$y = 1,98E+10x^2 + 3,88E+04x + 9,64E-01$	0.9955
HSA:NFX@CB[8]	$y = 2,74E+10x^2 + 3,50E+04x + 1,08E+00$	0.9977



Gráfica 3.5 Apagamiento de la fluorescencia de HSA por NFX y NFX@CB[n] (n = 7, 8).

3.4.2 Estudios de fotoproductos generados en la irradiación de NFX por HPLC.

3.4.2.1 Fotoproductos generados con luz UV-A.

Cuando NFX es irradiado con luz UV-A, la molécula es fotodegradada y su espectro de absorción UV-Vis cambia y aparecen nuevos máximos de absorción en 399 y 277 nm (**Ver sección 3.3.3.1**). Estos fotoproductos fueron monitoreados por Cromatografía Líquida de Alta Precisión con detector de arreglo de diodo. En la **Figura 3.9** NFX a 400 nm (**A.1**) presenta un tiempo de elución a los 26 min con una señal de 1800 mAU, sin embargo, una vez que NFX es irradiado con luz UV-A (**A.2**), la señal disminuye prácticamente a la mitad y aparecen otras 2 señales con tiempos de retención a los 23

y 25 min que posiblemente son los fótoproductos generados producto de la irradiación. Los monitoreos de NFX a 399 **(B.1)**, 277 **(C.1)** y 274 nm **(D.1)** indican que los grupos funcionales presentes en la molécula pueden absorber a esas longitudes de onda o también puede ser que el fármaco ya presenta un proceso de degradación producto del tiempo de almacenamiento, exposición a la luz, efecto del solvente de la molécula en solución o condiciones atmosféricas. Es importante señalar que el máximo de 274 nm es propio de NFX y lo normal es que sea detectado. De igual manera NFX irradiado con luz UV-A también fue monitoreado a 399 **(B.2)**, 277 **(C.2)** y 274nm **(D.2)** donde presentan disminución de sus señales a la mitad con respecto a las señales que presenta NFX no irradiado y también presenta el mismo patrón de señales en tiempos de retención a 23 y 25 minutos como en **(A.2)**.

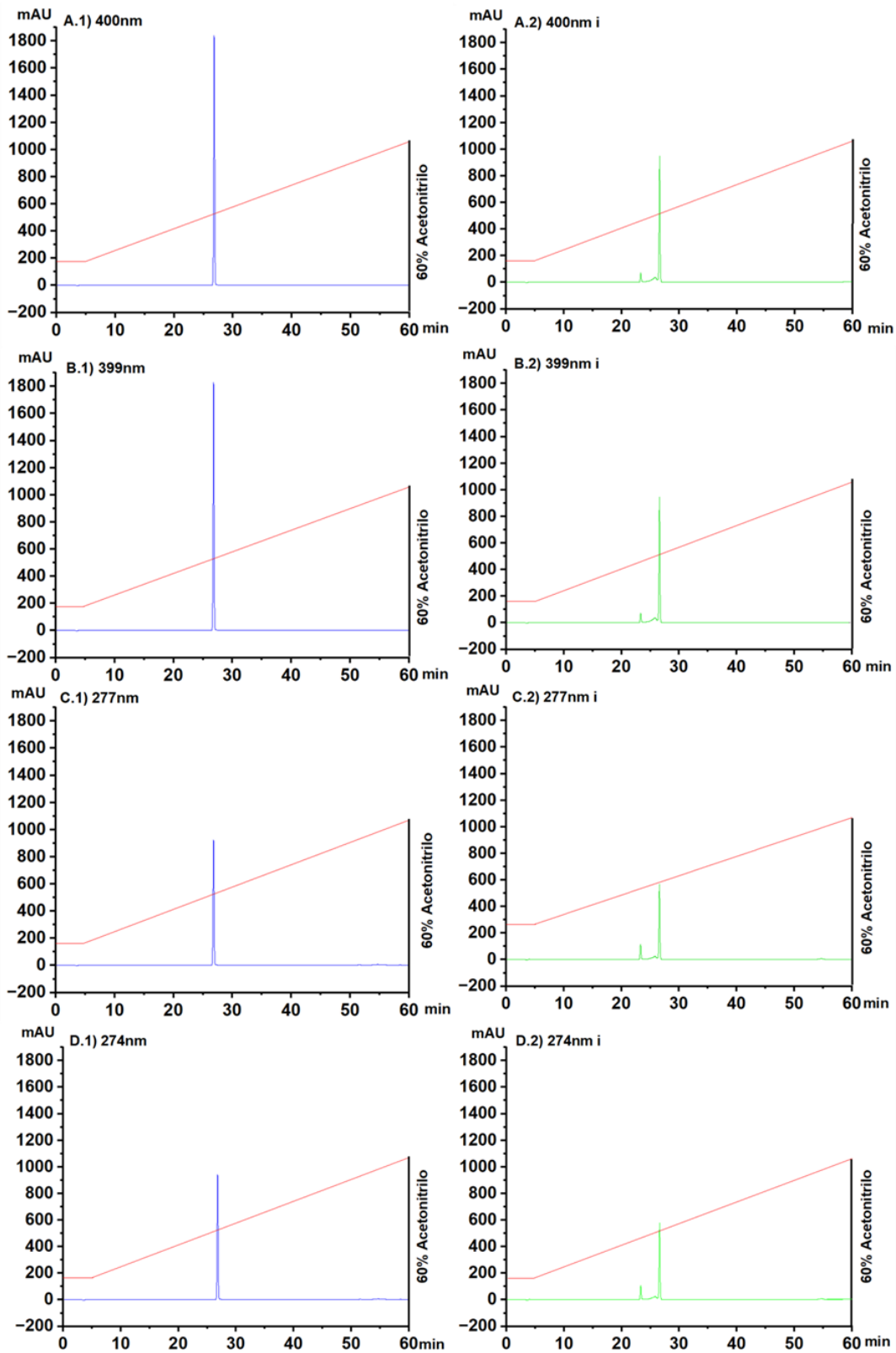


Figura 3.9 Cromatogramas de NFX monitoreado a 400 (A.1), 399 (B.1), 277 (C.1) y 274 nm (D.1) y NFX irradiado con luz UV-A monitoreado a 400 (A.2), 399 (B.2), 277 (C.2) y 274 nm (D.2).

3.4.2.2 Fotoproductos generados con luz Azul.

Cuando NFX es irradiado con luz azul, la molécula es degradada y su espectro de absorción UV-Vis cambia y aparecen nuevos máximos de absorción en 393, 319 y 231 nm (**Ver sección 3.3.3.2**). Estos fotoproductos fueron monitoreados por Cromatografía Líquida de Alta Precisión con detector de arreglo de diodo. En la **Figura 3.10** NFX a 400 nm (**A.1**) presenta un tiempo de elución a los 26 min con una señal de 1700 mAU, sin embargo, una vez que NFX es irradiado con luz azul (**A.2**) la señal disminuye aproximadamente cuatro veces y aparecen otras 2 señales con tiempos de elución a los 23 y 25 min, igual que con la luz UV-A. Los monitoreos de NFX a 393 (**B.1**), 319 (**C.1**) y 231 nm (**D.1**) indican que los grupos funcionales presentes en la molécula pueden absorber a esas longitudes de onda o también puede ser que el fármaco ya presente un proceso de degradación producto al tiempo de almacenamiento, exposición a la luz, efecto del solvente de la molécula en solución o condiciones atmosféricas. De igual manera NFX irradiado con luz azul también fue monitoreado a 393 (**B.2**), 329 (**C.2**) y 231 nm (**D.2**) donde presentan disminución de sus señales con respecto a las no irradiadas y también aparecen las señales con tiempos de retención de 23 y 25 min.

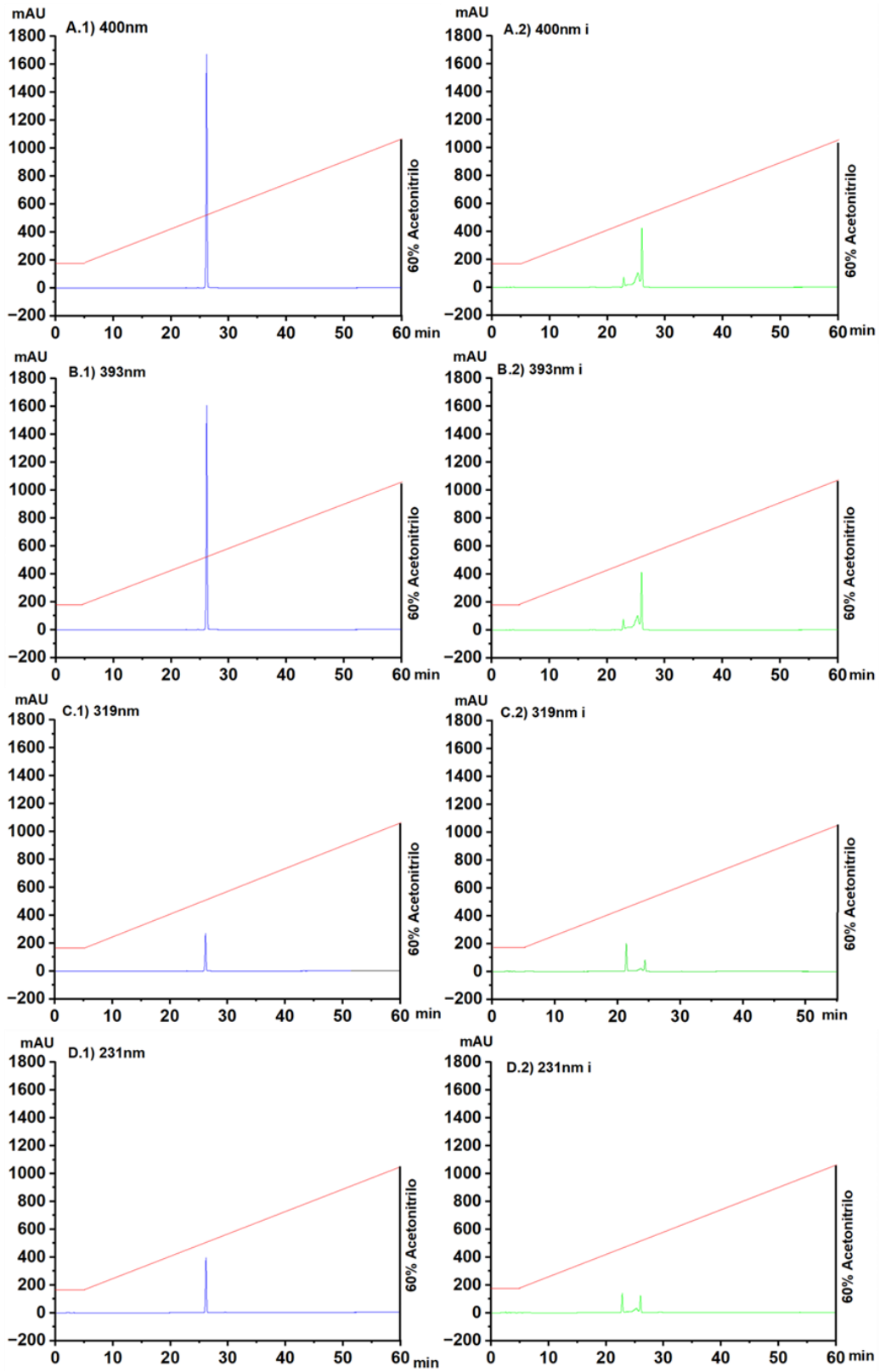


Figura 3.10 Cromatogramas de NFX monitoreado a 400 (A.1), 393 (B.1), 319 (C.1) y 231 nm (D.1) y NFX irradiado con luz azul monitoreado a 400 (A.2), 393 (B.2), 319 (C.2) y 231 nm (D.2).

La Química Supramolecular juega un papel importante en la protección de NFX del medio que la rodea. La luz UV-A tiene un máximo de absorptividad de 367 nm con una energía de 326 kJ/mol, esta energía probablemente es suficiente para fotodegradar el enlace del grupo hidrazona ($R_2C=NNR_2$) (**Figura 3.11 A**), la fotodegradación disminuye notablemente cuando la molécula se encuentra encapsulada en CB[7] y en CB[8], esto se vincula directamente a la encapsulación que protege a NFX de los efectos de la irradiación.

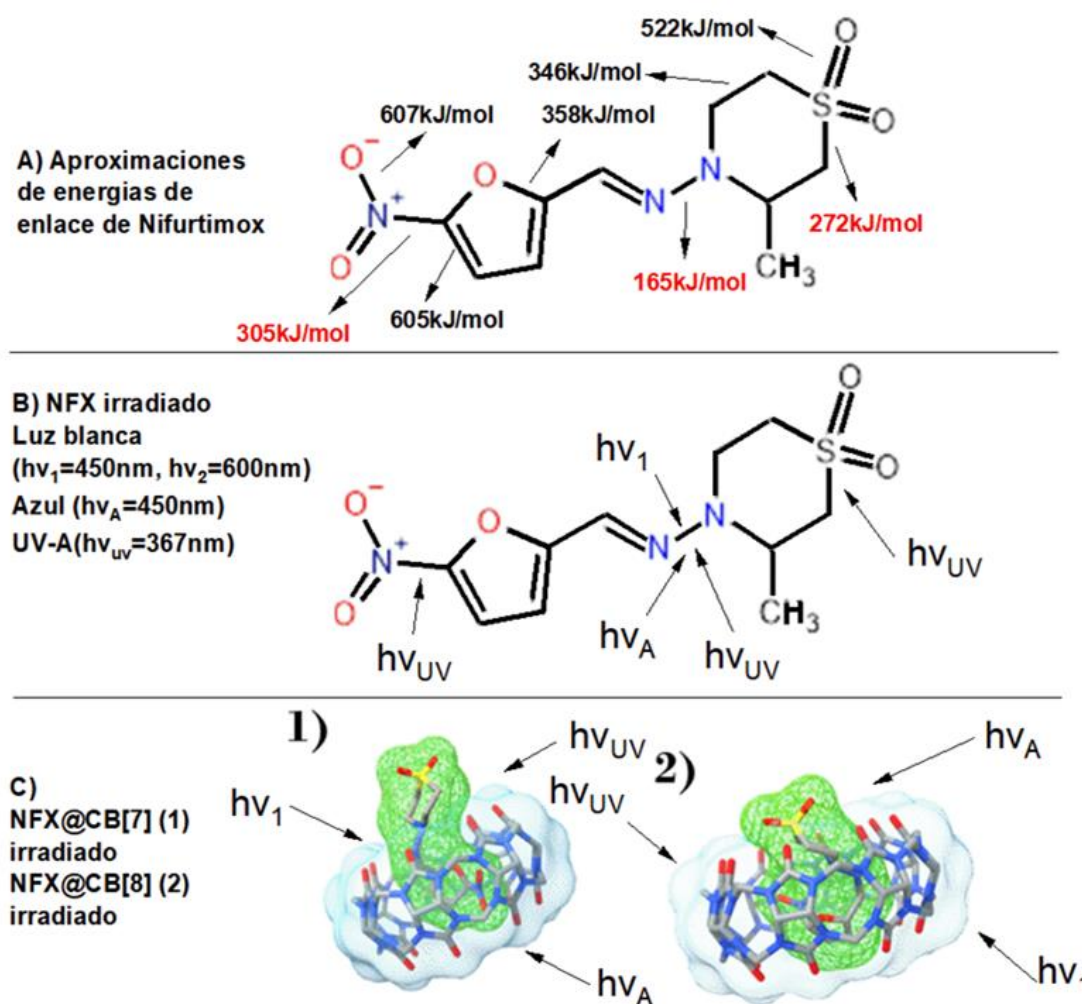


Figura 3.11 A) Energías de enlace aproximadas de NFX (Huheey, pps., 1958) B) Longitudes de onda que son usadas en la irradiación con luz blanca, azul y UV-A, C) NFX@CB[n] ($n = 7, 8$) bajo irradiación con luz blanca, azul y UV-A.

Además, los estudios de fotodegradación con luz blanca que presenta un máximo de absorptividad en 450 nm y en 600 nm con energías de 266 kJ/mol y 199 kJ/mol respectivamente. Los resultados indican que el máximo de absorptividad de 450 nm es el responsable de la fotodegradación del grupo hidrazona ($R_2C=NNR_2$) debido a que el máximo de 600 nm no cuenta con la energía suficiente para romper su enlace **(Figura 3.11 B)**. La irradiación con luz azul que cuenta con un máximo en 450 nm con energía de 266 kJ/mol pero con mayor intensidad que el máximo de la luz blanca es posible que pueda fotodegradar el enlace que une al grupo nitro con el anillo y también el enlace del grupo hidrazona **(Figura 3.11 B)**, es congruente debido a las 2 señales monitoreadas por Cromatografía Líquida de Alta Presión que fueron identificadas con tiempos de retención menores al NFX. En la **(Figura 3.11 C)** se ilustra que la encapsulación supramolecular de NFX le da protección a NFX de ser fotodegradado por la irradiación con luz azul, blanca y UV-A.

3.4.3 Ensayo de desplazamiento competitivo.

3.4.3.1 BNZ frente a NFX@CB[n] (n = 7, 8).

El complejo de inclusión de NFX@CB[n] (n = 7, 8) frente a BNZ presenta competencia por la cavidad del macrociclo, como se puede observar en la **(Figura 3.12)** donde se muestra la disminución de la absorbancia y corrimiento del máximo de 417 nm de NFX@CB[7] **(A)** hacia el azul, del mismo modo se da la disminución y corrimiento del máximo de 415 nm hacia el azul para NFX@CB[8] **(B)**. El máximo en 324 nm de BNZ aumenta con cada adición en ambos casos, **es importante tener presente que tan rápido aumente el máximo de absorción de 324 nm de BNZ por que da un indicio de la fuerza de unión a la cavidad del macrociclo.**

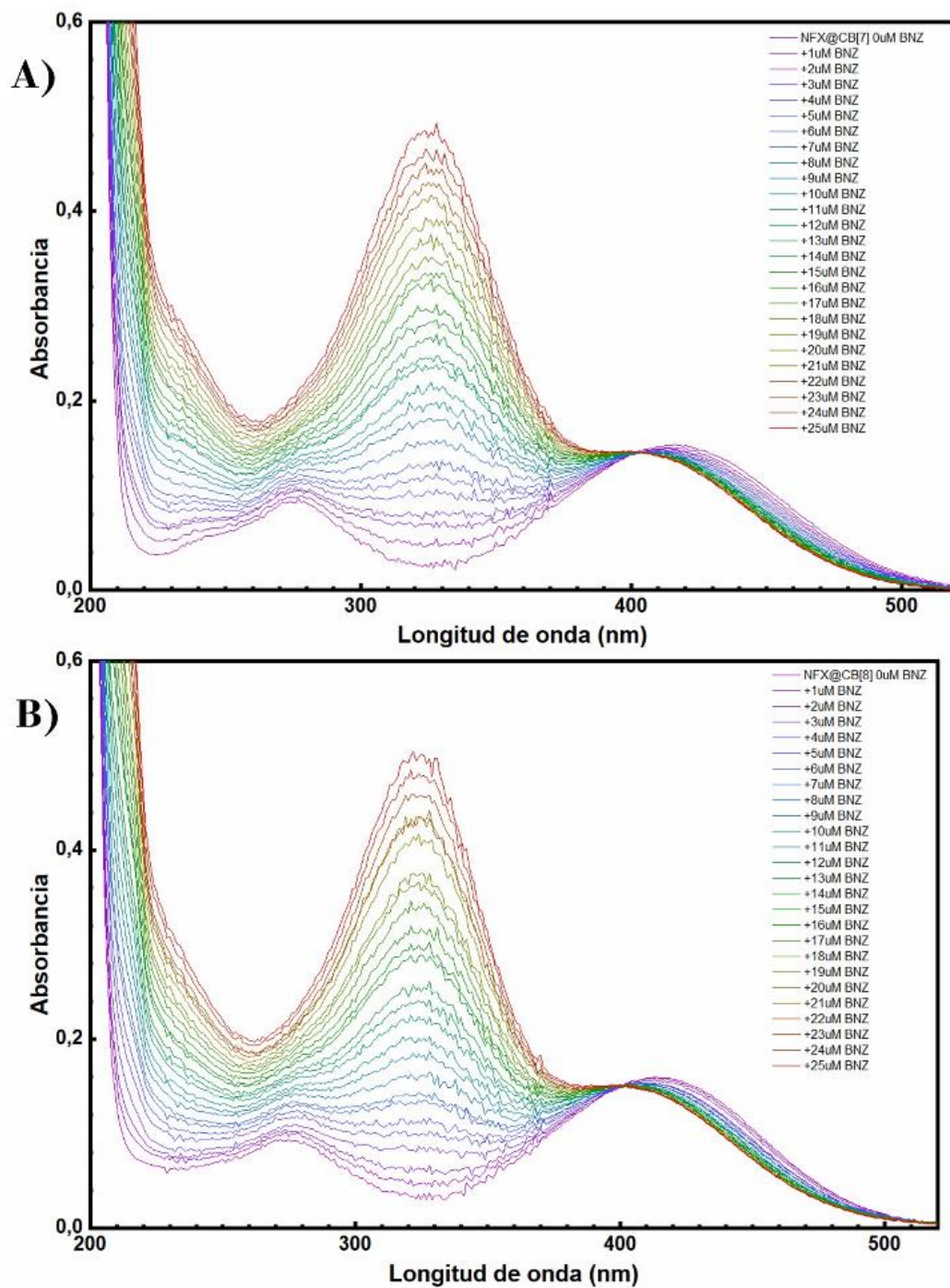


Figura 3.12 Ensayo de desplazamiento competitivo de BNZ frente a NFX@CB[n], n = 7(A), 8(B).

La calculadora de supramolecular.org arroja las constantes de asociación calculadas para ambos complejos de inclusión frente a BNZ, el **Cuadro 3.7** contiene las constantes calculadas y el error (**Ver sección 2.10.3.1**). Con estos resultados podemos señalar que la constante de asociación de BNZ no es lo suficientemente fuerte para sacar a NFX de cavidad del macrociclo por lo tanto se tiene que utilizar una molécula con una constante más fuerte para obtener una mejor aproximación de la constante aparente de NFX.

Cuadro 3.7 Constantes de asociación de BNZ frente a NFX@CB[n] (n = 7, 8).

	Constante de asociación (M ⁻¹)	Error (%)
NFX@CB[7]	5.7E+3	± 0.1091
NFX@CB[8]	2.6E+3	± 0.2237

3.4.3.2 MB frente a NFX@CB[n] (n = 7, 8).

El complejo de inclusión de NFX@CB[n] (n = 7, 8) frente a el azul de metileno presenta una competencia por la cavidad, como se puede observar en la **Figura 3.13** donde se muestra la disminución y corrimiento del máximo de 417 nm hacia el azul para NFX@CB[7] (**A**) y la disminución y corrimiento del máximo en 413 nm hacia el azul para NFX@CB[8] (**B**). Además, a medida que aumenta la concentración de MB aumenta de forma sutil el máximo en 664 nm que presenta el azul de metileno.

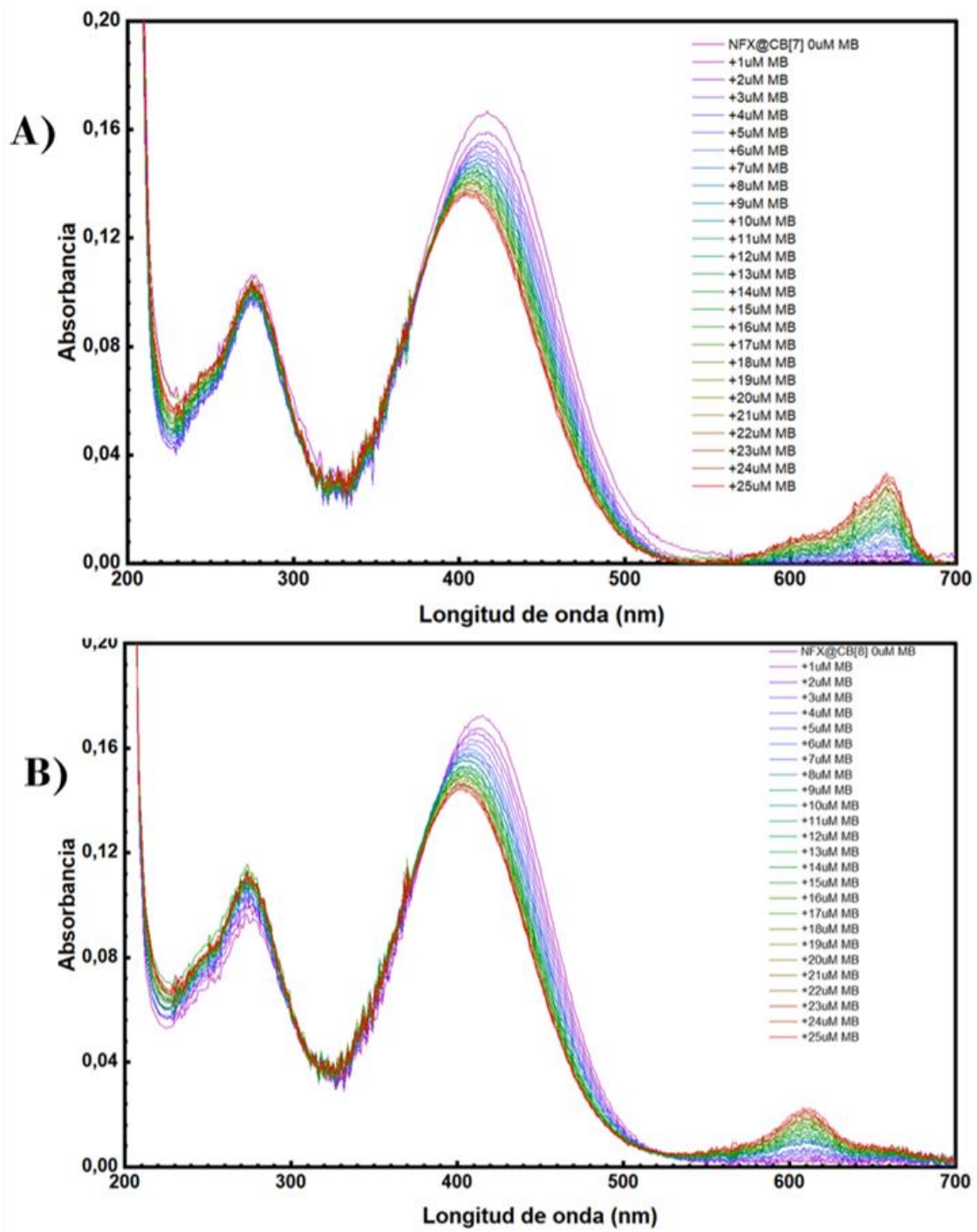


Figura 3.13 Ensayo de desplazamiento competitivo de MB frente a NFX@CB[n], n = 7(A), 8(B).

La calculadora de supramolecular.org arroja las constantes de asociación calculadas para ambos complejos de inclusión frente a MB, el **Cuadro 3.8** contiene las constantes calculadas y el error (Ver sección 3.10.3.2). El azul de metileno tiene una constante de asociación suficientemente grande para desplazar al NFX de la cavidad del macrociclo.

Cuadro 3.8 Constantes de asociación de MB frente a NFX@CB[n] (n = 7, 8).

	Constante de asociación (M ⁻¹)	Error (%)
NFX@CB[7]	2.256E+4	± 0.4178
NFX@CB[8]	6.300E+4	± 0.4518

En el **Cuadro 3.9** se muestran las constantes de asociación para BNZ, NFX y azul de metileno (MB) donde el BNZ tiene una constante de asociación similar con NFX y por eso experimentalmente no desplaza completamente de la cavidad del macrociclo a NFX porque sus constantes solamente difieren en casi un orden de magnitud. Por otra parte, el azul de metileno tiene una constante con un orden de magnitud de 7 que compite por la cavidad del macrociclo y desplaza completamente a NFX.

Cuadro 3.9 comparación de las constantes de asociación de BNZ, NFX y MB con CB[7] y CB[8].

	BNZ(K _{ITC} /M ⁻¹) ^o	NFX(K/M ⁻¹)	MB*
@CB[7]	(7.40±0.7)E+3	2.256E+4	1.26E+7
@CB[8]	(2.29±1.1)E+5	6.300E+4	1.06E+7

(*J. Robinson-Duggon et al., 2018.)(^oG. Dominguez., J. Robinson-Duggon., 2023)

Con las constantes de asociación de NFX@CB[n] con n=7,8 se puede señalar que la solubilidad de NFX en agua debería aumentar, haciendo una comparación con un estudio publicado (Bedogni, G., 2023) donde complejos de inclusión de NFX con β -ciclodextrinas tienen constantes de asociación de 236.79 M^{-1} y 359.57 M^{-1} y la solubilidad alcanza hasta $290 \mu\text{g/mL}$. El hecho de que las constantes de asociación entre Cucurbit[n]uril (n = 7, 8) con NFX sean mayores a β -ciclodextrinas y además similar a BNZ que según Dominguez (Dominguez G., 2018) mejora la solubilidad de BNZ gracias a los macrociclos, entonces podemos indicar que la solubilidad en agua debería aumentar para NFX cuando esta encapsulado en CB[7] y CB[8].

3.5 Estudios de acoplamiento molecular de NFX con CB[n] (n = 7, 8).

Para el NFX@CB[7] y NFX@CB[8] se realizaron 20 conformaciones según su afinidad y con el error raíz media cuadrática (RMSD). En la **Tabla 3.4** se presentan los datos y en la **Figura 3.14** se presenta una toma de las 20 conformaciones.

Tabla 3.4 Tabla de datos de afinidad y RMSD para 20 conformaciones de NFX@CB[n] n=7 (Izquierda), 8(Derecha).

Modos	Afinidad kcal/mol	rmsd l.b	rmsd l.u	Modos	Afinidad kcal/mol	rmsd l.b	rmsd l.u
1	-5.8	0.000	0.000	1	-6.6	0.000	0.000
2	-5.8	1.243	1.523	2	-6.5	2.948	5.737
3	-5.8	4.799	8.560	3	-6.5	2.892	5.670
4	-5.8	1.745	2.370	4	-6.4	1.787	3.150
5	-5.8	4.707	8.491	5	-6.4	1.572	3.143
6	-5.8	4.777	8.527	6	-6.3	1.849	2.345
7	-5.8	2.300	2.977	7	-6.2	1.873	2.430
8	-5.5	3.163	6.822	8	-6.1	2.670	5.294
9	-5.5	1.516	2.005	9	-6.0	1.473	1.948
10	-5.2	5.211	9.074	10	-5.9	2.734	5.764
11	-4.8	5.228	8.989	11	-5.6	3.481	6.070
12	-4.7	1.956	2.322	12	-5.6	4.008	6.855
13	-4.5	2.314	3.293	13	-5.6	3.975	6.283
14	-4.2	6.253	9.966	14	-5.5	3.005	5.175
15	-4.2	3.101	4.234	15	-5.4	2.294	3.145
16	-4.2	2.844	3.294	16	-5.3	2.210	3.324
17	-4.1	5.967	9.769	17	-5.3	2.374	2.722
18	-3.4	7.101	10.649	18	-5.3	2.781	5.964
19	-3.1	4.146	6.058	19	-5.2	2.664	3.202
20	-3.1	3.753	5.244	20	-4.9	2.819	6.410

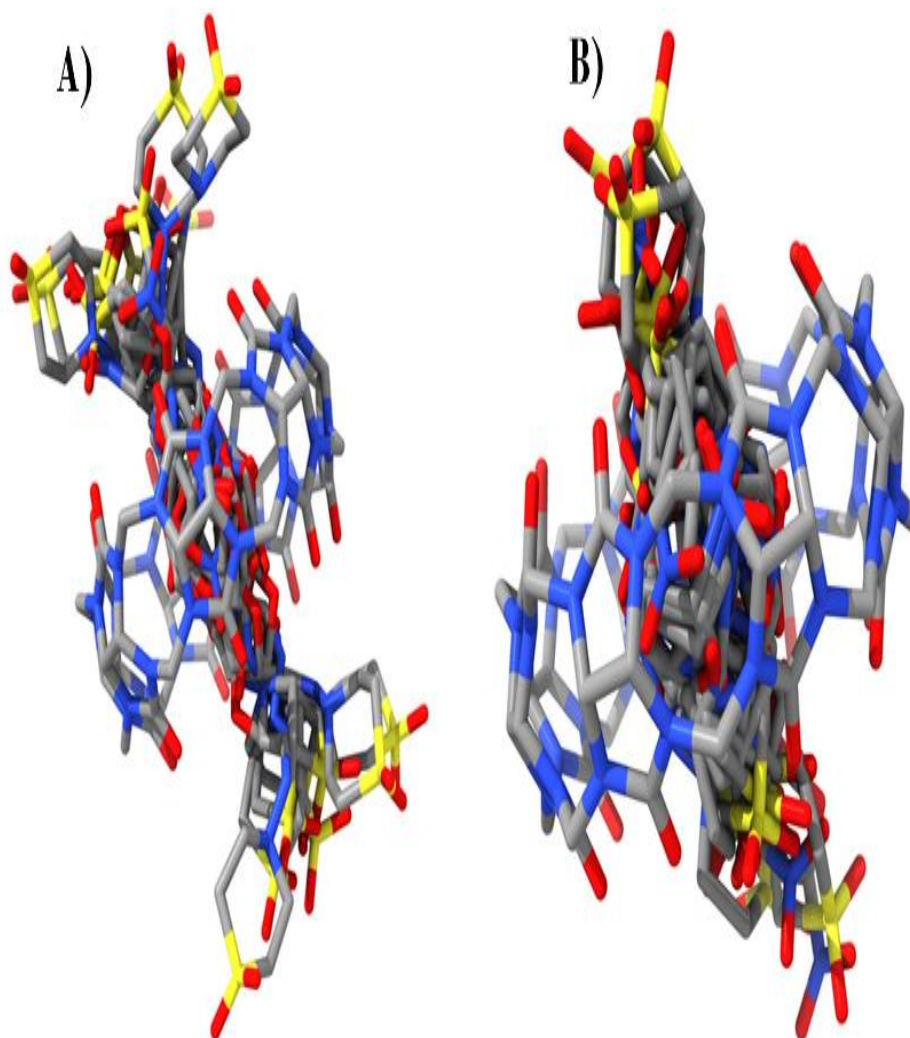


Figura 3.14 20 conformaciones posibles para NFX@CB[n] n = 7(A), 8(B).

Las configuraciones obtenidas en el histograma (**Figura 3.15**) se agruparon y se modelaron según su afinidad y energía, los modelados están en la **Figura 3.16** y **Figura 3.17**.

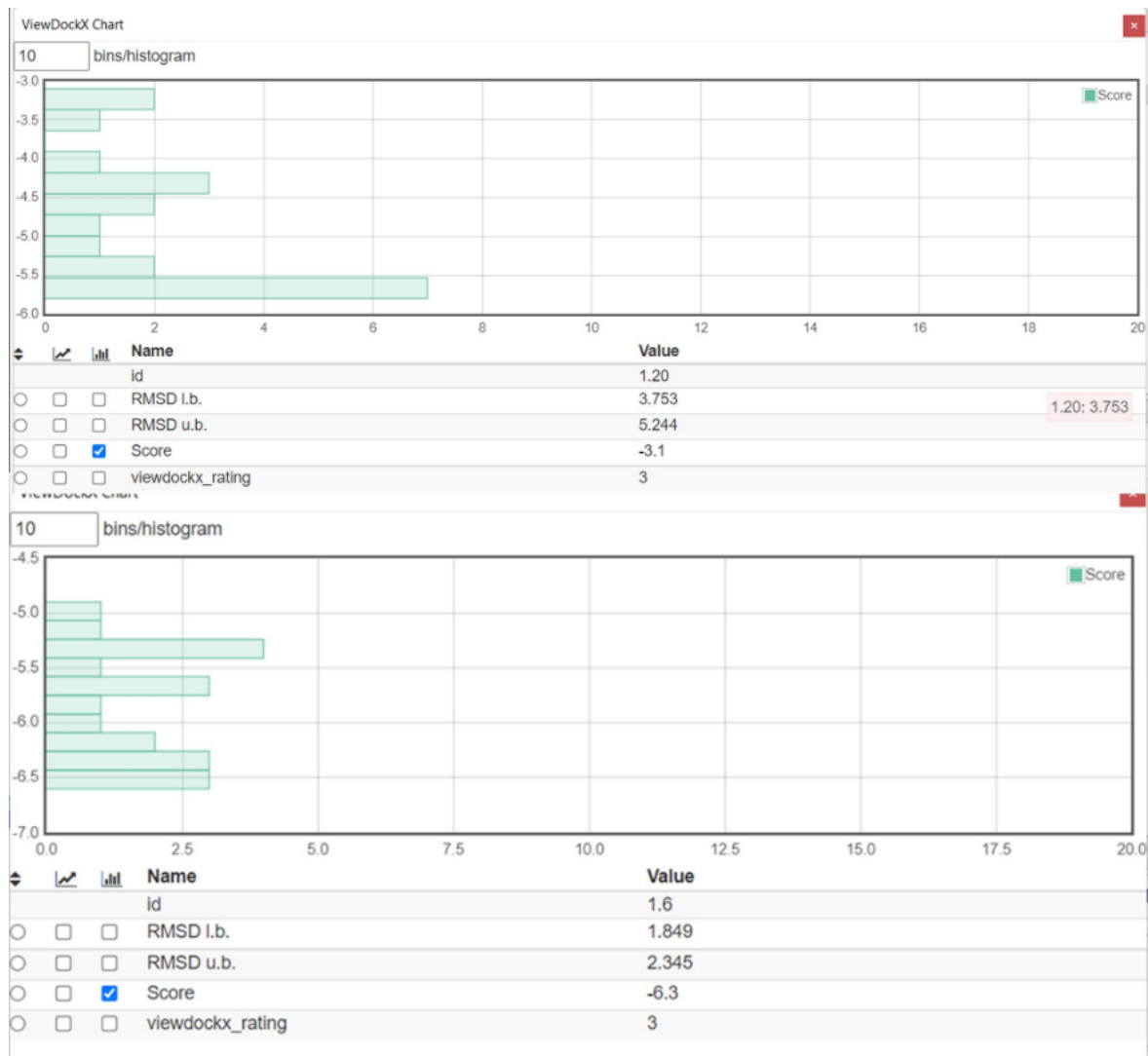


Figura 3.15 Histogramas de las 20 conformaciones posibles para NFX@CB[n], n = 7(Arriba), 8(Abajo).

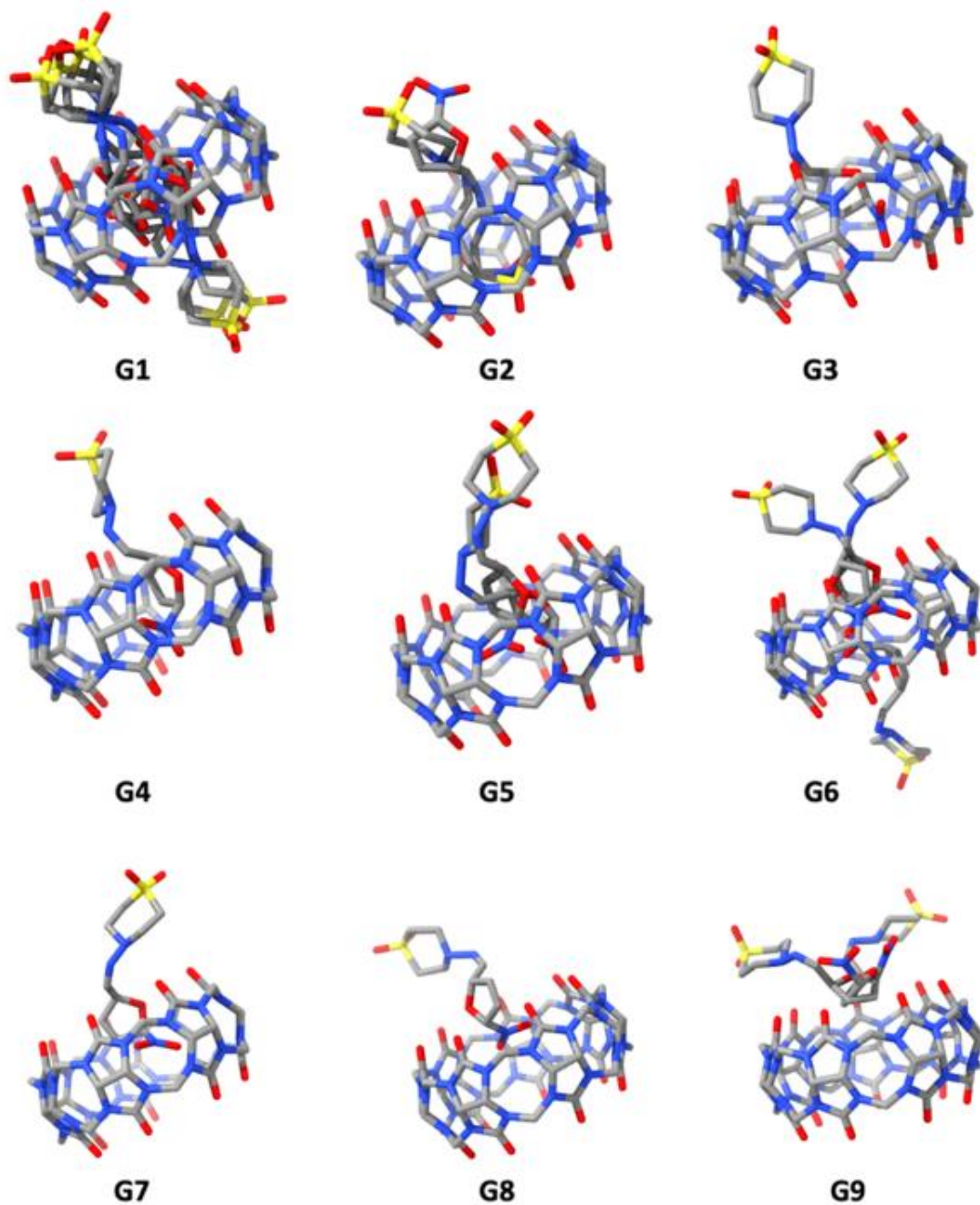


Figura 3.16 Diferentes grupos obtenidos en el histograma [grupo 1(G1) mayor afinidad, menor energía; grupo 9(G9) menor afinidad, mayor energía] para NFX@CB[7].

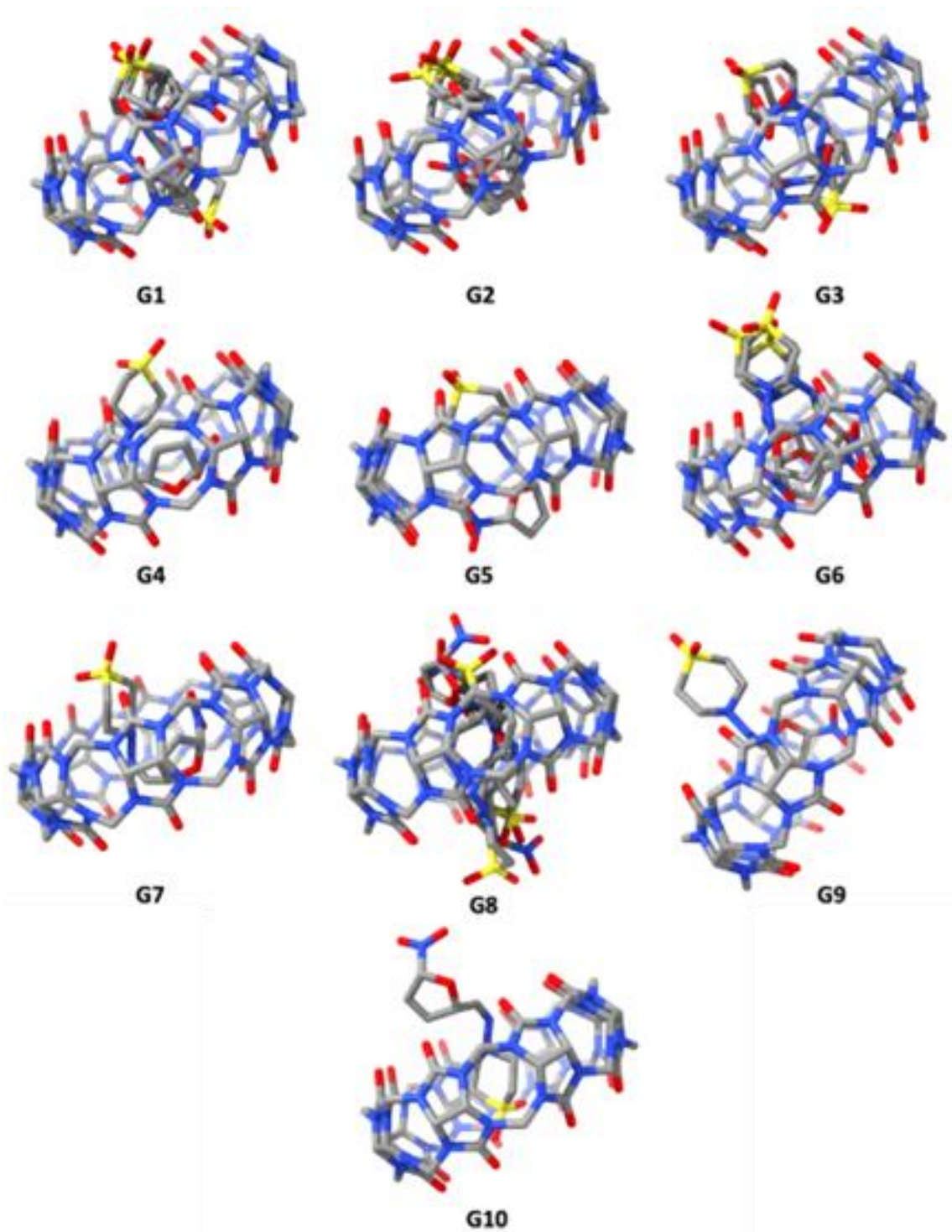


Figura 3.17 Diferentes grupos obtenidos en el histograma [grupo 1(G1) mayor afinidad, menor energía; grupo 9(G9) menor afinidad, mayor energía].

De todas las conformaciones se obtuvo la más estable, para NFX@CB[7] **Figura 3.18 (A)** y para NFX@CB[8] **Figura 3.18 (B)**.

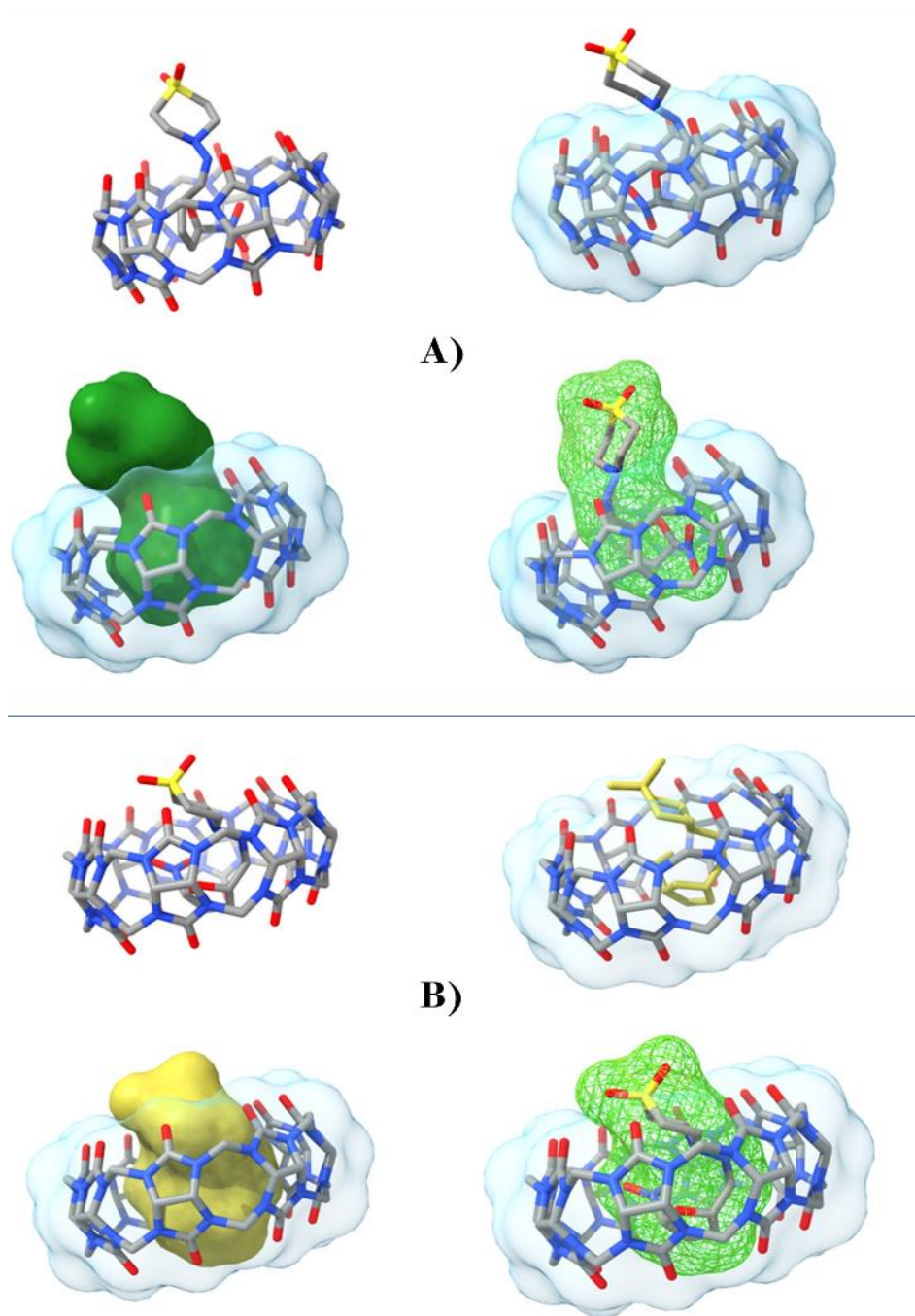


Figura 3.18 Conformación más estable para NFX@CB[n], n = 7(A), 8(B).

Conclusión

- 1- Se caracterizó fotofísicamente Nifurtimox y sus respectivos complejos de inclusión con el Cucurbit[7]urilo y Cucurbit[8]urilo. Los máximos de absorción de Nifurtimox cambian cuando se forma el complejo de inclusión con Cucurbit[7]urilo y Cucurbit[8]urilo,
- 2- Se determinaron las constantes de asociación del Nifurtimox con el Cucurbit[7]urilo y Cucurbit[8]urilo, Las constantes calculadas muestran que la asociación de Nifurtimox es mayor con Cucurbit[8]urilo y menor con Cucurbit[7]urilo.
- 3- Se observó el efecto de la encapsulación supramolecular del Nifurtimox en el Cucurbit[7]urilo y Cucurbit[8]urilo en sus propiedades acuosas. De este resultado se plantea que Nifurtimox en solución acuosa se estabiliza gracias a la presencia de Cucurbit[7]urilo y Cucurbit[8]urilo producto de la encapsulación supramolecular, lo que mejora su solubilidad en medios acuosos.
- 4- Se determinaron las estructura de los complejos de inclusión del Nifurtimox con el Cucurbit[7]urilo y Cucurbit[8]urilo. Los conformeros más estables obtenidos en el estudio de Acoplamiento Molecular Inducido muestran que el grupo sulfona de NFX queda afuera de las cavidades de los macrociclos.
- 5- Se observó el efecto de la encapsulación supramolecular del Nifurtimox en el Cucurbit[7]urilo y Cucurbit[8]urilo en la fotoestabilidad. Los resultados indican que el sistema de Nifurtimox en Cucurbit[7]urilo presentó mejor estabilidad frente a la irradiación que Nifurtimox en Cucurbit[8]urilo.

Recomendaciones

Realizar pruebas *in vitro* en células infestadas por *T.Cruzi* y evaluar la viabilidad celular en presencia de NFX, NFX@CB[7] y NFX@CB[8].

Realizar pruebas *in vitro* con células cancerígenas y evaluar la viabilidad celular en presencia de NFX, NFX@CB[7] y NFX@CB[8].

Referencias

- Álvarez-Hernández, D. A., Franyuti-Kelly, G. A., Díaz-López-Silva, R., González-Chávez, A. M., González-Hermosillo-Cornejo, D., & Vázquez-López, R. (2018). Chagas disease: Current perspectives on a forgotten disease. *Revista Médica del Hospital General de Mexico*, 81(3), 154-164.
- Annex, A. (1999). Recommendations from a satellite meeting. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 94(s1), 429-32.
- Apt, W., Heitmann, I., Jercic, M. I., Jofré, L., Noemí, I., San Martin, A. M., ... & Zulantay, I. (2008). Guías clínicas de la enfermedad de Chagas: Parte II. Enfermedad de Chagas en el adulto, la infancia y adolescencia. *Revista chilena de infectología*, 25(3), 194-199.
- Beckett, A. H., & Robinson, A. E. (1958). The Reaction of Nitrofurans with Bacteria--III. Reduction of a Series of Antibacterial Nitrofurans (Type B Compounds) by *Aerobacter aerogenes*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1(2), 155-164.
- Bedogni, G., Arrúa, E., Seremeta, K., Okulik, N., & Salomon, C. (2023). Elucidating the complexation of nifurtimox with cyclodextrins. *Journal of Molecular Liquids*, 382, 121852.
- Bern, C. (2015). Chagas' disease. *New England Journal of Medicine*, 373(5), 456-466.
- Boiani, M., Piacenza, L., Hernández, P., Boiani, L., Cerecetto, H., González, M., & Denicola, A. (2010). Mode of action of nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles

against *Trypanosoma cruzi*: is oxidative stress involved?. *Biochemical pharmacology*, 79(12), 1736-1745.

Carabarin Lima, A., González Vázquez, M. C., Baylon Pacheco, L., & Rosales Encina, J. L. (2011). *Enfermedad de Chagas: una enfermedad olvidada*.

Cerecetto, H., & González, M. (2011). Antiparasitic prodrug nifurtimox: revisiting its activation mechanism. *Future Microbiology*, 6(8), 847-850.

Chaves, O. A., Ferreira, R. C., Silva, L. S. D., de Souza, B. C., Cesarin-Sobrinho, D., Netto-Ferreira, J. C., ... & Ferreira, A. B. (2018). Multiple spectroscopic and theoretical approaches to study the interaction between HSA and the antiparasitic drugs: benznidazole, metronidazole, nifurtimox and megalol. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 29, 1551-1562.

Docampo, R., & Stoppani, A. O. (1979). Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 197(1), 317-321.

Docampo, R., & Stoppani, A. O. (1979). Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 197(1), 317-321.

Dong, N., Dong, M., Zhao, A., Zhu, Q., Tao, Z., & Zhao, Y. (2010). Preparation and characterization of inclusion complexes of antitumor camptothecin with cucurbit [n= 7, 8] urils. *Science China Chemistry*, 53, 2304-2310.

Fang, F. C. (2004). Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature Reviews Microbiology*, 2(10), 820-832.

Gavin, J. J., Ebetino, F. F., Freedman, R., & Waterbury, W. E. (1966). The aerobic degradation of 1-(5-nitrofurfurylideneamino)-2-imidazolidinone (NF-246) by *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 113(2), 399-404.

Gomez-Roman, N., McGregor, F., Wheate, N. J., & Plumb, J. A. (2015). Cucurbit [7] uril encapsulated cisplatin overcomes resistance to cisplatin induced by Rab25 overexpression in an intraperitoneal ovarian cancer model. *Journal of Ovarian Research*, 8(1), 1-10.

Guhl, F. (2009). Enfermedad de Chagas: Realidad y perspectivas. *Revista Biomedica*, 20(3), 228-234.

Haberland, A., Munoz Saravia, S. G., Wallukat, G., Ziebig, R., & Schimke, I. (2013). Chronic Chagas disease: from basics to laboratory medicine. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 51(2), 271-294.

Hall, B. S., Bot, C., & Wilkinson, S. R. (2011). Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *Journal of Biological Chemistry*, 286(15), 13088-13095.

Hettiarachchi, G., Nguyen, D., Wu, J., Lucas, D., Ma, D., Isaacs, L., & Briken, V. (2010). Toxicology and drug delivery by cucurbit [n] uril type molecular containers. *PLoS One*, 5(5), e10514.

Hibbert, D. B., & Thordarson, P. (2016). The death of the Job plot, transparency, open science and online tools, uncertainty estimation methods and other developments in supramolecular chemistry data analysis. *Chemical Communications*, 52(87), 12792-12805.

Huheey, pps. A-21 to A-34; T.L. Cottrell, "The Strengths of Chemical Bonds," 2nd ed., Butterworths, London, 1958; B. deB. Darwent, "National Standard Reference Data Series," National Bureau of Standards, No. 31, Washington, DC, 1970; S.W. Benson, J. Chem. Educ., 42, 502 (1965).

Kowalska, A., Kowalski, P., & Torres, M. Á. T. (2011). Chagas disease–american trypanosomiasis. Polish Annals of Medicine, 18(1), 156-167.

Kubata, B. K., Kabututu, Z., Nozaki, T., Munday, C. J., Fukuzumi, S., Ohkubo, K., ... & Urade, Y. (2002). A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by *Trypanosoma cruzi*. The Journal of experimental medicine, 196(9), 1241-1252.

Kuok, K. I., Li, S., Wyman, I. W., & Wang, R. (2017). Cucurbit [7] uril: an emerging candidate for pharmaceutical excipients. Annals of the New York Academy of Sciences, 1398(1), 108-119.

Liu, Q., Q. Tang, Y.-Y. Xi, et al. 2015. Interacciones huésped- huésped de tiabendazol con cucurbituril normal y modificado: ¹H NMR, solubilidad en fase y estudios de actividad antifúngica. Supramol. Chem. 27: 386-392.

Lyra, M. A., Soares-Sobrinho, J. L., Figueiredo, R. C., Sandes, J. M., Lima, A. A., Tenório, R. P., ... & Rolim-Neto, P. J. (2012). Study of benznidazole–cyclodextrin inclusion complexes, cytotoxicity and trypanocidal activity. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 73, 397-404.

Ma, W. J., Chen, J. M., Jiang, L., Yao, J., & Lu, T. B. (2013). The delivery of triamterene by cucurbit [7] uril: synthesis, structures and pharmacokinetics study. Molecular pharmaceutics, 10(12), 4698-4705.

Manne, J. M., Snively, C. S., Ramsey, J. M., Salgado, M. O., Bärnighausen, T., & Reich, M. R. (2013). Barriers to treatment access for Chagas disease in Mexico. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(10), e2488.

Mason, R. P., & Holtzman, J. L. (1975). Mechanism of microsomal and mitochondrial nitroreductase. Electron spin resonance evidence for nitroaromatic free radical intermediates. *Biochemistry*, 14(8), 1626-1632.

McCalla, D. R., Reuvers, A., & Kaiser, C. (1971). Breakage of bacterial DNA by nitrofurans derivatives. *Cancer research*, 31(12), 2184-2188.

Merino, F. J., Martínez-Ruiz, R., Olabarrieta, I., Merino, P., García-Bujalance, S., Gastañaga, T., & Flores-Chavez, M. (2013). Control de la infección por *Trypanosoma cruzi*/Enfermedad de Chagas en gestantes Latinoamericanas y sus hijos.

Miao, X., Li, Y., Wyman, I., Lee, S. M., Macartney, D. H., Zheng, Y., & Wang, R. (2015). Enhanced in vitro and in vivo uptake of a hydrophobic model drug coumarin-6 in the presence of cucurbit [7] uril. *MedChemComm*, 6(7), 1370-1374.

Montes-Navajas, P., González-Béjar, M., Scaiano, J. C., & García, H. (2009). Cucurbituril complexes cross the cell membrane. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 8(12), 1743-1747.

Moroni, A. B., Calvo, N. L., & Kaufman, T. S. (2023). Selected Aspects of the Analytical and Pharmaceutical Profiles of Nifurtimox. *Journal of Pharmaceutical Sciences*.

Moroni, A. B., Mayoral, E. P., Lionello, D. F., Vega, D. R., Kaufman, T. S., & Calvo, N. L. (2023). Solid-state properties of Nifurtimox. Preparation, analytical characterization,

and stability of an amorphous phase. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 184, 25-35.

Ozdemir, F. A., Demirata, B., & Apak, R. (2009). Adsorptive removal of methylene blue from simulated dyeing wastewater with melamine-formaldehyde-urea resin. *Journal of applied polymer science*, 112(6), 3442-3448.

Paço, J., & Vilhena de Mendonça, F. (2011). *Patologia da cavidade bucal, faringe e laringe na prática clínica: guia de diagnóstico e tratamento*.

Pérez de Ayala Balzola, A., Pérez-Molina, J. A., Navarro Beltrá, M., & López-Vélez, R. (2009). Enfermedad de Chagas en personas procedentes de Latinoamérica residentes en España. *Ministerio de Sanidad y Política Social*, 1-84.

Peterson, F. J., Mason, R. P., Hovsepian, J., & Holtzman, J. L. (1979). Oxygen-sensitive and-insensitive nitroreduction by *Escherichia coli* and rat hepatic microsomes. *Journal of Biological Chemistry*, 254(10), 4009-4014.

Petravicius, P. O., Costa-Martins, A. G., Silva, M. N., Reis-Cunha, J. L., Bartholomeu, D. C., Teixeira, M. M., & Zingales, B. (2019). Mapping benznidazole resistance in trypanosomatids and exploring evolutionary histories of nitroreductases and ABCG transporter protein sequences. *Acta tropica*, 200, 105161.

Plumb, J. A., Venugopal, B., Oun, R., Gomez-Roman, N., Kawazoe, Y., Venkataramanan, N. S., & Wheate, N. J. (2012). Cucurbit [7] uril encapsulated cisplatin overcomes cisplatin resistance via a pharmacokinetic effect. *Metallomics*, 4(6), 561-567.

Priotto, G., Kasparian, S., Mutombo, W., Ngouama, D., Ghorashian, S., Arnold, U., ... & Kande, V. (2009). Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial. *The Lancet*, 374(9683), 56-64.

Priotto, Gerardo, et al. "Three drug combinations for late-stage *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness: a randomized clinical trial in Uganda." *PLoS clinical trials* 1.8 (2006): e39.

Sholler, G. L. S., Brard, L., Straub, J. A., Dorf, L., Illeyne, S., Koto, K., ... & Nishi, R. (2009). Nifurtimox induces apoptosis of neuroblastoma cells in vitro and in vivo. *Journal of pediatric hematology/oncology*, 31(3), 187-193.

Sholler, G. L. S., Kalkunte, S., Greenlaw, C., McCarten, K., & Forman, E. (2006). Antitumor activity of nifurtimox observed in a patient with neuroblastoma. *Journal of pediatric hematology/oncology*, 28(10), 693-695.

Sinn, S., Krämer, J., & Biedermann, F. (2020). Teaching old indicators even more tricks: binding affinity measurements with the guest-displacement assay (GDA). *Chemical communications*, 56(49), 6620-6623.

Streeter, A. J., & Hoener, B. A. (1988). Evidence for the involvement of a nitrenium ion in the covalent binding of nitrofurazone to DNA. *Pharmaceutical research*, 5, 434-436.

Swaminathan, S., & Bryan, G. T. (1984). Biotransformation of the Bladder Carcinogen N-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl] formamide in Mice. *Cancer research*, 44(6), 2331-2338.

Teixeira, A. R., Hecht, M. M., Guimaro, M. C., Sousa, A. O., & Nitz, N. (2011). Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clinical microbiology reviews*, 24(3), 592-630.

Thordarson, P. (2011). Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry. *Chemical Society Reviews*, 40(3), 1305-1323.

Thordarson, P. (2011). Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry. *Chemical Society Reviews*, 40(3), 1305-1323.

Ventura-Garcia, L., Roura, M., Pell, C., Posada, E., Gascon, J., Aldasoro, E., ... & Pool, R. (2013). Socio-cultural aspects of Chagas disease: a systematic review of qualitative research. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(9), e2410.

Viodé, C., Bettache, N., Cenas, N., Krauth-Siegel, R. L., Chauvière, G., Bakalara, N., & Périé, J. (1999). Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles. *Biochemical pharmacology*, 57(5), 549-557.

Wilkinson, S. R., Taylor, M. C., Horn, D., Kelly, J. M., & Cheeseman, I. (2008). A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(13), 5022-5027.

Yao, Y. Q., Chen, K., Hua, Z. Y., Zhu, Q. J., Xue, S. F., & Tao, Z. (2017). Cucurbit [n] uril-based host-guest-metal ion chemistry: an emerging branch in cucurbit [n] uril chemistry. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 89, 1-14.

Yi, S., & Kaifer, A. E. (2011). Determination of the Purity of Cucurbit [n] uril (n= 7, 8) Host Samples. *The Journal of Organic Chemistry*, 76(24), 10275-10278.

Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R. D. S., Campbell, D. A., Chiari, E., Fernandes, O., ... & Schijman, A. G. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 1051-1054.

Anexos

Apéndice A: Abreviaciones

ACN- Acetonitrilo

BNZ@CB[7]-Complejo de inclusión entre el CB[7] y el BNZ

BNZ@CB[8]-Complejo de inclusión entre el CB[8] y el BNZ

BNZ-Benznidazol

CB[7]-Cucurbit[7]uril

CB[8]-Cucurbit[8]uril

DMSO-Dimetilsulfoxido

HSA:NFX@CB[7]-Complejo ternario entre la HSA y NFX@CB[7]

HSA:NFX@CB[8]-Complejo ternario entre la HSA y NFX@CB[8]

HSA-Seroalbúmina humana

HSA-Seroalbúmina humana

MB@CB[7]-Complejo de inclusión entre el CB[7] y el MB

MB@CB[8]-Complejo de inclusión entre el CB[8] y el MB

MB-Azul de metileno

NFX@CB[7]-Complejo de inclusión entre el CB[7] y el NFX

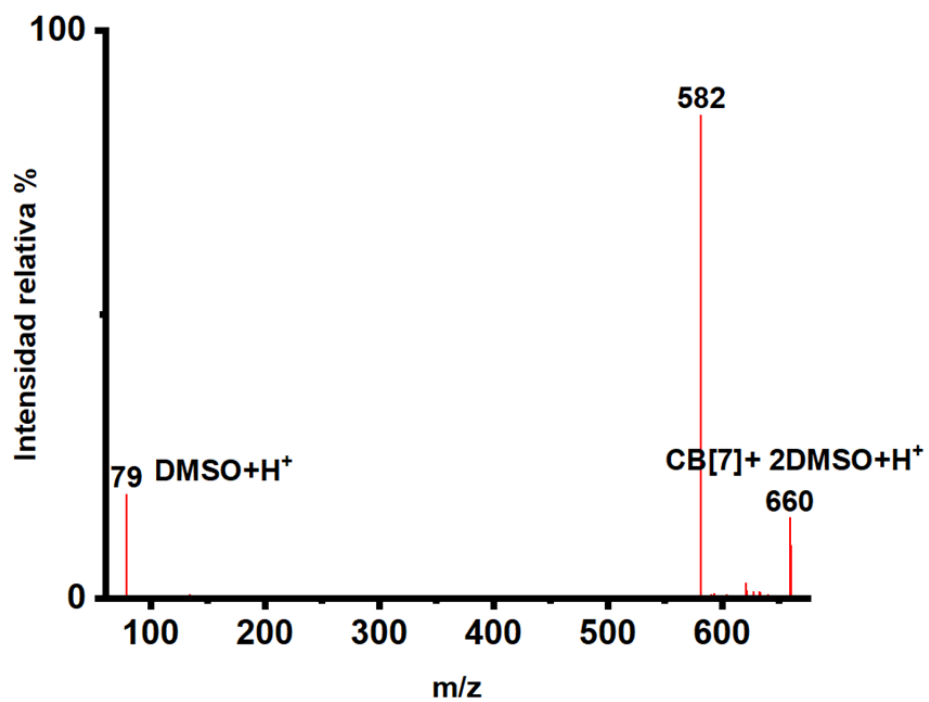
NFX@CB[8]-Complejo de inclusión entre el CB[8] y el NFX

NFX-Nifurtimox

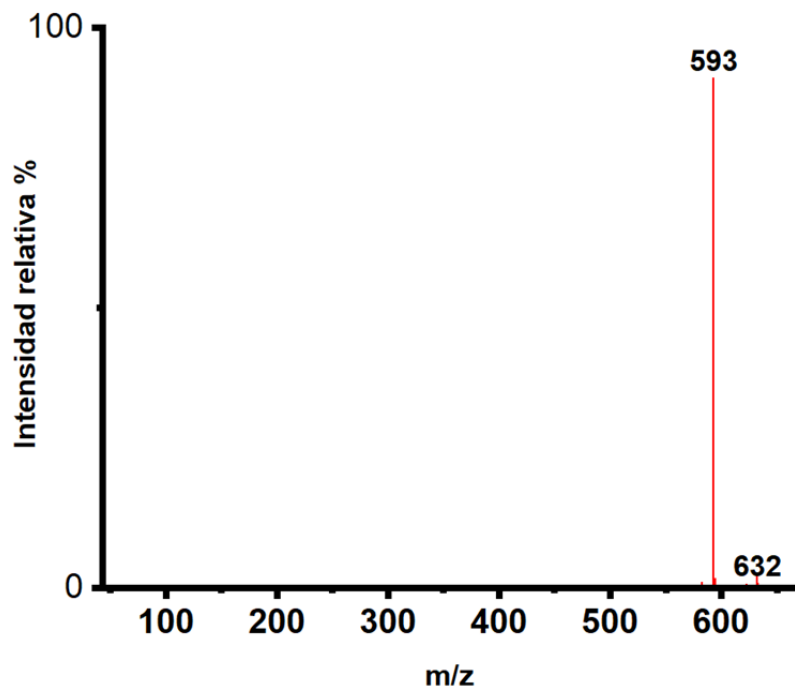
THF- Ácido trifluoroacético

λ -Longitud de onda máxima

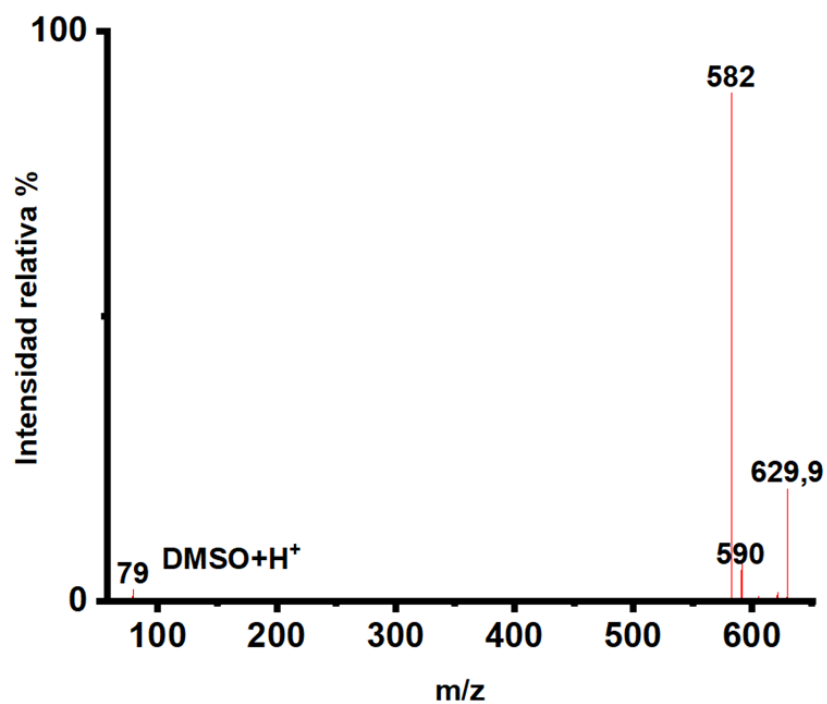
Apéndice B: Espectros de masas de la sección 4.1.4



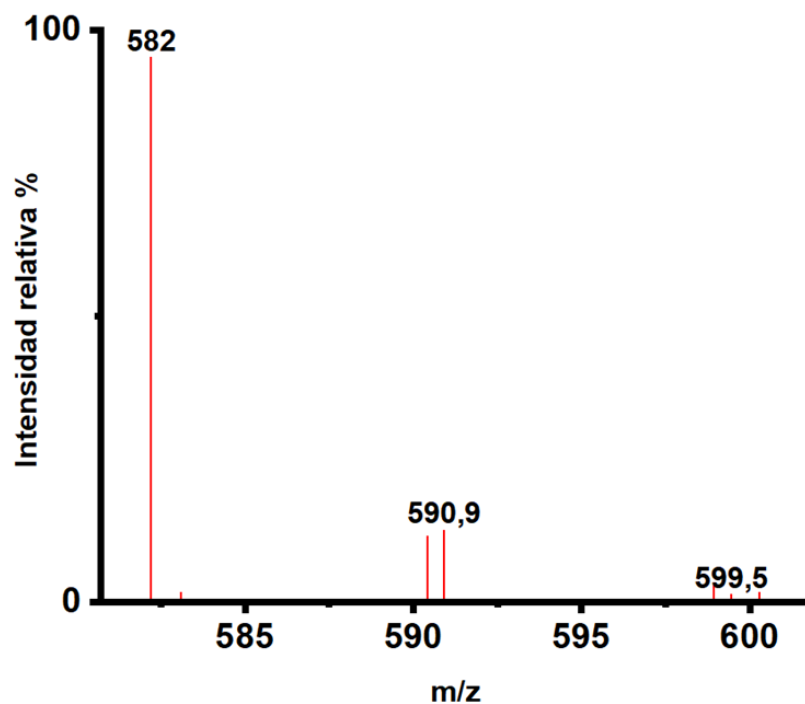
Espectro 0.1 Espectro de masas (MS/MS) de m/z 660.



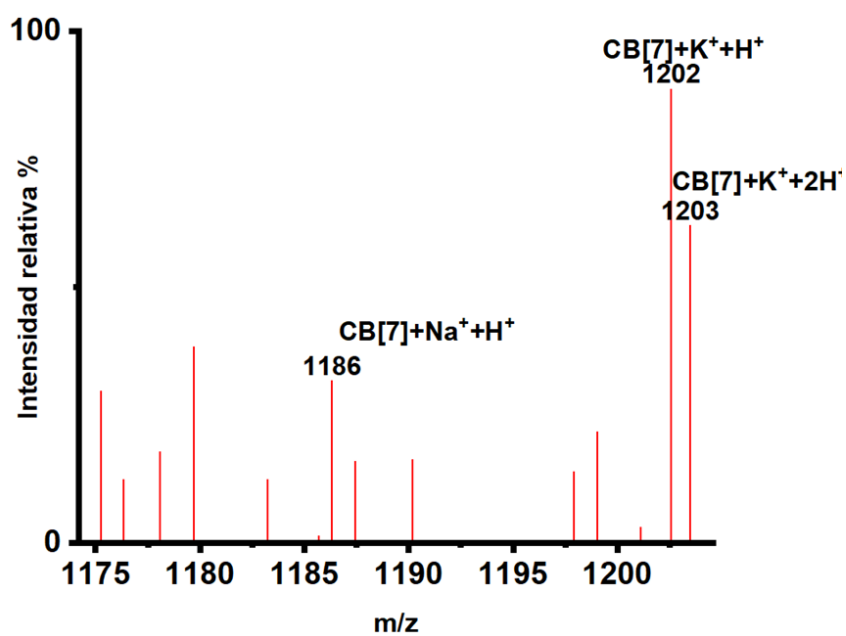
Espectro 0.2 Espectro de masas (MS/MS) de m/z 632.



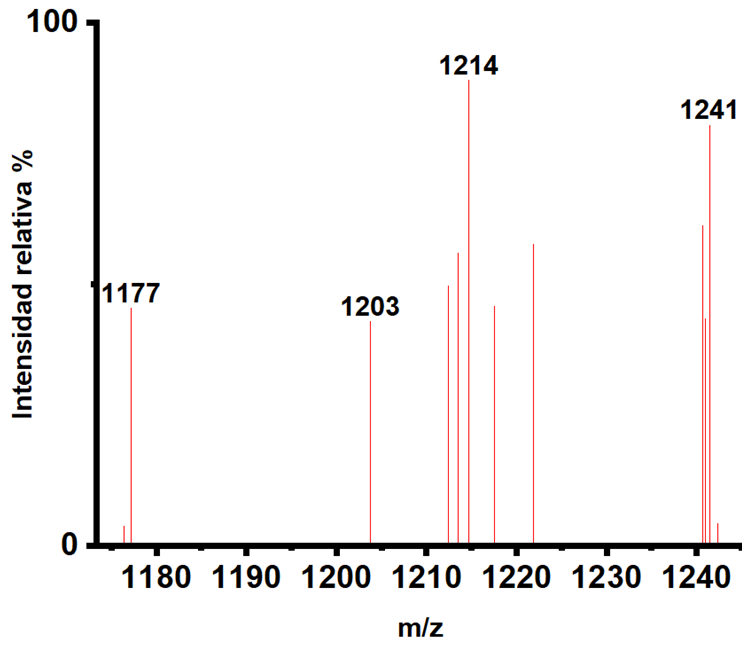
Espectro 0.3 Espectro de masas MS/MS de m/z 630.



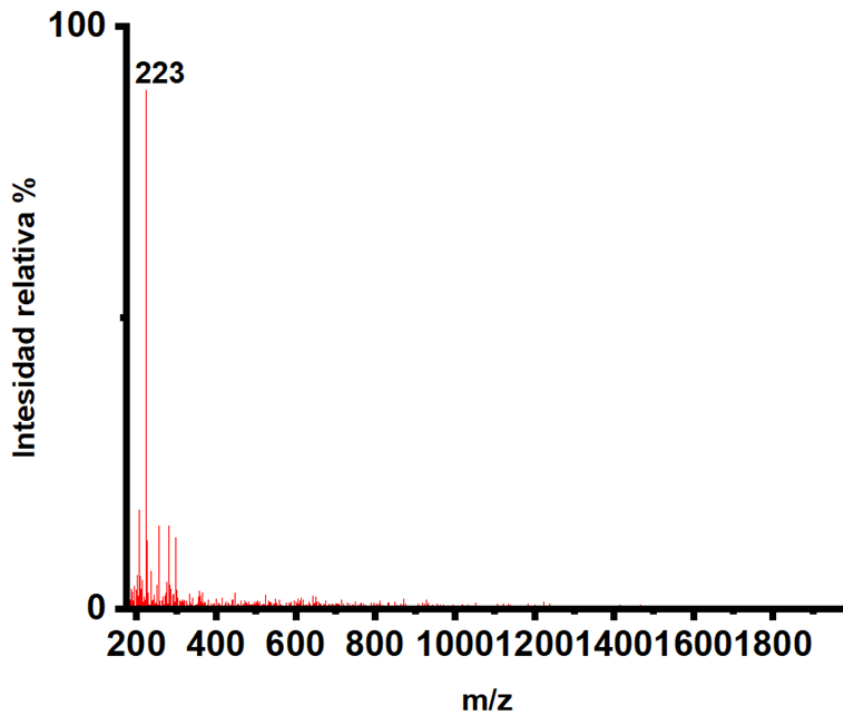
Espectro 0.4 Espectro de masas (MS/MS) de m/z 599.



Espectro 0.5 Espectro de masas MS/MS de m/z 1203.



Espectro 0.6 Espectro de masas (MS/MS) de m/z 1241.



Espectro 0.7 Espectro de masas del agua