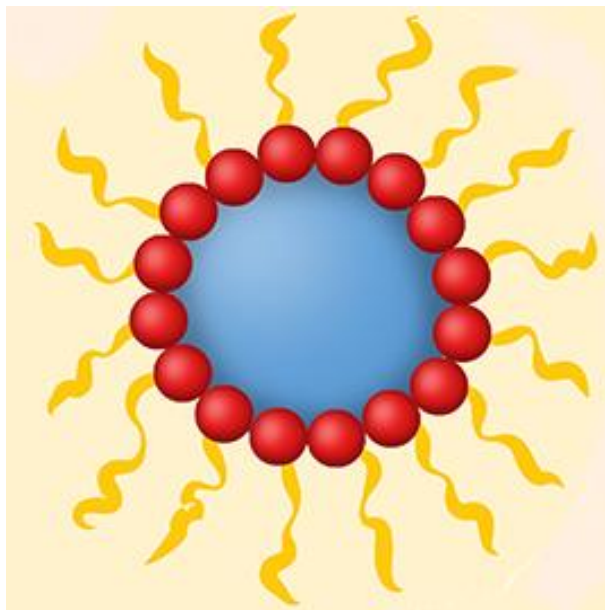




UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Farmacia

Preparación de Polímeros Auto-ensamblables. Nanopartículas Micelares



Nieves Iglesias Blanco



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Farmacia

Grado en Farmacia

Trabajo Fin de Grado

(Experimental)

Preparación de Polímeros Auto-ensamblables. Nanopartículas Micelares

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica

Tutoras: María Violante de Paz Báñez

Elsa Galbis Fuster

Alumna: Nieves Iglesias Blanco

Sevilla, Julio 2016

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer, en primer lugar, a mi tutora Viola, sin ella no hubiese podido llevar a cabo este trabajo. Le doy las gracias no sólo por enseñarme, sino por preocuparse por mí, animarme, aconsejarme y tratarme de la manera que lo ha hecho todo este tiempo.

Agradecer también, a mi otra tutora, Elsa, que siempre ha estado ahí para ayudarme en todo lo posible y para amenizarme el trabajo.

Así mismo, doy las gracias a todo el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla por haberme tratado desde el primer momento como una integrante más.

Finalmente, agradecer a mis padres, hermana y Fran, por todo el apoyo recibido durante todos mis años de carrera y por confiar en mí incluso cuando ni yo misma lo hacía.

RESUMEN

Actualmente existen numerosas enfermedades que ponen en peligro la salud de la población y en paralelo, han entrado en juego distintas estrategias terapéuticas para combatirlas. Como en numerosas ocasiones, la naturaleza ha servido de inspiración: dado que la respuesta a estímulos es un proceso básico de los sistemas vivos, se han diseñado materiales que respondan a estímulos externos como son cambios en la temperatura, el pH, la luz, el campo eléctrico, la presencia o no de determinados productos químicos y la fuerza iónica. Estas respuestas se manifiestan en cambios drásticos, como por ejemplo, modificaciones en las características de superficie, solubilidad, auto-ensamblaje molecular o transiciones gel-sol.

Este fascinante comportamiento “estímulo-respuesta” presente en los polímeros “inteligentes” ha impulsado el desarrollo de nuevas aplicaciones en distintos campos como la biomedicina. Así, se están estudiando en profundidad las aplicaciones de dichos materiales en la vectorización terapéutica, la ingeniería de tejidos, sensores etc. y numerosos artículos y patentes evidencian el rápido progreso en este área (Ferris y cols., 2014; Jeong, Gutowska, 2002; Ma, Tian, 2014; Roy y cols., 2013).

El objetivo científico-técnico que se plantea en esta Memoria es la preparación de polímeros con interés, como biomateriales en biomedicina y farmacia, mediante síntesis total a partir de monómeros comerciales fácilmente asequibles para la formación de sistemas de liberación de fármacos vectorizados y sensibles a estímulos externos. Se estudiará el auto-ensamblaje de los mismos en nanopartículas capaces de incorporar moléculas pequeñas o agentes terapéuticos.

Se trata, por tanto, de un trabajo que proyecta la obtención de suspensiones de nanopartículas orgánicas capaces de transportar cantidades suficientes de fármacos para ejercer su acción terapéutica bajo el estímulo adecuado.

Palabras clave: ATRP, DDS (“Drug Delivery System”), Micelas, Nanopartículas, Reacción click.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	5
2.	OBJETIVOS	12
3.	METODOLOGÍA.....	13
3.1.	Procedimientos generales	13
3.2.	Procedimientos de síntesis	15
3.2.1.	Síntesis de copolímeros	15
3.2.2.	Síntesis de 1,8-dimaleimida-3,6-dioxaoctano (DMDOO)	16
3.2.3.	Formación de nanopartículas micelares mediante proceso de auto-ensamblaje.....	16
3.2.4.	Entrecruzamiento del núcleo micelar	17
3.3.	Caracterización de las nanopartículas auto-ensambladas. Determinación de la concentración crítica micelar (CMC)	18
3.4.	Carga micelar de molécula lipófila: pireno. Curva de calibrado (espectroscopía de fluorescencia)	18
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
4.1.	Preparación de nanopartículas estables basadas en copolímeros de bloque anfifílicos.....	20
4.1.1.	Síntesis de copolímeros de bloque que contienen furano y de agentes entrecruzantes.....	20
4.1.2.	Formación de NP micelares en medio acuoso	21
4.1.3.	Estabilización de NP por reacciones de entrecruzamiento en el núcleo micelar	23
4.2.	Caracterización de las nanopartículas auto-ensambladas	25
4.2.1.	Determinación de la Concentración crítica micelar (CMC)	25
4.2.2.	Estudios de tamaño, distribución y geometría de NP. Estabilidad de las NP	26
4.3.	Carga micelar de molécula lipófila modelo: pireno.....	32
5.	TRABAJO POR FINALIZAR.....	35
6.	CONCLUSIONES.....	36
7.	BIBLIOGRAFÍA	37

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Vivimos en la era de los polímeros. Dicho término engloba una gran variedad de materiales tanto naturales como sintéticos, algunos de ellos tan conocidos como la celulosa, el almidón, las proteínas, el nailon, los plásticos, los cauchos, las pinturas, los adhesivos, etc. (Areizaga y cols., 2002).

El proceso químico por el cual ciertas moléculas pequeñas (monómeros) pueden reaccionar entre sí para dar una macromolécula con una constitución más o menos repetitiva, se conoce como **polimerización**. Así, los polímeros son macromoléculas compuestas por una o varias unidades constitucionales repetitivas (UCR), (Stevens, 1999). Existen diversas clasificaciones de polímeros en base a distintos criterios. En primer lugar, podemos distinguir entre **homopolímeros**, cuando el polímero está formado por una sola UCR y **copolímeros**, si por el contrario, el polímero está constituido por más de una UCR (**Ilustración 1**).

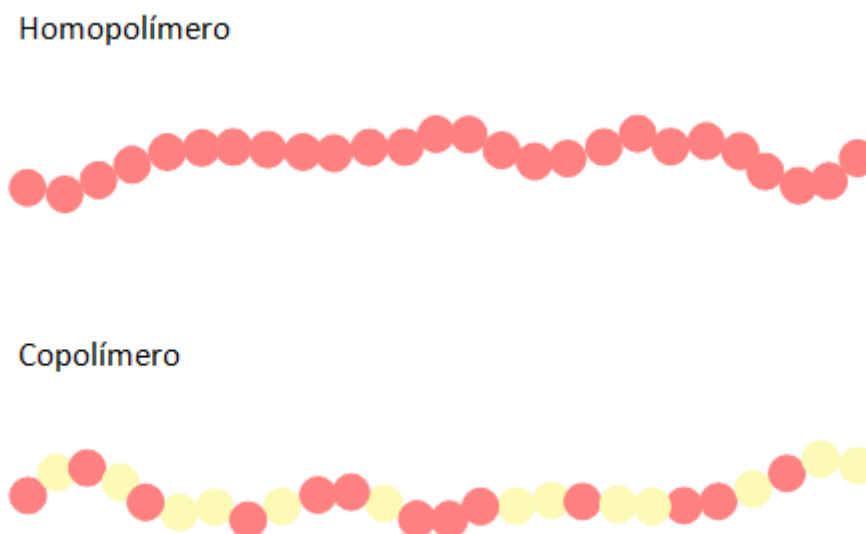


Ilustración 1. Estructura de un homopolímero y de un copolímero

Los copolímeros pueden clasificarse a su vez en base a la distribución de las unidades repetitivas dentro del polímero (**Ilustración 2**): **copolímeros alternantes**, si las UCR se alternan a lo largo de la cadena lineal; **copolímeros al azar**, si las UCR se distribuyen aleatoriamente; **copolímeros de bloque**, si las unidades constitucionales se encuentran agrupadas entre sí, formando bloques; y por último, **copolímeros de injerto**, si la cadena principal está formada por un solo tipo de UCR y las cadenas laterales por otro (Stevens, 1999).

Copolímero alternante



Copolímero al azar



Copolímero de bloques



Copolímero de injerto

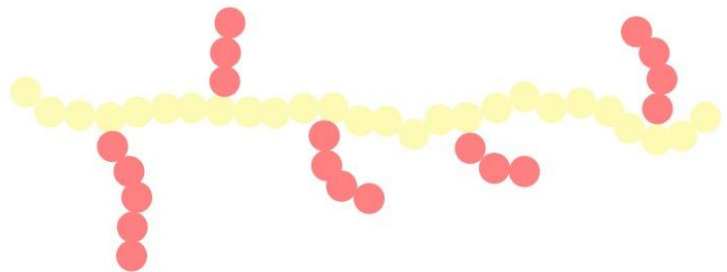


Ilustración 2. Tipos de copolímeros de acuerdo a la disposición relativa de las UCR

Los copolímeros de bloque, a diferencia del resto de copolímeros, mantienen características de sus correspondientes homopolímeros; así, es posible obtener una amplia gama teniendo en cuenta la longitud de cada bloque y la composición química de cada monómero (Rodríguez-Hernández y cols., 2005).

En función de la arquitectura de las cadenas poliméricas existe otro tipo de clasificación; de este modo, según la morfología de la cadena, se puede distinguir entre: **polímeros lineales**, no existen ramificaciones, excepto los grupos laterales presentes en los monómeros; **polímeros ramificados**, existen ramificaciones, más o menos largas, de idéntica constitución a la de la cadena principal, que emergen de ella de manera estocástica; **polímeros peine**, contienen cadenas laterales, de igual o similar longitud, que se disponen con cierta regularidad a lo largo de la cadena principal; **polímeros estrella**, son un caso particular de los ramificados en los que tres o más cadenas emanan de una misma unidad central; **polímeros escalera**, constituidos por una sucesión regular de ciclos (un caso particular son los **semiescalera** en los que los segmentos cíclicos alternan con segmentos lineales); y **polímeros entrecruzados o reticulados**

(red), que se pueden considerar un tipo de polímeros ramificados en los que las ramificaciones entrelazan unas cadenas con otras de manera que todo el conjunto puede considerarse una sola macromolécula (**Ilustración 3**).

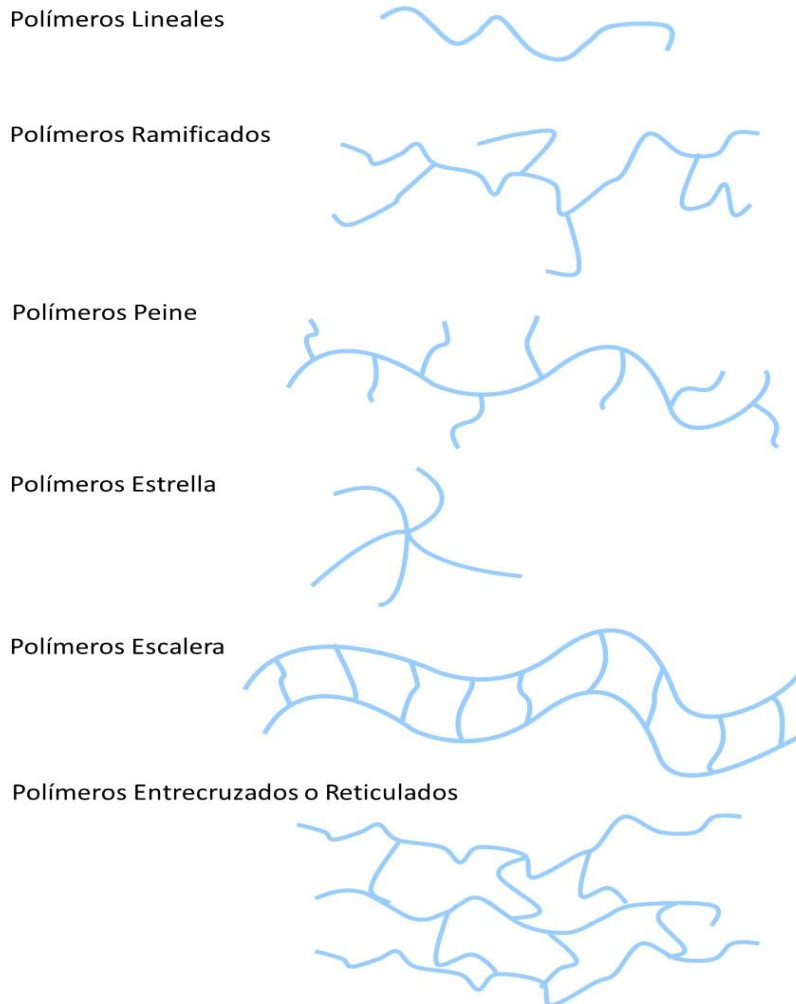


Ilustración 3. Tipos de polímeros según su estructura

Otra forma de clasificar los polímeros es atendiendo a si el proceso de polimerización se produce por pasos (**polimerización por pasos**) o mediante el crecimiento de la cadena (**polimerización en cadena**).

En las últimas décadas, se han desarrollado de forma extensa, técnicas de polimerizaciones “vivas” tales como las polimerizaciones oxoaniónicas (de Paz y cols., 2000), las polimerizaciones radicálicas por transferencia de átomos (ATRP), ya empleadas por el equipo de investigación (Robinson y cols., 2001; Galbis y cols., 2014) y polimerizaciones radicálicas por transferencia reversible de cadena mediante adición-fragmentación (RAFT) (Jones y cols., 2012). Todas ellas forman parte de las polimerizaciones en cadena.

Las polimerizaciones mediante ATRP conducen a la obtención de polímeros con una polidispersidad baja y pesos moleculares controlados a partir de una gran variedad de monómeros, lo que no ocurre con la polimerización radicalica clásica (De los Santos y cols., 2004).

Un tipo especial de copolímeros lo constituyen los denominados “copolímeros de bloque anfifílicos”, los cuales están formados por dos bloques incompatibles unidos covalentemente y son de especial interés debido a su potencial capacidad de auto-ensamblarse dando lugar a nanopartículas (NP). Así, cuando el copolímero se disuelve en un disolvente termodinámicamente bueno para un bloque pero malo para el otro, estos últimos se asocian formando nano- o micro-estructuras con posibles aplicaciones en pinturas, cosméticos, liberación de fármacos, materiales eléctricos y electro-ópticos, “nanoclusters” metálicos, biosensores y terapia génica (Cuadros-Moreno y cols., 2014).

Las NP son sistemas, a veces sólidos, de tamaño generalmente inferior a 300 nm. Aunque existen muchos tipos de nanopartículas (Xing y cols., 2014), sólo se hablará de las más relevantes de tipo orgánico (**Ilustración 4**).



Ilustración 4. Tipos de NP orgánicas

Los dendrímeros son macromoléculas muy ramificadas que se caracterizan por su particular arquitectura tridimensional globular bien definida, de tamaño nanoscópico (Xing y cols., 2014). Los liposomas son vesículas nanométricas compuestas principalmente por fosfolípidos o copolímeros dibloque, los cuales tienen la propiedad de adoptar espontáneamente la configuración de bicapas cuando se encuentran en medio acuoso. Esto se debe a que son moléculas anfifílicas en las que el extremo polar se orienta hacia la fase acuosa y el extremo no polar hacia el interior de la bicapa (Ball, 1995).

Finalmente, las micelas son partículas coloidales nanométricas, generalmente esféricas que se pueden generar también por una disposición termodinámicamente estable de los copolímeros de bloque de naturaleza anfifílica. Su formación depende de la concentración micelar crítica

(CMC), que se define como la concentración de polímero a partir de la cual éste se empieza a auto-ensamblar espontáneamente en disolución formando micelas (Nikova y cols., 2004).

Actualmente, los fármacos lipofílicos se administran vía rectal o inhalatoria lo que supone una serie de inconvenientes, dependiendo de la vía de administración: (a) en el caso de administración por vía rectal, la absorción es irregular e incompleta, su uso está contraindicado en el caso de fisuras, es doloroso y vergonzoso para el paciente y por último, algunos fármacos pueden producir diarrea o estreñimiento al ser administrados por dicha vía; (b) en el caso de ser administrados por vía inhalatoria, no producen efecto sistémico, no es posible la dosificación exacta y presentan una rápida absorción, lo que facilita la aparición de efectos secundarios en fármacos potentes con una ventana terapéutica pequeña (Perry, Potter, 2001).

Además de los inconvenientes intrínsecos asociados a cada vía de administración, existen una serie de inconvenientes generales como son: la necesidad de administración de la dosis del fármaco cada cierto intervalo de tiempo; la vigilancia de las concentraciones de fármacos para que estén dentro del margen terapéutico (relación entre la dosis de un medicamento que produce efecto terapéutico y la que provoca efecto tóxico); la dificultad de administración en aquellos fármacos que posean una acusada variabilidad en su comportamiento cinético; etc.

Por todo ello, se estudia la posibilidad de nuevas técnicas en la administración de fármacos lipofílicos, como la utilización de sistemas micelares funcionalizados (**Ilustración 5**) para la administración vectorizada hacia células o tejidos específicos, que faciliten simultáneamente la entrega de fármacos (Villafuerte-Robles, 2009).

La idea de que las micelas sean utilizadas como transporte de fármacos surge por su capacidad para la protección del fármaco o sustancia encapsulada de todas las vías de degradación posibles hasta que pueda alcanzar el lugar de acción, atravesar todo tipo de barreras biológicas y alcanzar compartimentos intracelulares (Irache, 2008). Cuando un fármaco es administrado y liberado desde su forma farmacéutica, su comportamiento fármaco-cinético depende, en gran medida, de su estructura química. Sin embargo, cuando el fármaco es administrado en forma de NP, son las propiedades físico-químicas de las últimas las que realmente afectan a la

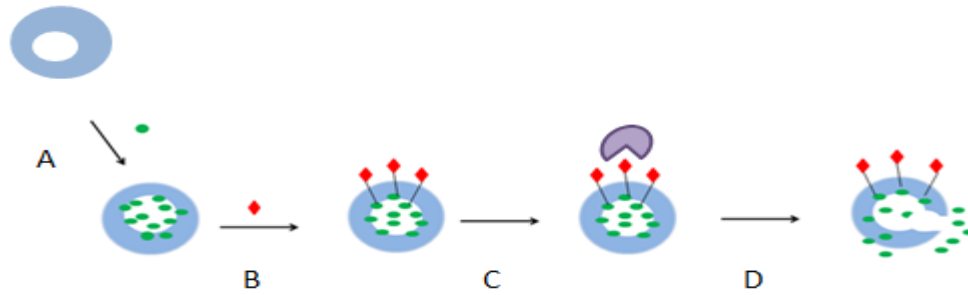


Ilustración 5. Esquema del transporte y liberación de fármacos mediado por NP inteligentes: A) Carga del fármaco en la micela; B) Funcionalización de la micela; C) Reconocimiento del tejido elegido; D) Liberación del agente terapéutico provocada por cambios externos.

distribución del fármaco (**Ilustración 6**), controlándose así la liberación del mismo, evitando efectos indeseables y aumentando el índice terapéutico (Irache, 2008).

Todas estas ventajas hacen que las micelas poliméricas sean ampliamente estudiadas y sean escogidas para el diseño de “Sistemas inteligentes”, llamados así por su capacidad de respuesta ante pequeños estímulos del entorno, como son cambios de: temperatura, pH, luz, campo eléctrico, productos químicos y fuerza iónica.

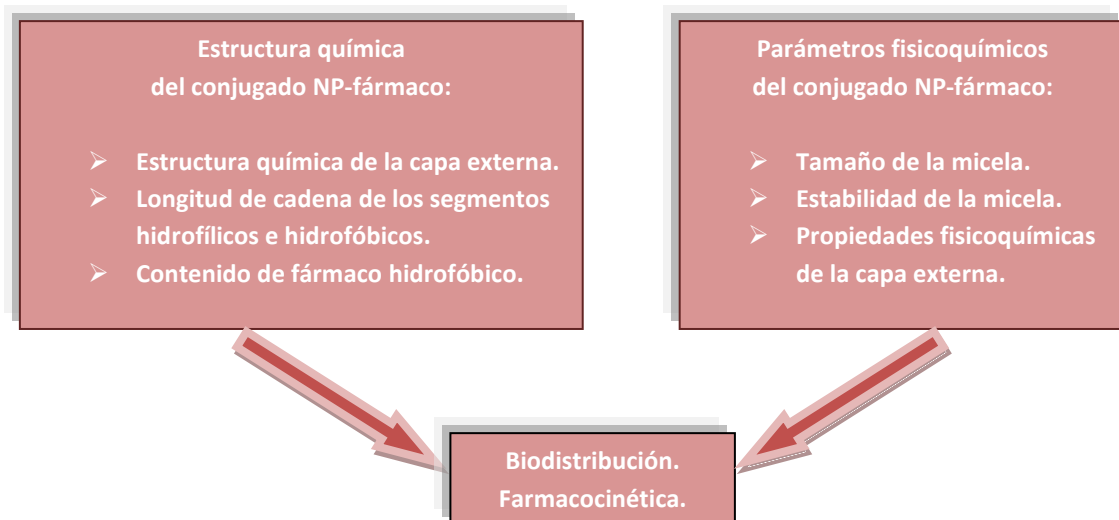


Ilustración 6. Factores que afectan a la biodistribución y farmacocinética

En el cuerpo humano sano predomina un pH de 4,0-7,0 y su valor depende del tipo de tejido considerado (Schmaljohann, 2006). Así, se pueden diseñar NP sensibles a cambios de pH que tengan como objetivo, por ejemplo, el microambiente extracelular y orgánulos intracelulares ácidos de tumores sólidos, siendo capaces de liberar el principio activo como respuesta a una

disminución del pH, mejorando así la especificidad por el tejido y los resultados terapéuticos (Kanamala y cols., 2016).

La naturaleza dinámica y reversible de formación de micelas a partir de cadenas poliméricas disueltas molecularmente es el origen de su inestabilidad. Para preparar micelas con mayor estabilidad física y prevenir la desagregación causada por la dilución, se puede modificar la estructura micelar entrecruzando física o químicamente la corona o el núcleo de la misma (**Ilustración 7**), generándose NP unimoleculares estables (Chen y cols., 2014). El entrecruzamiento puede llevarse a cabo mediante enlaces covalentes inter-catenarios en la micela que aumenten la estabilidad de las mismas en circulación sanguínea haciendo que su contenido sea liberado sólo bajo estímulos específicos (Garg y cols., 2011). Es también de interés que las NP presenten grupos funcionales que permitan la inclusión de ligandos de reconocimiento útiles para la vectorización activa a células y tejidos específicos.

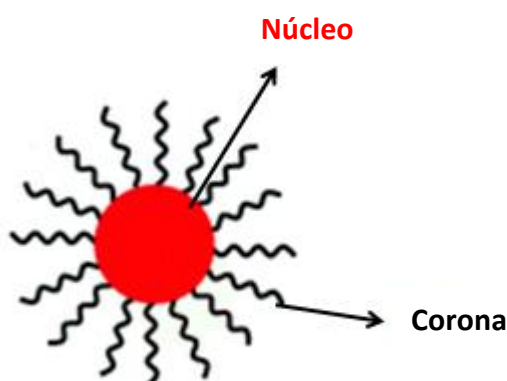


Ilustración 7. Representación de la estructura de una micela

El entrecruzamiento del núcleo micelar requiere la presencia de grupos funcionales reactivos en el bloque hidrofóbico que permitan su acoplamiento por reacción con agentes difuncionales o a través de reacciones de polimerización radicalica. De este modo, se modifica la porosidad y permeabilidad del núcleo, lo que también puede afectar a su capacidad de encapsulación de agentes terapéuticos y su posterior liberación. Este aspecto es particularmente interesante ya que ofrece la posibilidad de preparar micelas con un núcleo capaz de controlar tanto la carga del fármaco como su liberación (Álvarez y cols., 2016).

Para llevar a cabo el entrecruzamiento covalente del núcleo, se requieren reacciones simples, rápidas y fiables, con altos rendimientos, que no generen subproductos y en los que los reactivos y disolventes empleados sean materiales asequibles, de baja o nula toxicidad y

fácilmente eliminables. Este tipo de reacciones son la base de la “Química Click” (Kolb y cols., 2001; Moad y cols., 2005; Moad y cols., 2006; Moad y cols., 2009).

Dentro de estas reacciones “click”, la reacción de Diels-Alder es una de las más conocidas (**Ilustración 8**), la cual, desde su descubrimiento, ha sido citada en más de 40.000 documentos. Se trata de una reacción de cicloadición (4+2) en la que un dieno conjugado y un dienófilo reaccionan para dar lugar generalmente a ciclohexenos. Se utiliza en química de polímeros por ejemplo, para la formación de hidrogeles (Galbis y cols., 2014) y para entrecruzamiento micelar (Gacal y cols., 2006).

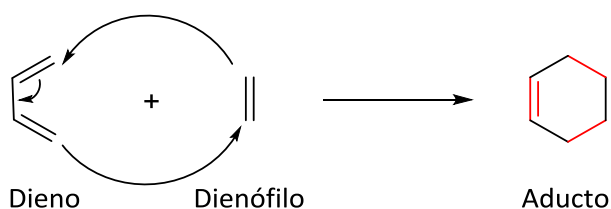


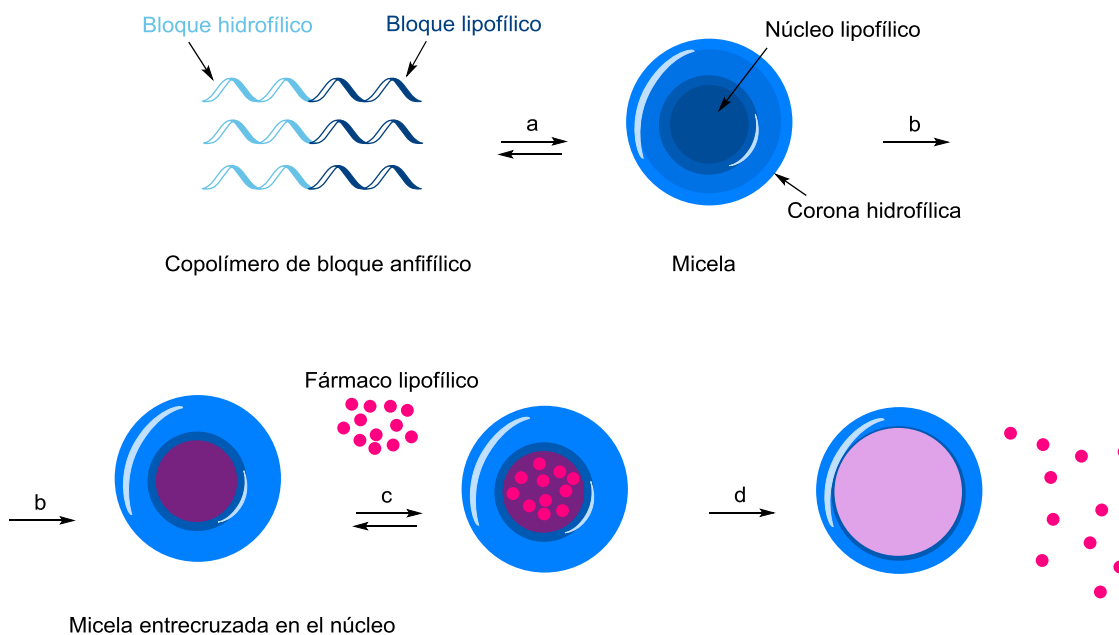
Ilustración 8. Esquema típico de una reacción Diels-Alder

2. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo (**Ilustración 9**) es la preparación de suspensiones de nanopartículas orgánicas, formadas por el auto-ensamblaje de copolímeros de bloque, que sean útiles como sistemas vectorizados de liberación de fármacos y que respondan liberando la molécula terapéuticamente activa bajo el estímulo adecuado.

Los principales objetivos específicos de este trabajo son los siguientes:

- Síntesis de materiales anfífilos de bloque susceptibles de auto-ensamblado posterior en medios adecuados
- Estudio de formación de nanopartículas, y geometría y distribución de las mismas
- Reacciones de entrecruzamiento del núcleo micelar que estabilicen su estructura
- Determinación de la estabilidad micelar
- Carga micelar. Ensayos de inclusión de moléculas lipófilas para su liberación posterior



(a) Autoensamblado del copolímero de bloque; (b) Entrecruzamiento del núcleo; (c) Carga del fármaco; (d) Liberación del fármaco mediante la activación estímulo-respuesta

Ilustración 9. Esquema representativo de los objetivos planteados en este trabajo

3. METODOLOGÍA

3.1. Procedimientos generales

Todos los reactivos y disolventes fueron suministrados por *Aldrich Chemical Co.* Los metacrilatos de 2-hidroxietilo (HEMA), *N,N*-dietilaminoetilo (DEA), *N,N*-dimetilaminoetilo (DMA) y furfurilo (FMA) se pasaron por una columna de alúmina básica y se destilaron antes de su uso.

Las cromatografías en capa fina (ccf) se realizaron en láminas de gel de sílice 60 F254 (Merck) y se revelaron con luz UV o mediante carbonización con ácido fosfomolibdico.

Los espectros IR se registraron en un espectrómetro JASCO FT/IR-4200 equipado con un accesorio de reflexión total atenuada (*Attenuated total reflection, ATR*) con cristal de diamante.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se realizaron en los Servicios Generales de Investigación de la Universidad de Sevilla (CITIUS) a 303 K en los equipos Bruker Avance AV-

500 y Bruker AMX-500. Los espectros 2D de RMN (COSY y HSQC) fueron utilizados como ayuda en la asignación de las señales de los espectros de ^1H y ^{13}C . Los desplazamientos químicos (δ) se dieron en partes por millón (ppm) usando como referencia Me_4Si .

Los espectros de masas se obtuvieron utilizando un equipo Kratos MS80RFA.

Los pesos moleculares y polidispersidades de los polímeros sintetizados se obtuvieron mediante cromatografía de permeación en gel (GPC), usando un equipo Waters 2414 y dos columnas HR (7'8 x 300mm) de Styragel®, termostalizadas a 60 °C y conectadas en serie. El equipo estaba conectado a un detector de índice de refracción. *N,N*-dimetilformamida (DMF) fue la fase móvil del sistema y el flujo se fijó a una velocidad de 1 ml/min. Los pesos moleculares fueron estimados en base a estándares de poli(metacrilato de metilo) (PMMA).

Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo en un espectrofotómetro de luminiscencia LS Perkin-Elmer (Norwalk, CT, USA) equipado con una lámpara de xenón. Todas las medidas se realizaron en una celda estándar de cuarzo de 10 mm de camino óptico, termostalizada a $25,0 \pm 0,1$ °C, con anchura de banda de 5 nm para la emisión y la excitación de los monocromadores. La fluorescencia se midió a 375 nm con una longitud de onda de excitación de 360 nm.

Un espectrofotómetro UV-vis Philips (Eindhoven, Netherlands) modelo PU-8720 se usó para llevar a cabo las medidas de absorbancia requeridas.

El diámetro hidrodinámico (D_h), la distribución de tamaño (índice de polidispersidad, PDI) y el potencial-Z de las muestras, se determinaron con un aparato Malvern *Zetasizer Nano-ZS Malvern Instruments* a 25 °C, con rango de análisis del tamaño de partículas de 0,6 nm a 6 μm . La intensidad de la luz dispersada (expresada en kilocuentas por segundo) se midió mediante dispersión dinámica de la luz (Dynamic Light Scattering, DLS).

La morfología y distribución de las NP se caracterizó por microscopio electrónico de barrido de alta resolución (scanning electron microscopy, SEM) usando un microscopio FE-SEM HITACHI S5200, operando a 5kV, con máxima resolución entre puntos de 5 Å. Antes de las observaciones por SEM, las suspensiones se depositaron en un soporte de silicio monocristalino tratado con plasma de oxígeno durante 80 s para hacerlo más hidrofílico.

Se utilizó un equipo de epifluorescencia ZEISS APOTOME para la observación de NP cargadas con pireno, con platina motorizada en XY (área máxima de escaneo 130x85 cm), iluminación epifluorescencia Excite 120HXP, con lámpara de vapor de mercurio de 120 W y cámara

monocroma Axiocam-506 de alta sensibilidad para captura de imágenes fluorescentes [sensor de 1936x1460px (3 Mpx)].

3.2. Procedimientos de síntesis

3.2.1. Síntesis de copolímeros

En un procedimiento estándar para la preparación del polímero poli[(DMA_{50%}-HEMA_{50%})-*block*-(DEA_{90%}-FMA_{10%})], el iniciador 2-bromo- 2-metilpropionato de etilo (EBiB, 37 mg, 28 μ l, 0,19 mmol), el monómero HEMA (0,92 ml; 7,59 mmol), y el monómero DMA (1,53 ml, 7,59 mmol) se disolvieron en 2,45 ml de metanol.

A la disolución desgasificada, se le adicionaron el ligando 2,2'-bipiridilo (bpy, 74 mg, 0,48 mmol) y el catalizador CuBr (27 mg, 0,19 mmol) y la mezcla de reacción se dejó agitando a 25 °C durante 2 horas. Posteriormente, se tomó una alícuota del medio de reacción justo antes de la adición de los otros monómeros. Esta alícuota fue analizada mediante ¹H-RMN y GPC con objeto de determinar tanto su peso molecular promedio en peso (Mn) como la composición porcentual molar del primer bloque. A continuación, se adicionó una disolución desgasificada de los monómeros DEA (2,3 ml; 13,67 mmol) y FMA (0,234 μ l; 1,52 mmol) en metanol (2,55 ml) y la reacción se agitó durante 24 horas a la misma temperatura.

Transcurrido ese tiempo, la purificación del polímero se llevó a cabo por filtración a través de un lecho de silicagel y tierra de diatomeas, dando lugar a una disolución incolora del polímero. El disolvente se eliminó a vacío dando lugar al copolímero puro con alto rendimiento (4.3 g, 85 %). Mn = 34.700; Mw = 45.100; Mw/Mn = 1,3.

IR, ν , (cm⁻¹): 3385 (O-H), 2991 (=C-H st, furano), 2946 (-C-H st), 1718 (C=O st), 1151 (C-O st éster). ¹H NMR (DMSO-d₆, 500 MHz), δ (ppm): 7,67-6,47 (m, 3 H, furano); 4,98 (s, 2 H, COOCH₂-furano, FMA); 4,82 (s, 1 H, OH, FMA); 4,51-4,32 (m, 4 H, COOCH₂, DMA y DEA), 3,91-3,82 (m, 6 H, COOCH₂CH₂, DMA, DEA, FMA); 3,59 (bs, 2 H, COOCH₂, FMA); 2,26-2,11 (m, 10 H, N(CH₃)₂, DMA y N(CH₂CH₃)₂, DEA); 2,03-1,62 (m, 8 H, -CH₂-C(CH₃)-, DMA, HEMA, FMA, DEA); 1,06-0,58 (m, 18 H, -CH₂-C(CH₃)-, DMA, HEMA, FMA, DEA).

Composición experimental del copolímero (determinada mediante ¹H RMN): [(DMA_{62%}-HEMA_{38%})-*block*-(DEA_{89%}-FMA_{11%})].

3.2.2. Síntesis de 1,8-dimaleimida-3,6-dioxaoctano (DMDOO)

Se prepararon dos disoluciones: en la primera se disolvió 1,8-diamino-3,6-dioxaoctano (7,84 ml, 1 mmol) en DMF (16 ml), y en la segunda, anhídrido maleico (10,5 g, 2 mmol) en DMF (32 ml). Se mezclaron ambas disoluciones controlando que la temperatura de la mezcla no superara los 80 °C y se agitó durante 20 min. Se añadieron posteriormente anhídrido acético (20,2 ml, 4 eq.), acetato de níquel (106 mg, 0,008 eq.) y trietilamina (3 ml, 0,4 eq.) y la disolución se agitó a 80 °C durante 1 h. Al cabo de ese tiempo se adicionó H₂O (40 ml) y el residuo se extrajo con diclorometano (300 ml). La fase orgánica se secó con sulfato de magnesio, se agitó con silicagel (70 g) y se filtró a través de una columna de celita. A continuación, se eliminó el disolvente mediante destilación a vacío y se purificó por cromatografía en columna usando como eluyente una mezcla de *tert*-butilmetil éter-hexano 9:1 (ccf: R_f 0.33). Se obtuvo el compuesto puro con rendimiento alto (11,9 g 72% rendimiento).

Punto de fusión: 97-98 °C (recristalizado de ^tBME). IR, ν, (cm⁻¹): 3168, 310 (=C-H st), 1703 (C=O st), 1109 (O-CH₂ st). ¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz), δ (ppm): 6.72 (s, 4 H, =CH), 3.72 (t, 4 H, N-CH₂, J = 5.8 Hz), 3.62 (t, 4 H, N-CH₂-CH₂O, J = 5.8 Hz), 3.56 (s, 4 H, O-CH₂-CH₂O-). ¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz), δ (ppm): 170.6 (C=O), 134.1 (=CH), 70.0, 67.8 (N-CH₂-CH₂O-), 37.2 (O-CH₂-CH₂O-).

Espectrometría de masas, ionización química m/z: 309 [(M+1)⁺], 124 [(C₄H₂O₂ N-CH₂-CH₂)⁺], 184 [(M-124)⁺].

3.2.3. Formación de nanopartículas micelares mediante proceso de auto-ensamblaje

El copolímero [(DMA_{62%} HEMA_{38%})-*block*-(DEA_{89%}-FMA_{11%})] (0,1 g) se disolvió a nivel molecular en tetrahidrofurano (THF, 10 ml, concentración final del polímero: 10 mg/ ml) a 20 °C y la disolución se adicionó gota a gota sobre 200 ml de agua destilada. Las cadenas poliméricas se auto-ensamblaron para formar una suspensión de micelas bien estructuradas en las que los bloques hidrofóbicos (DEA-FMA) originaron los núcleos deshidratados de las micelas. A continuación, la suspensión de las nanopartículas se diluyó con la cantidad suficiente de agua destilada para ajustar el volumen final de la suspensión (250 ml, concentración final del polímero = 0.4 mg/ml) y se agitó suavemente durante 72 horas.

“Z-average” = 177 nm; PDI = 0.12 (DLS).

3.2.4. Entrecruzamiento del núcleo micelar

Para la estabilización de las nanopartículas por reacciones de entrecruzamiento, se preparó en primer lugar una suspensión micelar (250 ml; concentración del polímero: 0,25 mg/ml) siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior. Esta suspensión sirvió como blanco a efectos comparativos. En segundo lugar, se seleccionó el agente entrecruzante (DMDOO o DMJF) y el grado de entrecruzamiento buscado (10 % o 20 %). Cada ensayo de entrecruzamiento (cuatro en total) se llevó a cabo como se describe a continuación:

A una disolución del polímero en THF (62,5 mg en 6,25 ml; concentración polímero = 1 mg/ml) se adicionó gota a gota el volumen necesario de una disolución del agente entrecruzante seleccionado (DMDOO o DMJF) en dimetilsulfóxido (DMSO, concentración agente entrecruzante = 1mg/ml) para obtener grados de entrecruzamiento del 10% y del 20% del núcleo micelar. La cantidad del agente entrecruzante se calculó en base a las unidades repetitivas de FMA incorporadas en el polímero. La mezcla se agitó suavemente, se enrasó con la cantidad suficiente de agua destilada hasta un volumen final de 250 ml (concentración del polímero = 0,25 mg/ml) y se dejó agitando suavemente durante 9 días a 25 °C. Los datos relativos a la formación de dichas micelas entrecruzadas se recogen en la **Tabla 1**.

Muestra	Agente entrecruzante				Aspecto	
	Tipo	%	mmoles	Masa (mg)	t= 5 min	t = 9 días
M10-1	--	--	--		Turbio, aspecto micelar	Turbio, aspecto micelar
M10-2	DMDOO	20	$8'49 \times 10^{-4}$	0'2616	Turbio, aspecto micelar	Turbio, aspecto micelar
M10-3	DMDOO	10	$4'24 \times 10^{-4}$	0'130	Transparente	Transparente
M10-4	DMJF	20	$8'49 \times 10^{-4}$	0'365	Transparente	Transparente
M10-5	DMJF	10	$4'24 \times 10^{-4}$	0'1823	Transparente	Turbio, aspecto micelar

Tabla 1. Formación de NP estabilizadas mediante DMDOO o DMJF al 10% o 20%. Concentración polímero 0,25 mg/ml; V= 250 ml.

3.3. Caracterización de las nanopartículas auto-ensambladas. Determinación de la concentración crítica micelar (CMC)

Para la determinación de la CMC se preparó una disolución base del copolímero de bloque (100 ml, 0,45 mg/ml) mediante dos pasos consecutivos: en primer lugar se disolvió 0,045 g del polímero en THF (4.5 ml) a 20 °C. Posteriormente, se adicionó la disolución preparada gota a gota sobre 90 ml de agua destilada bajo agitación y el volumen final de la disolución polimérica se ajustó con la cantidad necesaria de agua. A partir de esta disolución base, se obtuvieron las diluciones a estudiar, con concentraciones comprendidas entre 0,3375 mg/ml – 0,0067 mg/ml; posteriormente se incubaron las muestras a 25 °C (24 h).

Se midió la absorbancia de luz visible en un espectrofotómetro UV-vis Philips modelo PU-8720. Las medidas se realizaron a una longitud de onda de 600 nm usando agua destilada como blanco y los datos de cada muestra fueron el resultado de al menos tres medidas.

Muestra	Concentración (mg/ml)	Absorción (nm)
M2-1	0'45	0.041
M2-2	0'3375	0,268
M2-3	0'2531	0,183
M2-4	0'1898	0,105
M2-5	0'1423	0,073
M2-6	0'1067	0,048
M2-7	0'053	0,041
M2-8	0'026	0,007
M2-9	0'00133	0,001
M2-10	0'000667	--

Tabla 2: Medidas de absorbancia en UV-vis (600 nm) de las disoluciones del polímero

3.4. Carga micelar de molécula lipófila: pireno. Curva de calibrado (espectroscopía de fluorescencia)

Para la curva de calibrado del pireno, se preparó una disolución de la misma a partir de la cual se obtuvieron las disoluciones menos concentradas. El procedimiento fue como se detalla a continuación: se adicionaron 12 mg de pireno a un matraz aforado de 1 litro y se añadieron

100 ml de agua cada 30 minutos, agitando suavemente, hasta enrasar el matraz. Se dejó la disolución agitando suavemente durante 72 h para asegurar la disolución completa de pireno (12 $\mu\text{g/ml}$). A continuación, se prepararon tres diluciones cuyas concentraciones fueron: 6 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$, 1,5 $\mu\text{g/ml}$ (20 ml de disolución).

Se estudió la emisión de fluorescencia de las muestras a 375 nm utilizando agua destilada como blanco en las medidas realizadas. Se representaron los valores obtenidos de emisión frente a concentración de pireno (en $\mu\text{g/ml}$) (**Ilustración 10**).

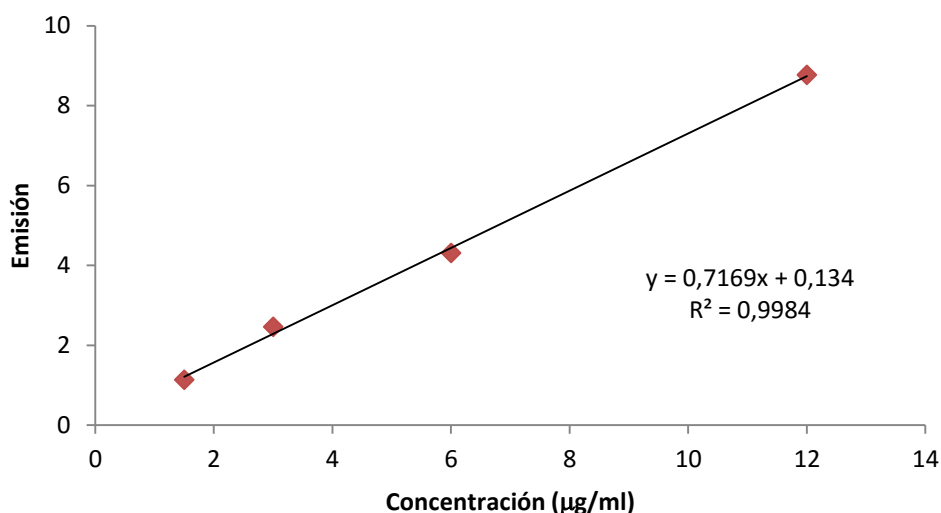


Ilustración 10. Recta de calibrado espectroscopía de fluorescencia del pireno

Para estudiar la incorporación de moléculas lipófilas en el núcleo micelar, se añadió una disolución de pireno (1,0 ml en H_2O , 12 $\mu\text{g/ml}$) gota a gota a la dispersión micelar (9 ml, concentración final de pireno 1,2 $\mu\text{g/ml}$) bajo agitación (muestras **M12-X**). La mezcla se agitó suavemente durante 48 h y fue posteriormente estudiada por diversas técnicas.

El proceso se llevó a cabo con las cinco suspensiones micelares preparadas, una no entrecruzada y otras cuatro con el núcleo estabilizado mediante reacciones click (con DMDOO, DMJF, al 10% o al 20%). Igualmente, se utilizó una muestra de agua destilada (9 ml) a la que se añadió 1 ml de la disolución de pireno (12 $\mu\text{g/ml}$) con fines comparativos (muestra **M12-0**).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Preparación de nanopartículas estables basadas en copolímeros de bloque anfifílicos

4.1.1. Síntesis de copolímeros de bloque que contienen furano y de agentes entrecruzantes

En primer lugar se abordó la síntesis de copolímeros de bloque de naturaleza anfifílica con capacidad de auto-ensamblarse generando NP micelares a partir de diversos metacrilatos (**Ilustración 11**). Como monómeros hidrofílicos se eligieron HEMA y DMA. Para el segmento lipofílico se seleccionaron los monómeros FMA y DEA. Con esta selección de monómeros se alcanzó: (a) la presencia de unidades sensibles al pH (DMA Y DEA) tanto en el segmento hidrofóbico como en el hidrofílico; (b) la existencia en los segmentos lipofílicos de grupos funcionales susceptibles de entrecruzamiento posterior mediante la reacción click de Diels-Alder (FMA) con bisdienófilos; (c) la inclusión de grupos hidroxilo funcionales para la vectorización posterior de las NP con los agentes marcadores seleccionados.

Se aplicó para su síntesis las polimerizaciones radicálicas por transferencia de átomos (ATRP) ya empleada por miembros del Equipo de Investigación (Galbis y cols., 2014; Robinson y cols., 2001) y de gran relevancia por tratarse de una técnica de polimerización “viva” que aporta excelente control sobre la constitución de los polímeros y la polidispersidad del material.

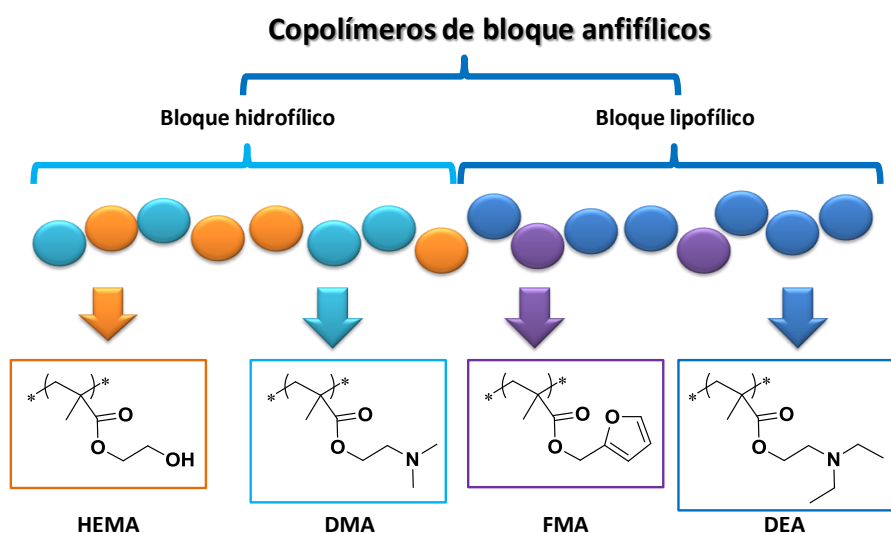


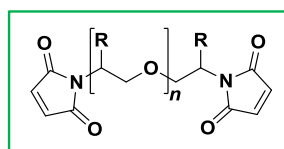
Ilustración 11. Estructura de Copolímeros de bloque anfifílicos.

Para la preparación de los polímeros, se adicionaron los monómeros constitutivos de ambos bloques en dos momentos distintos y seleccionados del proceso, de forma que el bloque

hidrofílico se sintetizó en primer lugar, y la adición de la mezcla de monómeros DEA y FMA se llevó a cabo cuando se había consumido un 95 % de los monómeros hidrofílicos (datos obtenidos mediante ^1H RMN). La composición del bloque hidrofílico se determinó mediante el estudio de una alícuota que se extrajo del medio de reacción antes de la adición de los monómeros hidrofóbicos. Así, se calculó la composición porcentual de cada unidad repetitiva mediante ^1H RMN y posteriormente, se analizó de forma similar el polímero global para la determinación de su composición porcentual total. Se sintetizaron varios copolímeros de bloque de distintas composiciones relativas y pesos moleculares, siendo el polímero de composición $[(\text{DMA}_{62\%} \text{HEMA}_{38\%})\text{-}i\text{block}\text{-}(\text{DEA}_{89\%}\text{-FMA}_{11\%})]$ ($M_n = 34.700$; $M_w/M_n = 1,3$) objeto del presente estudio, el único capaz de auto-ensamblarse en NP micelares.

En la preparación de los agentes entrecruzantes, se sintetizaron bisdienófilos capaces de llevar a cabo reacciones de Diels-Alder con los anillos de furano presentes en el bloque hidrofóbico del copolímero. Para ello se emplearon como productos de partida dos aminas: (a) 1,8-diamino-3,6-dioxaoctano; (b) la diamina Jeffamine D230, obteniéndose los bisdienófilos DMDOO Y DMJF, respectivamente, siendo éste último menos polar que el anterior. Se obtuvieron buenos rendimientos en ambos casos (72% y 75%, respectivamente). Las estructuras químicas de ambos agentes entrecruzantes se recogen en la **Ilustración 12**.

Agentes de entrecruzamiento



DMDOO: R = H; n = 2
DMJF: R = CH₃; n = 2.6

Ilustración 12. Estructura química de los bisdienófilos sintetizados

La capacidad de formación de aductos mediante reacciones Diels-Alder de este tipo de bisdienófilos con anillos de furano ha sido previamente confirmada mediante análisis de RMN y estudios de espectrometría de masas, ya sea por bombardeo con átomos rápidos (FAB) o por ionización química (CI); esta última técnica permitió confirmar la reversibilidad de la formación del aducto a temperaturas próximas a 80 °C (Galbis y cols., 2014).

4.1.2. Formación de NP micelares en medio acuoso

Para la preparación de dispersiones micelares fue preciso la disolución molecular del polímero formado en un disolvente orgánico, el éter cíclico tetrahidrofurano (THF), elegido por su escasa toxicidad y miscibilidad en medios acuosos. Se prepararon por el procedimiento descrito en el

apartado 3.2.3. de la presente Memoria. Se observó la aparición de una suave coloración azulada debida a la de difracción de la luz ocasionada por partículas en suspensión de tamaño nanométrico (**Ilustración 13**), lo que confirmó la formación de NP. Esto fue debido al auto-ensamblaje de las cadenas poliméricas en las que los bloques hidrofóbicos se agruparon entre sí creando un núcleo deshidratado, quedando por tanto los bloques hidrofílicos dirigidos al exterior de la nanopartícula y en contacto con el medio acuoso (**Ilustración 14**). Mediante estudios de DLS se constató que se trataba de una suspensión casi monodispersa de NP (PDI = 0,12) con $D_h = 177$ nm (**Ilustración 15**). A concentraciones elevadas del copolímero en el medio acuoso ($> 0,6$ mg/ml), estas NP se agregaron dando lugar a sistemas polidispersos (PDI entre 0,270 y 0,350) de tamaño micrométrico ($\approx 1500-1900$ nm) como se confirmó mediante DLS.



Ilustración 13.

Suspensión de NP en medio acuoso

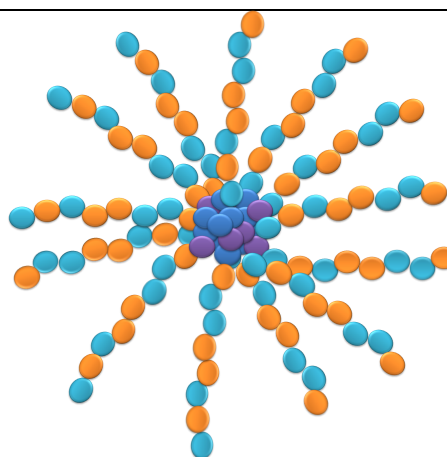


Ilustración 14.

Esquema representativo de NP micelares

Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 177,2	Peak 1: 204,9	100,0	81,48
Pdl: 0,123	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,947	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality Good

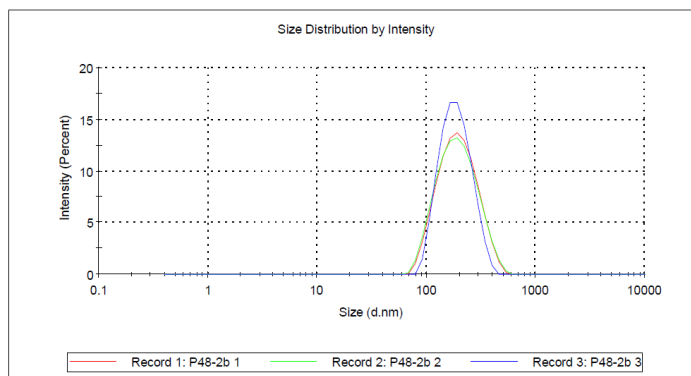


Ilustración 15. Resultados de estudio por DLS de las suspensiones preparadas

El estudio detallado de las nanopartículas generadas se describe en el apartado 4.2. de la presente Memoria.

4.1.3. Estabilización de NP por reacciones de entrecruzamiento en el núcleo micelar

El entrecruzamiento del núcleo micelar se llevó a cabo por medio de un tipo de reacción click: la reacción de Diels-Alder. En este caso, dos anillos de furano presentes en sendas UCR de FMA reaccionaron con los dos anillos de maleimida de DMDOO o DMJF (**Ilustración 16**). Se trata de una reacción de cicloadición en la que no se produce la pérdida de moléculas pequeñas y que permite la unión de distintas cadenas poliméricas generándose así un núcleo reticulado que le imparte estabilidad a la NP.

Inicialmente se intentó llevar a cabo el entrecruzamiento micelar sobre suspensiones de micelas ya formadas por la adición de una disolución del bisdienófilo seleccionado (en DMSO, 1mg/ml) y con grados de entrecruzamiento del 25% y del 50%. En estos casos, se observó la formación de un precipitado, probablemente debido a la insolubilidad del bisdienófilo y/o del aducto generado. Por ello se optó por sistemas menos entrecruzados y en los que el polímero y el bisdienófilo entraran en contacto antes de la adición del agua destilada. De esa forma, los bloques hidrofóbicos del copolímero actuarían como estabilizantes lipofílicos de estos reactivos en disolución acuosa. Se dejó agitando la mezcla de reacción durante 9 días.

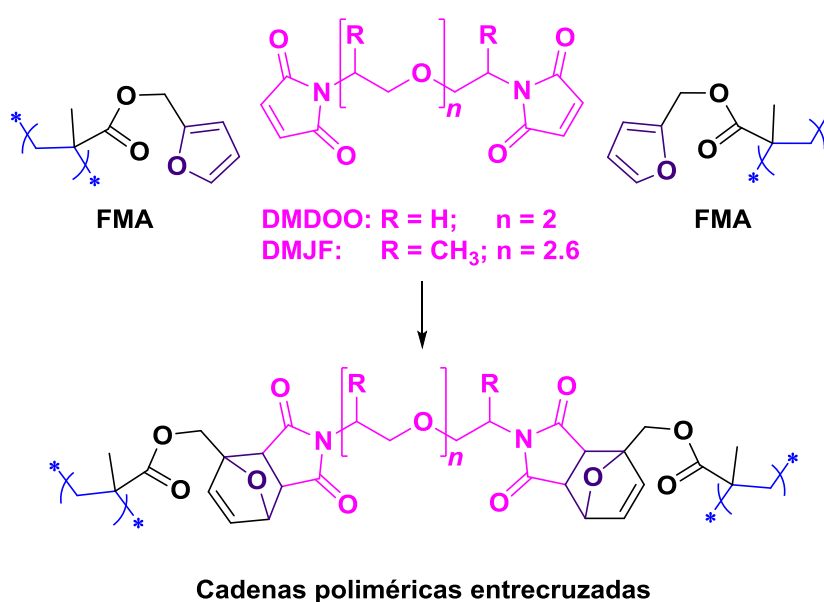


Ilustración 16. Reacción de entrecruzamiento entre DMDOO o DMJF y FMA

El éxito de las reacciones de acoplamiento se puede comprobar con facilidad adicionando la cantidad suficiente de ácido, ya que la presencia de las unidades repetitivas de DMA y DEA, con grupos amino terciarios, hace posible la protonación de las cadenas poliméricas a $\text{pH} < 6$. Así, cuando se adicionó una pequeña cantidad de ácido clorhídrico 3,0 M las unidades básicas del polímero se ionizaron. En el caso de que las micelas no estuvieran entrecruzadas (**Ilustración 17, caso A**), éstas se disgregarían y las cadenas poliméricas se separarían por la repulsión entre sus cargas. Tendríamos por tanto una disolución molecular del polímero (caso **B**). Si el entrecruzamiento se ha llevado a cabo con éxito (caso **C**), la protonación del núcleo no sería capaz de romper la estructura tridimensional de las NP debido a los enlaces covalentes generados en el proceso de entrecruzamiento. Se obtendría una estructura micelar con un núcleo hidratado, ya que se ha producido un aumento de la hidrofilia del mismo por la ionización de los restos básicos de DEA (caso **D**).

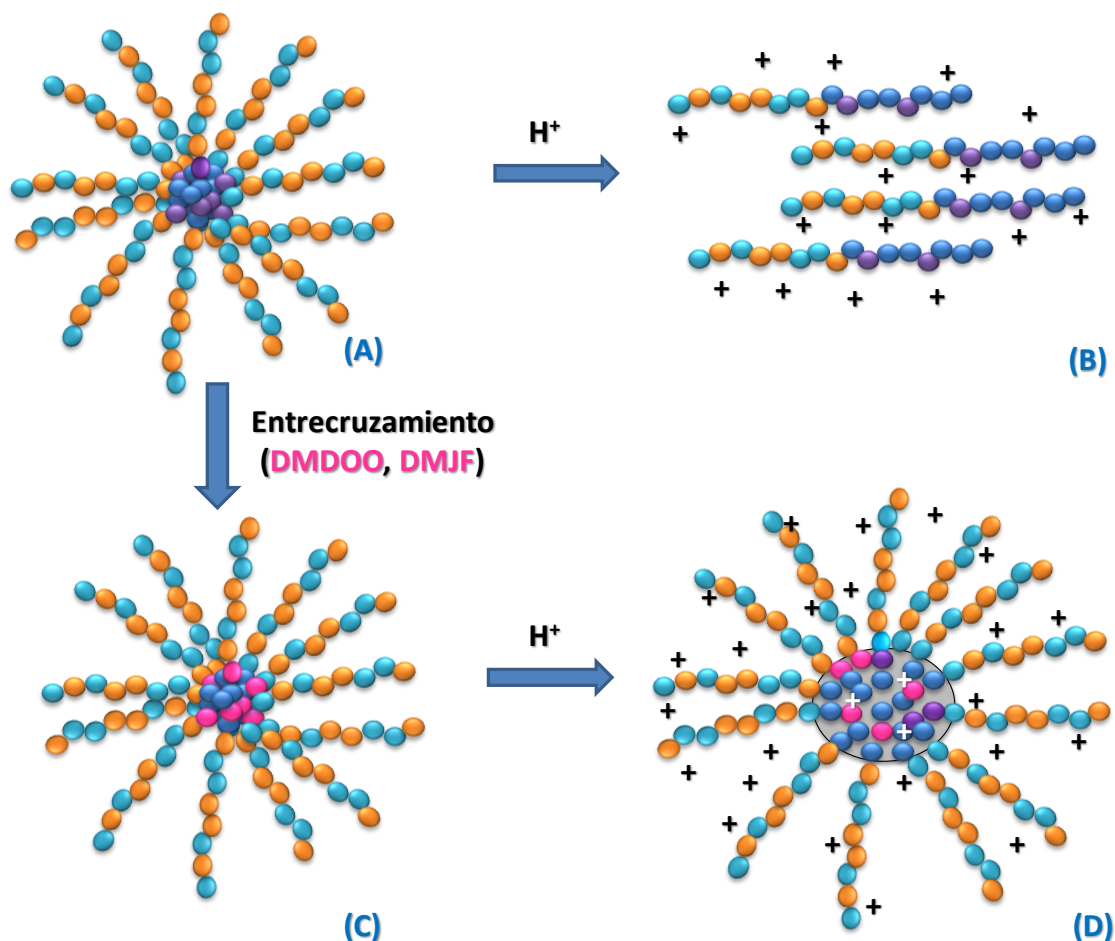


Ilustración 17. (A) Estructura micelar; (B) cadenas poliméricas protonadas tras la adición de ácido. Destrucción de la micela; (C) estructura micelar entrecruzada; (D) estructura micelar entrecruzada estable, protonada tanto en la corona como en el núcleo tras la adición de ácido

La existencia de estructuras micelares en el seno del medio acuoso ácido se evidenció por estudios de DLS y por microscopía electrónica de barrido (SEM) y su estabilidad por medidas de potencial Z, lo que confirmó el éxito de los procesos de entrecruzamiento en todos los casos.

4.2. Caracterización de las nanopartículas auto-ensambladas

4.2.1. Determinación de la Concentración crítica micelar (CMC)

Para el cálculo de la CMC se representó la absorbancia a 600 nm de las disoluciones de polímeros preparadas en función de la concentración de polímero (mg/ml).

Al representar los datos (**Ilustración 18**), se observó que las disoluciones con concentraciones iguales o inferiores a 0,05 mg/ml no experimentaban una elevada absorbancia de luz visible, aspecto característico de disoluciones moleculares de polímeros alifáticos. Sin embargo, cuando las concentraciones poliméricas igualaban o superaban los 0,11 mg/ml, se producía un cambio de tendencia y la absorbancia aumentaba de forma sustancial con respecto a la concentración. Además, en estas dispersiones más concentradas se observaba la coloración azulada típica de suspensiones de NP en agua.

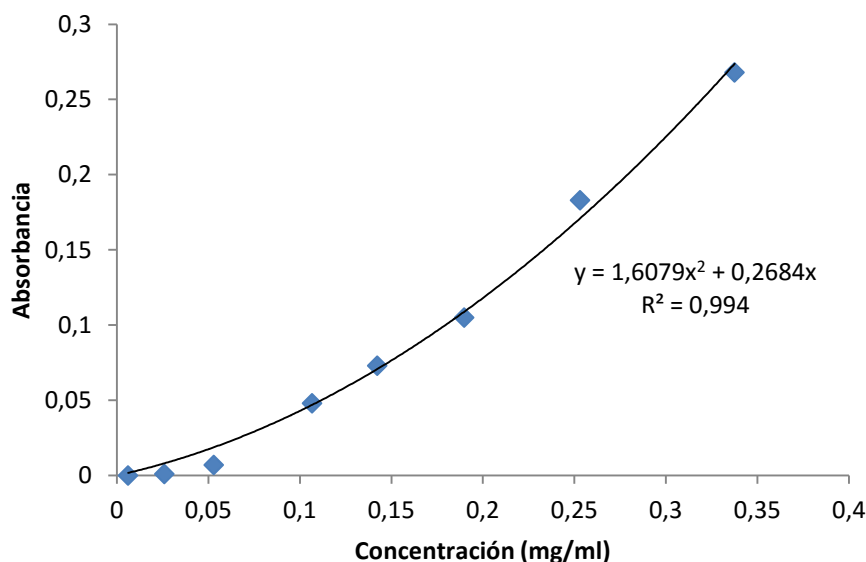


Ilustración 18. Representación de la absorbancia de las suspensiones poliméricas a 600 nm con respecto a la concentración del polímero

Debido a la distinta tendencia presentada por las disoluciones/dispersiones preparadas, se dividieron los datos en dos series diferentes y se analizaron separadamente (**Ilustración 19**). La CMC se obtuvo mediante la determinación del punto de corte o intersección de las dos líneas rectas de tendencia obtenidas por los análisis de las disoluciones de polímero a las concentraciones más bajas y a concentraciones mayores, siendo su valor igual a 0,078 mg/ml. Por encima de esta concentración, las cadenas de polímero se auto-ensamblan de forma significativa dando lugar a dispersiones de partículas nanométricas.

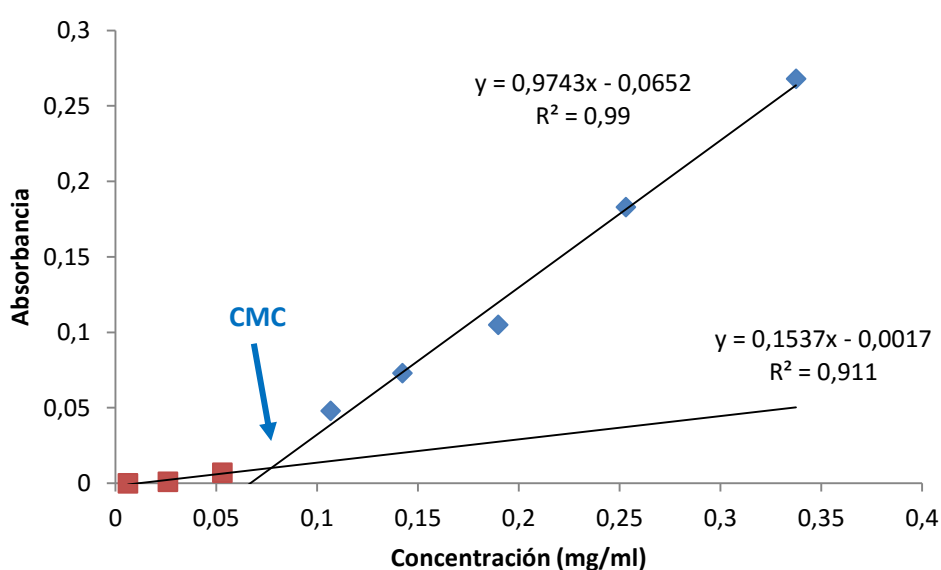


Ilustración 19. Representación en dos series de datos de la absorbancia respecto a distintas concentraciones

4.2.2. Estudios de tamaño, distribución y geometría de NP. Estabilidad de las NP

Para estudiar el tamaño de partículas se ha recogido en la **Tabla 3** los datos de “Z-average”, polidispersidad (PDI) y diámetro de partícula (D_{hr} , en nm). Se utiliza el término “Z-average” que se define como el tamaño hidrodinámico medio ponderado (por medidas de intensidad) del conjunto de partículas medidas mediante estudios de dispersión dinámica de luz (DLS). El “Z-average” deriva de un análisis acumulativo de la curva de correlación en la que se asume un tamaño de partícula único y un único ajuste exponencial es aplicado a la función de autocorrelación. Sin embargo, cuando hay dos poblaciones de partículas claramente diferenciadas en tamaño, este valor no se correlaciona de forma adecuada con la realidad de la

muestra. Por ello, se incluye también la polidispersidad del material, que nos da idea de la homogeneidad del tamaño de las partículas que dispersan la luz y el tamaño más frecuente (diámetro hidrodinámico D_h , en nm) de la población de NP más abundante en la muestra, en el caso de que se diera más de un pico.

En la **Tabla 3** se recogen los datos obtenidos mediante el análisis por DLS de las suspensiones preparadas a concentraciones de polímero 0,45 mg/ml, concentraciones muy por encima del CMC (0,078 mg/ml). Estos ensayos se denominaron **M4-X** y las cantidades de agente entrecruzante añadidas fueron aquellas que condujeran a la participación del 50% o del 25% de los anillos de furano del núcleo micelar en las reacciones del Diels-Alder.

Muestra	Bisdienófilo	Z-Ave (d.nm)	Pdl	N.º de picos	Población 1		Población 2	
					D_h (nm)	%	D_h (nm)	%
M4-1	...	107	0,40	2	79	52	317	48
M4-2	DMDOO 50%	125	0,44	3	73	48	341	45
M4-3	DMDOO 25%	142	0,71	3	61	30	335	57
M4-4	DMJF 50%	149	0,41	3	83	45	438	50
M4-5	DMJF 25%	151	0,77	3	60	31	334	52

Tabla 3. Valores de “Z-average”, PDI y D_h de las micelas preparadas a concentraciones 0,45 mg/ml

Se observó de forma general que se trataba de sistemas polidispersos, con 2 ó 3 poblaciones de NP, una de ellas de tamaño inferior a 100 nm (60 nm a 83 nm) y otra con tamaños en torno a 340 nm (317 nm a 438 nm), que anuncia cierta tendencia a la formación de agregados. Es de destacar que los datos correspondientes a las muestras **M4-3** y **M4-5** no son fiables por la elevada polidispersidad del material. Se observa que en los casos en los que el entrecruzamiento fue del 25 %, el tamaño micelar se mantiene constante (**población 1**) y un se produce un aumento de la polidispersidad de la suspensión. La presencia de una población de partículas de tamaño micrométrico (no recogidos en la Tabla) son responsables de que los valores de Z-average aumenten en todos los casos.

Los datos recogidos en la **Tabla 3** se obtuvieron cuando se hizo el análisis de la luz dispersada en función de la intensidad. Es importante resaltar que la luz dispersada depende del tamaño de la partícula con lo que una única NP de gran tamaño (por ejemplo, un aglomerado de diámetro superior a 1000 nm) puede tener un efecto dispersante equivalente a decenas y centenas de NP de tamaño pequeño. Este efecto se pone de manifiesto cuando los datos obtenidos se tratan en función del número de partículas encontradas. Cuando así fue, todas las muestras mostraron un único pico de tamaño menor a 100 nm, lo que demuestra que en todas las muestras, la población mayoritaria en cuanto al número de partículas totales presentes es la que ostenta menor diámetro. Para ejemplificar dicho concepto, se muestran las gráficas representativas de la distribución de tamaño de las partículas de la muestra **M4-1** (**Ilustraciones 20 y 21**).

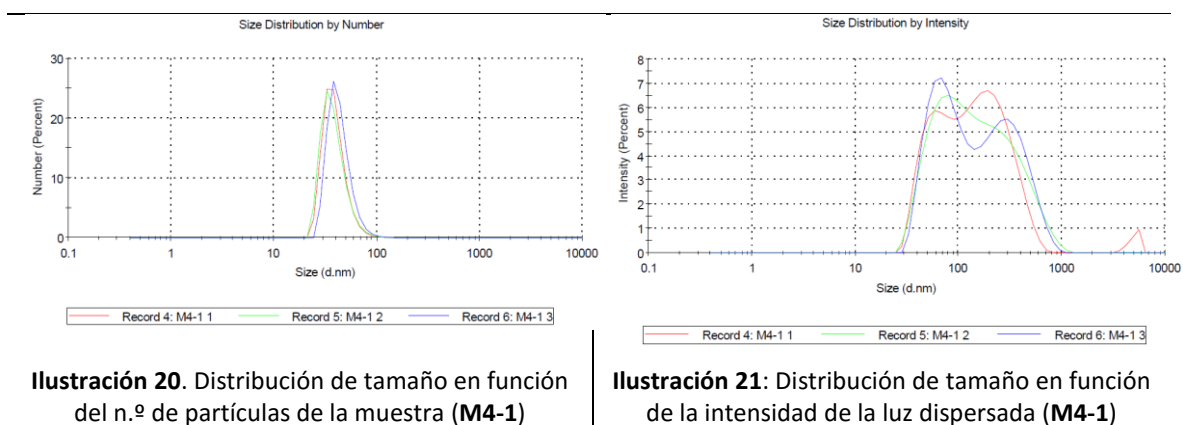


Ilustración 20. Distribución de tamaño en función del n.º de partículas de la muestra (**M4-1**)

Ilustración 21: Distribución de tamaño en función de la intensidad de la luz dispersada (**M4-1**)

En base a los resultados obtenidos, se acordó disminuir no sólo la concentración del polímero en la suspensión a 0,25 mg/ml así como el grado de entrecruzamiento buscado (20 % y 10 %). Cuando se estudiaron las micelas, estabilizadas o no (desde **M9-1** a **M9-5**), se observó mediante DLS que las NP de las cinco suspensiones estudiadas presentaban un D_h considerablemente mayor que en las suspensiones más concentradas (**M4-X**). En el caso de la muestra no entrecruzada, las NP presentaban un D_h en torno a los 240 nm (**M9-1**). Este tamaño disminuyó cuando el núcleo estuvo entrecruzado, pasando a valores que estuvieron comprendidos entre 95 y 150 nm. De este hecho se deduce que el proceso de entrecruzamiento supuso un incremento de densidad de la NP.

Cuando se llevaron a cabo las pruebas de resistencia de las NP a pH ácido, la nomenclatura de las muestras cambió a **M11-X**, para distinguirlas de las muestras originales. Se comprobó en

todos los casos un aumento considerable del tamaño de las partículas, en clara correlación con lo esperado. Al protonarse el núcleo de la micela (como se comentó con anterioridad) este se hidrata conduciendo a un aumento del diámetro hidrodinámico de las partículas.

Micelas a pH \approx 7					Micelas a pH \approx 3,5				
Muestra	Bisdien.	Z-Ave (d.nm)	Pdl	D _h (nm)	Muestra		Z-Ave (d.nm)	Pdl	D _h (nm)
M9-1	...	168	0,28	239	M11-1
M9-2	DMDOO 20%	108	0,33	129	M11-2	DMDOO 20%	245	0,33	199
M9-3	DMDOO 10%	83	0,28	113	M11-3	DMDOO 10%	198	0,25	250
M9-4	DMJF 20%	87	0,38	149	M11-4	DMJF 20%	177	0,36	224
M9-5	DMJF 10%	240	0,41	96	M11-5	DMJF 10%	203	0,22	239

Tabla 4. Valores de “Z-average”, PDI y D_h de las micelas preparadas a concentraciones 0,25 mg/ml a pH neutro y ácido

Estos datos se corroboraron con las imágenes SEM de las distintas muestras preparadas (**Ilustraciones 22, 23, 24 y 25**). En el caso de las micelas no entrecruzadas (**Ilustración 22**), se observa la presencia de NP redondeadas con distinto grado de aumento. En la imagen con menor aumento, se observa una panorámica general de la muestra, y se percibe la forma redondeada de las mismas, que se confirma cuando se toman las imágenes con más aumento. El tamaño de las NP es del orden de los 100 nm, en consonancia con los valores obtenidos por DLS.

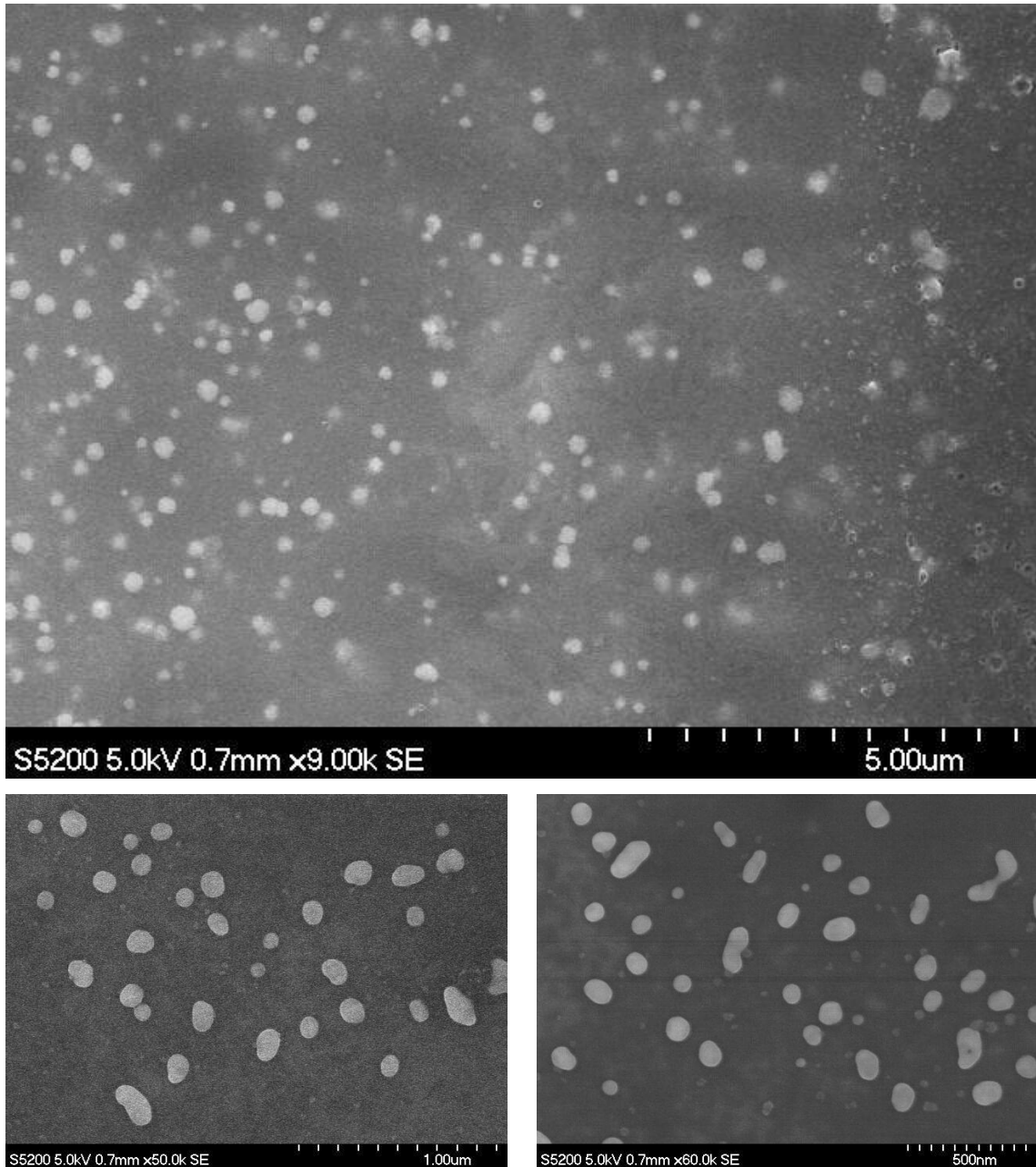
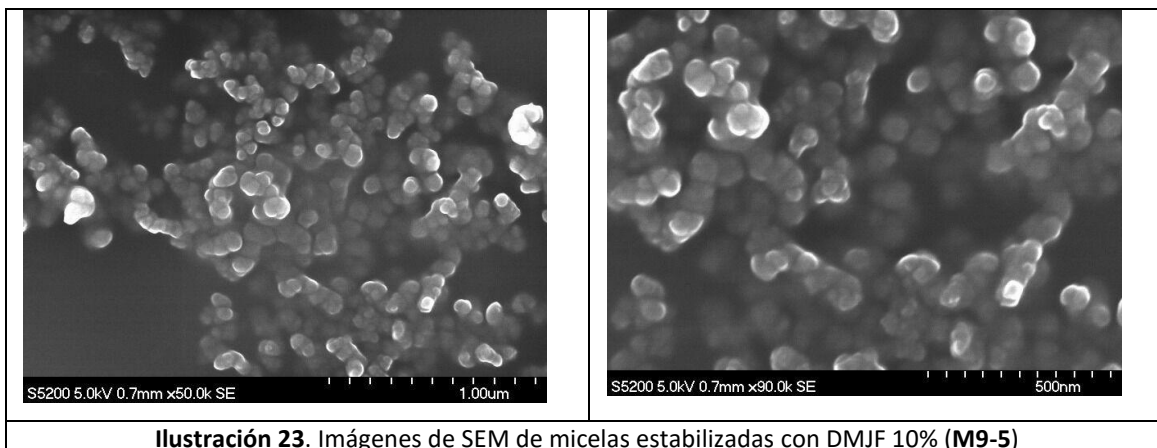


Ilustración 22. Imágenes de SEM de micelas no estabilizadas (M9-1)

La **Ilustración 23** recoge imágenes de las NP entrecruzadas con DMJF al 10%. Se observa que la forma de las mismas se mantiene redondeada y en este caso, se observan algunas agrupaciones de NP en diversas partes de la muestra.



A continuación se muestran algunas fotos de SEM de suspensiones micelares que prueban la eficacia del método de estabilización de las NP por entrecruzamiento del núcleo y que son estables al medio ácido. Así, por ejemplo, las **Ilustraciones 24** y **25** se corresponden con muestras entrecruzadas con ambos agentes entrecruzantes (DMDOO y DMJF) y que han sido sometidas previamente a un tratamiento ácido. En los casos estudiados, se mantiene la presencia de NP en el medio, lo que corrobora, junto con los datos de DLS, la eficacia del método de estabilización por entrecruzamiento del núcleo micelar.

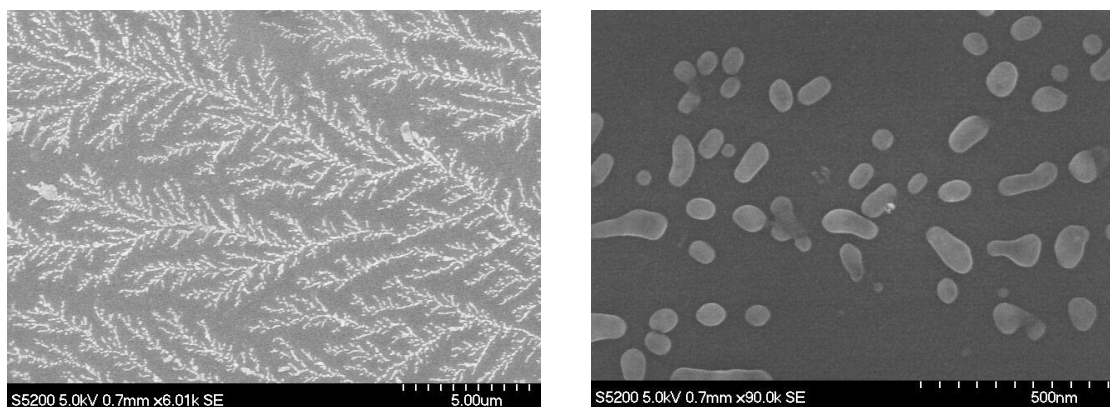


Ilustración 24. Imágenes de SEM de micelas estabilizadas con DMDOO 20% en medio ácido (M11-3)

En el caso de las partículas estabilizadas con DMDOO (**Ilustración 24**), se trata de nanopartículas flexibles cuya geometría se modifica por la aplicación de una fuerza en una dirección determinada. Ello se puede explicar en base al aumento importante de la hidrofilia del sistema en el medio ácido, con una entrada significativa de agua en la estructura micelar y a la naturaleza hidrófila del agente entrecruzante.

No obstante, cuando el bisdienófilo fue DMJF, más lipófilo (**Ilustración 25**), la forma de las NP se mantiene relativamente constante.

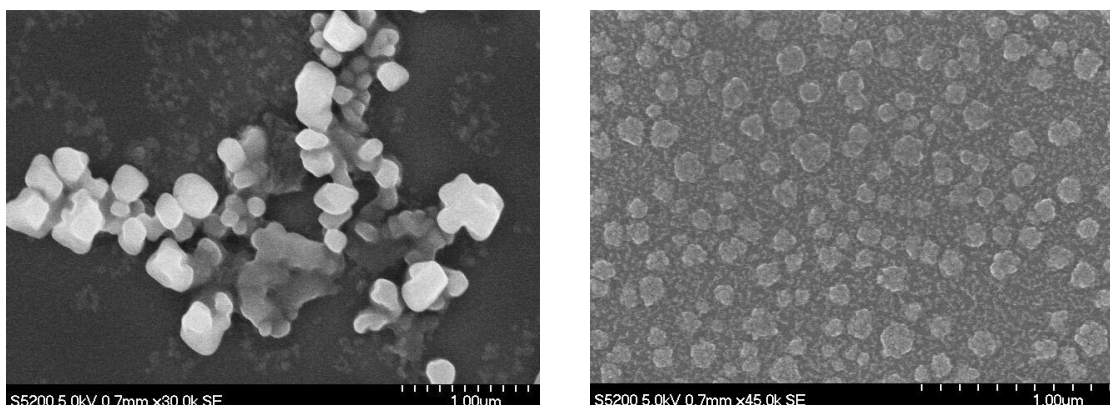


Ilustración 25. Imágenes de SEM de micelas estabilizadas con DMJF 10% en medio ácido (**M11-5**)

4.3. Carga micelar de molécula lipófila modelo: pireno

El estudio de la capacidad de carga micelar se llevó a cabo con una molécula lipófila modelo, el pireno (**Ilustración 26**), mediante espectroscopía de fluorescencia, espectroscopía UV-vis y microscopía de fluorescencia.

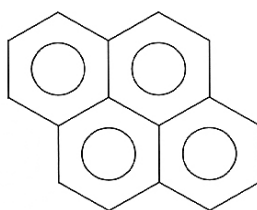


Ilustración 26. Estructura del pireno

Para el estudio de las muestras **M12-X**, cargadas con pireno, por espectroscopía de fluorescencia, se agitaron las muestras en un rotor durante varios días, y se midió la fluorescencia en 4 momentos distintos para observar la evolución de los datos. (**Tabla 5**). La muestra **M12-0** se corresponde con una disolución diluida de pireno (1,2 $\mu\text{g/ml}$) que mostró una señal nativa de emisión débil en medio acuoso, aún siendo en esta muestra donde se da la máxima concentración de pireno libre (Ocaña y cols., 2005) proponen que, la intensidad de

emisión de fluorescencia disminuye en disolución por pérdida de energía debido al choque con otras moléculas.

Muestra	Bisdienófilo	Tiempo			
		6 días	9 días	12 días	46 días
H ₂ O	...	0	0	0	0
M12-0	...	0,014	0,013	0,011	0,009
M12-1	...	0,42	0,39	0,477	0,369
M12-2	DMDOO 20%	0,189	0,198	0,192	0,164
M12-3	DMDOO 10%	0,142	0,176	0,149	0,122
M12-4	DMJF 20%	0,096	0,134	0,115	0,094
M12-5	DMJF 10%	0,215	0,19	0,228	0,178

Tabla 5. Datos de emisión en espectroscopía de fluorescencia a 375 nm de los ensayos de carga de pireno en micelas

Se estudiaron las propiedades fluorométricas del pireno en las distintas disoluciones micelares (**M12-1** a **M12-5**). Los datos de las disoluciones micelares muestran un incremento sustancial de la intensidad de la señal de emisión como se esperaba (Ocaña y cols., 2005), siendo entre 30-40 veces superior para el caso de **M12-1** y en torno a 10-20 veces mayor para las micelas entrecruzadas (desde **M12-2** a **M12-5**, **Tabla 6**).

La evolución de los datos con el tiempo se muestra en la **Ilustración 27**. En general, los valores se mantienen relativamente constantes a lo largo del tiempo, lo que indica que el acceso del pireno al núcleo micelar se produce con relativa rapidez, en los primeros momentos de contacto con la suspensión de NP. Además, los complejos pireno-NP se mantienen estables durante el tiempo de estudio (1,5 meses).

Muestra	Bisdienófilo	Incremento de la emisión fluorescencia a distintos tiempos respecto a M12-0			
		6 días	9 días	12 días	46 días
M12-1	...	30,0	30,0	43,4	41,0
M12-2	DMDOO 20%	13,5	15,2	17,5	18,2
M12-3	DMDOO 10%	10,1	13,5	13,5	13,6
M12-4	DMJF 20%	6,9	10,3	10,5	10,4
M12-5	DMJF 10%	15,4	14,6	20,7	19,8

Tabla 6. Incremento de la señal de emisión del pireno (en tanto por uno) con respecto a la disolución acuosa **M12-0**

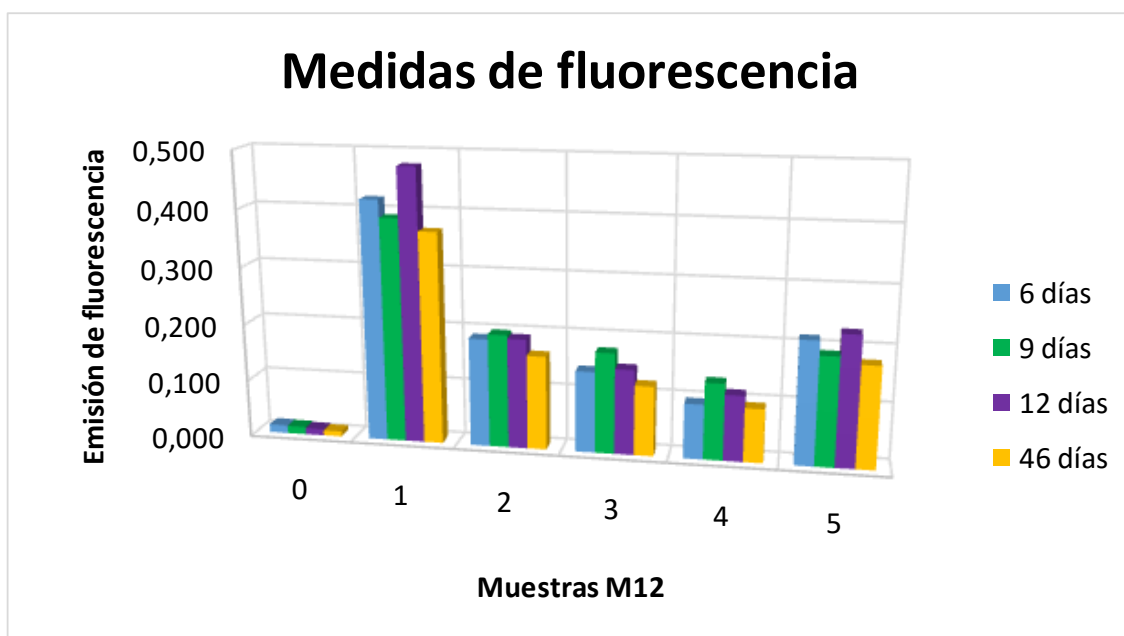


Ilustración 27. Gráfico de datos de emisión en espectroscopía de fluorescencia a 375 nm de los ensayos de carga de pireno en micelas

Se puede observar asimismo que los valores de emisión disminuyen cuando la micela está entrecruzada (muestras **M12-1** a **M12-5**) y en el caso del agente entrecruzante DMJF, cuanto mayor fue el grado de entrecruzamiento (**M12-4** con relación a **M12-5**), menor fue la emisión fluorescente. En cambio, en el caso de las micelas entrecruzadas con el bisdienófilo más hidrófilo, DMDOO, los núcleos más entrecruzados (**M12-2** en comparación con **M12-3**) mostraron una mayor fluorescencia, probablemente debido al realce del carácter lipófilo del mismo.

Se tomaron imágenes en el microscopio de fluorescencia de las distintas muestras y se observó que en el caso de las micelas no entrecruzadas, el tamaño micelar se incrementaba sustancialmente respecto a las micelas no cargadas con pireno.

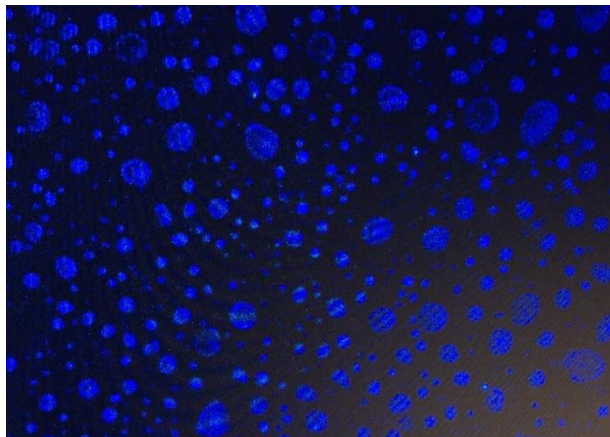


Ilustración 28. Imagen del microscopio de fluorescencia. Ensayos de carga de pireno en micelas (M12-1)

Se concluye por tanto que las nanopartículas formadas son capaces de incorporar de manera efectiva una molécula hidrofóbica en su núcleo. Por ello, se continuará el presente trabajo con el estudio de la inclusión de un fármaco, la pilocarpina, con baja solubilidad en agua y un alto impacto farmacológico, usado en clínica en xerostomía y como coadyuvante en el tratamiento de cáncer de cuello y cabeza, además de en el Síndrome de Sjogren (Mosqueda y cols., 2004).

5. TRABAJO POR FINALIZAR

Debido a la extensión del presente trabajo queda por finalizar:

1. El análisis de RMN de carbono-13 del copolímero auto-ensamblable
2. La caracterización del bisdienófilo DMJF
3. Los ensayos de captación de pilocarpina por las NP micelares y su liberación posterior mediante cambios de pH

6. CONCLUSIONES

Después de un curso dedicada al presente trabajo, las conclusiones a las que se ha llegado han sido las siguientes:

Se han sintetizado copolímeros de bloque de naturaleza anfifílica mediante ATRP con baja polidispersidad y un excelente control sobre la composición del material, encontrándose que el polímero con propiedades auto-ensamblables fue aquel con la composición relativa (DMA₆₂-HEMA₃₈)-*block*-(DEA₈₉-FMA₁₁).

En medio acuoso y a concentraciones de polímero inferiores a 0,45 mg/ml se produce el auto-ensamblaje de las cadenas poliméricas de forma espontánea, generándose una suspensión cuasi-monodispersa de NP de estructura micelar como se evidencia mediante estudios de DLS (PDI = 0,12; D_h = 177 nm) y SEM. La concentración crítica micelar (CMC = 0,078 mg/ml) se determinó experimentalmente mediante estudios UV-vis.

Se han sintetizado con buenos rendimientos dos bisdienófilos, uno hidrófilo y otro lipófilo, que actúan como agentes entrecruzantes del núcleo micelar. Con respecto a las reacciones de entrecruzamiento del mismo, se observó que los mejores resultados se obtuvieron con grados de entrecruzamiento del 10 % y el 20 %. En todos los casos, se obtuvieron micelas estabilizadas, como se confirmó mediante experimentos de estabilidad en medio ácido, manteniéndose íntegras, lo que se confirmó por DLS y SEM. Además, se observó que estas micelas fueron estables a lo largo del tiempo (> 5 meses) y a las temperaturas de trabajo.

Y por último, se ha llevado a cabo la carga de las NP con una molécula lipófila modelo, el pireno, constatándose el éxito del proceso mediante espectroscopía de fluorescencia, espectroscopía UV-vis y microscopía de fluorescencia. Todas las muestras exhibieron un incremento sustancial (entre 10 y 40 veces superior a las muestras sin micelas) de la intensidad de la señal de emisión de fluorescencia a 375 nm.

Los resultados encontrados son de gran relevancia por desplegar las NP sintetizadas un gran potencial como sistemas transportadores de fármacos; por un lado, por la importancia que tienen los sistemas de vectorización de fármacos con NP, especialmente en fármacos hidrófobos, y por otro, por tratarse de “sistemas inteligentes” capaces de liberar el principio activo bajo estímulos externos específicos.

Se ha demostrado, por tanto, que el trabajo ha sido exitoso y se han logrado los objetivos que en un principio se habían propuesto.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarez C, Concheiro A, Sosnik A. Micelas poliméricas para encapsulación, vectorización y cesión de fármacos. En: de Sousa H, Braga M, Sosnik A, editores. Biomateriales aplicados al diseño de sistemas terapéuticos avanzados. 1ª ed. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra; 2015. p. 183-217.
2. Areizaga J, Cortázar M, Elorza J, Iruin J. Polímeros. 1ª ed. Madrid: Síntesis; 2002.
3. Ball E. Liposomas en Dermatología. *Derm Venez*. 1995; 33(1): 15-23.
4. Chen S, Cardozo AF, Julcour C, Blanco JF, Barthe L, Gayet F, et al. Amphiphilic core-cross-linked micelles functionalized with bis(4-methoxyphenyl)phenylphosphine as catalytic nanoreactors for biphasic hydroformylation. *Polymer*. 2015; 72: 327-335.
5. Cuadros-Moreno A, Pimentel R, Martín-martínez E, Yañez J. Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. *LAJPE*. 2014; 8(4): 4314.1-4314.5.
6. De los Santos G, Elizalde L, Castro B, García A, Medellín D. Preparación de copolímeros fotoactivos por polimerización radicalica por transferencia de átomo (ATRP). *J Mex Chem Soc*. 2004; 48(4): 332-337.
7. De Paz MV, Robinson KL, Armes SP. Synthesis and solution properties of Dimethylsiloxane-2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate block copolymers. *Macromolecules*. 2000; 33(2): 451-456.
8. Ferris C, De Paz MV; Aguilar de Leyva A, Caraballo I, Galbis JA. Reduction-sensitive functionalized copolyurethanes for biomedical applications. *Polym Chem*. 2014; 5(7): 2370-2381.
9. Gacal B, Durmaz H, Tasdelen MA, Hizal G, Tunca U, Yagci Y, et al. Anthracene-maleimide-based Diels-Alder "click chemistry" as a novel route to graft copolymers. *Macromolecules*. 2006; 39(16): 5330-5336.
10. Galbis E, De Paz MV, McGuinness KL, Angulo M, Valencia C, Galbis JA. Tandem ATRP/Diels-Alder synthesis of polyHEMA-based hydrogels. *Macromolecules*. 2014; 5(18): 5391-5402.
11. Garg SM, Xiong X, Lu C, Lavasanifar A. Application of Click Chemistry in the Preparation of Poly (ethylene oxide) - block -poly (ϵ -caprolactone) with Hydrolyzable Cross-Links in the Micellar Core. *Macromolecules*. 2011; 44: 2058–2066.
12. Irache JM. Nanomedicina: nanopartículas con aplicaciones médicas. *An Sist Sanit Navar*. 2008; 31(1): 7-10.

13. Jeong B, Gutowska A. Lessons from nature: stimuli-responsive polymers and their biomedical applications. *Trends Biotechnol.* 2002; 20(7): 305-311.
14. Kanamala M, Wilson WR, Yang M, Palmer BD, Wu Z. Mechanisms and biomaterials in pH-responsive tumour targeted drug delivery: A review. *Biomaterials.* 2016; 85: 152-167.
15. Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem.* 2001; 40(11): 2004-2021.
16. Ma X, Tian H. Stimuli-Responsive Supramolecular Polymers in Aqueous Solution. *Acc. Chem. Res.* 2014; 47(7): 1871-1981.
17. Moad G, Rizzardo E, Thang S. Living Radical Polymerization by the RAFT Process. *Aust. J. Chem.* 2005; 58(6): 379-410.
18. Moad G, Rizzardo E, Thang S. Living Radical Polymerization by the RAFT Process – A First Update. *Aust. J. Chem.* 2006(10); 59: 669-692.
19. Moad G, Rizzardo E, Thang S. Living Radical Polymerization by the RAFT Process – A Second Update. *Aust. J. Chem.* 2009; 62(11): 1402-1472.
20. Mosqueda A. Efecto del clorhidrato de pilocarpina como estimulante de la producción salival en pacientes sometidos a radioterapia de cabeza y cuello [En línea]. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*, 2004. [Consultado en Mayo 2016]. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1698-44472004000300004&script=sci_arttext&tIng=e
21. Nikova AT, Gordon VD, Cristobal G, Talingting MR, Bell DC, Evans C, et al. Swollen vesicles and multiple emulsions from block copolymers. *Macromolecules.* 2004; 37(6): 2215–2218.
22. Ocaña JA, Barragán FJ, Callejón M. Spectrofluorimetric and micelle-enhanced spectrofluorimetric determination of gatifloxacin in human urine and serum. *J Pharm Biomed Anal.* 2005; 37(2): 327-332.
23. Potter PA. *Fundamentos de enfermería* [En línea]. 8ª ed. Mosby/Doyma Libros, 2002. [Consultado en Mayo 2016]. Disponible en: http://fama.us.es/record=b2156488~S5*sp
24. Robinson KL, De Paz MV, Wang XS, Armes SP. Synthesis of Well-Defined, Semibranched, Hydrophilic–Hydrophobic Block Copolymers Using Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules.* 2001; 34(17): 5799-5805.
25. Rodríguez-Hernández J, Checot F, Gnanou Y, Lecommandoux S. Toward “smart” nano-objects by self-assembly of block copolymers in solution. *Prog. Polym. Sci.* 2005; 30(7):

- 691-724.
26. Roy D, Brooks WL, Sumerlin BS. New directions in thermoresponsive polymers. *Chem. Soc. Rev.* 2013; 42(17): 7214-7243.
 27. Shmaljohann D. Thermo-and pH-responsive polymers in drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2006; 58(15): 1655-1670.
 28. Stevens MP. *Polymer Chemistry: An introduction*. 3^a ed. New York: Oxford University Press; 1999.
 29. Villafuerte-Robles L. Nanotecnología Farmacéutica. *Razón y Palabra*. 2009; 68(1): 1–20.
 30. Xing Y, Zhao J, Conti PS, Chen K. Radiolabeled Nanoparticles for Multimodality Tumor Imaging. *Theranostics*. 2014; 4(3): 290-306.