

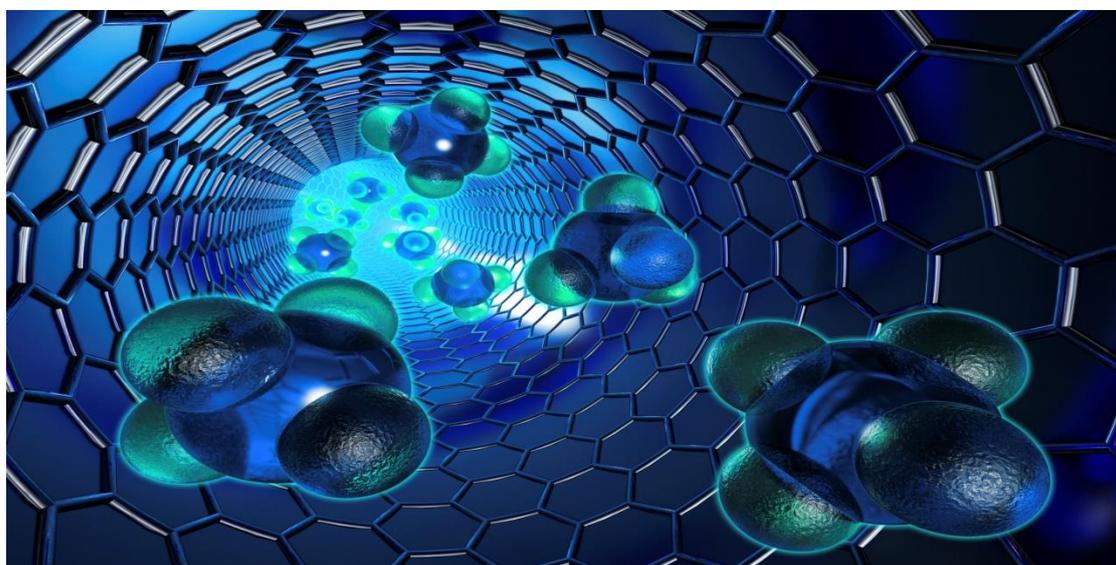


UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

**“Preparación de una molécula en tribloque conteniendo bis-
azobenceno por transesterificación”**

Ismael Manuel González González





FACULTAD DE FARMACIA, UNIVERSIDAD DE SEVILLA

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN FARMACIA

“Preparación de una molécula en tribloque conteniendo bis-azobenceno por transesterificación”

TFG de carácter experimental

Autor: Ismael Manuel González González

Sevilla, 26 de noviembre de 2018

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica

Tutores: Manuel Bueno Martínez, Inmaculada Molina Pinilla

RESUMEN

La transesterificación es una reacción clásica en química orgánica y muy usada en la industria. Existen numerosos antecedentes de su uso en laboratorios, así como en la industria farmacéutica, para sintetizar moléculas anfifílicas (parte hidrofóbica y parte hidrofílica), que precisamente por presentar este carácter pueden formar micelas. Esto es debido a que la parte hidrofóbica de estas moléculas se agregan y forman el núcleo de las micelas, quedando rodeados por una capa exterior que contiene la parte hidrofílica de la molécula. En el presente trabajo fin de grado se ha utilizado la reacción de transesterificación para preparar diversas macromoléculas anfifílicas a partir de bis-azobenceno dietiléster, un compuesto escasamente soluble, y polietilén glicol monometil éter (MeO-PEG_x) de diferentes pesos moleculares, donde x corresponde a la masa molar del PEG empleado. Se usaron MeO-PEG2000 en proporción 1:1 y MeO-PEG350 en proporción 1:1 y 1:2. Las reacciones de transesterificación se llevaron a cabo en ausencia de disolvente y en presencia del catalizador metálico octanoato de estaño. Los resultados obtenidos por resonancia magnética nuclear indican que una de las macromoléculas preparadas, el bis-azobenceno-diPEG350 se sintetizó con éxito obteniéndose con un buen rendimiento, estando su estructura de acuerdo con los datos espectroscopicos. También se confirmó su capacidad para autoensamblarse, probablemente en forma de micelas, encontrándose que la concentración micelar crítica es 1,318 mg/mL, según los espectros de excitación de fluorescencia de pireno. Al contrario que el compuesto de partida bis-azobenceno dietiléster, el bis-azobenceno-diPEG350 es soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos usuales y en agua.

Palabras Clave: transesterificación, azobenceno, micelas, moléculas anfifílicas.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 <i>La reacción de transesterificación, ¿en qué consiste?</i>	9
1.2 <i>Principales aplicaciones industriales de la transesterificación</i>	10
1.3 <i>Antecedentes</i>	22
2. OBJETIVOS.....	22
3. METODOLOGÍA.....	22
3.1 <i>Métodos generales</i>	22
3.2 <i>Síntesis de bis-azobenceno dietiléster</i>	25
3.3 <i>Transesterificación y síntesis de macromoléculas anfifílicas</i>	27
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
4.1 <i>Preparación y caracterización de las moléculas anfifílicas</i>	30
4.2 <i>Preparación y caracterización de las nanopartículas</i>	34
5. CONCLUSIONES.....	37
6. ABREVIATURAS.....	37
7. BIBLIOGRAFÍA.....	38

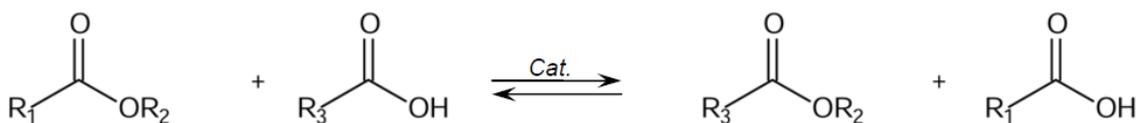
1. INTRODUCCIÓN

La reacción de transesterificación es una de las reacciones más usadas en química orgánica. Se pueden encontrar números ejemplos de su uso en la síntesis de muy diversos compuestos orgánicos así como en la preparación de materiales poliméricos; además, también goza de innumerables aplicaciones industriales, desde la producción de ésteres de aceites y grasas hasta la búsqueda de nuevas fuentes de energía renovable. En este trabajo fin de grado se comentarán algunas aplicaciones de esta reacción descritas en la última década, centrándonos especialmente en su uso en la industria farmacéutica.

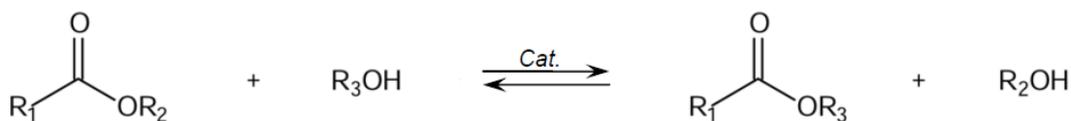
1.1 La reacción de transesterificación, ¿en qué consiste?

El término transesterificación se usa generalmente para designar a las reacciones en las que se produce un intercambio o sustitución del grupo acilo o alquilo de un éster con otra molécula. Así, si un éster interacciona con un ácido carboxílico para sustituir su grupo acilo por el del ácido, la reacción se denomina *acidólisis*; si el éster reacciona con un alcohol para sustituir su grupo alquilo por el del alcohol se conoce como *alcoholisis*; y si existe un intercambio entre los grupos acilo y alquilo de dos ésteres diferentes, la reacción se define como *interesterificación* (Figura 1) (Torossi, 2006).

Acidólisis:



Alcoholólisis:



Interesterificación:

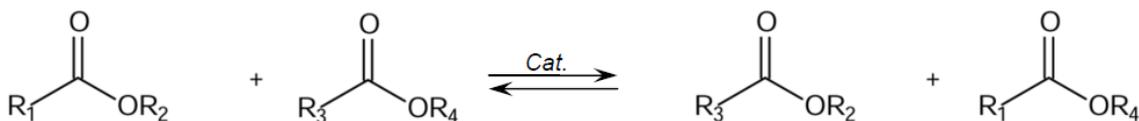


Figura 1. Reacciones generales de transesterificación

En la industria farmacéutica, la reacción de transesterificación suele llevarse a cabo mediante catálisis enzimática, usando habitualmente lipasas como *Candida antarctica*, o a través de catalizadores metálicos, generalmente basados en zinc o en estaño.

1.2 Principales aplicaciones industriales de la transesterificación

En los últimos años esta reacción ha sido muy usada para crear nuevos sistemas de liberación de fármacos, la mayor parte de ellos de tipo polimérico. Estos sistemas poliméricos son capaces de controlar la liberación de sustancias de interés farmacológico de modo que se obtengan niveles sanguíneos del fármaco definidos durante un tiempo específico (Schoenhammer y cols., 2009). Se elaboran usando polímeros biodegradables que habitualmente presentan la característica de ser anfifílicos, puesto que mejora la estabilidad termodinámica en solución acuosa de estos sistemas y los dota de capacidad de auto-ensamblaje (Figura 2) (Shah y cols., 2010).

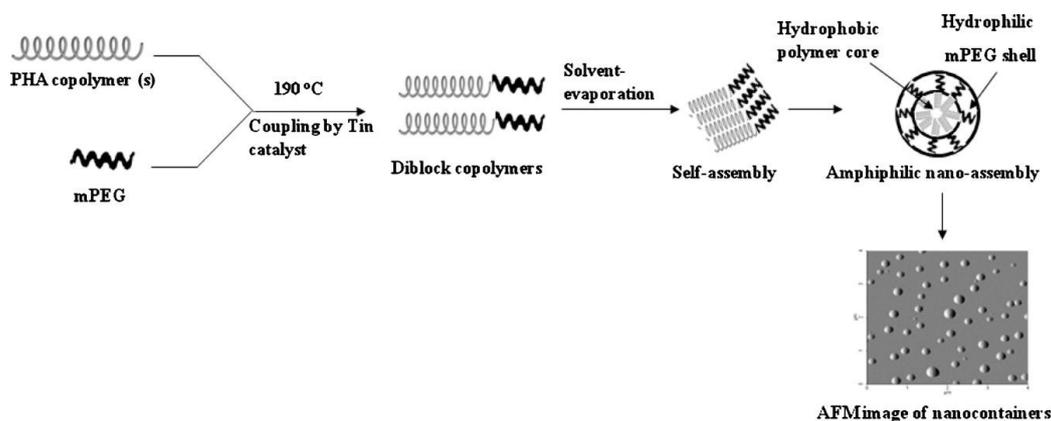


Figura 2. Síntesis de un copolímero en bloque anfifílico y posterior auto-ensamblaje en nanopartículas.

El carácter anfifílico se basa en que el polímero presente una constitución en bloques, uno hidrófobo que forma el núcleo interno donde se solubilizará el fármaco de carácter lipófilo, y otro bloque hidrofílico que formará la cubierta externa del sistema transportador. Es esencial que el nanotransportador presente una cubierta externa formada por un material compatible con la sangre y no tóxico para evitar el reconocimiento por los macrófagos, prolongar el tiempo de circulación en sangre y permitir así la liberación sostenida del fármaco (Mosqueira y cols., 2001; Duan y cols., 2006). El PEG (véase el apartado “Abreviaturas”, página 37) se usa frecuentemente como parte de la cubierta externa, debido a su biodegradabilidad y

biocompatibilidad, estando además aprobado su uso por la FDA. Asimismo, se ha comprobado que la incorporación de uno de sus derivados, el mPEG, en la cubierta externa reduce los efectos secundarios asociados a los polímeros (Kumar y Homme, 2008).

En la bibliografía se pueden encontrar procedimientos que describen la preparación de nanopartículas a partir de copolímeros en bloque anfifílicos usando la reacción de transesterificación en presencia de 2-etilhexanoato de estaño (II) como catalizador (Figura 3) (Shah y cols., 2010; 2012). Estos copolímeros consisten en una combinación entre PHA y mPEG, y fueron sintetizados siguiendo el procedimiento de Ravenelle y Marchessault (Figura 3).

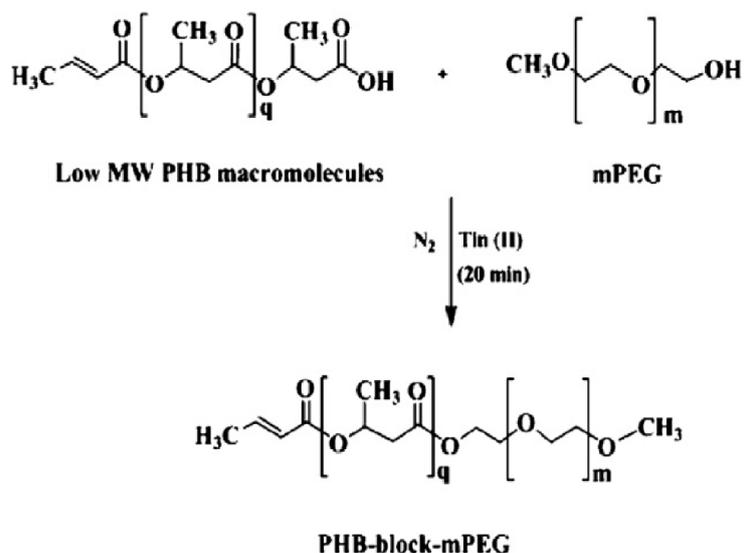


Figura 3. Fase de transesterificación del procedimiento (Ravenelle y Marchessault, 2002).

La encapsulación del fármaco en estas nanopartículas (Figura 4) presenta numerosas ventajas por su reducido tamaño, alta estabilidad y baja toxicidad. Así, permiten administrar la dosis efectiva de principio activo en un sitio específico durante un período sostenido de tiempo, esto es particularmente interesante en el caso del tratamiento de tumores, evitando los efectos secundarios asociados a dosis repetidas del fármaco. Esto es debido al efecto de permeabilidad y retención mejorada según el cual las partículas de pequeño tamaño pueden permear fácilmente los tejidos tumorales aprovechando la defectuosa estructura de vasos sanguíneos de estos tejidos, así como de un sistema linfático dañado, que carece de un drenaje efectivo para eliminar partículas tan pequeñas. De esta manera las nanopartículas se concentrarán en el tumor, evitando así la diseminación del fármaco por el resto del organismo.

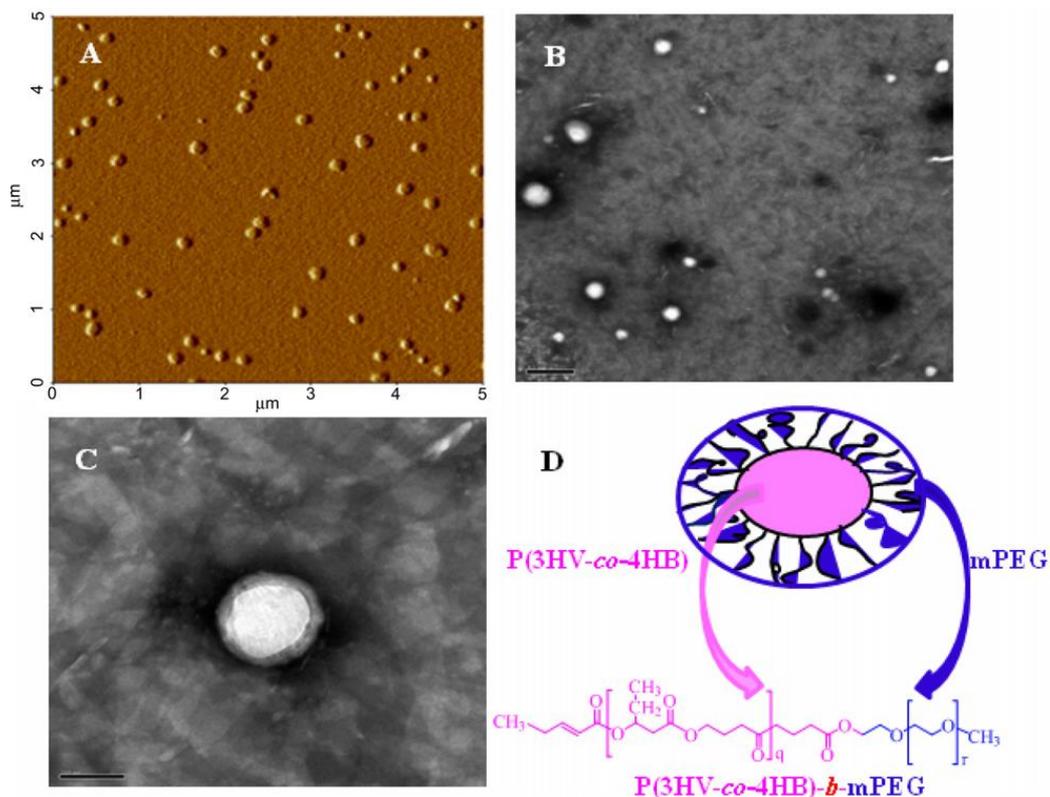


Figura 4. Observaciones morfológicas de nanopartículas cargadas. (A), imagen obtenida con AFM; (B), mediante TEM; (C), imagen ampliada tomada con TEM en la que se puede apreciar la estructura core-shell polimérica de las nanopartículas; (D), representación esquemática de la estructura interna de las nanopartículas.

En el año 2010 se realizó un estudio sobre la síntesis de un profármaco polimérico de ketoprofeno (Wang y cols., 2010). Los profármacos poliméricos de los antiinflamatorios no esteroideos han sido desarrollados para evitar los efectos secundarios gastrointestinales y mejorar la solubilidad y velocidad de liberación. Se comprobó que el polímero que formaba el profármaco era estable en el ambiente gástrico y liberaba el fármaco lentamente, lo cual podría reducir en gran medida los efectos indeseados de los AINE. En este estudio se defiende el uso de la polimerización enzimática para sintetizar polímeros, dado que es un método económico, sostenible y respetuoso con el medio ambiente. Por ello, una de las reacciones usadas en este experimento fue la transesterificación catalizada por lipasa tipo B de *Candida antarctica* (CALB) (Figura 5).

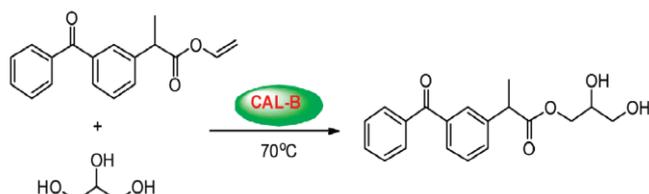


Figura 5. Esquema de una de las fases de la elaboración del profármaco de ketoprofeno: Transesterificación entre ketoprofén vinil éster y glicerol para producir ketoprofén glicerol éster.

El potencial de la catálisis enzimática para controlar procesos de polimerización de manera ecológica se comprobó también sintetizando unas estructuras constituidas por PEG y tetraetilén glicol, que servirán como núcleo de novedosos dendrímeros diseñados para llevar fármacos (Puskas y cols., 2011). Estos incluyen múltiples agentes terapéuticos, de diagnóstico, de localización y de imagen (Figura 6).

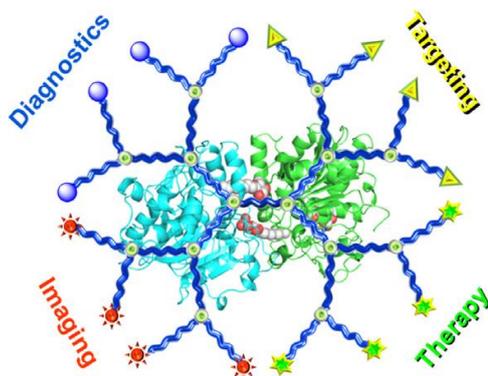


Figura 6. Diseño del dendrímero para la liberación específica de fármacos.

Estas estructuras se sintetizaron mediante un proceso que incluía la transesterificación catalizada por CALB. Además, se argumenta que las reacciones de transesterificación catalizadas por lipasa son especialmente útiles para la preparación de compuestos ópticamente activos por resolución de racémicos.

Se han realizado estudios sobre la mejora de la solubilidad y la biodisponibilidad de la artemisinina (Figura 7), fármaco antimalárico, mediante su asociación a nanovehículos de ciclodextrina (CD) sintetizados por transesterificación en presencia de la enzima termolisina (Choisnard y cols., 2011; Yaméogo y cols., 2012).

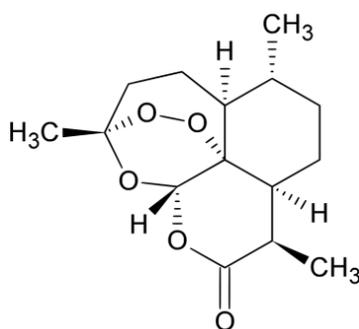


Figura 7. Estructura de la artemisinina.

Una de las ventajas que aporta la reacción de transesterificación enzimática en este procedimiento es la posibilidad de producir fácilmente diversos derivados de CD y en grandes cantidades, lo cual ofrece una amplia gama de morfologías del compuesto. Se demostró que los derivados anfifílicos de CD pueden auto-ensamblarse en nanosistemas con buenas propiedades como transportadores de fármacos por vía intravenosa. Para prolongar el tiempo de circulación en sangre y asegurar así que el fármaco alcanza los eritrocitos infectados, estos derivados de CD se integraron en una cubierta hidrófila constituida por ésteres de PEG.

Recientemente se ha descrito la elaboración de hidrogeles poliméricos inyectables en los que se emplea la reacción de transesterificación. Estos hidrogeles son muy útiles en aplicaciones biomédicas como la ingeniería de tejidos y la liberación controlada de principios activos. Tradicionalmente se usa PEG para su fabricación, pero estos hidrogeles basados en PEG tienen algunas limitaciones: el control espaciotemporal de la liberación del fármaco es restringido, lo que da lugar a un alto porcentaje de fármaco liberado durante las primeras horas de aplicación; y la dificultad para controlar el tiempo de degradación del material, de tal manera que el hidrogel, mucho tiempo después de haber liberado la última cantidad de fármaco, persiste en el organismo como un cuerpo extraño. Usando la reacción de transesterificación (Figura 9) se sintetizó un conjunto de hidrogeles con propiedades fisicoquímicas diversas, de manera que se obtuviera una plataforma suficientemente versátil que permitiera superar las limitaciones antes citadas (O'Shea y cols., 2015). Se utilizó CALB inmovilizada en resina acrílica para catalizar la transesterificación entre un poliol etoxilado y un exceso de tiol éster (Figura 9a). Se usaron dos estructuras diferentes de poliol etoxilado y cuatro estructuras para el tiol éster (Figura 9b). Como resultado se obtuvieron diversos tipos de poliol-ésteres que se combinaron con diacrilatos de PEG de diferentes pesos moleculares para así formar la plataforma de hidrogeles (Figura 9c).

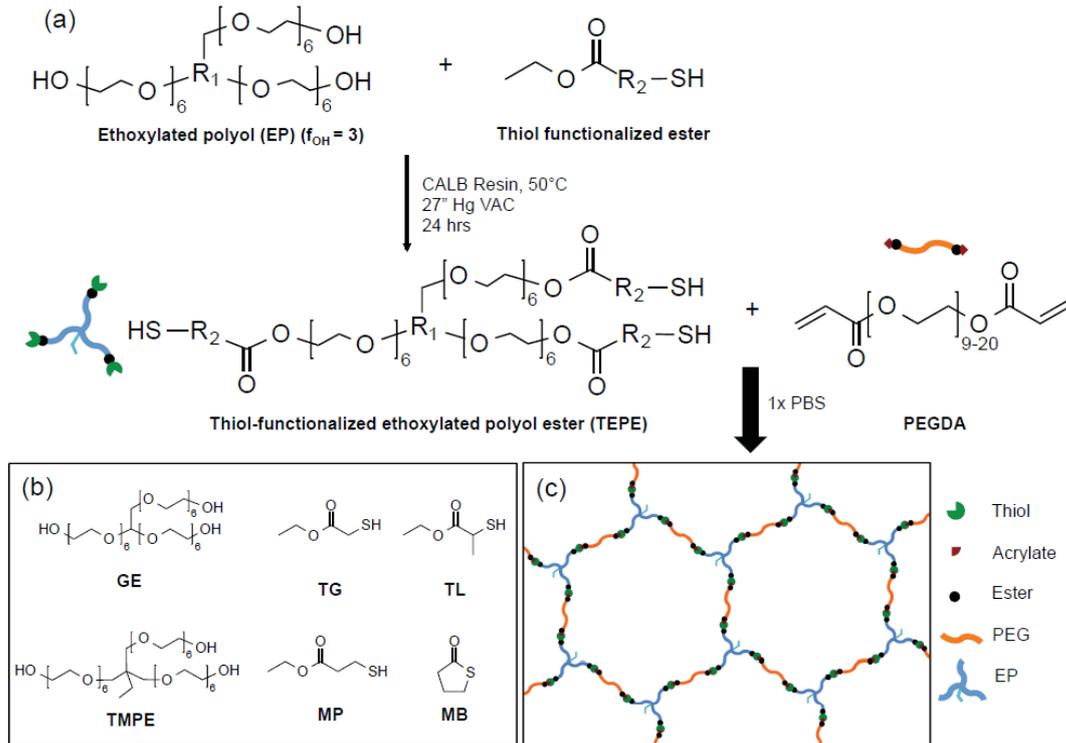


Figura 8. Esquema general de la fabricación del hidrogel.

Entre los hidrogeles de esta lista, se identificaron formulaciones que liberan el fármaco gradualmente y que permiten ajustar el tiempo de degradación del material.

Con motivo de abordar las limitaciones antes mencionadas de los hidrogeles de PEG, se realizó también una investigación en la que se sintetizó una serie de hidrogeles basados en policarbonato con glicidol semiramificado como componente hidrófilo, en lugar de PEG (Stevens y cols., 2015). Se trata de un compuesto descubierto recientemente, el cual mejora la capacidad de hinchamiento del hidrogel y, por tanto, la liberación del fármaco es más lenta y controlada. Esto se debe a que aumenta en gran medida la hidrofilia del hidrogel, por el gran número de grupos hidroxilo que posee. Para introducir el poliglicidol en la columna vertebral del policarbonato se usó la reacción de transesterificación y así reconfigurar la red polimérica que forma el hidrogel (Figura 9). La reacción fue llevada a cabo en presencia de acetato de zinc como catalizador.

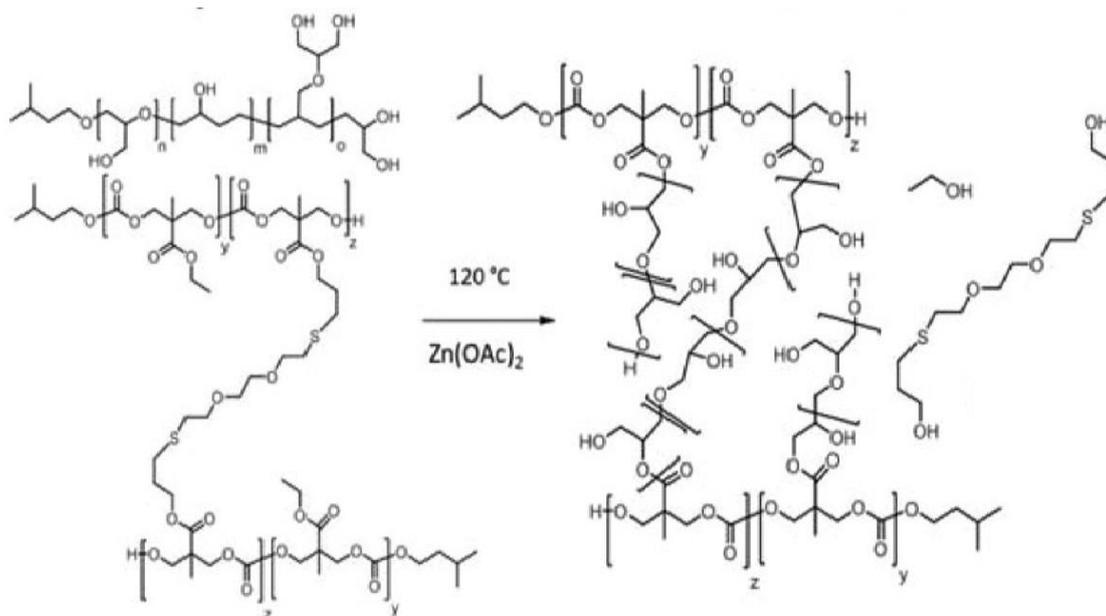


Figura 9. Reconfiguración de la red polimérica del hidrogel.

Los hidrogeles inyectables deben de cumplir una serie de requisitos para poder ser utilizados como transportadores de fármacos, fundamentalmente:

1. Excelente biocompatibilidad
2. Tasa de gelificación adecuada. Una tasa de gelificación rápida conduciría a obstrucción de la aguja durante la inyección, y una tasa demasiado lenta provocaría una rápida difusión del fármaco reduciéndose el efecto terapéutico.
3. Resistencia mecánica apropiada, para evitar la liberación anticipada del fármaco.

Un equipo de investigadores analizó las diferentes alternativas para elaborar hidrogeles inyectables de manera que cumplieran estos tres requisitos (Zhu y cols., 2017). La estrategia más versátil y sencilla resulta ser una gelificación en un solo paso, combinando simultáneamente procesos de entrecruzamiento físico (puentes de hidrógeno e interacciones π - π) y químico (transesterificación) entre los compuestos gelificantes. Siguiendo esta estrategia (Figura 10) y usando PANAM y NHS-PEG-MAL como compuestos gelificantes, se obtuvieron hidrogeles con un buen control de la tasa de gelificación, biocompatibilidad favorable y excelentes propiedades mecánicas.

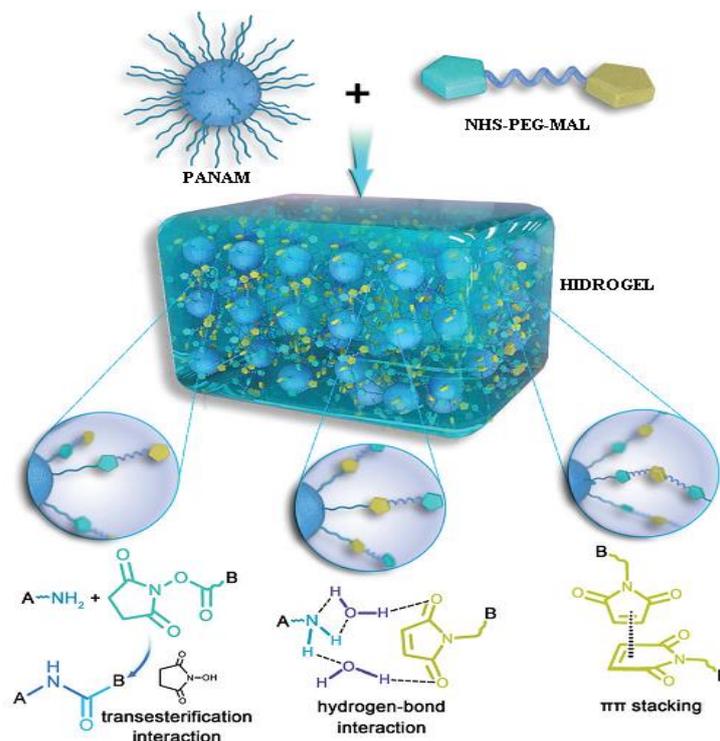


Figura 10. Esquema que muestra la estructura interna de los hidrogel.

Aparte de los hidrogel, existen otros sistemas de gelificación poliméricos que son sensibles a la temperatura (termogel), y pueden ser sintetizados mediante la reacción de transesterificación. Estos novedosos sistemas son muy prometedores especialmente para el tratamiento en oncología ya que duran más tiempo sin degradarse comparados con otros sistemas. Además presentan gran facilidad de administración, dado que son inyectables y gelifican en el cuerpo bajo las condiciones fisiológicas, formando un depósito *in situ* de gel intratumoral. Esto permite administrar agentes quimioterapéuticos de forma mínimamente invasiva, ya que al localizar la liberación de fármaco específicamente en el tumor se reducen los efectos secundarios. Para demostrarlo, se realizó un experimento en ratones a los que se les había provocado un tumor en la espalda (Wu y cols., 2016). Como tratamiento, se usó un fármaco ampliamente utilizado contra el cáncer: doxorubicina. A algunos ratones se les administró este fármaco con fluorescencia en solución salina (Figura 11, izquierda); a otros, se les administró un termogel polimérico cargado previamente con doxorubicina fluorescente (Figura 11, derecha). Este termogel fue sintetizado usando la reacción de transesterificación en presencia de un catalizador basado en estaño.

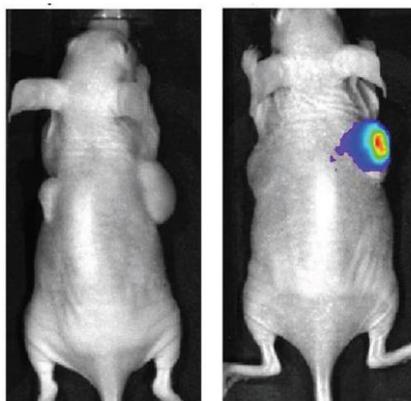


Figura 11. Imagen de fluorescencia de ratones con tumor.

Las imágenes de fluorescencia muestran que el termogel permitió localizar el fármaco específicamente en el tumor. Por el contrario, la solución salina con doxorrubicina no mostró fluorescencia, lo que indica que la concentración de fármaco fue significativamente menor, y que podría haberse difundido en todo el cuerpo o haber sido metabolizado cuando el termogel no se usó como vehículo.

Dejando a un lado los sistemas de gelificación, Du y colaboradores propusieron un sistema de liberación de insulina que permite la supervisión del tratamiento (Du y cols., 2016). Consiste en micelas fluorescentes sensibles a la glucosa, diseñadas y preparadas mediante polimerización fotoiniciada y transesterificación enzimática (CALB) (Figura 12).

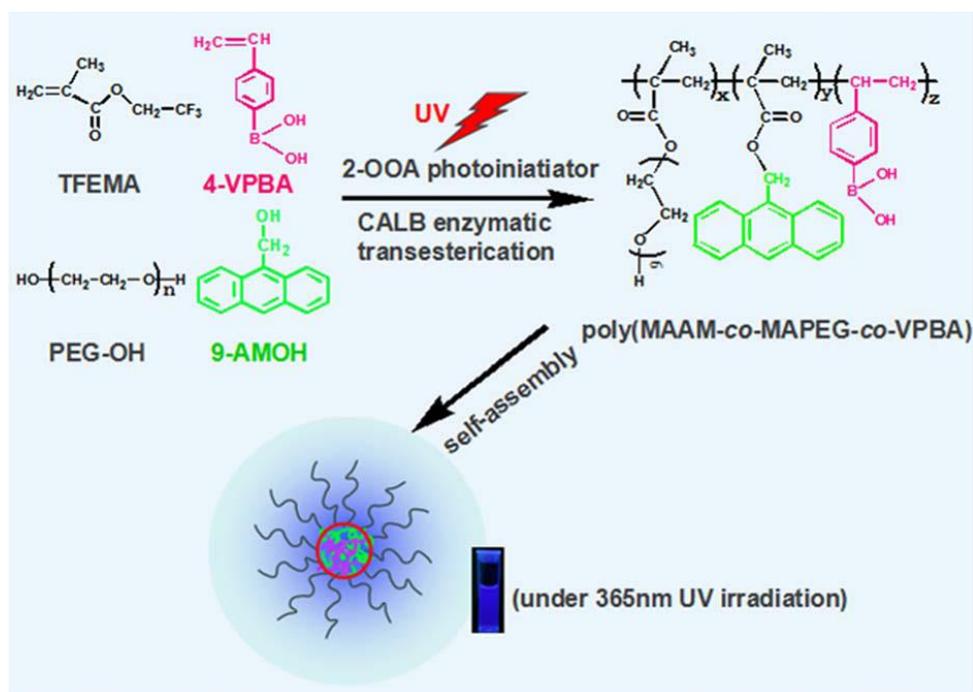


Figura 12. Ruta sintética del copolímero formador de micelas fluorescentes sensibles a glucosa.

Debido a la característica anfifílica de los copolímeros utilizados, las micelas poliméricas pudieron formarse mediante auto-ensamblaje y ser utilizadas para cargar insulina. Se escogió este procedimiento por ser más sencillo y económico que otros métodos que usan disolventes orgánicos, otros iniciadores y/o surfactantes. Además, la transesterificación enzimática permite fácilmente la introducción de compuestos fluorescentes. La fluorescencia de las micelas hace posible su detección para mejorar la supervisión del tratamiento, lo que proporciona un nuevo enfoque en la terapia de la diabetes.

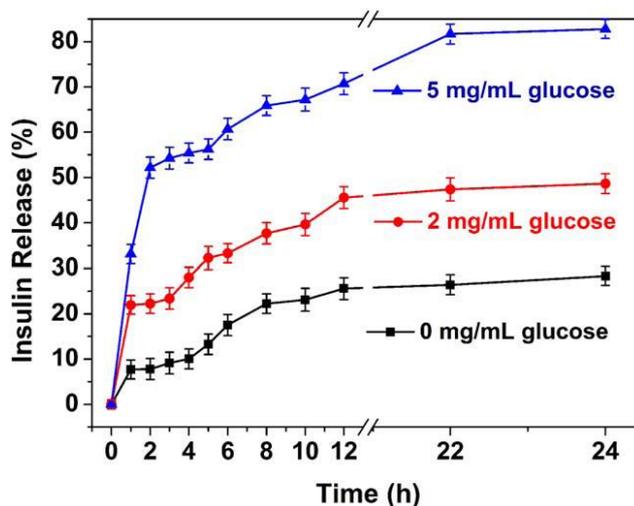


Figura 13. Gráfica comparativa de la velocidad de liberación de insulina según varias concentraciones de glucosa.

Como se muestra en la Figura 13, conforme aumenta la concentración de glucosa, aumenta la liberación de insulina por parte de las micelas. Junto con los resultados, su gran biocompatibilidad y baja toxicidad (debido en parte al uso de PEG) hace de estas micelas buenos candidatos para la liberación controlada de fármacos proporcionando una nueva estrategia para fabricar sistemas autorregulados de liberación de insulina.

Khatri y colaboradores sintetizaron un material de encapsulación polimérico para el colorante verde de indocianina (ICG) (Khatri y cols., 2017). Se trata de un compuesto con numerosas aplicaciones médicas como por ejemplo en el tratamiento del cáncer, pero que posee ciertas limitaciones como una vida media corta y baja estabilidad en solución acuosa. Con su encapsulación se pretende superar estas limitaciones. Los compuestos **C** y **D** se obtuvieron, como se muestra en la Figura 14, a partir de la reacción de transesterificación del dietil éster de PEG600 y el compuesto **A**. Como catalizador se usó Novozym 435, el cual consiste en la enzima CALB inmovilizada en un vehículo hidrófobo. Al igual que en algunos artículos citados anteriormente, se escogió esta metodología por ser respetuosa con el medio ambiente. Se

encapsuló eficazmente el colorante ICG en micelas constituidas por los copolímeros anfifílicos **C** y **D**, y el colorante mostró una mejora en su estabilidad.

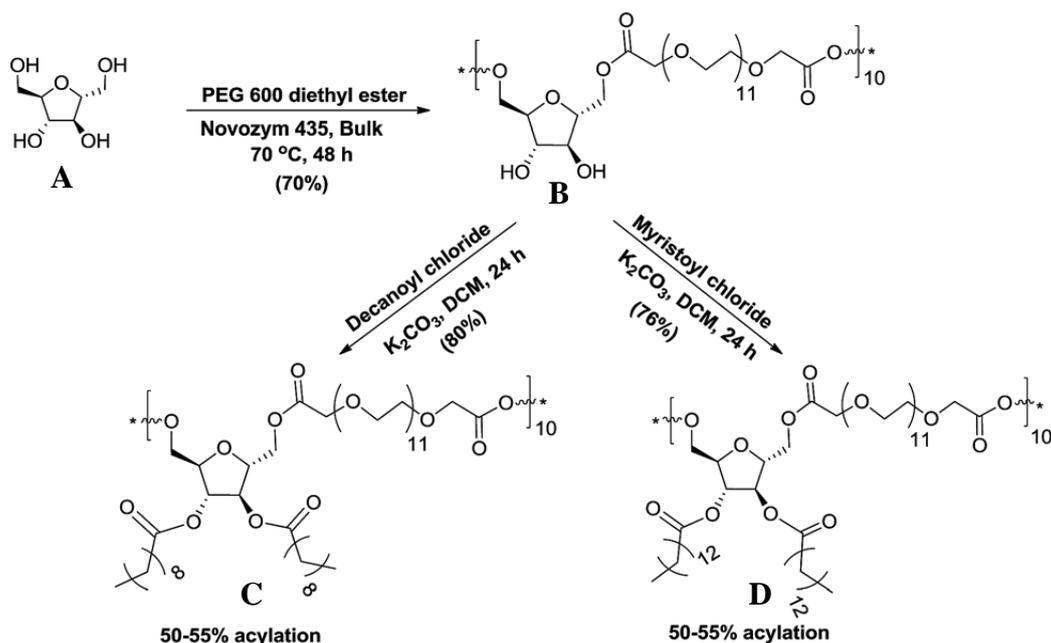


Figura 14. Esquema de la síntesis de los copolímeros **C** y **D**.

La reacción de transesterificación puede llevarse a cabo ayudándose de las microondas. Así, Jing y colaboradores sintetizaron muy recientemente un copolímero (mPEG-PLGA) empleando este procedimiento (Jing y cols., 2018). Se trata de uno de los polímeros sintéticos más usados en la fabricación de sistemas de liberación de fármacos por su excelente biodegradabilidad y biocompatibilidad, por ejemplo en la forma de nanopartículas. Tradicionalmente, este compuesto se sintetiza mediante transesterificación llevada a cabo por calentamiento convencional. Sin embargo, en este artículo se explora la síntesis del polímero a través de la reacción de transesterificación promovida por microondas, dado que posee ciertas ventajas frente al calentamiento convencional: se alcanzan altas temperaturas en períodos más cortos de tiempo, aumenta en gran medida la velocidad de reacción y, a veces, los productos resultantes tienen propiedades mejoradas. Esto ha atraído la atención de numerosos investigadores para seguir estudiando esta estrategia.

Quizá, una de las más conocidas aplicaciones de esta reacción es la producción de biodiesel, combustible que se obtiene de lípidos naturales como aceites vegetales o grasas animales y es una de las alternativas renovables a los derivados del petróleo. Sin embargo, uno

de los problemas que presenta esta aplicación de la reacción de transesterificación es la acumulación de grandes cantidades de glicerol, un subproducto de la producción de biodiesel. Por ello es urgente la búsqueda de nuevos usos para el glicerol, dada la dramática disminución de su precio.

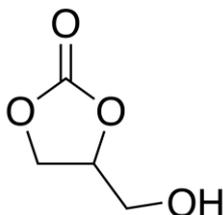


Figura 15. Estructura del carbonato de glicerol.

Con este propósito, se sintetizó carbonato de glicerol (GC) (Figura 15) por transesterificación de glicerol con dimetilcarbonato (DMC) usando un catalizador combinado de litio y óxido de zinc (Song y cols., 2017). El GC posee baja volatilidad, baja toxicidad y buena biodegradabilidad por lo que es un ingrediente muy usado en cosmética, así como para la fabricación de biolubricantes y la síntesis de polímeros y poliuretanos. Tal y como se indica en el artículo, de todos los métodos para sintetizar GC, se escoge habitualmente la transesterificación por ser la reacción con más rendimiento y casi ninguna reacción secundaria.

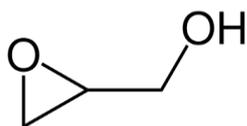


Figura 16. Estructura del glicidol.

Otro derivado del glicerol con propiedades muy similares al GC es el glicidol (GD) (Figura 16), compuesto muy útil para productos farmacéuticos y con muchas otras aplicaciones como la elaboración de perfumes, pinturas y detergentes. En una publicación reciente, se estudió el procedimiento más eficiente y respetuoso con el medio ambiente para sintetizar GD (Kondawar y cols., 2017). Se trata de una síntesis en tándem: transesterificación de glicerol con DMC para producir GC seguido de su descarboxilación en GD. El óxido de bario en combinación con lantánidos resultó ser el catalizador más eficiente para esta síntesis.

1.3 Antecedentes

En cuanto a los precedentes encontrados de reacciones de transesterificación en las que estén implicados derivados del azobenceno, citaremos un artículo publicado hace más de una década (Kang y cols., 2002), pero que se trata del antecedente más reciente encontrado. En dicho artículo se describe la síntesis de polinorbornenos conteniendo azobenceno, obteniéndose polímeros que presenta excelentes propiedades fotocromáticas y estabilidad térmica.

2. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo fin de grado ha sido transformar la molécula hidrofóbica bis-azobenceno dietiléster, compuesto con muy baja solubilidad, en diversas macromoléculas anfifílicas mediante la reacción de transesterificación con distintos polietilenglicol monometil éter de diferentes pesos moleculares. Posteriormente, comprobar la solubilidad de estos compuestos en diferentes disolventes orgánicos y en agua, así como su capacidad para formar micelas.

3. METODOLOGÍA

3.1 Métodos generales

Los reactivos y disolventes utilizados en las distintas síntesis fueron productos comerciales de las firmas Sigma-Aldrich y Panreac empleándose sin purificación previa. Polietilén glicol monometil éter (MeO-PEGs) de diversas masas molares (MeO-PEG350 y MeO-PEG2K) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich y se secaron antes de su uso mediante destilación azeotrópica con tolueno.

La evaporación de disolventes se efectuó a temperaturas inferiores a 40 °C con presiones estimadas entre 10 y 25 mm de mercurio. En los procesos de secado y almacenamiento de los disolventes se empleó tamiz molecular de 4 Å activado. Los puntos de

fusión (p.f.) se determinaron empleando un aparato de la casa Stuart, modelo SMP10, en capilares abiertos y sin corregir.

Cromatografía en capa fina

Se empleó el método de cromatografía en capa fina (c.c.f.) con carácter analítico cualitativo utilizando cromatofolios de gel de sílice Merck 60 GF₂₅₄ de un espesor de capa de 0.2 mm sobre aluminio. El eluyente utilizado en cada caso fue el mismo que el empleado en las correspondientes cromatografías en columna. Como reveladores se utilizaron: a) luz ultravioleta ($\lambda = 254$ nm); b) Ácido fosfomolibdico en EtOH al 3% y posterior calentamiento.

Cromatografía en columna

La purificación y separación de los productos de reacción se realizó por cromatografía en columna, empleando como fase estacionaria gel de sílice de tipo 60, con un tamaño de partícula de 0.040-0.063 mm (230-400 mesh). El eluyente se indica en cada caso.

Espectros de Infrarrojo (IR)

Los espectros de absorción de IR se registraron en un espectrofotómetro JASCO FT/IR-4200.

Espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se realizaron en un espectrofotómetro Bruker AMX-500 o Bruker AV300. Como disolventes se utilizaron deuterocloroformo y dimetilsulfóxido hexadeuterado. La interpretación de los espectros se facilitó utilizando los espectros de correlación bidimensional homonuclear ^1H - ^1H , y heteronuclear ^1H - ^{13}C , registrados empleando las secuencias de pulsos COSY y HETCOR, respectivamente.

Espectros de absorción en el Ultravioleta

Se registraron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2102PC de doble haz y registro automático a temperatura ambiente. Se prepararon disoluciones en agua, de concentraciones comprendidas entre $1.72 \cdot 10^{-5}$ y $3.68 \cdot 10^{-5}$ M. El registro se realizó a una velocidad media, para longitudes de onda comprendidas entre 200 y 600 nm, siendo el camino óptico de 1 cm.

Espectros de excitación en fluorescencia

Se registraron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2102PC de doble haz y registro automático a temperatura ambiente. Se prepararon disoluciones en agua, de concentraciones

comprendidas entre $1.72 \cdot 10^{-5}$ y $3.68 \cdot 10^{-5}$ M. Se obtuvieron los espectros de excitación en el rango 280-380 nm, utilizando una longitud de onda de emisión de 390 nm. La ranura de excitación y emisión se fijan a 2.5 nm.

Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Los termogramas DSC se adquirieron en un calorímetro TA DSC Q200, previamente calibrado con indio. La cantidad de muestra empleada fue aproximadamente de 2 mg de producto, colocadas en cápsulas de aluminio y bajo atmósfera de nitrógeno. La velocidad de barrido fue de $10 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Análisis Termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico se llevó a cabo en un aparato SDTQ600 de la casa TA instruments. La cantidad de muestra empleada fue aproximadamente de 8 mg de producto, colocadas en cápsulas de platino, y registrándose el experimento a una velocidad de calentamiento de $10 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, bajo un flujo de nitrógeno de $100 \text{ mL}/\text{min}$.

Tamaño de partícula y potencial zeta

El tamaño medio y el potencial zeta (carga superficial) de las nanopartículas se determinaron empleando un aparato zeta sizer (Nano ZS, Malvern Instrument) a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Las muestras estaban suficientemente diluidas para garantizar la difusión libre y el movimiento browniano sin obstáculos de las partículas. Los resultados de DLS y de potencial zeta mostrados se corresponden con la media de tres medidas.

Concentración micelar crítica (cmc)

Los valores de CMC se determinaron mediante espectroscopia de fluorescencia (Shimadzu UV-2102PC), empleando la molécula de pireno como sonda entre la fase hidrófoba y la acuosa a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Por un lado se preparó una disolución de pireno en acetona ($6 \cdot 10^{-5}$ M). Por otro lado, se prepararon una serie de disoluciones del compuesto a estudiar a diferentes concentraciones. A continuación, se añadió $80 \text{ }\mu\text{L}$ de la disolución de pireno en acetona en diferentes tubos Falcon de 50 mL y se evaporó el disolvente a presión reducida. A cada uno de estos tubos se añadió 8 mL de cada una de las disoluciones del compuesto a estudiar, de tal manera que la concentración de pireno en la disolución final fuera la misma en todos los tubos, mientras que del compuesto a estudiar variaba entre 0.5 y $5.24 \cdot 10^{-5} \text{ mg}/\text{mL}$. Posteriormente, los tubos Falcon conteniendo la mezcla pireno-producto se sonicaron a 400 W durante 10 minutos (intensidad y ciclo al máximo). Las muestras así preparadas se dejaron reposar durante la noche

hasta el día siguiente. Se midió la fluorescencia, obteniendo los espectros de excitación en el rango 280-380 nm, utilizando una longitud de onda de emisión de 390 nm.

3.2 Síntesis de bis-azobenceno dietiléster

Productos ya descritos (Torres, 2017)

4-Hidroxi-(4'-etoxicarbonil)azobenceno (1)

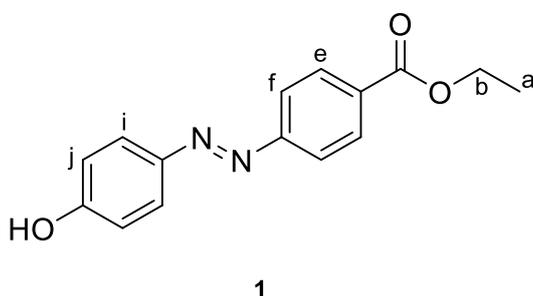


Figura 17. Estructura de 4-Hidroxi-(4'-etoxicarbonil)azobenceno

A una disolución agitada de 4-aminobenzoato de etilo (9.3 g, 0.0562 mol) en ácido clorhídrico diluido (2 M, 100 mL), enfriada en un baño de agua-hielo, se añadió durante aproximadamente 30 minutos una disolución de nitrito de sodio (4.8 g, 0.0564 mol) en agua (30 mL), procurando que la temperatura del baño se mantuviera por debajo de los 5 °C. A la mezcla de reacción resultante de color amarillo se le añadió fenol (6.34 g, 0.0673 mol), y se dejó agitando durante 90 minutos. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se vertió en un matraz de 500 mL y se neutralizó con una disolución saturada de NaHCO₃. La mezcla se filtró a vacío y el sólido obtenido se lavó con agua fría y se secó a vacío a temperatura ambiente. Finalmente, el sólido obtenido se recristalizó de una mezcla de metanol y agua (1:1), obteniéndose el producto del título como un sólido de color marrón-rojizo (9.36 g, 63%).

P.f.: 162-164 °C.

RMN (CDCl₃): ¹H, δ 8.17 (d, 2H, H-e), 7.95-7.85 (2d, 4H, H-f, H-i), 6.97 (d, 2H, H-j), 5.95 (sa, 1H, OH), 4.42 (c, 2H, H-b), 1.43 (t, 3H, H-a).

IR: ν_{max} 3389 (OH), 1691 (CO), 1591 (arC=C), 1504 (N=N), 1278, 1223 cm⁻¹ (C-O).

Trietilén glicol ditosilato (2)

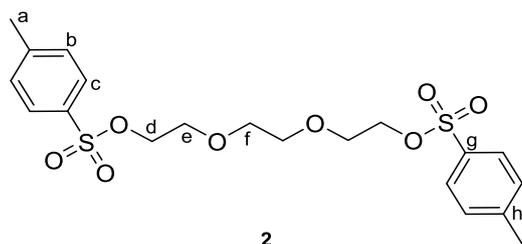


Figura 18. Estructura de trietilén glicol ditosilato

A una disolución agitada de trietilenglicol (6 ml, 6.744 g, 44.9 mmol) y cloruro de tosilato (22.88 g, 120 mmol) en diclorometano seco (70 ml), se añadió etildiisopropilamina (EDPA, 20.9 ml, 120 mmol). Al cabo de 8 horas de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con algo más de diclorometano (20 mL), se vertió en un embudo de decantación y se lavó con agua destilada (3 x 10 mL). Finalmente, la fase orgánica que se secó sobre MgSO₄ anhidro, se concentró a vacío, y el residuo se purificó en columna utilizando como eluyente una mezcla de hexano-acetato de etilo (2:1), obteniéndose el producto del título como un sólido cristalino (8.3 g, 40%).

P.f: 80-82 °C.

RMN (DMSO-*d*₆): ¹H, δ 7.79 (d, 4H, H-c), 7.48 (d, 4H, H-b), 4.11 (t, 4H, H-d), 3.56 (t, 4H, H-e), 3.40 (s, 4H, H-f), 2.43 (s, 6H, H-a); ¹³C, δ 144.86 (C-g), 132.43 (C-h), 130.09 (C-b), 127.57 (C-c), 69.90 (C-d), 69.56 (C-e), 67.87 (C-f), 21.05 (C-a).

Bis-azobenceno dietiléster (3)

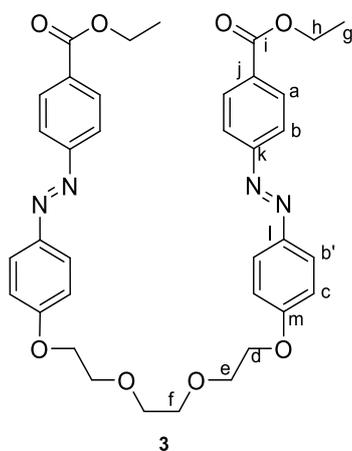


Figura 19. Estructura de bis-azobenceno dietiléster

Una suspensión de 4-Hidroxi-(4'-etoxicarbonil)azobenceno (1.0 g, 3.69 mmol), trietilenglicol ditosilato (0.846 g, 1.845 mmol), carbonato de potasio anhidro (0.51 g), y una cantidad catalítica de yoduro de potasio en acetonitrilo seco (25 mL) se calentó a reflujo durante 3 días. Transcurrido este tiempo, se enfrió a temperatura ambiente y se vertió en agua. El sólido separado se filtró, se lavó con agua fría y se secó en una estufa a vacío de bomba de acetite. El residuo obtenido se recrystalizó de acetato de etilo, obteniéndose el compuesto **3** (0.9 g, 75%) como un sólido esponjoso.

P.f.: 139-141 °C.

T_m (DSC): 139.90 °C ($\Delta H = 69.83$ j/g).

T_{Desc. máx.} (TGA): 319 °C.

RMN (CDCl₃): ¹H, δ 8.16 (d, 4H, H-a), 8.00-7.80 (m, 8H, H-b,b'), 7.02 (d, 4H, H-c), 4.41 (c, 4H, H-h), 4.22 (t, 4H, H-d), 3.91 (t, 4H, H-e), 3.79 (s, 4H, H-f), 1.42 (t, 6H, H-g); ¹³C, δ 166,15 (C-i), 161.84 (C-m), 155.26 (C-l), 147.09 (C-k), 131.57 (C-j), 130.53 (C-a), 125.14, 122.34 (C-b, b'), 114.93 (C-c), 70.98 (C-f), 69.69 (C-e), 67.78 (C-d), 61.19 (C-h), 14.53 (C-g).

IR: ν_{\max} 1710 (CO), 1599, 1580 (arC=C), 1497 (N=N), 1277, 1243 cm⁻¹ (C-O).

3.3 Transesterificación y síntesis de macromoléculas anfifílicas

Nuevas investigaciones:

Reacciones de transesterificación. Procedimiento general

Se llevaron a cabo las reacciones de transesterificación de bis-azobenceno dietiléster **3** con distintos polietilenglicol monometil éter de diferentes pesos moleculares (MeO-PEG_x), en presencia del catalizador metálico octanoato de estaño. La nomenclatura usada para referirnos a los diferentes polietilén glicoles monometiléter de diferente masa molar es MeO-PEG_x, donde x corresponde a la masa molar del polietilén glicol empleado. Así, por ejemplo, MeO-PEG350 corresponde a un polietilén glicol monometiléter de masa molar 350 gmol⁻¹.

Una mezcla de bis-azobenceno dietiléster **3** y MeO-PEG_x del peso molecular seleccionado, se calienta a 160 °C durante 30 minutos mientras se le hace vacío con una bomba de aceite. Posteriormente, la mezcla fundida, homogénea, fuertemente coloreada, se calienta a 180 °C a vacío durante una hora más. Transcurrido este tiempo, se enfría el matraz de reacción a

temperatura ambiente, y el residuo obtenido se disuelve en la mínima cantidad de diclorometano, purificándose por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de tetrahidrofurano-hexano. Finalmente, el residuo obtenido tras concentrar las fracciones que contenían el producto buscado, se disuelve en la mínima cantidad de diclorometano y se precipita en hexano. Los rendimientos y sus datos espectroscópicos se describen a continuación.

Bis-azobenceno etiléster-monopeg350 (4)

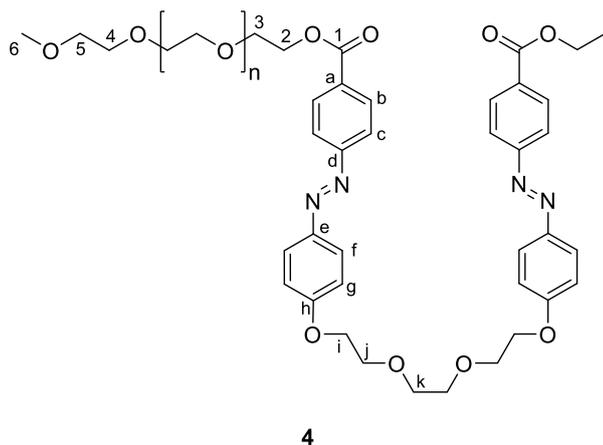


Figura 20. Estructura *Bis-azobenceno etiléster-monopeg350*

Una mezcla de bis-azobencenodietiléster **3** y polietilén glicol monometil éter (M_w 350 g mol⁻¹) en una proporción 1:1, se trató como se describe en el procedimiento general, obteniéndose el compuesto **4** con un rendimiento del 40%. De la purificación en columna se recuperó parte del producto de partida **3** (47%), por lo que el rendimiento corregido sobre el reaccionado sería del 73%.

Bis-azobenceno-diPEG350 (5)

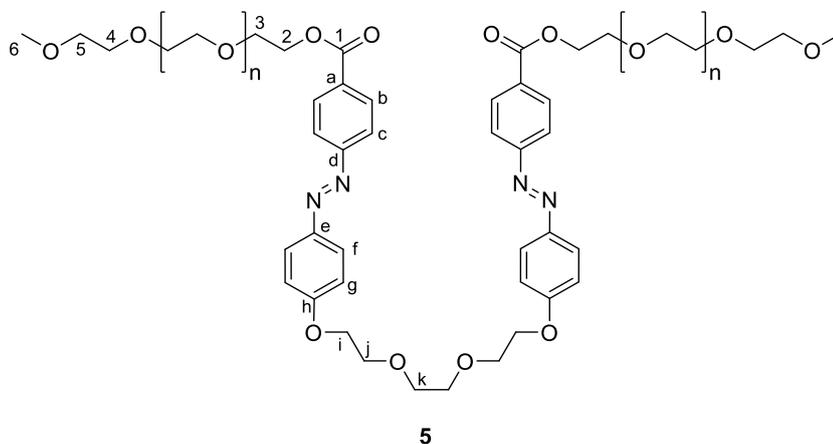


Figura 21. Estructura de *bis-azobenceno-diPEG350*

Una mezcla de bis-azobencenodietiléster **3** y polietilén glicol monometil éter (M_w 350 g mol⁻¹) en una proporción 1:2, se trató como se describe en el procedimiento general, obteniéndose el compuesto **5**, en un rendimiento del 81%.

RMN (CDCl₃): ¹H, δ 8.18 (d, 4H, H-b), 8.00-7.85 (m, 8H, H-c,f), 7.04 (d, 4H, H-g), 4.51 (m, 4H, H-2), 4.23 (m, 4H, H-i), 3.92 (m, 4H, H-j), 3.86 (m, 4H, H-3), 3.79 (s, 4H, H-k), 3.76-3.58 (m, 48H, H-4, PEG), 3.54 (m, 4H, H-5), 3.37 (s, 6H, H-6); ¹³C, δ 166.06 (C-1), 161.87 (C-h), 155.37 (C-d), 147.10 (C-e), 131.19 (C-a), 130.70 (C-b), 125.16 (C-c), 122.35 (C-f), 114.93 (C-g), 71.93 (C-5), 70.98 (C-k), 70.71 (C-4), 70.63 (C-PEG), 69.69 (C-j), 69.22 (C-3), 67.79 (C-i), 64.34 (C-2), 59.02 (C-6).

IR: ν_{\max} 1716 (CO), 1596, 1580 (Ar), 1242, 1091 cm⁻¹ (C-O).

Bis-azobenceno etiléster-monopeg2000 (6)

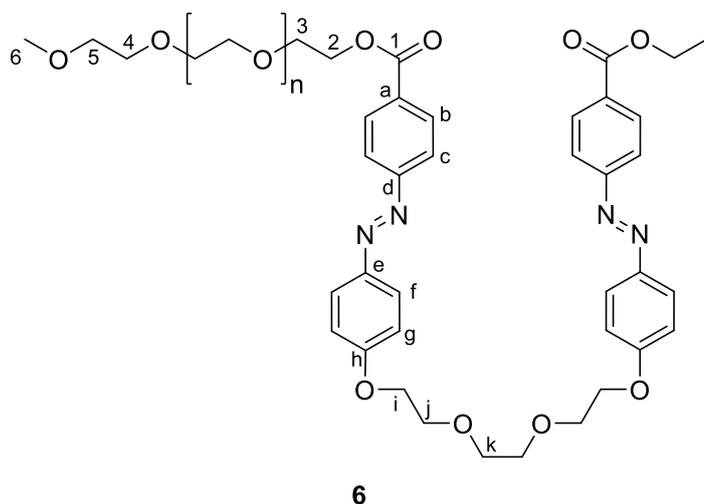


Figura 22. Estructura de bis-azobenceno etiléster-monopeg2000

Una mezcla de bis-azobenceno dietiléster **3** y polietilén glicol monometil éter (M_w 2000 g mol⁻¹) en una proporción 1:1, se trató como se describe en el procedimiento general, obteniéndose el compuesto **6** en un rendimiento del 40%.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo fin de grado se han preparado diversas macromoléculas anfifílicas utilizando bis-azobenceno dietiléster (**3**) como parte hidrofóbica y polietilén glicol monometil éster como parte hidrofílica.

4.1. Preparación y caracterización de las moléculas anfifílicas

La síntesis del bis-azobenceno dietiléster (**3**) se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito previamente (Torres, 2017); (Figura 18).

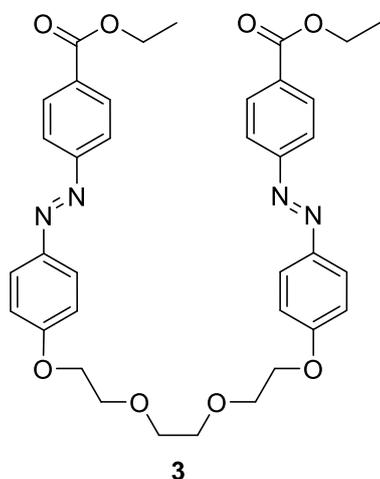


Figura 23. Estructura del bis-azobenceno dietiléster utilizado como parte hidrofóbica.

Su preparación se realiza en varios pasos de síntesis a partir de los productos comerciales 4-aminobenzoato de etilo y fenol, tal y como se indica, de nuevo, en la parte experimental de este TFG, y se muestra en la Figura 24.

El bis-azobenceno dietiléster **3** es un compuesto insoluble en agua, y que en general muestra también muy baja solubilidad en disolventes orgánicos. En diclorometano o cloroformo es algo soluble, siendo sólo soluble en disolventes polares apróticos como el dimetilsulfóxido o la dimetilformamida. Esta falta de solubilidad en los disolventes orgánicos habituales dificulta su normal reactividad.

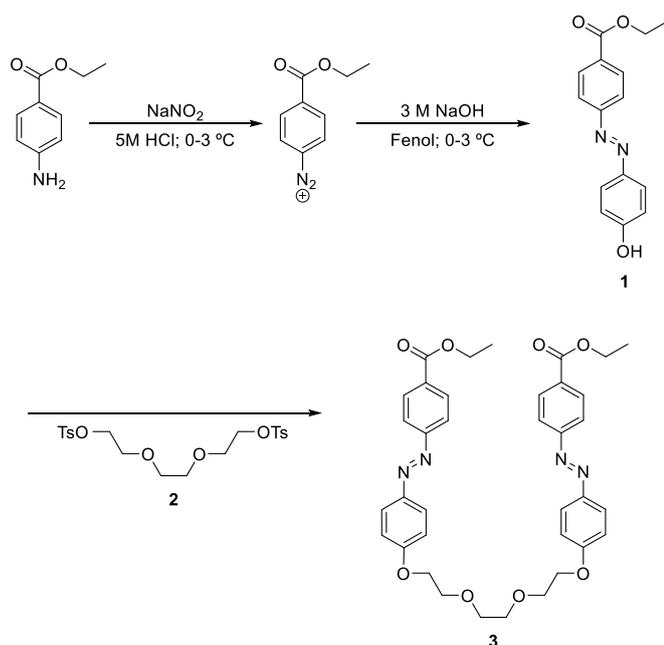


Figura 24. Esquema de preparación del compuesto 3

En este trabajo fin de grado se ha llevado a cabo la transformación de la molécula hidrofóbica **3**, escasamente soluble, en varias moléculas anfifílicas por reacción de transesterificación con polietilenglicol monometil éter (MeO-PEGx) de diferentes pesos moleculares y en presencia del catalizador octanoato de estaño. Los productos preparados, MeO-PEG350-Azo, (MeO-PEG350)₂-Azo y MeO-PEG2000-Azo, se obtienen con rendimientos aceptables (**Tabla 1**), y muestran una mayor solubilidad tanto en diferentes disolventes orgánicos como en agua.

TABLA 1				
Rendimiento obtenido y solubilidad en diferentes disolventes				
Compuesto	3	4	5	6
Rendimiento	75%	73%	81%	40%
Agua	-	+	+	+
Metanol	-	+	+	+
Acetona	-	+	+	+
Diclorometano	-	+	+	+
TBME	-	-	-	-
Hexano	-	-	-	-
DMSO	+	+	+	+

Tabla 1. Rendimiento y solubilidad de los compuestos **3**, **4**, **5** y **6**.

Las condiciones de reacción son similares a otras reacciones de transesterificación publicadas con anterioridad (Andrade et al., 2016). Debido a la gran insolubilidad de la molécula **3**, la reacción de transesterificación se realizó en ausencia de disolvente, a elevada temperatura y en presencia de un catalizador metálico, como suele ser habitual en este tipo de reacción. A 160 °C el diéster de partida está fundido, por lo que la mezcla inicialmente heterogénea se homogeniza. Por otro lado, durante la reacción se disminuye la presión para favorecer el equilibrio hacia la formación de los productos mediante la eliminación de etanol del medio de reacción.

La caracterización estructural se realizó por resonancia magnética nuclear (RMN) y espectroscopía de infrarrojos (IR). Los espectros de infrarrojos de los compuestos **4-6** muestran las bandas de absorción esperadas de acuerdo con las estructuras propuestas. Así, la presencia de las funciones éster y éter en la estructura de estos compuestos queda probada por la presencia en los espectros de IR de las bandas de absorción correspondiente a la vibración de tensión del carbonilo de éster (1715 cm^{-1}), junto con las bandas que aparecen a 1242 y 1091 cm^{-1} , que se corresponden con las vibraciones de tensión del enlace C-O-C. Por otro lado, la presencia de los anillos aromáticos de benceno está apoyada por la presencia de las bandas de absorción a 1596 y 1580 cm^{-1} .

Dada la buena solubilidad de las diferentes muestras en cloroformo, a pesar de estar unido al bis-azobenceno, los estudios de resonancia magnética nuclear se llevaron a cabo en deuterocloroformo. Estos estudios pusieron en evidencia que los compuestos **4** y **6** no se correspondían exactamente con las estructuras esperadas para estos compuestos, como se puso de manifiesto al estudiar los espectros de protones. Particularmente al comparar las integrales de las señales que aparecen a 4.43 y 1.44 ppm asignadas al metileno y metilo correspondientes al radical etilo que llevan estos compuestos con la señal a 4.25 ppm, asignada a H-i. Esta falta de concordancia entre las integrales de estas señales nos lleva a concluir que los compuestos **4** y **6** no se purificaron de la manera más adecuada, obteniéndose posiblemente como mezclas mono- y dipegilado, o menos probablemente, acompañado del bis-azo benceno de partida **3**.

A diferencia de los compuestos anteriores, el compuesto **5** sí está de acuerdo los datos obtenidos por espectroscopía de RMN con la estructura esperada. A continuación, se incluye los espectros de RMN de este compuesto (Figura 25).

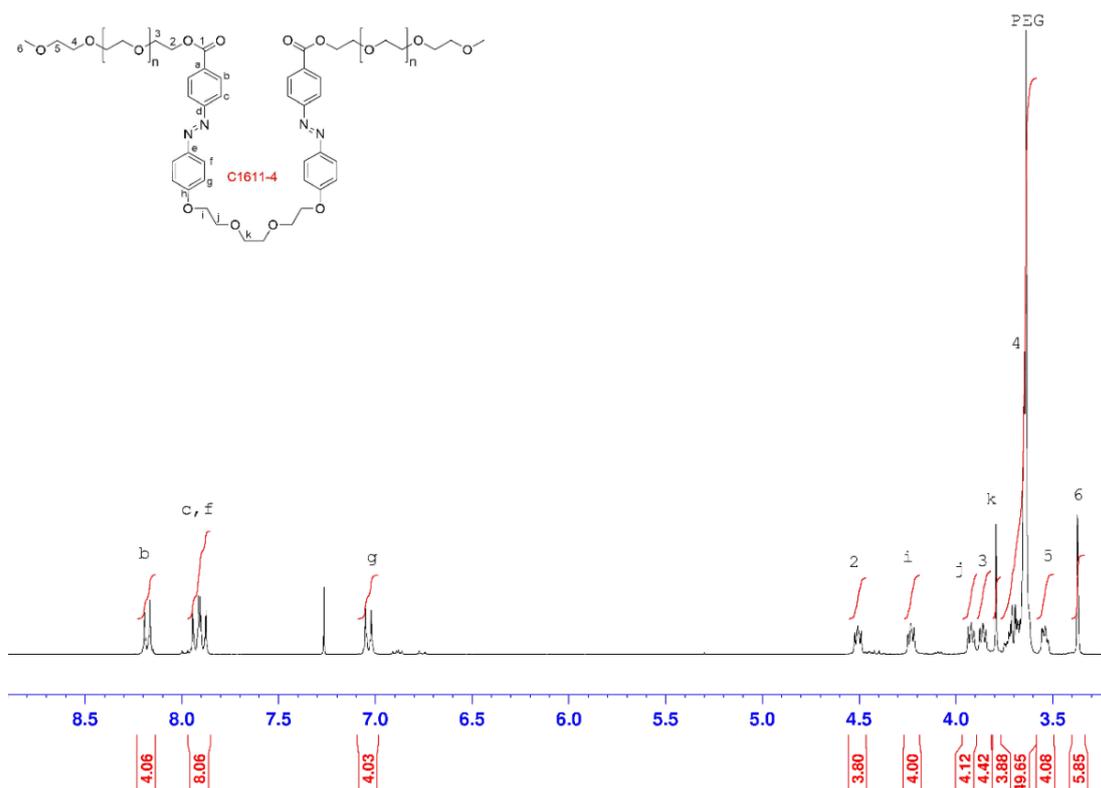


Figura 25. Espectro de ^1H RMN de **5** en deuteriocloroformo

La información más relevante mostrada en los espectros de ^1H y ^{13}C del compuesto **5** está relacionada con la desaparición de las señales correspondientes al radical etilo presente en el compuesto de partida **3**. Por otro lado, se puede confirmar también la unión entre el MeO-PEGOH inicial y el bis-azobenceno dietiléster, puesto que la señal correspondiente al metileno que lleva la función alcohol en el polietilén glicol monometil éter inicial debe de aparecer a un mayor valor de desplazamiento químico como consecuencia de la formación de la función éster. Así, en el espectro de protones la señal aparece a 4.50 ppm, aproximadamente 0.8 ppm más alta con relación al desplazamiento químico mostrado en el reactivo de partida (3.70 ppm). A la misma conclusión se llega si se comparan los espectros de carbono-13 (Figura 26). Así, mientras en el reactivo de partida dicho metileno aparece a 61.30 ppm, en el producto correspondiente a la transesterificación aparece a un mayor valor de desplazamiento químico, en concreto a 64.34 ppm. Además, como se puede observar en la Figura 20, en el rango mostrado de 75 a 58 ppm, no aparece ninguna señal a 61.19 ppm, que es el desplazamiento químico del metileno del radical etilo en el compuesto **3**. Todas estas asignaciones confirman que la reacción de transesterificación ha tenido lugar de manera exitosa.

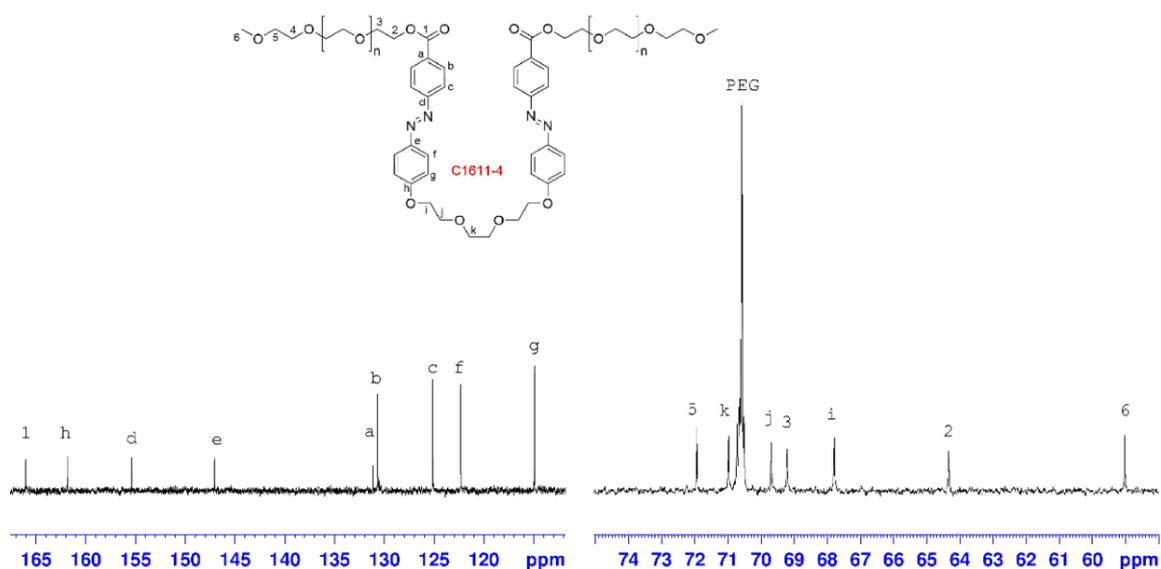


Figura 26. Espectro de carbono-13 del compuesto 5.

Frecuentemente se puede observar, fundamentalmente en el espectro de protones y a veces también en los de carbono-13, señales de menor intensidad que se corresponden con el diastereoisómero *Z* (ver Figura 19). Es conocido que los azobencenos se encuentran como una mezcla de isómeros *cis* y *trans*, siendo el mayoritario el isómero *trans*.

4.2 Preparación y caracterización de las nanopartículas

Es bien conocido que las moléculas que presentan carácter anfifílico, como ocurre en el compuesto 5, pueden formar micelas. Esto ocurre porque la parte hidrofóbica de estas moléculas se agregan y forman el núcleo de las micelas, quedando rodeados por una capa exterior que contiene la parte hidrofílica de la molécula. Si la concentración es muy baja en la disolución, estas moléculas se van a encontrar libremente dispersas en la misma. Sin embargo, al ir aumentando la concentración la energía libre del sistema va a ir aumentando debido a las interacciones desfavorables entre la parte hidrofóbica y las moléculas de agua. Cuando la concentración alcanza un determinado valor conocido como concentración micelar crítica (CMC), las partes hidrofóbicas se aíslan del entorno acuoso y se orientan formando micelas coloidales y alcanzando un mínimo de energía. A concentraciones por debajo de la CMC, la naturaleza de la molécula y el valor de las interacciones moleculares, determinarán la velocidad de disociación (Gauchera et al., 2012). A concentraciones por encima de la CMC, las micelas y las moléculas que están libres en la disolución se encuentran en un equilibrio dinámico pero son termodinámicamente estables y tienden a mantenerse en la forma de micelas.

Para determinar la CMC del compuesto **5**, se empleó la técnica de fluorescencia utilizando pireno como molécula fluorescente (Cui et al., 2011). El pireno es una molécula hidrófoba y cuando se forman micelas, el pireno se ubicará preferentemente dentro o cerca de la fase hidrófoba. Por lo tanto, sus características fotofísicas cambian en comparación con la molécula de pireno en el agua. Este cambio en los espectros de excitación de fluorescencia del pireno (Figura 27), es decir, el aumento en la relación de intensidad de los picos a 333-336 nm, indica el inicio de la micelización.

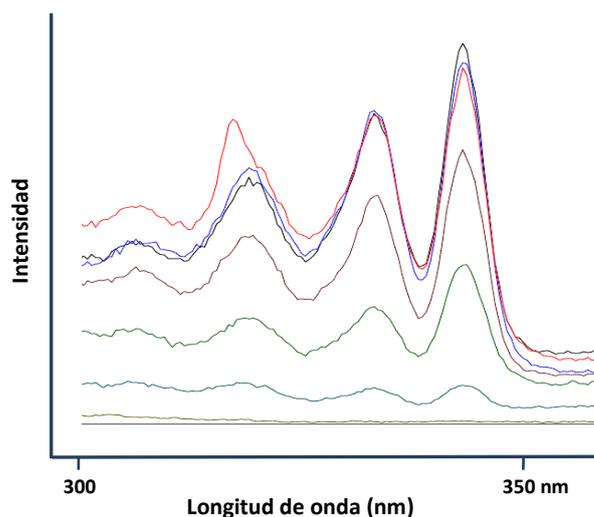


Figura 27. Espectros de excitación de fluorescencia de pireno en un medio acuoso conteniendo diferentes concentraciones del compuesto **5**.

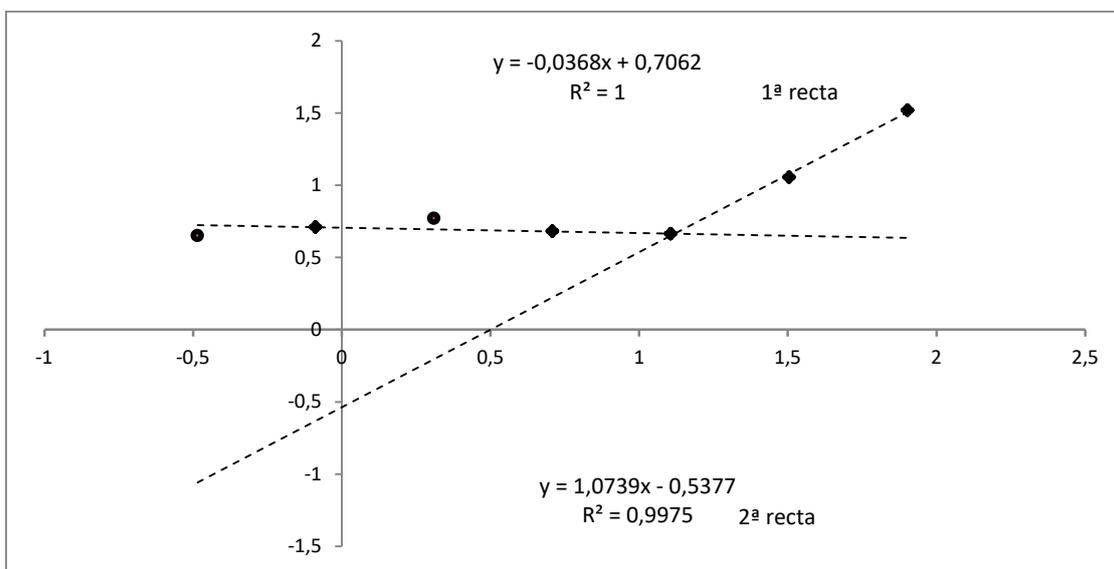


Figura 28. Evolución de la relación entre las intensidades de I_{337}/I_{334} del espectro de excitación del pireno en función de la concentración de **5**.

Como se puede calcular de la Figura 28, el valor de CMC del compuesto **5** presenta un valor de 1.318 mg/mL.

El tamaño y la distribución del tamaño de las nanopartículas formadas se midieron utilizando un nano Zetasizer, tanto en modo de número como de intensidad. Se encontró que la distribución del tamaño de las nanopartículas era unimodal y el mayor tamaño de partícula era en torno a 100 nm como se puede ver en la Figura 29.

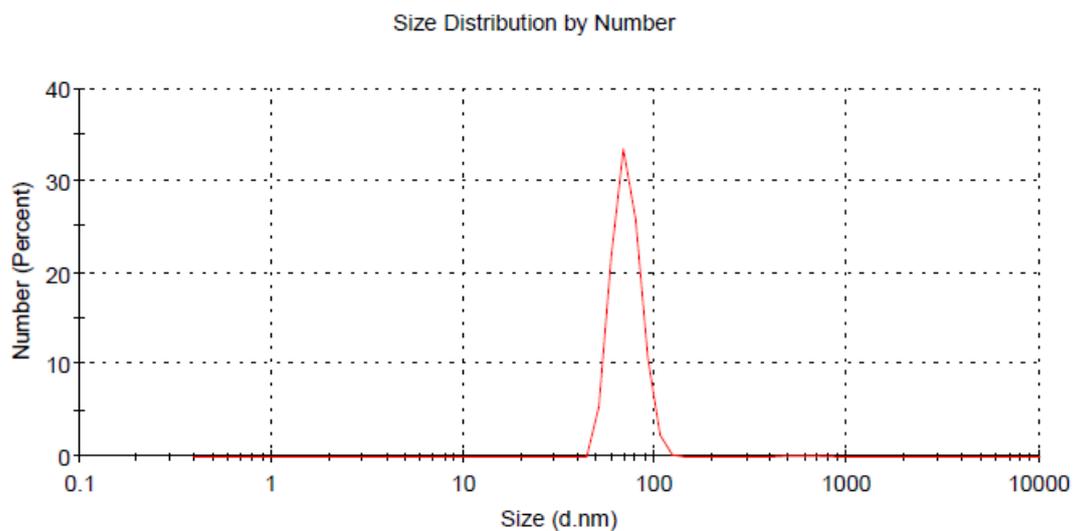


Figura 29. *Dispersión dinámica de la luz (DLS) de las micelas*

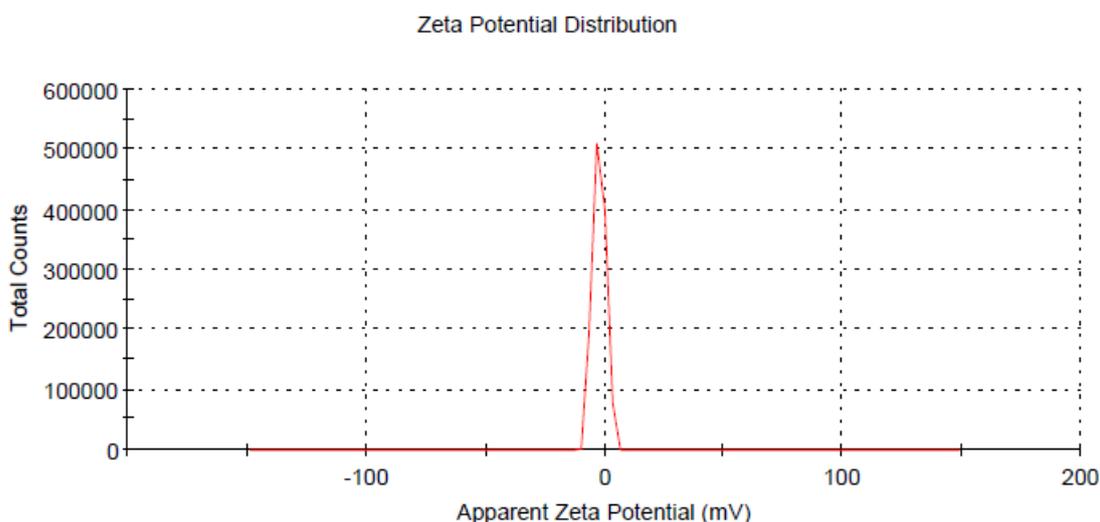


Figura 30. *Potencial Z de las micelas preparadas*

La magnitud del potencial zeta (Figura 30) da una indicación de la estabilidad del sistema coloidal. En el caso del compuesto **5**, el potencial zeta de las micelas formadas presentaba una carga superficial de -7 mV.

5. CONCLUSIONES

Se ha sintetizado con éxito bis-azobenceno-diPEG350 (compuesto **5**) con un buen rendimiento (81%), usando la reacción de transesterificación entre bis-azobenceno dietiléster (compuesto **3**) y MeO-PEG350.

El compuesto **5** es soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos usuales y también presenta una suficiente solubilidad en agua, mostrando por tanto unas características de solubilidad muy diferentes del compuesto **3**, que esencialmente era insoluble en prácticamente todos los disolventes, excepto en DMSO.

El compuesto **5** es capaz de autoensamblarse, probablemente en forma de micelas. Los espectros de fluorescencia, empleando pireno, y los datos obtenidos de medidas de DLS indican que presenta una concentración micelar crítica de 1.32 mg/mL, y que el mayor tamaño de partícula es en torno a 100 nm.

6. ABREVIATURAS

AFM: *microscopio de fuerza atómica*

AINE: *antiinflamatorios no esteroideos*

CALB: *lipasa tipo B de Candida antarctica*

FDA: *Food and Drug Administration*

mPEG: *metoxi-polietilén glicol*

mPEG-PLGA: *metoxi-polietilén glicol-poliláctico-co-glicólico*

NHS-PEG-MAL: *N-hidroxisuccinimida-polietilén glicol-maleimida*

PANAM: *poliamidoamina*

PEG: *polietilén glicol*

PHA: *polihidroxialcanoato*

TEM: *microscopio de transmisión electrónica*

7. BIBLIOGRAFÍA

-Andrade D, Moya C, Olate F, Gatica N, Sanchez S, Díaz E, et al. Soft amphiphilic polyesters obtained from PEGs and silicon fatty compounds: structural characterizations and self-assembly studies. *RSC Adv.* 2016; 6: 38505

-Choisnard L, Gèze A, Vanhaverbeke C, Yaméogo JB, Putaux JL, Brasme B, et al. Physicochemical Characterization of α -, β -, and γ -Cyclodextrins Bioesterified with Decanoate Chains Used As Building Blocks of Colloidal Nanoparticles. *Biomacromolecules.* 2011; 12: 3031–3038

-Cui Q, Wu F, Wang E. Thermosensitive Behavior of Poly(ethylene Glycol)-Based Block Copolymer (PEG-b-PADMO) Controlled via Self-Assembled Microstructure. *J. Phys. Chem. B.* 2011; 115: 5913–5922

-Du X, Jiang G, Li L, Yang W, Chen H, Liu Y, et al. Preparation of glucose-sensitive and fluorescence micelles via a combination of photoinitiated polymerization and chemoenzymatic transesterification for the controlled release of insulin. *J Appl Polym Sci.* 2016; 133: 43026-43034

-Duan Y, Sun X, Gong T, Wang Q, Zhang Z. Preparation of DHAQ-loaded mPEG–PLGA–mPEG nanoparticles and evaluation of drug release behaviors in vitro/in vivo. *J Mater Sci Mater Med.* 2006; 17: 509–516.

-Gauchera G, Marchessault RH, Leroux JC. Polyester-based micelles and nanoparticles for the parenteral delivery of taxanes. *J Control Release.* 2010; 143 (1): 2-12.

-Jeong KH, Kwon SH, Kim YJ. Characterizations and Release Behavior of Poly [(R)-3-hydroxy butyrate]-co-Methoxy Poly(ethylene glycol) with Various Block Ratios. *Macromol Res.* 2008; 16(5): 418-423.

-Jing Y, Yang M, Dai S, Quan C, Liu J, Jiang Q, et al. Microwaves promote transesterification in the rapid synthesis of methoxy-poly(ethylene glycol)-block-poly(L-lactide-random-glycolide). *Polym J.* 2018; 136: 187-193.

-Kang SH, Shin HD, Oh CH, Choi DH, Park KH. Synthesis and Photoisomerization Properties of Polynorbornenes with Azobenzene Chromophores. *Bull Korean Chem Soc.* 2002; 23 (7): 957-263.

-Khatri V, Bhatia S, Achazi K, Deep S, Kohli E, Sharma SK, et al. Lipase-mediated synthesis of sugar-PEG-based amphiphiles for encapsulation and stabilization of indocyanine green. *RSC Adv.* 2017; 7: 37534–37541.

-Kondawar SE, Patil CR, Rode CV. Tandem Synthesis of Glycidol via Transesterification of Glycerol with DMC over Ba-Mixed Metal Oxide Catalysts. *ACS Sustain Chem Eng.* 2017; 5: 1763-1774.

-Kumar V, Homme R. Thermodynamic limits on drug loading in nanoparticle cores. *J Pharm Sci.* 2008; 97: 4904–4914.

-Mosqueira V, Legrand P, Gulik A, Bourdon O, Gref R, Labarre D, et al. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. *Biomaterials.* 2001; 22: 2967–2979.

-O'Shea TM, Aimetti AA, Kim E, Yesilyurt V, Langer R. Synthesis and Characterization of a Library of In-Situ Curing, Nonswelling Ethoxylated Polyol Thiol-ene Hydrogels for Tailorable Macromolecule Delivery. *Adv. Mater.* 2015; 27: 65–72.

-Pekkanen AM, Zawaski C, Stevenson AT, Jr., Dickerman R, Whittington AR, et al. Poly(ether ester) Ionomers as Water-Soluble Polymers for Material Extrusion Additive Manufacturing Processes. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2017; 9: 12324–12331

-Puskas JE, Seo KS, Sen MY. Green polymer chemistry: Precision synthesis of novel multifunctional poly(ethylene glycol)s using enzymatic catalysis. *Eur Polym J.* 2011; 47: 524–534

-Ravenelle F, Marchessault RH. One-step synthesis of amphiphilic diblock copolymers from bacterial poly([R]-3hydroxybutyric acid). *Biomacromolecules.* 2002;3: 1057–1064.

-Schoenhammer K, Petersen H, Guethlein F, Goepferich A. Injectable in situ forming depot systems: PEG-DAE as novel solvent for improved PLGA storage stability. *Int J Pharm.* 2009; 371: 33–39.

-Shah M, Naseer MI, Choi MH, Kim MO, Yoon SC. Amphiphilic PHA-mPEG copolymeric nanocontainers for drug delivery: Preparation, characterization and in vitro evaluation. *Int J Pharm.* 2010; 400: 165–175.

-Shah M, Ullah N, Choi MH, Kim MO, Yoon SC. Amorphous amphiphilic P(3HV-co-4HB)-b-mPEG block copolymer synthesized from bacterial copolyester via melt transesterification: Nanoparticle preparation, cisplatin-loading for cancer therapy and in vitro evaluation. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012; 80: 518–527.

-Song X, Wu Y, Cai F, Pan D, Xiao G. High-efficiency and low-cost Li/ZnO catalysts for synthesis of glycerol carbonate from glycerol transesterification: The role of Li and ZnO interaction. *Appl Catal A Gen.* 2017; 532: 77–85.

-Stevens DM, Rahalkar A, Spears B, Gilmore K, Douglas E, Muthukumar M, et al. Semibranched polyglycidols as “fillers” in polycarbonate hydrogels to tune hydrophobic drug release. *Polym Chem.* 2015; 6: 1096-1102.

- Torres Mojarro, Carlos. Preparación de un derivado de azobenceno como agente de entrecruzamiento en polímeros derivados de carbohidratos. [Trabajo fin de grado]. Sevilla: Departamento de química orgánica y farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla; 2017.

-Torossi FD. Reacciones en contexto: la transesterificación en la producción de biodiésel a partir de aceite de fritura usado. *An Quím.* 2006; 102(3): 43-49

-Wang HY, Zhang WW, Wang N, Li C, Li K, Yu XQ. Biocatalytic Synthesis and in Vitro Release of Biodegradable Linear Polyesters with Pendant Ketoprofen. *Biomacromolecules.* 2010; 11: 3290–3293

-Wu YL, Wang H, Qiu YK, Liow SS, Li Z, Loh XJ. PHB-Based Gels as Delivery Agents of Chemotherapeutics for the Effective Shrinkage of Tumors. *Adv Healthc Mater.* 2016; 5: 2679–2685

-Yaméogo JB, Gèze A, Choïnard L, Putaux JL, Gansané A, Sirima SB, et al. Self-assembled biotransesterified cyclodextrins as Artemisinin nanocarriers – I: Formulation, lyoavailability and in vitro antimalarial activity assessment. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012; 80: 508–517.

-Zhu H, Cai X, Wua L, Gu Z. A facile one-step gelation approach simultaneously combining physical and chemical cross-linking for the preparation of injectable hydrogels. *J Mater Chem B.* 2017; 5: 3145-3153.