

Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Química Orgánica
Laboratorio de Materiales Poliméricos

**MODIFICACIÓN POST-SÍNTESIS DE MACROGELES
Y NANOGELLES: control del grado de
entrecruzamiento, estructura y funcionalización**

TESIS DOCTORAL

ALEXIS WOLFEL SANCHEZ

CÓRDOBA, 2019

Esta Tesis se presenta para optar al grado

académico de

Doctor en Ciencias Químicas

Directora

Prof. Dra. Cecilia Inés Alvarez Igarzabal

Comisión evaluadora

Prof. Dra. Mabel Yudi

Prof. Dra. Marcela Longhi

Prof. Dra. Miriam C. Strumia

Prof. Dr. Javier I. Amalvy



ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS

RESUMEN	1
CAPÍTULO 1 – INTRODUCCIÓN	9
1.1 - HIDROGELES.....	11
1.1.2 - Hidrogeles inteligentes.....	13
1.1.2.1 - Hidrogeles termosensibles.....	15
1.1.2.2 - Hidrogeles con enlaces covalentes reversibles tipo imina.....	18
1.1.3 - Síntesis de hidrogeles.....	21
1.1.3.1 - Síntesis de HGs por polimerización radicalaria en solución.....	24
1.1.4 - Propiedades de hidrogeles y su caracterización	25
1.1.5 - Modificación post-síntesis de hidrogeles.....	32
1.1.5.1 - Obtención de grupos funcionales aldehído y α -oxoaldehídos.....	33
1.2 - NANOGEL Y MICROGELES	36
1.2.1 - Nanogel termosensibles	36
1.2.2 - Síntesis de nanogel	37
1.2.3 - Propiedades de nanogel y su caracterización	40
1.2.4 - Modificación post-síntesis de nanogel - Funcionalización	41
1.3 - EL DESAFÍO DEL CONTROL DE LA ESTRUCTURA Y FUNCIONALIZACIÓN	42
1.4 – REFERENCIAS	43
CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS GENERALES	49
CAPÍTULO 3 - SÍNTESIS Y MODIFICACIÓN POST-SÍNTESIS DE HIDROGELES DE ACRILAMIDA	53
3.1 - CONSIDERACIONES GENERALES.....	55
3.2 - OBJETIVOS.....	59
3.3 - MATERIALES Y MÉTODOS.....	60
3.4 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	68
3.5 - CONCLUSIONES PARCIALES.....	81

3.6 – REFERENCIAS.....	83
CAPÍTULO 4 - SÍNTESIS Y MODIFICACIÓN POST-SÍNTESIS DE HIDROGELES DE ACRILAMIDA-AEMA.....	87
4.1 - CONSIDERACIONES GENERALES.....	89
4.2 – OBJETIVOS.....	92
4.3 - MATERIALES Y MÉTODOS.....	93
4.4 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	98
4.5 - CONCLUSIONES PARCIALES Y PERSPECTIVAS.....	114
4.6 – REFERENCIAS.....	116
CAPÍTULO 5 - SÍNTESIS Y MODIFICACIÓN POST-SÍNTESIS DE HIDROGELES TERMOSENSIBLES.....	119
5.1 - CONSIDERACIONES GENERALES.....	121
5.2 – OBJETIVOS.....	126
5.3 - MATERIALES Y MÉTODOS.....	127
5.4 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	134
5.5 - CONCLUSIONES PARCIALES.....	151
5.6 – REFERENCIAS.....	152
CAPÍTULO 6 - SÍNTESIS Y MODIFICACIÓN POST-SÍNTESIS DE NANOGELES TERMOSENSIBLES.....	155
6.1 - SÍNTESIS DE NANOGELES TERMOSENSIBLES BASADOS EN NIPAm Y NIPMAm	157
6.1.1 - CONSIDERACIONES GENERALES.....	157
6.1.2 - OBJETIVOS.....	161
6.1.3 - MATERIALES Y MÉTODOS.....	162
6.1.4 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	164
6.1.5 - CONCLUSIONES PARCIALES.....	192
6.2 - SÍNTESIS Y MODIFICACIÓN POST-SÍNTESIS DE NANOGELES TERMOSENSIBLES BASADOS EN NIPAm Y NIPMAm - POSIBLES APLICACIONES.....	194
6.2.1 - SÍNTESIS DE NANOGELES DE p-NIPAm-BIS-DAT Y MODIFICACIÓN POST-SÍNTESIS PARA LA INMOVILIZACIÓN COVALENTE DE DOXORUBICINA Y SU LIBERACIÓN CONTROLADA.....	195
6.2.1.1 - CONSIDERACIONES GENERALES.....	195

6.2.1.2 – OBJETIVOS	198
6.2.1.3 - MATERIALES Y MÉTODOS	199
6.2.1.4 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	201
6.2.1.5 - CONCLUSIONES PARCIALES Y PERSPECTIVAS.....	213
6.2.2 - SÍNTESIS DE NGs HUECOS PARA ENCAPSULADO Y LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS	214
6.2.2.1 - CONSIDERACIONES GENERALES.....	214
6.2.2.2 – OBJETIVOS	216
6.2.2.3 - MATERIALES Y MÉTODOS	217
6.2.2.4 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN	219
6.2.2.5 - CONCLUSIONES PARCIALES Y PERSPECTIVAS.....	229
6.2.3 - SÍNTESIS DE NANOGELES DE p-NIPAm-co-NIPMAm-BIS-DAT Y CONTROL POST-SÍNTESIS DEL GRADO DE ENTRECruzAMIENTO. EFECTO DEL CAMBIO ESTRUCTURAL EN EL CARGADO DE BIOACTIVOS DE ALTO PESO MOLECULAR.	230
6.2.3.1 - CONSIDERACIONES GENERALES.....	230
6.2.3.2 – OBJETIVOS	230
6.2.3.3 - MATERIALES Y MÉTODOS	230
6.2.3.4 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN	232
6.2.3.5 - CONCLUSIONES PARCIALES.....	240
6.3 – REFERENCIAS	241
CAPÍTULO 7 – CONSIDERACIONES FINALES	245
7.1 - CONCLUSIONES GENERALES	247
7.2 – PROYECCIONES	252
7.3 - PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	254
7.3.1 - PUBLICACIONES EN REVISTAS INTERNACIONALES.....	254
7.3.2 - PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS.....	254
7.4 - OTRAS INSTANCIAS DE FORMACIÓN	256
CAPÍTULO 8 - ANEXO	261

ABREVIATURAS

%ESR	Grado de hinchamiento en el equilibrio (porcentual)
%LC	Capacidad de carga (porcentual)
%LE	Eficiencia de carga (porcentual)
AADH	dihidrazida de ácido adípico
AEMA	2-aminoetilmetacrilato
AFM	Microscopía de fuerza atómica
AM	acrilamida
APS	persulfato de amonio
BIS	<i>N,N'</i> -metilenbis(acrilamida)
BSA-FITC	Albúmina sérica bovina con marcador fluorescente
CT	Concentración total de monómeros
DAT	(+)- <i>N,N'</i> -dialiltartradiamida
Dh	Diámetro hidrodinámico
DHEA	1,2-(dihidroxi-etil)bisacrilamida
DHOPMA	2,3-dihidroxipropil metacrilato
DIC	Contraste de interferencia diferencial
DLS	Dispersión dinámica de la luz
DMEMAm	<i>N</i> -(2,2-dimetoxietil)metacrilamida
DOXO	Doxorubicina clorhidrato

dPG	poliglicerol dentrítico
dPGAc	poliglicerol dentrítico acrilado
E	Módulo de Young
EG	etilenglicol
EPR	Efecto de permeación y retención aumentada
ESR	Grado de hinchamiento en el equilibrio
G'	Módulo elástico o módulo de almacenamiento
G''	Módulo viscoso o módulo de pérdida
G*	Módulo complejo
GF	grupo(s) funcional(es)
GPC	Cromatografía de permeación en geles
HEMA	hidroxietilmetacrilato
HGs	Hidrogeles
LCST	Temperatura crítica de solubilidad inferior
NaPS	persulfato de sodio
NGs	Nanogeles
NIPAm	<i>N</i> -isopropilacrilamida
NIPMAm	<i>N</i> -isopropilmetacrilamida
NPs	Nanopartículas
p-AM	poli(acrilamida)
PBS	Buffer fosfato salino

PDI	Índice de polidispersidad
RLV	Rango lineal viscoelástico
SAS	Difracción de bajo ángulo
SC	Auto-entrecruzamientos
SDS	dodecilsulfato de sodio
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SR	Grado de hinchamiento
tBC	tert-butilcarbazato
TEM	Microscopía de transmisión electrónica
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletildiamina
TNBS	ácido picrilsulfónico
T _{tf}	Temperatura de transición de fase
UCST	Temperatura crítica de solubilidad superior
UV-Vis	Espectrofotometría Ultravioleta-Visible
γ	Amplitud de deformación
ω	Frecuencia de deformación

RESUMEN

La actual, es considerada la generación de los materiales inteligentes. Éstos se caracterizan por ser capaces de sensar estímulos en su entorno, o su propio estado, y responder cambiando sus propiedades físico-químicas, de manera predecible y funcional. En los últimos años, el alto grado de desarrollo en este área ha generado la necesidad de sintetizar polímeros de alta complejidad que exhiben funcionalidades y propiedades distintivas. Como estrategia para alcanzar dicha complejidad, se recurre a los criterios de diseño y técnicas de control a nivel molecular desarrolladas en la Química Orgánica, que permiten la preparación de polímeros bien definidos y materiales nanoestructurados. Entre los materiales inteligentes más desarrollados en los últimos años, están los hidrogeles (HG). Estos son redes poliméricas entrecruzadas, que tienen la capacidad de absorber y retener grandes cantidades de agua o fluidos biológicos. Poseen propiedades particularmente excepcionales, que los han colocado en la mira del desarrollo científico en el área de materiales. La versatilidad química de los hidrogeles, por ser un material polimérico; sus propiedades mecánicas; sus propiedades de hinchamiento; su porosidad; la presencia de una interfaz líquido-sólido en su interior; y su similitud con tejidos biológicos, son algunas de las características que proponen el uso de estos materiales en un creciente número de aplicaciones, principalmente en el área de biomedicina.

La aplicación de los hidrogeles en entornos complejos como los biológicos, realizando funciones altamente específicas, requiere de la optimización de las propiedades mecánicas, propiedades de hinchamiento y funcionalidad química de los materiales. Por lo tanto, es necesario superar las barreras impuestas por los métodos tradicionales de síntesis de hidrogeles para lograr estructuras más controladas y funcionales tanto en la macro como en la micro o nanoescala.

En este contexto, se ubica el presente trabajo de tesis doctoral titulado: **“MODIFICACIÓN POST-SÍNTESIS DE MACROGELES Y NANOGELES: control del grado de entrecruzamiento, estructura y funcionalización”**. Este trabajo tiene como objetivo principal el estudio y

desarrollo de metodologías de síntesis de hidrogeles y nanogeles (NGs) por polimerización radicalaria, que permitan su modificación post-síntesis, para el control de la morfología, propiedades mecánicas, propiedades de hinchamiento y funcionalidad química de los materiales.

Durante el transcurso de esta tesis, se estudiaron y desarrollaron estrategias de síntesis radicalaria de hidrogeles que fueron útiles para controlar las propiedades mencionadas. Estas estrategias permitieron superar, en etapas post-síntesis, dificultades y limitaciones impuestas por las metodologías de síntesis radicalaria tradicionales de hidrogeles y nanogeles. En particular, se estudió la utilización del agente entrecruzante (+)-*N,N'*-dialiltartradiamida (DAT) en presencia o ausencia de *N,N'*-metilenbis(acrilamida) (BIS), para la síntesis radicalaria de hidrogeles (HG) y nanogeles (NG) basados en diferentes monómeros vinílicos derivados de la acrilamida o metacrilamida. La presencia de un grupo funcional (GF) diol vecinal en DAT permitió la modificación post-síntesis de los HG y NG, por tratamiento con soluciones de periodato de sodio. Estas reacciones se llevaron a cabo en solución acuosa, a tiempos cortos y temperatura ambiente. La modificación post-síntesis generó cambios en el grado de entrecruzamiento de HG y NG, por clivaje de los entrecruzamientos debidos a DAT, modificando sus propiedades de hinchamiento, propiedades mecánicas, morfología y funcionalidad química. Además, la oxidación de los dioles vecinales sensibles a periodato, permitió obtener GF α -oxo-aldehídos en los materiales sintetizados. Este GF es de alto valor sintético por su participación en reacciones (bio)ortogonales principalmente frente a aminas y α -nucleófilos como hidrazidas y alcoxilaminas. Los α -oxo-aldehídos son frecuentemente obtenidos en péptidos y proteínas para su utilización en bioconjugación, pero tienen muy escasos antecedentes en materiales sintéticos y no se encuentran reportes de su obtención en hidrogeles blandos. Posteriormente, se ensayó la reactividad de este GF con aminas e hidrazidas, en diferentes condiciones de reacción.

Como soporte de los estudios realizados y sus resultados, esta tesis se organizó de la siguiente manera:

En el Capítulo 1, se introducen conceptos sobre la naturaleza de los hidrogeles, sus características principales y su continuo desarrollo en la elaboración de materiales funcionales. Se describen sus actuales aplicaciones en desarrollo y los desafíos que presentan, principalmente en el control de sus propiedades por limitaciones en las metodologías de síntesis. En el Capítulo 2 se presentan los objetivos generales y específicos de este estudio. En los siguientes Capítulos (3, 4, 5) se muestran los resultados obtenidos en la síntesis y modificación post-síntesis de (macro)hidrogeles con creciente complejidad sintética. Posteriormente, en el Capítulo 6, las metodologías desarrolladas en HGs se aplicaron a la síntesis de NGs termosensibles. La necesidad de control del tamaño, la polidispersidad y la estructura en estos sistemas, impone un mayor número de limitaciones a la obtención de productos por síntesis directa. Por lo tanto, la metodología desarrollada es una herramienta de utilidad para la síntesis y modificación post-síntesis de nanogeles. Posteriormente, y como prueba de concepto, se exploraron tres diferentes aplicaciones basadas en los nanogeles termosensibles sintetizados: la encapsulación de proteínas para su liberación controlada; el desarrollo de nanogeles termosensibles con doxorubicina, un fármaco anticancerígeno, inmovilizado mediante enlaces covalentes pH sensibles para su liberación controlada; y la obtención de nanogeles huecos (nanocápsulas) basados en poli(*N*-isopropilacrilamida) (p-NIPAm). En el Capítulo 7 se presentan las conclusiones generales del trabajo de tesis y sus posibles proyecciones. En el Capítulo 8 se encuentra un Anexo con algunas figuras no incluidas en el cuerpo de la tesis.

Este trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Materiales Poliméricos (LaMaP) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, en colaboración con el grupo de investigación del Profesor Marcelo Calderón de la Freie Universität Berlín, Alemania. La metodología desarrollada y los resultados obtenidos en esta tesis conforman una nueva herramienta para el desarrollo de materiales funcionales, que podrían ser aplicadas en cualquiera de las actuales líneas de investigación de LaMaP: desde la producción de (nano)dispositivos para la liberación controlada de fármacos, al desarrollo de actuadores blandos (*soft actuators*), la modificación de superficies, el anclaje de biomoléculas en soportes cromatográficos, entre otras.

ABSTRACT

Smart materials are known by their capacity to sense environmental changes, or their own state, and respond by changing their physicochemical properties in a predictable and functional manner. In the last few years, smart materials development has generated the need for synthesizing highly complex polymers, endowed with distinctive properties and functionalities. To achieve these requirements, it is necessary to resort to the molecular level strategies of design and technical control developed by the organic chemistry, that allow the preparation of well-defined polymers and nanostructured materials. Hydrogels (HGs) are among the most developed smart materials in the last few years. These are polymeric crosslinked networks that have the capacity to absorb and retain high amounts of water or biological fluids. HGs possess particularly exceptional properties which have put them in the focus of scientific development in the area of materials. The chemical versatility, characteristic of polymeric materials; the mechanical properties; swelling properties; porosity; the internal liquid-solid interface; and their similarity with biological tissues, are some of the characteristics that propose the use of these materials in a growing number of applications, mainly in the biomedical area.

The application of HGs performing specific functions into complex environments, as the biological ones, requires the optimization of the mechanical properties, swelling properties and chemical functionality. Thus, it is necessary to overcome the barriers imposed by the traditional methods of synthesis to reach controlled and functional structures, both in the micro and nanoscale.

In this context, the present Doctoral Thesis work, entitled **“POST-SYNTHESIS MODIFICATION OF MACROGELS AND NANOGELS: control over the crosslinking degree, structure and functionalization”**, was developed. This work is aimed to the study and development of new methodologies for the free radical polymerization synthesis of hydrogels and nanogels (NGs), that allow a post-synthesis control over the morphology, mechanical properties, swelling properties and chemical functionality.

The proposed new strategies allowed us to overcome, in post-synthesis steps, some of the limitations and difficulties imposed by the traditional methods used for the synthesis of HGs and NGs. In particular, it was studied the incorporation of (+)-*N,N'*-diallyltartradiamide (DAT) as a crosslinking agent, in the absence or presence of *N,N'*-methylenebis(acrylamide) (BIS), for the free radical synthesis of HGs and NGs, composed by different acrylamide or methacrylamide based vinylic monomers. The presence of a vicinal diol functional group (FG) in DAT allowed the post-synthesis modification of the HGs and NGs, by their treatment with sodium periodate solutions. These reactions were performed in aqueous solutions, under short reaction times at room temperature. The post-synthesis modification caused changes in the crosslinking degree caused by the cleavage of the DAT crosslinks, modifying their swelling and mechanical properties, morphology and chemical functionality. Furthermore, the oxidation of the vicinal diols, generated α -oxo-aldehyde FG into the synthesized materials. This FG has a significant value because of its participation in (bio)orthogonal reactions, mainly with amines and α -nucleophiles as hydrazides and alkoxylamines. The α -oxo-aldehyde FG are frequently incorporated into peptides and proteins for its use in bioconjugation. However, there are scarce reports of these FG in synthetic materials and no reports in soft hydrogels. Furthermore, in this work, the reactivity of the α -oxo-aldehyde FG was assayed with hydrazides and amines at different reaction conditions.

As a support of the performed studies and their results, this manuscript was organized in the following order:

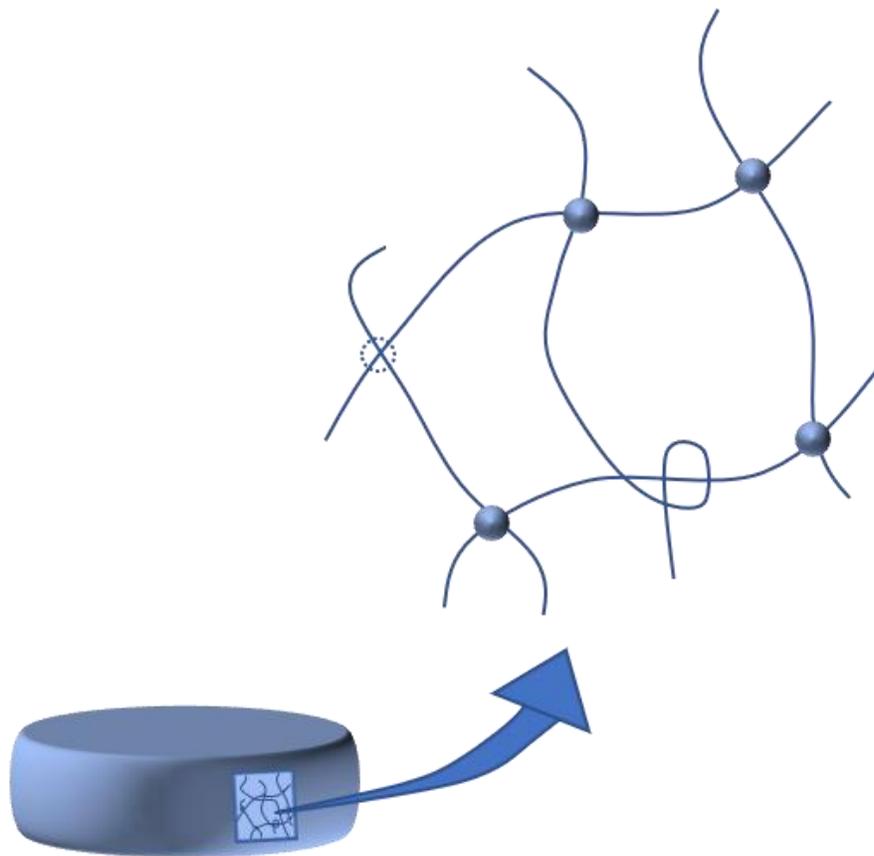
Chapter 1 introduces concepts about the nature of hydrogels, their main characteristics and continuous development toward functional materials. The main applications under development are described together with the current challenges they present, focusing on the control of their properties and limitations in the synthesis methodologies. General and specific objectives of this study are presented in the Chapter 2. The next Chapters (3, 4, 5) show the results obtained from the synthesis and post-synthesis modification of (macro)hydrogels with increasing complexity. Then, Chapter 6 shows the application of the previously developed methodologies to the synthesis and modification of NGs. In this case,

the need for high control over the size, polydispersity and structure, usually impose a higher number of limitations to the direct synthesis of the desired products. Thus, the developed methodology is a useful tool for the synthesis and post-synthesis modification of NGs. Subsequently, different applications, based on synthesized thermoresponsive NGs, were investigated as a proof of concept: protein encapsulation for its controlled release; thermosensitive nanogels with doxorubicin (an antitumoral drug), immobilized by pH sensitive covalent bonds, for its controlled release; and the obtention of hollow NGs (nanocapsules) based on poly(*N*-isopropylacrylamide) (p-NIPAm). Finally, the Chapter 7 summarizes the main conclusions of this Thesis and its future outlooks, while the Chapter 8 contains supporting information that was not included on the main manuscript.

This Thesis work was completed in the Laboratory of Polymeric Materials (*LaMaP*, by its acronym in Spanish) of the Faculty of Chemical Sciences of the National University of Córdoba (Argentina) in collaboration with the research group of Professor Marcelo Calderón at the Freie Universität Berlin, Germany. The developed methods and results obtained could be applied over any of the current research topics of LaMaP: from the development of nanodevices for controlled release of drugs, the production of soft actuators, materials surface modification, immobilization of biomolecules onto chromatographic supports, among others.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL



1.1 - HIDROGELES

Los hidrogeles (HG) son redes poliméricas entrecruzadas que tienen la capacidad de absorber y retener grandes cantidades de agua o fluidos biológicos y poseen numerosas características en común con los tejidos biológicos[1]. Estos materiales tienen poros que permiten la entrada de grandes cantidades de agua. Sin embargo, las cadenas de polímeros están unidas entre sí, impidiendo la completa disolución del material (Figura 1.1). Estas uniones pueden ser físicas o covalentes y el origen del polímero puede ser sintético, natural o una combinación de los anteriores (semi-sintético). La gran capacidad de absorción de agua se debe a la presencia de grupos funcionales (GF) hidrofílicos en la red (por ejemplo, -OH, -NH₂, -CONH, -COOH, -SO₃H, entre otros) [2].

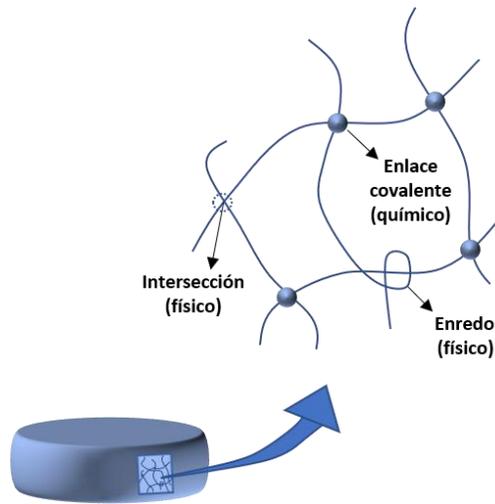


Figura 1.1 - Esquema de un hidrogel en forma de disco, hinchado en agua. Las uniones o interacciones entre las cadenas poliméricas mantienen unida a la red tridimensional permitiendo el hinchamiento sin alcanzar la completa disolución.

Algunos hidrogeles, considerados superabsorbentes, pueden llegar a absorber hasta mil veces su peso seco, en masa de agua. Esta gran capacidad ha sido aprovechada en el desarrollo de diversas aplicaciones, por ejemplo, para su uso en pañales descartables o en la mejora de las propiedades de retención de agua en suelos [3]. La naturaleza polimérica

de los geles les otorga versatilidad química, permitiendo introducir una gran variedad de grupos funcionales. Además, el ambiente acuoso de su interior involucra una interfaz líquido/sólido que es una oportunidad para el desarrollo de aplicaciones como soportes de catálisis, dispositivos para remediación ambiental [2], sensores y actuadores [4], [5], entre otras. Una de las principales características de los hidrogeles es su similitud con tejidos biológicos. Ésta ha incentivado al desarrollo de un muy extenso número de aplicaciones orientadas al área de biomateriales. Entre ellas, hidrogeles para la liberación controlada de bioactivos, lentes de contacto, parches para el curado de heridas, plataformas para la reparación de tejidos u órganos (ingeniería de tejidos), separación de biomoléculas o células, entre otras [6] (Figura 1.2).

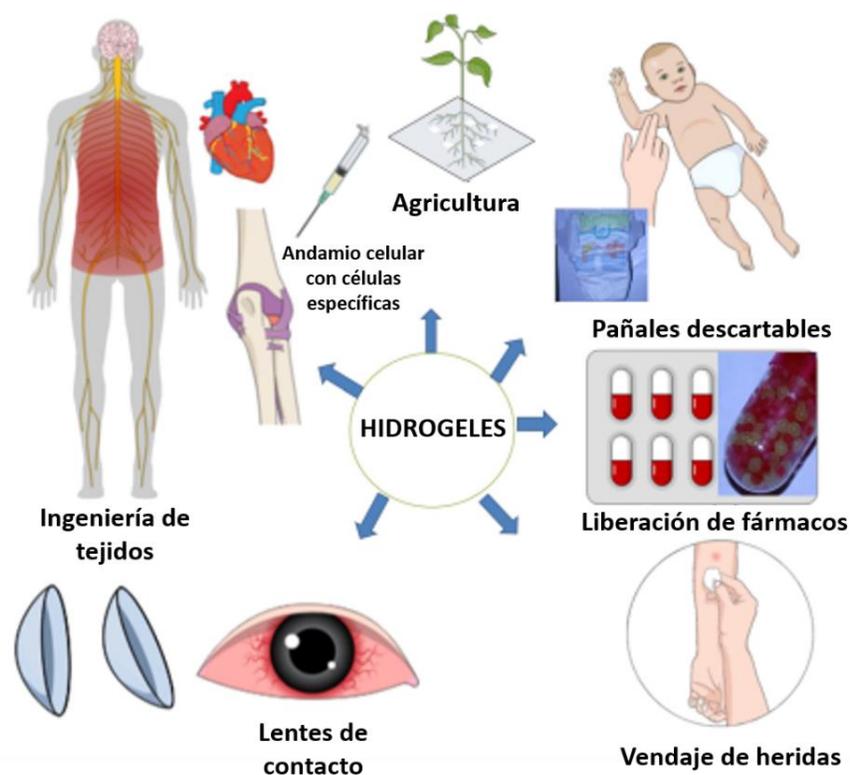


Figura 1.2 – Hidrogeles y algunas de sus aplicaciones. Figura adaptada de Varaprasad y colaboradores [7].

Los hidrogeles han sido ampliamente estudiados para lograr un control preciso de sus propiedades particulares y el desarrollo de un gran número de materiales funcionales. Por ello, se registra un incremento exponencial en el número de publicaciones científicas centradas en el área. La Figura 1.3 muestra el incremento en el número de artículos científicos asociados a la palabra "hydrogel" (hidrogel) registrados en la base de datos PubMed (sólo artículos asociados a la biomedicina).

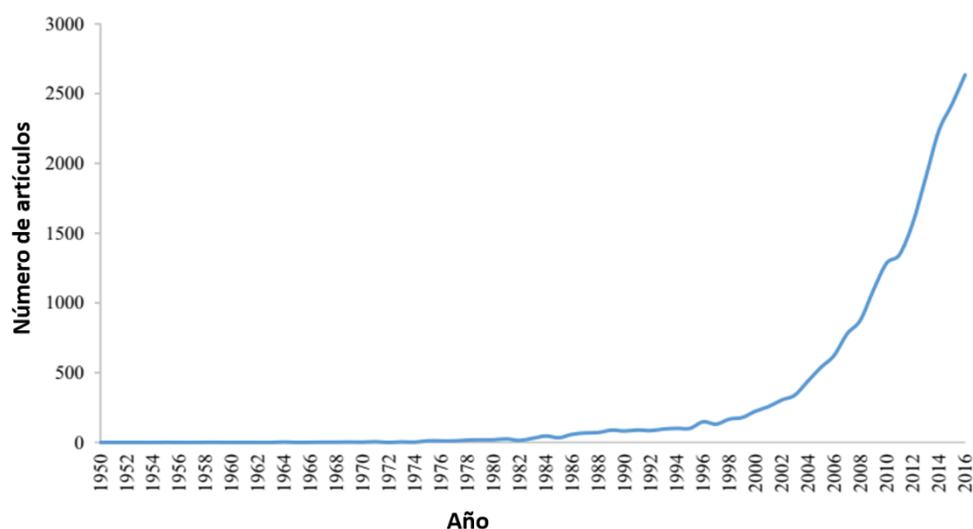


Figura 1.3 - Curva mostrando el incremento del número de artículos asociados a la palabra "hydrogel" desde 1950 hasta el 2016. Figura adaptada de Mahinroosta y colaboradores [6].

1.1.2 - HIDROGELES INTELIGENTES

Los materiales inteligentes son aquellos capaces de sensar estímulos en su entorno o su propio estado y responder, de manera funcional y predecible, cambiando sus propiedades físico-químicas [8]. Los hidrogeles inteligentes responden a cambios en su entorno para modificar sus propiedades de manera funcional. En general, son capaces de cambiar su grado de hinchamiento en respuesta al estímulo externo pasando de un estado colapsado (o de menor hinchamiento) a un estado de mayor hinchamiento (Figura 1.4). Los hidrogeles pueden responder a una gran variedad de estímulos: cambios en la temperatura o el pH,

estímulos eléctricos, salinidad, presencia de enzimas, potenciales rédox, luz, estrés mecánico, campos magnéticos, presencia de un analito, entre otros.

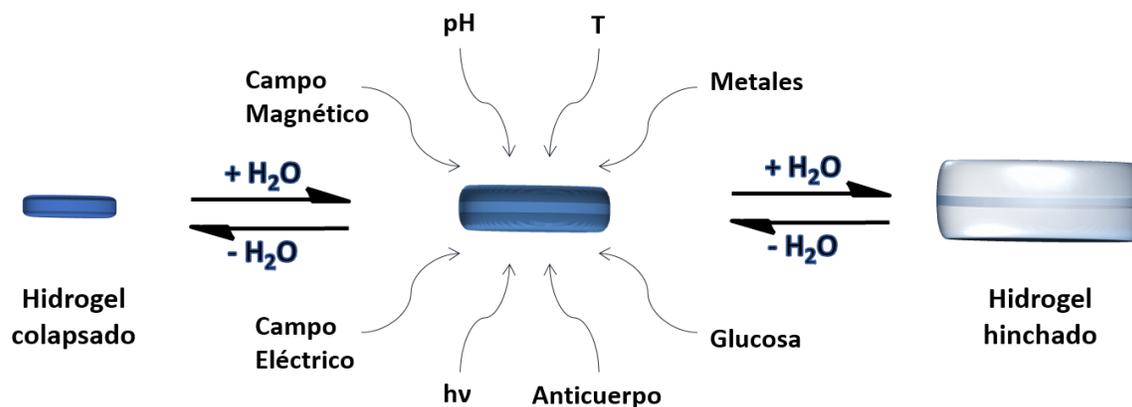


Figura 1.4 - Esquema del colapso/hinchamiento de hidrogeles inteligentes en respuesta a diferentes estímulos del entorno.

Además del cambio en su capacidad de hinchamiento, pueden tener otra gran variedad de respuestas inteligentes, tales como: capacidad de autocurado, memoria de forma, liberación a demanda de un bioactivo y/o degradación a demanda en entornos biológicos, entre otras. Muchas de las aplicaciones en desarrollo, que operan en entornos complejos y/o requieren de respuestas complejas, se basan en hidrogeles que combinan respuestas a múltiples estímulos [6], [9], [10].

En los últimos años, la incorporación de enlaces covalentes reversibles, uniones supramoleculares u otro tipo de interacciones reversibles, ha impulsado el estudio y desarrollo de dos novedosas características inteligentes en hidrogeles: la capacidad de autocurado y la memoria de forma.

El autocurado de hidrogeles imita la reparación de tejidos dañados que se observa en organismos vivos. La presencia de enlaces dinámicos/reversibles en el hidrogel permite que pueda auto-repararse luego de haber sido mecánicamente dañado. Por otro lado, la memoria de forma permite modificar la morfología del hidrogel, mediante fuerzas

mecánicas externas, y fijar temporalmente la(s) nueva(s) forma(s). El material puede ser devuelto a la forma original mediante la aplicación de un estímulo externo específico [11].

1.1.2.1 - HIDROGELES TERMOSENSIBLES

Los hidrogeles termosensibles son un tipo de materiales inteligentes muy estudiados, debido a que la temperatura es una variable fácil de controlar tanto *in vitro* como *in vivo* éstos son promisorios en aplicaciones biomédicas.

Los polímeros termosensibles que presentan sensibilidad en solución acuosa, muestran un cambio de fase por cambios en la temperatura de la solución. Por lo general se trata de un cambio abrupto que transcurre a una determinada temperatura, o en un rango acotado de temperaturas. La temperatura media de la transición es conocida como Temperatura de Transición de Fase (T_{tf}). Los polímeros más utilizados se caracterizan por encontrarse en una fase líquida homogénea por debajo de la T_{tf}, pero se separan en una nueva fase (sólida o gel) al aumentar la temperatura por encima de la T_{tf}. En este tipo de polímeros, la T_{tf} es también conocida como temperatura crítica de solubilidad inferior o LCST (por sus siglas en inglés, *lower critical solution temperature*), ya que por encima de esta temperatura el polímero precipita al disminuir su solubilidad. Existen también polímeros que tienen el comportamiento opuesto, mostrando una rápida transición desde el estado sólido/gel al estado soluble por encima de una cierta temperatura (*UCST, upper critical solution temperature*) [12]. El estímulo térmico es frecuentemente utilizado para provocar la gelación de polímeros solubles, obteniendo un comportamiento reversible de tipo sol-gel, particularmente útil en la generación de hidrogeles inyectables [13]. En el caso de hidrogeles termosensibles entrecruzados, el grado de hinchamiento del gel se vuelve dependiente de la temperatura y cambia abruptamente por encima y por debajo de la T_{tf} del polímero (Figura 1.5).

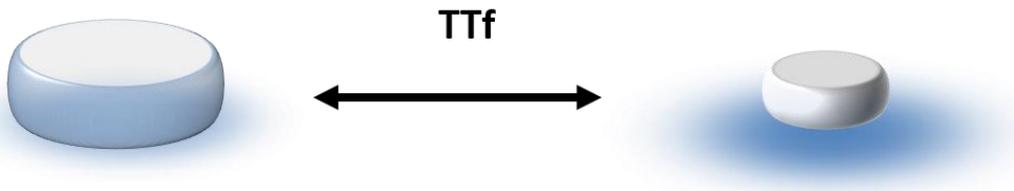


Figura 1.5 - Cambio del grado de hinchamiento de un hidrogel termosensible ante la modificación de la temperatura del medio por encima y por debajo de su temperatura de transición.

Si bien existen diversos polímeros termosensibles, el más extensivamente estudiado ha sido el poli(*N*-isopropilacrilamida) (p-NIPAm, Figura 1.6) [13]. p-NIPAm es obtenido a partir del monómero *N*-isopropilacrilamida (NIPAm) y presenta transición térmica totalmente reversible en medios acuosos, con una LCST de 32 °C. La cercanía de su T_{tf} con la temperatura corporal (aprox. entre 36,5 a 37,5 °C) es una de las razones por las cuales este polímero es tan estudiado. Además, mediante la copolimerización del monómero NIPAm con otros comonómeros es posible modificar la T_{tf} del hidrogel sintetizado, ajustándola al valor deseado en la aplicación de interés, por ejemplo, alcanzando valores cercanos los 37 °C para aplicaciones biomédicas. Por lo general, la co-polimerización de NIPAm con comonómeros hidrofílicos genera un aumento en la T_{tf} mientras que comonómeros hidrofóbicos la disminuyen [14].

La transición de fase de este polímero es originada por la presencia de grupos funcionales hidrofílicos (grupo amida), junto a grupos funcionales hidrofóbicos (grupo isopropilo y cadena principal del polímero) en su estructura. En este sistema, el balance de las interacciones hidrofílicas/hidrofóbicas entre el polímero y el agua es dependiente de la temperatura. Por ejemplo, en un hidrogel de p-NIPAm entrecruzado, a temperaturas por debajo de 32 °C ($T < T_{tf}$) las interacciones hidrofílicas entre el polímero y el agua son predominantes y por lo tanto, el hidrogel se encuentra en su grado de máximo hinchamiento. Cuando la temperatura es elevada por encima de 32 °C, las interacciones hidrofílicas polímero-solvente se debilitan y se favorecen las interacciones polímero-polímero entre los grupos isopropilos de las cadenas laterales de p-NIPAm y sus grupos

amida. Como consecuencia, las cadenas poliméricas se aproximan y el gel colapsa expulsando gran cantidad del agua contenida (Figura 1.5 y Figura 1.6) [14].

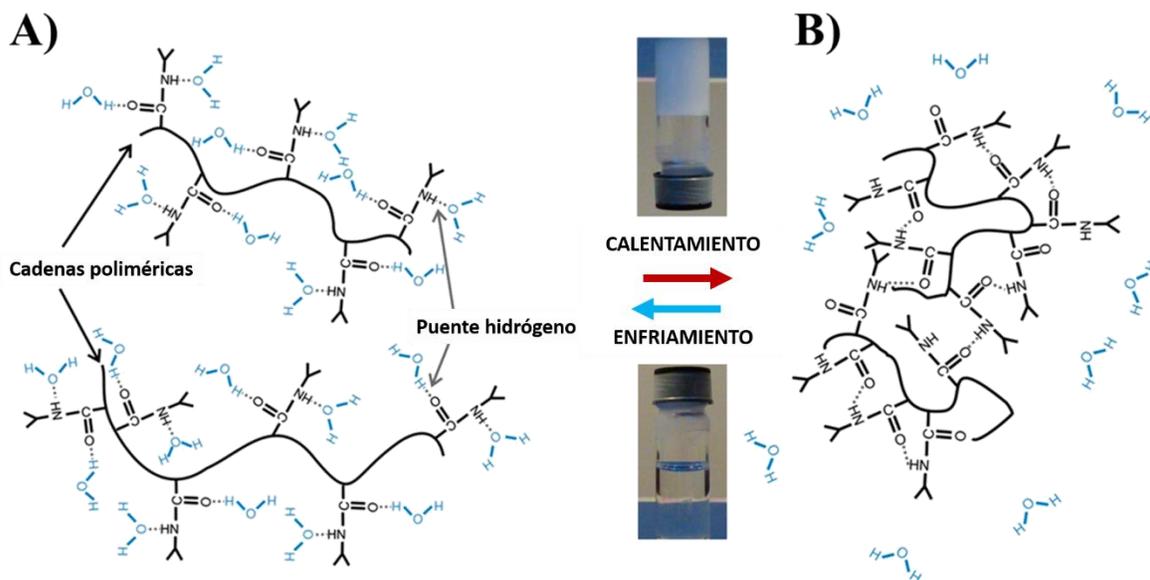


Figura 1.6 – A) Esquema de p-NIPAm hidratado en solución acuosa por debajo de su T_{tf} ($T < 32\text{ }^{\circ}\text{C}$). B) Esquema de p-NIPAm colapsado en solución acuosa por encima de su T_{tf} ($T > 32\text{ }^{\circ}\text{C}$). Las fotografías en el centro muestran el cambio reversible, en una solución de p-NIPAm no entrecruzado, del estado líquido translúcido (abajo) a un estado gel opaco (arriba) debido a la separación de fase del polímero promovida por la temperatura. Imagen adaptada de Lanzalaco y Armelin [14].

Las propiedades termosensibles de p-NIPAm, su comprobada biocompatibilidad y la posibilidad de combinarlo con otros comonómeros, u otros materiales orgánicos o inorgánicos ha generado una amplia gama de aplicaciones entre las que se destacan la liberación controlada de fármacos, ingeniería de tejidos, (bio)sensores, dispositivos de microfluídica, entre otros [14]. Sin embargo, si bien se ha comprobado la biocompatibilidad del homopolímero, la mayoría de los copolímeros de p-NIPAm no han sido estudiados *in vivo*, debido al alto costo y restricciones éticas que posee este tipo de análisis. Este es un aspecto considerable, teniendo en cuenta que la copolimerización de NIPAm es generalmente necesaria para el control de la T_{tf} y otras propiedades del material.

1.1.2.2 - HIDROGELES CON ENLACES COVALENTES REVERSIBLES TIPO IMINA

La utilización de enlaces covalentes reversibles puede ser útil para la obtención de hidrogeles con propiedades de auto-curado o memoria de forma, como se mencionó anteriormente. Por otro lado, el creciente interés de la aplicación de hidrogeles para su uso en entornos biológicos requiere de la optimización de las propiedades mecánicas de los materiales mediante el control de las interacciones polímero-polímero y el grado y tipo de entrecruzamientos. Además, para que los enlaces puedan ser formados *in situ*, deben generarse a través de reacciones con mínima toxicidad [9].

Uno de los enlaces covalentes reversibles más promisorios en el desarrollo de hidrogeles funcionales es el enlace imina o base de Schiff ($RN=CR_2$ donde $R = H$ y/o hidrocarbilo) [15]. La formación de iminas es una reacción eficiente que se produce cuando un grupo amino reacciona con un carbonilo para formar un enlace $C=N$, con agua como subproducto (Figura 1.7a). Este enlace covalente reversible puede ser obtenido en condiciones fisiológicas. Una vez formado, el enlace puede participar de tres tipos de reacciones: la hidrólisis, donde la imina regresa a sus precursores por la reacción con agua como solvente (Figura 1.7a, reacción inversa); el intercambio, donde la imina puede sufrir una transiminación por reacción con otra amina (Figura 1.7b); y metátesis, donde la imina puede intercambiar al grupo funcional amino frente a otra imina (Figura 1.7c) [16].

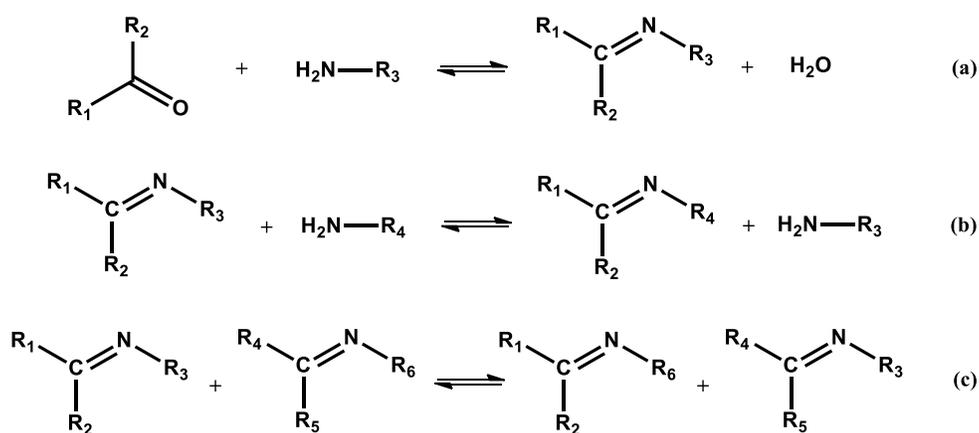


Figura 1.7 - Reacciones de iminas en el equilibrio. (a) Formación de enlaces imina y su hidrólisis (reacción inversa). (b) Transiminación. (c) Metátesis.

Todos los pasos de la reacción de formación de iminas son reversibles. Sin embargo, el equilibrio puede verse desplazado hacia los productos o precursores dependiendo de las condiciones del medio y de la naturaleza de los precursores. Algunos de los factores que influyen en el equilibrio son: el pH del medio, el solvente, la concentración y la temperatura. Además, el equilibrio puede verse desplazado por factores estéricos y electrónicos de reactivos y productos. La naturaleza reversible del enlace imina y su dependencia con las condiciones antes mencionadas, generan la oportunidad de controlar el equilibrio hacia la formación de productos o hacia los reactivos de manera predecible [16]. Por lo tanto, puede ser utilizado en el desarrollo de hidrogeles inteligentes estímulo-responsivos [17]. Por ejemplo, los enlaces imina han sido utilizados en hidrogeles donde la reversibilidad por hidrólisis generó sensibilidad al pH y propiedades autocurables, mientras la transiminación otorgó sensibilidad a analitos como aminoácidos o derivados de Vitamina B6 [18]; también en el desarrollo de hidrogeles con memoria de forma [19]; hidrogeles para el vendaje de heridas; hidrogeles inyectables, con posibilidad de liberar fármacos de manera controlada; o hidrogeles para ingeniería de tejidos [20]; entre otros.

Dado que la naturaleza electrónica de los reactivos tiene gran influencia en el equilibrio de la reacción (cinética y termodinámicamente), con frecuencia se utilizan aminas que poseen heteroátomos en posición alfa ($R-X-NH_2$) y se conocen como α -nucleófilos. De esta manera es posible manejar la reactividad para controlar el equilibrio de acuerdo a las necesidades de la aplicación. Los α -nucleófilos más utilizados son las hidrazinas e hidrazidas ($R-NH-NH_2$ y $R-C(O)-NH-NH_2$, respectivamente) y las alcoxilaminas ($R-O-NH_2$). En la literatura suele referirse con el término más general, "imina", al enlace formado por reacción de una amina sin heteroátomos sustituyentes en la posición alfa, con el carbonilo de un aldehído o cetona (Figura 1.8, a). Por otro lado, los productos de la reacción de una alcoxilamina o hidrazina/hidrazida con dicho carbonilo reciben el nombre de oxima o hidrazona, respectivamente (Figura 1.8, b y c) [21], [22].

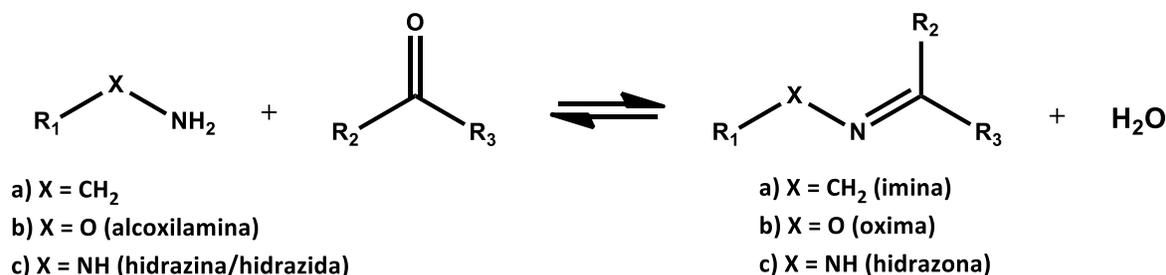


Figura 1.8 - Tipos de enlace imina de acuerdo sustituyente unido al nitrógeno de la amina.

Por lo general, los enlaces oxima son más estables a la hidrólisis que los enlaces hidrazona y estos más aún que los enlaces imina. Esta característica permite seleccionar a uno u otro, dependiendo de la necesidad de un enlace covalente no hidrolizables (ej. para la bioconjugación de una molécula en un soporte cromatográfico) o hidrolizable (ej. para la liberación controlada de un fármaco). Además, en todos los casos, la hidrólisis y la formación de estos enlaces es dependiente del pH del medio, por lo que es posible utilizarlos para obtener materiales pH-sensibles [23].

Una de las principales características de la reacción de formación de iminas, hidrazonas y oximas es su ortogonalidad, obteniendo altos rendimientos (en las condiciones adecuadas) con alta selectividad, inclusive en medios complejos como los biológicos. Debido a esto, y a que el único subproducto es H₂O, estas reacciones son consideradas *bio-ortogonales* [21], [24]. Estos enlaces han demostrado buena biocompatibilidad [25] y han sido utilizados en sistemas de liberación controlada de fármacos [26], afinidad cromatográfica [27], funcionalización de moléculas de reconocimiento inmunológico [28], vehículos para la liberación de material genético [29], hidrogeles autocurables [30], [31], entre otras aplicaciones.

1.1.3 - SÍNTESIS DE HIDROGELES

Los hidrogeles, por ser materiales capaces de absorber grandes cantidades de agua, son obtenidos a partir de precursores principalmente (pero no únicamente) hidrofílicos. En ocasiones, la combinación con precursores hidrofóbicos es utilizada para la mejora de las propiedades mecánicas del gel y el control de su grado de hinchamiento [32], [33].

Los precursores pueden ser de origen natural o sintético. Es frecuente la utilización de polímeros naturales, para aprovechar sus propiedades intrínsecas (algunos provenientes de fuentes renovables, biodegradables, biocompatibles, económicos, etc.), pero introduciendo modificaciones sintéticas que mejoran las propiedades mecánicas o la funcionalidad del material.

Los hidrogeles pueden sintetizarse de diversas maneras, generalmente centradas en la unión o entrecruzamiento de cadenas poliméricas u oligoméricas pre-existentes o mediante la polimerización y entrecruzamiento de unidades monoméricas, para dar lugar a la red tridimensional (ilustrada en la Figura 1.1). Dependiendo de la naturaleza del entrecruzamiento, los hidrogeles pueden clasificarse en [2]:

- Químicamente entrecruzados:

Poseen entrecruzamientos covalentes entre las cadenas poliméricas. Estas estructuras pueden alcanzarse por polimerización de monómeros (generalmente mono- o di-funcionales) y agentes entrecruzantes (di- o poli-funcionales) de bajo peso molecular, mediante polimerización radicalaria o por condensación de GF complementarios. También pueden obtenerse mediante el entrecruzamiento de cadenas poliméricas pre-existentes que poseen GF reactivamente complementarios (entrecruzamiento polímero/polímero. Ej. entrecruzamiento de un polímero con GF aldehídos con otro con GF amino) o mediante la reacción de los GF laterales del polímero con moléculas de bajo peso molecular con GF reactivamente complementarios (agentes entrecruzantes). Algunos polímeros pueden ser covalentemente entrecruzados por incidencia de radiación de alta energía.

- Físicamente entrecruzados:

Poseen uniones físicas o secundarias. Los polímeros pueden unirse a través de interacciones iónicas, interacciones por puente hidrógeno, formación de complejos, interacciones hidrofóbicas, dominios amorfos o cristalinos o complejos de inclusión supramolecular, entre otros.

Tanto la naturaleza química de los precursores utilizados, como la de las uniones o entrecruzamientos, definirán las propiedades de hinchamiento, las propiedades mecánicas y respuesta a estímulos del medio de los hidrogeles obtenidos.

Si bien la utilización de precursores de origen natural es preferible por su menor impacto ambiental, los hidrogeles obtenidos por polimerización de diferentes monómeros sintéticos generan materiales más versátiles, permitiendo diseñar y controlar sus propiedades mediante el control de la composición y funcionalidad de los monómeros. Es por ello que, entre las numerosas técnicas de síntesis de hidrogeles, la obtención mediante polimerización a radicales libres, es una de las estrategias más usadas.

Esta técnica se centra en la reacción de adición radicalaria de monómeros mono-vinílicos, entrecruzados con agentes di- o poli-vinílicos (Figura 1.9). La reacción es promovida por el uso de un iniciador radicalario, el que genera los primeros radicales en el medio de reacción. Estos se adicionarán a los dobles enlaces presentes en los monómeros vinílicos o entrecruzantes, generando nuevos radicales de peso molecular creciente y produciendo una reacción en cadena que lleva a la formación de polímeros de alto peso molecular, entrecruzados covalentemente.

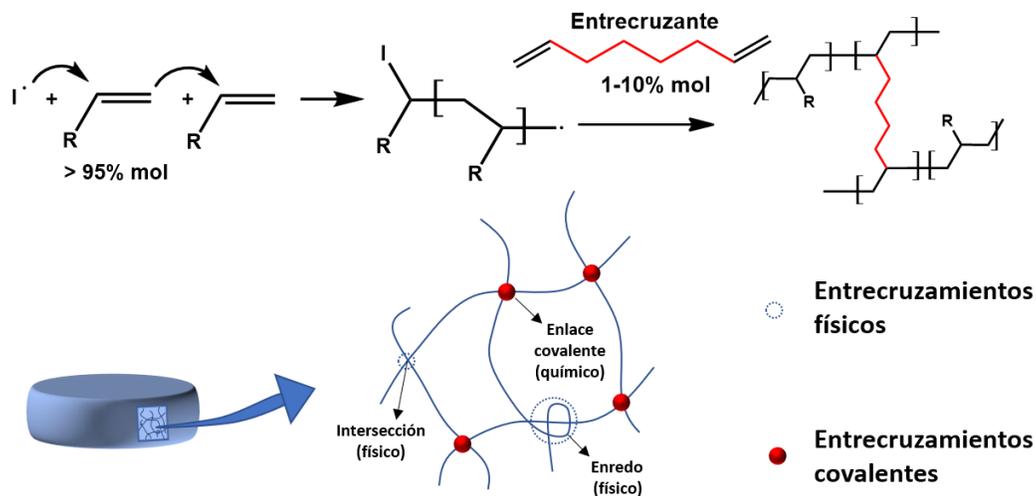


Figura 1.9 - Esquema de reacción radicalaria de monómeros y entrecruzantes vinílicos para dar lugar a una red entrecruzada covalentemente.

Para comenzar la polimerización, se utilizan diversos iniciadores de la reacción radicalaria. Algunos de ellos forman radicales a partir de su descomposición térmica (por ejemplo, peróxidos o azocompuestos), otros a partir de la irradiación con luz de una determinada longitud de onda (fotoiniciadores), y algunos a través de una reacción de óxido-reducción [2]. Los más ampliamente utilizados son las sales de persulfato (persulfato de amonio, de sodio o de potasio) los cuales se descomponen generando radicales, al ser calentados en solución acuosa (usualmente son calentados por encima de los $60\text{ }^\circ\text{C}$). En ocasiones, las sales de persulfato son utilizadas junto a aminas alquil-sustituidas que permiten la descomposición acelerada del persulfato, promoviendo una rápida generación de radicales a través de un mecanismo de óxido-reducción. La iniciación redox se produce más rápidamente por tener una barrera energética de reacción más baja, por lo que además permite realizar las polimerizaciones a temperaturas menores a las utilizadas en la descomposición térmica de persulfato. La amina más utilizada, por haber demostrado mayor efectividad, es tetrametiletilendiamina (TEMED o TMEDA) [34].

Respecto al medio de reacción, dado que en la síntesis de hidrogeles se utilizan principalmente precursores hidrofílicos, por lo general la síntesis se realiza por polimerización en solución acuosa.

1.1.3.1 SÍNTESIS DE HGS POR POLIMERIZACIÓN RADICALARIA EN SOLUCIÓN

En un esquema típico de obtención de hidrogeles mediante una polimerización radicalaria en solución (Figura 1.10), inicialmente se disuelven los monómeros y entrecruzantes en agua. Luego de la disolución total, se deoxigena la solución mediante burbujeo con un gas inerte (N_2 o Ar). Luego, se adiciona el iniciador y la mezcla se coloca a reaccionar en un baño a la temperatura deseada durante algunas horas, dependiendo de la reactividad de los precursores. Una de las ventajas de esta polimerización, es que el material tomará la forma del molde utilizado, lo cual tiene importancia en el desarrollo de hidrogeles de uso comercial (por ejemplo, en lentes de contacto). Luego de la síntesis, el hidrogel obtenido es extraído del molde, cortado en la forma requerida (en el esquema, en forma de discos) y lavado en agua para eliminar restos de reactivos no incorporados a la red.

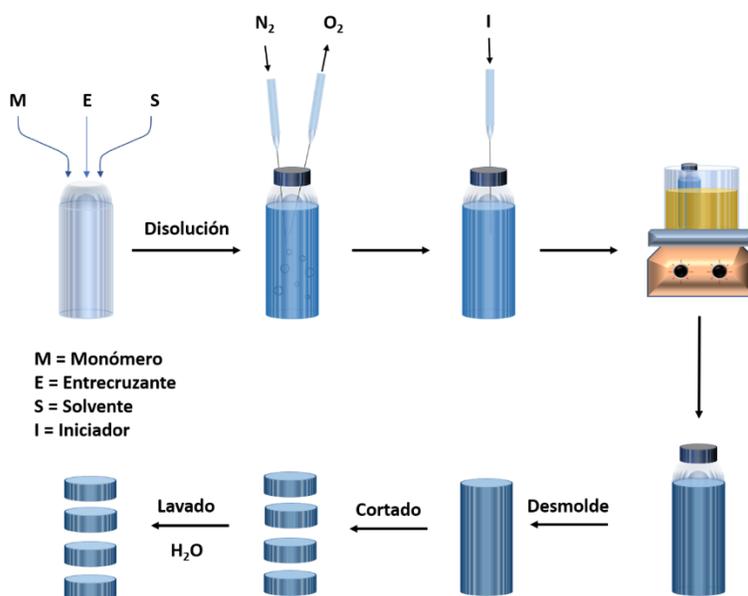


Figura 1.10 - Esquema de síntesis de hidrogeles mediante polimerización radicalaria en solución. Adaptado de la Tesis doctoral del Dr. Julio Cesar Cuggino, año 2011, Universidad Nacional de Córdoba.

La gran variedad de monómeros y entrecruzantes disponibles comercialmente, junto a la posibilidad de generar otros nuevos, a través de síntesis orgánica, generan una muy amplia gama de posibles combinaciones y estrategias de síntesis de hidrogeles funcionales.

1.1.4 PROPIEDADES DE HIDROGELES Y SU CARACTERIZACIÓN

COMPOSICIÓN QUÍMICA

Las técnicas de determinación de la composición química más utilizadas son las espectrometrías de resonancia magnética nuclear (RMN) y la de absorción infrarroja (IR). Estas dos técnicas espectroscópicas permiten tener información sobre los grupos funcionales presentes en los hidrogeles y, en ocasiones, sobre cómo están orientados en el espacio o estructurados. Además, es posible obtener información cuantitativa sobre la composición química. Sin embargo, la gran restricción de movimiento que tienen las cadenas poliméricas (debido a su extensión, a las numerosas interacciones entre ellas o a los entrecruzamientos) hace que las señales de absorción de radiación electromagnética sean más ensanchadas que lo observado habitualmente en moléculas más pequeñas. Este ensanchamiento de los picos es una evidencia de la presencia de interacciones entre los GF de los polímeros (en ocasiones puede dar cuenta de qué tipo de interacciones están sucediendo).

PROPIEDADES DE HINCHAMIENTO

CAPACIDAD DE HINCHAMIENTO

La capacidad de absorción y retención de agua en hidrogeles está principalmente controlada por la composición química, en términos de hidrofiliidad/hidrofobicidad de sus componentes, y por la unión o interacción entre las cadenas poliméricas, que limita la expansión dimensional del hidrogel.

En general, se ha observado que los hidrogeles que poseen grupos hidrofílicos tienden a hincharse más que aquellos con dominios hidrofóbicos. Esto se atribuye a que los grupos hidrofóbicos, al ser expuestos al agua, tienden a colapsar para minimizar su exposición ante

el no-solvente. Además, otras características del medio pueden afectar al hinchamiento, sobre todo en hidrogeles que responden a estímulos (estímulo-responsivos). Por ejemplo, un cambio en el pH del medio afectará al hinchamiento de hidrogeles que tengan grupos ionizables (pH sensibles), mientras cambios en la fuerza iónica o la temperatura afectarán al hinchamiento de hidrogeles sensibles a iones o termosensibles, respectivamente [1], [35].

Como se mencionó anteriormente, es necesario incorporar interacciones entre las cadenas poliméricas para que el hidrogel pueda expandirse hasta un límite y contener gran cantidad de agua sin disolverse. Por lo tanto, la naturaleza y cantidad de entrecruzamientos que unen a la red polimérica son factores limitantes de la capacidad de hinchamiento de los geles. El grado de entrecruzamiento puede ser definido como la cantidad en moles del agente entrecruzante respecto de la cantidad en moles de unidades repetitivas de polímero. Los hidrogeles con mayor grado de entrecruzamiento tendrán una estructura más entrelazada y comprimida que producirá menor capacidad de expansión y, por ende, menor capacidad de hinchamiento. Por el contrario, materiales menos entrecruzados tendrán cadenas poliméricas con mayor movilidad y capacidad de expansión, alcanzando mayor grado de hinchamiento, a costa de un detrimento en la rigidez del material [1].

PROPIEDADES MECÁNICAS

Cuando cotidianamente hablamos sobre la rigidez, elasticidad o resistencia de un material, nos referimos a algunas de sus propiedades mecánicas. En efecto, las propiedades mecánicas de un material son definidas en base a su respuesta o comportamiento cuando es sometido a una fuerza de estrés mecánico. La aplicación de una fuerza externa tendiente a deformar al material generará en éste una respuesta mecánica.

Algunas de las características mecánicas principales de los materiales son:

- Elasticidad: capacidad del material de deformarse reversible e instantáneamente cuando es sometido a una tensión de deformación. El módulo de Young o módulo tensil, E , describe la resistencia que el material elástico opone a la tensión de

deformación aplicada y es definido como la relación entre el esfuerzo de tracción y la deformación, donde el esfuerzo de tracción está definido en términos de fuerza por unidad de área.

- Resistencia a la rotura: es la tensión aplicada en el punto de quiebre (rotura) durante la deformación (excesiva) del material.
- Rigidez: se define como la resistencia del material a ser deformado cuando se le aplica una fuerza externa. Usualmente identificada como la pendiente de la región lineal en una curva de estrés vs. deformación.

Las propiedades mecánicas de los materiales son fundamentales respecto a su aplicación. Este aspecto resulta más obvio en materiales de uso cotidiano como la dureza del plástico de una botella o la viscosidad de una crema cosmética. Sin embargo, este aspecto es primordial en aplicaciones más específicas. Como ejemplo en el área de hidrogeles, se pueden mencionar los materiales para ingeniería de tejidos. El cultivo celular sobre matrices poliméricas, requiere que los hidrogeles tengan un comportamiento similar a los tejidos biológicos, para favorecer la correcta proliferación celular y crecimiento del tejido. Las propiedades mecánicas del soporte de cultivo, en la escala macroscópica y en la microscópica, tienen un rol fundamental en el comportamiento celular y direccionan el fenotipo y genotipo de las células cultivadas [36].

En hidrogeles, estas propiedades pueden ser modificadas cambiando el tipo y grado de entrecruzamiento del hidrogel. Por ejemplo, un aumento en la rigidez del gel puede ser conseguido mediante el incremento en su grado de entrecruzamiento. Como posible desventaja, esto podría generar una limitación en la capacidad de hinchamiento del material y hacerlo más quebradizo [1]. También es posible modificar las propiedades mecánicas cambiando la naturaleza de las interacciones entre las cadenas poliméricas, por ejemplo, generando dominios de asociaciones hidrofóbicas. La optimización de las propiedades mecánicas ha de ser realizada en función de la aplicación de interés (según se requiera un material más elástico, viscoso, rígido, etc.) y considerando que éstas están estrechamente vinculadas a las propiedades de hinchamiento.

CARACTERIZACIÓN MEDIANTE REOLOGÍA ROTACIONAL OSCILATORIA

Idealmente, frente a una fuerza de deformación externa, un material podría comportarse como un sólido ideal o un líquido ideal. En un sólido ideal, la fuerza de estrés aplicada se traduciría en una deformación elástica e instantánea del material (donde la energía de la fuerza aplicada es almacenada en dicha deformación), el cual podría reponerse completamente luego de la remoción del estrés “devolviendo” la energía de tensión previamente aplicada. Esto correspondería a un comportamiento elástico ideal, equivalente al comportamiento ideal de un resorte, matemáticamente representado a través de la ley de Hooke. Si el material se comportase como un líquido ideal Newtoniano, toda la fuerza aplicada generaría la deformación inelástica e irreversible del material, donde la energía empleada se perdería disipándose en dicha deformación inelástica. En la realidad, los materiales tienen un comportamiento intermedio entre estos dos ideales, por lo que se dice que es un comportamiento visco-elástico. Es decir que parte de la energía aplicada sobre el material es almacenada elásticamente y otra parte es disipada viscosamente. Dependiendo del material, su comportamiento puede asemejarse más a un sólido ideal o a un líquido ideal. Pero esto no sólo depende de la naturaleza del material, ni de la magnitud de la fuerza, sino también de la velocidad con que esa fuerza es aplicada.

Los materiales podrían comportarse como sólidos o líquidos ideales dependiendo de la escala de tiempo de aplicación (velocidad o frecuencia) del estrés mecánico (fuerza externa). Un hidrogel podría actuar elásticamente (como una goma) ante una fuerza de deformación, respondiendo instantáneamente al estrés aplicado y reponerse completamente luego de la remoción del estrés; o podría deformarse inelásticamente, como un líquido viscoso si la misma fuerza fuese aplicada a menor velocidad o por un periodo de tiempo más prolongado. Este periodo de tiempo, permitiría la relajación del material, respecto de la tensión aplicada. Por ello se dice que el comportamiento visco-elástico es tiempo-dependiente y se observará un cierto comportamiento elástico combinado con un comportamiento viscoso, cuya relación depende de la velocidad en que se aplicó la tensión [36]. El estudio del comportamiento visco-elástico de un material mediante la aplicación de fuerzas externas a distintos tiempos (frecuencias), permite

obtener información sobre las interacciones (covalentes o físicas) en el material, la movilidad de las cadenas, el grado de entrecruzamiento, entre otras.

La reología oscilatoria consiste en medir la respuesta del material al estrés mecánico cuando se le aplica una deformación de cizallamiento de comportamiento sinusoidal (respecto del ángulo de deformación). El hidrogel se coloca entre dos platos paralelos (Figura 1.11) que aplican la deformación y miden la respuesta del material.

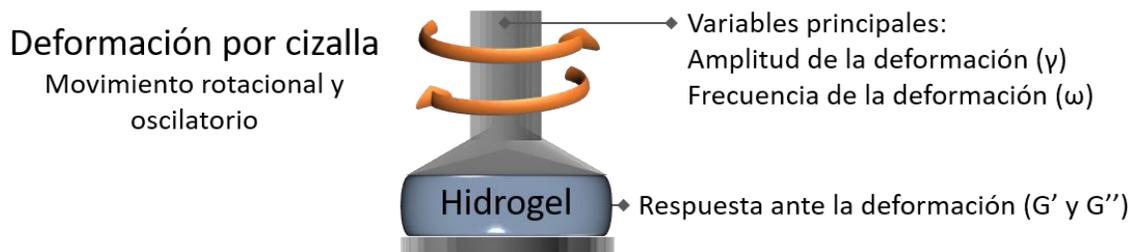


Figura 1.11 - Esquema de medida de las propiedades mecánicas de un gel en un reómetro rotacional oscilatorio.

El comportamiento viscoelástico a una determinada frecuencia (ω) es caracterizado midiendo el módulo complejo (G^*) del material. Este poseerá una contribución elástica, reflejada en el módulo de almacenamiento (G' , también llamado módulo elástico) y una viscosa, reflejada en el módulo de pérdida (G'' , también conocido como módulo viscoso).

$$G^*(\omega) = G'(\omega) + i \cdot G''(\omega)$$

Los principales ensayos de caracterización de hidrogeles consisten en determinar su comportamiento ante un barrido de amplitud de la deformación (1) y un barrido de frecuencias (2) [36].

En el primero, se varía el porcentaje de deformación impuesta al hidrogel (desplazamiento rotacional del material), a una frecuencia constante (Figura 1.12). Mediante esta prueba es posible determinar el Rango Lineal Viscoelástico (RLV) del hidrogel. En el RLV, los valores de G' y G'' son independientes (aproximadamente constantes) de la amplitud de la

deformación impuesta. Luego de superar el RLV (superando el “punto crítico”) la respuesta elástica del material frente a la deformación disminuye, indicando un aumento de la disipación de la energía mediante deformación inelástica (caída de G' y G''). Este ensayo permite observar diferencias en la extensión del RLV entre distintos hidrogeles para conocer cuánta deformación puede soportar el material respondiendo elásticamente y cuál es el momento en el que comienzan a ocurrir las deformaciones inelásticas por desplazamientos entre las cadenas o fracturas internas del material. La extensión del RLV a una dada frecuencia está ligada al tipo de interacciones y grado de entrecruzamiento del material. Un material más elástico tendrá un RLV extenso, mientras uno más quebradizo (generalmente más entrecruzado) se deformará inelásticamente, por fracturas, luego de pequeñas deformaciones.

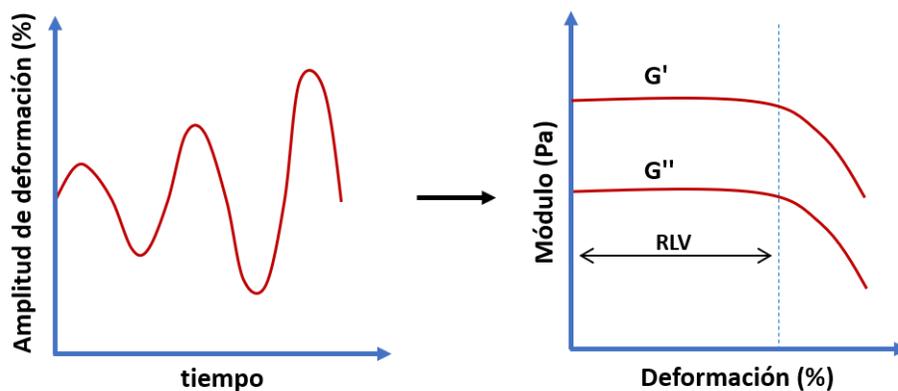


Figura 1.12 - Ensayo de barrido de amplitud de la deformación a una frecuencia constante. Determinación del rango lineal viscoelástico, anterior al punto crítico.

Sin embargo, como se mencionó anteriormente, el comportamiento viscoelástico de los hidrogeles es tiempo-dependiente. Es decir que, ante una misma amplitud de deformación (misma energía de estrés mecánico), el hidrogel puede comportarse más elásticamente o más viscosamente, dependiendo del tiempo y velocidad de aplicación de la fuerza. Si la fuerza es aplicada durante tiempos largos, es posible que el polímero se deforme inelásticamente por fenómenos de relajación de las interacciones poliméricas. Esto permite obtener información valiosa a partir del ensayo de barridos de frecuencia de deformación.

En este ensayo, el hidrogel es deformado a una amplitud constante, pero la frecuencia (velocidad) de aplicación de la deformación es variada (Figura 1.13). Este estudio permite comparar los G' y G'' de hidrogeles, con distinto grado de entrecruzamiento o composición, dando información sobre la fuerza de interacción entre las cadenas poliméricas y su naturaleza, permitiendo, por ejemplo, diferenciar las interacciones covalentes de las físicas. Generalmente, cuando el material es deformado a frecuencias altas, la alta velocidad de deformación no permite la relajación inelástica del material (o el desplazamiento entre dominios del polímero) y se comporta como un sólido (se observa aumento en los valores de los módulos). Por el contrario, a bajas frecuencias puede observarse la relajación del material estresado, por deformación inelástica (se observa disminución en los valores de los módulos'). Este último fenómeno es más frecuentemente observado cuando la mayor contribución al G' está dada por interacciones físicas, que pueden relajarse a tiempos largos, y es menos observado cuando la mayor contribución es covalente, porque estas uniones no permiten la relajación del material. De esta manera, se pueden comparar grados de entrecruzamientos y tipos de interacciones entre los hidrogeles medidos.

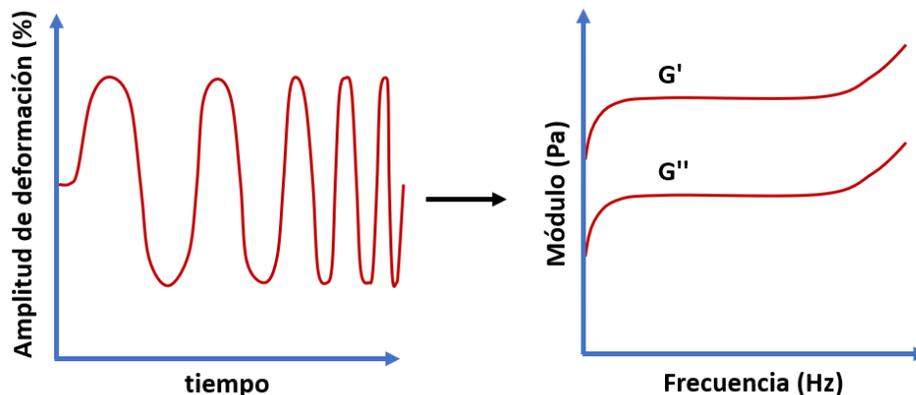


Figura 1.13 - Ensayo de barrido de frecuencias (velocidad de los ciclos de deformación) con una amplitud de deformación constante. Determinación del módulo de meseta (plató) y comportamiento en frecuencias extremas (en este caso, el esquema representa cualitativamente un comportamiento típico de un hidrogel en el que las interacciones físicas son muy relevantes).

OTRAS PROPIEDADES

Dependiendo de las propiedades particulares de cada hidrogel o de las aplicaciones de interés, se utilizan técnicas de determinación específicas para evaluar esas características. Por ejemplo, en hidrogeles pH sensibles, es frecuente el estudio de sus propiedades de hinchamiento o mecánicas a distintos valores de pH. En hidrogeles inyectables es necesaria la determinación de los tiempos de gelación *in situ*, de la biodegradabilidad o biocompatibilidad, etc.

1.1.5 - MODIFICACIÓN POST-SÍNTESIS DE HIDROGELES

En la última década, el alto grado de desarrollo en el área de materiales ha generado la necesidad de sintetizar polímeros de alta complejidad que exhiben funcionalidades y propiedades distintivas. Como estrategia para alcanzar dicha complejidad se recurre a los criterios de diseño y técnicas de control a nivel molecular desarrolladas en la Química Orgánica, que permiten la preparación de polímeros bien definidos y materiales nanoestructurados [37].

En muchos casos, luego de la síntesis, el material polimérico no tiene todas las propiedades deseadas. Esto puede deberse a limitaciones en la metodología de síntesis y/o susceptibilidad de los GF o de las moléculas a introducir, respecto a las condiciones de síntesis. En estos casos, se requieren cambios químicos en el producto, que pueden ser realizados en etapas post-síntesis. La principal estrategia de modificación de polímeros es conocida como modificación post-polimerización y está basada en la polimerización o copolimerización directa de monómeros con grupos funcionales que son inertes a las condiciones de polimerización, pero pueden ser convertidos cuantitativamente, en pasos siguientes, en una amplia variedad de otros grupos funcionales. El éxito de estos métodos se evalúa en función de los buenos rendimientos alcanzados en condiciones suaves de reacción, con excelente tolerancia a otros grupos funcionales y la ortogonalidad de las reacciones de modificación post-polimerización [38]. En este sentido, se han elaborado un gran número de estrategias para la inclusión de GF que puedan ser modificados en etapas post-síntesis. Por ejemplo: la utilización de anhídridos; isocianatos; ésteres activados;

dienos y dienófilos para reacciones de tipo Diels-Alder; acetales; alquinos, azidas y tioles para reacciones de tipo *click-chemistry*; son algunos de los GF modificables que pueden ser introducidos en las estructuras poliméricas [39].

La modificación post-síntesis de hidrogeles se usa a menudo para introducir nuevos grupos funcionales, para optimizar las propiedades mecánicas del material o para inmovilizar (bio)moléculas [40].

1.1.5.1 - OBTENCIÓN DE GRUPOS FUNCIONALES ALDEHÍDO Y α -OXO-ALDEHÍDO

La obtención de GF aldehído en polímeros es de gran interés por su participación en las reacciones (bio)ortogonales mencionadas anteriormente, como la formación de enlaces reversibles, pH dependientes, del tipo imina, oxima o hidrazona. En polímeros obtenidos mediante síntesis radicalaria, este grupo funcional se logra únicamente mediante modificaciones posteriores a la síntesis, ya que es inestable en las condiciones de polimerización, por su reacción con los radicales en crecimiento [38], [39]. Sin embargo, incluso la modificación post-síntesis es generalmente tediosa, implicando reacciones con varios pasos. Con frecuencia, se usan monómeros con grupos aldehídos protegidos en forma de acetal. Después de la síntesis del polímero, se deben realizar reacciones de desprotección, en ocasiones con reactivos no acuosos y ácidos fuertes [41]–[44].

En algunos polisacáridos de origen natural, no obtenidos mediante síntesis radicalaria, se sigue un protocolo de modificación sencillo. Los grupos aldehído se logran a través de la reacción entre los dioles vecinales de los carbohidratos con soluciones acuosas de periodato, mediante el mecanismo propuesto por Malaprade (Figura 1.14-A) [45]. Esta reacción se ha usado comúnmente para proporcionar aldehídos en hidrogeles de polisacáridos naturales como dextrano, quitosano, pectina, ácido hialurónico o alginato (Figura 1.14-B) [46]–[49]. Una alternativa interesante, es la aplicación de este protocolo sencillo a los materiales sintéticos, considerando que los hidrogeles producidos por la polimerización de diferentes monómeros generan materiales más versátiles con propiedades predecibles, mediante el control de la composición y la funcionalidad de los

monómeros. Por consiguiente, se ha usado glicidol (con un grupo funcional oxirano) para reaccionar con grupos hidroxilo de polímeros sintéticos que producen dioles vecinales anclados al material. Posteriormente, estos dioles terminales reaccionan con el periodato para producir aldehídos en la cadena del polímero y formaldehído como sub-producto [40].

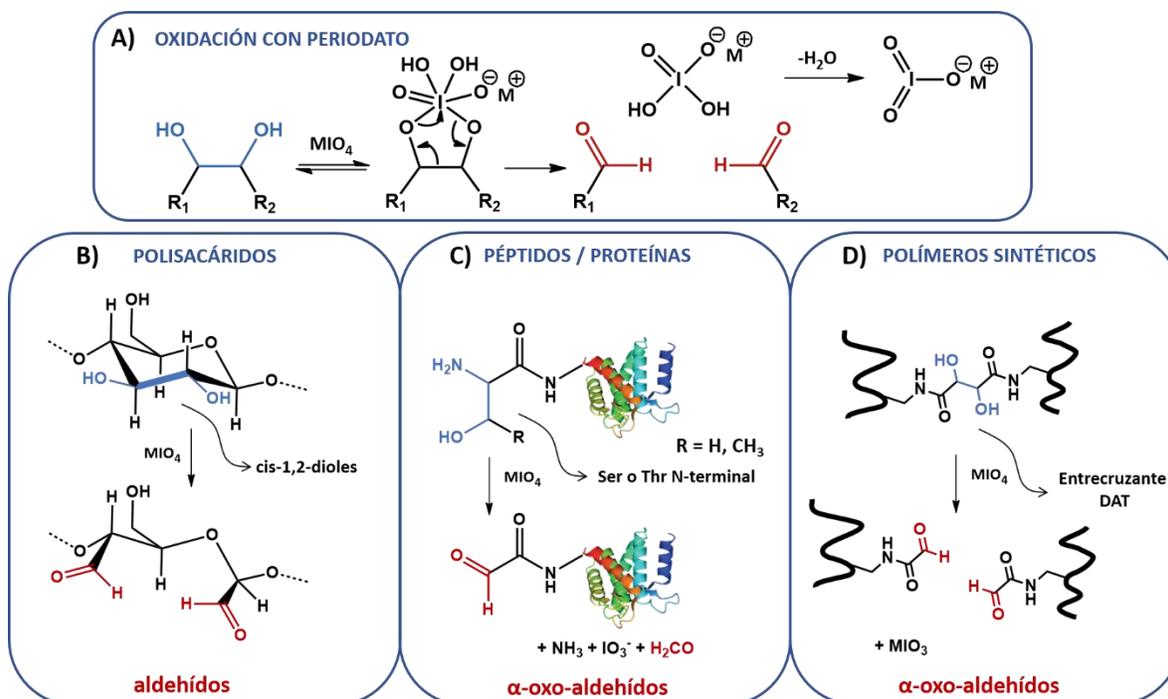


Figura 1.14 - A) Mecanismo de oxidación de dioles vecinales por reacción con el anión periodato. B) Oxidación de dioles en polisacáridos. C) Oxidación de β-aminoalcoholes en péptidos y proteínas. D) Oxidación de entrecruzamientos debidos al agente DAT.

Por otro lado, los α-oxoaldehídos son aldehídos con una función carbonilo (C=O) en posición alfa (α). Estos, son extensivamente utilizados en la síntesis y modificación de proteínas y péptidos, y su anclaje en diversos materiales, manteniendo su conformación y actividad biológica. Mediante el uso de este GF, se han obtenido excelentes rendimientos en la formación de enlaces oxima o hidrazona con alta selectividad y buena estabilidad de las uniones generadas [50], [51]. Esta estrategia de modificación es frecuentemente aplicada debido, no solo a los altos rendimientos de las reacciones bio-ortogonales, sino a que los α-

oxo-aldehídos son fácilmente obtenidos por la oxidación con periodato de los β -aminoalcoholes en el extremo N-terminal en serina y treonina (Figura 1.14-C) [50], [51]. Debido a su gran utilidad, se han desarrollado también algunas estrategias para la obtención de los α -oxoaldehídos en el extremo C-terminal de estas macromoléculas [52].

En polímeros sintéticos, es más frecuente la obtención de aldehídos alifáticos. Los aldehídos alifáticos pueden reaccionar mediante auto-aldolización [42] y usualmente forman enlaces hidrazona hidrolizables [23]. Estas características pueden ser requeridas en algunas aplicaciones, pero indeseadas en otras. Por otro lado, los α -oxoaldehídos no contienen hidrógenos en la posición α , impidiendo que ocurra la aldolización y, además, han demostrado la generación de enlaces hidrazona que permanecieron estables durante semanas [53].

Existen muy escasos antecedentes sobre la formación de α -oxoaldehídos en polímeros sintéticos. Kornysova y colaboradores prepararon micro-esferas no particuladas (continuas o monolíticas) que contenían vancomicina como selector quiral para la electrocromatografía capilar [54]. Para esto, se utilizó *N, N'*-dialiltartardiamida (DAT), que contiene un grupo funcional diol vecinal y se lo trató con periodato de sodio para convertirlo en grupos aldehído (Figura 1.14-D). Por lo tanto, se logró la activación de la matriz para la unión de vancomicina, y el aumento del tamaño de poro y porosidad del soporte. En otra publicación, los mismos autores reportaron la preparación de una columna capilar monolítica de afinidad, con α -manosa inmovilizada por aminación reductiva, por reacción con los aldehídos obtenidos por la oxidación de DAT. Por lo tanto, se logró una columna de afinidad cromatográfica para los estudios de separación, enriquecimiento o unión de lectinas específicas de manosa [55]. Más recientemente Tetala y colaboradores utilizaron DAT para la preparación de una columna cromatográfica basada en poli(hidroxietil)metacrilato (p-HEMA). Los GF aldehído obtenidos luego de la oxidación con periodato fueron modificados con ácido iminodiacético formando una base de Schiff, y luego, los grupos ácidos obtenidos se utilizaron para acomplejar cobre en el soporte cromatográfico. En dicha referencia bibliográfica, no se hace mención al efecto de la ruptura de los entrecruzamientos en las propiedades mecánicas o porosidad de la matriz [56]. En

todos los casos se trató de soportes rígidos, con alto grado de entrecruzamiento y no de hidrogeles blandos (*soft hydrogels*).

1.2 - NANOGELES Y MICROGELES.

Los nanogeles son redes poliméricas hidrofílicas de tamaños nanométricos. La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) recomienda considerar nanopartículas a aquellas que tengan diámetros menores a 100 nm. Sin embargo, dada la extensión de las propiedades nanométricas en algunos nanogeles de tamaños mayores, la denominación “nanogel” es frecuentemente aplicada a geles de diámetros de hasta 500 nm [57], [58].

Al igual que en macrogeles, existen nanogeles inteligentes que son capaces de sensar cambios en su estructura o su entorno, y responder con un propósito determinado. Tanto su tamaño nanométrico como su capacidad de accionar frente a cambios en el entorno, ha colocado a estos materiales en la mira del desarrollo científico tecnológico en diversas áreas de aplicación como en catálisis, liberación controlada de bioactivos (de interés farmacológico, nutricional, entre otros), ingeniería de tejidos, mejora de las propiedades en materiales macrométricos, lentes y sensores ópticos, actuadores, separación de proteínas, membranas, entre otros [59]–[61].

1.2.1 - NANOGELES TERMOSENSIBLES

Al igual que en macrogeles, los NGs termosensibles son los más ampliamente estudiados entre los NGs inteligentes. De manera análoga, estos NGs tienen la capacidad de colapsar o hincharse en respuesta a cambios en la temperatura del solvente en el que están dispersos, por lo que su utilización es prometedora en diversas áreas como las mencionadas anteriormente [62]. El sector de mayor desarrollo se enfoca en el cargado y liberación controlada de fármacos, principalmente orientada a tratamientos oncológicos. Entre los diferentes polímeros termosensibles, p-NIPAm ha sido el más estudiado, tanto en el área de macrogeles como en NGs, debido a su temperatura de transición (T_{tf}) cercana a la corporal. Como se mencionó anteriormente, esta temperatura puede ser modificada

mediante la incorporación de distintos comonómeros. En general, la utilización de comonómeros hidrofóbicos disminuye la T_{tf} de los nanogeles mientras que la utilización de un comonómero hidrofílico la aumenta. De esta manera se puede controlar la temperatura de transición según la necesidad de la aplicación en desarrollo [63].

1.2.2 - SÍNTESIS DE NANOGELES

Los nanogeles pueden ser sintetizados de diversas maneras, utilizando muchas de las estrategias de polimerización que se usan en la macroescala. Los precursores pueden ser tanto de origen natural como sintético, y las estrategias de síntesis se basan en la unión o entrecruzamiento de cadenas poliméricas u oligoméricas pre-existentes o la polimerización y entrecruzamiento de unidades monoméricas. Los entrecruzamientos pueden ser covalentes o físicos, o una combinación de ambos.

A diferencia de lo que ocurre en macrogeles, la síntesis de nanogeles requiere de metodologías que permitan tener un buen control del tamaño de los productos. Existen dos enfoques principales para la creación de nanogeles a escala nanométrica: el enfoque *top-down*, generando NPs desde partículas más grandes (ej. mediante fotolitografía); y el enfoque *bottom-up*, en el que la escala nanométrica se controla diseñando el ensamblaje de estructuras y conjuntos moleculares que son luego entrecruzados con enlaces covalentes o físicos. Esta última es la técnica más conveniente y comúnmente usada [58].

La mayoría de las síntesis de NGs poliméricos reportadas se realizan a través de polimerizaciones radicalarias, ya que la polimerización directa de los monómeros es un proceso en un solo paso (*one-pot*) que no requiere de síntesis previa del pre-polímero y posterior paso de entrecruzamiento. Se han desarrollado diversas estrategias para el control de los tamaños, como se muestra en la Tabla 1 [58], [64].

Tabla 1 - Estrategias de síntesis de nanogeles a través de polimerización radicalaria más utilizadas. Se mencionan algunas características generales, ventajas y desventajas.

Técnica	Detalles	Ventajas	Limitaciones
Miniemulsión	Formación de nanogotas por extrema agitación (ultrasonicación) de la mezcla de monómeros y surfactantes	Baja polidispersidad con diámetros entre 50-500 nm Permite encapsulamiento <i>in situ</i>	Necesita de un co-estabilizador. Necesidad de un equipamiento especial (ultrasonicador)
Microemulsión	Se usa un surfactante para la formación de micelas que encapsulan inicialmente a los monómeros	Se obtienen nanogeles con tamaños entre 10 y 150 nm. No se necesita extrema agitación	Necesidad de surfactante (alta concentración) y co-surfactante
Dispersión	Todos los reactivos son solubles inicialmente y la polimerización ocurre en fase homogénea. Los polímeros formados son insolubles y forman una dispersión estable con ayuda de estabilizadores.	Síntesis tipo <i>batch</i> . Tamaño ajustado por la concentración de monómero respecto de dispersante. Útil para partículas <i>core-shell</i>	Utilizado únicamente con monómeros vinílicos
Precipitación	Tanto los monómeros como los polímeros formados son solubles en el medio de reacción. Pero las partículas precipitan por formación de entrecruzamientos	Síntesis tipo <i>batch</i> . No se requieren surfactantes. El tamaño de partícula es ajustado con la concentración de monómeros en el rango de 100 - 600 nm	Frecuentemente el producto formado es de morfología irregular y alta polidispersidad.

SÍNTESIS DE NGs TERMOSENSIBLES

La técnica más utilizada en la síntesis de NGs termosensibles, es la termoprecipitación. Ésta utiliza monómeros solubles en agua que al polimerizar generan polímeros insolubles cuando éstos se encuentran por encima de su LCST [65]. Inicialmente, todos los precursores (iniciador, monómeros y entrecruzantes) son disueltos en agua. A la temperatura de polimerización (50-70 °C) el iniciador (peroxídico, azo-compuesto o iniciador rédox) se descompone para producir radicales libres. De manera equivalente a lo descrito para macrogeles, los radicales producidos por el iniciador atacarán a los monómeros y entrecruzantes para dar lugar a adiciones radicalarias, generando cadenas poliméricas en crecimiento. Luego de alcanzar un determinado largo, estos polímeros dejan de ser solubles en el medio de reacción, por tratarse de polímeros termosensibles y encontrarse reaccionando a una temperatura mayor a su LCST (por ejemplo, la reacción es llevada a cabo a 70 °C, mientras p-NIPAm no es soluble por encima de 32 °C). Las partículas insolubles formadas, se encuentran dispersas en la solución y son llamadas partículas precursoras (ver Figura 1.15). Estas pueden crecer para aumentar su tamaño mediante (a) agregación con otras partículas para formar partículas más grandes que sean coloidalmente más estables; (b) depositarse en la superficie de otra partícula existente; y (c) crecer por adición de monómeros y oligómeros. Una vez que las partículas alcanzan un tamaño crítico, se estabilizan coloidalmente al alcanzar un balance entre repulsión y atracción electrostática. La carga originada por los fragmentos de iniciador incorporados (grupos sulfato) tiene un rol fundamental en dicha estabilización y por ende, en el tamaño final de los nanogeles [66]. En ocasiones se utilizan surfactantes, los cuales tienen un marcado efecto en la estabilización coloidal. Éstos, permiten estabilizar de manera temprana a las partículas precursoras y disminuyen la tensión interfacial, obteniendo partículas más pequeñas que las obtenidas en su ausencia [59].

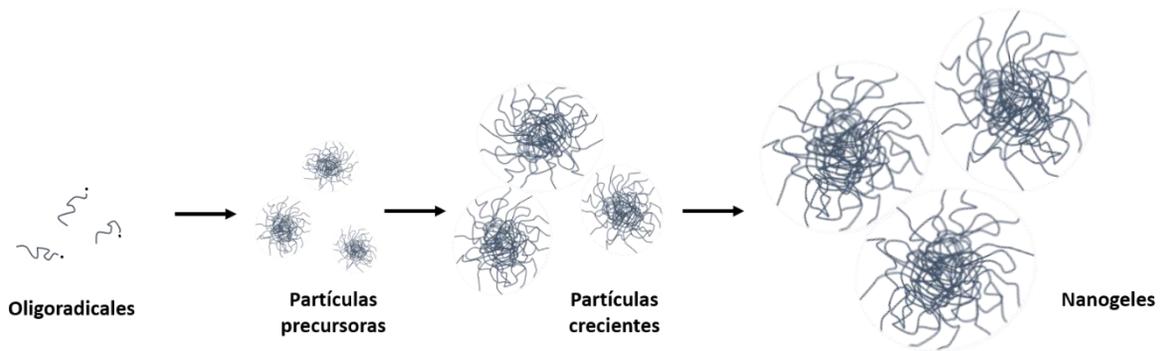


Figura 1.15 - Esquema de la formación de NGs termosensibles mediante termoprecipitación.

1.2.3 - PROPIEDADES DE NANOGELES Y SU CARACTERIZACIÓN

TAMAÑO, MORFOLOGÍA Y CAPACIDAD DE HINCHAMIENTO

Los nanogeles y microgeles pueden tener dimensiones entre 50 nm a 10 μm . Existen diversas técnicas utilizadas para la caracterización de los tamaños de partícula.

Dispersión dinámica de luz (DLS): es la técnica más frecuentemente usada, debido a su accesibilidad y a que da información sobre el tamaño, polidispersidad y estabilidad de las partículas en solución. La técnica determina el diámetro hidrodinámico de los nanogeles en solución, por lo que es influenciada por las cadenas pendientes en la superficie del polímero.

Medida de potencial zeta: permite medir la carga superficial de las nanopartículas.

Microscopías electrónicas: tanto la microscopía electrónica de transmisión (TEM) como la de barrido (SEM) permiten analizar la morfología, polidispersidad y tamaños de los nanogeles. En los últimos años, la técnica de TEM criogénico (cryo-TEM) se ha utilizado para observar las características mencionadas, en NGs congelados criogénicamente, para mantener una estructura equivalente a la que presentan en solución.

PARÁMETROS ESTRUCTURALES Y PROPIEDADES MECÁNICAS

Se ha demostrado que la estructura interna de los microgeles y nanogeles puede contener inhomogeneidades en el grado de entrecruzamiento o funcionalidad a lo largo de la partícula. Esta característica resulta más notoria en partículas de tipo *core-shell* o en partículas huecas, pero también se encuentra en otros micro/nanogeles.

La caracterización de estas inhomogeneidades estructurales es llevada a cabo mediante diversas estrategias como la dispersión estática de luz, de neutrones o de rayos X. Éstas, permiten obtener perfiles de densidad de la estructura de la nanopartícula en el espacio.

Por otro lado, la microscopía de fuerza atómica (AFM) incorpora técnicas particularmente útiles en la determinación de la morfología de las partículas (dimensiones) y en su comportamiento frente a deformaciones mecánicas. De manera análoga a lo descrito en macrogeles, las propiedades mecánicas de los nanogeles pueden ser determinadas mediante la aplicación de una fuerza de deformación y la medida de la respuesta mecánica de la nanopartícula. Este ensayo se realiza mediante un equipo de AFM usando la técnica conocida como nanoindentación [67].

1.2.4 - MODIFICACIÓN POST-SÍNTESIS DE NANOGELES - FUNCIONALIZACIÓN

Al igual que en macrogeles, en muchas ocasiones las características requeridas en los nanogeles, tanto estructurales como de funcionalización, no son alcanzadas durante la síntesis. En particular, las técnicas de síntesis de NGs, por su necesidad del control de tamaño, estructura y polidispersidad, implican un mayor número de limitaciones en la diversidad de precursores a utilizar. La directa incorporación de algunas moléculas o grupos funcionales durante la síntesis se ve impedida por factores como la inestabilidad térmica (por ejemplo, al requerir inmovilizar una proteína) o reactividad indeseada en las condiciones de reacción utilizadas (por ejemplo, la reactividad de radicales con el carbonilo de un aldehído). Además, la diferencia de reactividad entre los distintos monómeros puede producir que, durante la síntesis, los GF a introducir no se localicen en la región de interés. Por todo esto, generalmente se recurre a la síntesis de los nanogeles en condiciones

controladas para luego realizar modificaciones post-síntesis que permitan introducir los GF deseados [59].

1.3 - EL DESAFÍO DEL CONTROL DE LA ESTRUCTURA Y FUNCIONALIZACIÓN

La aplicación de los hidrogeles en sistemas complejos, como los biológicos, requiere de la superación de las barreras impuestas por los métodos tradicionales de síntesis, para lograr estructuras más controladas y funcionales tanto en la macro como en la micro o nanoescala. Debido a esto, numerosos trabajos recientes se orientan a la obtención de macrogeles con enlaces covalentes dinámicos, formación de geles con comportamiento sol-gel, propiedades de autocurado y/o memoria de forma y gelación bajo condiciones fisiológicas con mínima toxicidad.

En el caso de nanogeles, existen novedosos reportes sobre el control de la nanoestructura y su impacto en la funcionalidad del material [64]. Se han desarrollado materiales con estructuras tipo *core-shell*, huecas, huecas con doble capa, entre otras. Como se mencionó anteriormente, la funcionalización post-síntesis es un requisito indispensable para la obtención de nanogeles funcionales por lo que es necesario generar nuevas estrategias para obtener modificaciones cuantitativas y preferentemente realizables en condiciones fisiológicas y con toxicidad mínima.

Considerando estos desafíos, en este trabajo de Tesis se propuso el desarrollo de nuevas metodologías de síntesis y modificación post-síntesis de hidrogeles en la macro y nanoescala. Estas estrategias se centran en la utilización del agente entrecruzante *N,N'*-dialiltartardiamida (DAT) (descrito en la Sección 1.1.5 de este capítulo), y su clivaje oxidativo post-síntesis, para obtener mayor control sobre: la morfología de los materiales; su estructura; el tipo y grado de entrecruzamiento; y, por ende, de sus propiedades. Además, permitirían también la funcionalización de los hidrogeles con grupos funcionales α -oxoaldehídos, abriendo la posibilidad de que participen en reacciones consideradas (bio)ortogonales.

1.4 - REFERENCIAS

- [1] N. A. Peppas, P. Buresa, W. Leobandunga, and H. Ichikawa, "Hydrogels in pharmaceutical formulations," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 50, pp. 27–46, 2000.
- [2] F. Ullah, M. B. H. Othman, F. Javed, Z. Ahmad, and H. M. Akil, "Classification, processing and application of hydrogels: A review," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 57, pp. 414–433, 2015.
- [3] M. R. Guilherme, F. A. Aouada, A. R. Fajardo, A. F. Martins, A. T. Paulino, M. F. T. Davi, A. F. Rubira, and E. C. Muniz, "Superabsorbent hydrogels based on polysaccharides for application in agriculture as soil conditioner and nutrient carrier: A review," *Eur. Polym. J.*, vol. 72, pp. 365–385, 2015.
- [4] D. Buenger, F. Topuz, and J. Groll, "Hydrogels in sensing applications," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 37, no. 12, pp. 1678–1719, 2012.
- [5] M. R. Romero, A. Wolfel, and C. I. A. Igarzabal, "Smart valve: Polymer actuator to moisture soil control," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 234, pp. 53–62, 2016.
- [6] M. Mahinroosta, Z. Jomeh Farsangi, A. Allahverdi, and Z. Shakoory, "Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications," *Mater. Today Chem.*, vol. 8, pp. 42–55, 2018.
- [7] K. Varaprasad, G. M. Raghavendra, T. Jayaramudu, M. M. Yallapu, and R. Sadiku, "A mini review on hydrogels classification and recent developments in miscellaneous applications," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 79, pp. 958–971, 2017.
- [8] S. Kamila, "Introduction, Classification and Applications of Smart Materials: an Overview," *Am. J. Appl. Sci.*, vol. 10, no. 8, pp. 876–880, Aug. 2013.
- [9] A. P. and S. K. M. Shweta Sharma, *Hydrogels From simple networks to smart materials—advances and applications*. Elsevier Inc., 2018.
- [10] I. Willner, "Stimuli-Controlled Hydrogels and Their Applications," *Acc. Chem. Res.*, vol. 50, no. 4, pp. 657–658, 2017.
- [11] C. Löwenberg, M. Balk, C. Wischke, M. Behl, and A. Lendlein, "Shape-Memory Hydrogels: Evolution of Structural Principles To Enable Shape Switching of Hydrophilic Polymer Networks," *Acc. Chem. Res.*, vol. 50, no. 4, pp. 723–732, 2017.
- [12] C. Gong, T. Qi, X. Wei, Y. Qu, Q. Wu, F. Luo, and Z. Qian, "Thermosensitive Polymeric Hydrogels As Drug Delivery Systems," *Curr. Med. Chem.*, vol. 20, no. 1, pp. 79–94, 2012.
- [13] B. Jeong, S. W. Kim, and Y. H. Bae, "Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, no. SUPPL., pp. 154–162, Dec. 2012.
- [14] S. Lanzalaco and E. Armelin, "Poly(N-isopropylacrylamide) and Copolymers: A Review on Recent Progresses in Biomedical Applications," *Gels*, vol. 3, no. 4, p. 36, 2017.
- [15] "Imines," *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*, vol. 2. p. 2957, 2014.
- [16] M. E. Belowich and J. F. Stoddart, "Dynamic imine chemistry," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 6, p. 2003, 2012.

- [17] N. Boehnke, C. Cam, E. Bat, T. Segura, and H. D. Maynard, "Imine hydrogels with tunable degradability for tissue engineering," *Biomacromolecules*, vol. 16, no. 7, pp. 2101–2108, 2015.
- [18] Y. Zhang, L. Tao, S. Li, and Y. Wei, "Synthesis of multiresponsive and dynamic chitosan-based hydrogels for controlled release of bioactive molecules," *Biomacromolecules*, vol. 12, no. 8, pp. 2894–2901, 2011.
- [19] H. Xiao, W. Lu, X. Le, C. Ma, Z. Li, J. Zheng, J. Zhang, Y. Huang, and T. Chen, "A multi-responsive hydrogel with a triple shape memory effect based on reversible switches," *Chem. Commun.*, vol. 52, no. 90, pp. 13292–13295, 2016.
- [20] B. Gupta, M. Tummalapalli, B. L. Deopura, and M. S. Alam, "Preparation and characterization of in-situ crosslinked pectin-gelatin hydrogels," *Carbohydr. Polym.*, vol. 106, no. 1, pp. 312–318, 2014.
- [21] D. K. Kölmel and E. T. Kool, "Oximes and Hydrazones in Bioconjugation: Mechanism and Catalysis," *Chem. Rev.*, vol. 117, no. 15, pp. 10358–10376, 2017.
- [22] C. Godoy-Alcántar, A. K. Yatsimirsky, and J. M. Lehn, "Structure-stability correlations for imine formation in aqueous solution," *J. Phys. Org. Chem.*, vol. 18, no. 10, pp. 979–985, 2005.
- [23] J. Kalia and R. T. Raines, "Hydrolytic stability of hydrazones and oximes," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 47, no. 39, pp. 7523–7526, 2008.
- [24] Y. Zeng, T. N. C. Ramya, A. Dirksen, P. E. Dawson, and J. C. Paulson, "High-efficiency labeling of sialylated glycoproteins on living cells," *Nat. Methods*, vol. 6, no. 3, pp. 207–209, 2009.
- [25] H. An, K. Xu, L. Chang, Y. Wang, J. Qin, and W. Li, "Thermo-responsive self-healable hydrogels with extremely mild base degradability and bio-compatibility," *Polym. (United Kingdom)*, vol. 147, pp. 38–47, 2018.
- [26] S. J. Sonawane, R. S. Kalhapure, and T. Govender, "Hydrazone linkages in pH responsive drug delivery systems," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 99, pp. 45–65, 2017.
- [27] B. Zang, J. Ren, L. Xu, and L. Jia, "Direct site-specific immobilization of protein A via aldehyde-hydrazide conjugation," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1008, pp. 132–138, 2016.
- [28] H. T. Le, J. G. Jang, J. Y. Park, C. W. Lim, and T. W. Kim, "Antibody functionalization with a dual reactive hydrazide/click crosslinker," *Anal. Biochem.*, vol. 435, no. 1, pp. 68–73, 2013.
- [29] J. M. Priegue, I. Lostalé-Seijo, D. Crisan, J. R. Granja, F. Fernández-Trillo, and J. Montenegro, "Different-Length Hydrazone Activated Polymers for Plasmid DNA Condensation and Cellular Transfection," *Biomacromolecules*, vol. 19, no. 7, pp. 2638–2649, 2018.
- [30] Z. Wei, J. H. Yang, Z. Q. Liu, F. Xu, J. X. Zhou, M. Zrínyi, Y. Osada, and Y. M. Chen, "Novel biocompatible polysaccharide-based self-healing hydrogel," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 25, no. 9, pp. 1352–1359, 2015.
- [31] S. Mukherjee, M. R. Hill, and B. S. Sumerlin, "Self-healing hydrogels containing reversible oxime crosslinks," *Soft Matter*, vol. 11, no. 30, pp. 6152–6161, 2015.

- [32] S. Ito, M. Hashimoto, B. Wadgaonkar, N. Svizero, R. M. Carvalho, C. Yiu, F. A. Rueggeberg, S. Foulger, T. Saito, Y. Nishitani, M. Yoshiyama, F. R. Tay, and D. H. Pashley, "Effects of resin hydrophilicity on water sorption and changes in modulus of elasticity," *Biomaterials*, vol. 26, no. 33, pp. 6449–6459, 2005.
- [33] S. Abdurrahmanoglu, V. Can, and O. Okay, "Design of high-toughness polyacrylamide hydrogels by hydrophobic modification," *Polymer (Guildf)*, vol. 50, no. 23, pp. 5449–5455, 2009.
- [34] X. Q. Guo, K. Y. Qiu, and X. De Feng, "Studies on the kinetics and initiation mechanism of acrylamide polymerization using the persulfate/aliphatic diamine system as initiator," *Macromol. Chem. Phys.*, vol. 191, pp. 577–587, 1990.
- [35] L. Brannon-Peppas and N. A. Peppas, "Equilibrium swelling behavior of pH-sensitive hydrogels," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 46, no. 3, pp. 715–722, 1991.
- [36] A. Vedadghavami, F. Minooei, M. H. Mohammadi, S. Khetani, A. Rezaei Kolahchi, S. Mashayekhan, and A. Sanati-Nezhad, "Manufacturing of hydrogel biomaterials with controlled mechanical properties for tissue engineering applications," *Acta Biomater.*, vol. 62, pp. 42–63, 2017.
- [37] C. J. Hawker and K. L. Wooley, "The convergence of synthetic organic and polymer chemistries," *Science (80-.)*, vol. 309, no. 5738, pp. 1200–1205, 2005.
- [38] M. Gauthier, M. Gibson, and H.-A. Klok, "Synthesis of Functional Polymers by Post-Polymerization Modification," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 48, no. 1, pp. 48–58, 2009.
- [39] P. J. Roth, K. T. Wiss, and P. Theato, *Post-Polymerization Modification*, vol. 5. Elsevier B.V., 2012.
- [40] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Third edit. Waltham: Elsevier, 2013.
- [41] K. L. Christman and H. D. Maynard, "Protein micropatterns using a pH-responsive polymer and light," *Langmuir*, vol. 21, no. 18, pp. 8389–8393, 2005.
- [42] C. Legros, M. C. De Pauw-Gillet, K. C. Tam, S. Lecommandoux, and D. Taton, "Aldehyde-functional copolymers based on poly(2-oxazoline) for post-polymerization modification," *Eur. Polym. J.*, vol. 62, pp. 322–330, 2015.
- [43] N. M. B. Smeets, J. Meuldijk, J. P. a. Heuts, and A. C. J. Koeken, "Facile and selective synthesis of aldehyde end-functionalized polymers using a combination of catalytic chain transfer and rhodium catalyzed hydroformylation," *Polym. Chem.*, vol. 1, no. 7, p. 1102, 2010.
- [44] R. C. Li, R. M. Broyer, and H. D. Maynard, "Well-defined polymers with acetal side chains as reactive scaffolds synthesized by atom transfer radical polymerization," *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 44, no. 17, pp. 5004–5013, Sep. 2006.
- [45] G. Dryhurst, *Periodate Oxidation of Diol and Other Functional Groups*. Elsevier, 1970.
- [46] J. Maia, L. Ferreira, R. Carvalho, M. A. Ramos, and M. H. Gil, "Synthesis and characterization of new injectable and degradable dextran-based hydrogels," *Polymer (Guildf)*, vol. 46, no. 23, pp. 9604–9614, 2005.

- [47] B. Gupta, M. Tummalapalli, B. L. Deopura, and M. S. Alam, "Functionalization of pectin by periodate oxidation," *Carbohydr. Polym.*, vol. 98, no. 1, pp. 1160–1165, 2013.
- [48] Y. C. Chen, W. Y. Su, S. H. Yang, A. Gefen, and F. H. Lin, "In situ forming hydrogels composed of oxidized high molecular weight hyaluronic acid and gelatin for nucleus pulposus regeneration," *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 2, pp. 5181–5193, 2013.
- [49] P. R. Sarika, P. R. Anil Kumar, D. K. Raj, and N. R. James, "Nanogels based on alginic aldehyde and gelatin by inverse miniemulsion technique: Synthesis and characterization," *Carbohydr. Polym.*, vol. 119, pp. 118–125, 2015.
- [50] O. Melnyk, "α - Oxo Aldehyde or Glyoxylyl Group Chemistry in Peptide Bioconjugation Ouafa a," 2013.
- [51] R. J. Spears and M. A. Fascione, "Site-selective incorporation and ligation of protein aldehydes," *Org. Biomol. Chem.*, vol. 14, no. 32, pp. 7622–7638, 2016.
- [52] O. Melnyk and C. Grandjean, "Tartric Acid-Based Linker for the Solid-Phase Synthesis of C-Terminal Peptide r -Oxo Aldehydes," no. 12, pp. 4153–4160, 2001.
- [53] P. Chenevier, L. Bourel-Bonnet, and D. Roux, "Chemical Characterization of ??-Oxohydrazone Ligation on Colloids: Toward Grafting Molecular Addresses onto Biological Vectors," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 52, pp. 16261–16270, 2003.
- [54] O. Kornýšova, R. Jarmalavičiene, and A. Maruška, "A simplified synthesis of polymeric nonparticulate stationary phases with macrocyclic antibiotic as chiral selector for capillary electrochromatography," *Electrophoresis*, vol. 25, no. 16, pp. 2825–2829, 2004.
- [55] K. K. R. Tetala, B. Chen, G. M. Visser, A. Maruška, O. Kornýšova, T. A. van Beek, and E. J. R. Sudhölter, "Preparation of a monolithic capillary column with immobilized α-mannose for affinity chromatography of lectins," *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 70, no. 1, pp. 63–69, 2007.
- [56] A. Khaparde, M. A. Vijayalakshmi, and K. K. R. Tetala, "Preparation and characterization of a Cu (II)-IDA poly HEMA monolith syringe for proteomic applications," *Electrophoresis*, vol. 38, no. 22–23, pp. 2981–2984, 2017.
- [57] J. V. Alemán, A. V. Chadwick, J. He, M. Hess, K. Horie, R. G. Jones, P. Kratochvíl, I. Meisel, I. Mita, G. Moad, S. Penczek, and R. F. T. Stepto, "Definitions of terms relating to the structure and processing of sols, gels, networks, and inorganic-organic hybrid materials (IUPAC Recommendations 2007)," *Pure Appl. Chem.*, vol. 79, no. 10, pp. 1801–1829, 2007.
- [58] I. Neamtu, A. G. Rusu, A. Diaconu, L. E. Nita, and A. P. Chiriac, "Basic concepts and recent advances in nanogels as carriers for medical applications," *Drug Deliv.*, vol. 24, no. 1, pp. 539–557, 2017.
- [59] A. Pich and W. Richtering, *Polymer Nanogels and Microgels*, vol. 6. Elsevier B.V., 2012.
- [60] E. Dickinson, "Microgels - An alternative colloidal ingredient for stabilization of food emulsions," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 43, no. 2, pp. 178–188, 2015.
- [61] M. Barth, M. Wiese, W. Ogieglo, D. Go, A. J. C. Kuehne, and M. Wessling, "Monolayer microgel composite membranes with tunable permeability," *J. Memb. Sci.*, vol. 555, pp. 473–482, 2018.

- [62] R. Pelton, "Temperature-sensitive aqueous microgels," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 85, no. 1, pp. 1–33, 2000.
- [63] M. Karbarz, M. Mackiewicz, K. Kaniewska, K. Marcisz, and Z. Stojek, "Recent developments in design and functionalization of micro- and nanostructural environmentally-sensitive hydrogels based on N-isopropylacrylamide," *Applied Materials Today*, vol. 9, pp. 516–532, 2017.
- [64] S. Khoee and H. Asadi, "Nanogels: Chemical Approaches to Preparation," *Encycl. Biomed. Polym. Polym. Biomater.*, no. July, pp. 5266–5293, 2016.
- [65] N. Sanson and J. Rieger, "Synthesis of nanogels/microgels by conventional and controlled radical crosslinking copolymerization," *Polym. Chem.*, vol. 1, no. 7, pp. 965–977, 2010.
- [66] O. L. J. Virtanen, M. Brugnoli, M. Kather, A. Pich, and W. Richtering, "The next step in precipitation polymerization of: N -isopropylacrylamide: Particle number density control by monochain globule surface charge modulation," *Polym. Chem.*, vol. 7, no. 32, pp. 5123–5131, 2016.
- [67] O. Tagit, N. Tomczak, and G. J. Vancso, "Probing the morphology and nanoscale mechanics of single poly(N-isopropylacrylamide) microgels across the lower-critical-solution temperature by atomic force microscopy," *Small*, vol. 4, no. 1, pp. 119–126, 2008.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS GENERALES

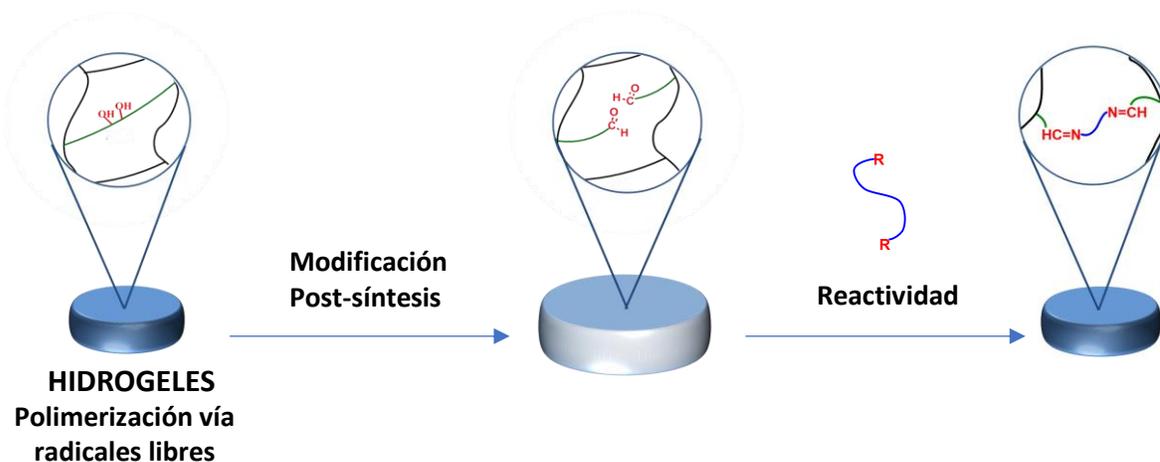
OBJETIVOS GENERALES

En este trabajo de tesis, se propuso el estudio y desarrollo de nuevas estrategias de síntesis y modificación post-síntesis de hidrogeles, orientadas al control de su estructura, propiedades mecánicas, propiedades de hinchamiento y funcionalidad química. Para ello, se propusieron los siguientes objetivos:

- Estudiar la incorporación del agente entrecruzante (+)-N,N'-dialiltartradiamida (DAT) en la síntesis de hidrogeles de diversa composición química, y evaluar su efecto en las propiedades de hinchamiento y mecánicas del material.
- Analizar la modificación post-síntesis de los hidrogeles, mediante la ruptura oxidativa del diol vecinal presente en el entrecruzante DAT, a partir de su reacción con soluciones de periodato de sodio. Evaluar su utilización como una estrategia efectiva para el control de la estructura, propiedades mecánicas, propiedades de hinchamiento y funcionalidad química de los hidrogeles.
- Evaluar la aplicación del clivaje oxidativo de DAT como una metodología sencilla para obtener grupos funcionales aldehídos en hidrogeles, superando las dificultades que presenta la incorporación de estos GF en hidrogeles sintetizados mediante polimerización radicalaria. Ensayar la reactividad, de los grupos funcionales (GF) obtenidos, frente a aminoderivados.

- Evaluar la utilización de las estrategias desarrolladas previamente en macrogeles, para su aplicación en la síntesis y modificación post-síntesis de nanogeles inteligentes, orientada a obtener mayor control de su estructura y funcionalidad. Analizar sus posibles aplicaciones.

SÍNTESIS Y MODIFICACIÓN POST-SÍNTESIS DE HIDROGELES DE ACRILAMIDA



En este capítulo se describe la incorporación del agente entrecruzante DAT en la formación de hidrogeles de poli(acrilamida). Dicho entrecruzante posee un diol vecinal en su estructura, el cual permite el control post-síntesis del grado de entrecruzamiento y la funcionalización de los hidrogeles.

3.1 - CONSIDERACIONES GENERALES

HIDROGELES DE ACRILAMIDA

La poli(acrilamida) (p-AM) es un polímero obtenido por la polimerización a radicales libres del monómero acrilamida. Este polímero hidrofílico e hidrosoluble es ampliamente utilizado en diversas aplicaciones como: espesante [1]; en el floculado de sólidos en una solución [2], con aplicaciones en el tratamiento de aguas residuales [3]; en la fabricación de papel, como retentivo o como aditivo de resistencia [4]; en la recuperación mejorada del petróleo (*Enhanced Oil Recovery*, EOR) [5]; entre otras. Además, la p-AM es frecuentemente copolimerizada junto a otros monómeros, y/o entrecruzada para la formación de HGs de p-AM. Generalmente, estas redes altamente hidrofílicas son generadas mediante la utilización de un agente entrecruzante divinílico durante la polimerización, siendo *N,N'*-metilenbis(acrilamida) (BIS) el más utilizado. Otra estrategia, implica el entrecruzamiento, post-síntesis, de polímeros lineales de acrilamida.

Los HGs de p-AM son utilizados en diversas áreas. A gran escala, p-AM se usa para el desarrollo de geles superabsorbentes. En este caso, el polímero es frecuentemente copolimerizado con acrilato de sodio y entrecruzado para formar redes con enorme capacidad de absorción de agua (superando valores de hasta 300 veces su propio peso). Estos polímeros se utilizan en agricultura, para la mejora de las propiedades de los suelos generando un aumento en la retención de agua, mejoras en la porosidad y aireación, limitando la erosión y permitiendo liberar nutrientes de manera controlada [6]. Por otro lado, los HGs de p-AM son utilizados en la recuperación mejorada del petróleo [7], en la remoción de metales pesados en agua [8], en la liberación de agentes para el control de plagas [9] y en la síntesis de geles de electroforesis aplicados a la separación de macromoléculas biológicas [10].

A menor escala y en áreas más especializadas, estos HGs se utilizan en el desarrollo de plataformas de cultivo celular [11] y su aplicación en medicina regenerativa [12], en la preparación de soportes cromatográficos para separación por tamaños o por afinidad [13],

encontrándose además numerosas investigaciones en torno al desarrollo de nuevas aplicaciones tecnológicas como: la generación de H₂ a partir de NaBH₄ mediada por la interacción de los geles con metales de transición [14], remoción de toxinas en vinos y otros alimentos [15], remoción de metales pesados y contaminantes orgánicos [8], [16], [17], degradación fotoquímica de contaminantes catalizada por nanopartículas (NPs) de TiO₂ en matrices de p-AM [18] o en la remoción de contaminantes para el cuidado de obras de arte del patrimonio cultural humano [19].

CONTROL DEL GRADO DE ENTRECruzAMIENTO

El control de la cantidad de entrecruzamientos en un hidrogel es de gran importancia ya que afecta directamente a las propiedades del material: su morfología, su capacidad de hinchamiento, su porosidad y sus propiedades mecánicas. Debido a esto, numerosas estrategias son utilizadas para el control de la cantidad, naturaleza y distribución espacial de los puntos de entrecruzamiento en los hidrogeles. En el caso de geles de acrilamida, el control del grado de entrecruzamiento depende de la estrategia de síntesis del hidrogel. En mayor medida, los geles son obtenidos por la polimerización radicalaria del monómero acrilamida junto a agentes entrecruzantes divinílicos [20]. Por otro lado, polímeros lineales de acrilamida, que pueden ser adquiridos comercialmente, pueden ser entrecruzados en presencia de agentes entrecruzantes de bajo peso molecular en condiciones experimentales específicas [21]. En ambos casos, el grado de entrecruzamiento es controlado mediante la cantidad de agente entrecruzante utilizado en la síntesis del gel, considerando también condiciones como la concentración de la solución y la reactividad del entrecruzante, frecuentemente afectada por las condiciones de reacción (pH, temperatura, etc.) [22]–[24]. El entrecruzamiento de los hidrogeles es crucial en la determinación de las propiedades finales del material, por lo que numerosos trabajos se han publicado orientados a su control en geles de p-AM [25], [26]. Además, se han desarrollado materiales inteligentes de p-AM donde los entrecruzamientos juegan un rol primordial en la sensibilidad al estímulo externo y/o en la respuesta del material. Como ejemplo, se puede citar la utilización de biomoléculas como agentes entrecruzantes, capaces de reconocer de

manera específica a determinados sustratos, cambiando el grado de entrecruzamiento del material, por ejemplo, en geles de p-AM entrecruzados con ADN [27], o con complejos antígeno-anticuerpo [28]. También puede encontrarse el uso de enlaces hidrazona para el control de la degradación de geles de p-AM y poli(aldehído guluronato) [29].

Por otro lado, el control post-síntesis del grado de entrecruzamiento permite la modificación a demanda de la estructura, del grado de hinchamiento, de la porosidad y de las propiedades mecánicas de los hidrogeles previamente sintetizados, características esenciales para su utilización en diversas aplicaciones. Por ende, la incorporación de agentes entrecruzantes susceptibles de ser modificados en etapas post-síntesis puede inferir, de manera estratégica, otorgando mayor versatilidad a un determinado material (pudiendo luego adaptar sus propiedades de acuerdo a las necesidades), o inclusive conferir propiedades inteligentes al hidrogel, como es el caso de los geles inteligentes de p-AM mencionados anteriormente.

En el trabajo propuesto en este capítulo, se prevé la utilización del agente entrecruzante divinílico (+)-*N,N'*-dialiltartradiamida (DAT) durante la síntesis, para su clivaje en etapas post-síntesis en presencia de periodato. Esta metodología, supone una novedosa estrategia que cuenta con escasos antecedentes semejantes, mencionados en el Capítulo 1 [30]–[32]. Sin embargo, no se encuentran reportes sobre la utilización de DAT en materiales blandos (*soft materials*) como hidrogeles y tampoco en la co-polimerización de acrilamida con dicho entrecruzante para el control post-síntesis del grado de entrecruzamiento.

OBTENCIÓN DE ALDEHÍDOS

La obtención de GF aldehídos en matrices poliméricas es de gran utilidad debido a la alta reactividad de este grupo funcional y su versatilidad para posteriores modificaciones químicas, ya sea para la obtención de nuevos grupos funcionales, la inmovilización de ligandos o biomoléculas, o la incorporación de enlaces covalentes reversibles (como imina, hidrazona, etc.). Como se mencionó en el Capítulo 1, la incorporación de GF aldehídos en polímeros obtenidos mediante síntesis radicalarias se ve dificultada por la incompatibilidad

con las condiciones de reacción. Por ello, se recurre a estrategias de síntesis y modificación post-síntesis [33], [34]. Habitualmente, se utilizan grupos protectores (GP), que preservan al GF aldehído durante la polimerización, y que luego son removidos en etapas posteriores.

En geles de acrilamida, se han descrito diversas estrategias para la obtención de grupos funcionales aldehído. Una de ellas, implicó la modificación de un aminoetil derivado de p-AM con gliceraldehído, mediante una aminación reductiva, y el posterior tratamiento con periodato del GF glicerol introducido, para obtener aldehídos. Éstos, se utilizaron para la inmovilización de proteínas mediante aminación reductiva [35]. En otro caso, geles de p-AM entrecruzados con BIS se sintetizaron mediante polimerización radicalaria en presencia del comonomero *N*-(5,6-di-*O*-isopropiliden)hexilacrilamida. Este último, contiene un grupo funcional acetal que condujo a la obtención de grupos funcionales aldehído luego de la desprotección con ácido trifluoroacético, y el tratamiento con periodato de sodio. La matriz de p-AM con GF aldehídos se utilizó para la inmovilización de ADN y la elaboración de *microchips* [36]. En dichos casos, la estrategia de síntesis precisó de la utilización de grupos protectores, de un gran número de pasos y condiciones experimentales drásticas para obtener los grupos funcionales aldehído. Finalmente, permitieron el desarrollo de aplicaciones de gran interés en el área de la bioconjugación. Si bien los geles de acrilamida son frecuentemente utilizados en numerosas aplicaciones biológicas como en geles de electroforesis, en la inmovilización de proteínas u otras biomoléculas para su utilización en soportes cromatográficos o en el desarrollo de plataformas de cultivos celulares, no se han encontrado reportes en torno a la de obtención de α -oxo-aldehídos en dichos materiales.

En este capítulo, la utilización del agente entrecruzante DAT (un portador de diol vecinal) en geles de AM prevé la obtención de α -oxo-aldehídos luego del tratamiento con periodato. Luego de su caracterización, se ensayó la reactividad de los grupos aldehído producidos, con dihidrazida de ácido adípico (AADH), permitiendo la obteniendo hidrogeles reticulados mediante enlaces hidrazona.

3.2 - OBJETIVOS

En este capítulo, se propone evaluar una nueva estrategia de síntesis y modificación post-síntesis de hidrogeles de acrilamida. Se propone analizar la incorporación del agente entrecruzante (+)-*N,N'*-dialiltartramida (DAT) en la síntesis de hidrogeles, y su posible modificación post-síntesis, para el control de la estructura y, por lo tanto, de las propiedades de los materiales. Además, se estudiará esta estrategia, como un posible método superador, para la incorporación de grupos funcionales aldehído en hidrogeles sintetizados por polimerización vía radicales libres. Para ello se plantearon los siguientes objetivos:

- Estudiar la incorporación del agente entrecruzante (+)-*N,N'*-dialiltartramida (DAT) en la síntesis radicalaria de hidrogeles blandos formados por el monómero acrilamida (AM) en combinación con el agente entrecruzante *N,N'*-metilenbis(acrilamida) (BIS).
- Analizar la composición química de los hidrogeles obtenidos y evaluar el efecto de los agentes entrecruzantes en las propiedades de hinchamiento y mecánicas de los geles (relación estructura-propiedad).
- Evaluar la modificación post-síntesis de los hidrogeles mediante el clivaje oxidativo del entrecruzante DAT, frente a periodato de sodio, para obtener grupos funcionales aldehído. Analizar el cambio en el grado de entrecruzamiento y composición química de los materiales, y su efecto en las propiedades mecánicas y de hinchamiento.
- Estudiar la reactividad de los grupos funcionales aldehído formados, frente a dihidrazida de ácido adípico (AADH).

3.3 - MATERIALES Y MÉTODOS

REACTIVOS

Los siguientes reactivos se usaron tal como se adquirieron: acrilamida (AM) (Fluka); *N, N'*-metilenbis(acrilamida) (BIS) (Sigma); (+) *N, N'*-dialiltartramida (DAT) (Sigma); *N, N, N', N'*-tetrametiletilendiamina (TEMED) (Sigma); persulfato de amonio (APS) (Anhedra); periodato de sodio (Sigma); etilenglicol (EG) (Anhedra); óxido de deuterio (Sigma); cloruro de amonio (Cicarelli); ácido acético glacial (Cicarelli); acetato de sodio (Anhedra) y dihidrazida de ácido adípico (AADH) (SIGMA). Las soluciones se prepararon con agua ultrapura ($18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$). Los monómeros y entrecruzantes utilizados se ilustran en la Figura 3.1.

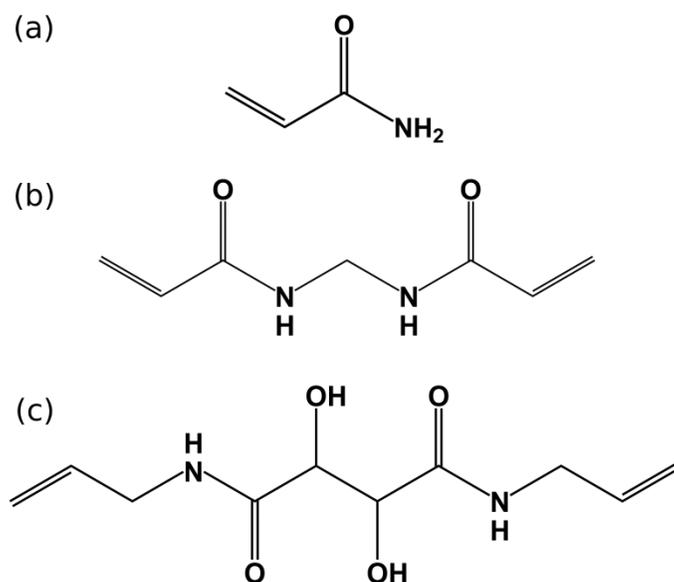


Figura 3.1 - Monómeros utilizados para preparar hidrogeles. (a) AM, (b) BIS y (c) DAT.

SÍNTESIS

Los hidrogeles se sintetizaron mediante polimerización por radicales libres. Para cada síntesis, las soluciones se prepararon disolviendo AM en 5 mL de agua ultrapura para alcanzar una concentración 1,4 M. Luego, se disolvieron BIS y/o DAT (agentes

entrecruzantes) y APS (iniciador) en las soluciones de AM usando un vial con un tapón de goma, en las proporciones que se muestran en Tabla 3.1. Las soluciones se enfriaron en un baño de hielo y se deoxigenaron con N₂ durante 10 min. Para iniciar la polimerización, se añadió una solución acuosa de TEMED (0,5 mL; 0,32 M) al vial. Inmediatamente, la solución completa se transfirió a una jeringa de plástico de 5 mL que se colocó en un baño termostático a 37 °C durante 18 h. Finalmente, los hidrogeles obtenidos se cortaron en discos de 3 mm de espesor y 12 mm de diámetro y se lavaron exhaustivamente con agua. Los productos se denominaron HG-1-7 como se muestra en la Tabla 1. Todas las síntesis se realizaron por triplicado.

Tabla 3.1 - Condiciones experimentales para la síntesis de hidrogeles.

HIDROGEL	MONÓMERO	ENTRECRUZANTE (%)*	INICIADOR (%)*
HG-1	AM (1,4 M – 5 mL)	BIS (5) - DAT (0)	APS (3,7) - TEMED** (1,4)
HG-2	AM (1,4 M – 5 mL)	BIS (5) - DAT (1)	APS (3,7) - TEMED (1,4)
HG-3	AM (1,4 M – 5 mL)	BIS (5) - DAT (3)	APS (3,7) - TEMED (1,4)
HG-4	AM (1,4 M – 5 mL)	BIS (5) - DAT (5)	APS (3,7) - TEMED (1,4)
HG-5	AM (1,4 M – 5 mL)	BIS (5) - DAT (7)	APS (3,7) - TEMED (1,4)
HG-6	AM (1,4 M – 5 mL)	BIS (5) - DAT (10)	APS (3,7) - TEMED (1,4)
HG-7	AM (1,4 M – 5 mL)	BIS (0) - DAT (10)	APS (3,7) - TEMED (1,4)

* Porcentaje molar respecto de moles de AM. ** Se utilizó 0,5 mL de solución 0,32 M de TEMED.

ESTUDIOS DE HINCHAMIENTO

Después de la síntesis, los discos de hidrogel se colocaron en agua durante más de 48 h y se pesaron para conocer su masa en el equilibrio de hinchamiento. Luego, se secaron en un horno a 37 °C hasta peso constante (≈ 80 mg). El porcentaje de hinchamiento en el equilibrio (%ESR) se calculó de acuerdo con la Ecuación 3.1:

$$\%ESR = \frac{[m_e - m_d]}{m_d} \times 100 \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

Donde m_e es la masa de la muestra en el equilibrio de hinchamiento y m_d es la masa seca.

El hidrogel se pesó usando una balanza Mettler Toledo (Nueva MF clásica, modelo MS204S, precisión de 0,1 mg). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

RUPTURA DE ENTRECruzAMIENTOS DE HIDROGELES CON PERIODATO

Los moles de periodato (n_{NaIO_4}) necesarios para la ruptura completa de entrecruzamientos producidos por DAT en una muestra de hidrogel, se estimaron a partir de los moles de DAT, BIS, AM y APS utilizadas en la síntesis y la masa de cada disco de hidrogel seco (m_d) según la Ecuación 3.2:

$$n_{\text{NaIO}_4} = \left[\frac{(n_{\text{DAT}} \cdot \text{Mw}_{\text{DAT}})}{(n_{\text{DAT}} \cdot \text{Mw}_{\text{DAT}} + n_{\text{BIS}} \cdot \text{Mw}_{\text{BIS}} + n_{\text{AM}} \cdot \text{Mw}_{\text{AM}} + n_{\text{APS}} \cdot \text{Mw}_{\text{APS}})} \right] \cdot \left(\frac{m_d}{\text{Mw}_{\text{DAT}}} \right) \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

donde n_{DAT} , n_{BIS} , n_{AM} y n_{APS} son los moles de DAT, BIS, AM y APS utilizados en la síntesis, respectivamente. Además, Mw_{DAT} , Mw_{BIS} , Mw_{AM} y Mw_{APS} son los pesos moleculares de DAT, BIS, AM y APS, respectivamente.

Para estimar la cantidad de periodato requerida para obtener la ruptura de DAT, se supuso que todo el DAT añadido como reactivo se incorporó a la red de polímero.

Además, el volumen de la solución de periodato se determinó considerando la cantidad mínima de líquido necesaria para sumergir completamente toda la muestra de disco de hidrogel.

CLIVAJE DE DAT EN HIDROGELES ENTRECruzADOS CON BIS Y DAT (HG-2-6)

Un disco de hidrogel, pesado en seco (aprox. 80 mg), se hinchó hasta su equilibrio en agua (por más de 48 h). El mismo se colocó en agua, en un vial de vidrio de 5 mL. Luego, se añadió una solución de NaIO_4 ($n_{\text{NaIO}_4} \times 2$, disuelto en 1,25 mL de agua). Para esta reacción, el

periodato fue colocado en exceso (200%) en relación con la cantidad de DAT utilizada para preparar el hidrogel. Los reactivos se dejaron en contacto durante 24 h a 25 °C. Luego, el líquido se descartó y el hidrogel tratado se lavó exhaustivamente con agua destilada. Los productos obtenidos se denominaron CHG-2-6 (Hidrogeles Clivados). La Figura 3.2A muestra un diagrama esquemático de hidrogeles reticulados con BIS y DAT antes y después de la reacción con periodato.

CLIVAJE PARCIAL DE DAT EN HIDROGELES RETICULADOS CON BIS Y DAT (HG-6)

Un disco de hidrogel hinchado en equilibrio en agua se trató con NaIO_4 durante 24 h a 25 °C siguiendo el procedimiento detallado en la sección anterior. Sin embargo, la concentración de periodato utilizada para obtener un clivaje parcial (50%) fue menor ($n_{\text{NaIO}_4} / 2$ disuelto en 1,25 mL de agua). El hidrogel producido se denominó pCHG-6 (Hidrogeles parcialmente Clivados).

La Figura 3.2B muestra un diagrama esquemático de la ruptura parcial de DAT en hidrogeles reticulados con BIS y DAT.

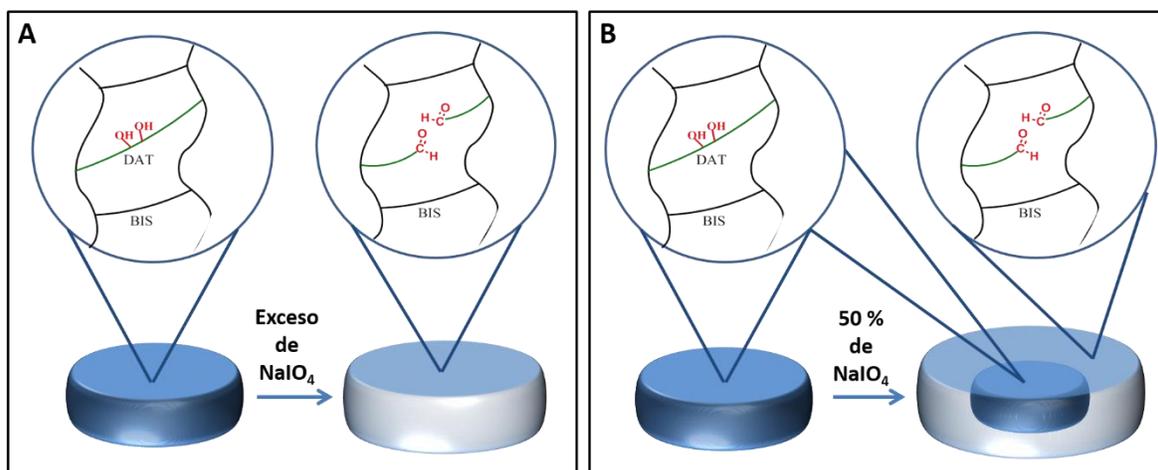


Figura 3.2 - A). Diagrama esquemático de hidrogeles entrecruzados con BIS y DAT antes y después de la reacción con periodato. B) Diagrama esquemático de la ruptura parcial de DAT en un hidrogel entrecruzado con BIS y DAT.

CARACTERIZACIÓN DE pCHG-6 POR MICROSCOPIA CONFOCAL

Las muestras analizadas se obtuvieron a partir del clivaje parcial de la síntesis HG-6, con periodato. Un disco de hidrogel pesado en seco (aprox. 80 mg), luego hinchado hasta el equilibrio en agua, se trató con NaIO_4 durante 24 h a 25 °C siguiendo el procedimiento detallado anteriormente para el clivaje parcial de los entrecruzamientos. Antes de las mediciones, las muestras de hidrogeles se cortaron axialmente para dejar expuesto el centro del gel. Para el caso en que se midieron muestras secas, éstas fueron liofilizadas. Las imágenes laser se tomaron sobre hidrogeles parcialmente modificados en estado seco. El contraste de interferencia diferencial (DIC) se usó para estudiar hidrogeles, no teñidos, en estado hidratado. Todas las imágenes de microscopía confocal se obtuvieron utilizando un microscopio confocal OLYMPUS LEXT OLS4000 del laboratorio LAMARX de la Universidad Nacional de Córdoba.

RUPTURA COMPLETA DE ENTRECruzAMIENTOS CON PERIODATO (HG-7)

Las muestras analizadas se obtuvieron a partir de la síntesis HG-7. Se colocó un disco de hidrogel, pesado en seco (aprox. 80 mg) y luego hinchado hasta el equilibrio en agua, en un vial de vidrio de 5 mL. Luego, se añadió una solución de NaIO_4 ($n_{\text{NaIO}_4} \times 1,3$, disuelto en 1,25 mL de agua). El periodato usado para esta reacción se colocó en exceso (130%) con respecto a la cantidad de DAT estimada para el disco de hidrogel seco. La reacción se llevó a cabo bajo agitación durante 24 h a 25 °C. Después de la reacción, se obtuvo un producto líquido (LHG-7). Luego, se añadieron 195 μL de solución de etilenglicol (2,48 %p/v) al producto de reacción y se dejó reaccionar durante 20 h. Finalmente, la solución de LHG-7 se burbujeó con N_2 conectado a una trampa de cloruro de amonio durante 10 min para eliminar la presencia de formaldehído, como un posible subproducto de escisión del etilenglicol. La Figura 3.3 muestra un diagrama esquemático de una ruptura completa del hidrogel entrecruzado sólo con DAT.

GRADO DE HINCHAMIENTO DE HIDROGELES (HG-1-7) DURANTE SU REACCIÓN CON PERIODATO.

Durante la reacción con una solución de periodato de sodio, se midió la variación, en el tiempo, del grado de hinchamiento de los hidrogeles de las síntesis HG-1-7. Cada hidrogel se hinchó, inicialmente, hasta su equilibrio en agua (durante más de 48 h). Luego, se sumergió en 12 mL de una solución 0,1 M de NaIO_4 en exceso y se siguió su cambio de hinchamiento gravimétricamente a lo largo del tiempo (130 min). Para llevar a cabo las mediciones, cada hidrogel se retiró momentáneamente de la solución de periodato, se secó con papel de secado, se pesó, y se sumergió nuevamente en la solución.

RE-ENTRECRUZAMIENTO DE HIDROGELES CLIVADOS

Se usaron soluciones de LHG-7 para obtener hidrogeles re-entrecruzados. Para este propósito, se estudió la reacción entre LHG-7 y dihidrazida de ácido adípico (AADH). Para cada ensayo, se mezclaron 150 μL de LHG-7 con 50 μL de solución de AADH. Las soluciones de AADH se prepararon por dilución de una solución madre 0,55 M. Los moles de AADH (n_{AADH}) se calcularon de acuerdo con la Ecuación 3.3:

$$n_{\text{AADH}} = \left[\frac{(n_{\text{DAT}} \cdot M_{\text{wDAT}})}{(n_{\text{DAT}} \cdot M_{\text{wDAT}} + n_{\text{AM}} \cdot M_{\text{wAM}} + n_{\text{APS}} \cdot M_{\text{wAPS}})} \right] \cdot \left(\frac{m_{\text{d}}}{M_{\text{wDAT}}} \right) \quad \text{Ecuación (3.3)}$$

El nuevo hidrogel se llamó RHG-7 (Hidrogel Re-entrecruzado). La Figura 3.3 muestra un diagrama esquemático de la formación de RHG-7 a partir de una solución líquida (LHG-7) después de la reacción con AADH.

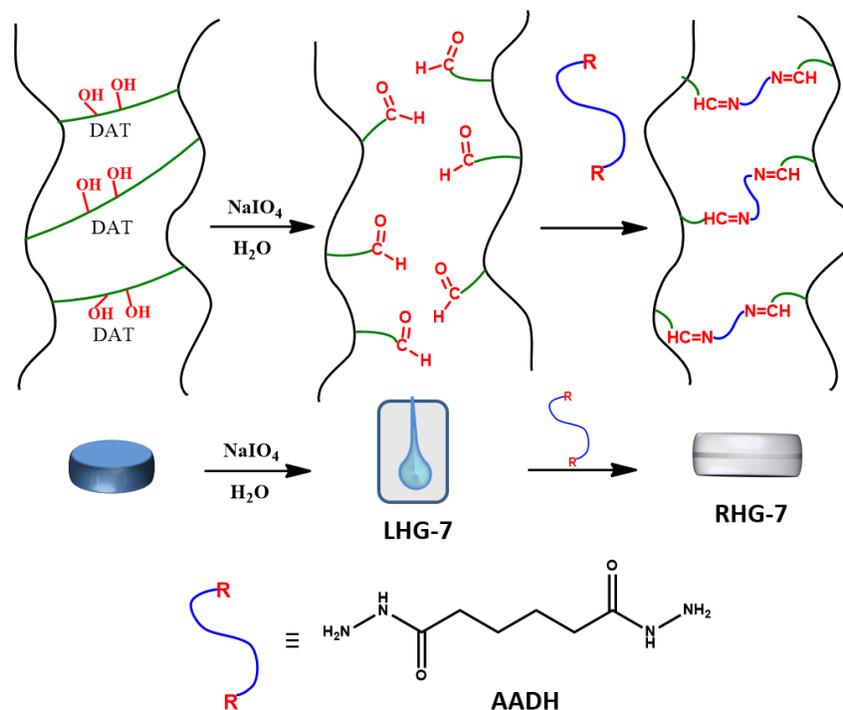


Figura 3.3 - Diagrama esquemático de la ruptura completa del hidrogel HG-7 para obtener un producto líquido (LHG-7) seguido del re-entrecruzamiento de la solución de LHG-7 con AADH para obtener el hidrogel RHG-7.

ESTUDIOS REOLÓGICOS

CLIVAJE DE DAT EN HIDROGELES ENTRECROZADOS CON BIS Y DAT

La evolución de las propiedades mecánicas de los hidrogeles durante su reacción con periodato de sodio se llevó a cabo por reología rotacional oscilatoria. Se midió el módulo elástico (G') de HG-1-6 durante 2700 s mientras ocurría la reacción. Para este experimento, los hidrogeles hinchados hasta el equilibrio en agua fueron cortados en 8 mm de diámetro y 2,3 mm de grosor. Cada muestra fue centrada entre dos platos paralelos de 8 mm del reómetro rotacional Anton Paar Physica MCR301. Para determinar el Rango Lineal Viscoelástico (RLV) de los hidrogeles, se realizó un barrido de estrés oscilatorio a una frecuencia de 1 Hz y 20 °C. Posteriormente, se efectuaron medidas oscilatorias con frecuencia ($\omega = 1$ Hz) y amplitud ($\gamma = 1$ %) constantes en el tiempo. Durante este ensayo, cada hidrogel fue colocado entre los platos paralelos y sumergido en agua. Se midió durante 2 min y luego, el exceso de agua fue removido. Posteriormente, una solución de NaIO_4 (0,2

M) se agregó a los 3,6 min de iniciado el ensayo, sumergiendo al hidrogel hasta el final de la medida. En la Figura 3.4 se observa un esquema del proceso de medida. Todas las medidas se realizaron por triplicado a una temperatura constante de $(20,0 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$.

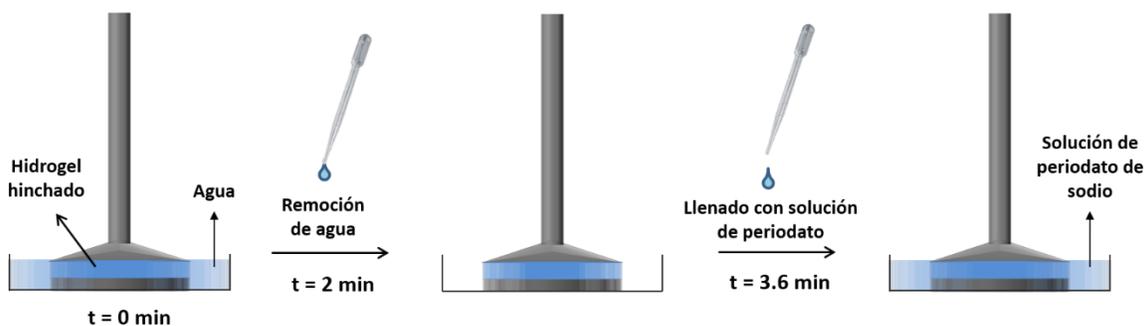


Figura 3.4 - Esquema representativo de la medida reológica, G' en función del tiempo, durante la reacción con periodato.

REOLOGIA DE RE-ENTRECRUZAMIENTO DE HIDROGELES CLIVADOS

Para este estudio, 150 μL de LHG-7 se colocaron entre los platos paralelos de una geometría circular de 25 mm de diámetro en el reómetro rotacional. La distancia entre los platos fue de 0,3 mm. Se registró el cambio del módulo elástico (G') en el tiempo, a 20 $^\circ\text{C}$, frecuencia ($\omega = 1 \text{ Hz}$) y amplitud ($\gamma = 1 \%$) constantes, durante 10 min. Posteriormente, se adicionaron 50 μL de una solución de AADH (calculada de acuerdo a la Ecuación 3.3) y se midió durante los siguientes 180 min.

ESPECTROSCOPÍA DE ^1H -RMN

Las medidas se tomaron con un espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear *NMR Bruker Advance 400 MHz*. Se utilizó D_2O como solvente en todos los casos.

CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO DE CLIVAJE DE DAT

Se disolvieron 57 mg de DAT ($2,5 \cdot 10^{-4}$ mol) en 1 mL de agua ultrapura. Luego, se adicionaron 106,9 mg de NaIO_4 ($5 \cdot 10^{-4}$ mol). La reacción procedió por una hora a 20 °C. La solución obtenida fue liofilizada. El producto seco fue luego re-disuelto en D_2O para realizar las medidas de RMN.

CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO DE CLIVAJE DE HG-7

Un disco hinchado de HG-7 (aprox. 80 mg de peso seco) se sumergió en NaIO_4 ($n_{\text{NaIO}_4} \times 3$, disuelto en 1,5 mL de D_2O). De esta manera el periodato fue estimado como un exceso 3 veces mayor a los moles de grupos dioles estimados en la masa del hidrogel tratado. La reacción procedió durante 12 h a 20 °C. Luego, se adicionaron acetato de sodio y ácido acético para alcanzar un buffer equimolar (0,1 M) a pH 4,7. Posteriormente, se realizaron las medidas de ^1H -RMN con el agregado de 0; 30; 70 y 120 % de AADH ($n_{\text{AADH}} \times 0; 0,3; 0,7$ y 1,2). La dihidrazida fue directamente disuelta en el tubo de medición con la mezcla de reacción, y agitada. Cada medida se realizó 5 min después de adicionar la AADH.

3.4 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES (HG-1-7)

Para todas las composiciones ensayadas (Tabla 3.1), se obtuvieron hidrogeles basados en AM. Los agentes entrecruzantes DAT y BIS se usaron en porcentajes molares entre 0-10 % y 0-5 % mol (con respecto a los moles de AM), respectivamente. La Figura 3.5 muestra los productos obtenidos. Los hidrogeles sintetizados con BIS y DAT simultáneamente (HG-1-6) fueron blanquecinos, mientras que los obtenidos sólo con DAT como entrecruzante (HG-7), fueron translúcidos.

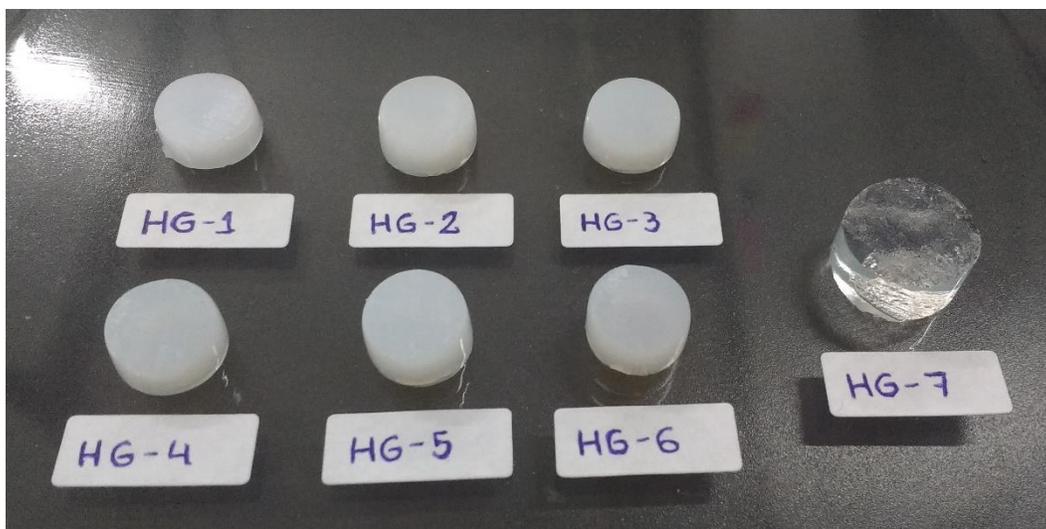


Figura 3.5 - Fotografías de hidrogeles HG-1-7.

Se estudiaron las propiedades de hinchamiento de los hidrogeles obtenidos. La Figura 3.6 muestra el porcentaje de hinchamiento en el equilibrio (% ESR) de los hidrogeles HG-1-6 frente al % DAT utilizado para la síntesis. En todos los casos, los hidrogeles mostraron alta capacidad de absorción de agua (> 700%). Además, aquellos preparados con mayores concentraciones de DAT mostraron %ESR más bajo. Este comportamiento de hinchamiento sugiere una incorporación creciente de DAT en las redes de la síntesis 1 a 6, dado que un aumento en el grado de entrecruzamiento restringe la posibilidad de expansión de los geles, limitando su capacidad de absorción de agua.

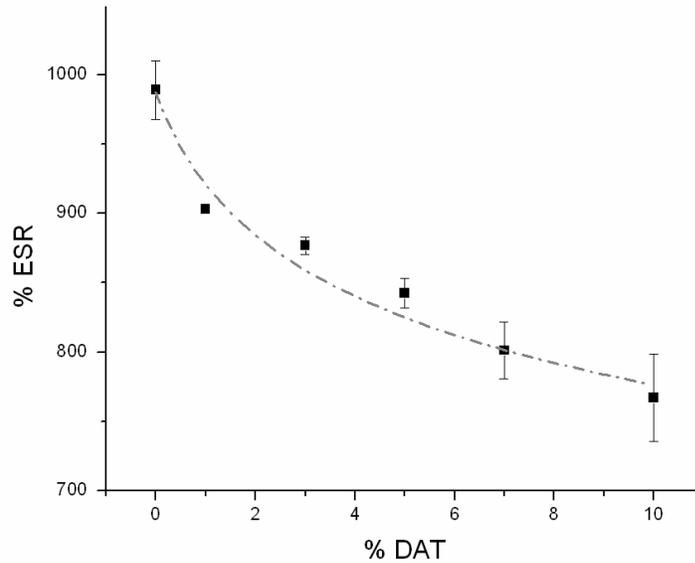


Figura 3.6 - Porcentaje de hinchamiento en el equilibrio (%ESR) de los hidrogeles, respecto del % DAT añadido en la síntesis.

El efecto del porcentaje de DAT sobre el equilibrio de hinchamiento del hidrogel (%ESR) puede estimarse usando una fórmula de ajuste no lineal (Ecuación 3.4):

$$\%ESR \cong \%ESR_0 / (1 + \%DAT)^k \quad \text{Ecuación (3.4)}$$

Donde $\%ESR_0 = (9,8 \pm 0,2) \cdot 10^2$ es el equilibrio de hinchamiento del hidrogel HG-1, en ausencia de DAT (reticulado sólo con BIS en 5 %mol) y $k = (0,10 \pm 0,01)$ es una constante de ajuste. El ajuste matemático de los datos de % ESR se muestra en la Figura 3.6 con una línea punteada. Se puede estimar que los aumentos posteriores al 10 % mol de DAT no producirían una disminución significativa en el %ESR. Este resultado es consistente con la relación entre el % ESR y la concentración de entrecruzante observada anteriormente [37], [38].

CLIVAJE DE DAT EN HIDROGELES RETICULADOS CON BIS Y DAT

Se estudió la reacción de hidrogeles entrecruzados simultáneamente con DAT y BIS, frente a soluciones de periodato de sodio. Se estimó que las unidades de DAT incorporadas dentro de la red polimérica reaccionarían con el periodato, ya que este entrecruzante tiene un diol vecinal en su estructura. En primera instancia, se llevaron a cabo estudios reológicos para determinar el módulo elástico (G') de los geles durante su reacción con periodato (Figura 3.7a). Antes de la reacción (en el tiempo = 0), el módulo elástico fue proporcional a la cantidad de DAT utilizada en la síntesis. El G' inicial fue de 9,6 y 4,3 kPa para los hidrogeles HG-6 y HG-1, respectivamente. Este resultado es coherente con los estudios de % ESR, indicando un mayor grado de entrecruzamiento en los geles sintetizados con mayor % DAT. Además, después de la adición de una solución de periodato (250 s), el módulo elástico disminuyó drásticamente en los geles que contenían DAT. En menos de media hora, el G' de las diferentes muestras de gel se estabilizó alcanzando un valor similar a los geles obtenidos en la síntesis de HG-1 (entrecruzado sólo con BIS 5%, es decir con DAT 0%). El tiempo requerido para la disminución del 95% del módulo elástico ($t_{95\%}$) fue en todos los casos inferior a 21 min. La Figura 3.7b muestra una comparación entre el módulo elástico de los hidrogeles (HG-1-6) en función de la concentración de DAT, antes y después de la reacción con el periodato. Independientemente de la concentración inicial de DAT, los valores finales de la elasticidad del hidrogel disminuyen al intervalo de 2,5 a 5,5 kPa, equivalente al hidrogel en que no se utilizó DAT (HG-1).

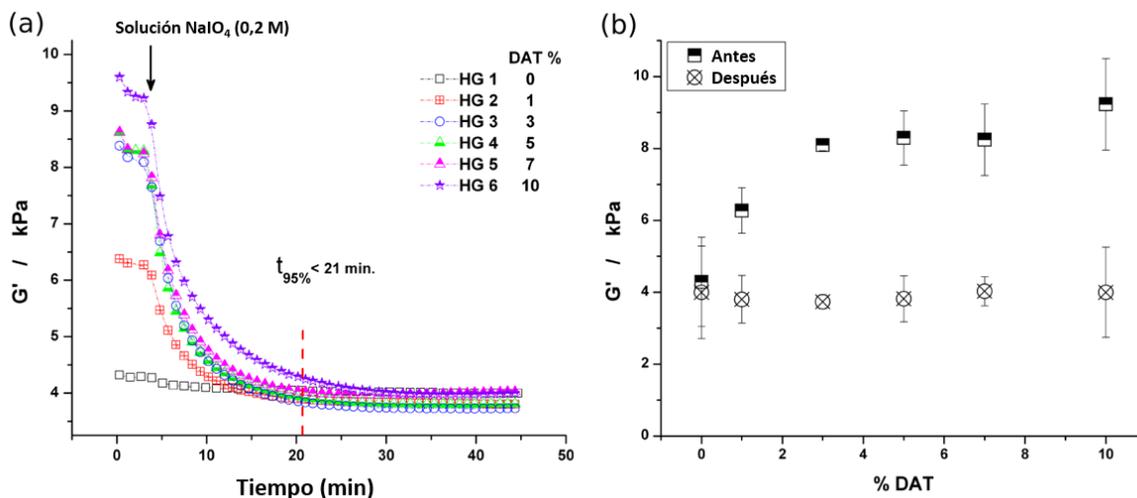


Figura 3.7 - (a) G' en función del tiempo (s) para HG-1-6 en presencia de periodato. La flecha muestra el momento en que se adicionó la solución del oxidante. La línea punteada indica el tiempo en que la elasticidad se ha reducido en un 95%. (b) G' frente a % DAT para hidrogeles antes y después del tratamiento con periodato.

La cinética de la reacción de escisión también se estudió midiendo el grado de hinchamiento a diferentes tiempos (SR_t), con respecto al grado de hinchamiento en el equilibrio en agua, de los hidrogeles HG-1-6, durante la reacción con periodato. Para evitar confusiones con el término de referencia porcentual (%ESR), en este ensayo, el grado de hinchamiento fue nombrado SR_i (grado de hinchamiento inicial). La Figura 3.8 muestra el cambio en la relación (SR_t / SR_i) en función del tiempo. Se observó que los hidrogeles HG-1 (que no contenían DAT) no mostraron cambios significativos en su índice de hinchamiento. En cambio, los hidrogeles sintetizados con DAT presentan un aumento del índice de hinchamiento entre 10 y 40 %. Dicho incremento es aproximadamente proporcional a la cantidad de DAT utilizada en la síntesis de cada hidrogel.

Como se observó por reología, el clivaje produce una disminución en el módulo elástico de la red, sugiriendo la ruptura de una parte de los entrecruzamientos, lo que podría permitir una mayor solvatación del polímero, produciendo un aumento del grado de hinchamiento del hidrogel.

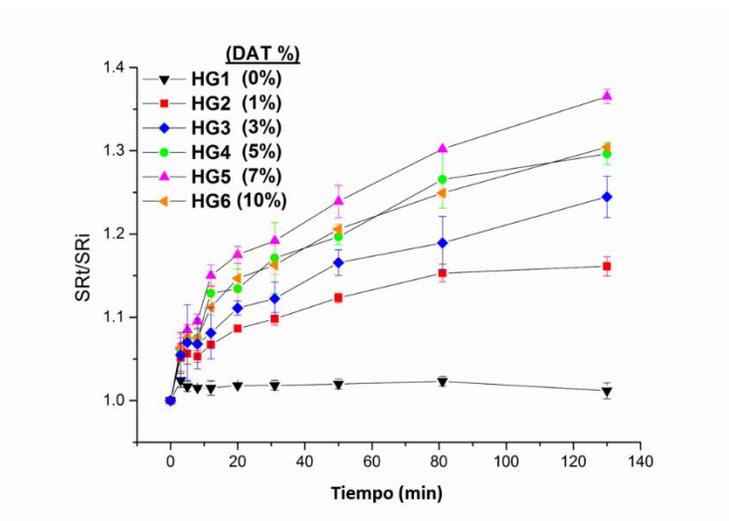


Figura 3.8 - (S_{Rt} / S_{Ri}) frente al tiempo (min) para los hidrogeles (HG-1-7) durante su reacción con el periodato.

Tanto los resultados reológicos como los de hinchamiento, sugieren que los entrecruzamientos debidos a unidades de DAT en la red se han clivado con periodato, sin afectar a los entrecruzamientos de las unidades de BIS.

Por otro lado, se observó que el efecto del ion periodato sobre los hidrogeles que contenían DAT no se produjo simultáneamente en toda la red. Por el contrario, se observó que la parte externa de los geles era ligeramente más translúcida que la parte interna, en los primeros min de la reacción de escisión. Considerando esto, se llevaron a cabo estudios en los que los entrecruzamientos de DAT fueron parcialmente escindidos por periodato.

CLIVAJE PARCIAL DE DAT EN HIDROGELES ENTRECruzADOS CON BIS Y DAT

La Figura 3.2b muestra un diagrama esquemático de HG-6, después de la reacción con periodato como reactivo limitante. Utilizando un defecto de moles de periodato para el tratamiento de los hidrogeles, el oxidante se consumió antes de romper todos los dioles vecinales presentes en la red que contiene DAT. La reacción se evidenció por el cambio de color de la zona externa, de blanquecino a transparente, dejando una zona central blanquecina en el material. La Figura 3.9a muestra una fotografía de un disco de hidrogel

(pCHG-6) después de la reacción con periodato como reactivo limitante. El círculo de puntos muestra una zona interna más opaca, presumiblemente con ausencia de clivaje. Luego, se realizó un corte axial del hidrogel parcialmente modificado para su estudio mediante microscopía. Se observó una sección transversal del fragmento, previamente liofilizado, mediante microscopía confocal (Figura 3.9b). El círculo de líneas punteadas que encierra la parte central del hidrogel muestra una zona interna morfológicamente diferente del área externa. Además, las Figura 3.9c y d muestran una imagen confocal de zonas externas (c) e internas (d) del hidrogel hidratado usando un accesorio DIC. El área externa muestra mayor rugosidad que la zona interna, probablemente causada por la presencia de mayor porosidad. La mayor rugosidad en la zona externa del material podría estar relacionada con la disminución de la elasticidad (entrecruzamientos), observada también por reología. La reacción de ruptura podría producirse mientras el frente de difusión del periodato se movía a través del gel, como se observó en otros estudios de modificación de hidrogeles con periodato [39]. Esta modificación controlada podría usarse como un método posterior a la síntesis para controlar el grado de reticulación o la porosidad de un gel, y adicionalmente con el control espacial de las propiedades requeridas.

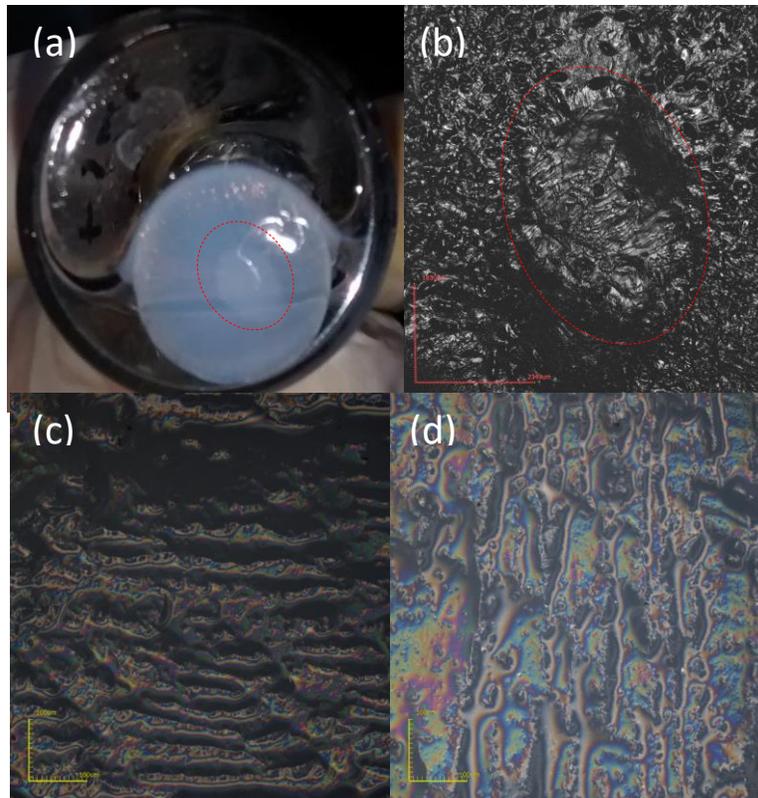


Figura 3.9 - (a) Fotografía de un disco de hidrogel (HG-6) después de la reacción con periodato como reactivo limitante. El círculo de líneas punteadas muestra una zona interna más opaca, presumiblemente con ausencia de clivaje. (b) Una sección transversal de un disco de hidrogel liofilizado después de la escisión parcial de DAT observada por microscopía confocal. El círculo punteado encierra una zona interna morfológica diferente al área externa. Imagen confocal (con un accesorio DIC) de zonas externas (c) e internas (d) de este hidrogel hidratado.

CLIVAJE TOTAL DE HIDROGELES, UTILIZANDO PERIODATO (HG-7)

Se supone que la estructura de red tridimensional de HG-7 obtenida con AM y DAT está soportada exclusivamente por la presencia de entrecruzamientos originados por unidades de DAT, incorporadas en la estructura del hidrogel. La reacción del periodato con HG-7 conduciría a la escisión de todos los entrecruzamientos. La Figura 3.10 muestra fotografías de HG-7 antes (a) y después (b) de la reacción con periodato. La reacción produjo un líquido viscoso translúcido (LHG-7). Como se observó previamente, los hidrogeles que contienen diferentes cantidades de DAT y BIS no originaron productos líquidos. En consecuencia, los resultados de este estudio confirman que los entrecruzamientos producidos por DAT son

los responsables de la estructura del gel HG-7 y son, en todos los HGs, los objetivos de la escisión por periodato.

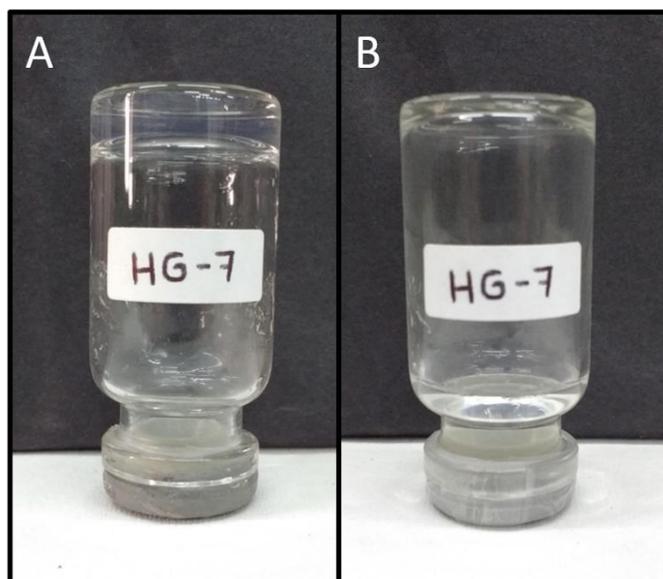


Figura 3.10 - Imagen de HG-7 antes (a) y después de (b) reacción con periodato. El producto de la reacción se mostró como un líquido viscoso translúcido (LHG-7).

Posteriormente, se realizaron estudios adicionales para determinar la composición química del producto de escisión. Con este propósito, tanto la ruptura de entrecruzamientos de HG-7 como la formación de nuevos grupos funcionales en el polímero se caracterizaron mediante estudios de ^1H -RMN (Figura 3.11, a y b). Además, se estudió el monómero DAT en ausencia y presencia de periodato por espectroscopía de ^1H -RMN como se muestra en las Figura 3.11, c y d, respectivamente. En ausencia de periodato, DAT muestra una señal particular a 4,6 ppm que se puede asignar al H carbinólico del diol vecinal (indicada como H_a en la estructura propuesta, Figura 3.11c). Como se esperaba, esta señal desapareció cuando DAT se trató con un exceso de periodato (Figura 3.11d), debido a la escisión del enlace C-C del diol vecinal. Además, aparece una nueva señal a 5,35 ppm que se puede asignar al hidrato de aldehído (H_b , Figura 3.11d) que indica la generación de dos moléculas de α -oxo-aldehído idénticas como productos de escisión de DAT. Es importante destacar que, en la literatura, las moléculas de aldehído de características similares y disueltas en

agua, se encuentran comúnmente en su forma hidratada [40] y que el corrimiento observado es equivalente al encontrado en la obtención de α -oxo-aldehídos en la oxidación de serina y treonina N-terminal en péptidos y proteínas [40].

La reacción en hidrogeles fue también estudiada por ^1H -RMN de HG-7, antes y después de su reacción con periodato (Figura 3.11, a y b, respectivamente). La Figura 3.11a muestra el espectro de HG-7, cuyas señales son notoriamente anchas. Dicho resultado puede asociarse con una baja movilidad molecular en el hidrogel, provocada por los entrecruzamientos de las cadenas poliméricas. A pesar de esto, la señal a 4,6 ppm (H_a) puede identificarse claramente. Además, la Figura 3.11b muestra el producto resultante del tratamiento de HG-7 con exceso de periodato. El producto de reacción era líquido y, en consecuencia, las señales observadas por ^1H -RMN se vuelven más estrechas y definidas, denotando el aumento en la movilidad de las cadenas por ruptura de entrecruzamientos. Además, se puede observar la desaparición del pico a 4,6 ppm y la aparición de la señal a 5,35 ppm, atribuida a la presencia de hidratos de aldehído en el producto.

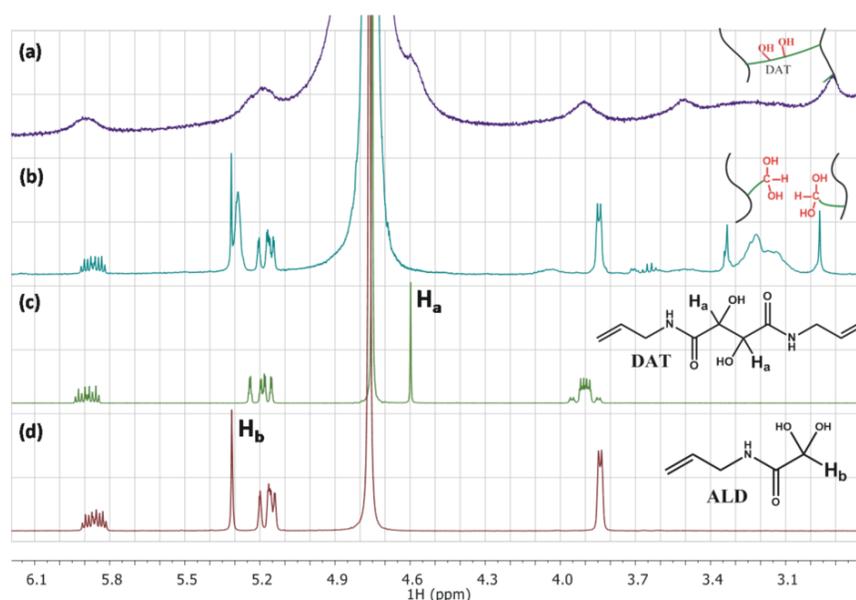


Figura 3.11 - ^1H -RMN de DAT y HG-7 antes y después de la reacción con periodato. (a) HG-7; (b) HG-7 + NaIO_4 (NaIO_4 en exceso); (c) DAT y (d) DAT + NaIO_4 (NaIO_4 en exceso). A la derecha: estructura molecular de DAT y estructura propuesta del producto, ALD. H_a y H_b son protones relevantes para analizar los cambios de reacción.

RE-ENTRECruzAMIENTO DE HIDROGELES CLIVADOS

Los geles entrecruzados sólo con DAT (HG-7) se trataron con periodato. La ruptura de entrecruzamientos generó un producto líquido y viscoso (LHG-7), con grupos funcionales aldehído, según se pudo observar por ^1H -RMN (Figura 3.11b). La reactividad de estos grupos aldehído se estudió usando AADH. En la Figura 3.12a, se muestra un tubo invertido que contiene LHG-7 en estado líquido. Sin embargo, la adición de una hidrazida bifuncional, tal como AADH, provocó la formación de nuevos entrecruzamientos covalentes entre las cadenas del polímero en menos de 5 min, dando lugar a un gel translúcido RHG-7 (Figura 3.12b).

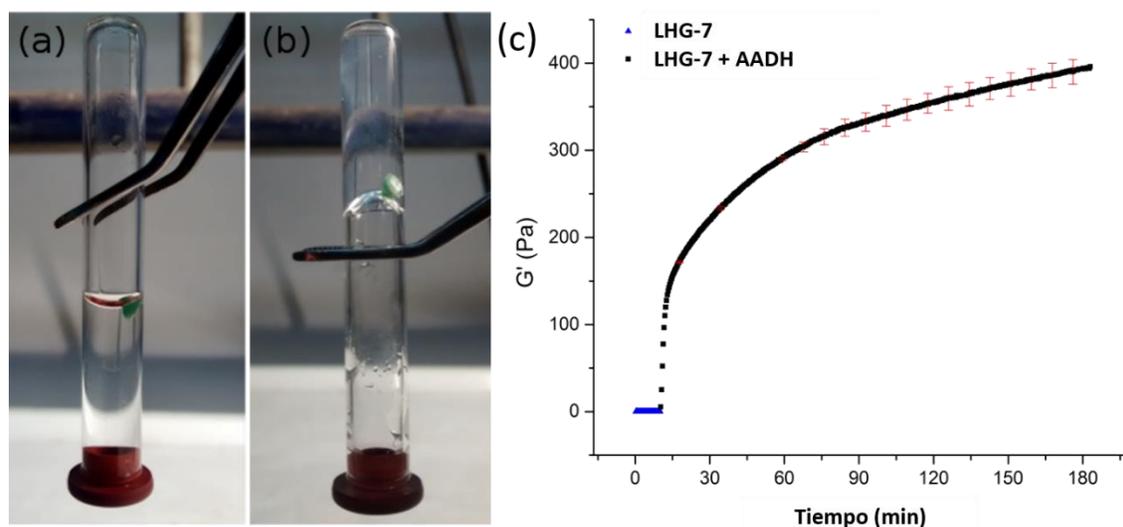


Figura 3.12 - Re-entrecruzamiento de hidrogel HG-7 clivado. (a) Producto escindido de HG-7 (LHG-7) con periodato; (b) Regeneración de hidrogel (RHG-7) usando AADH. Se añadió una bolita verde como referencia visual. (c) Evolución de G' en el tiempo para LHG-7 antes (azul) y después (negro) de la adición de AADH.

La cinética de re-entrecruzamiento de LHG-7 con AADH para obtener RHG-7 se estudió mediante reología como se muestra en la Figura 3.12c. Se observó que el módulo elástico de LHG-7 es de aproximadamente 0 Pa en las condiciones medidas, ya que el polímero se encuentra inicialmente en el estado líquido. Posteriormente, después de la adición de AADH

($t = 10$ min), el módulo elástico aumentó más de 102 Pa en menos de 5 min. Luego, la tasa de aumento de G' se redujo y los aumentos consecutivos de $\approx 10^2$ Pa requieren 15, 30 y 120 min de reacción, respectivamente.

Posteriormente, se realizó un estudio de la reacción química entre LHG-7 y AADH mediante ^1H -RMN, que se muestra en la Figura 3.13. En este estudio, se añadieron diferentes cantidades de AADH a una solución de LHG-7 en D_2O . LHG-7 en ausencia de AADH muestra las señales correspondientes al aldehído hidratado a 5,35 ppm. La adición gradual de AADH produce un ensanchamiento de las señales de RMN, lo que indica que el material pasa de un estado líquido a un estado de gel y las cadenas de polímero tienen menor libertad de movimiento. Además, se pudo observar la disminución relativa de las señales del grupo aldehído con respecto a las que pertenecen a p-AM (1,4 a 1,9 ppm, utilizadas como señal de referencia).

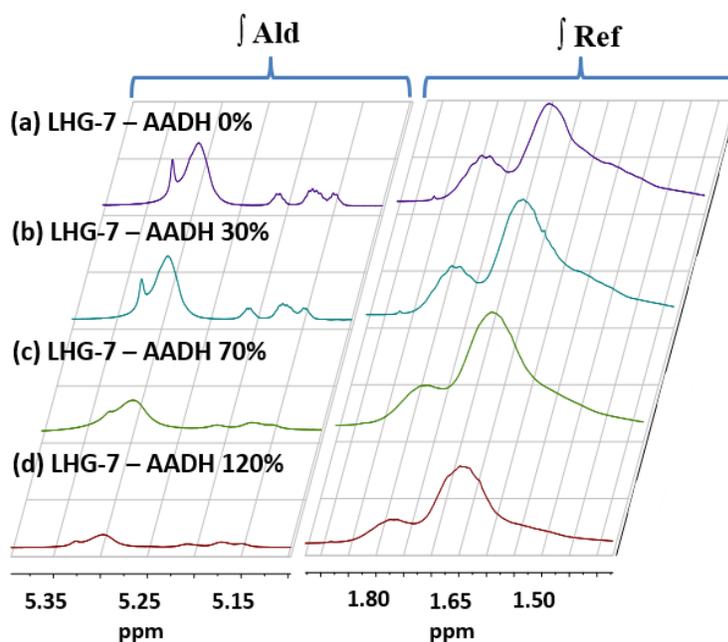


Figura 3.13 - Reacción entre LHG-7 y AADH estudiada por ^1H -RMN. Respuesta de diferentes adiciones de AADH (0; 30; 70 y 120%) a una solución de LHG-7 en D_2O .

Esto se confirmó mediante la medición de la integral del área correspondiente a las señales más relevantes. La Tabla 3.2 muestra el área integral de protones aldehídicos (\int_{Ald} , 5,25 a 5,4 ppm) y la relación entre \int_{Ald} y protones de referencia (\int_{Ref} , 1,4 a 1,9 ppm) para LHG-7 / AADH 0; 30; 70 y 120%. Los resultados indicaron que los protones que pertenecen al GF aldehído disminuyeron un 60% en relación con su área inicial, como resultado de la reacción con AADH.

Tabla 3.2 - Área integral de protones calculada a partir de $^1\text{H-RMN}$ de la Figura 14.

AADH (%)	\int_{Ald}	$\int_{\text{Ref}} / \int_{\text{Ald}}$
0	0,047	21,28
30	0,043	23,26
70	0,038	26,32
120	0,019	52,63

3.5 - CONCLUSIONES PARCIALES

En este capítulo, se resumieron los ensayos realizados en la síntesis y modificación post-síntesis de nuevos hidrogeles de AM, entrecruzados con BIS y DAT. La utilización de DAT en la síntesis de hidrogeles blandos no había sido reportada con anterioridad. Los estudios, realizados en geles reticulados con concentraciones crecientes de DAT (0 a 10%) y constante de BIS (5%), mostraron que el volumen de equilibrio de hinchamiento en agua disminuyó y el módulo elástico aumentó proporcionalmente con el porcentaje del entrecruzante. Esto demostró la efectiva incorporación de DAT, en la síntesis radicalaria de hidrogeles blandos de AM y BIS. Posteriormente, se comprobó que el diol vecinal presente en DAT puede ser escindido selectivamente por reacción con periodato. Durante esta reacción, el módulo elástico de las diferentes muestras de gel disminuyó de manera acorde al porcentaje de DAT utilizado en la síntesis y luego se estabilizó en un valor de G' similar al de los geles obtenidos únicamente con BIS 5%. Además, el grado de hinchamiento de los geles aumentó cuando DAT fue clivado por periodato. Estos hallazgos indicaron que el DAT incorporado al gel se escindió, mientras que el estado gel se mantuvo por los entrecruzamientos debidos a BIS. Además, el uso de periodato como reactivo limitante (en defecto, respecto de los moles de DAT), para la modificación de geles entrecruzados con BIS y DAT, permitió obtener geles con diferente grado de entrecruzamiento y funcionalidad en la zona externa, respecto a la interna. Este fenómeno podría aprovecharse para el desarrollo de materiales con porosidad, elasticidad y funcionalidad controladas espacialmente. Además, los geles entrecruzados sólo con DAT produjeron un líquido viscoso después de la reacción con periodato. Mediante estudios de RMN, se corroboró que DAT puede escindirse selectivamente con periodato cuando reacciona como un monómero o se incorpora a la red polimérica, obteniéndose grupos α -oxo-aldehídos hidratados como productos. Además, la reactividad de los grupos aldehído se verificó por reacción con AADH, produciendo nuevos hidrogeles.

Los resultados indicaron que la incorporación de DAT en los geles, y su posterior escisión con periodato, conforman una herramienta útil para producir polímeros, sintetizados

mediante polimerización radicalaria, que contienen grupos funcionales aldehído, sin la necesidad de utilizar reacciones de protección y deprotección de GF. Éstos podrían utilizarse para unir químicamente una variedad de moléculas a una matriz polimérica o para funcionalizar diversos polímeros sintéticos. Además, la estrategia permitió el control post-síntesis del grado de entrecruzamiento y, en consecuencia, de la estructura y propiedades de los geles.

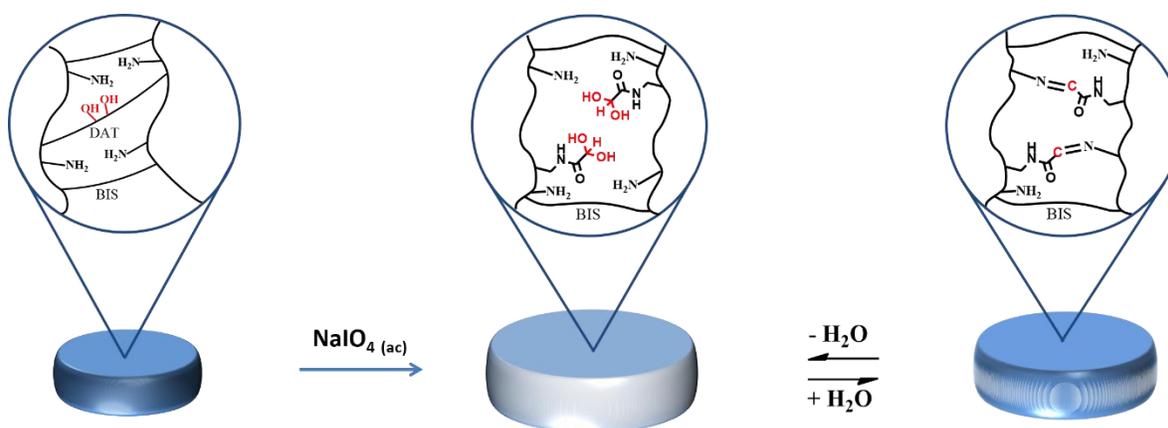
3. 6 - REFERENCIAS

- [1] S. Wang, S. Li, J. Qin, G. Xiao, G. Yang, and X. Feng, "Effect of Anionic Polyacrylamide on the Structural Stability of Thickened Tailings Slurry in Pipeline Transportation," vol. 2018, 2018.
- [2] J. Mikulec, G. Polakovičová, and J. Cvenroš, "Flocculation Using Polyacrylamide Polymers for Fresh Microalgae," *Chem. Eng. Technol.*, vol. 38, no. 4, pp. 595–601, 2015.
- [3] V. F. Kurenkov, H.-G. Hartan, and F. I. Lobanov, "Application of Polyacrylamide Flocculants for Water Treatment," *Ул. К. Маркса Казань. Татарстан. Россия*, vol. 3, no. 31, pp. 31–40, 2002.
- [4] S. S. Wong, T. T. Teng, A. L. Ahmad, A. Zuhairi, and G. Najafpour, "Treatment of pulp and paper mill wastewater by polyacrylamide (PAM) in polymer induced flocculation," *J. Hazard. Mater.*, vol. 135, no. 1–3, pp. 378–388, 2006.
- [5] Z. Chen, "Polyacrylamide and its derivatives for oil recovery," 2016.
- [6] G. R. Mahdavinia, S. B. Mousavi, F. Karimi, G. B. Marandi, H. Garabaghi, and S. Shahabvand, "Synthesis of porous poly(acrylamide) hydrogels using calcium carbonate and its application for slow release of potassium nitrate," *Express Polym. Lett.*, vol. 3, no. 5, pp. 279–285, 2009.
- [7] B. Bai, J. Zhou, and M. Yin, "A comprehensive review of polyacrylamide polymer gels for conformance control," *Pet. Explor. Dev.*, vol. 42, no. 4, pp. 525–532, 2015.
- [8] A. Mohammadinezhad, G. B. Marandi, M. Farsadrooh, and H. Javadian, "Synthesis of poly(acrylamide-co-itaconic acid)/MWCNTs superabsorbent hydrogel nanocomposite by ultrasound-assisted technique: Swelling behavior and Pb (II) adsorption capacity," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 49, no. September 2017, pp. 1–12, 2018.
- [9] G. Buczkowski, E. Roper, and D. Chin, "Polyacrylamide hydrogels: An effective tool for delivering liquid baits to pest ants (Hymenoptera: Formicidae)," *J. Econ. Entomol.*, vol. 107(2), pp. 748–757, 2014.
- [10] N. Saraswathy and P. Ramalingam, *Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics*. 2011.
- [11] Steven R. Caliari and Jason A. Burdick, "A Practical Guide to Hydrogels for Cell Culture," *Nat. Methods*, vol. 13, no. 5, pp. 405–414, 2016.
- [12] P. Petruzzo and J. M. Dubernard, *Regenerative Medicine Applications in Organ Transplantation*. 2014.
- [13] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Third edit. Waltham: Elsevier, 2013.
- [14] F. Seven and N. Sahiner, "NaOH modified P(acrylamide) hydrogel matrices for in situ metal nanoparticles preparation and their use in H₂ generation from hydrolysis of NaBH₄," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 131, no. 22, 2014.
- [15] V. Carrasco-Sánchez, A. Marican, A. Vergara-Jaque, C. Folch-Cano, J. Comer, and V. F. Laurie, "Polymeric substances for the removal of ochratoxin A from red wine followed by computational modeling of the complexes formed," *Food Chem.*, vol. 265, no. May, pp. 159–164, 2018.

- [16] G. Sharma, A. Kumar, M. Naushad, A. García-Peñas, A. H. Al-Muhtaseb, A. A. Ghfar, V. Sharma, T. Ahamad, and F. J. Stadler, "Fabrication and characterization of Gum arabic-cl-poly(acrylamide) nanohydrogel for effective adsorption of crystal violet dye," *Carbohydr. Polym.*, vol. 202, no. May, pp. 444–453, 2018.
- [17] M. T. Nakhjiri, G. B. Marandi, and M. Kurdtabar, "Poly(AA-co-VPA) hydrogel cross-linked with N-maleyl chitosan as dye adsorbent: Isotherms, kinetics and thermodynamic investigation," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 117, pp. 152–166, 2018.
- [18] W. Kangwansupamonkon, N. Klaikaew, and S. Kiatkamjornwong, "Green synthesis of titanium dioxide/acrylamide-based hydrogel composite, self degradation and environmental applications," *Eur. Polym. J.*, vol. 107, no. May, pp. 118–131, 2018.
- [19] M. Bonini, S. Lenz, R. Giorgi, and P. Baglioni, "Nanomagnetic sponges for the cleaning of works of art," *Langmuir*, vol. 23, no. 17, pp. 8681–8685, 2007.
- [20] R. Bansil, R. Bansil, M. K. Gupta, and M. K. Gupta, "Effect of Crosslinking Density on Polyacrylamide Gels," *Ferroelectrics*, vol. 30, no. August 2013, pp. 63–71, 1980.
- [21] T. Ni, G.-S. Huang, J. Zheng, P. Gao, and M.-M. Chen, "Research on the crosslinking mechanism of polyacrylamide/resol using molecular simulation and X-ray photoelectron spectroscopy," *Polym. J.*, vol. 42, no. 5, pp. 357–362, 2010.
- [22] H. Tobita and A. E. Hamielec, "Crosslinking kinetics in polyacrylamide networks," *Polymer (Guildf.)*, vol. 31, no. 8, pp. 1546–1552, 1990.
- [23] J. Baselga, I. Hernandez-Fuentes, I. F. Pierola, and M. A. Llorente, "Elastic properties of highly crosslinked polyacrylamide gels," *Macromolecules*, vol. 20, no. 12, pp. 3060–3065, 1987.
- [24] N. Orakdogan and O. Okay, "Correlation between crosslinking efficiency and spatial inhomogeneity in poly(acrylamide) hydrogels," *Polym. Bull.*, vol. 57, no. 5, pp. 631–641, 2006.
- [25] J. Qiao, J. Fu, L. Liu, Y. Liu, and J. Sheng, "Highly stable hydroxyl anion conducting membranes poly(vinyl alcohol)/poly(acrylamide-co-diallyldimethylammonium chloride) (PVA/PAADDA) for alkaline fuel cells: Effect of cross-linking," *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 37, no. 5, pp. 4580–4585, 2012.
- [26] S. Xie, F. Svec, and J. M. J. Frechet, "Preparation of porous hydrophilic monoliths: effect of the polymerization conditions on the porous properties of poly (acrylamide-co-N,N??-methylenebisacrylamide) monolithic rods," *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 35, no. 6, pp. 1013–1021, 1997.
- [27] M. L. Previtiera and N. A. Langrana, "Preparation of DNA-crosslinked Polyacrylamide Hydrogels," *J. Vis. Exp.*, vol. 2, no. 90, pp. 1–11, 2014.
- [28] T. Miyata, N. Asami, and T. Urugami, "Preparation of an antigen-sensitive hydrogel using antigen-antibody bindings," *Macromolecules*, vol. 32, no. 6, pp. 2082–2084, 1999.
- [29] K. Y. Lee, K. H. Bouhadir, and D. J. Mooney, "Controlled degradation of hydrogels using multi-functional cross-linking molecules," *Biomaterials*, vol. 25, no. 13, pp. 2461–2466, 2004.

- [30] O. Kornyšova, R. Jarmalavičiene, and A. Maruška, "A simplified synthesis of polymeric nonparticulate stationary phases with macrocyclic antibiotic as chiral selector for capillary electrochromatography," *Electrophoresis*, vol. 25, no. 16, pp. 2825–2829, 2004.
- [31] K. K. R. Tetala, B. Chen, G. M. Visser, A. Maruška, O. Kornyšova, T. A. van Beek, and E. J. R. Sudhölter, "Preparation of a monolithic capillary column with immobilized α -mannose for affinity chromatography of lectins," *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 70, no. 1, pp. 63–69, 2007.
- [32] A. Khaparde, M. A. Vijayalakshmi, and K. K. R. Tetala, "Preparation and characterization of a Cu (II)-IDA poly HEMA monolith syringe for proteomic applications," *Electrophoresis*, vol. 38, no. 22–23, pp. 2981–2984, 2017.
- [33] P. J. Roth, K. T. Wiss, and P. Theato, *Post-Polymerization Modification*, vol. 5. Elsevier B.V., 2012.
- [34] M. Gauthier, M. Gibson, and H.-A. Klok, "Synthesis of Functional Polymers by Post-Polymerization Modification," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 48, no. 1, pp. 48–58, 2009.
- [35] Fiddler Morris B.; Gray Gary R., "Immobilization of Proteins Polyacrylamide on Aldehyde-Activated Supports," *Anal. Biochem.*, vol. 86, pp. 716–724, 1978.
- [36] D. Proudnikov, E. Timofeev, and A. Mirzabekov, "Immobilization of DNA in polyacrylamide gel for the manufacture of DNA and DNA-oligonucleotide microchips," *Anal. Biochem.*, vol. 259, no. 1, pp. 34–41, 1998.
- [37] M. C. García, J. C. Cuggino, C. I. Rosset, P. L. Páez, M. C. Strumia, R. H. Manzo, F. L. Alovero, C. I. Alvarez Igarzabal, and A. F. Jimenez-Kairuz, "A novel gel based on an ionic complex from a dendronized polymer and ciprofloxacin: Evaluation of its use for controlled topical drug release," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 69, pp. 236–246, 2016.
- [38] J. C. Cuggino, G. Charles, G. Gatti, M. C. Strumia, and C. I. Alvarez Igarzabal, "New hydrogel obtained from a novel dendritic monomer as a promising candidate for biomedical applications," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 101, no. 12, pp. 3372–3381, 2013.
- [39] K. N. Plunkett, A. N. Chatterjee, N. R. Aluru, and J. S. Moore, "Surface-modified hydrogels for chemoselective bioconjugation," *Macromolecules*, vol. 36, no. 23, pp. 8846–8852, 2003.
- [40] O. Melnyk, " α - Oxo Aldehyde or Glyoxylyl Group Chemistry in Peptide Bioconjugation Ouafa a," 2013.

SÍNTESIS Y MODIFICACIÓN POST-SÍNTESIS DE HIDROGELES DE ACRILAMIDA Y 2-AMINOETILMETACRILATO (AEMA)



En este capítulo se describe la incorporación del monómero 2-aminoetilmacrilato (AEMA) en geles de poli(acrilamida), entrecruzados con BIS y DAT. El monómero AEMA se incluyó con el objetivo de generar enlaces covalentes reversibles del tipo imina por la reacción entre los GF amino de AEMA y los GF aldehído formados por modificación post-síntesis del entrecruzante DAT.

4.1 - CONSIDERACIONES GENERALES

La utilización de enlaces covalentes reversibles es una de las estrategias más utilizadas en el desarrollo de materiales funcionales, capaces de responder y adaptarse a cambios en su entorno. Este tipo de enlaces pueden mejorar la capacidad de los materiales de soportar estrés mecánico y también otorgar propiedades inteligentes como memoria de forma, autocurado, sensibilidad a un analito, operar como sensor-actuador o ser aprovechados en aplicaciones biomédicas como ingeniería de tejidos, liberación controlada de un bioactivo, entre otras [1].

En particular, los enlaces imina ($RN=CR_2$; con $R = H$ y/o hidrocarbilo) son formados por reacción de un grupo funcional amino con una cetona o aldehído, como se esquematiza en la Figura 4.1, y presentan un comportamiento reversible en solución acuosa. La reacción de formación e hidrólisis de enlaces imina es un proceso dependiente de las condiciones del medio, principalmente del pH. Este tipo de enlaces ha sido utilizado en el desarrollo de hidrogeles donde la reversibilidad por hidrólisis generó sensibilidad al pH y propiedades autocurables [2]; también en el desarrollo de hidrogeles con memoria de forma [3]; hidrogeles para el vendaje de heridas; hidrogeles inyectables con posibilidad de liberar fármacos de manera controlada; o para su uso en ingeniería de tejidos [4], entre otros.

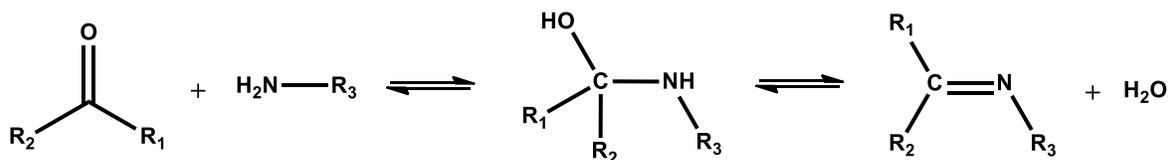


Figura 4.1 - Esquema de reacción de formación de enlaces imina

El monómero 2-aminoetil metacrilato es frecuentemente utilizado para obtener materiales poliméricos con GF amina mediante síntesis radicalaria. El homopolímero poli(2-aminoetil metacrilato) (p-AEMA) y su copolímero con BIS han demostrado biocompatibilidad [5], [6]. Además, el grupo funcional amino introducido por AEMA es frecuentemente utilizado para

realizar posteriores modificaciones en los materiales. En algunos casos, para su conjugación con GF aldehídos o cetonas mediante la formación de iminas. Por ejemplo, para la inmovilización de 2,4-di-hidroxibenzaldehído en copolímeros de poli(ácido metacrílico-co-2-aminoetil metacrilato) y su utilización como antifúngico frente al género *Aspergillus* [7]. En otro caso, AEMA se utilizó en la modificación superficial de membranas de polipropileno y, posteriormente, se inmovilizó salicilaldehído mediante formación del enlace imina. Luego, se ensayó la capacidad de adsorción de iones Cu(II) en la membrana, para el tratamiento de aguas residuales [8]. La alta especificidad de la reacción de formación de enlaces imina se utilizó también en la modificación específica de micropartículas de poliestireno-sulfonato modificado con GF aldehído, mediante la impresión de “tintas poliméricas” basadas en p-AEMA, para la obtención de micropartículas mono-modificadas, implicando un alto control en la reacción de modificación. Estas partículas tendrían promisorias aplicaciones en bio-sensores, imaginología (*imaging*), direccionamiento sitio-selectivo en superficies e interfaces, entre otras [9].

La reacción de α -oxo-aldehídos con aminas en polímeros sintéticos sólo cuenta con los escasos antecedentes de utilización del entrecruzante *N, N'*-dialiltartardiamida (DAT), mencionados en el Capítulo 1, donde se utilizó aminación reductiva para la inmovilización de ligandos en matrices poliméricas [10]–[12]. Sin embargo, la reacción de ácido glioxílico (un α -oxo-aldehído) con amoníaco y aminas primarias o secundarias ha sido explorada por Hoefnagel y colaboradores [13]. Como resultado de la reacción de aminas primarias se observó la formación reversible de iminas mediante el mecanismo propuesto en la Figura 4.2. La reversibilidad de la reacción mostró gran dependencia con el pH del medio, en solución acuosa.

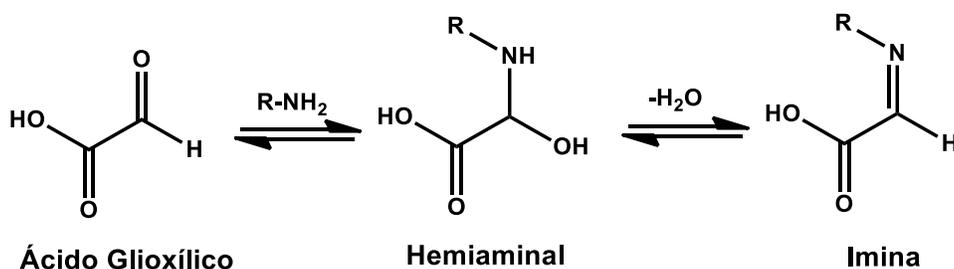


Figura 4.2 - Reacción de α -oxo-aldehídos de ácido glioxílico frente a aminas primarias.

Sin embargo, como se mencionó, la incorporación de α -oxo-aldehídos en matrices poliméricas tiene muy escasos antecedentes y la combinación de dicho GF con GF amino en matrices poliméricas podría ser una estrategia que permita la obtención de enlaces covalentes pH dependientes, otorgando al material propiedades inteligentes. Estas podrían ser utilizadas en la elaboración de materiales con propiedades como la memoria de forma, autocurables, la inmovilización de biomoléculas, la liberación controlada de fármacos, entre otras.

En este capítulo, se propuso la síntesis de hidrogeles inteligentes, pH sensibles, mediante la incorporación de ambos grupos funcionales, amina y α -oxo-aldehído en la misma matriz polimérica. Los hidrogeles fueron sintetizados a partir de los monómeros acrilamida (AM), 2-aminoetilmetacrilato (AEMA) y los entrecruzantes (+)-*N,N'*-dialiltartradiamida (DAT) y *N,N'*-metilenbis(acrilamida) (BIS). El monómero AEMA es el aportante de la funcionalidad amina en la red polimérica, mientras que los α -oxo-aldehídos fueron obtenidos mediante oxidación del entrecruzante DAT frente a periodato de sodio (Figura 4.3). Se estudiaron las propiedades mecánicas y de hinchamiento de los geles sintetizados y el efecto del tratamiento con periodato de sodio. Posteriormente se estudió la formación de enlaces imina en los hidrogeles y su dependencia con el pH.

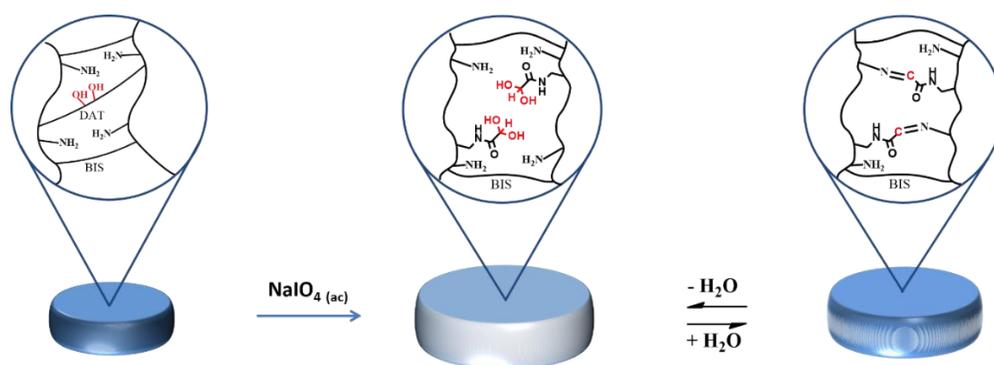


Figura 4.3 - Esquema de la reacción de los geles frente a periodato y su posibilidad de formar enlaces imina.

4.2 – OBJETIVOS

En este capítulo, se propone evaluar la utilización de una estrategia de síntesis y modificación post-síntesis para obtener hidrogeles inteligentes, pH sensibles, entrecruzados mediante enlaces covalentes de tipo imina, a partir de la incorporación de ambos grupos funcionales, amina y α -oxo-aldehído en la misma matriz polimérica. Para ello se propuso:

- Sintetizar hidrogeles formados por el monómero acrilamida (AM) y los entrecruzantes *N, N'*-metilenbis(acrilamida) (BIS) y (+)-*N, N'*-dialiltartramida (DAT) incorporando grupos funcionales amino a partir del comonómero 2-aminoetil metacrilato (AEMA).
- Caracterizar la composición química, y estudiar las propiedades de hinchamiento y mecánicas de los hidrogeles obtenidos.
- Analizar la modificación post-síntesis de los hidrogeles mediante el tratamiento con periodato de sodio, estudiando los cambios en sus propiedades físico-químicas: composición química y propiedades de hinchamiento.
- Estudiar la reactividad de los grupos funcionales aldehído formados, frente a los grupos funcionales amino presentes en la red polimérica, para dar lugar a la formación de nuevos entrecruzamientos, pH dependientes, de tipo imina.

4.3 - MATERIALES Y MÉTODOS

REACTIVOS

Para la síntesis de los hidrogeles se utilizaron los monómeros acrilamida (AM) y clorhidrato de 2-aminoetil-metacrilato (AEMA), (*Aldrich*), así como los agentes de entrecruzamiento (+)-*N,N'*-dialiltartradiamida (DAT) y *N,N'*-metilenbis(acrilamida) (BIS) (Figura 4.4). Para iniciar la reacción de polimerización se utilizó persulfato de amonio (APS), (*Anhedra*) y el activador *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamina (TEMED), (*Aldrich*). Los hidrogeles fueron modificados con periodato de sodio (NaIO₄), (*Aldrich*) y se utilizó solución de ácido picrilsulfónico (TNBS) 5 % (p/v) en H₂O (Sigma) en ensayos de identificación de aminas. Todos los reactivos fueron utilizados como fueron recibidos. Las soluciones fueron preparadas con agua ultra pura (18MΩcm⁻¹).

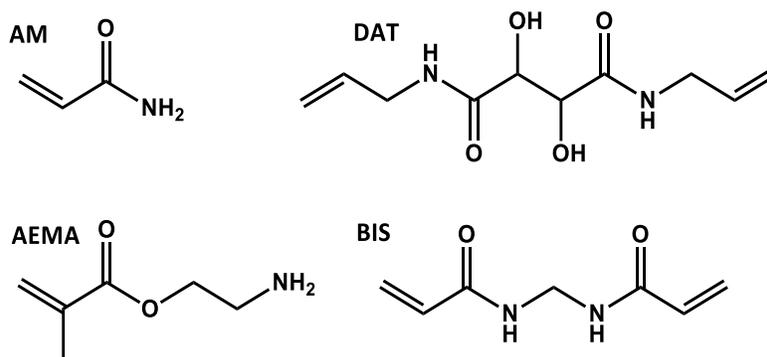


Figura 4.4 - Monómeros y agentes de entrecruzamiento.

SÍNTESIS DE HIDROGELES

Los hidrogeles se prepararon mediante polimerización a radicales libres. Los monómeros (7mmol), agentes de entrecruzamiento y APS fueron disueltos en agua ultrapura hasta un volumen final de 5 mL, en un vial con tapa de goma, en las proporciones indicadas en la Tabla 4.1. Las soluciones fueron enfriadas en un baño de agua con hielo y desoxigenadas mediante burbujeo de N₂ durante 10 min. Para iniciar la polimerización, se agregaron 0,5

mL de una solución de TEMED (0,32 M) al vial y se transvasó la solución a jeringas descartables de 5 mL. Las jeringas se colocaron en un baño térmico de agua a 50 °C durante 16 h. Finalmente, los hidrogeles se cortaron en discos de 3 mm de espesor y 12 mm de diámetro y lavaron exhaustivamente con agua.

Tabla 4.1 - Condiciones de síntesis de hidrogeles

SÍNTESIS	MONÓMEROS (relación molar)	ENTRECRUZANTES (%)*	INICIADOR (%)*
p-AM-AEMA-BIS	AM:AEMA (95:5)	BIS (5) - DAT (0)	APS (3,7) - TEMED** (1,4)
p-AM-AEMA-BIS-DAT(1)	AM:AEMA (95:5)	BIS (5) - DAT (1)	APS (3,7) - TEMED (1,4)
p-AM-AEMA-BIS-DAT(3)	AM:AEMA (95:5)	BIS (5) - DAT (3)	APS (3,7) - TEMED (1,4)
p-AM-AEMA-BIS-DAT(5)	AM:AEMA (95:5)	BIS (5) - DAT (5)	APS (3,7) - TEMED (1,4)
p-AM-AEMA-BIS-DAT(7)	AM:AEMA (95:5)	BIS (5) - DAT (7)	APS (3,7) - TEMED (1,4)
p-AM-AEMA-BIS-DAT(10)	AM:AEMA (95:5)	BIS (5) - DAT (10)	APS (3,7) - TEMED (1,4)

* Porcentaje molar respecto de moles totales de monómeros. ** Se utilizó 0,5 mL de solución 0,32 M de TEMED.

MODIFICACIÓN DE LOS HIDROGELES

La modificación se llevó a cabo mediante la ruptura oxidativa de DAT. Para ello, los discos de gel, luego del primer secado, se hincharon en 50 mL de agua durante 3 días. Una vez en el equilibrio, se colocaron en viales conteniendo 1,5 mL de solución de periodato de sodio 0,2 M y se agitaron en un oscilador orbital durante 1 h. La reacción se detuvo adicionando 2 mL de solución de glicerol 4% v/v. Luego, los discos se lavaron exhaustivamente con agua. Durante el transcurso de la reacción, se registró gravimétricamente el cambio de hinchamiento de cada hidrogel mediante mediciones realizadas cada una hora.

CARACTERIZACIÓN DE LOS GELES.

ESTUDIOS DEL HINCHAMIENTO EN EL EQUILIBRIO.

Para adquirir la masa de equilibrio, los discos de hidrogel se hincharon en agua a 20 °C durante tres días, alcanzando una masa constante. La masa del hidrogel deshidratado se obtuvo secando los discos en una estufa a 37 °C.

El grado de hinchamiento en el equilibrio (ESR) se calculó según la Ecuación 4.1 [14].

$$ESR = \frac{m_e - m_s}{m_s} \quad \text{(Ecuación 4.1)}$$

En donde m_e es la masa del gel en su máximo hinchamiento, en el equilibrio, y m_s corresponde a la masa de hidrogel seco.

CINÉTICA DE HINCHAMIENTO Y TIPO DE DIFUSIÓN DE AGUA EN EL HIDROGEL.

La cinética de hinchamiento de los hidrogeles se estudió mediante la determinación de la tasa de hinchamiento (SR) a distintos tiempos. La SR se calculó utilizando la Ecuación 4.2, donde m_t corresponde a la masa del gel a un determinado tiempo [14]:

$$SR = \frac{m_t - m_s}{m_s} \quad \text{(Ecuación 4.2)}$$

Los discos de hidrogel deshidratados se colocaron en agua y se registró el cambio en el peso en función del tiempo, hasta alcanzar una masa constante.

En base a la cinética de hinchamiento de los hidrogeles, se estimó el tipo de difusión de agua dentro de la matriz utilizando la Ecuación 4.3:

$$F = \frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad \text{(Ecuación 4.3)}$$

donde M_t corresponde a la masa de agua que difundió en la matriz a tiempo t ; M_∞ es la masa de agua que difundió hacia la matriz en el equilibrio y k es una constante relacionada con la estructura de la red. El exponente n es un número relacionado al tipo de difusión. Esta ecuación es aplicable sólo durante el inicio del hinchamiento, cuando es menor al 60% del hinchamiento de equilibrio. El valor de n y k se obtuvieron de la pendiente y ordenada al origen de la curva $\ln F$ vs. $\ln t$ [14].

ESTUDIOS REOLÓGICOS

Las propiedades mecánicas de las matrices se determinaron en un reómetro rotacional (Anton Paar-Physica MCR 301). Los discos de hidrogel se hincharon hasta el equilibrio, cortaron con un sacabocado y se colocaron en una geometría de platos paralelos de 8 mm de diámetro. Las medidas se tomaron a $(20,0 \pm 0,1)$ °C utilizando $2,00 \pm 0,01$ mm de distancia entre los platos. Se realizaron ensayos de deformación oscilatoria, variando la amplitud de esta de 0,01 a 100%, con una frecuencia de 1 Hz. Los barridos de frecuencia se realizaron con una amplitud de deformación centrada en el rango lineal viscoelástico, deformando las muestras en un 2% a frecuencias entre 0,025 - 20 Hz.

ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA (FT-IR) Y DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).

Las muestras se analizaron mediante espectroscopía infrarroja (FT-IR) en un equipo *Nicolet 5-SXC FTIR Spectrometer*, utilizando discos de KBr. Los discos se prepararon mezclando 2 mg de hidrogel o monómero deshidratado y 100 mg de KBr. La mezcla se pulverizó en mortero y luego se compactó en forma de disco utilizando una prensa hidráulica de 10 ton. El espectro FT-IR se adquirió en el rango espectral de $4000 - 400$ cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} utilizando 64 barridos por muestra.

Los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN se obtuvieron en un espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear RMN BRUKER ADVANCE 400MHz utilizando muestras pulverizadas y secas, posteriormente hinchadas en D_2O .

HINCHAMIENTO A DISTINTOS VALORES DE pH

Luego de ser tratados con periodato y lavados (si correspondiese), los geles se secaron en estufa a 37 °C hasta masa constate. Luego, se hincharon en soluciones *buffer* (0,02 M; Fuerza Iónica 0,06 M) de distintos valores de pH, con fuerza iónica equivalente (equiparada mediante adición de NaCl) durante 3 días hasta alcanzar su masa de equilibrio. La Tabla 4.2 muestra el pH y la composición de los distintos buffers.

Tabla 4.2 - pH y composición de las soluciones *buffer* utilizadas.

pH	COMPOSICIÓN CONC. = 0,02 M; F.I. = 0,06 M
5,3	HAcO / NaAcO
6,3	NaH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄
7,3	NaH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄
8,1	NaH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄

ENSAYO DE COLORACIÓN DE AMINAS CON TNBS

Como control, se sintetizaron geles de p-AM-BIS-DAT(10) (en ausencia de AEMA), en las mismas condiciones descritas anteriormente. Para el ensayo de identificación de grupos amino, fragmentos de los distintos hidrogeles (aproximadamente 50 mg), hinchados en agua, se sumergieron en 1 mL de una solución saturada de borato de sodio durante 1 h. Posteriormente, se adicionaron 90 µL de solución de TNBS 1,5 %P/V en etanol. Luego de 3 h se tomaron fotografías de los materiales modificados.

ENSAYO DE DEGRADACIÓN TOTAL DE ENTRECruzAMIENTOS

Además de los HGs mencionados en la Tabla 4.1, se sintetizaron geles que solo contienen a DAT como entrecruzante, p-AM-AEMA-DAT(10) y p-AM-DAT(10), utilizando las mismas condiciones de síntesis. Los discos de gel obtenidos, hinchados hasta el equilibrio luego de ser lavados en agua, se colocaron en viales. Se adicionó un exceso de NaIO₄ agregando 1,25 mL de solución 0,1 M y se observó la degradación de los geles en el tiempo y la evolución de su estado físico.

4.4 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

SÍNTESIS DE HIDROGELES

Se sintetizaron copolímeros de acrilamida (AM) y 2-aminoetil-metacrilato (AEMA) entrecruzados con una cantidad invariable de BIS (5 mol%, respecto de los moles totales de monómeros) y variable de DAT (0; 1; 3; 5; 7 y 10 mol%), como se indicó en la Tabla 4.1.

En todos los casos se obtuvieron geles blanquecinos y de buenas propiedades mecánicas, fáciles de manipular sin dañarlos. Para estudiar la incorporación de los entrecruzantes en las redes poliméricas y su efecto en las propiedades de los geles, se estudiaron las propiedades mecánicas y de hinchamiento de los materiales sintetizados.

ESTUDIOS DE HINCHAMIENTO EN EL EQUILIBRIO

En la Figura 4.5, se observa la dependencia entre el grado de hinchamiento de equilibrio (ESR) y el porcentaje de entrecruzante DAT utilizado en la síntesis de los geles. Los valores indicados como 1º ESR, corresponden al equilibrio de hinchamiento de los geles lavados en agua inmediatamente luego de la síntesis. En este caso, las cadenas poliméricas obtenidas y equilibradas en agua, han estado siempre hidratadas. La marcada disminución del ESR con el aumento en el %DAT evidencia la eficiente incorporación de un mayor número de entrecruzamientos covalentes al aumentar el porcentaje del entrecruzante en la síntesis. La tendencia observada es equivalente a la encontrada en los HGs de p-AM-BIS-DAT, desarrollada en el Capítulo 3 de esta Tesis. Estos entrecruzamientos actúan como “nudos” entre las cadenas de la red, limitando la capacidad de expansión del gel y restringiendo la absorción de mayores volúmenes de solvente. Para estudiar el efecto de las interacciones físicas entre las cadenas poliméricas, los hidrogeles se secaron a 37°C hasta peso constante y se rehidrataron en agua durante 3 días. A partir de la masa de estos geles, se calculó el grado de equilibrio del segundo hinchamiento (2do ESR, Figura 4.5). Durante el secado, la ausencia de solvente permite que las cadenas interactúen íntimamente entre sí. Esta aproximación promueve la formación de dominios amorfos y/o cristalinos que luego son difíciles de solvatar. Por esta razón el 2do ESR disminuye respecto del 1er ESR para todas

las muestras analizadas. En efecto, los nuevos dominios actúan como pseudo-entrecruzamientos, limitando la capacidad de hinchamiento de los hidrogeles y haciendo menos evidente la dependencia con el porcentaje de entrecruzamiento.

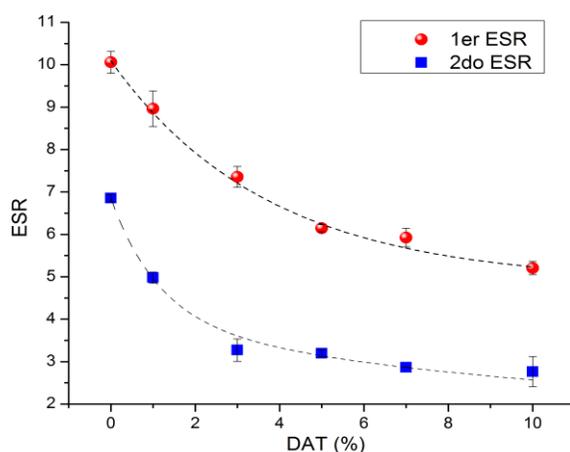


Figura 4.5 - Dependencia de la capacidad de hinchamiento con el grado de entrecruzamiento en las redes.

CINÉTICA DE HINCHAMIENTO Y TIPO DE DIFUSIÓN DE AGUA EN EL HIDROGEL

La cinética de hinchamiento de geles está íntimamente relacionada a su morfología, la interacción viscosa entre polímero y solvente, a las interacciones polímero-polímero y a las propiedades mecánicas del material [15]. Salvo su morfología, el resto de las características dependen de la funcionalidad de las cadenas poliméricas y del grado de entrecruzamiento de los materiales. Se estudió la cinética de hinchamiento en agua de los geles sintetizados, con el fin de determinar el mecanismo de difusión del solvente dentro de la matriz y el efecto del porcentaje de entrecruzante utilizado. En la Figura 4.6 se muestra la variación del grado de hinchamiento (SR) en el tiempo en los hidrogeles de p-AM-AEMA-BIS-DAT. Se observó que los geles incorporan agua rápidamente y, conforme se van hidratando, la velocidad de hinchamiento disminuye abruptamente luego de alcanzar el 90% del hinchamiento de equilibrio. En general, alcanzan el 50% del hinchamiento final en aproximadamente 1,5 h, mientras que el 95% es logrado en 5 h. Los datos cinéticos fueron

utilizados para determinar el tipo de mecanismo de difusión de agua dentro de los hidrogeles utilizando la Ecuación 4.3 (ver sección *Materiales y Métodos*). Para hidrogeles de forma cilíndrica, la teoría indica que: si $0 < n < 0,5$, el mecanismo de difusión del solvente sigue un comportamiento fickiano, donde sólo la velocidad de difusión del solvente dentro de la matriz es relevante; si $0,5 < n < 1$, representa un mecanismo de difusión no fickiana donde no sólo es relevante la difusión del solvente, sino también la cinética de relajación de las cadenas poliméricas; si $n=1$, corresponde a un mecanismo tipo II, donde la cinética de hinchamiento es determinada por la velocidad de relajación de las cadenas [14]. El tipo de difusión determinado experimentalmente corresponde en todos los casos a un mecanismo no fickiano, con valores de n de aproximadamente 0,6, independientemente del grado de entrecruzamiento de las matrices. Este resultado indicaría que, sin importar la diferencia en el grado de entrecruzamiento en los hidrogeles, la velocidad de difusión del agua es similar a la velocidad de relajación de las cadenas y la cinética en las primeras instancias de hinchamiento (hinchamiento menor al 60% respecto del correspondiente ESR) se comporta de manera similar en todas las muestras.

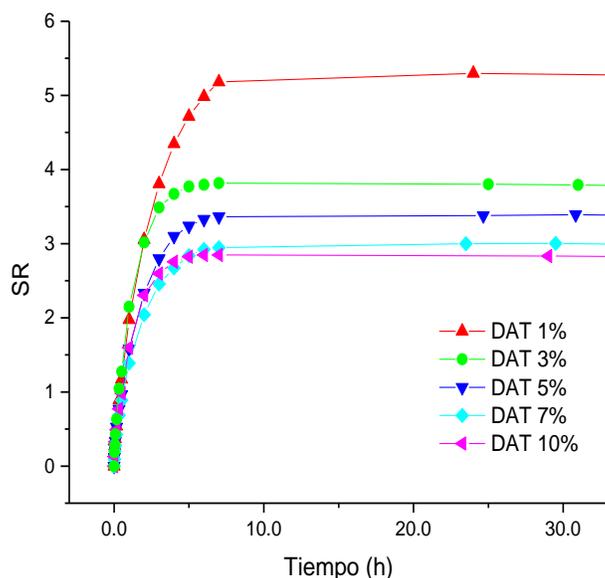


Figura 4.6 - Cinética de hinchamiento de los hidrogeles p-AM-AEMA-BIS-DAT en agua.

ESTUDIOS REOLÓGICOS

Se analizaron las propiedades mecánicas de los copolímeros de acrilamida, mediante ensayos de deformación a distintas frecuencias y amplitudes, de acuerdo con el procedimiento detallado en la sección *Materiales y Métodos*. La Figura 4.7a muestra el módulo elástico (G') en función del porcentaje de deformación oscilatoria, a una frecuencia de 10Hz, para los geles sintetizados. Este ensayo permite determinar el rango de deformación de respuesta lineal de los materiales poliméricos [16]. En el gráfico puede apreciarse que todos los geles tienen un rango de respuesta lineal similar que tiende a ser más corto según aumenta el porcentaje de DAT utilizado en la síntesis. Este comportamiento verifica la creciente incorporación de DAT como entrecruzante y su efecto en la elasticidad del material.

La Figura 4.7b muestra la respuesta de los hidrogeles sometidos a un barrido de frecuencias, a una deformación constante del 2%. El módulo elástico (G') fue mayor al viscoso (G'') durante todo el rango de estudio, indicando predominancia del comportamiento elástico por sobre el viscoso en los geles. El módulo elástico de p-AM-AEMA-BIS decrece a bajas frecuencias, resultado que evidencia el menor grado de entrecruzamiento covalente en esta matriz.

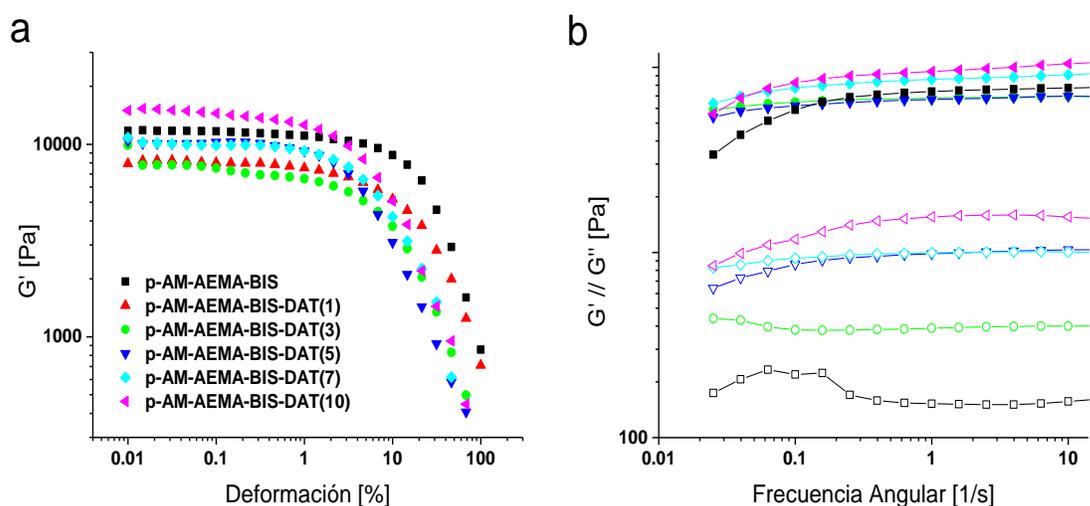


Figura 4.7 - a) Componente elástico (G') vs. porcentaje de deformación de los materiales sintetizados. b) Componente elástico (G') y Viscoso (G'') en función de la frecuencia angular (1/s).

Luego de verificar la incorporación del agente entrecruzante DAT en las matrices sintetizadas, se procedió al estudio de la modificación post-síntesis de los hidrogeles, mediante el clivaje del entrecruzante DAT en presencia de NaIO_4 .

RUPTURA OXIDATIVA DE DAT

RUPTURA OXIDATIVA DE LOS GELES CON PERIODATO.

Se realizó la ruptura oxidativa de DAT en presencia de NaIO_4 con el objetivo de obtener GF aldehído en la matriz polimérica. La presencia de GF amino debidos a AEMA en los hidrogeles, podría permitir la obtención de enlaces covalentes reversibles pH dependientes en los materiales. Estos enlaces podrían otorgar propiedades inteligentes a los materiales. Por ejemplo, generar una dependencia en la cinética y capacidad de hinchamiento de los geles con el pH del medio, o aumentar la sensibilidad de la red a la presencia de agua y la reversibilidad en el hinchamiento (ciclos de hinchamiento-secado sin cambio en las propiedades mecánicas y de hinchamiento).

En el Capítulo 3 se demostró que la combinación de los agentes entrecruzantes BIS y DAT permite el tratamiento de los geles de AM con NaIO_4 generando una ruptura selectiva del entrecruzante DAT sin afectar al entrecruzante BIS. Utilizando un protocolo equivalente, se modificó a los geles de p-AM-AEMA-BIS-DAT en presencia de soluciones de periodato de sodio. El cambio del grado de hinchamiento en el tiempo (SR) se determinó gravimétricamente, evidenciando la reacción de clivaje de entrecruzamientos (Figura 4.8). En todos los casos se observa incremento del volumen de los hidrogeles durante la reacción hasta alcanzar un SR aproximadamente constante luego de 3 h. Además, las redes entrecruzadas con mayor cantidad de DAT incrementan el SR hasta un 40%. En cambio, las redes que poseen menor porcentaje de DAT sufren un menor incremento. Como se observa en la Figura, cuando el hidrogel posee DAT 1% (p-AM-AEMA-BIS-DAT(1)) el índice SR aumenta solamente un 5%. Estas observaciones permiten suponer que el periodato estaría produciendo la ruptura del agente entrecruzante DAT de manera selectiva, sin afectar a BIS, como se observó anteriormente en geles de p-AM-BIS-DAT.

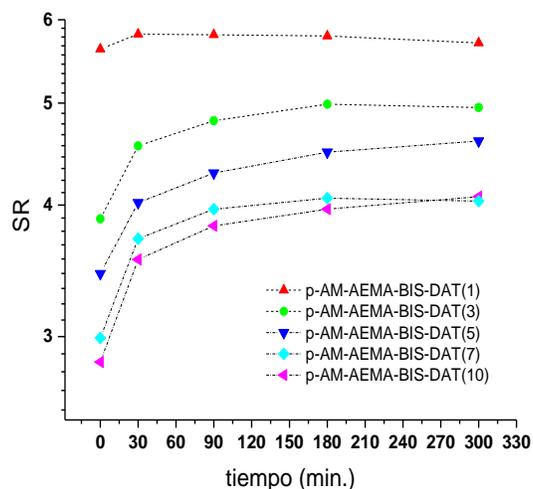


Figura 4.8 - Índice SR en función del tiempo de reacción con periodato para los hidrogel de p-AM-AEMA-BIS-DAT.

Luego del tratamiento con periodato, se realizaron ensayos para comprobar la formación de GF α -oxo-aldehídos en los hidrogel, la presencia de aminas debido a AEMA y la posible formación de enlaces imina reversibles.

CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE LOS PRODUCTOS DE OXIDACIÓN

ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA (FTIR)

Se realizó el estudio de absorción infrarroja de muestras de p-AM-AEMA-BIS-DAT(10) antes y después de su modificación con periodato (p-AM-AEMA-BIS- α -oxo-ALD(10)) y se compararon con la absorción del agente entrecruzante DAT. En la Figura 4.9 se muestran los espectros FT-IR de las muestras mencionadas. Las señales a 1061 y 1125 cm^{-1} , asignadas al estiramiento C-O en los alcoholes de DAT y la señal ancha entre 3650 y 3200 cm^{-1} , característica de estiramiento O-H, se observan también presentes en ambos hidrogel, indicando la incorporación del entrecruzante. Además, en los espectros correspondientes a los hidrogel se observa la desaparición de la señal asignada a la deformación fuera del plano del C-H perteneciente al grupo vinilo de DAT (918 cm^{-1}), denotando la incorporación del entrecruzante a la red mediante la polimerización radicalaria, a través del GF vinilo.

Como se demostró anteriormente en ensayos de RMN, la ruptura de los dioles vecinales en medio acuoso lleva a la formación de aldehídos hidratados, es decir de un GF diol geminal (-CH(OH)₂). Esto, explica la ausencia de bandas características de aldehídos en el espectro de p-AM-AEMA-BIS- α -oxo-ALD(10) y la presencia de bandas características de alcoholes en este material, luego del clivaje de los entrecruzamientos frente a periodato. Las señales generalmente observadas en aminas se encuentran solapadas por la absorción de otros GF presentes en el polímero: estiramiento -NH₂ (3500 a 3200 cm⁻¹) se encuentra en la región de intensa absorbancia de estiramiento O-H; la señal de deformación -NH₂ (1610 cm⁻¹, ausente en DAT y presente en ambos hidrogeles) podría corresponder tanto a los GF aminos de AEMA como a los GF amida de p-AM. De la misma manera, la señal correspondiente al estiramiento C=N de iminas es generalmente observada en la región de 1690 a 1520 cm⁻¹, la cual se solapa con la región de estiramiento C=O, donde podrían absorber los carbonilos de acrilamida, AEMA, BIS y DAT o su producto de oxidación.

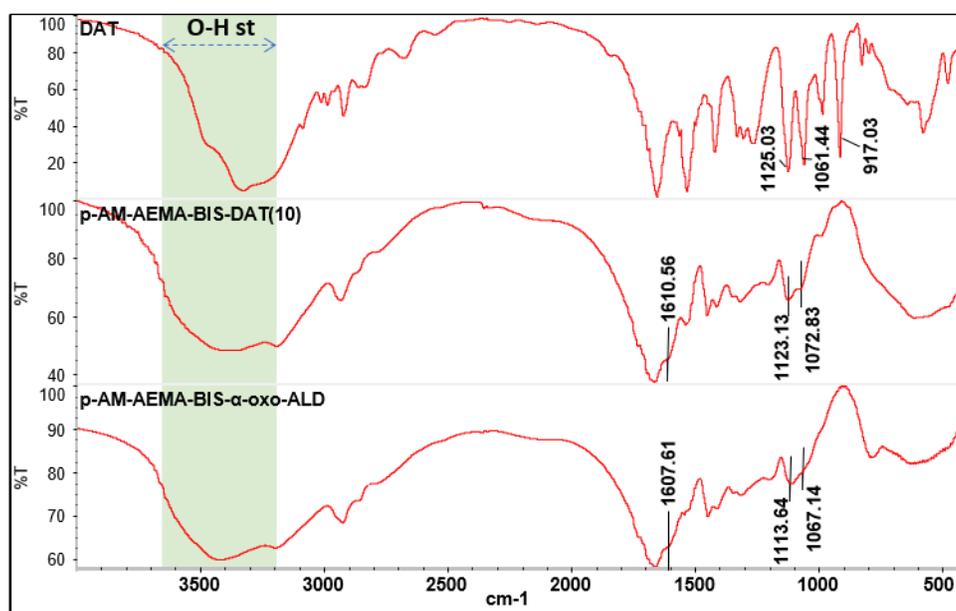


Figura 4.9 - FT-IR de DAT, p-AM-AEMA-BIS-DAT(10) y p-AM-AEMA-BIS- α -oxo-ALD(10).

ESPECTROSCOPÍA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

El HG p-AM-AEMA-BIS- α -oxo-ALD(10), se estudió mediante RMN para caracterizar la naturaleza química de la red polimérica luego de la oxidación con periodato. Para ello, el gel fue liofilizado, mortereado y reinchado en D₂O. En la Figura 4.10 puede observarse el espectro de ¹H-RMN. Las anchas señales son un indicio de la baja movilidad de las cadenas, debido a la estructura del polímero entrecruzado. Sin embargo, se distinguen algunas de las señales de los H principales del polímero como las de la cadena principal a 1,70 ppm (-CH₂) y 2,29 ppm (-CH-) y las de amida (-NH₂) de p-AM a 7,09 y 7,82 ppm [17], [18]. Se observan también dos pequeños hombros que podrían indicar la presencia del aldehído en la red polimérica: el pico a 5,33 ppm correspondiente al H del aldehído hidratado (-CH(OH)₂) y la señal a 3,23 ppm, de los H del metileno adyacente a la amida en la cadena lateral del aldehído (-CH₂-NH-R).

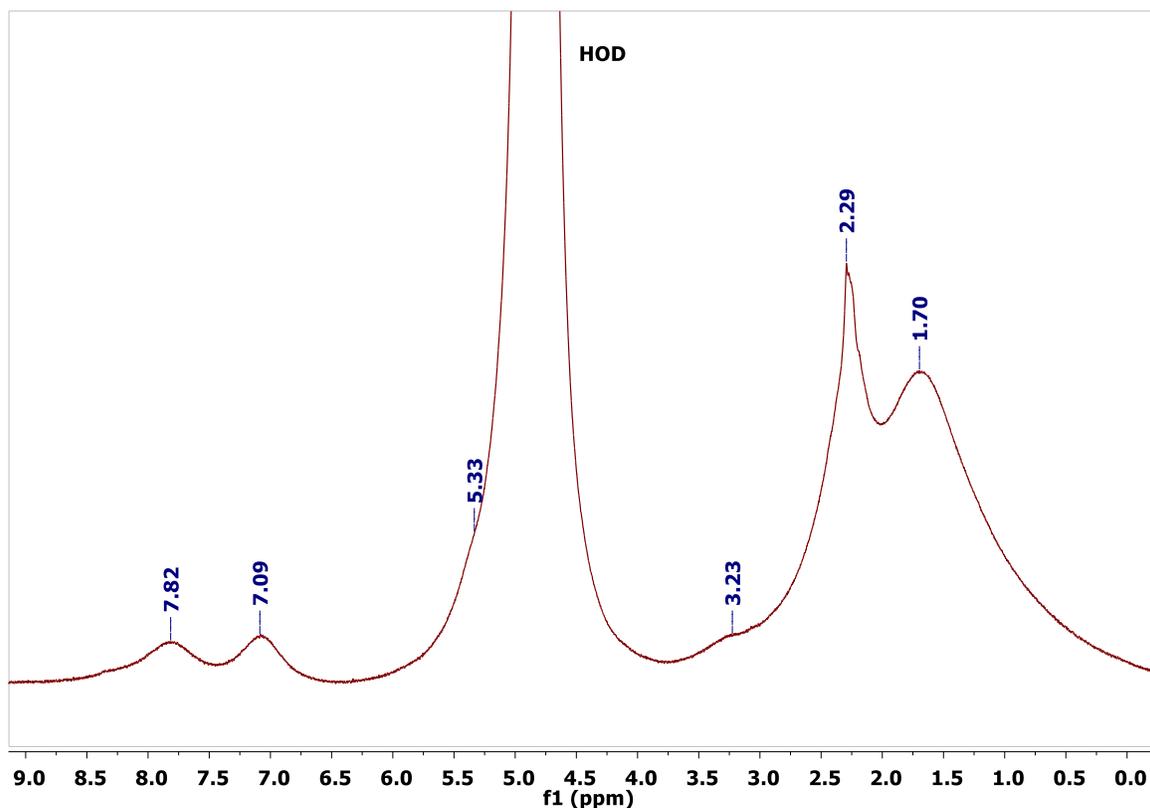


Figura 4.10 - Espectro de ¹H-RMN de p-AM-AEMA-BIS- α -oxo-ALD(10) en D₂O.

Por otro lado, las señales en el espectro de ^{13}C pueden distinguirse con mayor claridad, debido al desacoplamiento C-H utilizado en la técnica (Figura 4.11). Se diferencian las señales características de los C de p-AM, tanto de la cadena principal o *backbone* (señales *i* y *g* en la Figura 4.11) como la del carbono de la amida (señal *a*) [17]. Además, se destacan las señales características del α -oxo-aldehído hidratado a 87,10 ppm ($-\text{CH}(\text{OH})_2$) y 172,48 ppm ($-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}(\text{OH})_2$), indicando que el clivaje de DAT frente a periodato de sodio lleva a la formación del GF aldehído, tal y como se demostró en el Capítulo anterior [19]. Las señales *j* y *e* en la Figura 4.11 indican la incorporación del monómero AEMA en la red polimérica [20]. La baja proporción del monómero AEMA en la red (5% mol) se refleja en la baja intensidad de las señales respecto de otras en el polímero. Además, la señal de mayor intensidad en p-AEMA es la que corresponde a su carbono cuaternario (*h*), mientras que las otras son habitualmente menos intensas [20]. Por otro lado, no se observaron señales que indicasen la posible presencia de iminas (en el rango de 150 a 180 ppm) ni de hemiaminales (60 a 90 ppm) estables [13]. Sin embargo, esto no implica su ausencia, sino que debe considerarse que las iminas/hemiaminales formados estarían en baja proporción, inclusive menor a la de AEMA (es decir, menor al 5%), dificultando su detección mediante las técnicas espectroscópicas ensayadas.

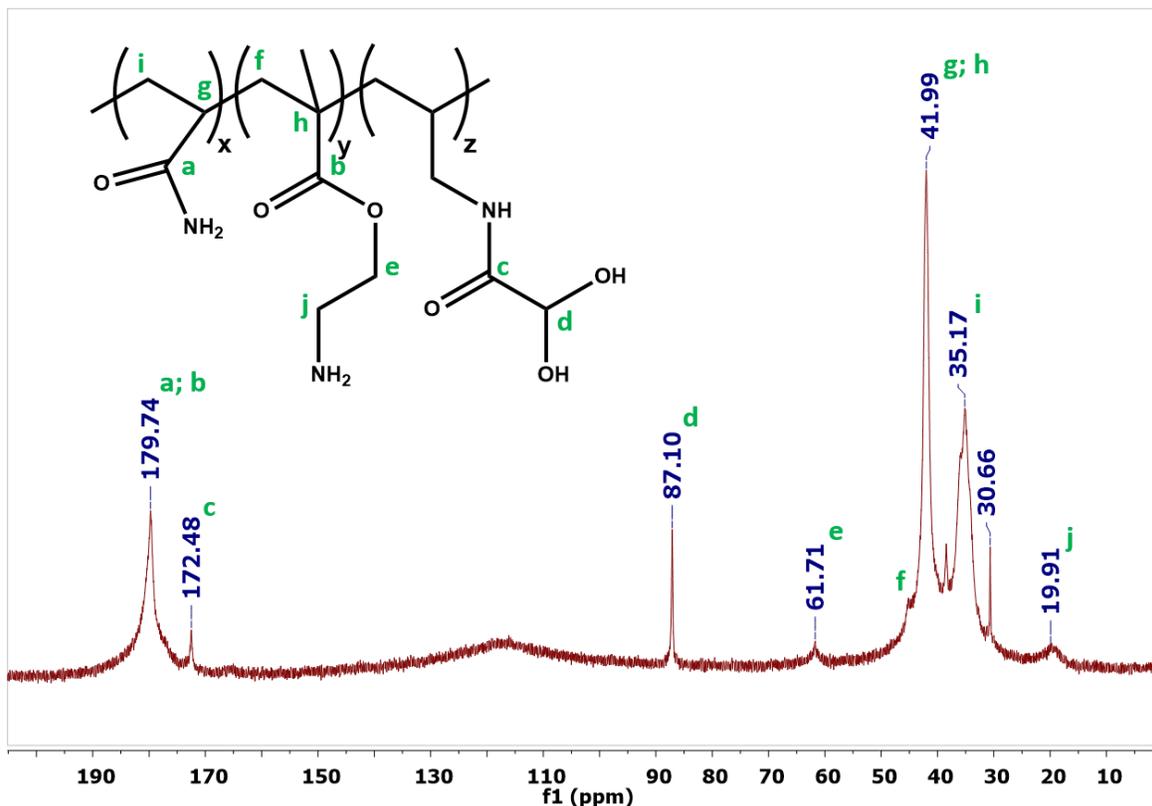


Figura 4.11 - Espectro de ¹³C-RMN de p-AM-AEMA-BIS-α-oxo-ALD(10) en D₂O.

ENSAYO TNBS

Para demostrar la presencia de grupos funcionales amina en los hidrogeles sintetizados, se realizó un ensayo químico de reactividad de aminas frente a ácido picrilsulfónico (TNBS). Este reactivo, que posee una coloración amarilla en solución, reacciona con aminas primarias para formar compuestos de color rojo, permitiendo la detección cualitativa o cuantitativa de grupos funcionales amina. Para utilizar como blanco, se sintetizaron geles de p-AM-BIS-DAT(10), es decir, en ausencia del monómero AEMA. El ensayo fue realizado sobre hidrogeles de p-AM-BIS-DAT(10), p-AM-BIS-α-oxo-ALD(10), p-AM-AEMA-BIS-DAT(10) y p-AM-AEMA-BIS-α-oxo-ALD(10). La coloración observada luego de la reacción de los geles con TNBS indica la ausencia de GF amino en los geles de p-AM-BIS-DAT(10) y p-AM-BIS-α-oxo-ALD(10), donde sólo se percibe el color amarillo típico de la solución de TNBS (Figura 4.12, 1 y 2, respectivamente). En cambio, se observó un color rojo intenso en los hidrogeles

de p-AM-AEMA-BIS-DAT(10) y p-AM-AEMA-BIS- α -oxo-ALD(10) (Figura 4.12, 3 y 4, respectivamente), luego de su reacción con TNBS. Este cambio de color confirma la presencia de GF amina, tanto antes como después del tratamiento de los geles con periodato, en los geles sintetizados en presencia del monómero AEMA, confirmando lo observado mediante espectroscopía de ^{13}C -RMN.

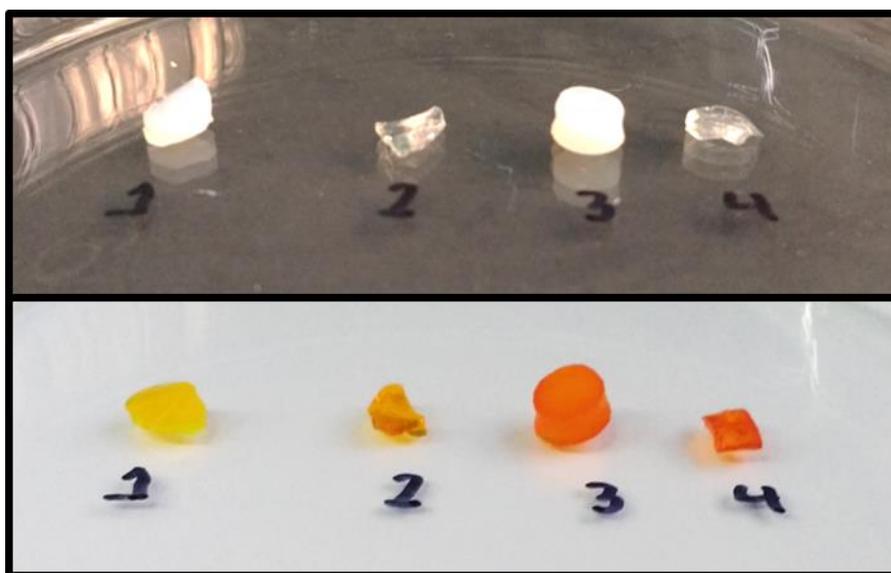


Figura 4.12 - Ensayo de identificación de grupos funcionales amino en hidrogeles de p-AM-BIS-DAT(10) (1), p-AM-BIS- α -oxo-ALD(10) (2), p-AM-AEMA-BIS-DAT(10) (3) y p-AM-AEMA-BIS- α -oxo-ALD(10) (4) previo a la adición de TNBS (arriba) y luego de la reacción con TNBS (abajo). La coloración rojiza indica la presencia de GF amino en la matriz.

ESTUDIOS SOBRE LA FORMACIÓN DE IMINAS LUEGO DEL TRATAMIENTO CON PERIODATO.

La presencia de GF amino junto a α -oxo-aldehídos en los hidrogeles, podría llevar a la formación de enlaces covalentes reversibles del tipo imina, en los hidrogeles modificados con periodato. El equilibrio en la formación e hidrólisis de este enlace dinámico es dependiente de la estructura química de los reactivos y de las condiciones del medio, principalmente del pH [21]. Para evaluar la posible formación de enlaces imina en los hidrogeles, y su dependencia con el pH, se midieron los cambios en las propiedades de

hinchamiento de los geles con el pH, antes y después de ser tratados con periodato. Para ello, cuatro muestras de los geles p-AM-AEMA-BIS-DAT(10) (geles con GF amino pero sin aldehídos), p-AM-AEMA-BIS- α -oxo-ALD(10) (con GF aldehídos y aminos) y p-AM-BIS- α -oxo-ALD(10) (con GF aldehído pero sin aminos) se llevaron a sequedad para favorecer la formación de enlaces imina durante el secado. Luego, los geles fueron rehinchados hasta el equilibrio en buffers pH: 5,3; 6,3; 7,3 y 8,1 (Concentración: 0,02 M; Fuerza Iónica: 0,06 M) y se calculó el valor de su ESR (Figura 4.13).

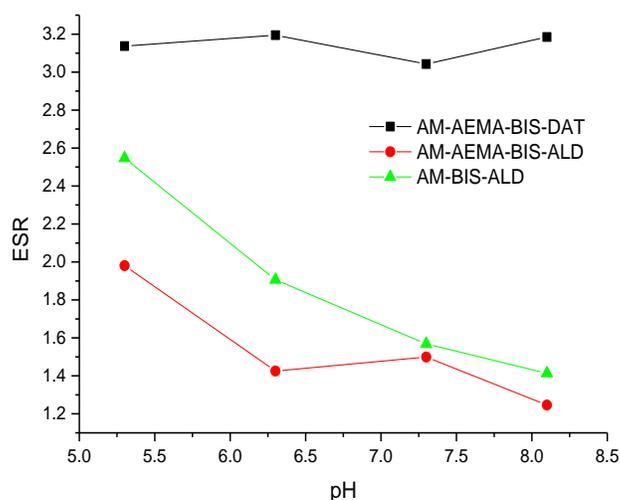


Figura 4.13 - Grado de hinchamiento en equilibrio (ESR) de hidrogeles de p-AM-AEMA-BIS-DAT(10) (cuadrados, negro), p-AM-AEMA-BIS- α -oxo-ALD(10) (círculos, rojo) y p-AM-BIS- α -oxo-ALD(10) (triángulos, verde) a diferentes pHs.

Los geles de p-AM-AEMA-BIS-DAT(10), que no fueron oxidados frente a NaIO_4 no mostraron variación considerable de su hinchamiento en equilibrio con el pH de la solución. La presencia de GF amino podría otorgar una dependencia del hinchamiento del material con el pH, por la formación de cargas iónicas en la red. Según datos de literatura, el pKa de poli(2-aminoetil metacrilato) es de aproximadamente 7,6 [22]. Esto indicaría que en un pH por debajo de ese valor, la mayoría de los grupos amino se encontrarían protonados,

generando cargas electrostáticas positivas. Por lo general, la repulsión electrostática lleva a un aumento en el grado de hinchamiento de los hidrogeles [23]. Por ende, se podría esperar que a pHs ácidos, los hinchamientos sean mayores en los geles conteniendo AEMA y que el valor de ESR disminuya a medida que el pH aumenta. En el caso de p-AM-AEMA-BIS-DAT no se observó una variación significativa. La dependencia del hinchamiento con el pH en redes con GF ionizables es dependiente de la cantidad del GF ionizable en la red, como también del grado de entrecruzamiento del material (afectando a su capacidad de expansión) y de la fuerza iónica de la solución [24]. La baja dependencia del ESR de p-AM-AEMA-BIS-DAT con el pH, podría deberse a la baja cantidad de AEMA utilizado en la síntesis (5% mol, respecto al total de monómeros); al alto grado de entrecruzamiento (se utilizaron 15 % mol de agentes entrecruzantes, respecto del total de monómeros), que se refleja en los bajos valores de ESR observados; y la fuerza iónica de las soluciones *buffer* utilizadas.

El comportamiento de hinchamiento en geles de p-AM-AEMA-BIS-DAT(10) y p-AM-BIS-DAT(10) luego del tratamiento con periodato (p-AM-AEMA-BIS- α -oxo-ALD(10) y p-AM-BIS- α -oxo-ALD(10)) mostró mayor dependencia con el pH. Como se mencionó anteriormente, previo al hinchamiento en soluciones *buffer*, los geles fueron llevados a sequedad para favorecer la formación de enlaces imina. Luego de su hinchamiento en las distintas soluciones *buffers*, ambos sistemas mostraron una tendencia equivalente en el hinchamiento, con mayores valores de ESR a pHs ácidos y menores valores a medida que el pH aumentó. Este comportamiento podría corresponderse con la formación de enlaces imina en los geles de p-AM-AEMA-BIS- α -oxo-ALD(10). En general, los enlaces imina son reversibles y su hidrólisis es catalizada en medios ácidos, mientras que el porcentaje de ruptura del enlace es considerablemente menor en medios neutros o básicos [25]. Además, los resultados obtenidos por Hoefnagel y colaboradores en la reacción de aminas primarias frente a ácido glicólico (un α -oxo aldehído), mostraron una tendencia equivalente, donde el equilibrio se vió desplazado hacia la formación de iminas a valores de pH básicos [13]. Por lo tanto, los máximos valores de hinchamiento a valores de pH ácidos podrían deberse a un mayor porcentaje de hidrólisis de los entrecruzamientos de tipo imina (formados durante el secado, previo al hinchamiento).

Por otro lado, es notoria la dependencia del ESR con el pH en los geles de p-AM-BIS-ALD. En este caso, la ausencia de GF amino no prevé la formación de cargas electrostáticas ni enlaces imina en la red. Además, no se encuentran reportes que indiquen dependencia del hinchamiento en geles de poli(acrilamida) con el pH. Por lo tanto, es posible que este comportamiento se deba a la presencia de los GF α -oxo-aldehído, los cuales podrían formar hemiacetales o acetales entre sí, como ha sido previamente descrito en α -oxo-aldehídos como glioxal [26], [27]. La hidrólisis de hemiacetales o acetales es también catalizada por el medio ácido, lo que podría explicar la dependencia del ESR con el pH [25]. Otra posible reacción podría darse entre GF aldehído y los grupos amida de la matriz de p-AM, para generar nuevos entrecruzamientos en condiciones básicas, como se ha reportado en literatura [28].

Debido al bajo porcentaje de los GF amino en los hidrogeles y a la baja movilidad de las cadenas en los polímeros, las técnicas espectroscópicas no permitieron verificar la presencia de enlaces imina o hemiacetales/acetales en los materiales. Sin embargo, se observó una clara dependencia de las propiedades de los hidrogeles con el pH, en los materiales modificados con GF aldehído. La naturaleza química de estas interacciones en dichos hidrogeles ha de ser elucidada en futuros estudios. No obstante, como se describe en la siguiente sección, la formación de enlaces imina, debidos a la reacción de los GF amino de AEMA y los GF α -oxo-aldehídos, se evidenció en ensayos de clivaje de entrecruzamientos en geles de p-AM-AEMA-DAT(10) y p-AM-DAT(10).

CLIVAJE TOTAL DE ENTRECruzAMIENTOS COVALENTES

Se ensayó el clivaje, con NaIO_4 , de los entrecruzamientos en hidrogeles entrecruzados solamente con el agente DAT. La comparación cualitativa del comportamiento de degradación en geles de p-AM-AEMA-DAT(10) y p-AM-DAT(10), permitió visualizar efectos de la presencia de GF amino en la red de p-AM-AEMA-DAT(10), frente a la generación de α -oxo-aldehídos por clivaje de DAT. En la Figura 4.14 se observan fotografías tomadas durante la reacción de los geles frente a periodato de sodio, a distintos tiempos. Antes del agregado

de periodato ($t = 0$) se observan los discos de hidrogeles previamente hinchados en agua. Luego de adicionar la solución del oxidante, se observó la digestión paulatina de los hidrogeles durante la primera hora de reacción. Posteriormente, los geles fueron completamente digeridos para dar lugar a líquidos viscosos. En ambos casos, los materiales permanecieron en estado líquido al menos durante las primeras 8 h, observándose un creciente aumento de la viscosidad en p-AM-AEMA- α -oxo-ALD(10).

Luego de 24 h, el polímero conteniendo grupos amino formó un gel capaz de mantener la forma del molde en que fue formado, mientras p-AM- α -oxo-ALD(10) se mantuvo en estado líquido. Este comportamiento sugiere que la presencia de GF amino frente a los α -oxo-aldehídos genera fuertes interacciones que llevan a la formación de una red polimérica tridimensional. Dichas interacciones podrían deberse a la formación de enlaces imina.

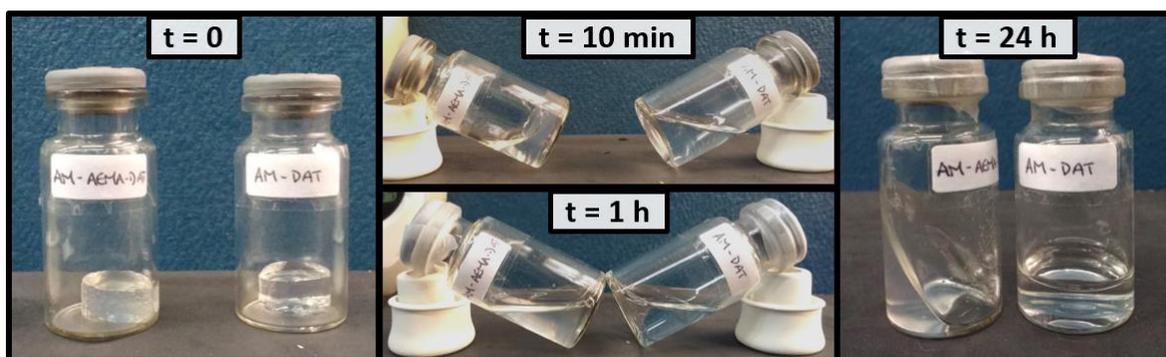


Figura 4.14 - Clivaje de entrecruzamientos debidos a DAT en geles de p-AM-AEMA-DAT(10) y p-AM-DAT(10) y su evolución en el tiempo.

Para comprobar la naturaleza química de las interacciones en p-AM-AEMA- α -oxo-ALD(10), se tomaron 0,2 mL del digerido (previo a su gelificación en el tiempo) y se diluyeron en D₂O dentro de un tubo de RMN.

Se llevó a cabo el ensayo espectroscópico, obteniéndose un espectro más definido que el conseguido anteriormente en geles de p-AM-AEMA-BIS- α -oxo-ALD(10), dada la mayor movilidad de las cadenas y homogeneidad de la muestra. En el espectro (Figura 4.15) se

distinguen con claridad las señales debidas a p-AM: H de la cadena principal a 1,65 y 1,76 ppm (-CH₂); 2,19 ppm y 2,33 (-CH-) y H de la amida (-NH₂) de p-AM a 7,82 y 7,09 ppm.

Además, se observan señales correspondientes a p-AEMA: 1,19 ppm (-CH₃ unido a la cadena principal) y 3,35 ppm (-CH₂-NH₂).

En el espectro, también se advierte la presencia de señales provenientes de GF α -oxo-aldehído provenientes del clivaje de DAT. Parte de estos aldehídos se encuentran anclados a la red, evidenciados por la señal a 3,21 ppm, correspondiente al metileno adyacente a la amida (-CH₂-NH-C(O)CH(OH₂)). Otra parte, corresponde a vinil-aldehídos generados, luego del tratamiento con periodato, a partir de unidades de DAT que se unieron solamente por un extremo vinílico a la matriz polimérica (señales a 5,86 y 5,21 ppm de H vinílicos; y señal a 3,85 ppm del metileno adyacente a la amida).

La reacción de GF α -oxo-aldehídos con GF amino para formar un enlace imina es evidenciada por la aparición de una señal a 7,67 ppm (-CH=NH-). Este corrimiento es similar al reportado por Hoefnagel y colaboradores en la formación de una imina entre ácido glioxílico (un α -oxo-aldehído) y *N*-metilamina (7,69 ppm) [13].

Por lo tanto, las observaciones realizadas sobre las reacciones de clivaje de p-AM-DAT(10) y p-AM-AEMA-DAT(10) y la posterior caracterización espectroscópica de p-AM-AEMA- α -oxo-ALD(10) indicarían la formación de enlaces imina en los hidrogeles que contienen al grupo amino, luego de la generación de GF α -oxo-aldehído por clivaje oxidativo de DAT.

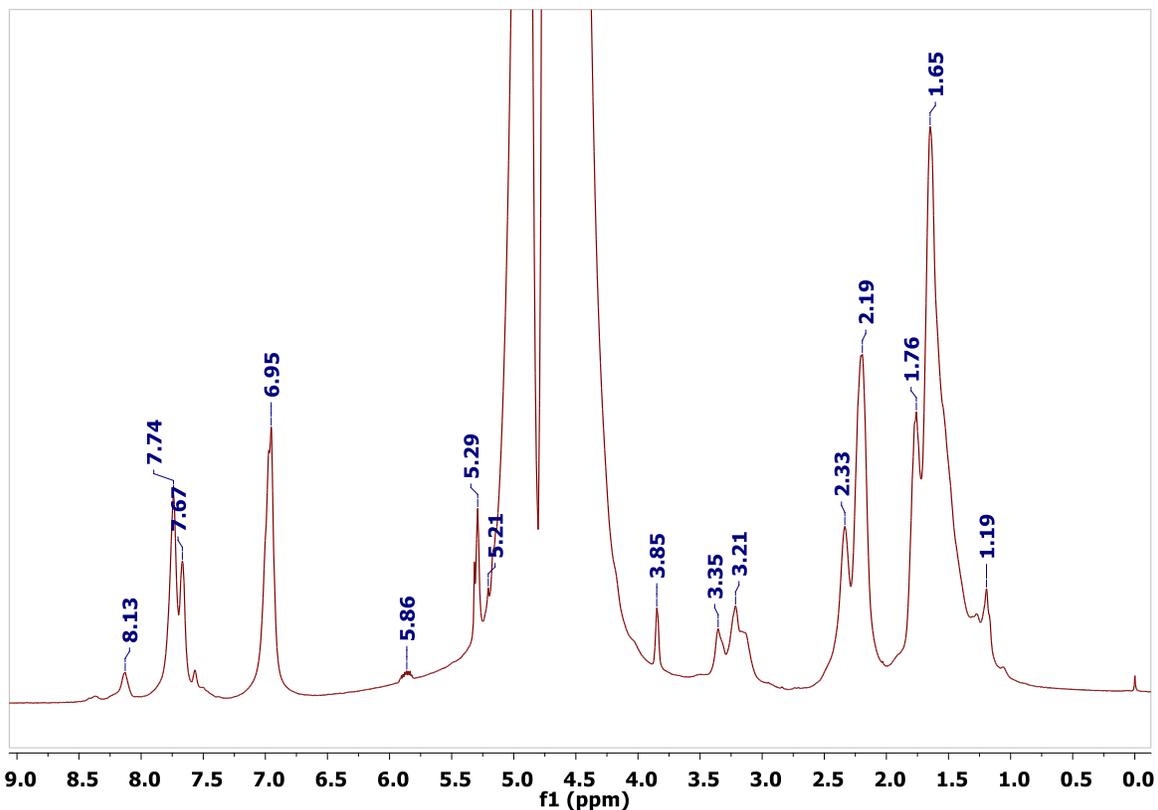


Figura 4.15 - $^1\text{H-RMN}$ de *p-AM-AEMA-BIS- α -oxo-ALD(10)*.

4.5 - CONCLUSIONES PARCIALES

Se obtuvieron nuevos hidrogeles basados en los monómeros acrilamida (AM), 2-aminoetil metacrilato (AEMA) y los entrecruzantes (+)-*N,N'*-dialiltartradiamida (DAT) y *N,N'*-metilenbis(acrilamida) (BIS), y se analizaron sus propiedades de hinchamiento, reológicas y espectroscópicas. Los distintos ensayos mostraron creciente incorporación del entrecruzante DAT al aumentar su concentración en la síntesis, generando cambios en las propiedades mecánicas y de hinchamiento en los materiales. Además, el tratamiento de estos geles frente a soluciones de periodato de sodio llevó al clivaje de los entrecruzamientos debidos a DAT, manifestando cambios en las propiedades de hinchamiento de los geles. Mediante técnicas espectroscópicas, se comprobó la formación de GF α -oxo-aldehído en la red, luego del clivaje de DAT frente a periodato.

La presencia de GF amino en los hidrogeles, debidos a la incorporación del monómero AEMA, junto a la presencia de GF α -oxo-aldehído obtenidos por el clivaje de DAT, llevó a la formación de nuevas interacciones pH dependientes en los hidrogeles, posiblemente enlaces de tipo imina, según se

comprobó mediante $^1\text{H-RMN}$. Además, de manera similar, se observó que la sola presencia de GF α -oxo-aldehído genera interacciones pH dependientes en las redes, con un comportamiento cinético distinto al obtenido en presencia de aminos. La estructura química de estas interacciones no ha sido aún elucidada, pero podrían deberse a la formación de hemiacetales/acetales o a la reacción de los aldehídos con los GF amida del hidrogel.

PERSPECTIVAS

Para lograr un mayor entendimiento de los fenómenos físico-químicos observados en los ensayos realizados y evaluar las potenciales aplicaciones de estos materiales, se propone:

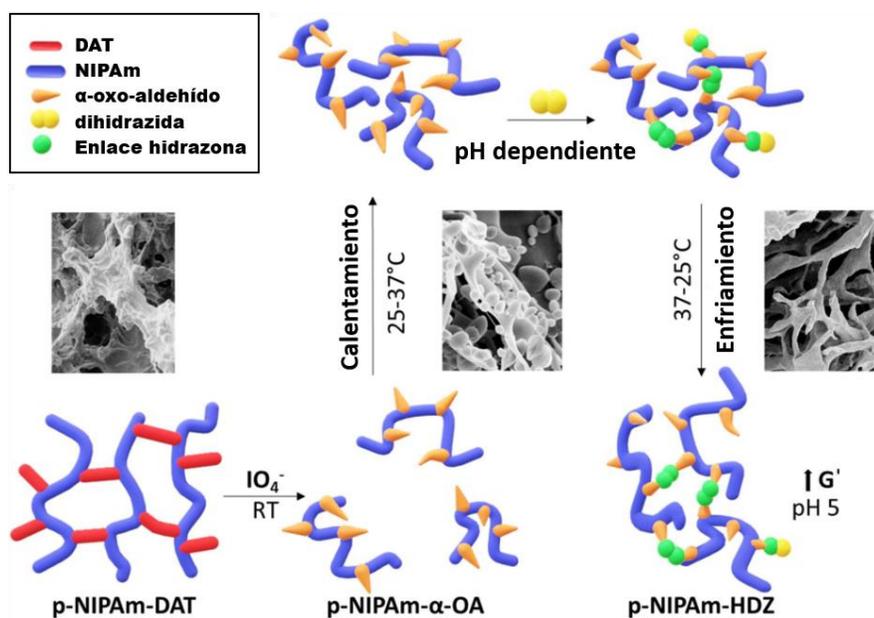
- Sintetizar nuevos hidrogeles con menor porcentaje del entrecruzante BIS y mayor contenido de AEMA: esto facilitaría la caracterización química de los fenómenos observados, mediante métodos espectroscópicos. Además, el menor grado de entrecruzamiento podría hacer más evidente a los cambios en las propiedades mecánicas y de hinchamiento de los materiales frente a la oxidación con periodato o a cambios en el pH del medio.
- Estudiar la dependencia de las propiedades mecánicas y de hinchamiento en los geles formados por p-AM-AEMA-BIS- α -oxo-ALD(10), a distintos valores de pH. Esto permitiría corroborar la presencia de enlaces covalentes reversibles en los hidrogeles y su dependencia con las condiciones del medio.
- Evaluar propiedades de autocurado, memoria de forma y cinética de gelificación. Luego de un estudio más profundo de las interacciones producidas entre los GF α -oxo-aldehído y aminos, y su dependencia con el pH, se podrían evaluar diferentes aplicaciones relacionadas al uso de enlaces covalentes dinámicos y a la gelificación espontánea de los materiales.

4.6 - REFERENCIAS

- [1] R. J. Wojtecki, M. a Meador, and S. J. Rowan, "Using the dynamic bond to access macroscopically responsive structurally dynamic polymers.," *Nat. Mater.*, vol. 10, no. 1, pp. 14–27, Jan. 2011.
- [2] Y. Zhang, L. Tao, S. Li, and Y. Wei, "Synthesis of multiresponsive and dynamic chitosan-based hydrogels for controlled release of bioactive molecules," *Biomacromolecules*, vol. 12, no. 8, pp. 2894–2901, 2011.
- [3] H. Xiao, W. Lu, X. Le, C. Ma, Z. Li, J. Zheng, J. Zhang, Y. Huang, and T. Chen, "A multi-responsive hydrogel with a triple shape memory effect based on reversible switches," *Chem. Commun.*, vol. 52, no. 90, pp. 13292–13295, 2016.
- [4] B. Gupta, M. Tummalapalli, B. L. Deopura, and M. S. Alam, "Preparation and characterization of in-situ crosslinked pectin-gelatin hydrogels," *Carbohydr. Polym.*, vol. 106, no. 1, pp. 312–318, 2014.
- [5] J. Weihang, D. Panus, R. N. Palumbo, R. Tang, and C. Wang, "NIH Public Access Author Manuscript Biomacromolecules. Author Poly(2-aminoethyl methacrylate) with well-defined chain-length for DNA vaccine delivery to dendritic cells," *Biomacromolecules*, vol. 12, no. 12, pp. 612–626, 2012.
- [6] G. Bisht, M. G. H. Zaidi, and B. Kc, "In vivo Acute Cytotoxicity Study of Poly(2-amino ethyl methacrylate-co-methylene bis-acrylamide) Magnetic Composite Synthesized in Supercritical CO₂," *Macromol. Res.*, vol. 26, no. 7, pp. 581–591, 2018.
- [7] N. Chanthaset, H. Ajiro, M. Akashi, and C. Choochottiros, "A novel comb-shaped polymethacrylate-based copolymers with immobilized 2,4-dihydroxybenzaldehyde for antifungal activity," *Polym. Bull.*, vol. 75, no. 4, pp. 1349–1363, 2018.
- [8] F. Farjadian, S. Schwark, and M. Ulbricht, "Novel functionalization of porous polypropylene microfiltration membranes: Via grafted poly(aminoethyl methacrylate) anchored Schiff bases toward membrane adsorbers for metal ions," *Polym. Chem.*, vol. 6, no. 9, pp. 1584–1593, 2015.
- [9] T. Tigges, D. Hoenders, and A. Walther, "Preparation of Highly Monodisperse Monopatch Particles with Orthogonal Click-Type Functionalization and Biorecognition," *Small*, vol. 11, no. 35, pp. 4540–4548, 2015.
- [10] O. Kornyšova, R. Jarmalavičiene, and A. Maruška, "A simplified synthesis of polymeric nonparticulate stationary phases with macrocyclic antibiotic as chiral selector for capillary electrochromatography," *Electrophoresis*, vol. 25, no. 16, pp. 2825–2829, 2004.
- [11] K. K. R. Tetala, B. Chen, G. M. Visser, and T. a van Beek, "Single step synthesis of carbohydrate monolithic capillary columns for affinity chromatography of lectins.," *J. Sep. Sci.*, vol. 30, no. 17, pp. 2828–35, 2007.
- [12] A. Khaparde, M. A. Vijayalakshmi, and K. K. R. Tetala, "Preparation and characterization of a Cu (II)-IDA poly HEMA monolith syringe for proteomic applications," *Electrophoresis*, vol. 38, no. 22–23, pp. 2981–2984, 2017.
- [13] A. J. Hoefnagel, J. A. Peters, and H. Vanbekkum, "The Reaction of Glyoxylic Acid with Ammonia Revisited," *J. Org. Chem.*, vol. 57, no. 14, pp. 3916–3921, 1992.

- [14] T. Caykara, S. Kiper, and G. Demirel, "Thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide) hydrogels: Synthesis, swelling and interaction with ionic surfactants," *Eur. Polym. J.*, vol. 42, no. 2, pp. 348–355, 2006.
- [15] A. Peters and S. J. Candau, "Kinetics of Swelling of Spherical and Cylindrical Gels," *Macromolecules*, vol. 21, no. 7, pp. 2278–2282, 1988.
- [16] D. S. Jones, "Dynamic mechanical analysis of polymeric systems of pharmaceutical and biomedical significance," *Int. J. Pharm.*, vol. 179, no. 2, pp. 167–178, 1999.
- [17] F. Ziaee, H. Bouhendi, and F. Ziaie, "NMR study of polyacrylamide tacticity synthesized by precipitated polymerization method," *Iran. Polym. J. (English Ed.)*, vol. 18, no. 12, pp. 947–956, 2009.
- [18] F. A. Bovey and G. V. D. Tiers, "Polymer NMR spectroscopy. IX. Polyacrylamide and polymethacrylamide in aqueous solution," *J. Polym. Sci. Part A Gen. Pap.*, vol. 1, no. 3, pp. 849–861, 1963.
- [19] O. Melnyk, "α - Oxo Aldehyde or Glyoxylyl Group Chemistry in Peptide Bioconjugation Ouafa a," 2013.
- [20] A. R. P. Figueiredo, A. G. P. R. Figueiredo, N. H. C. S. Silva, A. Barros-Timmons, A. Almeida, A. J. D. Silvestre, and C. S. R. Freire, "Antimicrobial bacterial cellulose nanocomposites prepared by in situ polymerization of 2-aminoethyl methacrylate," *Carbohydr. Polym.*, vol. 123, pp. 443–453, 2015.
- [21] C. Godoy-Alcántar, A. K. Yatsimirsky, and J. M. Lehn, "Structure-stability correlations for imine formation in aqueous solution," *J. Phys. Org. Chem.*, vol. 18, no. 10, pp. 979–985, 2005.
- [22] K. L. Thompson, E. S. Read, and S. P. Armes, "Chemical degradation of poly(2-aminoethyl methacrylate)," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 93, no. 8, pp. 1460–1466, 2008.
- [23] M. Rizwan, R. Yahya, A. Hassan, M. Yar, A. D. Azzahari, V. Selvanathan, F. Sonsudin, and C. N. Abouloula, "pH sensitive hydrogels in drug delivery: Brief history, properties, swelling, and release mechanism, material selection and applications," *Polymers (Basel)*, vol. 9, no. 4, 2017.
- [24] L. Brannon-Peppas and N. A. Peppas, "Equilibrium swelling behavior of pH-sensitive hydrogels," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 46, no. 3, pp. 715–722, 1991.
- [25] F. Seidi, R. Jenjob, and D. Crespy, "Designing Smart Polymer Conjugates for Controlled Release of Payloads," *Chem. Rev.*, vol. 118, no. 7, pp. 3965–4036, 2018.
- [26] F. Chastrette, M. Chastrette, J. C. Duplan, and J. Delmau, "Etude par RMN de la stéréochimie d'acétals du glyoxal," *Tetrahedron*, vol. 27, no. 22, pp. 5579–5585, 1971.
- [27] E. B. Whipple, "The Structure of Glyoxal in Water," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 92, no. 24, pp. 7183–7186, 1970.
- [28] S. Vail, C. Moran, and R. H. Barker, "The Formation of N,N'-dihydroxyethylenebisamides from Glyoxal and Selected Amides," *J. Org. Chem.*, vol. 30, no. 4, pp. 1195–1199, 1965.

SÍNTESIS Y MODIFICACIÓN POST-SÍNTESIS DE HIDROGELES TERMOSENSIBLES



En este capítulo se describe la obtención de hidrogeles termosensibles y su modificación post-síntesis para su funcionalización con grupos funcionales α-oxo-aldehído. Se estudió la formación de enlaces hidrazona y su dependencia con el pH y la temperatura del medio.

5.1 - CONSIDERACIONES GENERALES

HIDROGELES DE p-NIPAm

Los hidrogeles inteligentes se encuentran en permanente desarrollo debido a su rol como materiales funcionales. Su habilidad para sentir cambios en su entorno y actuar en consecuencia, modificando sus propiedades, propone su utilización en diversas áreas en las que son programados para responder de manera previsible y útil. Estas respuestas inteligentes complementan e incrementan las ventajosas propiedades de los hidrogeles, discutidas en capítulos anteriores, por ejemplo: su capacidad de hinchamiento en diversas soluciones, semejanza con tejidos biológicos, control de sus propiedades mecánicas, porosidad, versatilidad química, etc. Esta combinación ha llevado al desarrollo de hidrogeles inteligentes capaces de operar con utilidad, inclusive en entornos complejos como los biológicos [1]–[3]. Particularmente, los hidrogeles termosensibles son de los materiales inteligentes más estudiados. Éstos, se caracterizan por cambiar sus propiedades fisicoquímicas ante variaciones en la temperatura del medio. En la mayoría de los casos, este cambio se produce a una determinada temperatura o en un corto rango de temperaturas, cuyo valor medio es definido como la temperatura de transición de fase (T_{tf}) o temperatura de transición térmica del polímero. Generalmente, cuando el medio tiene una temperatura menor a la T_{tf}, el gel se encuentra en su estado de máximo hinchamiento, mientras que, si se supera dicha temperatura, el gel colapsa expulsando gran parte del líquido que contenía en su interior (Figura 5.1). Este fenómeno es aprovechado en diversas aplicaciones, por ejemplo, en la liberación de un fármaco contenido en la solución de hinchamiento del gel, el aprovechamiento de la fuerza mecánica y cambio de volumen del gel para el desarrollo de actuadores, la gelación de un polímero en solución mediante el estímulo térmico, entre otras.

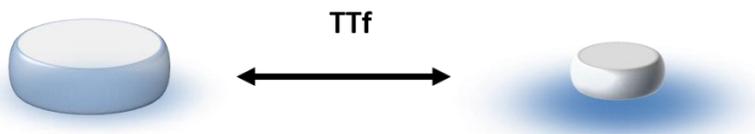


Figura 5.1 - Hinchamiento/colapso reversible de un hidrogel, inducido por un cambio de temperatura.

Los hidrogeles sintetizados a partir del monómero *N*-isopropilacrilamida (NIPAm) colapsan de manera reversible a una temperatura (T_{tf}) de alrededor de 32 °C [4]. Estos HGs son los más estudiados, ya que la T_{tf} se encuentra cercana a la temperatura corporal (37 °C). Además, mediante la copolimerización del monómero NIPAm con otros comonómeros, es posible modificar la T_{tf} del hidrogel sintetizado, alcanzando valores de 37 °C o superiores. Por otro lado, la posibilidad de combinar al monómero termosensible con otros monómeros, con estructuras inorgánicas, colorantes, agentes de refuerzo, entre otros, ha permitido obtener hidrogeles inteligentes con respuesta a más de un estímulo. Por ejemplo, HGs termo- y pH- sensibles [5]; magnéticos y termosensibles [6]; termosensibles y biodegradables [7], con respuesta térmica inducida por irradiación con luz [8], entre otras [9]. Esta versatilidad, sumado a la posibilidad de controlar la temperatura de transición según se requiera, ha propuesto el desarrollo de numerosos materiales inteligentes para su aplicación en diversas áreas, donde se destaca el desarrollo de aplicaciones biomédicas para su utilización en liberación controlada de fármacos, cultivo de tejidos celulares, membranas, entre otras, tanto en la macro como en la micro o nano escala (Figura 5.2) [4].

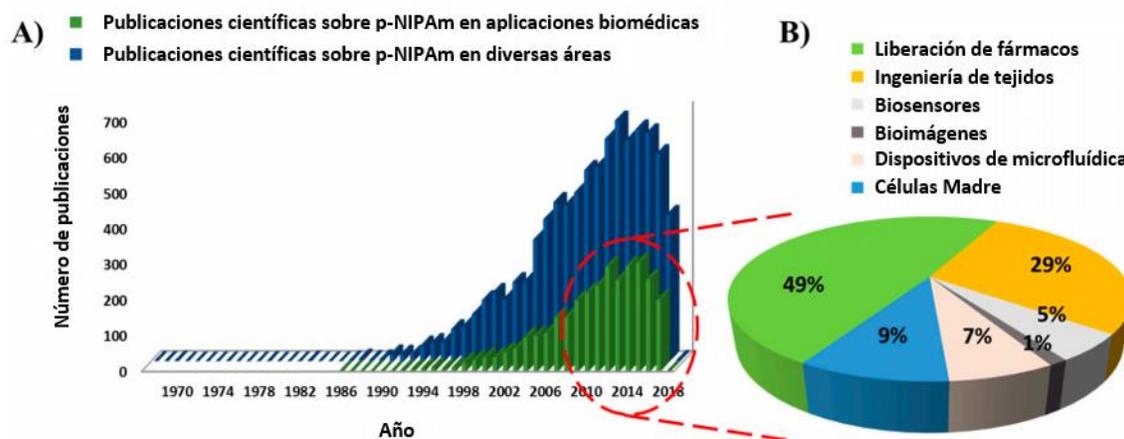


Figura 5.2 - (A) Evolución de artículos publicados acerca de poli(*N*-isopropilacrilamida) y su aplicación en el área biomédica y otros campos, por año; y (B) porcentaje de artículos de investigación publicados sobre la aplicación de p-NIPAm en el campo biomédico, clasificado por aplicación. Base de datos utilizada: Scopus® (Elsevier, Amsterdam, Holanda). Imagen adaptada de la revisión publicada por Lanzalaco y colaboradores [4].

CONTROL DEL GRADO DE ENTRECruzAMIENTO

Las numerosas aplicaciones de geles de p-NIPAm requieren de la síntesis de HGs con diversas y específicas propiedades físico-químicas, y es por ello que el control del grado de entrecruzamiento en estos HGs tiene un rol fundamental. Como se mencionó en capítulos anteriores, el grado de entrecruzamiento de un hidrogel afecta directamente a las propiedades del material: su capacidad de hinchamiento, su morfología, su porosidad y sus propiedades mecánicas.

Al ser NIPAm un monómero vinílico, por lo general, el control del grado de entrecruzamiento se da en la etapa de síntesis de los HGs, mediante la adición de un agente entrecruzante divinílico. El grado de entrecruzamiento en hidrogeles de NIPAm tiene efectos en la velocidad de la transición térmica (velocidad de colapso/hinchamiento) como así también en las propiedades de hinchamiento, mecánicas y en la porosidad del material, pero no tiene un efecto directo en su temperatura de transición [10]. Sin embargo, el entrecruzante podría modificar la T_{tr} por un efecto de su polaridad, como sucede con otros comonómeros [11].

Dada la amplia gama de posibles aplicaciones de este polímero, se han desarrollado hidrogeles con agentes entrecruzantes específicos que otorgan una propiedad inteligente adicional al material. Tal es el caso de hidrogeles con entrecruzamientos biodegradables por hidrólisis [7], [12] o escindibles ante un agente óxido-reductor [13], hidrogeles con entrecruzamientos supramoleculares [14], entre otros.

El control del grado de entrecruzamiento en geles de p-NIPAm, mediante el clivaje de dioles vecinales mediado por periodato, ha sido reportado en la modificación post-síntesis de nanogeles. Para ello, se utilizó al agente entrecruzante divinílico *N,N'*-(1,2-dihidroxietileno)bisacrilamida (DHEA) para la preparación de nanogeles huecos termosensibles [15], [16]; nanogeles *core-shell* de compartimientos múltiples [17] o para el estudio de la estructura química de nanogeles de p-NIPAm y poli(*N*-isopropilmetacrilamida) (p-NIPMAm) obtenidos mediante termoprecipitación [18], [19]. La utilización de dicho entrecruzante u otro de características equivalentes en macrogeles de p-NIPAm, no se encuentra reportada.

FUNCIONALIZACIÓN CON ALDEHÍDOS

Como se ha mencionado previamente, la obtención de GF aldehído en geles es de gran interés debido a las posibilidades de modificación que ese GF permite. Entre ellas, la modificación con hidrazinas, alcoholes, aminas y alcoxiaminas lleva a la formación de enlaces reversibles hidrazona, acetal (o hemiacetal), imina y oxima, respectivamente. Consecuentemente, dichos GF son utilizados en la inmovilización de biomoléculas, en química combinatorial, en el desarrollo de hidrogeles inyectables y de microgeles o micelas entrecruzadas, entre otros [20]. Por estas razones, es posible encontrar reportes sobre la síntesis y modificación de hidrogeles de p-NIPAm que incorporan el GF aldehído para el desarrollo de materiales inteligentes. La obtención de los GF aldehído en dichos polímeros procede generalmente a través de una serie de pasos. Por ejemplo, se pueden encontrar algunos reportes en donde se sintetizó y purificó un nuevo monómero, *N*-(2,2-dimetoxietil)metacrilamida (DMEMAm). Éste, tiene un GF aldehído protegido como acetal que, luego de la polimerización radicalaria, es desprotegido en medio ácido [21][22]. En otros casos, se combinó a p-NIPAm con polisacáridos que, por contener dioles vecinales, fueron tratados con periodato para lograr la formación de aldehídos en las cadenas de carbohidratos [23], [24]. En una aproximación similar, se copolimerizó a NIPAm con el comonómero monovinílico 2,3-dihidroxipropil metacrilato (DHOPMA) para luego tratar al polímero con NaIO_4 para formar GF aldehídos [12]. No se encontraron reportes sobre la copolimerización de (+)-*N,N'*-dialiltartradiamida (DAT) con NIPAm y tampoco sobre su modificación para formar GF aldehídos.

Además, tampoco se ha reportado la obtención de p-NIPAm con GF α -oxoaldehídos. Estos aldehídos han demostrado ser una herramienta de gran utilidad en el área de la bioconjugación [25], [26]. Por lo tanto, la síntesis de geles de p-NIPAm funcionalizados con α -oxoaldehídos podría permitir la bioconjugación del polímero termosensible con biomoléculas de interés, generando una amplia variedad de posibles aplicaciones, principalmente en el área de la biomedicina.

En este capítulo, la utilización del agente entrecruzante DAT (un portador de diol vecinal) en geles de p-NIPAm se utilizó para obtener α -oxo-aldehídos, luego del tratamiento de los

geles con periodato. Los productos se caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas y se ensayó el efecto de la temperatura y el pH en el comportamiento mecánico del polímero conteniendo aldehídos. Además, se ensayó la reactividad de los GF aldehído frente a dihidrazida de ácido adípico (AADH), a distintos valores de pH y temperaturas, obteniendo hidrogeles reticulados mediante enlaces hidrazona.

5.2 – OBJETIVOS

En este capítulo se propone aplicar la estrategia de síntesis y modificación post-síntesis desarrollada previamente, a la síntesis de polímeros termosensibles basados en *N*-isopropilacrilamida (NIPAm) y funcionalizados con α -oxoaldehídos. Además, se plantea el estudio de la formación de enlaces hidrazona ante distintas condiciones de reacción. Para ello se propuso:

- Estudiar la síntesis de hidrogeles termosensibles formados por el monómero *N*-isopropilacrilamida (NIPAm) y el agente entrecruzante (+)-*N,N'*-dialiltartrdiamida (DAT).
- Realizar la modificación post-síntesis de los HGs sintetizados, con el objetivo de generar GF α -oxoaldehídos, mediante el clivaje oxidativo de DAT. Caracterizar los productos de síntesis respecto a su estructura, funcionalidad y propiedades termosensibles.
- Analizar la reactividad de los GF α -oxoaldehídos para formar enlaces de tipo hidrazona considerando el efecto del pH y la temperatura en la reacción.

5.3 - MATERIALES Y MÉTODOS

REACTIVOS

Los siguientes reactivos se usaron tal como se recibieron: *N*-isopropilacrilamida (NIPAm) (Sigma-Aldrich); (+)-*N,N'*-dialiltartradiamida (DAT) (Sigma-Aldrich); *N,N,N',N'*-tetrametililetildiamina (TEMED) (Sigma); persulfato de sodio (NaPS) (Anedra); periodato de sodio (Sigma-Aldrich); dihidrazida de ácido adípico (AADH) (Anedra), etilenglicol (Sigma-Aldrich); bromuro de potasio (KBr) (Sigma-Aldrich); *tert*-butil carbazato (*t*-BC) (Aldrich); y solución de ácido picrilsulfónico 5 % (p/v) en H₂O (Sigma). Las soluciones se prepararon con agua ultrapura (18 MΩcm⁻¹) obtenida de un sistema Millipore Milli-Q® de purificación de agua.

SÍNTESIS DE HIDROGELES (HG_s)

Los HG_s se sintetizaron mediante polimerización a radicales libres, usando *N*-isopropilacrilamida (NIPAm) como monómero y (+)-*N,N'*-dialiltartradiamida (DAT) como agente entrecruzante (Figura 5.3A y B, respectivamente).

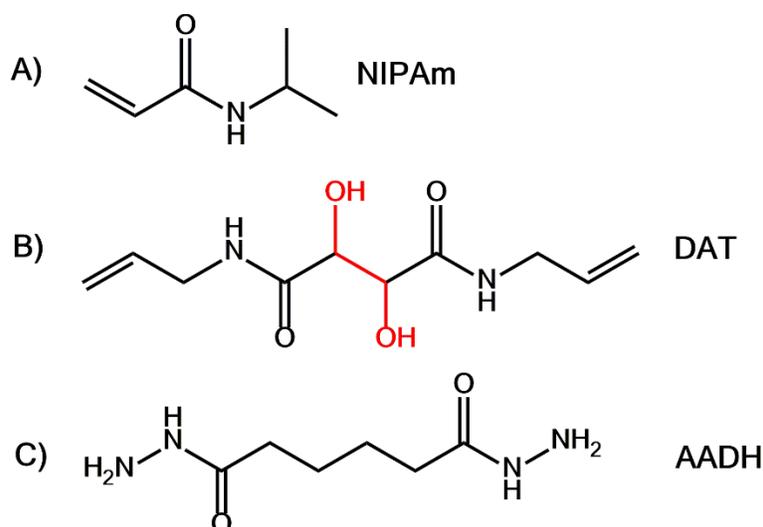


Figura 5.3 - Reactivos para síntesis y modificación de HG. A) *N*-isopropilacrilamida (NIPAm) (B) (+) *N,N'*-dialiltartradiamida (DAT). En DAT, los grupos funcionales hidroxilo se resaltan en rojo. C) Dihidrazida de ácido adípico (AADH).

Para sintetizar cada HG de p-NIPAm-DAT (ilustrado en la Figura 5.4), se disolvieron 0,7921 g de NIPAm y 0,1598 g de DAT (10 % mol con respecto a NIPAm) en 5 mL de agua ultrapura. Posteriormente, se disolvieron 0,0616 g de NaPS, y se eliminó el oxígeno de la muestra mediante burbujeo de N₂ durante 10 min. Luego, se inició la polimerización añadiendo 0,5 mL de una solución TEMED (0,32 M) a la mezcla de monómeros. Una vez que comenzó la reacción, la solución se colocó en una jeringa y se dejó reaccionar durante la noche, a 25 °C. Las síntesis se realizaron por quintuplicado. Los productos se obtuvieron en forma de barra y, posteriormente, se cortaron en discos de aproximadamente 5 mm de grosor y 1 cm de diámetro. Luego, cada disco se lavó completamente con agua durante 3 días para eliminar los reactivos que no fueron incorporados al polímero. Finalmente, los hidrogeles se secaron en un horno a 37 °C.

REACCIÓN DE CLIVAJE DE p-NIPAm-DAT CON PERIODATO

El procedimiento ha sido descrito en el Capítulo 2 para el clivaje de HGs de AM-DAT y publicado [27]. En resumen, una muestra de hidrogel seco p-NIPAm-DAT (100 mg) se sumergió en una solución acuosa de periodato de sodio (1,3 mL; 0,08 M) durante 12 h a temperatura ambiente y bajo agitación mecánica. Luego, se añadieron 110 µL de una solución de etilenglicol (5% p/v) y se dejó reaccionar durante otras 12 h. El producto p-NIPAm- α -oxo-ALD se purificó por diálisis, usando una membrana de 50 kDa (Spectra/Por® 6 Standard RC), para eliminar moléculas de bajo peso molecular, con repetidos cambios de agua destilada, durante al menos 48 h. Para verificar la ausencia de remanente de periodato, se realizó una reacción a modo cualitativo, colocando un pequeño volumen del producto dializado en contacto con una solución de yoduro de potasio y almidón, en medio ácido (0,1 y 0,05 g/mL, respectivamente). La presencia de trazas de iodato o periodato puede detectarse por un cambio de color de translúcido a violeta debido a la formación de un complejo entre almidón y el anión triyoduro (I³⁻). La diálisis de las muestras se llevó a cabo hasta que no se observó ningún color aplicando el ensayo mencionado. La Figura 5.4 muestra una reacción esquemática de escisión de p-NIPAm-DAT.

Con el fin de conocer la concentración final de los productos escindidos (mg/mL), un volumen conocido se liofilizó y pesó. Todo este procedimiento fue realizado por quintuplicado.

Por otro lado, la determinación de la temperatura crítica de solubilidad inferior o LCST (por sus siglas en inglés, lower critical solution temperature) se realizó utilizando un calorímetro de barrido diferencial (*Discovery DSC, TA Instrument*). La medida se realizó bajo un flujo de nitrógeno de 50 mL.min⁻¹. Las muestras fueron previamente hinchadas en agua durante 48 h y colocadas en una cápsula de aluminio sellada herméticamente. Se usó agua destilada como material de referencia. La calibración se realizó usando indio de alta pureza como estándar. Durante la medición, la muestra fue equilibrada a 15 °C y luego se aplicó una rampa de 3 °C.min⁻¹ hasta los 50 °C. La LCST fue asignada como la temperatura donde se observó el máximo en el pico endotérmico durante el barrido de temperaturas, como es usualmente reportado [28].

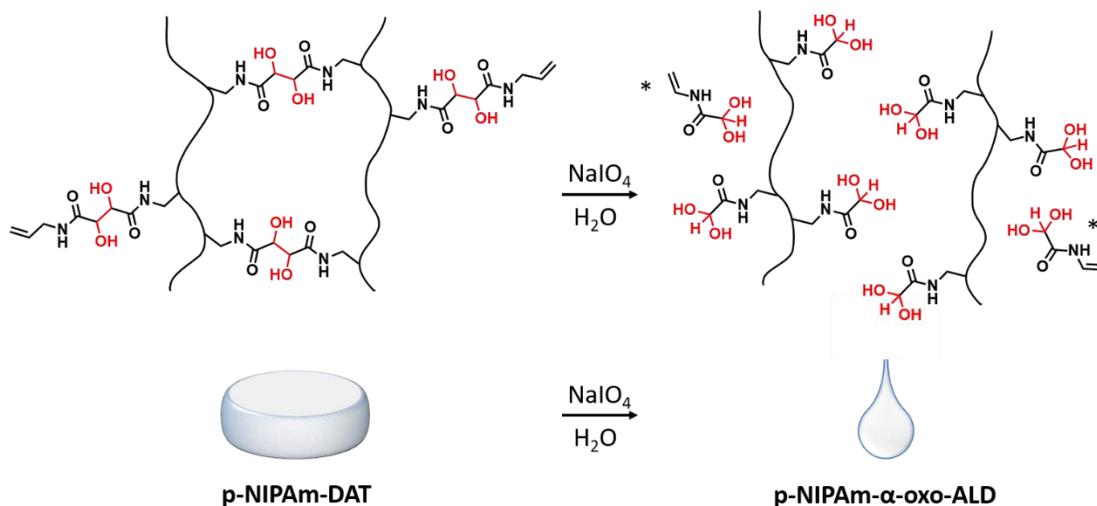


Figura 5.4 – Esquema de p-NIPAm-DAT con DAT unido a través de uno o dos de sus grupos vinílicos. Los grupos funcionales hidroxilo vecinales de DAT son clivados por reacción con periodato. El producto escindido (p-NIPAm- α -oxo-ALD) adquiere consistencia líquida y presenta grupos funcionales aldehído. Los compuestos de tipo vinil-aldehídos formados por clivaje de moléculas de DAT que se habían unido en un solo extremo (marcados con *) fueron fácilmente eliminados por diálisis.

CUANTIFICACIÓN DE ALDEHÍDOS.

La cantidad de aldehído por masa de polímero se cuantificó de acuerdo con el procedimiento descrito por Wen-Yu Su y colaboradores [29]. Se hizo reaccionar un exceso conocido de tert-butil carbazato (*t*-BC) con los GF aldehído del polímero, formando enlaces estables del tipo carbazona. Luego, el *t*-BC no reaccionado se cuantificó mediante la formación de un complejo coloreado con ácido picrilsulfónico (dmema), lo que permitió calcular indirectamente la cantidad de *t*-BC que reaccionó con los GF aldehído. Se utilizó un espectrómetro UV-Vis Shimadzu UV-PC1600 (Japón) para todas las mediciones espectrofotométricas.

En resumen, se disolvieron 5 mg de p-NIPAm- α -oxo-ALD liofilizado, en 1 mL de una solución de *t*-BC (8,63 mM) en buffer acetato (10 mM, pH 5,2, NaCl 0,2 M). La reacción procedió con agitación mecánica durante 16 h a temperatura ambiente. A continuación, se mezclaron 0,2 mL de esta solución con 1 mL de buffer borato (50 mM, pH 8,0) y se añadieron 50 μ L de solución de TNBS (5% P/V). Luego, la reacción continuó durante 2 h bajo agitación mecánica, a temperatura ambiente. Posteriormente, se diluyeron 0,2 mL de dicha reacción en 0,8 mL de solución de HCl (0,5 M). De inmediato, 0,3 mL de esta solución se diluyeron con 0,6 mL de solución de HCl y se midió la absorbancia UV-Visible a 334 nm. Como blanco, se siguió el mismo procedimiento, pero en ausencia de *t*-BC.

Para realizar la curva de calibración, se preparó una solución madre de *t*-BC (40 mM) en buffer acetato. Se realizaron diluciones de la solución madre con *buffer* para lograr diferentes soluciones: 10 mM; 8,6 mM; 7,2 mM; 5,8 mM; 4,4 mM y 3 mM. Antes de la medición UV-Visible, se diluyeron 0,2 mL de cada solución en 1 mL de buffer borato (50 mM, pH 8) en un tubo Eppendorf. Luego, se añadieron 50 μ L de solución de TNBS (5%) en cada tubo y la reacción continuó durante 2 h bajo agitación mecánica, a temperatura ambiente. A continuación, se diluyeron 0,2 mL de la primera solución en 0,8 mL de solución de HCl (0,5 M). De esta última solución, 0,3 mL fueron nuevamente diluidos en 0,6 mL de solución de HCl y la Absorbancia UV-Vis se midió a 334 nm. Como blanco, se siguió el mismo procedimiento, pero en ausencia de *t*-BC.

RE-ENTRECRUZAMIENTO DE p-NIPAM-ALD CON AADH

Con el fin de formar nuevos hidrogeles mediante entrecruzamiento de los grupos aldehído en presencia de AADH, se colocaron 144 μL de producto clivado (p-NIPAm- α -oxo-ALD) en un molde de plástico. Luego, se agregaron 36 μL de solución de AADH con diferentes concentraciones, se mezclaron con una espátula y se selló el molde. Después de 10 min, la muestra se colocó en un horno a la temperatura experimental requerida y se dejó reaccionar durante 60 min. Después, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente. Los geles sintetizados (p-NIPAm- α -oxo-HDZ) se lavaron exhaustivamente en agua destilada. Idealmente, 2 moles de GF aldehído se obtendrían de la oxidación del DAT incorporado en la red. Luego, un mol de AADH reaccionaría con 2 moles de GF aldehído para formar un punto de entrecruzamiento. Bajo esta aproximación, el número estimado de moles de AADH (n_{AADH}), necesarios para reaccionar con los GF aldehído, fueron calculados de acuerdo a la Ecuación 5.1, para una cierta masa de p-NIPAm- α -oxo-ALD seco (m_d).

$$n_{\text{AADH}} = \frac{n_{\text{DAT}} \times MW_{\text{DAT}}}{n_{\text{DAT}} \times MW_{\text{DAT}} + n_{\text{NIPAm}} \times MW_{\text{NIPAm}} + n_{\text{NaPS}} \times MW_{\text{NaPS}}} \times \frac{m_d}{MW_{\text{DAT}}} \quad (\text{Ecuación 5.1})$$

Donde n_{DAT} , n_{NIPAm} y n_{NaPS} , son los moles de DAT, NIPAm y NaPS utilizados en la síntesis, respectivamente. Así como MW_{DAT} , MW_{NIPAm} y MW_{NaPS} son los pesos moleculares de DAT, BIS, NIPAm y NaPS, respectivamente.

Por lo tanto, para el re-entrecruzamiento de p-NIPAm- α -oxo-ALD con AADH, se usaron excesos de 1,5; 2,5 y 5 veces, basados en el cálculo mencionado ($1,5 \times n_{\text{AADH}}$; $2,5 \times n_{\text{AADH}}$; y $5 \times n_{\text{AADH}}$, respectivamente). Luego de la cuantificación de los grupos funcionales aldehído de p-NIPAm- α -oxo-ALD, el exceso usado se calculó en 5; 8,33; y 25 veces, respectivamente.

ESPECTROMETRÍA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

Los distintos productos se analizaron mediante medidas de transmitancia en el infrarrojo, utilizando un espectrómetro Nicolet IN10 FTIR. Todas las determinaciones se realizaron en

el rango de 4000-400 cm^{-1} , usando 16 barridos y una resolución de 4 cm^{-1} . Las muestras fueron liofilizadas y compactadas con KBr para formar discos. Cada medida se realizó por triplicado.

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H

Los estudios se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker Advance (400 MHz–1.5T). De manera general, 10 mg de la muestra liofilizada se redisolvió en D_2O (0,5 mL) antes de cada determinación.

DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS)

Los estudios de DLS se realizaron en un equipo Nano-ZS 90 Malvern equipado con un láser He-Ne ($\lambda = 633 \text{ nm}$) midiendo la luz dispersada a un ángulo de 173° . El producto (clivado y purificado por diálisis) (10 mg) fue diluído 10 veces en agua destilada antes de ser medido. Cada muestra fue mantenida a 25 o 45 $^\circ\text{C}$ durante 10 min antes de la medida, ya que se corroboró que era tiempo suficiente para alcanzar la estabilidad térmica del sistema.

ESTUDIOS MECÁNICOS

Las propiedades mecánicas de los materiales se estudiaron usando un reómetro rotacional Anton Paar MCR 301. El procedimiento se describe a continuación.

ANÁLISIS TERMOMECAÁNICO DE p-NIPAm- α -oxo-ALD

Se colocaron 180 μL de cada muestra entre dos platos paralelos de 25 mm de diámetro, separados por una distancia (gap) constante de $(0,300 \pm 0,001) \text{ mm}$. Se midió el cambio en el módulo elástico (G') y el módulo de pérdida (G'') durante un barrido de temperaturas, manteniendo la deformación (1%) y la frecuencia (1 Hz) constantes. Se utilizó una celda Peltier (accesorio del reómetro) para controlar la temperatura. El barrido se programó para

calentar las muestras a $(20,00 \pm 0,01)$ °C durante 250 s, luego se elevó a $(37,00 \pm 0,01)$ °C por 2250 s, y finalmente se retornó a $(20,00 \pm 0,01)$ °C por 3500 s.

REACCIÓN DE p-NIPAm- α -oxo-ALD y AADH A DIFERENTES VALORES DE pH Y TEMPERATURAS

Se prepararon soluciones de AADH (0,18 M) mediante disolución de 30,7 mg ($1,76 \times 10^{-4}$ mol) de AADH en 1 mL de solución *buffer* pH 2,15; 5,3; 6,3; 7,3; 8,1; y 10 (0,1 M; Fuerza Iónica 0,3 M). La Tabla 5.1 muestra la composición de los distintos *buffers*.

Tabla 5.1 - Composición de los buffers utilizados

pH	Composición Concentración = 0,1 M ; F. I. = 0,3 M
2,15	H₃PO₄ / NaH₂PO₄
5,3	HAcO / NaAcO
6,3	NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄
7,3	NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄
8,1	NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄
10,0	NaHCO₃ / Na₂CO₃

Para la determinación reológica, se colocaron 144 μ L del producto clivado entre dos platos paralelos de 25 mm de diámetro. Luego, se adicionaron 36 μ L de la respectiva solución de AADH (de pH definido por su *buffer*) y el ensayo comenzó a los 30 s a la temperatura correspondiente. Durante cada reacción, los cambios en la elasticidad se midieron a una deformación constante del 1%, a una frecuencia de 1 Hz. Los valores finales de G' de cada curva fueron promediados e informados como el módulo elástico correspondiente a la temperatura y pH analizado.

ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA)

La descomposición térmica de las muestras se estudió en un Analizador Termogravimétrico (Discovery TGA 5500, TA Instruments). Las muestras, previamente liofilizadas, se calentaron desde 10 a 600 °C con una rampa de temperatura de 10 °C.min⁻¹.

MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

La medida SEM se llevó a cabo en un Microscopio Sigma FE-SEM del Laboratorio de Microscopía Electrónica (LAMARX), FAMAF, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. Antes de la medida, las muestras se hincharon en agua, se liofilizaron y se revistió la superficie mediante pulverizado (*sputter coating*) de oro (Au).

5.4 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

SÍNTESIS DE HGS DE p-NIPAm-DAT Y CLIVAJE CON PERIODATO

Los hidrogeles de p-NIPAm-DAT se obtuvieron mediante polimerización por radicales libres de monómeros vinílicos de NIPAm y DAT, en solución acuosa. Inmediatamente después de la adición de la dupla TEMED-NaPS, se obtuvieron geles blancos. Luego, el polímero obtenido se lavó exhaustivamente con agua destilada y se estudió mediante FT-IR. Como puede verse en el espectro infrarrojo de la Figura 5.5, los hidrogeles p-NIPAm-DAT exhiben las absorciones típicas correspondientes a los grupos funcionales de los monómeros NIPAm y DAT. La mayoría de las señales pertenecen a grupos funcionales de NIPAm, dado que se utilizó en mayor proporción molar respecto de DAT. Entre sus principales bandas de absorción se encuentra el C=O de la amida a 1649 cm⁻¹ (banda de amida I) y las bandas de deformación y estiramiento de N-H a 1540 cm⁻¹ (banda de amida II) y 3299 cm⁻¹, respectivamente. Otras bandas características son las de estiramiento de C-H a 2972, 2934 y 2876 cm⁻¹. Además, se encuentra una banda ancha a 3200-3500 cm⁻¹ que pertenece al estiramiento de grupos OH de DAT. Por lo tanto, las señales observadas confirman la incorporación de los monómeros en el esqueleto del polímero. Por otro lado, aparece una

señal de vinilo C=C a 3073 cm^{-1} , por la presencia de insaturaciones en la red. Este comportamiento indicaría que parte de los monómeros de DAT podrían estar unidos a la red por uno sólo de sus dos extremos vinílicos.

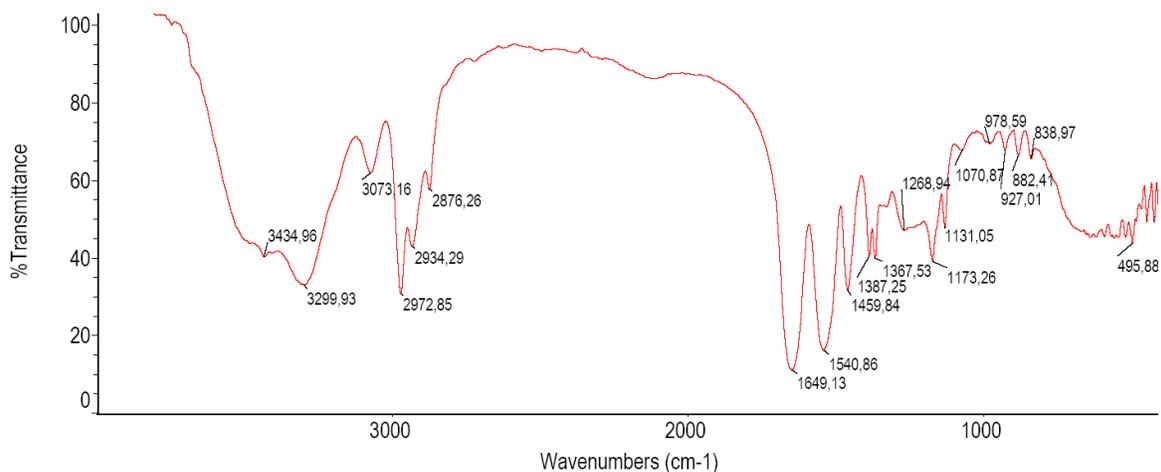


Figura 5.5 - Espectro FTIR de p-NIPAm-DAT

A continuación, p-NIPAm-DAT se trató con una solución acuosa de NaIO_4 bajo agitación mecánica y se obtuvo un líquido viscoso translúcido (p-NIPAm- α -oxo-ALD) en menos de 30 min. Las fotografías de la Figura 5.6 muestran el cambio de fase producido por el clivaje de los entrecruzamientos de p-NIPAm-DAT.

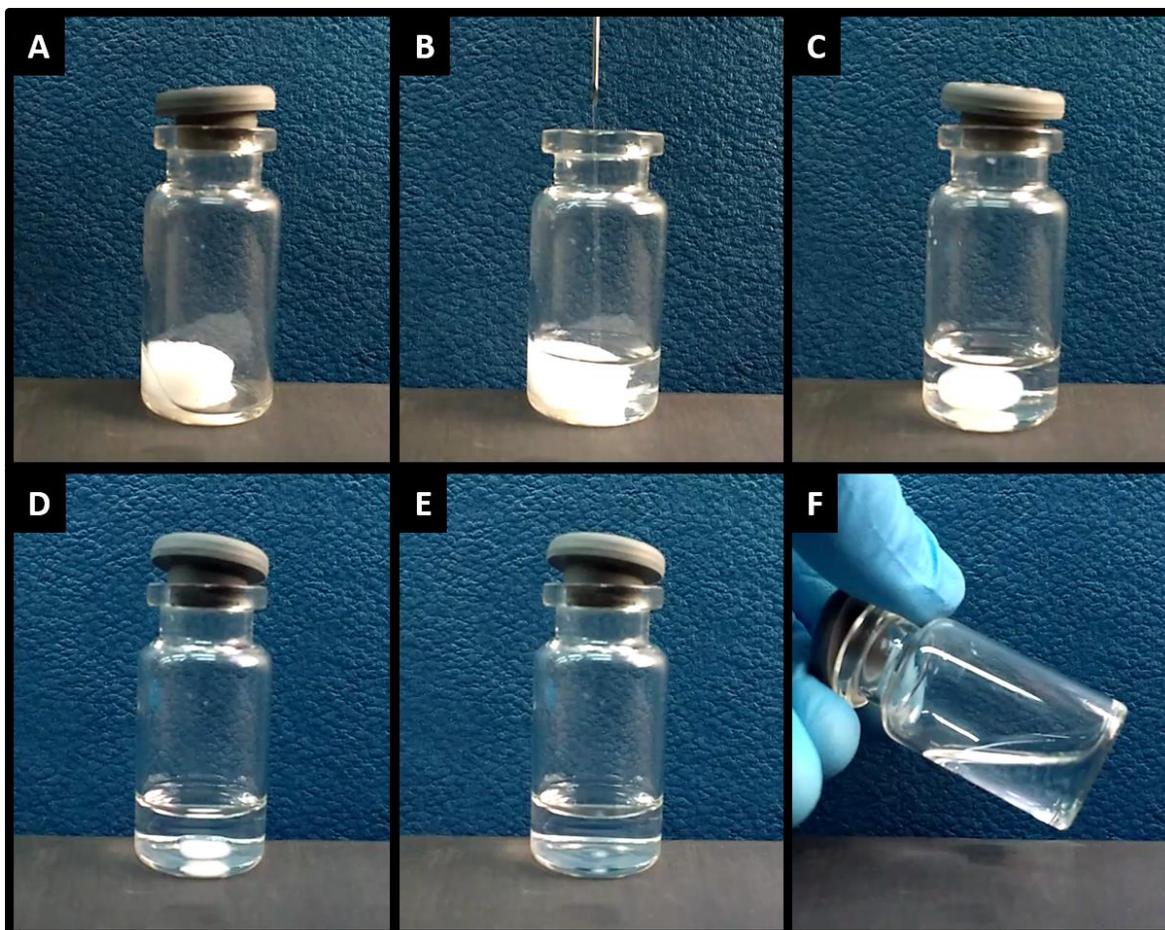


Figura 5.6 - Disco de gel de p-NIPAm-DAT antes (A) de adicionar solución de periodato (B) y el consiguiente clivaje químico a 30 min (C), 60 min (D) y 120 min (E) y 150 min (F).

Posteriormente, el producto clivado de p-NIPAm-DAT (nombrado p-NIPAm- α -oxo-ALD) se purificó por diálisis para eliminar restos de NaIO_4 . La ausencia de restos del oxidante se demostró mediante la prueba de iodo, en presencia de ioduro de potasio y almidón, en medio ácido. Además, se observó que la solución acuosa de p-NIPAm- α -oxo-ALD mostraba respuesta térmica al ser calentada, pasando de una solución translúcida a formar un gel de color blanco, de manera reversible. La temperatura crítica mínima de solubilidad (LCST) se determinó mediante DSC en un valor de $31,2\text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 5.7).

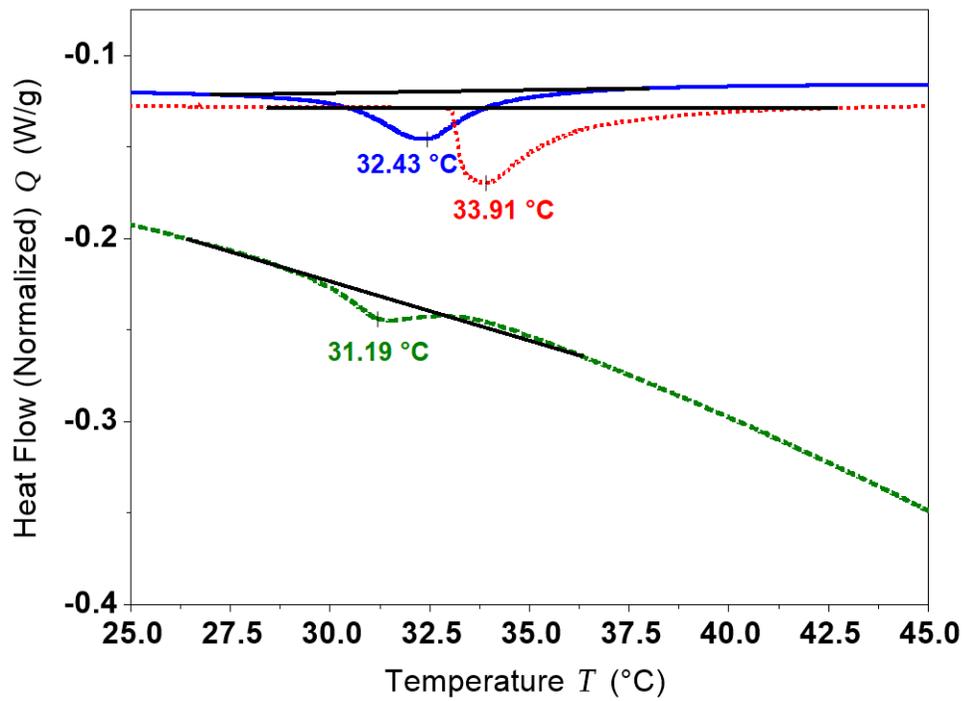


Figura 5.7 - DSC de los polímeros hidratados: p-NIPAm-DAT (azul, línea sólida), p-NIPAm- α -oxo-ALD (verde, línea segmentada) y p-NIPAm- α -oxo-HDZ (rojo, línea punteada).

Posteriormente, p-NIPAm- α -oxo-ALD se liofilizó y re-disolvió en D₂O para su estudio por RMN, como se muestra en la Figura 5.8. Los picos típicos de p-NIPAm se observan sin señales de ningún protón de vinilo residual. La señal a 5,28 ppm evidencia la presencia del α -oxo-aldehído en su forma hidratada.

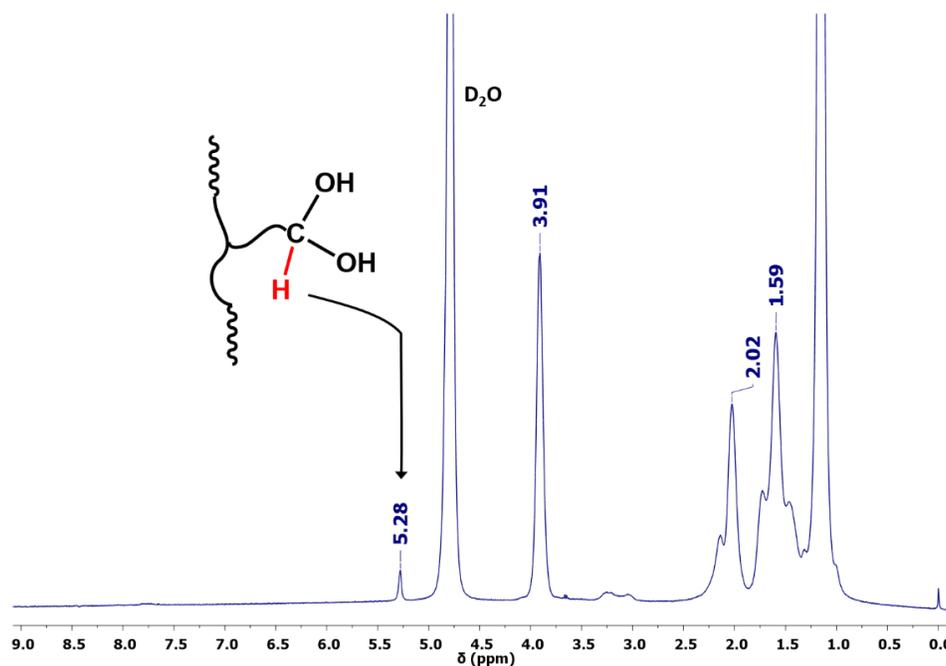


Figura 5.8 - Espectro de ^1H -RMN de $p\text{-NIPAm-}\alpha\text{-oxo-ALD}$ en D_2O . Luego de la reacción de $p\text{-NIPAm-DAT}$ con periodato, un pico característico a 5,28 ppm muestra la formación de un grupo funcional $\alpha\text{-oxoaldehído}$ en su forma hidratada.

DETERMINACIÓN DEL DIÁMETRO HIDRODINÁMICO DE $p\text{-NIPAm-}\alpha\text{-oxo-ALD}$

Con el fin de obtener información sobre el diámetro hidrodinámico (D_h) y el comportamiento termosensible de $p\text{-NIPAm-}\alpha\text{-oxo-ALD}$, se realizaron medidas de DLS a dos temperaturas. La Figura 5.9 muestra la distribución de tamaños según la intensidad de luz reflejada, a 25 (A) y 45 °C (B). A 25 °C, la distribución predominante de tamaños de partículas es de (50 ± 30) nm con un índice de polidispersidad (PDI) de $(0,270 \pm 0,003)$. Posteriormente, se midió el DLS a 45 °C para determinar el efecto de la temperatura en el diámetro hidrodinámico de $p\text{-NIPAm-}\alpha\text{-oxo-ALD}$. La Figura 5.9(B) muestra cambios significativos en el diámetro de las partículas con el aumento de la temperatura. Por encima de la LCST, las partículas presentaron una distribución de tamaños centrada en un diámetro de alrededor de (139 ± 2) nm con un menor PDI $(0,032 \pm 0,015)$. Este aumento en el D_h es observado con frecuencia en nanoestructuras de $p\text{-NIPAm}$ que se encuentran formando una dispersión coloidal, debido a que se promueven asociaciones de partículas más pequeñas durante la

transición térmica, produciendo mesoglobulos coloidalmente más estables, como se ha reportado previamente [30].

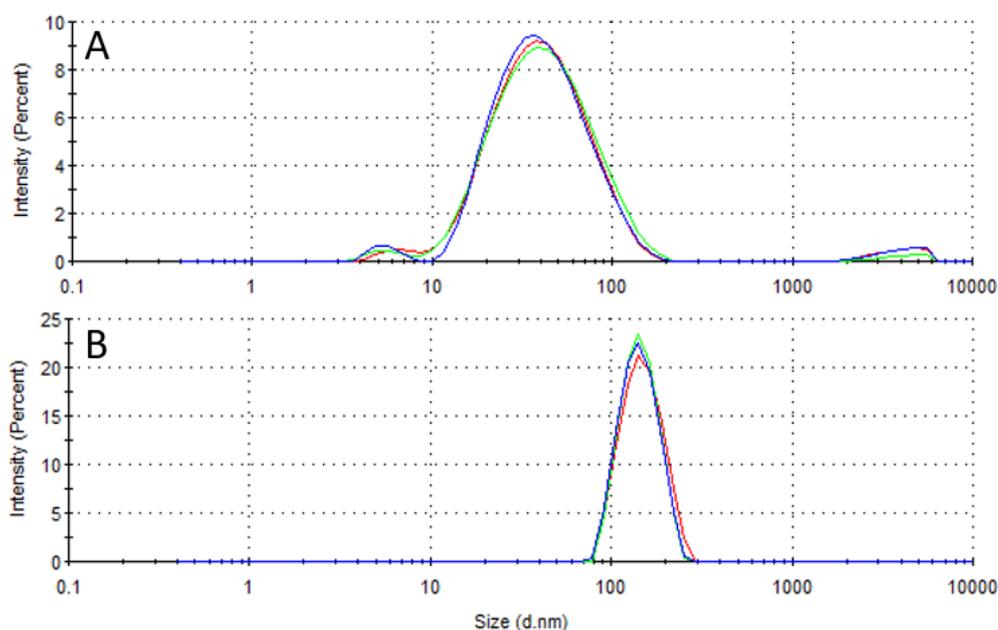


Figura 5.9 - Distribución por intensidad de luz dispersada en función del tamaño de partícula de p-NIPAm- α -oxo-ALD, a 25 °C (A) y 45 °C (B).

CUANTIFICACIÓN DE GRUPOS ALDEHÍDO

Durante la síntesis de p-NIPAm-DAT, se utilizó 10% en moles de DAT como reactivo (con respecto a moles de NIPAm). De manera teórica, podría esperarse que, luego del tratamiento con periodato, los GF aldehído alcanzaran un máximo de 20% en moles. Teniendo en cuenta que probablemente no todas las moléculas de DAT reaccionaron durante la síntesis para incorporarse en la red de hidrogel, fue necesario cuantificar la concentración de GF aldehído en los productos de p-NIPAm- α -oxo-ALD. Esta determinación se realizó mediante un método indirecto donde los GF aldehído reaccionaron con un exceso conocido de *t*-BC. Luego, el *t*-BC remanente se utilizó para formar un complejo coloreado en presencia de TNBS, el cual se midió por espectrofotometría UV-Visible, como se detalló en la sección Materiales y Métodos. La cuantificación demostró que p-NIPAm- α -oxo-ALD contenía $(4 \pm 1) \times 10^{-7}$ mol de GF aldehído por mg de polímero. Además, considerando que

los pesos esperados para las unidades repetitivas de aldehído y NIPAm son 131 y 113 g/mol, respectivamente, el porcentaje en moles de aldehído respecto de moles de NIPAm se estimó en 5%. Este valor muestra buena correlación con la cantidad de GF aldehído relativa estimada de la integración de los picos de ^1H -RMN (Figura 5.10). Por otro lado, cabe destacar que los grupos vinílicos observados por FTIR en los geles de p-NIPAm-DAT (previo al tratamiento con periodato), atribuidos a la reacción de DAT por uno sólo de sus extremos vinílicos, no se observaron en el espectro de RMN. Esto indicaría la eliminación efectiva mediante diálisis de aquellos sub-productos del tratamiento con periodato, derivados del anclaje de DAT por uno solo de sus extremos vinílicos (ver * en Figura 5.4). Además, esta podría ser una de las causas de la obtención de 5% en moles de GF aldehído, cuando el máximo estimado era de 20%.

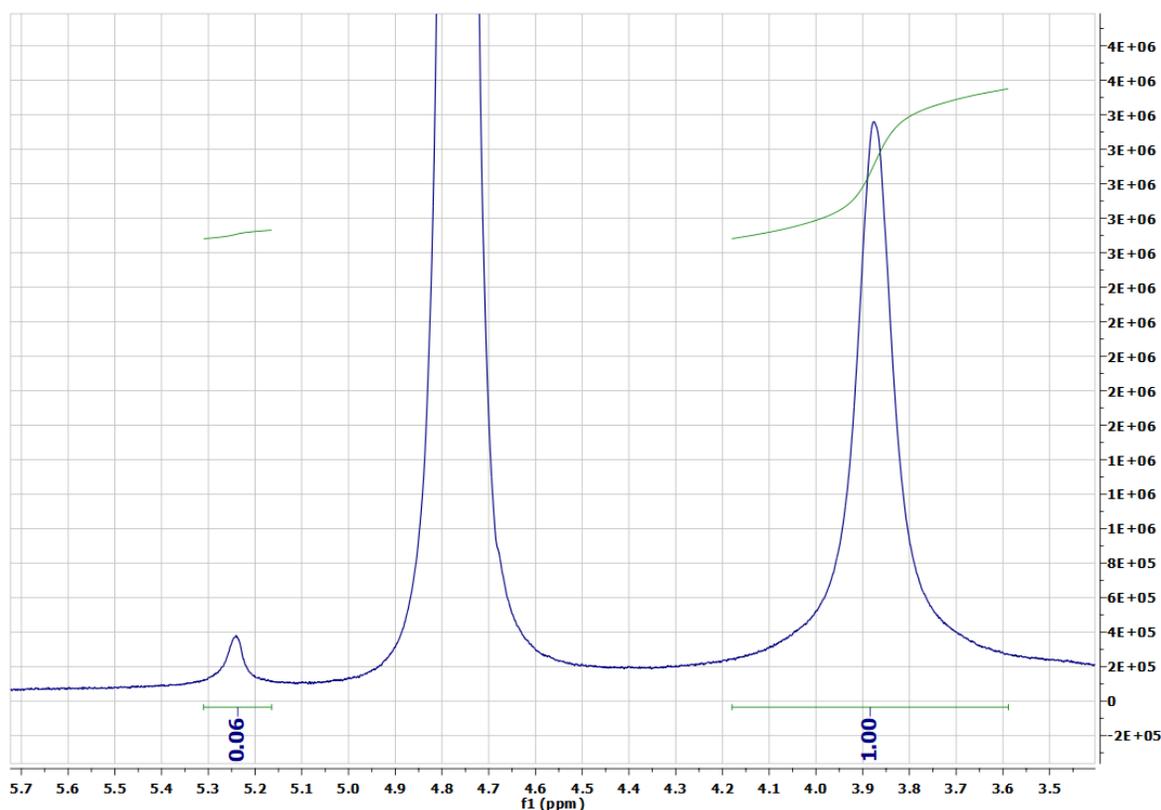


Figura 5.10 - Integrales de ^1H -RMN de p-NIPAm- α -oxo-ALD. La señal a 5,25 ppm, característica de los GF aldehído en su estado hidratado, integra para 0,06 cuando el pico de referencia del CH de p-NIPAm integra para 1.

Estudios reológicos DE p-NIPAm- α -oxo-ALD A DIFERENTES VALORES DE pH Y TEMPERATURAS

Se realizaron medidas reológicas para estudiar el comportamiento térmico de p-NIPAm- α -oxo-ALD a distintos valores de pH, en ausencia de entrecruzantes adicionales (Figura 5.11). En este ensayo, las muestras de p-NIPAm-ALD se sometieron a procesos de calentamiento y enfriamiento por encima y por debajo de LCST. En todos los casos, se observó que al calentar el polímero a 37 °C se incrementó el valor de G' . La respuesta térmica del módulo elástico podría deberse al aumento en las interacciones polímero-polímero, principalmente entre los grupos isopropilo de p-NIPAm, debido al colapso térmico. Sin embargo, este aumento en G' tiene una clara dependencia con el pH. Manteniendo la temperatura sobre la LCST, G' reporta un incremento mucho mayor a pH 5,3 que a pH 2,15 y 6,3. Además, estos valores de G' son más altos que a pH 7,3 y 8,1. Además, ante esos valores de pH, el proceso resultó reversible, ya que el polímero se relaja y vuelve al estado inicial luego de descender la temperatura por debajo de la LCST, mostrando un comportamiento reversible y dependiente del pH y de la temperatura. No se han reportado dependencias del módulo elástico de p-NIPAm con el pH durante su transición térmica. Por ello, el efecto del pH sobre G' podría ser atribuido a la presencia de α -oxo-ALD en la red polimérica y la formación de nuevas interacciones reversibles a la temperatura corporal. Este interesante comportamiento podría estar relacionado a la formación de grupos reversibles hemiacetales/acetales entre los grupos α -oxoaldehído (Figura 5.12), los cuales serían dependientes de la concentración y el pH, como ha sido reportado con otros GF equivalentes [31], [32]. Por otro lado, a pH 10, el módulo elástico aumentó luego de la disminución de la temperatura por debajo de la LCST. Este medio, podría estar favoreciendo la formación de interacciones fuertes entre los grupos aldehído de p-NIPAm- α -oxo-ALD, pero aún no se ha podido determinar su naturaleza química.

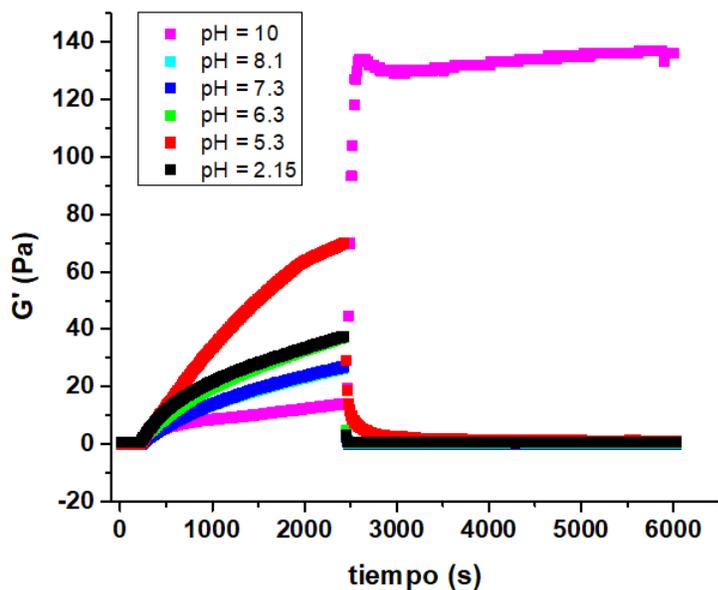


Figura 5.11 - Módulo elástico (G') respecto del tiempo (s) para p -NIPAm- α -oxo-ALD a 25 °C (0 a 250 s y 2500 a 6000 s) y 37 °C (250 a 2500 s) estudiado a pH 2,15; 5,3; 6,3; 7,3; 8,1 y 10.

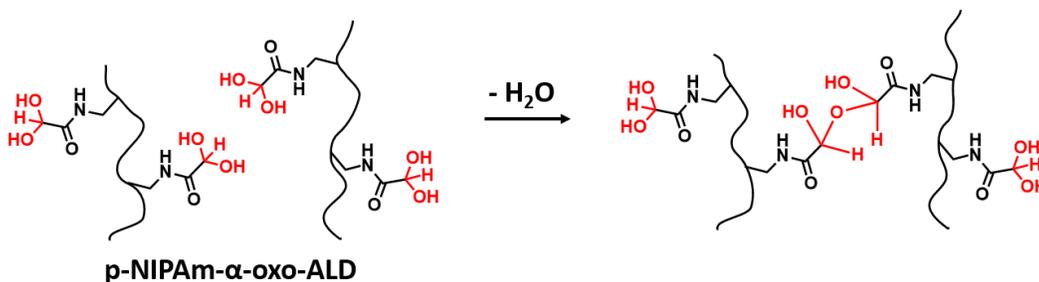


Figura 5.12 - Esquema representativo de la posible formación de hemiacetales entre los GF α -oxo-aldehído de p -NIPAm- α -oxo-ALD-

RE-ENTRECruzAMIENTO Y EFECTO DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES DE REACCIÓN p -NIPAm- α -oxo-ALD se hizo reaccionar con diferentes excesos de AADH a 25 y 40 °C (por debajo y por encima de la LCST, respectivamente). La Figura 5.13 muestra un esquema de la reacción de re-entrecruzamiento del polímero a través de enlaces hidrazona.

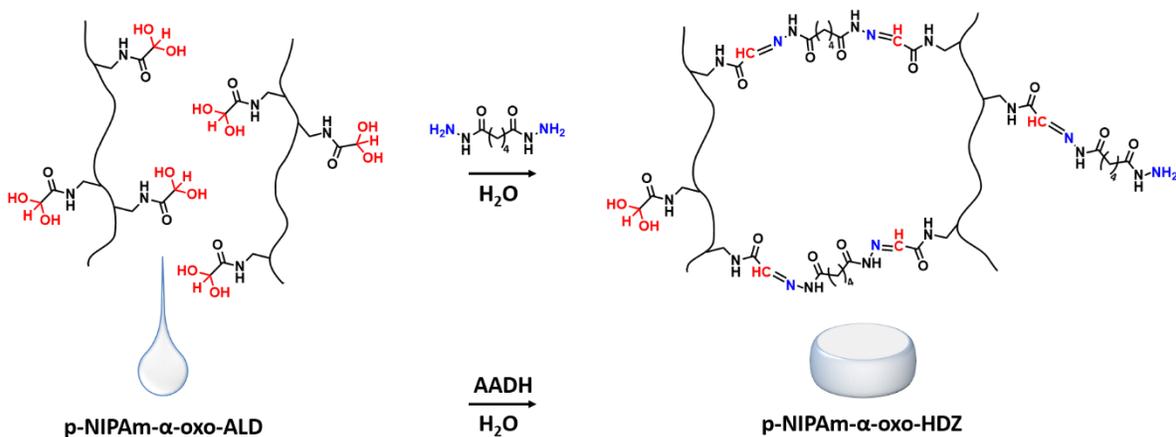


Figura 5.13 - Esquema de la reacción de re-entrecruzamiento de p-NIPAm- α -oxo-ALD con AADH a través de enlaces hidrazona.

Como se muestra en la Figura 5.14, no se obtuvieron geles cuando la reacción se realizó a 25 °C durante 1 hora de reacción, independientemente de la concentración de AADH utilizada. Incluso a tiempos largos, se observó el mismo resultado. Por otro lado, cuando se aumentó la temperatura, sobre la LCST, se obtuvieron geles en una relación de concentración AADH/ALD de 1,25 y 2,5. Sin embargo, cuando se utilizó un exceso de 5 veces de AADH, no se obtuvo gel. El exceso de AADH, podría favorecer la reacción de los grupos aldehído a través de solo uno de los dos grupos hidrazida del agente entrecruzante, disminuyendo por lo tanto la posibilidad de formación de puntos de entrecruzamiento. El hecho de obtener geles sólo al calentar la mezcla reactiva a 40 °C, podría estar relacionado a un aumento en la tasa de adición nucleofílica a temperaturas más altas, como fue observado por Shao y colaboradores, en una reacción de conjugación de α -oxo-aldehído/hidrazona de características químicas similares [33]. Adicionalmente, este incremento en la reactividad podría deberse a un aumento de la concentración local de GF aldehído, debido al colapso de las cadenas de p-NIPAm cuando la temperatura se eleva por encima de la LCST. Este efecto de aproximación, podría aumentar la posibilidad de reacción y formación de grupos hidrazona y, por lo tanto, promover la gelificación en tiempos más cortos. Además, las mejores propiedades mecánicas se observaron cuando se utilizó una relación AADH/ALD de 2,5 para obtener el hidrogel a 40 °C durante 1 h de reacción (p-

NIPAm- α -oxo-HDZ 2,5). Una vez que se ha curado, el hidrogel producido conserva la forma del molde. Además, es insoluble en agua y presenta termosensibilidad, mostrando una temperatura de transición de 33,9 °C (Figura 5.7).

Muestra	AADH/ALD	25 °C	45 °C	
p-NIPAm-α-oxo-HDZ 1,25	1,25	No Gel	Gel	
p-NIPAm-α-oxo-HDZ 2,5	2,5	No Gel	Gel	
p-NIPAm-α-oxo-HDZ 5	5	No Gel	No Gel	

Figura 5.14 - No se obtuvieron geles cuando p-NIPAm- α -oxo-ALD y diferentes cantidades de AADH se mezclaron a 25 °C por 1 h. Sin embargo, cuando la mezcla se calentó a 40 °C en las proporciones adecuadas, se obtuvieron los HGs p-NIPAm- α -oxo-HDZ 1,25 y p-NIPAm- α -oxo-HDZ 2,5. A la derecha se muestra una foto de p-NIPAm- α -oxo-HDZ 2,5.

Para comprender el efecto del pH en el proceso de gelificación y la consecuencia del calentamiento por encima del LCST, se realizaron ensayos de gelación mediante reología.

ESTUDIOS REOLÓGICOS DE LA REACCIÓN DE ENTRECruzAMIENTO ENTRE p-NIPAm- α -oxo-ALD y AADH

Se estudiaron los cambios en las propiedades mecánicas del material durante la reacción entre p-NIPAm- α -oxo-ALD y AADH (relación AADH/ALD de 2,5) en diferentes condiciones experimentales (Figura 5.15). Como se observó anteriormente, sólo se logra la gelificación del material si la temperatura es superior a la LCST de p-NIPAm. Además, cuando se estudió la reacción entre p-NIPAm- α -oxo-ALD y AADH a diferentes pH, se obtuvieron marcadas diferencias en el módulo elástico de los productos. En la Figura 5.15 se observa que las mezclas a 20 °C presentan cambios despreciables en su elasticidad cuando se exponen a diferentes valores de pH, excepto a pH 2, donde se alcanza un incremento del módulo elástico de 85 Pa. Sin embargo, los cambios más significativos se observaron cuando la reacción se estudió a 37 °C. Se produjo un mínimo de 60 Pa a pH 7, mientras que la catálisis ácida en la formación de enlaces tipo hidrazona quedó evidenciada al alcanzar valores de

125, 210 y 400 Pa a pH 6,3; 5,3 y 2, respectivamente. Estos resultados indican que la formación de la red se favorece cuando la temperatura es aumentada por encima de LCST de p-NIPAm y a pH ácido. Sin embargo, el hidrogel obtenido a pH 2 es el único producto que no fue capaz de mantener su estructura al ser lavado en una solución buffer del mismo pH, mientras que los otros permanecieron en estado de gel, inclusive luego de meses a pH 5,3. El fenómeno observado a pH 2 podría atribuirse a un aumento en la hidrólisis de los enlaces hidrazona cuando la concentración de protones es muy alta. Por otro lado, se observó también un aumento en el módulo elástico a pH básico, alcanzando un valor de 150 Pa, a pH 10.

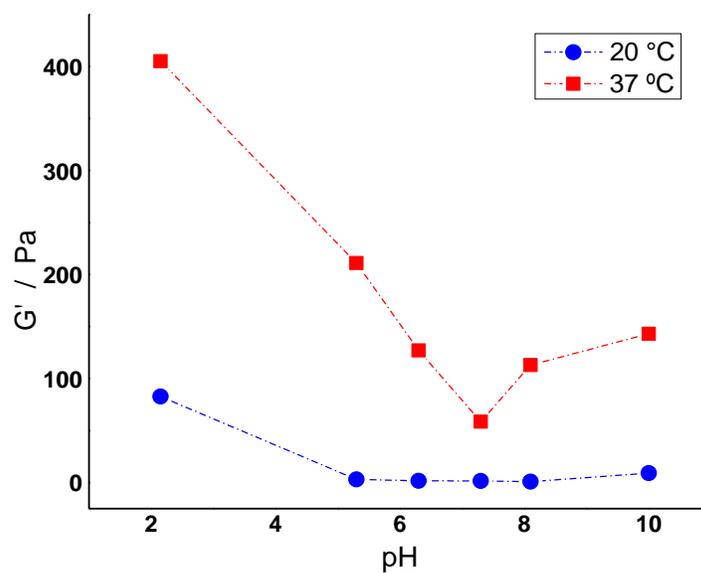


Figura 5.15 - Módulo Elástico de equilibrio (G') alcanzado por la reacción entre p-NIPAm- α -oxo-ALD y AADH (p-NIPAm- α -oxo-HDZ 1,25) a diferentes valores de pH y temperaturas. Las muestras se equilibraron a 20 °C (círculos azules) y 37 °C (cuadrados rojos) antes de la medida.

Por otro lado, se observó un proceso de endurecimiento o curado cuando la mezcla de reacción (p-NIPAm- α -oxo-ALD y AADH, a distintos valores de pH) fue calentada a 37 °C y luego enfriada a temperatura ambiente (Figura 5.16). Entre los valores de pH fisiológicamente relevantes, se observó claramente que el medio ácido cataliza la formación de enlaces hidrazona durante el proceso de curado. No se observaron cambios significativos a pH neutro o levemente básico, mientras que se alcanzaron valores de 50 y 400 Pa a valores

de pH 6,3 y 5,3, respectivamente. Este efecto de curado podría ser atribuido al efecto de la temperatura en la velocidad de reacción, como también al colapso de p-NIPAm sobre su temperatura de transición. Dicho colapso genera mayor aproximación entre las cadenas poliméricas, lo que podría facilitar las reacciones de entrecruzamiento entre ellas. La separación de fases, promovida por el estímulo térmico, se caracteriza por expeler gran cantidad de agua debido al colapso de los dominios hidrofóbicos. Por lo tanto, cuando la mezcla de reacción fue enfriada hasta 20 °C, la red entrecruzada parcialmente se hinchó en la solución de AADH, permitiendo la incorporación de nuevos entrecruzamientos. Además, el efecto opuesto se observó a pH 2, disminuyendo el G' final (respecto del G' a 37 °C) cuando la muestra se enfrió por debajo de la LCST. Este comportamiento se corresponde con el incremento en la velocidad de hidrólisis propuesto a ese pH tan bajo.

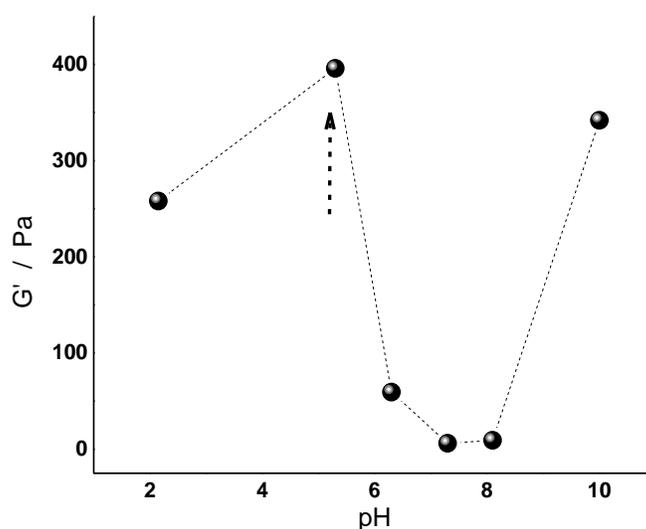


Figura 5.16 - Módulo elástico de equilibrio (G') alcanzado por la reacción de p-NIPAm- α -oxo-ALD con AADH (p-NIPAm- α -oxo-HDZ 1.25) a diferentes valores de pH y temperaturas. Las muestras fueron calentadas a 37 °C durante 45 °C min y enfriadas hasta 20 antes de cada medida.

Por lo tanto, las condiciones de acidez extrema promueven un comportamiento más dinámico en la formación e hidrólisis de los enlaces hidrazona, incrementando el grado de entrecruzamiento de la red cuando el polímero es calentado por encima de la LCST, pero decreciendo cuando es enfriado por debajo de la LCST. Por otro lado, la formación de enlaces hidrazona está claramente favorecida a pH 5,3, incrementando el módulo elástico

del material luego del proceso de curado (ver la flecha en la Figura 5.16), mientras la hidrólisis a este pH no parece ocurrir de manera significativa. Este resultado concuerda con lo reportado por Shao y colaboradores, quienes observaron que el pH ácido catalizó la reacción de formación de una conjugación α -oxo-aldehído/hidrazida químicamente similar, mientras que el enlace formado fue estable a la hidrólisis, a pH 5 [33].

ESTUDIOS ^1H -RMN DE p-NIPAm- α -oxo-HDZ 5

La mezcla de reacción p-NIPAm- α -oxo-ALD-HDZ 5 se dializó, liofilizó y redisolvió en D_2O para ser estudiada mediante ^1H -RMN, como se muestra en la Figura 5.17. Se utilizó p-NIPAm- α -oxo-ALD-HDZ 5, ya que este producto se encuentra en estado líquido y permite una mejor resolución de las señales en el espectro de RMN, en comparación con muestras en estado gel. Dos observaciones evidencian la formación de enlaces hidrazona luego de la reacción. En primer lugar, desapareció el pico característico del GF aldehído hidratado de p-NIPAm- α -oxo-ALD, que había sido observado a 5,28 ppm (Figura 5.8). En lugar de ello, se observa la aparición de una señal a 7,3 ppm. Este desplazamiento de señal indica la formación de un enlace hidrazona originado por la reacción de los α -oxo-aldehídos con los grupos hidrazida del entrecruzante.

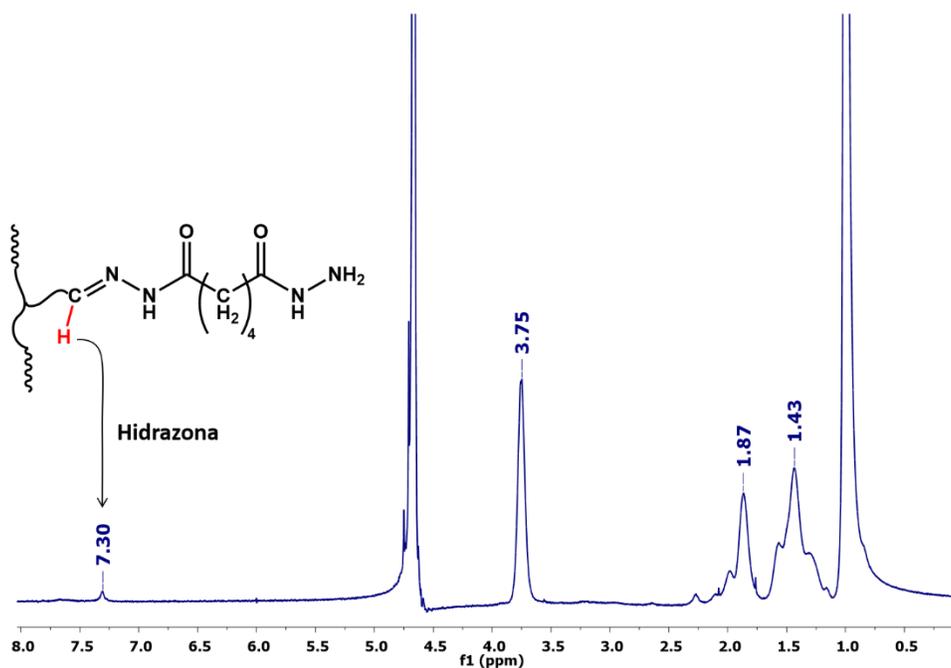


Figura 5.17 - ^1H -RMN de p-NIPAm- α -oxo-HDZ 5 en D_2O . Luego de la reacción con AADH, desapareció la señal correspondiente a los aldehídos hidratados (5,28 ppm) y se observó un nuevo pico a 7,30 ppm mostrando la formación de un enlace hidrazona.

ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO DE p-NIPAm-DAT; p-NIPAm- α -oxo-ALD Y p-NIPAm- α -oxo-HDZ 1,25

La Figura 5.18 muestra el análisis termogravimétrico de muestras de p-NIPAm-DAT; p-NIPAm- α -oxo-ALD y p-NIPAm- α -oxo-HDZ 1,25. Todos los materiales estudiados mostraron una temperatura de descomposición principal similar, de aproximadamente 420 °C, probablemente asociada a la degradación de las cadenas de carbono del polímero en fragmentos como el CO_2 u otros fragmentos volátiles. Del mismo modo, en todos los casos se observó disminución de menos del 6% cerca de los 30 °C. Tal cambio puede asociarse con la pérdida de agua ligada a la red. Además, se observó una primera caída de masa del 9% en p-NIPAm- α -oxo-ALD, a 134 °C. Este cambio no se observó en los otros productos, sugiriendo que los grupos funcionales aldehído participaron de este paso de descomposición.

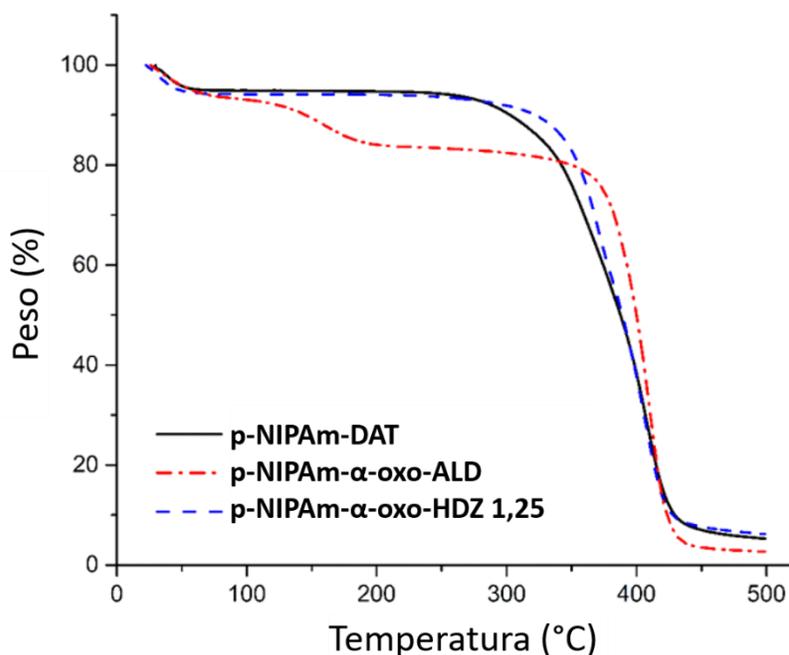


Figura 5.18 - TGA de de p-NIPAm-DAT; p-NIPAm-α-oxo-ALD y p-NIPAm-α-oxo-HDZ 1,25.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

Se analizó la estructura microscópica interna de los materiales mediante SEM (Figura 5.19). Para esto, p-NIPAm-DAT, p-NIPAm-α-oxo-ALD y p-NIPAm-HDZ 1,25 se equilibraron en agua, congelaron rápidamente (nitrógeno líquido) y liofilizaron.

p-NIPAm-DAT muestra una estructura de tipo esponja de porosidad homogéneamente distribuida (Figura 5.19a). Se observan ensamblados globulares pequeños. Luego del tratamiento con periodato, el producto p-NIPAm-α-oxo-ALD mostró finas fibras acompañadas de estructuras globulares dispersas de manera heterogénea (Figura 5.19b). Los glóbulos en p-NIPAm-α-oxo-ALD muestran morfología bien definida y aparentemente interactúan muy poco con las fibras u otros glóbulos. Por lo tanto, el análisis SEM de p-NIPAm-DAT es consistente con la estructura 3D de un hidrogel hidratado mientras que p-NIPAm-α-oxo-ALD parece estar organizado en fibras y estructuras globulares, como un polímero lineal en solución. Por otro lado, cuando p-NIPAm-α-oxo-ALD fue re-entrecruzado mediante enlaces hidrazona, se obtuvo nuevamente una red porosa tridimensional (Figura

5.19c). Este nuevo hidrogel muestra mayor porosidad que el p-NIPAm-DAT inicial, con una estructura formada por fibras más delgadas.

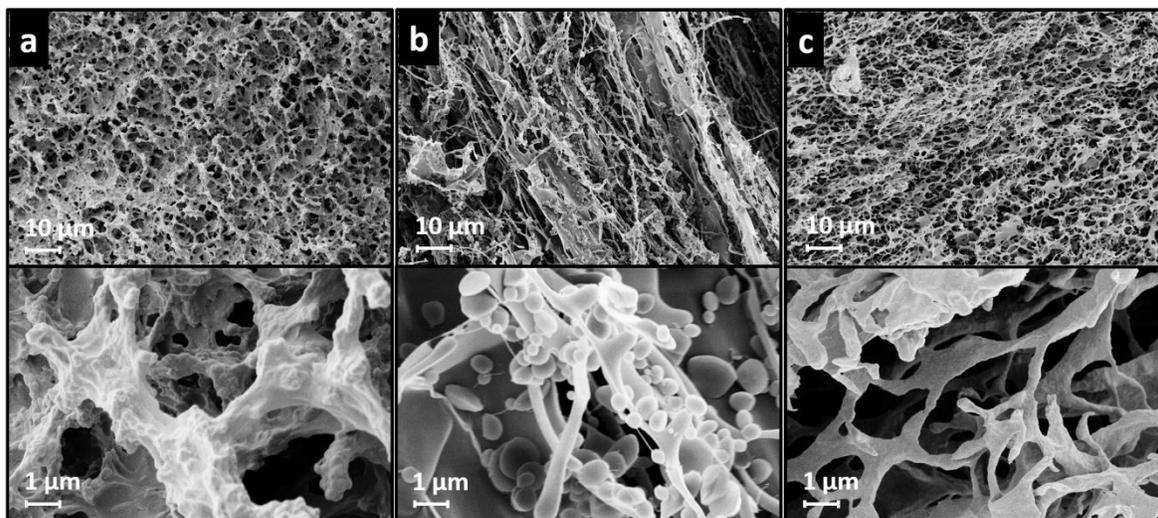


Figura 5.19 - Micrografías SEM de p-NIPAm-DAT (a), p-NIPAm- α -oxo-ALD (b) y p-NIPAm- α -oxo-HDZ 1,25 (c). Magnificación de 1000X (arriba) o 10000X (abajo).

5.5 – CONCLUSIONES PARCIALES

Se sintetizaron HGs termosensibles basados en NIPAm y DAT. El uso de DAT, un agente entrecruzante divinílico con un diol vecinal, permitió la ruptura de los entrecruzamientos en una etapa post-síntesis, mediante su reacción con periodato de sodio. Esta reacción llevó a la formación de p-NIPAm- α -oxo-ALD, un producto líquido conteniendo cadenas poliméricas cortas con grupos funcionales α -oxo-aldehído o glioxamida. Además, el diámetro hidrodinámico de las cadenas poliméricas obtenidas, en solución, mostró un aumento con el incremento en la temperatura debido a la asociación de las cadenas por encima de la LCST del polímero.

p-NIPAm- α -oxo-ALD reaccionó con AADH, logrando el re-entrecruzamiento de las cadenas a través de enlaces hidrazona para formar nuevos hidrogeles. Además, la formación de los enlaces hidrazona fue dependiente del pH y la temperatura. La reacción de entrecruzamiento se vio favorecida a pH 5,3, calentando al polímero por encima de su LCST y enfriándolo nuevamente. Este comportamiento podría deberse al acercamiento de las cadenas poliméricas durante el colapso térmico de p-NIPAm.

Esta estrategia sintética podría ser utilizada para el desarrollo de materiales pH- y termosensibles para aplicaciones biomédicas, entre otras.

5.6 - REFERENCIAS

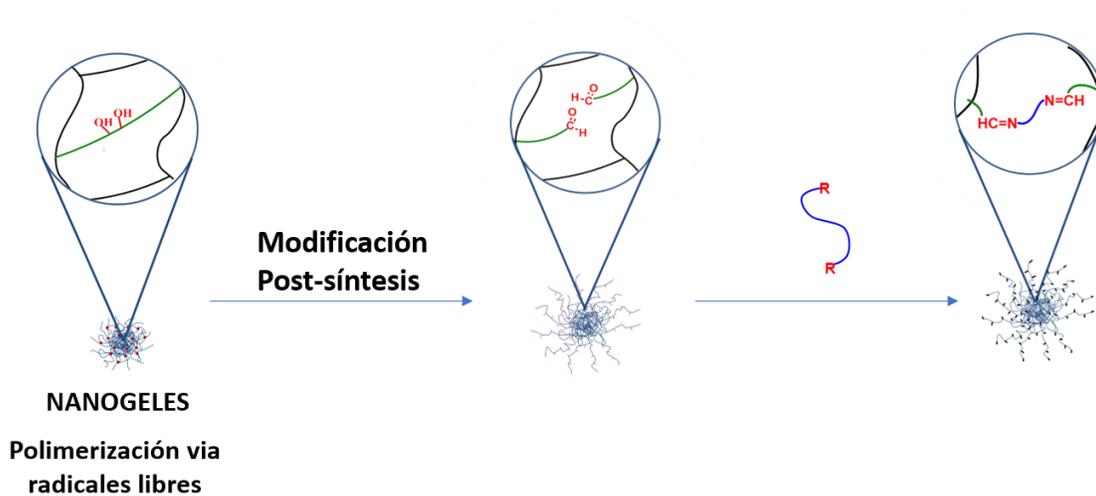
- [1] M. Mahinroosta, Z. Jomeh Farsangi, A. Allahverdi, and Z. Shakoori, "Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications," *Mater. Today Chem.*, vol. 8, pp. 42–55, 2018.
- [2] S. J. Buwalda, K. W. M. Boere, P. J. Dijkstra, J. Feijen, T. Vermonden, and W. E. Hennink, "Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials," *J. Control. Release*, vol. 190, pp. 254–273, 2014.
- [3] N. N. Ferreira, L. M. B. Ferreira, V. M. O. Cardoso, F. I. Boni, A. L. R. Souza, and M. P. D. Gremião, "Recent advances in smart hydrogels for biomedical applications: From self-assembly to functional approaches," *Eur. Polym. J.*, vol. 99, no. July 2017, pp. 117–133, 2018.
- [4] S. Lanzalaco and E. Armelin, "Poly(N-isopropylacrylamide) and Copolymers: A Review on Recent Progresses in Biomedical Applications," *Gels*, vol. 3, no. 4, p. 36, 2017.
- [5] A. Prasannan, H. C. Tsai, and G. H. Hsiue, *Formulation and evaluation of epinephrine-loaded poly(acrylic acid-co-N-isopropylacrylamide) gel for sustained ophthalmic drug delivery*, vol. 124. Elsevier B.V, 2018.
- [6] J. J. Chen, A. L. Ahmad, J. K. Lim, and B. S. Ooi, "Facile synthesis and characterization of thermo-magneto-responsive poly(N-isopropylacrylamide)-magnetite composite hydrogel and its adsorption-desorption study on chromium (III)," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 218, no. July, pp. 39–50, 2018.
- [7] Z. Li, X. Guo, S. Matsushita, and J. Guan, "Differentiation of cardiosphere-derived cells into a mature cardiac lineage using biodegradable poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels," *Biomaterials*, vol. 32, no. 12, pp. 3220–3232, 2011.
- [8] C. H. Zhu, Y. Lu, J. Peng, J. F. Chen, and S. H. Yu, "Photothermally sensitive poly(N-isopropylacrylamide)/graphene oxide nanocomposite hydrogels as remote light-controlled liquid microvalves," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 22, no. 19, pp. 4017–4022, 2012.
- [9] Z. M. O. Rzaev, S. Dinçer, and E. Pişkin, "Functional copolymers of N-isopropylacrylamide for bioengineering applications," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 32, no. 5, pp. 534–595, 2007.
- [10] X. J. Ju, L. Y. Chu, X. L. Zhu, L. Hu, H. Song, and W. M. Chen, "Effects of internal microstructures of poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels on thermo-responsive volume phase-transition and controlled-release characteristics," *Smart Mater. Struct.*, vol. 15, no. 6, pp. 1767–1774, 2006.
- [11] C. Obeso-Vera, J. M. Cornejo-Bravo, A. Serrano-Medina, and A. Licea-Claverie, "Effect of crosslinkers on size and temperature sensitivity of poly(N-isopropylacrylamide) microgels," *Polym. Bull.*, vol. 70, no. 2, pp. 653–664, 2013.
- [12] M. Patenaude and T. Hoare, "Injectable, Degradable Thermo-responsive Poly(N - isopropylacrylamide) Hydrogels," *ACS Macro Lett.*, vol. 1, no. 3, pp. 409–413, 2012.
- [13] J. Gan, X. X. Guan, J. Zheng, H. Guo, K. Wu, L. Liang, and M. Lu, "Biodegradable, thermo-responsive PNIPAM-based hydrogel scaffolds for the sustained release of

- levofloxacin," *RSC Adv.*, vol. 6, no. 39, pp. 32967–32978, 2016.
- [14] A. Bin Imran, K. Esaki, H. Gotoh, T. Seki, K. Ito, Y. Sakai, and Y. Takeoka, "Extremely stretchable thermosensitive hydrogels by introducing slide-ring polyrotaxane cross-linkers and ionic groups into the polymer network," *Nat. Commun.*, vol. 5, pp. 1–8, 2014.
- [15] S. Nayak, D. Gan, M. J. Serpe, and L. A. Lyon, "Hollow thermoresponsive microgels," *Small*, vol. 1, no. 4, pp. 416–421, 2005.
- [16] E. P. Sproul, S. Nandi, C. Roosa, L. Schreck, and A. C. Brown, "Biomimetic Microgels with Controllable Deformability Improve Healing Outcomes," *Adv. Biosyst.*, vol. 1800042, p. 1800042, 2018.
- [17] X. Hu, Z. Tong, and L. A. Lyon, "Multicompartment Core-Shell Microgels.pdf," pp. 11470–11472, 2010.
- [18] X. Hu, Z. Tong, and L. A. Lyon, "Control of Poly(*N*-isopropylacrylamide) Microgel Network Structure by Precipitation Polymerization near the Lower Critical Solution Temperature," *Langmuir*, vol. 27, no. 7, pp. 4142–4148, 2011.
- [19] M. H. Smith, E. S. Herman, and L. A. Lyon, "Network deconstruction reveals network structure in responsive microgels," *J. Phys. Chem. B*, vol. 115, no. 14, pp. 3761–3764, 2011.
- [20] M. Gauthier, M. Gibson, and H.-A. Klok, "Synthesis of Functional Polymers by Post-Polymerization Modification," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 48, no. 1, pp. 48–58, 2009.
- [21] D. Sivakumaran, E. Mueller, and T. Hoare, "Temperature-induced assembly of monodisperse, covalently cross-linked, and degradable poly(*N*-isopropylacrylamide) microgels based on oligomeric precursors," *Langmuir*, vol. 31, no. 21, pp. 5767–5778, 2015.
- [22] E. Mueller, R. J. Alsop, A. Scotti, M. Bleuel, M. C. Rheinstädter, W. Richtering, and T. Hoare, "Dynamically Cross-Linked Self-Assembled Thermoresponsive Microgels with Homogeneous Internal Structures," *Langmuir*, vol. 34, no. 4, pp. 1601–1612, 2018.
- [23] S. Li, Y. Xia, Y. Qiu, X. Chen, and S. Shi, "Preparation and property of starch nanoparticles reinforced aldehyde–hydrazide covalently crosslinked PNIPAM hydrogels," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 135, no. 5, pp. 1–13, 2018.
- [24] D. Sivakumaran, D. Maitland, T. Oszustowicz, and T. Hoare, "Tuning drug release from smart microgel-hydrogel composites via cross-linking," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 392, no. 1, pp. 422–430, 2013.
- [25] O. Melnyk, "α - Oxo Aldehyde or Glyoxylyl Group Chemistry in Peptide Bioconjugation Ouafa a," 2013.
- [26] R. J. Spears and M. A. Fascione, "Site-selective incorporation and ligation of protein aldehydes," *Org. Biomol. Chem.*, vol. 14, no. 32, pp. 7622–7638, 2016.
- [27] A. Wolfel, M. R. Romero, and C. I. Alvarez Igarzabal, "Post-synthesis modification of hydrogels. Total and partial rupture of crosslinks: Formation of aldehyde groups and re-crosslinking of cleaved hydrogels," *Polym. (United Kingdom)*, vol. 116, pp. 251–260, 2017.
- [28] K. Van Durme, G. Van Assche, and B. Van Mele, "Kinetics of demixing and remixing in poly(*N*-isopropylacrylamide)/water studied by modulated temperature DSC,"

Macromolecules, vol. 37, no. 25, pp. 9596–9605, 2004.

- [29] W. Y. Su, Y. C. Chen, and F. H. Lin, “Injectable oxidized hyaluronic acid/adipic acid dihydrazide hydrogel for nucleus pulposus regeneration,” *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 8, pp. 3044–3055, 2010.
- [30] J. Ye, J. Xu, J. Hu, X. Wang, G. Zhang, S. Liu, and C. Wu, “Comparative Study of Temperature-Induced Association of Cyclic and Linear Poly(N -isopropylacrylamide) Chains in Dilute Solutions by Laser Light Scattering and Stopped-Flow Temperature Jump,” *Macromolecules*, vol. 41, no. 12, pp. 4416–4422, 2008.
- [31] F. Chastrette, M. Chastrette, J. C. Duplan, and J. Delmau, “Etude par RMN de la stereochemie d’acetals du glyoxal,” *Tetrahedron*, vol. 27, no. 22, pp. 5579–5585, 1971.
- [32] E. B. Whipple, “The Structure of Glyoxal in Water,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 92, no. 24, pp. 7183–7186, 1970.
- [33] J. Shao and J. P. Tam, “Unprotected Peptides as Building Blocks for the Synthesis of Peptide Dendrimers with Oxime, Hydrazone, and Thiazolidine Linkages,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 117, no. 14, pp. 3893–3899, 1995.

SÍNTESIS Y MODIFICACIÓN POST-SÍNTESIS DE NANOGELES TERMOSENSIBLES



En este capítulo se describe la adaptación de la metodología de síntesis y modificación post-síntesis previamente desarrollada en macrogeles, a la química de nanogeles termosensibles.

Las investigaciones desarrolladas en este capítulo se llevaron a cabo en colaboración con el Prof. Dr. Marcelo Calderón, y su equipo de trabajo, en las instalaciones de la Universidad Libre de Berlín, Alemania.

6.1 - SÍNTESIS DE NANOGELES TERMOSENSIBLES BASADOS EN NIPAm Y NIPMAm

6.1.1 - CONSIDERACIONES GENERALES

Los nanogeles son redes poliméricas hidrofílicas de tamaños nanométricos. La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) recomienda considerar nanopartículas a aquellas que tengan diámetros menores a 100 nm. Sin embargo, dada la extensión de las propiedades nanométricas en algunos nanogeles de tamaños mayores, la denominación “nanogel” es frecuentemente aplicada a geles de diámetros de hasta 500 nm [1], [2].

Al igual que en macrogeles, los nanogeles inteligentes son capaces de sensor cambios en su estructura o en su entorno y responder con un propósito determinado. Tanto su tamaño nanométrico como su capacidad de accionar frente a cambios en el entorno, ha colocado a estos materiales en la mira del desarrollo científico tecnológico en diversas áreas de aplicación como en catálisis, liberación controlada de compuestos de interés (farmacológico, nutricional, entre otros), ingeniería de tejidos, mejora de las propiedades en materiales macrométricos, lentes y sensores ópticos, actuadores, separación de proteínas, membranas, entre otros [3]–[5].

En particular, la mayor cantidad de estudios en el área de los NGs se orientan a su utilización en el desarrollo de plataformas de liberación controlada de fármacos y/o diagnóstico, debido a sus convenientes propiedades: la estabilidad como dispersión en soluciones acuosas, el creciente control en la estructura y propiedades mecánicas y de hinchamiento, diversidad en la naturaleza química del material, posibilidad de funcionalización, capacidad de cargar un fármaco o agente de contraste por interacciones físicas y/o covalentes, y la posibilidad de responder a estímulos del entorno [2]. Un gran número de las investigaciones se orientan al desarrollo de plataformas de liberación controlada de fármacos para el tratamiento del cáncer. En este área, el tamaño nanométrico de los NGs permite evadir mecanismos de eliminación de partículas foráneas del cuerpo y facilita la acumulación selectiva del sistema de liberación del fármaco mediante efecto de permeación y retención aumentada (EPR) [6]. Además, los nanodispositivos pueden ser modificados para incluir una superficie activa con ligandos que permitan la interacción específica con receptores en el tejido tumoral,

incrementando la selectividad en la liberación del fármaco. Al mismo tiempo, los fármacos pueden ser liberados en sitios específicos bajo el efecto de estímulos del entorno [7].

Entre los NGs inteligentes, los más ampliamente estudiados son los termosensibles. De manera análoga a lo observado en la macroescala, estos NGs tienen la capacidad de colapsar o hincharse en respuesta a cambios en la temperatura del solvente en el que están dispersos. Esta característica ha hecho que sean ampliamente estudiados para su aplicación en diversas áreas como las mencionadas anteriormente [8]. El área de mayor desarrollo se enfoca en el cargado y liberación controlada de fármacos, principalmente orientada a tratamientos oncológicos. Entre los diferentes polímeros termosensibles, p-NIPAm ha sido el más estudiado, tanto en el área de macrogeles como en NGs, debido a su temperatura de transición (T_{tf}) cercana a la temperatura corporal. Esta temperatura puede ser modificada mediante la incorporación de distintos comonómeros. En general, la utilización de comonómeros hidrofóbicos disminuye la T_{tf} de los nanogeles, mientras que la utilización de un comonómero hidrofílico la aumenta. De esta manera, se puede controlar la T_{tf} según la necesidad de la aplicación en desarrollo [9].

Por otro lado, existen menos reportes acerca de NGs formados por polimerización del monómero *N*-isopropilmetacrilamida (NIPMAm) (Figura 6.1). La temperatura de transición de NGs homopoliméricos de poli(*N*-isopropilmetacrilamida) (p-NIPMAm) ha sido reportada en valores entre 38 a 47 °C, a diferencia de p-NIPAm, cuya T_{tf} es más baja y más unívocamente definida (32-33 °C) [10]. En los últimos años, ciertas publicaciones mostraron la combinación de NIPAm y NIPMAm como comonómeros para formar hidrogeles con T_{tf} intermedias entre los valores de los homopolímeros, es decir, entre 32 y 47 °C. Esta combinación resulta una estrategia sencilla para el control de la T_{tf} de los macrogeles y microgeles [11], [12]. La combinación de estos dos monómeros, también se ha utilizado para realizar microgeles de estructura y composición química anisotrópica, con fases separadas de cada polímero, obteniendo partículas con más de una T_{tf}, como microgeles *core-shell* [13], [14], microcápsulas con inclusiones del copolímero [15], o nanogeles huecos con doble capa [16].

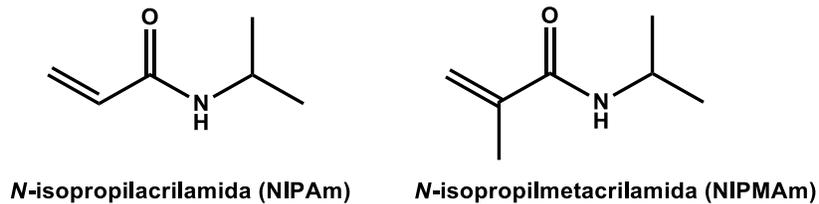


Figura 6.1 - Monómeros utilizados en el desarrollo de polímeros termosensibles.

Los nanogeles termosensibles son generalmente obtenidos mediante síntesis por termoprecipitación, como se describió en el Capítulo 1. La composición, tamaño y estructura de los nanogeles son dependientes de diversos factores de la síntesis como: la diferencia en reactividad de los monómeros y entrecruzantes, la fuerza iónica del medio, la polaridad de los monómeros y de los polímeros formados, la temperatura, entre otras. Por ello, es muy frecuente la utilización de métodos de modificación post-síntesis que permitan funcionalizar adecuadamente a los NGs, luego de haber llevado a cabo la termoprecipitación en condiciones que permitan un buen control del tamaño, estructura y polidispersidad (PD).

El control del grado de entrecruzamiento se realiza habitualmente durante la formación de los NGs por termoprecipitación, mediante la adición controlada de agentes entrecruzantes divinílicos, siendo *N,N'*-metilenbisacrilamida (BIS) el más utilizado [17], [18]. Además, se han generado NGs con entrecruzamientos degradables frente a diversos estímulos, siendo los más utilizados el pH, la presencia de enzimas o reacciones de oxido-reducción [19]. Recientemente, se ha reportado la síntesis de NGs de p-NIPAm entrecruzados con enlaces hidrazona, mediante la reacción de polímeros lineales de p-NIPAm funcionalizados con GF aldehídos, frente a polímeros equivalentes con GF hidrazida [20].

La utilización de periodato de sodio para el clivaje de moléculas con dos funciones vecinales, como dioles, cuenta con antecedentes en microgeles compuestos por polisacáridos como celulosa [21] o ácido hialurónico [22], donde se obtuvieron GF aldehído que fueron utilizados para la formación de enlaces tipo imina o hidrazona, respectivamente. Además,

en nanogeles obtenidos mediante polimerización a radicales libres, se ha utilizado a 1,2-(dihidroxietileno)bisacrilamida (DHEA) en la preparación de nanogeles de p-NIPAm y p-NIPMAm para estudiar la formación de autoentrecruzamientos en la síntesis de estos NGs por termoprecipitación [23]; o para la obtención de estructuras huecas [24] y nanogeles *core-shell* con múltiples compartimentos [25].

En este capítulo, se propone la utilización del entrecruzante (+)-*N,N'*-dialiltartramida (DAT) en la síntesis, mediante termoprecipitación, y modificación post-síntesis de nanogeles termosensibles basados en p-NIPAm y p-NIPMAm. De acuerdo con nuestro conocimiento, no se encuentran reportes en la utilización del agente entrecruzante DAT para la síntesis de nanogeles o microgeles, en ninguna composición. Además, tampoco se encuentran reportes de la obtención de GF α -oxo-aldehído en NGs. Esta técnica podría ser una importante herramienta para la modificación de la estructura y funcionalidad de nanogeles, generando además, facilidades para la (bio)conjugación de estos polímeros con moléculas de interés.

6.1.2 - OBJETIVOS

En este Capítulo se propone estudiar la aplicación de la estrategia de síntesis y modificación post-síntesis desarrollada en macrogeles, a la síntesis y modificación de nanogeles (NGs). Dada la diferencia en los mecanismos de síntesis de nanogeles respecto de macrogeles, se propone evaluar cómo afectan las condiciones de síntesis a la incorporación del entrecruzante DAT y el posterior efecto del tratamiento post-síntesis de los NGs. Luego, se propone estudiar una serie de posibles aplicaciones basadas en los NGs sintetizados mediante la estrategia desarrollada.

- Estudiar la síntesis de nanogeles termosensibles basados en los monómeros NIPAm y NIPMAm, entrecruzados con el agente (+)-*N,N'*-dialiltartradiamida (DAT). Evaluar la incorporación del entrecruzante ante diferentes condiciones de síntesis.
- Aplicar la modificación post-síntesis de los nanogeles previamente sintetizados, mediante el clivaje de los dioles vecinales del entrecruzante DAT por oxidación con periodato de sodio. Analizar cambios en la morfología y funcionalidad de las partículas.
- Ensayar posibles aplicaciones de materiales generados mediante la técnica de síntesis y modificación post-síntesis de NGs termosensibles previamente desarrollada.

6.1.3 - MATERIALES Y MÉTODOS

REACTIVOS

Los monómeros *N*-isopropilacrilamida (Sigma-Aldrich) y *N*-isopropilmetacrilamida (Sigma-Aldrich) fueron recristalizados en hexano para eliminar al agente estabilizante antes de utilizarlos. Los agentes *N,N'*-metilenbis(acrilamida) (BIS); (+)-*N,N'*-dialiltartrdiamida (DAT) (Sigma-Aldrich); *N,N,N',N'*-tetrametililetildiamina (TEMED) (Sigma); Persulfato de amonio (APS) (Anedra); dodecil sulfato de sodio (SDS) (Anedra); periodato de sodio (Sigma-Aldrich); dihidrazida de ácido adípico (AADH) (Anedra) se utilizaron tal y como fueron adquiridos. Las soluciones se prepararon con agua ultrapura ($18\text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$) obtenida de un sistema Millipore Milli-Q® de purificación de agua.

SÍNTESIS DE NANOGELÉS

Para la síntesis de NGs termosensibles se disolvió 1×10^{-3} mol del monómero (NIPAm y/o NIPMAm) junto con las respectivas cantidades de entrecruzantes (Tabla 6.1, Tabla 6.2 y Tabla 6.3) y $3,2 \times 10^{-3}$ mol de SDS en 5 mL de agua ultrapura (concentración final del monómero = 0,2 M). La solución se desoxigenó, en un balón de reacción, mediante burbujeo de N_2 durante 10 min. En los casos en que se utilizó TEMED, se adicionaron 0,25 mL de solución de TEMED (0,32 M). Luego, la solución se llevó a un baño a 70 °C con agitación magnética (350 r.p.m.) durante 5 min y, posteriormente, se adicionaron 0,25 mL de una solución de APS (0,158 M). Las reacciones procedieron con la mencionada temperatura y velocidad de agitación durante 4 h. Los productos fueron purificados mediante diálisis utilizando membranas de 50 kDa (Spectra/Por® 6 Standard RC), con repetidos cambios de agua destilada, durante al menos 48 h.

MODIFICACIÓN UTILIZANDO PERIODATO DE SODIO

Luego de ser sintetizados y purificados mediante diálisis, los NGs en solución fueron tratados con periodato de sodio. El periodato de sodio se estimó en exceso respecto de los

moles de DAT estimados, en un determinado volumen a tratar, mediante la siguiente Ecuación 6.1:

$$m_{DAT} = \frac{m_{DAT_i}}{V_f} \times V \quad \text{Ecuación 6.1}$$

Donde m_{DAT_i} corresponden a los moles totales del entrecruzante utilizados en la síntesis del NG a tratar; V_f es el volumen final de la solución durante la síntesis y V es el volumen a tratar con periodato. Por lo tanto, los moles de NaIO_4 en exceso, se calcularon como $m_{\text{NaIO}_4} = 2 \times m_{DAT}$.

Luego de 2 h de reacción a temperatura ambiente y bajo agitación mecánica, los nanogeles fueron purificados mediante diálisis utilizando membranas de 50 kDa (Spectra/Por® 6 Standard RC), con repetidos cambios de agua destilada, durante al menos 48 h.

DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ (DLS)

Los estudios de DLS se realizaron en un equipo Nano-ZS 90 Malvern equipado con un láser He-Ne ($\lambda = 633 \text{ nm}$) midiendo la luz dispersada a un ángulo de 173° . El producto purificado por diálisis y liofilizado fue resuspendido en agua destilada antes de ser medido (aprox. $1 \text{ mg}/1\text{mL}$). Cada muestra fue mantenida a la temperatura adecuada al menos durante 10 min antes de la medida, ya que se determinó que era tiempo suficiente para alcanzar la estabilidad térmica del sistema.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)

Las muestras se prepararon mediante la aplicación de 1 gota ($5 \mu\text{L}$) de solución de nanogeles ($1 \text{ mg}/\text{mL}$) sobre el soporte utilizado (descrito más abajo). El exceso de líquido se removió por secado con un papel absorbente. Luego, se adicionó 1 gota ($5 \mu\text{L}$) de solución de acetato de uranilo (1 \% p/v) y se mantuvo durante 60 segundos. El exceso de material de contraste

se removió con papel absorbente y la muestra se secó al aire. Utilizando esa metodología, las micrografías se tomaron en dos Microscopios Electrónicos distintos, utilizando el modo de Transmisión electrónica:

1) Microscopio electrónico TECNAI G2 20 TWIN operado a 200 kV y equipado con un filamento de LaB₆ en el instituto Polymat, San Sebastián, País Vasco. Las muestras se prepararon en grillas de cobre cubiertas de carbono (300 meshes, QUANTILOF).

2) Microscopio electrónico Hitachi Scanning (SU8030, Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan) (20 kV) de la Universidad Libre de Berlín. Las muestras se prepararon en grillas de cobre cubiertas de carbono (300 meshes, QUANTIFOIL Micro Tools GmbH, Großlöbichau, Germany) hidrofilizadas (60 s baja descarga a 8 W utilizando un dispositivo BALTEC MED 020).

6.1.4 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

NANOGELES BASADOS EN EL MONÓMERO NIPAm: síntesis mediante descomposición térmica de APS y descomposición redox APS/TEMED.

SÍNTESIS DE NGs.

Se sintetizaron NGs de p-NIPAm entrecruzados con un porcentaje fijo de BIS (1,5 %mol) y variable de DAT, mediante polimerización en dispersión (termoprecipitación), en presencia de SDS y a 70 °C. Para iniciar la reacción, se utilizaron dos diferentes estrategias: la descomposición térmica de APS o la iniciación mediante la dupla redox APS/TEMED. La Tabla 6.1 resume la composición de las distintas síntesis ensayadas para la síntesis de NGs.

Tabla 6.1 - Nanogeles basados en p-NIPAm: composición, condiciones de reacción y diámetro hidrodinámico (Dh) antes y después de su reacción con periodato.

Composición				Antes de la oxidación con NaIO ₄		Luego de la oxidación con NaIO ₄	
Síntesis	BIS (mol%)	DAT (mol%)	INICIADOR	Dh* (d.nm)	PDI (DLS)	Dh* (d.nm)	PDI (DLS)
p-NIPAm-BIS _{APS}	1,5	0	APS	137,9	0,117	137,7	0,114
p-NIPAm-BIS-DAT8 _{APS}	1,5	8	APS	113,3	0,12	144,9	0,141
p-NIPAm-BIS-DAT10 _{APS}	1,5	10	APS	83,92	0,048	132,4	0,132
p-NIPAm-BIS-DAT12 _{APS}	1,5	12	APS	89,76	0,114	118,4	0,162
p-NIPAm-BIS-DAT15 _{APS}	1,5	15	APS	109,1	0,107	133,5	0,135
p-NIPAm-BIS _{APS/TEMED}	1,5	0	APS/TEMED	182,1	0,095	177,0	0,086
p-NIPAm-BIS-DAT8 _{APS/TEMED}	1,5	8	APS/TEMED	211,2	0,178	178,5	0,067
p-NIPAm-BIS-DAT10 _{APS/TEMED}	1,5	10	APS/TEMED	202,5	0,225	168,4	0,076
p-NIPAm-BIS-DAT12 _{APS/TEMED}	1,5	12	APS/TEMED	204,4	0,244	166,5	0,088
p-NIPAm-BIS-DAT15 _{APS/TEMED}	1,5	15	APS/TEMED	274,6	0,395	126,4	0,134

* DLS, valor de la media de intensidad, promedio de 3 medidas consecutivas. Temperatura: 20 °C.

Los NGs de **p-NIPAm-BIS** fueron sintetizados con 1,5 mol% de BIS como único agente entrecruzante. Utilizando ambos sistemas de iniciación, se obtuvieron partículas con bajo índice de polidispersidad (PDI < 0,11). Notoriamente, los NGs de **p-NIPAm-BIS_{APS}** tienen un diámetro hidrodinámico (Dh) más pequeño que aquellos sintetizados en iguales condiciones, pero en presencia de TEMED.

Varios autores han descrito que durante la síntesis de NGs de NIPAm iniciada por la descomposición térmica de APS, se produce la formación de auto-entrecruzamientos (SC, del inglés *Self-Crosslinking*) entre las cadenas poliméricas de p-NIPAm, provocados por la abstracción de un hidrógeno de la cadena principal del polímero por parte de una cadena en crecimiento. Este SC ha permitido que se sintetizen NGs de p-NIPAm en ausencia de agentes entrecruzantes [23], [26], [27]. Smith y colaboradores reportaron que, al iniciar la reacción con la dupla APS/TEMED, la presencia de TEMED evita la formación de SC. Los autores propusieron que el TEMED residual actúa como un agente de transferencia

efectivo, minimizando las transferencias de cadenas entre polímeros de p-NIPAm. Considerando este fenómeno, el menor tamaño observado en **p-NIPAm-BIS_{APS}** en comparación con **p-NIPAm-BIS_{APS/TEMED}** podría deberse a la formación de auto-entrecruzamientos en el primer sistema. El incremento en el grado de entrecruzamientos podría llevar a un menor grado de hinchamiento, al generar una red más densa y compacta. Sin embargo, es posible que exista también un efecto relacionado a la cantidad de radicales formados al inicio de la reacción. La utilización de la dupla redox tiene como principal efecto la generación de un gran número de radicales libres al comienzo de la reacción, a velocidad más alta respecto de la descomposición térmica de APS. Esto podría tener consecuencias en el número de cadenas de propagación de la reacción al inicio, afectando posteriormente al tamaño final durante la nucleación de las partículas. Como se muestra a continuación, este efecto fue aún más marcado al incrementar el porcentaje de entrecruzante utilizando DAT.

Al combinar los entrecruzantes BIS y DAT, los tamaños de los NGs se ven aún más diferenciados, dependiendo del sistema de iniciación utilizado (Ver Figura 6.2). Los NGs sintetizados por descomposición térmica de APS disminuyeron su D_h levemente al incrementarse el porcentaje de DAT en la síntesis (**p-NIPAm-BIS-DATX_{APS}**), respecto de los NGs en ausencia de DAT (**p-NIPAm-BIS_{APS}**). Este resultado es equivalente al reportado en literatura para nanogeles de **p-NIPAm-BIS_{APS}**, donde se describe la disminución del D_h de las partículas al aumentar el porcentaje de BIS y luego, un aumento cuando el porcentaje de BIS alcanza el 15 % mol [28].

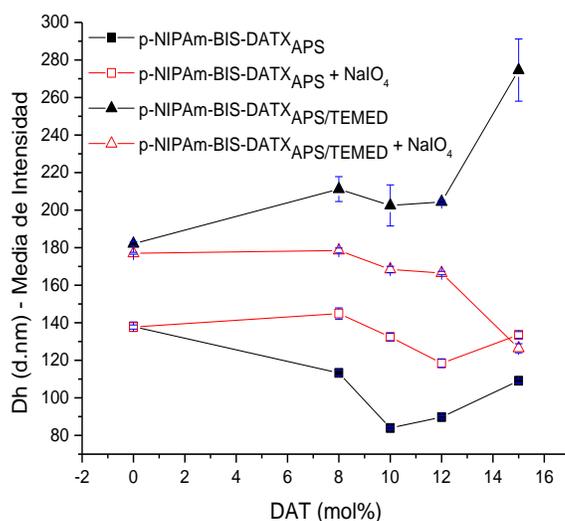


Figura 6.2 - Dh de NGs de p-NIPAm-BIS-DAT sintetizados por termoprecipitación iniciada por: descomposición térmica de APS (negro, cuadrados) o mediante la dupla redox APS/TEMED (negro, triángulos). Se muestran los Dh obtenidos luego del tratamiento con periodato (rojo, figuras huecas).

La tendencia fue completamente diferente en NGs sintetizados en presencia de TEMED. En este caso, el Dh aumentó con el incremento del %DAT en NGs de **p-NIPAm-BIS-DATX_{APS/TEMED}**. Este aumento no lineal respecto del porcentaje de entrecruzante utilizado es equivalente a lo descrito por Virtanen y colaboradores en sistemas de p-NIPAm-BIS, iniciados por la dupla redox APS/TEMED, según se aumenta el porcentaje de BIS [29], [30]. Estos autores describieron dicho aumento, en partículas en su estado colapsado post-síntesis, proponiendo que, en dichas condiciones de iniciación, el entrecruzante afecta a la nucleación de las partículas de manera temprana en la reacción y genera una incorporación más eficiente de los fragmentos de cadena corta de la fase continua. Es decir que, durante la fase de nucleación, se incrementaría la posibilidad de agregación irreversible de los polímeros globulares en crecimiento, al encontrarse con dobles enlaces no polimerizados de BIS en otros polímeros globulares. Este fenómeno causaría la disminución de la densidad de partículas en solución, resultando en tamaños mayores hacia el final de la reacción.

TRATAMIENTO CON PERIODATO.

Como se observó previamente en macrogeles, el agente entrecruzante DAT posee un diol vecinal que puede ser clivado en presencia del anión periodato, conduciendo a la ruptura selectiva de estos entrecruzamientos, mientras se mantienen aquellas uniones covalentes debidas a BIS. Bajo esa consideración, se trató a los nanogeles con una solución acuosa de periodato de sodio (en exceso) para lograr la ruptura de los entrecruzamientos debidos a DAT y evaluar la magnitud y naturaleza de los cambios en las propiedades de los nanogeles. Dichos cambios han de estar relacionados a la manera en que DAT fue incorporado en las partículas.

En la Figura 6.2 puede observarse la modificación de los valores Dh de los NGs al ser tratados con periodato de sodio. La ausencia de DAT en las síntesis **p-NIPAm-BIS_{APS}** y **p-NIPAm-BIS_{APS/TEMED}** produjo NGs cuyo Dh no se vió alterado frente al tratamiento con periodato, tanto en la reacción iniciada con APS como con la dupla APS/TEMED. Esto refleja, como ya se ha demostrado en macrogeles, que el periodato no produce modificaciones sobre el entrecruzante BIS. Por otro lado, en los NGs en que DAT fue utilizado como entrecruzante, se observó un evidente cambio en el Dh.

En el caso de NGs de **p-NIPAm-BIS-DATX_{APS}**, el Dh aumentó entre 22 y 58 %, respecto de los Dh originales, luego de la ruptura de DAT. Este cambio evidencia la incorporación de DAT en esas partículas y es coherente con la disminución del Dh al incrementarse el porcentaje de DAT en la síntesis, como se describió anteriormente. Además, luego del tratamiento con periodato, todos los valores de Dh se acercan al valor obtenido en **p-NIPAm-BIS_{APS}** (aprox. 137,9 nm), con una diferencia máxima de 20 nm (14%). Podría suponerse que en todas las síntesis se obtiene una estructura similar a la de **p-NIPAm-BIS_{APS}**, la cual define el Dh de los NGs, pero es la incorporación del entrecruzante DAT lo que lleva a una disminución del tamaño final. Entonces, se puede decir que la incorporación de DAT, en NGs de **p-NIPAm-BIS-DATX_{APS}**, sintetizados por descomposición térmica de APS, no es despreciable, pero es poco relevante en la determinación del Dh final de las partículas, inclusive utilizando altos porcentajes del entrecruzante. En estas condiciones, los entrecruzamientos predominantes en los NGs serían posiblemente debidos a BIS y a auto-entrecruzamientos.

Smith y colaboradores describieron un comportamiento análogo en la síntesis de NGs de p-NIPAm entrecruzados con el agente 1,2-(dihidroxi-etileno)bisacrilamida (DHEA). Se observó deficiente incorporación de DHEA en los NGs, en comparación con geles entrecruzados con BIS, atribuyendo esto a que DHEA es más hidrofílico que BIS. Esto, generaría que los segmentos ricos en el entrecruzante hidrofílico tengan menor tendencia a ser incorporados en las partículas de p-NIPAm que inician su crecimiento y podrían ser incorporados, hacia el final de la formación de los nanogeles, sobre su periferia. En los estudios de degradación de estos nanogeles, realizados por Smith y colaboradores, la estructura de los nanogeles mostró núcleos entrecruzados principalmente por el auto-entrecruzamiento de p-NIPAm mientras que el entrecruzante hidrofílico fue incorporado en la parte más externa del nanogel [23].

En la síntesis de macrogeles, se ha reportado al agente DAT como un entrecruzante más hidrofílico que DHEA y aún más hidrofílico que BIS. Además, se reportó que BIS y DHEA tienen similar reactividad frente al monómero acrílico acrilamida, mientras que DAT es aparentemente menos reactivo frente al mismo [31], [32]. Considerando estos antecedentes, es posible que DAT tenga una tendencia aún menor que DHEA a ser incorporado en las partículas durante todo el proceso de formación de las mismas. Posiblemente, cuando la reacción se inicia por descomposición térmica de APS, unos pocos radicales son formados al inicio, quienes reaccionarán con las moléculas más reactivas del medio para formar las primeras partículas de nucleación. Siendo BIS y NIPAm los agentes más reactivos, los NGs formados por descomposición térmica de APS alcanzarían su madurez con una composición predominante de estos dos componentes. Mientras, agentes entrecruzantes menos reactivos y/o hidrofílicos como DAT o DHEA formarían oligómeros hidrofílicos que se incorporarán en menor proporción, y posiblemente en la periferia de las partículas. Esto se refleja en los resultados obtenidos, al observar el poco efecto que tiene el aumento del porcentaje de DAT en los NGs de **p-NIPAm-BIS-DATX_{APS}**.

Por otro lado, los geles de **p-NIPAm-BIS-DATX_{APS/TEMED}** habían mostrado gran dependencia del D_h con el porcentaje de DAT utilizado. Como se aprecia en la Figura 6.2, luego del tratamiento con periodato, el tamaño de estos NGs disminuyó drásticamente, evidenciando

la ruptura de los entrecruzamientos generados por DAT. Los valores disminuyen hasta 2,2 veces respecto del diámetro inicial. En esta oportunidad, los tamaños disminuyeron hacia valores similares o menores al D_h obtenido en ausencia de DAT (**p-NIPAm-BIS_{APS/TEMED}**), con una tendencia proporcional al porcentaje de DAT utilizado en la síntesis. Este resultado revela que, en estas condiciones de iniciación, DAT es más eficientemente incorporado en las partículas finales y que participa en la nucleación de partículas de menor tamaño. Además, ante altas concentraciones de DAT, las partículas obtenidas en la modificación post-síntesis adquieren menor tamaño. Este resultado se corresponde con lo propuesto por Virtanen y colaboradores y sugiere que, ante altas concentraciones de entrecruzante, este interviene de manera más temprana en la nucleación de las partículas en crecimiento. Esto generaría la disminución de la densidad de partículas en la dispersión, generando tamaños mayores hacia el final de la nucleación. En nuestro caso, este efecto fue observado sólo frente a la iniciación con la dupla rédox APS/TEMED.

Por otro lado, se obtuvieron partículas de menor tamaño, monomodales y de menor PD luego del clivaje con periodato. Esto indicaría que, tempranamente en la reacción, se generaron partículas precursoras bien definidas que fueron luego nucleadas y entrecruzadas por DAT y/o engrosadas por incorporación de fragmentos poliméricos que contenían al entrecruzante. Además, el tamaño de estas partículas es menor, mientras mayor cantidad de DAT se utilizó en la síntesis. Esto, sustenta la hipótesis de que, ante altas concentraciones de DAT, éste interviene más tempranamente en la nucleación de las partículas en formación. Por último, es posible que estas partículas precursoras estén internamente entrecruzadas por BIS, por ser más hidrofóbico y reactivo que DAT.

MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.

Se realizaron micrografías TEM de los nanogeles, antes y después del tratamiento con periodato, utilizando acetato de uranilo como agente de contraste (Figura 6.3 y Figura 6.4).

Como puede observarse en la Figura 6.3 (a, a' y a''), los NGs de p-NIPAm-BIS-DAT10_{APS/TEMED} mostraron morfologías esféricas con tamaños entre 50 a 90 nm. Además, se observaron

partículas donde las esferas mencionadas aparentan estar unidas formando dímeros o trímeros de mayor tamaño. Este fenómeno coincide con los valores obtenidos por DLS. En particular, la distribución de tamaños de Dh de acuerdo a la media de volumen (ver Anexo) mostró una distribución bimodal con máximos en 103,6 y 260,3 nm. Por lo tanto, el valor de Dh medio de acuerdo a la intensidad de luz reflejada fue de 202,5 nm con un índice de PD relativamente alto. La medida por DLS arroja el valor del diámetro hidrodinámico del polímero en solución o el equivalente a una esfera que se mueve (movimiento Browniano) de la misma manera que el polímero en solución, por lo tanto, se ve afectada por la esfera de hidratación del polímero, la presencia de cadenas poliméricas en la zona externa o su morfología. Una partícula de forma alargada, por ejemplo en forma de barra, mostrará un Dh similar al de una esfera de diámetro equivalente al lado más largo de la partícula. Además, el Dh medio por intensidad en DLS pondera más a los tamaños más grandes de partícula, porque dispersan más la luz [33].

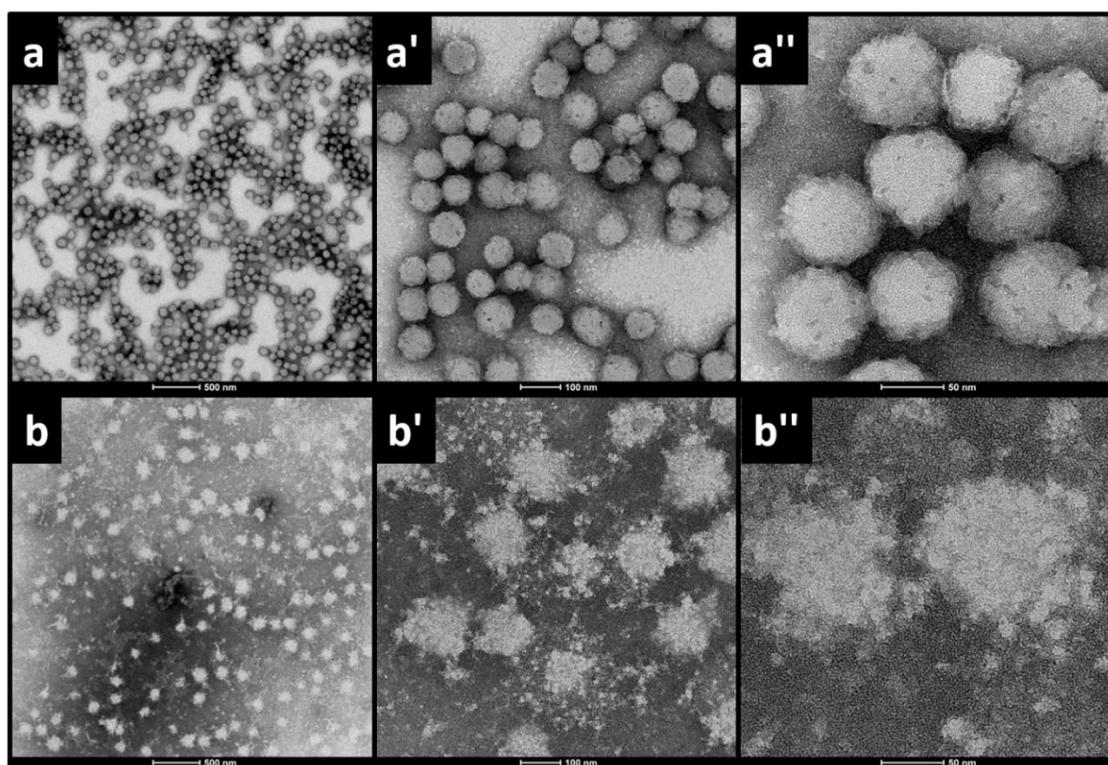


Figura 6.3 - Micrografía de TEM de $p\text{-NIPAm-BIS-DAT}(10)_{\text{APS/TEMED}}$ antes (arriba, a, a' y a'') y después (abajo, b, b' y b'') del tratamiento con periodato.

Luego del tratamiento con periodato de sodio, los NGs presentaron gran cambio a nivel morfológico/estructural. Debido a la ruptura de los entrecruzamientos, los NGs mostraron una morfología esférica menos definida y estructuras de aspecto menos homogéneo y poroso, aparentemente formadas por pequeñas partículas esféricas nucleadas. Además, se observaron partículas de menor tamaño alrededor de los NGs, posiblemente debidas al clivaje de cadenas poliméricas que se encontraban unidas a los NGs a través del entrecruzante DAT. No se observó la presencia de posibles dímeros o trímeros de las nanoesferas, indicando la ruptura de las uniones interpartícula. Esto concuerda con las observaciones realizadas mediante DLS, donde se observó disminución del PDI, curvas de distribución de tamaños monomodales y D_h medios menores, de alrededor de 120 nm. Esta tendencia indica que el clivaje llevaría a la ruptura de uniones entre partículas precursoras, que habían sido nucleadas mediante el entrecruzante DAT de manera poco controlada (llevando a valores de PDI altos). El clivaje de los entrecruzamientos lleva a la obtención de NGs con valores homogéneos de D_h . Considerando esto, y en condiciones en que el auto-entrecruzamiento estaría minimizado por el uso de TEMED, se puede inferir que el entrecruzante BIS ha sido más determinante en el tamaño de las partículas precursoras de los NGs, ya que se obtienen NGs con muy poca polidispersidad luego del tratamiento con periodato. Sin embargo, el entrecruzante DAT habría permitido la incorporación de nuevos fragmentos de polímero o la formación de uniones entre partículas maduras, aumentando el tamaño final de los nanogeles. Esta observación concuerda con lo propuesto por Smith y colaboradores, quienes indicaron que la incorporación de BIS, un agente entrecruzante más reactivo y más hidrofóbico, se daría de manera preferente en el interior de las partículas crecientes de p-NIPAm-BIS mientras que un entrecruzante más hidrofílico (como DHEA o DAT) se incorporaría de manera menos eficiente y en estados tardíos del crecimiento de las partículas. Sin embargo, la ruptura oxidativa de DAT genera claros cambios morfológicos en las partículas, como se observó en TEM, que podrían ser tanto superficiales como afectar a toda la estructura del NG.

La combinación del entrecruzante químicamente clivable, DAT, con el entrecruzante no clivable BIS, permitió indagar en la manera en que las partículas de nucleación han sido

formadas, y más tarde entrecruzadas para dar lugar a NGs de mayor tamaño. De lo contrario, si los entrecruzamientos debidos a BIS y DAT estuviesen distribuidos de manera más homogénea en la estructura de los NGs, se esperaría que el cambio de tamaño de los NGs, luego del tratamiento con periodato, no llevase a la formación de NGs con menor Dh, sino mayor (por disminución del grado de entrecruzamiento y aumento del hinchamiento).

Por otro lado, como se observó por DLS, los NGs de p-NIPAM-BIS-DAT_{APS}, sintetizados por descomposición térmica de APS, mostraron un comportamiento muy diferente respecto a la incorporación de DAT y el posterior tratamiento con periodato. Esta diferencia fue claramente confirmada mediante TEM (Figura 6.4).

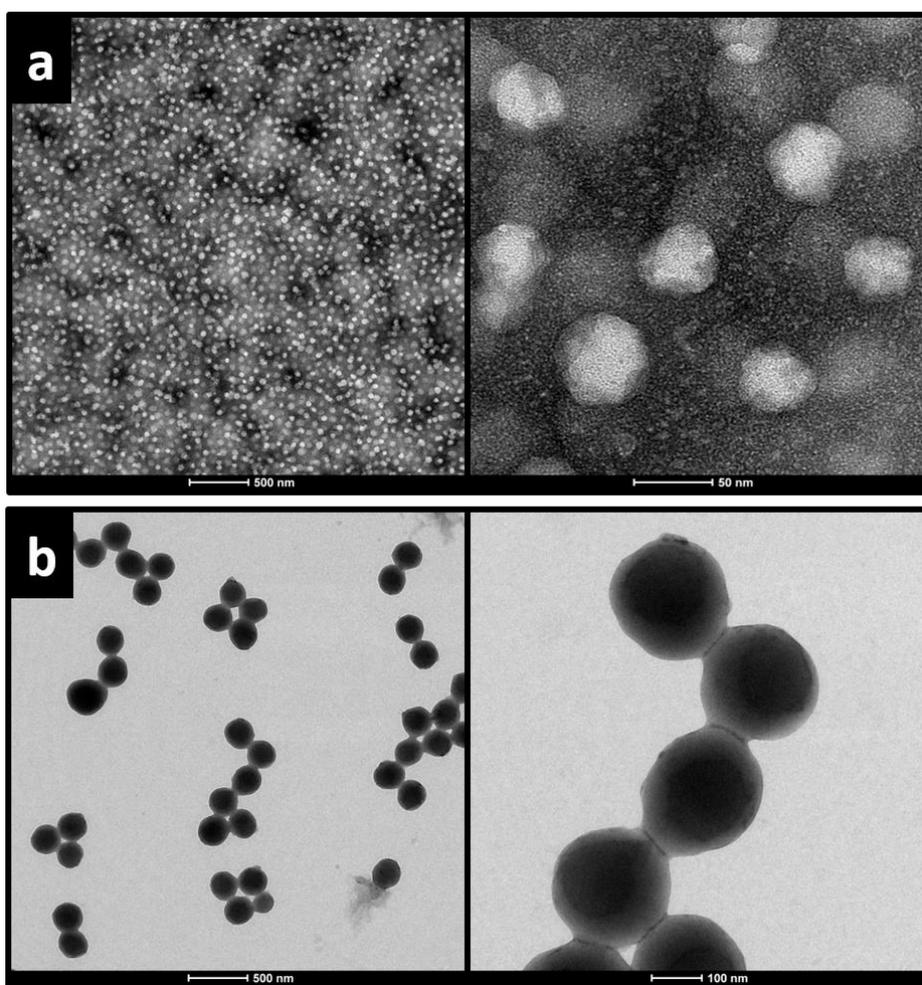


Figura 6.4 – Micrografía de TEM de a) p-NIPAm-BIS-DAT_{10APS} (antes del tratamiento con periodato). (b) p-NIPAm-BIS-ALD_{10APS} (luego del tratamiento con periodato).

Los NGs de **p-NIPAm-BIS-DAT10**_{APS} muestran morfologías esféricas con tamaños de entre 30 a 50 nm y baja polidispersidad (Figura 6.4a). Estos valores son coherentes a lo observado por DLS (aprox. 84 nm de diámetro y PDI 0,048). Luego del tratamiento con periodato de sodio (Figura 6.4b), la morfología esférica y la baja polidispersidad se mantienen, mientras que se observa aumento en el tamaño. Además, se observa una diferencia en la interacción con el agente de contraste que genera la apariencia de una estructura tipo núcleo-capa (*core-shell*), cuyo núcleo (zona de mayor contraste) es de aproximadamente 150 nm. Sin embargo, este tipo de arreglo espacial debería ser corroborado mediante otras técnicas de caracterización como la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, del inglés *Atomic Force Microscopy*) o técnicas de difracción de bajo ángulo (SAS, del inglés *Small-Angle Scattering*). Aún así, se puede concluir que el tratamiento con periodato genera un cambio en el tamaño de los NGs por ruptura de los entrecruzamientos debidos a DAT, manteniendo baja polidispersidad, tal y cómo se observó por DLS.

De manera general, se puede concluir que la combinación de los dos entrecruzantes y el posterior clivaje de DAT permitió diferenciar el efecto de iniciar la reacción con APS o con APS/TEMED. En el primer caso, se obtuvieron partículas de tamaño similar independientemente de la concentración de DAT, indicando baja incorporación de este entrecruzante, aunque no despreciable. Esto, evidencia la diferencia de reactividad y/o hidrofiliidad de los entrecruzantes y cómo esto afecta a su incorporación en las partículas. Por otro lado, la iniciación redox generó un cambio muy grande en la forma en que las partículas fueron formadas. Se observó un gran aumento del tamaño con el porcentaje de DAT, denotando su mayor incorporación con este sistema de iniciación. Además, los nanogeles obtenidos estarían formados por partículas más pequeñas, de baja PD, que han sido nucleadas por DAT, posiblemente hacia el final de la síntesis, según se observó luego del tratamiento con periodato. Entonces, el uso de TEMED no sólo tiene un efecto en minimizar la formación de auto-entrecruzamientos, sino también en cómo son incorporados los entrecruzantes en el material.

NANOGELES BASADOS EN EL MONÓMERO NIPMAm: síntesis mediante descomposición térmica de APS y descomposición redox APS/TEMED.

SÍNTESIS DE NANOGELES

Utilizando las mismas condiciones de síntesis empleadas en geles de p-NIPAm, se sintetizaron NGs usando al monómero *N*-isopropilmetacrilamida (NIPMAm). Nuevamente, se ensayó el efecto de iniciación de la reacción por descomposición térmica de APS o mediante iniciación redox con la dupla APS/TEMED, según se muestra en la Tabla 6.2.

Tabla 6.2 - Nanogeles basados en p-NIPMAm: composición, condiciones de reacción y diámetro hidrodinámico (D_h) antes y después de su reacción con periodato.

Composición				Antes de la oxidación con NaIO_4		Luego de la oxidación con NaIO_4	
Síntesis	BIS (mol%)	DAT (mol%)	INICIADOR	D_h^* (d.nm)	PDI (DLS)	D_h^* (d.nm)	PDI (DLS)
p-NIPMAm-BIS _{APS}	1,5	0	APS	158,6	0,066	157,8	0,092
p-NIPMAm-BIS-DAT8 _{APS}	1,5	8	APS	252,8	0,008	242,0	0,084
p-NIPMAm-BIS-DAT10 _{APS}	1,5	10	APS	139,0	0,024	142,7	0,108
p-NIPMAm-BIS-DAT12 _{APS}	1,5	12	APS	127,1	0,054	134,2	0,123
p-NIPMAm-BIS-DAT15 _{APS}	1,5	15	APS	134,1	0,049	149,1	0,122
p-NIPMAm-BIS _{APS/TEMED}	1,5	0	APS/TEMED	PD	0,444	PD	0,483
p-NIPMAm-BIS-DAT8 _{APS/TEMED}	1,5	8	APS/TEMED	139,2	0,292	PD	0,519
p-NIPMAm-BIS-DAT10 _{APS/TEMED}	1,5	10	APS/TEMED	149,9	0,232	PD	0,574
p-NIPMAm-BIS-DAT12 _{APS/TEMED}	1,5	12	APS/TEMED	157,3	0,209	153,3 [§]	0,457
p-NIPMAm-BIS-DAT15 _{APS/TEMED}	1,5	15	APS/TEMED	171,8	0,088	175,6 [§]	0,359

* DLS, promedio de la media de intensidad. § múltiples picos; por volumen se refleja una disminución de tamaño. PD: muestras demasiado polidispersas para informar un valor confiable de D_h .

Se observaron grandes diferencias al estudiar mediante DLS a los sistemas p-NIPMAm-BIS_{APS} y p-NIPMAm-BIS_{APS/TEMED}, sintetizados con BIS como único agente entrecruzante. Los NGs sintetizados por descomposición térmica de APS tuvieron una distribución monomodal con índices de polidispersidad menores a 0,07, mientras que en presencia de TEMED la

diversidad de tamaños de partícula alcanzó índices de 0,44 y distribuciones polimodales. Además, los nanogeles de **p-NIPMAm-BIS_{APS}** tienen D_h mayores a los obtenidos para **p-NIPAm-BIS_{APS}**. Es posible comprender estos resultados considerando reportes previos sobre la reactividad de NIPMAm y NIPAm frente al entrecruzante BIS.

Wedel y colaboradores también reportaron un mayor tamaño en NGs de NIPMAm, comparados con NGs de NIPAm sintetizados en las mismas condiciones. La principal diferencia entre estos monómeros está en el grupo metilo presente, en el doble enlace, en la estructura de NIPMAm y ausente en NIPAm (Figura 6.1). Durante la reacción de polimerización, el grupo metilo, ubicado sobre el carbono radical de la cadena creciente de p-NIPMAm, genera una mayor estabilización de la especie reactiva mediante el fenómeno de hiperconjugación. Por ende, el radical polimérico creciente de p-NIPMAm reaccionará más lentamente, y esto se verá reflejado en menor cantidad de partículas al inicio de la síntesis, derivando en NGs de mayor tamaño al final [34].

Además, estudios cinéticos han demostrado que los radicales formados a partir de BIS reaccionan más rápidamente con otras moléculas de BIS que con NIPMAm. Por lo tanto, se presume que el agente entrecruzante es consumido rápidamente, en los momentos iniciales de la polimerización, formando oligómeros sin sensibilidad térmica (hidrosolubles) que no serán incorporados en las etapas tempranas de nucleación de las partículas. Mientras tanto, se formarán oligómeros y partículas de p-NIPMAm con bajo porcentaje de BIS, es decir, partículas de nucleación levemente entrecruzadas. Los oligómeros de BIS podrían luego incorporarse a las partículas crecientes de p-NIPMAm por interacciones hidrofóbicas [10], [34]. En el trabajo de Wedel y colaboradores, se comprobó que luego de la síntesis de NGs de **p-NIPMAm-BIS_{APS}** se obtiene una gran cantidad de polímero residual soluble en agua que no fue incorporado en los microgeles (cerca del 50%). En contraste, en NGs de **p-NIPAm-BIS_{APS}** la cantidad de polímero residual soluble fue menor al 20%. Estos antecedentes explicarían la diferencia de tamaños observada entre NGs de **p-NIPMAm-BIS_{APS}** y **p-NIPAm-BIS_{APS}**.

Por otro lado, en uno de los citados reportes, se observó que el aumento en la concentración de iniciador o en la temperatura de reacción, lleva a la formación de mayor cantidad de polímero residual soluble en agua [10]. Considerando que el principal efecto de ambos cambios es el aumento en la cantidad de radicales presentes al inicio de la reacción, este efecto podría asociarse a lo observado en la síntesis de NGs de **p-NIPMAm-BIS_{APS/TEMED}**. Al ensayar la utilización de la dupla redox como iniciadora de la reacción, no se observó formación de NGs de baja PD, al contrario de lo obtenido mediante la descomposición térmica de APS. La utilización de la iniciación redox generaría un aumento en la cantidad de radicales formados al inicio de la reacción, lo que podría disminuir la cantidad de entrecruzante incorporada en las partículas. El gran número de radicales implicaría un alto consumo del entrecruzante (más reactivo) formando oligómeros, y aceleraría también las reacciones de terminación. Esto daría lugar a polímeros hidrosolubles de bajo peso molecular que serían difícilmente incorporados en las partículas crecientes de p-NIPMAm. Por lo tanto, los oligómeros y partículas crecientes de p-NIPMAm que fuesen formados, serían difícilmente nucleados para dar lugar a NGs, observándose altos índices de polidispersidad.

En el mismo trabajo, Duracher y colaboradores observaron que la cantidad de polímero residual soluble disminuía con el aumento del porcentaje de BIS utilizado en la síntesis de NGs de **p-NIPMAm-BIS_{APS}**, enfatizando el importante rol que tiene el entrecruzante en la nucleación y crecimiento de las partículas. En nuestro caso, el aumento en la cantidad de entrecruzante mediante la combinación de los agentes BIS y DAT lleva también a resultados interesantes en la síntesis de NGs de p-NIPMAm con ambos sistemas de iniciación radicalaria. En la Figura 6.5 se representan los D_h medios de los NGs de **p-NIPMAm-BIS-DAT_{APS}** y **p-NIPMAm-BIS-DAT_{APS/TEMED}**.

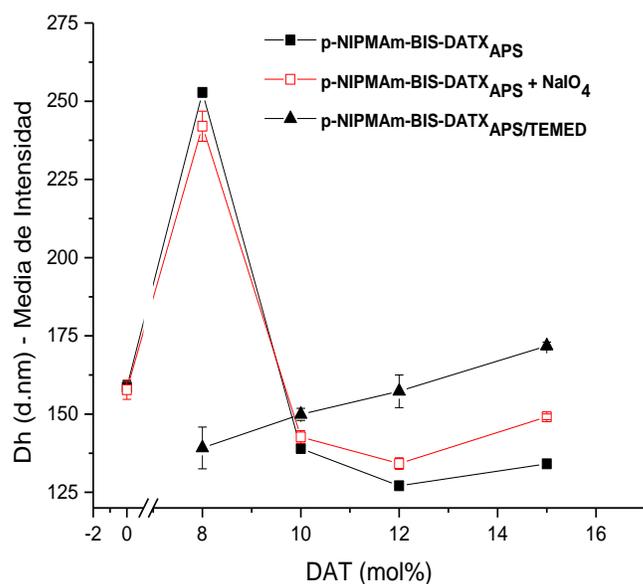


Figura 6.5 - Dh de NGs de p-NIPMAm-BIS-DAT sintetizados por termoprecipitación iniciada por: descomposición térmica de APS (negro, cuadrados) o mediante la dupla redox APS/TEMED (negro, triángulos). Se muestran los Dh obtenidos luego del tratamiento con periodato (rojo, figuras huecas).

Sorprendentemente, en todos los casos se obtuvieron NGs de PD relativamente baja, inclusive al utilizar el sistema de iniciación redox. Es importante destacar que, como puede verse en la Tabla 2, cuando la dupla APS/TEMED fue utilizada en la síntesis de **p-NIPMAm-BIS-DATX_{APS/TEMED}**, el PDI de los NGs disminuyó en tendencia inversamente proporcional con el aumento en la cantidad de entrecruzante utilizado, mientras el diámetro hidrodinámico aumentó con una proporcionalidad directa. Estas tendencias sugieren un aumento en la incorporación de DAT con la cantidad de entrecruzante empleado.

Respecto a las síntesis iniciadas por descomposición térmica de APS, la tendencia reportada en literatura para NGs de p-NIPMAm-BIS, al variar el porcentaje de BIS (con APS como iniciador), es una disminución del tamaño de partícula en porcentajes de BIS del 2 al 8 % mol, pero valores mayores de BIS generan un incremento de Dh [35]. En nuestro caso, en **p-NIPMAm-BIS-DAT8_{APS}** se observó incremento del tamaño y muy baja PD. Este comportamiento podría atribuirse, en principio, a un aumento de la incorporación de DAT, generando la nucleación de pequeñas partículas, como se observó en geles de p-NIPMAm-

BIS-DAT_{APS/TEMED}. Sin embargo, un consecutivo aumento de DAT no presenta una tendencia creciente de tamaños. Con cantidades mayores de entrecruzante se observó disminución del tamaño, respecto del tamaño en ausencia de DAT, para NGs sintetizados con 10 al 15 % mol de DAT.

TRATAMIENTO CON PERIODATO.

En la Figura 6.5 pueden observarse los cambios en el Dh de los NGs tratados con periodato. Como se esperaba, el tratamiento con periodato no generó cambios significativos en el Dh de los NGs cuando no se usó DAT durante la síntesis (**p-NIPMAm-BIS**_{APS}).

En el caso de nanogeles sintetizados en presencia de DAT y mediante descomposición térmica de APS (**p-NIPAm-BIS-DATX**_{APS}) se observó, de manera general, un incremento en el Dh de los nanogeles luego del tratamiento con periodato. Como excepción, **p-NIPAm-BIS-DAT8**_{APS}, el que ya tenía un comportamiento particular en la tendencia de tamaños, reflejó una caída del Dh luego del clivaje de DAT. Como se mencionó anteriormente, el mayor tamaño de los NGs de **p-NIPMAm-BIS-DAT8**_{APS} como también su baja PD podrían atribuirse a un aumento de la incorporación de DAT, generando la nucleación de pequeñas partículas, como se observó en geles de **p-NIPAm-BIS-DAT**_{APS/TEMED}. Sin embargo, el tratamiento con periodato no genera gran cambio de Dh por ruptura de entrecruzamientos ni aumento importante del PDI que indicase el clivaje de un gran número de entrecruzamientos en los NGs. En este caso, el mayor Dh de **p-NIPMAm-BIS-DAT8**_{APS} podría deberse a una incorporación diferenciada de BIS, donde DAT afectó a la nucleación de las partículas a pesar de no ser incorporado de manera efectiva en la media de los NGs. En los demás casos, el cambio de Dh medio es menor a 15 nm, pero el cambio en el PDI es más significativo y muestra una tendencia proporcional al porcentaje de DAT utilizado en la síntesis. Ésto indicaría que la cantidad de DAT incorporada en los NGs podría ser baja pero, aun así, afecta al tamaño y dispersidad de las partículas maduras. Además, refleja que mientras mayor cantidad de DAT fue usado en la síntesis, este se incorporó de manera proporcional y, por ende, la ruptura con periodato generó un aumento proporcional del PDI.

La tendencia en la incorporación de DAT y el posterior tratamiento con periodato es similar a la obtenida en geles de **p-NIPAm-BIS-DATX_{APS}**, sintetizados también por descomposición térmica de APS. Esto indicaría que, tanto en NGs de NIPAm como en NIPMAm, el DAT es incorporado en baja proporción cuando la reacción es iniciada en dichas condiciones pero, aun así, el posterior tratamiento con periodato genera modificaciones estructurales en los NGs que, de manera general, llevan a un aumento del tamaño inicial y de la PD, pero manteniendo aún la estructura de los NGs con una baja PD.

Sin embargo, es importante destacar que, en NGs de **p-NIPAm-BIS-DATX_{APS}**, el aumento de tamaño, luego del tratamiento con periodato, se vió claramente reflejado en un aumento del Dh medio, ponderado por la intensidad de dispersión de la luz, como también ponderado en volumen y número (Ver Anexo en Capítulo 8). En NGs de **p-NIPMAm-BIS-DATX_{APS}**, es interesante observar no sólo la distribución de partículas por intensidad sino también por volumen y número.

Como ejemplo, para **p-NIPMAm-BIS-DAT10_{APS}**, el cambio en el valor máximo medio de Dh por intensidad, antes y después del tratamiento con periodato, no muestra una diferencia marcada (Figura 6.6). Sin embargo, el PDI aumenta y la forma de la curva se ensancha de manera bastante homogénea (manteniendo su forma de campana). Esto significa que algunas partículas se observan en DLS con Dh más grandes y otras más pequeñas luego del tratamiento con periodato. Pero, teniendo en cuenta que la curva de distribución es ponderada por la intensidad de la luz dispersada por las partículas y que este valor es proporcional al diámetro a la sexta potencia ($Int \propto d^6$), las partículas más grandes generadas han de ser un número menor que las partículas más pequeñas (las más grandes dispersan la luz con mayor intensidad).

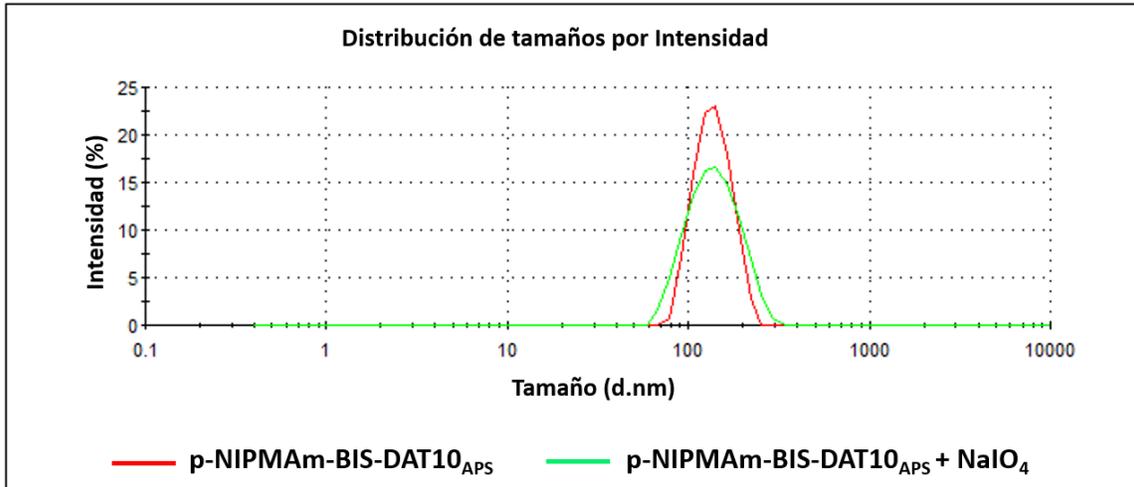
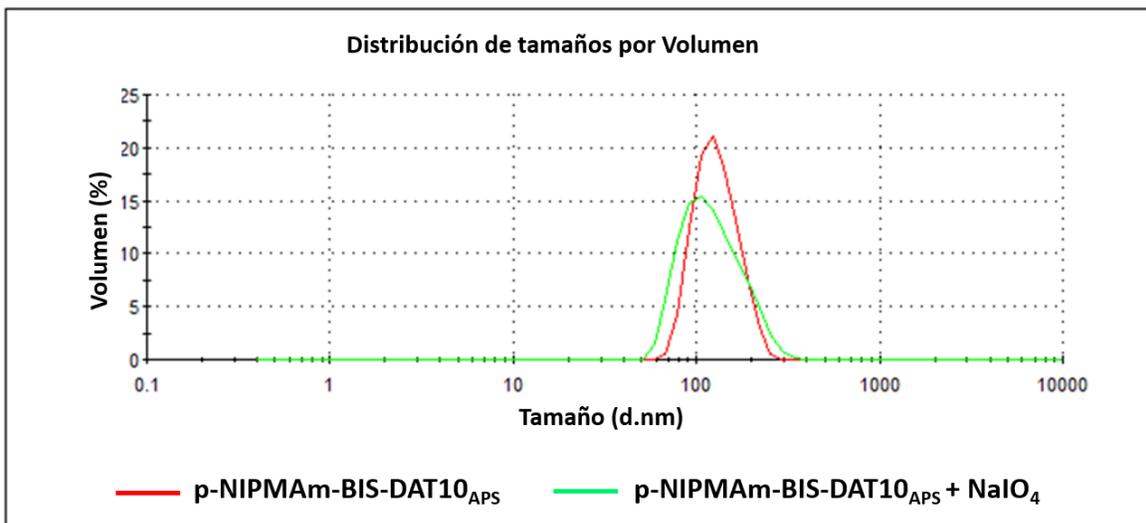


Figura 6.6 - DLS de p-NIPMAm-BIS-DAT10_{APS} antes (rojo) y después (verde) de su tratamiento con periodato.

Por lo tanto, es posible que, en general, se haya reducido el tamaño de partículas luego del tratamiento con periodato aún sin verse reflejado en el valor medio de Dh por intensidad. Este fenómeno se refleja en la distribución de tamaños por volumen y por número del DLS. El volumen medio de las partículas se ve desplazado hacia menores tamaños luego del tratamiento con periodato. El mismo efecto es observado en la media de distribución por número (Figura 6.7).



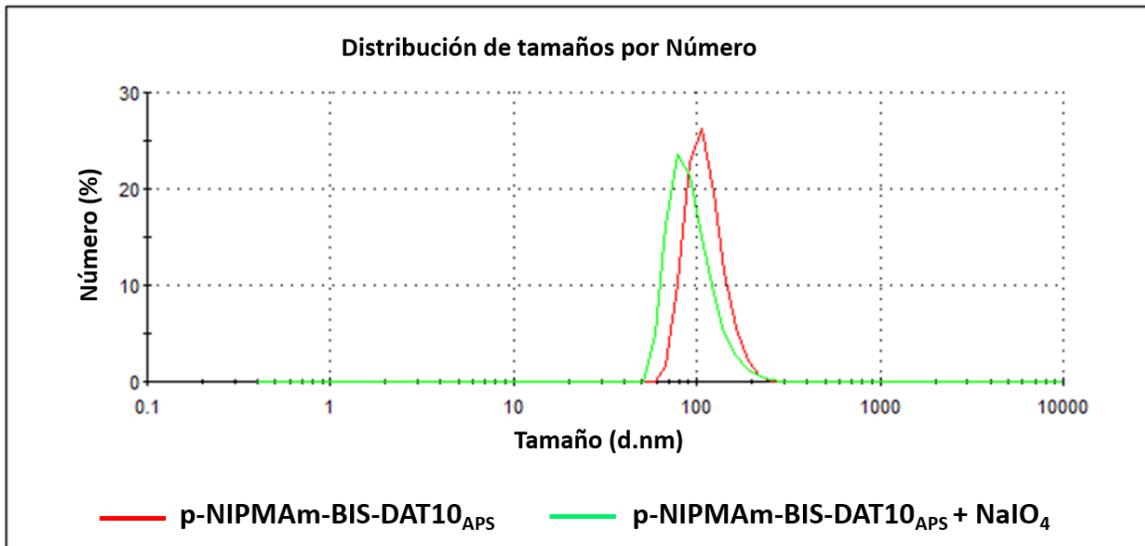


Figura 6.7 - DLS de *p*-NIPMAm-BIS-DAT10_{APS} antes (rojo) y después (verde) del tratamiento con periodato. Arriba: distribución de *D_h* por volumen. Abajo: distribución de *D_h* por número.

Por lo tanto, a diferencia de los NGs de **p-NIPMAm-BIS-DAT_{APS}**, el tratamiento con periodato en NGs de NIPMAm parece reducir el tamaño medio de las partículas. Esto indicaría que DAT actúa en la incorporación de fragmentos poliméricos a los núcleos en crecimiento, o en nucleación de partículas en crecimiento que no han sido entrecruzadas por BIS.

Los NGs de **p-NIPMAm-BIS-DAT_{APS/TEMED}** tuvieron un comportamiento diferente. Previo al tratamiento con periodato, mostraron aumento del *D_h* y disminución del PDI en función de la concentración de DAT utilizada. Además, luego de la oxidación post-síntesis, resultaron altamente modificados. La ruptura de los dioles del entrecruzante condujo a la pérdida de la distribución monomodal de tamaños, mostrando ahora curvas polimodales con altos índices de polidispersidad e imposibilitando la determinación del diámetro hidrodinámico por DLS. Esta observación corrobora lo propuesto anteriormente respecto a que, utilizando la iniciación redox, DAT logra nucleación más eficiente de las partículas en crecimiento y NGs más entrecruzados, cuando es usado en mayor cantidad. Además, en estas condiciones de iniciación y en ausencia de DAT, la generación de NGs entrecruzados solamente por BIS no fue efectiva. Este resultado sugiere que BIS no es eficientemente incorporado en los NGs

en estas condiciones. Luego, el aumento de DAT como entrecruzante llevó a la formación de NGs de manera más eficiente y con disminución del PDI, en forma proporcional a la cantidad de DAT utilizada. Sin embargo, a diferencia de los NGs de NIPAm, la ruptura de los entrecruzamientos debidos a DAT descompone los NGs a una mezcla de polímeros de diversos tamaños, en lugar de dar lugar a la formación de partículas de baja PD, como sucedió en **p-NIPAm-BIS-DATX_{APS/TEMED}**. Esta diferencia podría deberse a la reactividad diferenciada de los monómeros NIPAm y NIPMAm respecto de BIS. Por un lado, se ha reportado que NIPAm tiene reactividad similar a BIS, por lo que la incorporación del entrecruzante en los NGs (inclusive en aquellos iniciados por la dupla redox) es relativamente eficiente [30], [36]. Por el contrario, NIPMAm es menos reactivo que NIPAm y reacciona de manera menos eficiente con BIS [10], [34], por ende, BIS reaccionaría más rápidamente consigo y se incorporaría de manera menos eficiente en los NGs. Este efecto parece intensificarse cuando se utiliza la dupla redox en la iniciación de la reacción, posiblemente por el aumento en las reacciones de terminación. Entonces, la incorporación diferenciada de BIS en los NGs de NIPAm, respecto de NGs de NIPMAm, cuando se utiliza la iniciación redox, hace que luego del tratamiento con periodato, los NGs de NIPAm puedan mantener una estructura definida y una distribución monomodal, mientras que los NGs de NIPMAm son degradados por completo.

MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.

Se realizaron micrografías de los NGs de p-NIPMAm antes y después de su tratamiento con periodato.

En la Figura 6.8 se observan las micrografías TEM de los NG de p-NIPMAm-BIS-DAT10_{APS/TEMED} antes y después de su tratamiento por periodato. Los NGs antes de su tratamiento con periodato (Figura 6.8a) muestran tamaños mayores a 100 nm, como se había observado por DLS. La alta concentración de la muestra, durante la medida, impide distinguir correctamente la morfología y polidispersidad de estos NGs, sin embargo se observan estructuras poco esféricas o amorfas. Luego del tratamiento con periodato (Figura 6.8b) se advirtió la descomposición de los nanogeles, observándose productos de

pequeños tamaños y algunas estructuras de mayor dimensión. Por DLS se había observado, en todos los casos, gran aumento de la polidispersidad, lo que impidió determinar el diámetro hidrodinámico de las muestras con suficiente precisión. Estos resultados confirman la baja incorporación de BIS en los nanogeles, por diferencia de reactividad con NIPMAm, y la efectiva incorporación de DAT (que concluye en la degradación de los geles luego del tratamiento con periodato) cuando se utilizó a la dupla rédox en la iniciación de la reacción.

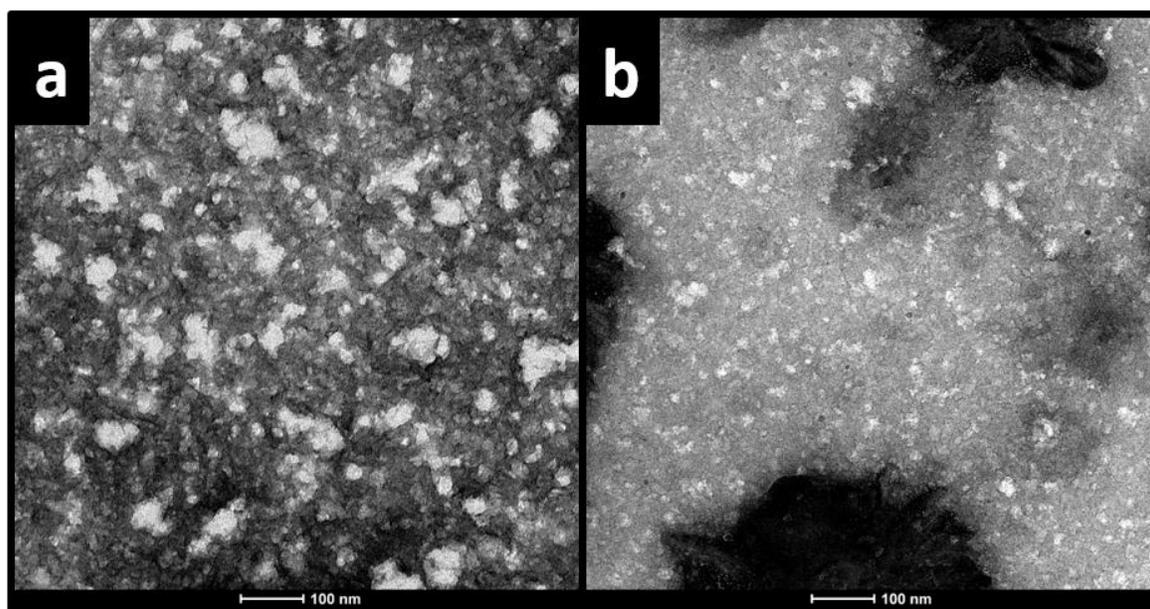


Figura 6.8 - Micrografía TEM de (a) *p*-NIPMAm-BIS-DAT10_{APS/TEMED} y (b) su producto de clivaje frente a periodato de sodio, *p*-NIPAM-BIS-ALD10_{APS/TEMED}.

Por otro lado, las micrografías de NGs sintetizados por descomposición térmica de APS se observan en la Figura 6.9. Las partículas muestran morfología esférica bien definida, tamaños de aproximadamente 90 nm y muy baja polidispersidad. Estos resultados son acordes a lo observado por DLS. Además, se observa una estructura menos homogénea o más porosa que lo observado en NGs de *p*-NIPAm sintetizados en las mismas condiciones.

Luego del tratamiento con periodato (ver Figura 6.9, abajo) el tamaño de los nanogeles no parece verse muy afectado. Sin embargo, su morfología aparenta estar menos definida,

denotando cambios estructurales por la ruptura del entrecruzante DAT. Aún así, los cambios son menos significativos que lo observado en NGs sintetizados con la dupla rédox, corroborando lo propuesto mediante los resultados de DLS.

En conclusión, las partículas de p-NIPMAm-BIS-DAT, sintetizadas por iniciación con el sistema TEMED/APS, serían principalmente entrecruzadas con DAT e incorporarían bajo porcentaje de BIS. Por lo tanto, luego de la ruptura de DAT, los NGs pierden casi toda su estructura, formando partículas poco definidas y fragmentos de tamaños variables. Por otro lado, cuando la síntesis fue iniciada por descomposición térmica de APS, BIS se incorpora más eficientemente y DAT es incorporado en menor proporción, por lo que el tratamiento con periodato genera cambios menos drásticos en la estructura del NG.

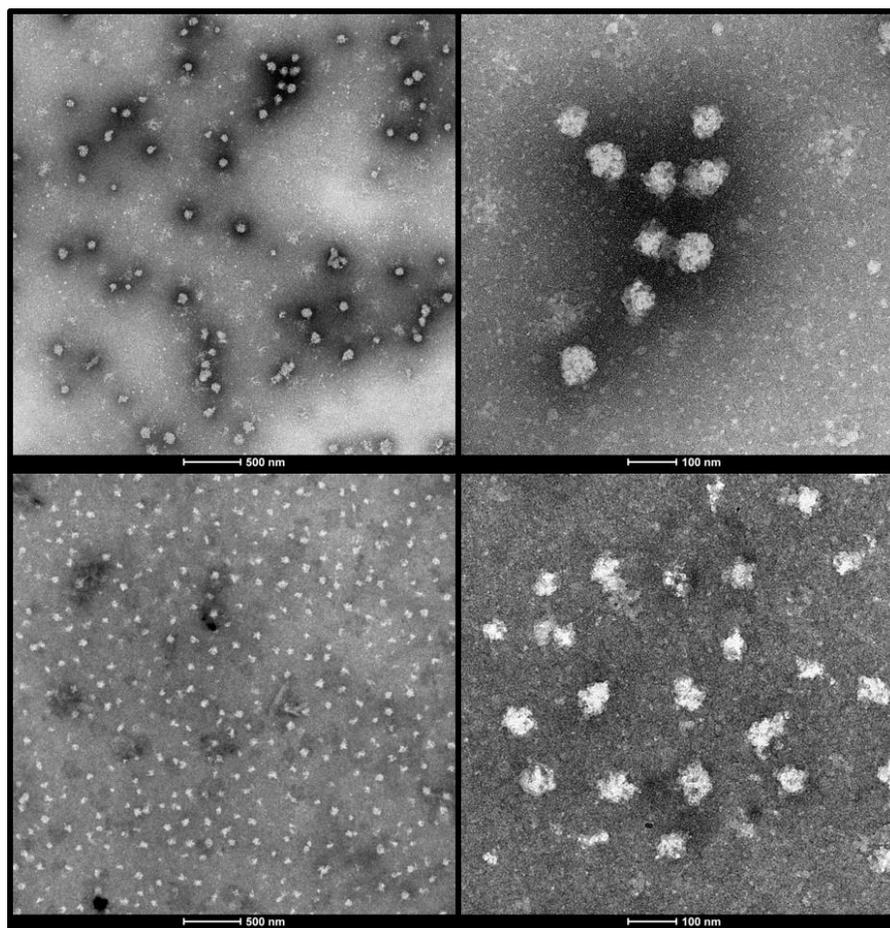


Figura 6.9 - Micrografías de TEM de p-NIPMAm-BIS-DAT10_{APS} antes (arriba) y después (abajo) de su tratamiento con periodato de sodio.

NANOGELES BASADOS LA MEZCLA DE MONÓMEROS NIPAm Y NIPMAm: síntesis mediante descomposición térmica de APS y descomposición redox APS/TEMED

SÍNTESIS DE NANOGELES

Se sintetizaron NGs de p-NIPAm-co-NIPMAm-BIS-DAT, mediante los dos sistemas de iniciación de reacción radicalaria, con el objetivo de investigar la estructura final de los NGs, acorde a la reactividad de monómeros, entrecruzantes y el sistema de iniciación de la reacción. En la Tabla 6.3 se resumen las condiciones ensayadas. En todos los casos se utilizó una mezcla 50:50 mol de los monómeros.

Tabla 6.3 - Nanogeles basados en p-NIPAm-co-NIPMAm: composición, condiciones de reacción y diámetro hidrodinámico (Dh) antes y después de su reacción con periodato.

Composición				Antes de la oxidación con NaIO ₄		Luego de la oxidación con NaIO ₄	
Síntesis	BIS (mol%)	DAT (mol%)	INICIADOR	Dh* (d.nm)	PDI (DLS)	Dh* (d.nm)	PDI (DLS)
p-NIPAm-co-NIPMAm-BIS _{APS}	1,5	0	APS	PD	>0,4	PD	>0,4
p-NIPAm-co-NIPMAm-BIS-DAT _{8APS}	1,5	8	APS	280,9	0,022	370,8	0,014
p-NIPAm-co-NIPMAm-BIS-DAT _{10APS}	1,5	10	APS	270,5	0,013	359,5	0,03
p-NIPAm-co-NIPMAm-BIS-DAT _{12APS}	1,5	12	APS	257,7	0,008	346,5	0,032
p-NIPAm-co-NIPMAm-BIS-DAT _{15APS}	1,5	15	APS	246,5	0,014	337,4	0,032
p-NIPAm-co-NIPMAm-BIS _{APS/TEMED}	1,5	0	APS/TEMED	PD	>0,4	PD	>0,4
p-NIPAm-co-NIPMAm-BIS-DAT _{8APS/TEMED}	1,5	8	APS/TEMED	413,7	0,055	PD	>0,4
p-NIPAm-co-NIPMAm-BIS-DAT _{10APS/TEMED}	1,5	10	APS/TEMED	450,9	0,054	PD	>0,4
p-NIPAm-co-NIPMAm-BIS-DAT _{12APS/TEMED}	1,5	12	APS/TEMED	402,8	0,039	PD	>0,4
p-NIPAm-co-NIPMAm-BIS-DAT _{15APS/TEMED}	1,5	15	APS/TEMED	354,1	0,084	PD	>0,4

* DLS, promedio de la media de intensidad. PD: muestras demasiado polidispersas para informar un valor confiable de Dh.

Cuando se usó BIS como único entrecruzante para las síntesis de NGs de p-NIPAm-co-NIPMAm-BIS, ninguno de los sistemas de iniciación radicalaria (APS o APS/TEMED) condujo

a la obtención de NGs con polidispersidad adecuada. Por el contrario, su estudio por DLS mostró numerosas poblaciones de diversos diámetros hidrodinámicos en cada una de las síntesis. Si bien, tanto NIPAm como NIPMAm habían demostrado la posibilidad de formar NGs entrecruzados con 1,5% mol BIS, cuando la iniciación se llevó a cabo por descomposición térmica de APS, este sistema parece no comportarse de una manera similar. Este resultado podría ser comprendido al considerar la concentración individual de cada reactivo en las condiciones de síntesis utilizadas, como también la reactividad de cada uno de los monómeros y su reactividad respecto a BIS. Durante estas síntesis, la concentración total de monómeros (CT) se mantuvo igual a la utilizada en las síntesis anteriores, en NGs de **p-NIPAm-BIS** o **p-NIPMAm-BIS**. Para los NGs de **p-NIPAm-co-NIPMAm-BIS** se utilizó una proporción 0,5:0,5 mol de cada monómero, es decir, $\frac{1}{2}$ CT de NIPAm + $\frac{1}{2}$ CT de NIPMAm. Esta dilución relativa de cada uno de los monómeros, respecto de síntesis anteriores, afectaría a la velocidad de homopolimerización, por lo que es un factor a considerar al observar resultados distintos a los obtenidos en las síntesis previas. Por otro lado, la mencionada diferencia de reactividad de NIPAm y NIPMAm podría implicar baja formación de copolímeros p-NIPAm-co-NIPMAm y mayor formación de fragmentos homopoliméricos de distintos tamaños que conllevan al producto final de gran polidispersidad.

Sin embargo, al utilizar BIS y DAT como agentes entrecruzantes, se obtuvieron NGs con ambos sistemas de iniciación radicalaria. En la Figura 6.10 se observan los valores de Dh medio para cada composición.

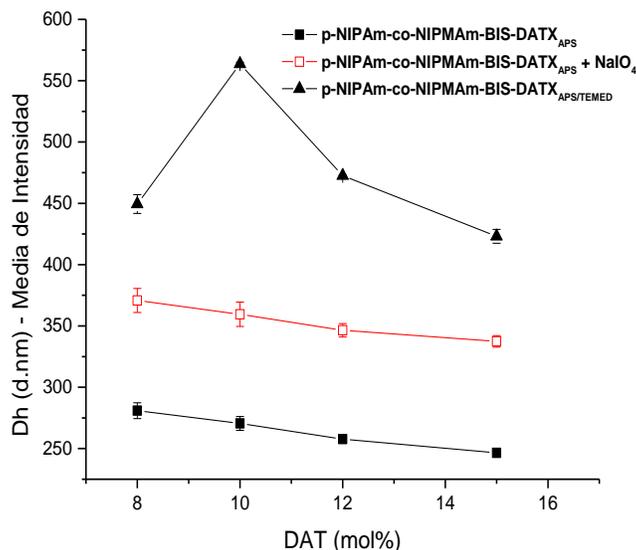


Figura 6.10 - Dh de NGs de p-NIPAm-co-NIPMAm-BIS-DAT sintetizados por termoprecipitación iniciada por: descomposición térmica de APS (negro, cuadrados) o mediante la dupla rédox APS/TEMED (negro, triángulos). Se muestran los Dh obtenidos luego del tratamiento con periodato (rojo, figuras huecas)

Con ambos sistemas de iniciación se obtuvieron NGs de baja polidispersidad. En el caso de los NGs de **p-NIPAm-co-NIPMAm-BIS-DATX_{APS/TEMED}** no se observó una tendencia clara en el Dh respecto de la cantidad de entrecruzante utilizado durante la síntesis. Sin embargo, en todos los casos se obtuvieron tamaños medios mayores a los obtenidos en ausencia de TEMED. Este comportamiento es equivalente a lo observado en las síntesis de **p-NIPAm-BIS-DAT** y **p-NIPMAm-BIS-DAT**. Como se mencionó anteriormente, la gran concentración de radicales al inicio de la reacción, en condiciones de iniciación redox, promueve que los agentes entrecruzantes actúen en la nucleación de las partículas de manera temprana en la reacción, generando disminución en la densidad de partículas en solución durante la reacción, y resultando en tamaños mayores hacia el final de la misma. Por otro lado, cuando sólo se utilizó la descomposición térmica de APS para iniciar la reacción, en todos los casos se formaron partículas de menor Dh y se observó una tendencia

lineal en cuanto a la disminución del tamaño de los NGs con el aumento del porcentaje de DAT.

TRATAMIENTO CON PERIODATO

La mayor diferencia entre estos sistemas se observó al tratar a los NGs con periodato. Los NGs sintetizados mediante la dupla redox APS/TEMED dieron lugar a la formación de sistemas altamente polidispersos luego de la reacción con periodato, de manera equivalente a lo observado en NGs de **p-NIPMAm-BIS-DATX_{APS/TEMED}**. Es posible que estos sistemas se comporten de manera similar, donde la gran cantidad de radicales formados al inicio de la reacción podría favorecer la incorporación temprana de DAT para nuclear partículas de diversas dimensiones y por ende, luego del clivaje, se obtendrían valores de alto índice de PD. Por otro lado, los NGs sintetizados con APS aumentaron de tamaño luego del tratamiento con periodato, de manera similar a **NIPMAm-BIS-DATX_{APS}**. Sin embargo, el cambio de Dh fue mayor, comparado con dicho sistema, mientras que la PD aumentó en menor proporción.

MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Se realizaron micrografías de TEM sobre los NGs co-poliméricos, sintetizados por descomposición térmica de APS. En la Figura 6.11 se muestra la micrografía de **p-NIPMAm-co-NIPMAm-BIS-DAT10_{APS}** antes y después del tratamiento con periodato, utilizando acetato de uranilo como agente de contraste.

La micrografía revela la baja polidispersidad de las partículas obtenidas, con una morfología esférica muy bien definida. Sorprendentemente, se observó una estructura tipo núcleo-capas (*core-shell*), donde la capa (*shell*) parece estar formada por la nucleación de partículas diferenciadas. Este tipo de estructuras son también definidas como núcleo-satélite (*core-satellite*). Es notoria la diferencia de contraste entre el *core* y la *shell*. Tomando en cuenta la interacción con el agente de contraste en las imágenes TEM de los NGs de homopolímeros, la interacción del agente con el core es similar a la observada en los homopolímeros de NIPMAm, mientras que la interacción en la *shell* es semejante a los de NIPAm. Sin embargo,

esto debe ser tomado con precaución ya que sólo es una apreciación referida a la interacción con el agente de contraste.

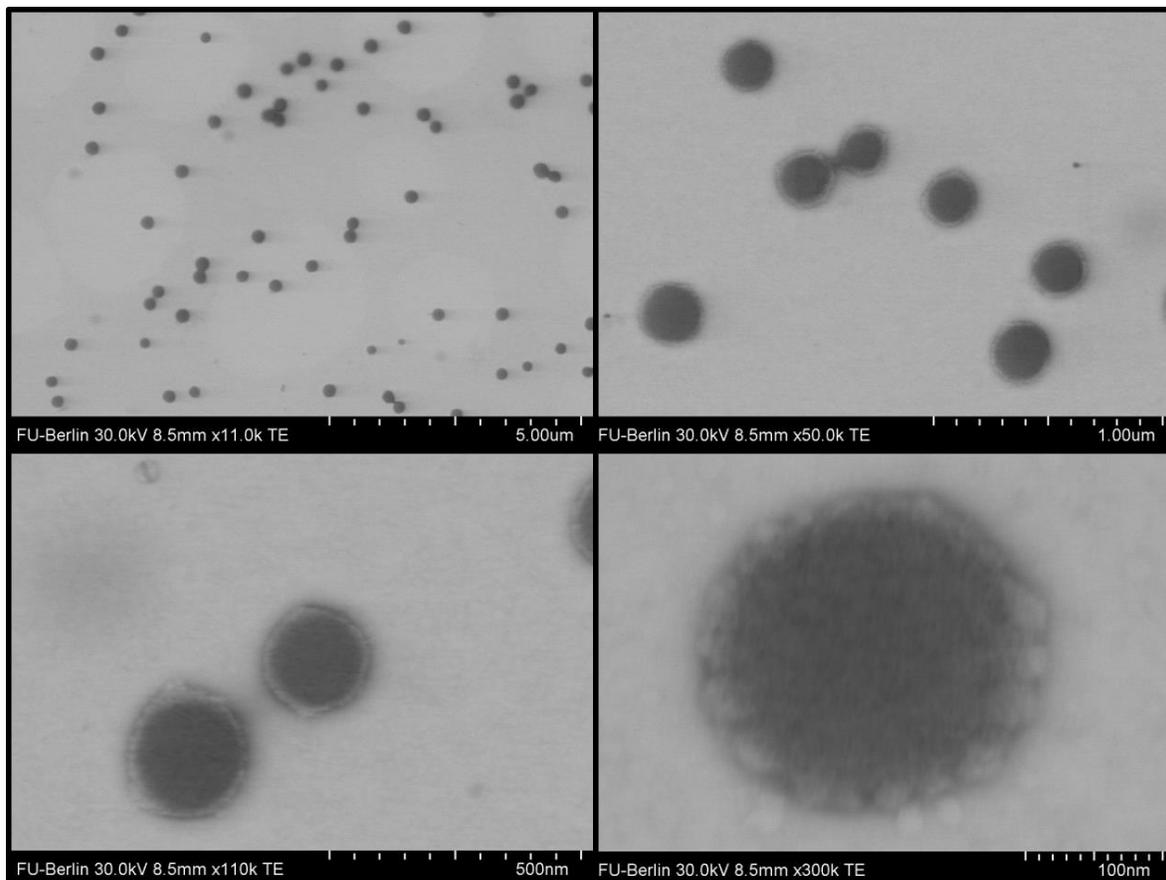


Figura 6.11 - Micrografías de TEM de *p-NIPAm-co-NIPMAm-BIS-DAT10_{APS}*.

Por otro lado, luego del tratamiento con periodato se observó la desaparición de la estructura diferenciada *core-shell*, observándose NGs de forma esférica definida, pero “decorados” con cadenas poliméricas en forma de cabellos (Figura 6.12). Este tipo de NGs es conocido como “*hairy nanogels*”. Además, se observó un gran cambio en la topología de las partículas, las cuales aparentan haber incrementado su porosidad en gran medida. Un gran número de pequeñas partículas de poca interacción con el agente de contraste se observan alrededor de los NGs tratados con periodato. Es posible que sean las cadenas

poliméricas clivadas de la superficie del NG *core-shell* mediante la degradación con periodato.

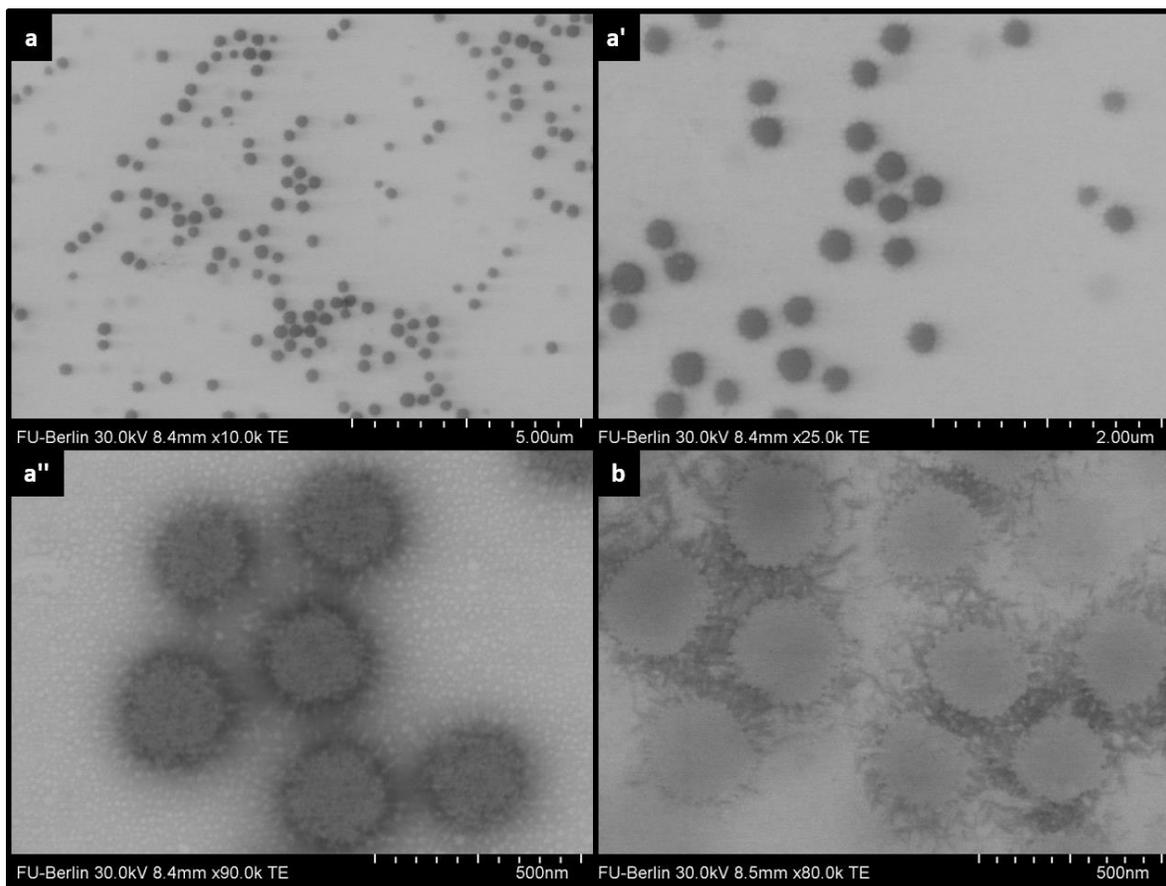


Figura 6.12 - Micrografías de TEM de p-NIPAm-co-NIPMAm-BIS-ALD10_{APS}. Se muestran distintas magnificaciones de la muestra (dializada con membrana de 50 kDa, a, a' y a'') y la misma muestra dializada con membrana de 1000kDa para eliminar los sub-productos de la degradación (b).

6.1.5 - CONCLUSIONES PARCIALES

Se estudió la síntesis de nanogeles termosensibles basados en los monómeros NIPAm y NIPMAm, entrecruzados con los agentes (+)-*N,N'*-dialiltartramida (DAT) y *N,N'*-metilenbis(acrilamida) (BIS). Se ensayaron síntesis mediante diferentes mecanismos de iniciación radicalaria: descomposición térmica de APS o iniciación rédox mediante la dupla APS/TEMED. Se analizó el efecto de cada uno de los sistemas de iniciación en la incorporación de los agentes entrecruzantes y, por ende, en el tamaño final y estructura de las partículas. En general se observó que la utilización de la dupla rédox llevó a una incorporación más temprana de los agentes entrecruzantes, observándose la nucleación de estructuras de menor tamaño por medio del entrecruzante DAT y un consecuente aumento del tamaño final de los nanogeles por disminución de la densidad de partículas en solución. Por otro lado, ante una iniciación radicalaria promovida por la descomposición térmica de APS, la incorporación del agente entrecruzante DAT fue menor, pero no despreciable, y se obtuvieron nanopartículas más pequeñas.

El clivaje oxidativo de los entrecruzamientos debidos a DAT permitió analizar la manera en que el entrecruzante fue incorporado durante la síntesis ante cada uno de los métodos de iniciación radicalaria. En general, la iniciación por descomposición térmica de APS llevó a obtener partículas de menor polidispersidad, luego del tratamiento con periodato, que aquellas obtenidas por iniciación con la dupla rédox APS/TEMED. Además, se generaron marcadas variaciones estructurales en las partículas, por el cambio en su grado de entrecruzamiento, luego de la oxidación.

Por otro lado, la síntesis de nanogeles copoliméricos de p-NIPAm-co-NIPMAm entrecruzados con DAT generó partículas de tipo *core-shell*, evidenciando la diferencia de reactividad entre los monómeros y entrecruzantes. El posterior tratamiento con periodato generó un marcado cambio morfológico en los nanogeles, que aparenta estar acompañado de un aumento en la porosidad. Estas estructuras mostraron un núcleo modificado con cadenas laterales, en un arreglo tipo *hairy nanogel*.

La metodología desarrollada permitió la síntesis y modificación post-síntesis de los nanogeles termosensibles. Los cambios estructurales y de funcionalización química logrados, podrían ser aprovechados para el desarrollo de diversas aplicaciones, principalmente en el área de biomedicina.

6.2 - SÍNTESIS Y MODIFICACIÓN POST-SÍNTESIS DE NANOGELES TERMOSENSIBLES BASADOS EN NIPAm Y NIPMAm - POSIBLES APLICACIONES

Las características de los nanogeles obtenidos en las síntesis descritas previamente proponen la utilización de esta metodología de síntesis y modificación post-síntesis para el desarrollo de diversas aplicaciones. Entre las ventajas obtenidas por esta metodología se encuentran, la posibilidad de obtener NGs inteligentes termosensibles, cuya estructura puede ser controlada en etapas post-síntesis para modificar la morfología, propiedades mecánicas y porosidad de los materiales. Además, la modificación permite obtener GF de alto valor sintético, por la formación de GF α -oxo-aldehídos, que pueden ser utilizados para la modificación química o inmovilización de moléculas de interés en etapas post-síntesis.

En las siguientes secciones se proponen, como prueba de concepto, diversas aplicaciones para los NGs sintetizados y se muestran los resultados preliminares obtenidos en cada una de las propuestas.

6.2.1 - SÍNTESIS DE NANOGELES DE p-NIPAm-BIS-DAT Y MODIFICACIÓN POST-SÍNTESIS PARA LA INMOVILIZACIÓN COVALENTE DE DOXORUBICINA Y SU LIBERACIÓN CONTROLADA.

6.2.1.1 - CONSIDERACIONES GENERALES

El uso de nanogeles termosensibles para la liberación controlada de fármacos corresponde a uno de los tópicos de mayor desarrollo en el área de materiales poliméricos. Sin embargo, la complejidad de los sistemas biológicos y la generación de sistemas de liberación controlada específica (direccionada hacia el tejido a tratar) requiere, en la mayoría de los casos, incrementar las características inteligentes del material termosensible.

Cuando estas plataformas son desarrolladas para la liberación controlada de fármacos para tratamientos oncológicos, las propiedades de los NGs termosensibles son optimizadas mediante: la incorporación de enlaces biodegradables, que permitan la descomposición del material sin generar sub-productos tóxicos; la modificación superficial, que le permita más tiempo de circulación en sangre y/o generar interacciones específicas con el tejido enfermo; el control del tamaño y las propiedades mecánicas, para aumentar el efecto de EPR y la penetración celular, evitando mecanismos de eliminación; la liberación del fármaco bajo demanda, mediante uniones o interacciones entre el fármaco y el polímero que permitan la liberación del bioactivo por respuesta a un estímulo externo predeterminado. Además, las diferencias que presentan las características fisiológicas de algunos tejidos cancerosos, comparadas con tejidos sanos, son frecuentemente utilizadas como disparadores de respuestas inteligentes en los materiales, entre ellas: mayor acidez en el pH del medio en el tejido enfermo, mayor potencial redox, la presencia de enzimas específicas y mayor temperatura [19], [37].

En particular, existen numerosos reportes sobre la inmovilización covalente del fármaco Doxorubicina (DOXO) mediante la formación de un enlace hidrazona pH dependiente. Doxorubicina es un fármaco muy utilizado en la quimioterapia del cáncer (Figura 6.13). Dado que DOXO posee un grupo funcional cetona en su estructura, su reacción con una

hidrazina o hidrazida genera enlaces hidrazona pH dependientes. La hidrólisis de dicha unión es catalizada en medio ácido ($\text{pH} \approx 4-6$) mientras es relativamente estable a pH fisiológico ($\text{pH} \approx 7,3$). Esto permite que el nanovehículo circule en el sistema sin generar una liberación inespecífica del fármaco y sólo se libere dentro del tejido tumoral (dado el aumento en la acidez del medio) o en los lisosomas celulares ($\text{pH} \approx 4-5$) luego de ser endocitado por las células tumorales [38]. Además, la conjugación del fármaco con plataformas de liberación pH sensible ha demostrado ser más efectiva frente a células tumorales resistentes [39].

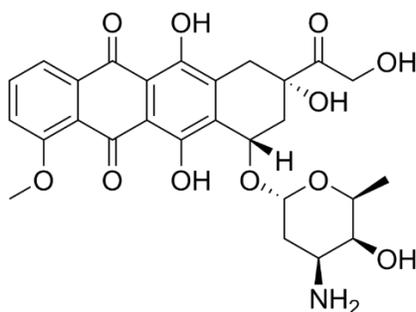


Figura 6.13 - Estructura química de Doxorubicina (DOXO).

Previamente en este capítulo se demostró la síntesis de NGs cuya estructura y propiedades de hinchamiento fueron modificadas en etapas post-síntesis. Además, se generaron GF α -oxoaldehído como GF de alto valor sintético, que permitirían una posterior funcionalización de los NGs.

En esta sección se propone la síntesis de NGs de p-NIPAm-BIS-DAT para su posterior tratamiento con periodato de sodio y la generación de GF α -oxoaldehído. Posteriormente, estos GF podrán ser derivatizados en presencia de dihidrazida de ácido adípico, como fue demostrado anteriormente en macrogeles. Los GF hidrazida obtenidos podrían ser utilizados para la inmovilización covalente de DOXO mediante enlaces hidrazona pH-sensibles, generando una plataforma para diagnósticos y tratamientos oncológicos de liberación controlada y específica (Figura 6.14).

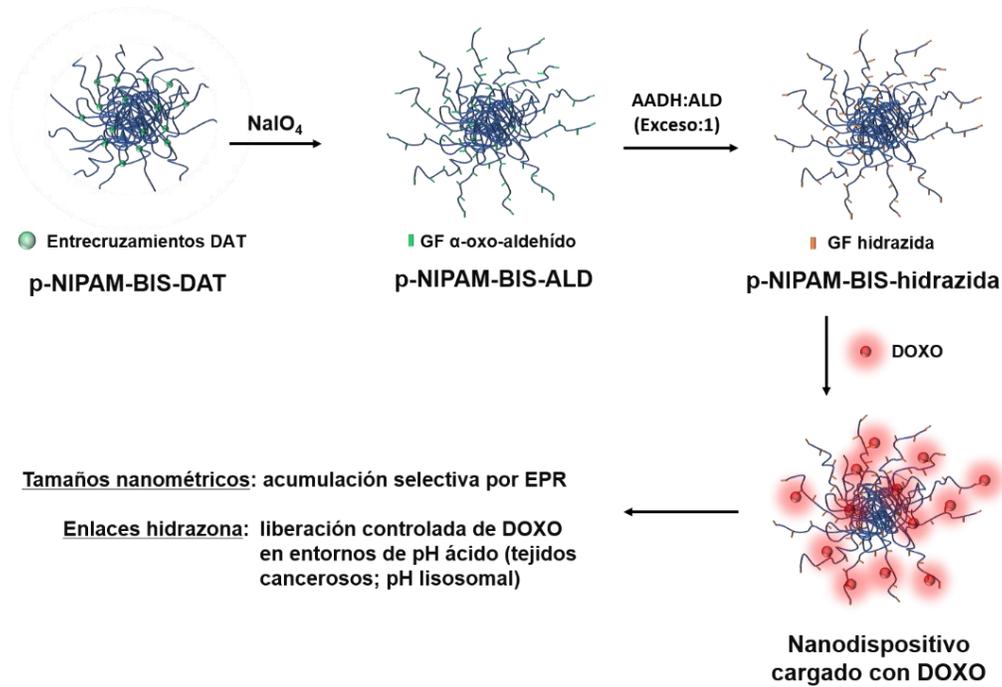


Figura 6.14 - Esquema de modificación de NGs para la unión de doxorubicina (DOXO) mediante enlaces hidrazona cuya hidrólisis es catalizada por el medio ácido.

6.2.1.2 - OBJETIVOS

Evaluar la utilización de NGs de p-NIPAm-BIS-DAT sintetizados y modificados (post-síntesis), con la metodología previamente desarrollada, en la elaboración de un nanodispositivo para la liberación controlada de Doxorubicina. Para ello se propone:

- Sintetizar NGs termosensibles de p-NIPAm-BIS-DAT y caracterizar sus propiedades fisico-químicas.
- Modificar a los NGs mediante el tratamiento con periodato de sodio y evaluar los cambios en sus propiedades, originados por el clivaje oxidativo del entrecruzante DAT. Verificar la formación de grupos funcionales α -oxo-aldehídos en los NGs.
- Utilizar los GF originados por la modificación post-síntesis para incorporar nuevos GF hidrazida que permitan unir covalentemente a Doxorubicina mediante un enlace hidrazona. Ensayar la unión de Doxorubicina en los NGs.

6.2.1.3 - MATERIALES Y MÉTODOS

SÍNTESIS DE NANOGELES Y MODIFICACIÓN CON PERIODATO DE SODIO

Para la síntesis de NGs termosensibles, se utilizaron las proporciones indicadas en la Tabla 6.4 y las condiciones de reacción descritas en la Sección 6.1.3, utilizando la dupla redox APS/TEMED para iniciar las reacciones. Para su posterior modificación con periodato de sodio, se siguió el procedimiento descrito en dicha sección.

DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ (DLS)

Se utilizaron las condiciones descritas en la sección 6.1.3.

CROMATOGRAFÍA DE PERMEACIÓN EN GELES (GPC)

Los estudios de cromatografía por exclusión de tamaños se realizaron en un equipo Shimadzu Prominente-i LC-2030 de cromatografía líquida equipado con un detector de índice de refracción Shimadzu RID-20A y detectores UV-Visibles. La columna GFC usada fue una Shodex OHpak SB-806M HQ con OHpak SB-G 6B como pre-columna. Las muestras fueron liofilizadas y redispersadas en buffer fosfato salino (PBS) en una concentración de 1 mg/mL y se utilizó el mismo buffer para realizar la determinación a una temperatura de 20 °C.

TURBIDIMETRÍA

Se midió la temperatura de transición de fase (T_{tf}) de los NGs mediante el cambio en el porcentaje de transmitancia (%T) UV-Visible de las muestras, a distintas temperaturas. Se utilizó un espectrofotómetro Cary 100 Bio UV-Vis equipado con una cámara de muestra de 6 posiciones con temperatura controlada (Universidad Libre de Berlín). Las soluciones acuosas (aprox. 1mg / mL) se calentaron a 0,2 °C/min en una rampa de temperaturas de 20 a 55 °C, mientras se midió la transmitancia (%T), a una longitud de onda de 500 nm (paso óptico de 1 cm). La temperatura de las soluciones fue determinada por una sonda de temperatura interna (termocupla). La T_{tf} de cada muestra se determinó usando el mínimo de la primera derivada del gráfico % T vs temperatura. Se realizaron 3 ciclos de enfriamiento-calentamiento para cada medición.

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Los análisis de ^1H -RMN se realizaron en un equipo JEOL ECX400 operando a 400 MHz (Universidad Libre de Berlín). Aproximadamente 10 mg de muestra liofilizada fueron resuspendidas en 0,5 mL de D_2O , 24 h antes de realizar la medida.

MODIFICACIÓN CON DIHIDRAZIDA DE ACIDO ADÍPICO (DHAA)

La modificación con DHAA de los NGs con GF α -oxoaldehído se realizó mediante el uso de un gran exceso de la dihidrazida, para evitar la formación de entrecruzamientos y promover la funcionalización. La cantidad de DHAA utilizada se estimó como $m_{\text{DHAA}} = m_{\text{DAT}} \times 5$. La reacción se realizó durante 4 h en una solución buffer de acetato de sodio (pH = 5,3 M; concentración = 0,02 M y Fuerza Iónica = 0,06 M) a temperatura ambiente y bajo agitación mecánica. Posteriormente, el producto fue purificado mediante diálisis utilizando membranas de 50 kDa (Spectra/Por[®] 6 Standard RC), con repetidos cambios de buffer fosfato (pH = 7,3 M; concentración = 0,02 M y Fuerza Iónica = 0,06 M), durante 72 h.

INMOVILIZACIÓN DE DOXORUBICINA (DOXO)

Para la inmovilización de DOXO en los nanogeles con GF hidrazida se resuspendieron 5 mg de nanogeles (p-NIPAm-BIS-HDZ), previamente liofilizados, en 2,5 mL de *buffer* fosfato pH 6,5 (0,2 M) y se adicionaron 2 mg de doxorubicina clorhidrato (DOXO, Sigma-Aldrich) disueltos en 0,5 mL de dimetilformamida (DMF). La reacción se llevó a cabo durante 12 horas, bajo agitación magnética y protegida de la luz. Posteriormente, se purificó mediante diálisis con membrana de 50 kDa (Spectra/Por[®] 6 Standard RC), haciendo 4 lavados de 2 L cada uno, utilizando solución *buffer* de pH 7,3.

MEDIDAS DE ABSORBANCIA UV-VIS

Las medidas se realizaron en un equipo Shimadzu modelo UV-1800. Las muestras de nanogeles con doxorubicina (p-NIPAm-BIS-DOXO) se midieron tal y como se obtuvieron luego de la diálisis. Por otro lado, se midieron muestras de DOXO y p-NIPAm-BIS-HDZ diluidas en el buffer utilizado para la diálisis. Se realizaron barridos de longitud de onda entre 700-300 nm a temperatura de 20 °C.

6.2.1.4 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

SÍNTESIS DE NGS DE P-NIPAM-BIS-DAT

Se realizaron síntesis de NGS de p-NIPAm-BIS-DAT_X_{APS/TEMED} utilizando la dupla rédox APS/TEMED como iniciadora de la reacción de termoprecipitación, en condiciones equivalentes a las utilizadas en la sección 6.1.3 de este capítulo. Se varió el porcentaje del entrecruzante DAT (0-15% mol) mientras se mantuvo fijo el porcentaje de BIS (1,5% mol), como se muestra en la Tabla 6.4.

Tabla 6.4 - Condiciones de síntesis de los NGS de p-NIPAm-BIS-DAT_X_{APS/TEMED}. El porcentaje molar (mol%) indicado es relativo a los moles de NIPAm utilizados en la síntesis.

Síntesis	NIPAm (M)	BIS (mol%)	DAT (mol%)
p-NIPAm-BIS- _{APS/TEMED}	0,2	1,5	0
p-NIPAm-BIS-DAT ₈ _{APS/TEMED}	0,2	1,5	8
p-NIPAm-BIS-DAT ₁₂ _{APS/TEMED}	0,2	1,5	12
p-NIPAm-BIS-DAT ₁₅ _{APS/TEMED}	0,2	1,5	15

DETERMINACIÓN DEL Dh DE LOS NGS Y SU DEPENDENCIA CON LA TEMPERATURA.

Los productos de síntesis se estudiaron, inicialmente, mediante Dispersión Dinámica de Luz (DLS). Los valores obtenidos se resumen en la Figura 6.15. En todos los casos se obtuvieron NGS de diámetro medio entre 125 a 180 nm. Si bien los tamaños fueron levemente menores a los informados en la primera sección de este capítulo, la tendencia mostró un comportamiento equivalente. El aumento en el porcentaje del entrecruzante DAT llevó a un aumento en el diámetro hidrodinámico medio de los NGS. Además, se obtuvieron bajos valores de polidispersidad (PD) cuando el porcentaje de DAT fue menor al 12%, mientras que un mayor incremento llevó a un marcado aumento en el índice de polidispersidad (PDI).

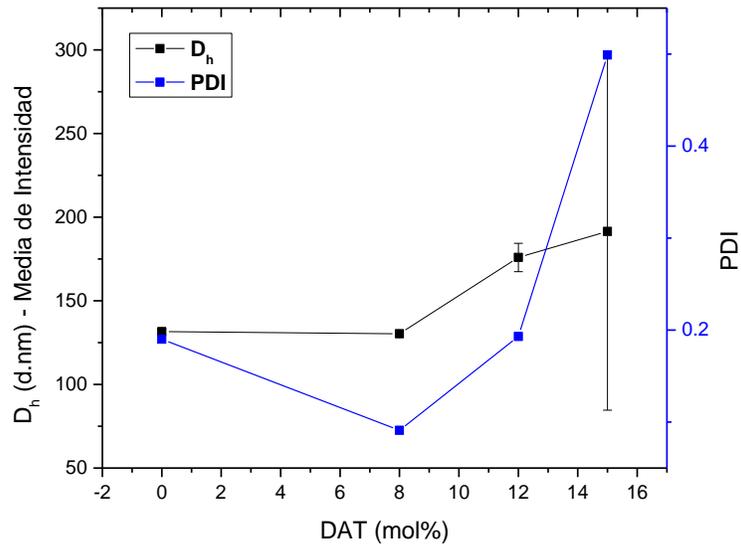


Figura 6.15 - Diámetro hidrodinámico (D_h) e Índice de Polidispersidad (PDI), determinado por DLS, para los NGs *p*-NIPAm-BIS-DAT_XAPS/TEMED

La composición basada en el monómero NIPAm prevé la obtención de nanogeles termosensibles. Para comprobar el efecto de la temperatura en el hinchamiento de estos materiales, se midió el D_h de los NGs a 25 y 40 °C. La Figura 6.16 muestra los valores obtenidos a partir de la media de intensidad reflejada por los NGs y a través del Z-Average (ajuste directo de la curva de correlación en la medida de DLS).

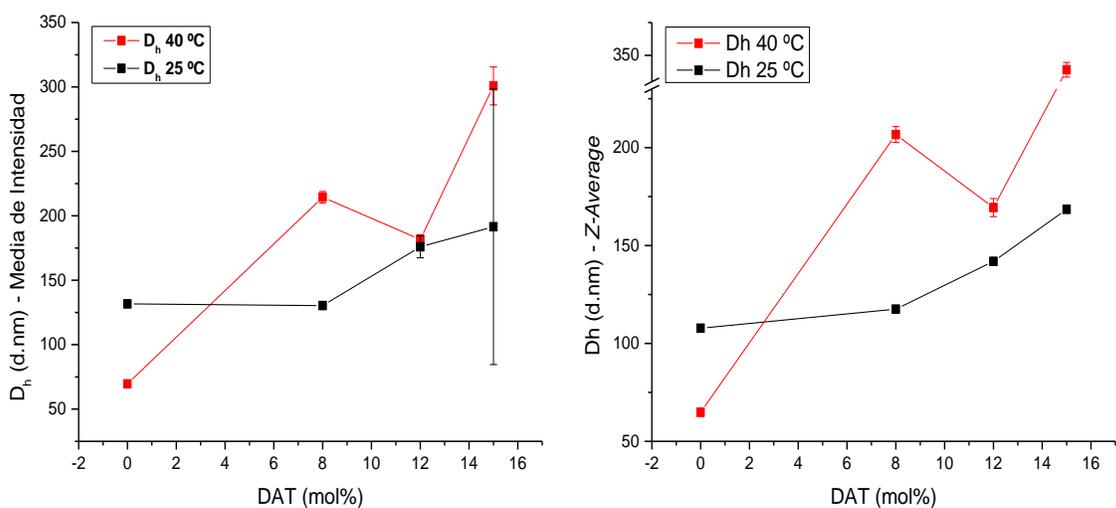


Figura 6.16 - Dh de los nanogels a 25 °C y 40 °C. Izquierda: media de intensidad; Derecha: Z-Average.

Las medidas reflejan un cambio en el Dh de los NGs con la temperatura, evidenciando su termosensibilidad. En el caso de p-NIPAm-BIS, el Dh disminuye con el calentamiento, demostrando el colapso de los NGs por favorecimiento de las interacciones polímero-polímero respecto de las polímero-solvente. Para el caso de los NGs conteniendo DAT, estos muestran un Dh medio mayor al observado a temperatura ambiente. A pesar de que se espera que el estímulo térmico genere un colapso de los NGs, disminuyendo su Dh, es habitualmente observado que los NGs de p-NIPAm formen agregados de mayor tamaño que los NGs a temperatura ambiente. Esta agregación es también debida al favorecimiento de las interacciones polímero-polímero por sobre las polímero-solvente y es dependiente de diversos factores, entre ellos: la carga superficial de los NGs, la concentración de partículas y la fuerza iónica del medio. Por ende, es posible que, de acuerdo con la naturaleza química de los NGs o con variaciones en la concentración de la muestra, algunas partículas formen agregados y otras no. Sin embargo, en todos los casos se observó una respuesta frente a la temperatura en los NGs sintetizados.

En el caso de p-NIPAm-BIS-DAT12_{APS/TEMED}, el cambio de Dh medio con la temperatura no se evidencia claramente en el valor de Dh medio ponderado por intensidad. Sin embargo, un

análisis más preciso sobre los datos obtenidos por DLS muestra que existe una disminución del índice de PD y las curvas de distribución por volumen y número muestran cambios claros (que no se han visto reflejados en el valor de intensidad media). Al observar el valor calculado como *Z-Average*, en lugar del obtenido a partir de la media de intensidad, los cambios resultan más evidentes (Figura 6.16, derecha).

MODIFICACIÓN POST-SÍNTESIS UTILIZANDO PERIODATO DE SODIO

Los nanogeles fueron modificados con periodato de sodio para lograr el clivaje de los entrecruzamientos debidos a DAT. Los productos mostraron un comportamiento equivalente al observado previamente (Figura 6.17).

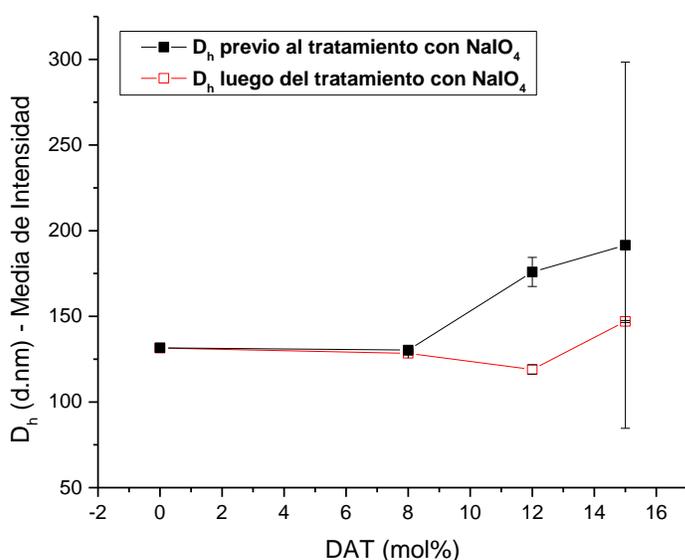


Figura 6.17 - D_h de los NGs *p*-NIPAm-BIS-DAT_X_{APS/TEMED} antes y después de ser tratados con periodato. Las barras de error corresponden a la desviación estándar respecto de 3 medidas consecutivas.

Luego del tratamiento con periodato, la ruptura de entrecruzamientos entre partículas nucleadas y entrecruzadas por DAT, generó partículas más pequeñas y menor PDI.

CROMATOGRAFÍA DE PERMEACIÓN EN GELES (GPC)

Para corroborar el efecto del tratamiento con periodato en los tamaños de los NGs, mediante una técnica de fundamentos diferentes a la dispersión dinámica de la luz (DLS), se realizaron medidas de Cromatografía de Permeación en Geles (GPC) sobre los nanogeles, antes y después del tratamiento con periodato. En la Figura 6.18 se graficaron los tiempos de retención observados en cada caso.

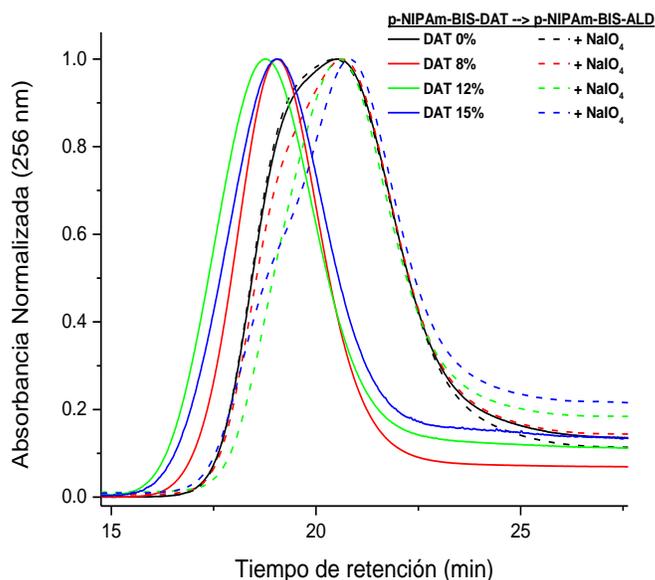


Figura 6.18 – Tiempos de retención en GPC de los NGs sintetizados antes (curva sólida) y después (curva punteada) de ser tratados con periodato de sodio.

Previo al tratamiento con periodato (líneas continuas), puede observarse que los productos de síntesis que se realizaron con mayor porcentaje de DAT poseen tiempos de retención menores que aquellos obtenidos con menor porcentaje, o sintetizados en ausencia de este entrecruzante. Este resultado es coherente con lo observado por DLS, e indica que el tamaño de los NGs aumentó con el porcentaje de DAT utilizado en la síntesis. Luego del tratamiento con periodato, todos los tiempos de retención se desplazaron hacia tiempos mayores, indicando la disminución del tamaño medio de partículas, tal y como se determinó por DLS. Este fenómeno se observó en todos los NGs que contienen DAT como

entrecruzante (p-NIPAm-BIS-DATX_{APS/TEMED}), pero no sucedió en los entrecruzados sólo con BIS (p-NIPAm-BIS_{APS/TEMED}), demostrando la selectividad de periodato en la ruptura del entrecruzante con el diol vecinal. Es importante destacar que la forma del cromatograma de p-NIPAm-BIS-DAT15_{APS/TEMED} luego del tratamiento con periodato, tiene un cierto carácter bimodal y que la población más abundante correspondería a la de partículas más pequeñas (el máximo a tiempos de retención mayores). Por lo tanto, es posible que la tendencia de tamaños luego del tratamiento con periodato sea equivalente a la observada por DLS (Figura 6.17), sólo que la población de partículas más grandes pondera en la determinación del Dh medio por intensidad en la medida de DLS (debido a que las partículas más grandes dispersan la luz con mayor intensidad), enmascarando a la población más pequeña. Bajo esta consideración, se fortalece la conclusión de que a mayores porcentajes del entrecruzante DAT, se nuclean fragmentos más pequeños de partículas durante la reacción y se arriba a tamaños medios finales mayores.

TEMPERATURA DE TRANSICIÓN DE FASE – TURBIDIMETRÍA

Se midió la temperatura de transición de fase de los nanogeles, antes y después de ser tratados con periodato de sodio, mediante turbidimetría (Figura 6.19).

La temperatura de transición de fase del homopolímero p-NIPAm es de ≈ 32 °C. Generalmente, esta Ttf es aumentada cuando NIPAm es copolimerizado con co-monómeros hidrofílicos, mientras que disminuye cuando se trata de co-monómeros hidrofóbicos. Los NGs de p-NIPAm-BIS_{APS/TEMED} mostraron una temperatura de transición de 34,5 °C, lo cual indicaría que BIS actúa como un co-monómero hidrofílico en la red. Este valor es coincidente con otros NGs de p-NIPAm-BIS reportados en literatura [18]. Por el contrario, la incorporación de DAT a la red genera disminución de la Ttf, proporcional a la cantidad de DAT utilizado en la síntesis. Esto indicaría que el entrecruzante actúa como un co-monómero hidrofóbico.

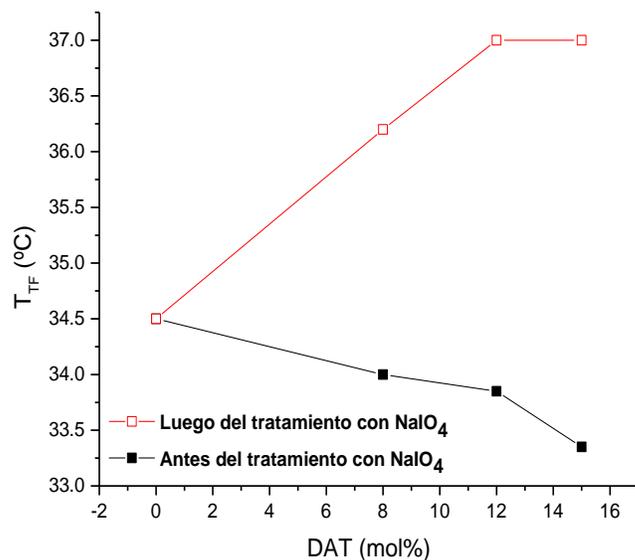


Figura 6.19 - Temperatura de Transición de Fase (T_{tf}) determinada por turbidimetría para NGs, antes y después del tratamiento con NaIO₄.

Luego de la modificación post-síntesis de los NGs, con periodato de sodio, se observaron marcados cambios en la T_{tf}. Los NGs entrecruzados solamente por BIS (p-NIPAm-BIS_{APS/TEMED}) no sufrieron cambios, pero aquellos que contenían DAT aumentaron la T_{tf} de manera proporcional a la cantidad de DAT utilizado en la síntesis. Este fenómeno indica la formación de nuevos grupos polares en los NGs luego de la ruptura de DAT, presumiblemente, GF α-oxo-aldehído.

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

La naturaleza química de los NGs termosensibles y el efecto del tratamiento con periodato de sodio se estudiaron mediante Resonancia Magnética Nuclear de ¹H (Figura 6.20).

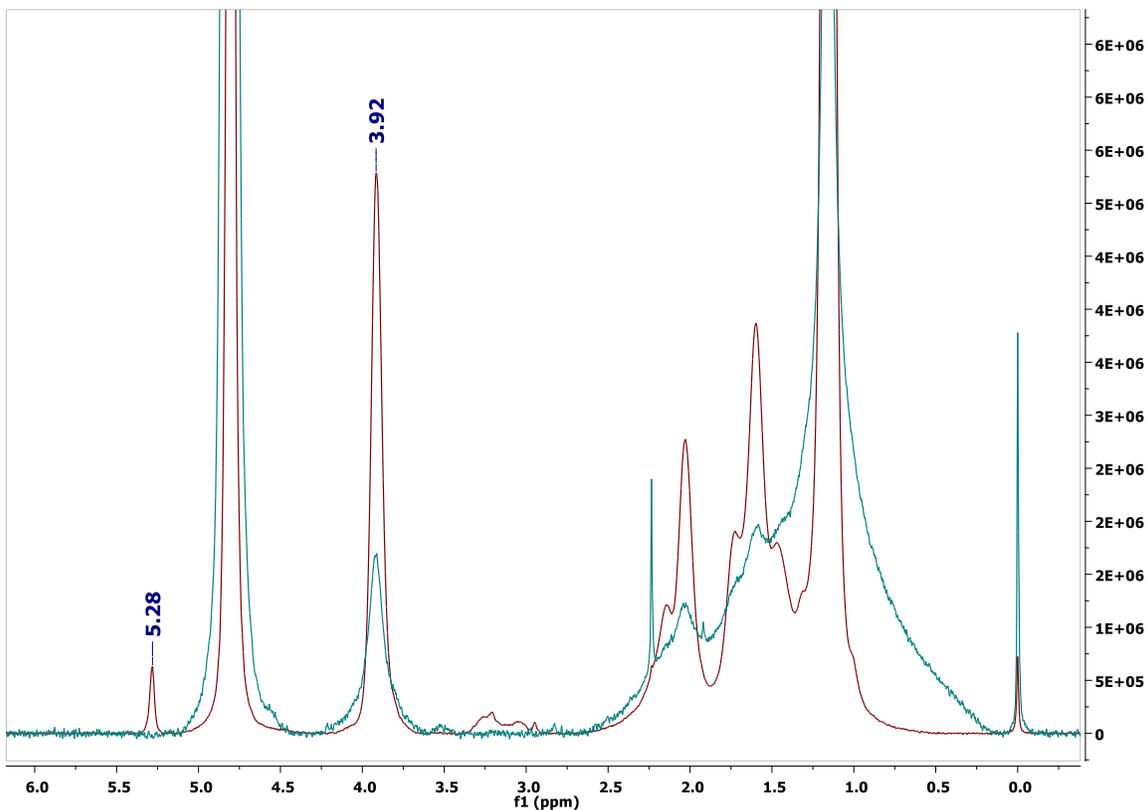


Figura 6.20 - ^1H -RMN de los nanogeles termosensibles antes (verde) y después (rojo) del tratamiento con NaIO_4 .

Para ello, los NGs purificados mediante diálisis fueron liofilizados y resuspendidos en D_2O . La Figura 6.20 muestra a los NGs termosensibles antes (verde) y después (rojo) del tratamiento con periodato para NGs de p-NIPAm-BIS-DAT8_{APS/TEMED}. En ambos casos se observaron las señales características de p-NIPAm. Luego del tratamiento con periodato, se verificó la presencia de GF α -oxo-aldehído en su estado hidratado por la aparición de una señal a 5,28 ppm.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)

La morfología y polidispersidad de los NGs se estudió mediante TEM, utilizando acetato de uranilo como agente de tinción. Las micrografías (Figura 6.21) revelaron la presencia de NGs de aproximadamente 60 nm de diámetro y morfología esférica irregular. Esta forma

irregular remite a una estructura porosa, formada por la nucleación de pequeñas partículas esféricas, como se observó anteriormente en este capítulo, en NGs de p-NIPAm-BIS-DAT_{APS/TEMED}. Luego del tratamiento con periodato, la morfología de los NGs cambió notoriamente. La forma esférica es más regular y las partículas lucen más homogéneas, mientras se observan partículas de diversos tamaños. Este cambio estructural refleja la ruptura de los entrecruzamientos debidos al entrecruzante DAT. Si bien el cambio en la morfología es evidente, el tamaño medio de las partículas no sufrió grandes cambios. Este resultado es acorde a lo observado en DLS para los NGs de p-NIPAm-BIS-DAT_{8APS/TEMED}.

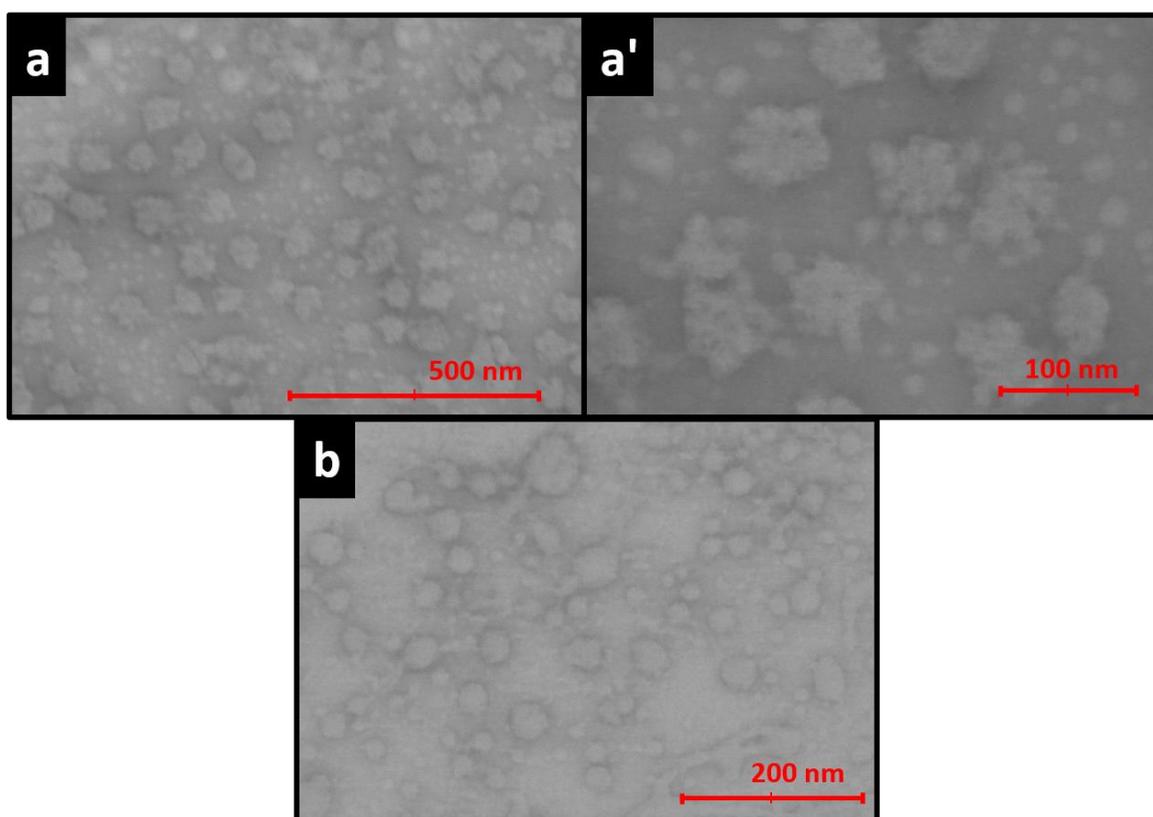


Figura 6.21 - Micrografías de TEM de los NGs de p-NIPAm-BIS-DAT_{8APS/TEMED} antes (arriba) y después (abajo) del tratamiento con periodato.

MODIFICACIÓN CON DHAA (SÍNTESIS DE p-NIPAm-BIS-HDZ)

Los NGs de p-NIPAm-BIS-ALD8_{APS/TEMED} se modificaron mediante reacción con un gran exceso de DHAA en buffer de acetato de sodio (pH 5,3). El exceso de DHAA se utilizó con el objetivo de favorecer la funcionalización de los NGs a través de sus GF α -oxo-aldehído, en lugar de la formación de entrecruzamientos entre los mismos. Luego de la reacción, los NGs fueron dializados en buffer fosfato 7,3 para eliminar restos de DHAA que no se hubiesen unido a la red.

La modificación no generó un cambio considerable en el diámetro medio determinado por DLS (ver Figura 6.22). Sólo se observó un aumento en la polidispersidad, el cual se vio reflejado en un pequeño ensanchamiento de la curva de distribución hacia tamaños mayores. Este aumento refleja un incremento de tamaño, posiblemente en una pequeña población de las partículas, y podría indicar la formación de entrecruzamientos entre los NGs en baja proporción.

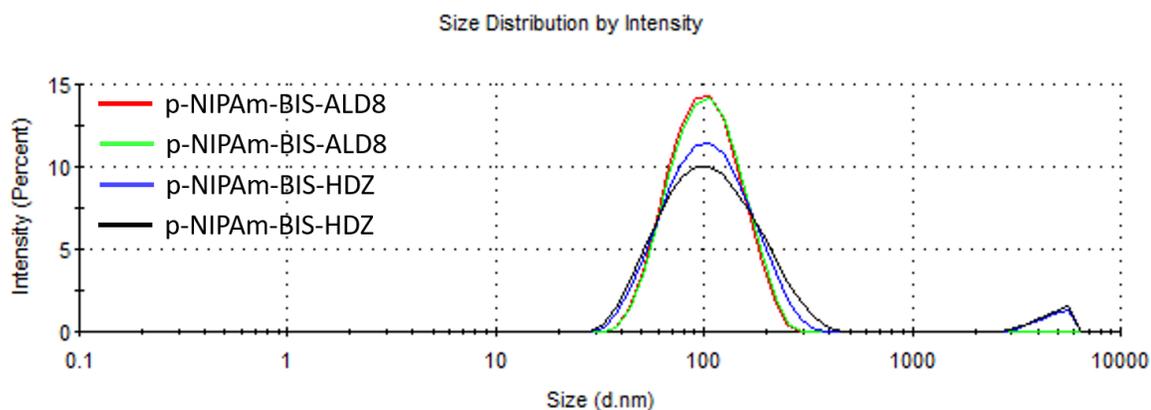


Figura 6.22- DLS de p-NIPAm-BIS-ALD8 antes y después de ser modificado con DHAA (producto: p-NIPAm-BIS-HDZ).

La modificación se corroboró mediante ^1H -RMN. Para ello, la muestra dializada post-modificación fue liofilizada y redispersada en D_2O . En la Figura 6.23 se graficaron los espectros superpuestos de p-NIPAm-BIS-ALD8 y p-NIPAm-BIS-HDZ. Luego de la

modificación, no se observa más la señal correspondiente a los GF α -oxo-aldehído, indicando que han sido modificados durante la reacción. Además, aparecen nuevas señales a 2,23 ppm y 1,58 ppm, correspondientes a los ^1H de la cadena hidrocarbonada de AADH; y una señal a 7,45 ppm debida a la formación de enlaces hidrazona, como se observó en los polímeros de p-NIPAm-ALD modificados con hidrazona informados en el Capítulo 5.

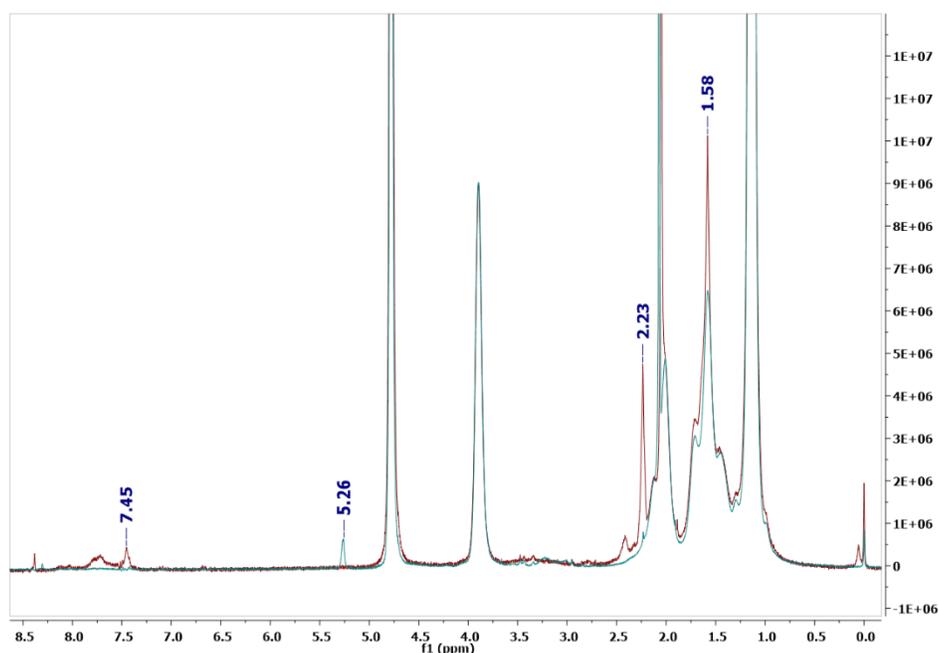


Figura 6.23 - ^1H -RMN de p-NIPAm-ALD8 antes (verde) y después (rojo) de ser modificado con DHAA (p-NIPAm-BIS-HDZ).

MODIFICACIÓN CON DOXORUBICINA (DOXO)

Como se mencionó previamente, el fármaco anticancerígeno Doxorubicina posee un grupo cetona en su estructura química, que podría ser utilizado para la formación de enlaces hidrazona sensibles al pH. Para unir covalentemente el fármaco a los NGs, se colocó una concentración conocida de DOXO en contacto con una dispersión de NGs p-NIPAm-BIS-HDZ en buffer pH 6,3 (0,2 M) bajo agitación y protegidos de la luz, durante 12 h. Se obtuvo una solución homogénea de color rojo. Se colocó esta solución a dializar en grandes volúmenes de buffer fosfato pH 7,4, cambiando el agua de diálisis con frecuencia, durante 72 h. Durante las últimas 24 h, no se observó más coloración en el agua de lavado. Como

producto, se obtuvo una solución de color rosa pálido (p-NIPAm-BIS-DOXO, ver Figura 6.24a). Dado que los NGs de p-NIPAm-BIS-HDZ son translúcidos en solución, y DOXO posee color rojo, esta coloración rosada indicaría la incorporación de DOXO en los nanogeles. Esto se corroboró mediante medidas UV-Vis, donde se observó un pico de absorbancia correspondiente a DOXO en los NGs modificados con el fármaco (Figura 6.24b).

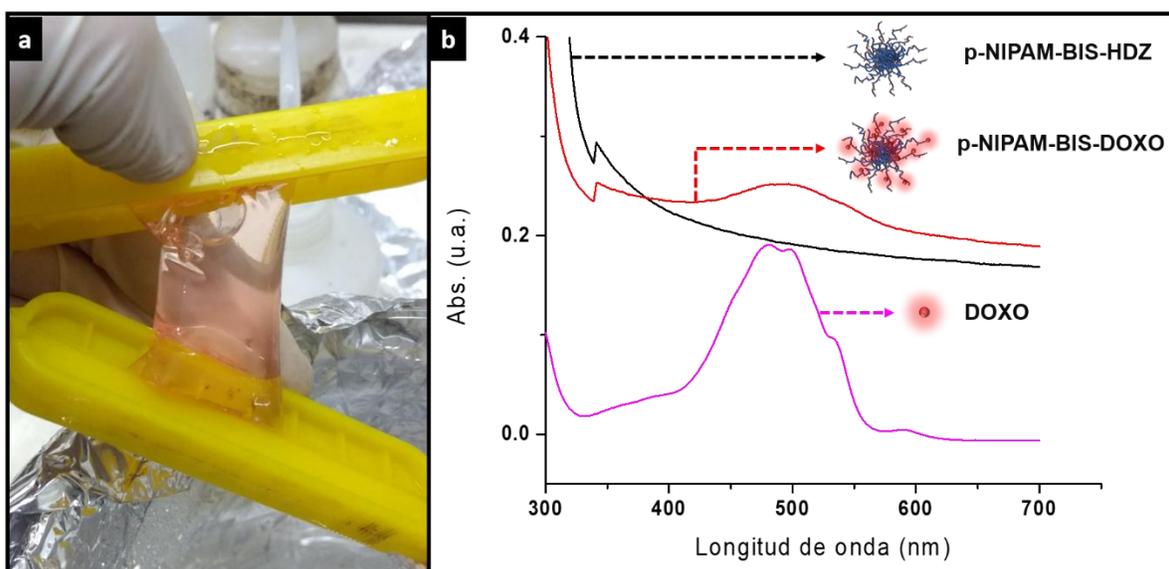


Figura 6.24 - Modificación de los NGs con DOXO. (a) Producto de reacción luego de la dialisis en buffer fosfato durante 72 h. Se observa un color rosa pálido que indica la presencia de DOXO. (b) Espectros UV-Vis de DOXO (curva magenta) y p-NIPAm-BIS-HDZ antes (curva negra) y después (curva roja) de la incorporación de DOXO.

Previo a la práctica de ensayos biológicos para evaluar el desempeño de los nanodispositivos frente a distintas líneas celulares, es necesario realizar una caracterización más profunda sobre la eficiencia, capacidad de carga y liberación de DOXO que presentan los NGs. En particular, es importante el estudio de la liberación a distintos valores de pH para evaluar si el fármaco fue incorporado a través de enlaces hidrazona pH sensibles que permitan la liberación selectiva de DOXO, en entornos ácidos como los de tejidos cancerosos o a pH lisosomal.

6.2.1.5 - CONCLUSIONES PARCIALES Y PERSPECTIVAS

Se sintetizaron nanogeles termosensibles basados en p-NIPAm y en los entrecruzantes BIS y DAT, obteniendo diámetros hidrodinámicos entre 130 y 180 nm. La modificación post-síntesis de las nanopartículas por clivaje oxidativo de los entrecruzamientos debidos a DAT llevó a cambios morfológicos en la estructura de los NGs y a la disminución de los tamaños de partícula, como se había observado anteriormente. Esto se corroboró mediante DLS, GPC y TEM.

Posteriormente, se comprobó la formación de GF α -oxo-aldehídos en los nanogeles, mediante RMN. Estos GF polares generaron un aumento en la temperatura de transición de fase de los NGs proporcional a la cantidad de DAT utilizado en la síntesis y alcanzando calores cercanos a la temperatura corporal. Los aldehídos obtenidos se utilizaron para la incorporación de GF hidrazida en los NGs, a través de su reacción con AADH.

Se ensayó la incorporación covalente de doxorrubicina por reacción del GF cetona presente en su estructura con los GF hidrazida obtenidos en NGs. La caracterización de los productos de reacción sugiere la efectiva incorporación de DOXO en los NGs. Sin embargo, es necesario una profundización en la caracterización de estos nanodispositivos en cuanto a su capacidad de carga del fármaco, el tipo de unión con el mismo y su comportamiento en la liberación controlada.

La metodología desarrollada de síntesis y modificación post-síntesis permitió el control de la morfología y funcionalidad de los NGs termosensibles, incorporando GF α -oxo-aldehídos que fueron fácilmente modificados mediante la formación de enlaces hidrazona en condiciones suaves. Estos NGs podrían ser utilizados en la inmovilización de fármacos y/u otros bioactivos (incluyendo péptidos o proteínas) para la generación de nanodispositivos para el tratamiento de enfermedades oncológicas.

6.2.2 - SÍNTESIS DE NGS HUECOS (NANOCÁPSULAS) PARA ENCAPSULADO Y LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS

6.2.2.1 - CONSIDERACIONES GENERALES

En los últimos años, el control de la microarquitectura en microgeles se ha convertido en un foco de interés, dado que la estructura de las partículas define sus características mecánicas, de hinchamiento, de respuesta a estímulos, su porosidad y capacidad de carga y liberación de un bioactivo, entre otras. El control sobre estas características podría optimizar o abrir nuevas posibilidades de aplicación de los microgeles, sobre todo en el área biomédica. Por lo tanto, en la última década se ha reportado el desarrollo de microgeles con diversas estructuras como: *core-shell*, microgeles con estructuras tipo “yema” (*yolk like microgels*), microgeles con cabellos (*hairy microgels*) o microgeles huecos (*hollow microgels*). Estos últimos, consisten en la obtención de estructuras esféricas con una o más capas de polímero en la zona externa y un núcleo hueco. Esta arquitectura otorga propiedades particulares a estos microgeles, principalmente por el espacio disponible para el cargado de moléculas de interés para liberación controlada (micro/nano cápsulas), pero también en cuanto a sus propiedades mecánicas [16], [24], [40], [41].

Una de las principales estrategias de síntesis de microcápsulas es mediante técnicas de microfluídica, que permite la obtención de partículas monodispersas. Sin embargo, estas tienen limitaciones dimensionales: se obtienen partículas relativamente grandes, entre 10000-100000 nm. Para la síntesis de partículas con diámetros menores, inclusive en la nanoescala, la estrategia más utilizada comprende la síntesis de una capa de polímero entrecruzado (*shell*) sobre un núcleo, generalmente denominado “de sacrificio”. Este núcleo es luego disuelto (por descomposición química), dejando una capa polimérica con un interior hueco. Los materiales más utilizados como núcleos de sacrificio, son las nanopartículas de sílica [42].

La formación de un núcleo polimérico de sacrificio, degradable frente a periodato de sodio, fue utilizado por Nayak y colaboradores para la síntesis de nanogeles huecos termoresponsivos. Para ello, se sintetizó un núcleo de p-NIPAm entrecruzado con 1,2-(dihidroxietileno)bisacrilamida (DHEA), el cual contiene dioles vecinales en su estructura. Posteriormente, se sintetizó una capa de p-NIPAm-BIS sobre el nanogel de sacrificio, para luego degradar el núcleo en presencia de periodato de sodio [24].

La similaridad estructural entre DHEA y (+)-N,N'-dialiltartradiamida (DAT) sugiere que este último podría ser utilizado de manera equivalente a DHEA para generar microestructuras huecas.

Por otro lado, se propone utilizar un copolímero de p-NIPAm junto a poliglicerol dendrítico acilado (dPGAc) para entrecruzar la capa de la nanocápsula. El poliglicerol dendrítico (Figura 6.25), incorporado en diversos nanodispositivos poliméricos, ha demostrado aumentar el tiempo de circulación en sangre y la internalización celular de los mismos, además de buenas propiedades biológicas en cuanto a citotoxicidad [43]. NGs basados en p-NIPAm y dPGAc han sido utilizados para el desarrollo de dispositivos para liberación de fármacos para tratamientos de enfermedades de la piel, logrando el encapsulado y liberación de una proteína sin pérdida de su actividad [44].

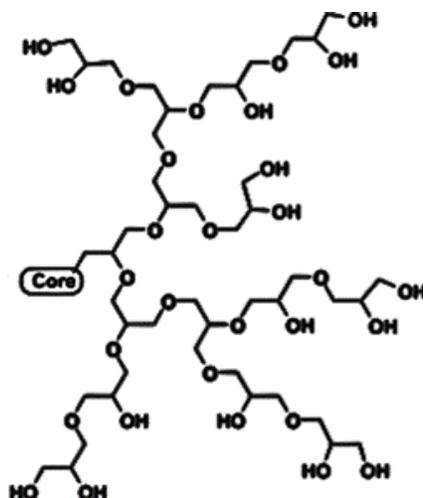


Figura 6.25 - Esquema de macromolécula de poliglicerol dendrítico (dPG).

6.2.2.2 - OBJETIVOS

- Analizar si es posible sintetizar núcleos de sacrificio (degradables) basados en p-NIPAm-DAT, aplicando la estrategia de degradación química por oxidación con periodato de sodio desarrollada previamente.
- Evaluar la síntesis de microgeles *core-shell* mediante polimerización sobre semillas (*seeded polymerization*) generando una capa de polímero termosensible, entrecruzada con poliglicerol dendrítico, sobre los nanogeles de sacrificio.
- Analizar, como prueba de concepto, si el clivaje post-síntesis realizado sobre DAT puede ser aprovechado para la síntesis de NGs huecos.

6.2.2.3 - MATERIALES Y MÉTODOS

SÍNTESIS DE NANOGELES Y MODIFICACIÓN CON PERIODATO DE SODIO

Para la síntesis de NGs termosensibles se utilizaron las cantidades indicadas en la Tabla 6.5 en las condiciones descritas en la sección 6.1.3, utilizando a la dupla redox APS/TEMED para iniciar las reacciones.

DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ (DLS)

Se utilizaron las condiciones descritas en la sección 6.1.3.

SÍNTESIS DE POLIGLICEROL DENDRÍTICO ACRILADO (Ac(9%)-dPG)

El poliglicerol dendrítico (dPG) de Mw promedio de 10kDa fue sintetizado de acuerdo a metodologías reportadas previamente [45]. El dPG se secó durante toda la noche al vacío, previo a la reacción de acrilado. Se adicionó por goteo una solución de cloruro de acrilóilo (1,17 mmol, 96% Fluka) en DMF seco (1 mL, 99.8% Acros) a una solución agitada de dPG (1g, 10 kDa) y trietanolamina (TEA, Acros) (1,08 mmol, 150 μ L) en DMF (7 mL) a 0 °C. La reacción se agitó toda la noche a temperatura ambiente. El producto de reacción (Ac(9%)-dPG) se purificó mediante diálisis (membrana MWCO 2kDa) en agua durante más de 48 h. El producto se almacenó en una habitación oscura en la presencia de p-metoxifenol y se dializó previo a su uso. Rendimiento del 90 %.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)

Las muestras se prepararon tal y como se indicó en la sección 6.1.3 y se utilizó el Microscopio electrónico Hitachi Scanning (SU8030) (20 kV) (Universidad Libre de Berlín), en el modo de Transmisión electrónica.

SÍNTESIS DE NANOGELES CORE-SHELL

La modificación superficial de los NGs de p-NIPAm-DAT y p-NIPAm-BIS-DAT se realizó mediante polimerización sobre semillas (*seeded polymerization*), como se esquematiza en la Figura 6.26. Para ello se dispersaron nanogeles de p-NIPAm-BIS-DAT o p-NIPAm-DAT (10 mg) en 5 mL y se burbujeó con N₂ durante 30 min. Posteriormente la dispersión se llevó a calentamiento a 70 °C durante 1 h bajo agitación (350 r.p.m.= Posteriormente se adicionó 1 mL de solución conteniendo 33 mg de Ac(9%)-dPG, 67 mg de NIPAm y 2,3 mg de persulfato de amonio (APS). La reacción procedió a 70 °C, durante 5 h, y luego el producto fue purificado mediante diálisis utilizando membranas de 50 kDa (Spectra/Por® 6 Standard RC), con repetidos cambios de agua destilada, durante al menos 48 h.

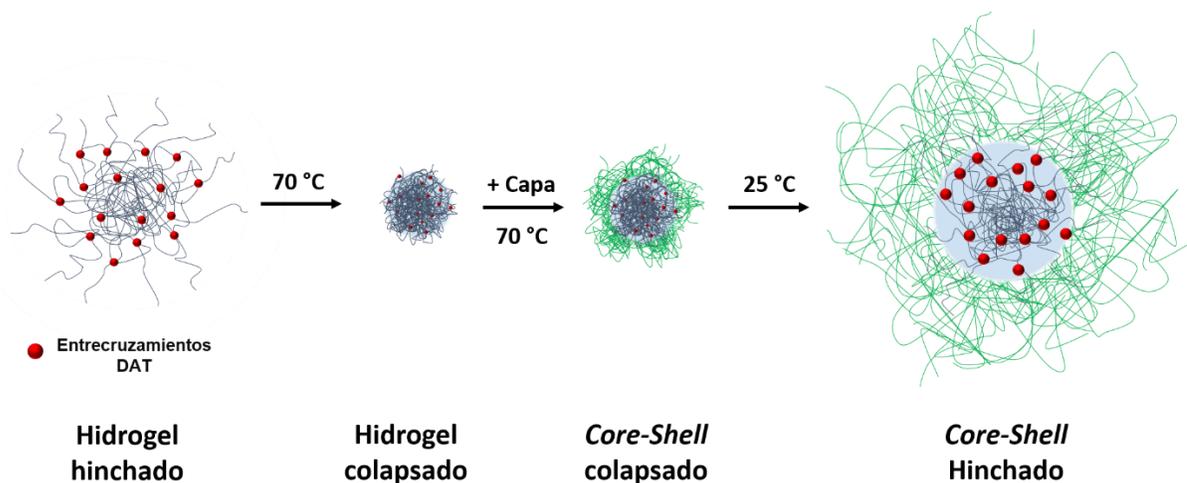


Figura 6.26 – Esquema de reacción de formación de partículas core-shell mediante seeded polymerization.

MODIFICACIÓN CON PERIODATO DE SODIO

La solución de partículas *core-shell* fue tratada con periodato de sodio para degradar el núcleo entrecruzado por DAT (Figura 6.27). Dado que no se conocía con precisión la cantidad de DAT incorporado en las nanopartículas core-shell, se utilizó un gran exceso de periodato. Para esto, se supuso como sobreestimación que la mitad de la masa de las partículas *core-shell* equivalía a moles de DAT. Luego de 4 horas de reacción a temperatura

ambiente, las partículas fueron dializadas utilizando membranas de 50 kDa (Spectra/Por® 6 Standard RC), con repetidos cambios de agua destilada, durante 7 días.

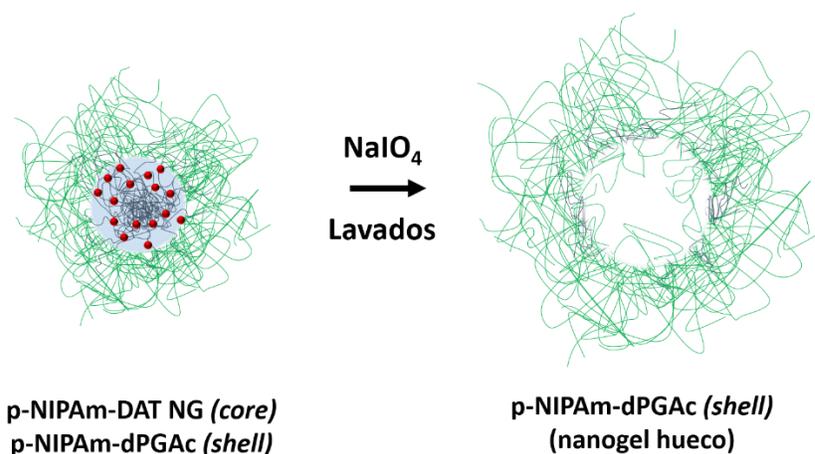


Figura 6.27 - Esquema de modificación de los NGs core-shell con periodato, para degradar el núcleo entrecruzado con DAT y obtener NGs huecos.

6.2.2.4 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los estudios realizados en macrogeles entrecruzados con el agente DAT mostraron que, mediante el tratamiento de dichos geles con periodato de sodio, es posible degradar la estructura de la red tridimensional que compone al gel. Además, los resultados obtenidos en la oxidación con periodato en nanogeles de p-NIPAm y p-NIPMAM entrecruzados con BIS y DAT mostraron que la ruptura de DAT llevó a importantes cambios morfológicos, afectando a la estructura de los nanogeles. Estos resultados sugieren que es posible degradar completamente la estructura de NGs de p-NIPAm-DAT frente a periodato. Esta propiedad podría ser aprovechada para la utilización de NGs de p-NIPAm-DAT como moldes para la elaboración de estructuras más complejas. Existen antecedentes en la utilización del entrecruzante 1,2-(dihidroxi-etil)bisacrilmida (DHEA) en la generación de nanogeles huecos mediante la síntesis de NGs termoresponsivos tipo *core-shell* y la posterior degradación del *core* (núcleo) mediante el tratamiento con periodato.

El agente entrecruzante DAT, poseedor de un diol vecinal como DHEA, podría ser utilizado de manera equivalente. Sin embargo, debido a las diferencias de reactividad entre estos dos entrecruzantes, dicha propuesta fue evaluada en este estudio. Además, la formación de α -oxoaldehídos por el clivaje de DAT podría representar una ventaja sobre el otro sistema, permitiendo la realización de modificaciones específicas en el interior de los nanogeles huecos.

SÍNTESIS DE NÚCLEOS DEGRADABLES DE p-NIPAm

Se sintetizaron NGs de p-NIPAm-DAT y p-NIPAm-BIS-DAT para ser utilizados como núcleos en la obtención de estructuras tipo *core-shell*. El empleo de DAT como entrecruzante prevé la completa degradación del núcleo luego del tratamiento con periodato en NGs de p-NIPAm-DAT mientras que los NGs de p-NIPAm-BIS-DAT fueron sintetizados como control y prevén una degradación parcial de la estructura.

Los NGs fueron sintetizados mediante termoprecipitación, a 70 °C, utilizando SDS para un mayor control del tamaño y PD de los núcleos. La reacción se inició mediante la dupla rédox APS/TEMED para evitar la formación de auto-entrecruzamientos, como fuese demostrado por Smith y colaboradores [23]. Se varió el porcentaje del entrecruzante DAT en las distintas síntesis para evaluar su efecto en el tamaño y PD de los NGs (ver Tabla 6.5). El porcentaje de DAT también podría tener efectos en el perfil de degradación de los NGs.

Tabla 6.5 - Composición de los NGs sintetizados para su empleo como núcleo degradable en la síntesis de NGs huecos.

Síntesis	[NIPAm] (M)	DAT (mol %)	BIS (mol %)
p-NIPAm-BIS-DAT(5)	0,2	5	1,5
p-NIPAm-BIS-DAT(10)	0,2	10	1,5
p-NIPAm-BIS-DAT(15)	0,2	15	1,5
p-NIPAm-BIS-DAT(25)	0,2	20	1,5
p-NIPAm-DAT(5)	0,2	5	0
p-NIPAm-DAT(10)	0,2	10	0
p-NIPAm-DAT(15)	0,2	15	0
p-NIPAm-DAT(25)	0,2	20	0

DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS)

El diámetro hidrodinámico de los NGs sintetizados se estudió mediante DLS. Como se observa en la Figura 6.28, las nanopartículas tienen buena polidispersidad sólo cuando el %DAT empleado en la síntesis es menor al 15 %mol, resultado coincidente con lo reportado anteriormente en este capítulo. Tanto en presencia como ausencia del entrecruzante BIS, los NGs con 5 o 10 %mol de DAT mostraron D_h entre los 125 y 75 nm, con índices de polidispersidad muy bajos, siempre menores a 0,1. Estas características son adecuadas para su utilización como núcleos degradables ya que, frente a las condiciones apropiadas de formación del *shell*, podrían permitir la obtención de NGs huecos de tamaños pequeños, sin demasiada polidispersidad, siendo morfológicamente conveniente para su utilización en liberación controlada de fármacos. Dado el menor tamaño obtenido en NGs de p-NIPAm-DAT(10) y considerando que el mayor número de entrecruzamientos implicaría mayor número de puntos de degradación de los núcleos, se utilizaron NGs de esta composición para realizar los siguientes ensayos.

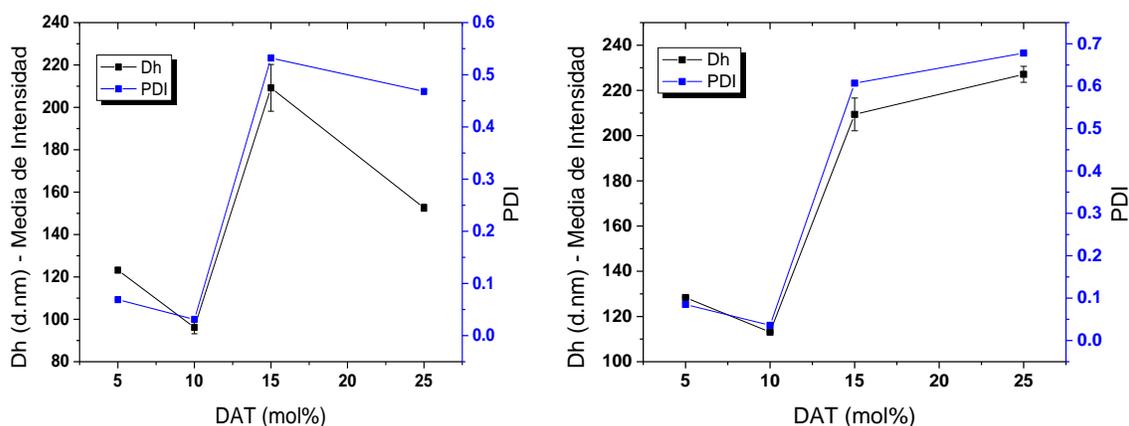


Figura 6.28 - Diámetro hidrodinámico y PDI respecto del %DAT utilizado en la síntesis de geles de p-NIPAm-DAT (izquierda) y p-NIPAm-BIS-DAT (derecha).

MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)

La polidispersidad de los geles de p-NIPAm-DAT(10) y su degradación frente a soluciones de NaIO_4 se estudió mediante TEM. Las micrografías de la Figura 6.29a muestran la baja polidispersidad de tamaños de los NGs, tal y como se determinó mediante DLS. El diámetro fue de alrededor de 100 nm. Luego del tratamiento con periodato de sodio, la estructura de los NGs se degradó por completo (Figura 6.29b) observándose sólo agregados de los productos de clivaje de las nanopartículas.

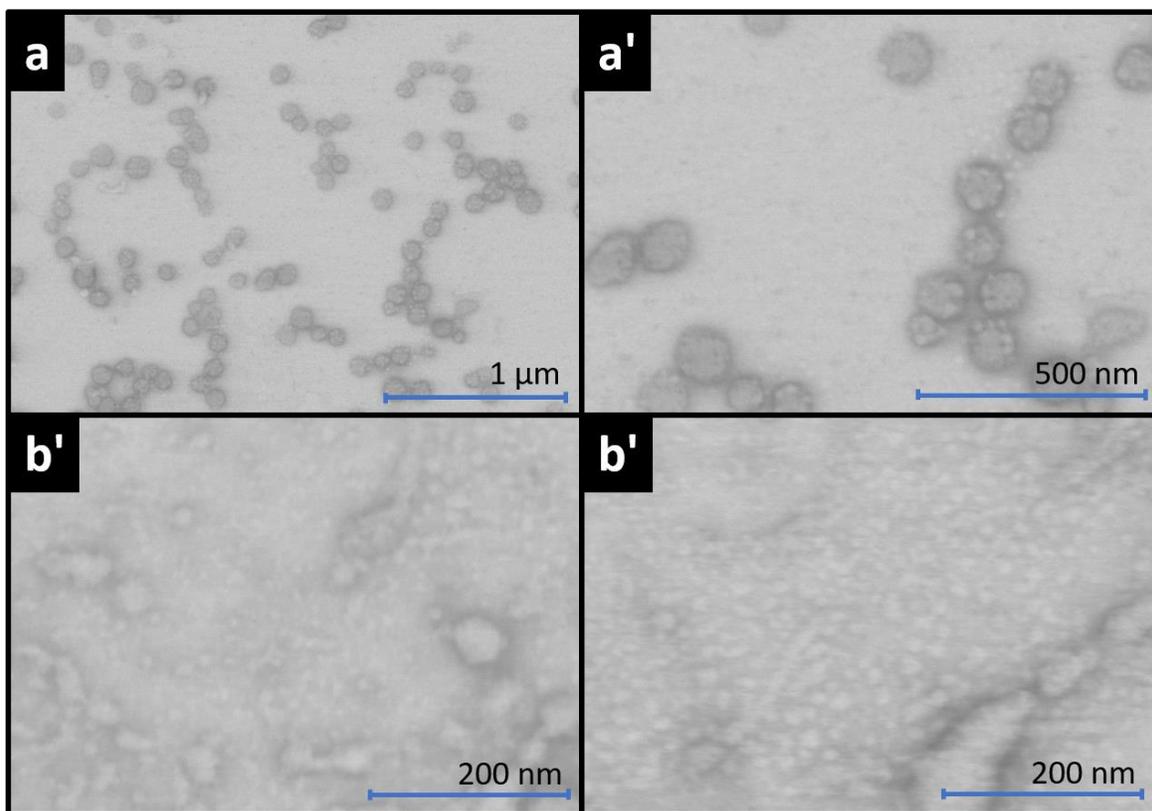


Figura 6.29 - Micrografía de TEM de los NGs p-NIPAm-DAT(10) antes (a y a') y después (b y b') de su degradación con periodato de sodio.

Basados en estos resultados, se procedió a la síntesis de nanogeles tipo *core-shell* mediante la modificación de la superficie de los NGs aquí descritos.

SÍNTESIS DE NGs CORE-SHELL

Los núcleos (*core*) de p-NIPAm-DAT(10) y p-NIPAm-BIS-DAT(10) se emplearon como semillas para generar una capa (*shell*) de polímero termosensible sobre ellos (*seeded polymerization*). El procedimiento se llevó a cabo en dispersiones altamente diluídas y deoxigenadas de los NGs núcleo, y a 70 °C. En estas condiciones, se adicionó una solución de NIPAm, Ac(9%)-dPG y APS para la generación de la capa externa sobre los núcleos. La alta dilución es necesaria para evitar la formación de grandes agregados de los NGs núcleo, y la alta temperatura se utiliza para mantener a los núcleos en su estado colapsado (por encima de su temperatura de transición térmica). El colapso de los núcleos disminuye su

porosidad para evitar el ingreso de los nuevos monómeros dentro de los núcleos (evitando la formación de redes interpenetradas), y favorece la nucleación de las nuevas cadenas de polímero termosensible, que crecen en la solución, por estar favorecidas las interacciones polímero-polímero a esta temperatura.

Los NGs obtenidos fueron purificados mediante diálisis y luego tratados con un exceso de periodato de sodio para ensayar la degradación de los núcleos. Estos últimos también fueron purificados por diálisis durante al menos 7 días. Los productos *core-shell*, antes y después de su tratamiento con periodato, fueron caracterizados mediante DLS y TEM.

CARACTERIZACIÓN DE LOS NGs CORE-SHELL Y NGs HUECOS.

La Figura 6.30 muestra los resultados obtenidos en la determinación de D_h por DLS en NGs modificados de p-NIPAm-BIS-DAT(10). Luego de la modificación superficial de los núcleos (*seeded polymerization*) los D_h de los geles crecieron hacia tamaños mucho mayores. Esto indicaría el crecimiento de capas de polímero sobre los NGs núcleo. El marcado incremento del D_h sugiere que la capa de polímero creada es muy grande, o que la modificación se realizó sobre el agregado de varias partículas núcleo. Luego del tratamiento con periodato, el D_h de los geles disminuyó considerablemente. Considerando que la *seeded polymerization* es realizada por encima de la temperatura de transición de las partículas núcleo, estas se encuentran en su estado colapsado durante la generación de la capa. Cuando las partículas son llevadas nuevamente a temperatura ambiente (debajo de su T_{tf} , como fueron medidas en DLS), los núcleos tenderían a hincharse, generando una tensión sobre la capa superficial. Por lo tanto, la ruptura de DAT podría minimizar la tensión de hinchamiento ejercida sobre la capa, por disminución del módulo elástico del/los núcleo/s. Este fenómeno indicaría la ruptura de los entrecruzamientos debidos a DAT, permitiendo la relajación de la capa (*shell*) tensionada por el hinchamiento impedido del núcleo. El efecto de colapso o hinchamiento de la capa, luego de la disolución de los núcleos, ha sido estudiada en nanogeles huecos y se ha reportado que depende de las propiedades

mecánicas (grado de entrecruzamiento y módulo elástico) de la capa cuando el núcleo es completamente degradado [42].

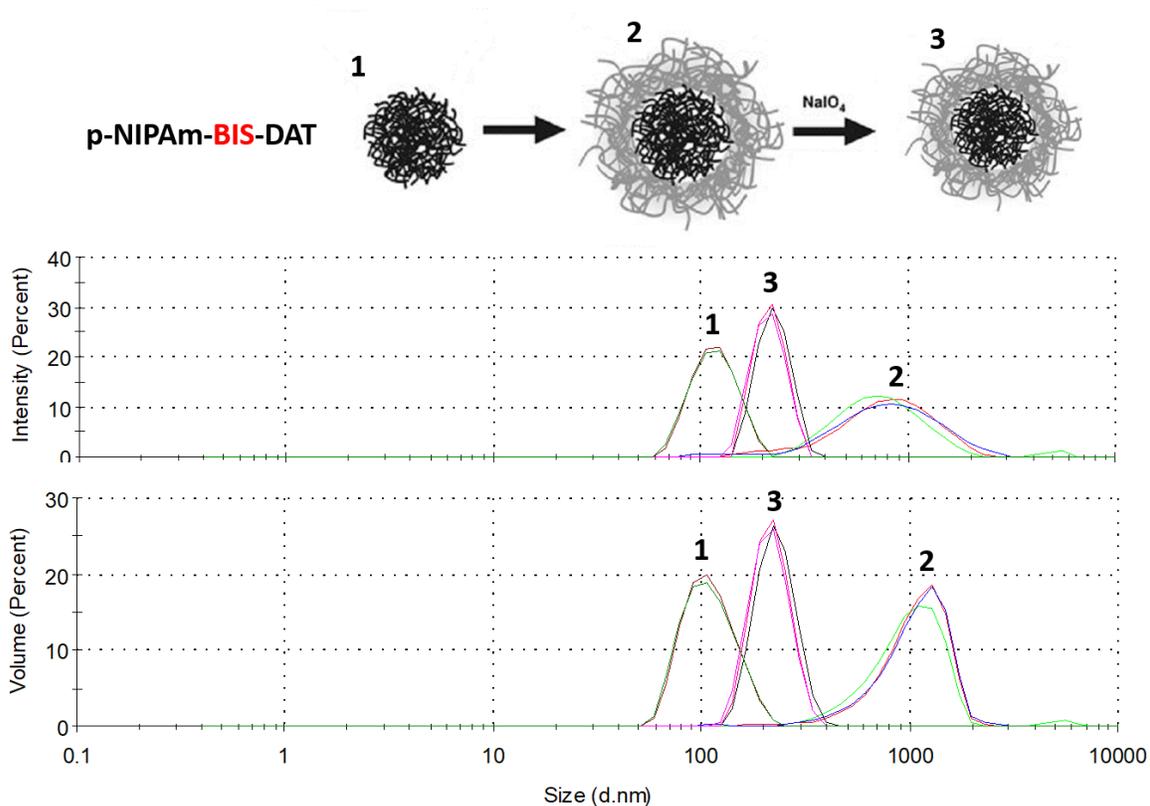


Figura 6.30 - Arriba: Esquema de la modificación de núcleos de p-NIPAm-BIS-DAT(10) (1) para obtener NGs tipo core-shell (2) y su posterior tratamiento con periodato de sodio (3). Abajo: curvas de distribución de Dh de los NGs, determinadas por DLS.

Los NGs *core-shell* con núcleo de p-NIPAm-BIS-DAT, luego del tratamiento con periodato, se estudiaron por TEM utilizando acetato de uranilo como agente de contraste. Las micrografías (Figura 6.31) muestran nanopartículas de aproximadamente 400 nm con una capa (*shell*) que se distingue de la parte interna. Esta distinción sugiere que la zona interna de las nanopartículas es menos densa por la ruptura de los entrecruzamientos, permitiendo mayor entrada del agente de tinción, o que interacciona más intensamente con el mismo. Este resultado, junto con el observado por DLS, indican la efectiva modificación de los NGs mediante *seeded polymerization* y posterior tratamiento con periodato. Además, los

tamaños de los NGs y particularmente del núcleo, sugieren que la *seeded polymerization* se realizó sobre agregados de más de un núcleo generando partículas “multi-núcleo”.

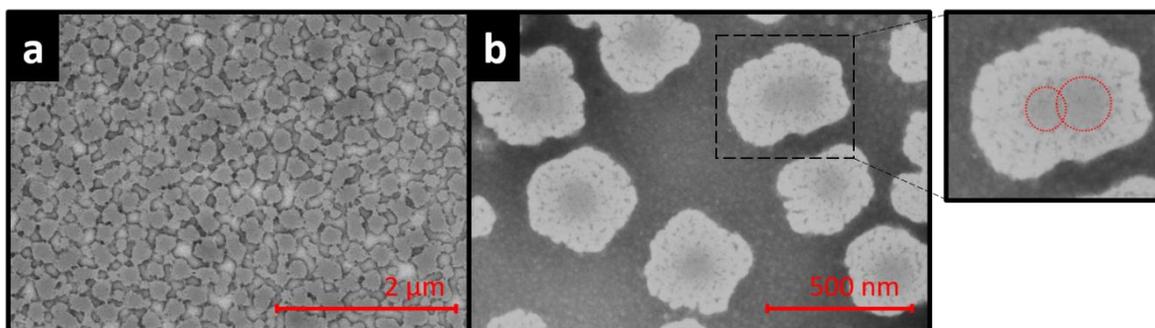


Figura 6.31 - Micrografía de TEM de NGs core-shell de p-NIPAm-BIS-DAT@dPG-NIPAm luego del tratamiento con periodato de sodio. (a) y (b) son micrografías de la misma muestra a distintas escalas. La ampliación de la imagen en (b) ilustra la incorporación de más de un núcleo durante la “seeded polymerization”.

Al realizar la *seeded polymerization* sobre NGs de p-NIPAm-DAT, los perfiles de distribución de tamaños mostraron un comportamiento diferente al sistema previamente descrito (Figura 6.32). Como se esperaba, la modificación de los NGs núcleo, con una capa de p-NIPAm-dPG, llevó al incremento de los valores de Dh. Sin embargo, la posterior oxidación de DAT, con periodato de sodio, generó un mayor incremento de los valores de Dh, evidenciando la reacción de clivaje de los entrecruzamientos. En este caso, la ruptura total de los entrecruzamientos del núcleo de p-NIPAm-DAT (como se comprobó anteriormente mediante TEM), condujo al aumento en el Dh de la capa externa (*shell*). Este resultado podría deberse a que la completa digestión del núcleo genera mayor libertad de movimiento a la capa externa, permitiendo su mayor expansión.

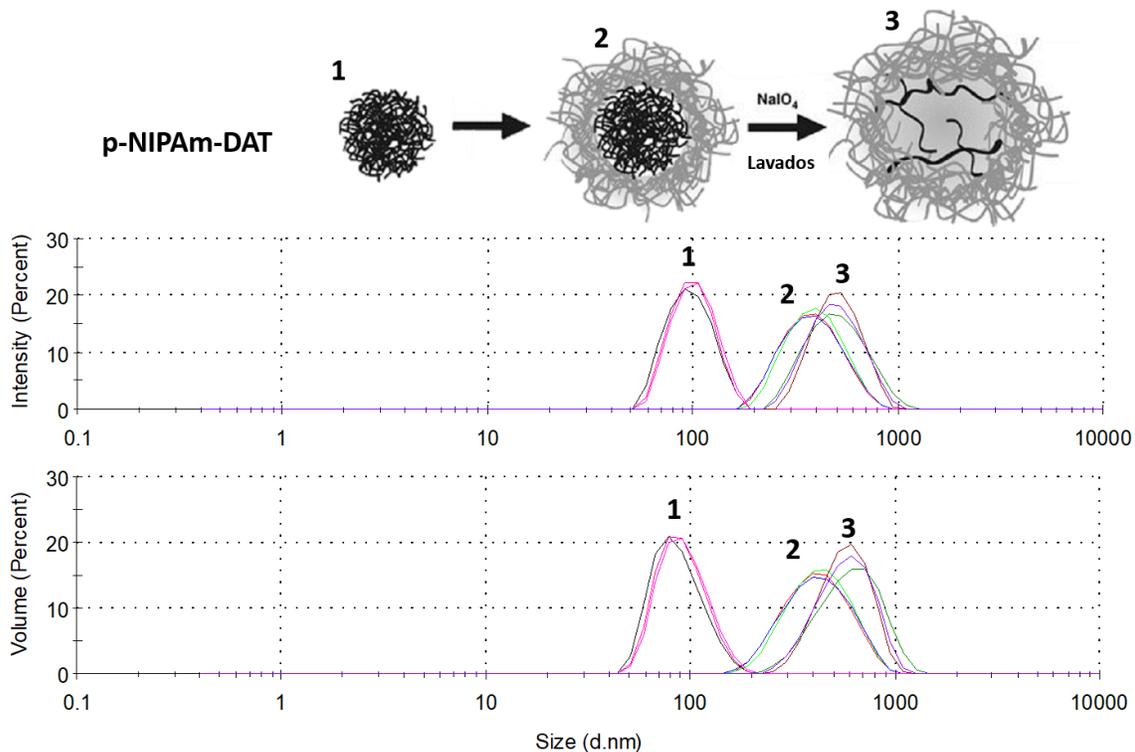


Figura 6.32 - Arriba: Esquema de la modificación de núcleos de p-NIPAm -DAT(10) (1) para obtener NGs tipo core-shell (2) y su posterior tratamiento con periodato de sodio (3). Abajo: curvas de distribución de Dh de los NGs, determinadas por DLS.

Las partículas resultantes se midieron mediante TEM. Luego de la *seeded polymerization*, se observó claramente la formación de una estructura tipo *core-shell* (Figura 6.33b). El diámetro de estas estructuras fue de aproximadamente 400 nm (a partir de las regiones coloreadas más intensamente, sin considerar la región difusa) con núcleos de aproximadamente 250 nm. Estos tamaños, comparados con el tamaño inicial de los NGs de p-NIPAm-DAT (Figura 6.33a), sugieren que se obtuvieron partículas *multi-core*, tal y como se concluyó mediante DLS. El posterior tratamiento de estas partículas con periodato de sodio, llevó a un cambio morfológico evidente (Figura 6.33c y c'). Las estructuras obtenidas muestran un diámetro de aproximadamente 200 nm, resultado que contrasta con lo observado por DLS. Esta diferencia podría deberse a la presencia de una población de partículas de diámetros más grandes que generasen una mayor dispersión de la luz en DLS (aumentando la media de los tamaños), como frecuentemente ocurre, y no se percibiesen

en TEM. Además, la determinación de los diámetros mediante una u otra técnica difieren, no sólo en la naturaleza de la medida, sino también en el estado físico de la muestra. Entonces, es posible que el diámetro hidrodinámico de las partículas, en solución, sea diferente del diámetro determinado mediante microscopía. Sin embargo, las estructuras observadas por TEM sugieren la presencia de un núcleo más hueco, donde la tinción se ve muy oscura, y una zona externa formada por estructuras globulares.

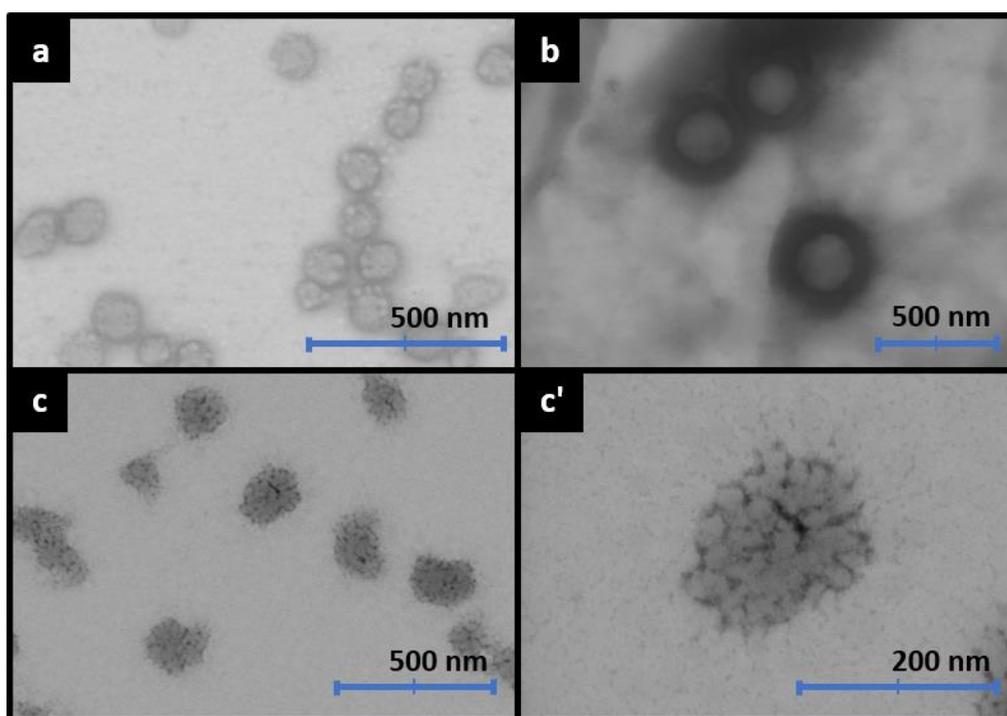


Figura 6.33 - Micrografía TEM de los nanogeles de p-NIPAm-DAT (a), su posterior modificación para generar NGs core-shell (b) y el consiguiente tratamiento con periodato de sodio para degradar el núcleo (c y c')

La confirmación de la obtención de nanogeles huecos o con una estructura más laxa en el interior debería realizarse mediante otras técnicas de caracterización como microscopía de fuerza atómica (AFM) o mediante técnicas de difracción de bajo ángulo (SAS).

6.2.2.5 - CONCLUSIONES PARCIALES Y PERSPECTIVAS

Se sintetizaron nuevos nanogeles basados en el polímero termorresponsivo p-NIPAm y entrecruzados con el agente (+)-N,N'-dialiltartrdiamida (DAT) en presencia o ausencia de N,N-metilenbisacrilamida (BIS). Los nanogeles de p-NIPAm-DAT se degradaron completamente frente a periodato de sodio, debido al clivaje de los dioles vecinal presentes en el entrecruzante DAT.

Las nanopartículas se utilizaron como semillas para la elaboración de nanogeles *core-shell* mediante *seeded polymerization*, generando una capa de p-NIPAm con poliglicerol dendrítico acrilado. Estas partículas fueron tratadas frente a periodato de sodio para escindir los entrecruzamientos debidos a DAT, generando cambios en los tamaños y morfología. Los estudios realizados por DLS y TEM sugieren que, cuando el núcleo de las partículas *core-shell* fue p-NIPAm-BIS-DAT, se generaron cambios en el núcleo luego del tratamiento con periodato. Sin embargo, la presencia de BIS, no reactivo frente a periodato, mantendría unida la estructura del núcleo impidiendo su clivaje total. Cuando las partículas *core-shell* con núcleos de p-NIPAm-DAT fueron tratadas con periodato, las determinaciones indicaron la posible generación de nanopartículas huecas. Sin embargo, es necesario recurrir a otras técnicas de caracterización para corroborar la estructura de los nanogeles obtenidos.

Los estudios realizados sugieren que los NGs obtenidos de p-NIPAm-DAT podrían ser utilizados en la generación de nanogeles huecos para ser utilizados en diversas aplicaciones, principalmente en la liberación controlada de fármacos.

6.2.3 - SÍNTESIS DE NANOGELES DE p-NIPAm-co-NIPMAm-BIS-DAT Y CONTROL POST-SÍNTESIS DEL GRADO DE ENTRECruzAMIENTO. EFECTO DEL CAMBIO ESTRUCTURAL EN EL CARGADO DE BIOACTIVOS DE ALTO PESO MOLECULAR.

6.2.3.1 - CONSIDERACIONES GENERALES

Las funciones altamente específicas que deben cumplir los nanogeles, operando en entornos complejos, requieren de avances en el control de su estructura y funcionalidad en la escala nanométrica. Es por esto que se encuentran en desarrollo estrategias de síntesis que permiten obtener nanogeles con estructuras de características particulares como: nanogeles huecos, nanogeles core-shell, huecos con doble capa, entre otros, como se mencionó en la Sección 6.2.2.1 [2], [46], [47]. Las propiedades distintivas de estos nanogeles podrían ser útiles en la optimización de nanoplataformas para aplicaciones en distintas áreas, principalmente en nanomedicina.

6.2.3.2 - OBJETIVOS

Analizar los cambios físicoquímicos generados por el clivaje oxidativo del agente entrecruzante DAT en NG de p-NIPAm-co-NIPMAm-BIS-DAT.

Evaluar el efecto que tiene el cambio en el grado de entrecruzamientos (y por ende, en la estructura y morfología) en el cargado de albúmina sérica bovina (BSA), un bioactivo de alto peso molecular, utilizada como modelo.

6.2.3.3 - MATERIALES Y MÉTODOS

SÍNTESIS DE NANOGELES

Los nanogeles utilizados para estos estudios, fueron descritos en la sección “*Síntesis de Nanogeles termosensibles basados en NIPAm y NIPMAm*”, donde también se indicó la metodología de síntesis y modificación post-síntesis (sección 6.1.3). Se utilizaron los NGs de p-NIPAm-co-NIPMAm-BIS-DAT con diferentes porcentajes de DAT y sintetizados por descomposición térmica de APS, antes y después de su tratamiento con periodato.

DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ (DLS)

Las medidas se realizaron en las condiciones descritas en la 6.1.3, a 20 °C.

CARGADO DE ALBÚMINA

Se ensayó el encapsulado de albúmina de suero bovino conjugada con fluoresceína (BSA-FITC, Sigma-Aldrich) como droga modelo en los NGs. Para esto, los NGs liofilizados (1 mg) fueron hinchados en soluciones de BSA-FITC (pH 7,4; PBS) de diferente concentración, durante 24 h a temperaturas entre 6-8 °C. Las soluciones se purificaron utilizando el dispositivo de centrifugado con membrana Vivaspín 300 kDa (10 min a 6000 r.p.m.; Sartorius AG, Göttingen, Alemania). La concentración de BSA-FITC encapsulada se determinó midiendo la absorbancia a 492 nm, a partir de una curva de calibración realizada con distintas concentraciones conocidas de BSA-FITC. Todas las medidas se realizaron por cuadruplicado.

Para evaluar la cantidad de albúmina incorporada en los sistemas, se analizaron dos parámetros. El primer parámetro se denomina eficiencia de encapsulación (LE%, por sus siglas en inglés de *Loading Efficiency*) y hace referencia a la cantidad de fármaco incorporado en función de la cantidad total a la que se expuso durante el incubado. Se calcula mediante la Ecuación 6.2:

$$LC\% = \frac{(n_{totalBSA} - n_{libreBSA})}{n_{totalBSA}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 6.2})$$

Donde $n_{totalBSA}$ es el número de moles de BSA-FITC presentes en la solución inicial de incubado y $n_{libreBSA}$ es el número de moles remanentes en la solución luego del centrifugado, es decir, la cantidad no encapsulada por el nanogel.

Por otro lado, se evaluó el contenido final del fármaco en el nanodispositivo (BSA-NG), conocido como Capacidad de Cargado (LC, por sus siglas en inglés de *Loading Capacity*). El

mismo refleja la cantidad de fármaco incorporado en el nanodispositivo, es decir, la masa del fármaco respecto de la masa total del nanodispositivo (BSA-NG) y se calcula mediante la Ecuación 6.3:

$$\%LC = \frac{m_{BSA \text{ incorporada}}}{m_{total \text{ del nanodispositivo}}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 6.3})$$

Donde $m_{BSA \text{ incorporada}}$ es la masa de BSA-FITC incorporada en el nanodispositivo (BSA-NG) y $m_{total \text{ del nanodispositivo}}$ es la masa total del nanodispositivo.

MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)

Las micrografías se tomaron en un Microscopio de Transmisión Electrónica TECNAI G2 20 TWIN operado a 200 kV y equipado con un filamento de LaB₆, sistema de microanálisis EDAX EDS y HAADF-STEM.

6.2.3.4 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

SÍNTESIS

Se sintetizaron NGs de p-NIPAm-co-NIPMAm-BIS-DAT con un porcentaje fijo del entrecruzante BIS (1,5 %mol) y variable de DAT (8, 10, 12, 15 %mol), en las condiciones descritas en la sección 6.1.3 de este capítulo. Los productos de síntesis se nombraron p-NIPAm-co-NIPMAm-BIS-DATX, siendo “X” el porcentaje de DAT utilizado en cada una de las síntesis.

DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS)

Los nanogeles sintetizados se caracterizaron mediante DLS. Se observó la disminución del diámetro hidrodinámico (Dh) de los NGs con el aumento del porcentaje de DAT, indicando

la posible mayor incorporación del entrecruzante en los NGs. Los índices de polidispersidad fueron muy bajos en todos los casos, tal y como se había reportado anteriormente (Figura 6.34, Izquierda).

Posteriormente, los NGs fueron modificados con soluciones acuosas de periodato de sodio (en exceso) para promover la ruptura de los entrecruzamientos debidos a DAT y modificar la estructura y funcionalidad de los NGs. El tratamiento con periodato condujo a un aumento en el Dh de los NGs (Figura 6.34, Derecha), indicando la efectiva ruptura del entrecruzante DAT. Los productos de modificación post-síntesis se nombraron p-NIPAm-co-NIPMAm-BIS-ALDX, siendo “X” el porcentaje de DAT utilizado en cada una de las síntesis, que promovió la formación de GF aldehídos (ALD).

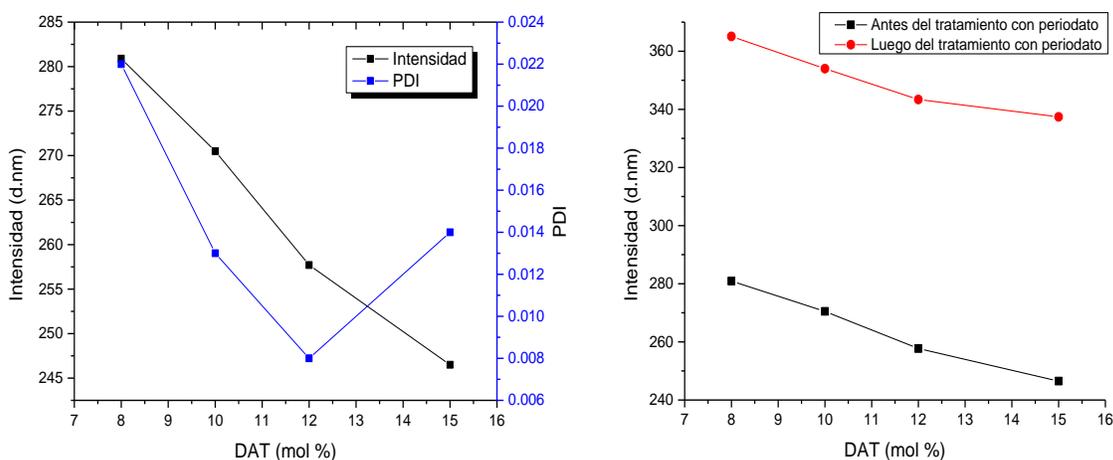


Figura 6.34 - Medidas de DLS de los NGs sintetizados. Izquierda: variación del tamaño medio del diámetro hidrodinámico (Dh) (negro) y el índice de polidispersidad (PDI, azul) en función de la concentración de DAT utilizada durante la síntesis. Derecha: variación del Dh, respecto del porcentaje de DAT para NGs antes y después de ser tratados con periodato de sodio.

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTÓN (^1H -RMN)

El producto de clivaje p-NIPAm-co-NIPMAm-BIS-ALD10 se analizó mediante ^1H -RMN. Se observaron las señales características de p-NIPAm, descritas anteriormente en el Capítulo 5, sección 5.4. Las señales de p-NIPAm y p-NIPMAm son semejantes y se superponen, debido a la similitud en la estructura química entre las dos moléculas. El GF metilo de la

cadena principal de p-NIPMAm es una diferencia característica con p-NIPAm. La señal relativa a los protones de dicho GF metilo se observa como un hombro con un corrimiento de 0,93 ppm (Figura 6.35). Además, se observó la presencia de una señal a 5,3 ppm, atribuida a la formación de GF α -oxo-aldehídos por clivaje oxidativo del entrecruzante DAT.

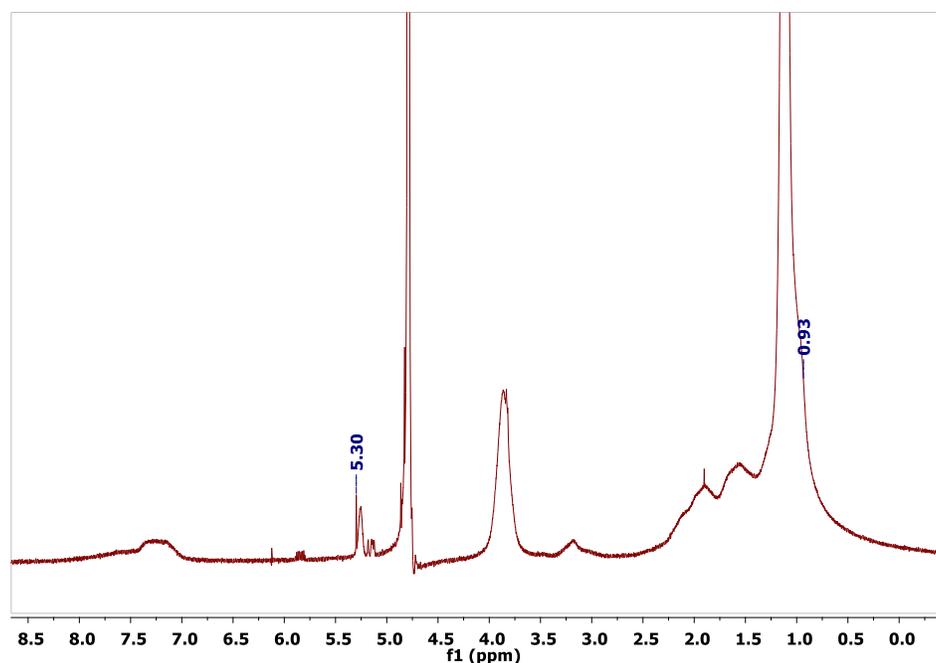


Figura 6.35 - Espectro de RMN de *p*-NIPAm-co-NIPMAm-BIS-ALD(10).

DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA DE TRANSICIÓN DE FASE (T_{tf}) MEDIANTE TURBIDIMETRÍA

La T_{tf} de los nanogeles, antes y después de su tratamiento con periodato, se midió mediante turbidimetría. El cambio en el porcentaje de transmitancia de luz UV-Vis con la temperatura, revela la transición térmica de los NGs. Antes del tratamiento con periodato de sodio (Figura 6.36, Izquierda), los nanogeles mostraron T_{tf} de alrededor de 40 °C. Este valor indica la incorporación de ambos monómeros, NIPAm y NIPMAm en los NGs, lo cual genera una temperatura de transición intermedia respecto de la de los homopolímeros (aprox 32 °C para p-NIPAm y 43 °C para p-NIPMAm). Los distintos porcentajes de DAT no incidieron en la T_{tf} de estos NGs.

Luego de su tratamiento con periodato de sodio (Figura 6.36, derecha), se observó aumento de la Ttf de los NGs, alcanzando valores de 42 °C. La generación de grupos α -oxo-aldeídos por clivaje de DAT implica la formación de grupos polares en la red, los cuales aumentan la Ttf de polímeros de p-NIPAm y p-NIPMAm, como se indicó en la introducción general. No se observaron diferencias entre las Ttf de los NGs con distinta composición de DAT inicial. Esto podría indicar que la diferencia en la incorporación del entrecruzante en las distintas composiciones no es demasiado significativa.

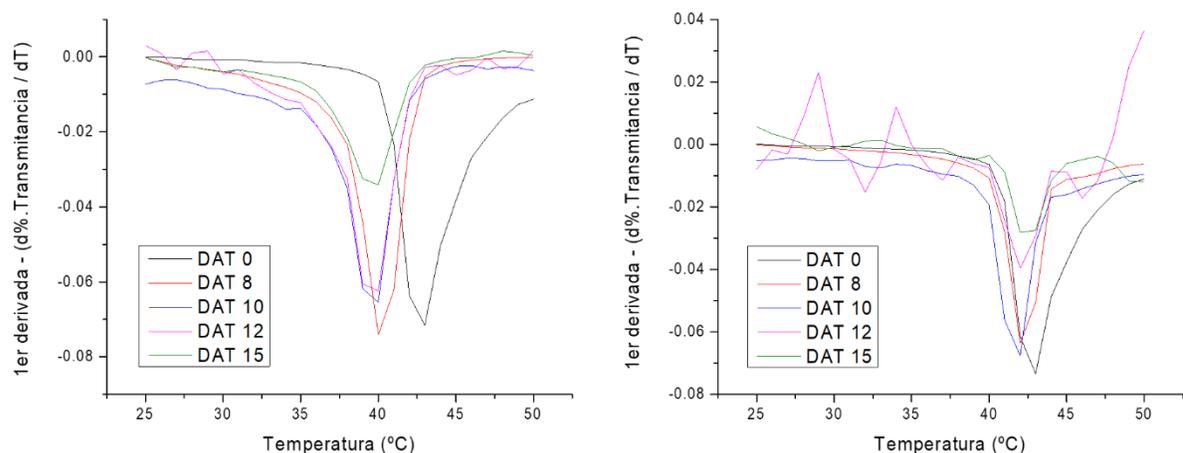


Figura 6.36 - 1er derivada obtenida a partir del cambio en el porcentaje de transmitancia (%T) de los NGs con la temperatura del medio. El mínimo observado es considerado la Ttf del NG. Izquierda: NGs antes de su modificación post-síntesis. Derecha: NGs modificados con periodato de sodio.

MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)

Los productos de síntesis se analizaron mediante TEM. Para ello, los NGs p-NIPAm-co-NIPMAm-BIS-DAT10 y su producto de modificación con periodato (p-NIPAm-co-NIPMAm-BIS-ALD10), se estudiaron utilizando acetato de uranilo como agente de contraste (Figura 6.37).

Las micrografías fueron realizadas en un Microscopio de Transmisión Electrónica distinto al usado en la sección 6.1.4 de este trabajo de tesis, y utilizando un sustrato (soporte) de distintas características. Esto generó que se observen algunas diferencias respecto a las medidas reportadas anteriormente.

Antes de la modificación post-síntesis, los NGs mostraron morfologías esféricas muy bien definidas y baja polidispersidad (Figura 6.37, a, a' y a''). Estas observaciones concuerdan con los valores medidos por DLS y los reportados en anteriores medidas de TEM. En este caso, la medida de TEM se realizó colocando a las partículas en un soporte más hidrofóbico que el utilizado anteriormente. Debido a esto y a las características de este microscopio, no se distingue la diferencia de contraste que permitió observar con claridad la estructura *core-shell* que se reportó previamente. Sin embargo, estas micrografías no descartan la posibilidad de que la superficie de estos NGs se encuentre cubierta de pequeñas esferas de otra composición. El posterior tratamiento con periodato generó el clivaje químico de los entrecruzamientos debidos a DAT y se observaron dos tipos de estructura en el producto de reacción: esferas de mayor tamaño (aprox. 250 nm) (Figura 6.37b, partícula que se sitúa a la izquierda); y conjuntos de esferas de menor tamaño (aprox. 100 nm) (Figura 6.37b, cúmulo de esferas situadas a la derecha). El cambio morfológico en los NGs luego de la modificación post-síntesis es evidente y muestra una parcial degradación química que lleva a la formación de una estructura menos homogénea y presuntamente más porosa. En las medidas realizadas en este equipo de microscopía no se observa con claridad la formación de "cabellos" de polímeros en los NGs modificados, como se había observado anteriormente. Sin embargo, se puede apreciar un aumento en el radio de la zona con mayor contraste (oscura) alrededor de las partículas, luego de la modificación, que podría deberse a la presencia de cadenas poliméricas en forma de "cabellos".

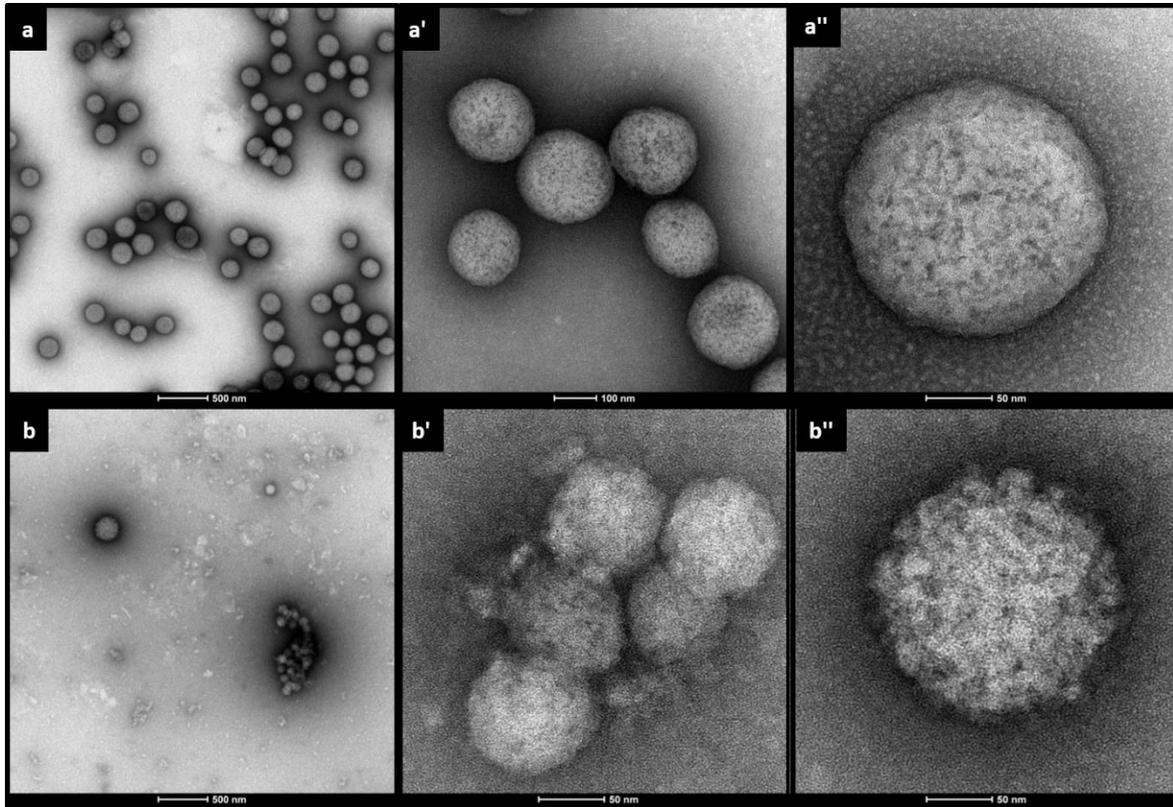


Figura 6.37 - Micrografías de TEM de los nanogeles *p*-NIPAm-co-NIPMAm-BIS-DAT10 antes (arriba, a, a' y a'') y después (abajo, b, b' y b'') de su tratamiento con periodato de sodio.

ENSAYO DE CARGADO DE ALBÚMINA SÉRICA BOVINA CON UN MARCADOR FLUORESCENTE (BSA-FITC)

Los NGs logrados mediante síntesis y modificación post-síntesis, son potenciales plataformas para la liberación controlada de fármacos. Su naturaleza como red polimérica capaz de absorber grandes cantidades de agua, puede ser aprovechada para la incorporación de una solución con un fármaco y su posterior liberación controlada. Los NGs obtenidos son termosensibles, por lo que su respuesta a la temperatura podría ser utilizada para la liberación “a demanda” del fármaco. Además, la modificación post-síntesis de los NGs llevó a la formación de GF α -oxo-aldehído de alto valor sintético, que podrían ser utilizados para la derivatización química de las nanoplataformas. Por último, la morfología porosa y tipo “*hairy nanogel*” alcanzada, podría tener implicancias en la interacción de estos nanodispositivos con tejidos biológicos.

Por todo esto, se evaluó el cargado de los NGs con la proteína albúmina sérica bovina marcada fluorescentemente (BSA-FITC), como droga modelo. La proteína fue cargada en NGs de p-NIPAm-co-NIPMAm-BIS-DAT8 y p-NIPAm-co-NIPMAm-BIS-DAT15, para evaluar diferencias respecto al porcentaje de DAT utilizado en la síntesis, y sobre los mismos NGs luego de la modificación post-síntesis (Figura 6.38).

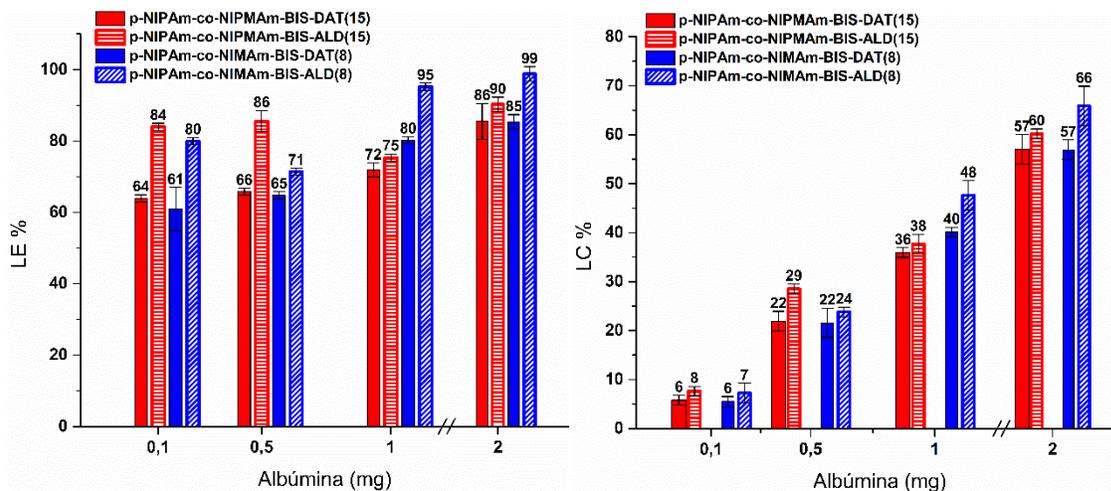


Figura 6.38 - Eficiencia de Encapsulado (%LE) y capacidad de carga (%LC) de los nanogeles antes y después de su modificación post-síntesis.

Los valores de Eficiencia de Encapsulado (%LE, por sus siglas en inglés: *Loading Efficiency*) permiten comparar la cantidad de proteína encapsulada o fisorbida en los NGs, respecto de la cantidad de proteína colocada inicialmente en la incubación. En la Figura 6.38 se observa la variación del %LE respecto de la cantidad de albúmina utilizada durante el incubado. A concentraciones bajas de proteína (0,1 mg/mL) se observa una marcada diferencia en la eficiencia de encapsulación entre los nanogeles antes de tratar con periodato, respecto de los modificados. Evidentemente, la modificación post-síntesis generó un aumento considerable del %LE de los NGs. Esto, podría deberse al cambio estructural causado por el periodato, que produce que estos NGs sean más porosos, permitiendo mayor penetración de la proteína. Además, la generación de GF polares aldehído, podrían tener un efecto en la interacción con la proteína. Por otro lado, no se observó un cambio significativo en el %LE entre los NGs con diferentes porcentajes de DAT.

Como se indicó en el comienzo de este capítulo, cuando se compararon las síntesis con distintos porcentajes de DAT, no se observó gran diferencia en la incorporación del entrecruzante ni en las características de los NGs, por lo que es coherente que presenten un comportamiento similar en la encapsulación de la proteína. A mayores porcentajes de albúmina, cuando la relación en peso entre albúmina y los nanocarriers fue mayor a 1, se observó un aumento general de la eficiencia de encapsulación. La diferencia en la eficiencia entre NGs tratados con periodato y los no tratados se hace menor y todos muestran eficiencias cercanas al 100%.

Por otro lado, la capacidad de carga (LC) indica el porcentaje de la masa del conjugado (proteína-nanogel) que corresponde a la biomolécula. En la Figura 6.38 se muestra la variación de LC respecto de la cantidad de albúmina colocada inicialmente en la incubación. En concordancia con los altos porcentajes de LE, se puede observar que la mayor parte de la albúmina incubada fue exitosamente incorporada en el nanodispositivo (proteína-nanogel).

6.2.3.5 - CONCLUSIONES

Los nanogeles de p-NIPAm-co-NIPMAm-BIS-DAT sintetizados con diferentes porcentajes de DAT mostraron tamaños nanométricos con morfologías esféricas muy definidas y con muy baja polidispersidad.

La modificación post-síntesis de estos NGs, por clivaje del agente entrecruzante DAT frente a periodato de sodio, permitió modificar a los NGs generando marcados cambios en su estructura y funcionalidad, manteniendo la baja polidispersidad.

Los NGs termosensibles alcanzados mediante síntesis y modificación post-síntesis en condiciones suaves, son potenciales plataformas para la liberación controlada de fármacos. Su respuesta a la temperatura podría ser utilizada para la liberación “a demanda” del fármaco. Además, la modificación post-síntesis dotó a los NGs de GF α -oxo-aldehído de alto valor sintético, que podrían ser utilizados para la derivatización química de las nanoplataformas, inclusive mediante reacciones realizadas en condiciones fisiológicas, orientadas a la formación de enlaces hidrazona u oxima. La morfología porosa y tipo “*hairy nanogel*” alcanzada, podría tener impacto en el desempeño del nanodispositivo en aplicaciones como la liberación controlada de fármacos, diagnóstico por imágenes, sensores, entre otras.

Por último, se ensayó la eficiencia de encapsulado y capacidad de carga de los NGs, cargando a la proteína BSA-FITC como droga modelo. Se observó aumento en la eficiencia de carga de la proteína, luego de la modificación post-síntesis de los nanogeles con periodato de sodio. Esto, podría atribuirse a la estructura porosa y tipo “*hairy nanogel*” lograda en las partículas.

6.3 – REFERENCIAS

- [1] J. V. Alemán, A. V. Chadwick, J. He, M. Hess, K. Horie, R. G. Jones, P. Kratochvíl, I. Meisel, I. Mita, G. Moad, S. Penczek, and R. F. T. Stepto, "Definitions of terms relating to the structure and processing of sols, gels, networks, and inorganic-organic hybrid materials (IUPAC Recommendations 2007)," *Pure Appl. Chem.*, vol. 79, no. 10, pp. 1801–1829, 2007.
- [2] I. Neamtu, A. G. Rusu, A. Diaconu, L. E. Nita, and A. P. Chiriac, "Basic concepts and recent advances in nanogels as carriers for medical applications," *Drug Deliv.*, vol. 24, no. 1, pp. 539–557, 2017.
- [3] A. Pich and W. Richtering, *Polymer Nanogels and Microgels*, vol. 6. Elsevier B.V., 2012.
- [4] E. Dickinson, "Microgels - An alternative colloidal ingredient for stabilization of food emulsions," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 43, no. 2, pp. 178–188, 2015.
- [5] M. Barth, M. Wiese, W. Ogieglo, D. Go, A. J. C. Kuehne, and M. Wessling, "Monolayer microgel composite membranes with tunable permeability," *J. Memb. Sci.*, vol. 555, pp. 473–482, 2018.
- [6] S. K. Golombek, J. N. May, B. Theek, L. Appold, N. Drude, F. Kiessling, and T. Lammers, "Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 130, pp. 17–38, 2018.
- [7] M. M. Yallapu, M. Jaggi, and S. C. Chauhan, "Design and engineering of nanogels for cancer treatment," *Drug Discov. Today*, vol. 16, no. 9–10, pp. 457–463, 2011.
- [8] R. Pelton, "Temperature-sensitive aqueous microgels," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 85, no. 1, pp. 1–33, 2000.
- [9] M. Karbarz, M. Mackiewicz, K. Kaniewska, K. Marcisz, and Z. Stojek, "Recent developments in design and functionalization of micro- and nanostructural environmentally-sensitive hydrogels based on N-isopropylacrylamide," *Applied Materials Today*, vol. 9, pp. 516–532, 2017.
- [10] D. Duracher, A. Elaïssari, and C. Pichot, "Preparation of poly(N-isopropylmethacrylamide) latexes kinetic studies and characterization," *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 37, no. 12, pp. 1823–1837, 1999.
- [11] L. Starovoytova, J. Spěváček, and M. Ilavský, "¹H NMR study of temperature-induced phase transitions in D 2O solutions of poly(N-isopropylmethacrylamide)/poly(N-isopropylacrylamide) mixtures and random copolymers," *Polymer (Guildf.)*, vol. 46, no. 3, pp. 677–683, 2005.
- [12] G. Fundueanu, M. Constantin, S. Bucatariu, and P. Ascenzi, "Poly (N -isopropylacrylamide-co - N - Responsive Microgels as Self-Regulated Drug Delivery System," pp. 1–9, 2016.
- [13] I. Berndt, J. S. Pedersen, and W. Richtering, "Temperature-sensitive core-shell microgel particles with dense shell," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 45, no. 11, pp. 1737–1741, 2006.
- [14] J. C. Gauding, A. B. South, and L. A. Lyon, "Hydrolytically degradable shells on thermoresponsive microgels," *Colloid Polym. Sci.*, vol. 291, no. 1, pp. 99–107, 2013.

- [15] X. Hu, Z. Tong, and L. A. Lyon, "One-pot synthesis of microcapsules with nanoscale inclusions," *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 32, no. 18, pp. 1461–1466, 2011.
- [16] A. J. Schmid, J. Dubbert, A. A. Rudov, J. S. Pedersen, P. Lindner, M. Karg, I. I. Potemkin, and W. Richtering, "Multi-shell hollow nanogels with responsive shell permeability," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. December 2015, pp. 1–13, 2016.
- [17] D. Duracher, A. Elaïssari, and C. Pichot, "Effect of a cross-linking agent on the synthesis and colloidal properties of poly(N-isopropylmethacrylamide) microgel latexes," *Macromolecular Symposia*, vol. 150, pp. 305–311, 2000.
- [18] C. Obeso-Vera, J. M. Cornejo-Bravo, A. Serrano-Medina, and A. Licea-Claverie, "Effect of crosslinkers on size and temperature sensitivity of poly(N-isopropylacrylamide) microgels," *Polym. Bull.*, vol. 70, no. 2, pp. 653–664, 2013.
- [19] X. Zhang, S. Malhotra, M. Molina, and R. Haag, "Micro- and nanogels with labile crosslinks—from synthesis to biomedical applications," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 44, no. 7, pp. 1948–1973, 2015.
- [20] E. Mueller, R. J. Alsop, A. Scotti, M. Bleuel, M. C. Rheinstädter, W. Richtering, and T. Hoare, "Dynamically Cross-Linked Self-Assembled Thermo-responsive Microgels with Homogeneous Internal Structures," *Langmuir*, vol. 34, no. 4, pp. 1601–1612, 2018.
- [21] L. Jin, Q. Sun, Q. Xu, and Xu; Yongjian, "Adsorptive removal of anionic dyes from aqueous solutions using microgel based on nanocellulose and polyvinylamine," *Bioresour. Technol. J.*, vol. 197, pp. 348–355, 2015.
- [22] X. Jia, Y. Yeo, R. J. Clifton, T. Jiao, D. S. Kohane, J. B. Kobler, S. M. Zeitels, and R. Langer, "Hyaluronic acid-based microgels and microgel networks for vocal fold regeneration," *Biomacromolecules*, vol. 7, no. 12, pp. 3336–3344, 2006.
- [23] M. H. Smith, E. S. Herman, and L. A. Lyon, "Network deconstruction reveals network structure in responsive microgels," *J. Phys. Chem. B*, vol. 115, no. 14, pp. 3761–3764, 2011.
- [24] S. Nayak, D. Gan, M. J. Serpe, and L. A. Lyon, "Hollow thermo-responsive microgels," *Small*, vol. 1, no. 4, pp. 416–421, 2005.
- [25] X. Hu, Z. Tong, and L. A. Lyon, "Multicompartment Core-Shell Microgels.pdf," pp. 11470–11472, 2010.
- [26] J. Gao and B. J. Frisken, "Cross-Linker-Free N -Isopropylacrylamide Gel Nanospheres," *Langmuir*, vol. 19, no. 13, pp. 5212–5216, 2003.
- [27] X. Hu, Z. Tong, and L. A. Lyon, "Control of Poly(N -isopropylacrylamide) Microgel Network Structure by Precipitation Polymerization near the Lower Critical Solution Temperature," *Langmuir*, vol. 27, no. 7, pp. 4142–4148, 2011.
- [28] W. McPhee, K. C. Tam, and R. Pelton, "Poly(N-isopropylacrylamide) latices prepared with sodium dodecyl sulfate," *Journal of Colloid And Interface Science*, vol. 156, no. 1, pp. 24–30, 1993.
- [29] O. L. J. Virtanen, H. M. Ala-Mutka, and W. Richtering, "Can the Reaction Mechanism of Radical Solution Polymerization Explain the Microgel Final Particle Volume in Precipitation Polymerization of N-Isopropylacrylamide?," *Macromol. Chem. Phys.*, vol. 216, no. 13, pp.

1431–1440, 2015.

- [30] O. L. J. Virtanen, M. Brugnoli, M. Kather, A. Pich, and W. Richtering, "The next step in precipitation polymerization of: N -isopropylacrylamide: Particle number density control by monochain globule surface charge modulation," *Polym. Chem.*, vol. 7, no. 32, pp. 5123–5131, 2016.
- [31] C. Gelfi, A. Alloni, D. Besi, and P. Giorgio, "Investigation of the properties of acrylamide bifunctional monomers (cross-linkers) by capillary zone electrophoresis," vol. 608, pp. 343–348, 1992.
- [32] C. Gelfi and P. G. Righetti, "Polymerization kinetics of polyacrylamide gels I. Effect of different cross-linkers," *Electrophoresis*, vol. 2, no. 4, pp. 213–219, 1981.
- [33] Malvern Instruments, "Intensity - Volume - Number," 2017.
- [34] B. Wedel, Y. Hertle, O. Wrede, J. Bookhold, and T. Hellweg, "Smart homopolymer microgels: Influence of the monomer structure on the particle properties," *Polymers (Basel)*, vol. 8, no. 4, 2016.
- [35] D. Duracher, A. Elaïssari, and C. Pichot, "Characterization of cross-linked poly(N-isopropylmethacrylamide) microgel latexes," *Colloid Polym. Sci.*, vol. 277, no. 10, pp. 905–913, 1999.
- [36] L. C. Kröger, W. A. Kopp, and K. Leonhard, "Prediction of Chain Propagation Rate Constants of Polymerization Reactions in Aqueous NIPAM/BIS and VCL/BIS Systems," *J. Phys. Chem. B*, vol. 121, no. 13, pp. 2887–2895, 2017.
- [37] F. Seidi, R. Jenjob, and D. Crespy, "Designing Smart Polymer Conjugates for Controlled Release of Payloads," *Chem. Rev.*, vol. 118, no. 7, pp. 3965–4036, 2018.
- [38] S. J. Sonawane, R. S. Kalhapure, and T. Govender, "Hydrazone linkages in pH responsive drug delivery systems," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 99, pp. 45–65, 2017.
- [39] W. L. Ye, Y. P. Zhao, R. Na, F. Li, Q. B. Mei, M. G. Zhao, and S. Y. Zhou, "Actively Targeted Delivery of Doxorubicin to Bone Metastases by a pH-Sensitive Conjugation," *J. Pharm. Sci.*, vol. 104, no. 7, pp. 2293–2303, 2015.
- [40] A. Scotti, M. Brugnoli, A. A. Rudov, J. E. Houston, I. I. Potemkin, and W. Richtering, "Hollow microgels squeezed in overcrowded environments," *J. Chem. Phys.*, vol. 148, no. 17, 2018.
- [41] C. Siltanen, M. Diakataou, J. Lowen, A. Haque, G. Stybayeva, and A. Revzin, "One step fabrication of hydrogel microcapsules with hollow core for assembly and cultivation of hepatocyte spheroids," *Acta Biomater.*, vol. 71, p. 552, 2018.
- [42] J. Dubbert, T. Honold, J. S. Pedersen, A. Radulescu, M. Drechsler, M. Karg, and W. Richtering, "How hollow are thermoresponsive hollow nanogels?," *Macromolecules*, vol. 47, no. 24, pp. 8700–8708, 2014.
- [43] J. C. Cuggino, C. I. Alvarez I., M. C. Strumia, P. Welker, K. Licha, D. Steinhilber, R.-C. Mutihac, and M. Calderón, "Thermosensitive nanogels based on dendritic polyglycerol and N-isopropylacrylamide for biomedical applications," *Soft Matter*, vol. 7, no. 23, p. 11259, 2011.

- [44] M. Witting, M. Molina, K. Obst, R. Plank, K. M. Eckl, H. C. Hennies, M. Calderón, W. Frieß, and S. Hedtrich, "Thermosensitive dendritic polyglycerol-based nanogels for cutaneous delivery of biomacromolecules," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 11, no. 5, pp. 1179–1187, 2015.
- [45] R. Haag and M. Radowski, "Nanotransport system having a dendritic architecture," EP1796649A2, 2004.
- [46] N. Sanson and J. Rieger, "Synthesis of nanogels/microgels by conventional and controlled radical crosslinking copolymerization," *Polym. Chem.*, vol. 1, no. 7, pp. 965–977, 2010.
- [47] S. Lanzalaco and E. Armelin, "Poly(N-isopropylacrylamide) and Copolymers: A Review on Recent Progresses in Biomedical Applications," *Gels*, vol. 3, no. 4, p. 36, 2017.

CAPÍTULO 7

CONSIDERACIONES FINALES

7.1 - CONCLUSIONES GENERALES

Durante el transcurso de esta tesis se estudiaron y desarrollaron estrategias de síntesis radicalaria de hidrogeles que permitieron su modificación post-síntesis para el control de sus propiedades mecánicas, propiedades de hinchamiento, funcionalidad química y morfología. Estas estrategias fueron aplicadas tanto en la macroescala como en la nanoescala permitiendo superar, en etapas post-síntesis, dificultades y limitaciones impuestas por las metodologías de síntesis radicalaria de hidrogeles y nanogeles. En particular, se estudió la utilización del agente entrecruzante (+)-*N,N'*-dialiltartradiamida (DAT) en combinación o ausencia de *N,N'*-metilenbis(acrilamida) (BIS), para la síntesis radicalaria de hidrogeles (HG) y nanogeles (NG) basados en diferentes monómeros vinílicos derivados de la acrilamida o la metacrilamida. Se logró la incorporación de DAT en hidrogeles, tanto en la macroescala como en la nanoescala. La presencia de un grupo funcional (GF) diol vecinal en DAT permitió la modificación post-síntesis de los HG y NG, por tratamiento con soluciones de periodato de sodio. Estas reacciones se llevaron a cabo en solución acuosa, a tiempos cortos y temperatura ambiente. La modificación post-síntesis generó un cambio en el grado de entrecruzamiento de HG y NG, por clivaje de los entrecruzamientos debidos a DAT, modificando sus propiedades de hinchamiento, propiedades mecánicas, morfología y funcionalidad química. Además, la oxidación de los dioles vecinales permitió obtener GF α -oxo-aldehído en los materiales sintetizados. En general, los GF aldehído son difícilmente obtenidos en hidrogeles sintetizados por polimerización radicalaria, y se requiere de reacciones de protección y desprotección de este GF. Por lo tanto, la estrategia desarrollada resulta en un avance que permite, mediante un protocolo sencillo y en condiciones suaves, la obtención de GF aldehído. Además, este GF es de alto valor sintético por su participación en reacciones bio(ortogonales), principalmente frente a aminas y α -nucleófilos como hidrazidas y alcoxilaminas. Particularmente, los α -oxo-aldehídos son frecuentemente obtenidos en péptidos y proteínas para su utilización en bioconjugación, pero tienen muy escasos antecedentes en materiales sintéticos, y no se encuentran reportes de su obtención en hidrogeles blandos. Durante

este trabajo, además, se ensayó la reactividad de este GF con aminas e hidrazidas, en diferentes condiciones de reacción.

En primera instancia, se sintetizaron hidrogeles basados en el monómero acrilamida (AM) y entrecruzados con DAT y/o BIS. Luego de caracterizar la incorporación del agente entrecruzante en los hidrogeles sintetizados, se evaluó su efecto en las propiedades de hinchamiento y mecánicas del material. Posteriormente, se demostró que, en hidrogeles entrecruzados con BIS y DAT, el tratamiento con periodato de sodio generó la ruptura de los entrecruzamientos debidos a DAT sin alterar aquellos debidos a BIS. Esta modificación llevó a cambios en las propiedades mecánicas de los hidrogeles, proporcionales a la cantidad de DAT utilizado en la síntesis. Un efecto similar se observó en el cambio en las propiedades de hinchamiento post-modificación. Además, se corroboró que la modificación puede realizarse con control espacial y que permite la obtención de hidrogeles con distintos grados de entrecruzamiento en distintas regiones de su estructura, mediante el control en la concentración del agente oxidante (NaIO_4). Por otro lado, se sintetizaron geles de AM entrecruzados solamente con DAT, y se demostró que su tratamiento con soluciones de periodato condujo al clivaje total de los entrecruzamientos del gel, obteniéndose un producto líquido. Este producto se caracterizó como p-AM funcionalizada con GF α -oxo-aldehído. Luego, se comprobó la reactividad de los nuevos GF frente a dihidrazida de ácido adípico (AADH), formando nuevos hidrogeles.

Por otro lado, se sintetizaron geles de AM co-polimerizados con el monómero 2-aminoetil metacrilato (AEMA, poseedor de GF amino) y los entrecruzantes BIS y DAT. Se evaluaron las propiedades fisicoquímicas de los geles, antes y después de su tratamiento con periodato de sodio. En este caso, la presencia de GF amino, junto a los GF α -oxo-aldehído obtenidos por el clivaje de DAT, llevó a la formación de enlaces covalentes imina, según se comprobó mediante técnicas espectroscópicas. Las nuevas interacciones entre cadenas poliméricas mostraron un comportamiento pH dependiente, típico de la formación de enlaces covalentes reversibles de tipo imina.

Además, se estudió la síntesis de hidrogeles termosensibles de *N*-isopropilacrilamida (NIPAm) entrecruzados con DAT. La ruptura oxidativa del entrecruzante llevó a la formación de un líquido viscoso soluble, correspondiente a p-NIPAm funcionalizado con GF α -oxoaldehído que mostró tamaños regulares y nanométricos en solución. Se comprobó la reactividad de los GF aldehído del polímero termosensible, frente a AADH a distintos valores de pH y temperaturas de reacción. Esto, llevó a la formación de enlaces hidrazona pH dependientes, que se vieron favorecidos en condiciones de catálisis ácida y por el calentamiento del polímero termosensible, por encima de su LCST, a la temperatura corporal de 37 °C. Por lo tanto, se obtuvieron polímeros inteligentes sensibles a la temperatura y al pH, que podrían ser utilizados para el desarrollo de diversas aplicaciones como: geles inyectables y liberación controlada de fármacos, inmovilización de biomoléculas, purificación de proteínas, entre otras.

La metodología desarrollada en escala macrométrica, se ensayó también en escala nanométrica, para la síntesis y modificación post-síntesis de nanogeles inteligentes termosensibles.

Para esto, se sintetizaron NGs de p-NIPAm y poli(*N*-isopropilmetacrilamida) (NIPMAM) entrecruzados con BIS y diferentes porcentajes de DAT. Se evaluó la incorporación de diferentes cantidades de DAT frente a dos metodologías de iniciación de la reacción: la descomposición térmica de APS y la utilización de la dupla rédox APS/TEMED. Se analizaron los tamaños y morfologías de los NGs sintetizados, antes y después de ser modificados con periodato de sodio. Esta modificación post-síntesis permitió investigar sobre la reactividad de los monómeros y entrecruzantes, y la manera en que son incorporados durante la reacción de termoprecipitación. En general, la utilización de la dupla APS/TEMED condujo a la incorporación de DAT en las etapas más tempranas del crecimiento de los nanogeles, generando importantes modificaciones estructurales luego del tratamiento con periodato. Por otro lado, la iniciación a través de la descomposición térmica de APS condujo a menor incorporación de DAT en los NGs, lo cual se reflejó en menor, pero no despreciable, variación de los tamaños y morfología de partículas luego del tratamiento con periodato.

Los NGs de p-NIPAm-BIS-DAT obtenidos por termoprecipitación, iniciada por la dupla APS/TEMED, fueron tratados con periodato de sodio para obtener NGs termosensibles funcionalizados con GF α -oxo-aldehído. Estos GF reactivos se utilizaron para incorporar funciones hidrazida en los nanogeles, que permitieron enlazar al fármaco antineoplásico Doxorubicina.

Además, los NGs sintetizados por copolimerización de NIPAm y NIPMAm, en una proporción 50:50, junto a los entrecruzantes DAT y BIS, mostraron morfologías esféricas muy definidas y una estructura tipo *core-shell*, atribuida a la diferencia de reactividad entre los precursores. La modificación post-síntesis por oxidación de DAT generó importantes cambios morfológicos y se obtuvieron partículas con “cabellos” poliméricos tipo “*hairy nanogel*”. Posteriormente, se realizaron ensayos de cargado de albúmina sérica bovina como droga modelo para el uso de estos NGs en la liberación controlada de bioactivos. Se observó un aumento de la eficiencia de cargado de la proteína luego de la modificación post-síntesis, atribuido al cambio en la morfología y porosidad del material, obteniendo resultados promisorios para la generación de nanodispositivos para liberación controlada de fármacos.

Por último, y como otra prueba de concepto, se ensayó la síntesis de hidrogeles huecos utilizando geles de p-NIPAm-DAT como núcleo de sacrificio. Esto permitió generar una capa (*shell*) de p-NIPAm-dPG generando estructuras tipo *core-shell*. El posterior tratamiento con periodato condujo a la degradación del núcleo y a la formación de estructuras que aparentan tener un centro hueco. Esta síntesis debería seguir siendo estudiada y optimizada para conseguir un mayor control del tamaño de partículas, estudiar la nanoestructura mediante otras técnicas y ensayar posibles aplicaciones.

La metodología de síntesis y modificación post-síntesis de hidrogeles, desarrollada durante este trabajo de tesis, demostró ser una herramienta útil para el control del grado de entrecruzamiento, propiedades mecánicas, propiedades de hinchamiento y morfología de los geles. Esta metodología fue exitosamente aplicada tanto en macrogeles como en nanogeles. Esto permitió que los geles sintetizados por síntesis radicalaria sean modificados

para acceder a estructuras con diferente grado de entrecruzamiento en diferentes regiones, permitiendo el control en la macro- y nanoestructura de los geles. Además, la modificación post-síntesis generó la formación de GF α -oxo-aldehído de alto valor sintético, que resultan químicamente equivalentes a las glioxamidas obtenidas por oxidación de serina y treonina en modificación de péptidos y proteínas. Estos, podrían ser utilizados para la derivatización química de los macro- o nanogeles sintetizados, para su modificación con biomoléculas o para la formación de nuevos puntos de entrecruzamiento a partir de enlaces formados en condiciones fisiológicas.

7.2 – PROYECCIONES

Algunos de los proyectos desarrollados en los capítulos anteriores podrían ser profundizados con el agregado de nuevos ensayos. En esta sección se proponen algunos de ellos.

En el Capítulo 4 se desarrollaron hidrogeles conteniendo entrecruzamientos covalentes del tipo imina. Dada la reactividad particular de los grupos funcionales (GF) α -oxo-aldehído, podría resultar de utilidad un estudio más profundo acerca de la reversibilidad de los enlaces imina y su dependencia con el pH. Luego de optimizarse el control sobre el equilibrio de entrecruzamientos reversibles, podría optimizarse el número de enlaces y explorar propiedades como: el comportamiento sol-gel del material; la memoria de forma; el autocurado; el efecto de los entrecruzamientos dinámicos en la reversibilidad del material ante ciclos de hinchamiento/deshinchamiento; entre otros.

En el Capítulo 5 se obtuvieron polímeros termosensibles de p-NIPAm funcionalizados con GF α -oxo-aldehído. Estos podrían ser de utilidad en diversas aplicaciones. Por ejemplo, debido a su capacidad de gelificar al ser sometidos a una temperatura de 37 °C, estos polímeros podrían ser utilizados para la preparación de plataformas para la ingeniería de tejidos, hidrogeles inyectables, o parches para la liberación controlada de fármacos. La formación de hemiacetales a partir de los GF α -oxo-aldehído o la formación de enlaces hidrazona podrían utilizarse como estrategias para el control de la cinética de gelificación, propiedades mecánicas y de hinchamiento. Además, la presencia de GF α -oxo-aldehído podría aprovecharse para la unión eficiente de biomoléculas que permitan mejorar las propiedades del dispositivo biomédico (ej. biocompatibilidad, liberación de biomoléculas, entre otras). Por supuesto, el desarrollo de materiales con aplicación en el área biomédica requerirá de ensayos de toxicidad de los materiales y de otros ensayos acordes a la aplicación propuesta.

En el Capítulo 6 se desarrollaron estrategias implementadas para la síntesis y modificación de nanogeles (NGs) termosensibles y se exploraron posibles aplicaciones. Con respecto al

control de la morfología y estructura de NGs, podrían estudiarse las reactividades relativas de los diferentes monómeros y entrecruzantes utilizados. De esta, se podría adquirir mayor control en la incorporación diferenciada de los reactivos en los nanogeles y lograr obtener estructuras prediseñadas. En el caso de los NGs de p-NIPAm-co-NIPMAm-BIS-DAT, se utilizaron para analizar el efecto del cambio estructural, por oxidación con periodato, en el cargado de la proteína albúmina. Aunque el efecto en el cargado fue evidente, resta evaluar las posibles causas del mismo, por ejemplo: aumento de la porosidad, presencia de GF α -oxo-aldehído y/o la estructura tipo “*hairy nanogel*”. Además, sería interesante realizar estudios sobre el efecto de la estructura y propiedades mecánicas de los NGs, en la interacción de los con tejidos biológicos: internalización celular, penetración en la piel, etc.

Respecto a los NGs de p-NIPAm-BIS-DAT cargados con Doxorubicina, resta estudiar la capacidad de carga y liberación de la droga. Posteriormente, podría caracterizarse el tipo de unión del nanogel con el fármaco para evaluar si puede ser liberado bajo demanda, frente a un pH ácido, por hidrólisis del enlace hidrazona. Luego, podrían realizarse ensayos de citotoxicidad y de liberación del fármaco, *in vitro* e *in vivo*, y evaluar la posible liberación de doxorubicina a pH lisosomal y su acumulación en el núcleo celular. En ese caso, podría ensayarse el uso del nanodispositivo para el tratamiento de líneas de células cancerígenas resistentes a Doxorubicina.

Por último, el desarrollo de nanogeles huecos o nanocápsulas de p-NIPAm-dPG podría ser aprovechado para la liberación de fármacos de manera controlada. Sin embargo, sería importante alcanzar un mayor control del tamaño de las nanocápsulas formadas. Esto podría realizarse mediante técnicas de síntesis de tipo *semi-batch*.

7.3 - PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

7.3.1 - PUBLICACIONES EN REVISTAS INTERNACIONALES

Durante el transcurso de esta tesis se publicaron los siguientes trabajos:

- **“Post-synthesis modification of thermo-responsive hydrogels: Hydrazone crosslinking of α -oxoaldehyde obtained from NIPAm-based polymers”**; Autores: Wolfel A.; Romero M.; Álvarez Igarzabal C. Publicado en la revista *European Polymer Journal*, Volúmen 112, 2019, páginas 389-399. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.01.028>
- **“Post-synthesis modification of hydrogels. Total and partial rupture of crosslinks, formation of aldehyde groups and re-crosslinking of cleaved hydrogels”**; Autores: Wolfel A.; Romero M.; Álvarez Igarzabal C. Publicado en la revista *Polymer*, Volúmen 116, 2017, páginas 251-260. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2017.03.068>
- **"Smart Valve. Polymer Actuator to Moisture Soil Control"**, Autores: Marcelo R. Romero, Alexis Wolfel y Cecilia Alvarez Igarzabal. Publicado en la revista *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volúmen 234, 2016, páginas 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.04.104>

7.3.2 - PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS DURANTE LA TESIS DOCTORAL

Parte de los resultados de esta tesis han sido presentados en diferentes reuniones científicas de carácter nacional e internacional:

INTERNACIONALES

2016. "Obtención de polímeros con grupos funcionales aldehído. Desarrollo de hidrogeles". Autores: Wolfel A.; Romero M.; Álvarez Igarzabal C. **16º Congreso Internacional de Metalurgia y Materiales SAM-CONAMET**. Noviembre de 2016. Córdoba, Córdoba, Argentina. Formato: Póster.

2016. "Modificación de xilemas vegetales para obtener actuadores químicos". Autores: Romero M.; Trejo G.; Wolfel A.; Álvarez Igarzabal C. **16º Congreso Internacional de Metalurgia y Materiales SAM-CONAMET.** Noviembre de Córdoba, Córdoba, Argentina. Formato: Póster.

2014. "Desarrollo de hidrogeles como actuadores para el control de humedad en suelo". Autores: Wolfel A.; Romero M.; Álvarez Igarzabal C. **Congreso Internacional de Metalurgia y Materiales SAM-CONAMET / IBEROMAT 2014.** Octubre de 2014. Santa Fe, Santa Fe, Argentina Formato: Póster.

2014. "Síntesis de nanotubos ciclopeptídicos derivatizados para el alineamiento de proteínas". Autores: Wolfel A., Montenegro J., Granja J. **XXII Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo (AUGM).** 28 de septiembre al 1 de octubre de 2014. Universidad de Playa Ancha, Valparaíso, Chile. Formato: Póster.

2014. "Modificación química de hidrogeles post-síntesis: ruptura parcial de entrecruzamientos utilizando periodato". Autores: Wolfel A.; Romero M.; Álvarez Igarzabal C. **XIV Latin American Symposium on Polymers (SLAP) y XII Ibero American Congress on Polymers (CIP).** Octubre 2014. Porto Galinhas, Brasil. Formato: Póster.

NACIONALES

2017. "Hidrogeles de p-NIPAm entrecruzado con enlaces hidrazona: respuesta al pH y la temperatura". Autores: Wolfel A.; Romero M.; Álvarez Igarzabal C. **XII Simposio Argentino de Polímeros (SAP 2017).** Octubre de 2017. Los Cocos, Córdoba, Argentina. Formato: Póster.

2016. Asistencia al III Workshop de Resonancia Magnética "NMR and EPR at the Forefront of Research", en la ciudad de Santa Fe, 31 de marzo y 1 de abril de 2016.

2015. "Relación entre el Equilibrio de Hinchamiento y la Fuerza de Expansión de Hidrogeles en contacto con el suelo. Aplicación del fenómeno en Actuadores Químicos".

Autores: Romero M.; Wolfel A.; Álvarez Igarzabal C. **XI Simposio Argentino de Polímeros (SAP 2015)**. Octubre de 2015. Santa Fe, Santa Fe, Argentina. Formato: Oral.

2015. “Nuevas estrategias en la modificación post-síntesis de Hidrogeles”. Autores: Wolfel A.; Romero M.; Álvarez Igarzabal C. **XI Simposio Argentino de Polímeros (SAP 2015)**. Octubre de 2015. Santa Fe, Santa Fe, Argentina. Formato: Poster.

2014. Presentación del proyecto “Smart Valve: Válvulas autónomas para la irrigación de agua en suelo utilizando hidrogeles inteligentes” en la muestra “**UNC Innova**” de la Incubadora de Empresas UNC, 21 de noviembre de 2014, Córdoba, Argentina. Formato: Exposición.

7.4 - OTRAS INSTANCIAS DE FORMACIÓN

7.4.1 - ACTIVIDADES DE DIVULGACIÓN

2016. Colaboración en la “**XIV Semana Nacional de la Ciencia y Tecnología**” en la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. 26 al 29 de septiembre de 2016.

2015. Artículo: Materiales inteligentes, Un presente impactante, un futuro desafiante para la ciencia de los polímeros. Autores: Prof. Miriam Strumia, con la colaboración de los integrantes del Grupo del Laboratorio de Materiales Poliméricos (LaMaP). 6ª Edición de la Revista BITACORA DIGITAL (Revista electrónica digital de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC), publicado el 30 de Noviembre de 2015.

2015. Presentaciones Orales en el espacio interactivo, “Diálogos y Cine”, de CONICET en la feria Tecnópolis. La presentación titulada “Relojes vivientes: ¿Podemos medir el tiempo con nuestro cuerpo?” se llevó a cabo los días 26 y 27 de Septiembre de 2015 en dicho espacio.

2015. Artículos publicados en la web. Durante Abril de 2015 se publicaron en la web distintos artículos referidos al trabajo “Smart Valve”.

<http://www.el1digital.com.ar/articulo/view/50716/smartvalveunmaterialquepiensaenel-entorno/>

<http://www.sustentartv.com/smart-valve-eficiencia-en-el-riego/>

<http://www.redvitec.edu.ar/smartvalveunsistemaparacontrolarelusodelaguaparariego/>

<http://www.diariodeciencias.com.ar/smart-valve-valvula-inteligente-para-regular-el-agua/>

2015. Participación en el Stand representativo de la Facultad de Ciencias Químicas en la **Muestra de Carreras-Ingreso 2016**, "La UNC Te Espera". Resolución 846/15 – UNC. 1-4 de Septiembre de 2015.

2015. Colaboración en la **“XIII Semana Nacional de la Ciencia y la Tecnología”** desde el proyecto de articulación: “Semana de la Ciencia 2015”, los días 29 de junio al 03 de julio de 2015.

2014. Participación en el proyecto de articulación **“La química como herramienta de integración II”**, trabajo en conjunto con el Instituto del lenguaje y la audición de Córdoba (ILAC). Agosto a Diciembre de 2014.

2014. El Proyecto "ID 16514 - SMART-VALVE" de Romero, Marcelo; Wolfel Sanchez, Alexis y Alvarez Igarzabal, Cecilia Inés, fue seleccionado para **publicación en el catálogo** en la Décima Edición del Concurso Nacional de Innovaciones, **INNOVAR 2014**, organizada por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Nación.

2014. Colaboración en la **“XII Semana Nacional de la Ciencia y la Tecnología”** desde el proyecto de articulación: “Semana de la Ciencia 2014”, los días 30 de junio y 1 al 4 de julio de 2014. Resolución 923/2014.

2014. Participación en el Stand representativo de la Facultad de Ciencias Químicas en la **Muestra de Carreras-Ingreso 2015**, "La UNC Te Espera" los días 2 al 5 de septiembre de 2014. Resolución 877/2014 – UNC.

7.4.2 - BECAS ADQUIRIDAS DURANTE LA TESIS DOCTORAL

2014-2019. Beneficiario de una **beca interna doctoral (5 años)**, otorgada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) a partir del 1º de abril de 2014. Resolución N° 4830 de fecha 17/12/2013 – Convocatoria 2013.

2017. Beneficiario de una **Beca Erasmus+** para realizar una estancia académica de 6 meses en la Universidad Libre de Berlín. La dotación económica incluyó dinero para pasajes aéreos y para cubrir gastos mensuales durante todo el período. Octubre de 2017 a Marzo de 2018.

2016. Beneficiario de una beca de transporte y alojamiento para participar en el **Curso de posgrado “Aplicaciones de Resonancias Magnéticas”** del 28 al 30 de Marzo de 2016, Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Biología y Ciencias Biológicas (Resolución N°1295/15) y en el III Workshop de Resonancia Magnética “NMR and EPR at the Forefront of Research”, en la ciudad de Santa Fe, 31 de marzo y 1 de abril de 2016.

2014. Beneficiario de una beca de transporte y alojamiento para participar en las **XXII Jornadas de Jóvenes Investigadores** organizadas por la Asociación de Universidades Grupo Montevideo (AUGM), Universidad de Playa Ancha, Valparaíso, Chile, del 28 de septiembre al 1 de octubre de 2014.

2014. Asistencia económica para participar de la **Escuela de Materiales Porosos Nanoestructurados** que se realizó en el marco del Simposio MATERIA, y como parte del Congreso Internacional de Metalurgia y Materiales, SAM-CONAMET 2014, en la ciudad de Santa Fe, Argentina, 18 al 20 de octubre. Dicha asistencia cubrió el alojamiento durante ese período.

7.4.3 - CURSOS DE POSGRADO

2018. Curso de posgrado **“Química Supramolecular: Principios, Aspectos Sintéticos y Analíticos. Tópicos Especiales: Nanoquímica y Dispositivos Moleculares”**. Director: Prof. Dra. Alicia Viviana Veglia. Realizado del 24 al 28 de septiembre de 2018. Facultad de Ciencia Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Aprobado con calificación 10 (diez).

2017. Curso de posgrado **“Presentación de Trabajos Finales y Tesis”**. Directora: Dra. Silvia Patricia Gil. Realizado del 29 de mayo al 2 de junio de 2017. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Aprobado con calificación 10 (diez).

2016. Curso de posgrado **“Aplicaciones de Resonancias Magnéticas”**. Directores: Dra. Ana Gennaro y Dr. Alberto Rizzi. Realizado del 28 al 30 de Marzo de 2016, Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (Resolución N°1295/15). Aprobado con calificación: Sobresaliente 10 (diez).

2015. Curso de pedagogía: **“Fundamentos Didácticos y Pedagógicos en la Enseñanza de la Química”**. Director: Dr. Alejandro Granados. Agosto de 2014 a Abril de 2015. Institución: Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Aprobado con calificación 10/10.

2014. Participación en la **Escuela de Materiales Porosos Nanoestructurados** que se realizó en el marco del Simposio MATERIA, y como parte del Congreso Internacional de Metalurgia y Materiales, SAM-CONAMET 2014, en la ciudad de Santa Fe, Argentina, 18 al 20 de octubre. Evaluación: Aprobado (sin escala numérica).

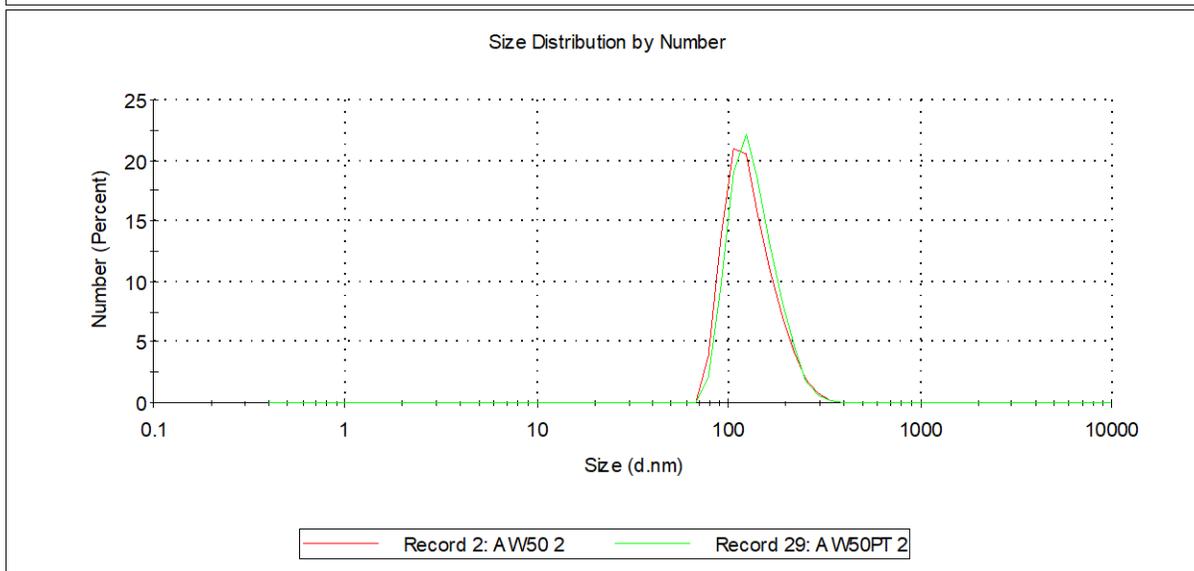
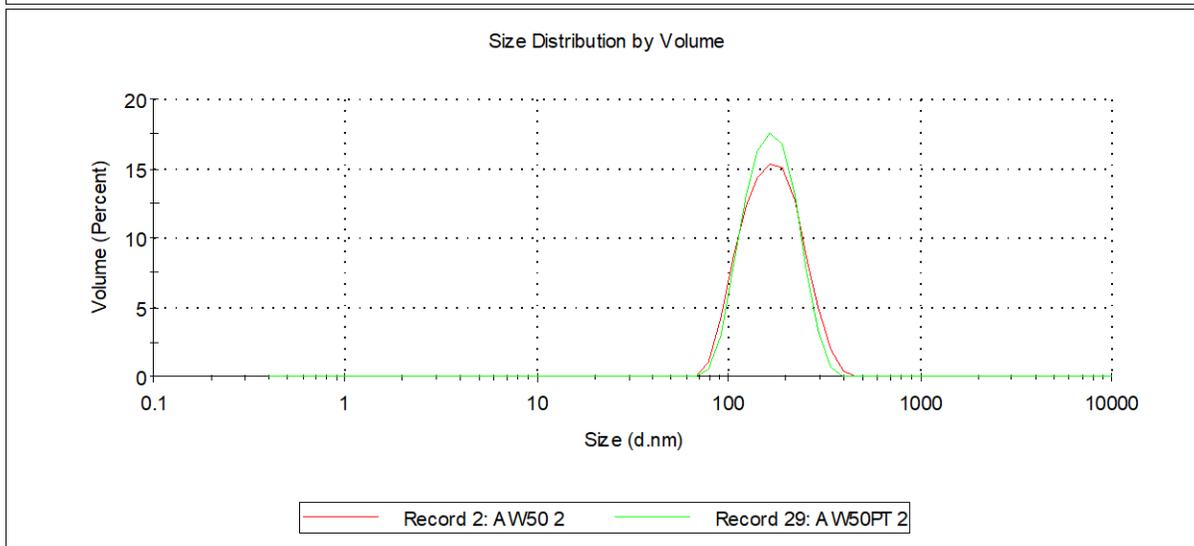
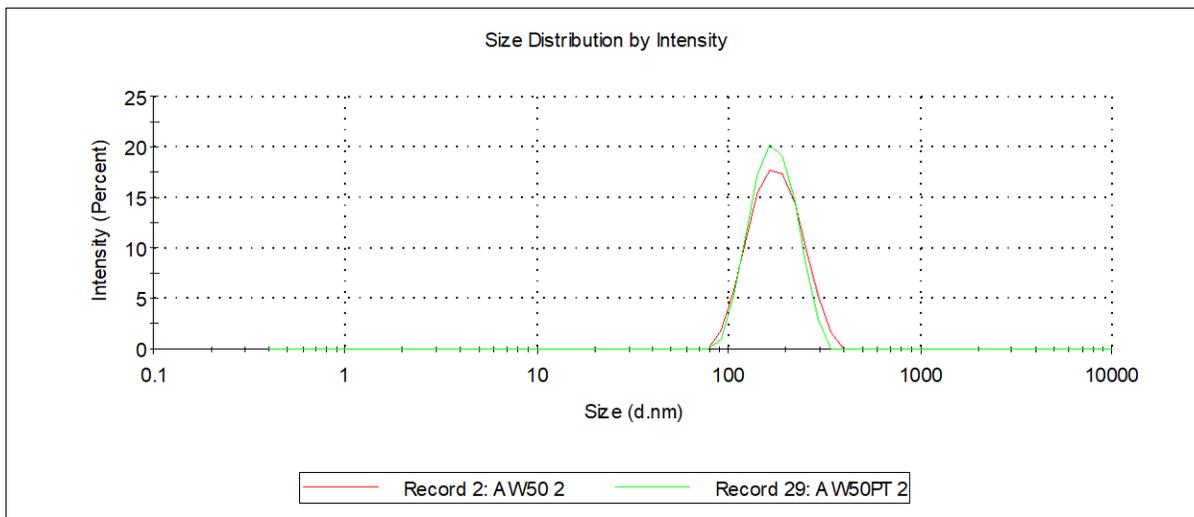
2014. Curso de posgrado **“Greener pathways to organics and nanomaterials: sustainable applications of nano-catalysts”**. Resolución HCD 413/2014. Del 9 al 11 de junio de 2014. Dirigido por el profesor Dr. Rajender S. Varma. Aprobado con calificación 10/10.

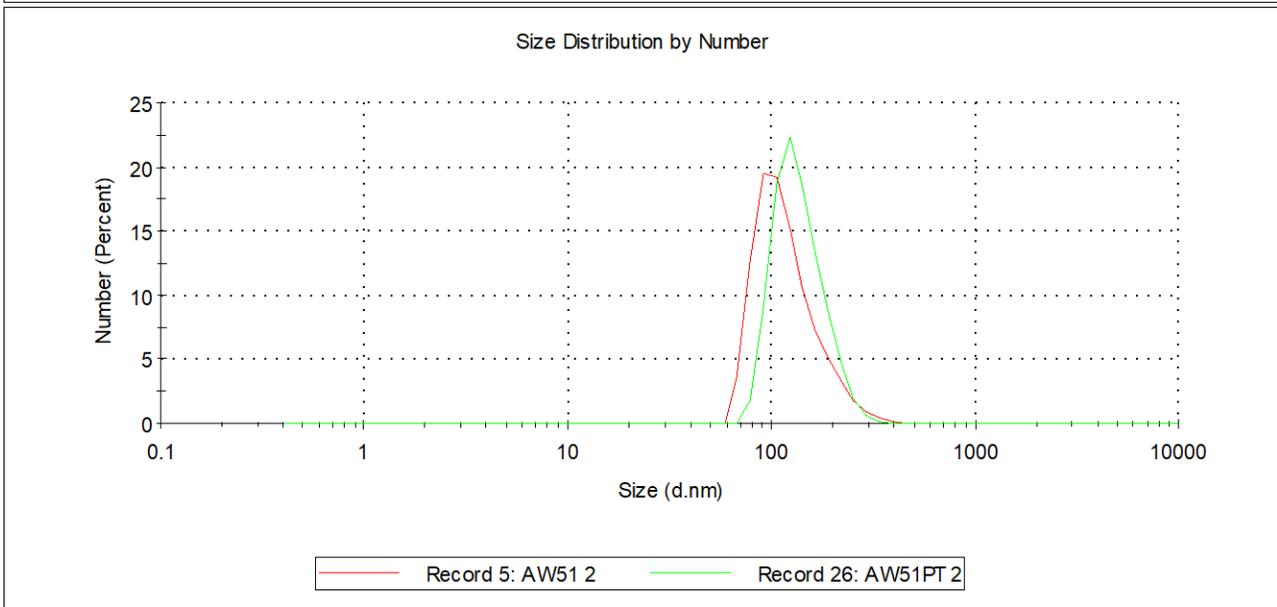
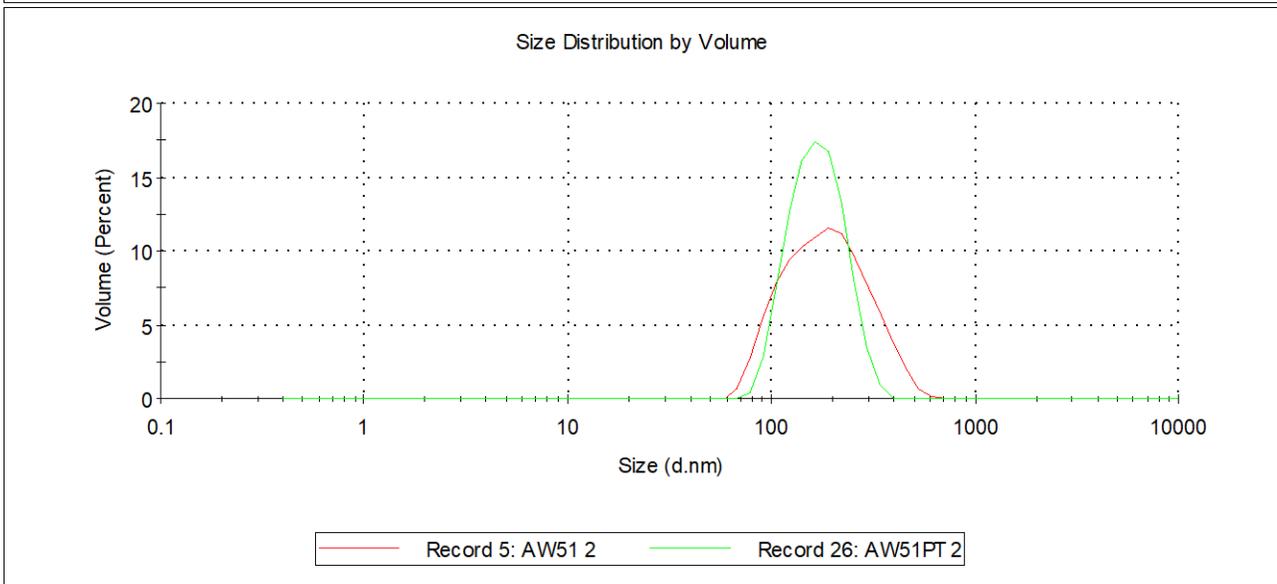
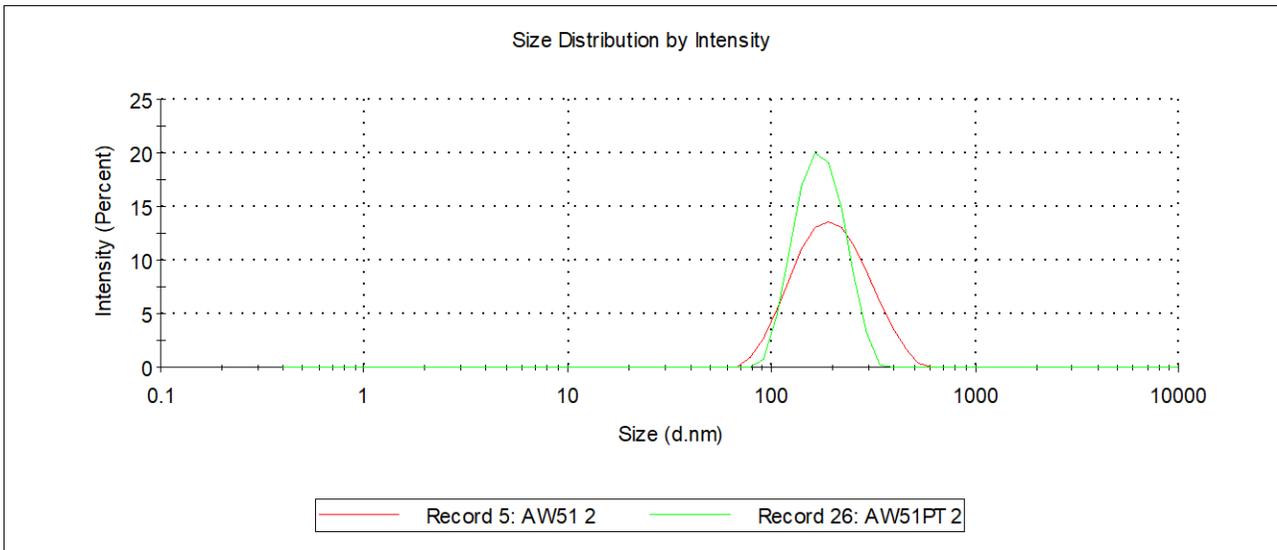
ANEXO

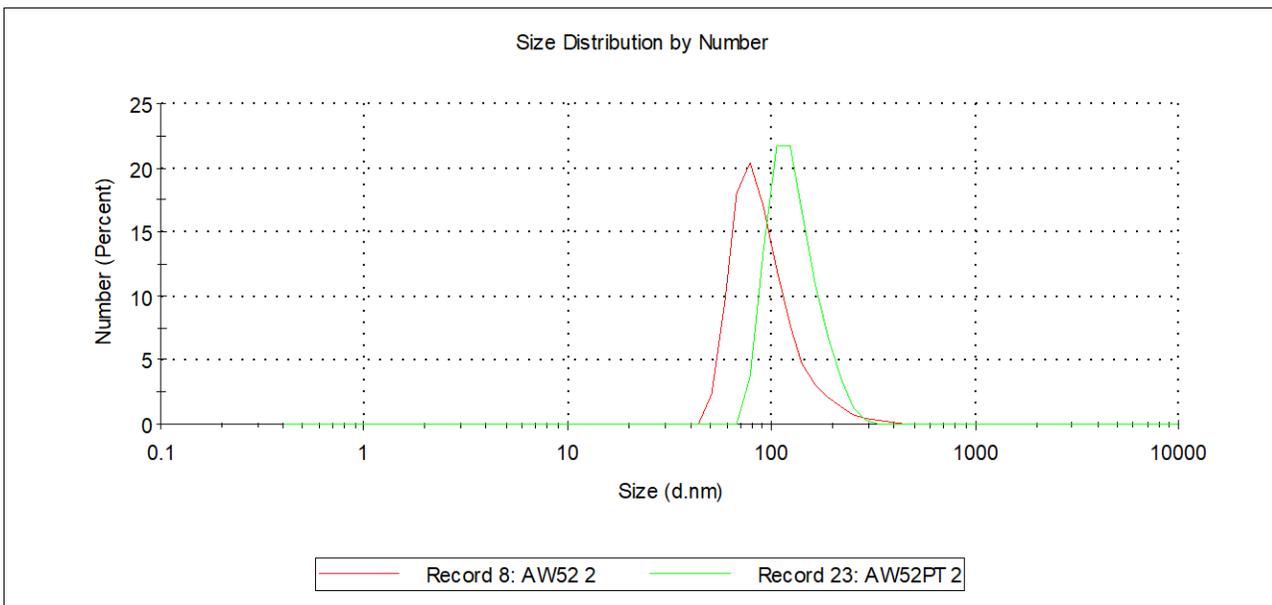
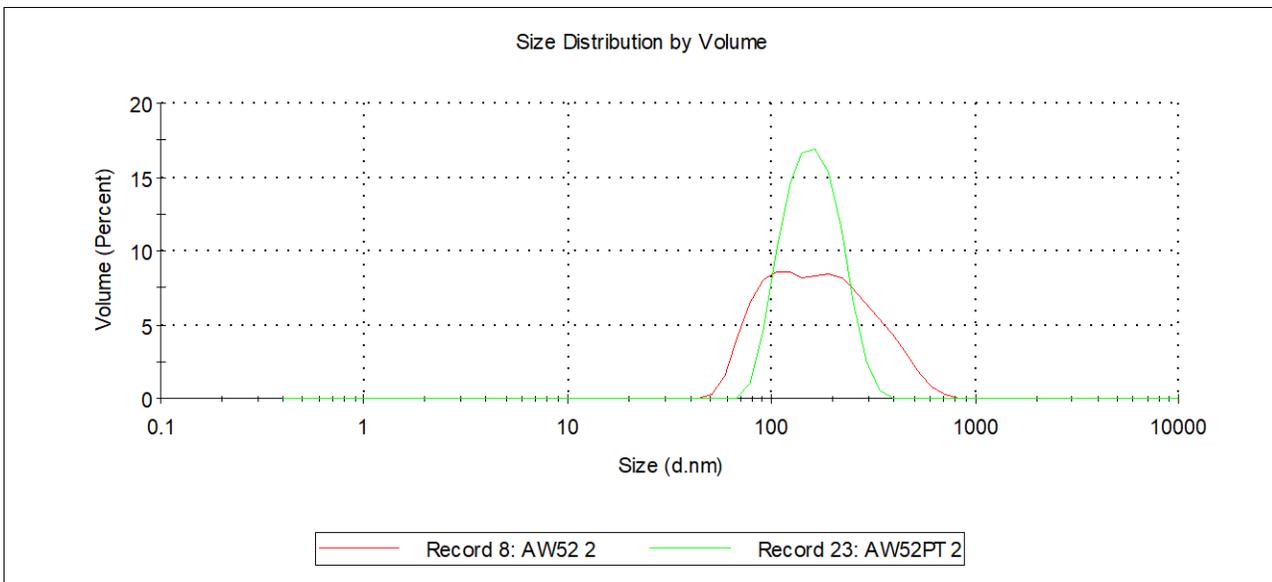
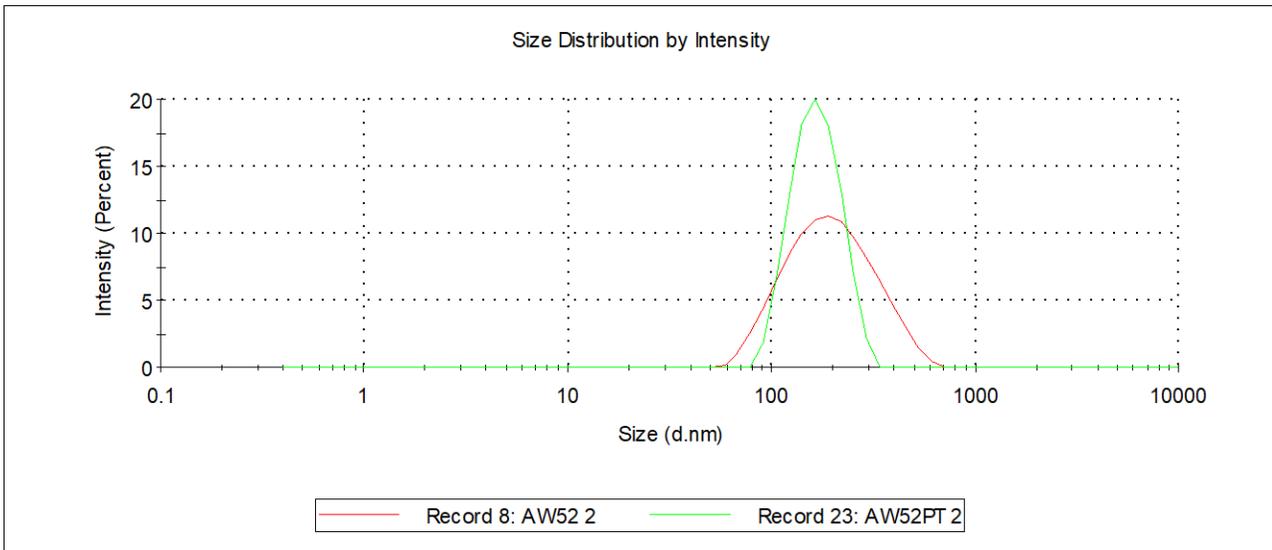
Anexo: Gráficos de DLS de síntesis de NGs de NIPAm y NIPMAM

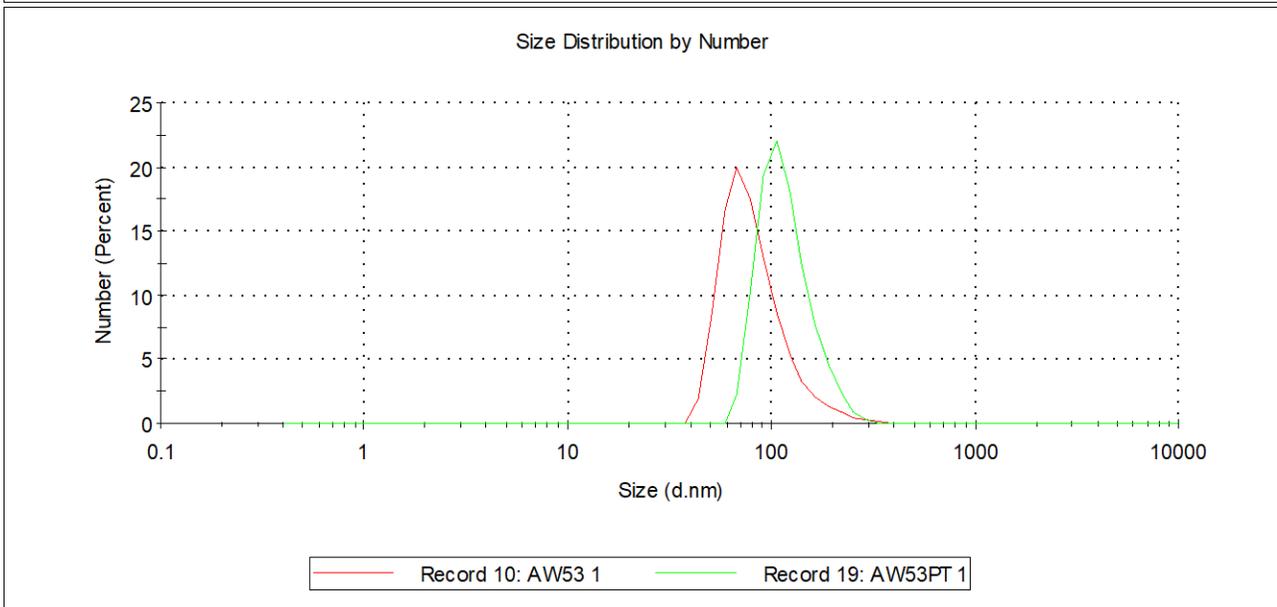
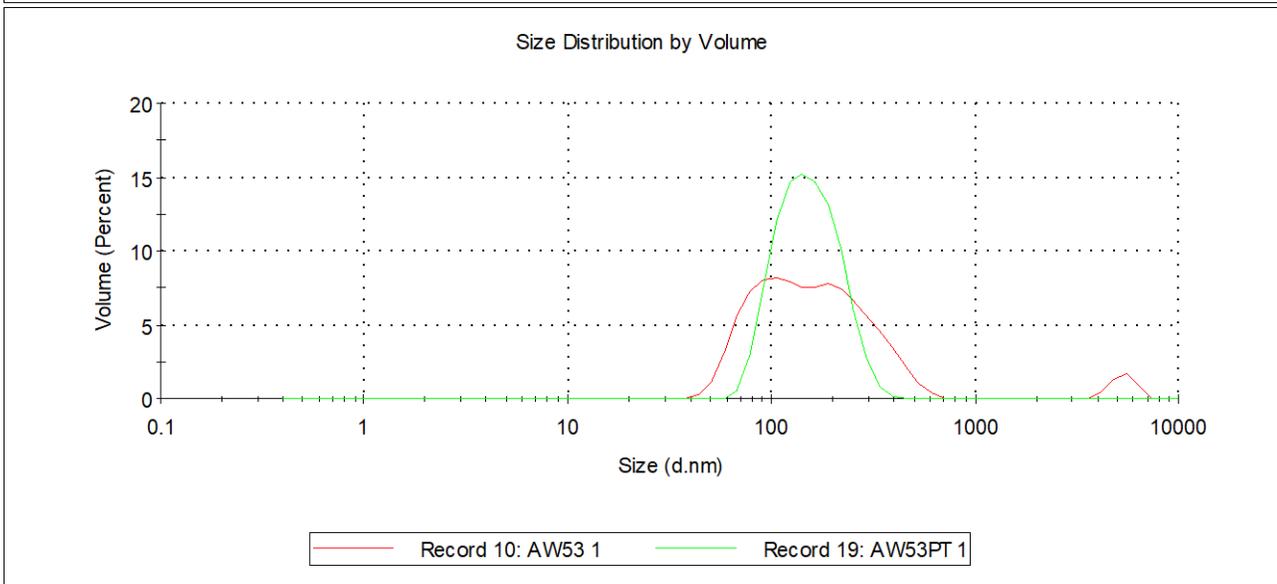
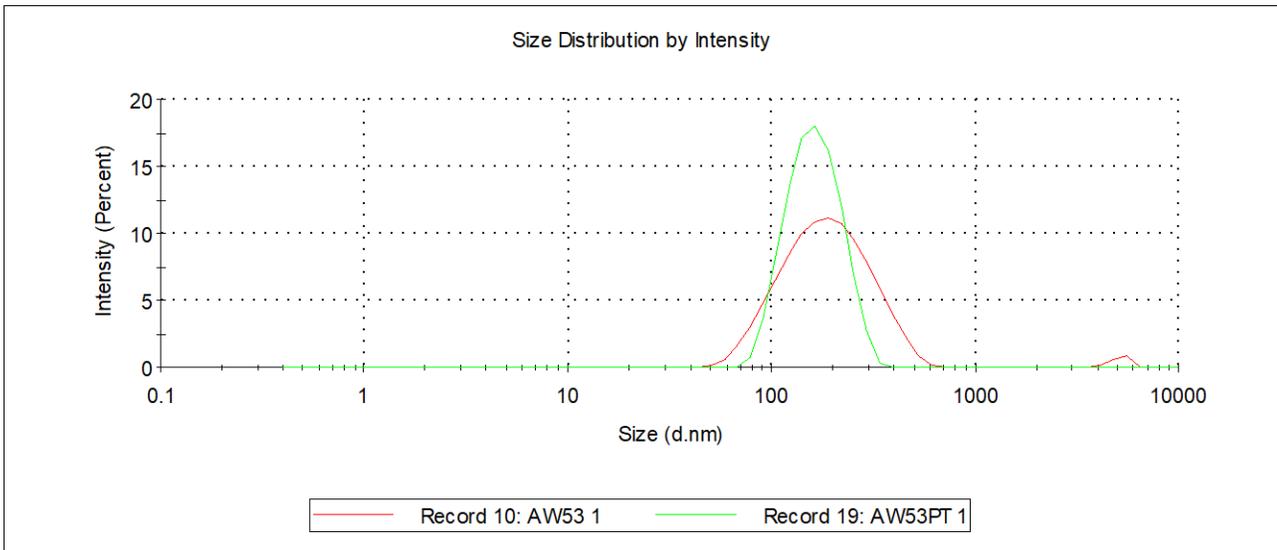
NGs de p-NIPAm con TEMED:

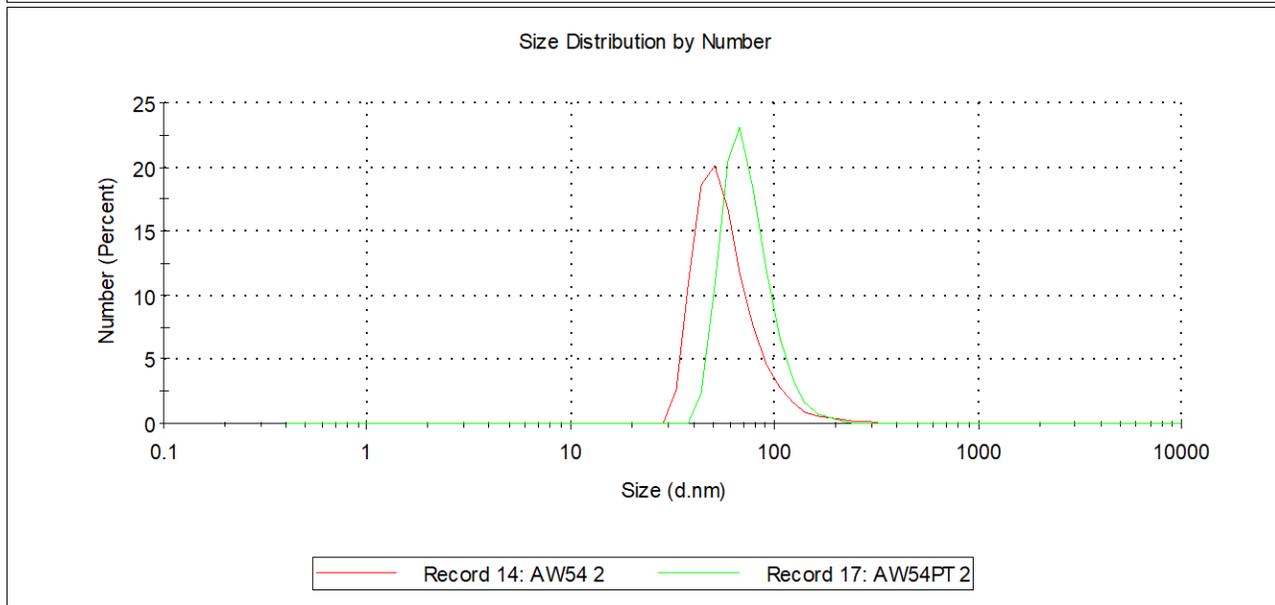
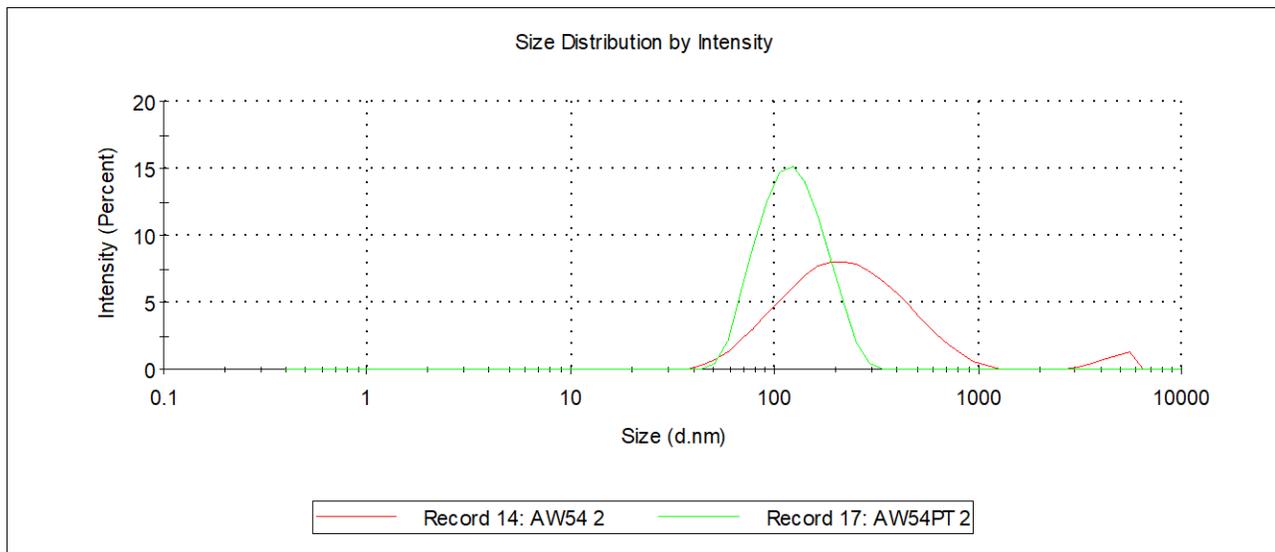
0%DAT





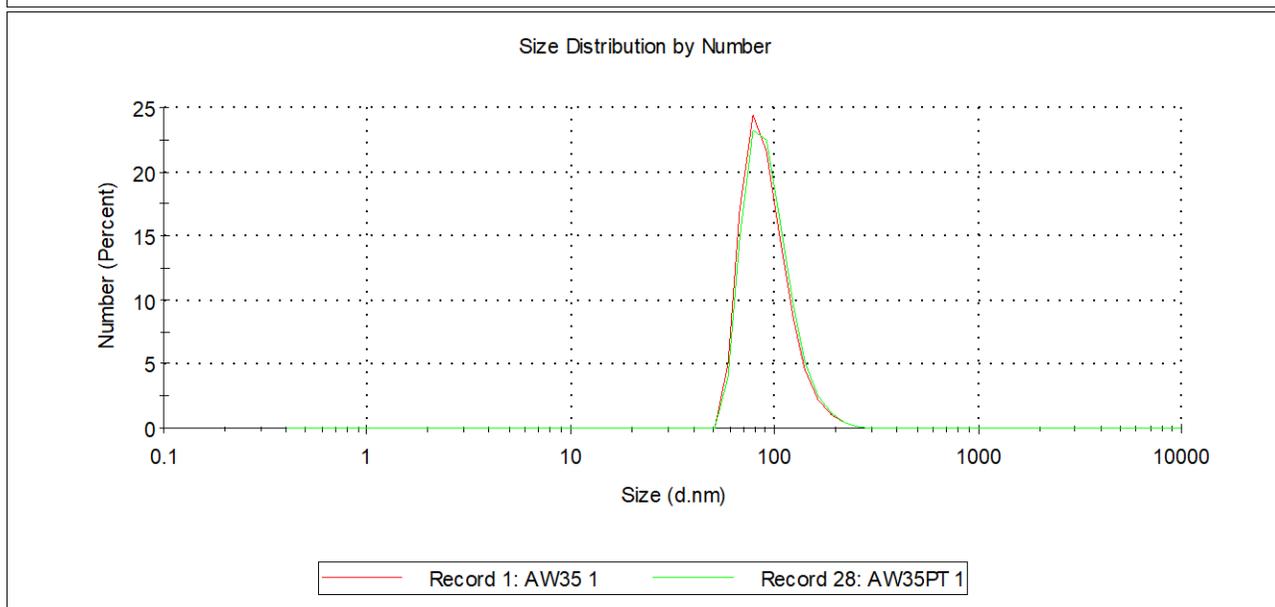
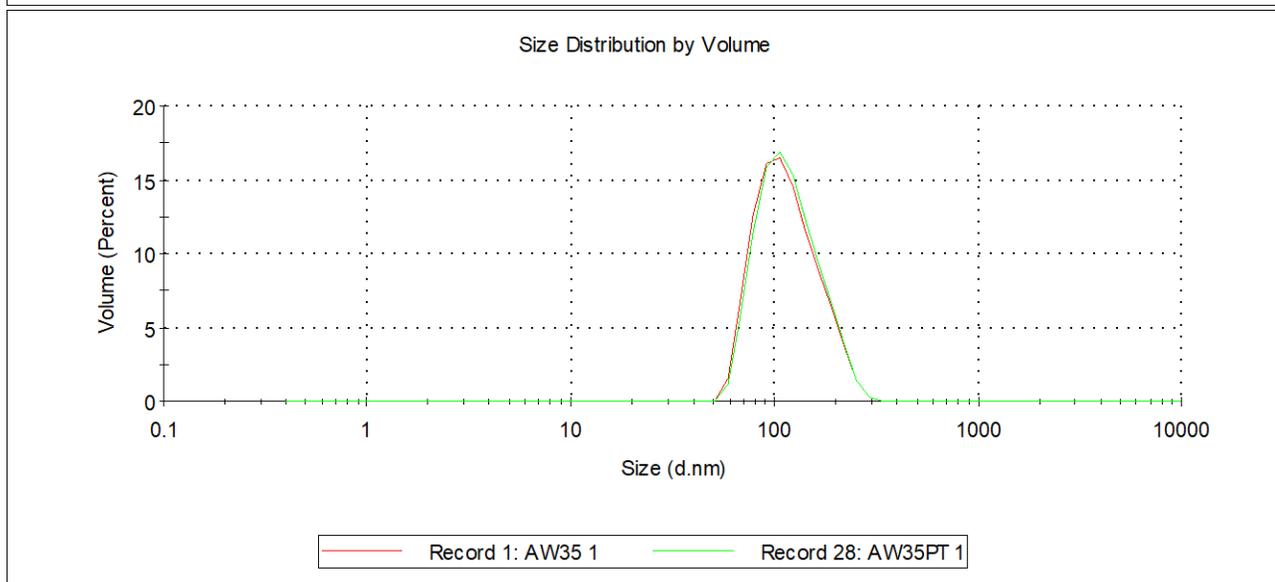
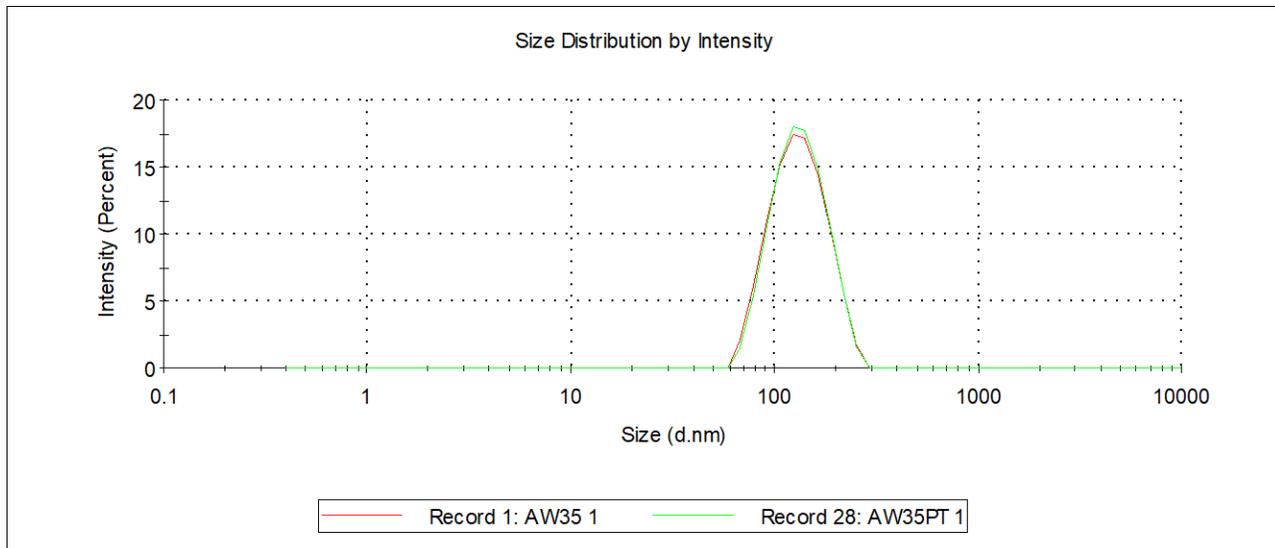


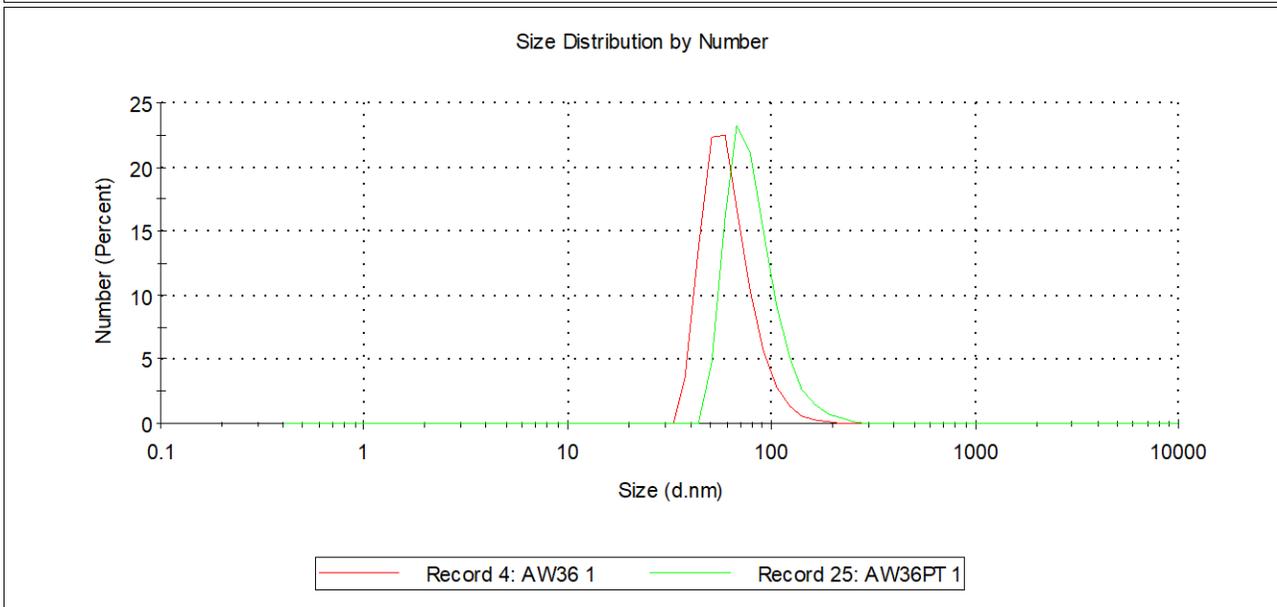
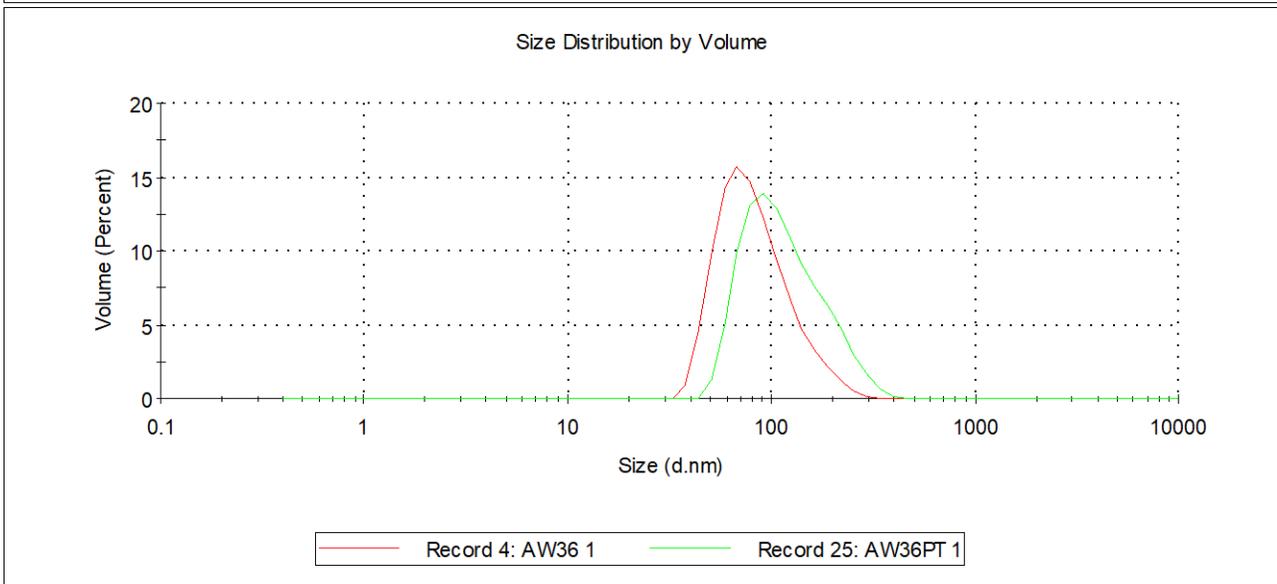
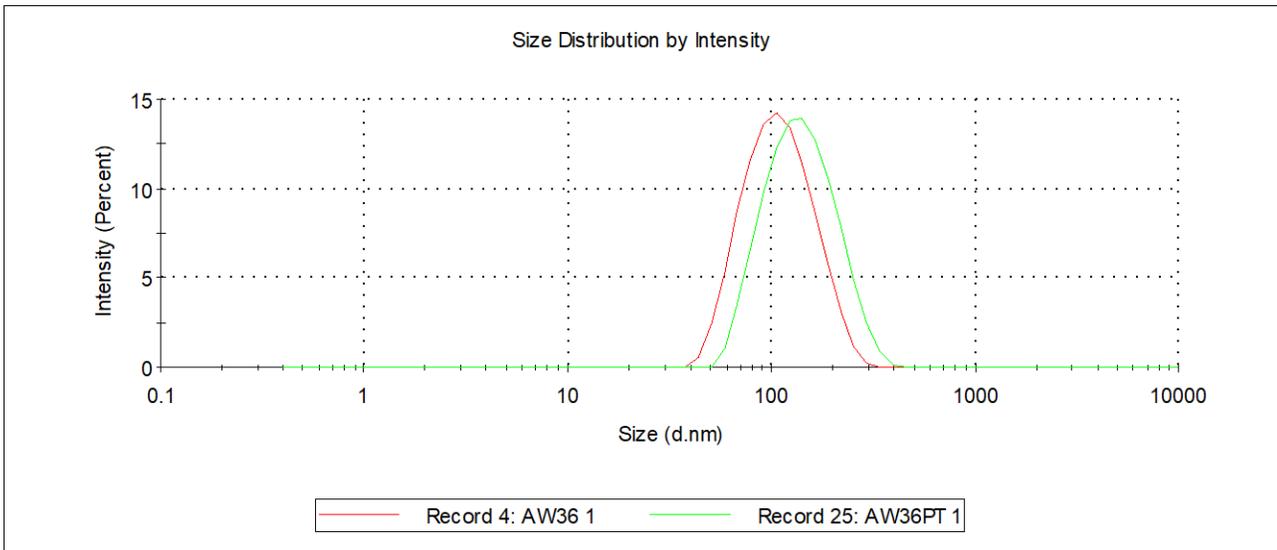


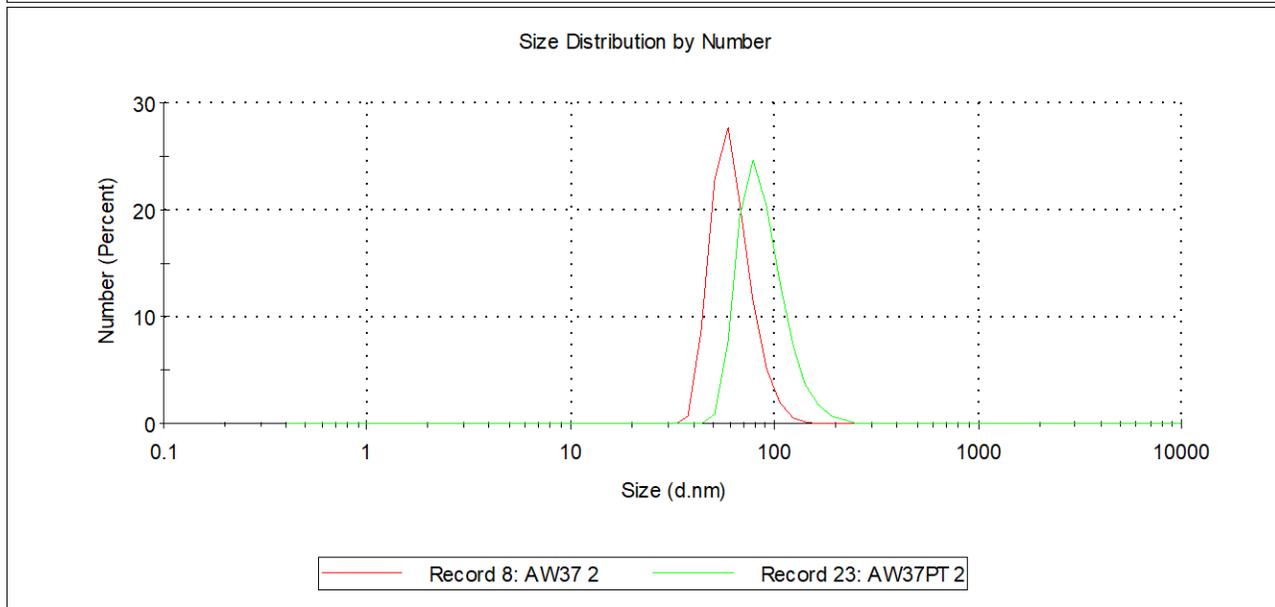
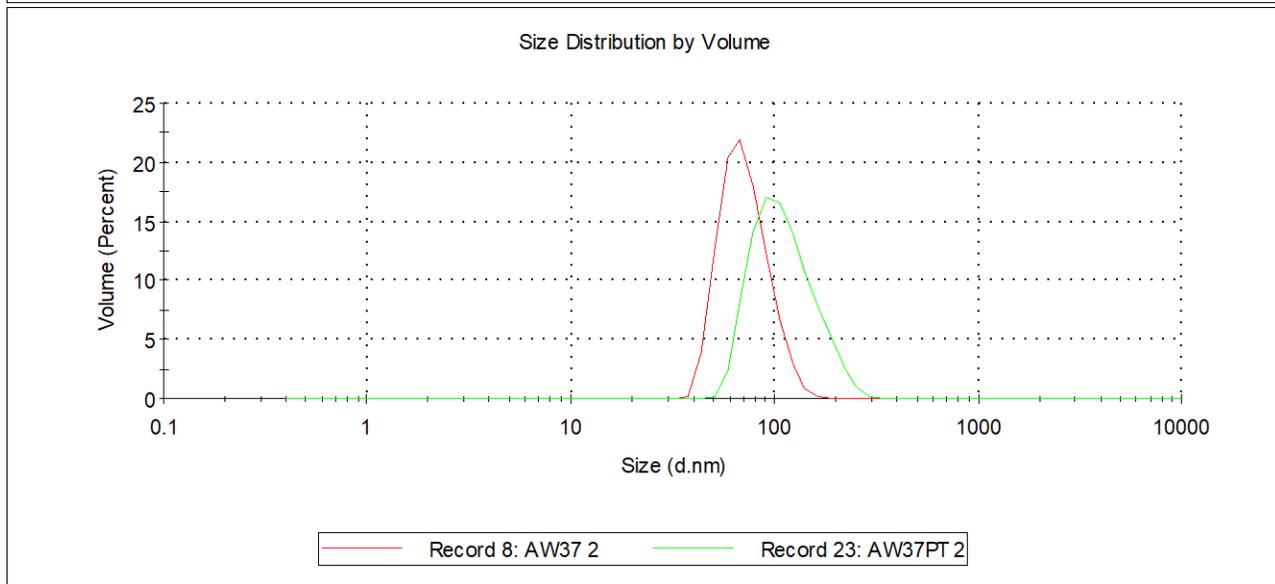
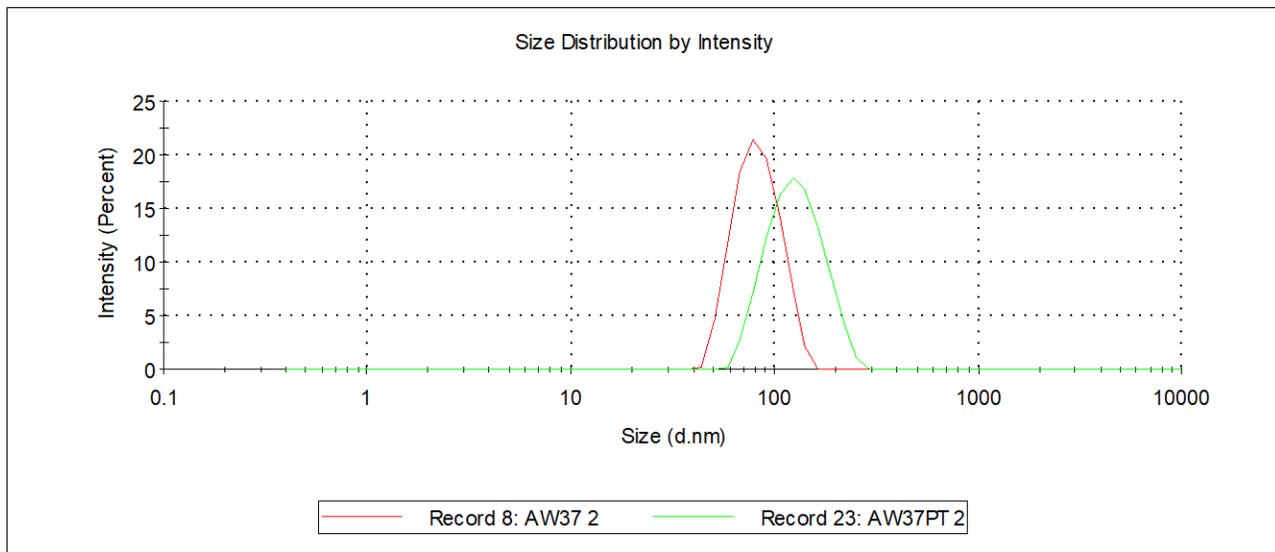


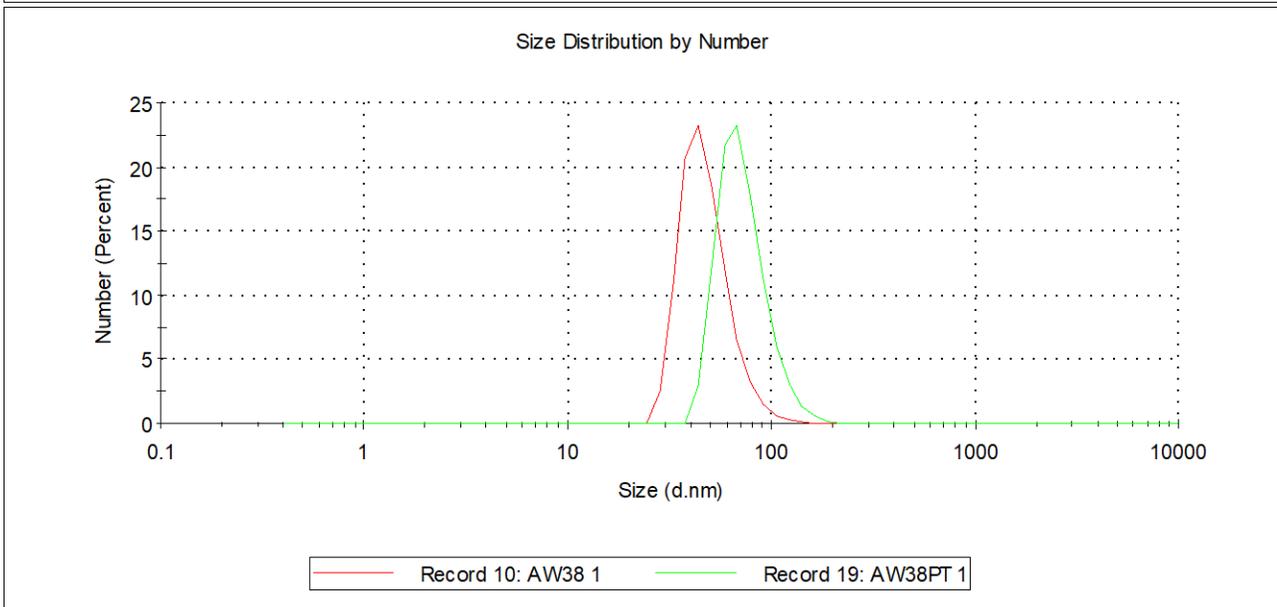
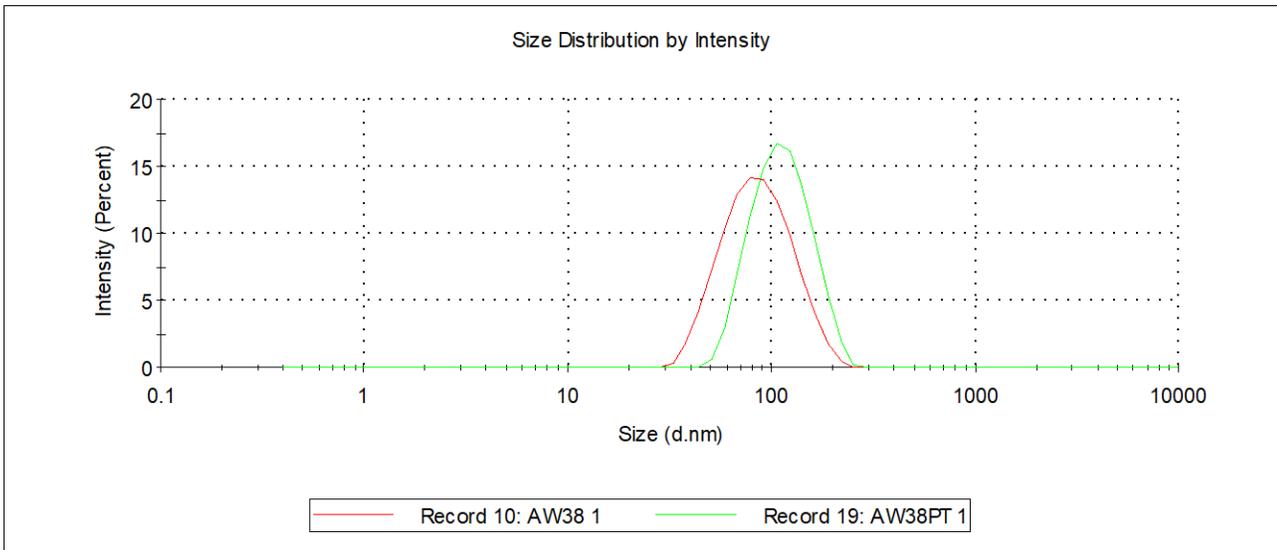
NGs de p-NIPAm sin TEMED:

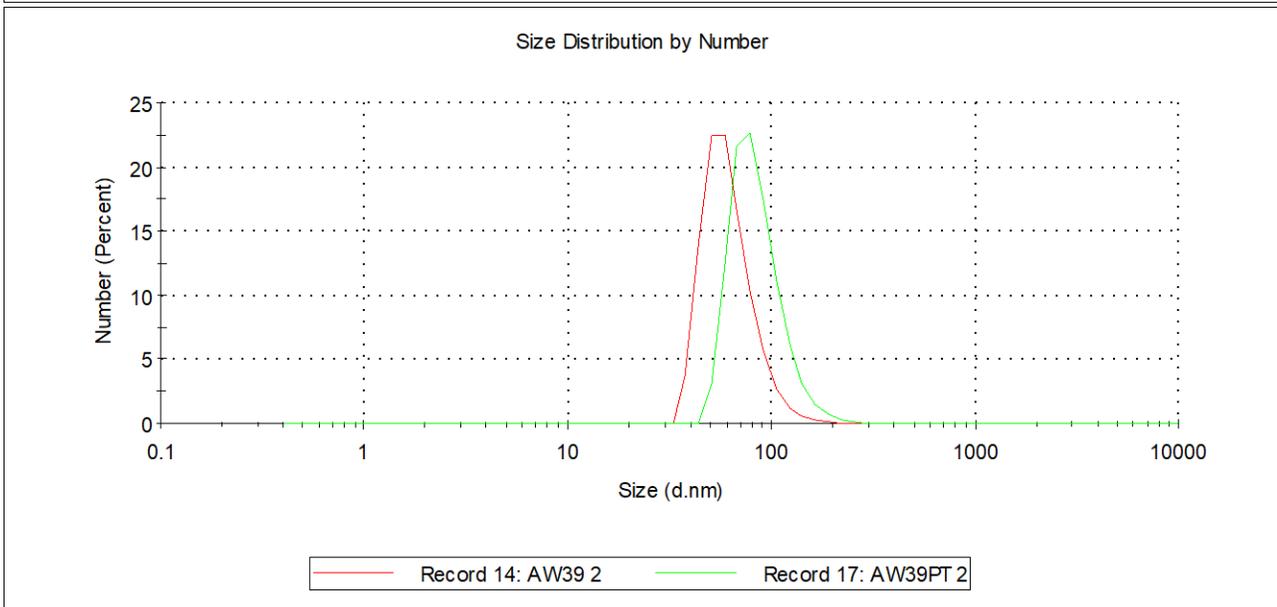
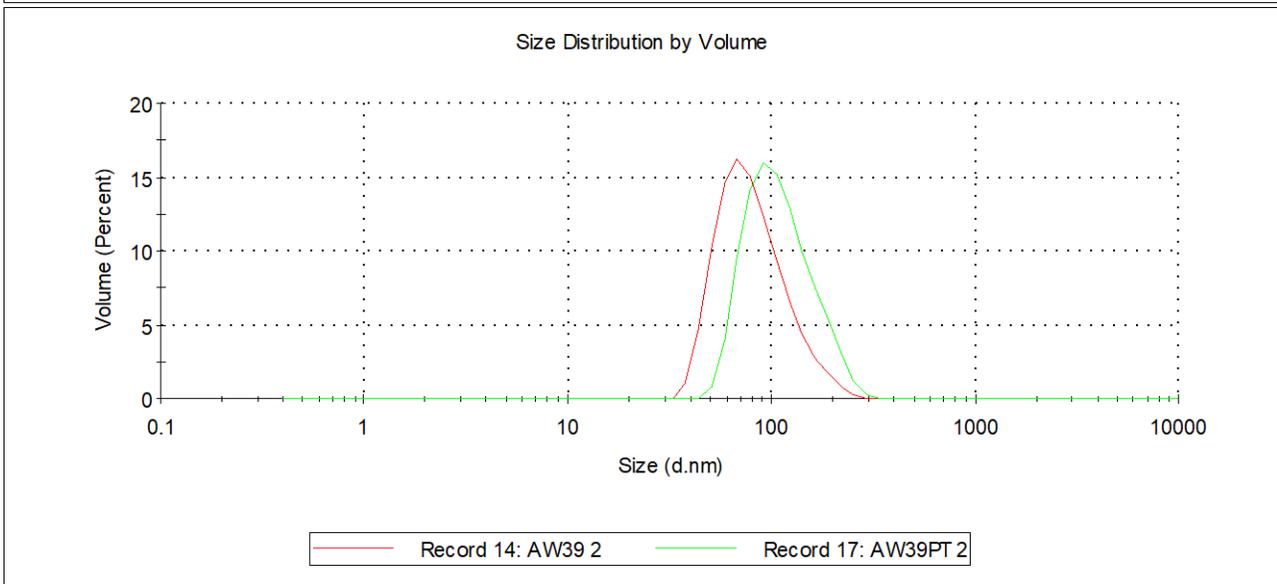
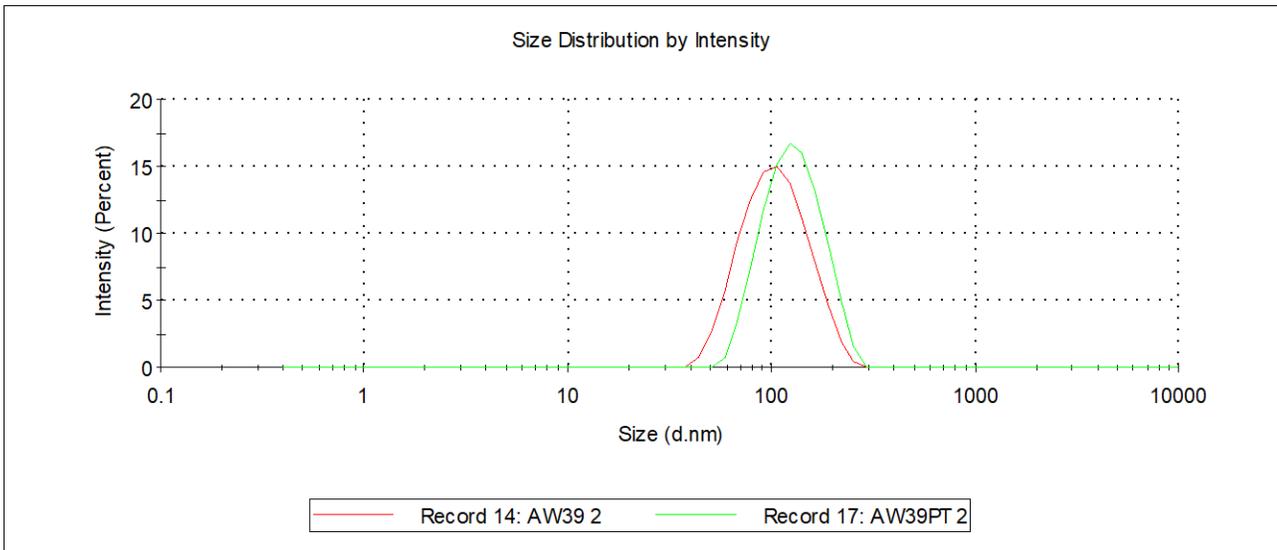
0%DAT

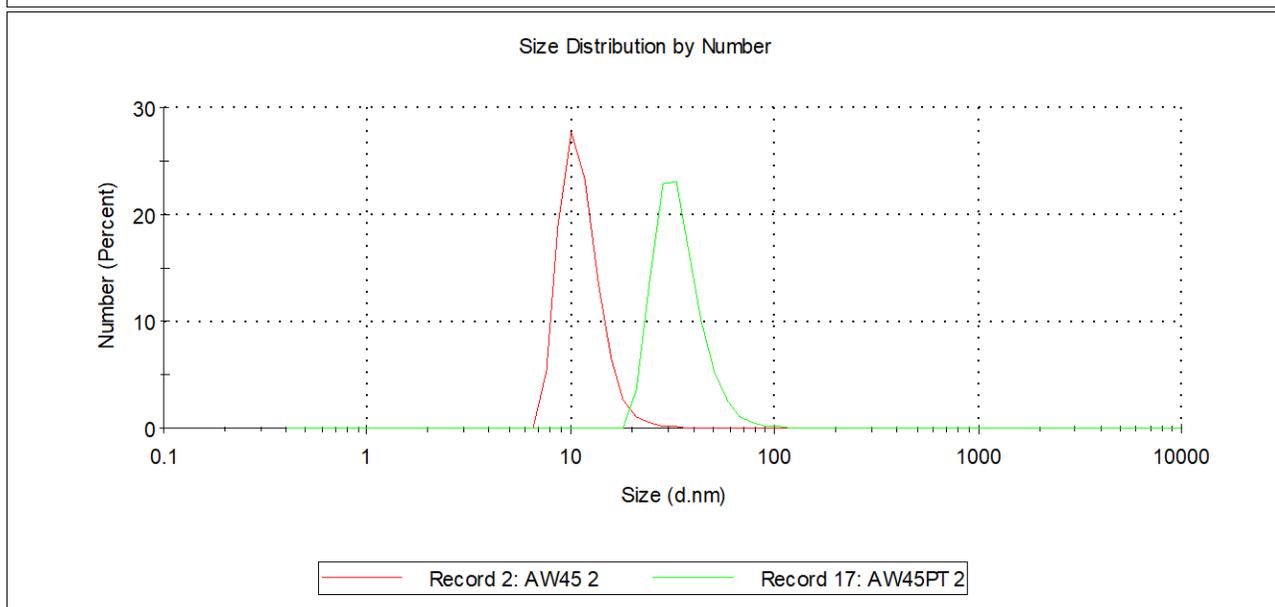
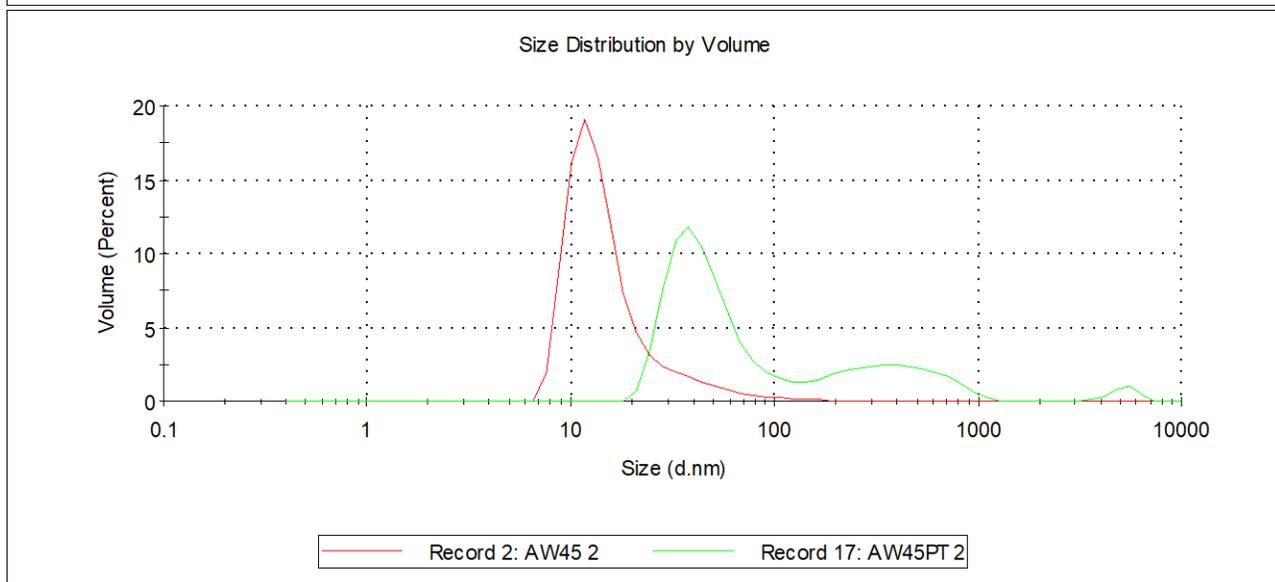
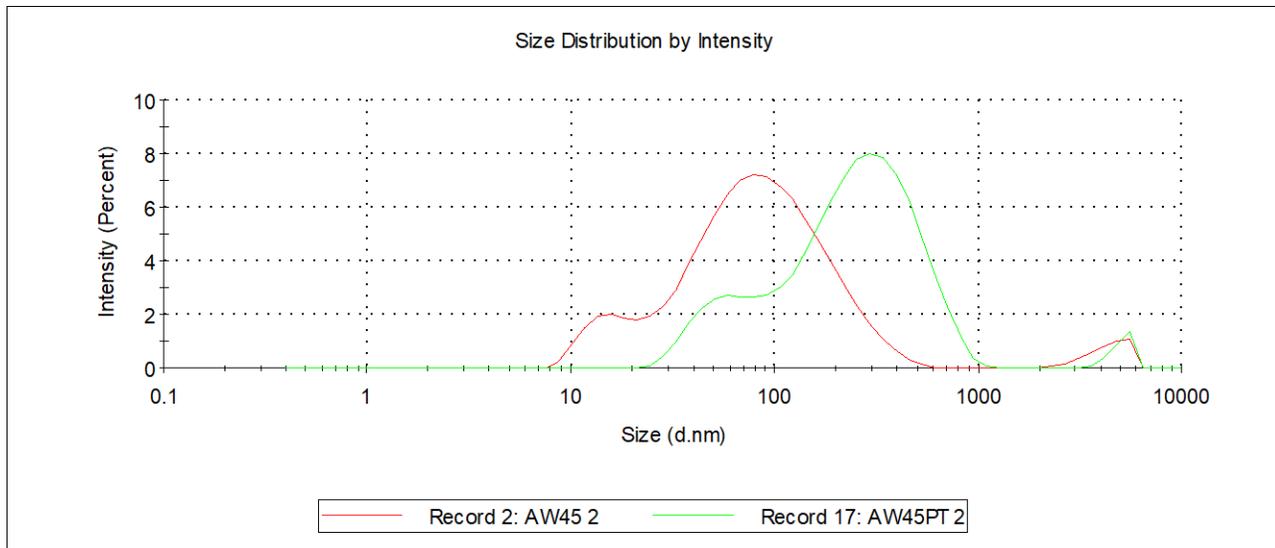


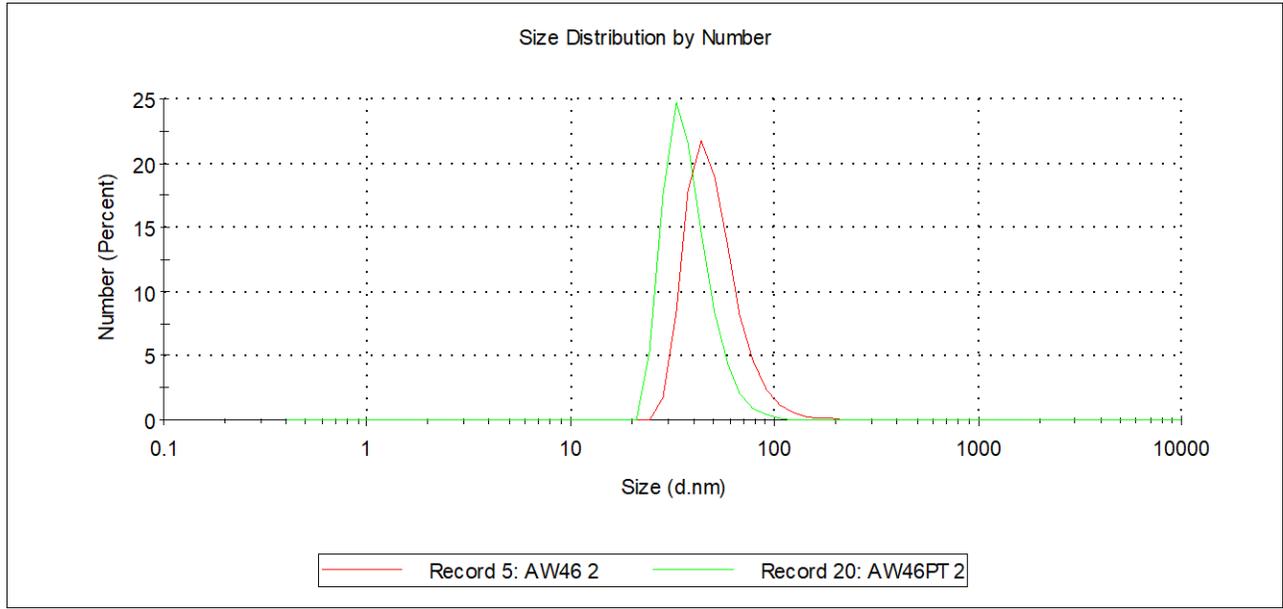
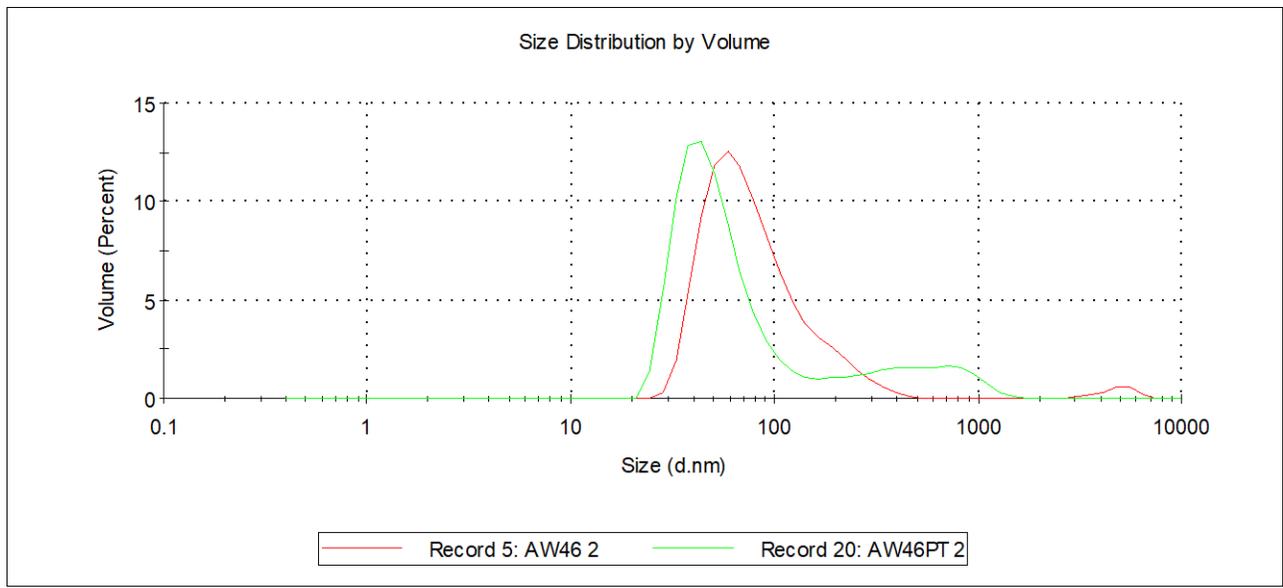
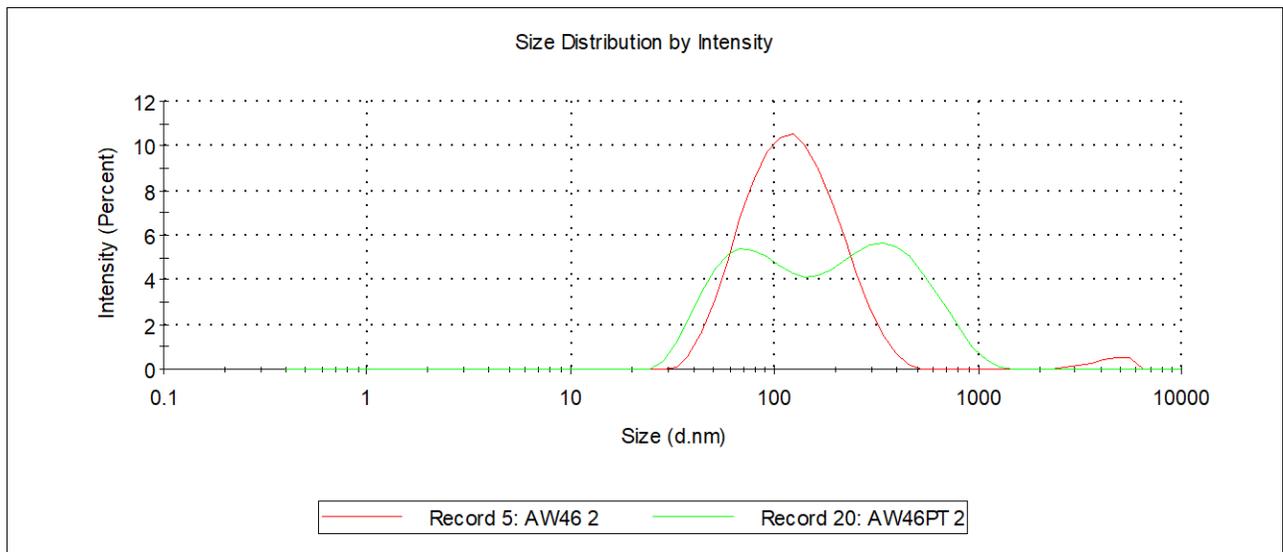


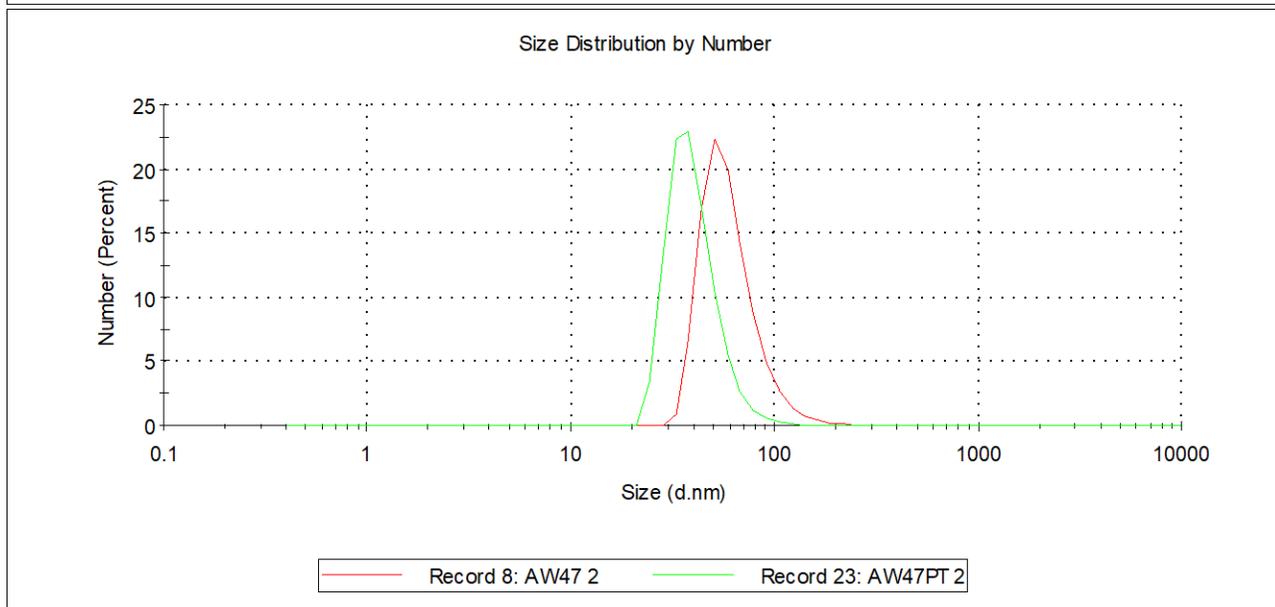
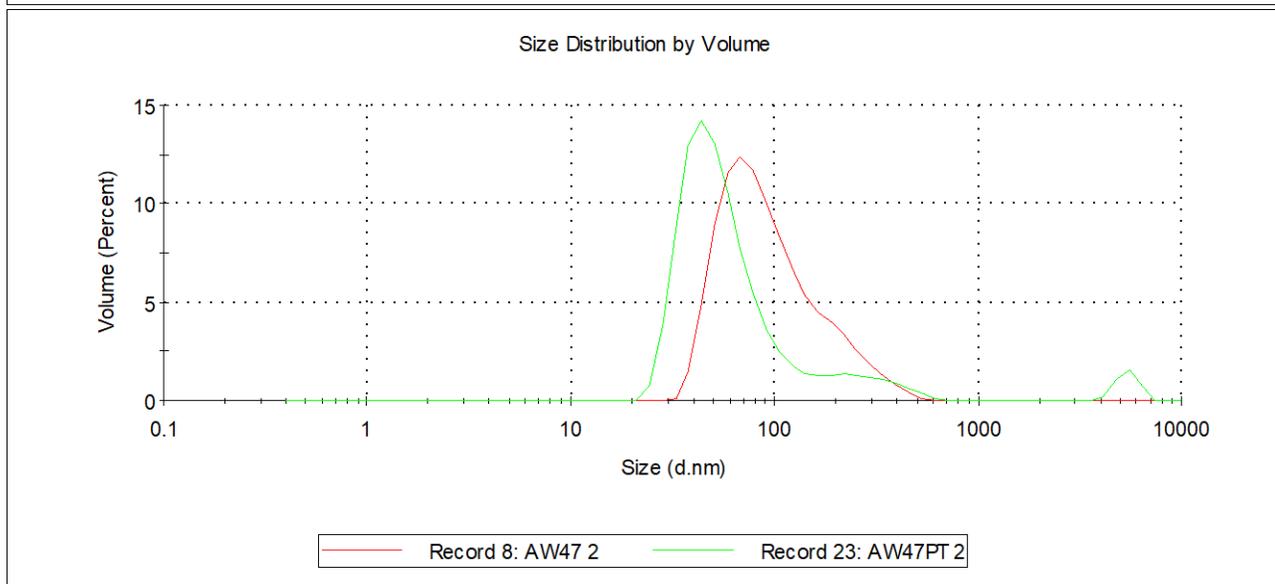
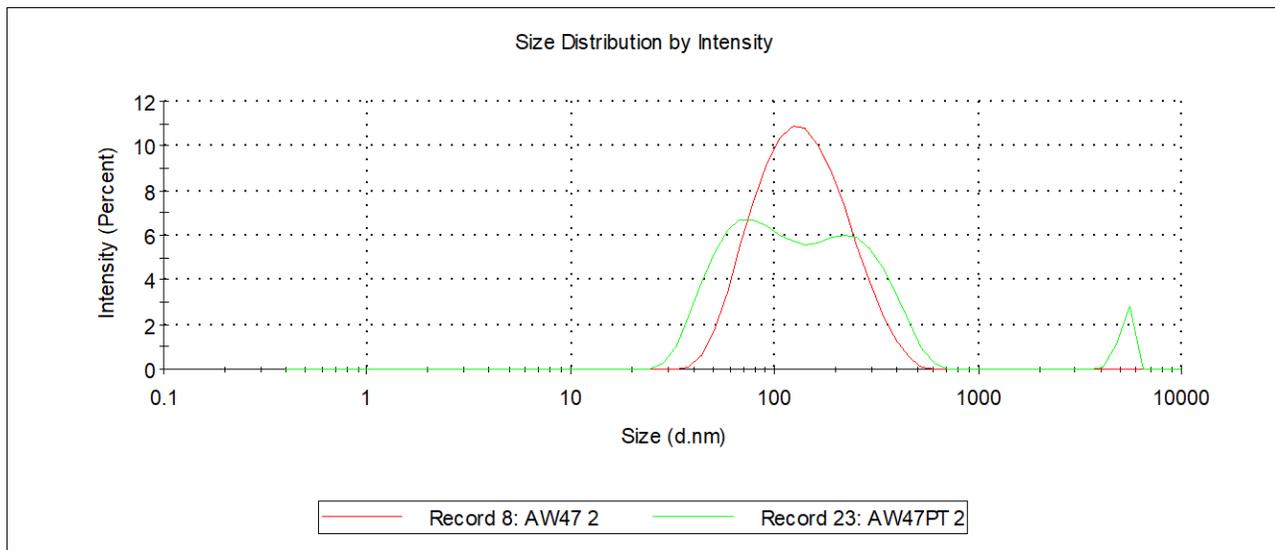


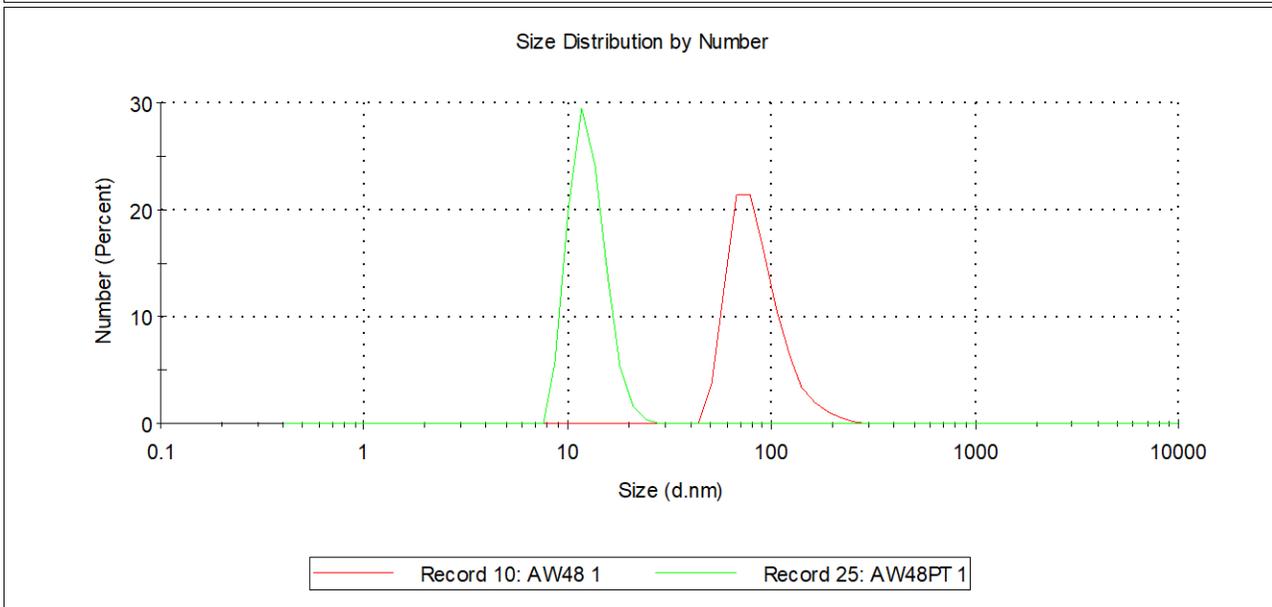
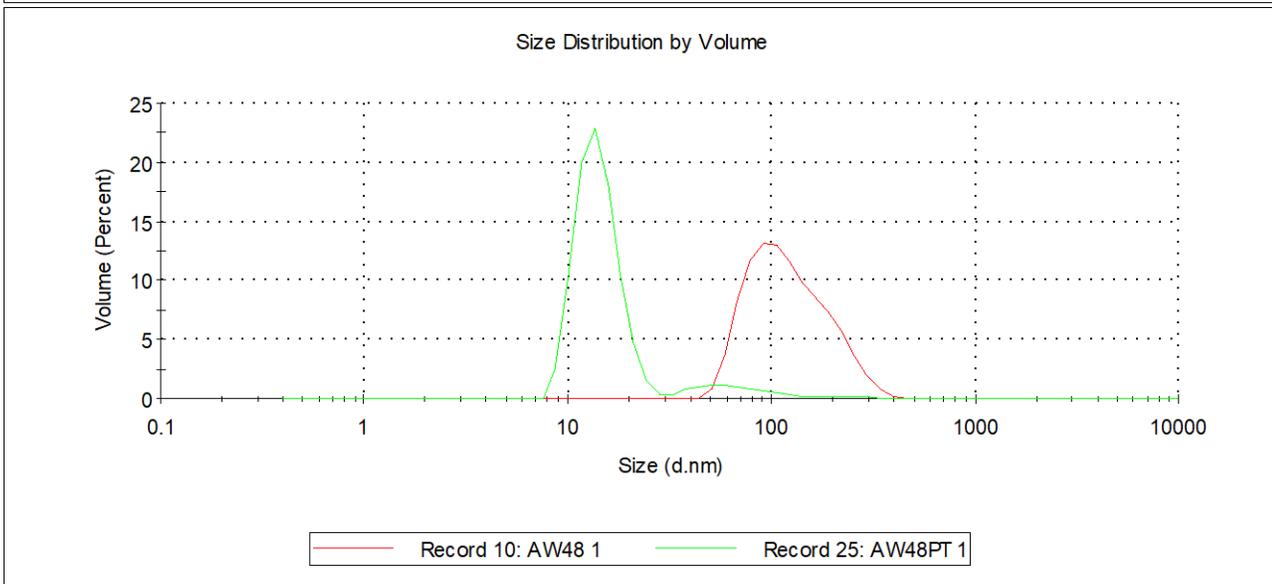
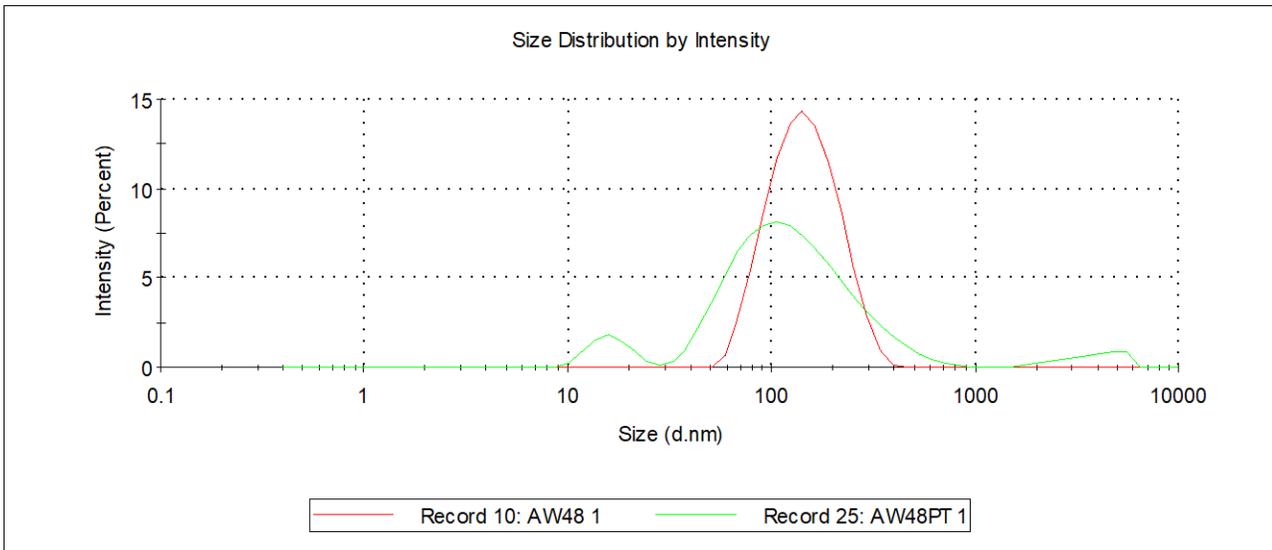


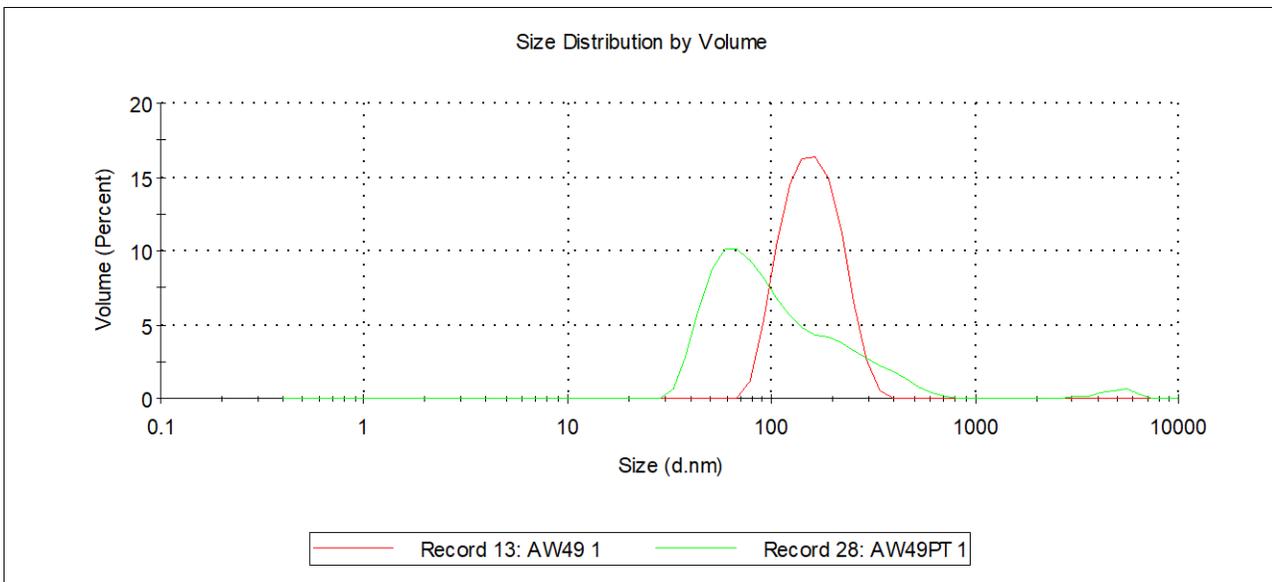
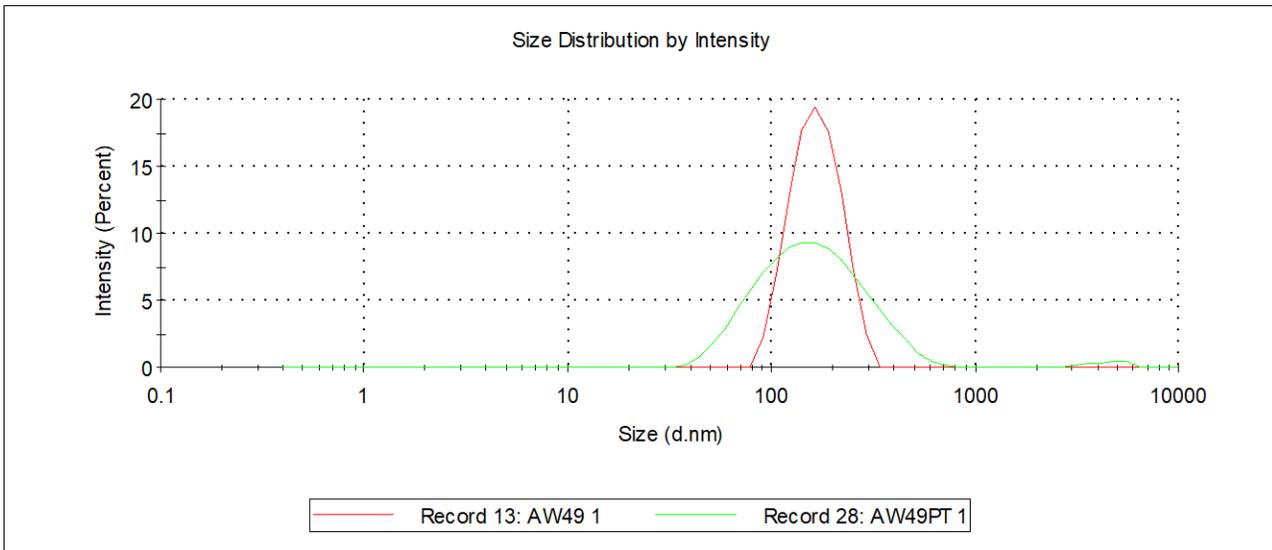






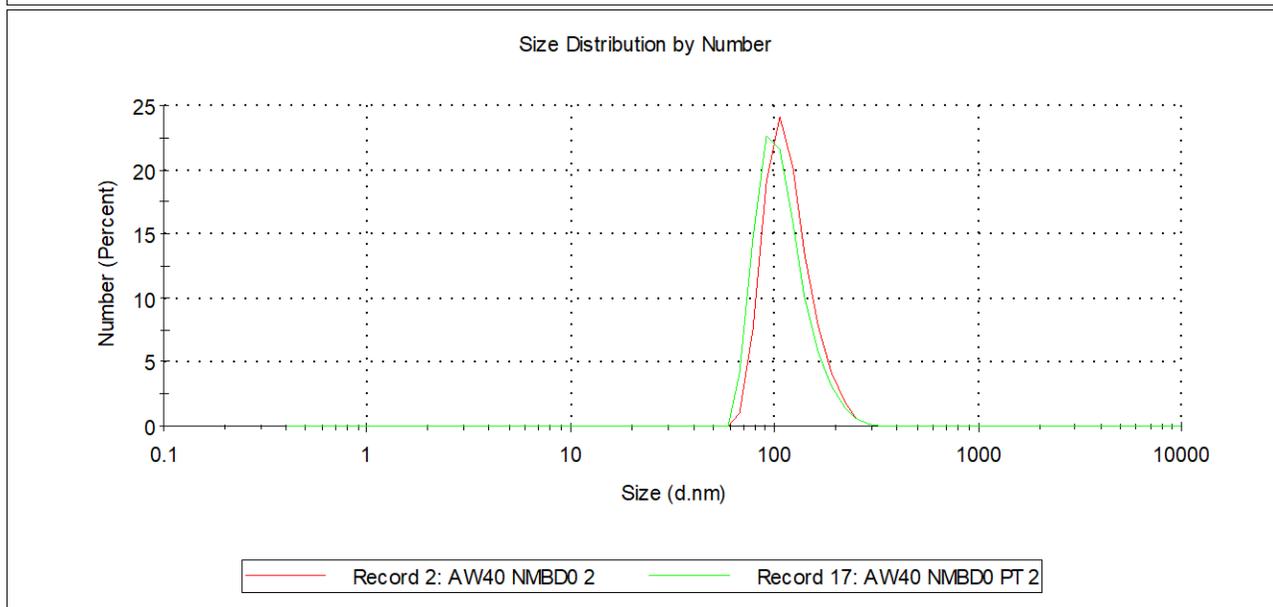
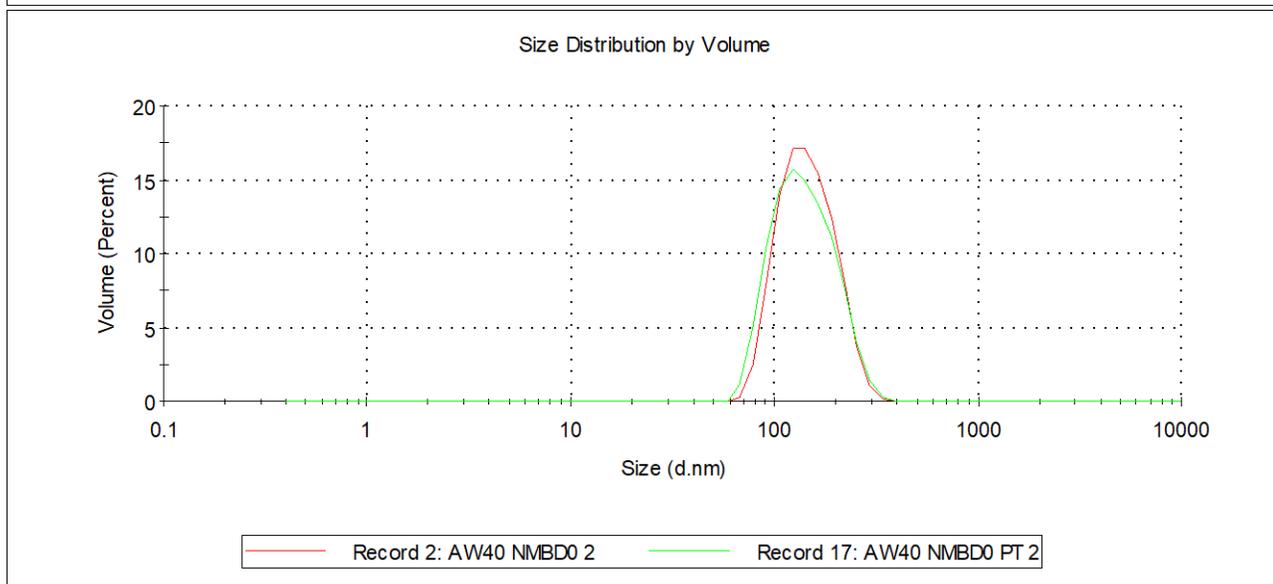
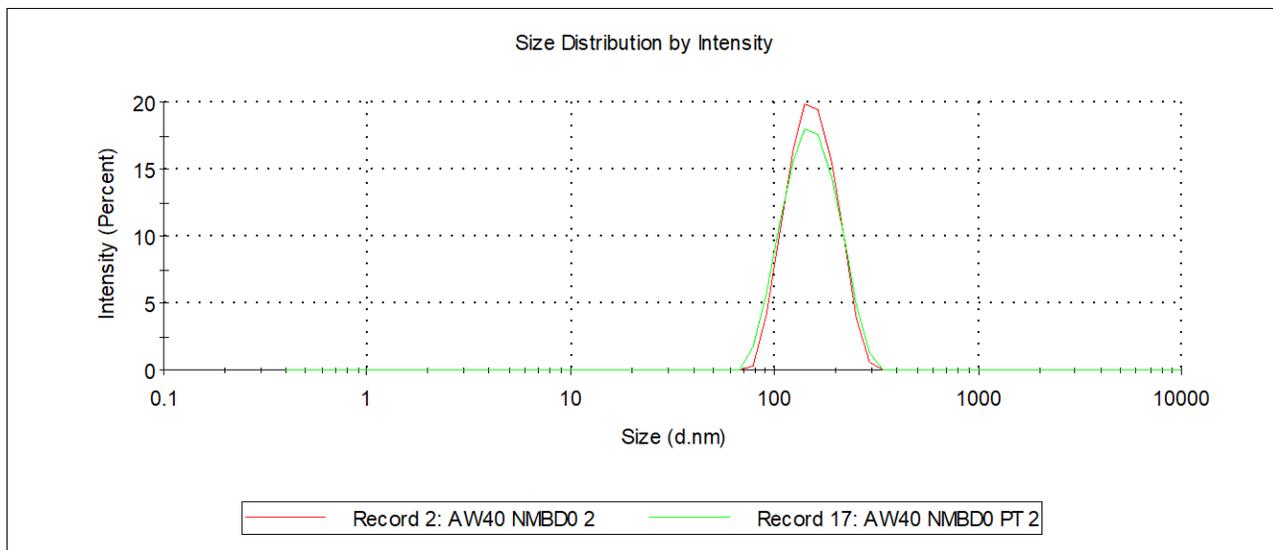


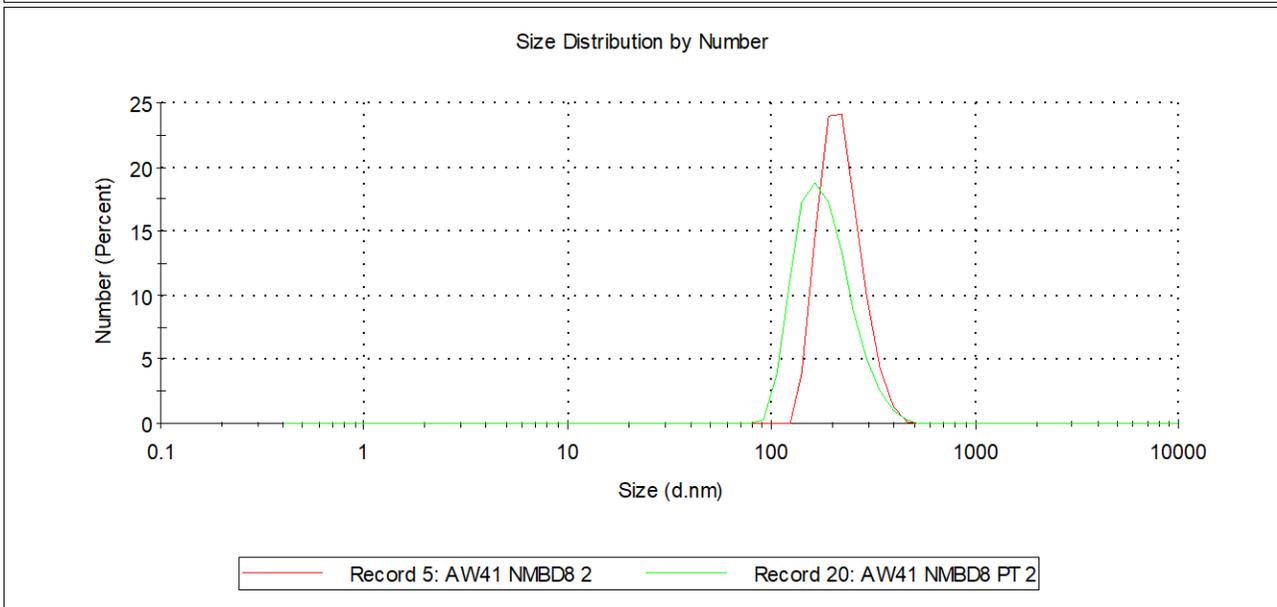
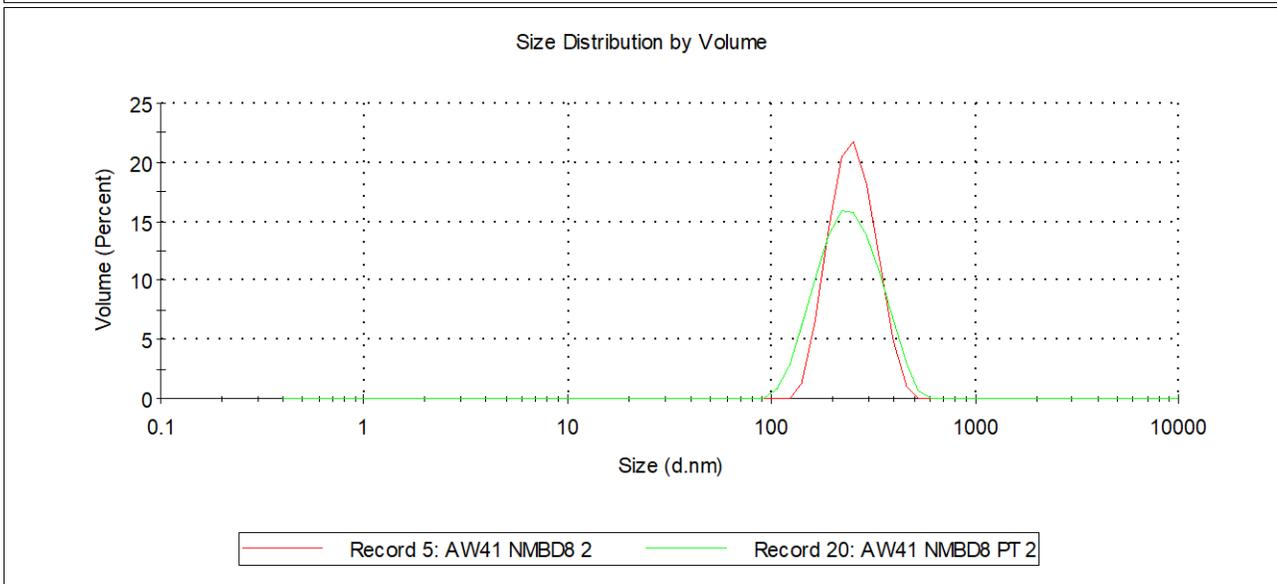
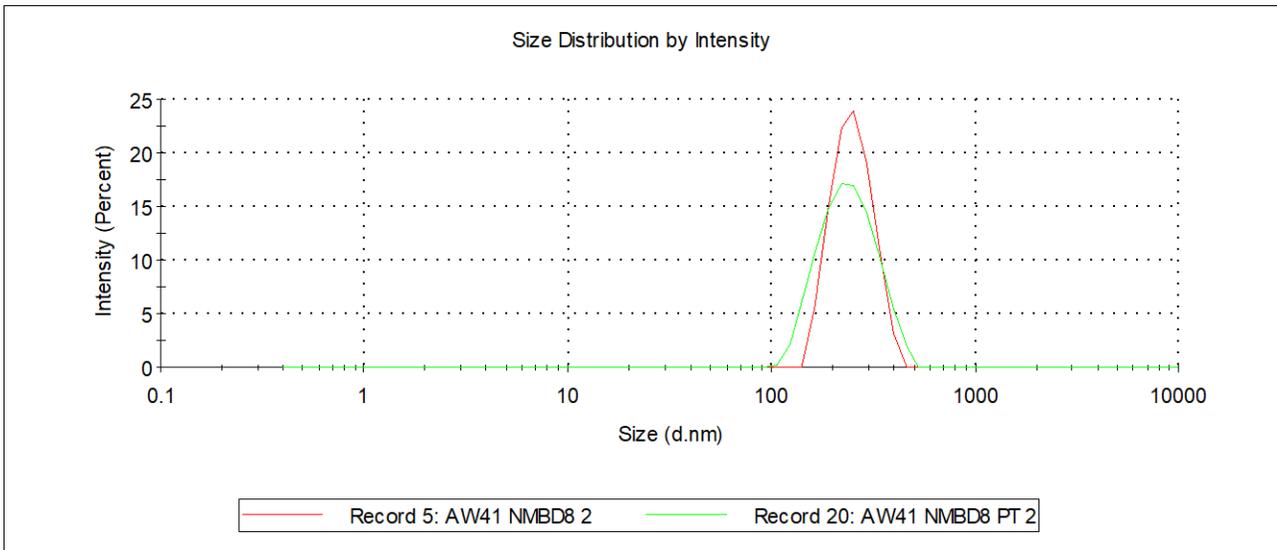


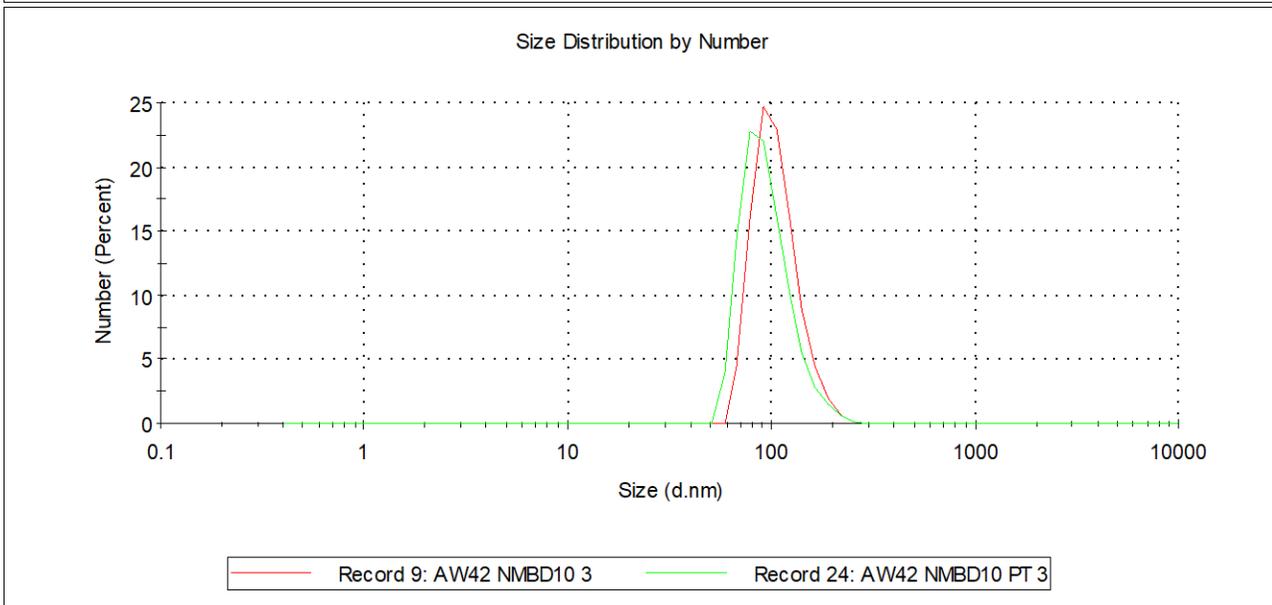
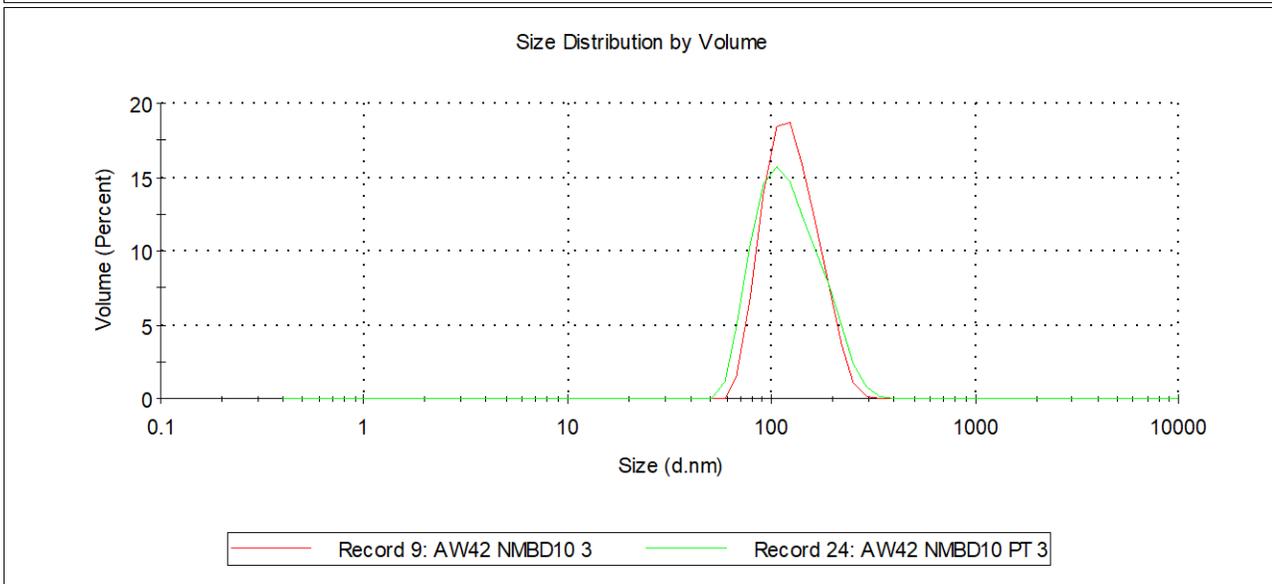
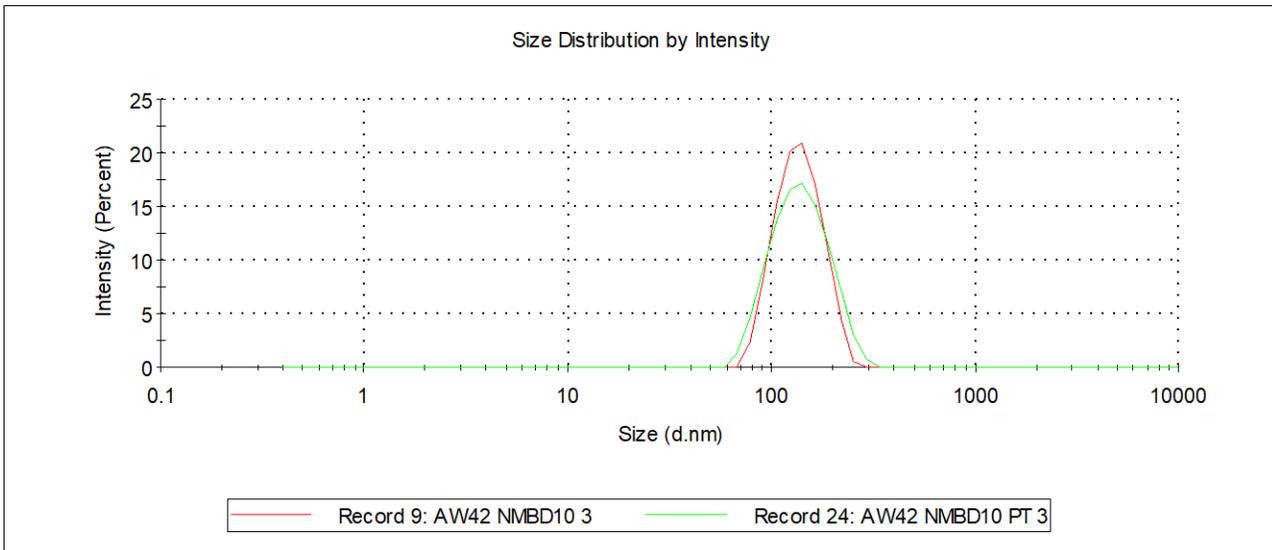


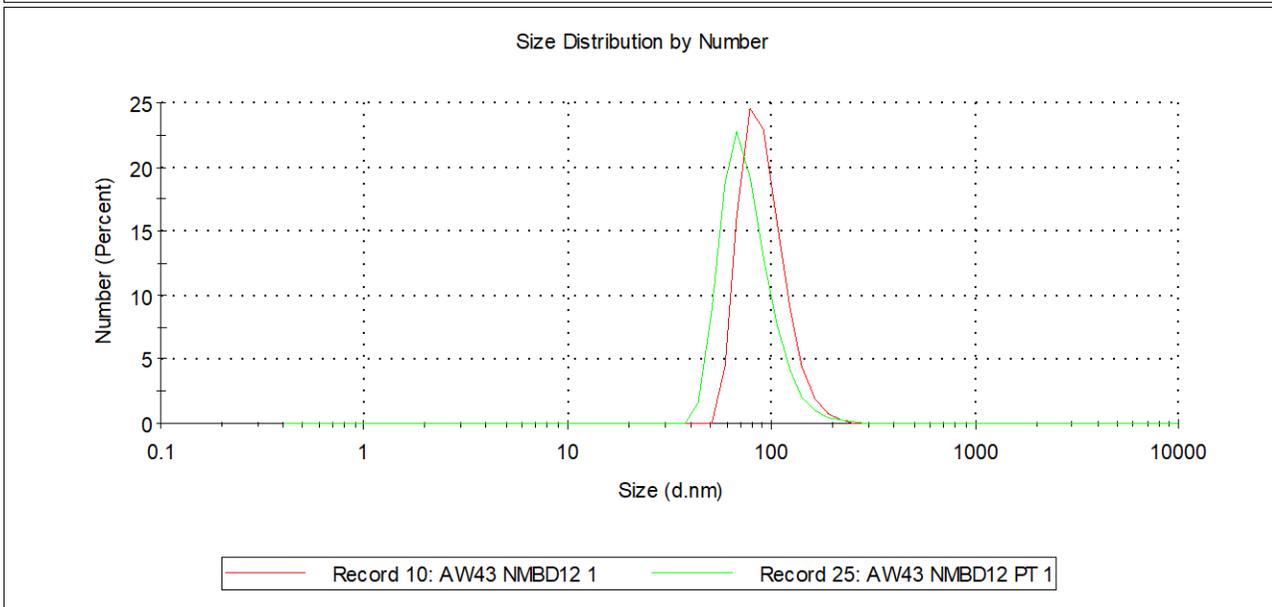
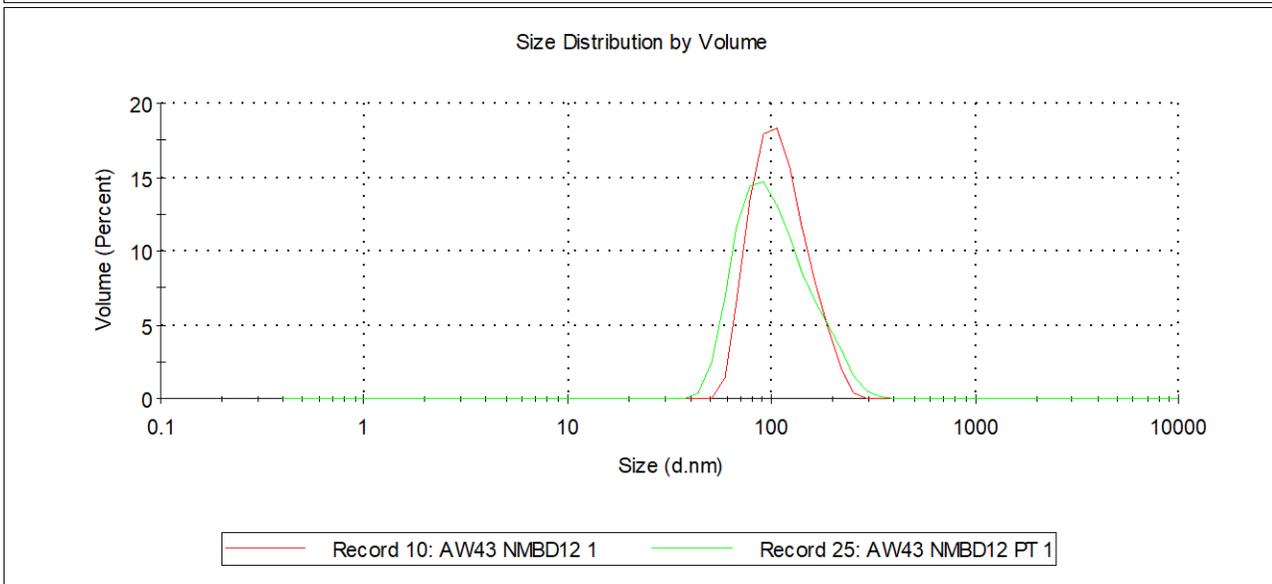
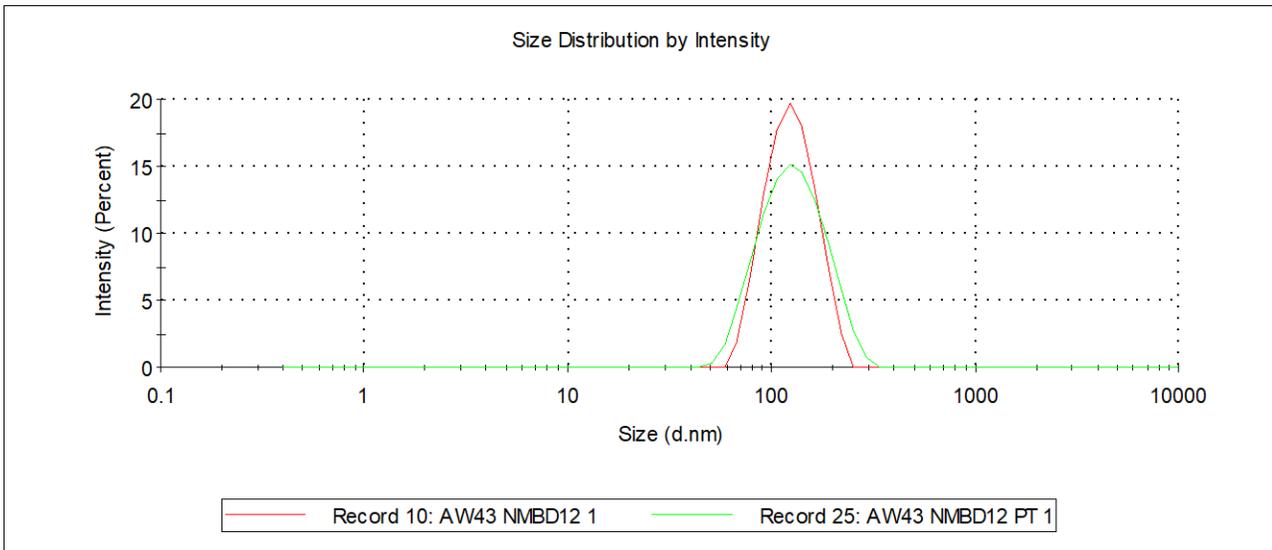
NGs de p-NIPMAm sin TEMED

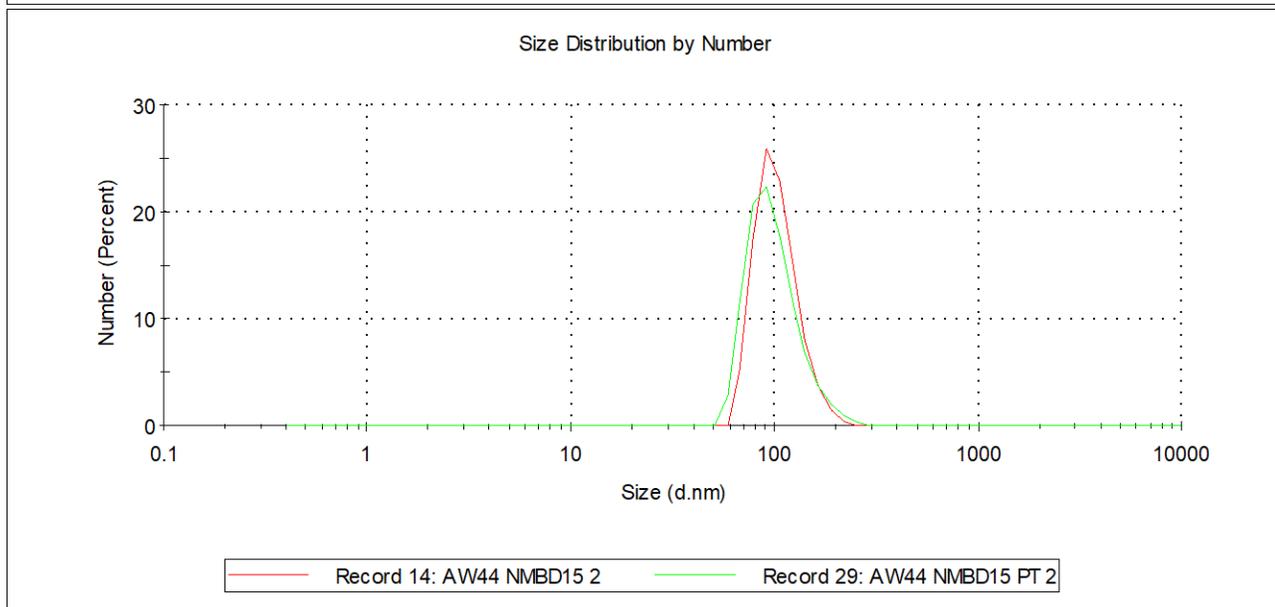
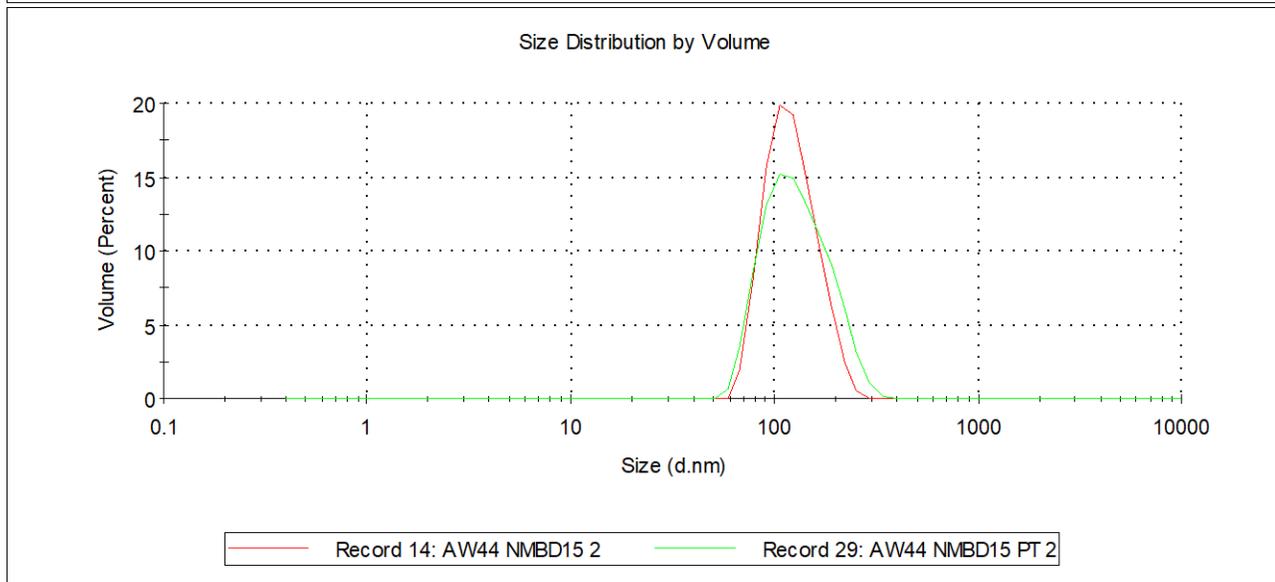
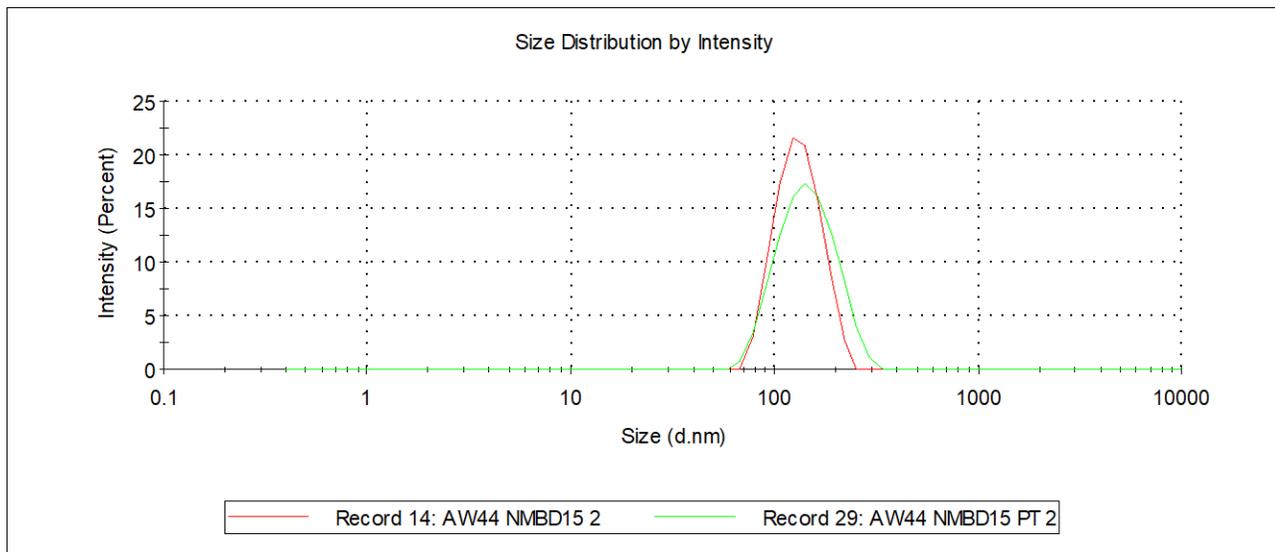
0%DAT



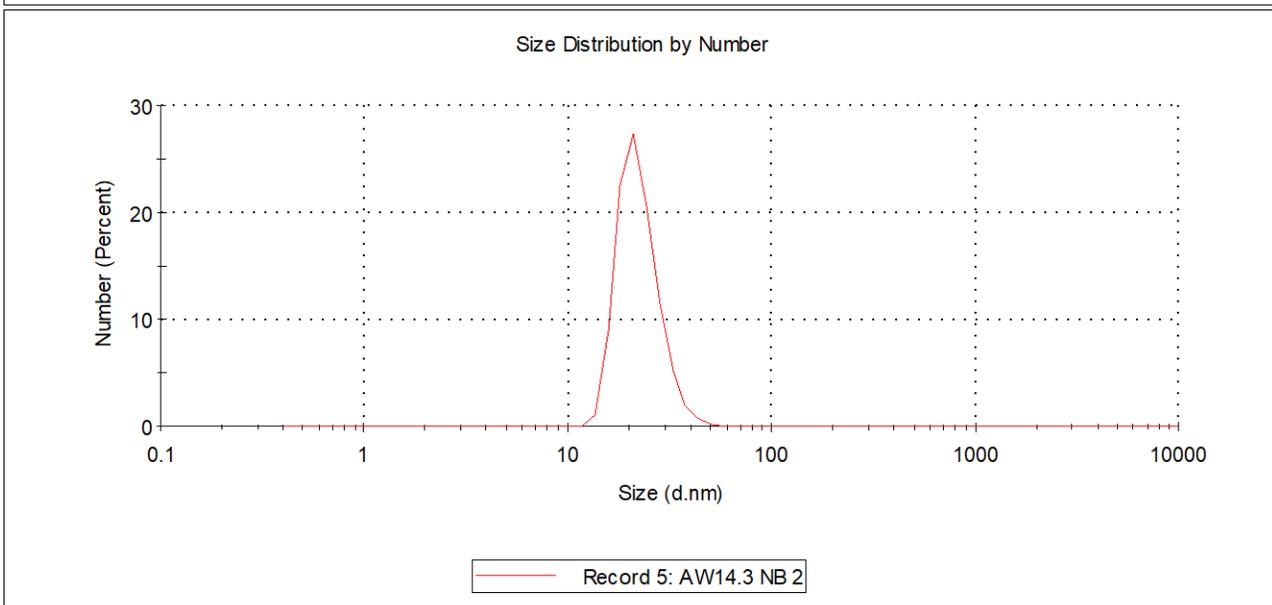
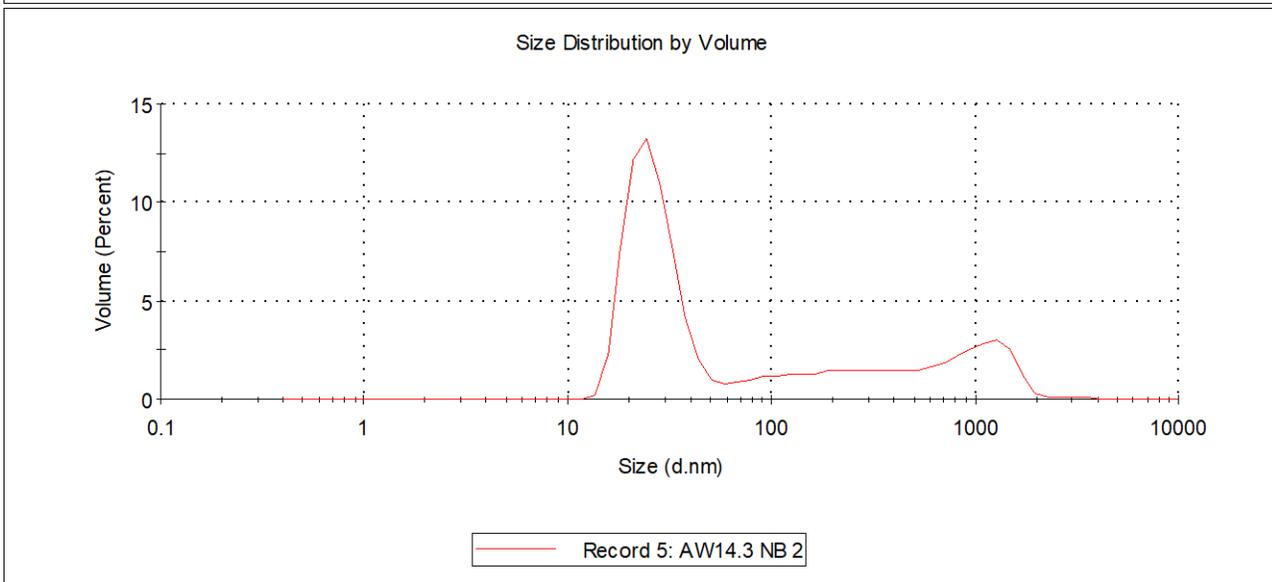
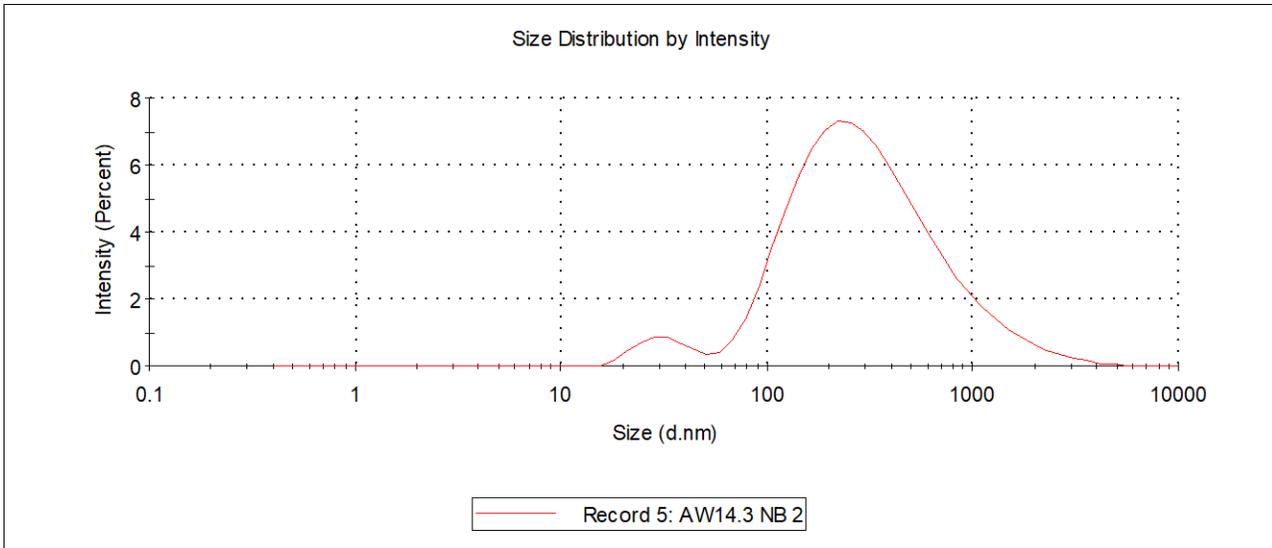


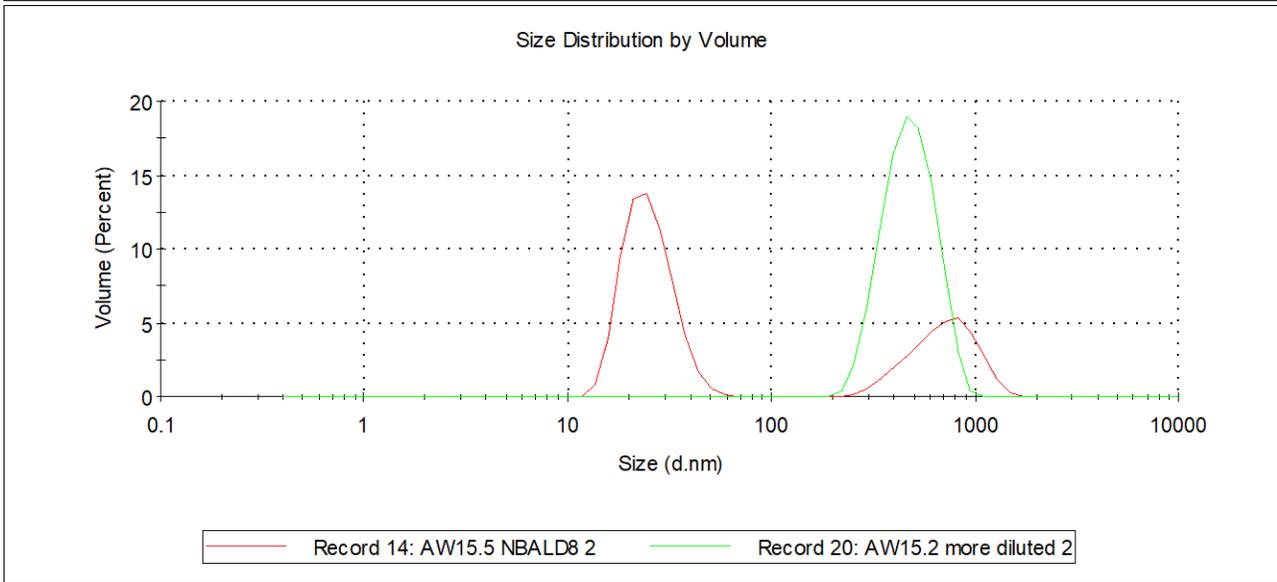
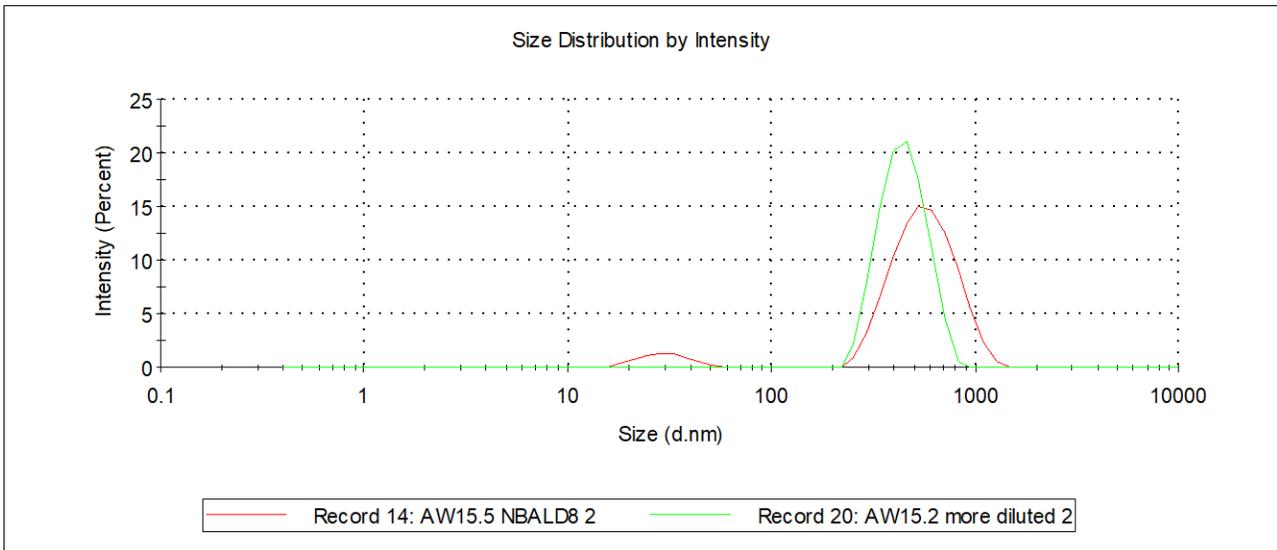


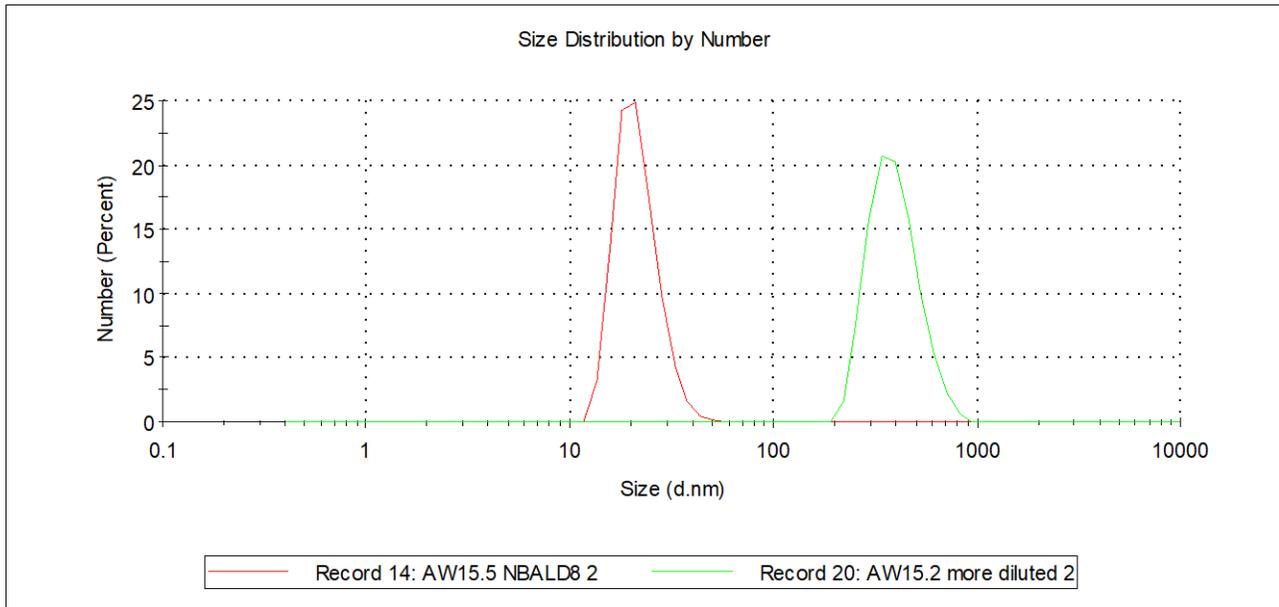




0%DAT







Sample Name: AW15.5 NBALD8 2

SOP Name: mansettings.nano

File Name: AW 15 NBD8.dts

Record Number: 14

Measurement Date and Time: lunes, 26 de marzo de 2018 17:12:45

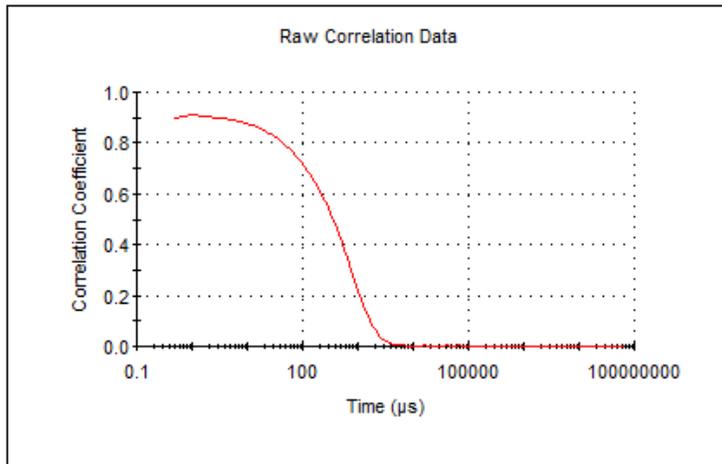
Temperature (°C): 25.0

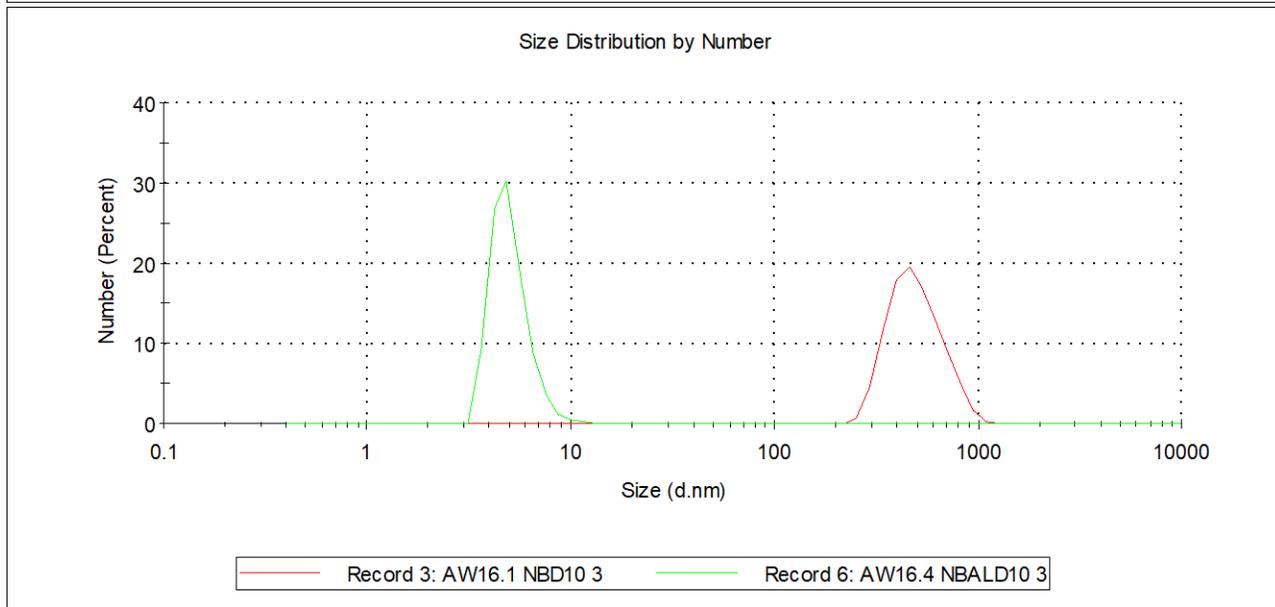
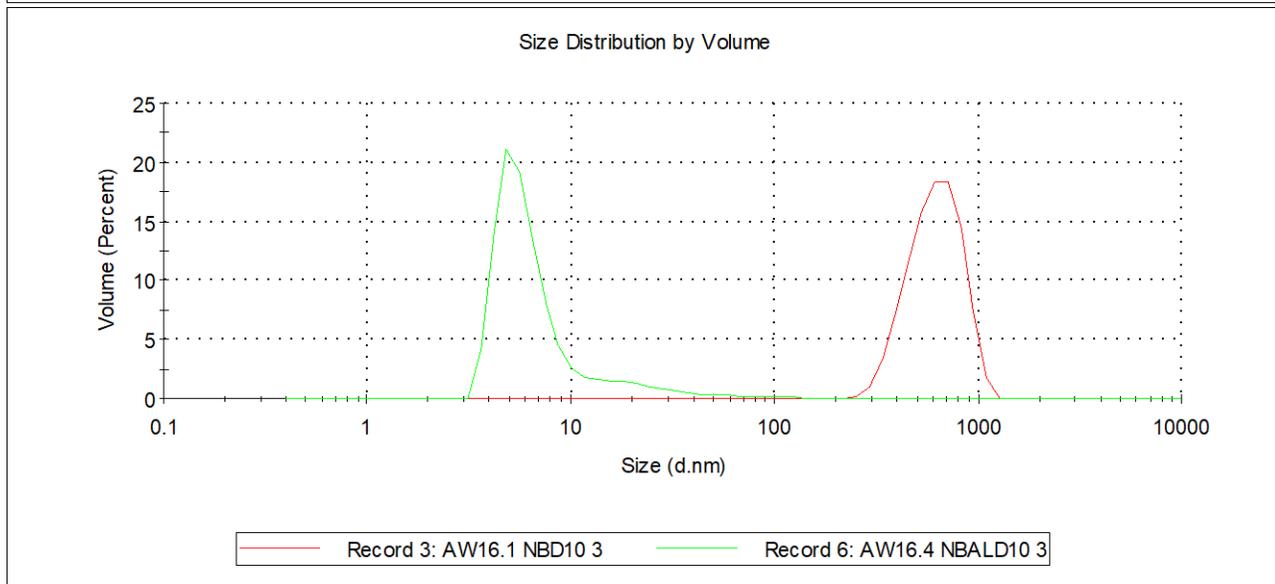
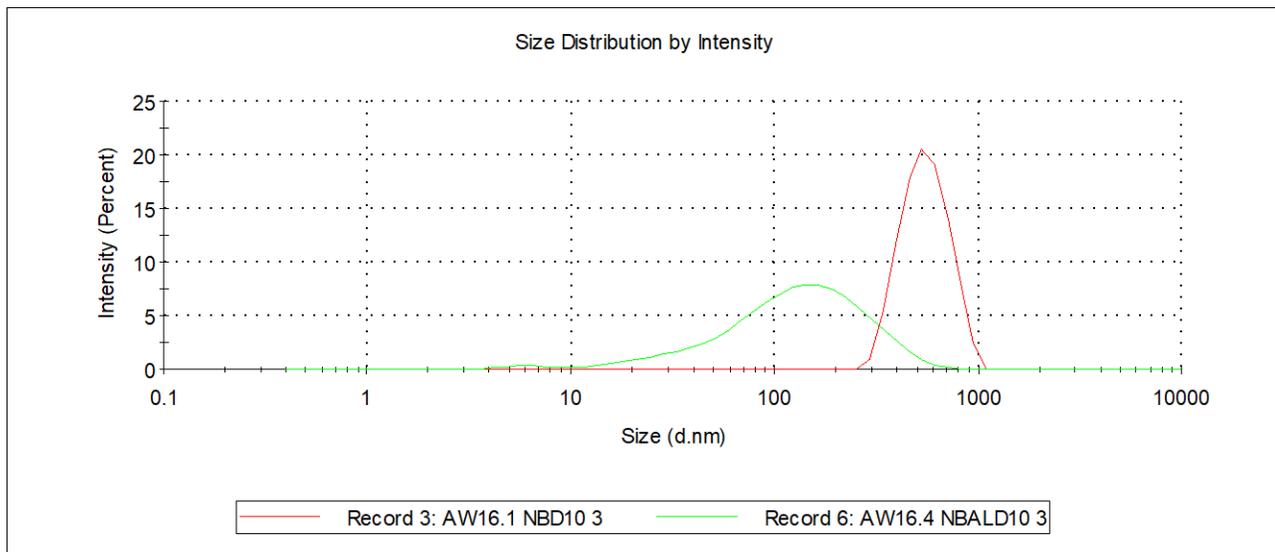
RESULT DOES NOT MEET QUALITY CRITERIA

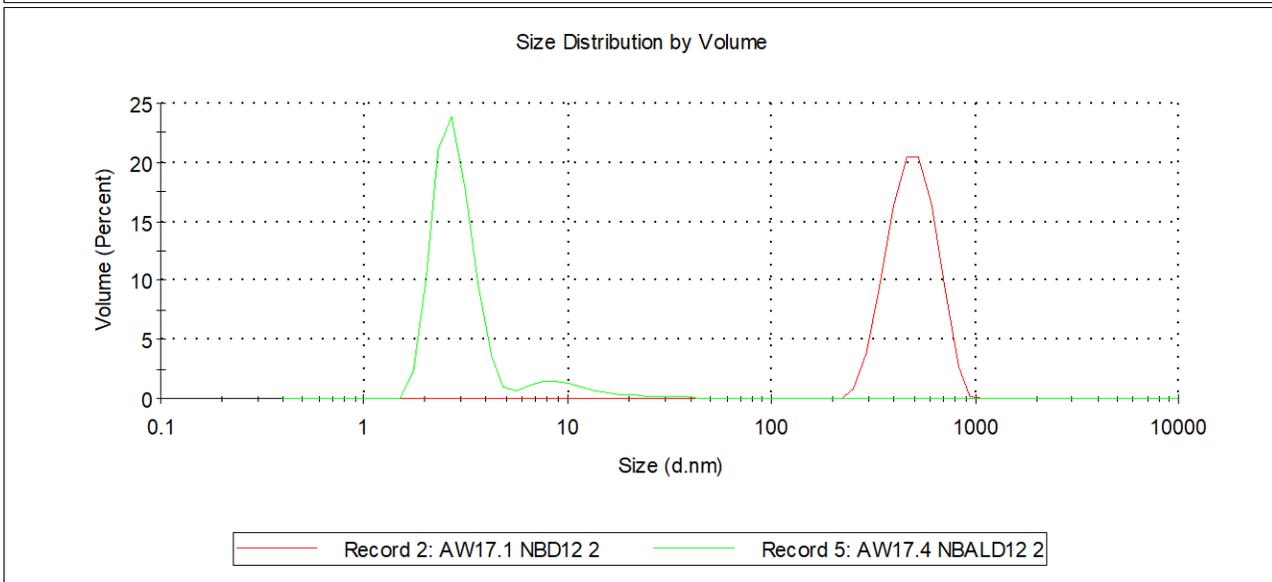
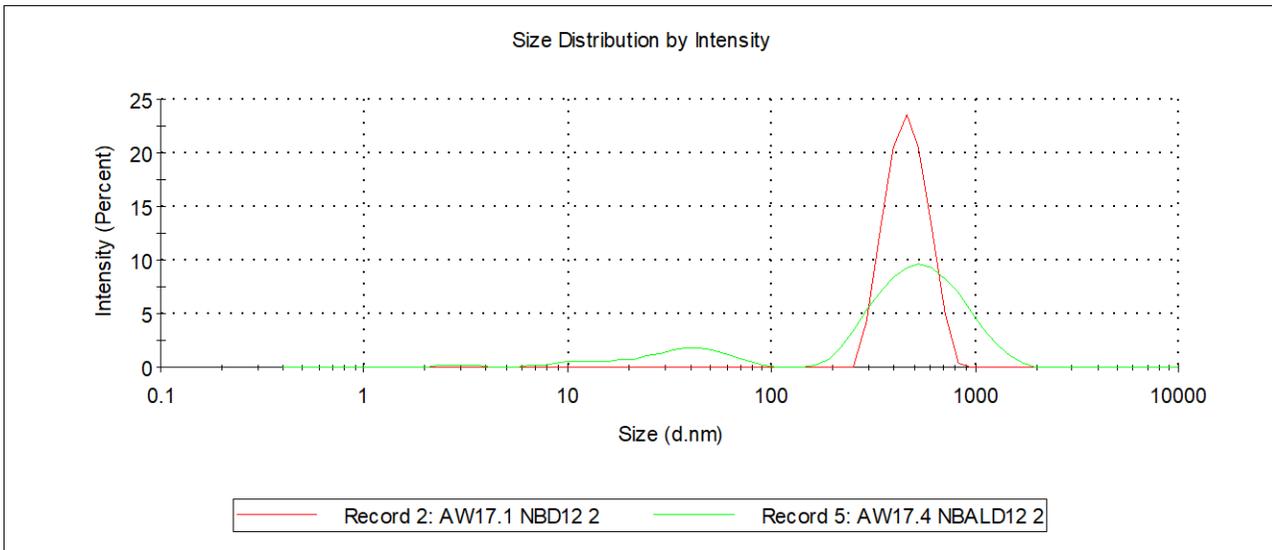
Sample too polydisperse for cumulant analysis - suggest rely on distribution analysis

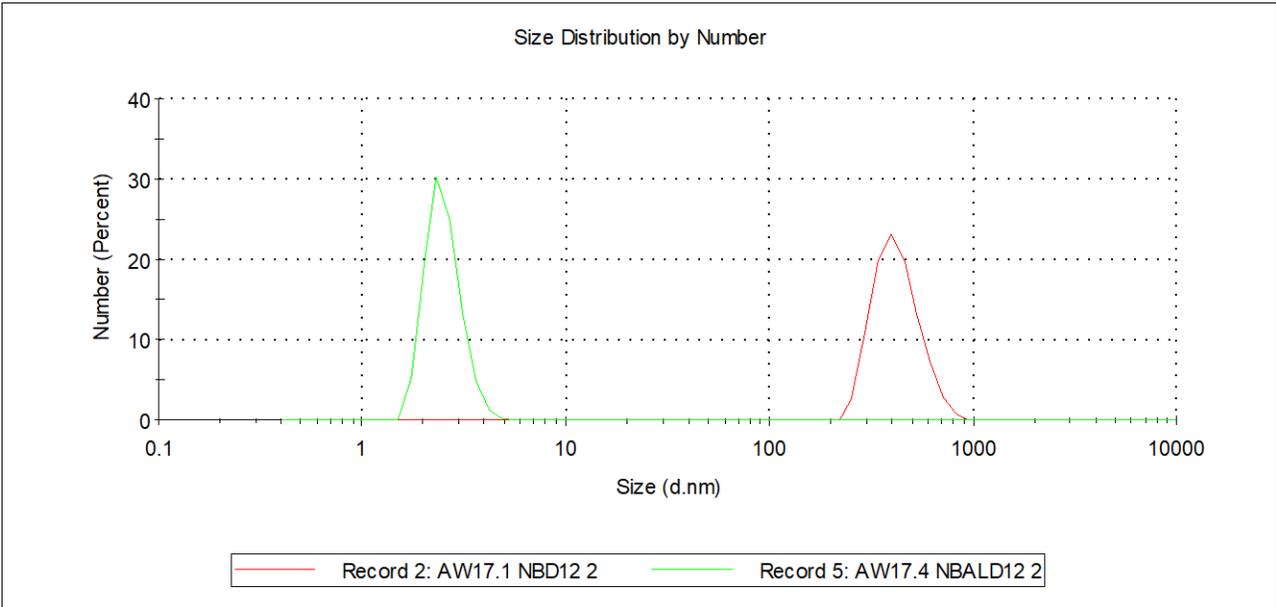
Cumulant fit error high

- * Data quality too poor for cumulant analysis
- * Sample too polydisperse for cumulant analysis
- * Inappropriate cumulant analysis settings in Research Software









Sample Name: AW17.4 NBALD12 2

SOP Name: mansettings.nano

File Name: AW 17 NBD12.dts

Record Number: 5

Measurement Date and Time: lunes, 26 de marzo de 2018 16:49:35

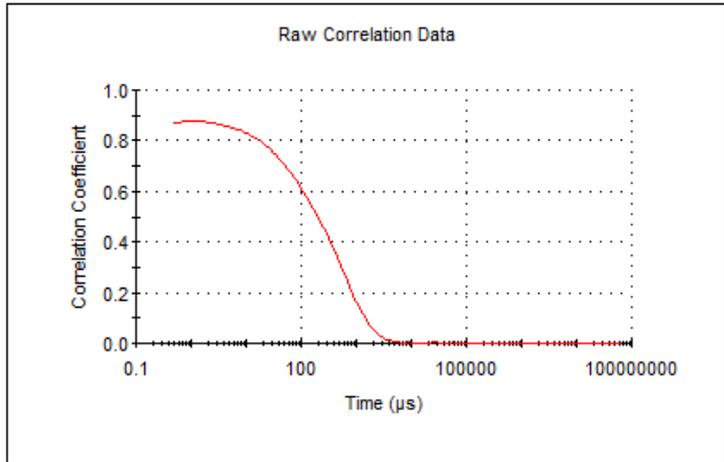
Temperature (°C): 25.0

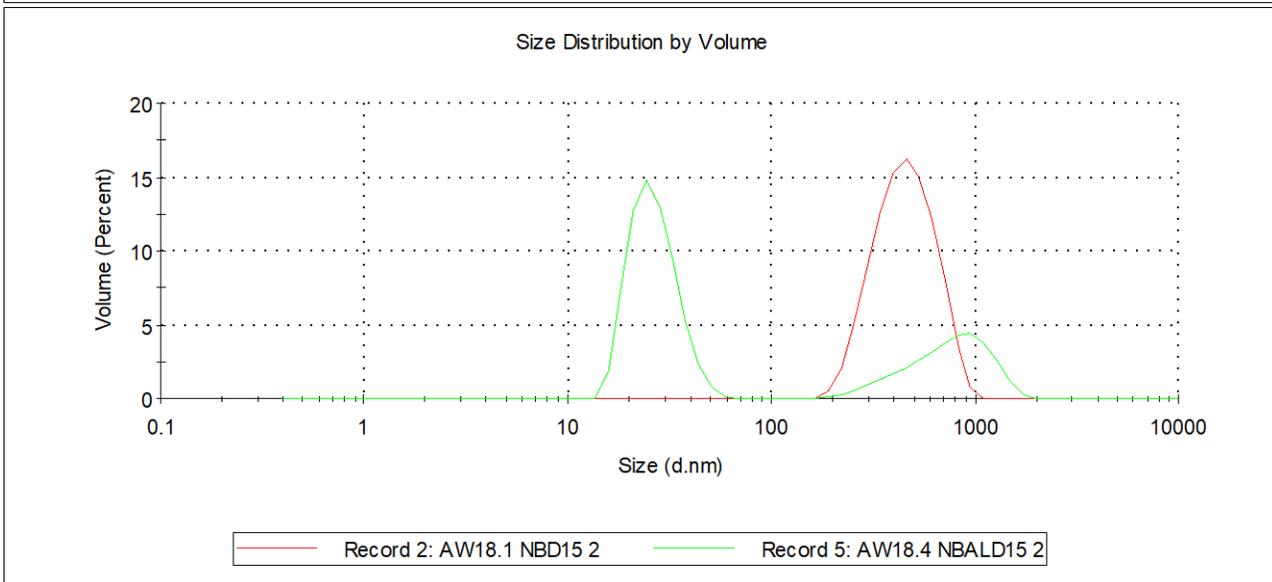
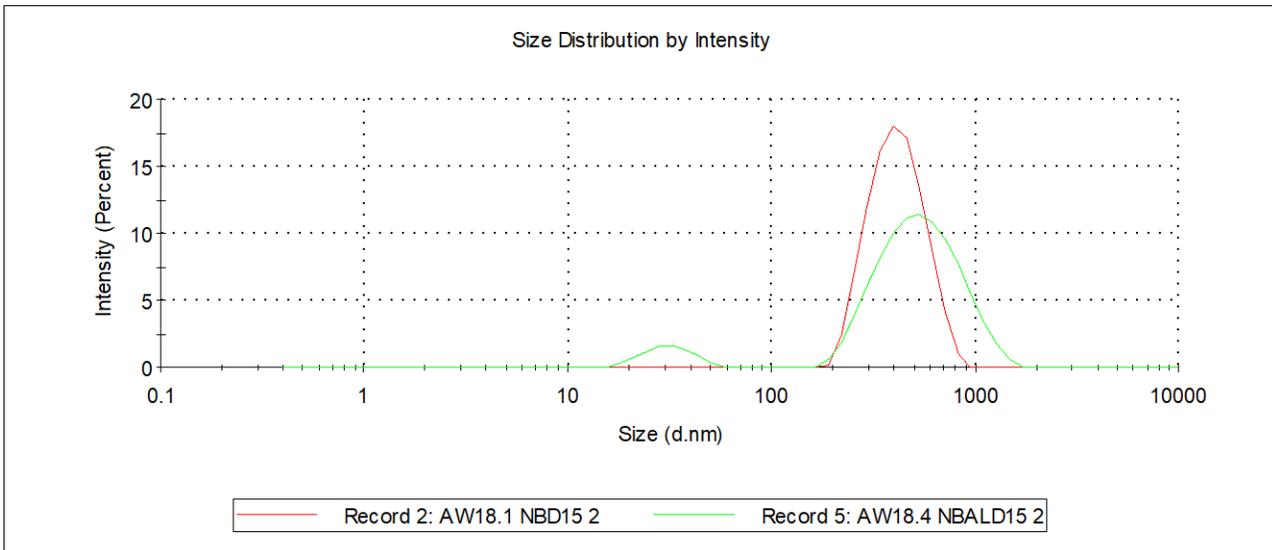
RESULT DOES NOT MEET QUALITY CRITERIA

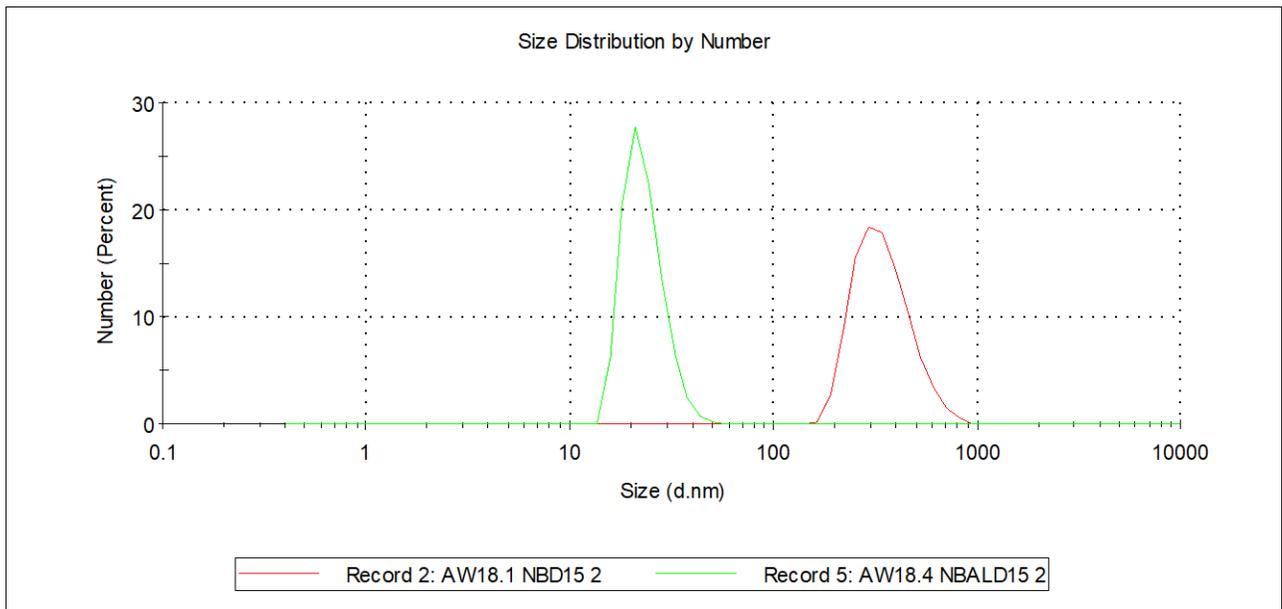
Sample too polydisperse for cumulant analysis - suggest rely on distribution analysis

Cumulant fit error high

- * Data quality too poor for cumulant analysis
- * Sample too polydisperse for cumulant analysis
- * Inappropriate cumulant analysis settings in Research Software







Sample Name: AW18.4 NBALD15 2

SOP Name: mansettings.nano

File Name: AW 18 NBD15.dts

Record Number: 5

Measurement Date and Time: lunes, 26 de marzo de 2018 17:01:05

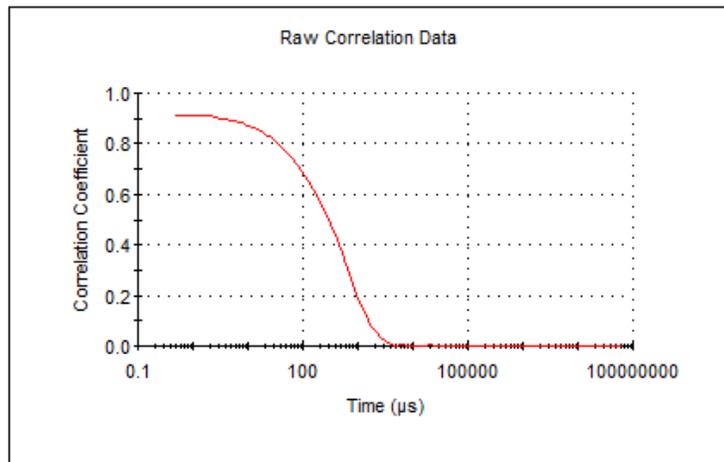
Temperature (°C): 25.0

RESULT DOES NOT MEET QUALITY CRITERIA

Sample too polydisperse for cumulant analysis - suggest rely on distribution analysis

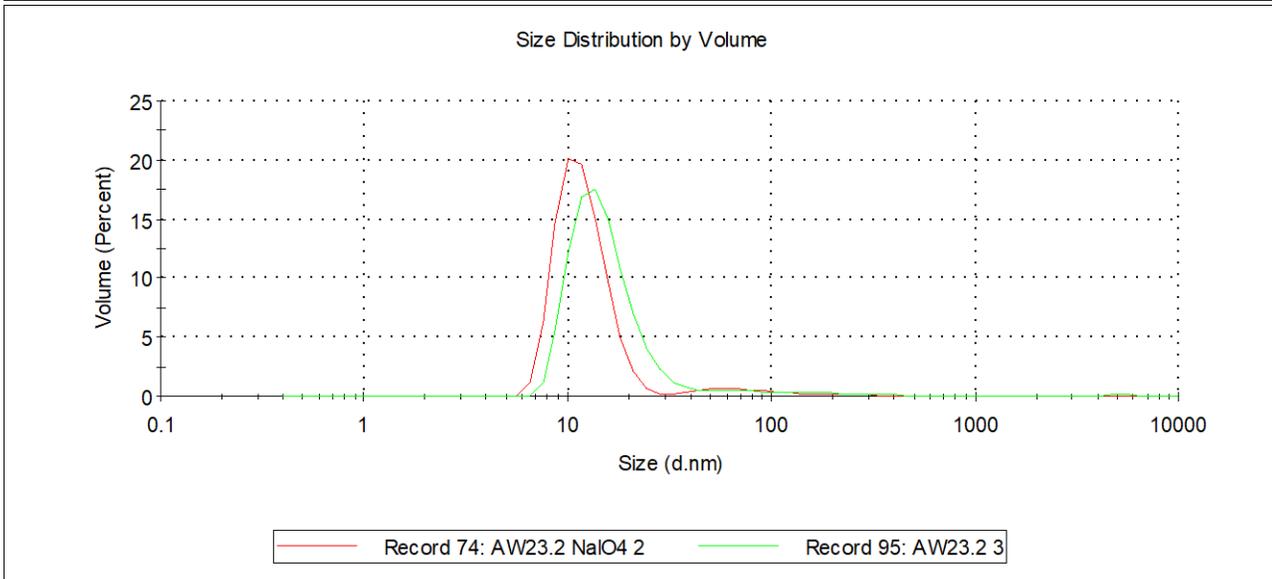
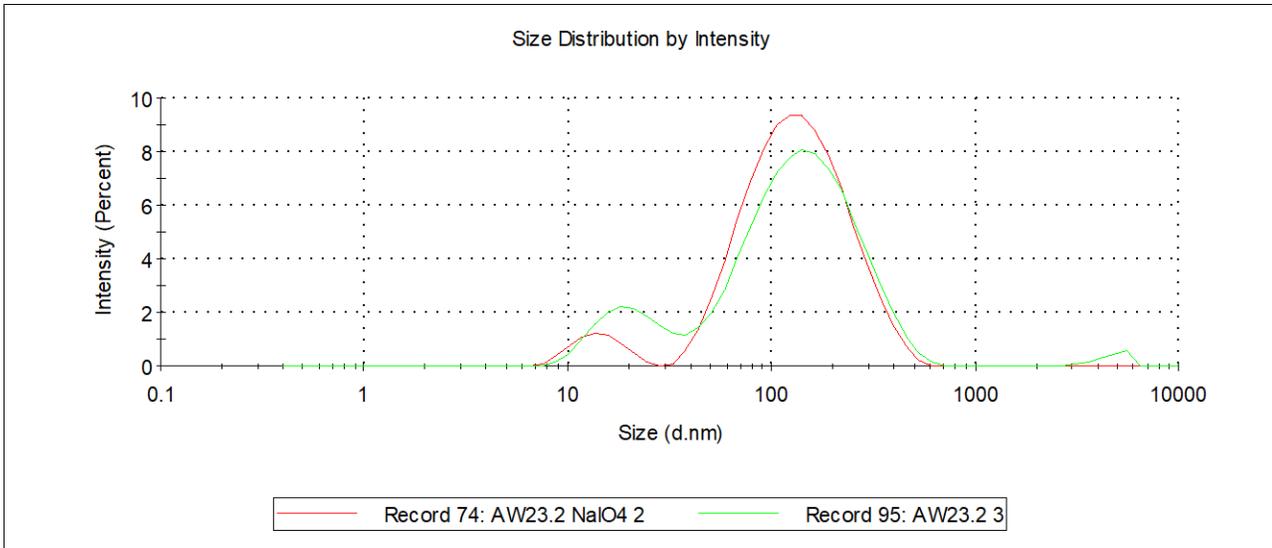
Cumulant fit error high

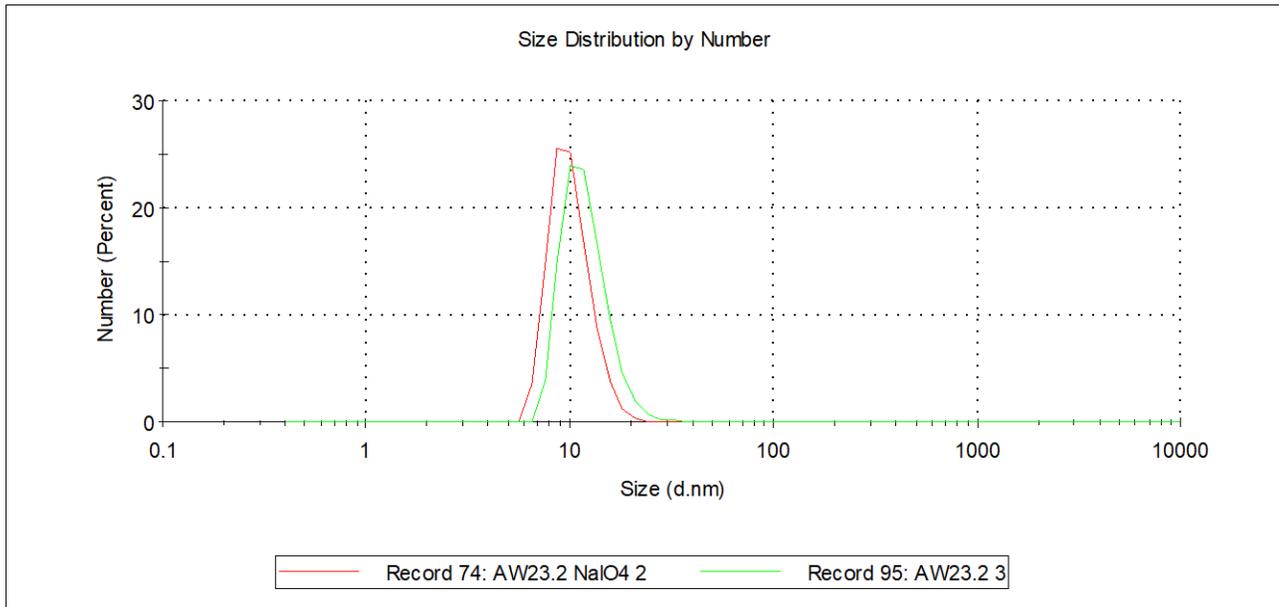
- * Data quality too poor for cumulant analysis
- * Sample too polydisperse for cumulant analysis
- * Inappropriate cumulant analysis settings in Research Software



NGs de NIPAm-co-NIPMAm sin TEMED:

0%DAT





Sample Name: AW23.2 3
SOP Name: mansettings.nano
File Name: AW19,20,21,22.dts
Record Number: 95
Measurement Date and Time: sábado, 31 de marzo de 2018 14:56:05
Temperature (°C): 25.0

RESULT DOES NOT MEET QUALITY CRITERIA

Sample too polydisperse for cumulant analysis - suggest rely on distribution analysis

- Cumulant fit error high
- * Data quality too poor for cumulant analysis
 - * Sample too polydisperse for cumulant analysis

