

Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Química Orgánica

Laboratorio de Materiales Poliméricos

Instituto de investigación y desarrollo en ingeniería de
Procesos y Química Aplicada (IPQA – CONICET)

**BIOMATERIALES EN LA NANOESCALA.
Síntesis de moléculas y polímeros
dendríticos para la obtención de nanogeles
con potencial aplicación en nanomedicina**

TESIS DOCTORAL

Anabella P. Rosso

Córdoba, 2022

Esta Tesis se presenta para optar al grado académico
de Doctor en Ciencias Químicas



Directora:
Prof. Dra. Marisa Martinelli

Comisión evaluadora:

Prof. Dra. María Dolores Rubianes

Profesora Adjunta del Departamento de Físicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Prof. Dra. Miriam C. Strumia

Profesora Emérita del Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Prof. Dra. Ariana Zoppi

Profesora Adjunta del Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Prof. Dr. Gustavo Abel Abraham

Profesor Asociado del Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Mar del Plata.

Agradecimientos

Imposible no empezar agradeciendo y recordando la gran oportunidad que nos otorga nuestro país de poder formarnos mediante la educación pública, gratuita y laica. Siempre estaré más que agradecida con la Universidad Nacional de Córdoba y con la Facultad de Ciencias Químicas, mi segundo hogar, por hacer posible el desarrollo de mis estudios. Espero que las siguientes generaciones puedan recibir y acceder a la misma educación que yo y el día que alguien quiera vulnerarla los que la hayamos disfrutado debemos ser los primeros en levantarnos y salir a defenderla.

Muchas gracias a las instituciones que financiaron este trabajo de Tesis, CONICET, FONCyT y SECyT-UNC, y en especial a CONICET por darme la oportunidad de dedicarme a lo que amo y no dejarme en banda en un momento tan crítico para todos a nivel mundial como fue la pandemia.

A la comisión asesora, Dras. Ariana Zoppi, Dolores Rubianes y Miriam Strumia gracias por todos sus aportes y sobre todo su predisposición para lo que sea que necesitara cuando lo necesitara durante todo el desarrollo de mi tesis. Cada una pudo darle una mirada distinta enriqueciéndola para que llegara a ser lo que es. Al Dr. Gustavo Abraham muchas gracias por haber aceptado ser evaluador de mi tesis.

A mi directora de Tesis Marisa, la Mari, la jefa, que más que directora ha sido una madre. Creo que hemos logrado hacer muy buen equipo a lo largo de estos 6 años. Gracias por dejarme trabajar libre a mi tiempo, pero sin dejar de demostrarme siempre que estabas presente si te necesitaba. Jamás me dejaste en banda con nada y me diste una mano siempre que lo necesite, y eso, lo valoro mucho. Me apoyaste en cada idea y propuesta, me ayudaste a crecer y me impulsaste a aprender. En serio muchas gracias por todo y sabe que esto no termina acá!

Al Laboratorio de Materiales Poliméricos (LaMaP) gracias por todo lo compartido. Son un grupo muy especial donde siempre que alguien necesite algo va a encontrar una mano amiga que le ayude o le explique. Pero también donde podés encontrar personas muy especiales con quienes compartir un café con torta por la tarde. A Miriam, como agradecerte todo lo que hiciste por mis estos años, siempre que necesite ayuda con algo estabas ahí al pie del cañón incluso aunque no te lo pidiera, siempre dándome ideas para seguir creciendo y creer en mi y en mis resultados. A la Ceci, con quien además me toco compartir consejo y quien me tuvo que aguantar todos los días en su oficina yendo con algún problema departamental nuevo, gracias por tu buena predisposición siempre y sobre todo tu confianza, fue muy lindo trabajar y compartir con vos. Gracias a Guido por meterme en el maravilloso mundo de lo nano y junto a Dave, Santi, Mati, Ani y Euti por haber compartido mesada conmigo. Ustedes son parte importante de esto también.

Al Departamento de Química Orgánica gracias por los pasillos, los días de la primavera, las tesis, los chulengos, los amigos invisibles y cada café con criollitos que compartimos solo porque sí, el día a día no sería lo mismo sin ustedes, me han enseñado y ayudado muchísimo y eso no se olvida.

Al grupete, la idea Happy, gracias por, a su manera, acompañarme en este camino. Particularmente Juli, Flor y Car, mis compañeras de locuras, mudanzas y festejos de fiestas de fin de año, esas amigas para toda la vida que podés pasar meses sin

hablarte pero que el cariño va a seguir siempre intacto hasta el próximo encuentro. Gracias por ser parte de mi vida y no faltarme nunca las adoro con el alma.

Carltoncha, mi mejor, mi hermana del alma, gracias por estar siempre, por hacerme parte de tu familia, por ser esa compañera incondicional, por las risas interminables, las flasheadas y los llantos que terminan en abrazos, te amo con el alma y sabe que todo es mucho mejor sabiendo que me estas acompañando siempre en los caminos que siga.

A los olímpicos! A esos seres que me han cambiado la vida, me han ayudado a crecer muchísimo como persona, a conocer el sistema y el mundo desde muchos otros ámbitos y puntos de vista, me enseñaron a luchar por lo que creo y a tratar siempre de hacer de este mundo un lugar mejor. Me han llenado de nuevas experiencias, charlas enriquecedoras, amistades y momentos lindos, de verdad gracias por haber aparecido en mi vida y hacerla mucho más bonita.

Al grupo comidistas, no me alcanzan las palabras para agradecerles, fueron mi motor de cada día en el doctorado, no quería faltar nunca al labo para no perderme ningún almuerzo con ustedes ni ninguna de esas charlas históricas que surgían día a día que me hacían reír hasta que me duelan los cachetes y que seguimos recordando incluso años después. Y ni hablar de las comidas super elaboradas y no tanto que hemos compartido gracias a nuestro común amor por la comida, tema del cual seguimos hablando incluso después de haber comido. En serio, agradezco fuertemente que sean parte de mi vida y mi día a día. JC uno de mis ahijados en la ciencia gracias por tantas risas y chistes tontos. Panchex, que decirte al principio nos odiábamos y hoy en día te has vuelto mi punto de descarga mental y emocional en el lab, el ser a quien molestar día a día y un apoyo muy importante, en serio gracias por estar. Ani, la Nana2, mi otra ahijada en la ciencia, mi nueva cómplice dentro del laboratorio gracias por todo lo compartido. Alechus, un referente en militar aquello en lo que uno cree, me has enseñado un montón y me has hecho crecer como persona así que gracias de verdad. Tincho querido, tantos momentos divertidos, tantas charlas profundas, y a pesar de la distancia seguís estando presente así que gracias por todo. Roxita, Roxy love, tantas cosas compartidas, tantas charlas, reuniones y vacaciones, gracias por tu amistad tan bella. Luri, desde la primera vez que fuiste mi ayudante cuando aún estaba en la carrera hemos ido construyendo una amistad cada vez más hermosa, hemos compartido tanto y aunque ahora estas lejitos físicamente siempre has estado cerquita mío así que gracias. Micu, mi amiga bella, me has enseñado tanto del mundo académico y me has demostrado que siempre puedo contar con vos dentro y fuera del lab, gracias por todo, pero, sobre todo, por ser como sos. Ferchula, mi bruja peluquera, aunque a veces te desaparezcás siempre has sido parte importante de mi vida y también me has enseñado y cuidado un montón así que gracias!

Dave, fuiste mi primer amiguito en el grupo jeje, con quien mas me toco compartir mesada, quien me ha hecho correr alrededor de las mesadas para que no me hiciera cosquillas, con quien he compartido charlas de todo tema habido y por haber, congresos, cursos, dendrones, te volviste uno de mis pilares durante todo el doctorado, el primero a quien preguntarle la mayoría de las cosas, así que de verdad gracias por todo eso y mucho más.

Euti, mi cómplice y compañero en cosas nuevas y por probar, gracias por las juntadas a comer, por esas charlas que solo podíamos tener entre nosotros, por meterme

siempre que había que hacer articulación o extensión, y sabe que, aunque me hayas hecho renegar mucho, me has enseñado y acompañado un montón así que gracias!

Giulita, mi concu hermosa, como agradecer todo lo vivido, todos los viajes, las horas de Friends, las comidas juntas, los llantos y risas compartidas, las charlas en el lab cuando me aburría y me cruzaba al 014 y no te dejaba trabajar jeje, gracias por tu hermosa amistad, todo lo vivido y sobre todo lo aprendido.

A esas personas que me he cruzado en la vida y con los que he entablado amistades especiales. Los chicos de la licenciatura sobre todo Rodri y Nachito con los que me ha tocado compartir caminos desde los últimos años de la facultad. Huguito Ruiz y Tin esos amigos random que quedan después del cole y que me siguen acompañando. Mica y Nani las amigas del alma que me trajo el handball. Lucio, Adri, Peta, Ale, Juli y Dani gracias por todo lo compartido, el apoyo y por siempre estar.

Gracias a todas esas personas que pasaron por mi vida durante estos 6 años y que hicieron su aporte para que yo sea quien soy hoy en día, algunos siguen siendo parte de mi día a día y otros por distintas cuestiones han seguido otros rumbos, pero todos han aportado su granito de arena para que yo sea quien soy hoy en día, así que a todos ellos gracias!

A mi familia por todo el apoyo y por acompañarme en todo este camino, mis tíos, abuelos, hermanos y sobre todo a mi mamá, mi fan número uno quien siempre me impulso a ser independiente, a seguir estudiando, a seguir creciendo como persona y me apoyo en cada decisión que he tomado así que por todo eso y mucho más gracias.

Y por último a Lucas, mi compañero de vida, el mejor compañero que uno podría tener para sobrellevar una cuarentena y hacer y rehacer una tesis. Gracias por estar a mi lado en los peores momentos y compartir conmigo los buenos, por ayudarme con cada inconveniente que se me cruzo, por hacer que mis días malos mejoren al llegar a casa con vos y el Chucho, por hacerme mejor persona y demostrarme siempre lo feliz y orgulloso que te ponen mis logros. Gracias por ser la maravillosa persona que sos y por compartir la vida conmigo. No importa lo que siga de acá en adelante siempre que lo enfrentemos juntos, mientras tenga tu apoyo todo va a estar bien. Gracias de verdad porque esta Tesis no sería lo que es sin vos.

Índice de contenidos

Abreviaturas	V
Resumen	IX

Sección I: Aspectos generales

Introducción General	3
Biomateriales	3
¿Qué son los biomateriales?	3
Los primeros biomateriales	4
Nanotecnología, nanomateriales y nanomedicina	6
Biomateriales poliméricos	10
Biomateriales dendríticos	14
Bibliografía	19
Objetivos generales	24
Materiales y métodos	26
Materiales	26
Métodos	27

Sección II: Resultados

Parte I: Moléculas dendríticas	33
Introducción	35
Bibliografía	37
Capítulo 1: Síntesis y caracterización de estructuras dendríticas	39
1. 1. Introducción	39
1. 2. Objetivos específicos	42
1. 3. Síntesis y caracterización de un monómero dendrítico a partir de Amina Behera	42
1. 3. 1. Parte experimental	42
1. 3. 1. 1. Acrilación de Amina Behera: obtención de di-tert-butil-4-acriloilamine 4-[2-(tert-butoxi-carbonil)etil]heptanodioato (ABA)	42
1. 3. 1. 2. Hidrólisis de los grupos éster: obtención de ácido 4-acrilomida-4-(2-carboxi etil)heptanodioico (ABC)	43
1. 3. 2. Resultados y discusión	44

1. 4. Síntesis y caracterización de un monómero dendrítico a partir de HEMA y Weis	49
1. 4. 1. Parte experimental	49
1. 4. 2. Resultados y discusión	50
1. 5. Síntesis y caracterización de un monómero dendrítico a partir de NAT y Weis	53
1. 5. 1. Parte experimental	53
1. 5. 1. 1. Obtención de NAT-Weis	53
1. 5. 1. 2. Hidrólisis de los grupos ter-butilo: obtención de NAT-Weish	53
1. 5. 2. Resultados y discusión	54
1. 6. Síntesis y caracterización del monómero dendrítico de amina Behera de segunda generación (Bis Behera)	58
1. 6. 1. Parte experimental	58
1. 6. 1. 1. Obtención de Cloruro de ácido del ácido 5-nitroisoftálico (Cl-5NI)	58
1. 6. 1. 2. Obtención de BisBehera-NO ₂ (BBNO ₂)	58
1. 6. 1. 3. Hidrogenación de BBNO ₂ : Obtención de BBAmينو (BBNH ₂)	59
1. 6. 2. Resultados y discusión	59
1. 7. Conclusiones parciales	63
1. 8. Bibliografía	64
Parte II: Nanogeles	67
Introducción	69
Bibliografía	73
Capítulo 2: Síntesis y caracterización de nanogeles dendríticos a partir de N-vinilcaprolactama y un dendrón	75
2. 1. Introducción	75
2. 2. Objetivos específicos	78
2. 3. Parte experimental	79
2. 3. 1. Síntesis y caracterización de NGs homopoliméricos a partir de VCL	79

2. 3. 2. Síntesis y caracterización de NGs dendríticos a partir de VCL y ABA o ABC	80
2. 4. Resultados y discusión	81
2. 4. 1. Síntesis y caracterización de NGs homopoliméricos a partir de VCL	81
2. 4. 2. Síntesis y caracterización de NGs dendríticos a partir de VCL y ABA o ABC	90
2. 5. Conclusiones parciales	103
2. 6. Bibliografía	105
Capítulo 3: Síntesis y caracterización de nanogeles dendronizados a partir de polímeros de origen natural	109
3. 1. Introducción	109
3. 2. Objetivos específicos	111
3. 3. Parte experimental	111
3. 3. 1. Síntesis de los NGs	111
3. 3. 2. Dendronización de los NGs	113
3. 3. 3. Hidrólisis de grupos ter-butilo	113
3. 4. Resultados y discusión	114
3. 5. Conclusiones parciales	125
3. 6. Bibliografía	126
Capítulo 4: Síntesis y caracterización de nanogeles híbridos a partir materiales de origen natural y sintético	131
4. 1. Introducción	131
4. 2. Objetivos específicos	133
4. 3. NGs obtenidos a partir de polivinilalcohol y polifenoles	133
4. 3. 1. Parte experimental	133
4. 3. 2. Resultados y discusión	134
4. 4. NGs de Gelatina injertados con VCL y entrecruzados con AT.	139
4. 4. 1. Parte experimental	139
4. 4. 2. Resultados y discusión	140
4. 5. Conclusiones parciales	148
4. 6. Bibliografía	150
Parte III: Aplicaciones Biomédicas	153
Introducción	155

Bibliografía	158
Capítulo 5: Estudio de aplicación de los NGs orientado a la nanomedicina	159
5. 1. Introducción	159
5. 2. Objetivos específicos	166
5. 3. Parte experimental	167
5. 3. 1. Estudio de la eficiencia de los NGs para la encapsulación y la liberación de verde de malaquita	167
5. 3. 2. Análisis de citotoxicidad de los NGs en células vaginales	168
5. 3. 3. Estudio de la capacidad de los NGs para la inhibición de infección del virus de VIH	168
5. 4. Resultados y discusión	169
5. 4. 1. Estudio de la eficiencia de los NGs para la encapsulación y la liberación de verde de malaquita	169
5. 4. 2. Análisis de citotoxicidad de los NGs en células vaginales	174
5. 4. 3. Estudio de la capacidad de los NGs frente a la inhibición de infección del virus de VIH	175
5. 5. Conclusiones parciales	179
5. 6. Bibliografía	181
<hr/>	
Sección III: Consideraciones finales	
<hr/>	
Conclusiones generales	193
Proyecciones	197
Producción científica	198

Abreviaturas

AB	Di- <i>ter</i> -butil-4-amino-4-(3-(<i>t</i> -butoxi)-3-oxopropil)heptanodiató, Amina de Behera
ABA	Di- <i>ter</i> -butil-4-acriloilamine 4-[2-(<i>ter</i> butoxicarbonil)etil]heptanodioato, Amina de Behera acrilada
ABC	Ácido 4-acrilomida-4-(2-carboxi etil)heptanodioico, Amina de Behera acrilada hidrolizada
Ac-5NI	Ácido 5-nitroisoftálico
AG	Ácido gálico
AOT	Dioctil sulfosuccinato de sodio
APS	Persulfato de amonio
AT	Ácido Tánico
ATRP	Polimerización radicalaria controlada por transferencia atómica
BBNH₂	Dendrón BisBehera con punto focal NH ₂
BBNO₂	Dendrón BisBehera con punto focal NO ₂
BIS	N,N'-metilenbisacrilamida
CDT	Coeficiente de difusión traslacional
CF	Compuestos fenólicos
Ch	Quitosán
Ch-AT	Nanogeles basados en Ch y AT
Ch-AT-Weis	Nanogeles basados en Ch, AT y Weis
Ch-AT-Weish	Nanogeles basados en Ch, AT y Weis hidrolizado
CI-5NI	Cloruro de ácido 5-nitroisoftálico
CIAc	Cloruro de acrilóilo
D_h	Diámetro hidrodinámico
DLS	Dispersión de luz dinámica
DMF	Dimetil formamida
DMSO	Dimetil sulfóxido
EE	Eficiencia de encapsulamiento
EPR	Efecto mejorado de permeación y retención
FA	Fase acuosa
FO	Fase orgánica

FT-IR	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier
G	Generación dendrítica
Gel	Gelatina
GelA-AT	Nanogeles basados en Gel tipo A y AT
GelA-AT-Weis	Nanogeles basados en Gel tipo A, AT y Weis
GelA-AT-Weish	Nanogeles basados en Gel tipo A, AT y Weis hidrolizado
GelB-AT	Nanogeles basados en Gel tipo B y AT
Gel-PVCL	Polímero de gelatina injertado con PVCL
Gel-PVCL/AT	Nanogeles basados en gel-PVCL y AT
HEMA	2-hidroxietil metacrilato
HEMA-Weis	Dendron basado en HEMA y Weis
IFA	Ingrediente farmacéutico activo
KPS	Persulfato de potasio
LC	Capacidad de carga
LCST	Temperatura de solución crítica inferior
LDHs	Hidróxidos dobles laminares
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
MG	Metil galato
MMA	Metilmetacrilato
MTT	Bromuro de 3-[4-5, dimetiltiazol-2-ilo]-2,5- difeniltetrazol
NaPS	Persulfato de sodio
NAT	N-tris(hidroximetil)metilacrilamida
NAT-Weis	Dendron basado en NAT y Weis
NAT-Weish	endron basado en NAT y Weis hidrolizado
NG	Nanogel
NIPAM	N-isopropilacrilamida
NP	Nanopartícula
P(VCL-co-ABA)	Nanogeles basados en VCL y ABA
P(VCL-co-ABC)	Nanogeles basados en VCL y ABC
PDI	Polidispersidad
PG	Ácido pirogálico
PGd	Poliglicerol dendrítico
PVA	Polivinil alcohol

PVA-AG	Nanogeles basados en PVA y AG
PVA-MG	Nanogeles basados en PVA y MG
PVA-PG	Nanogeles basados en PVA y PG
RAFT	Fragmentación y transferencia de cadena reversible
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROMP	Polimerización por metátesis de apertura de anillos
ROP	Polimerización por apertura de anillo
SDS	Dodecilsulfato de sodio
Span 80	Monooleato de polioxietilensorbitano
SPC	Policondensación de Suzuki
T_{cp}	<i>Cloud point temperature</i>
TEA	Trietilamina
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TEMED	Tetrametiletilendiamina
T_f	Temperatura de transición de fase
TGA	Análisis termogravimétrico
THF	Tetrahidrofurano
TMG	Tetrametilguanidina
Tween 20	Monolaurato de polioxietilensorbitano
UCST	Temperatura de solución crítica superior
UV-vis	Espectrofotometría ultravioleta-visible
VCL	N-vinilcaprolactama
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VPTT	Transición de fase de volumen
Weis	Di- <i>ter</i> -butil-4-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonil)etil]-4-isocianato-1,7-heptanodicarboxilato, Weisocianato

Resumen

Aunque los biomateriales aplicados en biomedicina existen desde hace 9000 años, actualmente el número de aplicaciones ha crecido, son cada vez más versátiles y permanentemente existe una búsqueda para superar más cantidad de limitaciones médicas y/o farmacológicas. Particularmente, ha ido en aumento el interés en los nanomateriales dada las numerosas ventajas que han demostrado tener. Pero el gran desafío se encuentra en lograr el diseño de un buen nanomaterial que cumpla su cometido, y para esto, es necesario apelar a la creatividad de los científicos. Ellos son los que trabajan en el desarrollo de nuevas técnicas de síntesis, aprovechan la posibilidad de utilizar materiales de bajo costo y alta biocompatibilidad o incorporan bloques de construcción novedosos que aumentan el valor agregado al material final.

Es por esto que, el presente trabajo de Tesis, se enfocó en el desarrollo de diferentes estrategias de síntesis y modificación de moléculas dendríticas y polímeros, tanto de origen natural como sintético, para la obtención de biomateriales altamente novedosos de tamaño nanométrico, como así también su caracterización y posibles aplicaciones en campos relacionados con la biomedicina. En todos los casos, el análisis de los resultados se basó en el estudio de la relación estructura-propiedad.

El trabajo de investigación se dividió en 3 etapas principales. En un primer lugar, se planteó la síntesis, purificación y caracterización de diferentes moléculas dendríticas a partir de la modificación de dendrones comerciales, para poder ser utilizados en un futuro como bloques de construcción de diversos biomateriales.

En una segunda etapa, se planteó el diseño y la síntesis de distintos nanomateriales que se dividieron en 3 clases: a) nanogeles dendríticos inteligentes, con respuesta a pH y/o temperatura, a partir de monómeros convencionales y un monómero dendrítico, b) nanogeles dendronizados a base de polímeros naturales y c) nanogeles híbridos en los cuales se combinaron materiales de origen natural y sintético. Para el desarrollo de estos nanomateriales se utilizaron diferentes técnicas de síntesis y se utilizaron numerosas técnicas de caracterización físico-químicas.

La última etapa, consistió en estudios de aplicación en biomedicina de algunos de los nanogeles sintetizados, más específicamente orientados a la liberación controlada de fármacos y la utilización de los nanogeles para el desarrollo de microbicidas tópicos para la inhibición del virus del VIH-1.

Los resultados alcanzados han evidenciado la importancia de la funcionalización, particularmente la presencia de un bloque dendrítico, en la relación estructura-propiedad de los nanogeles sintetizados.

El desarrollo de esta Tesis Doctoral destaca la importancia de realizar un correcto diseño de síntesis y una profunda caracterización de los nanomateriales, para lograr una correcta deducción tanto de la arquitectura estructural del sistema como de sus posibles aplicaciones a futuro. El trabajo presentado ha sido posible gracias a la labor

interdisciplinaria y al aporte realizado por investigadores de distintas áreas. Debido a la relevancia de los resultados, se espera la continuidad del estudio de aquellos sistemas que demostraron mejor desempeño con potencialidad para el diseño de nuevas plataformas con aplicaciones en nanomedicina y generar la posibilidad de que finalmente puedan ser utilizados en algunas de las aplicaciones para los que fueron diseñados.



Sección I: Aspectos generales



Introducción general

A modo introductorio, es necesario establecer el marco teórico de los temas que se desarrollarán en los diferentes Capítulos de este trabajo. El eje central de esta Tesis es **biomateriales poliméricos**, más específicamente, aquellos de tamaño submicrónico. Para esto, el tema ha sido abordado desde los diferentes bloques de construcción para el desarrollo de distintos tipos de biomateriales, considerando su obtención, origen, caracterización y aplicación final.

En primera instancia, es necesario discutir algunos conceptos básicos que sustentarán futuras discusiones dentro de este trabajo, como son por un lado la nanomedicina, la nanotecnología y los nanogeles, y por el otro, los biomateriales poliméricos y los materiales a base de moléculas dendríticas. Sin dudas, es necesario empezar por la comprensión del concepto de **biomateriales**.

Biomateriales

¿Qué son los biomateriales?

Es bastante lógico preguntarse si existe una definición consensuada del término biomaterial, y la respuesta debería ser no. El término biomateriales se ha utilizado alternativamente para describir materiales derivados de fuentes biológicas o para describir materiales utilizados para terapias en el cuerpo humano. Pero a lo largo de los años, la definición más "exacta" de biomateriales ha ido evolucionando y es por esto que, los profesores Dee, Puleo y Bizios [1] señalaron en su libro sobre interacciones tejido-biomaterial que: "cualquier definición actual de biomateriales no es perfecta ni completa, pero ... proporciona una excelente referencia o punto de partida para la discusión". Esto surge debido a "la primera definición consensuada" para un biomaterial introducida en 1987, que ha sido referenciada con frecuencia en la literatura, y se remonta al profesor D. F. Williams y asegura que: "un biomaterial es un material inerte utilizado en un dispositivo médico, destinado a interactuar con los sistemas biológicos". Sin embargo, el desarrollo de materiales que contienen células vivas desafía la inclusión de la palabra inerte en la definición tradicional de biomaterial. En

consecuencia, en 1992 se eliminó el término inviable y surgió la “segunda definición consensuada” la cual determina que un biomaterial es "un material destinado a interactuar con sistemas biológicos para evaluar, tratar, mejorar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función en el cuerpo". Pero retomando las palabras de los profesores Dee, Puleo y Bizios "cualquier definición actual de biomateriales no es perfecta ni completa, pero ... proporciona una excelente referencia o punto de partida para la discusión".[2]

Los primeros biomateriales

Se podría pensar que los biomateriales son algo moderno pero, en realidad, la introducción de materiales no biológicos en el cuerpo humano se remonta a tiempos prehistóricos. La evidencia más antigua de un material no biológico interactuando con un organismo vivo fue una flecha con cabeza de piedra encontrada en la cadera del hombre Kennewick, nombre dado a los restos de un hombre prehistórico, descubiertos en 1996 en Norte América, el cual se conservó por más de 9000 años. Sobre la flecha se evidencia cicatrización, indicando la recuperación de la marcha funcional y una elevada tolerancia a la presencia de un cuerpo extraño.[2] Los implantes dentales se pueden rastrear hasta los primeros egipcios. Hallazgos del 2000 a. C. comprueban tratamientos externos de fracturas, amputaciones y reemplazos exitosos con prótesis de madera, talladas para imitar rasgos anatómicos característicos de las extremidades humanas.

La evidencia más temprana de la aplicación de metal para procedimientos quirúrgicos es de 1565, que no tuvo éxito debido a infecciones después de la implantación.[3] Más adelante, en 1924 Arthur Zierold [4] documentó la reacción de los tejidos vivos frente a materiales como aluminio, plata y oro, de los cuales determinó que, a pesar de su buena tolerancia, sus propiedades mecánicas no eran aceptables, lo cual fue el punto de partida de muchas investigaciones que tenían como fin, elaborar aleaciones entre metales que combinaran buena tolerancia con características mecánicas aceptables.

La Segunda Guerra Mundial fue el punto de partida para el desarrollo de nuevos biomateriales y procesos, ante la necesidad de rehabilitar y mejorar la calidad de vida de los heridos en combate. Aunque cabe aclarar

que, la síntesis de materiales poliméricos artificiales, pensados como posibles alternativas a los metales para implantes, resultan anteriores a este acontecimiento. Entre los éxitos con más trascendencia en este periodo histórico se encuentra el adelanto de los implantes intraoculares de poli(metil metacrilato) [5] y el establecimiento de la multidisciplinariedad en la ciencia de los materiales, como consecuencia del trabajo conjunto que desarrollaron profesionales de la medicina, ingenieros y químicos.

Desde el nacimiento del campo de la ciencia de los polímeros, prácticamente todos los primeros que se conocen que han sido sintetizados, encontraron su camino en los estudios quirúrgicos experimentales, poco después de su invención, y muchos, perduraron para convertirse en elementos básicos de la práctica clínica.[6–8] Estos polímeros siguen siendo importantes en la medicina clínica, como componentes esenciales de dispositivos protésicos permanentes, incluidos implantes de cadera, lentes artificiales, injertos vasculares de gran diámetro, catéteres, etc., y la investigación continúa para optimizar la estabilidad y el rendimiento de estos materiales *in vivo*.

Algunos materiales sintetizados y aprobados para su utilización en medicina se detallan en la Tabla I.

Tabla I. Biomateriales y su aplicación en medicina.

Aplicación		Tipo de material
Sistema esquelético	Reemplazos de articulaciones (cadera, rodilla)	Aleación de titanio Ti-Al-V, acero inoxidable, polietileno.
	Fijación de fracturas de placa ósea	Acero inoxidable, aleación de cobalto-cromo.
	Cemento óseo	Polimetacrilato de metilo
	Reparación de defectos óseos	Hidroxiapatita
	Tendón y ligamento artificial	Teflón, dacrón
	Implante dental para fijación de dientes	
		Titanio, alúmina, fosfato de calcio

Sistema cardiovascular	Prótesis de vasos sanguíneos	Dacrón, teflón, poliuretano
	Válvula del corazón	Tejido reprocesado, acero inoxidable, carbono
	Catéter	Caucho de silicona, teflón, poliuretano
Órganos	Corazón artificial	Poliuretano
	Plantilla de reparación de piel	Compuesto de silicona y colágeno
	Riñón artificial (hemodializador)	Celulosa, poliacrilonitrilo
	Máquina corazón-pulmón	Goma de silicona
Sentidos	Reemplazo coclear	Electrodos de platino
	Lente intraocular	Poli (metacrilato de metilo), silicona, caucho, hidrogel
	Lentes de contacto	Acrilato de silicona, hidrogel
	Vendaje corneal	Colágeno, hidrogel

Nanotecnología, nanomateriales y nanomedicina

Por si sola la nanotecnología se define como el “diseño, caracterización, producción y búsqueda de aplicaciones intencionales en materiales, estructuras, dispositivos y sistemas, mediante el control de su tamaño y forma en el rango de la nanoescala” (ver Figura I).[9] Estos materiales suelen ser denominados nanomateriales.

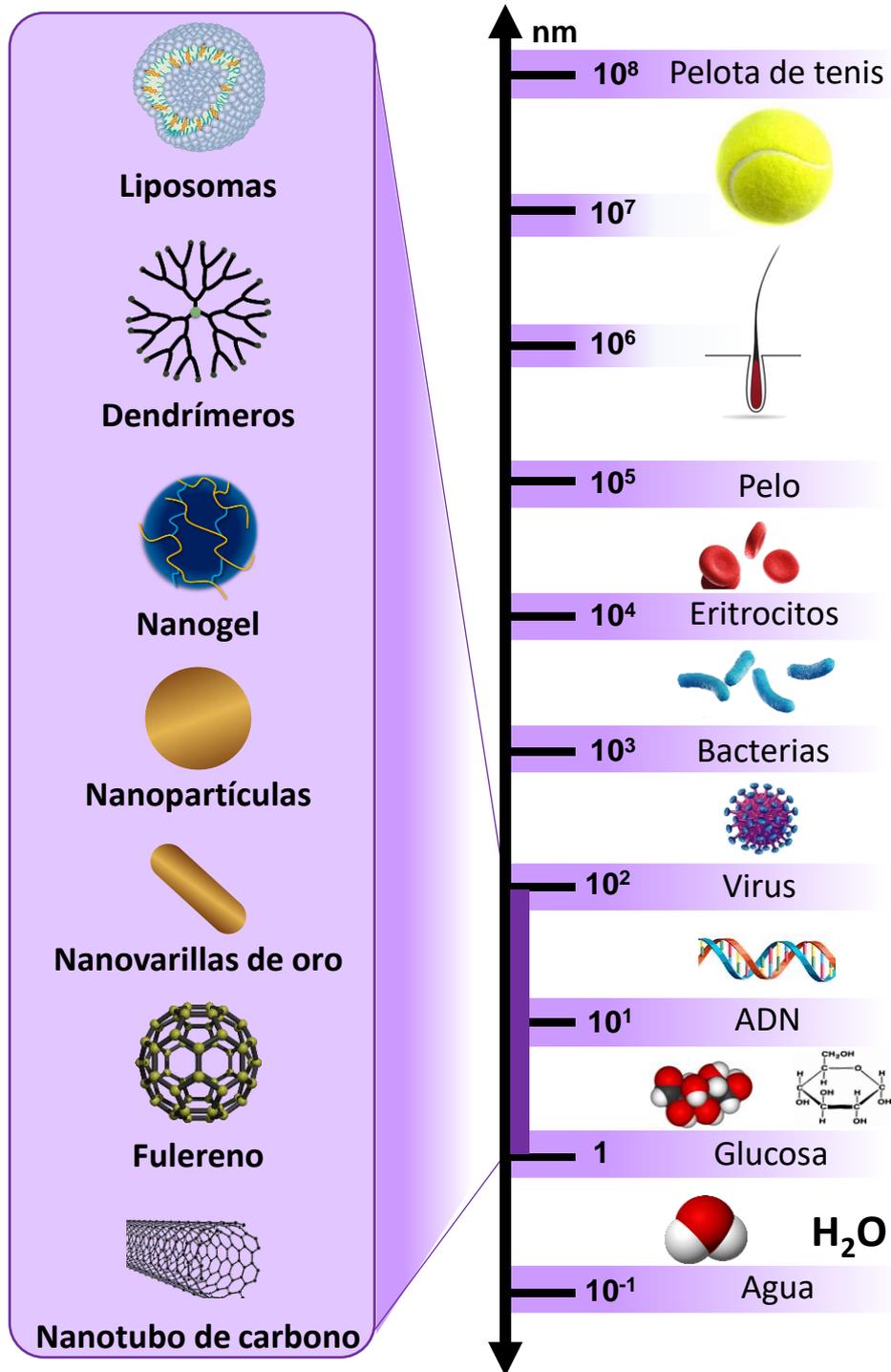


Figura I. Escala desde lo nano a lo macro.

Cuando la nanotecnología se fusiona con la Medicina surge la Nanomedicina [10] la cual es altamente interdisciplinaria ya que, para su desarrollo se requieren conocimientos de diferentes áreas tales como biología, química, física, ingeniería, medicina clínica, etc.[11,12]

El surgimiento de esta rama se debe a que, a pesar del desarrollo de gran número de biomateriales, la medicina convencional aún sufría algunas limitaciones. Muchas enfermedades son originadas por alteraciones en procesos biológicos a nivel molecular o nanoescala. Los genes mutados, las proteínas mal plegadas y las infecciones causadas por virus o bacterias pueden provocar un mal funcionamiento de las células o una falta de comunicación, lo que a veces, conduce a enfermedades potencialmente mortales. Estas moléculas y agentes infecciosos tienen un tamaño dentro de los nanómetros y pueden ubicarse en sistemas biológicos que están protegidos por barreras de tamaño nanométrico.[9] Los nanomateriales son similares en escala a las moléculas y sistemas biológicos, pero pueden diseñarse para tener varias funciones. Es así como, intentando superar los desafíos y los problemas que enfrenta la medicina convencional, surge la nanomedicina, buscando aprovechar las características de estos nuevos biomateriales.[13]

Es decir, el campo de la nanomedicina tiene como objetivo utilizar las propiedades y características físicas de los nanomateriales para el monitoreo, control, construcción, defensa y mejora de todos los sistemas biológicos humanos, trabajando a nivel molecular y utilizando nanodispositivos para el beneficio médico es decir, como se mencionó anteriormente, *la aplicación de la nanotecnología a la salud*. [9,10]

Además de su surgimiento para cubrir una necesidad, resulta que los nanomateriales presentan numerosas ventajas. Debido a su pequeño tamaño, algunos nanomateriales pueden atravesar los vasos linfáticos para llegar a los ganglios linfáticos y ser absorbidos por los macrófagos residentes.[14] A diferencia de los átomos y los materiales macroscópicos, los nanomateriales tienen una alta relación área de superficie/volumen, que puede ser órdenes de magnitud mayor que la de los materiales macroscópicos.[9] Cortar un cubo de 1 cm en 10^{21} cubos de 1 nm de lado, cada uno dará como resultado el mismo volumen y masa general, pero la superficie se incrementará en un factor de 10 millones. Por tanto, la ventaja de utilizar nanomateriales como portadores, es la factibilidad de recubrir/modificar su superficie con gran número de moléculas específicas. Además, pueden poseer propiedades ópticas, electrónicas, magnéticas y biológicas adaptables, y pueden diseñarse para tener diferentes tamaños (en el rango nanométrico), formas,

composiciones y características químicas o físicas de la superficie y estructuras huecas o sólidas.[15,16]

Estas propiedades se están incorporando a las nuevas generaciones de fármacos, vehículos para administración de fármacos, terapias, agentes de contraste y dispositivos de diagnóstico con imágenes *in vivo*, diagnóstico *in vitro*, implantes activos [17], cribado de células y tejidos [18] y direccionamiento *in vivo* de tumores con el uso de nanopartículas recubiertas con anticuerpos, péptidos u oligonucleótidos plegados en estructuras complejas llamadas aptámeros.[19,20] Además, los nanomateriales se están utilizando como plataformas para diseñar agentes multifuncionales con capacidades diagnósticas, terapéuticas y antioxidantes.[21–23]

Actualmente, la nanomedicina puede ser responsable del diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades, y del alivio del paciente mejorando su calidad de vida.[24] Algunos nanodispositivos se encuentran actualmente en investigación clínica o han sido aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) para uso en humanos [16,25,26], o se están realizando estudios de prueba de concepto de nanomateriales en cultivos celulares y modelos de animales pequeños para aplicaciones médicas.[27–29] Algunos de estos nanomateriales se detallan en la Tabla II.

Tabla II. Ejemplo de nanomateriales en uso clínico.

Nanomaterial		Nombre comercial	Aplicación	Objetivo	Estado actual
Metálico	Óxido de hierro	Feridex	Contraste de resonancia magnética	Hígado	Aprobado por la FDA
		Resovista		Hígado	Aprobado por la FDA
		Combidex		Ganglios linfáticos	En ensayos clínicos de fase 3
		NanoTherm	Terapia del cáncer	Diversas formas	En ensayos clínicos de fase 3
	Oro	Verigene	Diagnóstico <i>in vitro</i>	Genético	Aprobado por la FDA

		Aurinmune	Terapia del cáncer	Diversas formas	En ensayos clínicos de fase 2
	<i>Coreshell</i>	Auroshell	Terapia del cáncer	Cabeza y cuello	En ensayos clínicos de fase 1
Semiconductor	<i>Quantum dot</i>	Puntos cuánticos, EviTags, nanocristales semiconductores	Contraste fluorescente, diagnóstico <i>in vitro</i>	Tumores, células, tejidos y estructuras de detección molecular	Solo para uso de investigación
Orgánico	Proteína	Abraxane	Terapia del cáncer	Pecho	Aprobado por la FDA
	Liposoma	Doxil / Caelyx		Diversas formas	Aprobado por la FDA
	Polímero	Oncaspar		Leucemia linfoblástica aguda	Aprobado por la FDA
		CALAA-01		Diversas formas	Ensayos clínicos de fase 2
	Micela	Genexol-PM		Diversas formas	Para ensayos clínicos de fase 3
	Dendrímero	VivaGel	Microbicida	Cervicovaginal	En ensayos clínicos de fase 2

Biomateriales poliméricos

El enfoque de esta Tesis es el diseño de polímeros destinados a aplicaciones biomédicas, con énfasis en las nuevas aplicaciones emergentes que impulsan una expansión del campo de biomateriales poliméricos, por eso es importante ahondar un poco más en esta área.

Si bien los materiales poliméricos han existido en la tierra desde su origen, y la vida no sería posible si no existieran el ADN, los polisacáridos o las proteínas, fue recién llegado el año 1833 que la palabra "polímero" fue introducida por el químico sueco J. J. Berzelius.[30] Aunque la definición de entonces dista bastante de la actual, ya que utilizó este término para describir los compuestos orgánicos que comparten idénticas fórmulas

empíricas, pero difieren en el peso molecular. Consideró, por ejemplo, que el benceno (C_6H_6) era un polímero de etino (C_2H_2).[30,31] Fue recién en 1926 que H. Staudinger expone su hipótesis de que un polímero es una larga cadena de unidades pequeñas unidas por enlaces covalentes. Para después, en 1953 recibir el Premio Nobel de Química por sus descubrimientos en el campo de la química macromolecular.[32,33]

A pesar de la falta de un término que los definiera, los polímeros sintéticos existen desde mediados del siglo XIX y se comercializaron desde el siglo XX con marcas tales como celuloide (nitrato de celulosa) y baquelita (resina de fenol formaldehído).[34]

Los polímeros se convirtieron en la base de importantes productos industriales. Su rápido crecimiento en la producción se debió, además de factores sociales, a la necesidad de reemplazar los materiales clásicos. De hecho, en 1939, DuPont introdujo el nylon en el mercado, debido a la escases de seda, un recurso natural.[35]

En principio, estos materiales eran bastante simples, pero cumplían las exigencias requeridas por la sociedad. Sin embargo, la fabricación de materiales plásticos cada vez más sofisticados se debió a las crecientes demandas de la época.

Hoy en día los polímeros sintéticos pueden ser clasificados según su conformación en: a) homopoliméricos; cuando la red polimérica deriva de una única especie de monómero o polímero o b) copoliméricos, cuando están compuestos por dos o más especies de monómeros o polímeros diferentes, dispuestos en una configuración aleatoria, de bloques o alternada a lo largo de la cadena del polímero.[36] Además, pueden ser divididos de acuerdo con su arquitectura molecular y a su evolución en el tiempo, en cuatro categorías principales: lineales, entrecruzados, ramificados y estructuras dendríticas, Figura II.[37] Los polímeros dendríticos, por su parte, forman una nueva clase de macromoléculas con interesantes alternativas estructurales y funcionales y, en las últimas dos décadas, han atraído considerable interés como nanomateriales o bloques de construcción.

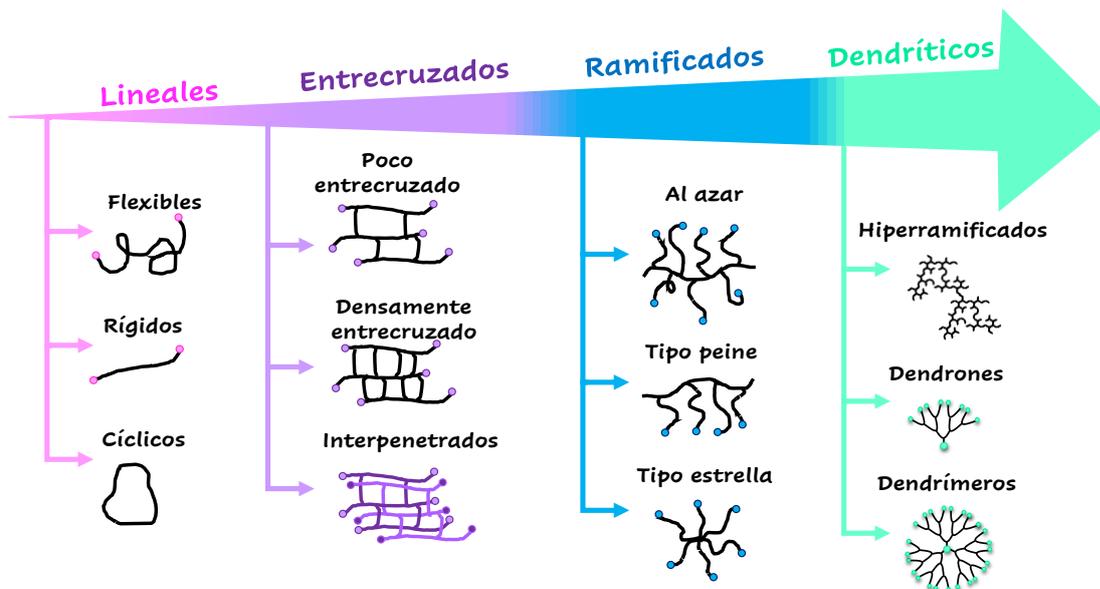


Figura II. Esquema de evolución de los polímeros y su clasificación.

En cuanto al uso de polímeros en medicina, como se mencionó anteriormente, muchos de los primeros polímeros sintéticos encontraron su camino en los procedimientos quirúrgicos y perduraron para convertirse en elementos básicos de las prácticas clínicas, incluso en la actualidad. Las suturas de nylon, el uso en cirugía de p(metilmetacrilato) (PMMA), el poliéster de dacrón y el cloruro de polivinilo por ejemplo, hicieron su aparición en reportes y artículos de revisión en importantes revistas médicas a mediados de la década de 1940.[7,8] Los polianhídridos se consideraron por primera vez en la década de 1930 para aplicaciones comerciales en textiles, pero eran demasiado inestables y no continuó su desarrollo hasta que se evidenció su capacidad de degradación, haciéndolos muy adecuados como sistemas de administración de fármacos biodegradables.[38] Todos estos polímeros fueron y siguen siendo, ejemplos de polímeros importantes en la medicina clínica como componentes esenciales de los dispositivos protésicos permanentes, incluidos los implantes de cadera, lentes artificiales, injertos vasculares de gran diámetro, catéteres, etc. y la investigación continúa para optimizar la estabilidad y el rendimiento de estos materiales *in vivo*.

Si bien las aplicaciones originales de los polímeros en cirugía se centraron principalmente, en los reemplazos de los tejidos conectivos, desde hace un tiempo, están surgiendo diferentes y nuevas aplicaciones como

resultado de los principales avances en las ciencias de la biología celular molecular y la biología del desarrollo. Una serie de novedosos fármacos basados en proteínas y ácidos nucleicos, que no pueden ser administrados en forma de un clásico comprimido, están impulsando nuevos polímeros implantables para la administración controlada de fármacos y la terapia génica.[6,39] Las aplicaciones en el campo relativamente nuevo de la ingeniería de tejidos, donde los polímeros se utilizan para ayudar a la regeneración de estructuras tridimensionales de tejidos y órganos, son más incipientes y están más integradas con las demandas biológicas.[6] Los polímeros más ampliamente utilizados en esta área son los geles hidrófilos, que generalmente se denominan hidrogeles, un material que exhibe la capacidad de hincharse y retener una fracción significativa de agua dentro de su estructura, pero sin disolverse.[36] Los hidrogeles han recibido una atención considerable en los últimos 60 años debido a que poseen un amplio grado de flexibilidad, muy similar al tejido natural. La capacidad de estos materiales para absorber agua surge de grupos funcionales hidrofílicos unidos a la estructura polimérica, mientras que, su resistencia a la disolución surge de los enlaces cruzados entre las cadenas de la red.[40] Los hidrogeles se pueden sintetizar a partir de componentes puramente sintéticos o naturales, o una mezcla de ambos. A lo largo de las décadas, se ha logrado diseñar polímeros sintéticos con estructuras bien definidas que pueden modificarse para producir una degradabilidad y una funcionalidad adaptables. Estos materiales se pueden sintetizar con procedimientos de un solo paso como polimerización y reticulación paralela de monómeros multifuncionales, así como procedimientos de múltiples pasos que implican la síntesis de polímero lineales que tienen grupos reactivos y su reticulación subsecuente, o también haciendo reaccionar polímeros con agentes de reticulación adecuados.[40] Se pueden diseñar y sintetizar estas redes de polímeros con control a escala molecular sobre la estructura, como la densidad de reticulación, y con propiedades personalizadas, como la biodegradación, la resistencia mecánica y la respuesta química y biológica a los estímulos.[41]

El campo de aplicación de los polímeros como biomateriales es inmenso y crece cada día más con la creatividad de los científicos, que buscan solucionar limitaciones y problemas de la medicina moderna, sobre todo con el desarrollo de los denominados polímeros “inteligentes” o estímulo sensibles, es decir aquellos que responden a un estímulo del medio, los

cuales se pueden encontrar en todas partes, por ejemplo, en ordenadores, televisores, automóviles, lentes de contacto, indumentaria y en una amplia variedad de aplicaciones médicas.[42] Existen numerosos materiales diseñados para responder a diversos estímulos, tales como temperatura, pH, fuerza iónica, luz, campo magnético, y biomoléculas, pudiendo responder con un cambio en su grado de hinchamiento, ionización o degradación. La respuesta de los hidrogeles está determinada por el tipo de monómero o polímero utilizado y/o cualquier post-modificación realizada.[43] Este tipo de respuestas son utilizadas principalmente para la liberación controlada de fármacos en lugares y momentos específicos.

Biomateriales dendríticos

Los dendrímeros son considerados por algunos autores como contenedores a nanoescala [44] y aunque son moléculas individuales, pueden contener un número muy elevado de grupos funcionales en su superficie. Esta característica, hace a estas moléculas particularmente atractivas para aplicaciones donde es importante la conexión covalente o no covalente o la proximidad con otras especies.

El campo de los dendrímeros se desarrolló a finales de 1970 [45] y principios de 1980 [46–48] y se ha disparado durante la última década.[49–53] Esta situación se debe, más allá del atractivo estético, a su gran potencial para aplicaciones en biología y ciencia de materiales. Estas estructuras serán definidas y descritas con más detalle en el Capítulo1.

Pertenecen a la familia de los polímeros por su estructura repetitiva. Sin embargo, los dendrímeros se diferencian de los polímeros clásicos por el estricto control de su estructura. De hecho, las estructuras dendríticas nunca se sintetizan mediante reacciones de polimerización, sino paso a paso, generalmente mediante la reiteración de dos pasos de reacción cuantitativos.[54,55]

El diseño, la síntesis y arquitectura detrás de los materiales dendronizados o dendríticos, precisa un elevado control sobre las propiedades buscadas en el material sintético, el cual involucra múltiples conceptos y disciplinas. De esta manera, la habilidad para predecir, y

quizás llegar a controlar, la relación estructura/propiedad a partir de la utilización de diferentes *building blocks*, constituye un enfoque meramente multidisciplinario en relación con la preparación de materiales con novedosas funcionalidades. Todo esto, ha llevado a la generación de numerosos tipos de materiales en los que se han combinado estructuras dendríticas con otro tipo de fragmentos, como polímeros lineales/entrecruzados o sistemas nanoestructurados, generando arquitecturas muy interesantes y novedosas. La Figura III muestra algunas de estas diferentes arquitecturas.[56,57]

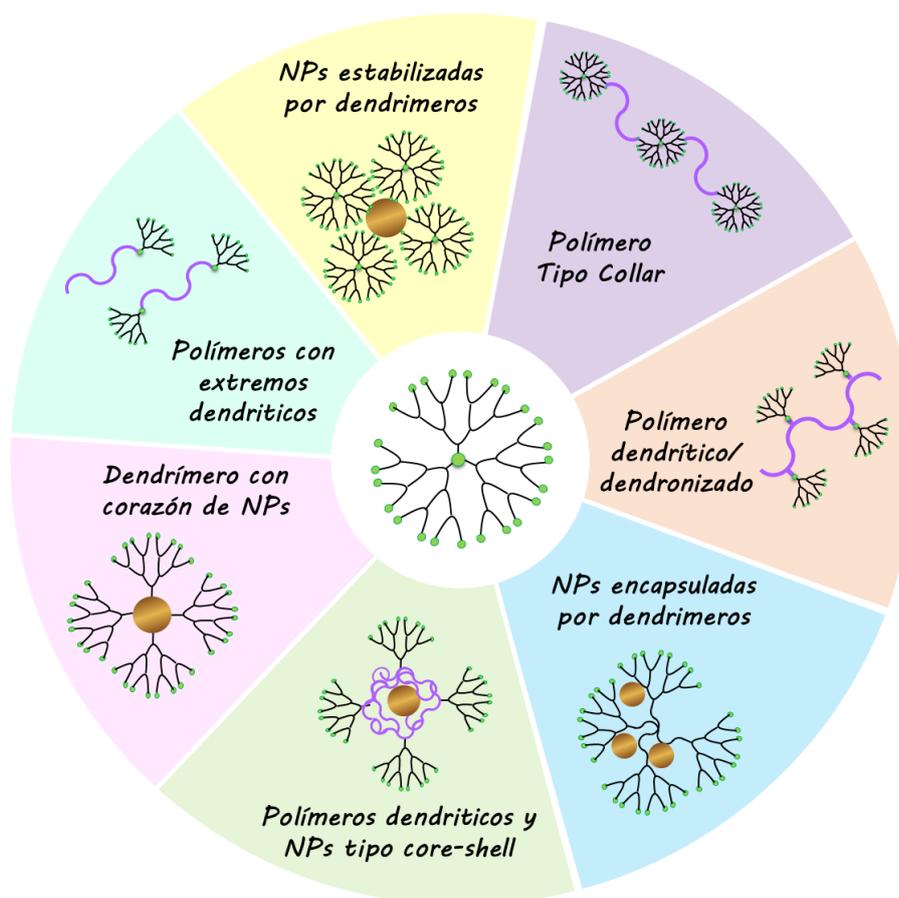


Figura III. Tipos de arquitecturas con estructuras dendríticas.

La innovación de la arquitectura y la estructura en la química macromolecular, ha sido uno de los avances más importantes en el abordaje de nuevas aplicaciones potenciales en diferentes áreas, no solo en la biomedicina [44], sino también en el almacenamiento de energía [58], catálisis [55], recubrimientos auto-cicatrizantes [59], captación,

emisión y amplificación de luz [60], entre otras. Como ya se mencionó anteriormente, se ha demostrado cómo la unión de moléculas multiramificadas (ya sea por interacciones covalentes o no covalentes), producen un cambio significativo en las propiedades del material final.[53,61,62] Y, en un futuro, probablemente se podrá conducir a su uso incluso en nuevas aplicaciones y a mejorar los niveles de comercialización.

Cabe aclarar que, la obtención de dendrímeros es un proceso complicado, siendo así la utilización de dendrones una alternativa más conveniente. La utilización de dendrones permite acelerar la síntesis, reducir el número de etapas de reacción y facilitar los tediosos procedimientos de purificación, mientras que, al mismo tiempo disminuye la necesidad de niveles excesivos de reactivos. De hecho, ya han sido utilizados en diferentes ocasiones como bloques de construcción, brazos espaciadores o agentes de funcionalización. [63–66] Ciertos aspectos del comportamiento de los dendrones están dominados por características estructurales y geométricas, ya que los grupos funcionales en la periferia (polar o no polar) y su arquitectura o tamaño definen su disposición espacial y sus propiedades finales.

No obstante, las propiedades dendríticas, las cuales serán detalladas en el Capítulo 1, en adición a las propiedades fisicoquímicas, su complejidad y su costo, limitan su aplicación. Por esta razón, incluir moléculas dendríticas como *building blocks* en materiales convencionales, como un polímero convencional lineal o entrecruzado, e incluso superficies de distintos tipos, constituye una ruta más ventajosa para obtener materiales con características únicas.

De esta manera, la combinación de las propiedades dendríticas (que serán detalladas en la Parte I de la sección II de esta Tesis) con otras estructuras, genera un valor agregado importante en el material final.[67] Con respecto a la incorporación de dendrones en los materiales, las estrategias sintéticas más utilizadas consisten en: (a) acoplamiento de moléculas dendríticas con polímeros (*graft-to*); (b) crecimiento de una molécula dendrítica desde la cadena polimérica (crecimiento divergente o *graft-from*); (c) crecimiento de una cadena polimérica desde el punto focal de un dendrón por un proceso de polimerización del monómero dendrítico (vía del macromonómero dendrítico), Figura IV.[56]

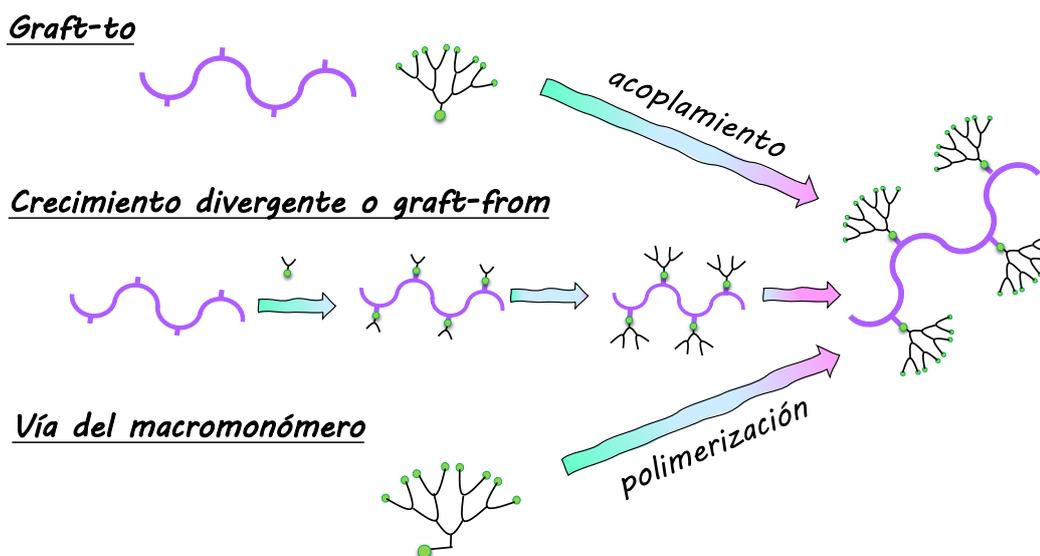


Figura IV. Rutas sintéticas para la obtención de polímeros dendríticos o dendronizados.

Por un lado, al utilizar las vías *graft-to* o *graft-from*, se puede partir de materiales ya conocidos caracterizados, para modificarlos a medida, de acuerdo con las necesidades, y obtener los denominados **polímeros dendronizados**. De esta manera, se pueden seguir los cambios en las características y propiedades iniciales del material a medida que se avanza en la modificación.[68–70]

En cuanto a la vía del macromonomero dendrítico, los dendrones son unidos a otra molécula o monómero que contenga un grupo polimerizable, por lo general un doble enlace, pudiendo ser tanto por una metodología convergente como divergente. Posteriormente, el monómero dendrítico generado es polimerizado, formando así un **polímero dendrítico**. Los principales beneficios de esta ruta radican en que los dendrones son colocados con precisión a lo largo del polímero formado. Se han empleado diferentes métodos de polimerización, no sólo la polimerización por radicales libres [49,71,72] sino por ejemplo, polimerización por adición, fragmentación y transferencia de cadena reversible (RAFT) [73–75], polimerización por metátesis de apertura de anillos (ROMP) [76–78], polimerización por apertura de anillo (ROP) [79], policondensación de Suzuki (SPC) [80–82], polimerización de inserción [83], acoplamiento de Stille [84,85], acoplamiento de Heck [86] y polimerización radicalaria controlada por transferencia atómica (ATRP) [87–89].

El propósito detrás del diseño de materiales que incorporan estructuras dendríticas, es lograr propiedades funcionales nuevas o específicas y deseadas, ya sea utilizando estructuras disponibles comercialmente o mediante modificación química de las mismas. Por lo tanto, la combinación o adaptación de cada componente de un material dendrítico en la arquitectura deseada, se convierte en la clave para comprender las propiedades y aplicaciones finales. Algunas metodologías recientemente publicadas, han surgido a partir del avance de la nanotecnología y de esta manera proporcionan herramientas poderosas para la preparación de nuevos materiales dendríticos, lo que permite un control estricto del tamaño, la forma y la precisión en la generación y funcionalidad química deseada.[90]

Como se ha destacado, la dendronización resulta muy interesante como alternativa para diseñar polímeros a medida (*taylor made*) con propiedades específicas. Se ha demostrado que la estructura química, la generación o el tamaño de la molécula dendrítica y el grado de dendronización, así como la arquitectura que estas moléculas le otorgan al material, determinan el comportamiento final, generando sistemas de estudio más que interesantes y prometedores.[50,51,61,70,91]

Teniendo en cuenta todo lo antes expuesto, resulta interesante el desarrollo de biomateriales de tamaño nanométrico que incluyan polímeros o compuestos de origen natural, polímeros termo o pH responsivos o bloques dendríticos en su estructura, o incluso una combinación de ellos para lograr un sinergismo en las propiedades y características del material final, que los vuelvan eficientes para su aplicación en nanomedicina.

Bibliografía

- [1] K.C. Dee, D.A. Puleo, R. Bizios, *An introduction to tissue-biomaterial interactions*, John Wiley & Sons, 2003.
- [2] Jeffrey O. Hollinger, *AN INTRODUCTION TO BIOMATERIALS*, 2nd ed., 2019.
- [3] S. V Bhat, *Biomaterials* 2nd edn (Harrow: Alpha Science International), (2005).
- [4] A.A. Zierold, Reaction of bone to various metals, *Arch. Surg.* 9 (1924) 365–412.
- [5] J.J. Garzón, Andrés, O., Aguirre, Nelly O., Olaya, Estado del arte en biocompatibilidad de recubrimientos, *Visión Electrónica.* 9 (2012) 160–177.
- [6] L.G. Griffith, Polymeric biomaterials, *Biomed. Mater.* 48 (1999) 83–119.
- [7] G. Blaine, The uses of plastics in surgery, *Lancet (London, England).* 2 (1946) 525–528.
- [8] F.D. Ingraham, E.J. Alexander, D.D. Matson, Synthetic plastic materials in surgery, *N. Engl. J. Med.* 236 (1947) 402–407.
- [9] B.Y.S. Kim, J.T. Rutka, W.C.W. Chan, *Nanomedicine*, *N. Engl. J. Med.* 363 (2010) 2434–2443.
- [10] G. Choi, H. Piao, M.H. Kim, J.H. Choy, Enabling Nanohybrid Drug Discovery through the Soft Chemistry Telescope, *Ind. Eng. Chem. Res.* 55 (2016) 11211–11224.
- [11] S. Krol, R. Macrez, F. Docagne, G. Defer, S. Laurent, M. Rahman, M.J. Hajipour, P.G. Kehoe, M. Mahmoudi, Therapeutic benefits from nanoparticles: The potential significance of nanoscience in diseases with compromise to the blood brain barrier, *Chem. Rev.* 113 (2013) 1877–1903.
- [12] H.-E. Schaefer, *Nanoscience: the science of the small in physics, engineering, chemistry, biology and medicine*, Springer Science & Business Media, 2010.
- [13] G. Chen, I. Roy, C. Yang, P.N. Prasad, *Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy*, *Chem. Rev.* 116 (2016) 2826–2885.
- [14] P.F.H. Mukesh G. Harisinghani, Jelle Barentsz, and R.W. Willem M. Deserno, Shahin Tabatabaei, Christine Hulsbergen van de Kaa, Jean de la Rosette, Noninvasive Detection of Clinically Occult Lymph-Node Metastases in Prostate Cancer Mukesh, *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) 687–696.
- [15] Y. Xia, Y. Xiong, B. Lim, S.E. Skrabalak, Shape-controlled synthesis of metal nanocrystals: Simple chemistry meets complex physics, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 48 (2009) 60–103.
- [16] D. Peer, J.M. Karp, S. Hong, O.C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy, *Nat. Nanotechnol.* 2 (2007) 751–760.
- [17] J. Shi, A.R. Votruba, O.C. Farokhzad, R. Langer, Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: From discovery to applications, *Nano Lett.* 10 (2010) 3223–3230.
- [18] P.K. Chattopadhyay, D.A. Price, T.F. Harper, M.R. Betts, J. Yu, E. Gostick, S.P. Perfetto, P. Goepfert, R.A. Koup, S.C. De Rosa, M.P. Bruchez, M. Roederer, Quantum dot semiconductor nanocrystals for immunophenotyping by polychromatic flow cytometry, *Nat. Med.* 12 (2006) 972–977.
- [19] S. Kim, Y.T. Lim, E.G. Soltesz, A.M. De Grand, J. Lee, A. Nakayama, J.A. Parker, T. Mihaljevic, R.G. Laurence, D.M. Dor, L.H. Cohn, M.G. Bawendi, J. V. Frangioni, Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping, *Nat. Biotechnol.* 22 (2004) 93–97.
- [20] X. Gao, Y. Cui, R.M. Levenson, L.W.K. Chung, S. Nie, In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots, *Nat. Biotechnol.* 22 (2004) 969–976.
- [21] W.H. Suh, Y.H. Suh, G.D. Stucky, Multifunctional nanosystems at the interface of physical and life sciences, *Nano Today.* 4 (2009) 27–36.
- [22] J.H. Park, L. Gu, G. Von Maltzahn, E. Ruoslahti, S.N. Bhatia, M.J. Sailor, Biodegradable

- luminescent porous silicon nanoparticles for in vivo applications, *Nat. Mater.* 8 (2009) 331–336.
- [23] N. Gharbi, M. Pressac, M. Hadchouel, H. Szwarc, S.R. Wilson, F. Moussa, [60]fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity, *Nano Lett.* 5 (2005) 2578–2585.
- [24] Y. Gao, J. Xie, H. Chen, S. Gu, R. Zhao, J. Shao, L. Jia, Nanotechnology-based intelligent drug design for cancer metastasis treatment, *Biotechnol. Adv.* 32 (2014) 761–777.
- [25] T.D. McCarthy, P. Karellas, S.A. Henderson, M. Giannis, D.F. O’Keefe, G. Heery, J.R.A. Paull, B.R. Matthews, G. Holan, Dendrimers as drugs: Discovery and preclinical and clinical development of dendrimer-based microbicides for HIV and STI prevention, *Mol. Pharm.* 2 (2005) 312–318.
- [26] M.E. Davis, J.E. Zuckerman, C.H.J. Choi, D. Seligson, A. Tolcher, C.A. Alabi, Y. Yen, J.D. Heidel, A. Ribas, Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles, *Nature.* 464 (2010) 1067–1070.
- [27] U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, T. Nann, Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels, *Nat. Methods.* 5 (2008) 763–775.
- [28] G.J. Hutchings, Nanocrystalline gold and gold palladium alloy catalysts for chemical synthesis, *Chem. Commun.* (2008) 1148–1164.
- [29] Z. Liu, X. Li, S.M. Tabakman, K. Jiang, S. Fan, H. Dai, Multiplexed multicolor raman imaging of live cells with isotopically modified single walled carbon nanotubes, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 13540–13541.
- [30] A.D. Wilson, J. Nicholson, H. Prosser, *Waterborne coatings*, Springer Science & Business Media, 1991.
- [31] D. Feldman, *Polymer History, Des. Monomers Polym.* (2012) 1–15.
- [32] H.A. Bruson, H. Staudinger, “Cyclopentadiene Rubber” A. New Cyclic Synthetic Polymerization Product, *Ind. Eng. Chem.* 18 (1926) 381–383.
- [33] J.E. Bertolini, Cómo ganar el Premio Nobel de Química (PQN), in: *An. La Real Soc. Española Química, Real Sociedad Española de Química*, 2009: pp. 234–238.
- [34] A.A. Aldana, *Dendronización de polímeros biocompatibles. Obtención de nuevos materiales de interes biológico*, Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Córdoba, 2013. gfgdgdgfdg.
- [35] J. V Kurian, A new polymer platform for the future—Sorona® from corn derived 1, 3-propanediol, *J. Polym. Environ.* 13 (2005) 159–167.
- [36] J. Kopeček, Hydrogel biomaterials: A smart future?, *Biomaterials.* 28 (2007) 5185–5192.
- [37] D.A. Tomalia, J.M.J. Fréchet, Discovery of dendrimers and dendritic polymers: A brief historical perspective, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 40 (2002) 2719–2728.
- [38] J. Tamada, R. Langer, The development of polyanhydrides for drug delivery applications., *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 3 (1992) 315–353.
- [39] D.W. Losordo, P.R. Vale, J.F. Symes, C.H. Dunnington, D.D. Esakof, M. Maysky, A.B. Ashare, K. Lathi, J.M. Isner, Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia, *Circulation.* 98 (1998) 2800–2804.
- [40] E.M. Ahmed, Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review, *J. Adv. Res.* 6 (2015) 105–121.
- [41] S. Burkert, T. Schmidt, U. Gohs, H. Dorschner, K.-F. Arndt, Cross-linking of poly(N-vinyl pyrrolidone) films by electron beam irradiation, *Radiat. Phys. Chem.* 76 (2007) 1324–1328.
- [42] Y. Dahman, *Biomaterials Science and Technology: Fundamentals and Developments*, Taylor & Francis Group, 2019.
- [43] S. Nayak, L. Andrew Lyon, Soft nanotechnology with soft nanoparticles, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 44 (2005) 7686–7708.

- [44] S. Svenson, D.A. Tomalia, Dendrimers in biomedical applications-reflections on the field, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 102–115.
- [45] E. Buhleier, “Cascade”- and “Nonskid-Chain-like” Syntheses of Molecular Cavity Topologies, *Synthesis (Stuttg.)* 2 (1978) 155–158.
- [46] D. Astruc, F. Chardac, Dendritic catalysts and dendrimers in catalysis, *Chem. Rev.* 101 (2001) 2991–3023.
- [47] D.A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith, Dendritic macromolecules: synthesis of starburst dendrimers, *Macromolecules* 19 (1986) 2466–2468.
- [48] D.A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith, A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules, *Polym. J.* 17 (1985) 117–132.
- [49] J.C. Cuggino, C.I. Alvarez I., M.C. Strumia, P. Welker, K. Licha, D. Steinhilber, R.C. Mutihac, M. Calderón, Thermosensitive nanogels based on dendritic polyglycerol and N-isopropylacrylamide for biomedical applications, *Soft Matter* 7 (2011) 11259–11266.
- [50] G.N. Rimondino, E. Miceli, M. Molina, S. Wedepohl, S. Thierbach, E. Rühl, M. Strumia, M. Martinelli, M. Calderón, Rational design of dendritic thermoresponsive nanogels that undergo phase transition under endolysosomal conditions, *J. Mater. Chem. B* 5 (2017) 866–874.
- [51] A.A. Aldana, B. Barrios, M. Strumia, S. Correa, M. Martinelli, Dendronization of chitosan films: Surface characterization and biological activity, *REACT.* 100 (2016) 18–25.
- [52] N. Dib, L. Fernández, L. Otero, M. Santo, M. Calderón, M. Martinelli, M. Strumia, First generation newkome-type dendrimer as solubility enhancer of antitumor benzimidazole carbamate, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 82 (2015) 351–359.
- [53] M. Calderón, M.A. Quadir, M. Strumia, R. Haag, Functional dendritic polymer architectures as stimuli-responsive nanocarriers, *Biochimie* 92 (2010) 1242–1251.
- [54] A.M. Caminade, A. Ouali, R. Laurent, C.O. Turrin, J.P. Majoral, The dendritic effect illustrated with phosphorus dendrimers, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 3890–3899.
- [55] A.-M. Caminade, C.-O. Turrin, R.L. Armelle Ouali, B. Delavaux Nicot, *Dendrimers: Towards Catalytic, Material and Biomedical uses*, 1st ed., 2012.
- [56] J.I. Paez, M. Martinelli, V. Brunetti, M.C. Strumia, Dendronization: A useful synthetic strategy to prepare multifunctional materials, *Polymers (Basel)* 4 (2012) 355–395.
- [57] Y. Zheng, S. Li, Z. Weng, C. Gao, Hyperbranched polymers: advances from synthesis to applications, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 4091–4130.
- [58] M.B. Sassin, J.W. Long, J.M. Wallace, D.R. Rolison, Routes to 3D conformal solid-state dielectric polymers: Electrodeposition versus initiated chemical vapor deposition, *Mater. Horizons* 2 (2015) 502–508.
- [59] M. Scheiner, T.J. Dickens, O. Okoli, Progress towards self-healing polymers for composite structural applications, *Polymer (Guildf)* 83 (2016) 260–282.
- [60] S.M. Grayson, J.M.J. Fre, *Convergent Dendrons and Dendrimers: from Synthesis to Applications*, *Chem. Rev.* 101 (2001) 3819–3867.
- [61] S.D. García Schejtman, S. Marzini Irranca, C.I. Alvarez Igarzabal, M. Martinelli, Redefining the chemistry of super-macroporous materials: When dendritic molecules meet polymer cryogels, *Polym. Chem.* 11 (2020) 4507–4519.
- [62] R. Soleyman, M. Adeli, Impact of dendritic polymers on nanomaterials, (2015) 10–24.
- [63] B. Huang, D.A. Tomalia, Poly(ether) dendrons possessing phosphine focal points for stabilization and reduced quenching of luminescent quantum dots, *Inorganica Chim. Acta* 359 (2006) 1961–1966.
- [64] T.J. Cho, R.A. Zangmeister, R.I. MacCuspie, A.K. Patri, V.A. Hackley, Newkome-type dendron-

- stabilized gold nanoparticles: synthesis, reactivity, and stability, *Chem. Mater.* 23 (2011) 2665–2676.
- [65] C. Ozawa, H. Hojo, Y. Nakahara, H. Katayama, K. Nabeshima, T. Akahane, Y. Nakahara, Synthesis of glycopeptide dendrimer by a convergent method, *Tetrahedron.* 63 (2007) 9685–9690.
- [66] S. Han, T. Yoshida, T. Uryu, Synthesis of a new polylysine-dendritic oligosaccharide with alkyl spacer having peptide linkage, *Carbohydr. Polym.* 69 (2007) 436–444.
- [67] M. Calderón, M. Strumia, HYPERBRANCHED AND HIPERFUNCTIONALIZED MATERIALS FROM DENDRITIC CHEMISTRY (MATERIALES HIPERRAMIFICADOS E HIPERFUNCIONALIZADOS DERIVADOS DE LA QUÍMICA DENDRÍTICA), *Rev. Latinoam. Metal. y Mater.* (2012) 2–14.
- [68] A.P. Rosso, M. Martinelli, Preparation and characterization of dendronized chitosan/gelatin-based nanogels, *Eur. Polym. J.* 124 (2020) 109506.
- [69] A.A. Aldana, M.C. Strumia, M. Martinelli, The Cooperative Effect in Dendronized Chitosan Microbeads, *Aust. J. Chem.* 68 (2015) 1918.
- [70] S.D. García Schejtman, R. Toselli, M.C. Strumia, M. Martinelli, Gelatin films dendronized selectively on one side: enhancing antimicrobial properties and water repellence, *Polym. Bull.* 72 (2015) 3043–3062.
- [71] E. Miceli, S. Wedepohl, E.R. Osorio Blanco, G.N. Rimondino, M. Martinelli, M. Strumia, M. Molina, M. Kar, M. Calderón, Semi-interpenetrated, dendritic, dual-responsive nanogels with cytochrome c corona induce controlled apoptosis in HeLa cells, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 130 (2018) 115–122.
- [72] F. Schneider, A. Balaceanu, A. Feoktystov, V. Pipich, Y. Wu, J. Allgaier, W. Pyckhout-Hintzen, A. Pich, G.J. Schneider, Monitoring the internal structure of poly(N -vinylcaprolactam) microgels with variable cross-link concentration, *Langmuir.* 30 (2014) 15317–15326.
- [73] A. Zhang, L. Okrasa, T. Pakula, A.D. Schlüter, Homologous Series of Dendronized Polymethacrylates with a Methyleneoxycarbonyl Spacer between the Backbone and Dendritic Side Chain: Synthesis, Characterization, and Some Bulk Properties, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 6658–6666.
- [74] A. Zhang, B. Zhang, E. Wächtersbach, M. Schmidt, A.D. Schlüter, Efficient synthesis of high molar mass, first- to fourth-generation distributed dendronized polymers by the macromonomer approach., *Chemistry.* 9 (2003) 6083–6092.
- [75] A. Zhang, L. Wei, A.D. Schlüter, Narrowly distributed dendronized polymethacrylates by reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization, *Macromol. Rapid Commun.* 25 (2004) 799–803.
- [76] K.O. Kim, T. Choi, Synthesis of Rod-Like Dendronized Polymers Containing G4 and G5 Ester Dendrons via Macromonomer Approach by Living ROMP, *ACS Macro Lett.* 1 (2012) 445–448.
- [77] A. Nyström, M. Malkoch, I. Furó, D. Nyström, K. Unal, P. Antoni, G. Vamvounis, C. Hawker, K. Wooley, E. Malmström, A. Hult, Characterization of poly(norbornene) dendronized polymers prepared by ring-opening metathesis polymerization of dendron bearing monomers, *Macromolecules.* 39 (2006) 7241–7249.
- [78] S. Rajaram, T.-L. Choi, M. Rolandi, J.M.J. Fréchet, Synthesis of dendronized diblock copolymers via ring-opening metathesis polymerization and their visualization using atomic force microscopy., *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 9619–9621.
- [79] Z.T. Ball, K. Sivula, J.M.J. Fréchet, Well-defined fullerene-containing homopolymers and diblock copolymers with high fullerene content and their use for solution-phase and bulk organization, *Macromolecules.* 39 (2006) 70–72.
- [80] Y. Fu, Y. Li, J. Li, S. Yan, Z. Bo, High Molecular Weight Dendronized Poly(fluorene)s with Peripheral Carbazole Groups: Synthesis, Characterization, and Properties, *Macromolecules.* 37 (2004) 6395–6400.

- [81] Z. Fei, Y. Han, Z. Bo, Synthesis of porphyrin-embedded dendronized polymers by Suzuki polycondensation, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 46 (2008) 4030–4037.
- [82] Y. Lyu, D. Cui, H. Sun, Y. Miao, H. Duan, K. Pu, Dendronized semiconducting polymer as photothermal nanocarrier for remote activation of gene expression, *Angew. Chemie.* 129 (2017) 9283–9287.
- [83] T. Kaneko, T. Horie, M. Asano, T. Aoki, E. Oikawa, Polydendron: polymerization of dendritic phenylacetylene monomers, *Macromolecules.* 30 (1997) 3118–3121.
- [84] P.R.L. Malenfant, J.M.J. Fréchet, Dendrimers as solubilizing groups for conducting polymers: Preparation and characterization of polythiophene functionalized exclusively with aliphatic ether convergent dendrons, *Macromolecules.* 33 (2000) 3634–3640.
- [85] R.C. Advincula, Hybrid organic–inorganic nanomaterials based on polythiophene dendronized nanoparticles, *Dalt. Trans.* (2006) 2778–2784.
- [86] Z. Bao, K.R. Amundson, A.J. Lovinger, Poly (phenylenevinylene) s with dendritic side chains: Synthesis, self-ordering, and liquid crystalline properties, *Macromolecules.* 31 (1998) 8647–8649.
- [87] A. Nyström, A. Hult, Dendronized polymers with tailored surface groups, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 43 (2005) 3852–3867.
- [88] H. Kim, K.-T. Bang, I. Choi, J.-K. Lee, T.-L. Choi, Diversity-oriented polymerization: one-shot synthesis of library of graft and dendronized polymers by Cu-catalyzed multicomponent polymerization, *J. Am. Chem. Soc.* 138 (2016) 8612–8622.
- [89] H. Yang, R. Tang, W. Wu, W. Liu, Q. Guo, Y. Liu, S. Xu, S. Cao, Z. Li, A series of dendronized hyperbranched polymers with dendritic chromophore moieties in the periphery: convenient synthesis and large nonlinear optical effects, *Polym. Chem.* 7 (2016) 4016–4024.
- [90] F.L. Hatton, P. Chambon, T.O. McDonald, A. Owen, S.P. Rannard, Hyperbranched polydendrons: a new controlled macromolecular architecture with self-assembly in water and organic solvents, *Chem. Sci.* 5 (2014) 1844–1853.
- [91] S.D. García Schejtman, C.I.A. Igarzabal, M. Martinelli, Synthesis and characterization of novel dendritic macroporous monoliths, *Eur. Polym. J.* 106 (2018) 102–111.

Objetivos generales

En base a lo expuesto a lo largo de toda la Introducción, en esta Tesis Doctoral se planteó como Objetivo General, obtener biomateriales poliméricos novedosos con potencial uso en nanomedicina, estudiando diversas metodologías de síntesis y/o modificación de los mismos. Para esto se propuso la utilización de dendrones como bloques de construcción, para así obtener nanogeles dendronizados o dendríticos. Cabe destacar que, existen escasos reportes en la literatura de esta clase de materiales ya que, esta área de la ciencia de los polímeros se encuentra aún en pleno desarrollo.

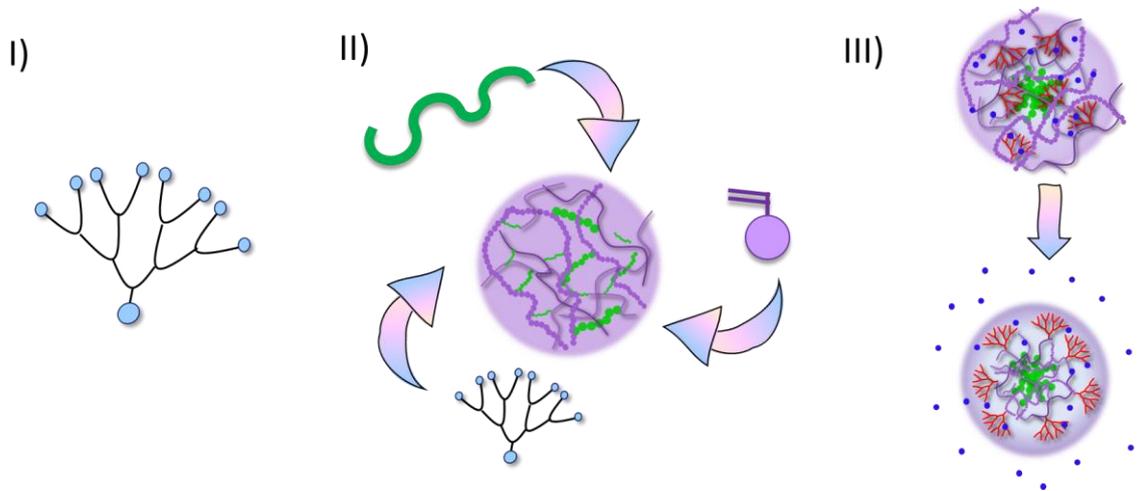
Para alcanzar este propósito, se propuso la utilización de diferentes bloques de construcción, para obtener diversas redes poliméricas sintéticas, naturales, dendríticas, dendronizadas o híbridas. Se buscó un sinergismo entre las ventajas e interacciones que pueden proporcionar los distintos bloques de construcción, y permitan el diseño de materiales óptimos para ser utilizados en diversas áreas de la nanomedicina.

El abordaje de este Objetivo General se realizó en etapas. En primera instancia, se seleccionaron moléculas clásicas para hacerlos reaccionar con dendrones y obtener así, potenciales macromonómeros dendríticos capaces de polimerizar formando redes con propiedades marcadas por la arquitectura dendrítica. En esta instancia se sintetizaron nuevas estructuras dendríticas, con diversas funcionalidades, tanto en la periferia como en el punto focal. Luego, se planteó el diseño y preparación de nanogeles combinando monómeros sintéticos, polímeros (naturales y sintéticos) y estructuras dendríticas previamente sintetizadas. En una última etapa, se seleccionaron algunas de las redes sintetizadas para ser ensayadas como potenciales biomateriales y su potencial aplicación en nanomedicina.

En base a esto, en este trabajo de Tesis se plantearon los siguientes Objetivos Específicos:

- (i) sintetizar y caracterizar diferentes moléculas dendríticas (Parte I);
- (ii) sintetizar y caracterizar nanogeles por combinación de diferentes bloques de construcción (Parte II);

(iii) Ensayar los biomateriales obtenidos como potenciales sistemas para ser empleados en el área de la nanomedicina (Parte III).



Con este Trabajo de Tesis se espera contribuir al diseño de nanomateriales que representen una alternativa para superar los desafíos y problemas que enfrenta la medicina convencional, demostrando la ventaja de combinar diferentes bloques de construcción y tipos de interacciones.

Materiales y métodos

Materiales

Los dendrones di-t-butil-4-amino-4-(3-(t-butoxi)-3-oxopropil)heptanodiato (Aminotriester, amina de Behera, AB) y di-t-butil-4-[2-(t-butoxicarbonil)etil]-4-isocianato-1,7-heptanodicarboxilato (Weisocianato, Weis) fueron provistos por Frontier Scientific (USA).

Los monómeros y entrecruzantes ácido acrílico, N,N' - metilenbisacrilamida (BIS) (99%), 2-hidroxiethyl metacrilato (HEMA) y N-[Tris(hidroximetil)metil]acrilamida (NAT, 93 %, contiene $\leq 7\%$ KCl) fueron provistos por Sigma-Aldrich y N-Vinilcaprolactama (VCL) por Aldrich.

Los solventes utilizados como hexano (C₆H₁₄) (Taurus), diclorometano (CH₂Cl₂) (Anedra), cloroformo (CHCl₃) (Cicarelli), dimetilformamida (DMF) (Sintorgan), acetato de etilo (EtOAc) (Anedra) y metanol (MeOH) (Sintorgan), fueron previamente destilados y/o secados utilizando tamices moleculares 4 Å 8-12 (Sigma, USA). Tetrahidrofurano (THF, Sintorgan, grado HPLC) fue almacenado con hilos de sodio metálico y el resto de los solventes como ciclohexano (C₆H₁₂) (Taurus), tolueno (C₇H₈) (Taurus), acetona (C₂H₆O) (Sintorgan), cloroformodeuterado (CDCl₃) (Aldrich), agua deuterada (D₂O) (Aldrich) y éter etílico (Et)₂O) (Sintorgan) fueron utilizados sin tratamiento previo.

Cloruro de benzoilo, cloruro de tionilo, persulfato de potasio (KPS), ácido gálico, y polivinil alcohol (PVA) fueron provistos por Merk.

Sorbitan mono-Oleato (span 80), monolaurato de polioxietilen(20)sorbitano (Tween 20) y dodecil sulfato de sodio (SDS) (96%) fueron provistos por BioPack.

Los agentes desecantes sulfato de magnesio (Mg₂SO₄) y cloruro de calcio (CaCl₂) anhidro, así como ácido clorhídrico (HCl), ácido fórmico, fosfato de sodio dibásico (Na₂HPO₄), ácido acético (C₂H₄O₂) y acetato de sodio (C₂H₃NaO₂) fueron provistos por Cicarelli.

La base trietilamina (EtN₃, 99,5 %, TEA), laurato de dibutil estaño, paladio sobre carbono (Pd/C 10 % p/p), tetrametilguanidina (TMG, 99 %), hidroquinona, los iniciadores canforquinona y persulfato de sodio (NaPS), quitosán (85% deacetilación DA, LMW), gelatina tipo A y tipo B (piel porcina), metil galato, ácido nitroisoftálico y sal de dioctil sulfosuccinato de sodio (AOT) (98%) fueron provistos por Sigma-Aldrich (USA).

Las sales utilizadas en la preparación de las soluciones buffer como, fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4), sodio carbonato (Na_2CO_3) y sodio bicarbonato (HNaCO_3) fueron provistos por Anedra.

El colorante verde de malaquita y ácido tánico fueron provistos por Mallinckrodt, el fármaco Bevacizumab por Avastin, ácido pirogálico por RP, N,N,N',N' tetrametiletilendiamina (TEMED) (98 %) por Fluka y piridina por ACS.

Métodos

Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los experimentos fueron realizados en un espectrómetro Bruker UltraShield 400, operado a 400 MHz y 100,6 MHz, para ^1H y ^{13}C , respectivamente, a 25°C y utilizando como solvente D_2O y CDCl_3 , según correspondiera. Para el análisis de los resultados obtenidos se usó el programa MestreC. Los espectros fueron calibrados usando la señal residual del solvente y los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) relativos a TMS.

Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros fueron realizados en un equipo Nicolet iN10 (Thermo Scientific, USA) empleando un detector enfriado con nitrógeno líquido de Mercurio Cadmio Telurio $7800\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ (MCT-A) o de temperatura ambiente $7600\text{-}450\text{ cm}^{-1}$ (DTGS), según la muestra. Se obtuvieron espectros a partir del promedio de al menos 64 mediciones con una resolución de 8 cm^{-1} . Las muestras fueron depositadas en un espejo de plata y analizadas por el modo reflexión. Se procesaron los espectros utilizando el programa Omnic 8.3

Análisis termogravimétrico (TGA)

Las curvas de TGA-DTA fueron obtenidas utilizando un equipo Shimadzu DTG-60 (Japan), en un rango de temperatura de T amb a 800°C con una curva de calentamiento de $20^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (de T amb a 150°C) y de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (de 150 a 800°C), con flujo de nitrógeno. Para graficar y procesar los datos se utilizó el programa OriginPro 8.0.

Espectrofotometría UV-visible

Las mediciones se efectuaron en espectrofotómetros Shimadzu MultiSpect 1810 y 1800. Los espectros fueron adquiridos entre 200-1100 nm a 25 °C con velocidad media de barrido, utilizando celdas de cuarzo con paso óptico de 1 cm y fueron realizados por triplicado. Para graficar y procesar los datos se empleó el programa OriginPro 8.0.

Dispersión de luz dinámica (DLS)

Los experimentos de DLS fueron llevados a cabo utilizando un Nano Zetasizer (Malvern Instruments), equipado con un láser He-Ne ($\lambda = 633$ nm) y ángulo de dispersión de 173°. Los tamaños de partículas (diámetro hidrodinámico, D_h) y la distribución de tamaños (índice de polidispersidad, PDI) se obtuvieron del promedio de 3 mediciones de las curvas de distribución de intensidad. La temperatura de transición de fase (T_f) se midió a diversas temperaturas que oscilaban entre 15 y 55 °C mediante dispersión dinámica de la luz. Los valores de potencial zeta (ζ) se midieron en el mismo equipo en una celda para medición de potencial zeta y los valores se obtuvieron del promedio de 3 mediciones.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las imágenes TEM se realizaron en un microscopio electrónico JEOL EXII operado a 80 kV. Las muestras fueron preparadas sobre grillas de cobre (200 mesh, QUANTIFOIL) depositando la solución que contenía la muestra y dejando secar a temperatura ambiente. Luego cada muestra sembrada se coloreo con una solución de acetato de uranilo al 2% y se dejó secar nuevamente a temperatura ambiente. Las imágenes se procesaron con el programa Image J y la distribución de tamaños se graficaron en el programa OriginPro 8.0 luego de la medición del tamaño de una población de aproximadamente 200 partículas.

Liofilizado de muestras

Diferentes muestras fueron liofilizadas para su posterior caracterización. El liofilizado consistió en una primera instancia en colocar las muestras a -20 °C durante 12 h en un freezer. Las muestras congeladas se colocaron

dentro de la unidad de liofilización. El proceso de liofilización se realizó utilizando un liofilizador de laboratorio (Rifacor L-T8) operado con un condensador a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y un vacío de 0,1 mbar durante 24 – 48 h.

Experimentos de turbidimetría

Se midieron las temperaturas de transición de fase de los nanogeles (T_{cp} , *Cloud point temperature*) en el espectrofotómetro Shimadzu MultiSpect 1810 y 1800. Las soluciones acuosas se calentaron de 15 a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ mientras se monitoreaba la transmitancia (% T) a 500 nm (1 cm de paso óptico) cada $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y fueron realizados por triplicado. Para graficar y procesar los datos se empleó el programa OriginPro 8.0. La T_{cp} de cada muestra se determinó usando el mínimo de la primera derivada del gráfico % T vs temperatura.



Sección II: Resultados





Parte I

Moléculas dendríticas



Parte I: Moléculas dendríticas

Introducción

El término dendrítico hace referencia a una estructura tipo arbórea, es decir, con una serie de ramificaciones.[1] La arquitectura dendrítica es una topología altamente observada en los sistemas biológicos en prácticamente todas las

escalas. Esta arquitectura se encuentra en la escala del metro en la ramificación y las raíces de los árboles, en las escalas de centímetros y milímetros en la anatomía humana, como en pulmones y vasos sanguíneos, en la escala micrométrica en las neuronas cerebrales y a nivel nanométrico en el glucógeno, la amilopectina y los proteoglucanos, Figura I.1. Al analizar estos patrones

dendríticos, es evidente que las arquitecturas altamente ramificadas deben ofrecer ventajas únicas.[2,3] Todos estos ejemplos corresponden a arquitecturas evolutivas que se han optimizado en los últimos miles de millones de años, para proporcionar estructuras que manifiesten interfaces máximas para una óptima extracción, almacenamiento, recuperación o distribución de energía, nutrientes, información, entre otras funciones.[4]

Los informes pioneros de moléculas dendríticas sintéticas inspiradas en estas estructuras dendríticas naturales se publicaron hace aproximadamente cuatro décadas.[5] Esos primeros estudios se centraron en su síntesis y sus propiedades físico-químicas.[2,4,6–8] Posteriormente, se comenzó a explorar el potencial de las moléculas dendríticas en diferentes aplicaciones. La presencia de una estructura altamente ramificada le confiere a estos polímeros una gran variedad de propiedades únicas y diferentes, que varían con la identidad y cantidad de dendrón presente, y que han demostrado posibilidad de uso en

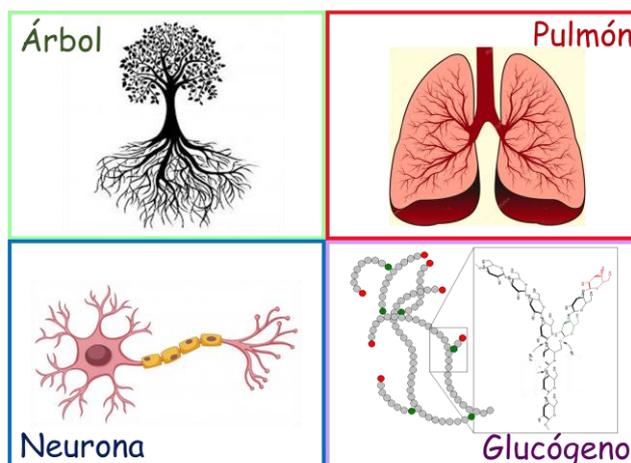


Figura I.1. Estructuras dendríticas observables en la naturaleza a distintas escalas.

diferentes aplicaciones específicas. Por ejemplo, en la administración dirigida de fármacos, portadores macromoleculares, catálisis enzimática, vacunas, antivirales, antibacterianos y terapéuticos anticancerígenos, sensores, ingeniería de superficies y aplicaciones biomiméticas.[6,9–14] Desde los primeros trabajos en este campo, se ha desarrollado una gran cantidad de estructuras dendríticas y se han convertido en objeto de intensos esfuerzos de investigación interdisciplinarios, que reúnen a científicos de áreas completamente diferentes.

Los polímeros dendríticos representan una nueva clase de macromoléculas con propiedades más allá de los polímeros convencionales [15]; es por esta razón que en la actualidad son reconocidos como uno de los cuatro principales tipos de polímeros, junto a los lineales, ramificados y entrecruzados.[2] Los estudios sobre materiales dendríticos se basan en su arquitectura y comprenden subclases tales como dendrímeros, dendrones, polímeros hiperramificados y *dendrigrraft*, Figura I.2.[5,16–19] La convergencia del "efecto dendrítico" impulsado arquitectónicamente, junto con la capacidad de controlar el tamaño, la forma y la funcionalidad química a nanoescala de estas construcciones dendríticas, han dado lugar a muchas propiedades nuevas sin precedentes.[20]

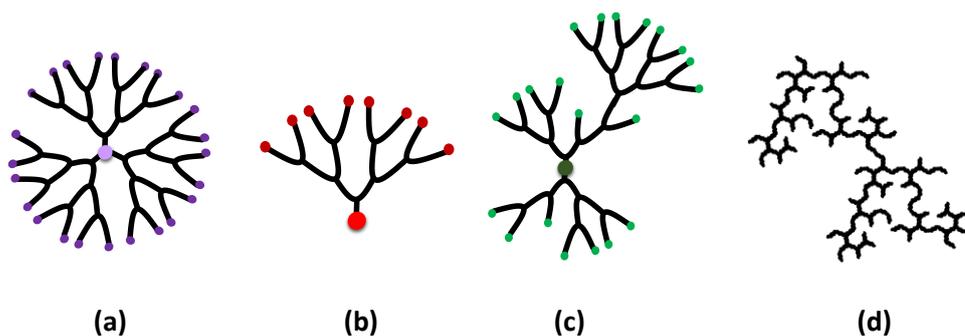


Figura I.2. Diferentes subclases de estructuras dendríticas: (a) dendrímero, (b) dendrón, (c) hiperramificado y (d) *dendrigraft*.

Bibliografía

- [1] S.D. García Schejtman, Síntesis de polímeros dendronizados. obtención de materiales para reconocimiento molecular específico, Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Córdoba, 2018.
- [2] D.A. Tomalia, J.M.J. Fréchet, Discovery of dendrimers and dendritic polymers: A brief historical perspective, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 40 (2002) 2719–2728.
- [3] S. Svenson, D.A. Tomalia, Dendrimers in biomedical applications-reflections on the field, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 102–115.
- [4] A.W. Bosman, H.M. Janssen, E.W. Meijer, About Dendrimers: Structure, Physical Properties, and Applications, *Chem. Rev.* 99 (1999) 1665–1688.
- [5] F. Vögtle, G. Richardt, N. Werner, *Dendrimer Chemistry: Concepts, Syntheses, Properties, Applications.*, 1st ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., KGaA: Weinheim, Germany, 2009.
- [6] E.R. Gillies, J.M.J. Fréchet, Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery, *Drug Discov. Today.* 10 (2005) 35–43.
- [7] G.R. Newkome, Z.Q. Yao, G.R. Baker, V.K. Gupta, Cascade Molecules: A New Approach to Micelles.1aA [27]-Arborol, *J. Org. Chem.* 50 (1985) 2003–2004.
- [8] F. Aulenta, W. Hayes, S. Rannard, Dendrimers: A new class of nanoscopic containers and delivery devices, *Eur. Polym. J.* 39 (2003) 1741–1771.
- [9] E.R. Gillies, T.B. Jonsson, J.M.J. Fréchet, Stimuli-responsive supramolecular assemblies of linear-dendritic copolymers, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 11936–11943.
- [10] S.E. Stiriba, H. Frey, R. Haag, Dendritic polymers in biomedical applications: From potential to clinical use in diagnostics and therapy, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 41 (2002) 1329–1334.
- [11] D. Astruc, F. Chardac, Dendritic catalysts and dendrimers in catalysis, *Chem. Rev.* 101 (2001) 2991–3023.
- [12] A.S. Gardberg, P.E. Doan, B.M. Hoffman, J.A. Ibers, Singly and Doubly Oxidized Phthalocyanine (pc) Rings: [Cu(pc)(ReO₄)] and [Cu(pc)(ReO₄)₂], *Angew. Chemie Int. Ed.* 40 (2001) 244–246.
- [13] G.H. Degenhart, B. Dordi, H. Schönherr, G.J. Vancso, Micro- and nanofabrication of robust reactive arrays based on the covalent coupling of dendrimers to activated monolayers, *Langmuir.* 20 (2004) 6216–6224.
- [14] G.M. Dykes, Dendrimers: A review of their appeal and applications, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 76 (2001) 903–918.
- [15] Y.H. Kim, O.W. Webster, Water soluble hyperbranched polyphenylene, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 4592–4593.
- [16] A. Carlmark, C. Hawker, A. Hult, M. Malkoch, New methodologies in the construction of dendritic materials, *Chem. Soc. Rev.* 38 (2009) 352–362.
- [17] H. Frauenrath, Dendronized polymers - Building a new bridge from molecules to nanoscopic objects, *Prog. Polym. Sci.* 30 (2005) 325–384.
- [18] J.M.J. Fréchet, D.A. Tomalia, *Dendrimers and Other Dendritic Polymers*, 2001.
- [19] G.R. Newkome, C.N. Moorefield, F. Vögtle, *Dendrimer Molecules: Concepts, Syntheses, Applications.*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA: Weinheim, Germany., 2002.
- [20] J.I. Paez, M. Martinelli, V. Brunetti, M.C. Strumia, Dendronization: A useful synthetic strategy to prepare multifunctional materials, *Polymers (Basel).* 4 (2012) 355–395.

Capítulo 1

Síntesis y Caracterización de estructuras dendríticas

1. 1. Introducción

La amplia gama de posibilidades de aplicaciones y características que hacen tan especiales a las moléculas dendríticas se debe principalmente a su arquitectura tan particular. Se trata de macromoléculas bien definidas y altamente ramificadas. Si bien todos los subtipos de estructuras dendríticas poseen una alta densidad de grupos funcionales y una alta cantidad de ramificaciones, algunas de ellas poseen estructuras más definidas que otras. Es por esto que, además, se pueden diferenciar en dos clases; por un lado los polímeros hiperramificados y los *dendrigrift* que se caracterizan por un gran número de puntos de ramificación con numerosos grupos terminales, mediante una distribución aleatoria en términos de su peso molecular y grado de ramificación, y los dendrímeros y dendrones que son de un peso molecular definido y con ramificaciones perfectas.[1] Estas diferencias estructurales radican en el modo de preparación, ya sea mediante polimerización de monómeros tipo AB_2 para los primeros o, por una serie de pasos de síntesis orgánica en el caso de los segundos. La perfección estructural de los dendrímeros y dendrones, al tener un control preciso sobre el tamaño, forma, funcionalidad, flexibilidad/rigidez y arquitectura, los hace buenos candidatos como *building blocks* a nanoescala, no así los hiperramificados.[2,3]

Además, se puede afirmar que los dendrímeros están compuestos por dendrones, que representan componentes estructurales del dendrímero original y también son secciones monodispersas.[4,5] Los dendrímeros/dendrones poseen tres características arquitectónicas claves: un núcleo iniciador denominado corazón o punto focal, unidades de ramificación interior con cavidades internas y una periferia con grupos funcionales de superficie, con una cantidad exacta de acuerdo a la generación (G), Figura 1.1.[6–8]

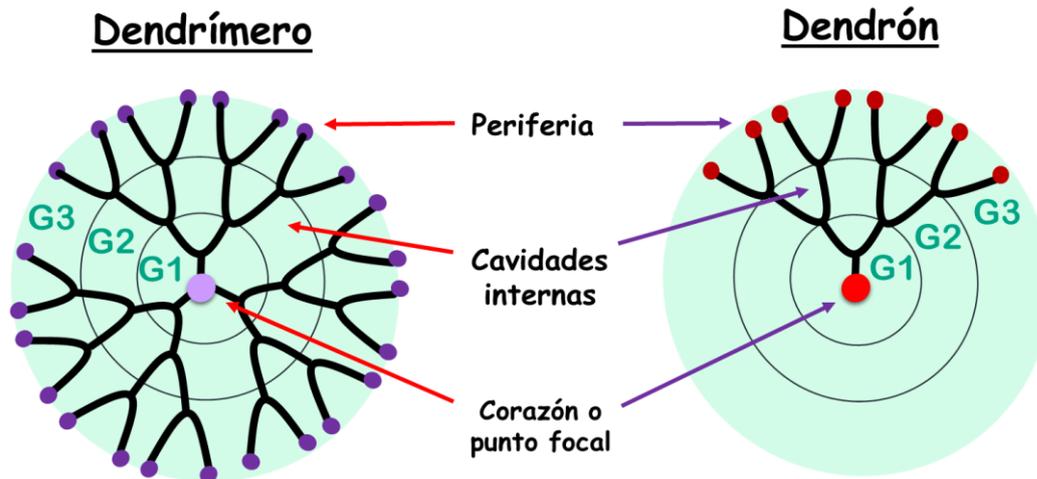


Figura 1.1. Esquema de la estructura general de dendrímeros y dendrones.

Las moléculas dendríticas poseen la capacidad de interactuar con otra molécula o superficie a través de uniones múltiples, debido a la funcionalidad y disposición estructural de la periferia. Esto se conoce como efecto dendrítico. Este efecto está conformado por dos efectos diferentes: la multivalencia o efecto multivalente y el efecto generacional. El primero, se refiere a una interacción simultánea entre múltiples funcionalidades como un todo, provocando propiedades únicas y diferentes a las que se obtienen mediante interacciones monovalentes. Un ejemplo cotidiano de esto es pretender sostener una pelota con los 5 dedos de una mano, lo que resulta más eficiente que sostenerla con 5 dedos cada uno perteneciente a 5 manos diferentes, (Figura 1.2). Si la interacción mencionada anteriormente es diferente cuando la generación de la estructura dendrítica incrementa o disminuye, entonces el efecto producido es un efecto generacional, que, en nuestro ejemplo cotidiano, sería la eficiencia de sostener una pelota con 5 dedos o con 2 dedos, (Figuras 1.2 b y 1.3). [1–9]

Es importante destacar que el efecto dendrítico puede ser positivo o negativo, es decir, que el resultado de las interacciones puede ser tanto mejorado como empeorado conforme aumenta la generación de la estructura. [3–10] La Figura 1.3 corresponde a una representación del cambio generacional conforme aumentan las ramificaciones en una estructura dendrítica.

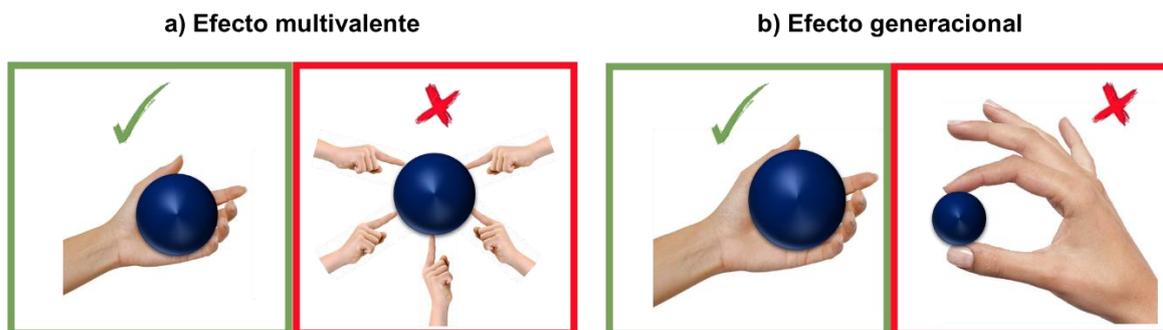


Figura 1.2. Representación esquemática de a) el efecto multivalente y b) el efecto generacional

En este trabajo de Tesis son de particular interés los dendrones, por diferentes motivos: por un lado, la preparación resulta más simple que la de dendrímeros, lo que reduce considerablemente los tiempos y costos de síntesis; por otro lado se los puede considerar como una sección o fragmento de los dendrímeros, o bien, una “rama” de los mismos, por lo que comparten muchas de sus características estructurales y propiedades físico-químicas.[11,12]

Los polímeros dendronizados, son una clase de materiales obtenidos por la combinación de polímeros lineales o entrecruzados y moléculas dendríticas, como restos pendientes de la cadena principal.[13–16] Por lo tanto, su preparación combina síntesis orgánica de dendrones y síntesis de polímeros, y se han desarrollado diferentes estrategias.[17,18]

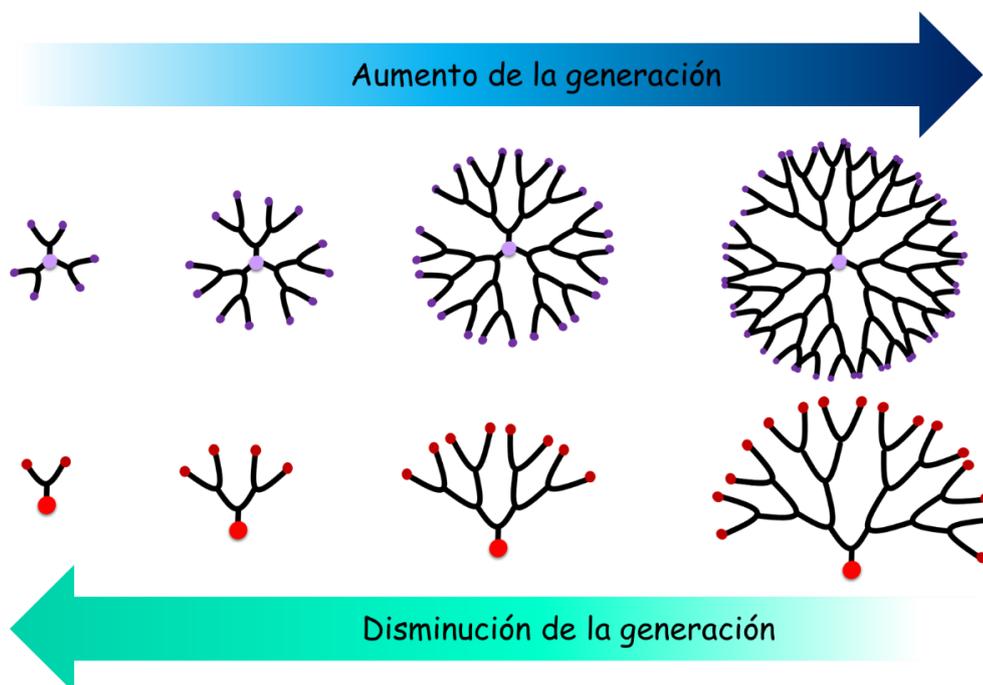


Figura 1.3. Esquema del aumento generacional de dendrímeros y dendrones.

El comportamiento de los polímeros dendronizados está dominado por características estructurales y geométricas, y se puede dividir en dos grupos. El primero está relacionado con las características estructurales y químicas de los dendrones, y está asociado al efecto dendrítico. El segundo depende del grado de dendronización, que es el número de dendrones por unidad de volumen o masa.[19]

Se conocen numerosos antecedentes de la incorporación de dendrones a una gran variedad de biomateriales, como bloques de construcción, brazo espaciador o agentes de funcionalización, mostrando una mejora en las propiedades del material con bajos porcentajes de incorporación. [20–25] Además, en los casos en los que se ha incorporado dendrones tipo Newkome se ha destacado la biocompatibilidad y baja citotoxicidad del material, haciendo de estos grandes candidatos para ser utilizados en el área de la biomedicina.[22–26]

Por todo esto, resulta atractivo evaluar la síntesis de dendrones con diferentes arquitecturas y grupos funcionales, que puedan ser utilizados como *building blocks* para el desarrollo de biomateriales para aplicaciones específicas.

Cabe destacar que, en estos últimos años, en el grupo de investigación, constantemente se está trabajando en conjunto para el desarrollo y optimización de este tipo de moléculas.

1. 2. Objetivos específicos

Sintetizar diversas moléculas o monómeros dendríticos a partir de la derivatización de dendrones comerciales y monómeros convencionales, para su futura utilización como bloques de construcción de biomateriales en la escala nano con potenciales aplicaciones en biomedicina.

1 3. Síntesis y caracterización de un monómero dendrítico a partir de Amina Behera

1. 3. 1. Parte experimental

1. 3. 1. 1. Acrilación de Amina Behera: obtención de di-tert-butil-4-acriloilamine 4-[2-(tert-butoxi-carbonil)etil]heptanodioato (ABA)

En primer lugar, en un balón de 2 bocas, previamente anhidrado y con flujo de N_2 , se pusieron a reaccionar 12,0 mL de ácido acrílico (0,18 mol), 35,0 mL de cloruro de benzoilo (0,30 mol), y se adicionaron 0,0200 g de hidroquinona (inhibidor radicalario). Luego, la mezcla de reacción se llevó a 150 °C con agitación constante, se realizó una destilación fraccionada y se recolectó la fracción que destiló por debajo de 85 °C en un balón enfriado con un baño de hielo, con agitación constante y una trampa de $CaCl_2$ para mantener el medio libre de humedad. En este balón se colocaron 2,0401 g de amina de Behera (AB) (5,0 mmol), 1,20 mL de trietilamina (TEA) (8,5 mmol) y 40,0 mL de CH_2Cl_2 .

El sistema con baño de hielo se dejó reaccionando por 24 horas, con agitación constante, a temperatura ambiente y bajo ambiente de N_2 . La reacción fue monitoreada mediante cromatografía en placa delgada contra testigo de reactivos, utilizando como fase móvil una mezcla de cloroformo:acetato de etilo 10:90.

El crudo de reacción se lavó con HCl diluido, $NaHCO_3$, salmuera y agua en una ampolla de decantación. La fase orgánica se secó sobre $MgSO_4$ anhidro, se filtró y se concentró a vacío para obtener un sólido blanco.

El producto se purificó por cromatografía en columna, empaquetada con sílicagel 60 (poros 0,063-0,200 mm) (70-230 mesh ASTM) y la fase móvil cloroformo:acetato de etilo 10:90. Luego, se concentró a vacío, obteniéndose nuevamente un sólido blanco que corresponde al monómero dendrítico di-tert-butil-4-acrililamine 4-[2-(tert-butoxi-carbonil)etil]heptanodioato (ABA) (rendimiento: 86%).

El producto obtenido se caracterizó por RMN 1H y ^{13}C y por espectroscopia FT-IR.

1.3.1.2. Hidrólisis de los grupos éster: obtención de ácido 4-acrilomida-4-(2-carboxi etil)heptanodioico (ABC)

Para la obtención de un dendrón con grupos terminales ácido, a partir de la hidrólisis de los grupos *ter*-butilo del monómero dendrítico ABA, cuya síntesis se detalla en el inciso anterior, se colocaron 1,0000 g (2,25 mmol) del monómero dendrítico ABA disueltos en 2,0 mL de acetona y se adicionaron luego 7,0 mL de ácido fórmico 89%. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 60 horas. Después del tiempo de reacción,

el exceso de ácido se eliminó por evaporación al vacío y el producto se recuperó como un sólido de color tostado pálido que corresponde al dendrón ácido 4-acrilomida-4-(2-carboxi etil)heptanodioico (ABC) (rendimiento: 95%).

El producto obtenido se caracterizó por RMN ^1H y ^{13}C y por espectroscopia de FT-IR.

1.3.2. Resultados y discusión

La amina de Behera o AB es una molécula dendrítica susceptible de ser derivatizada para obtener un monómero dendrítico capaz de polimerizar, además de poseer grupos funcionales éster en la periferia susceptibles de ser hidrolizados a grupos ácido y así, obtener un monómero con respuesta al pH del medio.

La síntesis de ABC, partiendo de AB se llevó a cabo en dos etapas, la primera fue la incorporación de un doble enlace al punto focal amino para obtener el monómero dendrítico ABA, metodología basada en el trabajo reportado por Newkome y colaboradores [27] con modificaciones, y luego la hidrólisis de los grupos éster de la periferia.

En el primer paso, la base presente en el medio (TEA) toma un protón del grupo amino de AB, esto aumenta su nucleofilicidad e induce la acrilación con cloruro de acrililo (ClAc) por sustitución nucleofílica, para obtener ABA. El ClAc es generado in situ mediante cloración de ácido acrílico con cloruro de benzoilo (Figura 1.4.).

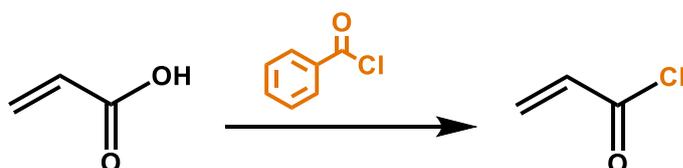


Figura 1.4. Reacción de obtención de Cloruro de Acriloilo

Al acrilar AB se obtiene una molécula con un doble enlace polimerizable que, a través de una polimerización típica de adición, puede dar lugar a un polímero dendrítico.

Luego de la acrilación, se hidrolizaron los tres grupos éster del dendrón ABA a grupos ácido, dando ABC como producto final. En la Figura 1.5, se representan las dos etapas sintéticas descritas.

Al cambiar la funcionalidad de la periferia del dendrón, de grupos ter-butilo a ácido, el monómero dendrítico resultante posee propiedades anfifílicas, con zonas hidrofílicas, debido a la presencia de los grupos polares presentes en la periferia y con una zona más hidrofóbica, consecuencia de la estructura interna del dendrón.

De esta manera, sustancias liposolubles podrían ser alojadas en las zonas más hidrofóbicas del polímero dendrítico, pudiendo mantener el sistema polímero-sustancia estable en medio acuoso.

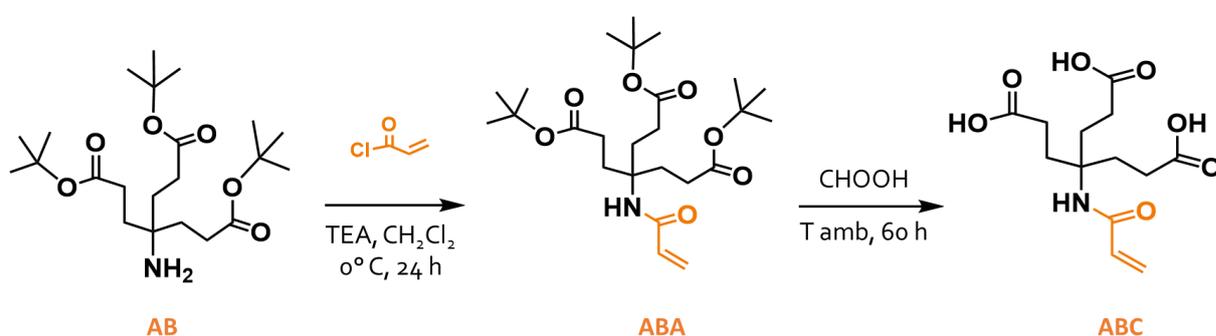


Figura 1.5. Esquema de la obtención de los monómeros dendríticos ABA y ABC.

El reactivo de partida AB y los productos obtenidos ABA y ABC, luego de purificados, fueron caracterizados por FT-IR, y RMN ¹H y ¹³C.

En el espectro de RMN-¹H de AB se observan 3 señales, dos tripletes a 2,3 y 1,7 ppm, que ambos integran para 6 H, provenientes de los protones de los grupos metileno (CH₂) en las ramificaciones del dendrón y, un singlete a 1,52 ppm que integra para 27 H correspondiente a los metilo (CH₃) de los ter-butilo de la periferia de la molécula.

Por otro lado, en el espectro del producto obtenido luego de la acrilación de AB, además de observarse las señales características del dendrón, es decir un singlete a 1,4 ppm y dos tripletes centrados a 2,2 y 1,9 ppm, se observan tres señales, (doblete a 5,5 y a 6,1 ppm; doble doblote a 5,9 ppm), que integran para un protón cada uno, los cuales fueron asignados a los protones vinílicos (CH=CH₂) del doble enlace adicionado.

Luego de hidrolizar los grupos éster, en el espectro de RMN-¹H se observan las mismas señales asignadas a ABA, a excepción de la señal a 1,4 ppm correspondiente a los protones de los grupos metilo terminales

del dendrón, la cual desaparece luego de este paso de síntesis evidenciando una hidrólisis eficiente de los grupo ter-butilo y por ende la obtención de ABC (Figura 1.6).

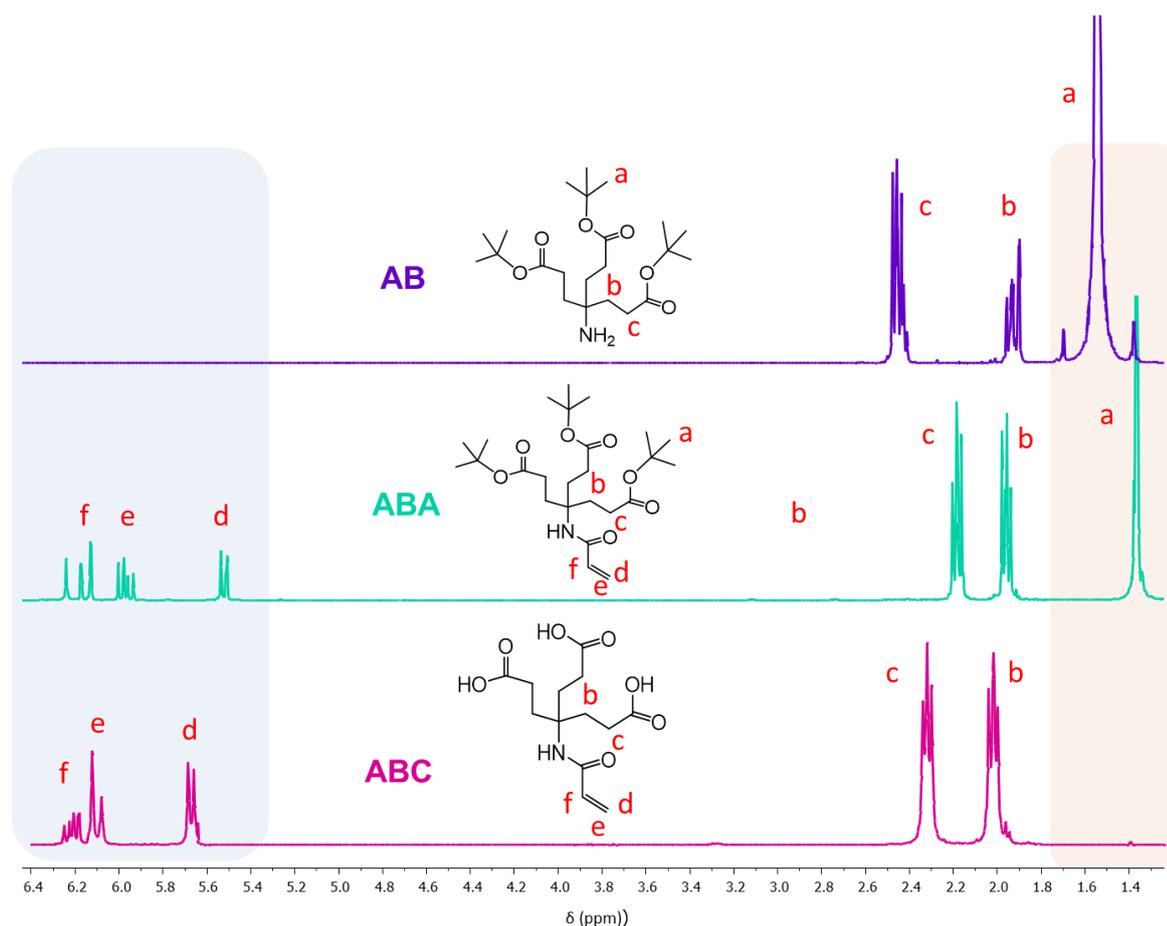


Figura 1.6. Espectros de RMN-¹H de AB (D₂O), ABA (CDCl₃) y ABC (D₂O).

Al analizar el espectro del dendrón AB se observan 3 señales alrededor de 30 ppm, dos de las cuales corresponden a los átomos de carbono del grupo metileno (CH₂) de las ramificaciones del dendrón y una a los átomos de carbono de los metilo (CH₃) terminales. Además, se observan 2 señales, a 81 y 174 ppm correspondientes a los átomos de carbono cuaternarios de los grupos ter-butilo (-C(CH₃)₃) y del grupo carbonilo (C=O), respectivamente.

Cuando se analizaron los espectros de RMN-¹³C se encontraron evidencias que ratifican la eficacia de la acrilación y de la hidrólisis.

Luego de la reacción de acrilación, el nuevo espectro obtenido muestra 3 señales nuevas, a 125, 131 y 164 ppm correspondientes a los dos átomos de carbono vinílicos (CH=CH₂) y al carbono carbonílico del grupo amida (NH-C=O) formado, respectivamente. Esta evidencia, indica también que la reacción de acrilación del dendrón fue eficiente, dando lugar a la obtención del monómero dendrítico ABA.

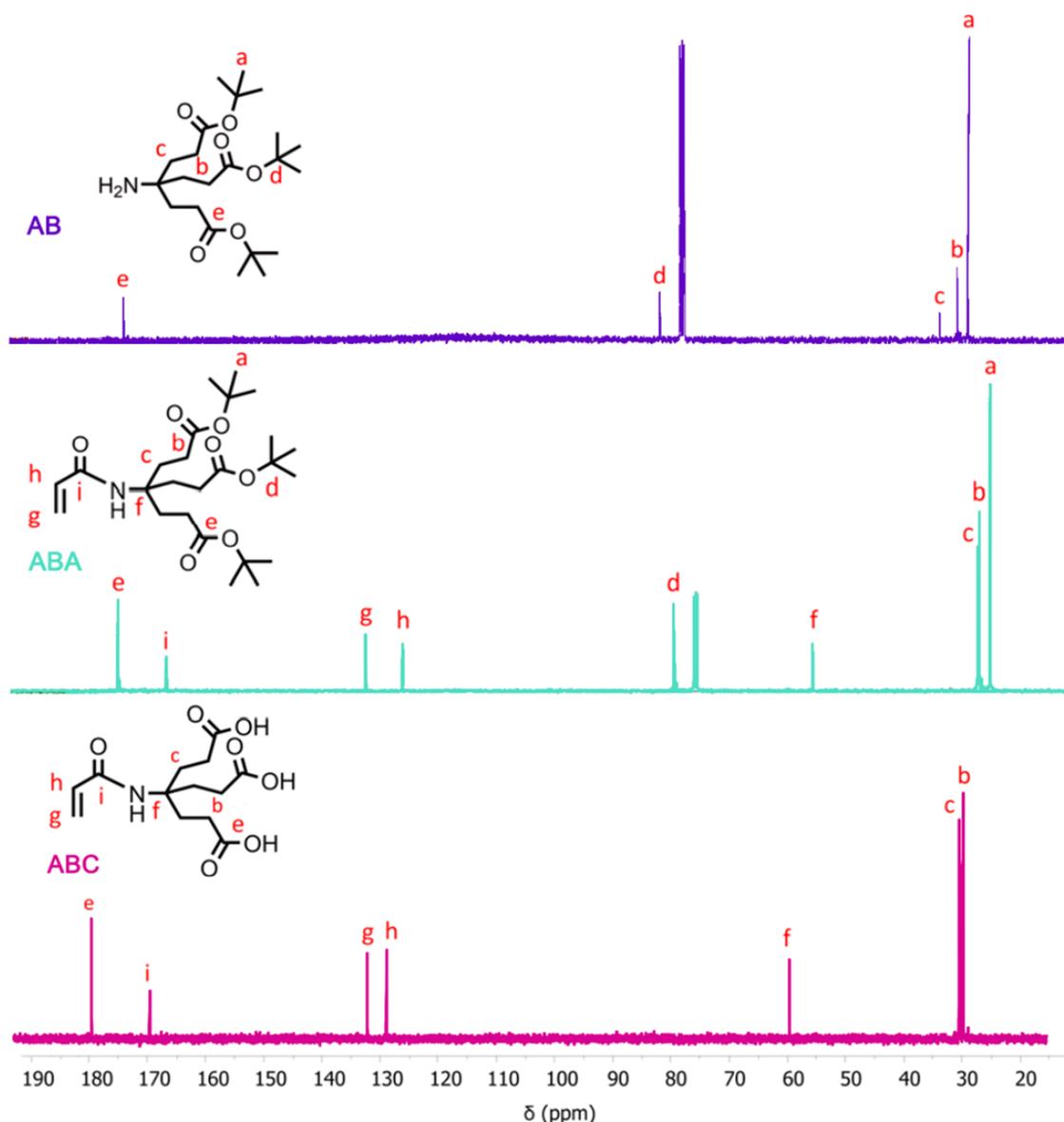


Figura 1.7. Espectros de RMN-¹³C de las moléculas dendríticas AB (D₂O), ABA (CDCl₃) y ABC (D₂O).

Al llevar a cabo la hidrólisis, el espectro de RMN-¹³C del producto obtenido (ABC) muestra las mismas señales que el dendrón ABA, a excepción de dos señales que no se observan en este nuevo espectro. La señal a 81 ppm y una de las señales ubicadas alrededor de 30 ppm correspondientes ambas a los átomos de carbono que forman los grupos

ter-butilo ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), indicando una completa hidrólisis y obtención del dendrón ABC, (Figura 1.7).

Por último, se analizaron los espectros FT-IR tanto del reactante como de los dos productos, Figura 1.8. En el caso de AB se observaron señales características de una amina primaria, vibración de estiramiento del enlace N-H entre 3300 y 3400 cm^{-1} , una señal intensa a 1725 cm^{-1} correspondiente a la vibración de estiramiento de C=O del grupo éster, una señal a 1242 cm^{-1} proveniente del estiramiento del enlace C-N y dos bandas intensas a 847 y 755 cm^{-1} características de vibraciones de enlace de los grupos ter-butilo de la periferia del dendrón.

Al observar el espectro de ABA se destacan algunas diferencias; las nuevas señales observadas se correspondieron a la vibración de estiramiento del enlace N-H del grupo amida, el estiramiento NHC=O (amida I) y la deformación NH y N-C=O (amida II) a 3300, 1648 y 1531 cm^{-1} , respectivamente. Cuando finalmente se lleva a cabo la hidrólisis de los grupos ter-butilo, el espectro FT-IR del producto obtenido muestra un perfil muy diferente. El primer cambio que se observa es la aparición de una banda ancha entre 2500 y 3500 cm^{-1} proveniente del estiramiento del enlace O-H de los grupos ácido formados después de la hidrólisis. Además, la señal del grupo carbonilo se desplaza de 1725 a 1715 cm^{-1} , por la conversión del grupo éster a grupo ácido y, por último, se puede destacar la desaparición de las señales a 847 y 755 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones de enlace de los grupos ter-butilo, presentes en el espectro de AB y ABA. La desaparición de dichas señales es consistente con la hidrólisis de dichos grupos, no estando presentes en el producto final ABC.

Los valores observados de número de onda (cm^{-1}) en todos los espectros FT-IR, se corresponden con lo esperado para aminas y amidas que presentan interacciones del tipo puente hidrógeno[28].

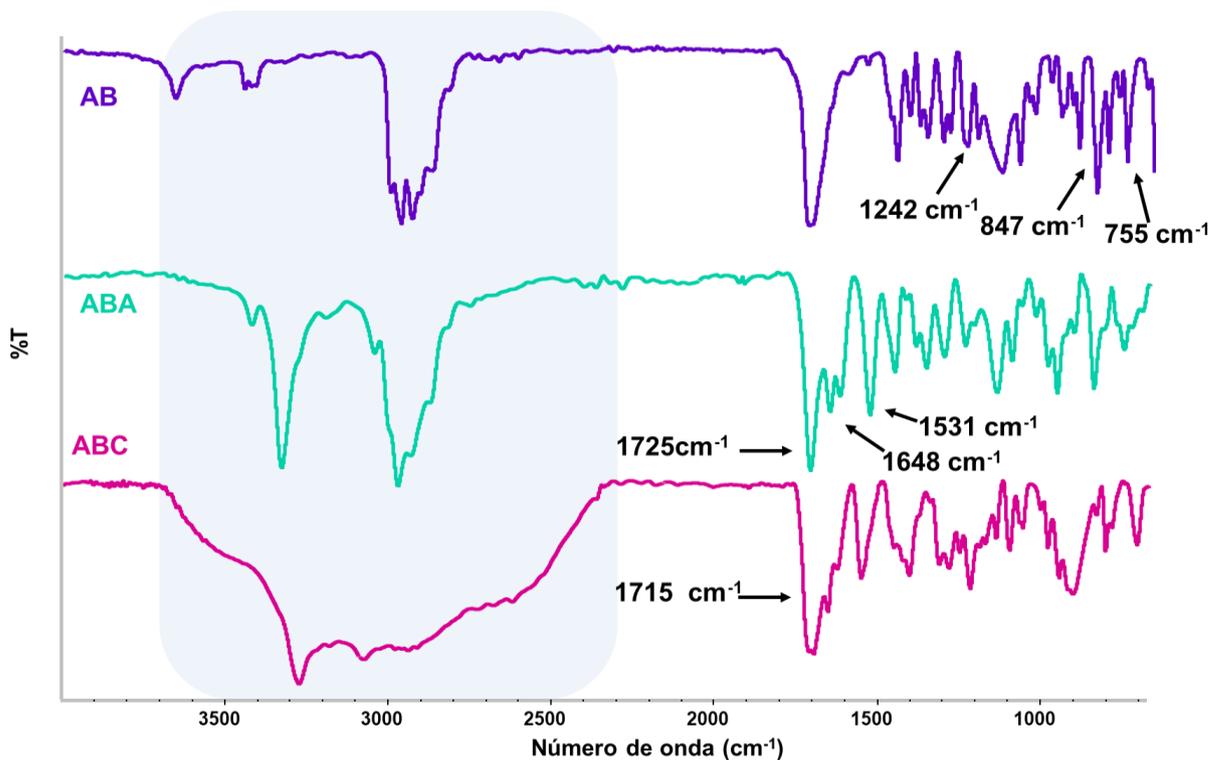


Figura 1.8. Espectros FT-IR de AB, ABA y ABC.

1. 4 Síntesis y caracterización de un monómero dendrítico a partir de HEMA y Weis

1. 4. 1. Parte experimental

Para esta síntesis se ensayaron tres medios de reacción, por un lado, se utilizó DMF como solvente y por el otro THF. En los casos que se utilizó THF, fue necesario activar el grupo hidroxilo del monómero 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) mediante la adición de una base, para lo cual se comparó la reactividad empleando piridina y tetrametil guanidina (TMG).

Para los sistemas donde se requirió la asistencia de una base, antes de comenzar la reacción se preparó una mezcla de 0,20 mL de HEMA (1,50 mmol) y 0,050 mL de piridina (0,75 mmol) o 0,10 mL de TMG (0,75 mmol). Esta mezcla se dejó con agitación constante por 1 hora.

En todos los casos, la reacción se llevó a cabo en un equipo de reflujo, previamente anhidrado, se hicieron reaccionar 0,20 mL de HEMA (1,50 mmol), o la mezcla HEMA-base correspondiente, 0,2050 g de Weis (0,50 mmol) y se llevaron a un volumen final de 8 mL. Por último, se adicionaron 0,10 mL de dilaurato de dibutil estaño (0,017 mmol), como catalizador. La mezcla de reacción se dejó con agitación constante por 48 horas a 85 o

70°C, según se haya utilizado DMF o THF como solvente, respectivamente. El avance de la reacción se siguió por cromatografía en placa delgada utilizando como fase móvil hexano:acetato de etilo 80:20.

Después del tiempo de reacción, se adicionaron 20,0 mL de éter etílico y se realizaron 6 lavados, 3 con salmuera y 3 con H₂O destilada, para recuperar el producto. Por último, se agregó un agente desecante (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. En todos los casos se obtuvo un aceite de color amarillento.

Luego de cada síntesis el producto se purificó por cromatografía en columna, en sílicagel 60 (poros 0,063-0,200 mm) (70-230 mesh ASTM) y fase móvil hexano:acetato de etilo 80:20 y se concentró a vacío.

El compuesto obtenido se caracterizó por RMN-¹H.

1. 4. 2. Resultados y discusión

El compuesto Weis es un dendrón comercial que posee un grupo funcional isocianato y nueve grupos metilo en la periferia (3 grupos *ter*-butilo), pero no posee un grupo funcional polimerizable por adición, por lo que no puede ser utilizado para la síntesis de biomateriales por esta vía.

El grupo funcional hidróxido del HEMA puede actuar como nucleófilo frente al grupo funcional isocianato (NCO), el cual contiene un átomo de carbono altamente electrofílico.[29] La formación de enlaces uretano (-O-CO-NH-) a partir de Weis, bajo distintas condiciones de reacción, ya ha sido estudiada en nuestro grupo de trabajo.[20,21,23] Generalmente, este tipo de reacciones con isocianatos son catalizadas por laurato de dibutilestano.

A diferencia de los productos previamente descritos (ABA y ABC), la síntesis de este monómero dendrítico presenta la inclusión no solo de un grupo alilo, sino también de un grupo etilenoxi (-O-CH₂-CH₂-) capaz de comportarse como un agente espaciador, Figura 1.9. Este espaciador podría facilitar la polimerización del monómero dendrítico, permitiendo un mayor largo de cadena y hasta quizás mejores rendimientos disminuyendo el impedimento estérico.

Para esta síntesis se varió el medio de reacción, se emplearon como solvente DMF o THF, y en los casos que se utilizó THF, se adicionó una base al medio para formar el alcóxido correspondiente del HEMA y lograr así, un mayor poder nucleofílico, debido a que con este solvente las condiciones de reacción son más suaves (temperaturas más bajas). Las bases seleccionadas fueron TMG y piridina. Las mismas fueron seleccionadas por tratarse de buenas bases (pKa 12,4 y 5,16 respectivamente), pero nucleófilos pobres, evitando la competencia entre nucleófilos.

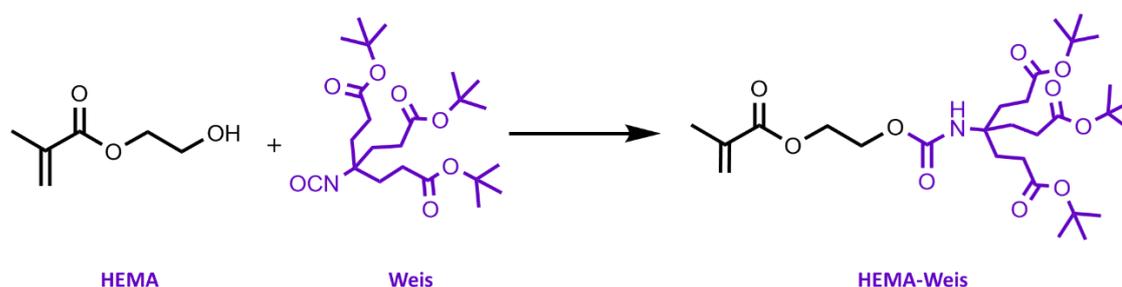


Figura 1.9. Reacción de obtención de HEMA-Weis

Una vez realizada la síntesis, bajo las distintas condiciones de reacción, los resultados demostraron que al usar como medio THF y piridina, no se obtuvo el producto deseado. En cambio, al emplear DMF como solvente, se obtuvo el producto HEMA-Weis, aunque con bajo rendimiento, debido a las dificultades en la etapa de purificación, donde fue difícil la eliminación del solvente y del catalizador. Los mejores rendimientos se obtuvieron empleando THF y TMG como base.

Inicialmente, se analizaron los espectros de RMN-¹H de los reactivos de partida, HEMA y Weis, Figura 1.10. Por un lado, el espectro del dendrón comercial mostró tres señales, 2 tripletes a 1,8 y 2,3 ppm que integran para 6 H cada uno, y un singlete a 1,4 ppm que integra para 27 H aproximadamente, correspondientes a los protones del grupo metileno (b y c: CH₂) de las ramificaciones y a los sustituyentes metilo (a: CH₃) de los grupo *ter*-butilo, respectivamente.

El espectro del monómero de partida HEMA mostró una señal intensa a 1,9 ppm que integra para 3 H correspondiente a los protones del metilo alílico (a: CH₃-C=CH₂), 2 señales que integran para 2 H cada una a 3,8 y 4,2 ppm correspondientes a los protones de los grupos metileno (d y e: COO-CH₂-CH₂) y 2 señales que integran para 1 H cada una a 5,7 y 6,1

ppm correspondientes a los protones vinílicos (b y c: $C=CH_2$), lo cual concuerda con lo observado en literatura.[30]

El análisis del correspondiente espectro de RMN- 1H del producto obtenido en THF con TMG como base, mostró la señal de los grupos metilo y metileno aportados por el dendrón a 1,4, 1,7 y 2,0 ppm (h: CH_3 ; f y g: CH_2). El corrimiento observado para los grupos metileno, con respecto al Weis, se debe al cambio en el entorno químico en el dendrón, el grupo funcional más próximo es un grupo isocianato, que luego de la reacción forma un grupo uretano. Además, se observan las señales de los grupos metileno a 3,8 y 4,2 ppm (d y e: $COO-CH_2-CH_2$), las señales de los dos protones vinílicos (b y c: $C=CH_2$) a 6,0 y 5,5 ppm y de los protones del metilo alílico (a: $CH_3-C=CH_2$) a 2,6 ppm aportados por el HEMA, Figura 1.10.

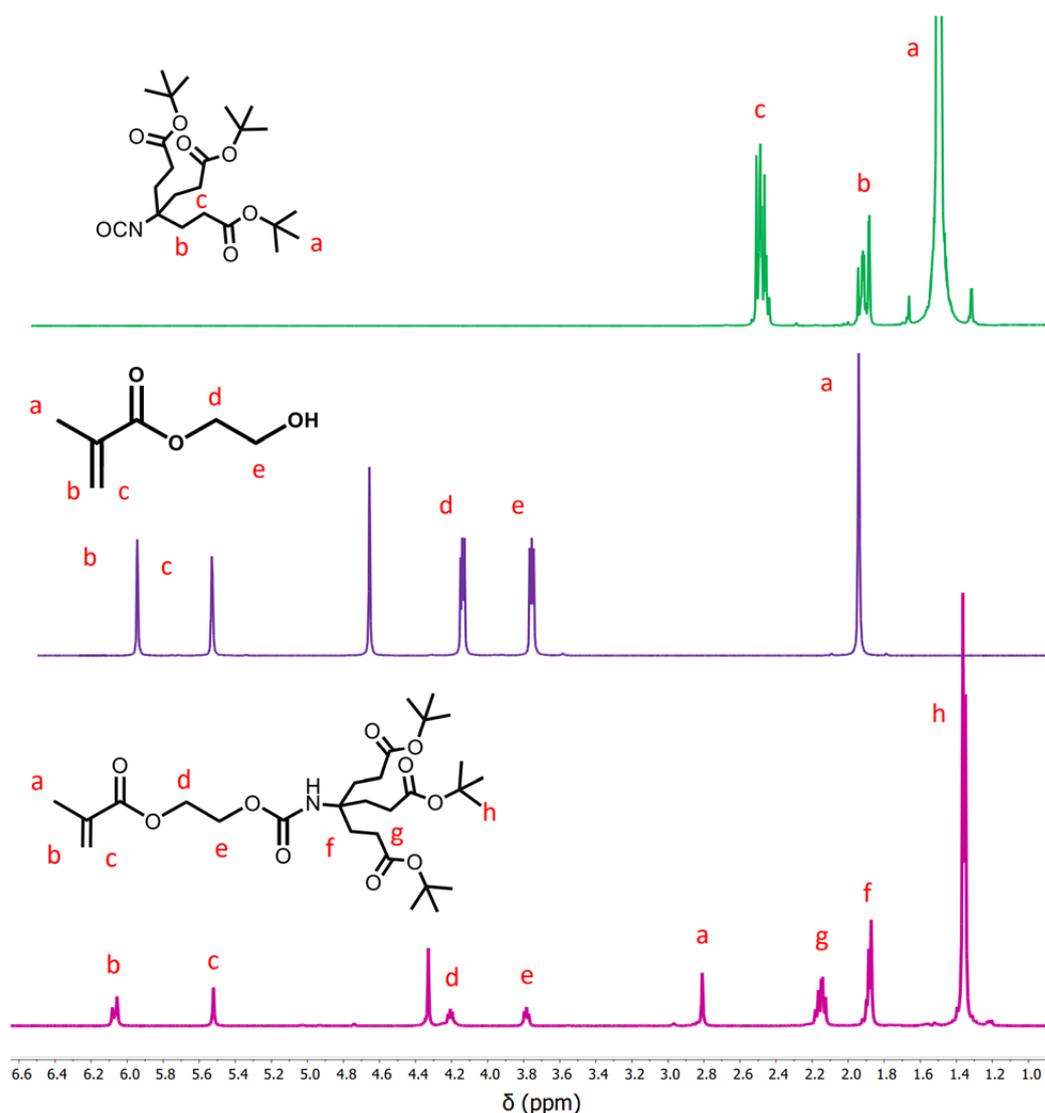


Figura 1.10. Espectros RMN- 1H de Weis ($CDCl_3$), HEMA (D_2O) y HEMA-Weis (D_2O).

1. 5. Síntesis y caracterización de un monómero dendrítico a partir de NAT y Weis

1. 5. 1. Parte experimental

1. 5. 1. 1. Obtención de NAT-Weis

Para llevar a cabo esta síntesis, en un equipo de reflujo, previamente anhidrado, se hicieron reaccionar 0,0500 g de NAT (0,30 mmol), 0,5050 g de Weis (1,20 mmol) y se disolvieron en 8,0 mL de DMF. Por último, se adicionaron 0,10 mL de dilaurato de dibutil estaño (0,017 mmol), como catalizador. La mezcla de reacción se dejó con agitación constante por 24 horas a 70°C.

Después del tiempo de reacción, se adicionaron 20,0 mL de éter etílico y se realizaron 6 lavados, 3 con salmuera y 3 con H₂O destilada, para recuperar el producto. Por último, se agregó un agente desecante (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío.

1. 5. 1. 2. Hidrólisis de los grupos *ter*-butilo: obtención de NAT-Weish

Una vez obtenido el monómero dendrítico NAT-Weis se procedió a la hidrólisis de los grupos *ter*-butilo para la obtención de un dendrón con grupos terminales ácidos. Para ello, se partió de NAT-Weis, previamente sintetizado, el cual se disolvió en 0,5 mL de acetona y luego se adicionaron 7 mL de ácido fórmico 89%. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 60 horas. Después del tiempo de reacción, el exceso de ácido se eliminó por evaporación al vacío.

El producto obtenido se caracterizó por RMN-¹H.

1. 5. 2. Resultados y discusión

La dendronización del monómero convencional NAT con el dendrón comercial Weis, es decir dos compuestos conocidos ampliamente por su biocompatibilidad, da como resultado un dendrón de segunda generación, (Figura 1.11)

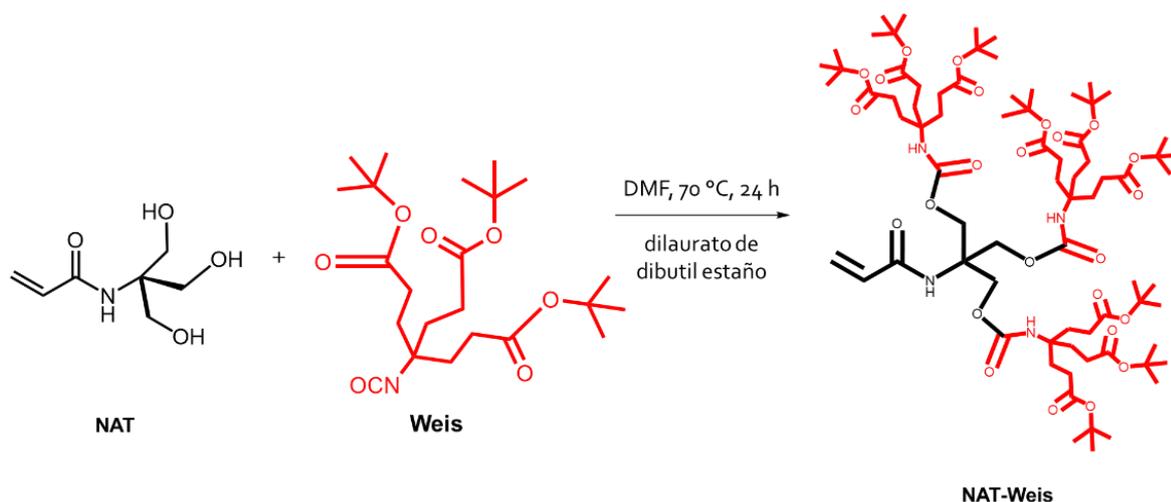


Figura 1.11. Reacción de obtención de NAT-Weis.

Esto, como se mencionó en la introducción, puede conducir a un material con propiedades muy diferentes a las del dendrón de primera generación, como consecuencia del llamado efecto generacional.[31]

Además, hay un aumento significativo de la densidad de grupos funcionales terminales, Weis posee 3 grupos en la periferia, mientras que NAT-Weis posee 9 grupos, mejorando/aumentando el efecto multivalente.[10]

La vía de síntesis es similar a la detallada en el apartado 1.4. de este capítulo y, consiste en la reacción de un grupo nucleofílico hidroxilo con un grupo electrofílico isocianato. La principal diferencia radica en que, para la síntesis de HEMA-Weis la relación monómero dendrón es 1:1 y en este caso es de 1:3.

En la síntesis de NAT-Weis se añade además un paso de hidrólisis para obtener grupos funcionales terminales ácido, en lugar de *ter*-butilo, aumentando así la hidrofiliidad de la molécula y dando lugar al denominado NAT-Weish (Figura 1.12).

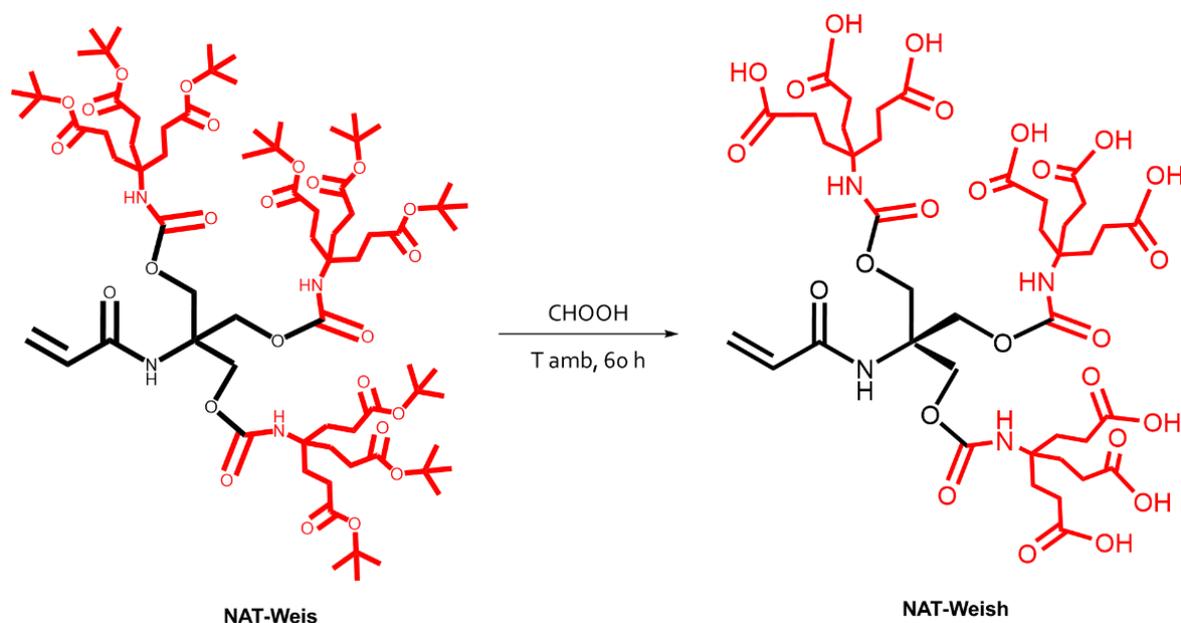


Figura 1.12. Reacción de hidólisis de NAT-Weis para la obtención de NAT-Weish.

Es decir, se obtienen dos monómeros dendríticos con posibilidad de encapsular una gran cantidad y un amplio rango de moléculas o compuestos, debido al marcado carácter hidrofóbico o hidrofílico de cada una de ellas y a la alta densidad de ramificaciones en su interior. Además, en el caso del NAT-Weish al ser incorporado como bloque de construcción en un material, le conferiría propiedades de un polímero inteligente, sumando respuesta al pH del medio, debido a la presencia de los grupos ácido ionizables.

Para corroborar la obtención de NAT-Weis y NAT-Weish, tanto los reactivos de partida como los productos obtenidos se caracterizaron por RMN-¹H (Figura 1.13)

El espectro correspondiente al dendrón de partida, Weis, ya fue descrito en la sección anterior de este capítulo (1.4.2).

El espectro del monómero NAT muestra cuatro señales, 3 de estas entre 5,6 y 6,4 ppm que integran para 1 H cada una y que corresponden a los protones vinílicos (a, b y c: $\text{CH}_2=\text{CH}$). La cuarta señal se encuentra a 3,8 ppm e integra para 6 H correspondientes a los protones de los grupos metileno (d: CH_2OH).

El producto obtenido en la primera etapa (NAT-Weis), mostró tres señales que integran para 1 H cada una, entre 5,2 y 6,5 ppm correspondientes a los protones vinílicos (a, b y c: $\text{CH}_2=\text{CH}$). Además, un singlete a 4,7 ppm que integra aproximadamente para 6 H y una serie de multipletes entre 1,8 y 2,5 ppm correspondientes a los protones del grupo metileno del NAT (d: CH_2OR) y metileno del dendrón (e y f: CH_2-CH_2), respectivamente. Por último, se puede destacar una señal intensa a 1,5 ppm correspondiente a los protones de los grupos *ter*-butilo del dendrón (g: $\text{C}(\text{CH}_3)_3$). Además, se observan otras señales que no pueden ser asignadas a reactivos o productos, indicando que, a pesar de los lavados realizados, el producto no se encontraba completamente puro.

Por otro lado, el espectro obtenido del producto después de la hidrólisis (NAT-Weish) mostró nuevamente tres señales entre 5,8 y 6,5 ppm que integran para 1 H cada una, correspondientes a los protones vinílicos (a, b y c: $\text{CH}_2=\text{CH}$). La señal de los protones del grupo metileno (d: CH_2) aportado por NAT no se observan, probablemente debido a la superposición con la señal del solvente a 4,7 ppm. Nuevamente, se observa una serie de multipletes entre 1,8 y 2,6 ppm correspondientes a los protones de los grupos metileno del Weis (d y e: CH_2). Es importante destacar que no se observa la señal a 1,5 ppm (asignada a los grupos metilo del *ter*-butilo), lo que indicaría una hidrólisis completa de los grupo *ter*-butilo aportados por el dendrón. En este caso, el patrón de señales se corresponde completamente con las correspondientes al producto NAT-Weish puro. Este hecho indicaría que las señales de impurezas observadas en el espectro de NAT-Weis, serían de carácter hidrofóbico. Con el fin de determinar la identidad de las impurezas, se registró el espectro de RMN- ^1H del catalizador (dilaurato de dibutil estaño). Se encontró similitud de este espectro con las señales identificadas como impurezas, en el espectro de NAT-Weis, permitiendo afirmar que las mismas provenían del catalizador, el cual no había sido correctamente eliminado durante los lavados del producto. El dilaurato de dibutil estaño es un compuesto de carácter hidrofóbico, lo que explica porque ya no se observa luego de la hidrólisis del NAT-Weis.

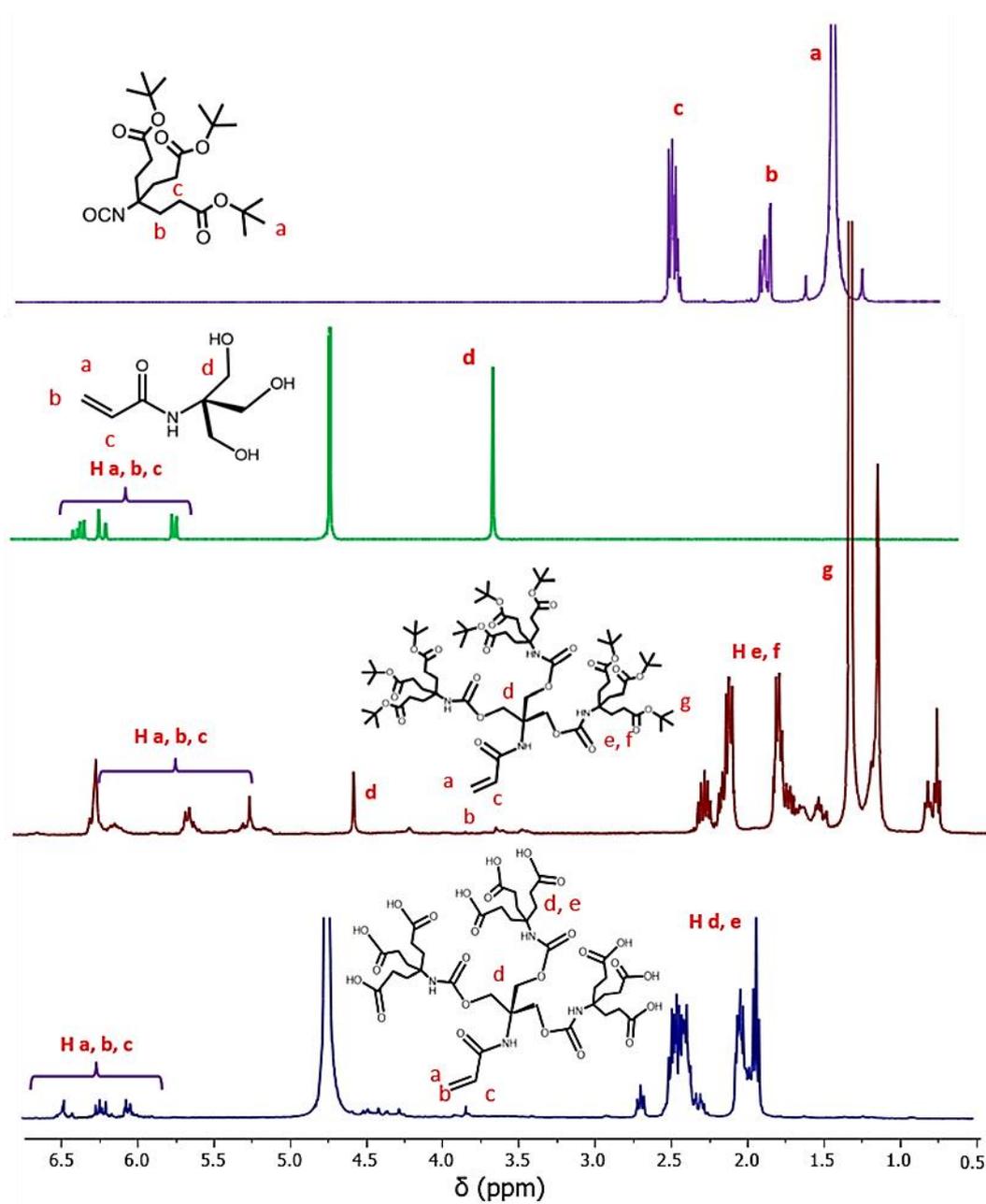


Figura 1.13. Espectros de RMN- ^1H de Weis (CDCl_3), NAT (D_2O), NAT-Weis (CDCl_3) y NAT-Weish (D_2O).

1. 6. Síntesis y caracterización del monómero dendrítico de amina Behera de segunda generación (Bis Behera)

1. 6. 1. Parte experimental

1. 6. 1. 1. Obtención de Cloruro de ácido del ácido 5-nitroisoftálico (Cl-5NI)

En un equipo de reflujo previamente anhidrado, se hicieron reaccionar 0,4993 g (2,50 mmol) de ácido 5-nitroisoftálico (Ac-5NI) con 1,00 mL de SOCl_2 en 10,0 mL de THF. La mezcla de reacción se dejó por 4 horas a reflujo con agitación constante.

Luego de transcurridas las 4 horas, el producto se concentró al vacío con doble trampa, una sumergida en aire líquido para la solidificación del solvente y otra conteniendo buffer fosfato (pH 9), para neutralizar el HCl formado durante la reacción. El producto final fue un líquido anaranjado.

1. 6. 1. 2. Obtención de BisBehera- NO_2 (BB NO_2)

Una vez seco el producto de cloración del ácido nitroisoftálico, se redisolvió en 25,0 mL de THF y se adicionó gota a gota desde una ampolla de decantación a un balón sobre un baño de hielo con una solución de 25,0 mL de 1,6600 g de AB (4 mmol) y 0,50 mL de trietilamina en THF. La mezcla de reacción se dejó con agitación constante a temperatura ambiente por 24 horas.

Una vez concluido el tiempo de reacción, se procedió a la evaporación del solvente a baja presión.

Luego, se redisolvió el crudo de reacción en cloroformo y se lavó con 3 alícuotas de salmuera y luego 3 alícuotas de agua. Finalmente, se evaporó el solvente a baja presión a sequedad obteniéndose un sólido color pardo. El avance de la reacción se siguió por cromatografía en placa delgada, utilizando hexano:diclorometano (20:80) como fase móvil.

Se continuó con la purificación del producto por cromatografía en columna, empleando sílicagel 60 (poros 0,063-0,200 mm) (70-230 mesh ASTM) y una mezcla de hexano:diclorometano (20:80), como fase móvil.

El producto obtenido en esta etapa se caracterizó por RMN ^1H y ^{13}C .

1. 6. 1. 3. Hidrogenación de BBNO₂: Obtención de BBAmينو (BBNH₂)

En un recipiente para hidrogenación se colocaron 0,2021 g de BBNO₂ (0,2 mmol), 0,0500 g del catalizador Pd soportado en carbono (10% Pd) y 50 mL de una mezcla de solvente cloroformo:metanol 50:50.

La mezcla de reacción fue llevada a una presión de H₂ de 40 psi por 12 horas.

Una vez concluido el tiempo de reacción, se procedió a purificar el producto a través de una filtración en columna de Celite utilizando CHCl₃.

El producto obtenido en esta etapa se caracterizó por RMN ¹H y ¹³C.

1. 6. 2. Resultados y discusión

Como se mencionó en la introducción, una forma de buscar nuevas y mejores propiedades en una molécula dendrítica es utilizar como recurso la derivatización de un dendrón comercial, para obtener por ejemplo un dendrón de segunda generación con un aumento de la densidad de grupos funcionales terminales, es decir, un aumento de la multivalencia.

Para lograr este objetivo se llevó a cabo en primer, lugar la activación del Ac-5NI con SOCl₂ (Figura 1.14).

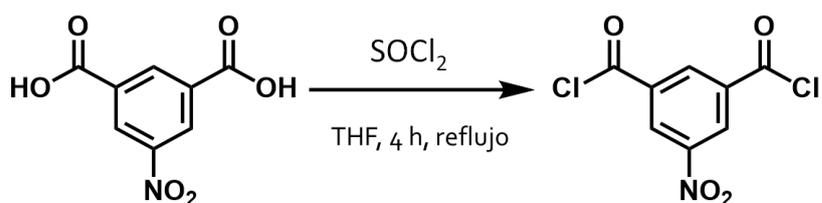


Figura 1.14. reacción de obtención Cl-5NI a partir de Ac-5NI.

Una vez activado, el producto obtenido posee dos átomos de carbono altamente electrofílicos capaces de reaccionar con el grupo amino nucleofílico del dendrón AB. De esta manera, se prepara el compuesto nitro bis behera o BBNO₂ (Figura 1.15).

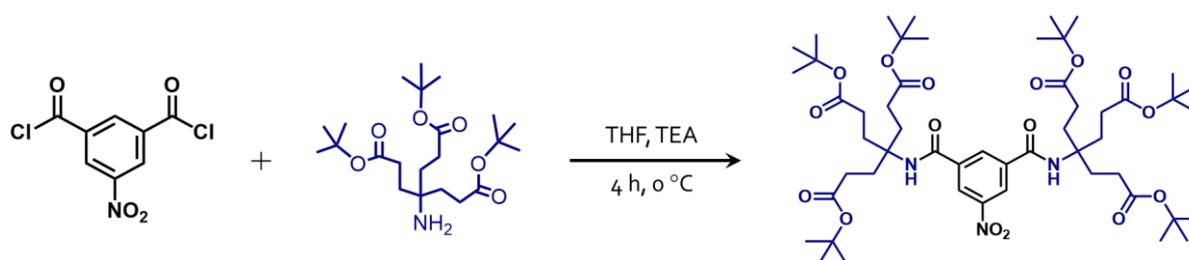


Figura 1.15. Esquema de reacción de obtención de la BBNO₂ a partir de Cl-5NI y AB.

Dado que el punto focal del dendrón es un grupo nitro, es necesario llevar a cabo una segunda derivatización, para obtener como “punto focal” de la molécula dendrítica un grupo funcional más reactivo y así, utilizar el producto final como bloque de construcción para la obtención de materiales dendronizados.

Es por esto, que se llevó a cabo una hidrogenación de BBNO₂, es decir, una reducción del grupo nitro a grupo amino, para obtener BBNH₂ (Figura 1.16).

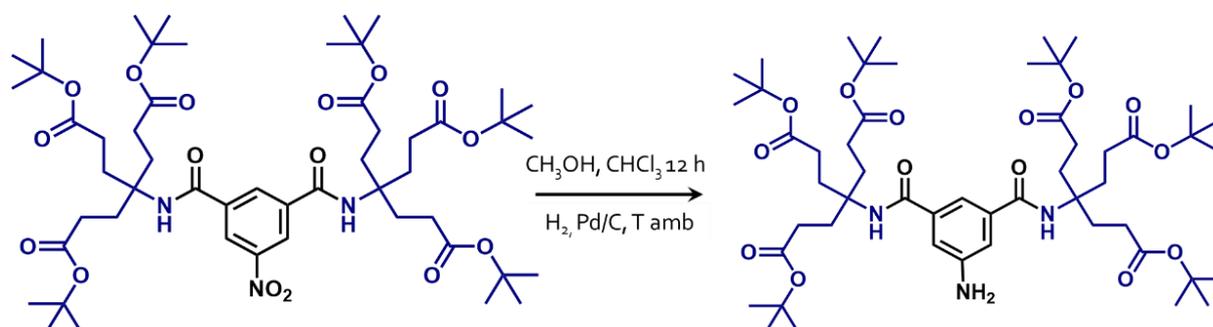


Figura 1.16. Esquemas de reacción para la obtención de BBNH₂ a partir de BBNO₂.

Para confirmar la identidad de los productos obtenidos, se caracterizaron por RMN ¹H y ¹³C.

En el espectro de RMN-¹H del producto BBNO₂ se observó un singlete a 1,4 ppm perteneciente a los protones de los grupos *ter*-butilo (a: C(CH₃)₃), 2 multipletes entre 2,0 y 2,3 ppm pertenecientes a los H de los grupos metileno (b y c: CH₂) y 2 señales a 8,8 y 8,7 que integran para 2 y 1 H respectivamente, pertenecientes al anillo aromático (d y e: CH). Estas últimas señales se desplazan a 7,6 y 8,0 ppm, respectivamente, luego de la reducción del grupo NO₂ a NH₂. Este hecho permite confirmar que la reacción de hidrogenación fue eficiente (Figura 1.17).

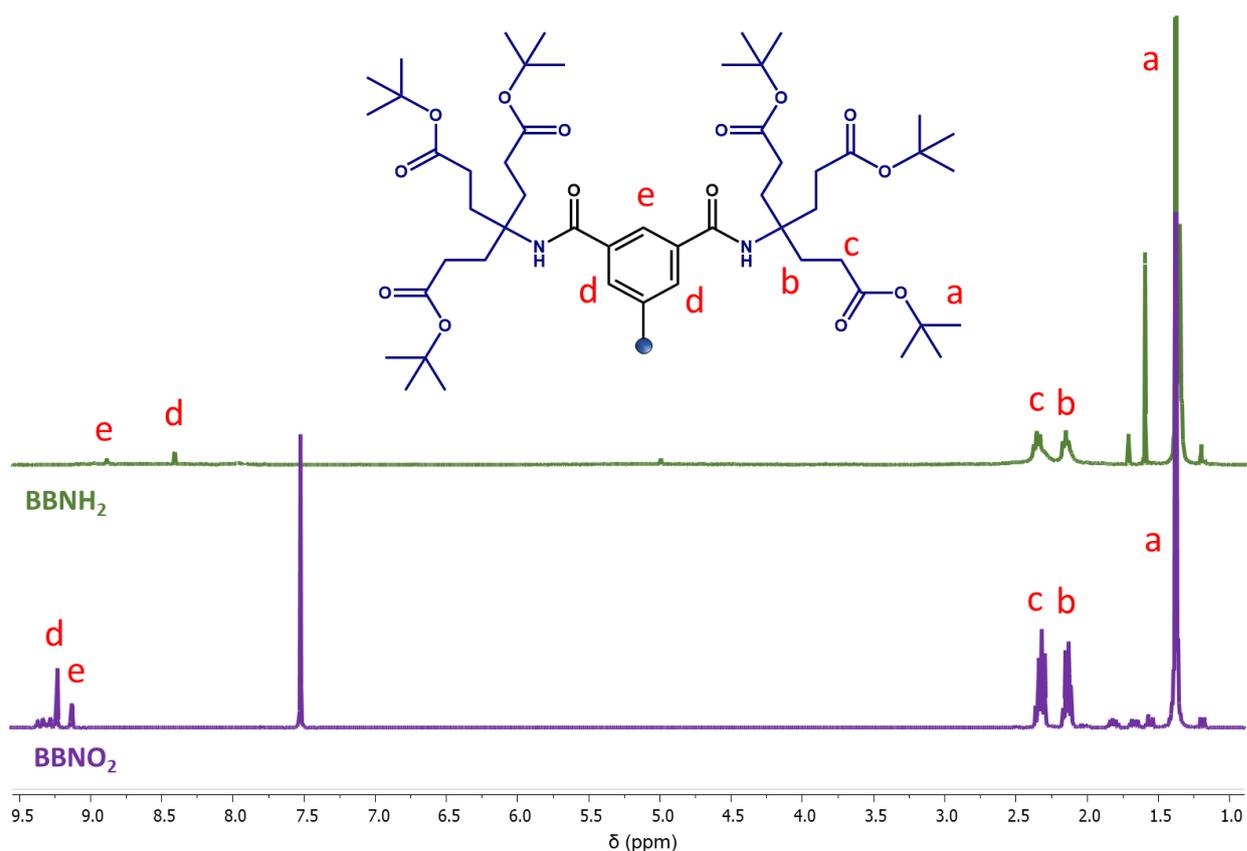


Figura 1.17. Espectros de RMN^{-1}H de a BBNO_2 (CDCl_3) y BBNH_2 (CDCl_3).

Por otro lado, se obtuvieron los espectros de RMN^{-13}C de ambos productos, Figura 1.18.

En cuanto al espectro de BBNO_2 , alrededor de 30 ppm se observan 3 señales pertenecientes a los átomos de carbono del grupo metileno (i y j: CH_2) y de los sustituyentes metilo de los grupo *ter*-butilo ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), además entre 120 y 150 ppm se observan 4 señales pertenecientes a los átomos de carbono aromáticos (c, d, e y f: CH), 2 señales a 80 y 58 ppm correspondientes a los átomos de carbono cuaternario aportados por las moléculas de Weis (h: $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) y (g: $\text{NHC}(\text{CH}_2)_3$), respectivamente y finalmente, 2 señales a 172 y 163 ppm provenientes de los átomos de carbono carbonílicos de los grupos éster (a: $\text{C}=\text{OOC}(\text{CH}_3)_3$) y amida (a: $\text{NHC}=\text{O}$), respectivamente.

Al analizar el espectro del BBNH_2 se observan las mismas señales que para BBNO_2 y con desplazamientos químicos muy semejantes, a excepción de las señales de los átomos de carbono aromáticos en posición *orto* (f) y *para* (e) al punto focal. El desplazamiento de 131 y 124 ppm a 116 y 115 ppm, respectivamente, evidencia nuevamente la hidrogenación del grupo nitro, que da lugar a la formación del producto BBNH_2 .

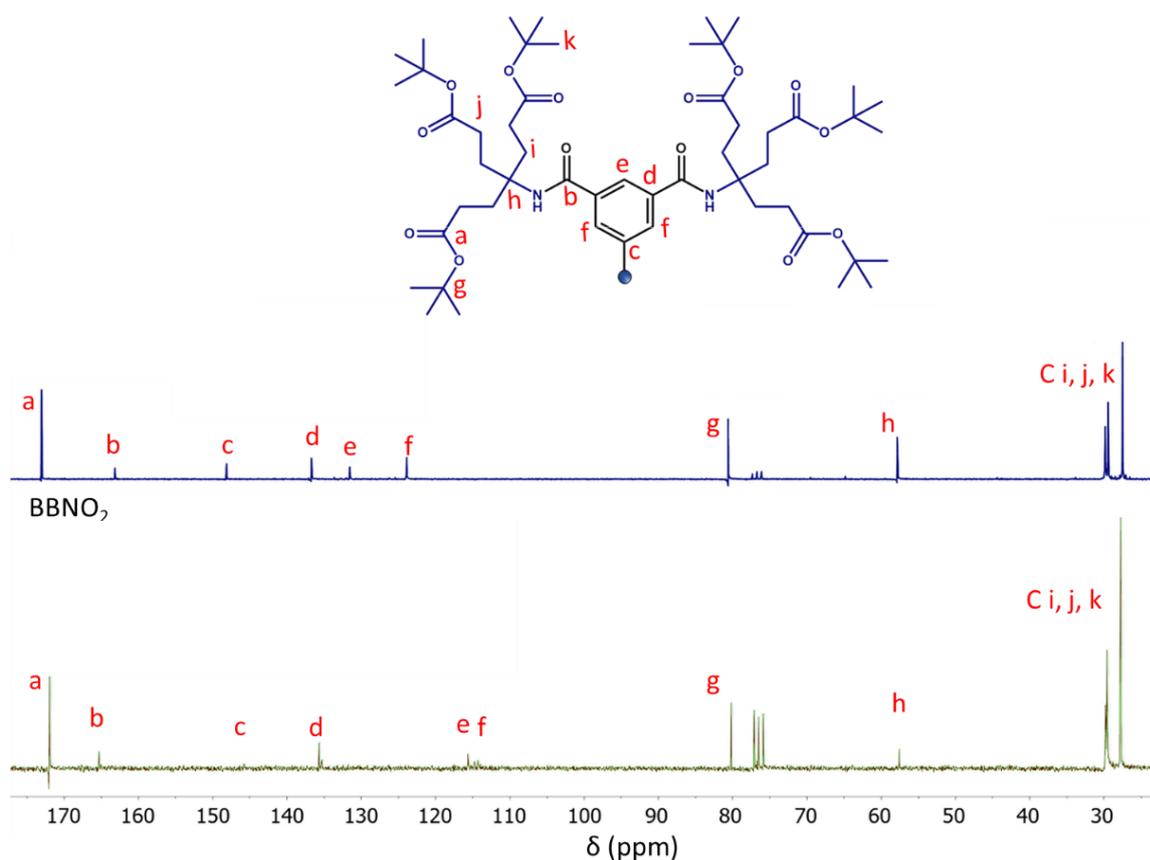


Figura 1.18. Espectros de RMN^{-13}C de BBNO_2 (azul) y BBNH_2 (verde).

1. 7. Conclusiones parciales

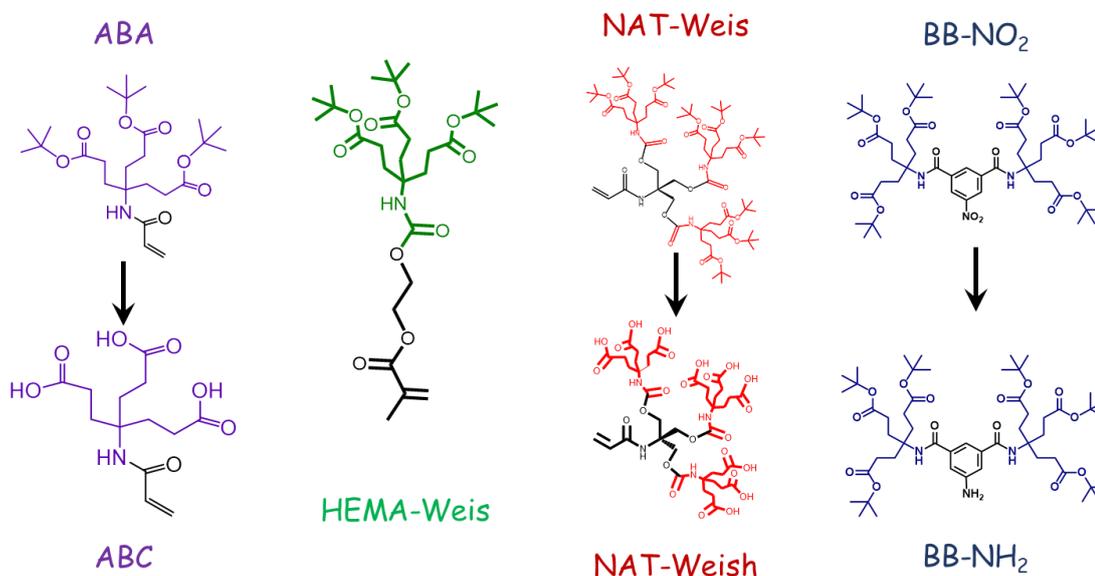
Se llevó a cabo la síntesis y caracterización de diferentes moléculas dendríticas, utilizando metodologías sintéticas de la química orgánica y partiendo de dendrones comerciales, Weis y AB.

Los dendrones obtenidos poseen las características estructurales adecuadas para ser empleados como bloques de construcción en la preparación de materiales con potenciales aplicaciones en el área de la biomedicina, destacando para ello el uso siempre de unidades con una conocida biocompatibilidad.

Teniendo en cuenta que, la síntesis y purificación de los dendrones ABA y ABC resulta más sencilla y da lugar a mayores rendimientos, estos resultan los más adecuados para comenzar a trabajar en el desarrollo de materiales dendríticos durante el estudio de esta Tesis.

Sin embargo, cabe destacar que, Nat-Weis y Nat-Weish resultan quizás los monómeros dendríticos desarrollados más prometedores y novedosos, debido a que representan dendrones de segunda generación, con una alta densidad de grupos funcionales terminales, obtenidos en pocos pasos de síntesis. Además, es destacable la posibilidad de modificar el balance hidrofílico/hidrofóbico, a través de la hidrólisis de los grupos de la periferia, según los requerimientos finales en el material a ser incorporados. Se espera en un futuro, continuar el estudio de estas moléculas y utilizarlas finalmente como bloque de construcción.

Estructuras obtenidas:



1.8. Bibliografía

- [1] S.D. Garcia Schejtman, V. Brunetti, M. Martinelli, M.C. Strumia, *Hybrid Polymer Composite Materials: Structure and Chemistry*, Elsevier Ltd., 2017.
- [2] A. Lederer, W. Burchard, T. Hartmann, J.S. Haataja, N. Houbenov, A. Janke, P. Friedel, R. Schweins, *Dendronized Hyperbranched Macromolecules: Soft Matter with a Novel Type of Segmental Distribution Angewandte*, (2015) 12578–12583.
- [3] S.D. García Schejtman, *Síntesis de polímeros dendronizados obtención de materiales para reconocimiento molecular específico*, Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Córdoba, 2018.
- [4] F. Vögtle, G. Richardt, N. Werner, *Dendrimer Chemistry: Concepts, Syntheses, Properties, Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., KGaA: Weinheim, Germany, 2009.
- [5] G.R. Newkome, C.N. Moorefield, F. Vögtle, *Dendrimer Molecules: Concepts, Syntheses, Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA: Weinheim, Germany., 2002.
- [6] J.M.J. Fréchet, D.A. Tomalia, *Dendrimers and Other Dendritic Polymers*, 2001.
- [7] B. Huang, D.A. Tomalia, Poly(ether) dendrons possessing phosphine focal points for stabilization and reduced quenching of luminescent quantum dots, *Inorganica Chim. Acta*, 359 (2006) 1961–1966.
- [8] B. Huang, D.A. Tomalia, Dendronization of gold and CdSe/cdS (core-shell) quantum dots with tomalia type, thiol core, functionalized poly(amidoamine) (PAMAM) dendrons, *J. Lumin.*, 111 (2005) 215–223.
- [9] A. Caminade, A. Ouali, The dendritic effect illustrated with phosphorus dendrimers, *Chem. Soc. Rev.*, (2014) 3890–3899.
- [10] J.I. Paez, M. Martinelli, V. Brunetti, M.C. Strumia, Dendronization: A useful synthetic strategy to prepare multifunctional materials, *Polymers (Basel)*, 4 (2012) 355–395.
- [11] G.M. Dykes, Dendrimers: A review of their appeal and applications, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 76 (2001) 903–918.
- [12] S.M. Grayson, J.M.J. Fre, *Convergent Dendrons and Dendrimers: from Synthesis to Applications*, *Chem. Rev.*, 101 (2001) 3819–3867.
- [13] H. Frauenrath, Dendronized polymers - Building a new bridge from molecules to nanoscopic objects, *Prog. Polym. Sci.*, 30 (2005) 325–384.
- [14] P.M. Welch, C.F. Welch, The Effects of Crowding in Dendronized Polymers, *Nano Lett.*, 6 (2006) 1922–1927.
- [15] C.M. Paleos, D. Tsiourvas, Z. Sideratou, *Molecular Engineering of Dendritic Polymers and Their Application as Drug and Gene Delivery Systems*, 4 (2006) 169–188.
- [16] R. Tang, C. Cheng, Y. Li, F. Xi, Synthesis, electroluminescence, and photovoltaic properties of dendronized poly (p -phenylene vinylene) derivatives, *Polymer (Guildf)*, 46 (2005) 5341–5350.
- [17] M. Calderón, M. Martinelli, P. Froimowicz, A. Leiva, L. Gargallo, D. Radić, M.C. Strumia, Synthesis and characterization of dendronized polymers, *Macromol. Symp.*, 258 (2007) 53–62.
- [18] A.D. Schlüter, J.P. Rabe, Dendronized polymers: Synthesis, characterization, assembly at interfaces, and manipulation, *Angew. Chemie (International Ed. English)*, 39 (2000).
- [19] M. Kröger, O. Peleg, A. Halperin, From dendrimers to dendronized polymers and forests: Scaling theory and its limitations, *Macromolecules*, 43 (2010) 6213–6224.
- [20] A.P. Rosso, M. Martinelli, Preparation and characterization of dendronized chitosan/gelatin-based nanogels, *Eur. Polym. J.*, 124 (2020) 109506.
- [21] A.A. Aldana, M.C. Strumia, M. Martinelli, The Cooperative Effect in Dendronized Chitosan Microbeads, *Aust. J. Chem.*, 68 (2015) 1918.
- [22] G.N. RRimondino, E. Miceli, M. Molina, S. Wedepohl, S. Thierbach, E. Rühl, M. Strumia, M. Martinelli, M. Calderón, Rational design of dendritic thermoresponsive nanogels that undergo phase transition under endolysosomal conditions, *J. Mater. Chem. B*, 5 (2017) 866–874.

- [23] S.D. GGarcía Schejtman, R. Toselli, M.C. Strumia, M. Martinelli, Gelatin films dendronized selectively on one side: enhancing antimicrobial properties and water repellence, *Polym. Bull.*, 72 (2015) 3043–3062.
- [24] J. Alsarraf, P. Gormand, J. Legault, M. Mihoub, A. Pichette, Synthesis of a first-generation L-rhamnose dendron, *Tetrahedron Lett.*, 61 (2020) 151706.
- [25] M. Martinelli, M.C. Strumia, Multifunctional nanomaterials: Design, synthesis and application properties, *Molecules*, 22 (2017) 1–11.
- [26] A.A. Aldana, B. Barrios, M. Strumia, S. Correa, M. Martinelli, Dendronization of chitosan films: Surface characterization and biological activity, *React. Funct. Polym.*, 100 (2016) 18–25.
- [27] G.E. Newkome, K.K. Kotta, C.N. Moorefield, Convenient synthesis of 1 → 3 C-branched dendrons, *J. Org. Chem.*, 70 (2005) 4893–4896.
- [28] M.B. E. Pretsch, P. Bühlmann, IR Spectroscopy, in: *Struct Determ Org Compd Tables Spectr*, 2009.
- [29] J. L. G. Wade, *Química Orgánica*, 7th ed., Pearson Education, Inc., Naucalpan de Juárez, 2012.
- [30] D. Skrtic, J.M. Antonucci, Bioactive Polymeric Composites for Tooth Mineral Regeneration: Physicochemical and Cellular Aspects, *J. Funct. Biomater.*, 2 (2011) 271–307.
- [31] E.R. Gillies, T.B. Jonsson, J.M.J. Fréchet, Stimuli-responsive supramolecular assemblies of linear-dendritic copolymers, *J. Am. Chem. Soc.*, 126 (2004) 11936–11943.



Parte II



Nanogeles



Parte II: Nanogeles

Introducción

Un gel es una red polimérica tridimensional reticulada capaz de absorber una gran cantidad de solvente sin disolverse, debido a la presencia de enlaces físicos o químicos entre las cadenas.[1–4] Si el solvente es agua se lo denomina hidrogel y, si éste es de tamaño submicrónico en todas las dimensiones, se lo denomina Nanogel (NG), Figura II.1.[5,6]



Figura II.1. Esquema de comparación entre lo macro y lo nano.

El término Nanogel se introdujo por primera vez en 1999 por Vinogradov et al. en un artículo publicado en la revista *Colloids and Surfaces B*, donde se reportó la preparación de una red hidrofílica de poli(etilenglicol) y polietilenimina reticulada químicamente.[7]

Desde entonces, el diseño de NGs poliméricos con nuevas propiedades representa un campo de constante interés en diversas disciplinas, y se han desarrollado para una gran variedad de aplicaciones, ya que pueden formarse a partir de compuestos de origen natural y/o sintético. Además, dependiendo de sus componentes pueden ser capaces de expandirse y absorber grandes cantidades de agua o fluido biológico, tener diversos comportamientos o propiedades fisicoquímicas y hasta ser biocompatibles.[4,8]

El desarrollo de nanoestructuras es de interés en aplicaciones biomédicas, sobre todo como *nanocarriers* en el suministro de productos farmacéuticos activos, agentes de imagen o transferencia génica. Por ejemplo, los materiales utilizados como portadores en la entrega de medicamentos generalmente deben estar en el rango de los nanómetros y deben ser de tamaño uniforme (monodispersos), para mejorar su capacidad de atravesar las membranas celulares, y reducir el riesgo de eliminación no deseada del cuerpo a través del hígado o el bazo. Los NGs, debido a su estructura tridimensional en forma de redes, son capaces de encapsular grandes cantidades de diversos compuestos como fármacos, proteínas, ARN, etc. Además, dependiendo de las características del material, también pueden llevar a cabo una liberación diferenciada y/o controlada según el medio o incluso ser dirigidos específicamente al sitio de acción deseado. Y finalmente, si dichos portadores están conformados con los componentes adecuados, es posible su desintegración o eliminación, sin generar residuos tóxicos o resultados adversos en el organismo.[4,8–12]

Los NGs se pueden clasificar de muchas maneras, las más utilizadas son las siguientes:

1) Por el tipo de enlaces, Figura II.2. Los enlaces son importantes para mantener la estructura de la red tridimensional y para prevenir la disolución de las cadenas.[5,8] Existen dos clases:

a) NGs físicamente reticulados. Este tipo de NGs dan lugar al concepto de NGs reversibles, los cuales pueden experimentar una transición de su estructura tridimensional estable a una solución de polímero. Los enlaces entrecruzados se forman a partir de fuerzas de atracción no covalentes entre las cadenas poliméricas. Estas fuerzas son a menudo del tipo puente hidrógeno, interacciones hidrofóbicas o electrostáticas.[13,14]

b) NGs químicamente reticulados.[6,15] Estos materiales son generalmente más estables que los físicamente reticulados, porque el entrecruzamiento se forma por enlaces covalentes. Las reticulaciones químicas son estructuras permanentes, a menos que se introduzcan intencionalmente enlaces químicos lábiles.[16]

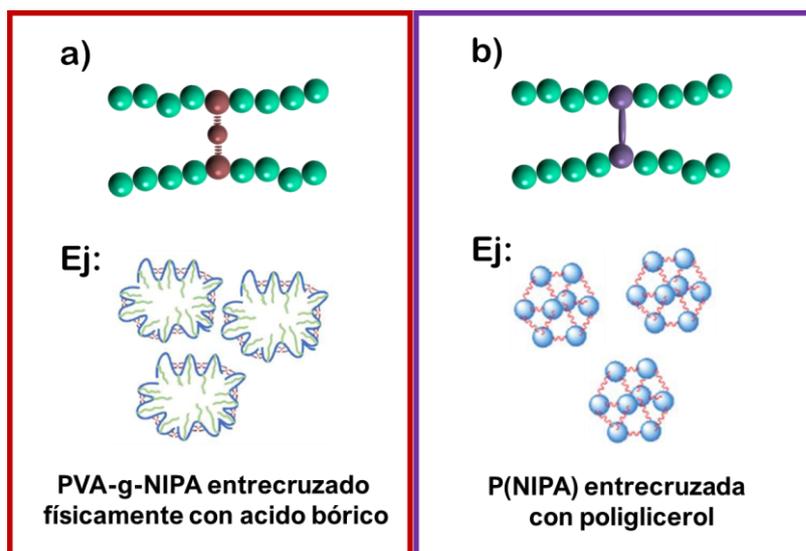


Figura II.2. Esquema de comparación para NGs clasificados según su tipo de entrecruzamiento a) físico y b) químico.

2) Por el tipo de materiales con los cuales fueron sintetizados. Existen a) NGs sintetizados a partir de materiales sintéticos [17,18] o b) de origen natural [19,20]. Además, se han desarrollado los denominados NGs híbridos que combinan ambos tipos de materiales [21,22] o incluso cualquiera de ellos con otros componentes, como nanopartículas metálicas [23], silica [24], entre otros.

3) Por su respuesta al medio: a) estímulo-sensibles y b) estímulo-no sensibles. Los NGs estímulo sensibles han sido denominados materiales "inteligentes", ya que tienen la propiedad de experimentar transiciones de fase cuando hay pequeños cambios en las variables externas, tales como temperatura [25], pH [26], fuerza iónica [27], luz [28], campo magnético [29], entre otros. Esta transición de fase suele traducirse en un cambio estructural/conformacional en el material. La respuesta de los NGs está determinada por el tipo de monómero o polímero utilizado, el tipo de enlaces y/o cualquier post-modificación realizada.[14]

4) Por tipo de carga. Cuando un NG colapsado (libre de solvente) se hincha en una solución de algún compuesto, fármaco o proteína, el mismo puede ingresar a la red y, como se mencionó anteriormente, ser encapsulado en el interior. Los grupos funcionales presentes en las cadenas de los polímeros que conforman el material pueden ser no iónicos, catiónicos [25], aniónicos [17] o anfotéricos [30], pueden tener

zonas hidrofílicas o hidrofóbicas o una combinación de ambas [31]. Depende de dichos grupos funcionales, el tipo y cantidad de carga, que puede encapsular el material.

Estos son solo algunos de los modos de clasificación, pero pueden existir otros, y la combinación de todas estas características permite infinitas posibilidades en el diseño de NGs con distintas propiedades y aplicaciones.

En este apartado se abordará la síntesis y caracterización de diversos NGs, que abarcan un amplio espectro dentro de estas clasificaciones. Por un lado, el desarrollo de NGs inteligentes con respuesta al pH y a la temperatura, obtenidos íntegramente a partir de materiales sintéticos y por el otro, materiales obtenidos a partir de polímeros de origen natural, tales como quitosán y gelatina. En ambos casos, entrecruzados con enlaces químicos y con capacidad de carga debido a las cavidades internas del material.

Además, se abordará el desarrollo de materiales híbridos que combinan materiales tanto sintéticos como de origen natural, sin respuesta a estímulos, como PVA con polifenoles, y con respuesta a estímulos, PVCL con gelatina y ácido tánico. En este caso, la formación de los mismos es a través de entrecruzamientos del tipo físicos.

Bibliografía

- [1] W. Wu, S. Zhou, Hybrid micro-/nanogels for optical sensing and intracellular imaging, *Nano Rev.* 1 (2010) 5730.
- [2] S. V. Vinogradov, T.K. Bronich, A. V. Kabanov, Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: Preparation, properties and interactions with cells, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002) 135–147.
- [3] M. Hamidi, A. Azadi, P. Rafiei, Hydrogel nanoparticles in drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 1638–1649.
- [4] M. Molina, M. Asadian-Birjand, J. Balach, J. Bergueiro, E. Miceli, M. Calderon, Stimuli-responsive nanogel composites and their application in nanomedicine, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 6161–6186.
- [5] O.E. Rayo, D.Q. Guerrero, Nanogeles poliméricos: Una nueva alternativa para la administración de fármacos, *Rev. Mex. Ciencias Farm.* 45 (2014) 17–38.
- [6] C. Biglione, NANODISPOSITIVOS MAGNÉTICOS Y TERMOSENSIBLES: síntesis, estudios de sus propiedades físico-químicas y potencial aplicación en nanomedicina, Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Córdoba, 2017.
- [7] S. Vinogradov, E. Batrakova, A. Kabanov, Poly(ethylene glycol)-polyethyleneimine NanoGel(TM) particles: Novel drug delivery systems for antisense oligonucleotides, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 16 (1999) 291–304.
- [8] I. Neamtu, A.G. Rusu, A. Diaconu, L.E. Nita, A.P. Chiriac, Basic concepts and recent advances in nanogels as carriers for medical applications, *Drug Deliv.* 24 (2017) 539–557.
- [9] B. Sierra-Martin, A. Fernandez-Barbero, Multifunctional hybrid nanogels for theranostic applications, *Soft Matter.* 11 (2015) 8205–8216.
- [10] G. Aguirre, J. Ramos, J.P.A. Heuts, J. Forcada, Biocompatible and thermo-responsive nanocapsule synthesis through vesicle templating, *Polym. Chem.* 5 (2014) 4569–4579.
- [11] J. Bergueiro, M. Calderón, Thermoresponsive nanodevices in biomedical applications, *Macromol. Biosci.* 15 (2014) 183–199.
- [12] M.D. Bhavsar, M.M. Amiji, Polymeric nano- and microparticle technologies for oral gene delivery., *Expert Opin. Drug Deliv.* 4 (2007) 197–213.
- [13] K. Akiyoshi, S. Deguchi, N. Moriguchi, S. Yamaguchi, J. Sunamoto, Self-Aggregates of Hydrophobized Polysaccharides in Water. Formation and Characteristics of Nanoparticles, *Macromolecules.* 26 (1993) 3062–3068.
- [14] S. Nayak, L. Andrew Lyon, Soft nanotechnology with soft nanoparticles, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 44 (2005) 7686–7708.
- [15] G.N. RRimondino, E. Miceli, M. Molina, S. Wedepohl, S. Thierbach, E. Rühl, M. Strumia, M. Martinelli, M. Calderón, Rational design of dendritic thermoresponsive nanogels that undergo phase transition under endolysosomal conditions, *J. Mater. Chem. B.* 5 (2017) 866–874.
- [16] A. Wolfel, M.R. Romero, 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, *Polymer (Guildf).* 116 (2017) 251–260.
- [17] J.C. Cuggino, M. Molina, S. Wedepohl, C.I.A. Igarzabal, M. Calderón, L.M. Gugliotta, Responsive nanogels for application as smart carriers in endocytic pH-triggered drug delivery systems, *Eur. Polym. J.* 78 (2016) 14–24.
- [18] O. Zavgorodnya, C.A. Carmona-Moran, V. Kozlovskaya, F. Liu, T.M. Wick, E. Kharlampieva, Temperature-responsive nanogel multilayers of poly(N-vinylcaprolactam) for topical drug

- delivery, *J. Colloid Interface Sci.* 506 (2017) 589–602.
- [19] F. Brunel, L. Véron, C. Ladavière, L. David, A. Domard, T. Delair, Synthesis and structural characterization of chitosan nanogels, *Langmuir*. 25 (2009) 8935–8943.
- [20] S. Balthasar, K. Michaelis, N. Dinauer, H. Von Briesen, J. Kreuter, K. Langer, Preparation and characterisation of antibody modified gelatin nanoparticles as drug carrier system for uptake in lymphocytes, *Biomaterials*. 26 (2005) 2723–2732.
- [21] N. Sahiner, S. Sagbas, N. Aktas, C. Silan, Inherently antioxidant and antimicrobial tannic acid release from poly(tannic acid) nanoparticles with controllable degradability, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 142 (2016) 334–343.
- [22] M.M. Raskin, I. Schlachet, A. Sosnik, Mucoadhesive nanogels by ionotropic crosslinking of chitosan-g-oligo(NiPAam) polymeric micelles as novel drug nanocarriers, *Nanomedicine*. 11 (2016) 217–233.
- [23] J. Siirilä, M. Karesoja, P. Pulkkinen, J.M. Malho, H. Tenhu, Soft poly(N-vinylcaprolactam) nanogels surface-decorated with AuNPs. Response to temperature, light, and RF-field, *Eur. Polym. J.* 115 (2019) 59–69.
- [24] Z. Cao, L. Yang, Y. Yan, Y. Shang, Q. Ye, D. Qi, U. Ziener, G. Shan, K. Landfester, Fabrication of nanogel core-silica shell and hollow silica nanoparticles via an interfacial sol-gel process triggered by transition-metal salt in inverse systems, *J. Colloid Interface Sci.* 406 (2013) 139–147.
- [25] J. Ramos, A. Imaz, J. Forcada, Temperature-sensitive nanogels: Poly(N-vinylcaprolactam) versus poly(N-isopropylacrylamide), *Polym. Chem.* 3 (2012) 852–856.
- [26] S. Nowag, R. Haag, PH-responsive micro- and nanocarrier systems, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 53 (2014) 49–51.
- [27] S. Kazakov, M. Kaholek, I. Gazaryan, B. Krasnikov, K. Miller, K. Levon, Ion Concentration of External Solution as a Characteristic of Micro- and Nanogel Ionic Reservoirs, *J. Phys. Chem. B.* 110 (2006) 15107–15116.
- [28] F.D. Jochum, P. Theato, Temperature- and light-responsive smart polymer materials, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 7468–7483.
- [29] C. Biglione, J. Bergueiro, M. Asadian-Birjand, C. Weise, V. Khobragade, G. Chate, M. Dongare, J. Khandare, M.C. Strumia, M. Calderón, Optimizing circulating tumor cells' capture efficiency of magnetic nanogels by transferrin decoration, *Polymers (Basel)*. 10 (2018) 1–14.
- [30] A.E. Ekkelenkamp, M.M.T. Jansman, K. Roelofs, J.F.J. Engbersen, J.M.J. Paulusse, Surfactant-free preparation of highly stable zwitterionic poly(amido amine) nanogels with minimal cytotoxicity, *Acta Biomater.* 30 (2016) 126–134.
- [31] S. Vinogradov, Colloidal Microgels in Drug Delivery Applications, *Curr. Pharm. Des.* 12 (2006) 4703–4712.

Capítulo 2

Síntesis y Caracterización de nanogeles dendríticos a partir de N-VinilCaprolactama y un dendrón

2. 1. Introducción

Como se mencionó en la Introducción General, los geles de polímeros inteligentes de tamaño nanoscópico, capaces de hincharse de forma reversible en agua y evitar que se disuelvan por reticulación, son candidatos muy prometedores para su uso en biomedicina debido a su tamaño ajustable, porosidad y perfil de hinchamiento.[1,2]

Entre los NGs inteligentes más estudiados se pueden encontrar los termosensibles encabezando la lista. La capacidad de respuesta térmica, es la capacidad de un polímero de cambiar drásticamente al menos una de sus propiedades fisicoquímicas, dependiendo de la temperatura.[3–5] Estos polímeros se clasifican en dos grupos, aquellos que exhiben una temperatura de solución crítica inferior (LCST) y los que exhiben una temperatura de solución crítica superior (UCST). Un polímero LCST es soluble (hinchable) por debajo de una temperatura crítica e insoluble por encima de esta, mientras que sucede lo opuesto para un polímero UCST.[5,6] En ambos casos, existe un equilibrio entre las interacciones polímero-polímero y las interacciones polímero-solvente y es la temperatura del medio la que determina cuáles serán las interacciones que predominen.[5,6] Mientras no se produzca degradación del polímero, la capacidad de respuesta térmica es una característica reversible y estos polímeros aún exhiben una temperatura crítica incluso después de varios ciclos de calentamiento/enfriamiento.[3,4]

La transición de fase de las nanopartículas se observa como una temperatura de transición de fase de volumen (VPTT), es decir, que en agua experimentan una transición de un estado hinchado a uno colapsado al variar la temperatura. Esto se debe a que, junto con el aumento de la hidrofobicidad de las cadenas de polímero, las moléculas de agua disociadas se expulsan del interior del NG, lo que provoca una disminución en el volumen por encima de la LCST, o por debajo de la UCST, del polímero (Figura 2.1.).[1,7–9]

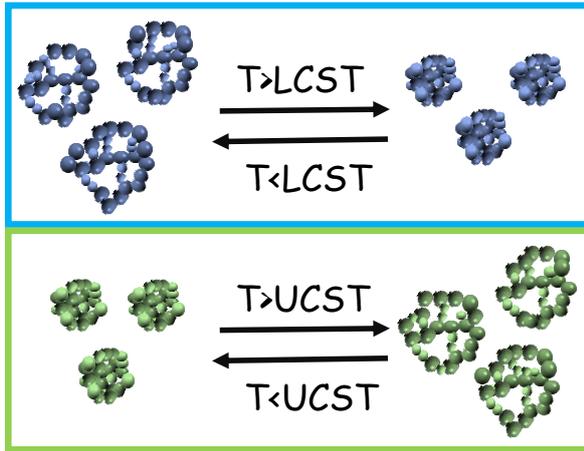


Figura 2.1. Comportamiento de nanogeles termosensibles (LCST y UCST) en función de la temperatura.

Los reportes sobre polímeros que muestran un comportamiento LCST superan en gran medida, sobre todo en los últimos años, a aquellos con UCST.[9,10] Este hecho se debe al interés especial en los NGs basados en polímeros, que tienen una temperatura de solución crítica (LCST) cercana a la fisiológica.[7–10] En la mayoría de estos sistemas los enlaces puente hidrógeno

permiten al material tener la capacidad de respuesta térmica, lo que representa una ventaja cuando son empleados en un entorno biológico, una solución compleja de diferentes iones y con valores de pH variables. La estabilidad de un enlace tipo puente hidrógeno se rige por la temperatura. A medida que aumenta la temperatura, aumenta la agitación molecular y las moléculas no permanecen en una posición estable entre sí, debilitando este tipo de enlaces. En este caso, la interacción de las moléculas de agua con los grupos funcionales de una cadena polimérica es más débil a medida que aumenta la temperatura y el efecto hidrofóbico se vuelve predominante, ya que las interacciones polímero-polímero son más importantes que las interacciones polímero-agua, y así la red elimina el solvente y colapsa.[3,10,11]

Entre los diferentes polímeros termorresponsivos disponibles para el diseño de NGs con aplicaciones biomédicas, la poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) y la poli(N-vinilcaprolactama) (PVCL) son algunos de los candidatos más prometedores, debido a su biocompatibilidad y su LCST de alrededor de 32°C, cercana a la temperatura fisiológica (Figura 2.2.).[1,9,12,13]

Tanto PVCL como PNIPAM, son polímeros no iónicos hinchables (a $T < LCST$) en agua y exhiben LCST similares. Aunque ambos polímeros son adecuados para varias aplicaciones, PVCL ha demostrado poseer mejor biocompatibilidad que PNIPAM. La PVCL tiene un grupo amida cíclica hidrofílico y una cadena principal alifática hidrofóbica. El grupo amida está directamente unido a la cadena principal, y en caso de hidrólisis, en condiciones fuertemente ácidas, produce un ácido carboxílico polimérico, y no un pequeño compuesto amida tóxica, que no es deseable para aplicaciones biomédicas, como ocurre en el caso de PNIPAM. Por lo tanto, el uso de PNIPAM como biomaterial puede estar limitado debido a su mayor citotoxicidad y su menor viabilidad celular en comparación con PVCL.[7,14–16]

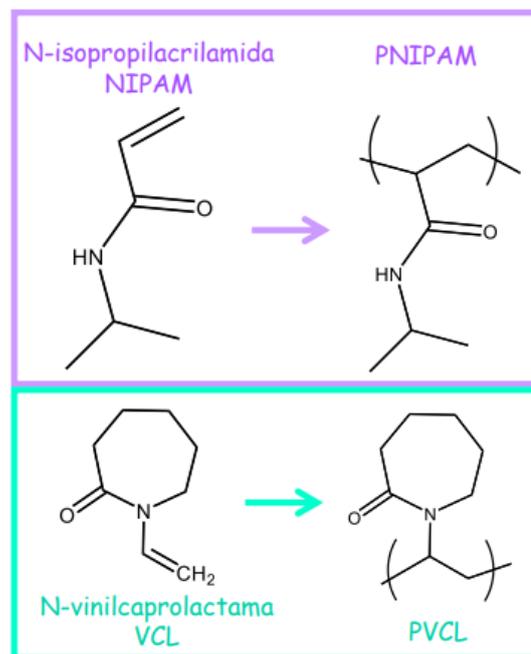


Figura 2.2. Estructura de los monómeros NIPAM y VCL

La polimerización de VCL con diferentes comonómeros, ha sido estudiada sistemáticamente en los últimos años.[17–20] Aunque no se han reportado trabajos de funcionalización/copolimerización con estructuras dendríticas.

En busca de una optimización de la funcionalidad de los NGs a base de VCL y con el fin de obtener materiales novedosos para su potencial aplicación en nanomedicina, resulta interesante la incorporación de bloques de construcción dendríticos dentro de la estructura de dichos NGs.[21–24]

Como se mencionó anteriormente, las estructuras dendríticas son particularmente interesantes por sus propiedades fisicoquímicas, las cuales están controladas por sus características estructurales y geométricas. El equilibrio hidrofílico-hidrofóbico y el potencial multivalente del NG pueden ajustarse, de acuerdo con el tamaño del dendrón y el

número y tipo de grupos funcionales en la periferia, la generación y el grado de dendronización.[22,25,26]

Otro estímulo que puede emplearse para cambiar las características de un NG, es el gradiente de pH. Este factor es de interés por ejemplo en sistemas de liberación controlada, teniendo en cuenta que la zona extra e intracelular y entre un tejido sano y uno enfermo, hay variaciones en el valor del pH.[27] Por lo tanto, un transportador sensible al pH puede entregar selectivamente su carga a los diferentes tejidos sanos o inflamados.[28] Los sistemas que son pH-responsivos poseen en su estructura grupos funcionales ionizables, como por ejemplo ácido carboxílico [20] o amina.[29]

Teniendo en cuenta la fundamentación previa y la conocida biocompatibilidad y no toxicidad de la VCL [14] y de los derivados de dendrones comerciales del tipo Newkome [22,30], resulta de interés la síntesis de NGs por combinación de estos monómeros, clásicos y dendríticos (ABA y ABC), que revistan potenciales aplicaciones en biomedicina.[31–33] El dendrón ABC además de las ventajas de las moléculas dendríticas antes mencionadas, puede sumar al sistema grupos ácido ionizables otorgando al material la capacidad de responder al pH del medio.[22]

2. 2. Objetivos específicos

Siendo el diseño de biomateriales inteligentes de fundamental importancia en el desarrollo de sistemas novedosos para la nanomedicina, se plantearon para este capítulo los siguientes objetivos específicos:

- Sintetizar y caracterizar NGs termosensibles con la técnica de polimerización por precipitación a partir de N-vinilcaprolactama (VCL).
- Estudiar el comportamiento térmico de los NGs de PVCL.
- Sintetizar y caracterizar NGs termosensibles dendríticos a partir de VCL y un dendrón (ABC o ABA).
- Evaluar el efecto dendrítico en los NGs dendríticos.

2. 3. Parte experimental

2. 3. 1. Síntesis y caracterización de NGs homopoliméricos a partir de VCL

Se comenzó el estudio con la síntesis de los NGs homopoliméricos a partir del monómero termomensible N-vinilcaprolactama (VCL 100%) y N,N'-metilenbisacrilamida (BIS) como agente entrecruzante. En primer lugar, se evaluó el efecto del tipo de iniciador (KPS, NaPS, APS o canforquinona), la presencia de tetrametiletilendiamina (TEMED) y el medio de polimerización (agua destilada, agua de grado Mili-Q o Buffer pH 7) (Tabla 2.1). Se estudió, para todos los productos obtenidos, la respuesta a la temperatura, como un parámetro de eficiencia del método de polimerización. Para ello, los sistemas obtenidos en solución se llevaron a un baño a 60 °C y luego a uno de hielo.

Luego de optimizadas las condiciones de reacción (iniciador, presencia de TEMED y medio de reacción), se varió el porcentaje del reticulante (BIS) entre 0,5 y 4,0%.

Todos los NGs se prepararon por polimerización por precipitación de acuerdo con el siguiente procedimiento: 0,0800 g de VCL y 0,0013 g del tensioactivo dodecilsulfato de sodio (SDS) (0,9% en moles), se disolvieron en el medio correspondiente hasta llegar a un volumen final de reacción de 3,0 mL (Tabla 2.1). Todas las soluciones se purgaron igualmente con nitrógeno durante 15 minutos bajo agitación mecánica continua para eliminar el oxígeno disuelto.

Finalmente, se añadió 1% en moles del iniciador y 1% en moles de TEMED (cuando correspondiera) respecto a la cantidad de monómeros totales. La reacción se llevó a cabo a 70 °C durante 5 h con agitación continua.

Al finalizar el tiempo de reacción, para eliminar el tensioactivo y los restos de monómero sin reaccionar, los NGs se purificaron por diálisis empleando una membrana con un límite de peso molecular de 50 kDa, contra agua destilada durante una semana. Posteriormente y para su caracterización, las muestras se liofilizaron obteniendo un sólido blanco.

Los productos obtenidos se denominaron según su composición $P(VCL)_x$ donde x representa el porcentaje en moles de BIS con respecto a los moles totales de monómero (VCL).

Se realizaron varias repeticiones de cada sistema para confirmar su reproducibilidad y fueron caracterizados por DLS, UV, TGA, TEM, RMN y FT-IR, siguiendo los procedimientos descritos anteriormente en la sección Materiales y Métodos.

2. 3. 2. Síntesis y caracterización de NGs dendríticos a partir de VCL y ABA o ABC

Siguiendo una metodología semejante a la descrita en el punto 2.3.2. se sintetizaron polímeros dendríticos, añadiendo al medio un monómero dendrítico (ABA o ABC) derivado de amina Behera previamente sintetizado, tal como se describió en el Capítulo 1. Nuevamente, se varió la cantidad de reticulante (entre 0,5 y 4%) así como el grado de dendronización (entre 0,5 y 3%).

Las reacciones de copolimerización con ABA se llevaron a cabo en agua de grado Mili-Q y con ABC en Buffer pH 7,0. Se agregó al medio de reacción la cantidad apropiada de VCL, de dendrón (de acuerdo a la relación final de monómeros buscada, ver Tabla 2.3, 2.4, 2.5 y 2.6) y 0,0020 g del surfactante SDS (1,4% en moles), hasta obtener concentraciones de monómeros totales de 0,2 M en un volumen final de 3 mL. De igual manera, todas las soluciones se purgaron con nitrógeno durante 15 minutos bajo agitación mecánica continua para eliminar el oxígeno disuelto.

Finalmente, se añadió 1% en moles de KPS y 1% en moles respecto a la cantidad de monómeros totales de TEMED. Las condiciones de reacción fueron idénticas a la síntesis de NGs de PVCL, 70 °C durante 5 h con agitación continua.

Para eliminar los restos de monómeros sin reaccionar y el tensioactivo, los NGs se purificaron por diálisis con una membrana con un límite de peso molecular de 50 kDa contra agua destilada durante una semana.

Posteriormente y para su caracterización, las muestras se liofilizaron obteniendo un sólido blanco.

Los productos fueron denominados según su composición $P(VCL-co-ABA^y)_x$ y $P(VCL-co-ABC^y)_x$ donde y representa el porcentaje de dendrón y x el porcentaje en moles de BIS, con respecto a los moles totales de monómeros.

Se realizaron varias repeticiones de cada sistema para confirmar su reproducibilidad y fueron caracterizados por DLS, UV, y FT-IR siguiendo los procedimientos descritos anteriormente en la sección Materiales y Métodos.

2. 4. Resultados y discusión

2. 4. 1. Síntesis y caracterización de NGs homopoliméricos a partir de VCL

La polimerización por precipitación consiste en llevar a cabo la reacción en solución, a una temperatura superior a la temperatura de transición de fase del material. Luego de iniciada la reacción, cuando la longitud de la cadena de los oligómeros crece, su solubilidad en agua disminuye y los sistemas homogéneos anteriores se vuelven heterogéneos, con partículas que forman una fase dispersa y son estabilizados por un surfactante. Dentro de la fase dispersa, las partículas crecen a medida que la polimerización continúa hasta la llamada "longitud crítica" en la que se detiene la polimerización y el NG colapsa, Figura 2.3.[17,23,34]

Las reacciones de polimerización pueden involucrar distintos tipos de iniciadores, como por ejemplo los iniciadores por temperatura [6,35–37], por radiación UV [38,39], por polimerización radicalaria por transferencia electrónica (ATRP) [40,41] entre muchos otros.

Algunos iniciadores termosensibles, y los más ampliamente utilizados, son los persulfatos (APS, NaPS y KPS), que tienen grupos aniónicos en la estructura. Éstos se descomponen en fase acuosa a partir de cierta temperatura y forman radicales oligoméricos en presencia de un monómero vinílico (Figura 2.4.).[42]

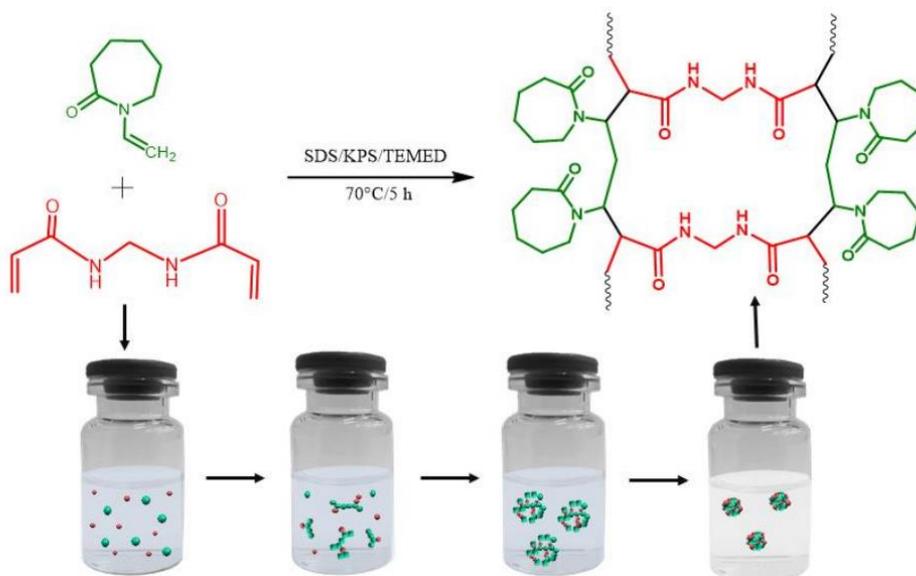


Figura 2.3. Esquema de la síntesis de NGs de PVCL preparados por polimerización por precipitación en fase acuosa.

Otro tipo de polimerización, cada vez más utilizada en los últimos tiempos, es la fotopolimerización, la cual representa una alternativa más sustentable, ya que involucra condiciones más “suaves” de reacción, que incluyen menores temperaturas y tiempos de reacción, debido a la posibilidad de utilizar fuentes de energía de bajo consumo LEDs (por sus siglas en inglés *Light Emitting Diode*).[43,44]

Una de las alternativas para llevar a cabo una reacción de fotopolimerización es el empleo de canforquinona, una molécula capaz de absorber en la región del visible entre 400-500 nm debido a las transiciones $n-\pi^*$ del cromóforo α -dicarbonilo. Debido a esto, la reacción puede ser iniciada con luz azul (450-500 nm).[39,44]

Frente a todas estas posibilidades, se seleccionaron los iniciadores del tipo persulfato y canforquinona, para evaluar las mejores condiciones de reacción para obtener NGs a partir de VCL.

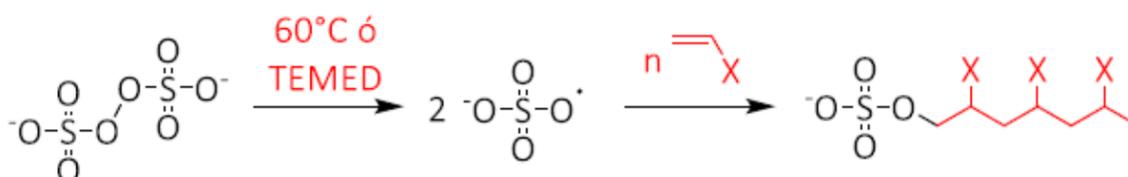


Figura 2.4. Esquema de polimerización radicalaria iniciada con persulfato

La temperatura del medio de reacción determina cuáles serán las interacciones que estarán favorecidas, las polímero-polímero o las polímero-solvente. En el caso que predominen las interacciones polímero-polímero, las cadenas del mismo tienden a asociarse entre sí y eventualmente separarse de la solución, lo que conduce a una suspensión turbia. Para los polímeros del tipo LCST, las cadenas del polímero son hinchables por debajo de la temperatura de transición y mantienen una alta afinidad con el medio circundante lo que torna la solución transparente, siendo más importantes las interacciones polímero-solvente. La temperatura a la cual ocurre la transición de fase se denomina T_{cp} (por sus siglas en inglés *Cloud point temperature*) [13,45] y es aprovechada para determinar de manera rápida la capacidad de responder a los cambios de temperatura (termo-sensibilidad), de los distintos NGs sintetizados bajo las diferentes condiciones de reacción.

Una vez realizada la síntesis en los distintos medios de reacción (agua destilada, agua MiliQ y solución buffer) y con los distintos iniciadores (KPS, APS, NaPS y canforquinona), se consideró como parámetro para determinar la eficiencia de las condiciones de reacción la termo-sensibilidad observable a nivel macroscópico.

Los resultados obtenidos permitieron concluir que, los NGs termosensibles solamente se obtuvieron al emplear como iniciador KPS en buffer pH 7 o agua de grado Mili-Q. Además, se observó que la reacción ocurre aún en ausencia de TEMED aunque, la presencia de este activador o catalizador, da lugar a NGs de menores valores de D_h y de índices de PDI, a tiempos más cortos de reacción. Esto quiere decir, que las cadenas poliméricas crecen a mayor velocidad, ya que se observó que el medio de reacción se enturbia a tiempos más cortos, lo cual indica que las cadenas se están formando a velocidades mayores. Este efecto se traduce en menores tiempos de reacción con un gasto de energía menor. En base a estos resultados, se consideró que las mejores condiciones de reacción que permiten la obtención de NGs termo-sensibles de tamaño adecuado requiere el empleo de TEMED como catalizador de la polimerización. Con el resto de las condiciones puede que el peso molecular de los materiales obtenidos sea muy bajo, por lo que, el largo de la cadena del polímero no es lo suficientemente extenso como para presentar una respuesta al cambio de la temperatura del medio.

Tabla 2.1. Respuesta termosensible* de NGs de VCL.

Iniciador	Solvente	Termosensibilidad
APS	H ₂ O destilada	No detectada
	Buffer pH 7	No detectada
	Mili Q	No detectada
NaPS	H ₂ O destilada	No detectada
	Buffer pH 7	No detectada
	Mili Q	No detectada
KPS	H ₂ O destilada	No detectada
	Buffer pH 7	Detectada
	Mili Q	Detectada
KPS/TEMED	Mili Q	Detectada
Canforquinona	H ₂ O destilada	No detectada
	Buffer pH 7	No detectada
	Mili Q	No detectada

*La detección de la termosensibilidad se realizó observando de manera visual la aparición de turbidez o no con el aumento de la temperatura.

Una vez optimizadas todas las condiciones de reacción y sintetizados los NGs de PVCL entrecruzados con BIS, se procedió a su caracterización.

Para confirmar la polimerización de VCL y la reticulación con BIS se llevaron a cabo mediciones de espectroscopía FT-IR.

La Figura 2.5. muestra los espectros FT-IR correspondientes al monómero VCL y a los NGs con 0,5 y 4 % de BIS.

En cuanto al espectro del monómero, el mismo presenta las bandas características a 2900-3000 y 1648 cm^{-1} debido a la vibración de estiramiento de $\text{Csp}^3\text{-H}$ y $\text{C}=\text{C}$ respectivamente, correspondientes a la cadena alquílica y al resto vinílico presentes en la VCL. Además, se

observan dos señales a 1698 y 1476 cm^{-1} correspondientes al enlace $\text{C}=\text{O}$ y $\text{C}-\text{N}$ del grupo amida presente en el monómero (Figura 2.5 (a)).[46]

Los NGs, por otro lado, mostraron un corrimiento de la banda del grupo $\text{C}=\text{O}$ a 1634 cm^{-1} y la desaparición de la banda correspondiente al resto vinílico, confirmando así la completa polimerización y correcta eliminación de los restos del monómero sin reaccionar. Además, se observó la aparición de una banda entre los 3000 y 3500 cm^{-1} correspondiente al estiramiento $\text{N}-\text{H}$ y un hombro a 1535 cm^{-1} , ambos correspondientes al estiramiento y deformación del enlace $\text{N}-\text{H}$ (grupo amida) del entrecruzante y, cuyas intensidades relativas, aumentan con la cantidad de reticulante agregado (Figura 2.5 (b) y (c)).

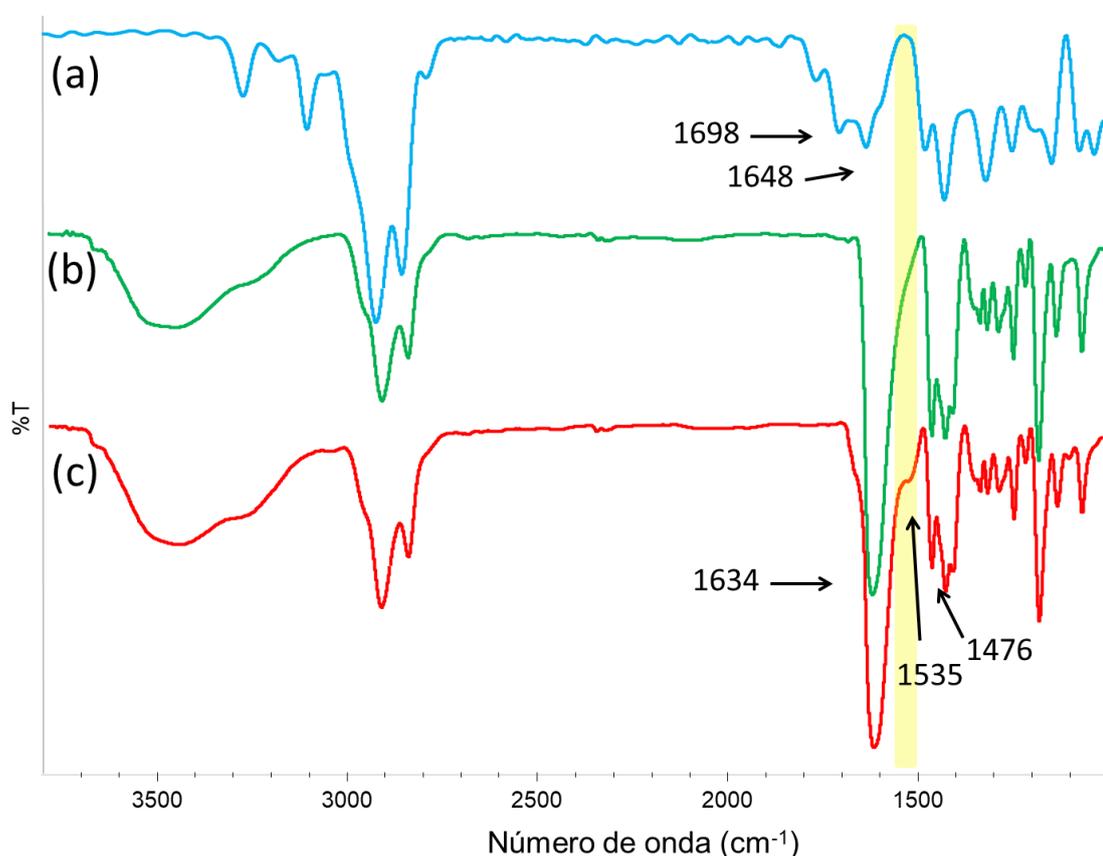


Figura 2.5. Espectros FT-IR de (a) VCL, (b) $\text{P(VCL)}_{0.5}$ Y (c) P(VCL)_4

El espectro de $^1\text{H-NMR}$, del monómero VCL muestra señales a 7,2; 4,8 y 4,6 ppm (1H cada uno, $=\text{CH}$ protones vinílicos), y a 3,7; 2,6 (2H cada uno, $-\text{CH}_2$) y 1,7 ppm (6H, $-\text{CH}_2$), correspondientes al anillo de la caprolactama.[47] En los espectros de $^1\text{H-NMR}$ de los NGs de PVCL,

posible observar el ensanchamiento típico de las señales, así como la desaparición de aquellas provenientes de los protones vinílicos (Figura 2.6.). Estas evidencias permiten confirmar la reacción de polimerización y la ausencia de monómero libre, indicando que todo el monómero ha polimerizado o fue eliminado completamente durante la purificación final de los NGs.

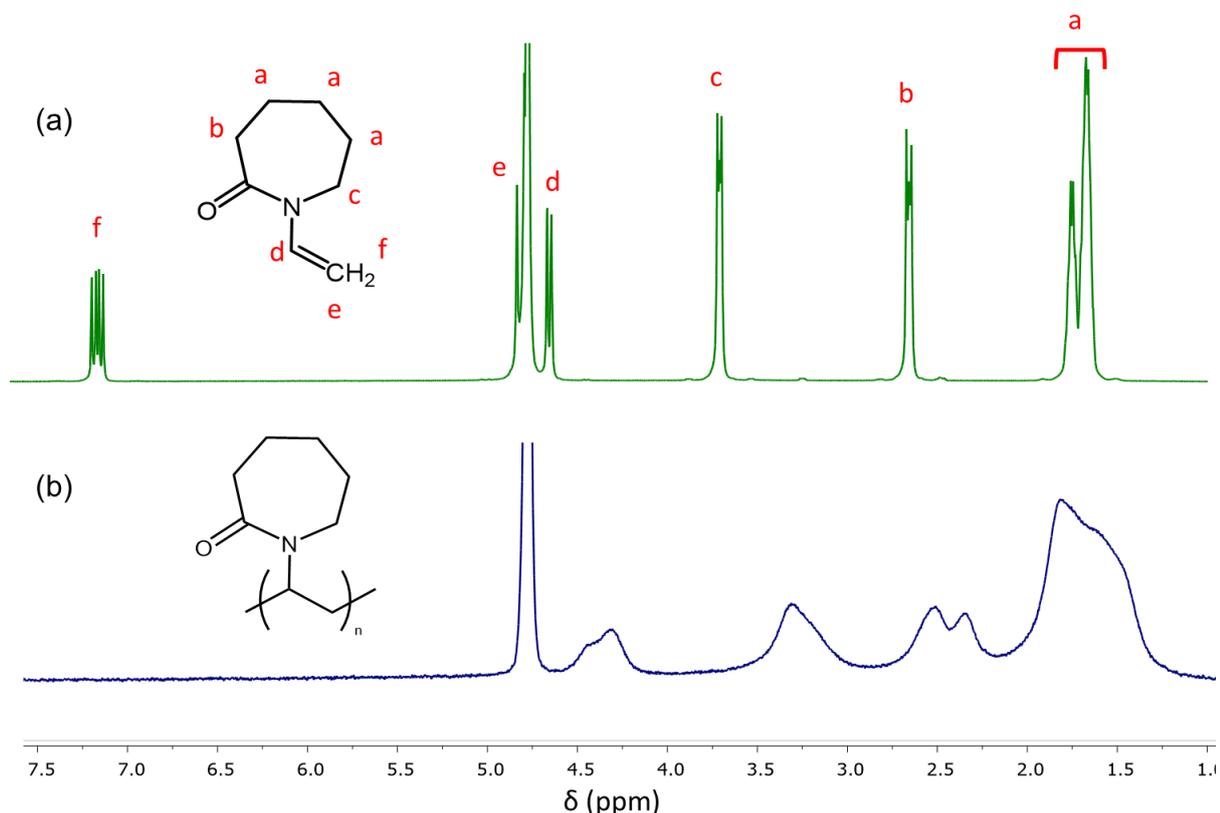


Figura 2.6. Espectros de RMN^{-1}H de (a) el monómero VCL (D_2O) y (b) NGs de $\text{P}(\text{VCL})_4$ (D_2O).

El comportamiento térmico de los reactivos y los NGs secos se investigó cualitativamente mediante análisis termogravimétrico TGA (Figura 2.7.). En el perfil térmico del monómero VCL, se observa una pérdida de masa única alrededor de 400°C . Por otro lado, el termograma del entrecruzante muestra dos pérdidas de masa, a 190 y 230°C . Para los NGs entrecruzados ($\text{P}(\text{VCL})_2$ y $\text{P}(\text{VCL})_4$), las curvas muestran el comienzo de la degradación térmica a temperaturas menores que el monómero (alrededor de 360°C) y luego una pérdida de masa más importante a 400°C . Este inicio de la degradación térmica de los NGs se observa a menores temperaturas, corresponde con la degradación de BIS a temperaturas más bajas [24] y evidencia la incorporación de este en la red.

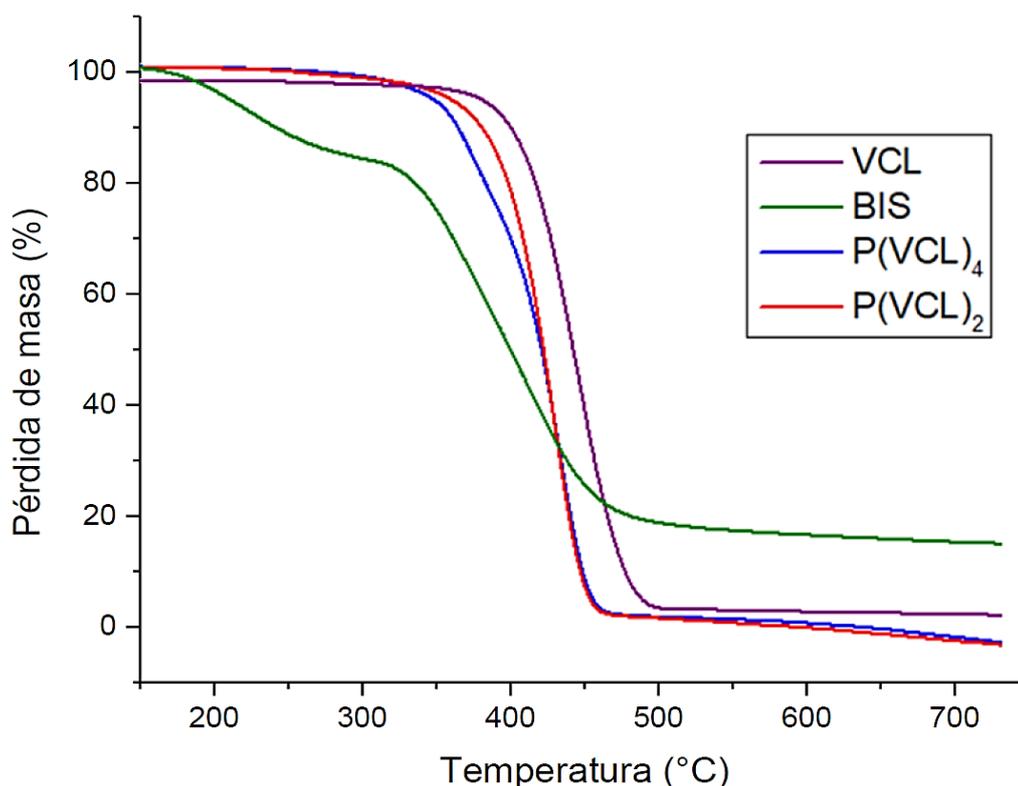


Figura 2.7. Curvas de TGA de los reactantes, VCL y BIS, y de los NGs de P(VCL) sintetizados con distinto grado de entrecruzamiento.

Una vez obtenidos los NGs con diferente grado de entrecruzamiento, se midieron el diámetro hidrodinámico (D_h) y el índice de polidispersidad (PDI) a 15°C, de modo de permanecer por debajo de la temperatura de transición de fase, Tabla 2.2. En todos los casos, se obtuvieron tamaños dentro de la escala nanométrica y valores de PDI entre 0,2 y 0,4. Se observó que, al aumentar el grado de entrecruzamiento del NG aumenta el valor de D_h . Este último comportamiento es opuesto a lo que se espera en este tipo de sistemas ya que, por lo general, un aumento en el grado de entrecruzamiento conlleva a una disminución del tamaño del hidrogel, debido a un aumento en la rigidez del sistema que dificulta la expansión de la red. Forcada y col. [48,49] han estudiado y reportado la relación existente entre la nanoestructura del NG y su comportamiento. La velocidad de reacción del agente entrecruzante (BIS) es mayor que la del monómero (VCL), formando una estructura de tipo *core-shell*, con un núcleo rico en BIS rodeado de una coraza de VCL, Figura 2.8. Luego, a una mayor concentración de BIS, el tamaño del núcleo aumenta, y el resultado es un NG con mayor D_h .

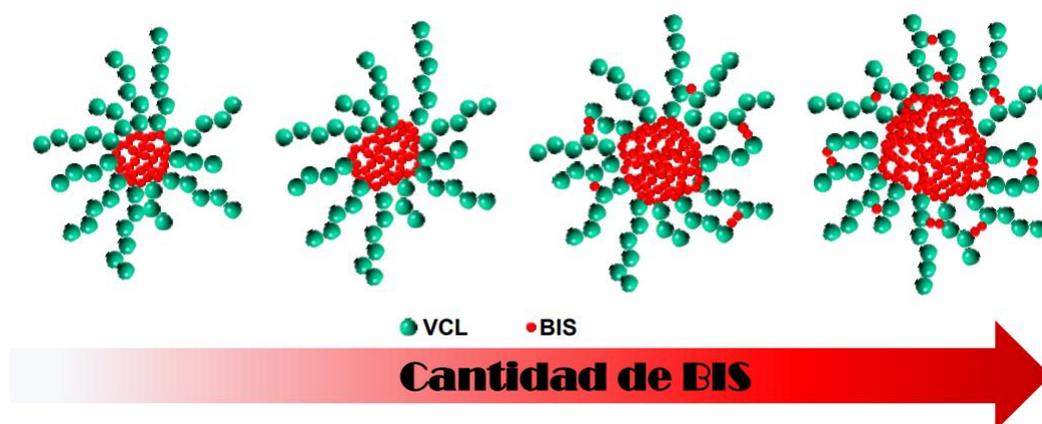


Figura 2.8. Esquema estructural de los NGs de VCL según la cantidad relativa de BIS.

Además, la temperatura de transición de fase de cada NG se determinó por turbidimetría UV-vis. En la determinación de la T_{cp} se aprovecha el cambio visual de la solución, transparente a turbia, temperatura que se conoce también como punto de nube. Para realizar esta determinación, se mide la absorbancia de una solución de NG a una determinada longitud de onda (típicamente 600 nm), mientras se calienta empleando una rampa de temperatura adecuada. La transmitancia de luz es máxima cuando la solución es completamente transparente, indicando que el polímero es completamente soluble en el medio acuoso, mientras que es mínima cuando la solución se vuelve turbia. El punto de inflexión de la curva obtenida en el gráfico de Absorbancia en función de la temperatura corresponde al valor de la T_{cp} del material.[3]

Los valores de T_{cp} obtenidos a partir de espectroscopia UV-vis, fueron comparados con la temperatura de transición de fase (T_f) determinados por DLS. Para llevar a cabo estas últimas medidas, se determinaron los valores de D_h de los NGs, empleando una rampa de temperatura y observando el valor de temperatura a partir de la cual ocurre la transición de fase de volumen y los NGs colapsan. Los valores obtenidos por ambas metodologías fueron comparables, tal como se muestra en la Tabla 2.2.

Para NGs con porcentajes bajos de BIS, la temperatura de transición fue semejante, pero por encima del 2% de entrecruzante estos valores comienzan a disminuir (Figura 2.9). La molécula de BIS es más hidrofílica que el monómero VCL y, por lo tanto, un aumento en la cantidad de entrecruzante debería resultar en valores de T_{cp}/T_f más altos. Teniendo en cuenta el tipo de estructura propuesto para los NGs (*core-shell*), un

mayor porcentaje de BIS forma un corazón muy denso, favoreciendo la formación de interacciones intramoleculares del tipo puente hidrógeno entre los grupos amida. En consecuencia, la temperatura de transición de fase disminuye, predominando las interacciones polímero-polímero sobre las interacciones polímero-solvente. El resultado final son valores de temperatura de transición menores a medida que el porcentaje de entrecruzamiento de la red aumenta lo suficiente.

Tabla 2.2. Valores de diámetro hidrodinámico (Dh), temperatura de enturbiamiento (T_{cp}) y temperatura de transición de fase (T_f) de NGs P(VCL)_x.

NG	Bis (%)	T _{cp} (°C)	T _f (°C)	Dh (nm)*
P(VCL) _{0,5}	0,5	32,8 ± 0,2	32,7 ± 0,3	68 ± 3
P(VCL) ₁	1,0	32,3 ± 0,3	32,5 ± 0,2	73 ± 1
P(VCL) ₂	2,0	32,1 ± 0,2	32,1 ± 0,4	120 ± 3
P(VCL) ₃	3,0	30,8 ± 0,4	30,9 ± 0,5	155 ± 3
P(VCL) ₄	4,0	25,2 ± 0,3	24,4 ± 0,3	199 ± 2

* Dh medido por debajo de la temperatura de transición de fase de los NGs

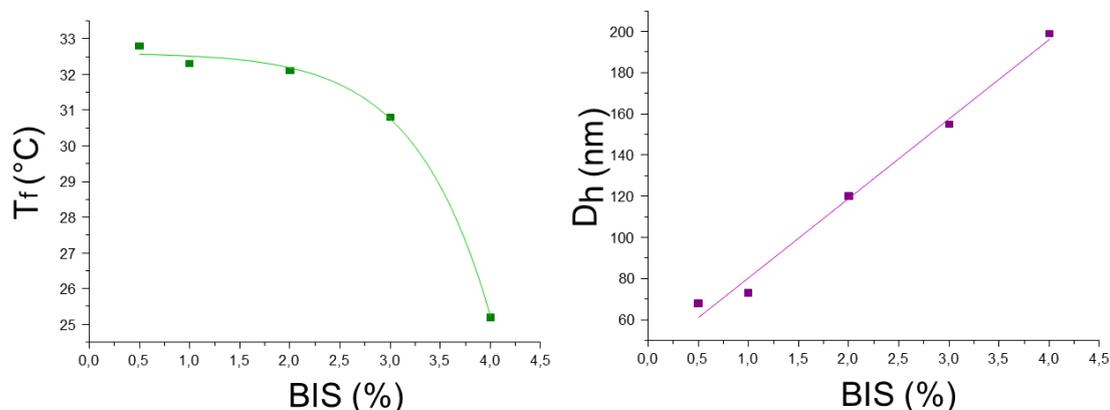


Figura 2.9. Variación de T_{cp} y Dh de los NGs de P(VCL)_x (0,0800 g iniciales de VCL) en función del porcentaje de BIS.

Para examinar la distribución del tamaño y la morfología de los NGs, se realizaron estudios TEM en uno de los sistemas. La Figura 2.10 muestra la imagen TEM y la distribución de tamaño correspondientes a P(VCL)₄.

La imagen TEM revela un tamaño promedio de aproximadamente 50 nm, mostrando baja polidispersidad y forma esférica de las partículas. El valor de Dh determinado por DLS es mayor que el obtenido a partir de TEM. Este hecho se debe a que las medidas en DLS se realizan en solución

donde los NGs se encuentran en un estado hinchado, en cambio esto no sucede en las obtenidas con TEM, donde la muestra debe estar seca.

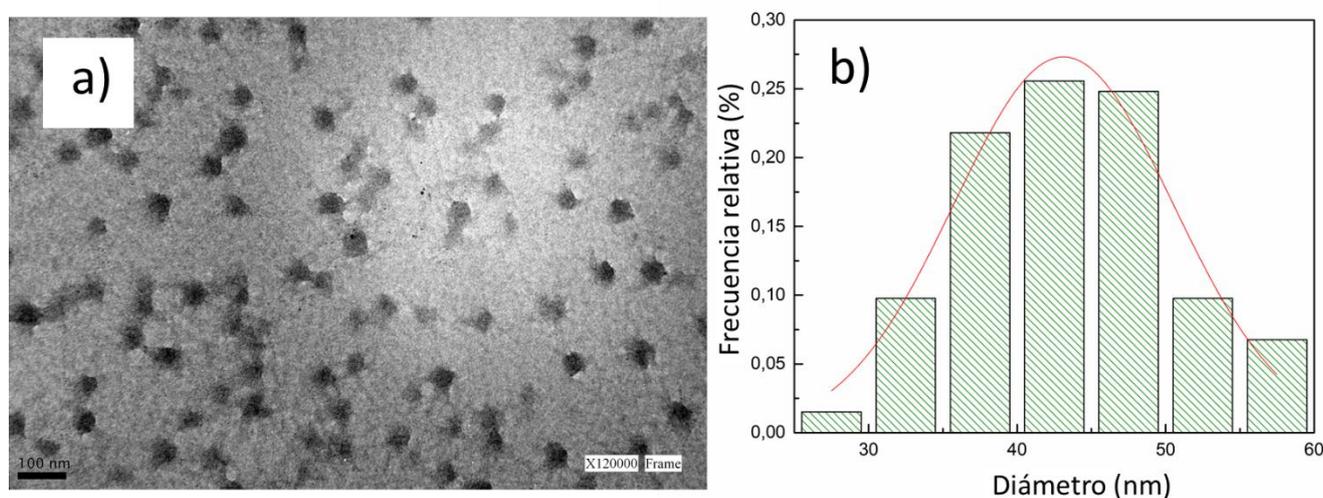


Figura 2.10. a) Imagen TEM y b) distribución de tamaños para los NGs P(VCL)₄.

2. 4. 2. Síntesis y caracterización de NGs dendríticos a partir de VCL y ABA o ABC

Se llevó a cabo la síntesis de NGs dendríticos empleando ABA y ABC como monómeros dendríticos, los cuales fueron sintetizados según se detalló en el Capítulo 1.

Por un lado, el dendrón ABA es de carácter hidrofóbico debido a la presencia de los grupos *ter*-butilo terminales, los que además generan impedimento estérico en la periferia.

Por el otro lado, el monómero dendrítico ABC posee un carácter hidrofílico, con una alta densidad de grupos ácido en la periferia y al igual que el dendrón ABA, genera un impedimento estérico importante, no solo debido al tamaño de los grupos, sino también debido a la posibilidad de ionización de los grupos ácido a grupos carboxilato, provocando repulsión entre las cargas negativas.

Siguiendo la metodología descrita en la Parte Experimental de este Capítulo, se llevó a cabo la síntesis de los NGs dendríticos y su posterior caracterización.

Los espectros FT-IR de los NGs dendríticos mostraron además, de las bandas características del bloque dendrítico, las correspondientes a la VCL, de acuerdo a la descripción del espectro correspondiente a los NGs P(VCL) homopoliméricos. En los NGs dendríticos se observa la aparición de una banda a 1730 cm^{-1} para P(VCL-co-ABA) y 1723 cm^{-1} para P(VCL-co-ABC), correspondiente al estiramiento del enlace C=O de los grupos carbonilo, éster o ácido, presentes en las moléculas dendríticas ABA y ABC, respectivamente. Es importante destacar que, se observa un aumento en la intensidad relativa de esta última señal con el aumento en el porcentaje de dendrón, Figura 2.12.

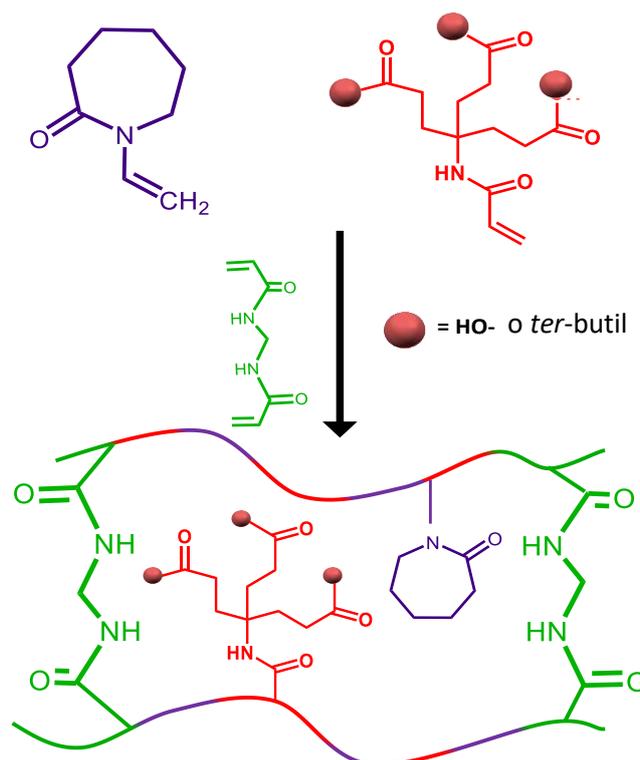


Figura 2.11. Esquema de reacción de polimerización de los NGs dendríticos

En los espectros correspondientes a los NGs P(VCL-co-ABC), al aumentar el porcentaje de dendrón, aumenta el aporte de grupos hidroxilo y esto se evidencia por un aumento en la intensidad relativa de la señal de estiramiento del enlace O-H entre 3000 y 3500 cm^{-1} con respecto a la banda de estiramiento C-H sp^3 aproximadamente a 2900 cm^{-1} .

Nuevamente, y al igual que en los espectros de los NGs P(VCL) homopoliméricos, se observa un hombro a 1535 cm^{-1} que corresponde a la deformación del enlace N-H (grupo amida) del BIS cuya intensidad relativa aumenta con la cantidad de entrecruzante incorporado.

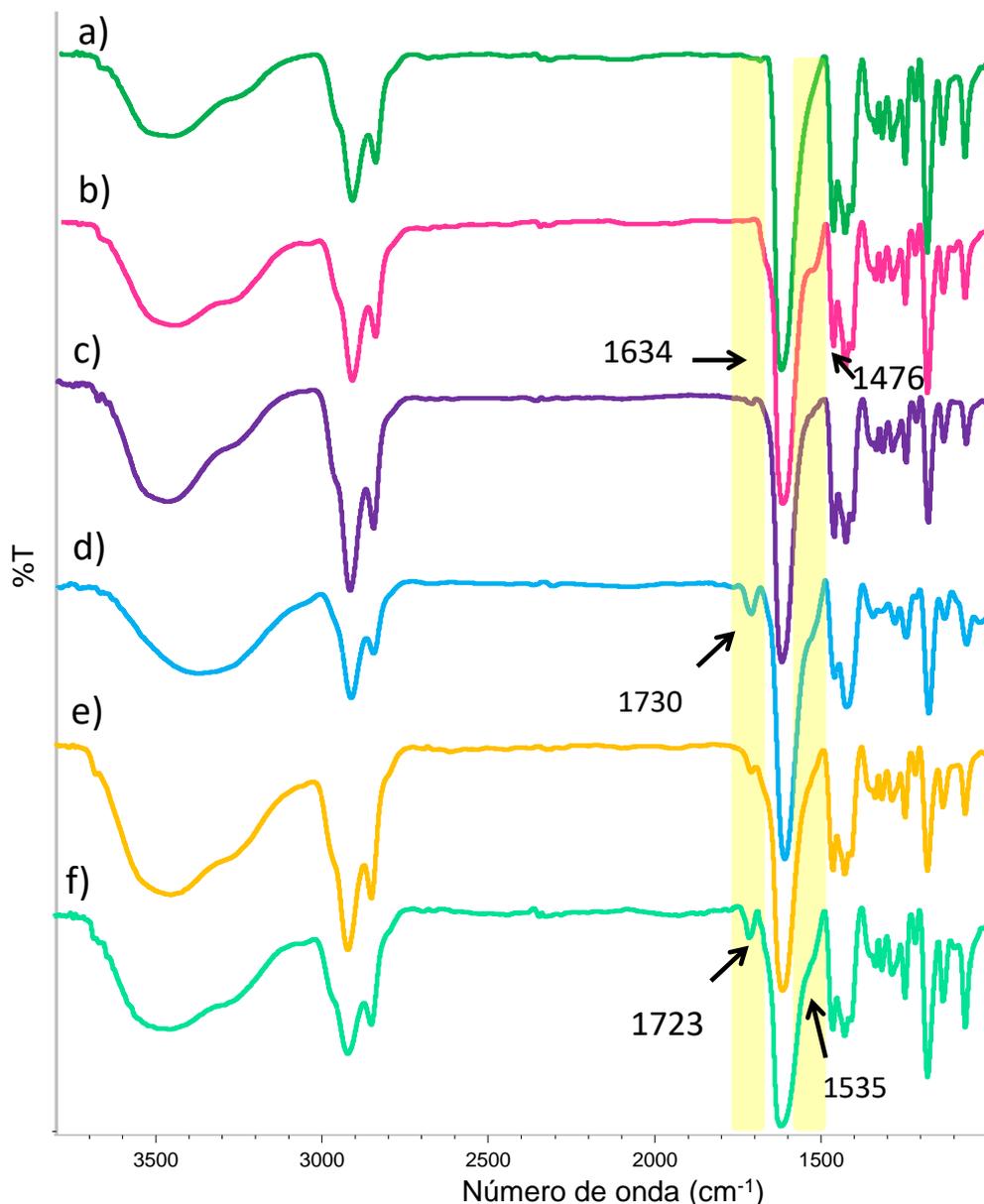


Figura 2.12. Espectros FT-IR de (a) P(VL)_{0,5}, (b) P(VL)₄, (c) P(VL-co-ABA¹)_{0,5}, (d) P(VL-co-ABA³)₁, (e) P(VL-co-ABC^{0,5})_{0,5} y (f) P(VL-co-ABC³)₂.

Luego del análisis espectroscópico de los NGs dendríticos con diferente grado de entrecruzamiento y dendronización, se determinaron por DLS los valores de D_h y de PDI a 15°C, temperatura por debajo de la temperatura de transición de fase de los materiales. En todos los casos se obtuvieron tamaños dentro de la escala nanométrica y valores de PDI entre 0,2 y 0,4. La determinación de T_{cp} de cada NG se realizó por turbidimetría.

Estudio de la influencia del porcentaje de BIS en los NGs

Los primeros resultados a discutir corresponden a NGs dendríticos con diferente grado de entrecruzamiento, manteniendo constante el porcentaje de dendronización en 1%.

Después de medir los valores de T_{cp} de los materiales dendríticos con ABA y ABC, es posible concluir que la presencia de ambos dendrones en la matriz polimérica aumenta la temperatura de transición del material, siendo más significativo el aumento en los NGs con ABC (Tablas 2.3 y 2.4). Además, los NGs formados por copolimerización de VCL con ABA mostraron la misma tendencia al variar el porcentaje de reticulante que los NGs P(VCL). Es decir, a mayores grados de entrecruzamiento, se observaron menores temperaturas de transición de fase.

Las características hidrofóbicas del dendrón ABA dificulta que las moléculas de agua ingresen a la red, por lo que prevalecen los enlaces del tipo puente hidrógeno intramoleculares entre las cadenas de BIS, presente fundamentalmente en el corazón del NG. Este comportamiento se refleja en una disminución en el valor de la T_{cp} a un mayor porcentaje de entrecruzamiento. Nuevamente, las interacciones polímero-polímero predominan sobre las interacciones polímero-agua.

Por otro lado, en los NGs que contienen ABC como dendrón, no se observa una tendencia clara al variar el porcentaje de BIS, lo que indicaría que existe un compromiso entre la cantidad relativa de dendrón y BIS, y las interacciones puente hidrógeno que predominan ya que, como se mencionó anteriormente es posible formar uniones puente H entre las moléculas de BIS, entre los grupos ácido de ABC o incluso entre el entrecruzante y el dendrón. El tipo y cantidad de interacciones que se establezcan va a depender de las cantidades relativas de cada uno dentro de la red, lo cual repercutirá finalmente en el valor de T_{cp} del material.

Con respecto a los valores de D_h medidos, también se observaron dos tendencias diferentes según el tipo de dendrón. En el caso de los NGs P(VCL-co-ABC), se observó la misma tendencia que para los homopolímeros P(VCL), mostrando tamaños más grandes a mayor grado de entrecruzamiento. Por otro lado, para los NGs P(VCL-co-ABA) no se observaron cambios significativos en el tamaño al variar el grado de reticulación. Esto podría atribuirse a la presencia de los grupos *ter*-butilo

en la periferia del dendrón, que provocan un aumento de la hidrofobicidad en la superficie del material, dificultando la entrada de agua en la red. En consecuencia, no existiría una expansión/hinchamiento de la red suficiente que genere un cambio apreciable de tamaño de los NGs.

Tabla 2.3. Valores de T_{cp} y D_h para NGs dendríticos $P(VCL-co-ABA^1)_x$ y $P(VCL-co-ABC^1)_x$.

Sample	Bis (%)	T_{cp} (°C)	D_h (nm)*
$P(VCL-co-ABA^1)_{0,5}$	0,5	$35,3 \pm 0,4$	135 ± 5
$P(VCL-co-ABA^1)_1$	1,0	$34,8 \pm 0,1$	115 ± 10
$P(VCL-co-ABA^1)_2$	2,0	$32,4 \pm 0,3$	139 ± 6
$P(VCL-co-ABA^1)_4$	4,0	$30,3 \pm 0,2$	119 ± 2
$P(VCL-co-ABC^1)_{0,5}$	0,5	$36,8 \pm 0,5$	45 ± 3
$P(VCL-co-ABC^1)_1$	1,0	$33,9 \pm 0,1$	246 ± 4
$P(VCL-co-ABC^1)_2$	2,0	$38,5 \pm 0,2$	384 ± 9
$P(VCL-co-ABC^1)_4$	4,0	$36,9 \pm 0,6$	490 ± 10

* D_h medidos por DLS por debajo de la temperatura de transición de fase de los NGs.

Estudio de la influencia del porcentaje de dendrón en los NGs

Finalmente, se seleccionaron NGs con mayores valores de T_{cp} , 0,5 y 1% de entrecruzante para los NGs $P(VCL-co-ABA)$ y 0,5, 2 y 4% para los NGs $P(VCL-co-ABC)$ y se continuó el estudio variando el porcentaje de dendronización del material entre 0,5 y 3%.

En el caso de los NGs $P(VCL-co-ABA^1)_1$ (Tabla 2.4), los valores de T_{cp} no varían significativamente con el aumento en la cantidad de dendrón. Este resultado indica que quien estaría gobernando el comportamiento del NGs es el grado de reticulación, independientemente de la cantidad de dendrón incorporado. Esto se observa para los sistemas con hasta un 3% de ABA donde el efecto del dendrón cobra importancia. Para los sistemas con 0,5% de entrecruzamiento ($P(VCL-co-ABA^3)_{0,5}$), se observa una disminución de la temperatura de transición de 35 a 31°C, en cambio cuando el porcentaje de BIS es de 1% ($P(VCL-co-ABA^3)_1$) se observa una pérdida total de la termosensibilidad del material.

Por un lado, al comparar ambos comportamientos, se puede concluir que la rigidez que adquiere el sistema con el entrecruzamiento de la red y la

presencia de los grupos *ter*-butilo del dendrón, voluminosos e hidrofóbicos, provocan una pérdida de la capacidad de la red para responder frente a un cambio de la temperatura del medio. Pero, al disminuir la cantidad de BIS, se pierde parte de la rigidez por el entrecruzamiento y se recupera la termosensibilidad del material. Estos resultados demostrarían que la cadena de PVCL debe poseer flexibilidad suficiente para conservar la termosensibilidad.

En cuanto al sistema $P(VCL-co-ABA^3)_{0,5}$ la disminución de la T_{cp} puede ser atribuida a la hidrofobicidad del comonomero dendrítico y la cantidad relativa de dendrón: entrecruzante.

Al igual que, al variar el grado de entrecruzamiento, no se observaron cambios significativos en el tamaño de los NGs, al variar la cantidad de dendrón y manteniendo constante el grado de entrecruzamiento. Esto puede deberse a que la presencia de los grupos *ter*-butilo hidrofóbicos del ABA, dificultan el ingreso de moléculas de agua a la red y por ende el hinchamiento del NG. Nuevamente, esto se observa para los NGs con hasta un 3% de ABA. En cuanto a los sistemas $P(VCL-co-ABA^3)_1$ el aumento del tamaño es importante, en cambio para los NGs de $P(VCL-co-ABA^3)_{0,5}$ dicho aumento es más leve. Este mayor valor de D_h con 3% de dendron podría deberse a que toma importancia el impedimento estérico entre los grupos terminales del dendrón que buscan alejarse, aumentando así el tamaño del NG. Por otro lado, al comparar estos dos NGs con iguales cantidades de dendrón, se vuelve a la premisa de que a mayores cantidades de BIS se observan mayores valores de D_h .

Todos estos resultados estarían indicando que la presencia del dendrón, junto al grado de entrecruzamiento, son los responsables de las características finales del material.

Tabla 2.4. Valores de T_{cp} y D_h para NGs P(VCL-co-ABA).

NG	ABA (%)	Bis (%)	T_{cp} (°C)	D_h (nm)*
P(VCL-co-ABA ^{0.5}) ₁	0,5	1,0	36,0 ± 0,4	119 ± 3
P(VCL-co-ABA ¹) ₁	1,0	1,0	34,8 ± 0,1	115 ± 4
P(VCL-co-ABA ²) ₁	2,0	1,0	35,1 ± 0,2	133 ± 4
P(VCL-co-ABA ³) ₁	3,0	1,0	-	339 ± 2
P(VCL-co-ABA ^{0.5}) _{0,5}	0,5	0,5	34,9 ± 0,3	127 ± 3
P(VCL-co-ABA ¹) _{0,5}	1,0	0,5	35,3 ± 0,4	135 ± 5
P(VCL-co-ABA ³) _{0,5}	3,0	0,5	31,4 ± 0,3	197 ± 6

* D_h medidos en el estado hinchado del NG por debajo de la temperatura de transición del material.

Los NGs P(VCL-co-ABC) mostraron un comportamiento atípico para la variación de T_{cp} , teniendo en cuenta que el monómero dendrítico posee características hidrofílicas con grupos ácido en la periferia (Tabla 2.5). Al aumentar la cantidad de ABC se esperaría un aumento en el valor de T_{cp} , sin embargo, se observó el efecto opuesto. Mientras el porcentaje de dendrón aumenta, la T_{cp} disminuye.

Estos resultados estarían demostrando que el efecto del dendrón sobre el valor de T_{cp} de los NGs, se corresponde con el de un comonómero hidrofóbico. La disposición de los grupos periféricos del dendrón facilitan las interacciones polímero-polímero sobre las polímero-solvente. Estos resultados evidencian el denominado efecto dendrítico, donde la disposición de los grupos funcionales de la periferia permite que interaccionen en forma cooperativa. Este comportamiento ha sido reportado previamente por Rimondino et.al [22] para NGs de P(NIPAM-co-ABC).

Sin embargo, por debajo de la T_{cp} , la estructura expandida de tipo *core-shell* de los NGs, evidencia la capacidad de solvatación de las partículas, mostrando un aumento en los valores de D_h a medida que aumenta la cantidad de ABC.

Tabla 2.5. Valores de T_{cp} y D_h para NGs P(VCL-co-ABC)

NG	ABC (%)	Bis (%)	T _{cp} (°C)	D _h (nm)*
P(VCL-co-ABC ^{0,5}) ₂	0,5	2,0	39,5 ± 0,8	129 ± 3
P(VCL-co-ABC ¹) ₂	1,0	2,0	38,5 ± 0,2	384 ± 4
P(VCL-co-ABC ²) ₂	2,0	2,0	32,4 ± 0,2	478 ± 10
P(VCL-co-ABC ³) ₂	3,0	2,0	31,7 ± 0,3	543 ± 2
P(VCL-co-ABC ¹) ₄	1,0	4,0	36,9 ± 0,6	490 ± 4
P(VCL-co-ABC ³) ₄	3,0	4,0	27,3 ± 0,2	560 ± 2

* Dh medidos en el estado hinchado del NG por debajo de la temperatura de transición del material.

Estudio de la influencia del porcentaje de BIS en NGs con 0,5% de ABC

De acuerdo a los resultados obtenidos y discutidos anteriormente, se llevaron a cabo los últimos estudios con NGs P(VCL-co-ABC^{0,5})_y. Es importante destacar que, estos NGs a pesar de poseer bajo porcentaje de monómero dendrítico, el carácter hidrofílico del mismo se ve reflejado en un valor de T_{cp} alto (39°C). Considerando que, tanto el porcentaje de dendrón como de entrecruzante, estarían gobernando las propiedades del material final, resultó interesante evaluar el comportamiento de NGs (T_{cp} y D_h) con solo 0,5% de comonómero dendrítico con diferentes grados de entrecruzamiento (Tabla 2.6).

Table 2.6. Valores medidos de T_{cp} y D_h para NGs P(VCL-co-ABC^{0,5})_y.

Sample	Bis (%)	T _{cp} (°C)	D _h (nm)*
P(VCL-co-ABC ^{0,5}) _{0,5}	0,5	41,8 ± 0,8	62 ± 2
P(VCL-co-ABC ^{0,5}) ₁	1,0	31,6 ± 0,2	85 ± 3
P(VCL-co-ABC ^{0,5}) ₂	2,0	39,5 ± 0,8	129 ± 2

* Dh medidos en el estado hinchado del NG por debajo de la temperatura de transición del material.

Los valores de D_h y T_{cp} obtenidos para los NGs de ABC con 0,5% de ABC y 2 o 0,5 % de BIS resultan interesantes, ya que no superaron los 150 nm y se alcanzan temperaturas de transición de 41°C. Este valor de T_{cp} es relevante sobre todo para el uso de estos NGs como *carriers* de fármacos promoviendo la liberación del mismo por calentamiento con luz infrarroja.

De acuerdo a los resultados presentados, para los NGs dendríticos basados en ABA, el efecto estérico es un factor más importante que la contribución no polar. Mientras que, para los NGs a base de ABC el equilibrio hidrofílico/hidrofóbico predomina, promoviendo las interacciones polímero-polímero y dificultando las interacciones red-disolvente.

Estudio de la temperatura de transición de los NGs con diferentes técnicas

Para un estudio más detallado de los sistemas, se determinaron los valores de T_f de algunos sistemas por DLS y se compararon con los obtenidos previamente por turbidimetría (T_{cp}) (Tabla 2.7.).

Tabla 2.7. Valores medidos de T_{cp} y T_f para NGs P(VCL-co-ABA) y P(VCL-co-ABC).

NG	T_{cp} (°C)	T_f (°C)
P(VCL-co-ABA ¹) ₁	34,8 ± 0,1	34,87 ± 0,06
P(VCL-co-ABA ¹) ₂	32,4 ± 0,3	32,0 ± 0,7
P(VCL-co-ABA ¹) ₄	30,3 ± 0,2	29,6 ± 0,3
P(VCL-co-ABA ¹) ₁	34,8 ± 0,1	34,87 ± 0,06
P(VCL-co-ABA ²) ₁	35,1 ± 0,2	35,6 ± 0,3
P(VCL-co-ABA ³) ₁	-	-
P(VCL-co-ABC ¹) ₁	33,9 ± 0,1	34,8 ± 0,3
P(VCL-co-ABC ¹) ₂	38,5 ± 0,2	30,8 ± 0,4
P(VCL-co-ABC ¹) ₄	36,9 ± 0,6	25,9 ± 0,4
P(VCL-co-ABC ¹) ₂	38,5 ± 0,2	30,8 ± 0,4
P(VCL-co-ABC ²) ₂	32,4 ± 0,2	31,6 ± 0,2
P(VCL-co-ABC ³) ₂	31,7 ± 0,3	31 ± 1

En el caso de los NGs P(VCL-co-ABA) los valores de temperatura de transición (T_{cp} y T_f) obtenidos con cada metodología fueron comparables.

Por el contrario, para la mayoría de los NGs P(VCL-co-ABC) no se obtuvieron valores similares de T_{cp} y T_f . Los valores de T_f resultaron muy similares a los obtenidos para los NGs P(VCL)_x con iguales porcentaje de entrecruzante. Además, al igual que con los homopolímeros, se observa una disminución de la temperatura de transición con el aumento en la cantidad de BIS, independiente de la cantidad de dendrón. Este

comportamiento puede ser explicado teniendo en cuenta el principio físico mediante el cual se calcula el tamaño de partícula empleando las medidas de DLS.

En DLS se mide el movimiento browniano y se lo relaciona con el tamaño de las partículas. El movimiento browniano es el movimiento aleatorio de partículas que ocurre entre las moléculas de solvente que están alrededor. Mientras mayor sea el tamaño de la partícula o molécula, más lento será el movimiento browniano. La velocidad del movimiento browniano se define por una propiedad conocida como el coeficiente de difusión traslacional (CDT). De este modo, el diámetro de partícula que se obtiene con esta técnica es el diámetro de una esfera que tiene el mismo CDT que la partícula. Este coeficiente dependerá no solo del tamaño del "núcleo" de la partícula, sino también de cualquier estructura superficial que afecte la velocidad de difusión, así como la concentración y el tipo de iones presentes en el medio. Cualquier cambio en la superficie de una partícula que afecte la velocidad de difusión cambiará en consecuencia el tamaño aparente de la partícula.[50–52] Es decir, al determinar el diámetro de partículas con superficies semejantes, se deberían observar cambios en intervalos similares de temperatura. Como se mencionó anteriormente, los valores de T_f para NGs P(VCL-co-ABC) fueron semejantes a los NGs análogos P(VCL), esto indicaría que la estructura de ambos tipos de NGs presentan una superficie similar. Para comprender mejor este comportamiento, se debe tener en cuenta la estructura propuesta, del tipo *core-shell*, para los NGs y las interacciones intramoleculares (enlaces tipo puente H) que se establecen entre el entrecruzante y el dendrón. En la mencionada estructura del NG, la cadena de BIS forma lo que se denomina corazón dentro de la estructura de la nanopartícula, teniendo en cuenta entonces la posibilidad de formar enlaces puente H entre los grupos funcionales del BIS y del dendrón, es probable que el dendrón se ubique orientado hacia el interior, dejando una superficie rica en VCL similar a la del homopolímero. De este modo, cuando se produce un aumento en la temperatura del sistema se afectan las interacciones polímero-polímero, algunas cadenas de polímeros ricas en VCL (homopoliméricas probablemente), que se encuentran en la superficie comienzan a colapsar y dejan al descubierto al dendrón. Este cambio de estructura en la superficie del material es detectado por el

equipo como un cambio aparente en el tamaño del NG y por ende como el comienzo de la transición del estado hinchado al colapsado del NG.

Con el objetivo de buscar evidencia experimental alternativa, que permita corroborar la disposición propuesta para el monómero dendrítico, se propuso demostrar la respuesta de los NGs al pH, teniendo en cuenta la presencia de los grupos ácido presentes en la periferia del dendrón. Para esto, se llevaron a cabo mediciones de potencial zeta (ζ) en medio ácido y básico a 15 y 45°C, por debajo y por encima de la temperatura de transición de fase, (Tabla 2.8.).

Tabla 2.8. Valores de potencial zeta para sistemas P(VCL-co-ABC^x)₂ y P(VCL)₂ en medio ácido y básico a 15 y 45°C.

NGs	Potencial zeta (mV)			
	pH 4.0		pH 9.0	
	15 °C	45 °C	15 °C	45 °C
P(VCL) ₂	-13,3	-10,8	-10,6	-11,5
P(VCL-co-ABC ¹) ₂	-15,5	-20,6	-11,1	-21,1
P(VCL-co-ABC ³) ₂	-19,5	-26,1	-18,8	-29,3

El potencial zeta es el potencial eléctrico en el plano de deslizamiento. Este plano es la interfaz que separa el fluido móvil del fluido que permanece unido a la superficie. Es la diferencia de potencial entre el medio de dispersión y la capa estacionaria de fluido unida a la partícula dispersa. Este potencial es causado por la carga eléctrica neta contenida dentro de la región limitada por el plano de deslizamiento, y también depende de la ubicación de ese plano. Por lo tanto, es frecuentemente empleado para la cuantificación de la magnitud de la carga.[50]

Al comparar los valores de ζ obtenidos para los diferentes NGs, se puede observar un fuerte aumento en el potencial de los NGs P(VCL-co-ABC) al aumentar la temperatura, hecho que no se observa en los NGs homopoliméricos. Esto indicaría que está ocurriendo un cambio en la superficie del material al colapsar con el aumento de la temperatura. Al aumentar la temperatura y producirse el colapso del NG, los grupos ácido

del dendrón quedan expuestos en la superficie, mientras que, cuando el NG está en estado hinchado (por debajo de la T_{cp}/T_f), se postula que el dendrón se orienta hacia el interior de la red (hacia el corazón), interactuando con las cadenas del BIS.

Por otra parte, al comparar los valores de potencial obtenidos a pH 4,0 y 9,0, a 45 °C (NGs colapsados), se observan mayores valores a pH 9,0, cuando en el NG predominan los grupos carboxilato cargados negativamente. Este resultado permite corroborar la respuesta de los NGs al pH del medio, consecuencia de los grupos funcionales ionizables presentes en la periferia del dendrón. Por el contrario, a 15°C los NGs permanecen en estado hinchado y difícilmente los grupos funcionales queden expuestos en la superficie de las partículas incluso a pesar de la repulsión que se puedan producir entre las cargas por la formación del carboxilato. Esto último queda evidenciado por la semejanza en los valores de ζ a ambos pH (Figura 2.13).

Además, para todos los NGs, a los dos valores de pH y de temperatura, se observa un aumento en el valor del potencial con el aumento en el porcentaje del dendrón, corroborando el aumento de grupos ácido/carboxilato en la red.

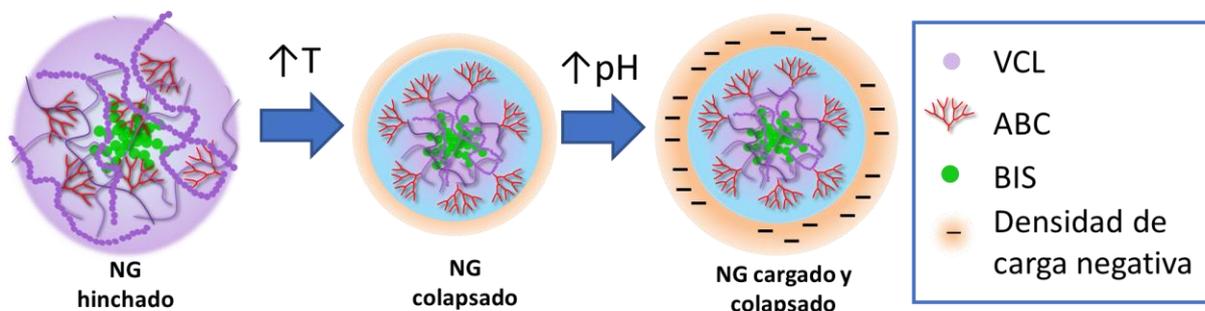


Figura 2.13. Representación esquemática de la conformación de los NGs durante el colapso y cambio de pH.

Finalmente, para examinar la distribución morfología y distribución de tamaño de los NGs, se tomaron imágenes TEM, Figura 2.14.

Las imágenes TEM revelan que un tamaño de alrededor de 50, 70 y 200 nm, para los NGs $P(VCL)_2$, $P(VCL-co-ABA^1)_2$ y $P(VCL-co-ABC^3)_2$ respectivamente. En todos los casos se observó baja polidispersidad y forma esférica de las partículas.

Los valores de tamaño determinados por DLS son superiores a los obtenidos por TEM. Sin embargo, la relación de tamaño se mantiene, siendo los sistemas homopolimérico y el NG basado en ABC, el de menor y mayor volumen, respectivamente.

Las diferencias observadas en la determinación de los tamaños se pueden atribuir a la capacidad de hinchamiento de los NG y a las condiciones experimentales para llevar a cabo cada una de las medidas. Las mediciones en DLS se realizan en solución acuosa, por lo que los NG se hinchan y el tamaño obtenido representa el diámetro hidrodinámico. En cambio, para obtener imágenes TEM, las muestras deben secarse y las mediciones deben realizarse al vacío.[17,53–55]

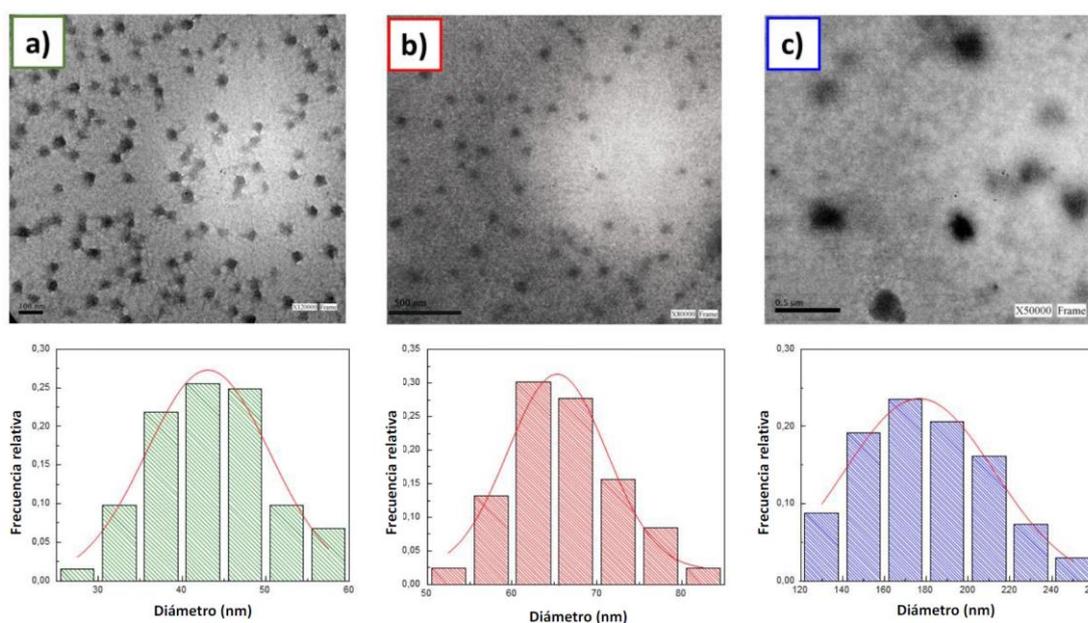


Figura 2.14. Imágenes TEM y distribución de tamaño de partícula de: a) $P(VCL)_2$, b) $P(VCL-co-ABA^1)_2$ y c) $P(VCL-co-ABC^3)_2$.

Las grandes diferencias de tamaño observadas son un indicador del grado de hidrofiliidad de los materiales. El NG con 3% de dendrón muestra la mayor diferencia entre los tamaños obtenidos por ambas metodologías. Este NG contiene la mayor cantidad de grupos ácido y es el más hidrófilo. Como resultado, este NG se hinchará más en un medio acuoso, lo que explica las diferencias observadas.

2. 5. Conclusiones parciales

Se sintetizaron y caracterizaron NGs basados en un monómero sintético termosensible VCL, estructuras dendríticas derivadas de la Amina de Behera, ABA y ABC, y un entrecruzante convencional ampliamente utilizado, BIS.

Estos NGs se prepararon mediante la técnica de polimerización por precipitación, optimizando inicialmente las diferentes condiciones de reacción tales como, el medio, el iniciador y la presencia del catalizador (TEMED). Se evaluó además, la influencia del grado de entrecruzamiento y de dendronización.

Se obtuvieron NGs con bajo índice de polidispersidad, donde el valor de D_h fue regulado por el porcentaje de entrecruzante y la cantidad, la identidad y el carácter hidrofílico/hidrofóbico del dendrón.

Para los NGs P(VCL-co-ABA), la hidrofobicidad y el impedimento estérico del dendrón, fueron determinantes, mostrando todos los NGs valores de D_h y T_{cp}/T_f similares y sin una tendencia clara.

En cambio, para los NGs P(VCL-co-ABC), el diámetro hidrodinámico fue mayor que en los NGs homopoliméricos P(VCL) y, aún mayor al incrementar el porcentaje de dendrón, debido a la periferia hidrofílica del mismo (grupos ácido). Por otra parte, se evidenció el denominado efecto dendrítico, al evaluar la variación en el valor de la temperatura de transición de fase. La presencia del dendrón favoreció la formación de enlaces del tipo puente hidrógeno intramoleculares, debido a los grupos ácido de ABC, disminuyendo el valor de T_{cp} al aumentar el porcentaje de dendronización.

Los valores de T_f medidos por DLS mostraron diferencias con los valores de T_{cp} obtenidos para los NGs con ABC. Dichos valores fueron similares a los obtenidos con los NGs homopoliméricos de VCL con iguales cantidades de BIS. Estos resultados, además de los valores de potencial zeta, permitieron demostrar la distribución espacial de los dendrones en la estructura de la red, orientados hacia el corazón (interior) y quedando expuestos a temperaturas por encima de la transición de fase, cuando las cadenas de VCL comienzan a colapsar y algunos enlaces puentes H comienzan a romperse.

Además, los valores de potencial zeta obtenidos resultaron muy interesantes ya que evidenciaron un cambio estructural de los NGs P(VCL-co-ABC) al variar el pH, lo cual no es algo muy frecuente de encontrar en la literatura sobre el tema. Por otro lado, estos resultados estarían indicando una posible respuesta de los NGs al pH, motivando a continuar con la investigación de las propiedades físico-químicas de estos sistemas. Tal como se discutió en la introducción de este Capítulo, el desarrollo de nano-biomateriales sensibles, tanto con respuesta a la temperatura como al pH, resultan de un gran interés para su uso como agentes de liberación controlada de fármacos.

De este modo, estos NGs estarían representando una nueva clase de biomateriales inteligentes, basados en VCL y monómeros dendríticos, cuyas propiedades están determinadas por el grado de entrecruzamiento, el tipo y la cantidad de comonomero dendrítico.

Se pueden destacar entre las potenciales aplicaciones, el área de la nanomedicina, sobre todo, para liberación controlada de fármacos, teniendo en cuenta la respuesta a la temperatura que mostraron y que los valores de las T_f pueden ser cercanas a la temperatura fisiológica del cuerpo humano.

El diseño *tylor-made* de estos NGs puede realizarse teniendo en cuenta las aplicaciones finales buscadas. Es importante destacar, los valores de temperatura de transición de fase alcanzados con algunos de los NGs, como el $P(VCL-co-ABC^{0,5})_{0,5}$ y el $P(VCL-co-ABC^{0,5})_2$, donde la temperatura fue superior pero cercana a la temperatura corporal, y siendo posible generar un cambio de fase del sistema y, por ende, una liberación más controlada de algún compuesto, por irradiación con luz infrarrojo focalizada. Resulta interesante en un futuro continuar con los estudios de estos NGs tan novedosos para este tipo de aplicación.

2. 6. Bibliografía

- [1] L. Etchenausia, E. Deniau, A. Brûlet, J. Forcada, M. Save, Cationic Thermoresponsive Poly(N-vinylcaprolactam) Microgels Synthesized by Emulsion Polymerization Using a Reactive Cationic Macro-RAFT Agent, *Macromolecules*, 51 (2018) 2551–2563.
- [2] J. Bergueiro, M. Calderón, Thermoresponsive nanodevices in biomedical applications, *Macromol. Biosci.*, 15 (2014) 183–199.
- [3] A. Bordat, T. Boissenot, J. Nicolas, N. Tsapis, Thermoresponsive polymer nanocarriers for biomedical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 138 (2019) 167–192.
- [4] J. Lutz, Thermo-Switchable Materials Prepared Using the OEGMA-Platform, *Adv. Mater.*, 23 (2011) 2237–2243.
- [5] M.A. Ward, T.K. Georgiou, Thermoresponsive polymers for biomedical applications, *Polymers (Basel)*, 3 (2011) 1215–1242.
- [6] B. Yang, C. Wang, Y. Zhang, L. Ye, Y. Qian, Y. Shu, J. Wang, J. Li, F. Yao, A thermoresponsive poly(N-vinylcaprolactam-co-sulfobetaine methacrylate) zwitterionic hydrogel exhibiting switchable anti-biofouling and cytocompatibility, *Polym. Chem.*, 6 (2015) 3431–3442.
- [7] J. Ramos, A. Imaz, J. Forcada, Temperature-sensitive nanogels: Poly(N-vinylcaprolactam) versus poly(N-isopropylacrylamide), *Polym. Chem.*, 3 (2012) 852–856.
- [8] A.E. Ekkelenkamp, M.R. Elzes, J.F.J. Engbersen, J.M.J. Paulusse, Responsive crosslinked polymer nanogels for imaging and therapeutics delivery, *J. Mater. Chem. B*, 6 (2018) 210–235.
- [9] M.N. Mohammed, K. Bin Yusoh, J.H.B.H. Shariffuddin, Poly(N-vinyl caprolactam) thermoresponsive polymer in novel drug delivery systems: A review, *Mater. Express*, 8 (2018) 21–34.
- [10] D. Roy, W.L.A. Brooks, B.S. Sumerlin, New directions in thermoresponsive polymers, *Chem. Soc. Rev.*, 42 (2013) 7214–7243.
- [11] S. Fujishige, K. Kubota, I. Ando, Phase transition of aqueous solutions of poly(N-isopropylacrylamide) and poly(N-isopropylmethacrylamide), *J. Phys. Chem.*, 93 (1989) 3311–3313.
- [12] J. Liu, A. Debuigne, C. Detrembleur, C. Jérôme, Poly(N-vinylcaprolactam): A Thermoresponsive Macromolecule with Promising Future in Biomedical Field, *Adv. Healthc. Mater.*, 3 (2014) 1941–1968.
- [13] C. Boutris, E.G. Chatzi, C. Kiparissides, Characterization of the LCST behaviour of aqueous poly(N-isopropylacrylamide) solutions by thermal and cloud point techniques, *Polymer (Guildf.)*, 38 (1997) 2567–2570.
- [14] H. Vihola, A. Laukkanen, L. Valtola, H. Tenhu, J. Hirvonen, Cytotoxicity of thermosensitive polymers poly(N-isopropylacrylamide), poly(N-vinylcaprolactam) and amphiphilically modified poly(N-vinylcaprolactam), *Biomaterials*, 26 (2005) 3055–3064.
- [15] L. Jun, W. Bochu, W. Yazhou, Thermo-sensitive polymers for controlled-release drug delivery systems, *Int. J. Pharmacol.*, 2 (2006) 513–519.
- [16] J. Imaz, Ainara, and Forcada, N-Vinylcaprolactam-Based Microgels for Biomedical Applications, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, 48 (2010) 1173–1181.
- [17] A. Balaceanu, V. Mayorga, W. Lin, M.P. Schürings, D.E. Demco, A. Böker, M.A. Winnik, A. Pich, Copolymer microgels by precipitation polymerisation of N-vinylcaprolactam and N-isopropylacrylamides in aqueous medium, *Colloid Polym. Sci.*, 291 (2013) 21–31.
- [18] A. Melle, A. Balaceanu, M. Kather, Y. Wu, E. Gau, W. Sun, X. Huang, X. Shi, M. Karperien, A. Pich, Stimuli-responsive poly(N-vinylcaprolactam-co-2-methoxyethyl acrylate) core-shell microgels: Facile synthesis, modulation of surface properties and controlled internalisation into cells, *J. Mater. Chem. B*, 4 (2016) 5127–5137.
- [19] S. Peng, C. Wu, Surfactant effect on pH and temperature sensitivities of poly(N-vinylcaprolactam-co-sodium acrylate) microgels, *Macromolecules*, 34 (2001) 568–571.

- [20] N.I. Shtanko, W. Lequeieu, E.J. Goethals, F.E. Du Prez, PH- and thermo-responsive properties of poly(N-vinylcaprolactam-co-acrylic acid) copolymers, *Polym. Int.*, 52 (2003) 1605–1610.
- [21] A.L. Sisson, R. Haag, Polyglycerol nanogels: Highly functional scaffolds for biomedical applications, *Soft Matter*, 6 (2010) 4968–4975.
- [22] G.N. RRimondino, E. Miceli, M. Molina, S. Wedepohl, S. Thierbach, E. Rühl, M. Strumia, M. Martinelli, M. Calderón, Rational design of dendritic thermoresponsive nanogels that undergo phase transition under endolysosomal conditions, *J. Mater. Chem. B*, 5 (2017) 866–874.
- [23] J.C. Cuggino, C.I. Alvarez I., M.C. Strumia, P. Welker, K. Licha, D. Steinhilber, R.C. Mutihac, M. Calderón, Thermosensitive nanogels based on dendritic polyglycerol and N-isopropylacrylamide for biomedical applications, *Soft Matter*, 7 (2011) 11259–11266.
- [24] S.D. García Schejtman, C.I.A. Igarzabal, M. Martinelli, Synthesis and characterization of novel dendritic macroporous monoliths, *Eur. Polym. J.*, 106 (2018) 102–111.
- [25] J.I. Paez, M. Martinelli, V. Brunetti, M.C. Strumia, Dendronization: A useful synthetic strategy to prepare multifunctional materials, *Polymers (Basel)*, 4 (2012) 355–395.
- [26] S.D. GGarcía Schejtman, R. Toselli, M.C. Strumia, M. Martinelli, Gelatin films dendronized selectively on one side: enhancing antimicrobial properties and water repellence, *Polym. Bull.*, 72 (2015) 3043–3062.
- [27] J.R. Casey, S. Grinstein, J. Orlowski, Sensors and regulators of intracellular pH, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 11 (2010) 50–61.
- [28] S. Nowag, R. Haag, PH-responsive micro- and nanocarrier systems, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 53 (2014) 49–51.
- [29] M.A. Pujana, L. Pérez-Álvarez, L.C.C. Iturbe, I. Katime, Water soluble folate-chitosan nanogels crosslinked by genipin, *Carbohydr. Polym.*, 101 (2014) 113–120.
- [30] A.W. Bosman, H.M. Janssen, E.W. Meijer, About Dendrimers: Structure, Physical Properties, and Applications, *Chem. Rev.*, 99 (1999) 1665–1688.
- [31] A.A. Aldana, B. Barrios, M. Strumia, S. Correa, M. Martinelli, Dendronization of chitosan films: Surface characterization and biological activity, *React. Funct. Polym.*, 100 (2016) 18–25.
- [32] L. Fernandez, M. Calderón, M. Martinelli, M. Strumia, H. Cerecetto, M. González, J.J. Silber, M. Santo, Evaluation of a new dendrimeric structure as prospective drugs carrier for intravenous administration of antichagasic active compounds, *J. Phys. Org. Chem.*, 21 (2008) 1079–1085.
- [33] G.N. Rimondino, M.C. Strumia, M. Martinelli, Synthesis and characterization of water-soluble dendronized chitosan using newkome-type dendrons, *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 2 (2014) 2582–2587.
- [34] F.A.L. Janssen, M. Kather, L.C. Kröger, A. Mhamdi, K. Leonhard, A. Pich, A. Mitsos, Synthesis of Poly(N-vinylcaprolactam)-Based Microgels by Precipitation Polymerization: Process Modeling and Experimental Validation, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 56 (2017) 14545–14556.
- [35] Y. Wang, J. Zheng, Y. Tian, W. Yang, Acid degradable poly(vinylcaprolactam)-based nanogels with ketal linkages for drug delivery, *J. Mater. Chem. B*, 3 (2015) 5824–5832.
- [36] S.S. Cutié, P.B. Smith, D.E. Henton, T.L. Staples, C. Powell, Acrylic acid polymerization kinetics, *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, 35 (1997) 2029–2047.
- [37] W. V. Venner, G.J. Puts, P.L. Crouse, Influence of initiators on the sintering discolouration of PTFE, *J. Fluor. Chem.*, 217 (2019) 63–71.
- [38] S. Abele, F.Q. Nie, F. Foret, B. Paull, M. Macka, UV-LED photopolymerised monoliths, *Analyst*, 133 (2008) 864–866.
- [39] K. Zhang, Dental implant and prosthetic device preparation kit Patente, 2011.
- [40] X. Jiang, Y. Li, G. Lu, X. Huang, A novel poly(N-vinylcaprolactam)-based well-defined amphiphilic graft copolymer synthesized by successive RAFT and ATRP, *Polym. Chem.*, 4 (2013) 1402–1411.

- [41] N. Li, W. Zheng, Y. Shen, L. Qi, Y. Li, J. Qiao, F. Wang, Y. Chen, Preparation of a novel polymer monolith with functional polymer brushes by two-step atom-transfer radical polymerization for trypsin immobilization, *J. Sep. Sci.*, 37 (2014) 3411–3417.
- [42] Y. Mori, H. Kawaguchi, Impact of initiators in preparing magnetic polymer particles by miniemulsion polymerization, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 56 (2007) 246–254.
- [43] P. Petrov, E. Petrova, C.B. Tsvetanov, UV-assisted synthesis of super-macroporous polymer hydrogels, *Polymer (Guildf.)*, 50 (2009) 1118–1123.
- [44] J. Jakubiak, X. Allonas, J.P. Fouassier, A. Sionkowska, E. Andrzejewska, L.Å. Linden, J.F. Rabek, Camphorquinone-amines photoinitiating systems for the initiation of free radical polymerization, *Polymer (Guildf.)*, 44 (2003) 5219–5226.
- [45] M. Netopilip, M. Bohdanecw, V. Chytr, K. Ulbrich, Cloud point of poly(N-isopropylmethacrylamide) solutions in water: is it really a point?, *Macromol. Rapid Commun*, 111 (1997) 107–111.
- [46] A. Usanmaz, T. Özdemir, Ö. Polat, Solid state polymerization of N-vinylcaprolactam via gamma irradiation and characterization, *J. Macromol. Sci. Part A Pure Appl. Chem.*, 46 (2009) 597–606.
- [47] M. Prabakaran, J.J. Grailer, D. a. Steeber, S. Gong, Stimuli-responsive chitosan-graft-Poly(N-vinylcaprolactam) as a promising material for controlled hydrophobic drug delivery, *Macromol. Biosci.*, 8 (2008) 843–851.
- [48] A. Imaz, J. Forcada, N-Vinylcaprolactam-Based Microgels: Synthesis and Characterization, *J Polym Sci Part A Polym Chem*, 46 (2008) 2510–2524.
- [49] A. Imaz, J. Forcada, N-Vinylcaprolactam-Based Microgels: Effect of the Concentration and Type of Cross-linker, *J Polym Sci Part A Polym Chem*, 46 (2008) 2766–2775.
- [50] S. Bhattacharjee, DLS and zeta potential - What they are and what they are not?, *J. Control. Release*, 235 (2016) 337–351.
- [51] Malvern, M. Instruments, Dynamic Light Scattering : An Introduction in 30 Minutes, Tech. Note MRK656-01, (2011) 1–8. <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Dynamic+Light+Scattering+:+An+Introduction+in+30+Minutes#3>
- [52] W. Schärtl, *Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions*, Springer, Mainz, Germany, 2006.
- [53] Y. Chen, X. Zheng, X. Wang, C. Wang, Y. Ding, X. Jiang, Near-Infrared Emitting Gold Cluster – Poly(acrylic acid) Hybrid Nanogels, 3 (2014) 2013–2015.
- [54] Y.S. Lakshmi, P. Kumar, G. Kishore, C. Bhaskar, A.K. Kondapi, Triple combination MPT vaginal microbicide using curcumin and efavirenz loaded lactoferrin nanoparticles, *Sci. Rep.*, 6 (2016) 1–13.
- [55] F.F. Sahle, M. Giulbudagian, J. Bergueiro, J. Lademann, M. Calderón, Dendritic polyglycerol and N -isopropylacrylamide based thermoresponsive nanogels as smart carriers for controlled delivery of drugs through the hair follicle, *Nanoscale*, 9 (2017) 172–182.

Capítulo 3

Síntesis y Caracterización de nanogeles dendronizados a partir de polímeros de origen natural

3.1. Introducción

Entre los biomateriales nanotransportadores, los NGs derivados de polímeros naturales, específicamente quitosán (Ch) o gelatina (Gel), son fuentes eficientes, rentables y ecológicas.[1–5] Luego un control sobre sus propiedades, como la arquitectura y la funcionalidad, permitiría determinar sus potenciales aplicaciones.[6]

La nanoestructuración de polímeros naturales podría resultar en NGs con mayor relevancia para la biomedicina.[7–12] El Ch, sus derivados [13,14] y la Gel, se encuentran entre los biopolímeros más versátiles y más frecuentemente empleados en el desarrollo de biomateriales [15,16]. Estos polímeros se extraen de fuentes naturales, son biocompatibles, biodegradables y no tóxicos.[17,18] El Ch es un derivado de la quitina [19,20], que es el segundo polímero natural más ampliamente encontrado en la naturaleza. La fuente más común de quitina es el exoesqueleto de los crustáceos.

La Gel, por otro lado, se obtiene de la desnaturalización térmica o la degradación físicoquímica del colágeno [21,22]. Es el producto obtenido de la hidrólisis parcial del colágeno de la piel, tejido conectivo y huesos de animales. La Gel obtenida a partir de un tejido precursor por tratamiento ácido es conocida como Tipo A y la obtenida por tratamiento básico es conocida como Tipo B.[23] Esto conlleva a que cada una (A o B) tenga composiciones distintas en su estructura primaria, es decir del tipo de aminoácidos que la conforman.[24]

Cabe señalar que, numerosos polímeros naturales no son capaces de formar hidrogeles, y en muchos casos, es necesario realizar modificaciones químicas apropiadas, como por ejemplo el entrecruzamiento del biopolímero para obtener hidrogeles con rendimientos y propiedades adecuadas.[11,25] En este sentido, el uso de ácido tánico (AT) como agente de reticulación con Ch [26] y Gel [27], podría ser una alternativa para lograr polímeros con mejores

propiedades.[21] Es importante destacar que, el AT es un éster gálico de D-glucosa, una molécula natural conocida por sus propiedades hemostáticas y antibacterianas, empleadas en el tratamiento de quemaduras y heridas.[26,28,29] Además, el AT es un polifenol con propiedades antioxidantes.

Por otro lado, la funcionalidad también juega un papel importante en la propiedad fisicoquímica final de los NGs. La arquitectura ramificada, multivalente y multifuncional de las estructuras dendríticas [30] se puede combinar con NGs para mejorar sus aplicaciones.[31–37] El uso del proceso de dendronización para funcionalizar microesferas y películas de Ch y Gel han sido reportados por nuestro grupo de investigación, demostrando la capacidad de mejorar y controlar las propiedades mecánicas y físicoquímicas del material final. El efecto dendrítico fue evidenciado tanto en el comportamiento fisicoquímico, como en la interacción con otras moléculas y con iones metálicos.[38–43] La biocompatibilidad y la no toxicidad, entre otras propiedades, han hecho que los dendrones tipo Newkome sean candidatos viables, como agentes de dendronización, para la preparación de materiales con potencial biomédico.[44,45]

Teniendo en cuenta la fundamentación previa, para esta parte del trabajo se propuso el diseño de NGs nanoestructurados, a partir de la combinación de los biopolímeros Gel y Ch con una estructura dendrítica. Los NGs se prepararon entrecruzando las redes con AT, seguido de una reacción de dendronización con el dendrón Weisisocianato (Weis). Los NGs se prepararon por nanoemulsión inversa [46,47], de acuerdo a la descripción que se presenta en la parte experimental de este capítulo.

La estrategia de modificar NGs basados en polímeros naturales utilizando estructuras dendríticas, es una forma particularmente novedosa e interesante de sintetizar biomateriales altamente funcionalizados y no convencionales, de interés potencial para diferentes aplicaciones, por ejemplo como *nanocarriers*.

3.2. Objetivos específicos

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente mencionado, dándole especial importancia al uso de materiales de origen natural para la obtención de biomateriales, se plantearon como objetivos específicos de esta parte:

- Sintetizar y caracterizar nanogeles por nanoemulsión inversa asistida por ultra sonicación, a partir de Gel o Ch y ácido tánico (AT) como agente entrecruzante.
- Funcionalizar los nanogeles sintetizados utilizando un dendrón comercial (Weisisocianato).
- Modificar las características hidrofílicas de los nanogeles por hidrólisis de los grupos *ter*-butilo terminales de los dendrones.

3. 3. Parte experimental

3. 3. 1. Síntesis de los NGs

En primer lugar, se prepararon soluciones de AT, Ch y Gel. Para el agente entrecruzante se prepararon soluciones de diferente concentración, a saber 0,3, 0,6 y 0,9% p/p, en buffer carbonato/bicarbonato ($\text{Na}_2\text{CO}_3 / \text{HNaCO}_3$) 1 M de pH 9,0. A cada una de las soluciones se burbujeó oxígeno durante 1 hora para la oxidación de los grupos fenólicos.

Por otro lado, se prepararon soluciones al 3% p/p de Gel tipo A, Gel tipo B y Ch. La solución de Ch se preparó en ácido acético al 10% a temperatura ambiente y, las de Gel en agua destilada a 60°C para lograr la disolución total del polímero.

La síntesis de los NGs se llevó a cabo empleando nanoemulsión inversa, metodología ampliamente descrita y estudiada en la literatura [48], la cual consiste en dos fluidos inmiscibles, uno disperso en el otro, formando coloides metaestables llamados emulsiones o mini-emulsiones, de acuerdo con el diámetro coloidal. La diferencia entre los sistemas de polimerización en emulsión inversa (también llamada emulsión de agua en aceite) respecto a los sistemas en emulsión directa (emulsión de aceite en agua), es que en el primer caso el monómero se disuelve en la fase acuosa dispersa. Los tensioactivos se agregan en una emulsión inversa para proporcionar estabilidad coloidal al sistema.[49]

Para la obtención de estos NGs, se ensayaron distintos tipos y cantidades relativas de surfactantes y se optimizaron los tiempos de sonicado de cada etapa, hasta lograr efectivamente la formación de una nanoemulsión que demostrara ser estable en el tiempo.

Los surfactantes seleccionados fueron monooleato de polioxietilensorbitano (Span 80), monolaurato de polioxietilensorbitano (Tween 20) y dioctil sulfosuccinato de sodio (AOT). Luego de probar los distintos surfactantes en distintas cantidades se continuó trabajando con AOT.

Una vez optimizadas las variables anteriormente mencionadas, se procedió a la síntesis de los distintos sistemas basados en Ch y Gel como se detalla a continuación, variando el porcentaje de entrecruzante, el tipo de Gel y la relación entre las distintas fases en la emulsión.

En primera instancia, la formación de pre-emulsiones fue necesaria para cada componente, es decir el biopolímero y el entrecruzante. Para la formación de micelas y la estabilización de las nanogotas de agua dispersas en la fase orgánica (FO), se preparó una solución 0,02 M del tensioactivo AOT en ciclohexano, solvente que forma la FO en estas emulsiones.

Igual cantidad de solución del surfactante se añadieron gota a gota a la solución de AT (correspondiente al grado de entrecruzamiento deseado) y a la solución de biopolímero, con agitación vigorosa constante (mezcla inicial) hasta obtener relaciones de FO:Fase acuosa (FA) 90:10 o 80:20, según corresponda, como se presenta en la Tabla 3-1. Luego, cada mezcla inicial se agitó mecánicamente durante 1 hora a 1200 rpm hasta formar una pre-emulsión. En el caso de la Gel (A y B), ambas fases y la pre-emulsión se mantuvieron a 60°C en todo momento para evitar la coagulación del material. Cada pre-emulsión se sonicó 3 veces durante 3 minutos con un ultrasonificador de punta, Omnic Ruptor 4000, al 70% de la potencia. Luego, ambas emulsiones (biopolímero y AT) se mezclaron y sonicaron nuevamente 3 veces durante 3 minutos (nanoemulsión). Una vez finalizado el tiempo de sonicado, la reacción de reticulación tuvo lugar a 60°C durante 12 h con agitación constante. En los sistemas de Ch y Gel A con relaciones de fase 90:10, se varió el grado de entrecruzamiento (10, 20 y 30% en peso respecto al biopolímero).

Una vez que se completó la síntesis, los NGs se precipitaron mediante la adición de 3,0 mL de acetona, lo que provocó la separación de ambas fases y permitiendo así la extracción del solvente orgánico. La FA se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos, se extrajo el sobrenadante y posteriormente, se procedió a resuspender el pelet en agua destilada y se centrifugó nuevamente. Este procedimiento se repitió 3 veces. Finalmente, el sedimento se congeló y se liofilizó hasta sequedad. Los NGs se identificaron de acuerdo con la nomenclatura que se muestra en la Tabla 3.1.

3. 3. 2. Dendronización de los NGs

Una vez que se obtuvieron los NGs de Ch y Gel entrecruzados con AT, se modificaron con un dendrón comercial tipo Newkome el di-t-butil-4- [2-(t-butoxicarbonil) etil] -4-isocianato-1,7-heptanodicarboxilato) llamado Weisisocianato (Weis). Para ello, se sometieron a reflujo 20,0 mg de cada NG, 26,5 mg de dendrón, 8 mL de DMF anhidra y 0,1 mL del catalizador (dilaurato de dibutilestaño) durante 8 h, en un sistema cerrado con una atmósfera inerte. Finalmente, el solvente se eliminó por evaporación a presión reducida a una temperatura de 70°C.

3. 3. 3. Hidrólisis de grupos *ter*-butilo

Para hidrolizar los grupos *ter*-butilo del dendrón a grupos terminales ácido, los NGs dendronizados se redisolviéron en 4,0 mL de ácido fórmico y se llevaron a 60°C con agitación constante durante 48 h. El ácido se evaporó a presión reducida y los NGs se volvieron a dispersar en agua destilada y se dializaron durante 5 días, renovando el agua cada 24 h y así eliminar los restos de dendrón sin reaccionar y el catalizador. La diálisis se realizó con una membrana de éster de celulosa con un límite de peso molecular de 50 kDa frente a agua destilada.

Se realizaron varias repeticiones de cada sistema para confirmar su reproducibilidad. Los NGs secos, antes y luego de dendronizar e hidrolizar, se caracterizaron por DLS, TGA y FT-IR, siguiendo los

procedimientos descritos anteriormente en la sección Materiales y Métodos.

3.4. Resultados y discusión

Las características principales, y también las más difíciles de lograr, que requiere un sistema nanoscópico para ser utilizado en nanomedicina, incluyen buena biocompatibilidad, baja citotoxicidad y óptima biodegradabilidad.[50,51] El uso de polímeros naturales, como Ch y Gel, puede asegurar esas características, por lo tanto, es un desafío particularmente interesante obtener NGs a partir de los mismos.[51,52] Como se discutió previamente, para obtener NGs a partir de polímeros naturales, es necesario el uso de agentes de entrecruzamiento, que permitan la formación de una red tridimensional con propiedades físico-químicas adecuadas. En este trabajo, se seleccionó como agente de reticulación AT, el cual posee propiedades antibacterianas [53,54], antioxidantes [53,55] mucoadhesivas [56] y antitumorales [57]. De este modo, los biopolímeros y AT, fueron combinados para la obtención de productos con alto valor agregado.

La eficiencia de la técnica de nanoemulsión inversa asistida por ultrasonido se ha establecido en diferentes estudios.[48,49] Esta metodología permite limitar el tamaño de los geles y obtener productos dentro del rango de tamaño deseado. Dos líquidos inmiscibles coexistentes componen el sistema, una fase acuosa (FA) y una fase orgánica (FO); la presencia de un surfactante es condición necesaria para la estabilidad del sistema e incluso, de este agente puede depender la efectividad de la técnica para obtener un material final con las características deseadas. Inicialmente, fue necesario evaluar el uso de distintos surfactantes y determinar el más eficiente para obtener NGs del tamaño deseado. La Figura 3.1. muestra las diferentes etapas en el procedimiento de síntesis por nanoemulsión inversa, de acuerdo a lo detallado en la parte experimental.

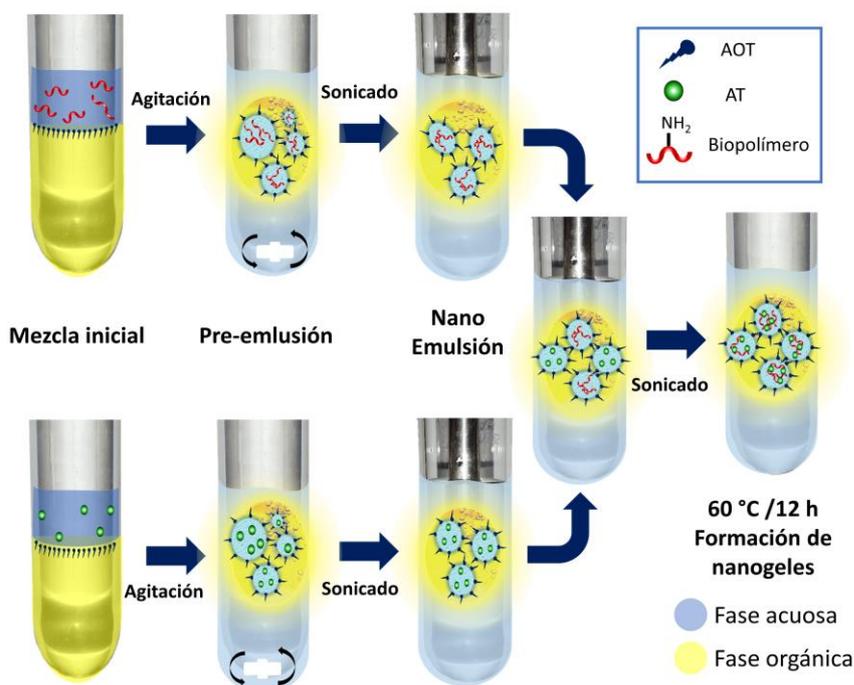


Figura 3.1. Esquema sintético para obtener NGs por nanoemulsión inversa.

Los surfactantes Tween 20, Span 80 y AOT son ampliamente utilizados para la obtención de emulsión inversa y por eso, fueron seleccionados para evaluar su eficiencia para esta síntesis en particular. Para Tween 20 y Span 80, se ensayaron diferentes cantidades, tiempos de sonicado y relación FA/FO, pero en todos los casos se obtuvieron geles de tamaño macroscópico por lo que fueron descartados, y se continuó avanzando con el trabajo utilizando AOT.

De este modo, se preparó una serie de NGs a partir de los biopolímeros (Ch o Gel) y AT como agente de reticulación, por nanoemulsión inversa y AOT como agente tensioactivo para controlar el tamaño y la distribución de partículas, Figura 3.2.

De acuerdo con la bibliografía y, teniendo en cuenta la reactividad de los grupos alcohol y amino, es posible realizar la reacción de reticulación entre un compuesto polifenólico (AT) y grupos amino de polipéptidos y polisacáridos, como Gel y Ch, en condiciones oxidativas a través de la formación de un intermediario derivado de la o-benzoquinona [27], Figura 3.2.

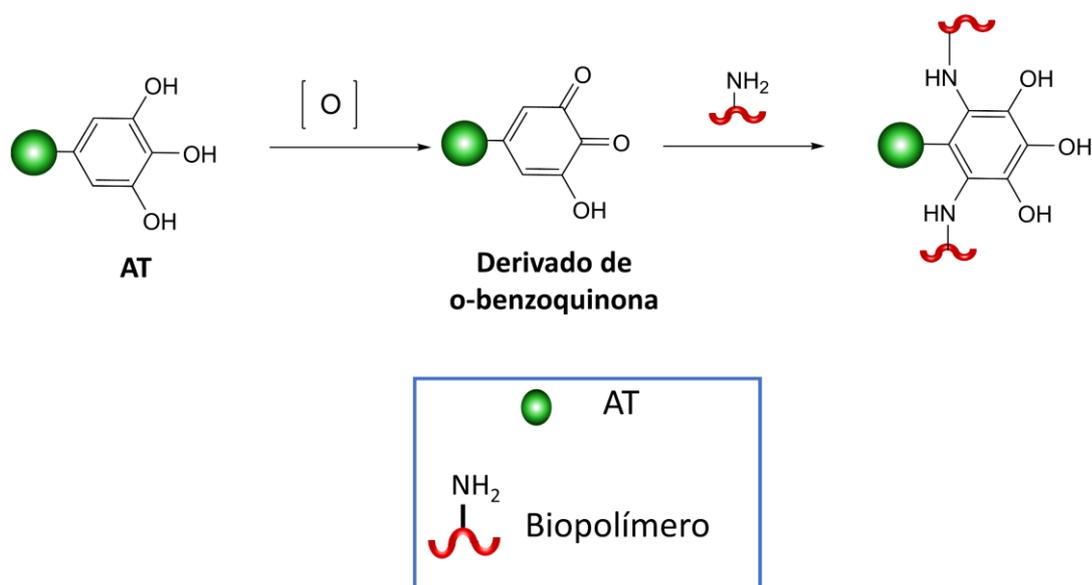


Figura 3.2. Reacción de reticulación entre AT y polímeros naturales (Gel o Ch).

La formación de estructuras moleculares rígidas por reacciones de ortoquinona derivadas de la oxidación de ácidos fenólicos es bien conocida. Un difenol se oxida fácilmente enzimáticamente o por oxígeno a una ortoquinona. La quinona forma un dímero en una reacción secundaria o reacciona con el grupo amino de las cadenas laterales del polímero (Gel o Ch) para formar enlaces C-N covalentes con el anillo fenólico, con regeneración de la hidroquinona. Esta hidroquinona se puede re-oxidar y unir a un segundo grupo amino, dando como resultado una reticulación. Alternativamente, dos quininas podrían dimerizarse produciendo otro tipo de entrecruzamiento.[58–61]

La reacción de reticulación se llevó a cabo a $60^{\circ}C$ con agitación constante. Los NGs se sintetizaron variando la cantidad de entrecruzante, la relación de FO y FA en la emulsión y el tipo de Gel. Se purificaron mediante lavado y centrifugación, obteniéndose en todos los casos un sólido. Para los NGs sintetizados a partir de Ch, el sólido obtenido fue tipo ceniza y para los de Gel tenía un aspecto tipo algodón de color amarronado.

Posteriormente, la combinación de las redes entrecruzadas con bloques de construcción dendríticos permitió incorporar multifuncionalidad a los NGs. Se empleó Weis, como agente de dendronización, una molécula con grupos éster *ter*-butilo en la periferia, susceptibles de ser hidrolizados a grupos ácido. Según el número y tipo de grupos funcionales en la periferia del dendrón, se puede controlar el balance hidrofílico-hidrofóbico de la

red. El grupo isocianato (punto focal del dendrón) puede reaccionar con el grupo amino o hidroxilo de la matriz polimérica (Ch o Gel), para formar un enlace tipo uretano o urea, respectivamente. Para llevar a cabo la reacción de dendronización, los NGs purificados y secos se resuspendieron en DMF anhidra en presencia de Weis. Posteriormente, los grupos éster de la periferia se hidrolizaron a ácido carboxílico (Weish), Figura 3.3. Los productos obtenidos se nombraron según el biopolímero (Ch, Gela o GelB), el dendron (Weis o Weish) y el porcentaje de reticulante (superíndice 1, 2, 3): Ch-AT¹, Ch-AT², Ch-AT³, GelB-AT¹, Gela-AT¹, Gela-AT², Gela-AT³, Ch-AT²-Weis, Ch-AT²-Weish, Gela-AT²-Weis y Gela-AT²-Weish.

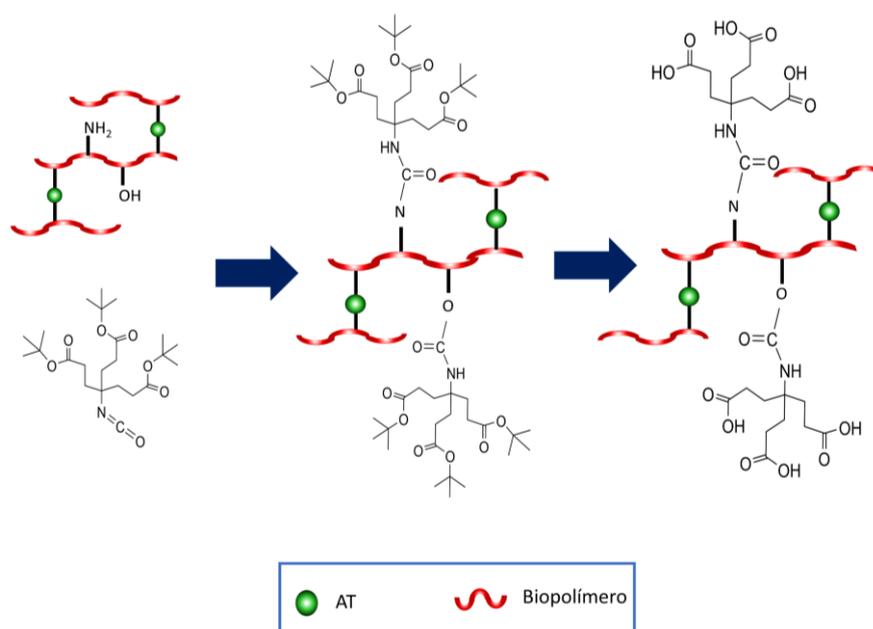


Figura 3.3. Reacción dendronización entre Weis y los polímeros naturales (Gel o Ch).

Para confirmar la reacción de reticulación y la dendronización de los NGs, se registraron los espectros infrarrojo de los compuestos puros, del dendrón, de los biopolímeros (Ch, Gel) y del agente entrecruzante AT (Figura 3.4), así como de los NGs dendronizados y no dendronizados (Figuras 3.5 y 3.6). El perfil de bandas de los espectros de los compuestos puros fue coincidente con los reportados en la literatura, como se detalla a continuación.

Tal como puede verse en la Figura 3.4, el espectro FT-IR del dendrón muestra la banda característica a 2251 cm^{-1} correspondiente al grupo isocianato ($\text{C}\equiv\text{N}$), la banda a 1715 cm^{-1} correspondiente al grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) y dos bandas a 850 y 760 cm^{-1} características de los grupos *ter*-butilo.

El espectro de Ch puro exhibe una amplia banda de absorción entre 3600 - 2500 cm^{-1} correspondiente a la superposición de la vibración de estiramiento de las bandas O-H, N-H y alifáticas C-H. También muestra la banda de amida I a 1633 cm^{-1} , la banda de amida II a 1553 cm^{-1} , la señal a 1153 cm^{-1} correspondiente la vibración de estiramiento de los enlaces C-O-C y las señales a 1070 y 1022 cm^{-1} correspondientes a los estiramientos C-O.[62]

Por su parte, el espectro de AT muestra una banda ancha entre 3600 y 3000 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del enlace O-H presente en los polifenoles. La banda a 1710 cm^{-1} se asignó a la vibración de estiramiento de los grupos $\text{C}=\text{O}$. Las otras bandas características a 1615 , 1535 y 1448 cm^{-1} se atribuyeron al estiramiento de los enlaces del resto aromático y la absorción a 1183 , 1088 y 1030 cm^{-1} correspondiente a la vibración de los anillos de benceno sustituido.[53]

Por otro lado, el espectro FT-IR de la Gel muestra las bandas características de la amida I a 1668 cm^{-1} debido al estiramiento del grupo $\text{C}=\text{O}$, junto con una contribución a la deformación de C-N y N-H. La banda de la amida II a 1555 cm^{-1} correspondiente al estiramiento de C-N y la deformación de N-H; la banda de la amida III a 1241 cm^{-1} y una banda ancha entre 3300 - 3400 cm^{-1} , correspondiente a la vibración del N-H de los grupos amino, superpuestos con la vibración del enlace O-H de los grupos hidroxilo.[63]

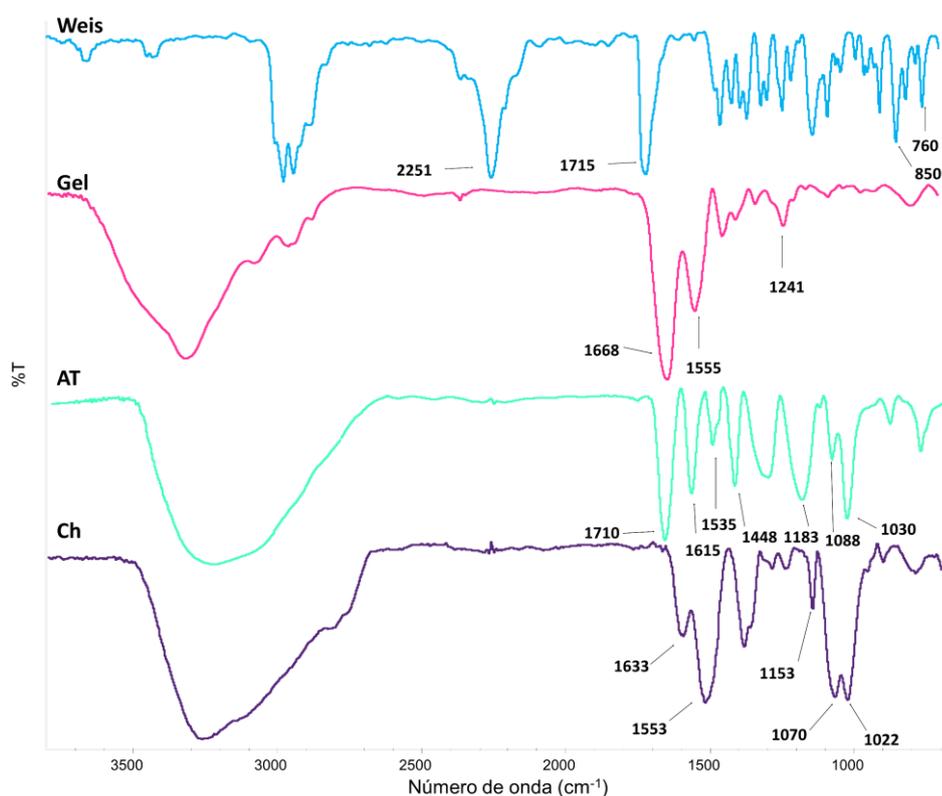


Figura 3.4. Espectro FT-IR de Weis, Gel, AT y Ch.

En el perfil de bandas de los NGs de Gel entrecruzados (Figura 3.5), además de las bandas características del biopolímero, se observan las dos bandas alrededor de 1038 y 1080 cm^{-1} correspondientes al estiramiento de C-O, evidenciando la presencia de AT. La intensidad relativa de la banda de amida III disminuye con la cantidad de reticulante, lo que indicaría que los grupos amino de la Gel participan en la reacción de entrecruzamiento.

En cuanto al espectro de los NGs de Ch entrecruzados con AT (Figura 3.6), el mismo muestra las bandas características correspondientes al biopolímero y al entrecruzante. Sin embargo, se pueden observar algunos cambios en la frecuencia y en la intensidad relativa de ciertas bandas. Es importante destacar la vibración de estiramiento correspondiente a los grupos C=O del AT a 1727 cm^{-1} , el cual se desplaza con respecto a la banda de AT sin reaccionar (1710 cm^{-1}). Además, la vibración de estiramiento a 1042 cm^{-1} correspondiente al enlace C-O muestra una mayor intensidad relativa. Los corrimientos en la frecuencia y las variaciones en la intensidad relativa de algunas señales particulares, evidenciarían la reacción de entrecruzamiento entre el AT y el Ch y la formación de un nuevo grupo éster.[53]

Posteriormente, para las reacciones de dendronización, se seleccionaron los NGs con un porcentaje de reticulación medio, es decir, GelA-AT² y Ch-AT², debido al compromiso entre la solubilidad de los NGs y su tamaño (como se discute más adelante). Al aumentar la cantidad de agente reticulante, aumenta la densidad de los grupos hidrofílicos y, en consecuencia, la hidrofiliidad del material también aumenta, generando un incremento en la solubilidad. Después de la dendronización, los espectros FT-IR de los NGs mostraron cambios significativos en las intensidades relativas de bandas específicas. Las Figuras 3.5. y 3.6. muestra los espectros correspondientes a los NGs Ch-AT²-Weis y GelA-AT²-Weis. Lo primero que se observa es una banda que corresponde a la superposición de la vibración del grupo carbonilo del éster o del enlace urea formado. Particularmente, para GelA-AT² y GelA-AT²-Weis, las bandas correspondientes a los grupos C=O del AT y del dendrón se solapan y este último se observa como un hombro. Finalmente, se observaron dos bandas a 850 y 760 cm⁻¹ correspondientes a los grupos *ter*-butilo del Weis. En el espectro de CH-AT²-Weis la señal a 760 cm⁻¹ se superpone con otras bandas, por lo que no puede ser claramente distinguida. Las bandas asignadas a los grupos *ter*-butilo desaparecen después de la hidrólisis de los grupos éster, sin embargo, el resto del perfil espectral permanece sin cambios (Figura 3.5 y 3.6).

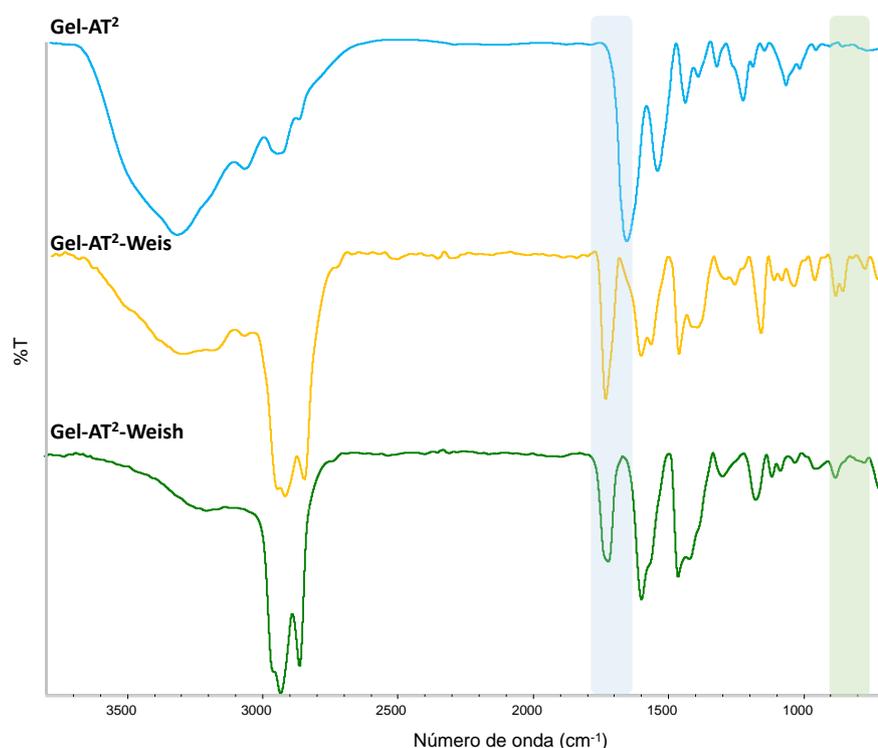


Figura 3.5. Espectro FT-IR de Gel-TA², Gel-TA²-Weis y Gel-TA²-Weish

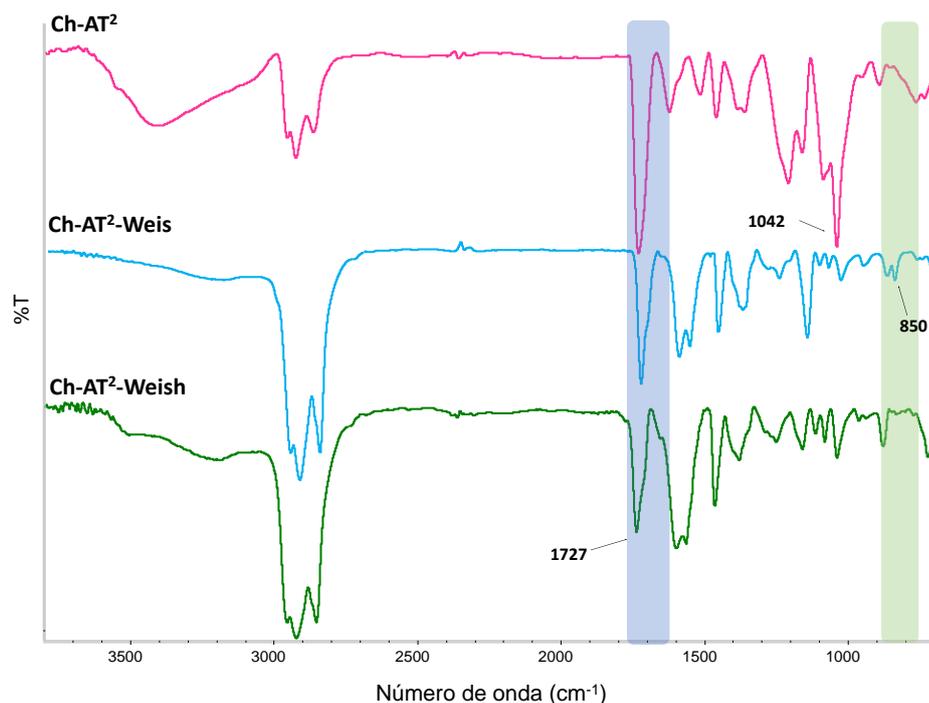


Figura 3.6. Espectro FT-IR de Ch-AT², Ch-AT²-Weis y Ch-AT²-Weish.

Para todos los NGs preparados se determinó el valor de diámetro hidrodinámico (D_h) y polidispersidad PDI por DLS y los resultados se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. D_h y PDI para cada NG sintetizado

NG	AT %	FO:FA (%)	D _h (nm)	PDI
Ch-AT ¹	10	80:20	565 ± 9	0,63
		90:10	349 ± 11	0,25
Ch-AT ²	20	90:10	573 ± 13	0,51
Ch-AT ³	30	90:10	615 ± 9	0,40
Ch-AT ² -Weis	20	90:10	493 ± 9	0,42
Ch-AT ² -Weish	20	90:10	393 ± 22	0,34
GelB-AT ¹	10	90:10	206 ± 19	0,62
GelA-AT ¹		80:20	303 ± 22	0,46
		90:10	180 ± 18	0,28
GelA-AT ²	20	90:10	272 ± 4	0,29
GelA-AT ³	30	90:10	304 ± 19	0,39
GelA-AT ² -Weis	20	90:10	253 ± 5	0,33
GelA-AT ² -Weish	20	90:10	120 ± 6	0,44

La mayoría de los sistemas se encuentran dentro de la escala nanométrica con valores de índice de polidispersidad (PDI) entre 0,2 y 0,5.

Para Ch y GelA se ensayaron dos relaciones FO:FA (90:10 y 80:20), observando menores valores de D_h y PDI cuando se empleó una relación 90:10, seleccionando esta condición para la preparación del resto de los NGs. Además, el valor de PDI fue notablemente menor para los NGs preparados a partir de Gel tipo A, por lo que se seleccionó GelA-AT para continuar trabajando.

En todos los casos, se observó un aumento en el valor de D_h de los NGs con un aumento del grado de entrecruzamiento. Esta relación entre el tamaño y el porcentaje de reticulación se atribuye a la complejidad estructural, al tamaño y a la gran hidrofiliidad del agente entrecruzante. La mayor hidrofiliidad de los NGs debido a la presencia de porcentajes más elevados de AT, permite la incorporación de más agua a la red, alcanzando un mayor índice de hinchamiento del material, de acuerdo a resultados que se discuten más adelante. Por otra parte, se obtuvieron mayores tamaños para los NGs sintetizados a partir de Ch. La complejidad estructural y la hidrofiliidad del AT y la capacidad del Ch para formar una mayor cantidad de entrecruzamiento, podrían explicar el mayor tamaño de sus NGs. La reacción de entrecruzamiento del Ch podría verse favorecida por la mayor cantidad de grupos amino e hidroxilo disponibles en la cadena en relación con la Gel.

Después de la dendronización, los NGs mostraron una reducción en el tamaño, lo que podría atribuirse a la hidrofobicidad de los grupos *ter*-butilo de la periferia, dificultando el ingreso de agua a la red. Los valores de D_h también se determinaron después de la hidrólisis de los grupos *ter*-butilo del dendrón, y se observó nuevamente una disminución de los mismos. Este comportamiento podría atribuirse a la formación de enlaces del tipo puente hidrógeno intramoleculares. En consecuencia, estos enlaces puente hidrógeno tienen una contribución hidrofóbica, generando que las interacciones polímero-polímero prevalezcan sobre las interacciones polímero-solvente. Este comportamiento ha sido ya reportado por nuestro grupo de investigación, cuando se estudió la incorporación de estructuras dendríticas en NGs basados en NIPAM, y se observó que los valores de D_h en solución acuosa determinados por DLS, disminuyen cuando la

periferia del dendrón posee grupos ácido protonados. Este comportamiento fue atribuido a la presencia de enlaces puente hidrógeno entre las cadenas del polímero, lo que fue corroborado por espectroscopía RAMAN.[45]

La misma tendencia en los valores de D_h se observó para todos los NGs dendronizados.

El comportamiento térmico de los reactivos y los NGs secos (dendronizados y no dendronizados) se investigó cualitativamente mediante medidas de TGA. El perfil de descomposición de los biopolímeros (Ch y GelA) mostró una pérdida de masa a 220 y 250 °C, respectivamente.[64–66] Por el contrario, el termograma del AT mostró dos pérdidas de masa entre 210 y 390 °C.[67] Todos los resultados obtenidos coinciden con los datos reportados en la literatura.

Los termogramas de los NGs mostraron perfiles similares a sus reactivos, entrecruzante y biopolímero correspondiente, en un rango de temperaturas entre 220 y 400 °C. Sin embargo, en todos los casos se observó una nueva pérdida de masa a temperaturas más bajas y este valor de temperatura aumenta con el aumento en el porcentaje de AT en el sistema. Esta dependencia de la temperatura con el porcentaje de entrecruzamiento podría indicar la incorporación creciente de AT, siendo esta diferencia de temperatura más significativa en los NGs de Gel.

El termograma del dendron Weish muestra dos pérdidas de masa significativas, a 313 y 368 °C. Los termogramas de los NGs dendronizados y no dendronizados son considerablemente diferentes. En ambos casos, Ch-AT²-Weish y GelA-AT²-Weish, se observan dos pérdidas de masa importantes, a 253 y 380 °C para el primero y, 253 y 477 °C para el segundo caso. Estas señales tan diferentes, permitirían afirmar que todo el dendrón que ha reaccionado se encuentra unido a la cadena polimérica.

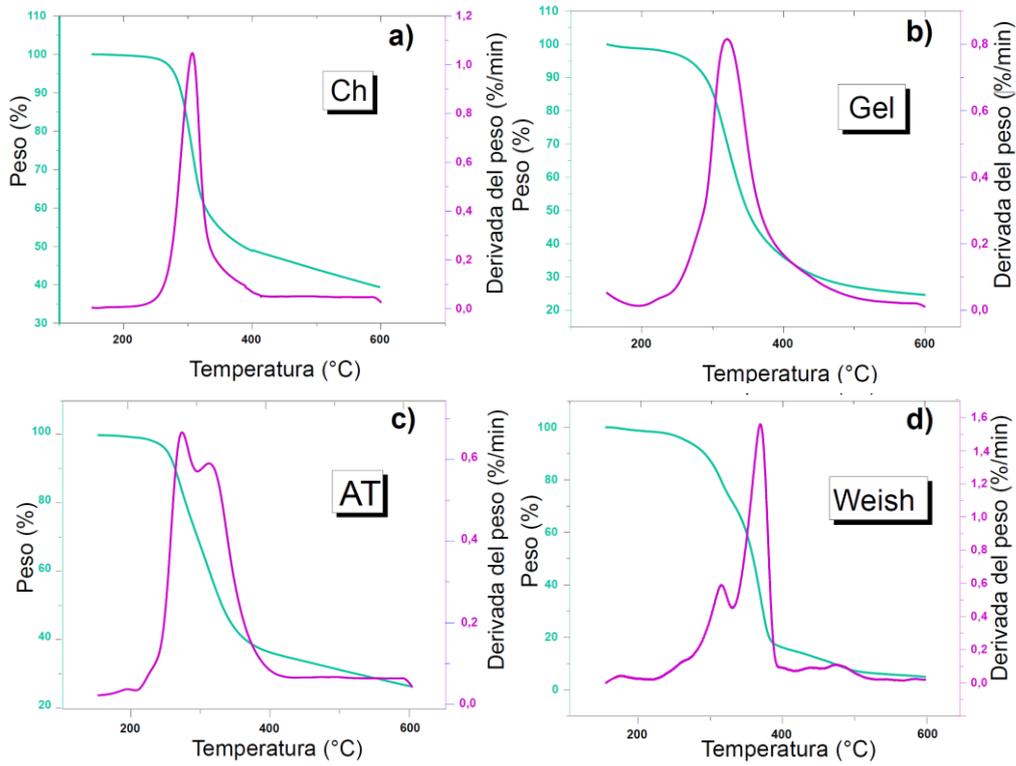


Figura 3.7. Curvas de TGA y DTG de a) Ch, b) Gel, c) AT y d) Weish.

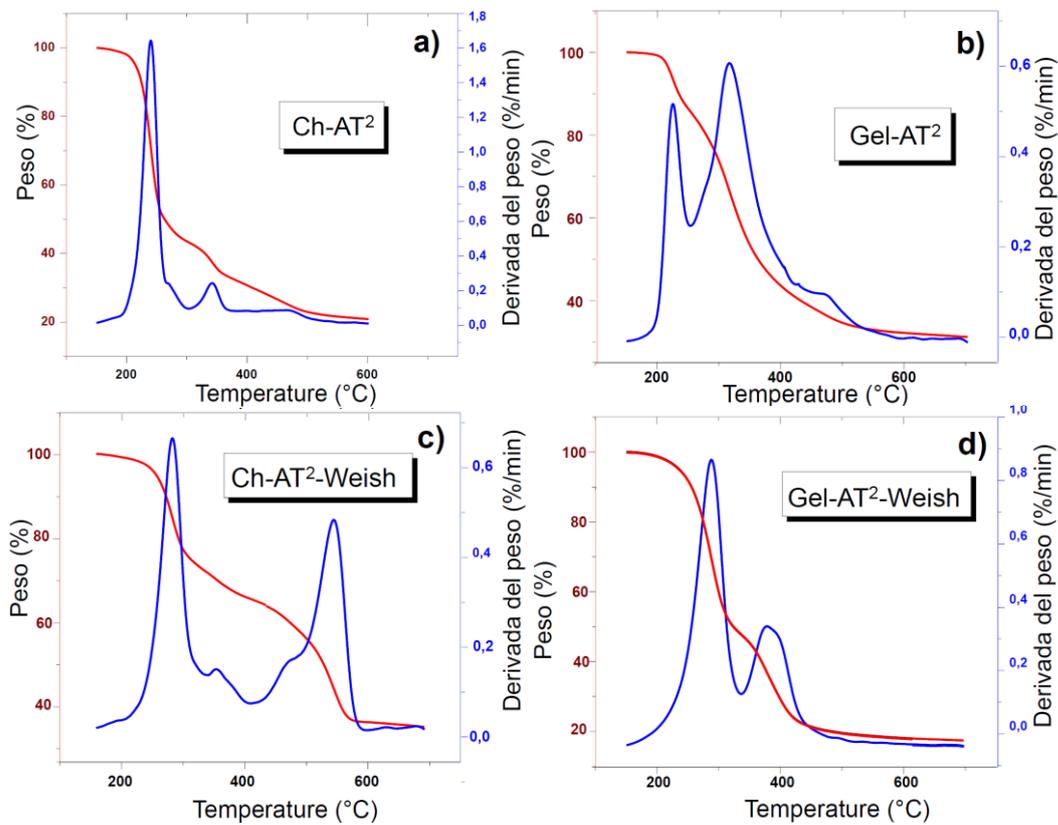


Figura 3.8. Curvas de TGA y DTG de a) Ch-AT², b) Ch-AT²-Weish, c) Gel-AT² y d) Gel-AT²-Weish.

3. 5. Conclusiones parciales

En esta parte del trabajo de Tesis, se sintetizaron y caracterizaron NGs basados en polímeros naturales dendronizados, para obtener materiales con un control estructural y funcional que permita manejar sus propiedades finales. Estos NG se prepararon mediante unión covalente entre el dendrón Weisisocianato (dendrón de tipo Newkome) y Ch o Gel en una red de reticulación con ácido tánico.

Como resultado de esta combinación, se obtuvieron NGs con baja polidispersidad, que mostraron un valor de D_h regulado por el porcentaje de reticulante y el carácter hidrofílico/hidrofóbico del dendrón. El diámetro hidrodinámico disminuyó después de la dendronización, evidenciando el carácter hidrofóbico de los dendrones. Para Weis, la hidrofobicidad se debe a la presencia de los grupos *ter*-butilo de la periferia mientras que, para Weish es consecuencia de la formación de uniones puente hidrógeno inter e intramoleculares entre los grupos ácido que impiden el ingreso de agua a la red. En ambos casos, el resultado final es la disminución del D_h determinado por DLS.

La estrategia de síntesis presentada en este Capítulo parece abrir una nueva ruta de materiales basados en Ch/Gel con considerable importancia en muchos campos sobre todo en el área de la biomedicina. Particularmente resultan sistemas interesantes para liberación controlada, debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, funcionalidad y sobre todo teniendo en cuenta que podrían ser suministradas por vías en las cuales se aproveche la capacidad de mucoadhesión característica del entrecruzante como, por ejemplo, para aplicaciones oculares o para vía nasal e incluso para piel.

3. 6. Bibliografía

- [1] N. Wen, S. Lü, X. Xu, P. Ning, Z. Wang, Z. Zhang, C. Gao, Y. Liu, M. Liu, A polysaccharide-based micelle-hydrogel synergistic therapy system for diabetes and vascular diabetes complications treatment, *Mater. Sci. Eng. C*, 100 (2019) 94–103.
- [2] S. Xu, H. Li, H. Ding, Z. Fan, P. Pi, J. Cheng, X. Wen, Allylated chitosan-poly(N-isopropylacrylamide) hydrogel based on a functionalized double network for controlled drug release, *Carbohydr. Polym.*, 214 (2019) 8–14.
- [3] R. Rakhshaei, H. Namazi, H. Hamishehkar, H.S. Kafil, R. Salehi, In situ synthesized chitosan–gelatin/ZnO nanocomposite scaffold with drug delivery properties: Higher antibacterial and lower cytotoxicity effects, *J. Appl. Polym. Sci.*, 136 (2019) 1–9.
- [4] R. Shanmuganathan, T.N.J.I. Edison, F. LewisOscar, P. Kumar, S. Shanmugam, A. Pugazhendhi, Chitosan nanopolymers: An overview of drug delivery against cancer, *Int. J. Biol. Macromol.*, 130 (2019) 727–736.
- [5] M. Winnacker, Polyamides and their functionalization: Recent concepts for their applications as biomaterials, *Biomater. Sci.*, 5 (2017) 1230–1235.
- [6] J.L. Mann, A.C. Yu, G. Agmon, E.A. Appel, Supramolecular polymeric biomaterials, *Biomater. Sci.*, 6 (2018) 10–37.
- [7] D. Dheer, D. Arora, S. Jaglan, R.K. Rawal, R. Shankar, Polysaccharides based nanomaterials for targeted anti-cancer drug delivery, *J. Drug Target.*, 25 (2017) 1–16.
- [8] K.S. Soni, S.S. Desale, T.K. Bronich, Nanogels: An overview of properties, biomedical applications and obstacles to clinical translation, *J. Control. Release*, 240 (2016) 109–126.
- [9] H. Zhang, Y. Zhai, J. Wang, G. Zhai, New progress and prospects: The application of nanogel in drug delivery, *Mater. Sci. Eng. C*, 60 (2016) 560–568.
- [10] R.T. Chacko, J. Ventura, J. Zhuang, S. Thayumanavan, Polymer nanogels: A versatile nanoscopic drug delivery platform, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 64 (2012) 836–851.
- [11] F. Alhaique, P. Matricardi, C. Di Meo, T. Coviello, E. Montanari, Polysaccharide-based self-assembling nanohydrogels: An overview on 25-years research on pullulan, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 30 (2015) 300–309.
- [12] H. Wang, J. Qian, F. Ding, Recent advances in engineered chitosan-based nanogels for biomedical applications, *J. Mater. Chem. B*, 5 (2017) 6986–7007.
- [13] B. Fonseca-Santos, M. Chorilli, An overview of carboxymethyl derivatives of chitosan: Their use as biomaterials and drug delivery systems, *Mater. Sci. Eng. C*, 77 (2017) 1349–1362.
- [14] M. Hosseinejad, S.M. Jafari, Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan, *Int. J. Biol. Macromol.*, 85 (2016) 467–475.
- [15] E.H. Kim, G.D. Han, S.H. Noh, J.W. Kim, J.G. Lee, Y. Ito, T. Il Son, Photo-reactive natural polymer derivatives for medical application, *J. Ind. Eng. Chem.*, 54 (2017) 1–13.
- [16] H. Mittal, S.S. Ray, B.S. Kaith, J.K. Bhatia, Sukriti, J. Sharma, S.M. Alhassan, Recent progress in the structural modification of chitosan for applications in diversified biomedical fields, *Eur. Polym. J.*, 109 (2018) 402–434.
- [17] L. Cui, J. Jia, Y. Guo, Y. Liu, P. Zhu, Preparation and characterization of IPN hydrogels composed of chitosan and gelatin cross-linked by genipin, *Carbohydr. Polym.*, 99 (2014) 31–38.
- [18] F. Laffleur, B. Strasdat, Gelatin-based formulations for dermal application, *Eur. Polym. J.*, 118 (2019) 542–550.
- [19] R.A.A. Muzzarelli, J. Boudrant, D. Meyer, N. Manno, M. Demarchis, M.G. Paoletti, Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial, *Carbohydr. Polym.*, 87 (2012) 995–1012.
- [20] R.A.A. Muzzarelli, *Chitin Nanostructures in Living Organisms*, Springer Science, Ancona, 2010.
- [21] A. Sionkowska, B. Kaczmarek, K. Lewandowska, Modification of collagen and chitosan mixtures by the addition of tannic acid, *J. Mol. Liq.*, 199 (2014) 318–323.

- [22] M. Sarem, F. Moztafzadeh, M. Mozafari, How can genipin assist gelatin/carbohydrate chitosan scaffolds to act as replacements of load-bearing soft tissues?, *Carbohydr. Polym.*, 93 (2013) 635–643.
- [23] J. Ratanavaraporn, R. Rangkupan, H. Jeeratawatchai, S. Kanokpanont, S. Damrongsakkul, Influences of physical and chemical crosslinking techniques on electrospun type A and B gelatin fiber mats, *Int. J. Biol. Macromol.*, 47 (2010) 431–438.
- [24] S. Van Vlierberghe, E. Vanderleyden, P. Dubruel, F. De Vos, E. Schacht, Affinity study of novel gelatin cell carriers for fibronectin, *Macromol. Biosci.*, 9 (2009) 1105–1115.
- [25] A. Oryan, A. Kamali, A. Moshiri, H. Baharvand, H. Daemi, Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds, *Int. J. Biol. Macromol.*, 107 (2018) 678–688.
- [26] S. Rivero, M.A. García, A. Pinotti, Crosslinking capacity of tannic acid in plasticized chitosan films, *Carbohydr. Polym.*, 82 (2010) 270–276.
- [27] G. Strauss, S.M. Gibson, Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients, *Food Hydrocoll.*, 18 (2004) 81–89.
- [28] M. Violeta Ghica, M. Georgiana Albu, L. Popa, M. Leca, L. Brăzdaru, C. Cotruț, V. Trandafir, Drug delivery systems based on collagen-tannic acid matrices, *Rev. Roum. Chim.*, 54 (2009) 1103–1110.
- [29] N. Aelenei, M.I. Popa, O. Novac, G. Lisa, L. Balaita, Tannic acid incorporation in chitosan-based microparticles and in vitro controlled release, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 20 (2009) 1095–1102.
- [30] M. Yousefi, P. Orojzadeh, S.M. Jafari, Nanoencapsulation of food ingredients by dendrimers, *Biopolym. Nanostructures Food Encapsulation Purp.*, 1 (2019) 607–625.
- [31] M. Martinelli, M.C. Strumia, Multifunctional nanomaterials: Design, synthesis and application properties, *Molecules*, 22 (2017) 1–11.
- [32] G.R. Newkome, C.D. Shreiner, Poly(amidoamine), polypropylenimine, and related dendrimers and dendrons possessing different 1 → 2 branching motifs: An overview of the divergent procedures, *Polymer (Guildf.)*, 49 (2008) 1–173.
- [33] M. Calderón, M.A. Quadir, M. Strumia, R. Haag, Functional dendritic polymer architectures as stimuli-responsive nanocarriers, *Biochimie*, 92 (2010) 1242–1251.
- [34] S. Mignani, J. Rodrigues, H. Tomas, M. Zablocka, X. Shi, A.M. Caminade, J.P. Majoral, Dendrimers in combination with natural products and analogues as anti-cancer agents, *Chem. Soc. Rev.*, 47 (2018) 514–532.
- [35] A.M. Caminade, J.P. Majoral, Which dendrimer to attain the desired properties? Focus on phosphorhydrazone dendrimers, *Molecules*, 23 (2018) 1–12.
- [36] X. Lin, X. Huang, C. Zeng, W. Wang, C. Ding, J. Xu, Q. He, B. Guo, Poly(vinyl alcohol) hydrogels integrated with cuprous oxide–tannic acid submicroparticles for enhanced mechanical properties and synergetic antibiofouling, *J. Colloid Interface Sci.*, 535 (2019) 491–498.
- [37] S.G. Ding, L. Yu, L.H. Wang, L.D. Wang, Z.Q. Yu, Y.Z. You, Self-assembling Janus dendritic polymer for gene delivery with low cytotoxicity and high gene transfection efficiency, *J. Mater. Chem. B*, 4 (2016) 6462–6467.
- [38] G.N. Rimondino, M.C. Strumia, M. Martinelli, Synthesis and characterization of water-soluble dendronized chitosan using newkome-type dendrons, *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 2 (2014) 2582–2587.
- [39] A.A. Aldana, B. Barrios, M. Strumia, S. Correa, M. Martinelli, Dendronization of chitosan films: Surface characterization and biological activity, *React. Funct. Polym.*, 100 (2016) 18–25.
- [40] A.A. Aldana, R. Toselli, M.C. Strumia, M. Martinelli, Chitosan films modified selectively on one side with dendritic molecules, *J. Mater. Chem.*, 22 (2012) 22670–22677.
- [41] S.D. GGarcía Schejtman, R. Toselli, M.C. Strumia, M. Martinelli, Gelatin films dendronized selectively on one side: enhancing antimicrobial properties and water repellence, *Polym. Bull.*, 72 (2015) 3043–3062.
- [42] A.A. Aldana, M.C. Strumia, M. Martinelli, The Cooperative Effect in Dendronized Chitosan

- Microbeads, *Aust. J. Chem.*, 68 (2015) 1918–1925.
- [43] M.C. García, A.A. Aldana, L.I. Tártara, F. Alovero, M.C. Strumia, R.H. Manzo, M. Martinelli, A.F. Jimenez-Kairuz, Bioadhesive and biocompatible films as wound dressing materials based on a novel dendronized chitosan loaded with ciprofloxacin, *Carbohydr. Polym.*, 175 (2017) 75–86.
- [44] E.R. Gillies, J.M.J. Fréchet, Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery, *Drug Discov. Today*, 10 (2005) 35–43.
- [45] G.N. RRimondino, E. Miceli, M. Molina, S. Wedepohl, S. Thierbach, E. Rühl, M. Strumia, M. Martinelli, M. Calderón, Rational design of dendritic thermoresponsive nanogels that undergo phase transition under endolysosomal conditions, *J. Mater. Chem. B*, 5 (2017) 866–874.
- [46] Y. Sasaki, K. Akiyoshi, Nanogel engineering for new nanobiomaterials: From chaperoning engineering to biomedical applications, *Chem. Rec.*, 10 (2010) 366–376.
- [47] O.E. Rayo, D.Q. Guerrero, Nanogeles poliméricos: Una nueva alternativa para la administración de fármacos, *Rev. Mex. Ciencias Farm.*, 45 (2014) 17–38.
- [48] A. Ethirajan, K. Schoeller, A. Musyanovych, U. Ziener, K. Landfester, Synthesis and Optimization of Gelation Nanoparticles Using the Miniemulsion Process, *Biomacromolecules*, 9 (2008) 2383–2389.
- [49] I. Capek, On inverse miniemulsion polymerization of conventional water-soluble monomers, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 156 (2010) 35–61.
- [50] P. Sunny, D. Ray, P. Kumar, Characteristics of xanthan gum-based biodegradable superporous hydrogel, *Int. J. Biol. Macromol.*, 45 (2009) 364–371.
- [51] M. Artech Pujana, L. Pérez-Álvarez, L.C. Cesteros Iturbe, I. Katime, Biodegradable chitosan nanogels crosslinked with genipin, *Carbohydr. Polym.*, 94 (2013) 836–842.
- [52] M.N.V.R. Kumar, R.A.A. Muzzarelli, C. Muzzarelli, H. Sashiwa, A.J. Domb, Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives, *Chem. Rev.*, 104 (2004) 6017–6084.
- [53] N. Sahiner, S. Sagbas, N. Aktas, C. Silan, Inherently antioxidant and antimicrobial tannic acid release from poly(tannic acid) nanoparticles with controllable degradability, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 142 (2016) 334–343.
- [54] C. Robins, J.D. Brooker, The effects of *Acacia aneura* feeding on abomasal and intestinal structure and function in sheep, *Anim. Feed Sci. Technol.*, 121 (2005) 205–215.
- [55] E. Bouki, V.K. Dimitriadis, M. Kaloyianni, S. Dailianis, Antioxidant and pro-oxidant challenge of tannic acid in mussel hemocytes exposed to cadmium, *Mar. Environ. Res.*, 85 (2013) 13–20.
- [56] M. Shin, K. Kim, W. Shim, J.W. Yang, H. Lee, Tannic Acid as a Degradable Mucoadhesive Compound, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2 (2016) 687–696.
- [57] K.T. Chung, T.Y. Wong, C.I. Wei, Y.W. Huang, Y. Lin, Tannins and human health: A review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 38 (1998) 421–464.
- [58] Y. Chen, S. Jiang, Q. Chen, Q. Liu, B. Kong, Antioxidant activities and emulsifying properties of porcine plasma protein hydrolysates modified by oxidized tannic acid and oxidized chlorogenic acid, *Process Biochem.*, 79 (2019) 105–113.
- [59] I. Choi, S.E. Lee, Y. Chang, M. Lacroix, J. Han, Effect of oxidized phenolic compounds on cross-linking and properties of biodegradable active packaging film composed of turmeric and gelatin, *Lwt*, 93 (2018) 427–433.
- [60] M.D. Bhavsar, M.M. Amiji, Polymeric nano- and microparticle technologies for oral gene delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.*, 4 (2007) 197–213.
- [61] Y. Chen, A.E. Hagerman, Quantitative examination of oxidized polyphenol-protein complexes, *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 6061–6067.
- [62] J.D. Schiffman, C.L. Schauer, Cross-linking chitosan nanofibers, *Biomacromolecules*, 8 (2007) 594–601.
- [63] S. Fu, C. Wu, T. Wu, H. Yu, S. Yang, Y. Hu, Preparation and characterisation of Chlorogenic acid-gelatin: A type of biologically active film for coating preservation, *Food Chem.*, 221 (2017) 657–663.

- [64] M. Nieto-Suárez, M.A. López-Quintela, M. Lazzari, Preparation and characterization of crosslinked chitosan/gelatin scaffolds by ice segregation induced self-assembly, *Carbohydr. Polym.*, 141 (2016) 175–183.
- [65] C.H. Chen, F.Y. Wang, C.F. Mao, W.T. Liao, C.D. Hsieh, Studies of chitosan: II Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol)/gelatin ternary blend films, *Int. J. Biol. Macromol.*, 43 (2008) 37–42.
- [66] B. Sarker, D.G. Papageorgiou, R. Silva, T. Zehnder, F. Gul-E-Noor, M. Bertmer, J. Kaschta, K. Chrissafis, R. Detsch, A.R. Boccaccini, Fabrication of alginate-gelatin crosslinked hydrogel microcapsules and evaluation of the microstructure and physico-chemical properties, *J. Mater. Chem. B*, 2 (2014) 1470–1482.
- [67] J.L. Whittaker, S. Subianto, N.K. Dutta, N.R. Choudhury, Induced insolubility of electrospun poly(N-vinylcaprolactam) fibres through hydrogen bonding with Tannic acid, *Polymer (Guildf.)*, 87 (2016) 194–201.

Capítulo 4

Síntesis y Caracterización de nanogeles híbridos a partir materiales de origen natural y sintético

4. 1. Introducción

Como se mencionó en la introducción de la presente sección, una de las múltiples formas de clasificar a los NGs es según el tipo de materiales a partir de los cuales pueden ser sintetizados, dando lugar a la obtención de NGs naturales, sintéticos o a una combinación de ambos, denominando a estos últimos “nanogeles híbridos”.

Los bloques de construcción de origen natural, para el diseño de materiales biomédicos, suelen presentar numerosas ventajas, entre las que se pueden mencionar el bajo costo, la alta biocompatibilidad, la biodegradabilidad y la no toxicidad.[1–5] Cabe señalar que, numerosos compuestos de origen natural no son capaces de formar NGs; además, en muchos casos, el rendimiento de los NGs necesita una mejora significativa y, para ello, es necesario realizar diferentes modificaciones químicas, particularmente cuando se buscan materiales con propiedades específicas, tales como respuesta a estímulos. En algunos casos, debido a la complejidad estructural de las redes es difícil lograr un adecuado control sobre el tamaño y polidispersidad de los NGs.[6,7]

Por el contrario, existen numerosos bloques de construcción sintetizados específicamente para el desarrollo de materiales, empleando diversas técnicas de polimerización o reacciones de entrecruzamiento. Entre ellos pueden seleccionarse los más apropiados en búsqueda de ciertas aplicaciones específicas y, en algunos casos, tener un control preciso de las propiedades, tales como, una eficiente respuesta frente a estímulos del medio, un tamaño nanométrico y una baja polidispersidad.[8–12] No obstante, existen algunas desventajas, especialmente cuando se considera el costo de estos materiales o cuando se evalúa la citotoxicidad y en muchos casos, los resultados demuestran que no son viables para ser utilizados en el organismo humano.

Otro método de clasificación de NGs ya mencionado, depende del tipo de enlaces presentes, pudiendo ser del tipo químico covalente o físico. Los

materiales basados en enlaces no covalentes han atraído una atención considerable en diferentes campos, debido a sus características especiales, como son el autocurado, la memoria de forma y las propiedades de algunos de ellos de responder a ciertos estímulos, entre otras.[13–17] De hecho, los enlaces del tipo puente hidrógeno son interacciones no covalentes reversibles ideales para la preparación de redes supramoleculares, que combinan alta resistencia y excelente reversibilidad a través de sus enlaces.[18]

Los compuestos fenólicos (CF) como el ácido tánico (AT), el metil galato (MG), el ácido gálico (AG) y el ácido pirogálico (PG), tienen un gran potencial como agentes entrecruzantes para el diseño de redes supramoleculares, debido a su capacidad para formar interacciones hidrófobas, enlace puente hidrógeno y metal-ligando, Figura 4.1. Además, estos son compuestos de origen natural que ya han demostrado tener gran capacidad para actuar como agentes antioxidantes, antibacterianos,

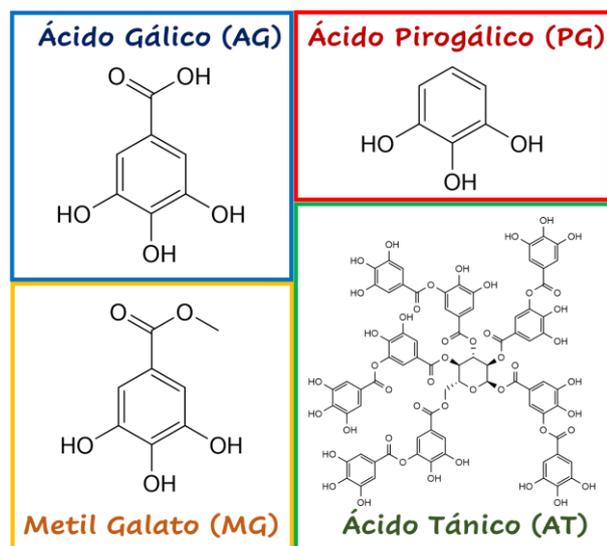


Figura 4.1. Estructura molecular de compuestos polifenólicos.

antimutagénicos, antitumorales entre muchas otras.[19–21] Sumado a todas estas características, estos compuestos son obtenidos de numerosas fuentes en la naturaleza, a partir de cortezas y raíces de frutos y plantas, y en menor medida en algunas hojas. Todo esto significa que su obtención no impacta en forma negativa en el medio ambiente.[22–24]

De acuerdo a todo lo expuesto, en este Capítulo se discute la obtención de distintos NGs obtenidos por la combinación de materiales sintéticos y de origen natural, utilizando en todos los casos CF como agentes de entrecruzamiento físico, a través de interacciones puente hidrógeno entre las cadenas de polímero y el compuesto fenólico.

4. 2. Objetivos específicos

En búsqueda de materiales novedosos, donde se establezca un sinergismo entre las propiedades aportadas por los diferentes bloques de construcción, de origen natural y sintético, y se logre un material con versatilidad en las propiedades fisicoquímicas, se plantearon en esta parte de este trabajo de Tesis los siguientes objetivos específicos:

- Sintetizar y caracterizar NGs híbridos por nanoemulsión inversa asistida por ultra sonicación, a partir de polivinil alcohol (PVA) utilizando distintos polifenoles como entrecruzantes.
- Sintetizar y caracterizar NGs híbridos, a partir del entrecruzamiento físico con AT de polímeros de injerto de gelatina (Gel) y p(vinilcaprolactama) (VCL).

Parte de los estudios presentados en este capítulo fueron realizados en colaboración con el instituto INTEC de la Universidad Nacional del Litoral provincia de Santa Fe, y particularmente con la Dra. Ludmila Ronco y el Dr. Matías Picchio.

4. 3. NGs obtenidos a partir de polivinilalcohol y polifenoles

4. 3. 1. Parte experimental

Se llevó a cabo la síntesis de los NGs utilizando la técnica de nanoemulsión inversa asistida por un ultrasonicador de punta, la cual ya fue descrita detalladamente en el Capítulo 3. Nuevamente, se utilizó ciclohexano como fase orgánica, agua destilada como fase acuosa y AOT como surfactante.

Se analizaron cuatro variables diferentes, cantidad de surfactante, relación de FA:FO, tipo de enfriamiento e identidad del polifenol a utilizar como agente entrecruzante.

Para comenzar se disolvieron en 1,0 mL de agua destilada (FA) a 90 °C 50 mg de PVA (98%) y 50 % p/p respecto al polímero del entrecruzante correspondiente. Por otro lado, se realizaron diferentes soluciones de AOT en 9,0 mL de tolueno (FO) y se calentaron a 90 °C.

Una vez disuelto completamente el PVA en el agua destilada (1 hora aproximadamente) ambas fases (FO y FA) se mezclaron y se llevaron a un sonicador de punta en un baño a 90 °C, para evitar la precipitación del PVA y con agitación constante. Esta mezcla fue sonicada en tres etapas, por 3 minutos cada vez. Una vez finalizado el sonicado, se procedió a dejar enfriar la mezcla, manteniendo agitación vigorosa constante hasta llegar a temperatura ambiente, en algunos casos, o con ayuda de un baño de hielo en otros (Tabla 4.1.).

Una vez que se completó la síntesis, los NGs se precipitaron por centrifugado de la emulsión a 10000 rpm durante 10 minutos, luego de lo cual se extrajo la FO y el sobrenadante acuoso y posteriormente, se procedió a resuspender el *pellet* en agua destilada y se centrifugó nuevamente. Este proceso se repitió 3 veces.

Se realizaron varias repeticiones de cada sistema para confirmar su reproducibilidad y fueron caracterizados por FT-IR y DLS.

Tabla 4.1. Condiciones experimentales para la síntesis de cada NG.

NG	Entrecruzante	AOT (mg)	Emulsión (FA:FO)	Baño de hielo
AG 1	ácido gálico	90	20:80	×
AG 2		90	20:80	✓
AG 3		90	10:90	×
AG 4		90	10:90	✓
AG 5		100	10:90	×
AG 6		120	10:90	×
PG 1	ácido pirogálico	120	10:90	×
MG 1	metil galato	120	10:90	×

4. 3. 2. Resultados y discusión

Se comenzó abordando el primer objetivo planteado, la síntesis de NGs a partir de PVA utilizando distintos polifenoles como entrecruzantes.

El poli(vinilalcohol) se obtiene por hidrólisis de poli (acetato de vinilo), por lo que se pueden producir diferentes tipos de PVA dependiendo del grado de hidrólisis.[25] Es un polímero no tóxico, soluble en agua, que se produce y emplea ampliamente en la industria para la tecnología de biomateriales en las áreas farmacéutica y biomédica, debido a sus excelentes propiedades filmógenas, emulsionantes y de adhesión [25,26] y porque a pesar de su carácter sintético, es el único polímero cuya cadena principal está formada por uniones carbono-carbono, que es biodegradable tanto en condiciones aeróbicas [27] como anaeróbicas [28].[29]

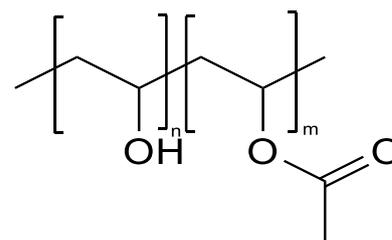


Figura 4.2. Estructura molecular del PVA.

De esta manera, la síntesis de materiales de tamaño nanométrico a partir de PVA y distintos polifenoles resulta interesante para el transporte de fármacos, proteínas u otros compuestos en el organismo humano, resultando un material biodegradable, no tóxico, de bajo costo y que, además, puede aportar los beneficios antes mencionados por los distintos agentes entrecruzantes.

Se procedió a determinar el tamaño y polidispersidad de los NGs. Para esto, se midió el diámetro hidrodinámico (Dh) y el índice de polidispersidad (PDI) por DLS. Los valores obtenidos para los diferentes NGs se detallan a continuación en la tabla 4.2.

Tabla 4.2. Valores obtenidos de Dh y PDI para cada NG obtenido sintetizado según condiciones detalladas en Tabla 4.1.

NG	Entrecruzante	Dh (nm)*	PDI
AG 1	Ácido gálico	236 ± 10	0,75
AG 2		368 ± 9	0,61
AG 3		288 ± 11	0,50
AG 4		307 ± 12	0,41
AG 5		341 ± 19	0,38
AG 6		166 ± 10	0,32
PG 1	Ácido pirogálico	370 ± 6	0,40
MG 1	Metil galato	418 ± 12	0,49

*Valores de Dh medidos a 25 °C en agua destilada.

En primera instancia se analizaron los valores de D_h y de PDI medidos por DLS para los NGs PVA-AG, con el objetivo de evaluar el efecto de las diferentes variables estudiadas y optimizar las condiciones de reacción para los NGs PVA-PG y PVA-MG. Por un lado, si bien la utilización de un baño de hielo posterior al sonicado (Tabla 4.1), para el enfriamiento de la miniemulsión inversa, disminuye la polidispersidad, los NGs obtenidos AG2 y AG4 son de mayor tamaño. Por otro lado, la relación de fases 90:10 da lugar a mejores valores de PDI con respecto a una relación 80:20, pero no muestra cambios significativos en los tamaños (D_h). Por otra parte, la cantidad de surfactante impactó tanto en los valores de D_h como de PDI, a mayor cantidad de surfactante (Tabla 4.1) se observaron menores tamaños (D_h) y valores de PDI.

La evaluación conjunta de todos los resultados obtenidos permitió determinar que las mejores condiciones para la síntesis de NGs por miniemulsión, teniendo en cuenta una posible aplicación biomédica, fueron las condiciones empleadas en la síntesis de NGs AG 6, sin baño de hielo, con 120 mg de surfactante y una relación de fase acuosa y fase orgánica de 10:90, ya que los NGs obtenidos bajo estas condiciones mostraron los valores más bajos de PDI y los menores tamaños.

Luego de haber optimizado las condiciones de síntesis, se procedió a la preparación de los NGs con PG y MG como agentes entrecruzantes. Los NGs obtenidos se caracterizaron por FT-IR obteniéndose los espectros detallados en las Figuras 4.3. y 4.4.

Para el PVA se realizaron dos espectros, uno con PVA sólido (Figura 4.3. a)) y otro con PVA disuelto en una mezcla etanol:agua 50:50 y luego llevado a sequedad (Figura. 4.3. b)). Las bandas características de PVA que se encuentran en literatura son principalmente la banda entre 3500 y 3300 cm^{-1} correspondiente a vibraciones de estiramiento del grupo funcional O-H, la banda entre 2900 y 3000 cm^{-1} debido al estiramiento $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$, una señal alrededor de los 1100 cm^{-1} correspondiente al estiramiento C-O, una señal alrededor de los 1400 cm^{-1} debido a la deformación en el plano del enlace O-H y una banda a 1700 cm^{-1} proveniente de los grupos carbonilo de los grupos acetato que quedaron sin hidrolizar en el polímero. Todas estas señales se pueden observar en ambos espectros, sin embargo, surgen algunas diferencias. Por un lado, se produce una disminución significativa del área de la banda

correspondiente a la vibración del grupo -OH en el espectro b) respecto a la misma señal en el espectro a), para el polímero en estado sólido, la banda es ancha mientras que, una vez disuelto esta es aguda y con mayor intensidad relativa. Además, la señal del grupo carbonilo se desplaza de 1706 a 1725 cm^{-1} . Todas las variaciones observadas se deben a interacciones físicas intramoleculares del tipo puente hidrógeno.[25]

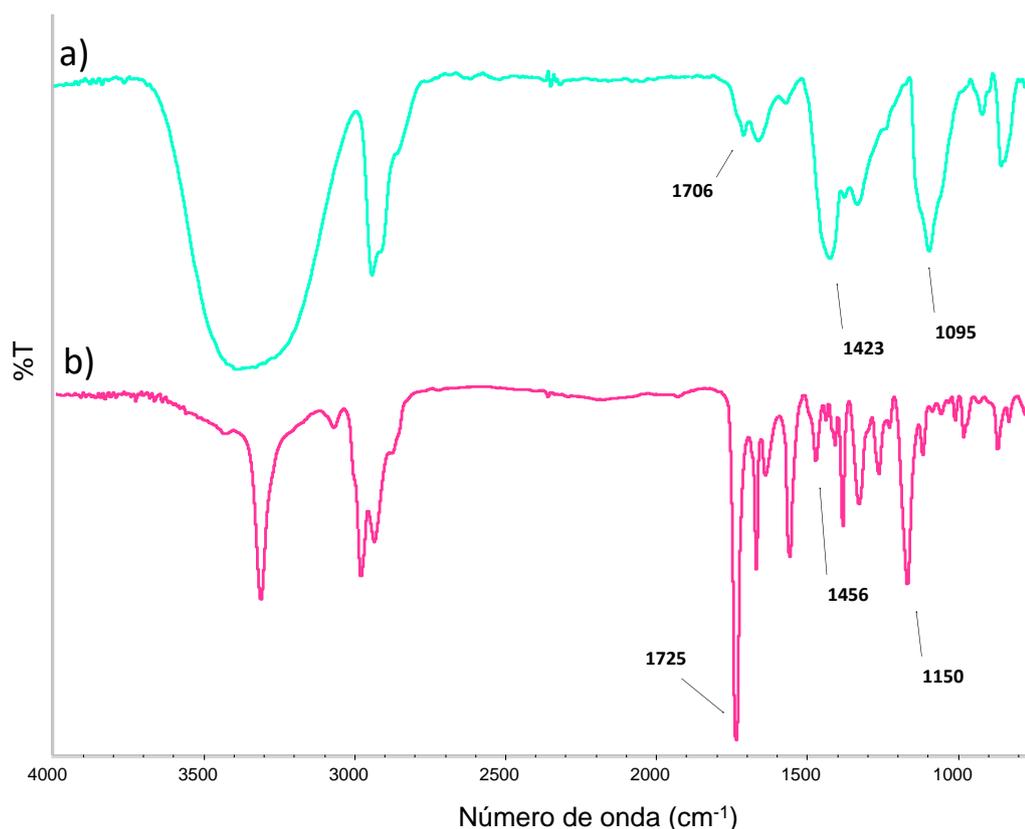


Figura 4.3. Espectros de FT-IR de A) PVA sólido y B) PVA disuelto en una mezcla etanol:agua 50:50 y luego llevado a sequedad.

Por otro lado, los espectros de los polifenoles (Figura 4.4) mostraron una banda ancha entre 3100 y 3500 cm^{-1} proveniente de los grupos OH y las bandas entre 1240 y 1617 cm^{-1} , que corresponden a vibraciones de enlaces C-C en el anillo aromático principalmente. Además, MG mostró señales entre 2900 y 3000 cm^{-1} debido a estiramiento $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ y una señal a 1687 cm^{-1} que se atribuye al grupo C=O del éster y AG una señal a 1707 cm^{-1} correspondiente al grupo carbonilo del ácido carboxílico.[30–32]

Al analizar los espectros obtenidos de los NGs de PVA entrecruzados con los polifenoles (Figura 4.4), en todos los casos se observa, por un lado, una clara disminución de la intensidad relativa de la banda entre 3500 y 3300 cm^{-1} de los grupos hidroxilo con respecto a la banda entre 2900 y 3100 cm^{-1} proveniente del estiramiento $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$, a pesar de que los polifenoles aportan grupos OH al material. Esto estaría indicando que los grupos OH están participando en el entrecruzamiento de la red de los NGs. Además, la señal proveniente del grupo carbonilo aportada por el polifenol y/o el PVA, sufre un corrimiento en todos los casos a mayores números de onda, de 1731, 1730 y 1732 cm^{-1} para los NGs de GA, PC y MG, respectivamente. Esto último, es un comportamiento típicamente observado en sistemas donde los grupos carbonilo participan de enlaces del tipo puente hidrógeno. Todas estas evidencias confirmarían un entrecruzamiento del tipo físico a través de enlaces puente hidrógeno, en los que participan tanto los grupos OH como los grupos $\text{C}=\text{O}$ del polímero y el polifenol correspondiente.[18]

Como puede observarse, los espectros FT-IR permitieron confirmar la presencia del polifenol como en los materiales actuando como un entrecruzante por interacciones físicas. Además, los valores de D_h demuestran que en todos los casos se obtuvieron sistemas dentro de la escala nanométrica, aunque en algunos casos el índice de polidispersidad fue algo elevado, principalmente para los sistemas MG 1 y PG 1. Si bien es posible continuar la búsqueda de las mejores condiciones para optimizar los valores de PDI, se observó que luego de liofilizar, probablemente dada la fuerte interacción polímero-polímero, los NGs se aglomeran formando un macrogel no redispersable. Por ello, y a pesar de todos los esfuerzos realizados, se vio desalentada la continuidad de estudios y caracterización posteriores para estos NGs.

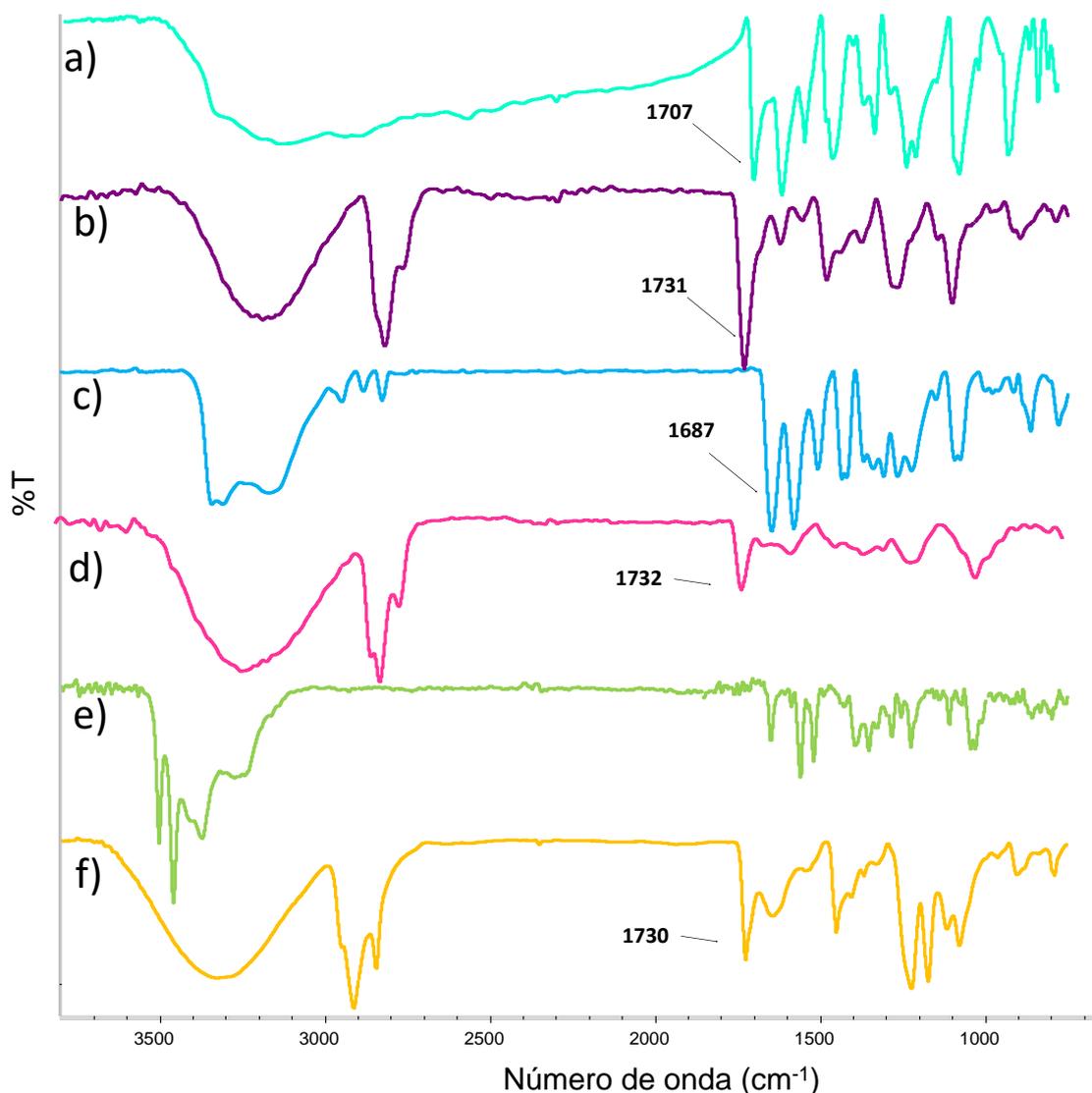


Figura 4.4. Espectros de FT-IR de a) AG, b) PVA-GA, c) MG, d) PVA-MG, e) PG y f) PVA-PG.

4. 4. NGs de Gelatina injertados con VCL y entrecruzados con AT

4. 4. 1. Parte experimental

Se prepararon una serie de NGs con distinto grado de entrecruzamiento a partir de un copolímero de Gelatina injertado con VCL (Gel-PVCL) y AT como agente entrecruzante. Para esto, en 2,8 mL de agua grado mili-Q se colocaron 30 mg del copolímero Gel-VCL y 3,0 mg del surfactante Tween 20 y se llevaron a 50 °C, con agitación mecánica constante durante 5 horas. Luego, se procedió a gotear lentamente sobre la mezcla 0,2 mL de una solución de AT con una concentración proporcional al grado de entrecruzamiento deseado desde 0,025 a 0,15 mg de AT por mg de Gel-

PVCL (Tabla 4.3.). Esta nueva mezcla permaneció a 50°C durante 8 horas y luego, siempre con agitación constante, se dejó enfriar hasta llegar a temperatura ambiente.

Una vez obtenidos los NGs, para eliminar los restos de AT y tensioactivo, se purificaron por diálisis empleando una membrana con un límite de peso molecular de 50 kDa, contra agua destilada durante una semana y renovando periódicamente el medio.

Una vez purificados los NGs, se cuantificó la cantidad de entrecruzante en los materiales por espectrofotometría UV-Visible, previa curva de calibración de AT en agua destilada.

Se realizaron varias repeticiones de cada sistema para confirmar su reproducibilidad y fueron caracterizados por DLS, UV y FT-IR siguiendo la metodología descrita anteriormente en la sección Materiales y Métodos.

4. 4. 2. Resultados y discusión

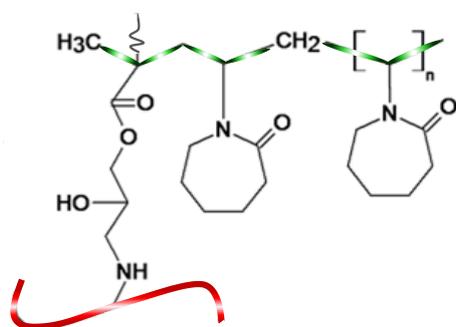


Figura 4.5. Representación esquemática del polímero injertado.

Gracias al conocimiento adquirido a lo largo de esta Tesis sobre gelatina, VCL y polifenoles, surge esta colaboración en la cual se llevó a cabo el entrecruzamiento físico con AT de un polímero a base de gelatina injertada con cadenas de un polímero termosensible, P(VCL). Dicho polímero fue sintetizado en el instituto INTEC en la Universidad Nacional del Litoral en la ciudad de Santa Fe en una relación de gelatina y VCL 50:50.[33]

Existen en literatura antecedentes de entrecruzamiento físico con AT tanto de gelatina [34,35] como de homopolímeros de P(VCL) [36,37], a través de enlaces del tipo puente hidrógeno. Por lo tanto, es viable emplear el polifenol AT para entrecruzar la red de un copolímero sintetizado a partir de ambos bloques.

Como se mencionó anteriormente, el polímero P(VCL) es termosensible, es decir, responde frente a variaciones de temperatura del medio, cambiando bruscamente su hinchabilidad en agua. Es decir, el material posee características hidrofóbicas al superar la T_f . Por esta razón, el copolímero injertado Gel-PVCL por debajo del valor de T_f de P(VCL), se encuentra como una cadena polimérica simple de gelatina con cadenas pendientes de un homopolímero de VCL. En cambio, a temperaturas superiores a la T_f , el material adquiere un carácter anfílico formando una especie de micela con un corazón rico en cadenas de PVCL hidrofóbicas y una coraza hidrofílica expuesta al medio de cadenas de gelatina (Figura 4.6.). Bajo estas condiciones, la presencia de puntos de entrecruzamiento permite que, al disminuir la temperatura por debajo de la T_f , la red sea estable, pudiendo el agua acceder al interior, produciendo un hinchamiento del material y obteniendo finalmente la estructura tipo NG deseada.

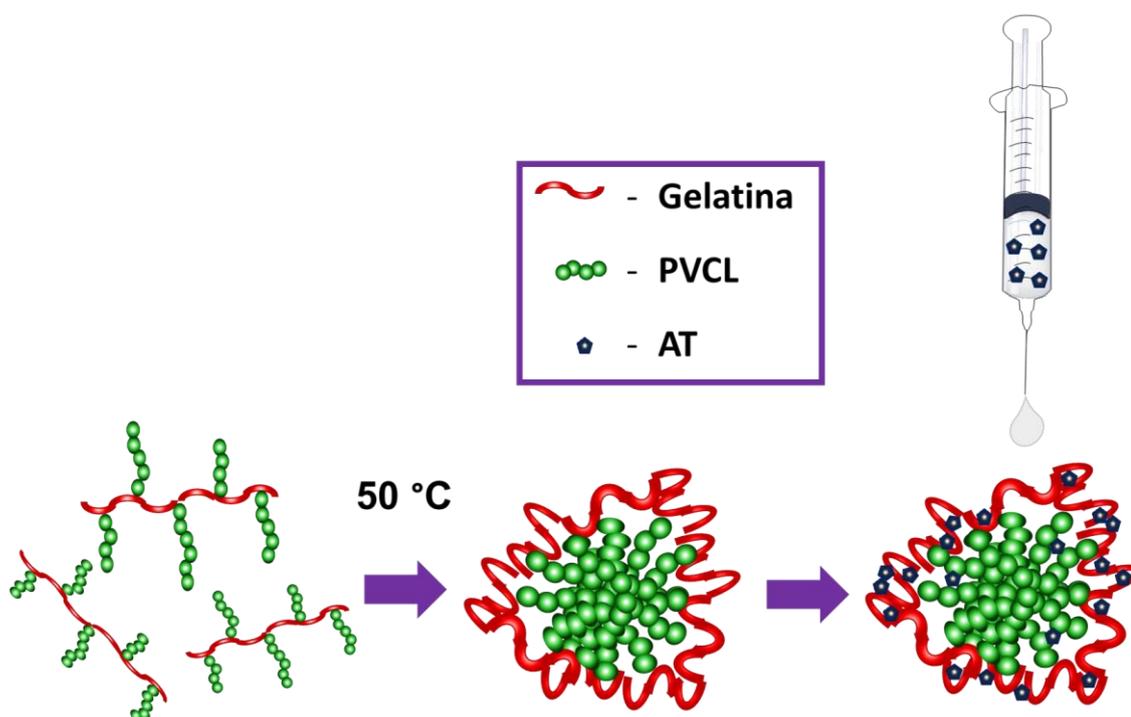


Figura 4.6. Esquema de reacción para la síntesis de NGs de gel-PVCL/AT.

Para confirmar la interacción física, tipo puente hidrógeno entre el polifenol y el polímero injertado, los NGs fueron caracterizados por FT-IR.

Las Figuras 4.7. y 4.8. muestran los espectros obtenidos a partir de los reactivos de partida, el polímero injertado sin entrecruzar y entrecruzado

(Figura 4.7.) y los NGs con distinto grado de entrecruzamiento (Figura 4.8.).

En cuanto a los espectros de los reactantes (Figura 4.7), los mismos ya fueron discutidos detalladamente en los Capítulos 2 y 3.

En cuanto a los espectros de Gel-PVCL sin y con entrecruzante, se observa que a medida que aumenta la cantidad de entrecruzante, el perfil de bandas comprendido entre los 1000 y 1500 cm^{-1} es más similar al perfil del espectro del AT puro en el mismo intervalo, el cual ya fue discutido en el Capítulo 3 de esta Tesis. Esto se debe al aumento en la cantidad de grupos fenólicos en la estructura polimérica, lo cual concuerda con lo esperado y confirma la incorporación del polifenol.

Por otro lado, se observa que a medida que aumenta la cantidad de AT se produce una fuerte disminución en la intensidad relativa de la banda ubicada entre 3000-3500 cm^{-1} , correspondiente al estiramiento de los enlaces O-H y N-H, con respecto a la banda de estiramiento C-H sp^3 ubicada alrededor de 2900 cm^{-1} . El AT aporta grupos hidroxilo, por lo tanto, al aumentar la cantidad del agente entrecruzante, aumenta la cantidad de grupos hidroxilo en la red y la posibilidad de formar uniones puente hidrógeno con los grupos funcionales presentes en el copolímero. Esto último explica la disminución en la intensidad relativa de la banda correspondiente a la vibración de los enlaces O-H y N-H.

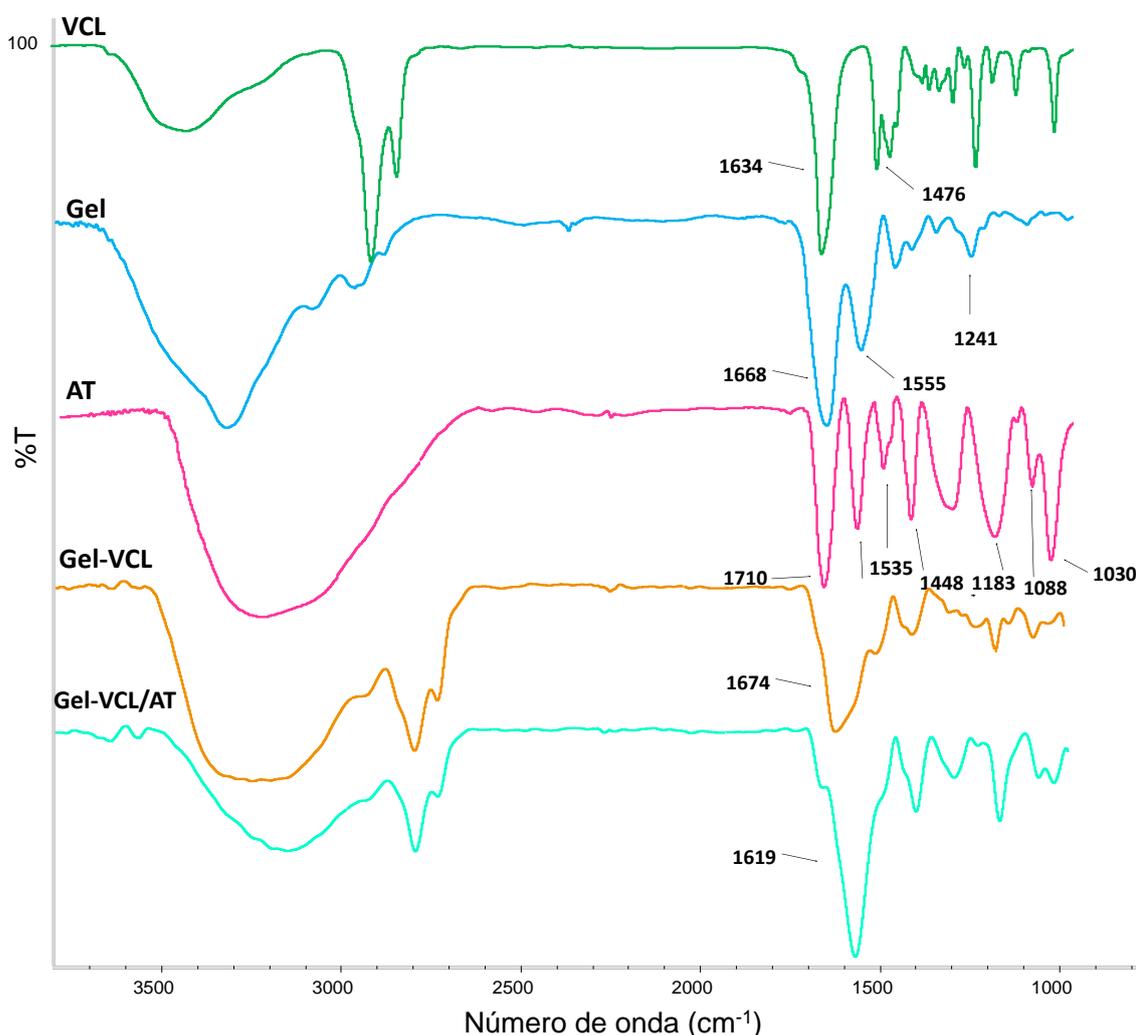


Figura 4.7. Espectros de FT-IR de los reactivos de partida, el polímero injertado sin entrecruzar y entrecruzado.

Por último, se puede destacar que el espectro del polímero sin entrecruzar posee una banda ensanchada a 1674 cm^{-1} proveniente del estiramiento $\text{C}=\text{O}$ de los distintos grupos carbonilo, aportados tanto por el polímero natural como por VCL. Al producirse el entrecruzamiento con AT, se observa que dicha señal se desplaza a menores números de onda conforme aumenta el grado de entrecruzamiento, hasta llegar a los 1619 cm^{-1} para los NGs con $0,15\text{ mg}$ de AT. Esto es un comportamiento típico en las estructuras en las que participan enlaces físicos, sobre todo cuando los mismos son del tipo puente hidrógeno.

Estas últimas dos evidencias confirman la participación tanto de los grupos hidroxilo del AT, como de los grupos carbonilo del polímero

inertado Gel-PVCL en enlaces puente de hidrógeno, lo cual demuestra que el entrecruzamiento producido es completamente debido a interacciones físicas.

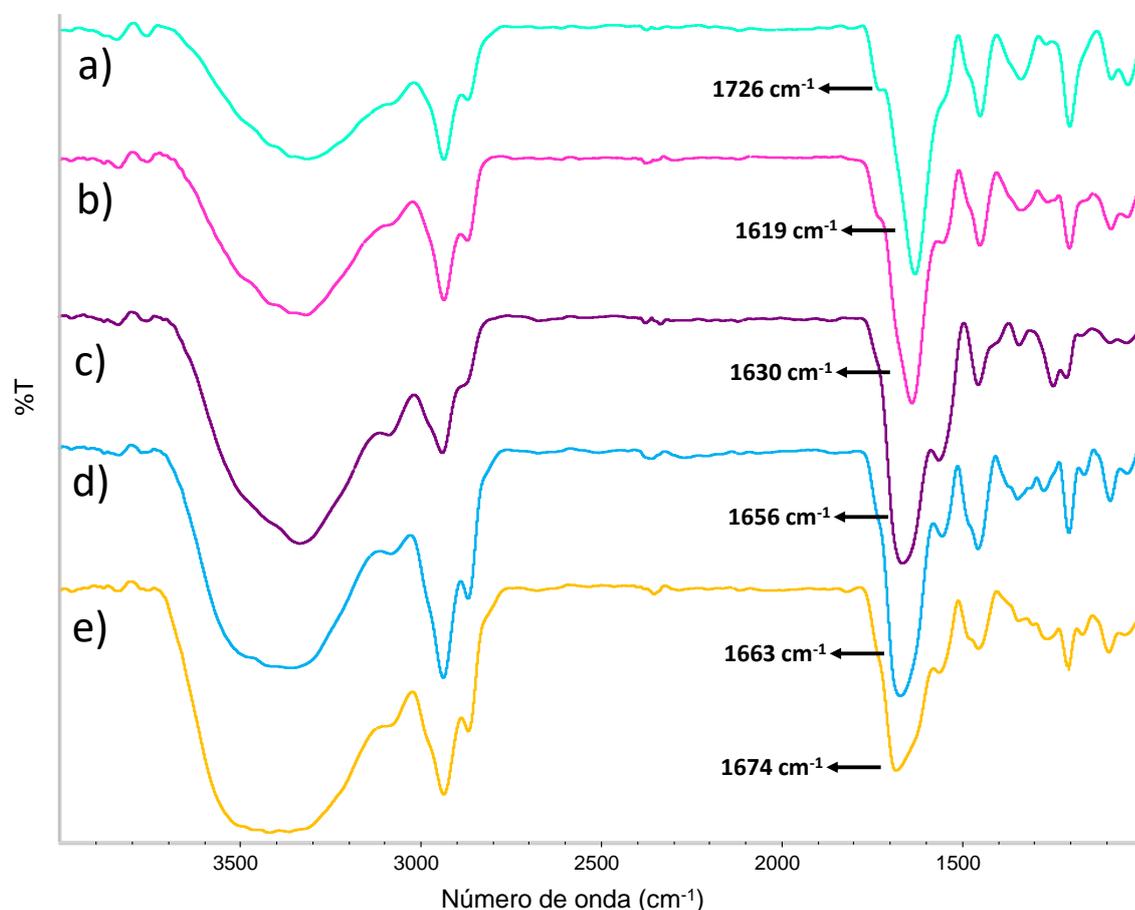


Figura 4.8. Espectros FT-IR obtenidos de a) Gel-PVCL/AT₄, b) Gel-PVCL/AT₃, c) Gel-PVCL/AT₂, d) Gel-PVCL/AT₁ y e) Gel-PVCL.

Una vez confirmado el entrecruzamiento del polímero Gel-PVCL con AT, se llevó a cabo la determinación de la cantidad de AT que efectivamente participa en la formación del NG. Para realizar la cuantificación de AT se empleó espectrofotometría UV-Vis, determinando el máximo de absorbancia a 274 nm. Para esto, previamente se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones del entrecruzante en un intervalo de 2 a 14 μM . Luego, se calculó el coeficiente de extinción molar (ϵ) de AT y se realizó la medición de la absorción a 274 nm de los NGs sintetizados, utilizando como blanco una solución acuosa del polímero inertado Gel-PVCL. A partir de las absorbancias obtenidas se calculó la cantidad de AT real por mg de NG, obteniendo los resultados que se detallan en la Tabla 4.3.

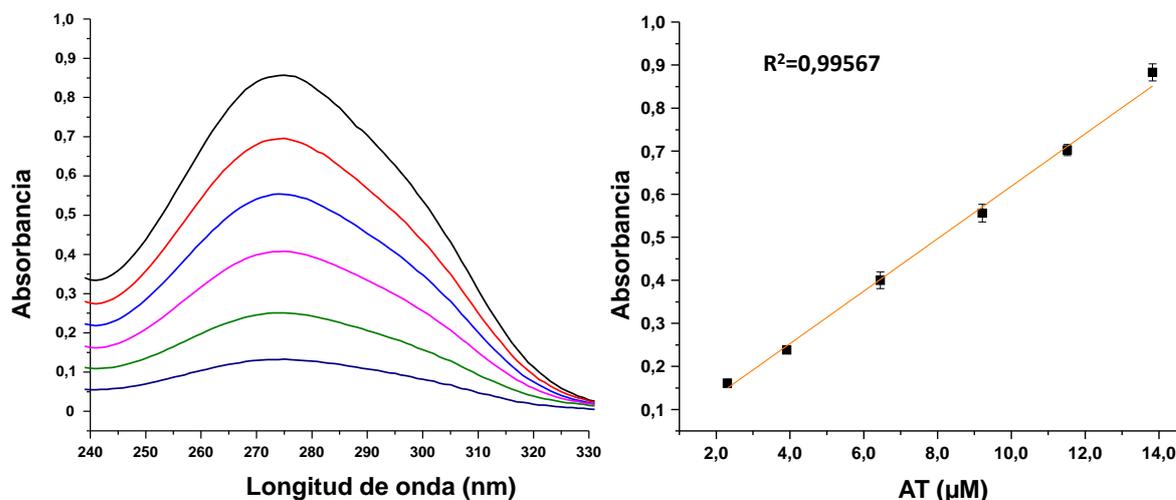


Figura 4.9. Curva de calibración a 274 nm obtenida para Acido Tánico. Ecuación de la recta obtenida: $y = 0,0620 x + 0,0014$ ($R^2 = 0,99567$).

Tabla 4.3. Valores de AT calculado por espectrofotometría de UV-visible para cada material.

Material	mg de AT.mg ⁻¹ de Gel-PVCL teórico	mg de AT.mg ⁻¹ de Gel-PVCL real
Gel-PVCL/AT ₁	0,025	$(2,75 \pm 0,9) \times 10^{-2}$
Gel-PVCL/AT ₂	0,075	$(7,6 \pm 0,8) \times 10^{-2}$
Gel-PVCL/AT ₃	0,10	$(1,03 \pm 0,07) \times 10^{-1}$
Gel-PVCL/AT ₄	0,15	$(1,6 \pm 0,2) \times 10^{-1}$

La alta coincidencia entre los valores teóricos y los calculados experimentalmente, indican que prácticamente todo el AT agregado es incorporado a la red mediante formación de uniones puente hidrógeno, siendo un entrecruzamiento altamente eficiente.

Posteriormente, se llevó a cabo la determinación del Dh y PDI a 20 °C, por DLS para los diferentes NGs sintetizados y sus respectivas T_f, obteniéndose los valores detallados en la Tabla 4.4.

Cabe destacar, que en todos los casos, se observó que luego de liofilizados los NGs eran re-dispersables, y mantenían tanto, el D_h como los índices de PDI.

Tabla 4.4. Valores de D_h , de PDI y valores de T_f para los diferentes NGs.

Material	mg de AT.mg ⁻¹ de Gel-PVCL	PDI	D_h^* (nm)	T_f (°C)
Gel-PVCL	0	0,44	47 ± 1	34,8 ± 0,2
Gel-PVCL/AT ₁	0,025	0,39	164 ± 6	38,5 ± 0,3
Gel-PVCL/AT ₂	0,075	0,29	153 ± 2	39,4 ± 0,3
Gel-PVCL/AT ₃	0,1	0,19	146 ± 2	37,2 ± 0,9
Gel-PVCL/AT ₄	0,15	0,27	151 ± 3	-

* D_h medido por debajo de la temperatura de transición de fase de los NGs

Como se puede observar el entrecruzamiento del polímero injertado lleva a mayores valores de D_h pero menores valores de PDI, respecto al nanogel sin entrecruzar (Gel-PVCL). Esto puede deberse, por un lado, a un aumento de la hidrofiliidad del material debido al aumento de grupos OH aportados por el AT. Por otra parte, la complejidad y tamaño de la molécula del polifenol podría generar una conformación de la red tal que, aleja las cadenas entre sí provocando un aumento en el tamaño de las partículas.

Además, se puede observar que a medida que aumenta la cantidad de AT se produce una disminución del tamaño y polidispersidad del NG. Esto puede deberse a que una mayor cantidad de AT conlleva a un mayor grado de entrecruzamiento y por ende, a un movimiento más impedido de las cadenas y menor posibilidad de hinchamiento.

Este comportamiento/tendencia se mantiene, hasta llegar a 0,1 mg de AT.mg⁻¹ de Gel-PVCL (Gel-PVCL/AT₃), con mayores agregados de AT, se observa un aumento del D_h y del PDI. Esto podría indicar que existe una cantidad máxima de AT que puede actuar como agente entrecruzante y al superar esta cantidad, las moléculas de polifenol interactúan entre sí, convirtiéndose en un agente espaciador que separa las cadenas de polímero entre si, más que en un entrecruzante. Este hecho podría

deberse al impedimento estérico generado por el tamaño y la complejidad de la molécula de AT, causando que los NGs posean mayores tamaños. Por otro lado, el aumento de la cantidad de entrecruzante sumado al impedimento estérico mencionado, puede impedir el ingreso de más moléculas de polifenol al interior de la red, permaneciendo sobre la superficie “decorando” el exterior de la nanopartícula y provocando el aumento del Dh observado (Figura 4.10.).

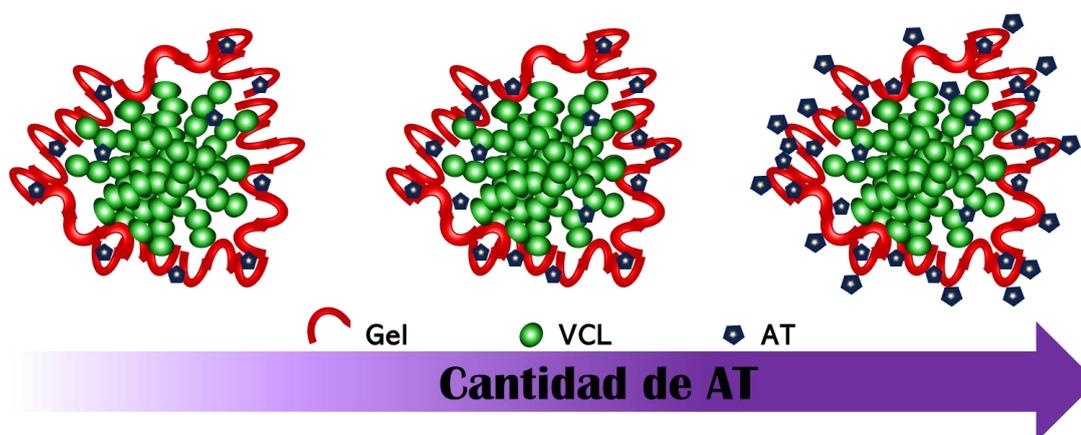


Figura 4.10. Esquema estructural de los NGs de gel-VCL/AT según la cantidad relativa de AT.

En todos los casos se observa que la respuesta a la temperatura se mantiene, aún luego del proceso de entrecruzamiento, excepto para los NGs Gel-PVCL/AT₄. En el resto de los sistemas entrecruzados se observaron valores de T_f similares y, mayores al NG sin entrecruzar. Todo lo antes expuesto indica que, el sistema se vuelve más rígido a mayor cantidad de puntos de entrecruzamiento, perdiendo movilidad de las cadenas y dificultando el proceso de hichamiento-colapso, hasta no observarse efectivamente un colapso del sistema para los NGs con 0,15 mg de AT.

4. 5. Conclusiones parciales

Se llevó a cabo la síntesis de una serie de NGs supramoleculares siguiendo diferentes metodologías, a partir de la incorporación de materiales de origen natural y sintético, por entrecruzamiento físico (interacciones puente hidrógeno) entre las cadenas poliméricas y los agentes entrecruzantes empleados del tipo polifenol.

En primer lugar, se desarrollaron una serie de materiales de tamaño nanométrico a partir de un polímero sintético ampliamente producido y empleado en la industria como es el PVA, a partir de nano emulsión inversa entrecruzando el mismo con polifenoles, tales como AG, MG y PG por enlaces del tipo puente hidrógeno.

Se optimizaron las condiciones de reacción variando relación de fases, cantidad de surfactante y modo de enfriamiento de la emulsión inversa.

A pesar de haber obtenido los sistemas deseados en la escala nanométrica, los mismos no fueron redispersables una vez secos, por lo que los mismos no resultaron atractivos para ser utilizados como biomaterial en nanomedicina ya que su almacenamiento requeriría de cuidados mayores.

Por otro lado, se llevó a cabo el entrecruzamiento con distintas cantidades de AT de gelatina, un compuesto de origen natural, injertado con cadenas de PVCL, un polímero termosensible obtenido a partir de la polimerización de un monómero de origen sintético.

A partir de la síntesis de estos NGs se obtuvieron valores de D_h y PDI de entre 146 y 164 nm y 0,19 y 0,39, respectivamente, valores que se mantuvieron incluso luego de ser liofilizados y redispersados. Estos valores fueron gobernados principalmente por la cantidad de entrecruzante adicionado.

Se observó que el aumento de la cantidad de entrecruzante lleva a una disminución del tamaño del NG hasta un cierto punto a partir del cual el tamaño vuelve a aumentar, debido a interacciones entre moléculas de entrecruzante. Además, se observó un aumento en la T_f de los sistemas luego del entrecruzamiento, independiente de la cantidad de AT incorporado. No obstante, para el NG con mayor porcentaje de

entrecruzamiento el sistema se vuelve demasiado rígido dificultando el colapso del NG y, por ende, una respuesta a la temperatura.

Por otra parte, se determinó la cantidad de AT presente en cada sistema luego de la purificación a través de espectrofotometría de UV-visible y se concluyó que, todo el polifenol adicionado es incorporado al NG, evidenciando la fuerte interacción que existe entre el entrecruzante con la gelatina y la VCL.

El análisis de los resultados encontrados durante la síntesis y caracterización de los sistemas presentados en este Capítulo, permitió establecer que las interacciones físicas generadas por entrecruzantes del tipo polifenol sobre cadenas poliméricas ricas en grupos hidroxilo y/o amino, dependen de la capacidad de formación de enlaces tipo puente hidrógeno inter (polímero-entrecruzante) e intra moleculares (entrecruzante-entrecruzante), la concentración del polifenol y el impedimento estérico que pueden generar. Estos factores gobiernan la conformación final de la red y sus propiedades físico-químicas, limitando o determinando las potenciales aplicaciones del material final.

Particularmente, los NGs que contienen P(VCL) en su estructura, son un material inteligente que poseen respuesta a cambios de temperatura del medio. Esta capacidad puede ser aprovechada en nanotransportadores, para un mejor control y direccionamiento de la liberación de la molécula de interés. Además, la incorporación de la gelatina, ampliamente estudiada y utilizada como bloque de construcción en muchos biomateriales, confiere alta biocompatibilidad y baja toxicidad. Por último, la presencia del polifenol, con reconocidas propiedades antioxidantes, resulta muy prometedor, ya que esta propiedad puede ser aprovechada por el cuerpo humano, cuando tiene lugar la biodegradación del material, luego de haber cumplido su función como nanotransportador.

4. 6. Bibliografía

- [1] K. Szczubialka, K. Zomerska, A. Karewicz, M. Nowakowska, Novel drug carrier — Chitosan gel microspheres with covalently attached nicotinic acid, *Macromolecules*. 38 (2005) 8503–8511.
- [2] M. Nieto-Suárez, M.A. López-Quintela, M. Lazzari, Preparation and characterization of crosslinked chitosan/gelatin scaffolds by ice segregation induced self-assembly, *Carbohydr. Polym.* 141 (2016) 175–183.
- [3] M. Shin, K. Kim, W. Shim, J.W. Yang, H. Lee, Tannic Acid as a Degradable Mucoadhesive Compound, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2 (2016) 687–696.
- [4] M.L. Picchio, Y.G. Linck, G.A. Monti, L.M. Gugliotta, R.J. Minari, C.I. Alvarez Igarzabal, Casein films crosslinked by tannic acid for food packaging applications, *Food Hydrocoll.* 84 (2018) 424–434.
- [5] A. González, C.I. Alvarez Igarzabal, Soy protein - Poly (lactic acid) bilayer films as biodegradable material for active food packaging, *Food Hydrocoll.* 33 (2013) 289–296.
- [6] F. Alhaique, P. Matricardi, C. Di Meo, T. Coviello, E. Montanari, Polysaccharide-based self-assembling nanohydrogels: An overview on 25-years research on pullulan, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 30 (2015) 300–309.
- [7] B. Fonseca-Santos, M. Chorilli, An overview of carboxymethyl derivatives of chitosan: Their use as biomaterials and drug delivery systems, *Mater. Sci. Eng. C*. 77 (2017) 1349–1362.
- [8] C. Biglione, J. Bergueiro, M. Asadian-Birjand, C. Weise, V. Khobragade, G. Chate, M. Dongare, J. Khandare, M.C. Strumia, M. Calderón, Optimizing circulating tumor cells' capture efficiency of magnetic nanogels by transferrin decoration, *Polymers (Basel)*. 10 (2018) 1–14.
- [9] A. Wolfel, M.R. Romero, 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, *Polymer (Guildf)*. 116 (2017) 251–260.
- [10] Z. Hu, T. Cai, C. Chi, Thermoresponsive oligo (ethylene glycol) - methacrylate- based polymers and microgels, *Soft Matter*. 6 (2010) 2115–2123.
- [11] J.C. Cuggino, M. Molina, S. Wedepohl, C.I.A. Igarzabal, M. Calderón, L.M. Gugliotta, Responsive nanogels for application as smart carriers in endocytic pH-triggered drug delivery systems, *Eur. Polym. J.* 78 (2016) 14–24.
- [12] G.N. Rimondino, E. Miceli, M. Molina, S. Wedepohl, S. Thierbach, E. Rühl, M. Strumia, M. Martinelli, M. Calderón, Rational design of dendritic thermoresponsive nanogels that undergo phase transition under endolysosomal conditions, *J. Mater. Chem. B*. 5 (2017) 866–874.
- [13] J.L. Mann, A.C. Yu, G. Agmon, E.A. Appel, Supramolecular polymeric biomaterials, *Biomater. Sci.* 6 (2018) 10–37.
- [14] X. Yan, F. Wang, B. Zheng, F. Huang, Stimuli-responsive supramolecular polymeric materials, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 6042–6065.
- [15] A. Campanella, D. Döhler, W.H. Binder, Self-Healing in Supramolecular Polymers, *Macromol. Rapid Commun.* 39 (2018) 1–19.
- [16] Z. Huang, B. Qin, L. Chen, J.F. Xu, C.F.J. Faul, X. Zhang, Supramolecular Polymerization from Controllable Fabrication to Living Polymerization, *Macromol. Rapid Commun.* 38 (2017) 1–12.
- [17] R. Dong, Y. Pang, Y. Su, X. Zhu, Supramolecular hydrogels: synthesis, properties and their biomedical applications, *Biomater. Sci.* 3 (2015) 937–954.
- [18] E.M. Euti, A. Wolfel, M.L. Picchio, M.R. Romero, M. Martinelli, R.J. Minari, C.I.A. Igarzabal, Controlled Thermoreversible Formation of Supramolecular Hydrogels Based on Poly(vinyl

- alcohol) and Natural Phenolic Compounds, *Macromol. Rapid Commun.* 40 (2019) 1–7.
- [19] M. Karker, H. Falleh, K. Msaada, A. Smaoui, C. Abdely, J. Legault, R. Ksouri, Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of the medicinal halophyte *Reaumuria vermiculata*, *EXCLI J.* 15 (2016) 297–307.
- [20] M.J. Zhang Lin, Ravipati, Anjaneya S., Koyyalamudi, Sundar Rao, Seong, Sang Chul, Reddy, Narsimha, Smith, Paul T., Bartlett, John, Shanmugam, Kirubakaran, Munch, Gerald, and Wu, Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants and fungi containing phenolic and flavonoid compounds, *Chinese Med. (United Kingdom)*. 7 (2012) 12361–12367.
- [21] N. Sahiner, S. Sagbas, N. Aktas, C. Silan, Inherently antioxidant and antimicrobial tannic acid release from poly(tannic acid) nanoparticles with controllable degradability, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 142 (2016) 334–343.
- [22] I. Volf, V.I. Popa, *Integrated Processing of Biomass Resources for Fine Chemical Obtaining: Polyphenols*, Elsevier B.V., 2018.
- [23] Á.L. Santana, J.A. Zanini, G.A. Macedo, Dispersion-assisted extraction of guarana processing wastes on the obtaining of polyphenols and alkaloids, *J. Food Process Eng.* 43 (2020) 1–11.
- [24] A. Woinaroschy, C. Badarau, B. Brezan, The total content of polyphenols and flavonoids of some plants extracts, as potential additions for cider obtaining, *UPB Sci. Bull. Ser. B Chem. Mater. Sci.* 81 (2019) 23–30.
- [25] C.A. Finch, Chemical Modification and Some Cross-linking Reactions of Water-Soluble Polymers, *Chem. Technol. Water-Soluble Polym.* (1983) 81–111.
- [26] G.G.D. Silva, J.A. Sobral, R.A. Carvalho, P.V.A. Bergo, O. Mendieta-Taboada, A.M.Q.B. Habitante, Biodegradable Films Based on Blends of Gelatin and Poly (Vinyl Alcohol): Effect of PVA Type or Concentration on Some Physical Properties of Films, *J. Polym. Environ.* 16 (2008) 276–285.
- [27] T. Mori, M. Sakimotoa, T. Kagia, & T. Sakai, Isolation and Characterization of a Strain of *Bacillus megaterium* That Degrades Poly(vinyl alcohol), *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60 (1996) 330–332.
- [28] S. Matsumura, H. Kurita, and H. Shimokobe, Anaerobic biodegradability of polyvinyl alcohol, *Biotechnol. Lett.* Vol. 15 (1993) 749–754.
- [29] S. Matsumura, N. Tomizawa, A. Toki, K. Nishikawa, Novel Poly (vinyl alcohol) -Degrading Enzyme and the Degradation Mechanism, *Macromolecules*. 32 (1999) 7753–7761.
- [30] N. Hirun, S. Dokmaisrijan, V. Tantishaiyakul, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy Experimental FTIR and theoretical studies of gallic acid – acetonitrile clusters*, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 86 (2012) 93–100.
- [31] S. Selvaraja, P. Rajkumar, K. Thirunavukkarasu, S. Gunasekaran, S. Kumaresan, Vibrational (FT-IR and FT-Raman), electronic (UV-Vis) and quantum chemical investigations on pyrogallol: A study on benzenetriol dimers, *Vib. Spectrosc.* 5 (2018) 16–22.
- [32] N. Ain, Z. Aslam, M. Yousuf, W.A. Waseem, S. Bano, I. Anis, F. Ahmed, S. Faizi, M.I. Malik, M.R. Shah, Green synthesis of methyl gallate conjugated silver nanoparticles : a colorimetric probe for, *New J. Chem.* 43 (2019) 1972–1979.
- [33] G. STEINBACH, *Conjugados de poli(N-vinilcaprolactama)-gelatina sensibles a la temperatura y al pH*, Tesina de Grado, Universidad Nacional del Litoral, 2019.
- [34] J.P. Robinson, V.B. and W. B., Formation of Complexes between Protein and Tannic Acid, *J. Agric. Food Chem.* 17 (1969) 772–777.
- [35] T. Aewsiri, S. Benjakul, W. Visessanguan, P.A. Wierenga, H. Gruppen, Antioxidative activity and emulsifying properties of cuttle fish skin gelatin – tannic acid complex as influenced by types

of interaction, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11 (2010) 712–720.

- [36] J.L. Whittaker, S. Subianto, N.K. Dutta, N.R. Choudhury, Induced insolubility of electrospun poly(N-vinylcaprolactam) fibres through hydrogen bonding with Tannic acid, *Polymer (Guildf)*. 87 (2016) 194–201.
- [37] C.M. López, A. Pich, Supramolecular Stimuli-Responsive Microgels Crosslinked by Tannic Acid, *Macromol. Rapid Commun.* 39 (2018) 1–7.



Parte III

Aplicaciones biomédicas



Parte III: Aplicaciones Biomédicas

Introducción

Como se ha mencionado anteriormente hoy en día los focos de la investigación en biomateriales se centran mayormente en la escala nanométrica. Y es desde su aparición, que los nanomateriales se han diseñado y sintetizado en búsqueda de su utilización en muchas y diversas aplicaciones como la purificación de agua [1], la creación de sensores [2], indumentaria textil [3], *packagings* alimenticios [4] pero sin duda, el área más grande de aplicación de este tipo de materiales es la biomedicina [5].

Durante décadas, los biomateriales se han utilizado con éxito en aplicaciones médicas para mejorar, tanto la calidad como el tiempo de vida, de los seres humanos. La nanomedicina es una ciencia interdisciplinaria que incluye diferentes campos de investigación [6]:

Administración de fármacos. Los vehículos de administración a nanoescala, pueden mejorar la eficacia terapéutica y minimizar los efectos adversos asociadas con los medicamentos disponibles, permitir nuevas clases de terapias y además, fomentar la re-investigación de nuevas entidades moleculares farmacéuticamente no viables, pero biológicamente activas.

Diagnóstico *in vitro*. Los sensores basados en nanotecnología, pueden permitir una detección rápida y de alto rendimiento de biomarcadores de enfermedades con mayor sensibilidad y menor consumo de muestras. La nanotecnología también ofrece esperanzas para la detección temprana de virus, bacterias y células tumorales circulantes, así como para el análisis de células individuales.

Imágenes *in vivo*. Las nano-sondas de detección selectiva, podrían proporcionar una forma más rápida, menos invasiva y más precisa de diagnosticar enfermedades en sus etapas más tempranas y monitorear la progresión de la enfermedad. Algunas otras posibles oportunidades incluyen, informar sobre la eficacia *in vivo* de las terapias y rastrear la biodistribución de los nanoportadores en el organismo. Además, las nano-sondas de imágenes, podrían ayudar a los cirujanos a localizar tumores y

sus márgenes, identificar estructuras adyacentes importantes y mapear los ganglios linfáticos centinela.

Terapia. Ciertos nanomateriales tienen propiedades terapéuticas únicas que difieren de los medicamentos convencionales y pueden utilizarse para tratar enfermedades sin ningún otro tipo de intermediario. Por ejemplo, las nanopartículas a base de óxido de hafnio y oro pueden mejorar enormemente la terapia de rayos X; la plata nanocristalina se utiliza como agente antimicrobiano; las nanovarillas de oro, nanotubos de carbono y nanopartículas magnéticas, pueden inducir hipotermia para matar células cancerosas, entre otros.

Implantes. Los nanomateriales biocompatibles que tienen propiedades mecánicas óptimas, se pueden utilizar para implantes médicos, como restauraciones dentales y sustitutos óseos. Los nano recubrimientos o las superficies nanoestructuradas además, pueden mejorar la biocompatibilidad y la adhesión de los biomateriales.

Ingeniería de tejidos. La nanotecnología puede permitir el diseño y la fabricación de *scaffolds* biocompatibles a nanoescala, y controlar la liberación espacio-temporal de factores biológicos, que se asemejan a la matriz extracelular nativa, para corregir los comportamientos celulares y eventualmente conducir a la creación de tejidos implantables.

Algunas de estas áreas de aplicación están en proceso de convertirse en realidad o se están utilizando actualmente, mientras que, otras resultan prometedoras en sus primeras fases de desarrollo y se espera que experimenten un fuerte crecimiento en el futuro cercano. A pesar de esto, desde el punto de vista del número de artículos publicados en revistas académicas y el número de patentes en el mundo, hoy en día, y sobre todo cuando se habla de nanogeles, se cree que la administración de fármacos, es el área más importante de la nanomedicina.[7]

Cabe destacar que, en las distintas áreas de aplicación ya mencionadas, se ha explorado el desarrollo de moléculas dendríticas y se han alcanzado resultados superiores o incluso no alcanzados por otro tipo de polímeros. La modificación de los grupos funcionales, tanto de la periferia como del corazón o punto focal de los dendrímeros o dendrones, permite una variedad de efectos en la estructura final del material y en las propiedades fisicoquímicas, permitiendo una mayor versatilidad en su aplicación,

llegando a ser desarrolladas como vacunas prometedoras, antibacterianas y hasta antivirales funcionando como fármacos por sí solos.[8] Por ejemplo Roy y colaboradores [9] intentaron imitar las glicoproteínas multivalentes de la superficie celular, utilizando una molécula dendrítica sililada teniendo en cuenta que la infección de las células huésped por los virus de la influenza implica α -sialosidos. El estudio encontró que los α -tiosialósidos dendríticos exhibían una poderosa inhibición de la hemaglutinación de las células. Por otro lado, Ziem y colaboradores [10] sintetizaron una plataforma de políglicerol dendrítico (PGd) modificada con grupos SO_4^{2-} que mostró una fuerte inhibición de partículas de Orthopoxvirus, lo cual fue atribuido al efecto multivalente (positivo) generado por los grupos sulfato de la estructura; además, el potencial antiviral del nanosistema resultó similar al de la heparina. En 2012 Chonco y colaboradores [11], investigaron la utilización de un dendrímero de carbosilano aniónico soluble en agua como microbicida tópico vaginal. El estudio se centró en ensayos de citotoxicidad *in vitro* e *in vivo* realizados en tractos genitales de conejas, simulando un modelo *in vitro* de epitelio vaginal y simulación de dinámica molecular. Los estudios mostraron que la molécula resultó propicia para inhibir la infección del virus del VIH tipo I.

Todos estos antecedentes, son solo algunos ejemplos del avance que se ha logrado en el área de la nanomedicina y que evidencian todo lo que aún queda por explorar y explotar de estos materiales y sus posibles combinaciones.

Bibliografía

- [1] N.F.S. y J.H. Nur Syahirah Kamarudin, Rohayu Jusoh, Herma Dina Setiabudi, Potential nanomaterials application in wastewater treatment: Physical, chemical and biological approaches, *Mater. Today Proc.* 42 (2021) 107–114.
- [2] N.S. Alsaiari, K.M.M. Katubi, F.M. Alzahrani, S.M. Siddeeg, M.A. Tahooh, The application of nanomaterials for the electrochemical detection of antibiotics: A review, *Micromachines*. 12 (2021) 308.
- [3] C. Pereira, A.M. Pereira, C. Freire, T. V. Pinto, R.S. Costa, J.S. Teixeira, Nanoengineered textiles: from advanced functional nanomaterials to groundbreaking high-performance clothing, Elsevier Inc., 2020.
- [4] M. Hoseinnejad, S.M. Jafari, I. Katouzian, Inorganic and metal nanoparticles and their antimicrobial activity in food packaging applications, *Crit. Rev. Microbiol.* 44 (2018) 161–181.
- [5] M. Aflori, Smart nanomaterials for biomedical applications—a review, *Nanomaterials*. 11 (2021) 1–33.
- [6] J. Shi, A.R. Votruba, O.C. Farokhzad, R. Langer, Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: From discovery to applications, *Nano Lett.* 10 (2010) 3223–3230.
- [7] V. Wagner, A. Dullaart, A.K. Bock, A. Zweck, The emerging nanomedicine landscape, *Nat. Biotechnol.* 24 (2006) 1211–1217.
- [8] E.R. Gillies, J.M.J. Fréchet, Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery, *Drug Discov. Today*. 10 (2005) 35–43.
- [9] R. Roy, D. Zanini, S.J. Meunier, A. Romanowska, Solid-phase synthesis of dendritic sialoside inhibitors of influenza A virus haemagglutinin, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 24 (1993) 1869–1872.
- [10] B. Ziem, H. Thien, K. Achazi, C. Yue, D. Stern, K. Silberreis, M.F. Gholami, F. Beckert, D. Gröger, R. Mülhaupt, Highly efficient multivalent 2D nanosystems for inhibition of orthopoxvirus particles, *Adv. Healthc. Mater.* 5 (2016) 2922–2930.
- [11] L. Chonco, M. Pion, E. Vacas, B. Rasines, M. Maly, M.J. Serramía, L. López-Fernández, J. De la Mata, S. Alvarez, R. Gómez, M.A. Muñoz-Fernández, Carbosilane dendrimer nanotechnology outlines of the broad HIV blocker profile., *J. Control. Release*. 161 (2012) 949–958.

Capítulo 5

Estudio de aplicación de los NGs orientado a la nanomedicina

5. 1. Introducción

El desarrollo de *nanocarryers* o nanodispositivos para la administración de fármacos, surgió como meta para lograr objetivos específicos y superar ciertos inconvenientes que se encontraban los químicos, investigadores e industrias farmacéuticas. Metas e inconvenientes tales como lograr una liberación controlada y sostenida en el tiempo [1], baja solubilidad de los compuestos activos [2,3], biodisponibilidad mejorada [4,5], enmascaramiento del sabor [6], superación de la resistencia a los fármacos [7], direccionamiento pasivo [8–10], y la focalización activa [11,12]. Existen diferentes portadores de fármacos tales como, nanogeles y micelas poliméricas, dendrímeros e incluso compuestos inorgánicos como nanopartículas de sílice, hidróxidos dobles laminares (LDHs), óxidos de titanio y óxidos de hierro (Figura 5.1).[13–16]

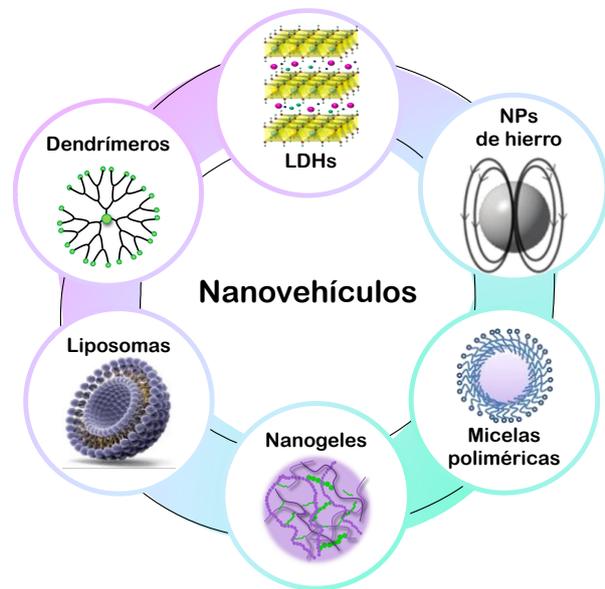


Figura 5.1. Esquema de nanovehículos utilizados para liberación controlada de fármacos.

Una pregunta interesante para responder es, ¿por qué los nanodispositivos resultan tan propicios para su utilización como transportadores de fármacos?. Para responder a este interrogante, se debe tener en cuenta que, los materiales en escala nanométrica tienen varias propiedades que los hace interesantes: (a) poseen una estructura 3D definida con un tamaño nanométrico, que permite aprovechar los mecanismos de internalización celular y favorecer la biodistribución [17]; (b) pueden poseer alta capacidad de carga de diversos compuestos ya sea fármacos [18,19], ADN [20–22], proteínas [23,24], entre otros, mediante encapsulación o conjugación; (c) se pueden diseñar de manera que posean diferentes propiedades de activación / desactivación conmutables, que pueden activarse mediante señales o cambios

ambientales; (d) permiten realizar un seguimiento en el organismo mediante técnicas de bioimagen; y (e) se pueden diseñar de manera que posean un reconocimiento específico para la entrega selectiva al sitio de acción.[25,26]

Como sistema de administración y debido a su gran relación área/volumen, los nanogeles pueden incorporar físicamente de manera simple o por conjugación química, múltiples combinaciones de medicamentos para diversos tipos de enfermedades y trastornos inmunes o se puede llevar a cabo la modificación superficial del dispositivo con distintos grupos *targeting* u orientadores.[27,28]

Una de las enfermedades que más interés ha despertado para el desarrollo de este tipo de sistemas es, sin dudas, el cáncer. El término cáncer es utilizado para denominar un grupo heterogéneo de enfermedades malignas, en las que las células anormales se dividen sin control y son capaces de invadir otros tejidos. Una masa de células cancerosas se llama tumor y un crecimiento incontrolado del mismo, resulta en la destrucción de los tejidos sanos adyacentes o periféricos. La diseminación de células tumorales a través de la sangre o el flujo linfático, conduce a la formación de tumores secundarios o metástasis en otros órganos o tejidos.[29,30] La mayoría de los agentes anticancerígenos que se utilizan hoy en día, no pueden diferenciar entre las células cancerosas y las normales, ocasionando toxicidad sistémica y efectos adversos, limitando así la dosis máxima de fármaco. Además, la eliminación rápida y la distribución generalizada en órganos y tejidos específicos requieren de la administración de un fármaco en grandes cantidades, lo que incrementa el costo del tratamiento y produce una toxicidad indeseable.[29] Los nanomateriales infundidos en el torrente sanguíneo pueden acumularse en los tumores, debido al efecto mejorado de permeación y retención (EPR por sus siglas en inglés), lo que permite la extravasación de nanopartículas de la sangre al tejido tumoral y pueden internalizarse de manera eficiente por endocitosis.[31] El fenómeno EPR fue descubierto por Matsumura y colaboradores en la década de los '80.[32] Estos investigadores demostraron que las nanopartículas se acumulan selectivamente en los tejidos tumorales, resultando así en un *targeting* o direccionamiento pasivo. Cuando las células tumorales alcanzan el tamaño de 150–200 μm , comienzan a desarrollar su propio suministro de sangre y se vuelven dependientes de la neovasculatura, por su aporte nutricional y de oxígeno. Así, los vasos tumorales recién formados son generalmente de forma y arquitectura anormales. Las

células endoteliales defectuosas están mal alineadas, con amplia fenestración, con espacios entre 100 y 780 nm de tamaño o carentes de la capa de músculo liso y deterioran los receptores funcionales de la angiotensina I y, por lo tanto, los nanodispositivos pueden acumularse selectivamente. Además, los tejidos tumorales por lo general carecen de drenaje linfático eficaz. Todos estos factores dan lugar a la dinámica molecular y de transporte de fluidos anormales (Figura 5.2).[32–34]

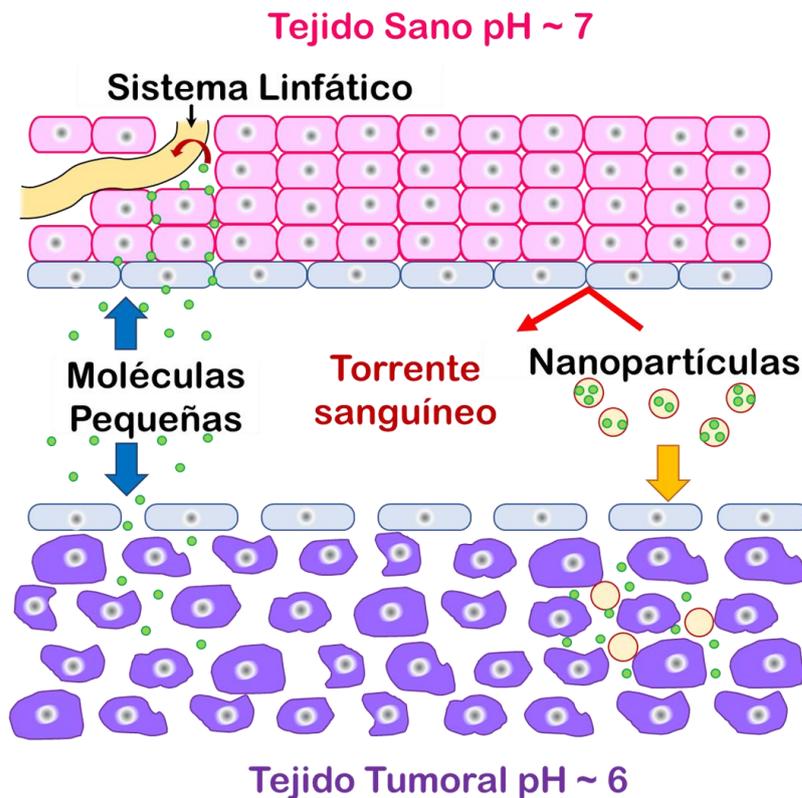


Figura 5.2. Representación esquemática de las características anatómicas y fisiológicas del tejido normal y tumoral con respecto a la permeabilidad vascular y retención de moléculas pequeñas (molécula de fármaco) y grandes (efecto EPR).

Se han realizado estudios en modelos animales y pacientes humanos, que han demostrado que el microambiente de los tumores es ligeramente más ácido, de hecho el valor del pH en el tejido tumoral es a menudo 0,5-1,0 unidades más bajo que en el tejido normal.[35] Esta diferencia podría contribuir a la liberación extracelular de fármacos unidos a polímeros de acoplamiento a través de uniones sensibles a valores de pH ácido, especialmente si el fármaco queda atrapado por el tumor durante períodos de tiempo más prolongados.

Por otro lado, las macromoléculas pueden ser captadas por la célula a través de endocitosis (Figura 5.3.). Durante este proceso, se produce una caída significativa del valor del pH desde el valor fisiológico (7,2 a 7,4) en el espacio extracelular, hasta un pH de 6,5 a 5,0 en los endosomas y hasta aproximadamente un pH de 4,0 en los lisosomas primarios y secundarios.[36] Un gran número de enzimas lisosomales se activan en el entorno ácido de estas vesículas, por ejemplo, fosfatasas, nucleasas, proteasas, esterases y lipasas. Los conjugados o complejos de fármaco-polímero deben ser suficientemente estables en el torrente sanguíneo antes de que el fármaco se libere en el sitio de acción. Existen diversas formas por la cual el fármaco unido al polímero puede liberarse una vez en la célula, como por ejemplo por hidrólisis por enzimas, por reducción o como respuesta al cambio de pH. En un caso ideal, la escisión del conjugado fármaco-polímero en el sitio del tumor se desencadena por una

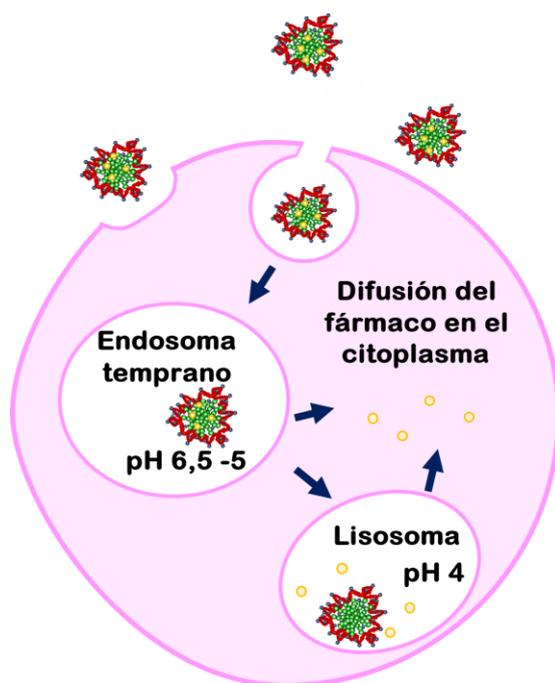


Figura 5.3. Esquema del proceso de endocitosis de una macromolécula en una célula

propiedad bioquímica o fisiológica única para el tumor individual. Aunque estas características verdaderamente específicas del tumor rara vez se encuentran, ya que las condiciones dependen mucho del tipo y la localización del tumor, la sobreexpresión de ciertas enzimas, un ambiente ácido e hipóxico en los tumores sólidos, así como la vía endocitótica de las macromoléculas ofrecen varias opciones para diseñar conjugados fármaco-polímero que son preferencialmente escindidos dentro de la mayoría de los tumores.

La infusión de fármacos antineoplásicos con nanomateriales como portadores, da como resultado una mayor carga útil de fármacos para el tumor, en comparación con la infusión convencional. Estos nanomateriales también pueden ser diseñados para aumentar su vida media en la circulación sanguínea, evitar que las proteínas opsonizantes se adhieran a la superficie del nanomaterial y reducir el metabolismo y la

depuración rápida. Además, el uso de nanomateriales para la administración de fármacos puede minimizar los efectos adversos al prevenir la absorción inespecífica de agentes terapéuticos en los tejidos sanos.[37,38] De hecho, cambiar la farmacocinética y la biodistribución de un ingrediente farmacéutico activo (IFA o fármaco) a través de su incorporación a un nanoportador, para evitar efectos secundarios graves e incluso aumentar la eficacia del IFA original, ha sido uno de los más grandes avances.[39–41] Además, el empleo de nanodispositivos mejoran la solubilidad y biodisponibilidad del fármaco, prolongan el tiempo de circulación en el torrente sanguíneo, evitando la eliminación anticipada por los macrófagos antes de alcanzar a las células tumorales, evadiendo así al sistema retículo endotelial, que es el responsable de detectar y remover las partículas extrañas del cuerpo. [42–44]

Con respecto al fenómeno de EPR, mencionado anteriormente, este efecto hoy en día es un tanto controvertido, porque no todos los tumores exhiben porosidad de las células endoteliales circundantes, que es uno de los factores que dan lugar a este fenómeno, ya que existe una variabilidad significativa entre distintos tumores y de un paciente a otro.[45,46] Aunque el *targeting* pasivo por EPR presenta una mejora en el transporte y liberación de fármacos al paciente y, en consecuencia, la toxicidad sistémica del fármaco en sí se reduce, también produce algunos inconvenientes. Una de las principales falencias es que, al ser un proceso poco controlado, los fármacos pueden no ser eficientemente conducidos hasta el tumor o, como se mencionó anteriormente, puede que el efecto EPR no suceda.[47,48] Otra forma de direccionar el nanotransportador a un tejido específico, es utilizar sistemas a nanoescala sensibles a un estímulo y aplicar el estímulo en el área y tiempo deseados. Entre los diferentes estímulos, la temperatura es quizás, el más popular. Los tejidos pueden soportar una hipertermia moderada de hasta 43°C durante un período prolongado de tiempo, sin consecuencias irreversibles.[49] Esta leve hipertermia puede producirse por un estado febril del paciente o puede generarse de manera controlada utilizando microondas [50], ultrasonido [51], radiofrecuencia [52], iluminación infrarroja [53] o hipertermia de fluido magnético [54]. Estos métodos no requieren cirugía invasiva y, por lo tanto, son fáciles de implementar para el profesional médico. Se han investigado muchos nanoportadores termorresistentes durante los últimos 20 años, pero solo uno de ellos se encuentra actualmente en fase III de ensayo clínico: ThermoDox® [55].

A la hora de diseñar un nanodispositivo, se deben tener en cuenta algunas consideraciones dentro de las cuales se pueden nombrar: a) proteger el fármaco de la degradación prematura, b) evitar que los fármacos interactúen tempranamente con el entorno biológico, c) mejorar su absorción en un tejido seleccionado, d) controlar el perfil farmacocinético y de distribución en los tejidos, e) mejorar la internalización intracelular, f) estar constituido de un material que sea biocompatible, g) ser fácilmente funcionalizable, h) exhibir una alta eficacia de absorción diferencial en las células a ser tratadas sobre las células normales (o tejido), i) ser soluble o dispersable en condiciones acuosas para aumentar la efectividad, j) tener una circulación prolongada, una baja tasa de agregación y una extensa vida útil, k) ser capaz de administrar múltiples tipos de agentes terapéuticos con propiedades fisicoquímicas potencialmente diferentes.[29,43,56–59]

Como se mencionó anteriormente, las moléculas dendríticas, como los dendrímeros y dendrones, se han utilizado en diversos campos de aplicación. Al poseer cavidades internas, también pueden albergar moléculas de solvente, modificar la solubilidad de un material, o encapsular una sustancia de interés.[60]

Se han logrado avances recientes en la aplicación de dendrímeros biocompatibles al tratamiento del cáncer, incluido su uso como sistemas de administración de fármacos anticancerosos potentes como cisplatino y doxorubicina, [61–63] así como agentes para la terapia de captura de neutrones de boro y la terapia fotodinámica.[64,65] Una comparación de las características de los dendrímeros con las de los polímeros lineales, muestra que la arquitectura dendrítica puede proporcionar diferentes ventajas para las aplicaciones en administración de fármacos. Por ejemplo, la multivalencia controlada de los dendrímeros, se puede aprovechar para unir varias moléculas de fármaco, grupos diana y grupos solubilizantes a la periferia de los dendrímeros de una manera bien definida. Además, la baja polidispersión de los dendrímeros proporcionaría un comportamiento farmacocinético reproducible, en contraste con el de algunos polímeros lineales que contienen fracciones con pesos moleculares muy diferentes dentro de una misma muestra.[66]

Los estudios iniciales de dendrímeros, como posibles sistemas de administración, se encontraron con una alta dificultad para controlar la liberación de moléculas albergadas en el núcleo del dendrímero. En algunos casos, se requieren condiciones severas para que esta liberación

ocurra [67], mientras que en otros, el fármaco encapsulado no se retiene lo suficiente y las moléculas se liberan con relativa rapidez.[61,68] Un enfoque alternativo para el desarrollo de dendrímeros como portadores de fármacos contra el cáncer, es aprovechar su multivalencia bien definida para la unión covalente de moléculas de fármacos a la periferia del dendrímero. La carga de fármaco se puede ajustar variando el número de generación del dendrímero, y la liberación del fármaco se puede controlar incorporando enlaces degradables entre el fármaco y el dendrímero.[62,63] En un estudio realizado por Padilla de Jesus et al.[69] se diseñaron dendrímeros de poliéster alifáticos basados en ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico para el desarrollo de conjugados de fármacos contra el cáncer. Los estudios de biodistribución en ratones, mostraron que el dendrímero de cuarta generación con un peso molecular de 3800 tenía una vida media en circulación de menos de 10 minutos y se excretaban rápidamente en la orina. Aunque la falta de acumulación observada del dendrímero en órganos vitales, es una característica deseable para muchas aplicaciones biológicas, se requiere una vida media más larga para obtener un direccionamiento pasivo al tumor a través del efecto EPR. Debido a que la tasa de filtración renal se basa en el volumen hidrodinámico, es decir las moléculas más grandes se eliminan más lentamente [70], un enfoque para aumentar la vida media es hacer que el dendrímero sea más grande. Sin embargo, la preparación sintética de dendrímeros de alta generación bien definidos requiere mucho tiempo y, como resultado de las arquitecturas globulares de los dendrímeros, el aumento del volumen hidrodinámico es modesto.[66]

Los portadores más ramificados se excretan a un ritmo más lento en la orina por filtración glomerular, probablemente como consecuencia de su menor flexibilidad y capacidad para reptar (difundir axialmente) a través de los poros en relación con los polímeros lineales. Como resultado de las interacciones estéricas, se considera que los polímeros dendronizados logran conformaciones extendidas y rigidizadas. En estudios recientes de biodistribución, estas moléculas han mostrado un comportamiento farmacocinético interesante, diferente al que presentan los polímeros lineales con peso molecular y volumen hidrodinámico equivalentes.[71] Además, como resultado de sus vidas medias de circulación prolongadas y numerosos grupos periféricos o poros para la interacción con fármacos, restos diana y grupos solubilizantes, estos polímeros muestran ser prometedores para aplicaciones de administración de fármacos.

Otra de las aplicaciones altamente prometedoras que han llevado a los dendrímeros a ser ampliamente consideradas en el área de la biomedicina, es la posibilidad de ser utilizados como inhibidores del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Muchos compuestos con actividad anti-VIH-1 han sido probados como microbicidas tópicos, como los polisacáridos sulfatados (carragenano y dextrano sulfatado) [72,73], medicamentos como tenofovir [74–76] o dapivirina [77] y nanoestructuras como los dendrímeros [78,79].

Particularmente Sepulveda-Crespo et al. [80] han desarrollado un dendrímero carbosilano polianiónico de segunda generación, denominado g2-s16, con el cual han podido demostrar mediante estudios que la administración vaginal tópica de este dendrímero previene la transmisión del VIH-1 en ratones humanizados en un 84% sin presencia de ARN del VIH-1 y lesiones vaginales. Mediante diferentes ensayos, han comprobado que dicho dendrímero ejerce actividad anti-VIH-1 en una etapa temprana de la replicación viral y que además tiene la capacidad para inhibir la transmisión del VIH-1 de célula a célula, lo que confirma su capacidad multifactorial y no específica. Se cree que la capacidad de inhibición de estas moléculas se debe principalmente a su naturaleza polianiónica, pero hasta el momento no se han reportado ensayos con polímeros polianiónicos que demuestren tener el mismo efecto inhibitorio.

5. 2. Objetivos específicos

En búsqueda de comprobar la eficiencia de los NGs sintetizados a lo largo de esta Tesis, para las potenciales aplicaciones mencionadas anteriormente, se plantearon como objetivos específicos de este capítulo:

- Realizar ensayos de eficiencia de encapsulación y liberación de una molécula modelo (verde de malaquita).
- Realizar estudios de efectividad de los NGs dendronizados como potenciales inhibidores de la infección contra el virus de VIH-tipo I.

Parte de los estudios presentados en este capítulo fueron realizados en el marco de un proyecto CyTED, en el que participó nuestro grupo de investigación (Dra. Miriam Strumia, responsable) y el Hospital General Universitario Gregorio Marañón de la Comunidad de Madrid (Dra. María Angeles Muñoz-Fernandez, responsable) y gracias a la colaboración de la Dra. Micaela Macchione, investigadora de nuestro grupo.

5. 3. Parte experimental

5. 3. 1. Estudio de la eficiencia de los NGs para la encapsulación y la liberación de verde de malaquita

Se estudió la capacidad de carga de los NGs utilizando un colorante modelo. Se seleccionó el verde de malaquita para tal fin por su naturaleza iónica.

Para esto, se prepararon 5 dispersiones, de cada NG a evaluar, con 2 mg de NGs en 1,0 mL de agua destilada cada una y se llevaron a 50 °C por 1 hora, para asegurar el colapso total de los NGs. Luego, a cada dispersión se adicionó 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 y 6,0 mg de colorante, respectivamente y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente de manera que los NGs se hinchen nuevamente en la solución de colorante. Los NGs hinchados permanecieron con agitación constante por otras 48 horas. Luego, para separar el analito libre, las suspensiones se refrigeraron por media hora y se centrifugaron 2 veces cada una a 9000 rpm por 15 minutos, volviendo a refrigerarlas entre cada centrifugación, evitando así que eleven su temperatura y vuelvan a colapsar. Una vez centrifugadas se separó el sobrenadante y el *pelet* se liofilizó.

Se determinó la concentración de colorante en cada sobrenadante por espectrofotometría UV-VIS, luego de realizada la curva de calibración correspondiente y por balance de masa, se calculó la cantidad de analito encapsulado en los NGs. La capacidad de carga (LC por sus siglas en inglés) y la eficiencia de encapsulamiento (EE) se calcularon de la siguiente manera [81]:

$$LC = \frac{\textit{masa de analito cargada}}{\textit{masa del sistema polimerico}} \times 100 \%$$

$$EE = \frac{\textit{masa de analito cargada}}{\textit{masa de analito adicionada}} \times 100 \%$$

Una vez realizados los estudios de capacidad de encapsulamiento, se llevaron a cabo los ensayos de liberación a dos temperaturas, 15 y 37 °C, y a dos valores de pH diferentes, 4,0 y 7,4. Para esto, 15,0 mg de NG cargado se colocaron en un equipo de liberación con membrana de

diálisis (Figura 5.4) y se disolvieron en 1,0 mL de buffer. Posteriormente, los ensayos de liberación se realizaron en 4,0 mL de buffer. A intervalos de tiempo regulares se extrajeron muestras del medio de liberación y se renovó con medio fresco. En el caso de las liberaciones a pH 7,4, a las extracciones se les adicionó HCl concentrado hasta llevarlos a un pH de alrededor de 4. La concentración de colorante en el medio de liberación extraído se determinó por espectrofotometría de UV-vis.

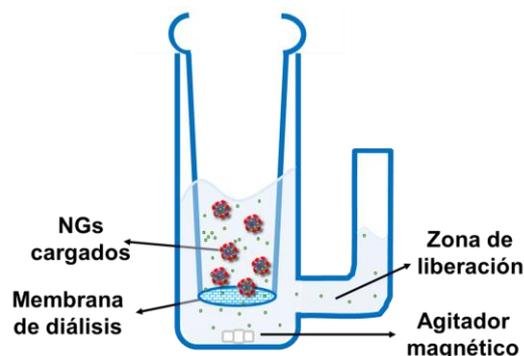


Figura 5.4. Esquema del sistema empleado para la liberación controlada de colorante a partir de los NGs.

5. 3. 2. Análisis de citotoxicidad de los NGs en células vaginales

Se llevaron a cabo los análisis de citotoxicidad de los NGs $P(VCL)_4$, $P(VCL-co-ABC^1)_4$ y $P(VCL-co-ABC^3)_4$, mediante ensayo de MTT con células TZM.bl modificadas genéticamente para producir luciferasa al ser infectadas por el virus del VIH-1. Se varió la concentración de los NGs desde 0,1 hasta $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. DMSO (10%) y medio de cultivo se utilizaron como controles positivos y negativos de muerte celular, respectivamente. Cada experimento se realizó por triplicado.

5. 3. 3. Estudio de la capacidad de los NGs para la inhibición de infección del virus de VIH

Luego de determinadas las concentraciones máximas admisibles de NGs, a través del ensayo de citotoxicidad, se realizaron ensayos de inhibición de la replicación de HIV-1 a los NGs, mediante luminiscencia con células TZM.bl modificadas genéticamente, utilizando g2-s16 como control negativo y medio de cultivo como control positivo. El g2-s16 se trata de un dendrímero sintetizado por el grupo de la Dra. María Angeles Muñoz-Fernandez que ha demostrado elevadas tasas de inhibición del virus. Se

utilizó luciferina para realizar el análisis cuantitativo por fluorescencia mediante la formación del complejo luciferina-luciferasa.

5. 4. Resultados y discusión

5. 4. 1. Estudio de la eficiencia de los NGs para la encapsulación y la liberación de verde de malaquita

Una vez caracterizados los distintos sistemas sintetizados, en una segunda etapa se continuó con los estudios preliminares de encapsulación y liberación de un colorante modelo, a fin de continuar con el análisis de la relación estructura/propiedad de los distintos NGs y, avanzar con las posibles aplicaciones para estos sistemas. Se seleccionó una molécula modelo, el colorante verde de malaquita, Figura 5.5.

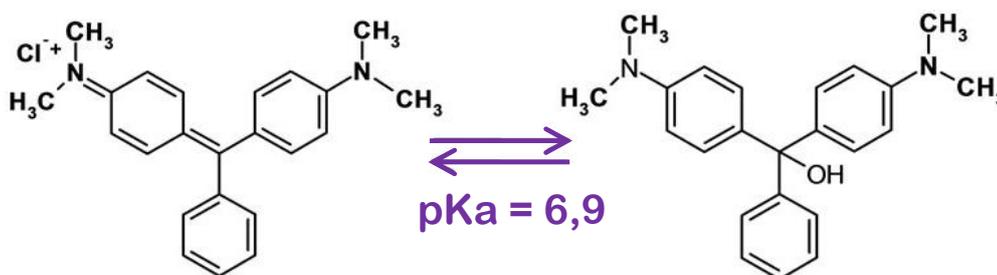


Figura 5.5. Estructura molecular del colorante Verde de Malaquita.

Para evaluar la cantidad de colorante incorporado en los sistemas, se analizaron los parámetros de EE y LC. En primera instancia, se compararon NGs de VCL con distintos porcentajes de BIS, para determinar la influencia del grado de entrecruzamiento de la red en la capacidad de encapsulamiento. Los resultados obtenidos se encuentran representados en la Figura 5.6. (a y b). En estos gráficos, se observa como la LC aumenta con la cantidad de colorante, es decir los NGs son capaces de incorporar mayor masa en su interior a mayor concentración de analito en el medio. En cuanto a la EE, la misma aumenta con la cantidad de colorante hasta que alcanza un plató (EE 37%). Además, se determinó que, tanto los valores obtenidos de EE como de LC, son similares para los tres sistemas, indicando que la encapsulación del colorante es independiente del grado de entrecruzamiento.

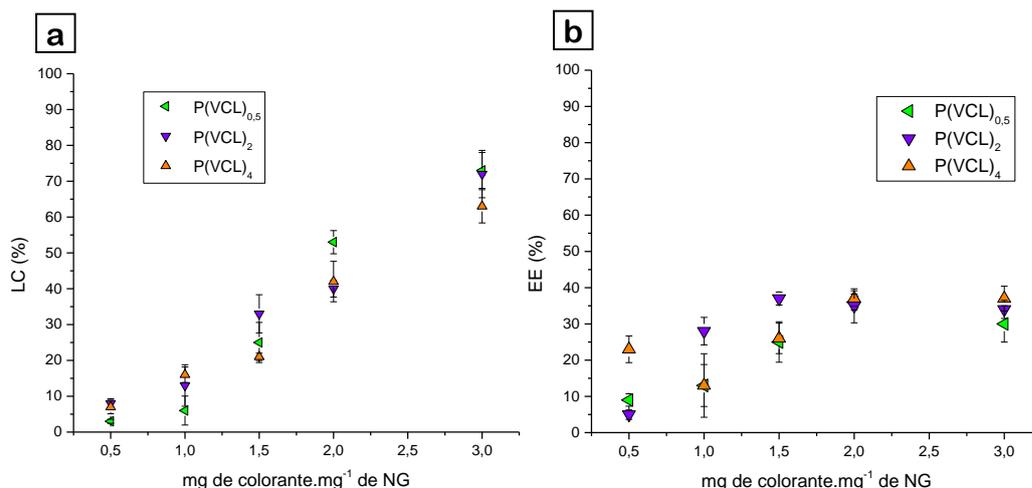


Figura 5.6. Gráficos de a) capacidad de carga y b) eficiencia de encapsulación en función de la cantidad de verde de malaquita para distintos sistemas P(VCL)_x.

Una vez determinada la capacidad de encapsulamiento de los sistemas homopoliméricos, se procedió a evaluar la influencia del grado de dendronización de los NGs. Se seleccionaron los NGs PVCL-ABC debido a su carácter más hidrofílico, propiedad particularmente importante para aplicaciones biomédicas, y considerando la posible respuesta frente a cambios de pH del medio que puedan presentar. Los valores de EE y LC obtenidos se encuentran representados gráficamente en la Figura 5.7. (a y b). A partir de los resultados obtenidos, se determinó en primer lugar que, los NGs con 0,5 % de dendronización presentan una capacidad de encapsulamiento y de carga muy similar a la de los NGs homopoliméricos.

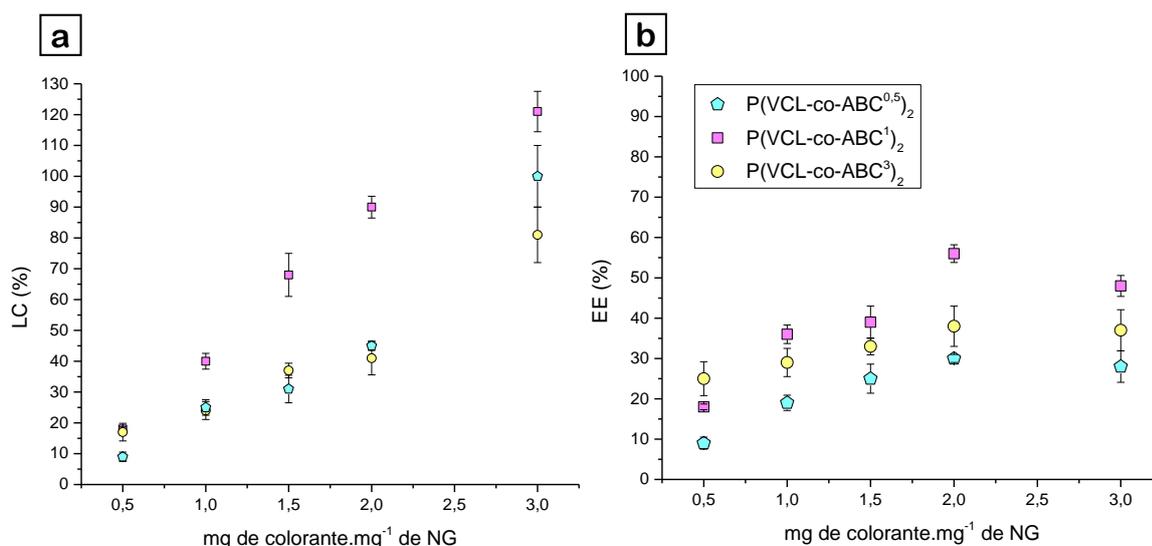


Figura 5.7. Gráficos de a) capacidad de carga y b) eficiencia de encapsulación en función de la cantidad de verde de malaquita para distintos sistemas P(VCL-co-ABC)_x.

En cambio, los NGs con 1% de dendrón mostraron un aumento de la EE de hasta un 20% y de un 40% del LC, lo que indicaría que este sistema presenta un efecto dendrítico positivo y que, una pequeña cantidad de dendrón influye marcadamente en el comportamiento del material. Es decir que, a pesar que las estructuras dendríticas son complejas e incluso en algunos casos costosas, el uso de cantidades mínimas representa ventajas muy significativas e imparten un valor agregado destacable al material final, minimizando las desventajas relacionadas al costo económico y sintético.

Por último, en cuanto a los valores de EE y LC obtenidos para los NGs con 3% de ABC, se observa una mejoría en la capacidad de encapsulación y carga con respecto a los NGs sin dendronizar o con 0,5% de dendrón, pero una disminución con respecto a los que poseen un 1% de ABC. Es decir, el aumento en el porcentaje de dendronización no se traduce en un material con mejores propiedades de carga. Esto es una consecuencia de la formación de uniones puente hidrógeno entre los grupos ácido de la periferia de ABC, que disminuyen la afinidad con el colorante y aumentan la interacción del tipo polímero-polímero. Este tipo de efectos suele ser denominado efecto dendrítico negativo y ha sido reportado previamente por nuestro grupo de investigación, donde se ha observado que, los sistemas dendríticos muestran un comportamiento óptimo hasta un determinado grado de dendronización, generalmente bajo, y por encima del cual las propiedades buscadas se pierden.[82]

Una vez determinados los valores de EE y LC de cada material, se llevaron a cabo los ensayos de liberación a temperatura ambiente (aproximadamente 15 °C) y 37 °C y a dos valores de pH diferentes, 4 y 7,4. Los valores obtenidos se representan en la Figura 5.8.

Una característica general que se observa es que, los valores de liberación obtenidos no superan el 50 %. Este comportamiento evidencia las fuerzas intermoleculares que predominan en cada sistema, para los NGs dendríticos, la interacción es fundamentalmente del tipo iónica, entre el colorante y los grupos funcionales de la periferia del dendrón, y para los NGs homopoliméricos, las fuerzas son más bien del tipo hidrofóbicas, entre los anillos aromáticos del colorante y el anillo lactama del monómero.

A los valores de pH de liberación, tanto el verde de malaquita como el dendrón ABC, se encuentran parcialmente ionizados. Para el dendrón, el valor de pKa de los grupos ácido se encuentran alrededor de 5 [19] es decir que, probablemente a pH 7,4 se encuentra en gran parte deprotonado y a pH 4, aunque la mayoría de los grupos ácido están protonados, existe una pequeña cantidad sin protonar. En cuanto al colorante, tiene un pKa de alrededor de 7 [83], es decir que a pH 4 predomina la carga positiva y a pH 7,4 un porcentaje alto de las moléculas aún conservarán la carga. De esta manera, la interacción iónica existente entre el colorante y los grupos carboxilato del dendrón, dificulta en todos los casos la liberación. Esto explica, además, la diferencia notable entre los porcentajes de liberación a pH 4 y a pH 7,4 para los NGs de PVCL-ABC, donde dichas interacciones iónicas predominan al mayor valor de pH. La máxima liberación alcanzada a pH 7,4, para todos los NGs, ronda entre un 4 y un 10 % en cambio, a pH 4 estos porcentajes llegan a valores entre un 20 y 45 %.

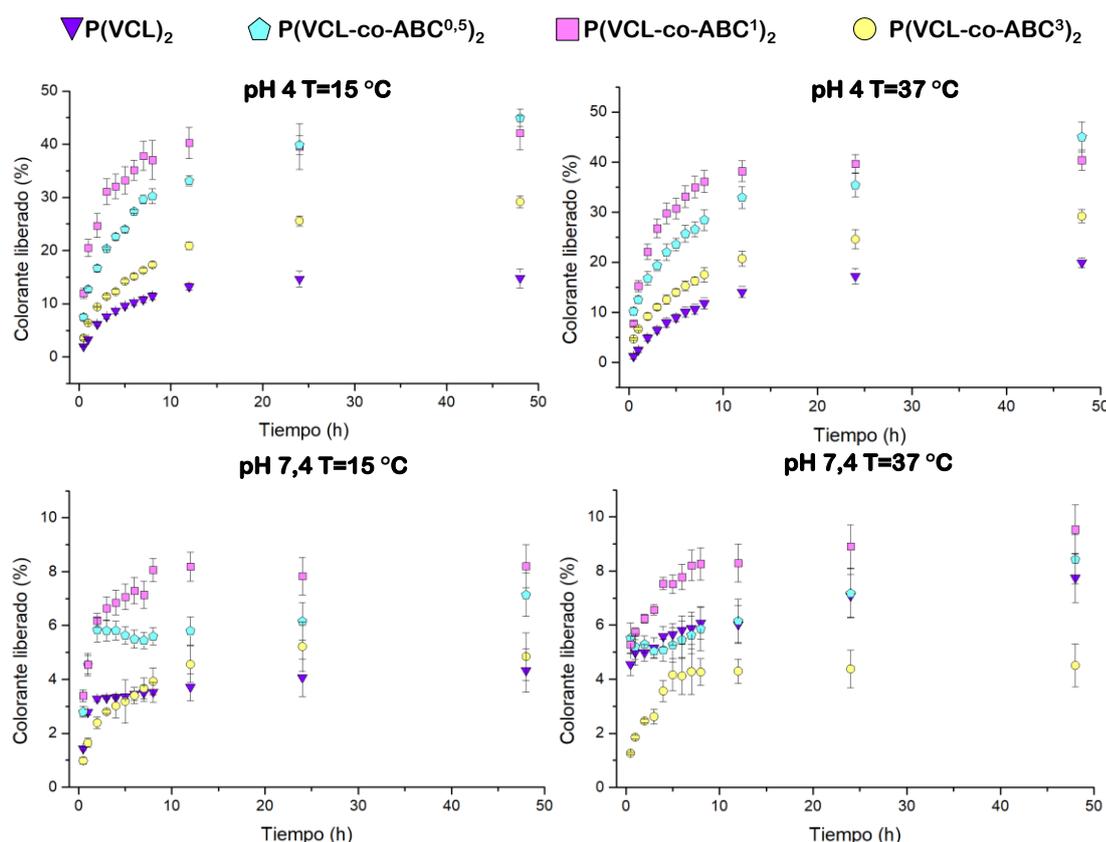


Figura 5.8. Perfiles de liberación del colorante para distintos pH y temperaturas.

En cuanto al comportamiento mostrado a diferentes temperaturas, para los NGs de PVCL, se observa un aumento en la cantidad de colorante liberado a 37 °C (aunque nunca llega al 100%), no así en el caso de los NGs dendríticos, donde el porcentaje de verde de malaquita liberado no cambia considerablemente con la temperatura. Esto puede deberse a las interacciones iónicas que aún persisten y que, al colapsar los materiales las moléculas dendríticas quedan expuestas y se aglomeran dejando al colorante atrapado en una red de interacciones iónicas (Figura 5.9.).

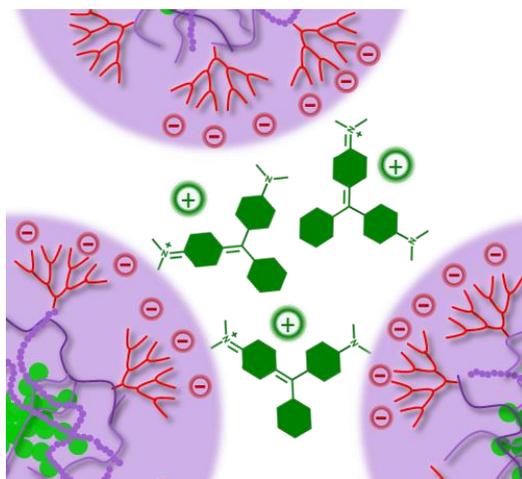


Figura 5.9. Esquema de interacciones iónicas y aglomeración de los NGs a 37°C.

De este modo, los NGs demostraron poseer un comportamiento controlable con el pH del medio. Resultando sistemas atractivos por su capacidad de transportar moléculas iónicas a través del torrente sanguíneo, con gran control de la liberación de las mismas mientras el valor de pH es aproximadamente 7,0. Mientras que, cuando el pH es más ácido, en el tejido tumoral por ejemplo y en un proceso de endocitosis, se produciría un significativo aumento en la cantidad de fármaco liberado, logrando así una liberación controlada del mismo en el sitio deseado. Además, a pH ácido a 37°C, la liberación se produce de manera sostenida, llegando a un 90% del total del colorante liberado, entre las 12 y las 24 horas en todos los casos. Esto evita llegar a una concentración de fármaco que supere el límite de toxicidad del mismo, disminuyendo problemas colaterales o reacciones secundarias que suelen surgir en el consumo de medicamentos.

Cabe destacar que, en casi todos los casos se obtiene una mayor liberación de la molécula, además de una mayor encapsulación, en los NG PVCL-ABC frente a los homopoliméricos. Este comportamiento evidencia nuevamente el efecto dendrítico sobre el comportamiento de encapsulación/liberación, siendo mayor para los NGs con solamente 1% de dendrón, demostrando que se pueden mejorar significativamente las características de un material con un porcentaje de dendronización bajo.

Finalmente, estos resultados evidenciaron una vez más que, el comportamiento de los NGs está claramente gobernado por el bloque dendrítico y las interacciones que se establecen entre los grupos funcionales presentes en la periferia, ya sea en estado hinchado (bajas temperaturas) o colapsado (altas temperaturas), y las moléculas del colorante.

5. 4. 2. Análisis de citotoxicidad de los NGs en células vaginales

Se evaluó la toxicidad de algunos NGs en una línea celular epitelial cervicovaginal, mediante el uso de un ensayo de actividad metabólica (MTT). Se probó un rango de concentración de 0,01 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y 48 h de exposición.

Los NGs elegidos para realizar este estudio fueron $\text{P}(\text{VCL})_4$, $\text{P}(\text{VCL-co-ABC}^1)_4$ y $\text{P}(\text{VCL-co-ABC}^3)_4$ y los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.10.

En primer lugar, se puede observar un evidente cambio de comportamiento de la citotoxicidad de los NGs dendronizados frente a los NGs sin dendrón. Para los primeros, existe cierta tendencia donde, la viabilidad celular disminuye al aumentar la concentración de los NGs en el medio. En cambio, en los NGs homopoliméricos, hasta cierta concentración no se observa prácticamente citotoxicidad y a partir de los 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ la viabilidad celular cae alrededor de un 40 % y se mantiene constante. Estos resultados evidencian la presencia nuevamente de un efecto dendrítico que controla el comportamiento de la citotoxicidad de la red.

Además, al comparar los NGs con 1 % de dendrón frente a los NGs sin dendronizar, a concentraciones altas, con los primeros se observan mayores porcentajes de viabilidad celular, indicando que la presencia del dendrón disminuye la toxicidad del material. En cambio, con los NGs con

3 % de ABC a altas concentraciones, se observan niveles similares de viabilidad celular a los NGs sin dendronizar. Nuevamente, este comportamiento puede deberse a un efecto dendrítico negativo al aumentar la concentración de dendrón o podría estar relacionado al mayor tamaño de los NGs con 3% de dendrón.

Una vez más, la capacidad para gobernar las propiedades y comportamiento de los NGs, se logra con bajos porcentajes de dendronización.

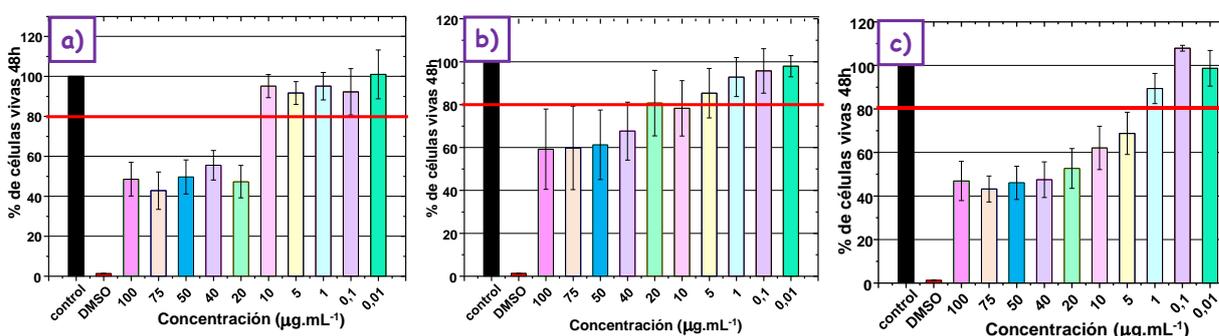


Figura 5.10. Gráficos de viabilidad celular con células TZM.bl modificadas genéticamente frente a: concentración de NGs de a) P(VCL)₄, b) P(VCL-co-ABC¹)₄ y c) P(VCL-co-ABC³)₄.

Por último, estos estudios permitirían asegurar que los NGs evaluados resultarían aptos para ser utilizados en la síntesis de nanomateriales con potenciales aplicaciones en biomedicina, ya que las concentraciones de NGs necesarias para observar altos niveles de citotoxicidad, son suficientemente elevadas.

5. 4. 3. Estudio de la capacidad de los NGs frente a la inhibición de infección del virus de VIH

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un virus que infecta a las células del sistema inmunitario, alterando o anulando su función.[84]

El VIH puede transmitirse por relaciones sexuales vaginales, anales u orales con una persona infectada, la transfusión de sangre contaminada o el uso compartido de agujas, jeringas u otros instrumentos punzantes. Asimismo, puede transmitirse de la madre al hijo durante el embarazo, el parto y la lactancia.[84]

El Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH / SIDA (ONUSIDA) estima que a finales de 2020 a nivel mundial aproximadamente 37,7 millones de personas convivían con el virus del VIH. En ese mismo año murieron 680 mil personas por causas relacionadas con el VIH y 1,5 millones de personas contrajeron la infección. De todas las personas VIH positivos de ese año, solo 27,5 millones se encontraban en tratamiento con antirretrovirales. Esto equivale a una tasa mundial de cobertura del 73% de los adultos y el 54% de los niños.[84] Por ejemplo, incluso en los Estados Unidos, uno de los países mejor posicionados en el mundo a nivel económico, se estima que solo el 28% de las personas infectadas por el VIH se encontraban en tratamiento.[85,86]

Más de dos tercios de todas las personas con el VIH viven en la región del África subsahariana (25,3 millones) y, es por esto que, se ha establecido firmemente como el epicentro mundial del VIH / SIDA y representa el mayor desafío para la salud mundial en los tiempos modernos.[84,85] Si bien el VIH es prevalente entre la población en general en esta región, un número cada vez mayor de nuevas infecciones se producen entre un grupo de población en particular.[84] Más de 5 mil mujeres se infectan con el VIH semanalmente, y la mayoría de estas nuevas infecciones ocurren en África subsahariana, en mujeres jóvenes que lo adquieren en un promedio de 5 a 7 años antes que los hombres, junto con Sudáfrica tienen una de las tasas de incidencia más altas.[74,85,87] Se cree que esto se debe a una economía limitada, falta de educación, razones religiosas, la disparidad de género y la violencia que llevan a que en general, la mujer no puede controlar/decidir sus encuentros sexuales, lo que aumenta la exposición a situaciones de riesgo y crea obstáculos para acceder a servicios de prevención, detección y tratamiento del VIH eficaces, de calidad y asequibles.[84,87]

Existen dos tipos de virus del VIH el 1 y el 2, siendo el VIH-1 el más predominante a nivel mundial.[88] En los últimos años, el uso de microbicidas tópicos de larga duración, controlados por mujeres y eficaces para disminuir y controlar la epidemia de VIH-1 entre las mujeres ha surgido con fuerza.[89–92] Como se ha mencionado anteriormente, muchos compuestos con actividad anti-VIH-1 han sido probados como microbicidas tópicos, como los polisacáridos sulfatados como el carragenano y el dextrano sulfatado, [72,73] medicamentos como tenofovir [74–76] o dapivirina [77] y nanoestructuras como los

dendrimeros [78–80]. Sin embargo, la mayoría de ellos han fallado en los ensayos clínicos, debido a la toxicidad vaginal y la irritación, aumentando la susceptibilidad a las infecciones de transmisión sexual en lugar de proporcionar protección.[93,94] Es por todo esto que, resulta necesario, realizar este tipo de ensayos antes de evaluar la capacidad de inhibición frente al virus.[95]

Luego de evaluar la citotoxicidad de los NGs $P(VCL)_4$, $P(VCL-co-ABC^1)_4$ y $P(VCL-co-ABA^3)_4$ en una línea celular epitelial cervicovaginal, se ensayaron como candidatos potenciales para su uso en la formulación de microbicidas tópicos anti-VIH. Las concentraciones se consideraron no tóxicas para esta aplicación en particular, si la viabilidad celular era superior al 80% en comparación con el control no tratado, siguiendo protocolos anteriores. Por lo cual, $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ fue la concentración máxima probada para los NGs $P(VCL)_4$ y $P(VCL-co-ABC^1)_4$ y $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para $P(VCL-co-ABA^3)_4$ (Figura 5.11.). Si bien para $P(VCL-co-ABC^1)_4$, se observa una viabilidad celular ligeramente menor al 80 % a concentraciones de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ y dicha viabilidad es mayor con una concentración de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$, se consideró que puede existir una inversión de los porcentajes de citotoxicidad según la tendencia, por lo que se realizaron los ensayos con una concentración máxima de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para el NG $P(VCL-co-ABC^1)_4$. Cabe aclarar que, dicha desviación de la tendencia pudo deberse a la falta de repeticiones del ensayo y a la complejidad del sistema, razones por lo cual también se obtuvieron valores poco precisos, lo que se refleja en las barras de error representadas en el gráfico b de la Figura 5.10.

Una vez definidas las concentraciones máximas de NG para cada sistema, se llevaron a cabo ensayos de inhibición del VIH-1, para determinar la eficacia anti-VIH-1 de cada material. Se seleccionó el virus aislado R5-HIV-1_{NLAD8}, ya que es un virus de laboratorio ampliamente utilizado predominantemente en los primeros pasos de la infección por VIH-1[96] y los resultados obtenidos se detallan en la Figura 5.11. Lo primero que se observa es que, efectivamente tanto $P(VCL)_4$ como $P(VCL-co-ABC^1)_4$ presentan un efecto inhibitorio contra el aislado R5-HIV-1 *in vitro*, ya que se obtuvieron tasas de inhibición de alrededor del 75 y 85 %, respectivamente, a la concentración máxima no tóxica ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Si bien con $P(VCL-co-ABA^3)_4$, dicho efecto no se observa, esto puede deberse simplemente a las bajas concentraciones con las que fue posible realizar los ensayos. En todos los casos la capacidad de inhibir la

infección por VIH-1 disminuye a medida que baja la concentración del NG, ejerciendo un efecto dependiente de la dosis.

A partir de estos resultados se podría asegurar que la presencia del dendrón en la red polimérica mejora considerablemente la capacidad inhibitoria del NG, ya que se observó alrededor de un 10 % más de inhibición con tan solo un 1 % de dendronización.

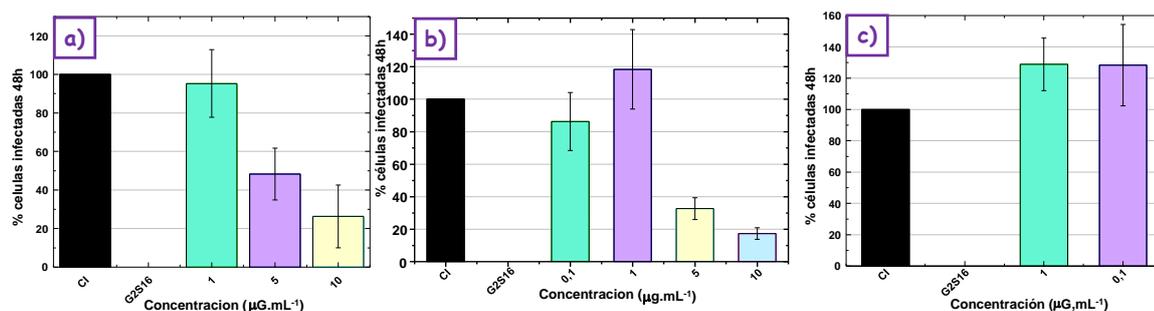


Figura 5.11. Gráficos de % de células infectadas en función de la concentración de NG de: a) P(VCL)₄, b) P(VCL-co-ABC¹)₄ y c) P(VCL-co-ABC³)₄.

Por otro lado, ya que los NGs de P(VCL)₄ sintetizados no pueden formar restos aniónicos, que han demostrado ser importantes para la actividad antiviral, su efecto inhibitor provendría exclusivamente de los grupos funcionales de la matriz polimérica.

Recientemente, se publicó una patente en la que se usaron formulaciones hipotónicas de hidrogel sintético basado en poloxámer, como barreras vaginales o de la mucosa colorrectal.[95,97] Se demostró su capacidad para atrapar virus, incluido el VIH. Este trabajo constituye, según nuestro conocimiento, el único informe del uso de hidrogeles poliméricos sintéticos como agentes anti-VIH por sí mismos. Por esto y, respaldados en todos los resultados presentados se está en condiciones de decir que, por primera vez, los NGs podrían considerarse candidatos para un nuevo microbicida tópico contra el VIH-1. Sin embargo, se requieren más estudios para revelar los mecanismos involucrados en este efecto inhibitorio.

5. 5. Conclusiones parciales

Se realizaron ensayos de encapsulación y liberación de un colorante modelo con los sistemas copoliméricos VCL-ABC. Los mismos demostraron que, la incorporación de 1% de dendrón en los nanovehículos lleva a un aumento de la EE de hasta un 20% y de un 40% del LC, es decir a un aumento notable en la capacidad de encapsulación, lo que indicaría que este sistema presenta un efecto dendrítico positivo. Sin embargo, los valores de EE y LC obtenidos para los NGs con 3% de ABC muestran una disminución con respecto a los que poseen un 1%. Es decir, el aumento en el porcentaje de dendronización no se traduce en un material con mejores propiedades de carga. Este tipo de efectos suele ser denominado efecto dendrítico negativo y ha sido reportado previamente por nuestro grupo de investigación.

Estos NGs además de su capacidad de encapsulación, demostraron poseer una respuesta frente al pH, lo que los convierte en sistemas más que prometedores para su aplicación en liberación controlada de fármacos. Aunque, no mostraron un comportamiento dependiente con la temperatura para la liberación de un compuesto iónico (verde de malaquita), no debe generalizarse esta conclusión antes de evaluar este comportamiento estudiando un espectro de moléculas de diferentes características físico-químicas. Si bien estos sistemas no resultan ideales para transportar fármacos iónicos cuando se busca cierta respuesta a la temperatura, pueden resultar adecuados para otro tipo de compuestos. Esta conclusión se fundamenta en la experiencia previa de nuestro grupo de investigación. Se ha demostrado que, NGs basados en P(NIPAM-co-ABC), muestran un comportamiento como agentes de liberación controlada de ciertos fármacos, dependiente tanto del pH como de la temperatura.

Además, en búsqueda de diferentes y novedosas aplicaciones para los sistemas desarrollados en esta Tesis, se realizaron ensayos de viabilidad celular para los NGs P(VCL)₄ y NGs dendríticos con 1 y 3 % de ABC, en una línea celular epitelial cervicovaginal y luego se realizaron ensayos de inhibición contra el virus del VIH- 1. Los mismos demostraron que nuevamente los NGs con 1 % de dendrón resultan los más prometedores para ser utilizados como microbicidas tópicos contra el virus, mostrando una capacidad de inhibición contra la infección de casi un 85 %. Quedan pendientes para realizar en el futuro, los estudios necesarios para

determinar el mecanismo por el cual se produce este efecto de inhibición por parte de los materiales frente al virus del VIH-1.

Los resultados alcanzados en esta última etapa de trabajo, han permitido establecer una clara relación estructura-reactividad. Se ha evidenciado una vez más, la influencia del bloque dendrítico en el comportamiento de los materiales y la baja concentración necesaria para generar este efecto. Todo esto, corrobora la hipótesis inicial de esta Tesis, en la que se planteó a estos biomateriales como excelentes candidatos para su utilización en diferentes áreas de la nanomedicina, pudiendo así cumplir con los objetivos planteados inicialmente.

5. 6. Bibliografía

- [1] R.S. Langer, N.A. Peppas, Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems, *Biomaterials*. 2 (1981) 201–214.
- [2] J. Kim, J. Yang, J. Lee, G. Choi, D. Park, M. Jo, S. Choi, J. Choy, 2D Inorganic–Antimalarial Drug–Polymer Hybrid with pH-Responsive Solubility, *Chem. Asian J.* 10 (2015) 2264–2271.
- [3] G. Choi, J.-H. Lee, Y.-J. Oh, Y. Bin Choy, M.C. Park, H.C. Chang, J.-H. Choy, Inorganic-polymer nanohybrid carrier for delivery of a poorly-soluble drug, ursodeoxycholic acid, *Int. J. Pharm.* 402 (2010) 117–122.
- [4] M. Baek, J.-H. Choy, S.-J. Choi, Montmorillonite intercalated with glutathione for antioxidant delivery: Synthesis, characterization, and bioavailability evaluation, *Int. J. Pharm.* 425 (2012) 29–34.
- [5] M.R. Berber, K. Minagawa, M. Katoh, T. Mori, M. Tanaka, Nanocomposites of 2-arylpropionic acid drugs based on Mg–Al layered double hydroxide for dissolution enhancement, *Eur. J. Pharm. Sci.* 35 (2008) 354–360.
- [6] J.-H. Lee, G. Choi, Y.-J. Oh, J.W. Park, Y. Bin Choy, M.C. Park, Y.J. Yoon, H.J. Lee, H.C. Chang, J.-H. Choy, A nanohybrid system for taste masking of sildenafil, *Int. J. Nanomedicine*. 7 (2012) 1635.
- [7] S.-J. Choi, G.E. Choi, J.-M. Oh, Y.-J. Oh, M.-C. Park, J.-H. Choy, Anticancer drug encapsulated in inorganic lattice can overcome drug resistance, *J. Mater. Chem.* 20 (2010) 9463–9469.
- [8] Z. Gu, B.E. Rolfe, A.C. Thomas, J.H. Campbell, G.Q.M. Lu, Z.P. Xu, Cellular trafficking of low molecular weight heparin incorporated in layered double hydroxide nanoparticles in rat vascular smooth muscle cells, *Biomaterials*. 32 (2011) 7234–7240.
- [9] H.-E. Chung, D.-H. Park, J.-H. Choy, S.-J. Choi, Intracellular trafficking pathway of layered double hydroxide nanoparticles in human cells: size-dependent cellular delivery, *Appl. Clay Sci.* 65 (2012) 24–30.
- [10] T.-H. Kim, J.Y. Lee, M.-K. Kim, J.H. Park, J.-M. Oh, Radioisotope Co-57 incorporated layered double hydroxide nanoparticles as a cancer imaging agent, *RSC Adv.* 6 (2016) 48415–48419.
- [11] J.-H. Choy, J.-S. Jung, J.-M. Oh, M. Park, J. Jeong, Y.-K. Kang, O.-J. Han, Layered double hydroxide as an efficient drug reservoir for folate derivatives, *Biomaterials*. 25 (2004) 3059–3064.
- [12] C. Li, R. Liang, R. Tian, S. Guan, D. Yan, J. Luo, M. Wei, D.G. Evans, X. Duan, A targeted agent with intercalation structure for cancer near-infrared imaging and photothermal therapy, *RSC Adv.* 6 (2016) 16608–16614.
- [13] T.K. Jain, M.A. Morales, S.K. Sahoo, D.L. Leslie-Pelecky, V. Labhasetwar, Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents, *Mol. Pharm.* 2 (2005) 194–205.
- [14] T. Watanabe, A. Hirao, Precise Synthesis of Dendrimer-Like Star-Branched Poly (methyl methacrylate) s with Different Branched Architectures up to Third-Generation by Iterative Methodology, in: *Macromol. Symp.*, Wiley Online Library, 2006: pp. 5–13.
- [15] H.-C. Shin, A.W.G. Alani, H. Cho, Y. Bae, J.M. Kolesar, G.S. Kwon, A 3-in-1 polymeric micelle nanocontainer for poorly water-soluble drugs, *Mol. Pharm.* 8 (2011) 1257–1265.
- [16] C.E. Smith, A. Shkumatov, S.G. Withers, B. Yang, J.F. Glockner, S. Misra, E.J. Roy, C.-H. Wong, S.C. Zimmerman, H. Kong, A polymeric fastener can easily functionalize liposome surfaces with gadolinium for enhanced magnetic resonance imaging, *ACS Nano*. 7 (2013) 9599–9610.
- [17] J. Bergueiro, M. Calderón, Thermoresponsive nanodevices in biomedical applications, *Macromol. Biosci.* 15 (2014) 183–199.
- [18] K. Madhusudana Rao, K.S.V. Krishna Rao, G. Ramanjaneyulu, C.S. Ha, Curcumin encapsulated pH sensitive gelatin based interpenetrating polymeric network nanogels for anti cancer drug delivery, *Int. J. Pharm.* 478 (2015) 788–795.

- [19] G.N. Rimondino, E. Miceli, M. Molina, S. Wedepohl, S. Thierbach, E. Rühl, M. Strumia, M. Martinelli, M. Calderón, Rational design of dendritic thermoresponsive nanogels that undergo phase transition under endolysosomal conditions, *J. Mater. Chem. B* 5 (2017) 866–874.
- [20] S.K. Samal, M. Dash, S. Van Vlierberghe, D.L. Kaplan, E. Chiellini, C. Van Blitterswijk, L. Moroni, P. Dubruel, Cationic polymers and their therapeutic potential, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 7147–7194.
- [21] J. Ramos, J. Forcada, R. Hidalgo-Alvarez, Cationic polymer nanoparticles and nanogels: From synthesis to biotechnological applications, *Chem. Rev.* 114 (2014) 367–428.
- [22] M.D. Bhavsar, M.M. Amiji, Polymeric nano- and microparticle technologies for oral gene delivery., *Expert Opin. Drug Deliv.* 4 (2007) 197–213.
- [23] T.G. Shutava, Y.M. Lvov, Nano-engineered microcapsules of tannic acid and chitosan for protein encapsulation, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6 (2006) 1655–1661.
- [24] H. Ayame, N. Morimoto, K. Akiyoshi, Self-assembled cationic nanogels for intracellular protein delivery, *Bioconjug. Chem.* 19 (2008) 882–890.
- [25] J. Khandare, M. Calderón, N.M. Dagia, R. Haag, Multifunctional dendritic polymers in nanomedicine: opportunities and challenges, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 2824–2848.
- [26] R. Haag, F. Kratz, Polymer therapeutics: concepts and applications, *Angew. Chemie Int. Ed.* 45 (2006) 1198–1215.
- [27] Q. He, S. Guo, Z. Qian, X. Chen, Development of individualized anti-metastasis strategies by engineering nanomedicines, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 6258–6286.
- [28] D.-E. Lee, H. Koo, I.-C. Sun, J.H. Ryu, K. Kim, I.C. Kwon, Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 2656–2672.
- [29] M. Estanqueiro, M.H. Amaral, J. Conceição, J.M.S. Lobo, Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: the state of the art, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 126 (2015) 631–648.
- [30] E. Pérez-Herrero, A. Fernández-Medarde, Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 93 (2015) 52–79.
- [31] S.K. Hobbs, W.L. Monsky, F. Yuan, W.G. Roberts, L. Griffith, V.P. Torchilin, R.K. Jain, Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95 (1998) 4607–4612.
- [32] Y. Matsumura, H. Maeda, A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs, *Cancer Res.* 46 (1986) 6387–6392.
- [33] Y. Rojas-Aguirre, K. Aguado-Castrejón, I. González-Méndez, La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿La (r)evolución de la terapia contra el cáncer?, *Educ. Química* 27 (2016) 286–291.
- [34] W. Dai, X. Wang, G. Song, T. Liu, B. He, H. Zhang, X. Wang, Q. Zhang, Combination antitumor therapy with targeted dual-nanomedicines, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 115 (2017) 23–45.
- [35] I.F. Tannock, D. Rotin, Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation, *Cancer Res.* 49 (1989) 4373–4384.
- [36] S. Mukherjee, R.N. Ghosh, F.R. Maxfield, Endocytosis, *Physiol. Rev.* 77 (1997) 759–803.
- [37] G. Prencipe, S.M. Tabakman, K. Welsher, Z. Liu, A.P. Goodwin, L. Zhang, J. Henry, H. Dai, PEG branched polymer for functionalization of nanomaterials with ultralong blood circulation, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 4783–4787.
- [38] F. Alexis, E. Pridgen, L.K. Molnar, O.C. Farokhzad, Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles, *Mol. Pharm.* 5 (2008) 505–515.
- [39] J.K. Gour, A. Srivastava, V. Kumar, S. Bajpai, H. Kumar, M. Mishra, R.K. Singh, Nanomedicine

- and leishmaniasis: future prospects, *Dig. J. Nanomater. Biostructures*. 4 (2009) 495–499.
- [40] R.K. Jain, T. Stylianopoulos, Delivering nanomedicine to solid tumors, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 7 (2010) 653–664.
- [41] M.E. Davis, Z. Chen, D.M. Shin, Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer, *Nanosci. Technol. A Collect. Rev. from Nat. Journals*. 7 (2010) 239–250.
- [42] Y. Gao, J. Xie, H. Chen, S. Gu, R. Zhao, J. Shao, L. Jia, Nanotechnology-based intelligent drug design for cancer metastasis treatment, *Biotechnol. Adv.* 32 (2014) 761–777.
- [43] E. Polo, M. Collado, B. Pelaz, P. Del Pino, Advances toward More Efficient Targeted Delivery of Nanoparticles, *ACS Nano*. 11 (2017) 2397–2402.
- [44] E. Blanco, H. Shen, M. Ferrari, Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery, *Nat. Biotechnol.* 33 (2015) 941–951.
- [45] E. Huynh, G. Zheng, Cancer nanomedicine: addressing the dark side of the enhanced permeability and retention effect, *Nanomedicine*. 10 (2015) 1993–1995.
- [46] J.W. Nichols, Y.H. Bae, EPR: Evidence and fallacy, *J. Control. Release*. 190 (2014) 451–464.
- [47] A.G. Arranja, V. Pathak, T. Lammers, Y. Shi, Tumor-targeted nanomedicines for cancer theranostics, *Pharmacol. Res.* 115 (2017) 87–95.
- [48] S.K. Sriraman, B. Aryasomayajula, V.P. Torchilin, Barriers to drug delivery in solid tumors, *Tissue Barriers*. 2 (2014) 58–65.
- [49] A. Bordat, T. Boissenot, J. Nicolas, N. Tsapis, Thermoresponsive polymer nanocarriers for biomedical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 138 (2019) 167–192.
- [50] R. Colombo, L.F. Da Pozzo, A. Salonia, P. Rigatti, Z. Leib, J. Baniel, E. Caldarera, M. Pavone-Macaluso, Multicentric study comparing intravesical chemotherapy alone and with local microwave hyperthermia for prophylaxis of recurrence of superficial transitional cell carcinoma., *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 21 (2003) 4270–4276.
- [51] T. Boissenot, A. Bordat, E. Fattal, N. Tsapis, Ultrasound-triggered drug delivery for cancer treatment using drug delivery systems: from theoretical considerations to practical applications, *J. Control. Release*. 241 (2016) 144–163.
- [52] P. Wust, M. Seebass, J. Nadobny, P. Deuffhard, G. Mönich, R. Felix, Simulation studies promote technological development of radiofrequency phased array hyperthermia, *Int. J. Hyperth.* 25 (2009) 517–528.
- [53] T. Brockow, Mild water-filtered near-infrared whole-body hyperthermia as an adjunct to a standard multimodal rehabilitation in the treatment of fibromyalgia: results from a randomized controlled trial, *Eur. J. Integr. Med.* 1 (2008) 15.
- [54] A. Jordan, R. Scholz, P. Wust, H. Fähling, R. Felix, Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles, *J. Magn. Mater.* 201 (1999) 413–419.
- [55] R.T.P. Poon, N. Borys, Lyso-thermosensitive liposomal doxorubicin: a novel approach to enhance efficacy of thermal ablation of liver cancer, *Expert Opin. Pharmacother.* 10 (2009) 333–343.
- [56] Y. Gao, J. Xie, H. Chen, S. Gu, R. Zhao, J. Shao, L. Jia, Nanotechnology-based intelligent drug design for cancer metastasis treatment, *Biotechnol. Adv.* 32 (2014) 761–777.
- [57] N. Kamaly, Z. Xiao, P.M. Valencia, A.F. Radovic-Moreno, O.C. Farokhzad, Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 2971–3010.
- [58] H.K. Patra, A.P.F. Turner, The potential legacy of cancer nanotechnology: cellular selection, *Trends Biotechnol.* 32 (2014) 21–31.

- [59] D. Peer, J.M. Karp, S. Hong, O.C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy, *Nat. Nanotechnol.* 2 (2007) 751–760.
- [60] S.E. Stiriba, H. Frey, R. Haag, Dendritic polymers in biomedical applications: From potential to clinical use in diagnostics and therapy, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 41 (2002) 1329–1334.
- [61] C. Kojima, K. Kono, K. Maruyama, T. Takagishi, Synthesis of polyamidoamine dendrimers having poly (ethylene glycol) grafts and their ability to encapsulate anticancer drugs, *Bioconjug. Chem.* 11 (2000) 910–917.
- [62] N. Malik, E.G. Evagorou, R. Duncan, Dendrimer-platinate: a novel approach to cancer chemotherapy, *Anticancer. Drugs.* 10 (1999) 767–776.
- [63] R. Duncan, N. Malik, Dendrimers: biocompatibility and potential for delivery of anticancer agents, *Proc Int Symp Control Release Bioact Mater.* 23 (1996) 105–106.
- [64] R.F. Barth, D.M. Adams, A.H. Soloway, F. Alam, M. V Darby, Boronated starburst dendrimer-monoclonal antibody immunoconjugates: evaluation as a potential delivery system for neutron capture therapy, *Bioconjug. Chem.* 5 (1994) 58–66.
- [65] S.H. Battah, C.-E. Chee, H. Nakanishi, S. Gerscher, A.J. MacRobert, C. Edwards, Synthesis and biological studies of 5-aminolevulinic acid-containing dendrimers for photodynamic therapy, *Bioconjug. Chem.* 12 (2001) 980–988.
- [66] E.R. Gillies, J.M.J. Fréchet, Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery, *Drug Discov. Today.* 10 (2005) 35–43.
- [67] J.F.G.A. Jansen, E.W. Meijer, E.M.M. de Brabander-van den Berg, The Dendritic Box: Shape-Selective Liberation of Encapsulated Guests, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 4417–4418.
- [68] M. Liu, K. Kono, J.M.J. Fréchet, Water-soluble dendritic unimolecular micelles: Their potential as drug delivery agents, *J. Control. Release.* 65 (2000) 121–131.
- [69] O.L. Padilla De Jesús, H.R. Ihre, L. Gagne, J.M.J. Fréchet, F.C. Szoka, Polyester dendritic systems for drug delivery applications: in vitro and in vivo evaluation, *Bioconjug. Chem.* 13 (2002) 453–461.
- [70] M. Nishikawa, Y. Takakura, M. Hashida, Pharmacokinetic evaluation of polymeric carriers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 21 (1996) 135–155.
- [71] C.C. Lee, S.M. Grayson, J.M.J. Fréchet, Synthesis of narrow-polydispersity degradable dendronized aliphatic polyesters, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 42 (2004) 3563–3578.
- [72] D. Marais, D. Gawarecki, B. Allan, K. Ahmed, L. Altini, N. Cassim, F. Gopolang, M. Hoffman, G. Ramjee, A.L. Williamson, The effectiveness of Carraguard, a vaginal microbicide, in protecting women against high-risk human papillomavirus infection, *Antivir. Ther.* 16 (2011) 1219–1226.
- [73] J. López-Aldeguer, K. Aguirrebengoa, J. Ramón Arribas, J.A. Esté, J. María Kindelán, New targets and new drugs in the treatment of HIV, *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 23 (2005) 33–40.
- [74] N.R. Klatt, R. Cheu, K. Birse, A.S. Zevin, M. Perner, L. Noël-romas, A. Grobler, G. Westmacott, I.Y. Xie, J. Butler, L. Mansoor, L.R. Mckinnon, J.S. Passmore, Q.A. Karim, S.S.A. Karim, A.D. Burgener, Vaginal bacteria modify HIV tenofovir microbicide efficacy in African women, *Science* (80-.). 356 (2017) 938–945.
- [75] R.D. Jayant, S. Tiwari, V. Atluri, A. Kaushik, A. Tomitaka, A. Yndart, L. Colon-Perez, M. Febo, M. Nair, Multifunctional Nanotherapeutics for the Treatment of neuroAIDS in Drug Abusers, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1–12.
- [76] G. Andrei, A. Lisco, C. Vanpouille, A. Introini, E. Balestra, J. Van Den Oord, T. Cihlar, C. Perno, R. Snoeck, L. Margolis, J. Balzarini, Article Topical Tenofovir , a Microbicide Effective against HIV , Inhibits Herpes Simplex Virus-2 Replication, *CHOM.* 10 (2011) 379–389.
- [77] B. Devlin, J. Nuttall, S. Wilder, C. Woodsong, Z. Rosenberg, Development of dapivirine vaginal ring for HIV prevention, *Antiviral Res.* 100 (2015) S3–S8.

- [78] C.F. Price, D. Tyssen, S. Sonza, A. Davie, S. Evans, G.R. Lewis, S. Xia, T. Spelman, P. Hodsman, T.R. Moench, A. Humberstone, J.R.A. Paull, G. Tachedjian, SPL7013 gel (vivagel®) retains potent HIV-1 and HSV-2 inhibitory activity following vaginal administration in humans, *PLoS One*. 6 (2011) 1–12.
- [79] D. Sepúlveda-Crespo, M.J. Serramía, A.M. Tager, V. Vrbanac, R. Gómez, F.J. De La Mata, J.L. Jiménez, M.Á. Muñoz-Fernández, Prevention vaginally of HIV-1 transmission in humanized BLT mice and mode of antiviral action of polyanionic carbosilane dendrimer G2-S16, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 11 (2015) 1299–1308.
- [80] D. Sepúlveda-Crespo, R. Gómez, F.J. De La Mata, J.L. Jiménez, M.Á. Muñoz-Fernández, Polyanionic carbosilane dendrimer-conjugated antiviral drugs as efficient microbicides: Recent trends and developments in HIV treatment/therapy, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 11 (2015) 1481–1498.
- [81] T.S. Anirudhan, S. Sandeep, Synthesis, characterization, cellular uptake and cytotoxicity of a multi-functional magnetic nanocomposite for the targeted delivery and controlled release of doxorubicin to cancer cells, *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 12888–12899.
- [82] S.D. García Schejtman, C.I.A. Igarzabal, M. Martinelli, Synthesis and characterization of novel dendritic macroporous monoliths, *Eur. Polym. J.* 106 (2018) 102–111.
- [83] N. M. Cuong, S. Ishizaka, N. Kitamura, Donnan Electric Potential Dependence of Intraparticle Diffusion of Malachite Green in Single Cation Exchange Resin Particles: A Laser Trapping-Microspectroscopy Study, *Am. J. Anal. Chem.* 03 (2012) 188–194.
- [84] OMS, (n.d.) https://www.who.int/topics/hiv_aids/es/.
- [85] K.M. De Cock, H.W. Jaffe, J.W. Curran, The evolving epidemiology of HIV/AIDS, *Aids*. 26 (2012) 1205–1213.
- [86] R. Martin, D. Jankovic, A. Goel, M. Mulders, A. Dabbagh, N. Khetsuriani, I. Ogbuanu, Increased transmission and outbreaks of measles-European region, 2011, *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 60 (2011) 1605–1610.
- [87] ONU mujeres, (n.d.) <https://www.unwomen.org/es/what-we-do/hiv-and-aids>.
- [88] P.M. Sharp, D.L. Robertson, B.H. Hahn, Cross-species transmission and recombination of “AIDS” viruses., *Philos. Trans. Biol. Sci.* 249 (1995) 41–47.
- [89] J.M. Baeten, T. Palanee-Phillips, E.R. Brown, K. Schwartz, L.E. Soto-Torres, V. Govender, N.M. Mgodhi, F. Matovu Kiweewa, G. Nair, F. Mhlanga, S. Siva, L.G. Bekker, N. Jeenarain, Z. Gaffoor, F. Martinson, B. Makanani, A. Pather, L. Naidoo, M. Husnik, B.A. Richardson, U.M. Parikh, J.W. Mellors, M.A. Marzinke, C.W. Hendrix, A. Van Der Straten, G. Ramjee, Z.M. Chirenje, C. Nakabiito, T.E. Taha, J. Jones, A. Mayo, R. Scheckter, J. Berthiaume, E. Livant, C. Jacobson, P. Ndase, R. White, K. Patterson, D. Germuga, B. Galaska, K. Bunge, D. Singh, D.W. Szydlo, E.T. Montgomery, B.S. Mensch, K. Torjesen, C.I. Grossman, N. Chakhtoura, A. Nel, Z. Rosenberg, I. McGowan, S. Hillier, Use of a vaginal ring containing dapivirine for HIV-1 prevention in women, *N. Engl. J. Med.* 375 (2016) 2121–2132.
- [90] A. Nel, N. Van Niekerk, S. Kapiga, L.G. Bekker, C. Gama, K. Gill, A. Kamali, P. Kotze, C. Louw, Z. Mabude, N. Miti, S. Kusemererwa, H. Tempelman, H. Carstens, B. Devlin, M. Isaacs, M. Malherbe, W. Mans, J. Nuttall, M. Russell, S. Ntshela, M. Smit, L. Solai, P. Spence, J. Steytler, K. Windle, M. Borremans, S. Ressler, J. Van Roey, W. Parys, T. Vangeneugden, B. Van Baelen, Z. Rosenberg, Safety and efficacy of a dapivirine vaginal ring for HIV prevention in women, *N. Engl. J. Med.* 375 (2016) 2133–2143.
- [91] C. Farr Zuend, J.F. Nomellini, J. Smit, M.S. Horwitz, Generation of a Dual-Target, Safe, Inexpensive Microbicide that Protects Against HIV-1 and HSV-2 Disease, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1–15.
- [92] Y.S. Lakshmi, P. Kumar, G. Kishore, C. Bhaskar, A.K. Kondapi, Triple combination MPT vaginal microbicide using curcumin and efavirenz loaded lactoferrin nanoparticles, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–13.

- [93] L. Peterson, K. Nanda, B.K. Opoku, W.K. Ampofo, M. Owusu-Amoaka, A.Y. Boakye, W. Rountree, A. Troxler, R. Dominik, R. Roddy, L. Dorflinger, SAVVY® (C31G) gel for prevention of HIV infection in women: A phase 3, double-blind, randomized, placebo-controlled trial in Ghana, *PLoS One*. 2 (2007) 1–8.
- [94] A.B. Moscicki, R. Kaul, M.A. Yifei, M.E. Scott, I.I. Daud, E.A. Bukusi, S. Shiboski, A. Rebbapragada, S. Huibner, C.R. Cohen, Measurement of mucosal biomarkers in a phase 1 trial of intravaginal 3% starpharma LTD 7013 gel (vivagel) to assess expanded safety, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 59 (2012) 134–140.
- [95] M.A. Macchione, C. Guerrero-Beltrán, A.P. Rosso, E.M. Euti, M. Martinelli, M.C. Strumia, M.Á. Muñoz-Fernández, Poly(N-vinylcaprolactam) Nanogels with Antiviral Behavior against HIV-1 Infection, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–10.
- [96] K. Maeda, D. Das, H. Nakata, H. Mitsuya, CCR5 inhibitors: emergence, success, and challenges, *Expert Opin. Emerg. Drugs.* 17 (2012) 135–145.
- [97] K. Maisel, L. Ensign, J. Hanes, R. Cones, *Patente: Hypotonic hydrogel formulations for enhanced transport of active agents at mucosal surfaces*, 2018.



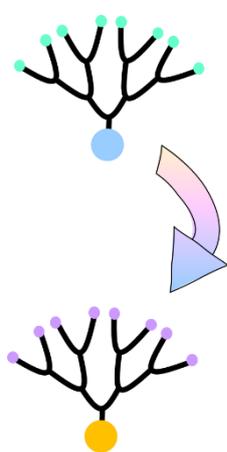
Sección III: Consideraciones finales



Conclusiones generales

Al comienzo de esta Tesis, se planteó como objetivo general el desarrollo de bloques de construcción dendríticos y de nuevos biomateriales de tamaño nanoscópico, con el fin de diseñar potenciales plataformas para su uso en el área de la biomedicina. Para alcanzar este objetivo, se diseñó de manera eficiente el trabajo de investigación que permitió obtener los diferentes biomateriales presentados en este manuscrito.

Además de la utilización de diversas metodologías para la síntesis de los distintos biomateriales, se estudió la influencia de la dendronización sobre la morfología y las propiedades fisicoquímicas del material final, evidenciando el efecto de la multivalencia (efecto dendrítico). Teniendo en cuenta el objetivo general, la Tesis fue dividida en 3 partes: i) síntesis de moléculas dendríticas como bloques de construcción para la preparación de biomateriales dendríticos, ii) síntesis de diferentes nanogeles, utilizando materiales de origen natural o sintético y una combinación de ambos para formar los denominados materiales híbridos y iii) ensayos de aplicación en el área de la biomedicina. Las conclusiones de cada una de las partes se detallan a continuación:

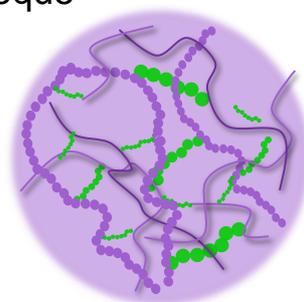


- i) A través de reacciones típicas de la Química Orgánica, se sintetizaron y caracterizaron, diferentes dendrones. Se partió de dendrones comerciales que, a través de distintas reacciones químicas, derivatizando tanto los grupos de la periferia como el punto focal, se obtuvieron estructuras dendríticas novedosas. Algunas de ellas con un punto focal capaz de polimerizar en reacciones de polimerización radicalarias convencionales, convirtiéndolas en estructuras versátiles para su utilización como bloques de construcción de biomateriales.

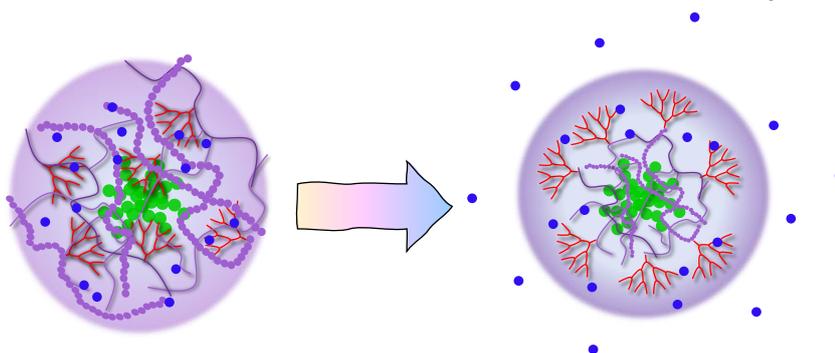
Particularmente se destaca la sencillez y alto rendimiento en la síntesis de los dendrones ABA y ABC y la versatilidad de los mismos pudiendo aportar bloques hidrofóbicos o hidrofílicos según el requerimiento por una simple reacción de polimerización clásica.

- ii) En esta etapa, el trabajo se focalizó en el diseño de materiales de tamaño nanométrico, atendiendo el emergente avance científico en el área de los biomateriales y sus potenciales aplicaciones. De este modo,

se obtuvieron exitosamente distintos nanogeles poliméricos, donde se combinaron la revalorización de polímeros de origen natural, las propiedades responsivas de Poli(vinilcaprolactama) (PVCL) y las destacadas propiedades de los bloques dendríticos. En todos los casos que se llevó a cabo la incorporación de un bloque dendrítico, quedó en evidencia la influencia de dicha molécula en las propiedades del material final, siendo estas gobernadas por este bloque. Se observó que, el aporte dendrítico queda establecido con una pequeña proporción de la estructura en la composición del material. Es decir, la incorporación de pequeñas cantidades de una estructura dendrítica, provoca cambios significativos y determina las características y comportamientos del material final. El trabajo desarrollado en esta Tesis, demuestra que, el correcto diseño y el conocimiento detallado de los efectos de la incorporación de dendrones, deben aprovecharse para diseñar nuevos materiales con alto valor agregado, donde el control estructural marque las propiedades del material final y como consecuencia lo transforme en una mejor alternativa para las aplicaciones buscadas.



iii) Por último y, avanzando en el estudio de potenciales aplicaciones de los nanogeles desarrollados, se realizaron ensayos que permitieron demostrar la capacidad, de algunos de los materiales, para ser utilizados en aplicaciones en el área de la biomedicina. Por un lado, a través de ensayos de encapsulación y liberación de una molécula modelo, fue posible corroborar la eficiencia de los nanogeles dendríticos sintéticos, descritos en la segunda parte de este manuscrito, para ser utilizados como *carriers* para liberación controlada de fármacos. Se demostró la mayor capacidad de encapsulación y un mejor perfil de liberación dependiente del pH del medio, para los sistemas dendríticos. Nuevamente, el efecto dendrítico se evidenció con porcentajes de



modificación de tan solo 1%. Un aspecto del trabajo y los resultados obtenidos a destacar es, haber demostrado por primera vez el empleo de nanogeles como inhibidores de un virus, en este caso el VIH-tipo 1. Se alcanzaron niveles de inhibición cercanos al 75% para nanogeles no dendríticos, valor que fue superado por los materiales dendríticos (85%). Este último resultado es uno de los más relevantes del trabajo, ya que el nanogel solo posee en su composición 1% del bloque dendrítico y no fue necesario incorporar un fármaco específico.

Finalmente, el conocimiento adquirido durante el desarrollo de esta Tesis, permitió diseñar nanogeles a medida (*taylor made*), establecer la relación estructura-propiedad y seleccionar los materiales con mejor *performance* para las aplicaciones específicas. Particularmente, se puede destacar que la presencia de una molécula dendrítica en los NGs llevó a características muy diferentes a las observadas en los no dendríticos. Esto brinda la posibilidad de trabajar con sistemas muy distintos entre sí y obtener diversos materiales con excelentes propiedades. Además, cabe destacar que se logró un gran aporte al conocimiento dado los escasos antecedentes que se pueden encontrar en bibliografía sobre el tema que aun se encuentra en creciente desarrollo.

Se evidenció la importancia de un correcto diseño sintético del biomaterial, teniendo en cuenta las posibles interacciones, inter e intramoleculares, y la potencial aplicación final. Además, destaca la importancia de una caracterización detallada de los sistemas para determinar así las posibles arquitecturas del material obtenido y lograr una mejor comprensión de las propiedades físico-químicas finales.

Proyecciones

En este trabajo de Tesis, las moléculas dendríticas han demostrado la capacidad de modificar y mejorar, en gran medida, diversas propiedades de una matriz polimérica. Por lo que en primer lugar se propone continuar con la optimización en la síntesis de las moléculas dendríticas para luego incorporarlas como bloque de construcción en algún material polimérico. Particularmente resulta muy interesante la posibilidad de ampliar la caracterización y posterior incorporación en algún material a las moléculas dendríticas sintetizadas NAT-Weis y NAT-Weish, las cuales representan la posibilidad de obtener dendrones de segunda generación con alta densidad de grupos funcionales hidrofóbicos o hidrofílicos por un método de síntesis sencillo.

En segunda instancia, los nanogeles sintetizados y caracterizados presentaron excelentes propiedades para ser utilizados en el área de la nanomedicina. Por esta razón, se propone continuar estudiando estos sistemas para su perfeccionamiento. Se plantea un estudio completo de la incorporación y liberación de diferentes fármacos evaluando diferentes condiciones. A su vez, estos sistemas también podrían modificarse empleando grupos *targeting* para aplicaciones aún más específicas. Además, en el grupo de investigación se espera continuar con los estudios biológicos de estos sistemas, ya sea la internalización celular, la citotoxicidad (al liberar el fármaco), estudios *in vivo*, etc. Finalmente, se propone continuar con estudios más exhaustivos de los distintos nanogeles basados en PVCL-ABC para ser utilizados como microbicidas tópicos en la lucha contra el VIH-I, particularmente realizar estudios para entender el mecanismo por el cual se produce la inhibición del virus por parte de los materiales.

Producción científica

Trabajos Publicados

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han sido parcialmente publicados en los siguientes artículos:

"Poly(N-vinylcaprolactam) Nanogels with Antiviral Behavior against HIV-1 Infection" Anabella P. Rosso[&], Micaela A. Macchione[&], Carlos Guerrero-Beltrán[&], Esteban Euti, Marisa Martinelli, Miriam C. Strumia* y Ma. Angeles Muñoz-Fernandez. *Scientific Report*. Publicado. [&]Authors with equally contribution to this work. *Sci Rep* 9, 5732 (2019). Doi: 10.1038/s41598-019-42150-9.

"Preparation and Characterization of Dendronized Chitosan/Gelatin-based Nanogels" Rosso, Anabella P. y Martinelli Marisa*. *European Polymer Journal* 124 (2020) 109506. Doi: 10.1016/j.eurpolymj.2020.109506.

"Nanogels and Dendritic Molecules Combined to Form a Smart Nanomaterial" Rosso, Anabella P. y Martinelli Marisa*. *European Polymer Journal* (2021). Doi:10.1016/j.eurpolymj.2021.110874

Otras publicaciones:

"Materiales inteligentes, un presente impactante, un futuro desafiante para la ciencia de los polímeros." Dra. Miriam Cristina Strumia, Dra. Cecilia Inés Alvarez Igarzabal, Dra. Marisa Martinelli, Dr. Agustín González, Dr. Esteban Euti, Lic. David Garcia Schejtman, Dra. Micaela Macchione, Dr. Matías Picchio, Lic. Francisco Figueroa, Lic. Martín Juárez Data, Bioq. Virginia Pasotti, Lic. Anabella Rosso, Lic. Alexis Wolfen, en la revista la Bitácora de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Octubre 2015.

"Biomateriales poliméricos: los gigantes que nacen de un desafío multidisciplinario." Dra. Miriam Cristina Strumia, Dra. Cecilia Inés Alvarez Igarzabal, Dra. Marisa Martinelli, Dr. Agustín González, Dr. Esteban Euti, Dr. David Garcia Schejtman, Dra. Micaela Macchione, Dr. Matías Picchio, Lic. Francisco Figueroa, Lic. Martín Juárez Data, Bioq. Virginia Pasotti, Lic.

Anabella Rosso, Lic. Alexis Wolfen, en la revista la Bitácora de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Septiembre 2018.

Presentaciones a Reuniones Científicas

I. Presentación en el XII Simposio Argentino de Polímeros (SAP). Córdoba, Argentina. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOGELES A PARTIR DE BIOPOLÍMEROS UTILIZANDO ÁCIDO TÁNICO COMO ENTRECruzANTE. Anabella P. Rosso y Marisa Martinelli. Poster. 2017.

II. Presentación en el XII Simposio Argentino de Polímeros (SAP). Córdoba, Argentina. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOGELES INTELIGENTES DENDRONIZADOS A PARTIR DE N-VINILCAPROLACTAMA Y UN MONÓMERO DENDRÍTICO. Anabella P. Rosso y Marisa Martinelli. Poster. 2017.

III. Asistencia a Workshop “Publishing your research” dictado por la Dra. Cornelia Bohne, ACS Omega Co-Editor. En la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad nacional de Córdoba. Res.1193/17.

IV. Asistencia a III Workshop de Resonancia Magnética “NMR and EPR at the Forefront of Research” organizado por el Departamento de Física de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral. 2016.

V. Asistencia al VI Encuentro Argentino de Materia Blanda, Facultad de Matemáticas, Astronomía, Física y Computación de la Universidad Nacional de Córdoba. 2016.

VI. Participación en las VIII Jornadas de posgrado y II Jornadas de Ciencia y Técnica en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOGELES INTELIGENTES DENDRONIZADOS A PARTIR DE N-VINILCAPROLACTAMA Y UN MONÓMERO DENDRÍTICO. Anabella P. Rosso y Marisa Martinelli. Poster. 2018.

VII. Presentación en el XVI Simposio Latinoamericano de Polímeros y XIV Congreso Iberoamericano de Polímeros (SLAP). Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF DENDRONIZED NANOGELE FROM CHITOSAN CROSSLINKED WITH TANNIC ACID. Anabella P. Rosso y Marisa Martinelli. Poster. 2018.

VIII. Presentación en el XIII Simposio Argentino de Polímeros (SAP 2019). Córdoba, Argentina. EFECTO DEL GRADO DE ENTRECruzAMIENTO Y DENDRONIZACIÓN EN NANOGELES TERMOSENSIBLES DE N-VINILCAPROLACTAMA. Anabella P. Rosso y Marisa Martinelli. Poster.

X. Presentación en la Reunión Anual de la Asociación Argentina de Nanomedicinas Nanomed-Ar 2020. Realizado con modalidad virtual. Organizado por la Fundación Argentina de Nanomedicina. DENDRITIC NANOGELES AS POTENTIAL TOPICAL MICROBICIDAL AGENTS AGAINST THE HIV VIRUS. Anabella P. Rosso, Micaela Macchione, Miriam Strumia y Marisa Martinelli. Video Flash.

X. Presentación en el IV Workshop de Polímeros Biodegradables y Biocompuestos (BIOPOLI 2021). Realizado en modalidad virtual. SINTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOGELES DENDRÍTICOS DE GELATINA. Anabella P. Rosso y Marisa Martinelli. Poster.

XI. Presentación al Simposio Nacional de Química Orgánica (SINAQO 2021) Realizado en modalidad virtual. NANOGELES SUPRAMOLECULARES AUTOENSAMBLADOS BASADOS EN ALCOHOL POLI(VINILICO) Y ÁCIDO GÁLICO. Anabella P. Rosso, Sergio D. García Schejtman, Matías L. Picchio, Alicia V. Veglia, Eduardo A. Coronado y Marisa Martinelli. Poster.

XII. Presentación en el XIII Simposio Argentino de Polímeros (SAP 2021) Realizado en modalidad mixta presencial y virtual. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOGELES DENDRONIZADOS INTELIGENTES Y MOLECULARMENTE IMPRESOS. A. Carnicero, A. P. Rosso y M. Martinelli. Poster.