

**“Dendronización de polímeros
biocompatibles. Obtención de
nuevos materiales de interés
biológico”**

Tesis Doctoral
Ana Agustina Aldana

El presente Trabajo de Tesis fue realizado en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, y se presenta a consideración de dicha Facultad para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Directora:

Prof. Dra. Marisa Martinelli

Comisión de Tesis:

Prof. Dra. Miriam C. Strumia

Prof. Dra. Margarita C. Briñón

Prof. Dr. Gustavo Rivas

Evaluadora Externa:

Prof. Dra. Susana Cortizo

ÍNDICE

SECCION I. Introducción

Capítulo 1. Introducción General	1
1.1. EVOLUCIÓN DE LOS POLÍMEROS	2
1.2. POLÍMEROS DENDRÍTICOS. DENDRÍMEROS	2
1.2.1. Dendrimeros: características químicas y estructurales	4
1.2.2. Aplicaciones biológicas de dendrimeros	7
1.3. POLÍMEROS DENDRONIZADOS	10
1.3.1. ¿Qué son los polímeros dendronizados?	11
1.3.2. Estrategias de síntesis	13
1.3.2.1. Vía "graft-to" o injerto de dendrones	14
1.3.2.2. Vía "graft-from" o crecimiento de dendrones	15
1.3.2.3. Vía del macromonómero	16
1.3.3. Estructura molecular y supramolecular	18
1.3.3.1. Forma y tamaño	18
1.3.3.2. Estructura interna	20
1.3.4. Aplicaciones	22
1.3.4.1. Unidades constructoras de estructuras nanoscópicas	22
1.3.4.2. Catálisis	23
1.3.4.3. Aplicaciones biológicas	25
1.4. QUITOSANO: CARACTERÍSTICAS, PROPIEDADES Y APLICACIONES	26
1.4.1. Antecedentes de quitosano dendronizado	28
Capítulo 2. Fundamentos metodológicos	31
2.1. TÉCNICAS MICROSCÓPICAS	32
2.1.1. Microscopia de fuerza atómica	32
2.1.1.1. AFM en modo de contacto intermitente "tapping mode"	33
2.1.2. Microscopia electrónica de barrido	34

2.1.3. Microscopia óptica y análisis de la imagen	36
2.2. ÁNGULO DE CONTACTO	36
2.3. ANÁLISIS TÉRMICO	38
2.3.1. Análisis termo-gravimétrico	38
2.3.2. Calorimetría diferencial de Barrido	40
2.4. REOLOGÍA	41
2.5. VOLTAMETRÍA CÍCLICA: TRANSFERENCIA EN INTERFASES LÍQUIDO/LÍQUIDO	45
2.5.1. Transferencia a través de la interfaz líquido/líquido	45
2.5.2. Transporte de carga a través de la interfaz líquido/líquido	48
2.5.2.1- Transferencia directa de iones	48
2.5.2.2- Transferencia facilitada de iones	49
2.5.2.3- Transferencia de electrones	51
2.5.3. Transferencia de polímeros: aspectos termodinámicos.	51
2.6. ISOTERMAS DE PRESIÓN SUPERFICIAL/ÁREA MOLECULAR	53
2.6.1. Determinación de tensión superficial	53
2.6.1.1- Tensiómetro	53
2.6.1.2- Balanza de Langmuir	54
2.6.2. Descripción de las isothermas de presión lateral-área molecular	55
 Bibliografía	 57

SECCIÓN II. Polvos

Consideraciones generales	63
 Capítulo 3. Obtención de polvos dendronizados	 65
3.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE Ch-W	66
3.1.1. Dendronización. Obtención de Ch-W	66
3.1.2. Análisis térmico	69
3.1.3. Microscopia de fuerza atómica	71
3.2. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE Ch-MA-AB	72
3.2.1. Modificación con espaciador: MA. Obtención de Ch-MA	72

3.2.2. Dendronización. Obtención de Ch-MA-AB	74
3.2.3. Estudios de Hinchamiento	75
Capítulo 4. Modificación de las partículas dendronizadas	77
4.1. HIDRÓLISIS DE GRUPOS <i>tert</i> -BUTILO PERIFÉRICOS DE LAS ESTRUCTURAS DENDRÍTICA	78
4.2. INTRODUCCIÓN DE UNA MOLÉCULA CON GRUPOS AMINO CUATERNARIO EN LA CADENA POLIMÉRICA	80
4.2.1. Obtención de Ch-gtmac	80
4.2.2. Obtención de polímeros dendronizados y gtmac	83
4.2.2.1. Ch-W y gtmac.	83
4.2.2.2. Ch-MA-AB-gtmac	84
4.3. UNIÓN DE ÁCIDO FÓLICO	85
Capítulo 5. Comportamiento electroquímico	89
5.1. QUITOSANO y W	91
5.1.1. Quitosano (Ch)	91
5.1.2. Ch-W	92
5.1.2.1. Comportamiento electroquímico. ITIES	92
5.1.2.2. Comportamiento interfaz agua/aire. Balanza de Langmuir	92
5.1.3. Ch-Wh	94
5.1.3.1. Efecto del pH	95
5.1.3.2. Efecto de la velocidad de barrido	96
5.2. QUITOSANO y gtmac	99
5.2.1. Ch-gtmac (1:3)	99
5.2.1.1. Efecto de la concentración del polímero en fase acuosa.	99
5.2.1.2. Efecto de la naturaleza del electrolito soporte.	100
5.2.1.3. Efecto del pH	101
5.2.1.4. Efecto del potencial de corte	104
5.2.1.5. Efecto de los pulsos de potencial, variación del tiempo	104
5.2.2. Ch-gtmac (1:0,6)	108
5.2.3. Ch-MA-AB-gtmac	110
5.3. INTERACCIÓN DE POLÍMEROS CON FÁRMACOS	111
5.3.1. Estudios con ibuprofeno	111

5.3.1.1. Interacción Ch-gtmac con IBU	112
5.3.1.2. Interacción Ch-MA-AB-gtmac con IBU	113
5.3.2. Estudios con propranolol	115
5.3.2.1. Interacción Ch-gtmac con PROP	115
5.3.2.2. Interacción Ch-W con PROP	115
Capítulo 6. Conclusiones Parciales	117
Bibliografía	121

SECCIÓN III. Esferas

Consideraciones generales	125
Capítulo 7. Obtención de esferas dendronizadas	127
7.1. SÍNTESIS DE DENDRONES: BISAMINA DE BEHERA BB	128
7.2. OBTENCIÓN DE ESFERAS	130
7.3. OBTENCIÓN DE MATRICES ACTIVADAS: Ch-ECH y Ch-BDGE	130
7.4. OBTENCIÓN DE ESFERAS DENDRONIZADAS: Ch-ECH-AB, Ch-ECH-BB, Ch-BDGE-AB y Ch-BDGE-BB	132
7.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS ESFERAS DENDRONIZADAS	133
7.5.1. Microscopía electrónica de Barrido	134
7.5.2. Análisis térmico gravimétrico y calorimetría diferencial de barrido	134
7.5.3. Estudios de Hinchamiento	138
Capítulo 8. Modificación de las esferas dendronizadas	141
8.1. HIDRÓLISIS DE GRUPOS <i>tert</i> -BUTILO PERIFÉRICOS DE LAS ESTRUCTURAS DENDRÍTICA. OBTENCIÓN DE Ch-ECH-ABh, Ch-ECH-BBh, Ch-BDGE-ABh Y Ch-BDGE-BBh	142
8.1.1. Obtención de Ch-ECH-ABh, Ch-ECH-BBh, Ch-BDGE-ABh y Ch-BDGE-BBh	142
8.1.2. Estudios de hinchamiento	143
8.2. UNIÓN DE ÁCIDO FÓLICO	147
Capítulo 9. Aplicaciones de las esferas dendronizadas	151
9.1. AFINIDAD DE METALES INMOVILIZADOS	152

9.1.1. Estudios como soportes de afinidad de metales inmovilizados	154
IR	158
9.1.1.1. Estudio del complejo esfera-cobre (II) por espectroscopia	158
9.1.1.2. Absorción de albúmina bovina	159
9.1.1.3. Catálisis de peróxido de hidrógeno	160
9.2. ESTUDIO DEL POTENCIAL COMO SOPORTES PARA EL TRANSPORTE DE FÁRMACOS.	163
Capítulo 10. Conclusiones parciales de partículas	167
Bibliografía	171

SECCIÓN IV. Películas

Consideraciones generales	173
Capítulo 11. Obtención de películas dendronizadas	177
11.1. PREPARACIÓN DE PELÍCULAS DE QUITOSANO	178
11.1.1. Obtención de Ch-PVP	179
11.1.2. Obtención de Ch-Gen	180
11.2. DENDRONIZACIÓN DE LAS PELÍCULAS. OBTENCIÓN DE Ch-PVP-W y Ch-Gen-W	182
11.3. CARACTERIZACIÓN	185
11.3.1. Análisis térmico: DSC y TGA	185
11.3.2. Técnicas microscópicas	187
11.3.2.1. Microscopia óptica y análisis de la imagen	187
11.3.2.2. Microscopia de fuerza atómica	189
11.3.3. Espectroscopia UV-Visible	191
Capítulo 12. Potencial como apósitos para heridas	193
12.1. ESTUDIOS DE HINCHAMIENTO	196
12.2. PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA	198
12.3. REOLOGÍA EXTENSIONAL	200
12.4. ÁNGULO DE CONTACTO	202
12.5. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	204

12.6. REGENERACIÓN CELULAR	207
12.6.1. Determinación del metabolismo de L-arginina	209
12.6.1.1. Macrófagos	209
12.6.1.2. Fibroblastos	210
12.6.2. Citotoxicidad: ensayo LDH	211
12.6.3. Ensayo de adhesión celular	212
Capítulo 13. Conclusiones parciales de películas	215
Bibliografía	219

SECCIÓN V. Parte experimental

Capítulo 14. Parte Experimental	223
14.1. MATERIALES Y EQUIPOS	223
14.1.1. Materiales	223
14.1.2. Equipos	224
14.2. METODOLOGÍAS	227
14.2.1. Síntesis del dendrón Bisamina de Behera, BB	227
14.2.2. Obtención de partículas dendronizadas	227
14.2.2.1. Dendronización. Obtención de Ch-W	227
14.2.2.2. Obtención de Ch-MA-AB	228
14.2.3. Obtención de esferas dendronizadas	229
14.2.3.1. Obtención de esferas	229
14.2.3.2. Obtención de matrices activadas: Ch-ECH y Ch-BDGE	230
14.2.4. Obtención de películas dendronizadas	231
14.2.4.1. Obtención de películas Ch-PVP y Ch-Gen	231
14.2.4.2. Dendronización de las películas. Obtención de Ch-PVP-W y Ch-Gen-W	232
14.2.5. Modificaciones de los productos dendronizados	233
14.2.5.1. Hidrólisis de grupos periféricos de los dendrones AB y BB	233
14.2.5.2. Introducción de una molécula con grupos amino cuaternario en la cadena polimérica. Unión de clorhidrato de glicidiltrimetilamonio a Ch	234
14.2.5.3. Unión de ácido fólico	234

14.2.6. Determinación de grupos funcionales	235
14.2.6.1. Test de ninhidrina	235
14.2.6.2. Titulación de grupos epóxido	236
14.2.6.3. Titulación de grupos ácido	236
14.2.7. Estudios de hinchamiento	237
14.2.7.1. Determinación de E_{sw} por variación en volumen	237
14.2.7.2. Determinación de E_{sw} por variación en masa	238
14.2.8. Comportamiento electroquímico. Voltametría cíclica. ITIES	238
14.2.9. Comportamiento interfaz agua/aire. Balanza de Langmuir	240
14.2.10. Retención de cobre (II)	240
14.2.11. Adsorción de BSA	241
14.2.12. Catálisis de H_2O_2	242
14.2.13. Retención y liberación de nimodipina	243
14.2.14. Permeabilidad al vapor de agua	244
14.2.15. Reología extensional	246
14.2.16. Ángulo de contacto	246
14.2.17. Actividad antimicrobiana	246
14.2.18. Regeneración celular	248
14.2.18.1. Determinación de óxido nítrico. Reacción de Griess	249
14.2.18.2. Determinación de actividad arginasa	249
14.2.18.3. Determinación de actividad de lactato deshidrogenasa	250
 Bibliografía	 251

SECCIÓN VI. Conclusiones generales

Capítulo 15. Conclusiones y proyecciones	253
15.1. Conclusiones generales	253
15.2. Proyecciones	257
 ANEXO I: Glosario de estructuras	 259

ABREVIATURAS

Å	Amstrong
1,2-DCE	1,2-dicloroetano
AB	amina de Behera
AFM	microscopia de fuerza atómica
ATR-FTIR	espectroscopia de reflectancia total atenuada
BB	bisamina de Behera
BDGE	butilendiglicidil éter
BSA	albúmina de suero bovina
Ch	Quitosano
Ch-gtmac	quitosano-gtmac
Ch-MA	quitosano-acrilato de metilo
Ch-MA-AB	quitosano-acrilato de metilo-amina de Behera
CP-MAS	experimento en RMN de sólidos (<i>crosspolarization and magnetic angle spinning</i>)
DCC ⁻	anión dicarbonilcobaltato
DLBT	dilaurato de dibutilestaño
DMAC	dimetilacetamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DRI-FTIR	espectroscopia de reflectancia difusa
DSC	calorimetría diferencial de barrido
ECH	Epiclorhidrina
EDC	clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarodiimida
E _p	potencial de pico
ESW	índice de hinchamiento
eV	Electrovoltios
F-AAS	espectroscopia de absorción atómica
G	generación de la estructura dendrítica
Gen	Genipina
gtmac	clorhidrato de glicidiltrimetilamonio
IMAC	cromatografía de afinidad de metales inmovilizados
Inos	óxido nítrico sintetasa inducida
I _p	potencial de pico
ITIES	interfaz entre dos soluciones electrolíticas inmiscibles
LDH	lactato de deshidrogenasa
LPS	Lipopolisacárido
MA	acrilato de metilo
mC	micro Coulomb
NiH	línea celular de fibroblastos
NO	óxido nítrico

PBS	solución <i>buffer</i> fosfato
PCA	placa de recuento
PDI	índice de polidispersidad
PMA	polimixina A
PMB	polimixina B
PVP	Polivinilpirrolidona
Raw	línea celular de macrófagos
RMN	resonancia magnética nuclear
RMS	índice de rugosidad
RPMI	medio de cultivo (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
SEM	microscopia electrónica de barrido
TCIPhB-	anión tetraclorofenilborato
TGA	análisis termogravimétrico
TPATCIPhB	tetraclorofenilborato de tetrapentilamonio
TPhAsDCC	dicarbonilcobaltato de tetrafenilarsonio
UFC	unidad formadora de colonia
W	Weisocianato
WVP	permeación al vapor de agua
WVRT	velocidad de permeabilidad del vapor de agua
π	presión superficial

OBJETIVOS

Objetivo General

En la actualidad, la demanda de materiales sofisticados y altamente específicos crece rápidamente. Los materiales funcionales son componentes claves con gran potencial, debido a que pueden ser diseñados eficientemente con una arquitectura y funcionalidad determinada, influyendo en sus propiedades finales y aplicaciones.^{58,95} Desde este punto de vista, los progresos y avances en el diseño en este campo, son relevantes para la obtención de nuevos materiales multifuncionales. En consecuencia, la dendronización es una herramienta para el desarrollo de los mismos. Los polímeros dendronizados son una nueva arquitectura polimérica, que ha ganado una creciente atención durante los últimos años, gracias a su tamaño controlable y a la versatilidad de forma y funcionalización, expandiendo el campo de estudio de los polímeros y la nanociencia, con una amplia variedad de aplicaciones, debido a las propiedades únicas de los mismos.

Por otro lado, el interés en el uso de fuentes renovables en arquitecturas moleculares complejas, ha surgido como consecuencia de la búsqueda para sustitutos de materiales derivados del petróleo. Entre ellos se encuentra el quitosano (Ch), el cual es un polisacárido obtenido de la desacetilación de la quitina. Este polímero ha demostrado ser reactivo, a partir del cual numerosos derivados han sido preparados y caracterizados.^{80,82,86,87,96} Los mismos poseen muy buena biocompatibilidad, biodegradabilidad y otras propiedades como antitrombogénico, homeostático e inmunogénico.⁸²⁻⁸⁵

Con el **objetivo general** de contribuir a la ciencia de los materiales, el desafío planteado en esta Tesis Doctoral, fue sintetizar nuevos sistemas multifuncionales basados en quitosano y dendrones. Además, estudiar la

influencia de la dendronización sobre las propiedades del quitosano y el potencial empleo en distintas aplicaciones biológicas.

Objetivos específicos

La concreción del objetivo general se llevó a cabo mediante el desarrollo de los siguientes objetivos específicos:

1. Sintetizar dendrones de primera generación y de distinta funcionalidad en la periferia (tipo y cantidad de grupos funcionales). Caracterizar los productos obtenidos.
2. Activar quitosano para su posterior modificación con moléculas dendríticas sintetizadas.
3. Modificar quitosano con moléculas dendríticas. Optimizar condiciones de dendronización.
4. Caracterizar las distintas matrices obtenidas empleando diversas metodologías fisicoquímicas.
5. Evaluar y comparar las propiedades de quitosano nativo y dendronizado.
6. Estudiar el potencial de los sistemas en diferentes aplicaciones: liberación de fármacos, cromatografía de afinidad y catálisis.

RESUMEN

El interés en los polímeros dendríticos se ha incrementado exponencialmente desde su primera aparición. En 1997, había aproximadamente 500 contribuciones científicas discutiendo el concepto de dendrímeros. Una década después, hay cerca de 2.000 publicaciones por año. Hoy en día, se pueden encontrar más de 15.000 referencias y más de 1.500 patentes que involucran el concepto de polímeros dendríticos. Entre ellos, se encuentran los polímeros dendronizados. Éstos son una clase particular de polímeros ramificados, los cuales tienen dendrones unidos a lo largo de la cadena polimérica. A medida que aumenta el tamaño del dendrón, aumentan las interacciones entre dendrones adyacentes, generando una macromolécula con conformaciones más extendidas hasta llegar a una forma rígida cilíndrica.

A través de la modificación de un polímero con dendrones, es posible controlar la funcionalidad de la superficie, forma y tamaño de la estructura a escala nanométrica, que le confieren al polímero propiedades únicas, conocido como efecto dendrítico. Estas características le otorgan una gran variedad de aplicaciones en diferentes disciplinas. Por ejemplo, se han estudiado superficies de silicio modificadas con dendrones con grupos periféricos tert-butilo, como soportes en cromatografía gaseosa capilar de alta resolución y en microextracción capilar. Modificaciones químicas de sílica y celulosa han sido realizadas con dendrones como el poli(amidoamino) (PAMAM), y estudiado su potencial como soportes en cromatografía de afinidad y transporte de fármacos.

En particular, los polímeros dendronizados representan soportes interesantes para la liberación de fármacos, dado que el gran número de grupos funcionales periféricos (multifuncionalidad) y la arquitectura molecular, podrían permitir un significativo aumento en la cantidad de fármaco incorporado y además, se ha observado que la forma y la multivalencia de estas macromoléculas puede influir

en sus propiedades farmacocinéticas, por ejemplo mejorar el tiempo de vida media en plasma.

En los últimos años, se ha despertado el interés en el empleo de estructuras dendríticas en el estudio de adhesión celular y en aplicaciones de ingeniería tisular. Un ejemplo relevante, ha sido el incremento significativo en la afinidad de células epiteliales sobre superficies dendronizadas, donde los periodos de incubación prolongados aumentaron la densidad celular sobre las mismas. La dendronización de superficies de biomateriales podría introducir propiedades específicas para una aplicación concreta, resultando importante los avances que puedan realizarse en esta área.

Por otro lado, el interés en el uso de fuentes renovables en arquitecturas moleculares complejas, ha surgido como consecuencia de la búsqueda para sustitutos de materiales derivados del petróleo. Entre ellos se encuentra el quitosano (Ch), el cual es un polisacárido obtenido de la desacetilación de la quitina. Este polímero posee muy buena biocompatibilidad, biodegradabilidad y otras propiedades como antitrombogénico, homeostático e inmunogénico. Sin embargo, los problemas en su procesamiento y las malas propiedades mecánicas y la insolubilidad a pH neutros, hacen que sea necesaria su modificación química.

En este contexto, la presente Tesis Doctoral se enfocó en el desarrollo de nuevos materiales multifuncionalizados, basados en quitosano y dendrones, empleando una metodología diferente a las reportadas. A partir de la combinación de las características de ambas estructuras, se pretendió obtener sistemas con aplicaciones biológicas.

La Tesis se encuentra dividida en seis secciones: introducción (I), partículas (II), esferas (III), películas (IV), experimental (V), y conclusiones y proyecciones (VI). En la primera, se presenta el marco teórico de los polímeros (capítulo 1) y los fundamentos metodológicos de las metodologías empleadas (capítulo 2).

Los resultados y discusiones se encuentran divididos en tres secciones según la forma física de los materiales desarrollados, las cuales son polvos (sección II),

esferas (sección III) y películas (sección IV). A su vez, cada sección se encuentra dividida en capítulos de obtención, modificación y aplicaciones de las mismas.

En los mismos se presentan las distintas metodologías empleadas para la dendronización de quitosano con distintos dendrones, y el estudio de los cambios producidos en el polímero nativo. Además, se realizaron modificaciones en función de las aplicaciones de los mismos como transporte de fármacos y cromatografía de afinidad. Por lo tanto, para favorecer la solubilidad de los productos a valores de pH próximos a 7, se realizó la hidrólisis de grupos *tert*-butilo periféricos o unión de una molécula con grupos amino cuaternario, y para obtener matrices con potencialidad como transporte direccionado de fármacos, se unió el ácido fólico. Las partículas dendronizadas, en forma de polvo, se caracterizaron por voltametría cíclica (capítulo 5) y se estudió la interacción con dos fármacos (ibuprofeno y clorhidrato de propanolol). Por otro lado, las esferas dendronizadas se evaluaron como soportes para cromatografía de afinidad, catálisis y transporte de fármacos (capítulo 9). En cuanto a las películas, se realizaron distintos estudios para emplearlas como apósitos para heridas (capítulo 12).

En la sección V, se encuentran los detalles experimentales correspondientes a todas las metodologías empleadas. Y en la última sección, se presentan las conclusiones generales y proyecciones del Trabajo de Tesis.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN GENERAL



El presente capítulo se encuentra dividido en cuatro partes. Las tres primeras detallan el marco teórico de los polímeros dendríticos, y son: evolución de los polímeros (inciso 1.1), polímeros dendríticos y dendrímeros (inciso 1.2), y polímeros dendronizados (inciso 1.3). La cuarta parte (inciso 1.4), se centra en las características de quitosano, empleado como esqueleto polimérico en esta Tesis.

1.1. EVOLUCIÓN DE LOS POLÍMEROS

Los materiales poliméricos han existido en la tierra desde su origen. De hecho, la vida no sería posible si no existieran estas estructuras macromoleculares. El ácido desoxirribonucleico (ADN), los polisacáridos y las proteínas son polímeros fundamentales para la existencia de la vida. Sin embargo, los polímeros sintéticos se descubrieron por primera vez a 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). En 1939, DuPont introdujo *nylon*, debido a la falta de la seda, un recurso natural.^{1,2} El *nylon* se convirtió en una sensación mundial, abriendo el camino para los polímeros sintéticos. Se hizo evidente que los mismos estaban aquí para quedarse. En principio, estos materiales eran bastante simples, pero cumplían las exigencias requeridas de la época. Sin embargo, las crecientes demandas de nuestra sociedad condujeron a la fabricación de materiales plásticos cada vez más sofisticados. Hoy en día, los polímeros inteligentes, aquellos que responden a un estímulo (pH, temperatura, etc.), se pueden encontrar en todas partes, por ejemplo, en ordenadores, televisores, automóviles, lentes de contacto, indumentaria y en una amplia variedad de aplicaciones médicas.³⁻⁵

Los polímeros sintéticos pueden ser divididos de acuerdo a su arquitectura molecular y a su evolución en el tiempo, en cuatro categorías principales: lineales, entrecruzados, ramificados y estructuras dendríticas (Figura 1.1).¹ Los polímeros dendríticos, por su parte, forman una nueva clase de macromoléculas con interesantes alternativas estructurales y en las últimas dos décadas han atraído considerable interés como nanomateriales.

1.2. POLÍMEROS DENDRÍTICOS. DENDRÍMEROS

La primera aproximación a las moléculas dendríticas fueron los estudios de polímeros hiperramificados y redes macromoleculares realizados por Flory ⁶ y Stockmayer ⁷ en la década de los 40. Estas polimerizaciones, en un único paso, de unidades repetitivas del tipo AB_2 , producen macromoléculas altamente ramificadas, pero irregulares, con grados de ramificación del 60%

en el mejor de los casos y con polidispersidades entre 2 y 10, debido a un crecimiento estadístico incontrolado.

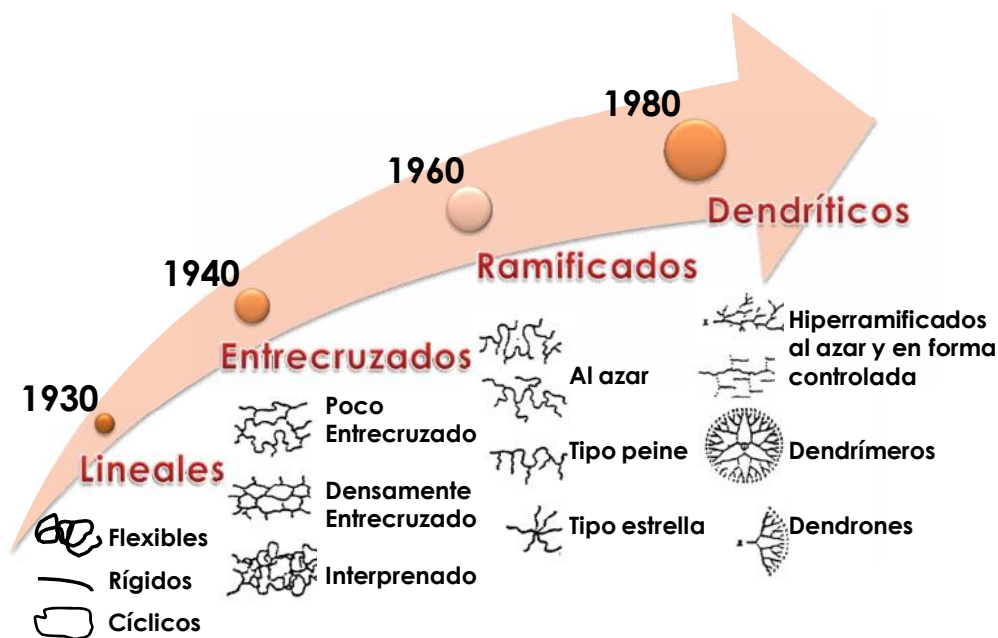


Figura 1.1. Esquema de evolución de polímeros y clasificación.

No fue hasta 1978 cuando F. Vögtle,⁸ con el objetivo de sintetizar compuestos con cavidades capaces de ocluir otras moléculas electrostáticamente o mediante complejación, describió la primera síntesis controlada de un dendrímero mediante un procedimiento divergente (ver inciso 1.2.1) que denominó "*cascade synthesis*". La secuencia de reacción consiste en una adición de Michael de acrilonitrilo a una amina y la posterior activación de los grupos nitrilo terminales por reducción a amina.⁸

Más tarde, una patente de Denkewalter en 1981,⁹ y los trabajos publicados por Newkome¹⁰ y Tomalia¹¹ en 1985, fueron el verdadero inicio de una química en torno a estas macromoléculas que sigue incrementándose con el paso de los años. El número de publicaciones ha crecido de forma exponencial durante las últimas dos décadas, ampliándose del mismo modo sus aplicaciones y las áreas científicas en las que se estudian. La síntesis de dendrímeros ha dado paso al diseño de estructuras dendríticas más centradas en sus propiedades específicas que en su tamaño. De este modo, se han

podido emplear estos compuestos en el campo de la nanotecnología, sintetizando dendrímeros electro y fotoactivos,^{12,13} usándolos como cristales líquidos,¹⁴⁻¹⁷ para formar films mono o multicapa.¹⁸

1.2.1. Dendrímeros: características químicas y estructurales

Los dendrímeros son considerados como una nueva clase de polímeros que poseen una serie de propiedades únicas y muy interesantes, los cuales se diferencian de los polímeros clásicos en que son estructuras bien definidas, con un alto grado de uniformidad molecular, además de poseer una superficie con una elevada funcionalidad.^{4,13,19} Su gran versatilidad radica en la facilidad con la que se pueden diseñar y modificar las partes que lo componen, variando sus propiedades fisicoquímicas. Así, se puede diseñar un dendrímero en función de la aplicación deseada.

Los dendrímeros presentan un control sin precedentes sobre la reacción de adición de cada ramificación y muestran valores de polidispersidad (PDI) entre 1,00 y 1,05. El resto de los polímeros tienen valores de PDI desde 1,5 a 10,0 e incluso mayores.¹

La arquitectura de un dendrímero consiste de tres componentes básicos (figura 1.2): 1) el corazón, 2) el interior y 3) los grupos terminales o periféricos.

El corazón está ubicado en el centro, y se unen al mismo las porciones de ramificación, conocidas como dendrones. El tamaño del dendrón y del dendrímero depende del número de capas de monómero, donde cada capa representa una generación (G). El interior consiste en monómeros que tienen una funcionalidad de ramificación AB_x donde $X \geq 2$, figura 1.2. La preparación cuidadosa de la unidad de ramificación hace que sea posible controlar la reacción entre A y B. El interior del dendrímero es tradicionalmente inactivo y no está disponible para modificaciones posteriores. Sin embargo, hay algunos ejemplos de dendrímeros tratados con ácidos o bases fuertes para generar sitios activos dentro del interior dendrítico, permitiendo una funcionalización adicional.

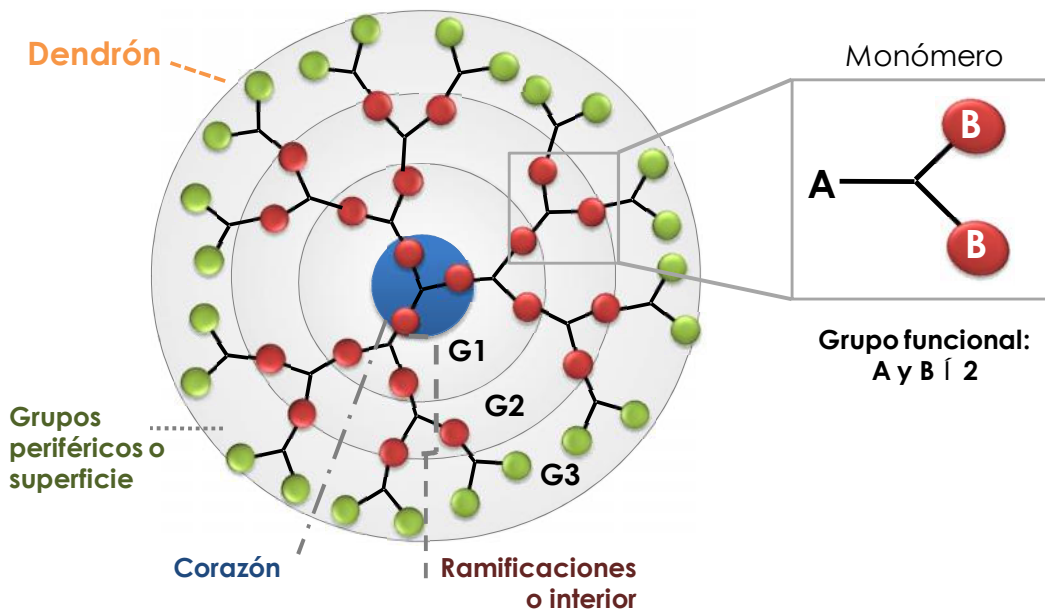


Figura 1.2. Esquema de arquitectura básica y componentes de un dendrímoro.

La cantidad y la composición química de la funcionalidad de B en el monómero darán al dendrímoro algunas de sus propiedades características. Por ejemplo, una alta densidad de funcionalidades y una unidad de ramificación aromática darán un dendrímoro térmicamente estable.^{20,21} La funcionalidad de los grupos periféricos de un dendrímoro es la parte más atractiva del mismo, ya que es accesible para su posterior funcionalización. Muchas de las propiedades que los dendrímoros exhiben están determinadas por los grupos terminales. Por ejemplo, la unión de cadenas largas alquílicas convierte al dendrímoro en hidrofóbico, mientras que, el mismo dendrímoro con hidratos de carbono se convierte en hidrofílico, permitiendo la conjugación multivalente a proteínas o células.^{4,5,22,23}

Se han sintetizado muchas clases de dendrímoros con una gran variedad de moléculas o elementos químicos en el núcleo, distintas clases de ramas y diferentes modificaciones de la periferia.^{5,16,24,25}

Las generaciones más pequeñas de los dendrímoros poseen estructuras abiertas y, a medida que estas van aumentando se hacen más densas y globulares llegando a alcanzar tamaños adecuados para ser utilizados en distintos campos de la nanociencia. A medida que va creciendo el sistema,

van surgiendo nuevos compartimentos o huecos, que dependiendo de la morfología de las ramas dendríticas, pueden ser adecuados para alojar otras moléculas. Además, una forma más globular disminuye la viscosidad intrínseca del polímero, confiriéndole mejores características para ser empleado en el área de la industria y en la ciencia de materiales. La disposición globular es susceptible de ser modificada por agentes externos, tales como el disolvente o la fuerza iónica del medio, lo que puede dar lugar a la modificación de propiedades del compuesto, como ocurre con la solubilidad.

Tradicionalmente, los dendrímeros son sintetizados empleando estrategias de crecimiento divergente (desde el corazón hacia la periferia) o convergente (la unión de dendrones preformados al corazón), Figura 1.3. Ambas consisten en una técnica iterativa donde monómeros AB_x son adicionados alternativamente para el crecimiento de la especie siguiendo pasos de desprotección-activación.

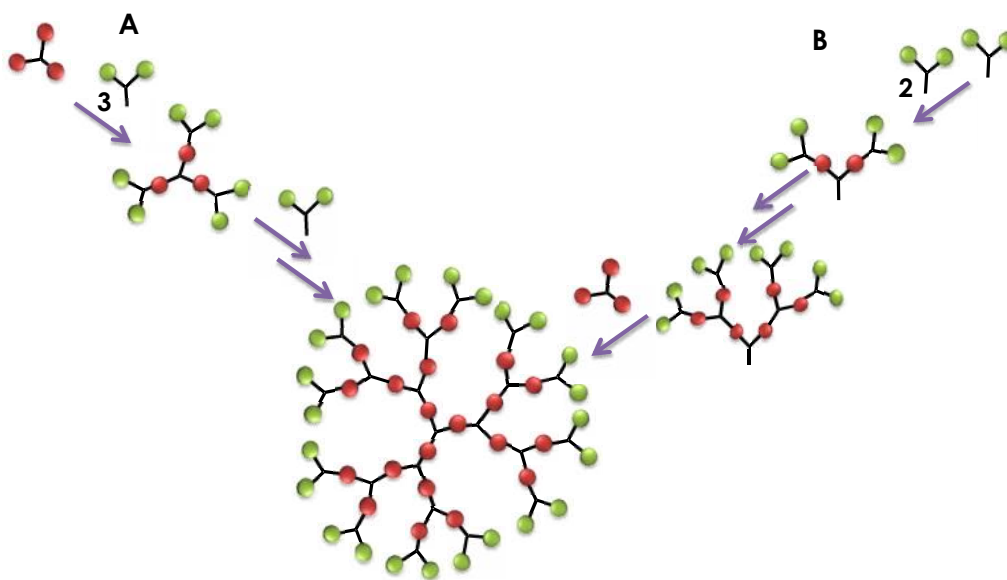


Figura 1.3. Esquema de estrategias divergente (A) y convergente (B) para la obtención de dendrímeros. Las esferas verdes se refieren a grupos funcionales sin reaccionar, y las rojas corresponden a una vez unidos los monómeros.

Estos protocolos dependen de la eficiencia de las reacciones que aseguren la completa sustitución de los grupos terminales B. Cualquier

desviación en este proceso, conducirá a defectos estructurales que, acumulados durante el crecimiento del dendrímero, resultan en procesos de purificación imposibles y/o muy tediosos. En consecuencia, la necesidad de reacciones químicas con alta eficiencia es un requisito esencial para la síntesis del dendrímero. A medida que aumenta el tamaño de la macromolécula, los grupos funcionales están más próximos, llegando a una situación de congestión superficial que produce defectos en su estructura, dejando de ser monodispersa. Más allá de esto, los dendrímeros son materiales que requieren, en general, procesos tediosos, costosos y mucho tiempo para su síntesis.

1.2.2. Aplicaciones biológicas de dendrímeros

El uso de dendrímeros como sistemas de soporte para el estudio y la modulación de procesos biológicos ha incrementado su popularidad.³ Este creciente interés es debido principalmente, a la capacidad para mostrar múltiples grupos funcionales en su superficie para los procesos de reconocimiento biológico.

Mediante microscopía de fuerza, se observó que la cadena de ADN se envuelve alrededor de los polímeros dendronizados.²⁶ También, se combinaron segmentos de ADN con dendrímeros.^{22,23,25} Los dendrímeros de poli(amido amino) (PAMAM), poli (propileno imina) y PAMAM parcialmente hidrolizados, se han utilizado como sistemas de transporte de ADN.^{5,23,25,27} Dendrímeros PAMAM funcionalizados con ciclodextrina mostraron la expresión de un gen aproximadamente 100 veces mayor que para el dendrímero sin funcionalizar o para la mezcla no covalente de PAMAM y ciclodextrina.²⁸ El dendrímero PAMAM de generación 5, funcionalizado con poli(etilenglicol) (PEG) produjo un aumento de 20 veces en la eficiencia de transfección utilizando el plásmido de ADN, que codifica para una enzima α -galactosidasa.²⁹

Además, el empleo de dendrímeros como sistemas de liberación de fármacos es de gran interés, debido a la capacidad de aumentar la selectividad y la estabilidad de agentes terapéuticos. Se han propuesto sistemas de liberación de fármacos de diferentes interacciones dendrímero-fármaco; como la encapsulación de fármacos en las cavidades internas del

dendrímtero (figura 1.4-A) y redes dendrímtero-fármaco (figura 1.4-B). También, se investigaron profármacos, los cuales poseen un agente terapéutico unido covalente o físicamente a la superficie del dendrímtero, figura 1.4-C y D, respectivamente.³⁰⁻³²

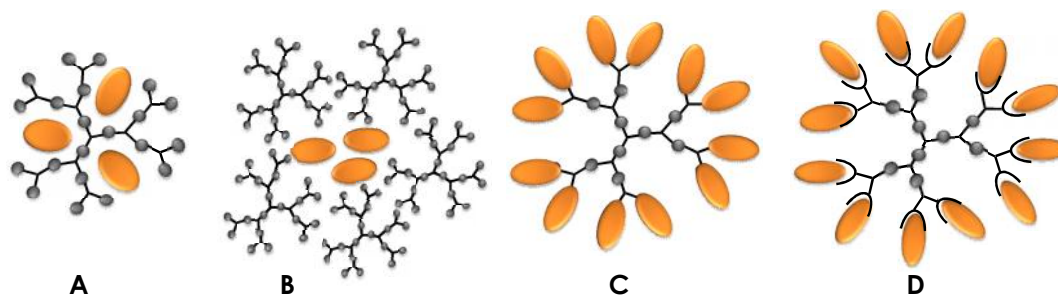


Figura 1.4. Representación esquemática de sistemas dendrímtero-fármaco.

En una publicación reciente, se unieron una serie de colorantes al dendrímtero de poli(propilenimina) de generación 5 (G-5) y se observó que tanto la carga como la forma del colorante influyeron en su afinidad por el polímero.³³ Un dendrímtero de PAMAN (centro hidrofílico) y funcionalizado en su periferia con un alcano de cadena larga (capa hidrofóbica), se unió al 5-fluorouracilo, un fármaco antitumoral soluble en agua.³⁴ Esta estructura se recubrió con fosfolípidos, el complejo resultante mostró el doble de biodisponibilidad oral del fármaco en ratas con respecto a la estructura sin los ácidos grasos.

Se han estudiado distintas formulaciones incluyendo dendrímteros, como por ejemplo, liposomas³⁵ y geles con potenciales aplicaciones en la administración de fármacos.³⁶ También se han investigado profármacos de dendrímteros de segunda y tercera generación con residuos de ácido 5-aminolevulínico, para la terapia fotodinámica,³⁷ y con el insecticida fipronil.³²

En la figura 1.5 se muestran algunas estructuras de los dendrímteros mencionados anteriormente.

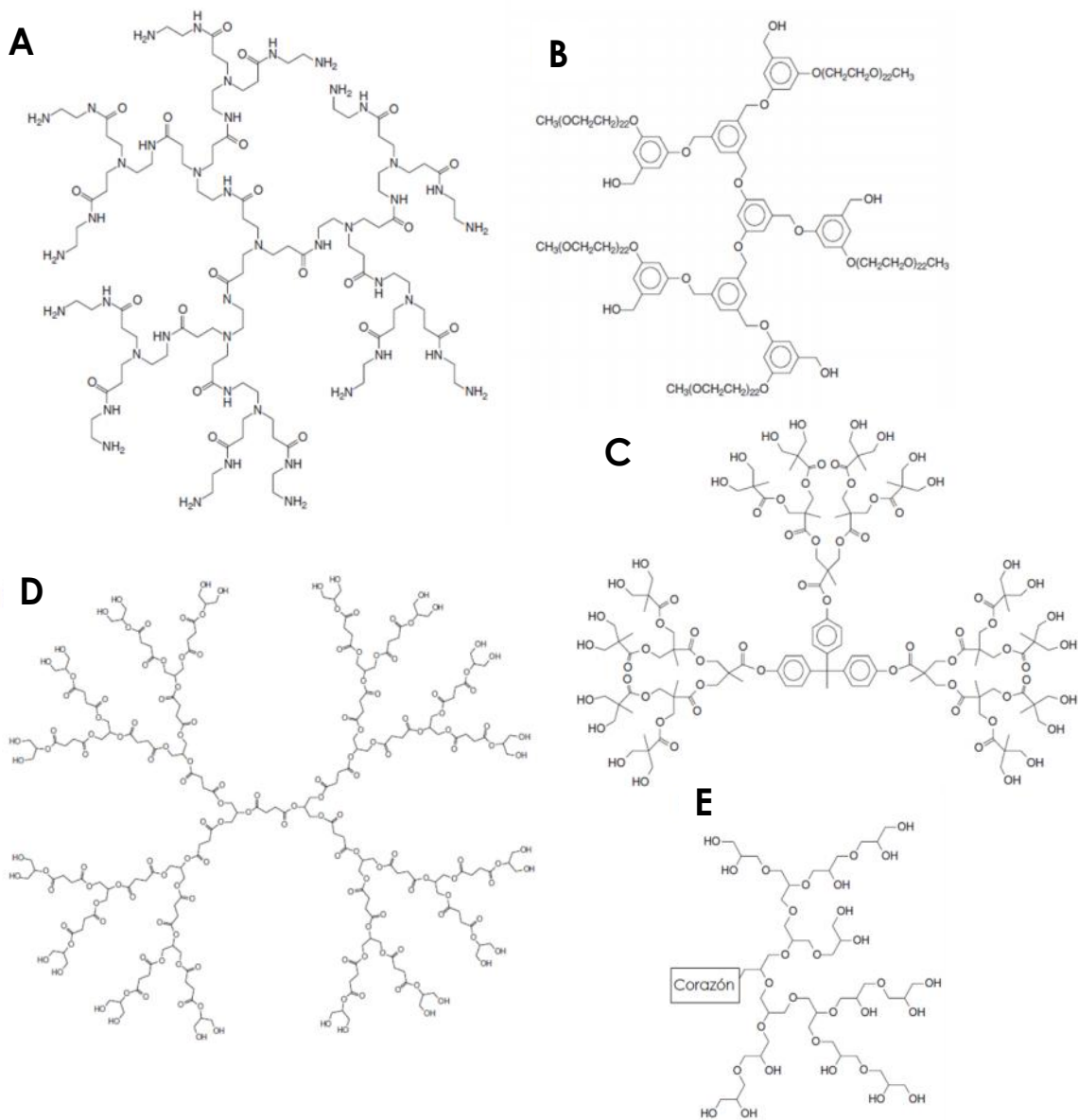


Figura 1.5. Ejemplos de dendrímeros: PAMAM (A), poliaryl éter (B), poliéster basado en ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico (C), poliéster basado en glicerol y ácido succínico(D), y poliglicerol (E).

Está claro que hay muchas otras áreas de la química biológica en la que la aplicación de los dendrímeros resulta útil. Por ejemplo, el desarrollo de dispositivos de análisis altamente sensibles,^{38,39} agentes de contraste,⁴⁰ investigación prión,^{41,42} tratamiento de quemaduras⁴³ y formación de imágenes resonancia paramagnética electrónica con dendrímeros marcados.⁴⁴

Un ejemplo relevante en la aplicación de dendrímeros, es el Vivagel® (Starpharma), compuesto predominantemente por lisina, que puede prevenir o reducir potencialmente la transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Esta propiedad se basa en la multivalencia o multifuncionalidad que le confiere la gran densidad de grupos periféricos. Los mismos interactúan fuertemente con los sitios receptores del virus en las células (figura 1.6), bloqueando la unión del virus a la misma.⁴⁵

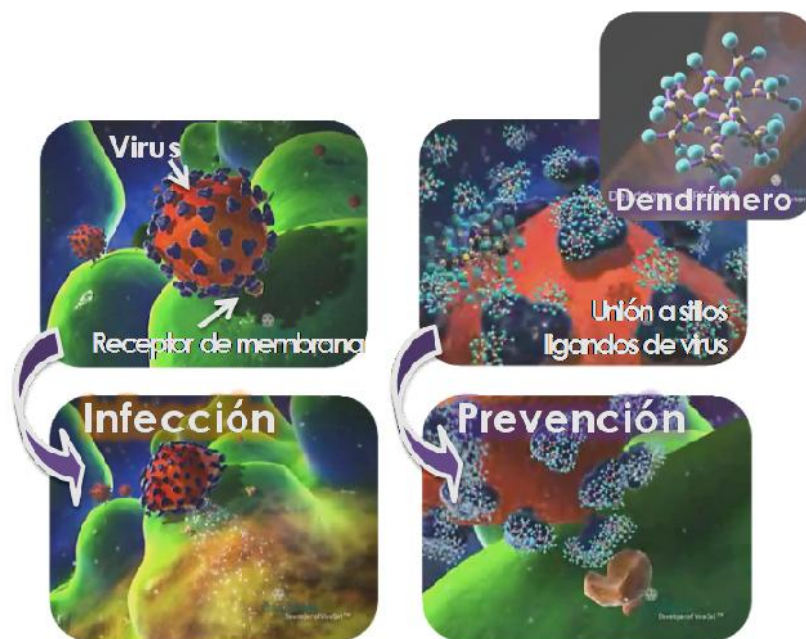


Figura 1.6. Esquema de mecanismo de acción de Vivagel®.

1.3. POLÍMEROS DENDRONIZADOS

Los polímeros dendronizados aparecieron por primera vez con una patente presentada por Tomalia y col. en 1987, para la síntesis de una amplia y muy funcionalizada estructura.⁴⁶ Sin embargo, Fréchet y Hawker fueron los primeros en reconocer estructuras híbridas de dendrímeros y polímeros lineales como el siguiente paso en la arquitectura molecular y en 1992, dendrones tipo Fréchet fueron unidos al poliestireno.⁴⁷ Percec y col. reconocen el papel

preponderante de la geometría en el autoensamblaje de polímeros equipado con cadenas laterales en forma de "cono".^{15-17,48} Por último, Schlüter y col. establecieron la importancia de la funcionalización de la cadena polimérica con dendrones, en la conformación y la forma general de las macromoléculas resultantes, obteniendo nanoobjetos con forma cilíndrica persistente.⁴⁹ A partir de entonces, los polímeros dendronizados se han utilizado cada vez más en una variedad de aplicaciones tales como la catálisis,⁵⁰ materiales de transferencia de energía, recolección de luz y conductores de electricidad,^{51,52} polielectrolitos altamente cargados,²⁶ administración de fármacos,⁵³⁻⁵⁵ modelado de superficies.^{56,57}

El creciente avance en la investigación de polímeros dendronizados ha desarrollado un nuevo y creciente campo en la interfaz de la química orgánica, la síntesis de polímeros y la ciencia de los materiales. De hecho, los polímeros dendronizados se encuentran entre las principales estructuras moleculares y supramoleculares más interesantes desarrolladas durante los últimos años, que han contribuido a desdibujar las líneas entre estas diferentes disciplinas. Estas estructuras crean un nuevo puente entre el mundo de las moléculas y los objetos nanoscópicos.

1.3.1. ¿Qué son los polímeros dendronizados?

Una de las clases más interesantes de arquitecturas dendríticas son los polímeros dendronizados. La búsqueda de macromoléculas con estructuras definidas y de mayor tamaño, ha dado lugar a la extensión del concepto dendrímeros a polímeros dendronizados.^{49,58} Los polímeros dendronizados resultan de la unión de dendrones a una cadena polimérica (figura 1.7).

Los polímeros en solución se encuentran con una conformación de ovillo al azar o una varilla rígida, o una combinación entre ambas.⁵⁸ En el caso de una varilla rígida, los polímeros tienen el potencial para extenderse sobre varios nanómetros en longitud, pero presentan una sección transversal en el intervalo de sólo unos pocos Angstrom (\AA). Por lo tanto, no son objetos de tamaño nanométrico en un sentido estricto.

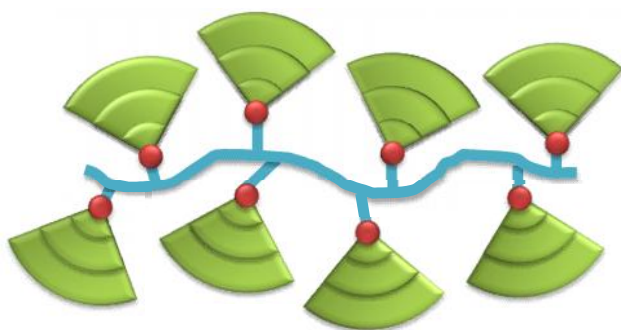


Figura 1.7. Esquema de polímero dendronizado.

En caso de un ovillo al azar, pueden presentar un diámetro en el orden de unos pocos nanómetros en todas las dimensiones. Sin embargo, debido a la flexibilidad conformacional de la cadena principal del polímero, éstos exhiben una dinámica estructural,¹² es decir, su forma promedio en solución es globular y no constante. En consecuencia, la presentación de grupos funcionales al entorno es al azar y lo más importante, no se encuentra definido el exterior, el interior, o la superficie de la estructura polimérica. Por lo tanto, los polímeros clásicos no son los candidatos ideales para muchas aplicaciones "sofisticadas".

Por su parte, los dendrímeros son algunas de las arquitecturas moleculares más interesantes que se han desarrollado en los últimos años. Como se mencionó anteriormente, han originado una nueva clase de materiales con aplicaciones prometedoras en diferentes campos, que van desde la bioquímica a la microelectrónica. Sin embargo, el tamaño del dendrímero se limita a unos pocos nanómetros debido al problema inherente de impedimento estérico por el creciente número de ramas.

Los polímeros dendronizados pueden tener diferentes conformaciones dependiendo de la estructura, el tamaño y la densidad del dendrón a lo largo de la cadena polimérica. Las estructuras poliméricas convencionales, tales como poli (acrilato) o poli (estireno), pueden variar con la dendronización desde una conformación ovillo al azar a una barra rígida o cilíndrica molecular,⁵⁹ como se muestra en la figura 1.8. La cadena polimérica se estira mediante la unión de dendrones de generaciones crecientes, como consecuencia del incremento de las repulsiones estéricas entre ellos. Este

control de la forma del polímero puede ser modulado por la interacción de varios factores, tales como dendrón-dendrón, dendrón-cadena polimérica y disolvente-dendrón. Por lo tanto, mediante la fusión de las propiedades de dendrímeros y polímeros, se pueden obtener distintas estructuras con tamaños desde unos pocos a varios cientos de nanómetros de diámetro y longitud, con propiedades que dependen de la constitución química, rigidez y grupos funcionales de la superficie del dendrón.^{49,56,59}

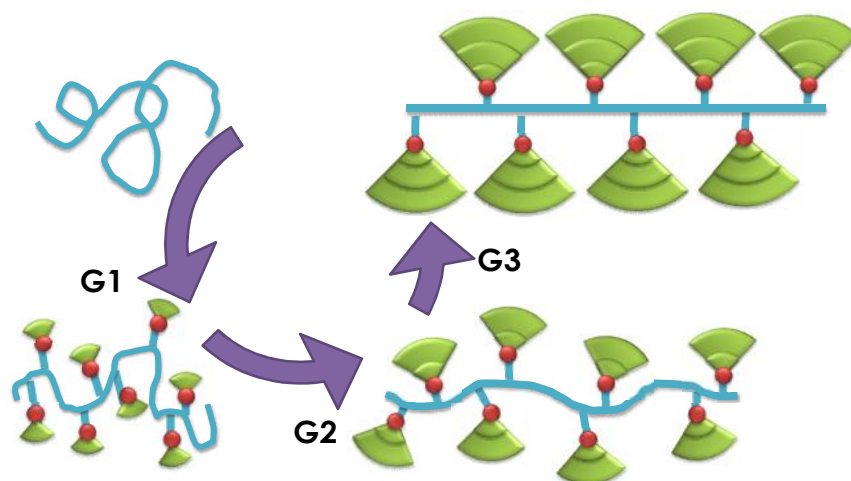


Figura 1.8. Cambio de forma con generación del dendrón. G1, G2 y G3 representan primera, segunda y tercera generación.

1.3.2. Estrategias de síntesis

Dado que los polímeros dendronizados surgen de la fusión de la química de los dendrímeros y de polímeros clásicos, su obtención es una combinación de la síntesis orgánica de ambos.⁵⁸ Por lo tanto, cualquiera de las estrategias para la obtención de polímeros dendronizados, incluirá la síntesis difícil y, a menudo, tediosa de los segmentos dendríticos.

Se distinguen tres vías de síntesis de polímeros dendronizados: *graft-to* o injerto de dendrones (A), *graft-from* o crecimiento de dendrones (B) y macromonómero (C), figura 1.9.

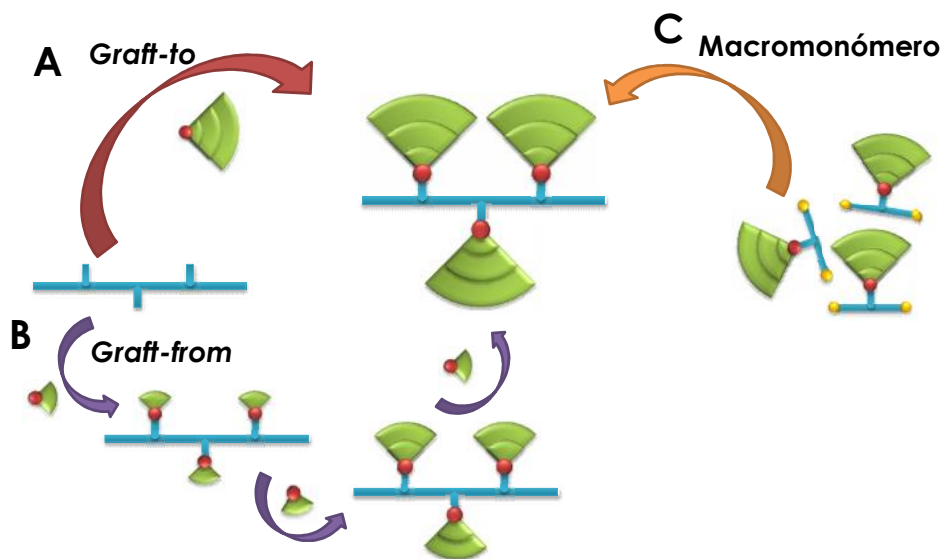


Figura 1.9. Esquema de vías sintéticas de polímeros dendronizados. En verde aparecen los dendrímeros, y celeste el polímero.

1.3.2.1. Vía “graft-to” o injerto de dendrones

Esta estrategia consiste en la unión de dendrones, de la generación deseada, a los grupos funcionales reactivos de una cadena polimérica preformada (figura 1.9-A). Esta vía también se conoce como la “ruta convergente”.

Las reacciones de dendronización son difíciles de lograr con un alto grado de conversión. La principal razón de esto, es el impedimento existente entre los grupos que reaccionan; el polímero en su conformación de ovillo al azar tiene algunos de sus grupos reactivos inaccesibles. Además, los grupos funcionales reactivos del dendrón de alta generación (punto focal) se intercalan entre las ramas dendríticas. Sólo algunos métodos eficientes de acoplamiento se han logrado con alto grado de dendronización, en los cuales se empleó dendrones de baja generación y polímeros con características estructurales rígidas y abiertas.⁶⁰

La mayoría de los ejemplos publicados, se limitan al uso de dendrones de primera y segunda generación en la modificación de polímeros rígidos, como poli(siloxanos)⁴⁸ y poli(fenilenos),⁶¹ como se muestran en la figura 1.10.

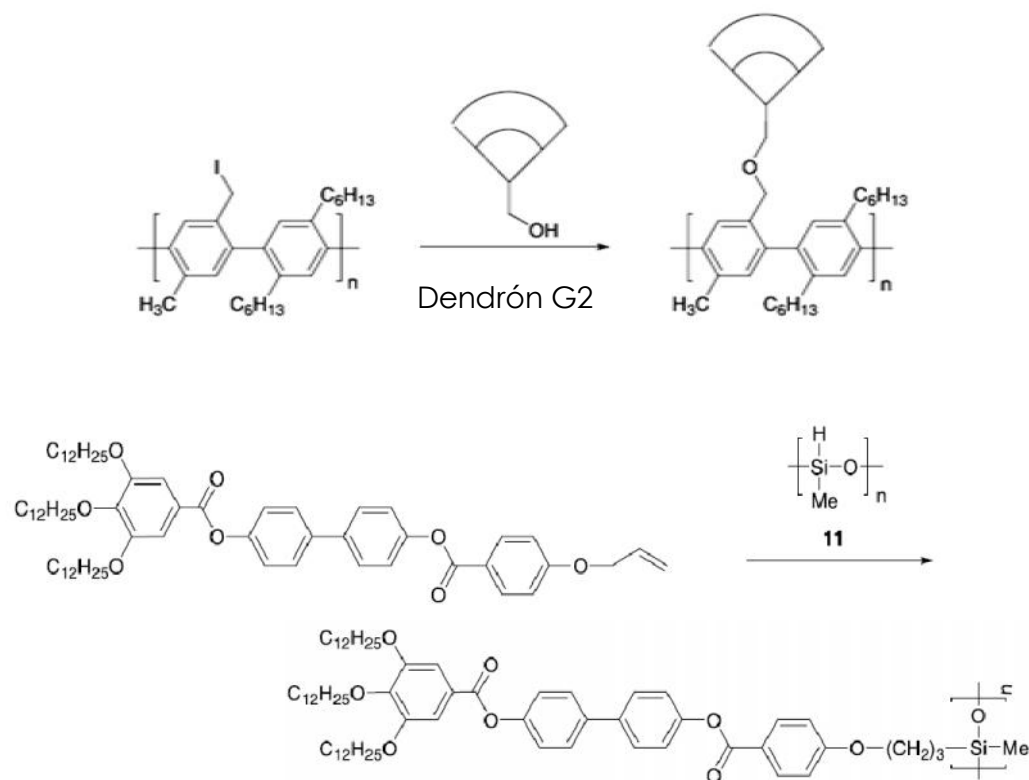


Figura 1.10. Ejemplos de síntesis *graft-to* de poli(fenilenos) y poli(siloxanos) dendronizados.

1.3.2.2. Vía “*graft-from*” o crecimiento de dendrones

En esta vía, se unen dendrones de primera generación al polímero preformado y posteriormente, se incrementa la generación del dendrón (figura 1.9- B). Esto último, se logra mediante reacciones alternativas de desprotección y acoplamiento. Esta metodología es conocida como “ruta divergente”.

A diferencia de la vía convergente, no hay mayores inconvenientes de encuentro entre los grupos reactivos, debido a que las moléculas precursoras son pequeñas y tienen menor impedimento para difundir al interior de las estructuras poliméricas. Sin embargo, se presenta la gran dificultad de no lograr una síntesis completa de cada generación del dendrón sobre el esqueleto del polímero. Las estructuras obtenidas con defectos estructurales son difíciles de remover del producto deseado, debido a su similitud en tamaño y estructura. Otro problema asociado a esta estrategia, es la

caracterización de los productos, en particular, con respecto a la determinación del grado de dendronización del polímero.

En un ejemplo de esta vía *graft-from*, los autores⁶² partieron de poli(4-hidroxiestireno) con polidispersidad de 1,1 y pesos moleculares entre 4000 y 10000 (figura 1.11). El polímero fue purificado luego de cada paso de reacción mediante precipitación en metanol. Los polímeros de bajo peso molecular se modificaron con dendrones de tercera generación con una polidispersidad de 1,17. Sin embargo, a mayores pesos moleculares se producen agregados, resultando un menor cubrimiento del polímero.

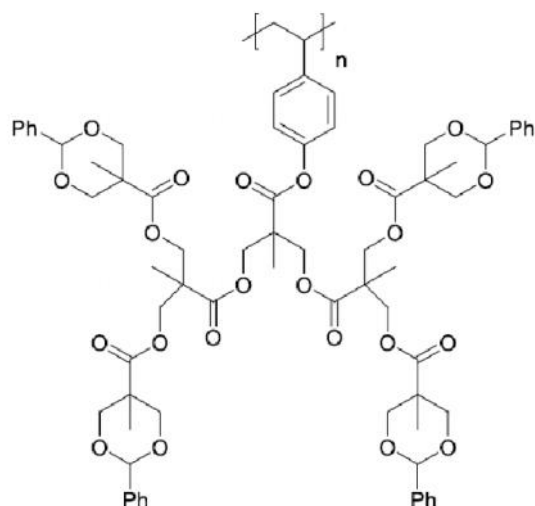


Figura 1.11. Ejemplo de poli(estireno) dendronizado obtenido vía *graft from*.

1.3.2.3. Vía del macromonómero

El polímero dendronizado es obtenido a partir de la unión de un grupo funcional polimerizable en el punto focal de los dendrones de la generación deseada, y su posterior polimerización (figura 1.9- C). La ventaja evidente de esta estrategia con respecto a las anteriores, es el hecho de no involucrar pasos post-polimerización. Como resultado, si la polimerización es factible, se obtienen polímeros con grado de dendronización total, sin defectos estructurales. Sin embargo, el gran impedimento estérico que genera el

tamaño del dendrón, afecta la cinética de la polimerización. En consecuencia, se puede llegar a inhibir completamente la polimerización o, incluso, generar oligómeros o una amplia polidispersidad del polímero resultante. A pesar de estos inconvenientes, esta estrategia es la más exitosa en la obtención de polímeros dendronizados.⁶³

La reacción de polimerización del macromonómero puede realizarse por diferentes métodos al igual que los polímeros clásicos, por lo tanto, existen diversos mecanismos, tales como polimerización por crecimiento en etapas, crecimiento en cadena, reacciones de coordinación, apertura de anillo, etc. En la figura 1.12, se muestran algunos ejemplos de polímeros obtenidos por esta ruta sintética y mediante distintos tipos de polimerización.

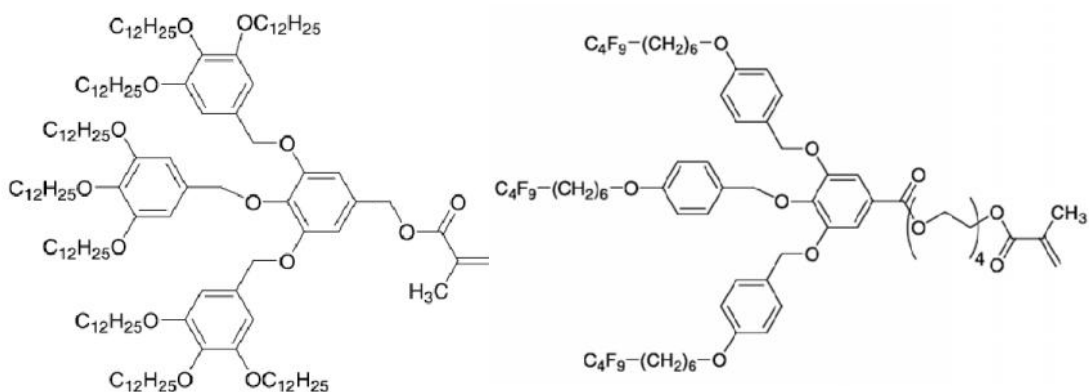


Figura 1.12. Ejemplos de macromonómeros empleados en la estrategia de polimerización

De las vías antes propuestas, aún no es posible determinar cuál es la que brinda mejores resultados respecto de la obtención de polímeros con bajas distribuciones de pesos moleculares y con un alto grado de cobertura dendrítica. La optimización de las condiciones en cada una de las vías sintéticas es aún un área en desarrollo. Sin embargo, en la actualidad ha habido un cambio notable en el énfasis de la síntesis de estos sistemas, siendo

relevante el uso de la mejor estrategia de síntesis disponible para obtener la mejor estructura en función de la aplicación específica deseada.

En esta Tesis, entre las rutas posibles para la dendronización de un biopolímero, se seleccionó *graft-to*, debido a que permite obtener polímeros con dendrones injertados sin defectos estructurales.

1.3.3. Estructura molecular y supramolecular

De las propiedades que han presentado los polímeros dendronizados obtenidos hasta el presente, no tan sólo combinan las propiedades de los dos tipos de moléculas, sino que además han mostrado algunas particulares. A nivel molecular, la característica principal que poseen está dada por la enorme cantidad y variedad de grupos funcionales que se pueden confinar en una distribución espacial pequeña, abriendo un abanico enorme de aplicaciones. En el caso de los polímeros dendronizados, este efecto de "multifuncionalidad" se ve incrementado por la confinación de un gran número de estructuras dendríticas unidas al esqueleto polimérico. Entre varios aspectos, esto tiene una influencia directa sobre la formación de microentornos y cavidades internas, que para el caso de los polímeros dendronizados, se extienden a lo largo de toda la estructura polimérica.

La estructura molecular y supramolecular que adopta un polímero dendronizado es resultado tanto de un efecto topográfico como químico, donde el primero depende de la arquitectura y geometría de las moléculas. Mientras que, la naturaleza química depende de los grupos funcionales y enlaces químicos de las estructuras, incluyendo interacciones secundarias entre los constituyentes del polímero dendronizado.

1.3.3.1. Forma y tamaño

La forma y tamaño de los polímeros dendronizados dependen del peso molecular, el grado de dendronización, la generación dendrítica, la naturaleza química y cantidad de grupos periféricos.^{58,64} De estos factores, la mayor influencia es la naturaleza topológica. Este efecto es resultado de distintos factores tales como el impedimento estérico inducido por los dendrones como

fuerza repulsiva; interacciones secundarias entre las cadenas adyacentes como interacciones π - π o puente hidrógeno, que actúan como fuerza atractiva conduciendo al autoensamble; y la formación de fases altamente ordenadas en estado condensado.

Se ha demostrado por distintas metodologías,⁶⁵ la existencia de un peso molecular crítico para el cambio desde una estructura inicial de características globulares a una estructura cilíndrica (figura 1.13).

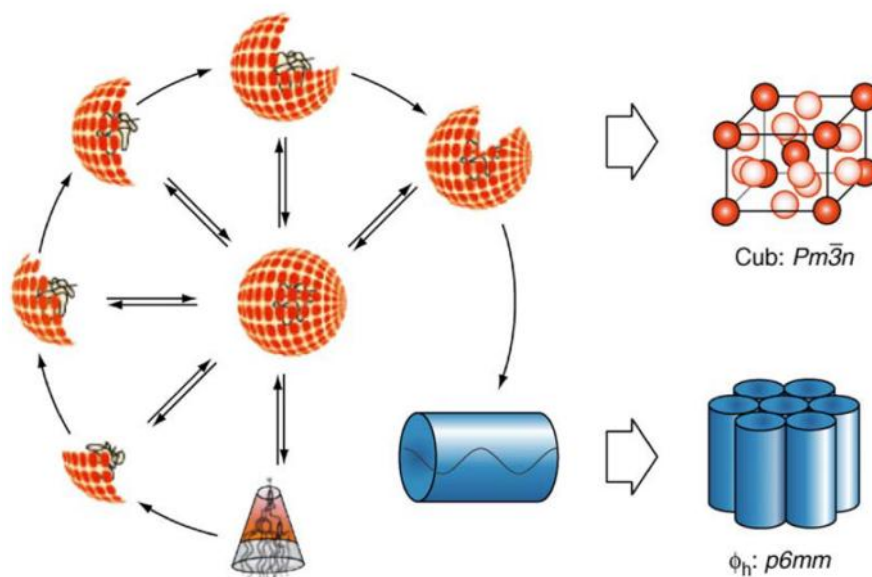


Figura 1.13. Autoensamblado de polímeros dendronizados en superestructuras esféricas y cilíndricas propuestas por Percec y col.⁶⁵

Sheiko y col. compararon la longitud de contorno de poli(metacrilato) dendronizado de primera y segunda generación,⁶⁵ obtenidos mediante la estrategia del macromonomero. En la figura 1.14-A, el polímero dendronizado de primera generación tuvo una longitud dos veces menos que lo esperado por el peso molecular, esto implica un cierto encogimiento de las moléculas debido a la formación de hélice al azar. Por otro lado, el polímero dendronizado de segunda generación (G2) presentó una conformación extendida. Estos resultados evidencian que el grado de extensión y el desplegamiento entrópicamente desfavorable del polímero, son determinados por el impedimento estérico de los dendrones unidos a la cadena polimérica.

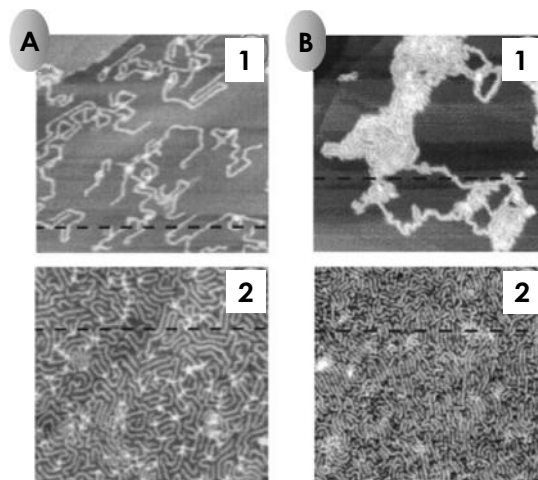


Figura 1.14. Imágenes de fuerza atómica de moléculas individuales (1) y películas delgadas (2): poli(estireno) dendronizado G1 (A) y poli(metacrilato) dendronizado G2 (B).

Se ha estudiado el efecto de la dendronización de poli(estireno) y poli(metacrilato), los cuales revelan que dependiendo de la naturaleza y generación del dendrón y el grado de dendronización en el polímero, varía la conformación de una hélice al azar a extendida completamente.⁶⁶

Se ha reportado la síntesis de películas de poli(estireno) con dendrones de tipo Frechet de tercera generación, sobre grafito pirolítico altamente orientado.⁵⁶ Se ha observado una alta tendencia de las cadenas de los polímeros dendronizados a empaquetarse en forma alineada y paralela, con una distancia característica entre ellas de 5,0 nm ($\pm 0,5$ nm). Se debe tener en cuenta que de acuerdo al modelado molecular el diámetro de las mismas es 4,4 nm.

1.3.3.2. Estructura interna

Se ha demostrado, en distintas publicaciones, la existencia de dos zonas en la estructura de los polímeros dendronizados, una interna y otra externa.

Pakula y col. han estudiado poli(metacrilato) dendronizado de primera a cuarta generación, por calorimetría diferencial de barrido.⁶⁷ Se observó un incremento notable en las temperaturas de transición vítrea (T_g) de más de 20°C (para G1 $T_g = 55,8^\circ\text{C}$ y $55,9^\circ\text{C}$, y G3 $T_g = 79,6^\circ\text{C}$ y $76,5^\circ\text{C}$), acompañado por un notable ensanchamiento del pico de transición. Los autores explicaron

que el incremento en el grado de ramificación (mayor generación del dendrón), podría reducir la movilidad segmental (aumento T_g) y, por otro lado, el mayor número de grupos periféricos podría incrementar su movilidad superficial (ensanchamiento de pico). De esta manera, se distinguen dos regiones, una interna con características rígidas, y una externa con mayor movilidad, donde el incremento de generación dendrítica aumenta la diferencia entre ambas zonas.

Percec y col. han investigado sistemáticamente las estructuras supramoleculares y el autoensamblado de poli(metacrilato) y poli(estireno) dendronizados, en estado condensado mediante diferentes metodologías.⁶⁸⁻⁷⁰ Los polímeros con dendrones tipo Percec G1 con espaciadores largos, exhiben una fase de columna hexagonal. El diámetro promedio de las columnas incrementa con el largo del espaciador y disminuye con el incremento de la temperatura. Los autores proponen que una cadena polimérica forma el centro de una columna, con espaciadores hidrofílicos formando el interior de la misma, y los grupos periféricos del dendrón hacia afuera. El autoensamblado es conducido aparentemente, por el empaquetamiento π - π de las porciones aromáticas del dendrón y con igual importancia, por la segregación de microfase de interior hidrofílico y periferia hidrofóbica de las columnas. Mediante estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) de sólidos de los mismos,⁷¹ se observó un gradiente en la movilidad de las cadenas laterales dendríticas, aumentando desde el interior de las ramas dendríticas hacia la periferia.

En conclusión, en la estructura molecular y supramolecular de los polímeros dendronizados, con alto peso molecular y generación del dendrón constituyen objetos moleculares cilíndricos, rígidos, con formas persistentes, con una longitud cercana al contorno de la cadena polimérica, diámetro definido, y una superficie densamente empaquetada. Estos sistemas tienen el largo suficiente para ser visualizados como moléculas individuales. Una de las principales características, y diferencia con los dendrímeros, es el tamaño de estas superestructuras que alcanzan varios cientos de nanómetro, formando

así, objetos anisotrópicos que constituyen un puente entre la escala molecular y la nanoscópica.

1.3.4. Aplicaciones

Los polímeros dendronizados son híbridos estructuralmente situados entre los dendrímeros y los polímeros, combinando características de ambos y, a la vez, propias. Como se discutió anteriormente, presentan varias propiedades que han hecho de los dendrímeros una nueva generación de materiales, a lo que se le suma la particularidad de formar estructuras nanoscópicas anisotrópicas, lo cual puede ser explotado en usos futuros. Entre sus potenciales aplicaciones, se detallan algunas a continuación.

1.3.4.1. Unidades constructoras de estructuras nanoscópicas

Uno de los potenciales usos es la preparación de nanoestructuras con alto grado de organización. Entre los estudios preliminares realizados, se encuentran la formación de macroestructuras anfifílicas con diversas características, la estructuración en arreglos similares a proteínas con funciones de canales iónicos y la formación de nanotubos.

Los polímeros dendronizados con arreglos anfifílicos y dimensiones nanoscópicas tienen propiedades equivalentes a la de sus análogos de menor peso molecular, con el mismo potencial de aplicación. Debido a sus dimensiones laterales, a las formas anisotrópicas y a los tamaños definidos, se han podido obtener las distintas arquitecturas mostradas en la figura 1.15, algunas de las cuales son novedosas y cautivantes debido a que son inalcanzables por métodos de polimerización convencionales.

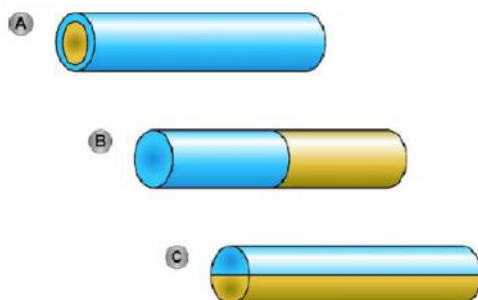


Figura 1.15. Diferentes arquitecturas de polímeros dendronizados anfifílicos: radialmente (A), dibloque AB (B) y segregado a lo largo (C).

Percec y col.^{35,36} sintetizaron polímeros dendronizados capaces de adquirir arquitecturas supramoleculares cilíndricas por interacciones puente hidrógeno y tipo π - π . Cuando se las mezcló con un dendrímero (figura 1.16),⁷² el arreglo supramolecular cambió a hexagonal como el que se observa en la figura. Por difracción de rayos X, se demostró que cada unidad estructural está formada por tres unidades de polímeros dendronizados y una cuarta de dendrímero. El potencial uso de estas estructuras fue estudiado en la síntesis de canales iónicos, usando dendrímeros con corazones hidrofílicos y periferias fluoradas, encontrándose resultados alentadores en el uso como canal hidrofílico.

En una variación del concepto de objetos radialmente segregados, Zimmerman y col. utilizaron polímeros dendronizados para la obtención de nanotubos.⁷³ La metodología involucró el autoensamblado de las estructuras, el entrecruzamiento de los grupos funcionales superficiales por apertura de anillo, y el clivaje final del esqueleto dendrítico por transesterificación. De esta forma, se obtuvo un tubo con un diámetro del orden de los nanómetros, con un exterior hidrofóbico y un interior hidrofílico.

1.3.4.2. Catálisis

Una de las más claras aplicaciones de los polímeros dendronizados, es en catálisis. Esto radica en la gran densidad de grupos funcionales de la periferia dendrítica y el efecto cooperativo de los mismos.

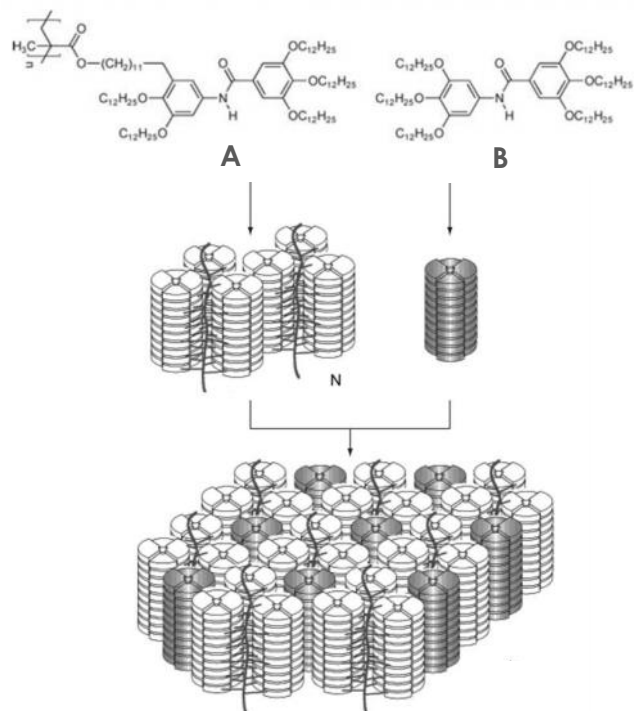


Figura 1.16. Ensamblado de polímeros dendronizados y dendrímeros con potencial aplicación como canales iónicos.

Frechet y col. investigaron la catálisis en la esterificación de alcoholes terciarios dentro de un polímero dendronizado,⁷⁴ encontrando que el microambiente que proporciona la estructura favorece la reacción.

Un ejemplo de catálisis en la superficie de polímeros dendronizados fue reportado por Koten y col.⁷⁵ Los polímeros dendronizados G1 y G3 fueron funcionalizados en la superficie con “pinzas” de platino y paladio (figura 1.17). Dependiendo del número de unidades repetitiva en el polímero y la generación del dendrón, se logran cientos de sitios activos en la superficie.

Además de las ventajas mencionadas anteriormente, los polímeros dendronizados pueden ser recuperados por simple precipitación y filtración, de esta manera, son reusados sin purificación, obteniendo los mismos resultados en actividad catalítica e inducción quiral.

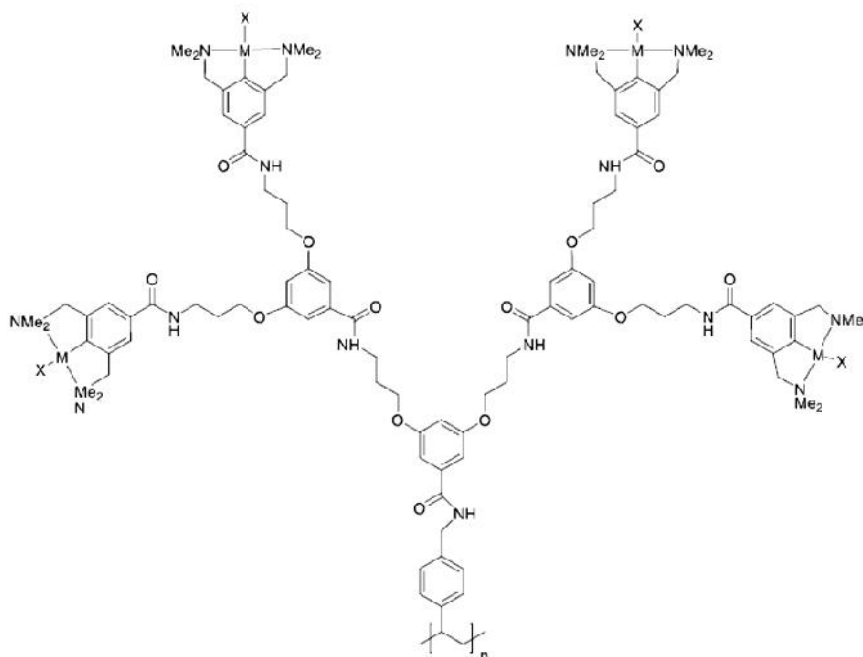


Figura 1.17. Polímero dendronizado con potenciales aplicaciones en catálisis.

1.3.4.3. Aplicaciones biológicas

La importancia en la aplicación de los polímeros dendronizados en el campo de biomedicina y biología, radica en la interacción con sistemas biológicos (multivalencia) y la conformación que adoptan mimetizando estructuras biológicas. Un primer paso en esta área, fue la síntesis de polímeros dendronizados biodegradables basados en policaprolactona,⁷⁶ resultando un sistema con buena biocompatibilidad y comportamiento *in vivo*.

Los polímeros dendronizados policatiónicos han despertado un gran interés en biomedicina, debido a su capacidad de asociarse con moléculas de ADN. Shlutler, Rabe y col.⁴² utilizaron poli(estirenos) dendronizados catiónicos como sustratos en la asociación con ADN. Los estudios por microscopía de fuerza atómica (AFM por sus siglas en inglés), demostraron la asociación óptima con los polímeros dendronizados de cuarta generación, debido a que sus dimensiones coincidieron con el tamaño interno de la hélice de ADN (figura 1.18)

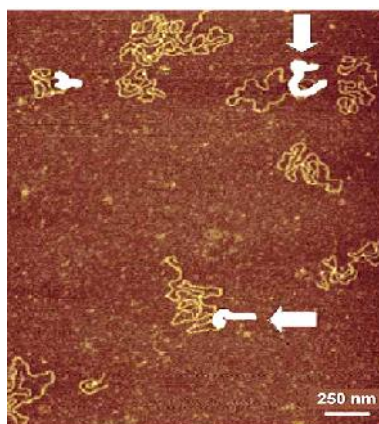


Figura 1.18. Imagen de AFM de complejos del polímero dendronizado y ADN.

1.4. QITOSANO: CARACTERÍSTICAS, PROPIEDADES Y APLICACIONES

El quitosano es un polímero natural que se obtiene a partir de quitina, uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza. La quitina forma parte de la estructura de soporte de numerosos organismos vivos, tales como artrópodos (crustáceos e insectos), moluscos y hongos. Se trata además de un subproducto importante de varias industrias como la pesquera y la cervecera. En particular, en nuestro grupo de investigación surge el empleo de quitosano en el marco de un proyecto de recuperación del polímero de desechos de crustáceos de la Patagonia Argentina.

Quitina y quitosano son biopolímeros que en los últimos años han encontrado gran cantidad de aplicaciones, especialmente en la industria alimentaria y en la biotecnológica.⁷⁷

Quitina está formada por unidades de 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucosa unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 4). La obtención de quitosano a partir de quitina se realiza por una desacetilación incompleta de la misma (entre 50 y 100%), dejando libre el grupo amino del carbono 2.⁷⁸ Es por ello, que el quitosano es un copolímero de 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucosa y 2-amino-2-deoxy- β -D-glucosa (figura 1.19).

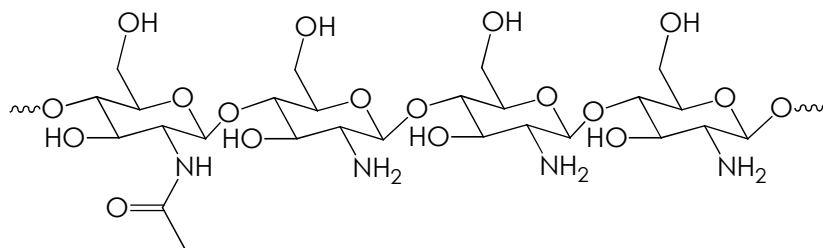


Figura 1.19. Estructura de quitosano.

Las principales propiedades fisicoquímicas de quitosano, que determinan sus propiedades funcionales, son su grado de desacetilación y su peso molecular promedio. El porcentaje de grupos amino que quedan libres en la molécula de quitosano, es lo que se denomina grado de desacetilación y está estrechamente vinculado con su solubilidad. Como consecuencia de la hidrólisis del grupo N-acetilo, aumenta la capacidad hidrofílica de quitosano y pasa a ser soluble en soluciones ácidas diluidas (acético, fórmico, clorhídrico, entre otros), ya que el pKa del grupo amino de quitosano es aproximadamente 6.^{77,79}

La insolubilidad de quitosano en medios neutros y básicos, es el principal limitante de su uso. Sin embargo, mediante diferentes modificaciones químicas es posible llegar a derivados solubles de quitosano, introducir grupos funcionales en la cadena polimérica y controlar las propiedades hidrofóbicas, catiónicas y aniónicas.⁷⁹ Los progresos que se realicen en esta área conducirán a la obtención de nuevos derivados, que exhibirán potenciales aplicaciones sin límites en diversos campos.

Algunas de las propiedades funcionales del quitosano son: biodegradabilidad, biocompatibilidad, mucoadhesión, capacidad filmogénica, hemostático, promotor de absorción, actividad antimicrobiana, antiolesterolémica y antioxidante. Estas propiedades funcionales han promovido su utilización en varios campos distintos como son agricultura, industria textil y medicina.^{77,79,80} También ha sido utilizado en la industria papelera y en el tratamiento de aguas residuales.⁸¹ Ha sido altamente utilizado en el campo de la biomedicina debido a su actividad inmunoestimuladora,

propiedades anticoagulantes, acción antifúngica y promotor de la cicatrización de heridas.⁸²⁻⁸⁵

Debido a su carácter catiónico y a sus propiedades gelificantes y filmogénicas, el quitosano ha sido estudiado en la industria farmacéutica por su potencial en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos.^{79,86,87} Constituye un vehículo para la encapsulación del fármaco, protegiéndolo y liberándolo de forma controlada, además de promover su absorción a través del epitelio. La toxicidad del quitosano por vía oral es baja; se ha descrito una LD50 (dosis letal para el 50% de un conjunto de animales de prueba) de 16g por Kg en ratas.⁸⁸

En los últimos años, el estudio de quitosano se ha centrado sobre todo en mejorar la liberación y la absorción de las llamadas biomoléculas terapéuticas, como son los fármacos proteicos.^{80,87} Existen resultados contradictorios sobre la mayor eficiencia de quitosano en solución, en polvo o en forma de nanopartículas en la liberación *in vivo*. En general, se ha observado que la eficiencia de la absorción de macromoléculas en mucosas, utilizando nanopartículas de quitosano como vehículo de encapsulación, es inferior a la obtenida con formulaciones de quitosano en solución o en polvo.⁸⁹

1.4.1. Antecedentes de quitosano dendronizado

En la actualidad, se encuentran muy pocos reportes de polisacáridos dendronizados, particularmente, relacionados a quitina y quitosano, y la mayoría sólo abarcan aspectos sintéticos. Sashiwa y col. sintetizaron híbridos de quitosano-dendrímeros de acuerdo a dos métodos. El primero corresponde al crecimiento de dendrones en la cadena polimérica, vía divergente.⁹⁰⁻⁹² Sin embargo, la reactividad del dendrón es limitada en este método. En el segundo método, se unieron dendrones comerciales de poli(amidoamino) (PAMAM) o poli(etilenimina) a quitosano. En este caso, el principal inconveniente fue el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas y un bajo grado de dendronización.

Otro antecedente, es la unión de dendrones de poliglicerol al o-carboximetil-quitosano.⁹³ Zhao y col. desarrollaron un derivado de quitosano dendronizado, hidroxietil-quitosano con benzoato de 3,4,5-tris[*p*-(*n*-dodeciloxi)-*m*-metoxibenziloxi] (HECS-g-DOVOB),⁹⁴ el cual se comporta como cristal líquido y tiene propiedades de autoensamblado.

Los únicos reportes de quitosano dendronizado, mencionados anteriormente, se limitan a la síntesis y, en el último antecedente, al estudio del comportamiento físico del material resultante.

En este contexto, la presente Tesis Doctoral se enfocó en el desarrollo de nuevos materiales multifuncionalizados, basados en quitosano y dendrones, empleando una metodología diferente a las reportadas. Por un lado, el empleo del biopolímero aporta todas las características relevantes en el área biológica y médica, y por otro lado, la contribución de las interesantes propiedades de los polímeros dendríticos, que resultan de la multifuncionalidad y arquitectura molecular de los mismos. A partir de la combinación de estas características, se pretende obtener sistemas con potenciales aplicaciones biológicas.

Capítulo 2

FUNDAMENTOS METODOLÓGICOS



En el presente capítulo, se presentan los fundamentos de las distintas metodologías empleadas en la caracterización de los polímeros dendronizados.

2.1. TÉCNICAS MICROSCÓPICAS

2.1.1. Microscopía de fuerza atómica

La microscopía de fuerza atómica (AFM por sus siglas en inglés) es un sistema mecánico-óptico, que ha ido desarrollándose como un instrumento útil para la medición directa de fuerzas intermoleculares con resolución atómica. Esta característica hace posible que sea empleado en un amplio espectro de aplicaciones, tales como sistemas electrónicos, semi-conductores, materiales manufacturados, polímeros, aplicaciones biológicas y biomateriales.⁹⁵

Este instrumento mecánico-óptico, detecta fuerzas a nivel atómico y genera imágenes a través de una medición óptica resultante del movimiento sobre una superficie, de una palanca (cantiléver) que tiene una punta muy afilada de diamante en su extremo (figura 2.1-A).

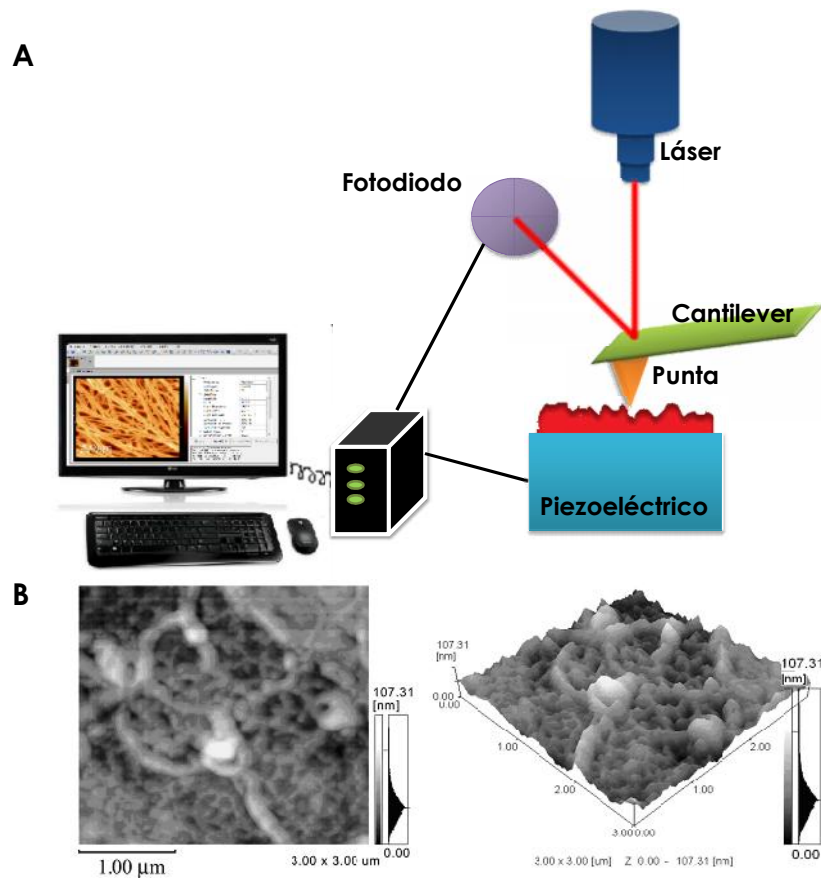


Figura 2.1. Esquema de un microscopio de fuerza atómica (A) y una imagen obtenida por AFM (B).

El fundamento básico de AFM, es la obtención de imágenes tridimensionales de superficies, a partir de la detección de fuerzas entre la muestra y una punta afilada, sin usar un rayo incidente como los microscopios clásicos. La muestra es montada en un escáner piezoeléctrico, que permite un posicionamiento tridimensional con exactitud sub-nanométrica; mientras la fuerza es monitorizada con sensibilidad en pico-newton, detectando la medida de desviación del cantiléver. Esta flexión es registrada por un sensor adecuado y la señal obtenida se introduce en un circuito de retroalimentación, el cual determina la altura de la punta sobre la muestra. Representando la altura de la punta frente a su posición sobre la muestra es posible trazar un mapa topográfico de la muestra.

El principio del proceso de medición del AFM es el barrido de la punta sobre la superficie de la muestra con un mecanismo de *feedback*. La fuerza repulsiva entre átomos progresivamente debilita las fuerzas de atracción, cuando la distancia Interatómica disminuye. Las fuerzas de interacción son nulas, cuando la distancia entre átomos alcanza un par de Amstrong, y pasa a ser repulsivo cuando los átomos están en contacto.

2.1.1.1. AFM en modo de contacto intermitente “tapping mode”

Existen dos modos de operación en un microscopio AFM, continuo e intermitente (figura 2.2). Sólo se describe el segundo modo, el cual se empleó en esta Tesis Doctoral.

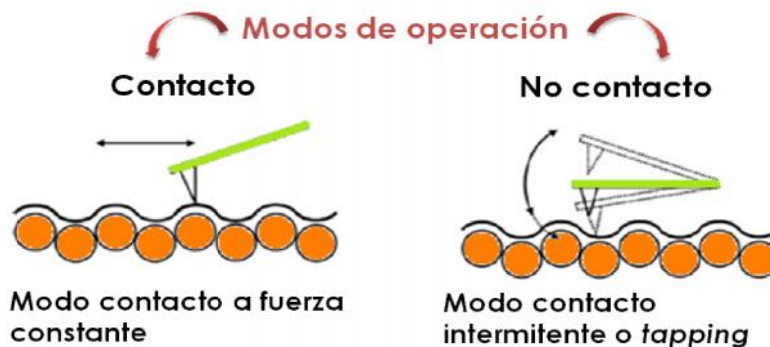


Figura 2.2. Modos de operación del microscopio de fuerza atómica.

En este modo, la punta está en contacto intermitente con la superficie a mientras la está barriendo, y el cantiléver oscila sobre la muestra. La variación de amplitud de oscilación de la punta, debido a la amortiguación sobre la superficie, es lo que se utiliza como señal de control. Se aplica una fuerza en la base del cantiléver que provoca la vibración de la punta con amplitudes, que habitualmente oscilan en un rango de 20-100 nm, cuando la punta no está en contacto con la superficie. Durante el barrido de la muestra, la punta toca ligeramente la superficie de forma intermitente. Cuando la punta del cantiléver pasa sobre una protuberancia de la superficie, la amplitud de vibración decrece, consecuencia de que se detecta una pérdida de espacio de vibración. En otras ocasiones cuando la punta pasa sobre una depresión la amplitud de vibración se incrementa. Estos cambios en la amplitud de vibración van acorde con la topografía de la superficie de la muestra.

Las ventajas de este modo de contacto intermitente, son que las mediciones son muy estables, la fuerza de presión es muy débil y la resolución es elevada. En consecuencia, esto permite obtener imágenes de alta resolución en muestras blandas, lo cual es muy difícil de conseguir, en el modo de contacto continuo. Además, presenta las mejores prestaciones para la medida topográfica de alta resolución y evita imágenes artificiales, que en ocasiones aparecen en AFM.

2.1.2. Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido (SEM por su acrónimo en inglés)⁹⁶ se desarrolló debido a las limitaciones de los microscopios convencionales, los cuales permiten una ampliación entre 500 y 1000 aumentos y una resolución de 0,2 micrómetros.

Cuando se hace incidir un haz de electrones sobre una superficie de un sólido, se produce radiación electromagnética de varios tipos. Recolectando la información de esa radiación electromagnética con varios detectores, es posible obtener imágenes del área en que incide el haz electrónico; este proceso también se realiza al vacío. La técnica más popular es la formación de imágenes usando electrones secundarios, los cuales son emitidos desde la

muestra como consecuencia de las ionizaciones surgidas de las interacciones inelásticas (Figura 2.3). Por esta razón, poseen baja energía (50 eV), con ellos se pueden observar topografías superficiales. El contraste se produce por efecto del número atómico y la orientación cristalina combinada con alta resolución.

SEM explora la superficie de la imagen punto por punto, recorriendo la muestra con un haz electrónico, figura 2.3. Los electrones retro-dispersados y los secundarios son recogidos y contados por un dispositivo electrónico, donde cada punto leído de la muestra corresponde a un píxel en un monitor. Cuanto mayor sea el número de electrones contados por el dispositivo, mayor será el brillo del píxel en la pantalla. A medida que el haz de electrones barre la muestra se generan señales, las cuales pueden ser captadas con detectores adecuados para cada una de ellas. De esta forma, SEM provee información sobre morfología y características de la superficie de muestra en micrómetros.

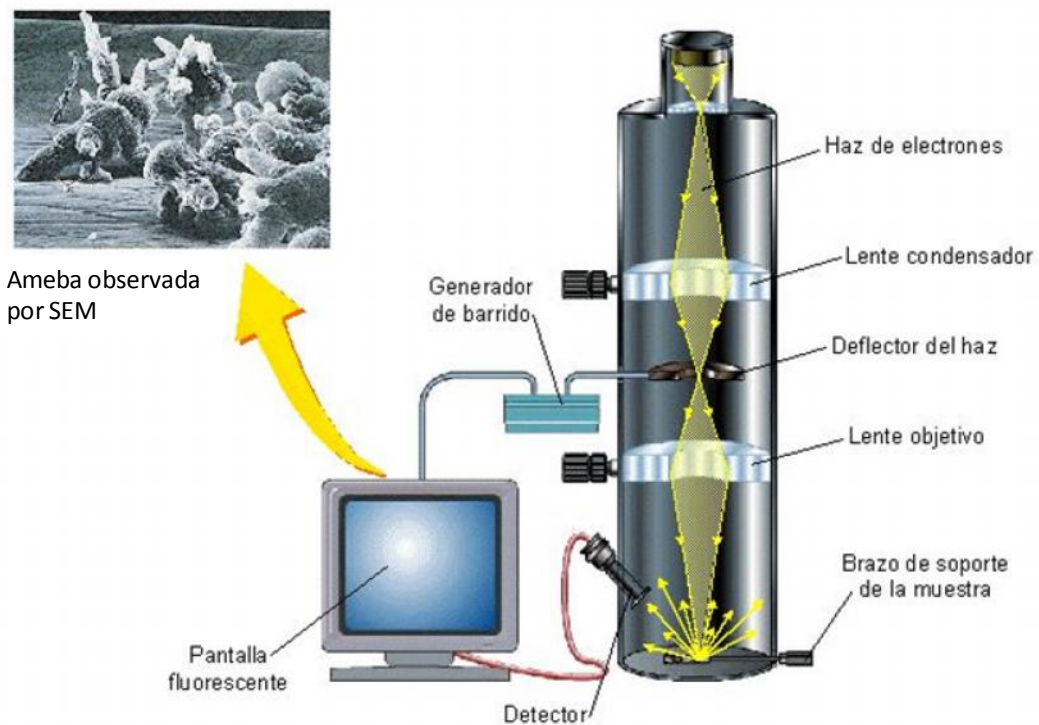


Figura 2.3. Esquema del microscopio electrónico de barrido.

2.1.3. Microscopía óptica y análisis de la imagen

El análisis visual de un material representa una primera aproximación a la estructura del mismo. La estructura atómica, y por tanto sus propiedades, se reflejan en la morfología del material.⁹⁷

El procesamiento de imágenes digitales es la tecnología de aplicación de distintos algoritmos a imágenes digitales. Del resultado de este proceso, se puede obtener una serie de características o propiedades representativas de la imagen original.⁹⁸ Las aplicaciones del procesamiento de imágenes digitales han sido enmarcadas en diversas áreas, como en sistemas robóticos-inteligentes, imágenes médicas, sensores y fotografías. Una imagen consiste en un número indefinido de puntos con amplitudes y coordenadas continuas. Para convertir la imagen en una forma digital, tanto las coordenadas como las amplitudes se procesan, donde los puntos de la imagen serán cambiados a píxeles y las amplitudes a valores discretos (valores de intensidad o nivel de gris).

En esta Tesis se empleó un microscopio digital CMOS, mediante el cual se adquiere una imagen, la cual es digitalizada con el programa ImageJ 1.40g. La imagen resultante es un gráfico tridimensional (figura 2.4), en el cual cada punto representa una posición espacial (coordenada x e y) en píxeles, y el valor de amplitud (eje z) es obtenido mediante la transformación *watershed*. Esta transformación, como se explica en la figura 2.4, consiste en considerar a las zonas oscuras como bajas, y a las claras como altas.⁹⁹ Esta última variable corresponde a la luz reflejada en la superficie del material y es el resultado de dos efectos: el topográfico (rugosidad) y el químico (cristalinidad y grupos funcionales).

2.2. ÁNGULO DE CONTACTO

Las mediciones de ángulo de contacto proveen una caracterización cuantitativa de la energía superficial del material.

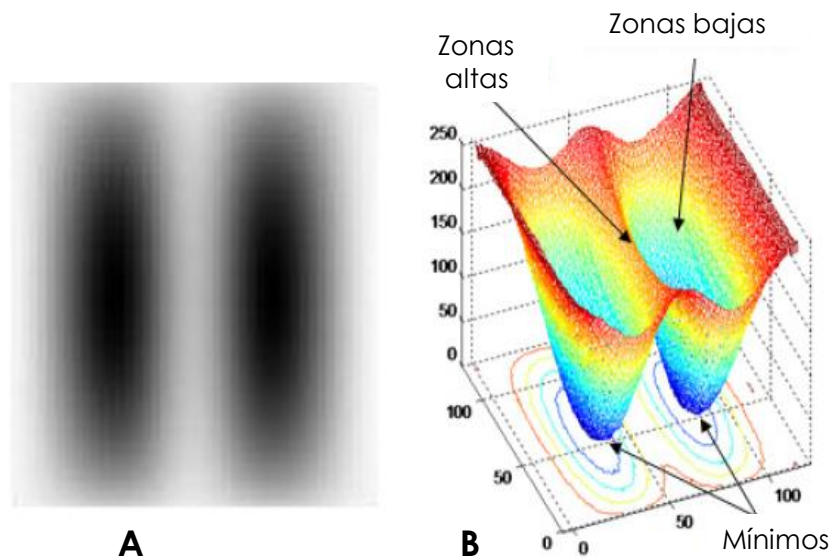


Figura 2.4. Principio de *watershed*: imagen de dos manchas oscuras, generada en escala de grises (A); y transformación *watershed* requiere asociar la imagen a una topografía de superficie, donde las zonas brillantes son los “altos” y las áreas oscuras los “bajos” (B).

Las medidas de ángulo de contacto se realizan con un goniómetro, que consta de una lámpara de tungsteno de 20 watts como fuente de luz y un polarizador para incrementar el contraste entre la gota y el aire. El sistema para depositar la misma, consta de un dispensador graduado para controlar el volumen de la gota y de un sistema de regulación de altura. El porta muestra permite regular la altura y la posición transversal de la muestra. La cámara de video dispone de un sensor CMOS de 2 Mpixel. El ángulo formado por un líquido en contacto con una superficie sólida, viene dado por el equilibrio termodinámico de la gota sometida a la acción de tres tensiones interfaciales (γ): sólido-vapor (γ_{sv}), sólido-líquido (γ_{sl}) y líquido-vapor (γ_{lv}). Cuando las tres tensiones se equilibran, el ángulo de contacto en estado de equilibrio, puede ser determinado a partir de la Ecuación de Young (ecuación 2.1).¹⁰⁰

$$\cos \theta = \frac{\gamma_{sv} - \gamma_{sl}}{\gamma_{lv}} \quad (2.1)$$

El ángulo θ se obtiene del procesamiento de las imágenes, utilizando el programa Spanishdub.exe e ImageJ.exe. Un incremento en el ángulo de

contacto con agua, indica un aumento en el carácter hidrofóbico de superficie (figura 2.5) y un valor menor del componente polar de la energía superficial.

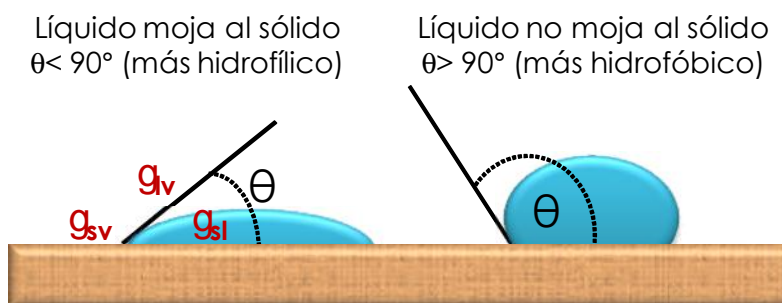


Figura 2.5. Determinación de ángulos de contacto entre un líquido y una superficie.

2.3. ANÁLISIS TÉRMICO

2.3.1. Análisis termo-gravimétrico

El análisis termogravimétrico (TGA) es una metodología analítica utilizada para determinar la estabilidad térmica de un material, la fracción de componentes volátiles y el comportamiento de la desorción de moléculas líquidas o gaseosas en un material sólido. Además, se emplea para estimar la energía de activación de la descomposición vía reacciones químicas, durante el proceso de calentamiento hasta altas temperaturas (típicamente hasta 1000°C) en una atmósfera controlada.

El análisis se lleva a cabo por medio de la medición del cambio de masa de un material en función de la temperatura cuando éste es calentado de forma constante, lineal o variable. Dichas mediciones, se realizan en una atmósfera de aire, nitrógeno u otros gases inertes de arrastre como helio o argón. En algunas ocasiones, la prueba se desarrolla en una atmósfera combinada de 1 a 5 % de O₂ en N₂ o He para retrasar la oxidación.

El equipo utilizado comúnmente (figura 2.6-A), consiste de una balanza de alta precisión con un recipiente cargado con la muestra, la cual es colocada en un horno pequeño calentado eléctricamente, y tiene conectados termopares para medir la temperatura con precisión. La atmósfera se purga con gases inertes para prevenir la oxidación u otras reacciones no deseadas. Se obtiene un gráfico de temperatura vs pérdida de masa, conocido como termograma o curva de termogravimetría (figura 2.6-B).

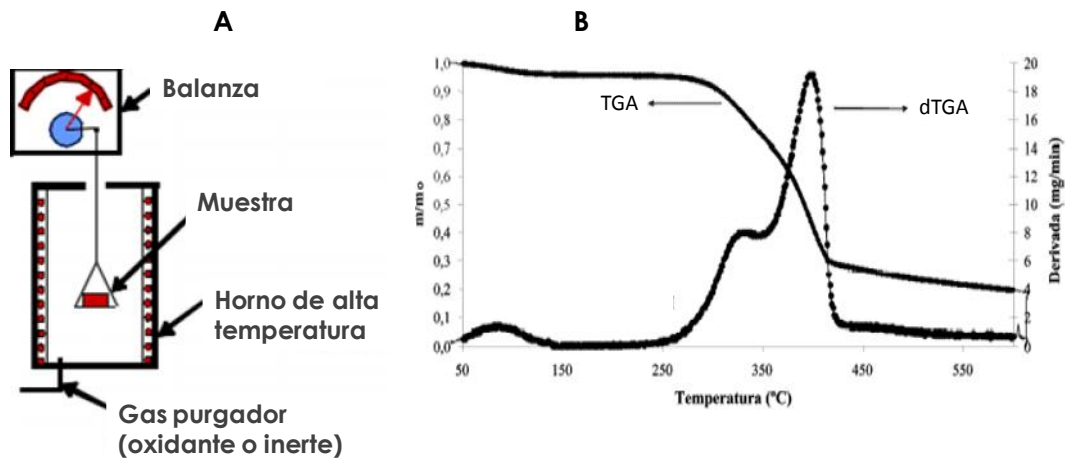


Figura 2.6. Esquema de analizador termogravimétrico TGA (A), y la curva termogravimétrica (TGA) con su derivada primera (dTGA), correspondientes a línea continua y punteada, respectivamente (B).

Debido a que muchas curvas de cambio de masa vs cambio de temperatura son muy similares, se puede requerir una transformación de los datos para interpretar sus resultados. La derivada primera de la curva de pérdida de masa (dTGA, figura 2.6-B) se emplea para analizar los puntos críticos de la curva, por ejemplo, el punto en el cual la pérdida de masa es más aparente o significativa, aunque también se puede requerir de una deconvolución de los picos traslapados.

2.3.2. Calorimetría diferencial de Barrido.

La calorimetría diferencial de barrido (DSC por su siglas en inglés) permite el estudio de los procesos en los que se produce una variación entálpica, como puede ser la determinación de calores específicos, puntos de ebullición y cristalización, pureza de compuestos cristalinos, entalpías de reacción y determinación de otras transiciones de primer y segundo orden.

El equipo de DSC mide el flujo de calor en la muestra a estudiar y en un material inerte de referencia de forma independiente. En la figura 2.7 se muestra un esquema de un aparato de DSC.

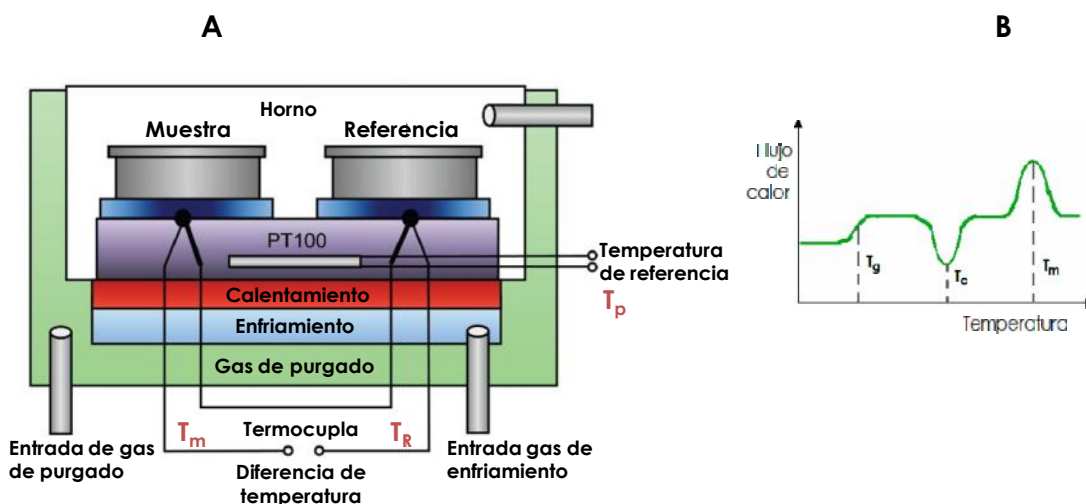


Figura 2.7. Esquema de equipo DSC (A) y curva de DSC de un polímero (B) donde T_g , T_c y T_m corresponden a las temperaturas de transición vítrea, cristalización y fusión, respectivamente.

Ambas células que contienen la muestra (m) y la referencia (R), están equipadas con un sensor para la medida de su temperatura, y una resistencia de calentamiento independiente para cada una de ellas. Estas resistencias mantienen ambas células a una temperatura programada T_p . Las temperaturas instantáneas de cada célula (T_m y T_R) se miden y comparan continuamente con el valor programado T_p . El sistema trabaja de modo que la energía suministrada en cada momento por cada resistencia de

calentamiento, es función de la diferencia entre la temperatura de cada célula y la temperatura programada, es decir:

$$E_m = W_m \cdot (T_m - T_p) \quad (2.2)$$

$$E_R = W_R \cdot (T_R - T_p) \quad (2.3)$$

donde E_m y E_R son las energías eléctricas suministradas por las resistencias, y W_m y W_R son constantes del sistema para la muestra y la referencia, respectivamente, que dependen de las características de cada material, como la masa y su capacidad calorífica. La diferencia de energía, entre E_m y E_R , requerida para mantener las dos células a la temperatura programada, es la cantidad que se representa en función de la temperatura (T_p , T_m o T_R) o en función del tiempo a temperatura constante. A estas dos representaciones se las denomina termogramas (figura 2.7-B).

El principio básico subyacente a esta técnica es que, cuando la muestra experimenta una transformación física tal como una transición de fase, se necesitará que fluya más (o menos) calor hacia la muestra que hacia la referencia para mantener ambas a la misma temperatura. El hecho de que fluya más o menos calor a la muestra depende si el proceso es exotérmico o endotérmico. Determinando la diferencia de flujo calorífico entre la muestra y la referencia, los calorímetros DSC son capaces de medir la cantidad de calor absorbido o eliminado durante tales transiciones.

2.4. REOLOGÍA

El análisis de las propiedades mecánicas de una material se determina de la capacidad del mismo a resistir la acción de fuerzas externas.¹⁰¹ Estas fuerzas producen una deformación del material, generando fuerzas o tensiones que se oponen a la acción de la carga aplicada. Si la fuerza externa es lo suficientemente grande, puede superarse la tensión máxima posible del material, generando la ruptura del mismo. Las fuerzas externas aplicadas al material pueden ser de compresión, extensión o tracción, torsión, cizalla o

corte y flexión (figura 2.8). La compresión (figura 2.8-A) y la tracción (figura 2.8-B), consisten en exponer a un cuerpo a la acción de dos fuerzas de igual dirección, que actúan en sentido opuesto, tendiendo a comprimir o estirar el material, respectivamente. Por su parte, las fuerzas de torsión (figura 2.8-C) son aplicadas en sentido opuesto y en diferentes direcciones, en forma perpendicular al eje longitudinal del cuerpo en estudio. Las fuerzas de cizalla o de corte (figura 2.8-D) son efectuadas en sentido contrario al desplazamiento del material a modo de fricción y actúan en diferentes direcciones, mientras que la flexión (figura 2.8-E) es una fuerza perpendicular al eje longitudinal del material, el cual se encuentra sostenido en sus extremos.

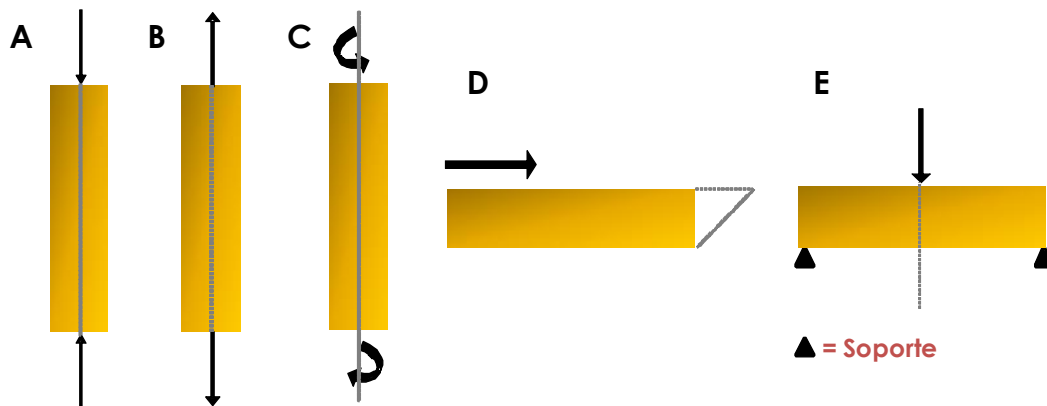


Figura 2.8. Fuerzas de compresión (A), tracción (B), torsión (C), de corte (D) y flexión (E).

El estudio de las propiedades mecánicas es realizado a través de dos tipos de análisis: estudios estáticos, se aplican fuerzas en forma constante, y estudios dinámicos, se aplican en forma oscilante observando la respuesta desfasada del material. En la presente Tesis Doctoral, se empleó un reómetro Anton Paar con la geometría para películas (Figura 2.9), para estudiar el comportamiento dinámico de las películas obtenidas.

La reología extensional es la ciencia asociada con el flujo y las deformaciones, que implican alargamiento o estiramiento de materiales mediante la aplicación de fuerzas de flexión. Las propiedades mecánicas

macroscópicas tienen un origen molecular microscópico. La deformación observada en una muestra polimérica es consecuencia de la capacidad de movimiento y desplazamiento que tengan sus cadenas macromoleculares. Los flujos extensionales son muy sensibles a la topología molecular (ramificación de cadena larga) y a las cadenas poliméricas de alto peso molecular.^{102,103}

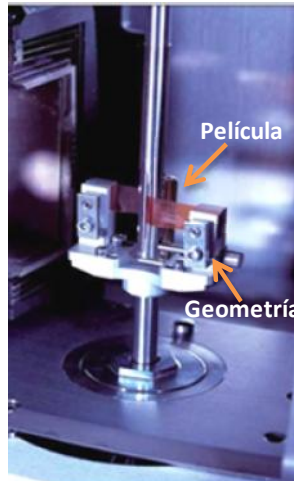


Figura 2.9. Imagen de geometría empleada para estudio reológico extensional de películas.

Un ensayo de tensión dinámico se realiza variando la amplitud de deformación a una frecuencia angular constante, obteniéndose como resultado los gráficos del módulo de almacenamiento E' y el módulo de pérdida E'' en función de la deformación (γ) y esfuerzo tensil (σ). Donde E' es la habilidad del material para almacenar energía, y es una medida de la elasticidad del material, mientras que E'' es la habilidad del material para disipar energía, y está relacionado con la respuesta viscosa del mismo. A partir de los datos obtenidos, se puede graficar una curva de esfuerzo tensil (σ) en función de la deformación (γ), figura 2.10.

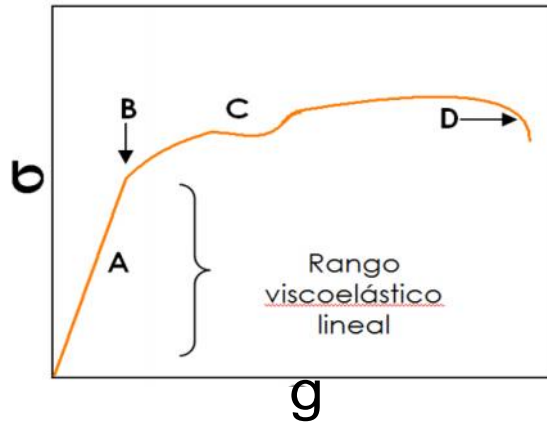


Figura 2.10. Curva de esforço tensil (σ) vs deformación tensil (γ).

Como se observa en la figura 2.10, existe una zona de deformación elástica (A), donde luego de retirada la fuerza aplicada, el material vuelve a su estado original, sin sufrir una deformación permanente. Por su parte, se observa el sector de deformación plástica o irreversible (C), donde el material cede y luego de retirar la fuerza aplicada no vuelve a su estado original. El punto límite entre la deformación elástica y plástica, se denomina punto de fluencia (B) y el valor máximo de esfuerzo y deformación soportado por la película, es llamado punto de rotura (D). A partir de la pendiente de la curva, en el rango viscoelástico lineal (figura 2.10, zona A), se obtiene el módulo elástico o de Young (E), parámetro que está relacionado con el grado de elasticidad de los materiales ensayados en experimentos extensionales (ecuación 2.4).

$$E = \frac{\sigma}{\gamma} \quad (2.4)$$

2.5. VOLTAMETRÍA CÍCLICA: TRANSFERENCIA EN INTERFASES LÍQUIDO/LÍQUIDO

2.5.1. Transferencia a través de la interfaz líquido/líquido

Los estudios electroquímicos en interfaces líquido/líquido se iniciaron en 1902, cuando Nernst y Riesenfeld¹⁰⁴ observaron la transferencia de iones durante el pasaje de corriente a través de interfaces de agua/fenol/agua. En 1906, Cremer¹⁰⁵ señaló la analogía entre el sistema agua/aceite/agua y membranas biológicas, y el interés en utilizar este sistema como un modelo para la investigación de diferencias de potencial y corrientes observadas en las células biológicas. Desde esos primeros estudios hasta la actualidad, el empleo del estudio electroquímico a través de interfaces líquido-líquido ha evolucionado y ha atraído la atención de una amplia gama de investigaciones, destinadas al estudio de permeación de especies a través de membranas líquidas,¹⁰⁶ estudios electroquímicos de sistemas redox dentro de gotas de agua inmobilizadas,¹⁰⁷ síntesis de nanopartículas¹⁰⁸ y películas nanocristalinas.¹⁰⁹

La interfaz entre dos soluciones electrolíticas inmiscibles (*ITIES* – *Interface between Two Immiscible Electrolytic Solutions*) se forma cuando se ponen en contacto dos solventes líquidos de baja (idealmente cero) miscibilidad mutua, cada uno conteniendo un electrolito adecuado para aplicaciones electroquímicas. Uno de estos disolventes es por lo general agua, y el otro es un solvente orgánico con una permitividad dieléctrica moderada o alta, tal como nitrobenceno (NB) o 1,2-dicloroetano (1,2-DCE).

Cuando a este sistema se le aplica una diferencia de potencial mayor al potencial de equilibrio desde una fuente externa, pueden ocurrir dos procesos: el cargado de la doble capa (figura 2.11-A-1) y la transferencia de iones a través de la interfaz (figura 2.11-A-2). El programa de potencial aplicado es un barrido triangular que parte desde un valor inicial E_i y aumenta linealmente con el tiempo hasta un valor final E_f , para luego disminuir hasta un valor que puede ser igual o diferente de E_i . La pendiente de los gráficos E vs tiempo, se denomina velocidad de barrido. Los registros de la variación de la corriente (I)

en función del potencial aplicado (E), se denominan voltagramas o voltamperogramas (figura 3.11-B).

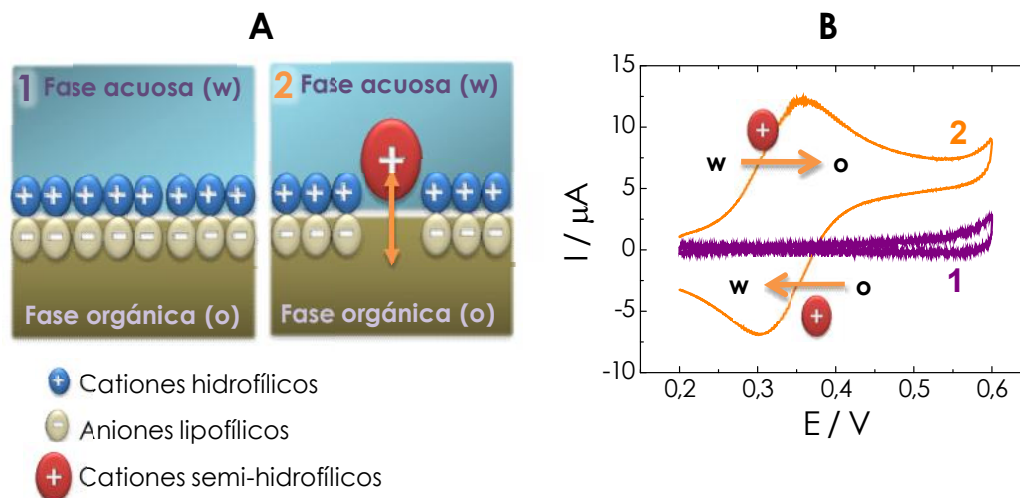


Figura 2.11. Esquema de interfaz líquido/líquido (A): cargado de doble capa (1) y transferencia de catión semi-hidrofílico (2). Voltagramas (B) de electrolito soporte (1) y transferencia de catión semi-hidrofílico Y^{z+} (2).

La transferencia de iones de los electrolitos soporte definen los límites de potencial. En esta ventana de potencial la interfaz, se comporta como un electrodo idealmente polarizado (figura 2.11-B-1). Esto permite que, dentro de dicha ventana, se observe la transferencia de un ión semi-hidrofílico (Y^{z+}) que se encuentre presente en el sistema (figura 2.11-B-2). El potencial (E_p^+) y la intensidad de corriente (I_p^+) del pico en el barrido directo, se relaciona con la energía necesaria para la transferencia y la cantidad de iones transferidos, respectivamente. Por lo tanto, a medida que aumenta la hidrofobicidad del ión, el potencial de pico se corre a valores mayores, y cuando mayor es la cantidad de ión transferido aumenta la intensidad de corriente de dicho proceso.

Los signos de la corriente de transferencia de los iones (X^+ e Y^- son cationes y aniones, respectivamente) desde una fase a la otra, están definidos por convención y se muestran en la tabla 2.1, en donde w y o se refieren a la fase acuosa y orgánica, respectivamente.

Tabla 2.1. Signos para la corriente de transferencia de iones desde una fase a la otra.

Corriente Positiva	Corriente Negativa
$\begin{matrix} \text{O}^{\text{org}} & \rightarrow & \text{P}^{\text{org}} \\ \text{X}^{\text{w}} & - & \text{X}^{\text{o}} \end{matrix}$	$\begin{matrix} \text{O}^{\text{org}} & \rightarrow & \text{P}^{\text{org}} \\ \text{X}^{\text{o}} & - & \text{X}^{\text{w}} \end{matrix}$
$\begin{matrix} \text{O}^{\text{org}} & \rightarrow & \text{P}^{\text{org}} \\ \text{Y}^{\text{o}} & - & \text{Y}^{\text{w}} \end{matrix}$	$\begin{matrix} \text{O}^{\text{org}} & \rightarrow & \text{P}^{\text{org}} \\ \text{Y}^{\text{w}} & - & \text{Y}^{\text{o}} \end{matrix}$

La celda utilizada para estudiar la transferencia de polímeros a través de una interfaz formada por dos electrolitos inmiscibles, permite emplear un sistema de cuatro electrodos para polarizar adecuadamente dicha interfaz (figura 2.12). Dos de estos electrodos son de referencia, Ag|AgCl|Cl⁻, conectados a ambos lados de la interfaz y utilizados para controlar la diferencia de potencial a través de ésta. Los demás son contraelectrodos de Pt, uno en cada fase, que permiten la circulación de la corriente en el sistema. El electrodo de referencia correspondiente a la fase orgánica se sumerge en una solución acuosa que está en contacto con la fase orgánica. Esta fase acuosa tiene disuelta una sal que contiene el mismo catión del electrolito soporte de la fase orgánica, e iones cloruros como contraión, de manera tal que la interfaz formada entre esta solución y la fase orgánica sea no polarizable.

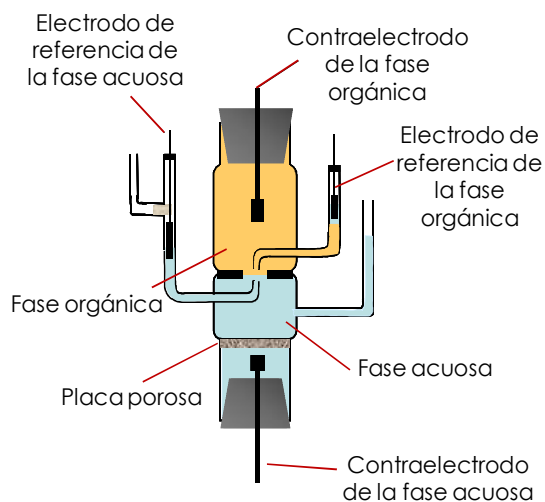


Figura 2.12. Esquema de celda de vidrio empleada en ITIES.

2.5.2. Transporte de carga a través de la interfaz líquido/líquido

Una de las características de la electroquímica en las ITIES, es la diversidad de reacciones de transferencia de carga que se pueden estudiar empleando diferentes técnicas.¹¹⁰⁻¹¹² Estas reacciones de transferencia de carga se pueden clasificar en tres categorías principales: transferencia directa de iones, transferencia facilitada de iones y transferencia de electrones.

2.5.2.1. Transferencia directa de iones

En este caso, un ión presente en la fase acuosa se transfiere a la orgánica (o viceversa), siempre que se le entregue una diferencia de potencial equivalente a la energía de Gibbs necesaria, según la ecuación 3.5.



Desde el punto de vista termodinámico, la reacción de transferencia de iones implica tres etapas principales:¹¹¹

- i. Transporte de masa desde el seno de una de las fases a la interfaz (principalmente difusión)
- ii. Reacción electroquímica de transferencia del ión a través de la interfaz.
- iii. Transporte de masa desde la interfaz al seno de la otra solución.

Cuando se aplica un barrido lineal de potencial y la transferencia del ión es reversible y controlada por difusión, la corriente se relaciona con el tiempo según la ecuación 3.6.^{113,114}

$$I(\dagger) = zFAc_x^{w*} D_x^{w1/2} \left(\frac{zFv}{RT} \right)^{1/2} f^{1/2} t(\dagger) \quad (2.6)$$

donde c_x es la concentración de X en el seno de la solución, A es el área interfacial en cm², D_x^w es el coeficiente de difusión en la fase acuosa, $\chi(\tau)$ es la función corriente. Además, $\dagger = (zF/RT)vt$ donde t es el tiempo, v es la velocidad de barrido en Vs⁻¹ y z es la cantidad de carga del ión. Cuando la señal alcanza un máximo, $\pi^{1/2}\chi(\tau)$ toma un valor de 0,4463 y la corriente de

pico (I_p) se relaciona con la concentración del ión transferido a través de la ecuación de Randles –Sevcik.¹¹⁴

$$I_p = 0,4463zFAc_X^{w*}D_X^{w/2}\left(\frac{zFv}{RT}\right)^{1/2} \quad (2.7)$$

A partir de esta ecuación se puede calcular el coeficiente de difusión (D_x) de la especie que se transfiere.

Teniendo en cuenta la diferencia de potencial eléctrico entre dos fases, el potencial de Galvani (${}^o_w\varphi$) generado en la interfaz, se puede obtener de la relación de este potencial con la concentración de las especies según:

$${}^o_w\varphi = {}^o_w\varphi^0 - \frac{RT}{z_iF} \ln\left(\frac{a_i^o}{a_i^w}\right) \quad (2.8)$$

donde a_i^o y a_i^w son las concentraciones de la especie en la fase orgánica y acuosa, respectivamente.

Además, el potencial estándar de transferencia de una especie i se puede definir como:

$${}^o_w\varphi^0 = -\frac{G_{tr,i}^{0,w \rightarrow o}}{z_iF} \quad (2.9)$$

donde $G_{tr,i}^{0,w \rightarrow o}$ es al energía libre estándar de Gibbs de transferencia de iones desde la fase acuosa a la orgánica y por lo tanto, una medida de la hidrofobicidad de la molécula.

2.5.2.2. Transferencia facilitada de iones

Se puede presentar la situación en la que un ión (M^{z+}) de la fase acuosa, sea muy hidrofílico y su transferencia a la fase orgánica no ocurra dentro de la ventana de potencial. Sin embargo, esta transferencia puede ocurrir cuando se encuentre un ionóforo o ligando (L) en la fase orgánica que pueda complejar a este ión. La formación del complejo ión-ionóforo en fase orgánica, disminuye la energía libre de transferencia del ión y ésta ocurre dentro de la ventana de trabajo.

Existen diferentes tipos de mecanismos de transferencia facilitada, dependiendo de las concentraciones del ión libre y del ligando en la fase acuosa y orgánica y de las constantes de asociación. Los mecanismos que están involucrados en este tipo de transferencia se describen a continuación.¹¹⁰

- ACT (*aqueous complexation followed by transfer*): Formación del complejo en la fase acuosa, previo a la transferencia de carga.



donde *s* representa el número de moléculas de ligando que forman el complejo. Si bien en el mecanismo ACT, la transferencia electroquímica del complejo ML_s^{z+} es una transferencia directa, se incluye esta situación dentro de la clasificación de transferencia facilitada ya que la formación del complejo permite transferir el catión a la fase orgánica.

- TOC (*transfer followed by complexation in the organic phase*): Transferencia de carga seguida de formación de complejo en la fase orgánica.



- TIC/TID (*transfer by interfacial complexation/dissociation*): Mecanismo concertado de formación de complejo interfacial y transferencia heterogénea de carga.



A partir de experimentos de voltametría cíclica, variando la concentración del ión y del ionóforo, se puede tener información relativa al mecanismo de transferencia de carga, la estequiometría y la constante de formación del complejo. Las ecuaciones que relacionan los potenciales de transferencia con la estequiometría y la constante de formación de complejo

han sido detalladas por varios autores entre ellos Girault¹¹⁰ y Homolka y col.^{115,116}

2.5.2.3. Transferencia de electrones

Las primeras evidencias de transferencia de electrones en interfaces líquidas fueron encontradas por Guainazzi y col.,¹¹⁷ quienes redujeron cobre (III) en fase acuosa a cobre metálico, utilizando hexacarbonilvanadato de tetrabutilamonio en 1,2-dicloroetano. Por otra parte, se ha aplicado la transferencia interfacial de electrones para llevar a cabo métodos de electropolimerización en interfaces líquidas, con el objetivo de estudiar mecanismos de polimerización, permeabilidad de polímeros a iones y nuevas rutas sintéticas.¹¹⁸⁻¹²⁵ En todos los casos, se utiliza un monómero en fase orgánica el cual es oxidado al radical catión correspondiente, por un oxidante presente en fase acuosa. Esta oxidación desencadena el mecanismo de polimerización.

Hay muy pocos estudios electroquímicos sobre este mecanismo de transferencia, debido a la dificultad para elegir un sistema experimental en el cual la energía de transferencia de Gibbs para reactivos y productos sea conocida, de tal forma que se asegure que la corriente observada se deba a la transferencia de electrones y no de iones.

2.5.3. Transferencia de polímeros: aspectos termodinámicos

La actividad superficial de una molécula es una medida de su habilidad para acumularse en una interfaz, cuando la energía libre del estado adsorbido es significativamente menor que la del estado en disolución.¹²⁶ La diferencia energética entre ambos estados está determinada por las interacciones entre las moléculas involucradas, como así también por efectos entrópicos.¹²⁷ Los cambios en las energías de la interacción que ocurren como consecuencia de la adsorción están asociados con la interfaz y las moléculas involucradas.

Al adsorberse un polímero anfifílico en una interfaz, disminuye el contacto directo de ambas fases, al reemplazarse por contactos de segmentos no polares del polímero con la fase orgánica y de segmentos polares con la fase

acuosa.¹²⁸ Estas interacciones disminuyen la energía libre generada en la interfaz. Además, cuando la molécula se disuelve en agua, los segmentos no polares manifiestan un efecto hidrofóbico energéticamente desfavorable, en consecuencia, impulsan la adsorción a la interfaz. Sin embargo, otros tipos de interacciones pueden también contribuir a la actividad superficial, favoreciendo o dificultando la adsorción (interacciones electrostáticas, puente hidrógeno, etc).

Los efectos entrópicos asociados con el proceso de adsorción, se deben al hecho de que cuando un polielectrolito se adsorbe en la interfaz, se confina en una región que es considerablemente más pequeña que el volumen que ocuparía en el seno del líquido, de forma que su movimiento molecular queda restringido. Estos efectos son entrópicamente desfavorables y así, una molécula sólo se adsorberá en una interfaz si la energía ganada en las interacciones es suficientemente grande como para contrarrestar la disminución de entropía. Cuando ocurre lo contrario, las moléculas tienden a localizarse principalmente en el seno del líquido, presentando una baja actividad superficial.

Por lo tanto, los polímeros pueden presentar diferentes orientaciones en la interfaz, ya que el número de segmentos en contacto con la misma dependerá de la flexibilidad molecular de la cadena y de la afinidad de ésta por el medio de disolución. En el caso específico de proteínas globulares en solución, adoptan una conformación tridimensional, en la cual los aminoácidos no-polares se disponen preferentemente en el interior de la molécula, de forma de mantenerse ocultos al agua.¹²⁹ Cuando un polímero se adsorbe en la interfaz, se encuentra menos rodeado de moléculas de agua, de forma que puede reducir su energía libre alterando su conformación, orientando sus grupos hidrofóbicos hacia la fase aire y los hidrofílicos hacia la acuosa.¹³⁰ Las moléculas de polímero se estructuran, interaccionando entre sí, con un consiguiente aumento en la tensión superficial.

2.6. ISOTERMAS DE TENSIÓN SUPERFICIAL/ÁREA MOLECULAR

2.6.1. Determinación de tensión superficial

2.6.1.1. Tensiómetro

La tensión superficial hace referencia a la interfaz gas-líquido, y se determina usando instrumentos denominados tensiómetros superficiales. Estos tensiómetros se emplean para obtener información sobre las características de las superficies o de las interfaces y las propiedades de los surfactantes, tales como su concentración superficial, su presión superficial, la concentración micelar crítica y la cinética de adsorción.¹²⁶ Existen diferentes tipos de tensiómetros que difieren de acuerdo al principio físico en el que se basan; el diseño mecánico, si las mediciones son dinámicas o estáticas y si son capaces de medir la tensión superficial, la interfacial o ambas.

En esta Tesis, se utilizó el método de la placa de *Wilhelmy*, el cual consiste en medir la fuerza debida a la tensión superficial en una placa de platino suspendida, parcialmente inmersa en el líquido (figura 2.13). La fuerza es convertida en tensión superficial (mN/m o dinas/cm), con la ayuda de las dimensiones de la placa.

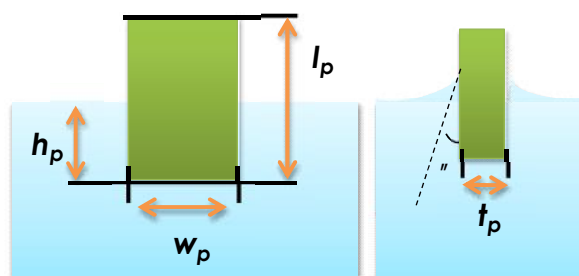


Figura 2.13. Placa de Wilhelmy inmersa en la superficie del agua. Para las dimensiones de la misma se emplearon siglas h_p , w_p , l_p y t_p .

Las fuerzas que actúan sobre la placa son la gravedad, la tensión superficial y la flotación debido al agua desplazada hacia abajo. Para una placa rectangular de dimensiones l_p , w_p y t_p , de material ρ_p , inmersa en una profundidad h_p en un líquido de densidad ρ_l , la fuerza neta (F) hacia abajo está dada por la siguiente ecuación:

$$F = \rho_p g l_p w_p t_p + 2\gamma(w_p + t_p)(\cos\theta) - \rho_l g l_l w_l t_l \quad (2.15)$$

donde, γ es la tensión superficial del líquido, θ es el ángulo de contacto del líquido en la placa sólida y g es la constante gravitacional. La presión superficial se determina midiendo el cambio de F (ΔF) para una placa estacionaria entre una superficie de un líquido puro y una monocapa de surfactante. Si la placa está mojada completamente por el líquido (por ejemplo $\cos \theta = 1$) la presión superficial (π) se obtiene de la siguiente ecuación:

$$\pi = - \gamma = - \left[\frac{\Delta F}{2(w_p + t_p)} \right] = - \frac{\Delta F}{2w_p}, \quad \text{si } w_p \gg t_p \quad (2.16)$$

La fuerza se determina por la medición de los cambios en la masa de la placa, mediante una electrobalanza.

2.6.1.2. Balanza de Langmuir

La figura 2.14 muestra un esquema de la balanza de Langmuir. La subfase, generalmente agua o una solución acuosa, se introduce dentro de una cuba de teflón, cuyas dimensiones son: 364mm x 75mm x 15mm. El área superficial de la cuba se puede variar mediante dos barreras móviles, ubicadas sobre la superficie de la misma. Las barreras están hechas de Delrin, un material hidrofílico, y suficientemente pesado para prevenir cualquier fuga de la monocapa por debajo de las barreras. La presión superficial del material adsorbido y el área molecular son continuamente monitoreadas durante el proceso de compresión.

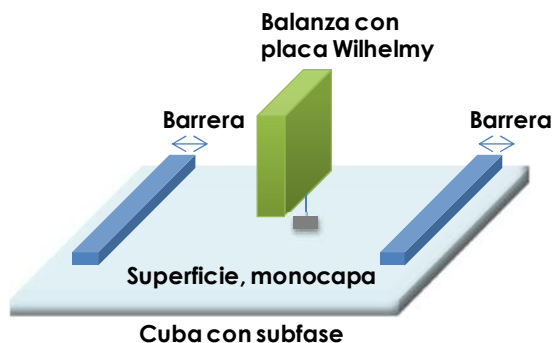


Figura 2.14. Esquema de la balanza de Langmuir con placa de wilhelmy, y barreras para reducir el área de superficie disponible.

2.6.2. Descripción de las isothermas de presión lateral-área molecular

Cuando una solución de un compuesto anfipático disuelto en un solvente insoluble en agua, se deposita en la superficie de la subfase con una microjeringa, la solución se distribuye rápidamente para cubrir toda el área disponible. La monocapa se forma cuando el solvente se evapora. Cuando el área disponible para la monocapa es grande, la distancia entre moléculas adyacentes también lo es, y sus interacciones son débiles. La monocapa puede considerarse como un gas en dos dimensiones. Bajo estas condiciones, la monocapa tiene un pequeño efecto en la tensión superficial del agua. Si el área superficial disponible para la monocapa se reduce acercando las barreras (figura 2.14), las moléculas comienzan a ejercer un efecto entre ellas.

La presión superficial π se determina a partir de la medida de la tensión superficial, siendo:

$$\pi = \gamma - \gamma_0 \quad (2.17)$$

donde, γ_0 es la tensión superficial o interfacial de la fase acuosa en ausencia de la sustancia tensioactiva, y γ es el valor de equilibrio correspondiente a la tensión superficial cuando en la interfaz acuosa hay un exceso de tensioactivo. El indicador más importante de las propiedades de las monocapas de un material tensioactivo, es la variación de la presión superficial en función del área de la superficie del agua disponible para cada molécula, o área molecular. Este procedimiento se realiza a temperatura constante, y los gráficos obtenidos se conocen como isothermas presión superficial/área molecular. Usualmente, una isoterma se obtiene por compresión del área molecular disponible (reduciendo el área total con las barreras) a velocidad constante, mientras se monitorea la presión superficial. En la figura 2.15, se muestra un esquema de una isoterma π - A_0 .

La compresión de la monocapa conduce a cambios de fase que se observan en diferentes regiones de la isoterma. Las características de una monocapa y las diferentes fases que pueden existir están determinadas principalmente por las propiedades físicas y químicas de la sustancia anfipática, la temperatura de subfase y la composición de la subfase. Una

forma de observar mejor estas transiciones, es realizando la derivada primera de la curva π - A_0 , conocida como curva β .

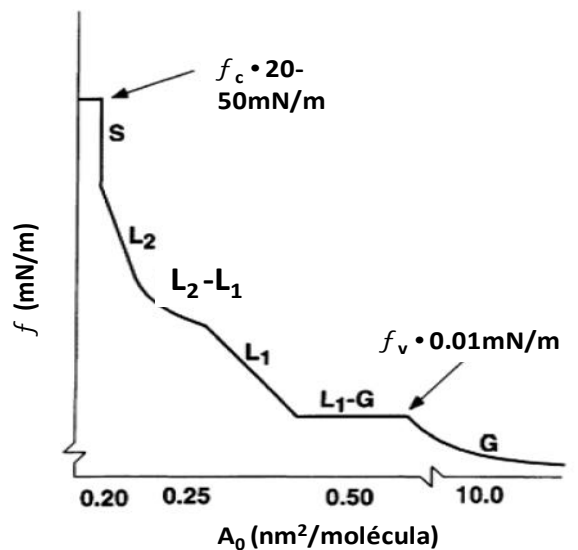


Figura 2.15. Esquema de isothermas π -área (A_0), donde G, L y S representan estados gaseosos, líquidos y sólidos.

A principios de 1952, W. D. Harkins propuso una terminología simple para clasificar las diferentes fases de las monocapas de ácidos grasos. Cuando las moléculas están expandidas en toda la superficie disponible de la subfase, las monocapas existen en estado gaseoso (G) y pueden, por medio de la compresión, alcanzar una transición de fase al estado líquido expandido (L_1), en el cual las moléculas alcanzan cierto nivel de ordenamiento. Durante la transición, coexisten las dos fases y la presión se mantiene constante, como puede observarse en la figura 2.15. La posterior compresión conduce a la transición de fase líquido expandido-líquido condensado (L_2), y a mayores densidades, la monocapa finalmente alcanza el estado sólido (S). En cada una de estas transiciones, la estructuración de las moléculas en la monocapa es mayor. Si la monocapa se comprime después de alcanzar el estado S, la misma colapsará en estructuras tridimensionales. Generalmente, el colapso se observa como una rápida disminución en la presión superficial o como una ruptura horizontal en la isoterma, si la monocapa está en estado líquido.

Bibliografía

- (1) Frechet, J. M. J.; Tomalia, D. A.; Nature Publishing Group: 2001.
- (2) Kurian, J. A New Polymer Platform for the Future — Sorona® from Corn Derived 1,3-Propanediol, *J Polym Environ* **2005**, *13*, 159.
- (3) Callister, W. D.; Rethwisch, D. G. *Fundamentals of Materials Science and Engineering: An Integrated Approach*; Wiley, 2012.
- (4) Boas, U.; Heegaard, P. M. H. Dendrimers in drug research, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 43.
- (5) Boas, U.; Christensen, J. B.; Heegaard, P. M. H. *Dendrimers in medicine and biotechnology: new molecular tools*; RSC Pub., 2006.
- (6) Flory, P. J. Molecular Size Distribution in Three Dimensional Polymers. I. Gelation I, *J. Am. Soc.* **1941**, *63*, 3083.
- (7) Stockmayer, W. H. Theory of Molecular Size Distribution and Gel Formation in Branched-Chain Polymers, *J. Chem. Phys.* **1943**, *11*.
- (8) Rossa, L.; Vögtle, F. In *Cyclophanes I*; Vögtle, F., Ed.; Springer Berlin Heidelberg, 1983; Vol. 113, p 1.
- (9) Denkwalter, R. G.; Kolc, J.; Lukasavage, W. J.; Nature Publishing Group: 1981.
- (10) Newkome, G. R.; Yao, Z.; Baker, G. R.; Gupta, V. K. Micelles. Part 1. Cascade molecules: a new approach to micelles. A [27]-arborol, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2003.
- (11) Tomalia, D. A. A new class of polymers-starburst-dendritic macromolecules, *Polym. J.* **1985**, *17*, 117.
- (12) Tomalia, D. A.; Fréchet, J. M. J. Discovery of dendrimers and dendritic polymers: A brief historical perspective*, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2002**, *40*, 2719.
- (13) Tomalia, D. A.; Naylor, A. M.; Goddard, W. A. Starburst dendrimers: molecular-level control of size, shape, surface chemistry, topology, and flexibility from atoms to macroscopic matter, *Angew. Chem. Int. Edn. Engl.* **1990**, *29*, 138.
- (14) Zeng, X. B.; Ungar, G.; Liu, Y. S.; Percec, V.; Dulcey, S. E.; Hobbs, J. K., *Nature* **2004**, *428*, 157.
- (15) Percec, V.; Peterca, M.; Sienkowska, M. J.; Ilies, M. A.; Aqad, E.; Smidrkal, J.; Heiney, P. A. Synthesis and Retrostructural Analysis of Libraries of AB₃ and Constitutional Isomeric AB₂ Phenylpropyl Ether-Based Supramolecular Dendrimers, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3324.
- (16) Percec, V.; Peterca, M.; Dulcey, A. S. E.; Imam, M. R.; Hudson, S. D.; Nummelin, S.; Adelman, P.; Heiney, P. A. Hollow Spherical Supramolecular Dendrimers, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13079.
- (17) Percec, V.; Imam, M. R.; Peterca, M.; Wilson, D. A.; Heiney, P. A. Self-assembly of dendritic crowns into chiral supramolecular spheres, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *131*, 1294.
- (18) Watanabe, S.; Sato, M.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Iwamura, M. New dendritic caged compounds: synthesis, mass spectrometric characterization, and photochemical properties of dendrimers with α -carboxy-2-nitrobenzyl caged compounds at their periphery, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12588.
- (19) Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P., *Polym. J.* **1985**, *17*, 117.
- (20) Rozhkov, V.; Wilson, D.; Vinogradov, S. Phosphorescent Pd porphyrin-dendrimers: tuning core accessibility by varying the hydrophobicity of the dendritic matrix, *Macromolecules* **2002**, *35*, 1991.
- (21) Li, S.; Szalai, M. L.; Kevitch, R. M.; McGrath, D. V. Dendrimer disassembly by benzyl ether depolymerization, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10516.

- (22) Albertazzi, L.; Mickler, F. M.; Pavan, G. M.; Salomone, F.; Bardi, G.; Panniello, M.; Amir, E.; Kang, T.; Killops, K. L.; Bräuchle, C.; Amir, R. J.; Hawker, C. J. Enhanced Bioactivity of Internally Functionalized Cationic Dendrimers with PEG Cores, *Biomacromolecules* **2012**, *10*, 4089.
- (23) Li, Y. Controlled assembly of dendrimer-like DNA, *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 38.
- (24) Chen, P.; Yang, Y.; Bhattacharya, P.; Wang, P.; Ke, P. C. A Tris-Dendrimer for Hosting Diverse Chemical Species, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 12789.
- (25) Oliveira, J. M.; Salgado, A. J.; Sousa, N.; Mano, J. F.; Reis, R. L. Dendrimers and derivatives as a potential therapeutic tool in regenerative medicine strategies—A review, *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *35*, 1163.
- (26) Gossl, I.; Shu, L.; Schluter, A. D.; Rabe, J. P. Molecular structure of single DNA complexes with positively charged dendronized polymers, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6860.
- (27) Muresan, L.; Maroni, P.; Popa, I.; Porus, M.; Longtin, R. m.; Papastavrou, G.; Borkovec, M. Conformational Changes of Polyamidoamine (PAMAM) Dendrimers Adsorbed on Silica Substrates, *Macromolecules* **2011**, *44*, 5069.
- (28) Arima H; Kihara F; Hirayama F; K, U. Enhancement of gene expression by polyamidoamine dendrimer conjugates with α -, β -, and γ -cyclodextrins., *Bioconjug. Chem.* **2001**, *12*, 476.
- (29) Luo, D.; Haverstick, K.; Belcheva, N.; Han, E.; Saltzman, W. M. Poly(ethylene glycol)-conjugated PAMAM dendrimer for biocompatible high-efficiency DNA delivery., *Macromolecules* **2002**, *35*, 3456.
- (30) Florence, A. T.; Hussain, N. Transcytosis of nanoparticle and dendrimer delivery systems: evolving vistas. , *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *50*, S69.
- (31) Esfand, R.; DA, D. A. T. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications., *Drug Discov. Today* **2001**, *6*, 427.
- (32) Goller, R.; Vors, J. P.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P. Phosphorus dendrimers as new tools to deliver active substances., *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3587.
- (33) Chen, S.; Yu, Q.; Li, L.; Boozer, C. L.; Homola, J.; Yee, S. S.; Jiang, S. Detecting the adsorption of dye molecules in homogeneous poly(propyleneimine) dendrimer monolayers by surface plasmon resonance sensor, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3395.
- (34) Tripathi, P. K.; Khopade, A. J.; Nagaich, S.; Shrivastava, S.; Jain, S.; Jain, N. K. Dendrimer grafts for delivery of 5-fluorouracil, *Pharmazie* **2002**, *57*, 261.
- (35) Khopade, A. J.; Caruso, F.; Tripathi, P.; Nagaich, S.; Jain, N. K. Effect of dendrimer on entrapment and release of bioactive from liposomes, *Int. J. Pharm.* **2002**, *232*, 157.
- (36) Marmillon, C.; Gauffre, F.; Gulik-Krzywicki, T.; Loup, C.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Vors, J. P.; Rump, E. Organophosphorus dendrimers as new gelators for hydrogels, *Angew. Chem. Int. Edn Engl.* **2001**, *40*, 2626.
- (37) Battah, S. H.; Chee, C. E.; Nakanishi, H.; Gerscher, S.; MacRobert, A. J.; Edwards, C. Synthesis and biological studies of 5-aminolevulinic acid-containing dendrimers for photodynamic therapy, *Bioconjug. Chem.* **2001**, *12*, 980.
- (38) Yoon, H. C.; Lee, D.; Kim, H. S. Reversible affinity interactions of antibody molecules at functionalized dendrimer monolayer: affinity-sensing surface with reusability, *Anal. Chem. Acta* **2002**, *456*, 209.
- (39) Benters, R.; Niemeyer, C. M.; Drutschmann, D.; Blohm, D.; Wohrle, D. DNA microarrays with PAMAM dendritic linker systems, *Nucleic Acid Res.* **2002**, *30*, 1.
- (40) Konda, S. D.; Wang, S.; Brechbiel, M.; Wiener, E. C. Biodistribution of a 153Gd-folate dendrimer, generation = 4, in mice with folatereceptor positive and negative ovarian tumor xenografts, *Invest. Radiol.* **2002**, *37*, 199.
- (41) Supattapone, S.; Nguyen, H. O. B.; Cohen, F. E.; Prusiner, S. B.; Scott, M. R. Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 14529.
- (42) Supattapone, S.; Nishina, K.; Rees, J. R. Pharmacological approaches to prion research, *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *63*, 1383.
- (43) Halkes, S. B. A.; Vrasidas, I.; Rooijer, G. R.; Berg, A. J. J. V. d.; Liskamp, R. M. J.; Pieters, R. J. Synthesis and biological activity of polygalloyldendrimers as stable tannic acid mimics, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1567.

- (44) Yordanov, A. T.; Yamada, K. I.; Krishna, M. C.; Mitchell, J. B.; Woller, E.; Cloninger, M.; Brechbiel, M. W. Spin-labeled dendrimers in EPR imaging with low molecular weight nitroxides, *Angew. Chem. Int. Edn Engl.* **2001**, *40*, 2690.
- (45) Starpharma.
- (46) Tomalia, D. A.; Kirchoff, P. M. In *US Patent*; Company, T. D. C., Ed.; 4: USA, 1987; Vol. 694.
- (47) Hawker, C. J.; Fréchet, J. M. J. The synthesis and polymerization of a hyperbranched polyether macromonomer, *Polymer* **1992**, *33*, 1507.
- (48) Percec, V.; Heck, J. Liquid crystalline polymers containing mesogenic units based on half-disc and rod-like moieties. I. Synthesis and characterization of 4-([11-undecan-1-yloxy]-40-[3,4,5-tris(p-n-dodecan-1-yloxybenzyloxy)benzo-ate]biphenyl side groups., *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **1991**, *29*, 591.
- (49) Schlüter, A. D.; Rabe, J. P. Dendronized polymers: synthesis, characterization, assembly at interfaces, and manipulation, *Angew. Chem. Int. Edn. Engl.* **2000**, *39*, 864.
- (50) Astruc, D.; Blais, J.-C.; Daniel, M.-C.; Martinez, V.; Nlate, S.; Ruiz, J. Nano-scale metallodendritic complexes in electron-transfer processes and catalysis, *Macromol. Sym.* **2003**, *196*, 1.
- (51) Sato, T.; Jiang, D.-L.; Aida, T. A blue-luminescent dendritic rod: poly(phenylene ethynylene) within a light-harvesting dendritic envelope, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10658.
- (52) Pogantsch, A.; Wenzl, F. P.; List, E. J. W.; Leising, G.; Grimsdale, A. C.; Müllen, K. Polyfluorenes with dendron side chains as the active materials for polymer light-emitting devices, *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 1061.
- (53) Gillies, E.; Fréchet, J. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery, *Drug Disc. Today* **2005**, *10*, 35.
- (54) Stiriba, S. E.; Frey, H.; Haag, R. Dendritic polymers in biomedical applications: from potential to clinical use in diagnostics and therapy, *Angew. Chem. Int. Edn. Engl.* **2002**, *41*, 1329.
- (55) Ihre, H. R.; De Jesus, O. L. P.; Szoka, F. C.; Fréchet, J. M. J. Polyester dendritic systems for drug delivery applications: design, synthesis, and characterization, *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 443.
- (56) Stocker, W.; Schürmann, B. L.; Rabe, J. P.; Förster, S.; Lindner, P.; Neubert, I.; Schlüter, A. D. A dendritic nanocylinder. Shape control through implementation of steric strain, *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 793.
- (57) Stocker, W.; Karakaya, B.; Schürmann, B. L.; Rabe, J. P.; Schlüter, A. D. Ordered dendritic nanorods with a poly(p-phenylene) backbone, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7691.
- (58) Frauenrath, H. Dendronized polymers—building a new bridge from molecules to nanoscopic objects, *Prog. Polym. Sci.* **2005**, *30*, 325.
- (59) Frey, H. From random coil to extended nanocylinder: Dendrimer fragments shape polymer chains, *Angew. Chem. Int. Edn Engl.* **1998**, *37*, 2193.
- (60) Percec, V.; Heck, J.; Lee, M.; Ungar, G.; Alvarez-Castillo, A. Reentrant isotropic phase in a supramolecular disc-like oligomer of 4-[3,4,5-tris(n-dodecyloxy)benzyloxy]-40-[(2-vinyloxy)ethoxy]biphenyl, *J. Mater. Chem.* **1992**, *2*, 1033.
- (61) Karakaya, B.; Claussen, W.; Schaefer, A.; Lehmann, A.; Schlüter, A. D. Full coverage of a hydroxy-substituted poly(p-phenylene) with first- and second-generation dendritic wedges having isocyanate focal points, *Acta Polymer* **1996**, *47*, 79.
- (62) Grayson, S. M.; Fréchet, J. M. J. Divergent synthesis of dendronized poly(p-hydroxystyrene), *Macromolecules* **2001**, *34*, 6542.
- (63) Schlüter, A. D. The macromonomer route to dendronized polymers, *Comptes Rendus Chimie* **2003**, *6*, 843.
- (64) Schlüter, A. D.; Rabe, J. P. Dendronized polymers: Synthesis, characterization, assembly at interfaces, and manipulation., *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 864.
- (65) Percec, V.; Ahn, C. H.; Ungar, G.; Yeardley, D. J. P.; Moller, M.; Sheiko, S. S. Controlling polymer shape through the selfassembly of dendritic side-groups, *Nature* **1998**, *391*, 161.

- (66) Percec, V.; Ahn, C. H.; Cho, W. D.; Jamieson, A. M.; Kim, J.; Leman, T.; Schmidt, M.; Gerle, M.; Moller, M.; Prokhorova, S. A.; Sheiko, S. S.; Cheng, S. Z. D.; Zhang, A.; Ungar, G.; Yearley, D. J. P. Visualizable cylindrical macromolecules with controlled stiffness from backbones containing libraries of self-assembling dendritic side groups, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8619.
- (67) Zhang, A.; Okrasa, L.; Pakula, T.; Schlüter, A. D. 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.* **2004**, *126*, 6658.
- (68) Percec, V.; Heck, J.; Tomazos, D.; Falkenberg, F.; Blackwell, H.; Ungar, G. Self-assembly of taper-shaped monoesters of oligo(ethylene oxide) with 3,4,5-tris(p-dodecyloxybenzyloxy)benzoic acid and of their polymethacrylates into tubular supramolecular architectures displaying a columnar mesophase, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1993**, 2799.
- (69) Kwon, Y. K.; Chvalun, S.; Schneider, A.-I.; Blackwell, J.; Percec, V.; Heck, J. A. Supramolecular tubular structures of a polymethacrylate with tapered side groups in aligned hexagonal phases, *Macromolecules* **1994**, *27*, 6129.
- (70) Percec, V.; Ahn, C. H.; Barboiu, B. Self-encapsulation, acceleration and control in the radical polymerization of monodendritic monomers via self-assembly, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12978.
- (71) Rapp, A.; Schnell, I.; Sebastiani, D.; Brown, S. P.; Percec, V.; Spiess, H. W. Supramolecular assembly of dendritic polymers elucidated by ¹H and ¹³C solid-state MAS NMR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13284.
- (72) Percec, V.; Ahn, C. H.; Bera, T. K.; Ungar, G.; Yearley, D. J. P. Coassembly of a hexagonal columnar liquid crystalline superlattice from polymer(s) coated with a three-cylindrical bundle supramolecular dendrimer, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1070.
- (73) Kim, Y.; Mayer, M. F.; Zimmerman, S. C. A new route to organic nanotubes from porphyrin dendrimers, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1121.
- (74) Liang, C. O.; Helms, B.; Hawker, C. J.; Frechet, J. M. J. Dendronized cyclocopolymers with a radial gradient of polarity and their use to catalyze a difficult esterification, *Chem. Commun.* **2003**, 2524.
- (75) Suijkerbuijk, B. M. J. M.; Shu, L.; Gebbink, R. J. M. K.; Schlüter, A. D.; Van Koten, G. Single-site catalysts on cylindrical dendronized polymer support beyond nanosize, *Organometallics* **2003**, *22*, 4175.
- (76) Lee, C. C.; Grayson, S. M.; Frechet, J. M. J. Synthesis of narrow-polydispersity degradable dendronized aliphatic polyesters, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2004**, *42*, 3563.
- (77) Ravi Kumar, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications, *Reac. Func. Polym.* **2000**, *46*, 1.
- (78) Duarte, M. L.; Ferreira, M. C.; Marvão, M. R.; Rocha, J. An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy, *Int. J. Biol. Macromol.* **2002**, *31*, 1.
- (79) Mourya, V. K.; Inamdar, N. N. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore, *Reac. Func. Polym.* **2008**, *68*, 1013.
- (80) Jayakumar, R.; Menon, D.; Manzoor, K.; Nair, S. V.; Tamura, H. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review, *Carbohydr. Polym.* **2010**, *82*, 227.
- (81) Cárdenas, G.; Orlando, P.; Edelio, T. Synthesis and applications of chitosan mercaptanes as heavy metal retention agent, *Int. J. Biol. Macromol.* **2001**, *28*, 167.
- (82) Jayakumar, R.; Prabakaran, M.; Sudheesh Kumar, P. T.; Nair, S. V.; Tamura, H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications, *Biotech. Adv.* **2011**, *29*, 322.
- (83) Muzzarelli, R. A. A. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone, *Carbohydr. Polym.* **2009**, *76*, 167.
- (84) Kong, M.; Chen, X. G.; Xing, K.; Park, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review, *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *144*, 51.

- (85) Raafat, D.; Sahl, H.-G. Chitosan and its antimicrobial potential – a critical literature survey, *Microbial Biotech.* **2009**, *2*, 186.
- (86) Amidi, M.; Mastrobattista, E.; Jiskoot, W.; Hennink, W. E. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens☆, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 59.
- (87) Garcia-Fuentes, M.; Alonso, M. J. Chitosan-based drug nanocarriers: Where do we stand?, *J. Control. Release* **2012**, *161*, 496.
- (88) Hirano, S.; Seino, H.; Akiyama, Y.; Nonaka, I. In *Progress in Biomedical Polymers*; G.G. Gebelein, R. L. D., Ed.; Plenum Press, New York, 1990, p 283.
- (89) Dyer, A. M.; Hinchcliffe, M.; Watts, P.; Castile, J.; Jabbal-Gill, I.; Nankervis, R.; Smith, A.; Illum, L. Nasal delivery of insulin using novel chitosan based formulations: A comparative study in two animal models between simple chitosan formulations and chitosan nanoparticles, *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 998.
- (90) Sashiwa, H.; Shigemasa, Y.; Roy, R. Chemical Modification of Chitosan. 3. Hyperbranched Chitosan–Sialic Acid Dendrimer Hybrid with Tetraethylene Glycol Spacer, *Macromolecules* **2000**, *33*, 6913.
- (91) Sashiwa, H.; Shigemasa, Y.; Roy, R. Chemical modification of chitosan. Part 9: Reaction of N-carboxyethylchitosan methyl ester with diamines of acetal ending PAMAM dendrimers, *Carbohydr. Polym.* **2002**, *47*, 201.
- (92) Sashiwa, H.; Shigemasa, Y.; Roy, R. Highly Convergent Synthesis of Dendrimerized Chitosan–Sialic Acid Hybrid1, *Macromolecules* **2001**, *34*, 3211.
- (93) de Queiroz, A. A. A.; Abraham, G. A.; Camillo, M. A. P.; Higa, O. Z.; Silva, G. S.; Fernández, M. D. M.; Román, J. S. Physicochemical and antimicrobial properties of boron-complexed polyglycerol–chitosan dendrimers, *J. Biomat. Sci., Polymer Ed.* **2006**, *17*, 689.
- (94) Zhao, Y.; Chen, J.; Zeng, E.; Hu, X.; Liu, A.; Dong, Y. Synthesis and characterization of hydroxyethyl chitosan grafted by carboxyl ending DOVOB dendrimer: A novel liquid crystalline polymer, *Carbohydr. Polym.* **2008**, *74*, 828.
- (95) Braga, P. C.; Ricci, D. *Atomic Force Microscopy: Biomedical Methods and Applications*; Humana Press, 2004.
- (96) Khurshheed, A. *Scanning Electron Microscope Optics and Spectrometers*; World Scientific Publishing Company, 2011.
- (97) Arzate-Vázquez, I.; Chanona-Pérez, J. J.; Calderón-Domínguez, G.; Terres-Rojas, E.; Garibay-Febles, V.; Martínez-Rivas, A.; Gutiérrez-López, G. F. Microstructural characterization of chitosan and alginate films by microscopy techniques and texture image analysis, *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87*, 289.
- (98) Zhou, H.; Wu, J.; Zhang, J. In *Part I*; Huiyu Zhou, J. W., Jianguo Zhang & Ventus Publishing ApS, Ed.; BookBoon: 2010; Vol. 1.
- (99) Zhou, H.; Wu, J.; Zhang, J. In *Part II*; Huiyu Zhou, J. W., Jianguo Zhang & Ventus Publishing ApS, Ed.; BookBoon: 2010; Vol. 2.
- (100) Mittal, K. L. *Contact Angle, Wettability and Adhesion*; Brill Academic Publishers, Incorporated, 2008.
- (101) Rao, A. A. *Rheology of Fluid and Semisolid Foods: Principles and Applications*; Springer, 2010.
- (102) Rošic, R.; Pelipenko, J.; Kocbek, P.; Baumgartner, S.; Bešter-Rogač, M.; Kristl, J. The role of rheology of polymer solutions in predicting nanofiber formation by electrospinning, *European Polym. J.* **2012**, *48*, 1374.
- (103) Steffe, J. F. *Rheological Methods in Food Process Engineering*; Freeman Press, 1996.
- (104) Nernst, W.; Riesenfeld, E. H., *Annals of Physics* **1902**, *8*, 600.
- (105) Cremer, M. Z. *Journal of Biology*, **1906**, *47*, 562.
- (106) Velicky, M.; Tamand, K. Y.; Dryfe, R. A. W., *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 2541.
- (107) Davies, T. J.; Wilkins, S. J.; Compton, R. G., *J. Electroanal. Chem.* **2006**, *586*, 260.
- (108) Izquierdo, D.; Martines, A.; Heras, A.; Lopez-Palacios, I.; Ruiz, V.; Dryfe, R. A. W.; Colina, A., *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 5723.
- (109) Luo, K.; Schroedes, S. L. M.; Dryfe, R. A. W., *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 4172.
- (110) Girault, H. H. In *Modern Aspects of Electrochemistry*; J.O'M. Bockris, B. C., R. White, Ed.; Plenum Press, New York, 1993; Vol. 25, p 1.

- (111) Reymond, F.; Fermín, D.; Lee, H. J.; Girault, H. H. Electrochemistry at liquid/liquid interfaces; methodology and potential applications, *Electrochim. Acta* **2000**, *45*, 2647.
- (112) Senda, M.; Kakiuchi, T.; Osakai, T. Electrochemistry at the interface between two immiscible electrolyte solutions, *Electrochim. Acta* **1991**, *36*, 253.
- (113) Nicholson, R. S.; Shain, I. Theory of Stationary Electrode Polarography. Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems., *Anal. Chem.* **1964**, *36*, 706.
- (114) Bard, A. J.; Faulkner, L. R. New York, 1980.
- (115) Homolka, D.; Marecek, V.; Samec, Z.; Base, K.; Wendt, H. The partition of amines between water and an organic solvent phase., *J. Electroanal. Chem.* **1984**, *163*, 159.
- (116) Homolka, D.; Holub, K.; Marecek, V. Facilitated ion transfer across the water/nitrobenzene interface. Theory for single-scan voltammetry applied to a reversible system., *J. Electroanal. Chem.* **1982**, *138*, 29.
- (117) Guainazzi, M.; Silvestry, G.; Survalle, G., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1975**, 200.
- (118) K.Gorgy; F.Fusalba; Evans, U.; K.Konttri; Cunnane, V. J. Electropolymerization of 2,2':5',2'' terthiophene at an electrified liquid-liquid interface, *Synthetic metals* **2002**, *125*, 365.
- (119) Cheng, Y.; Corn, R. M. Ultrathin polypeptide multilayer films for the fabrication of model Liquid/Liquid electrochemical interfaces, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 8726.
- (120) Rieger, J.; Dubois, P.; Jérôme, R.; Jérôme, C. Controlled Synthesis and Interface Properties of New Amphiphilic PCL-g-PEO Copolymers, *Langmuir* **2006**, *22*, 7471.
- (121) Johans, C.; Clohessy, J.; Fantini, S.; Kontturi, K.; V.J.Cunnane Electrosynthesis of polyphenylpyrrole coated silver particles at a liquid-liquid interface, *Electrochem. Comm.* **2002**, *4*, 227.
- (122) Marecek, V.; Jänchenová, H.; Stibor, I.; Budka, J. Compact poly-pyrrole layers formed at a liquid | liquid interface, *J.Electroanal.Chem* **2005**, *575*, 293.
- (123) Maeda, K.; Jächenová, H.; Lhotský, A.; Stibor, I.; Budka, J.; Marecek, V. Formation of a polymer layer from monomers adsorbed at a liquid / liquid interface, *J. Electroanal. Chem* **2001**, *516*, 103.
- (124) Cheng, Y.; Murtomäki, L.; Corn, R. M. Electrochemical characterization of the ultrathin polypeptide film:1,2-dichloroethane liquid / liquid interface., *J. Electroanal. Chem* **2000**, *483*, 88.
- (125) Fantini, S.; Clohessy, J.; Gorgy, K.; F.Fusalba; Johans, C.; Kontturi, K.; Cunnane, V. J. Influence of the presence of a gel in the water phase on the electrochemical transfer of ionic forms of β -blockers across a large water/1,2-dichloroethane interface, *European J. Pharma. Sci.* **2003**, *18*, 251.
- (126) Hiemenz, P. C.; Marcel dekker, New York, USA, 1986, p 398.
- (127) Shaw, D. J. *Introduction to Colloid and Surface Chemistry*; Butterworths, London, UK, 1980.
- (128) Israelachvili, J. N. *Intermolecular and Surface Forces*; Academic Press, London-UK, 1992.
- (129) Dill, K. A., Dominant forces in protein folding, *Biochemistry* **1990**, *29*, 7133.
- (130) Dalgleish, D. G. In *Food emulsions*; Sjoblom, J., Ed.; Marcel Dekker, New York, USA, 1996, p 287.

Consideraciones generales

A través de la modificación de un polímero con dendrones, es posible controlar la funcionalidad de la superficie, forma y tamaño de la estructura a escala nanométrica, que le confieren al polímero propiedades únicas, conocido como efecto dendrítico. Estas características le confieren una gran variedad de aplicaciones. Por ejemplo, se han estudiado superficies de silicio modificadas con dendrones con grupos periféricos *tert*-butilo, como soportes en cromatografía gaseosa capilar de alta resolución y en microextracción capilar.^{1,2} Modificaciones químicas de sílica,³⁻⁵ celulosa^{6,7} y quitosano,^{8,9} han sido realizadas con dendrones como el poli(amidoamino) (PAMAM), y estudiado su potencial como soportes en cromatografía de afinidad y transporte de fármacos.

Los polímeros dendronizados tienen un gran potencial para ser empleados en nanotecnología. Esta disciplina se define como la tecnología que permite controlar, manipular, estudiar y elaborar estructuras y dispositivos a escala nanométrica.¹⁰ Por lo tanto, los nanomateriales incluyen tanto a materiales con dimensiones menores a 200 nm, como aquellos con rasgos estructurales (partículas, fibras, superficies) en estas dimensiones. Estas partículas tienen propiedades y funciones únicas muy diferentes a sistemas obtenidos de materiales idénticos, como menor tamaño, mayor área superficial y mejor solubilidad, que le confieren potenciales aplicaciones en diferentes áreas como liberación de fármacos y genes,^{10,11} catálisis,^{12,13} y dispositivos electrónicos.¹⁴

En particular, los polímeros dendronizados representan soportes interesantes para la liberación de fármacos, dado que el gran número de grupos funcionales periféricos y la arquitectura molecular, podrían permitir un significativo aumento en la cantidad de fármaco incorporado y además, se ha observado que la forma y la multivalencia de estas macromoléculas puede influir en sus propiedades farmacocinéticas, por ejemplo mejorar el tiempo de vida media en plasma.¹⁵⁻¹⁷

Por otro lado, los polímeros biodegradables en forma de nanopartículas han sido estudiados extensamente en las últimas décadas, como transporte de fármacos e ingeniería de tejidos.¹⁰ Dentro de estos polímeros, se encuentra el quitosano. Éste ha sido estudiado ampliamente como transporte de fármacos debido a que es un material biocompatible, biodegradable, antitrombogénico, homeostático, entre otras.¹⁸⁻²⁰ Sin embargo, una desventaja que presenta es su baja o nula solubilidad a valores de pH mayores de 6, representando un gran inconveniente para su vehiculización en plasma. Además, el gran carácter hidrofílico de la estructura disminuye la interacción con fármacos hidrofóbicos.

En este contexto, se planteó como principal desafío la dendronización de quitosano con distintas estructuras dendríticas (capítulo 3), estudiando los cambios producidos en el polímero debido a la presencia del dendrón. Además, se realizaron modificaciones para favorecer la solubilidad de los productos a valores de pH próximos a 7 (capítulo 4), para lo cual se hidrolizó la periferia dendrítica o se injertó en el polímero una amina cuaternaria (clorhidrato de glicidiltrimetilamonio, gtmac).

Se empleó voltametría cíclica para evaluar los cambios en los materiales obtenidos respecto a quitosano, principalmente el efecto sobre el balance hidrofílico/hidrofóbico en los mismos; y se estudió la interacción de fármacos con los nuevos materiales, evaluando la influencia del dendrón (capítulo 5).

OBTENCIÓN DE POLVOS DENDRONIZADOS



En el presente capítulo se presentan las rutas sintéticas seguidas para la obtención de quitosano dendronizado. Se emplearon dos dendrones con diferente punto focal: un grupo isocianato en el dendrón weisocianato (W), y un grupo amino en amina de Behera (AB). Para este último, fue necesaria una activación previa del polímero con acrilato de metilo (MA). La funcionalización de quitosano con weisocianato fue realizada directamente por la unión del dendrón a la matriz. La figura 3.1 muestra las estructuras de W, AB y MA.

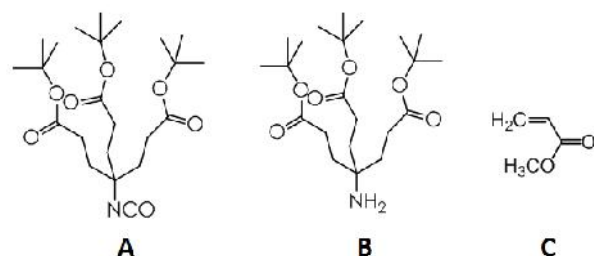


Figura 3.1. Estructuras de W (A), AB (B) y MA (C).

A continuación se presentan los resultados de la síntesis de los polímeros dendronizados y su caracterización.

3.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE Ch-W

3.1.1. Dendronización. Obtención de Ch-W

El dendrón weisocianato (W) tiene como punto focal un grupo isocianato, el cual es un electrófilo que reacciona con los grupos funcionales nucleofílicos presentes en quitosano. La reacción ocurre por el ataque nucleofílico, del grupo amino y/o hidroxilo (del carbono 6) del quitosano, al carbono electrofílico del punto focal del dendrón, formando un enlace urea y/o uretano, respectivamente. La reacción se llevó a cabo en dimetilacetamida (DMAc) con la presencia de dilaurato de dibutilestaño (DLBT), el cual es un catalizador eficiente de reacciones entre alcoholes o aminas con isocianatos y a su vez, evita la formación de productos secundarios, siendo necesario trabajar a temperaturas inferiores a 70°C.²¹ La figura 3.2 muestra un esquema de la obtención de quitosano-weisocianato (Ch-W).

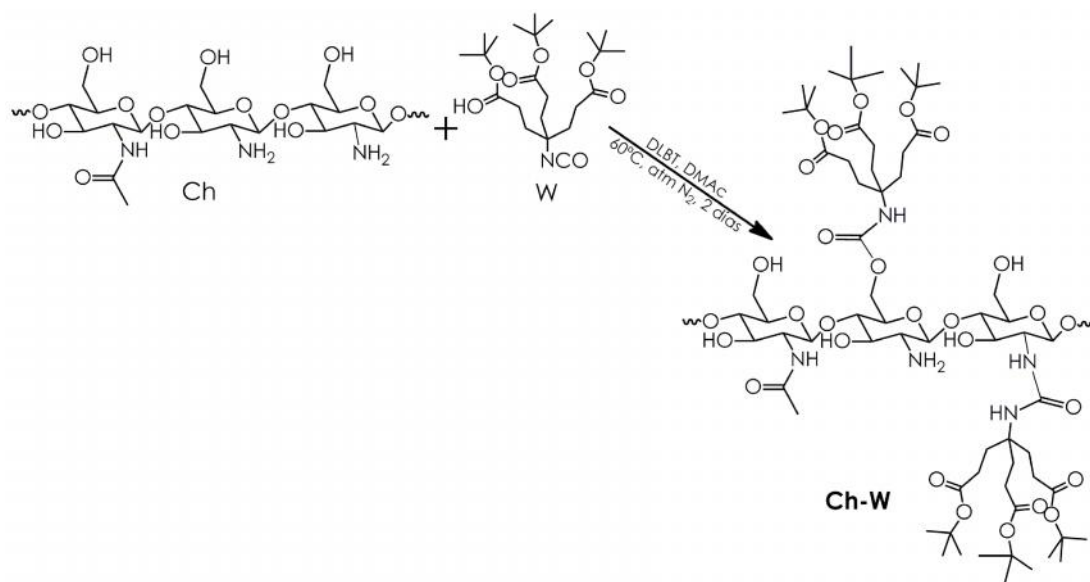


Figura 3.2. Reacción entre Ch y W.

La formación del producto deseado, Ch-W, fue evidenciada por espectroscopia infrarroja, resonancia magnética nuclear en estado sólido y en solución. En el espectro FT-IR del producto (figura 3.3) se observan las señales debidas a la presencia del dendrón, a 1727 cm^{-1} (estiramiento C=O), 848 y 757 cm^{-1} (estiramiento O-C-O-*tert*-butilo), 2973 cm^{-1} (estiramiento CH₃). Además, las señales a 1640 cm^{-1} (estiramiento C=O) y 1457 cm^{-1} (estiramiento N-C-O) podrían atribuirse a los grupos urea y/o uretano resultante de la unión del dendrón a los grupos amino y/o hidroxilo de Ch, respectivamente.

Se tomaron los espectros de RMN-¹³C de sólidos (CP-MAS por sus siglas en inglés) del dendrón, del polímero y del producto Ch-W. En la figura 3.4, se presentan los espectros obtenidos junto a las estructuras de Ch y W, las señales fueron asignadas a los correspondientes carbonos, teniendo en cuenta tanto tablas como bibliografía de referencia.²²

Se destaca que el espectro del producto muestra la desaparición de la señal a aproximadamente 125 ppm, correspondiente al átomo de carbono del grupo isocianato del dendrón, y la aparición de una nueva señal a 156 ppm, atribuida al carbono de la unión urea y/o uretano. Tanto el carbono de un grupo urea como uretano presentan un corrimiento semejante, lo cual dificulta la elucidación del tipo de unión formada. Otra evidencia de la unión

química entre W y polímero, es el corrimiento de la señal del carbono cuaternario **b** de 60 a 55 ppm, debido al cambio del grupo isocianato del punto focal a un grupo urea y/o uretano.

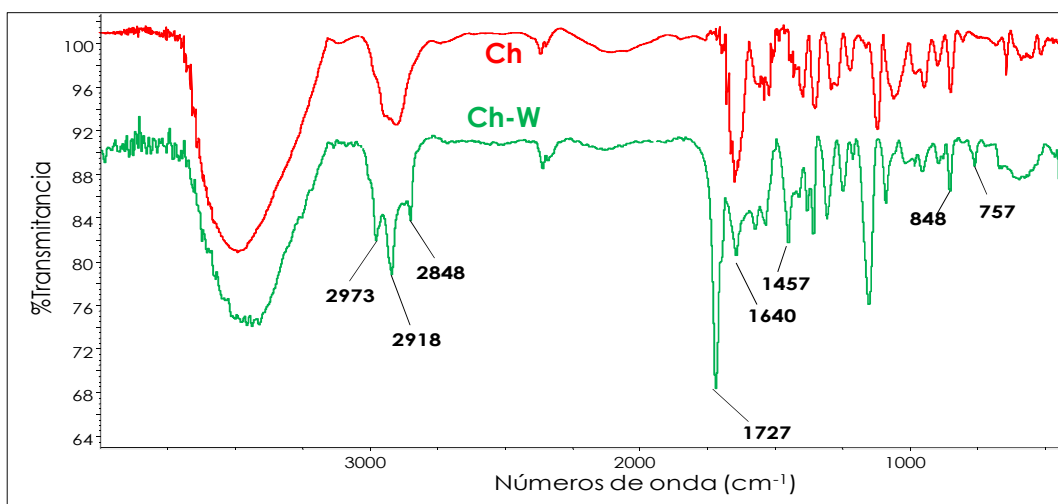


Figura 3.3. Espectro FT-IR de Ch y Ch-W.

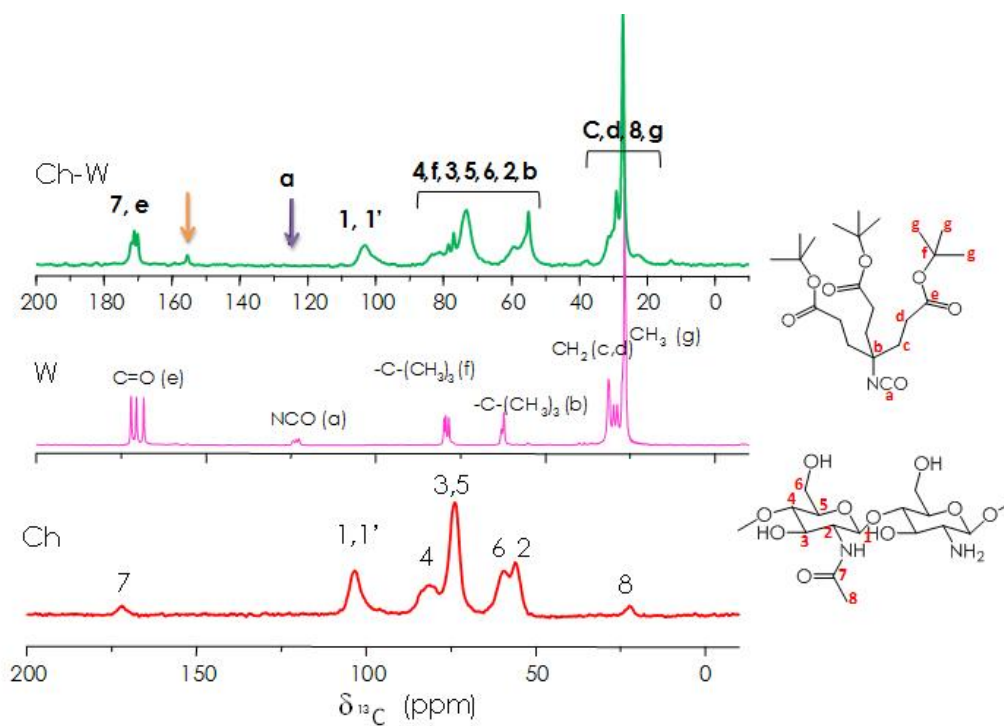


Figura 3.4. Espectro de resonancia magnética de ^{13}C (estado sólido) de quitosano (Ch), weisocianato (W) y Ch-W.

El espectro de RMN-¹H (en solución) y la estructura de Ch-W, se presenta en la figura 3.5. En el mismo, se observa el patrón de señales características de quitosano, las cuales fueron asignadas teniendo en cuenta su espectro. La principal evidencia de la unión del dendrón es la aparición de la señal a 1,3 ppm, característica de los protones del grupo *tert*-butilo (grupos periféricos de W).

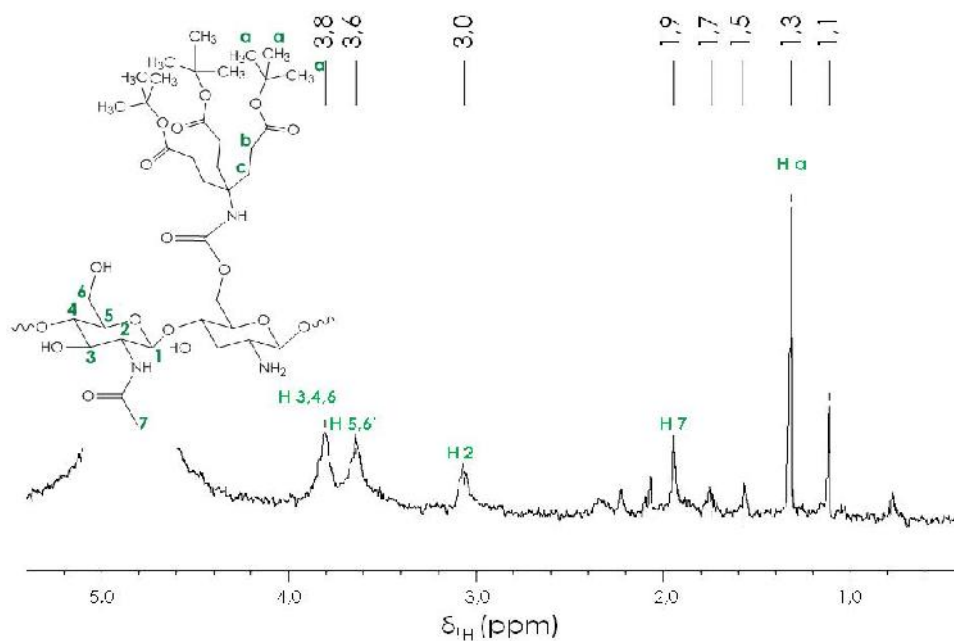


Figura 3.5. Espectro RMN-¹H de Ch-W.

Mediante el empleo del *test* de la ninhidrina,²³ se titularon grupos amino libres de Ch-W y se compararon con los de Ch, determinando el valor de $5,27 \times 10^{-4}$ moles de W por gramo de matriz, el cual representa la cantidad de dendrón unido al polímero únicamente a través de los grupos amino.

3.1.2. Análisis térmico

En la figura 3.6 se presentan los termogramas de Ch-W y Ch. El quitosano muestra dos eventos característicos, el primero está relacionado con la

pérdida de agua absorbida dentro de la estructura polimérica y ocurre alrededor de los 100°C. El segundo evento es observado entre los 250 y 350°C, con una pérdida de masa del 40%, correspondiente a la degradación térmica del quitosano y la pérdida de material volátil, comenzando con la ruptura de la estructura polimérica y posteriormente, la descomposición de las unidades monoméricas en ácido acético y ácido butírico, entre otros compuestos.²⁴

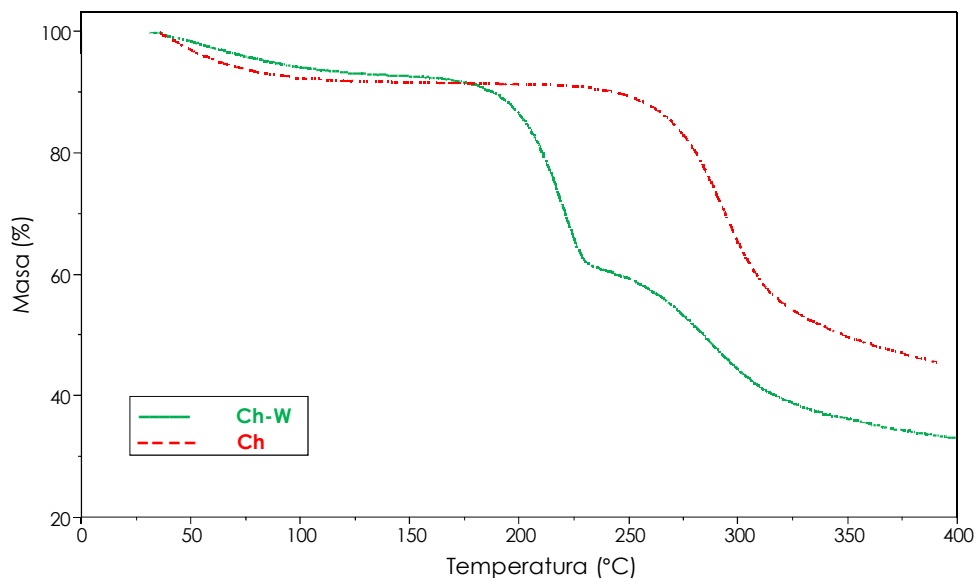


Figura 3.6. Curvas de TGA de Ch y Ch-W.

El producto Ch-W presenta tres eventos de pérdida de masa, siendo alrededor de 100°C la evaporación de agua absorbida por el polímero. La etapa de degradación que comienza alrededor de 190°C, es característica de la estructura dendrítica unida al Ch, y se correlaciona con la eliminación de isobutileno, inducido térmicamente a partir de los grupos éster *tert*-butilo.⁶ El porcentaje de masa perdido de la matriz en este evento, se podría relacionar con la cantidad de dendrón en la matriz. En consecuencia, se puede estimar que hay $1,36 \times 10^{-3}$ moles W/g de matriz, siendo este número mayor al determinado por *test* de ninhidrina. Considerando el total de dendrón unido a la matriz y la cantidad unido a través del grupo amino, se puede afirmar que la mayor cantidad de W se une a través del grupo hidroxilo del Ch. Por otro lado, el tercer evento estaría relacionado a la descomposición de quitosano, el cual

tiene un máximo de descomposición a una menor temperatura, siendo 298°C y 285°C para Ch y Ch-W, respectivamente.

3.1.3. Microscopia de fuerza atómica

La microscopía de fuerza atómica (AFM por sus siglas en inglés) representa una poderosa herramienta para el estudio de dendrímeros y polímeros dendronizados sobre superficies. A través de imágenes de AFM se ha demostrado que los dendrímeros adsorbidos se aplanan sustancialmente sobre sustratos sólidos²⁵⁻²⁷ y su grado de hinchamiento puede ser controlado por la naturaleza del sustrato.²⁸ Los dendrímeros adsorbidos sobre sustratos de carga opuesta forman monocapas con una estructura como cristales líquidos.²⁷ De manera semejante, se conoce que los polímeros dendronizados pueden aplanarse en su estado adsorbido; sin embargo, este aplanamiento es de menor magnitud que para los dendrímeros.²⁹ Además, estudios de AFM de polímeros dendronizados cargados, revelaron que pueden plegarse sobre sí mismos, creando estructuras ramilletes dobles.³⁰

La imagen AFM de Ch (figura 3.7-A) muestra partículas pequeñas del orden del micrón y una de mayor tamaño. Esto se debe al empleo de un solvente (empleado para dispersar la muestra en el sustrato) con poca afinidad con el polímero. Mientras que, en la imagen AFM de Ch-W (figura 3.7-B) se observan aglomerados mucho más pequeños en altura, con alturas de alrededor 25 nm, y los mismos presentan un cierto patrón, como si se tratara de un sistema cristalino. Estos resultados muestran que el polímero dendronizado cambia su estructura respecto al polímero natural.

Estos estudios preliminares mostrarían que el sistema Ch-W tiene una estructura más ordenada, debido a la forma que adopta al adsorberse en el sustrato empleado.

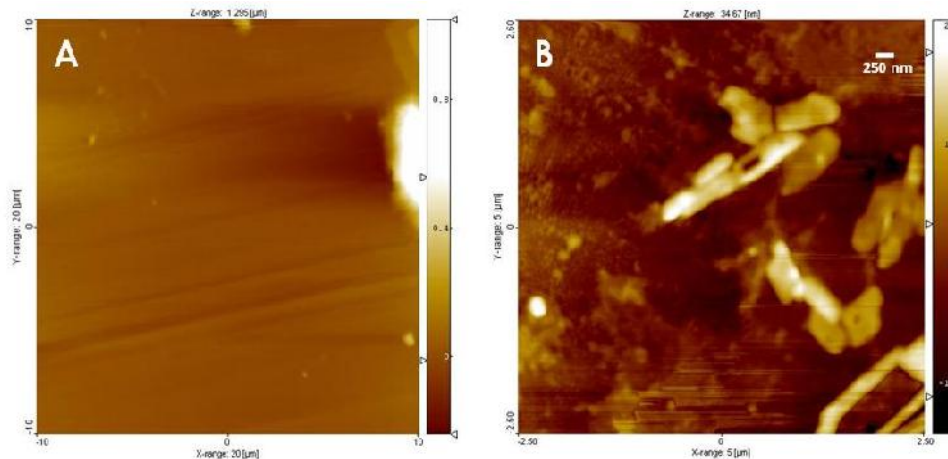


Figura 3.7. Imágenes AFM de Ch (A) y Ch-W (B).

3.2. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE Ch-MA-AB

3.2.1. Modificación con acrilato de metilo. Obtención de Ch-MA

El quitosano fue activado con acrilato de metilo (MA) con el objetivo de obtener grupos éster libres, los cuales posteriormente pueden reaccionar con los grupos amino del punto focal de AB, figura 3.8. Sashiwa y col.^{31,32} han reportado la unión exitosa de acrilato de metilo a quitosano a través de una adición de Michael. La reacción ocurre por el ataque nucleofílico del grupo amino del polímero al carbono con densidad de carga positiva correspondiente al doble enlace del acrilato de metilo, para obtener de esta forma el producto denominado quitosano-acrilato de metilo (Ch-MA).

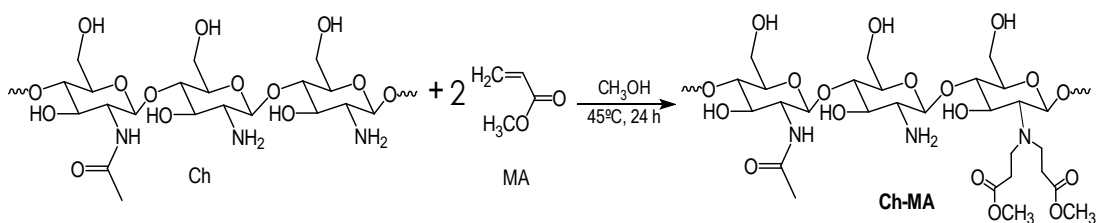


Figura 3.8. Reacción de quitosano con acrilato de metilo. Obtención Ch-MA.

En espectrofotometría infrarroja generalmente, un enlace amida presenta las bandas de absorción del enlace C=O, conocida como banda de amida I, y la del enlace N-H, banda de amida II.³³ La primera aparece típicamente alrededor de 1630-1740 cm^{-1} y se desplaza a menores frecuencias por la formación de puentes hidrógeno. Mientras que, la banda II aparece entre 1500 y 1550 cm^{-1} y se desplaza a mayores frecuencias por las uniones puentes hidrógeno. En el espectro de quitosano (Ch), estas bandas aparecen a 1657 (banda de amida I) y 1559 (banda de amida II). Además, el espectro de Ch exhibe una banda ancha a 3450 cm^{-1} (estiramiento de los enlaces N-H y O-H), 1027 (estiramiento del enlace C-O), 1155 (estiramiento asimétrico del enlace C-O-C, éter del anillo), alrededor de 2880 y 2920 cm^{-1} (vibraciones asimétricas y simétricas del enlace C-H₂).³⁴

En el espectro infrarrojo del producto (figura 3.9-A), se observan las señales características de quitosano y se destaca la banda a 1735 cm^{-1} (estiramiento C=O) correspondiente al grupo éster del MA.

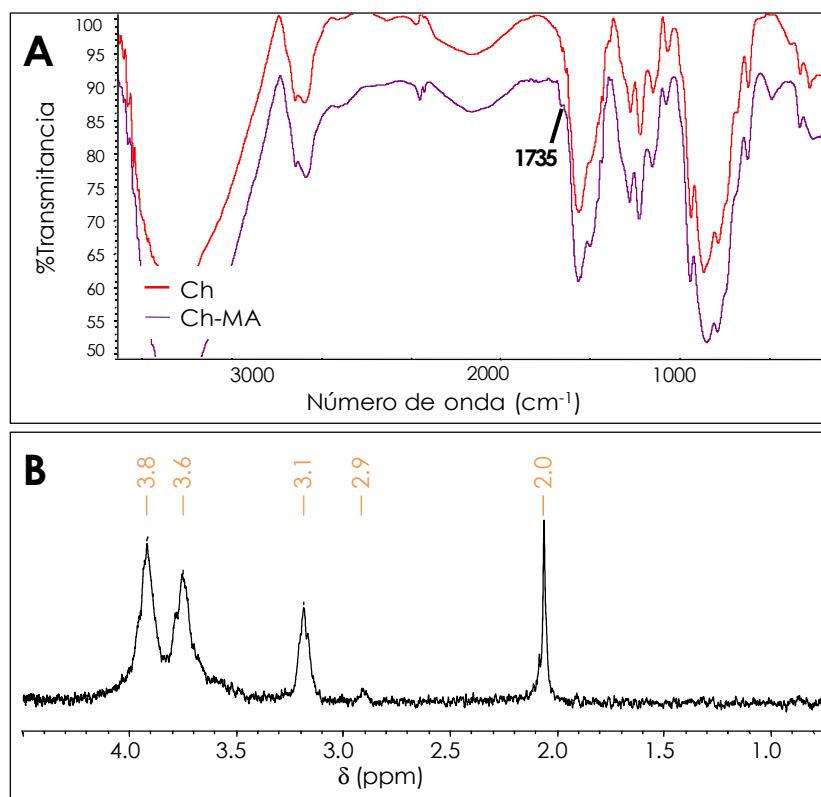


Figura 3.9. Espectros FT-IR de Ch y Ch-MA (A). Espectro RMN-¹H de Ch-MA (B).

En el espectro de RMN-¹H (figura 3.9-B), se observan los picos correspondientes a quitosano a 3,8 ppm (H 3, 4 y 6), 3,6 ppm (H 5 y 6'), 3,1 ppm (H 2) y 2,0 ppm (H 7); mientras que, la unión del acrilato de metilo se corroboró por la aparición de la señal a 2,9 ppm correspondiente al protón del grupo metileno (-CH₂-). Las demás señales se encuentran superpuestas con las del polímero. Se determinó el porcentaje de modificación del quitosano por titulación de grupos amino mediante el test de la ninhidrina;²³ el valor obtenido fue de 68,5% (7,78x10⁻⁴ moles MA/g matriz).

3.2.2. Dendronización. Obtención de Ch-MA-AB.

Una vez realizada la funcionalización de quitosano con acrilato de metilo (Ch-MA), se procedió a la unión del dendrón AB mediante una reacción de amidación entre el grupo amino del dendrón y los grupos éster del Ch-MA (figura 3.10).

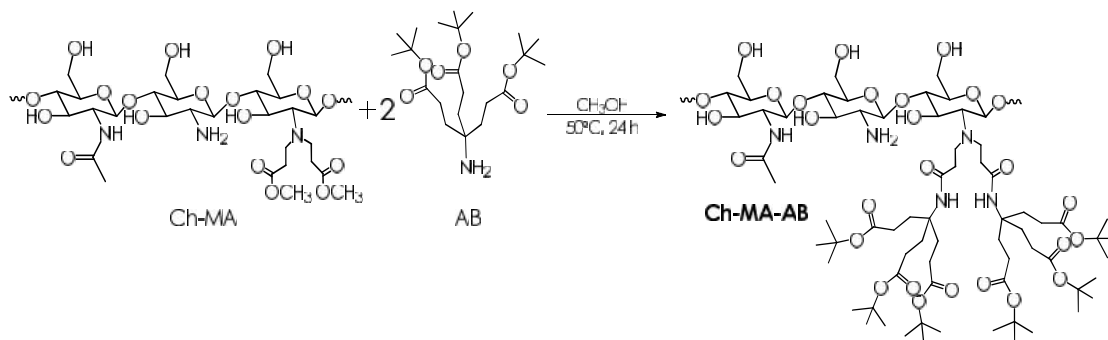


Figura 3.10. Reacción de amidación. Obtención de Ch-MA-AB.

El espectro FT-IR del producto (figura 3.11) mostró la aparición de las bandas características de los dendrones a 1726 cm⁻¹ (estiramiento del enlace C=O), 2960 cm⁻¹ (estiramiento del enlace C-H de metilo) y a 840 y 757 cm⁻¹ la deformación del enlace O-C del grupo O-C-*tert*-butilo correspondiente a la amina de Behera. Además, se podría atribuir la aparición de la señal a 1662 cm⁻¹ (estiramiento del grupo C=O, banda I de la amida) y el aumento en la

intensidad de la señal a 1313 cm^{-1} (deformación de C-N) es atribuida a la formación del enlace amida entre el dendrón y el polímero.

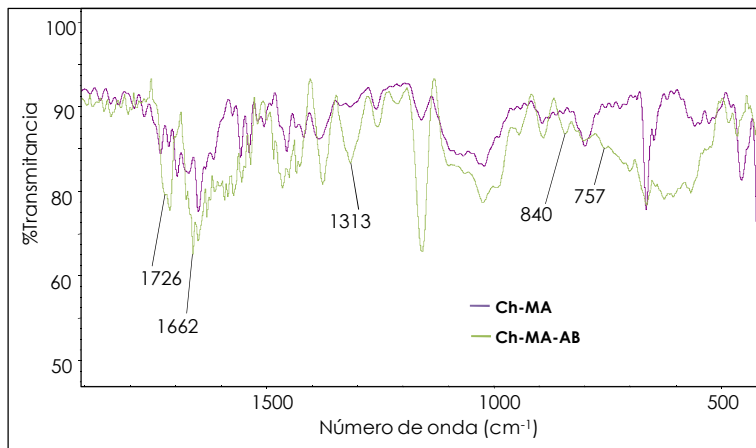


Figura 3.11. Espectros FT-IR de Ch-MA y Ch-MA-AB.

3.2.3. Estudios de Hinchamiento

Se realizaron estudios de hinchamiento a dos valores de pH: 1,2 y 7,4. Los mismos fueron seleccionados por dos razones, el primero es debido al potencial de los materiales como sistemas transportadores de fármacos, siendo el pH ácido que se encuentra en el estómago y el pH 7,4 se encuentra en el plasma. La otra razón, es porque estos valores de pH representan las condiciones por encima y por debajo del pKa de los grupos amino de quitosano ($pK_a \approx 6$),²⁰ permiten evaluar el comportamiento de los polímeros cuando se encuentran cargadas positivamente o prácticamente sin carga, por la presencia de grupos amonio ($-\text{NH}_3^+$) o amina ($-\text{NH}_2$), respectivamente.

En general, como se observa en la tabla 3.1, los valores de hinchamiento son mayores a pH 1,2 cuando el polímero se encuentra cargado positivamente y por lo tanto, el hinchamiento aumenta debido a la repulsión electrostática entre las cadenas de quitosano. El polímero sin modificar, es soluble a este valor de pH, por lo que no fue posible realizar dicho estudio.

La modificación con acrilato de metilo (Ch-MA) disminuye significativamente el hinchamiento respecto a Ch. Este comportamiento se debe a la disminución de la cantidad de grupos amino libres de la cadena polimérica y a su vez, a posibles entrecruzamientos entre las cadenas de quitosano. Cabe destacar que a pH 1,2, se pudo medir el hinchamiento de Ch-MA. Al unir AB al polímero (Ch-MA-AB), se observa un leve incremento en el hinchamiento con respecto al Ch-MA, a ambos valores de pH. Probablemente, el tamaño del dendrón genera una mayor separación entre las cadenas poliméricas permitiendo un mayor ingreso de agua entre las mismas.

Tabla 3.1. Valores de índices de hinchamiento (E_{sw}) de quitosano y sus derivados.

Polvos	E_{sw}^a (%)	
	pH 7,4	pH 1,2
Ch	$(40 \pm 2) \times 10^1$	-
Ch-MA	75 ± 4	$(45 \pm 2) \times 10^1$
Ch-MA-AB	100 ± 5	$(60 \pm 3) \times 10^1$

^a E_{sw} es calculado según la fórmula 14.6, apartado 14.2.7.1.

MODIFICACIÓN DE LAS POLVOS DENDRONIZADOS



A partir de las polvos dendronizados obtenidas, se realizaron diferentes modificaciones con el objetivo de cambiar la polaridad y reactividad en la periferia de la molécula dendrítica. De esta manera, se podría aumentar la solubilidad de los sistemas, en medios acuosos en un mayor intervalo de pH y además, unir una molécula que actúe como *target*, para obtener sistemas con potenciales propiedades como transportadores de fármacos. Los polímeros dendronizados se modificaron por hidrólisis de los grupos éster de la

periferia de las estructuras dendríticas (inciso 4.1), unión de una molécula con grupos amino cuaternario (clorhidrato de glicidiltrimetilamonio) en la cadena polimérica (inciso 4.2), y unión de ácido fólico (inciso 4.3).

4.1. HIDRÓLISIS DE GRUPOS *tert*-BUTILO PERIFÉRICOS DE LAS ESTRUCTURAS DENDRÍTICAS

Se empleó medio ácido para promover la protonación del grupo carbonilo y el ataque nucleofílico de agua al grupo éster. De esta manera, se generó el dendrón hidrolizado y el grupo saliente 2,2-hidroximetilpropanol (figura 4.1-B). De esta forma se obtuvieron los productos Ch-MA-ABh y Ch-Wh, figura 4.1-A.

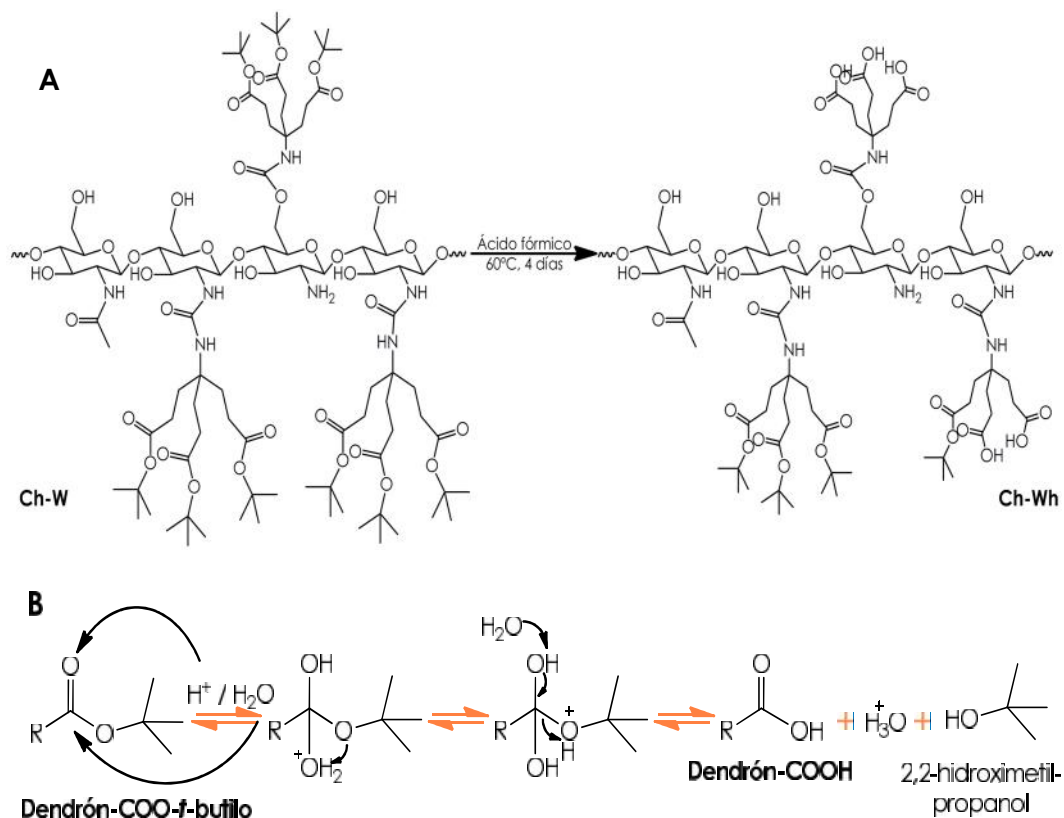


Figura 4.1. Reacción de hidrólisis de W (A). Esquema del mecanismo de hidrólisis de grupos ésteres del dendrón (B).

Las modificaciones fueron evidenciadas por espectroscopia Infrarroja (figuras 4.2-A y B), tanto para Ch-MA-ABh como para Ch-Wh se observó el corrimiento de la banda de vibración del grupo carbonilo de 1726 a 1712 cm^{-1} y de 1727 a 1712 cm^{-1} , respectivamente, correspondiente a la conversión de los grupos éster a grupos ácido. Además, se observó la disminución de intensidad relativa de las bandas de los grupos *tert*-butilo a 840 cm^{-1} (y 848 cm^{-1} para Ch-Wh) correspondiente a la deformación del enlace C-O, y a 2973 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del enlace C-H. En los espectros también se evidencia el aumento y ensanchamiento de la banda alrededor de 3400 cm^{-1} , correspondiente al enlace O-H los grupos hidroxilo.

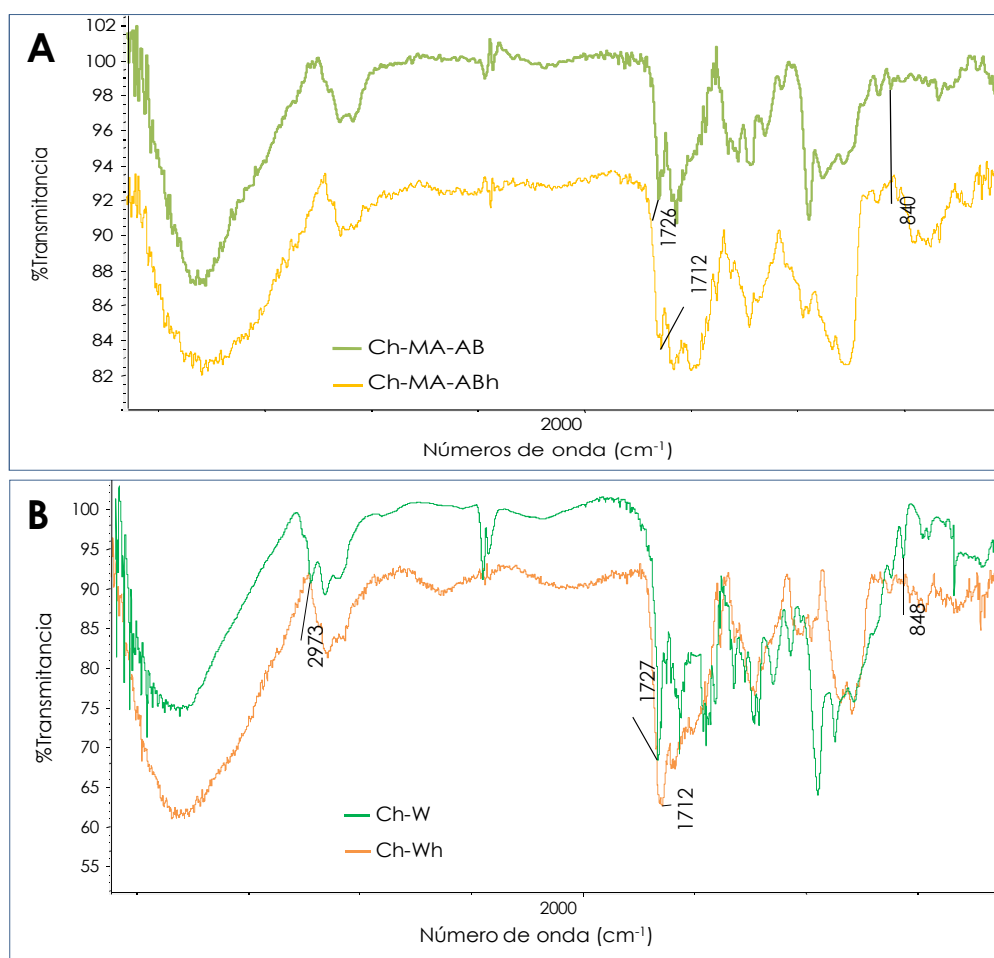


Figura 4.2. Espectros FT-IR de (A) Ch-MA-AB y Ch-MA-ABh, y (B) Ch-W y Ch-Wh.

Se determinó la cantidad de dendrón hidrolizado mediante titulación de grupos ácido. En la tabla 4.1, se muestra la cantidad de dendrón hidrolizado para cada sistema.

Tabla 4.1. Determinación de dendrones con grupos ácido en su periferia.

Sistema	Dendrón hidrolizado (moles/g matriz)
Ch-MA-ABh	$4,61 \times 10^{-4}$
Ch-Wh	$7,56 \times 10^{-4}$

4.2. UNIÓN DE UNA MOLÉCULA CON GRUPOS AMINO CUATERNARIO

El quitosano es soluble en medio ácido, debido a la protonación de los grupos amino que posee en la estructura, pero es insoluble a pH fisiológico. Para resolver este problema, se han estudiado diferentes modificaciones con moléculas que poseen carga permanente, como por ejemplo aminas cuaternarias, lo que le confiere al polímero carga permanente y permite que sea soluble en un intervalo más amplio de pH.³⁵ En este marco, se realizó la unión de clorhidrato de glicidiltrimetilamonio (gtmac) a quitosano, para evaluar la solubilidad del polímero a distintos valores de pH. Posteriormente, se evaluó la unión a los polímeros dendronizados.

4.2.1- Obtención de Ch-gtmac

Se obtuvo Ch-gtmac, empleando una relación molar entre los grupos amino de Ch y grupos epóxido de gtmac de 1:3. La reacción de quitosano con anillos epóxido involucra una sustitución nucleofílica y la apertura del mismo. El grupo amino es el centro nucleofílico más favorable del Ch, aunque también el grupo hidroxilo podría reaccionar en condiciones neutras, como se muestra en la figura 4.3.

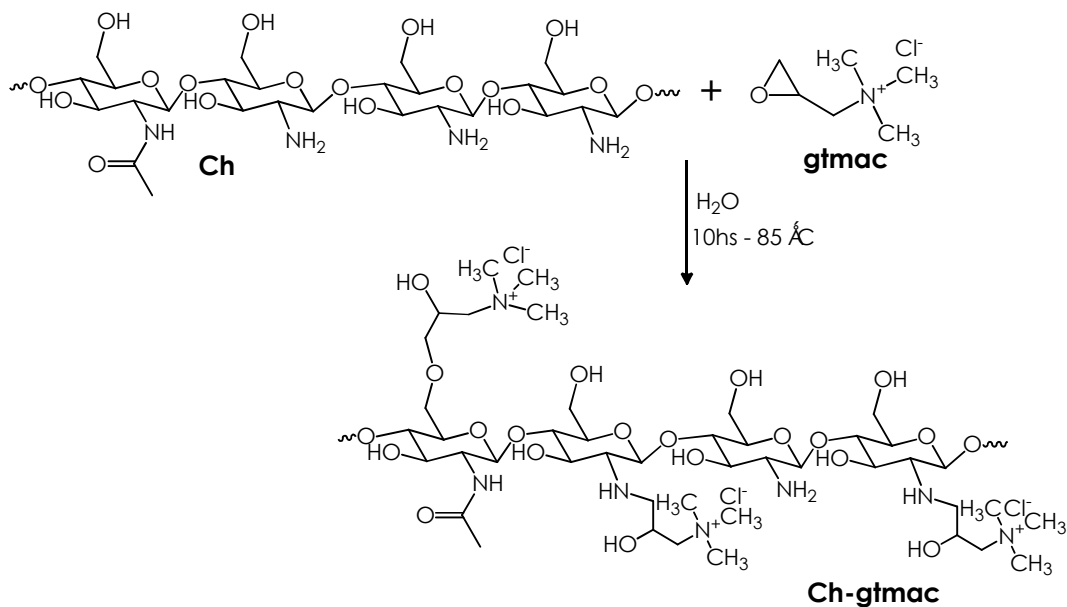


Figura 4.3. Reacción de Ch con gtmac.

Ch-gtmac se caracterizó por espectroscopia FT-IR y RMN-¹H. En el espectro FT-IR de Ch (figura 4.4) aparecen los picos a 1650 y 1590 cm⁻¹ correspondientes a la absorción de los grupos carbonilo y amino, respectivamente.

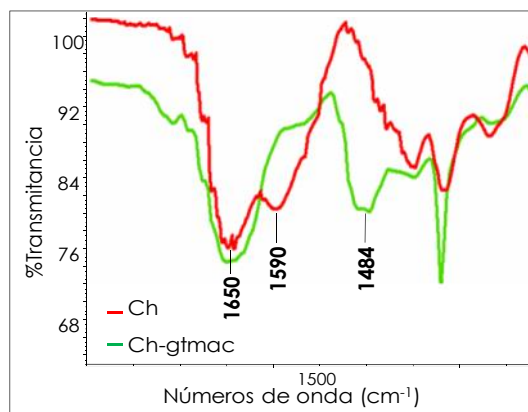


Figura 4.4. Región del espectro, entre 500 y 2000 cm⁻¹, FT-IR de Ch y Ch-gtmac.

El espectro FT-IR de Ch-gtmac presenta una disminución considerable en la intensidad relativa de la banda a 1590 cm⁻¹ correspondiente al grupo

amino, debido a la reacción del mismo con el epóxido del gtmac. Además, una nueva banda correspondiente a los grupos metilo de gtmac aparece a 1484 cm^{-1} , la cual corresponde a la deformación angular asimétrica de los grupos metilo del grupo amonio cuaternario.

En el espectro de RMN- ^1H (figura 4.5) de Ch-gtmac se observan las señales de todos los protones del anillo glucopiranosilo de Ch, localizados entre 3,3 y 4,6 ppm. Además, aparecen señales nuevas correspondientes al gtmac, siendo el pico a 3,1 ppm, característico de los grupos metilos del nitrógeno cuaternario y es la señal más evidente de la unión del gtmac al polímero.³⁶

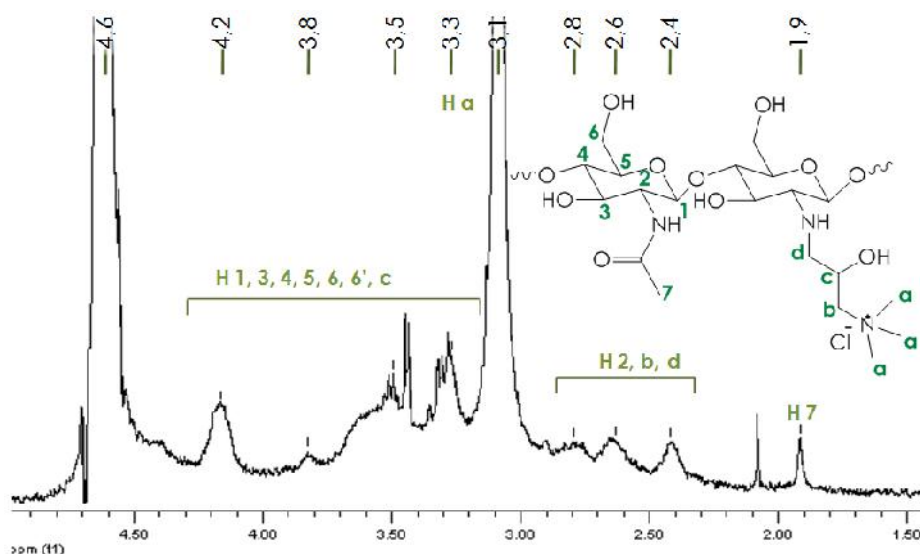


Figura 4.5. Espectro RMN- ^1H de Ch-gtmac.

La cantidad de grupos amino en Ch y Ch-gtmac, se determinó por titulación potenciométrica ácido-base. En la figura 4.6, se muestran las curvas de valoración de ambos polímeros, obteniéndose en cada caso dos puntos de inflexión, los cuales se determinaron a partir de la segunda derivada. La diferencia entre los dos puntos de inflexión en la curva de titulación corresponde a los moles de ácido necesarios para protonar los grupos amino de quitosano. Se observó claramente como disminuye la distancia entre los puntos de inflexión de Ch-gtmac respecto a Ch. Por lo tanto, se calculó el

porcentaje de modificación de Ch-gtmac empleando la diferencia en grupos amino entre Ch y Ch-gtmac, siendo el valor obtenido del 45%. Este porcentaje indica que en la cadena polimérica hay $1,99 \times 10^{-3}$ moles de moléculas de gtmac por gramo del polímero.

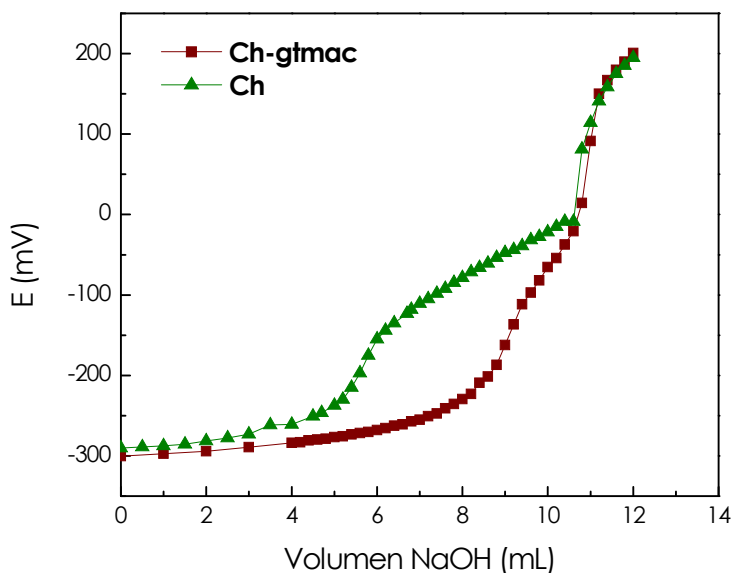


Figura 4.6. Curva de titulación de Ch y Ch-gtmac.

4.2.2. Obtención de polímeros dendronizados y gtmac

4.2.2.1. Ch-W y gtmac

Se planteó la unión de gtmac al polímero Ch-W en las mismas condiciones que la reacción descrita para Ch y gtmac. Sin embargo, en este caso no fue posible obtener el producto deseado. Por esta razón, se evaluó la unión de W al polímero Ch-gtmac (inciso 4.2.1), tampoco fue efectiva esta vía. Probablemente, estos resultados negativos se deban principalmente al alto grado de modificación del polímero con gtmac, lo cual restringe por impedimento estérico, la segunda etapa de modificación.

Se realizó nuevamente la reacción de Ch y gtmac, como se describió anteriormente en el punto 4.2.1, empleando una relación molar entre los grupos amino de Ch y grupos epóxido de gtmac igual a 1:0,6. De esta forma,

se obtuvo un polímero de menor grado de sustitución, como se puede observar en el espectro FT-IR (figura 4.7), por la disminución en la intensidad relativa de la banda a 1482 cm^{-1} , correspondiente a los grupos metilo del nitrógeno cuaternario. Sin embargo, este producto presento una solubilidad más limitada (estudios de voltametría cíclica descritos en el capítulo 5) y ya que el objetivo era obtener sistemas solubles no se prosiguió con su modificación con dendrones.

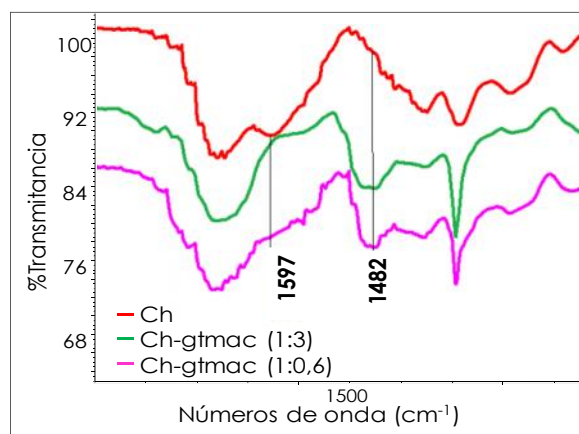


Figura 4.7. Región del espectro, entre 500 y 2000 cm^{-1} , de Ch, Ch-gtmac con una relación molar 1:3 y 1:0,6.

4.2.2.2. Ch-MA-AB-gtmac

Dadas las complicaciones encontradas en la obtención de Ch-W-gtmac, probablemente debido a la presencia de impedimento estérico, se procedió a la reacción entre el Ch-MA-AB y gtmac en las mismas condiciones que el inciso 4.2.1. En este caso, fue posible la introducción de los grupos amonio cuaternario a la cadena polimérica para obtener Ch-MAAB-gtmac (figura 4.8-A). En el espectro FT-IR del producto (figura 4.8-B) se observa la aparición del pico característico de los grupos metilo de gtmac a 1484 cm^{-1} , y una disminución en la intensidad relativa de la banda a 1590 cm^{-1} correspondiente al grupo amino, debido a la reacción del grupo amino del Ch con el epóxido de gtmac. En este caso, el éxito de la reacción se debe probablemente, a que el MA actúa como espaciador entre la cadena polimérica y el dendrón,

disminuyendo así el impedimento estérico como también el grado de dendronización del polímero. Esta modificación permitió obtener un sistema soluble (Ch-MA-AB-gtmac) en un intervalo de pH amplio.

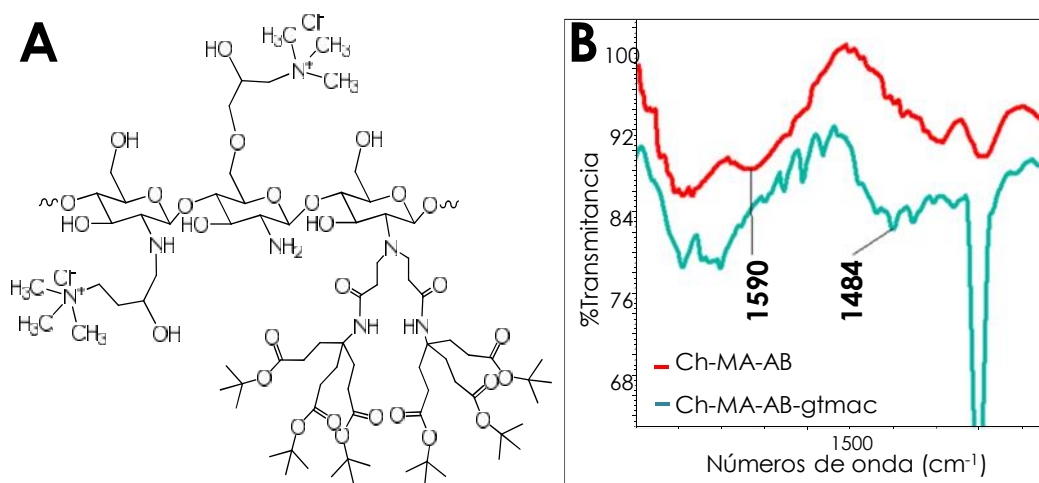


Figura 4.8. Ch-MA-AB-gtmac: estructura (A) y espectro FT-IR (B).

4.3. UNIÓN DE ÁCIDO FÓLICO

Los receptores folato son conocidos por ser sobre expresados en diferentes células cancerígenas de ovario, mama, colon, riñón, pulmón y cerebro.³⁷ Sin embargo, difícilmente se encuentren en la superficie de una célula normal.³⁸ Se conoce que la unión covalente de ácido fólico a través de su grupo carboxílico a un material empleado como *carrier*, conserva una alta afinidad de unión al receptor folato de la célula cancerígena, y no afecta a la captura celular del sistema derivatizado.³⁹ La presencia de receptores folato en tumores ha sido utilizada para la vectorización de fármacos anticancerígenos, genes, y radiofármacos vía endocitosis.^{40,41} Entre los materiales que se han empleado más comúnmente como *carrier* se encuentran los polímeros, como por ejemplo, poli(lisina)^{42,43} y polietilenimina.⁴⁴

En este contexto, y teniendo en cuenta la capacidad de los sistemas sintetizados para la interacción con fármacos (apartado 3, capítulo 6), se planteó la unión de ácido fólico a quitosano dendronizado. Este estudio preliminar, se realizó como un primer paso para obtener sistemas con potencial aplicación como *carrier* direccionado y específico hacia células tumorales. Se seleccionaron Ch-W y Ch-MA-AB para la unión de ácido fólico a la cadena polimérica.

El ácido fólico (F) se unió a las partículas por ataque nucleofílico del grupo amino de Ch al carbono electrofílico del grupo ácido de F activado. Esta activación de ácido fólico se realizó con clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) en medio ácido. De esta forma, se obtuvieron las partículas Ch-W-F y Ch-MA-AB-F, las cuales adquirieron una coloración amarilla debido los anillos aromáticos de ácido fólico. La figura 4.9 muestra esquema de formación de Ch-W-F, siendo semejante para la obtención de Ch-MA-AB-F

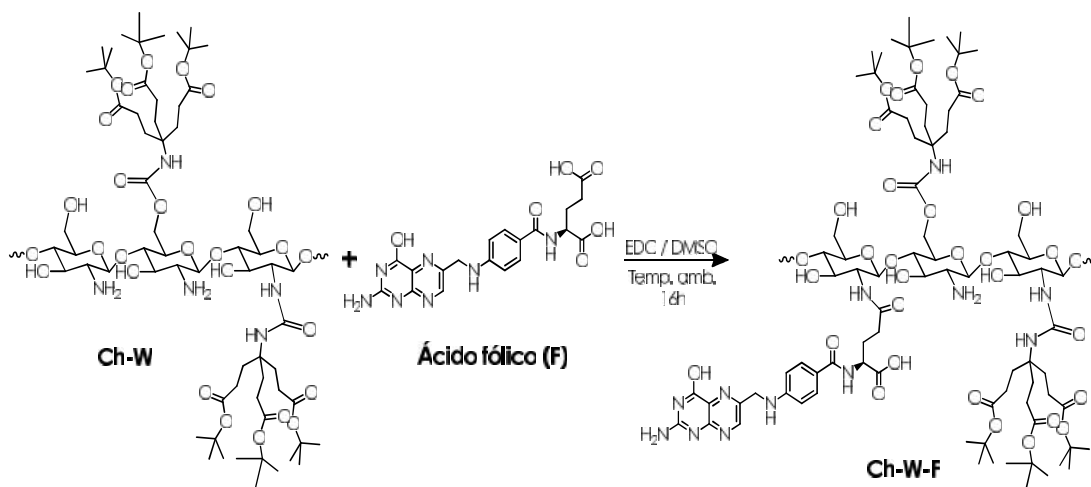


Figura 4.9. Esquema de reacción de Ch-W con ácido fólico (F).

Por espectroscopia FT-IR se corroboró la formación de los productos Ch-W-F y Ch-MA-AB-F (figura 4.10). Se observó la banda a 1715 ó 1712 cm^{-1} correspondiente a la vibración de estiramiento del enlace C=O del grupo ácido libre de F. Además, se asignaron las bandas a 1450 y 1612 cm^{-1}

correspondientes a la vibración de estiramiento de los enlaces C=C del anillo aromático.^{33,37}

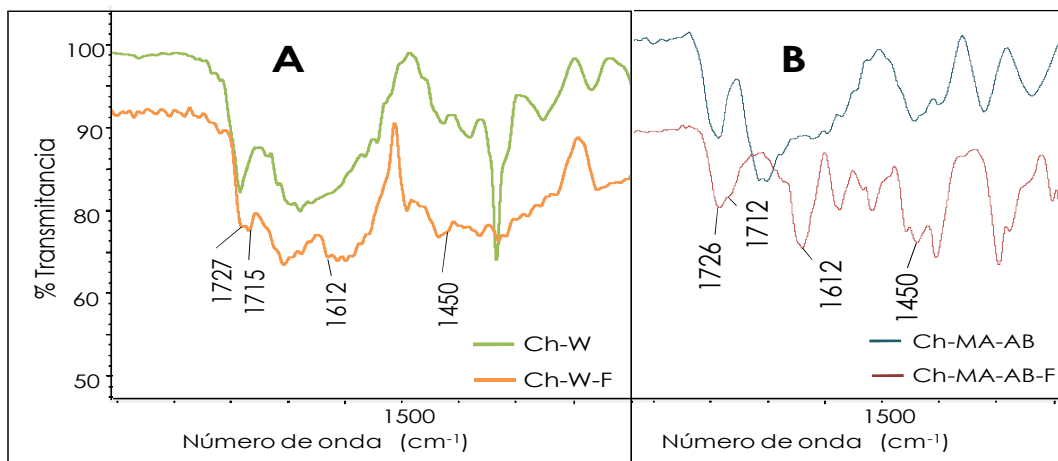


Figura 5.10. Espectro IR de Ch-W-F (A) y Ch-MA-AB-F (B).

A partir de estos ensayos, es posible decir que la reacción de ácido fólico con el polímero dendronizado es efectiva, lo cual es un resultado prometedor considerando las potenciales aplicaciones de los sistemas resultantes, en particular, como transporte direccionado de fármacos.

Capítulo 5

COMPORTAMIENTO ELECTROQUÍMICO



Un sistema muy utilizado en electroquímica es la interfaz formada por dos soluciones electrolíticas no miscibles (ITIES), la cual ha atraído el interés de numerosos estudios debido a la diversidad de aplicaciones.⁴⁵ Los métodos electroquímicos aplicados a estas interfaces, demostraron ser una herramienta útil para determinar coeficientes de partición de moléculas ionizadas.⁴⁶⁻⁴⁸ Esta

metodología permite el control del potencial interfacial y, de este modo, la distribución de iones en ambas fases.

En los últimos años, se comenzó con el estudio de macromoléculas, por ejemplo dendrímeros, polímeros, polímeros hiperramificados, etc., utilizando metodologías electroquímicas aplicadas a ITIES. Entre ellos, se pueden citar estudios electroquímicos de moléculas dendríticas con el objetivo de analizar las propiedades ácido-base, el carácter hidrofílico/hidrofóbico y el comportamiento interfacial de estas estructuras.⁴⁹⁻⁵¹ Además, se estudiaron polímeros catiónicos tanto en lo que respecta a su interacción con distintas moléculas,⁵² como a su comportamiento interfacial en la interfaz líquido/líquido.⁵²⁻⁵⁵ También se investigó la adsorción de biopolímeros incluyendo al polisacárido heparina,⁵⁶⁻⁵⁹ insulina,⁶⁰ hemoglobina,^{61,62} mioglobina,⁶³ otras proteínas,^{59,64} citocromo C y ribonucleasa,⁶⁵ ADN y complejos de ADN.⁶⁶⁻⁶⁸ Se utilizó además, esta herramienta para caracterizar la interacción entre ácido húmico (polielectrolito aniónico) y herbicidas.⁶⁹

Por otro lado, las propiedades que afectan la permeación de fármacos a través de las membranas biológicas son: lipofilicidad, carga, tamaño y capacidad de formar interacciones puente hidrógeno. De todas ellas, la más estudiada es la lipofilicidad, la cual es ampliamente usada para evaluar la actividad de los fármacos, así como también su interacción con dispositivos de liberación controlada.^{70,71}

Los fármacos pueden interactuar físicamente con polímeros dendronizados, a través del encapsulamiento en los espacios vacíos (contenedores a nanoescala) o asociados a los grupos funcionales superficiales o a una mezcla de ambas interacciones.^{11,72} El tipo de interacciones pueden ser por puente hidrógeno, Van der Waals y/o atracción electrostática. Se ha estudiado la asociación de diferentes fármacos a estructuras dendríticas, como por ejemplo drogas anticancerígenas, antiinflamatorios, antimicrobianos, entre otras, con el objeto de dilucidar el tipo de interacción entre ambas estructuras.^{73,74}

En este contexto, se empleó el estudio de la transferencia de polímeros dendronizados a través de la interfaz agua/1,2- dicloroetano, para evaluar los

cambios en las propiedades fisicoquímicas, como solubilidad, hidrofobicidad, etc., con respecto al quitosano. Además, se estudió cómo interactúan los mismos con fármacos modelos, ibuprofeno y clorhidrato de propranolol. Los resultados obtenidos de los diferentes estudios electroquímicos se encuentran ordenados en tres grupos: quitosano y W (inciso 5.1), quitosano y gtmac (inciso 5.2), e interacción de polímeros con fármacos (inciso 5.3). Se estudió la transferencia de estos polímeros, variando condiciones experimentales como pH, velocidad de barrido, concentración de polímero, potencial de corte, tiempo de pulso, entre otras.

5.1. QUITOSANO y W

Se seleccionaron los sistemas Ch, Ch-W y Ch-Wh, estos últimos descritos en los incisos 3.1 y 4.1, respectivamente. Los sistemas fueron seleccionados con el objetivo de evaluar el efecto de la estructura dendrítica en el comportamiento electroquímico del polímero y la influencia de la naturaleza química de los grupos periféricos del dendrón (grupos éster y ácido de W y Wh, respectivamente).

5.1.1. Quitosano (Ch)

Se realizaron estudios con quitosano, empleando una solución al 0,4% P/V en fase acuosa, a diferentes valores de pH (entre 1,2 y 5,3) y variando la velocidad de barrido (α 10, 25, 50, 75, 100, 150 y 200 mVs^{-1}).

En la figura 6.1, en presencia de Ch (α pH 1,2; 3,6 y 4,8) sólo se observa el cargado de la doble capa eléctrica y la transferencia de iones del electrolito soporte a potenciales extremos (descritos en el inciso 2.5), lo mismo acontece en todas las condiciones experimentales.

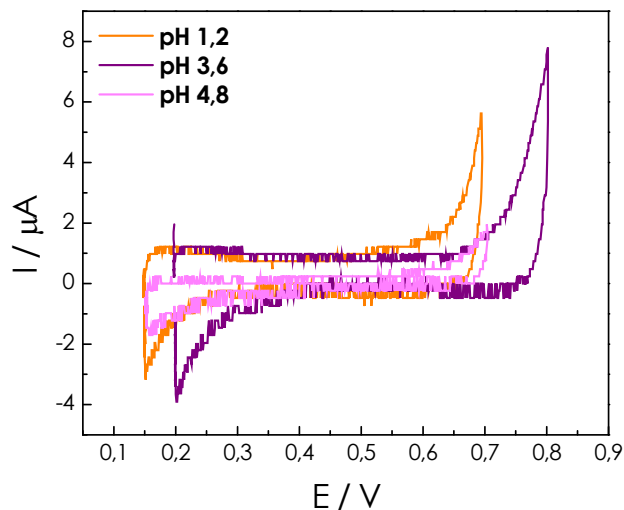


Figura 5.1. Perfiles i/E correspondientes a los electrolitos base en presencia de Ch. Fase acuosa: $\text{LiCl } 1 \times 10^{-2} \text{ M} + \text{Ch } 0,4\% \text{ P/V}$, pH 1,2; 3,6 y 4,8. Fase orgánica: $1 \times 10^{-2} \text{ M}$ tetraclorofenilborato de tetrapentilamonio (TPATCIPhB). $\nu = 0,050 \text{ Vs}^{-1}$.

5.1.2. Ch-W

5.1.2.1. Comportamiento electroquímico. ITIES

En el caso de Ch-W, se estudió la respuesta voltamétrica de una solución al 0,40% P/V del polímero. Debido a la solubilidad del mismo, se trabajó a pH 1,2 y 3,6. En el voltograma de Ch-W (figura 5.2), se observa que este polímero no presenta una transferencia, sin embargo, a diferencia de Ch muestra un aumento significativo de la corriente capacitiva en toda la ventana de trabajo. Este comportamiento de Ch-W se asocia a una acumulación de cargas en la interfaz. Una de las razones de esto, es la organización del polímero en la interfaz, orientando los dendrones hacia la fase orgánica y la cadena de Ch cargada positivamente hacia la interfaz acuosa, debido a la naturaleza química hidrofóbica e hidrofílica de la estructura.

5.1.2.2. Comportamiento interfaz agua/aire. Balanza de Langmuir

Con el objetivo de analizar el comportamiento interfacial de Ch-W, se realizaron isotermas de adsorción en la interfaz agua/aire, utilizando una solución $\text{LiCl } 1 \times 10^{-2} \text{ M}$ como subfase, manteniendo las mismas condiciones empleadas en los experimentos electroquímicos en la interfaz líquido/líquido.

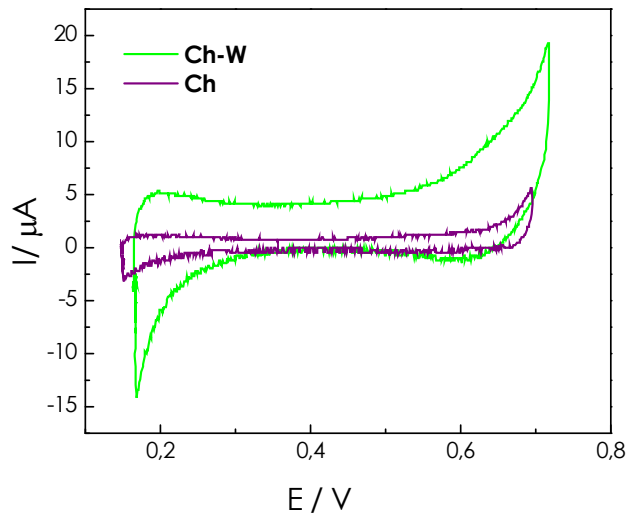


Figura 5.2. Perfiles i/E correspondientes a los electrolitos base en presencia de Ch y Ch-W. Fase acuosa: $\text{LiCl } 1 \times 10^{-2} \text{ M}$ + polímero 0,4% P/V, pH 1,2. Fase orgánica: $1 \times 10^{-2} \text{ M TPATCIPhB}$. $\nu = 0,050 \text{ Vs}^{-1}$.

En la figura 5.3 se muestra la isoterma de presión/área molecular del polímero Ch-W. Como se puede observar, se define claramente una isoterma de adsorción, alcanzando una presión máxima de 52 mNm^{-1} aproximadamente.

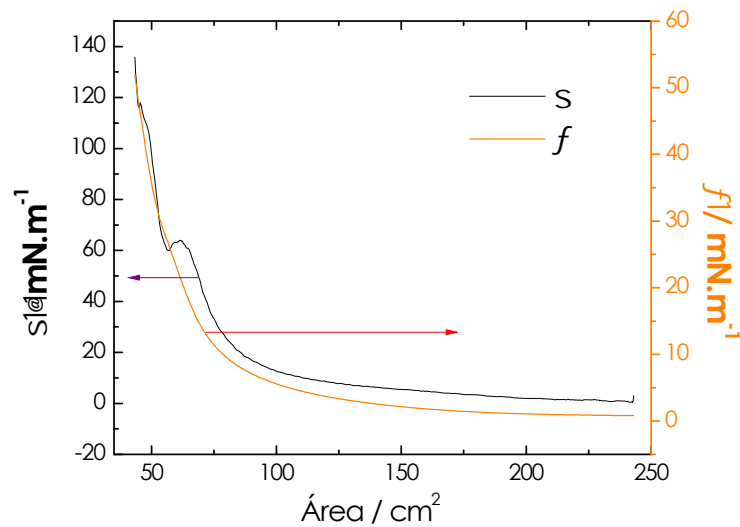


Figura 5.3. Isotherma tensión/área molecular de Ch-W (π) en una interfaz agua aire. Composición de la subfase: $\text{LiCl } 1 \times 10^{-2} \text{ M}$, pH 1,2. β es la derivada primera de la isoterma π .

En la curva β , se observa un cambio en la pendiente a un valor de 60 mNm^{-1} , esto se debe a que cambia la interacción del polímero con la subfase. Teniendo en cuenta las características estructurales de los polímeros dendronizados, se puede plantear una reorganización interfacial, produciéndose una disminución del área molecular debido a que disminuye la interacción del polímero con la subfase acuosa. En este caso, los dendrones se organizan en la fase aire debido a su alta hidrofobicidad y, en consecuencia, disminuye el área del polímero. El comportamiento en la interfaz agua/aire corrobora lo observado electroquímicamente, el aumento de la corriente capacitiva se debe a la acumulación del polímero en la interfaz fase acuosa/fase orgánica. Se puede concluir que la formación de pares iónicos en la interfaz, dada por el anión de la fase orgánica y los grupos amino cargados positivamente en el esqueleto polimérico Ch, son los responsables de la acumulación de cargas, lo cual está favorecido porque los grupos dendríticos del polímero se organizan hacia la fase orgánica, debido a la alta hidrofobicidad que presentan, estabilizando la adsorción interfacial del polímero.

5.1.3. Ch-Wh

En la figura 5.4 se presenta la respuesta voltamétrica de Ch-Wh comparada con la de Ch. Para Ch-Wh, se observa un comportamiento diferente a Ch, presentando un pico de transferencia a $0,289 \text{ V}$ [proceso p(+)] durante el barrido positivo y, un pico a $0,230 \text{ V}$ [proceso p(-)] en el barrido inverso.

En este caso, el proceso se debe a la transferencia de polímero desde la fase acuosa a la fase orgánica en el barrido directo [proceso p(+)], y el retorno de éste a la fase acuosa en el barrido inverso [proceso p(-)]. En consecuencia, se podría decir que cambia la hidrofobicidad del polímero, permitiendo que se observe el proceso de transferencia del mismo dentro de la ventana de trabajo. Ch-Wh posee grupos ácido y éster (la hidrólisis de AB fue parcial) en la periferia de los dendrones, y menor cantidad de grupos amino en la cadena polimérica de Ch; por lo tanto, estos cambios son responsables del balance hidrofílico/hidrofóbico del polímero dendronizado.

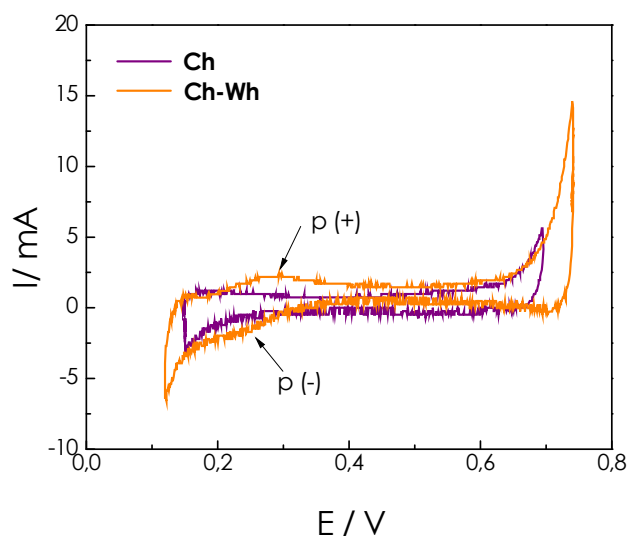


Figura 5.4. Perfiles i/E correspondientes a los electrolitos base en presencia de Ch (-) y Ch-Wh (-). Fase acuosa: $\text{LiCl } 1 \times 10^{-2} \text{ M}$ + polímero 0,4% P/V, pH 1,2. Fase orgánica: $1 \times 10^{-2} \text{ M TPATCIPhB}$. $\nu = 0,050 \text{ Vs}^{-1}$.

5.1.3.1. Efecto del pH

En la Figura 5.5 se muestran los voltagramas correspondientes a la transferencia de Ch-Wh a diferentes valores de pH (1,8, 4,8 y 6,8). A medida que cambia el pH de la solución, se observa una variación en el potencial de pico de transferencia, lo cual puede deberse a cambios en la carga superficial del polímero dendronizado (Ch-Wh).

Como se describió en el inciso anterior, la estructura del polímero presenta grupos amino libres de la cadena de Ch y grupos ácido de la periferia del dendrón W. Por ende, se pueden presentar tres situaciones teniendo en cuenta estos grupos ionizables. A valores de pH muy ácidos (pH 1,2), sólo se encuentran cargados los grupos amino libres ($-\text{NH}_3^+$). Por el contrario, a pH 6,8 predominan los grupos ácido ionizados ($-\text{COO}^-$), otorgándole carga negativa a la estructura. Sin embargo, a un pH intermedio la macromolécula puede tener cargados ambos grupos funcionales ($-\text{NH}_3^+$ y $-\text{COO}^-$). A medida que cambia la carga del polímero, varía la energía necesaria para que ocurra la transferencia, lo cual se refleja en el cambio del potencial de pico. Es importante mencionar que, el aumento en el potencial de pico (barrido directo) representa un aumento en la hidrofiliicidad de la molécula, ya que se necesita mayor energía para que el catión se transfiera de la fase acuosa a la orgánica (inciso 2.5).

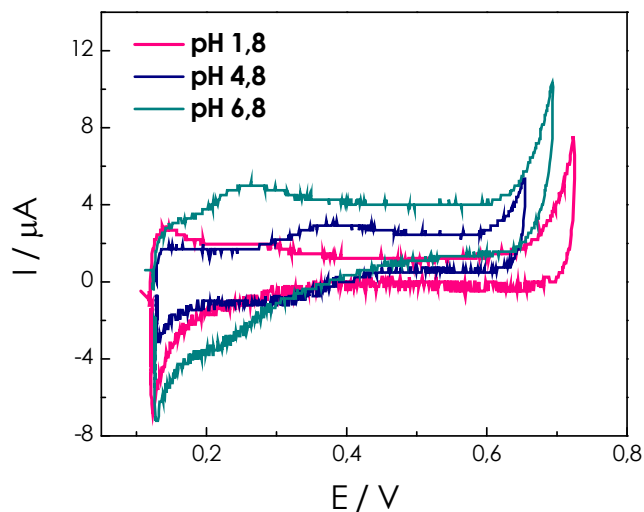


Figura 5.5. Voltagramas obtenidos para la transferencia de Ch-Wh a través de la interfaz agua/1,2 DCE, pH 1,8, 4,8 ó 6,8. Fase acuosa: Ch-Wh 0,40% + LiCl 1×10^{-2} M. Fase orgánica: TPATCIPhB 1×10^{-2} M. ν : 0,050 V/s.

5.1.3.2. Efecto de la velocidad de barrido

La corriente de pico (I_p) es proporcional a la velocidad de barrido, por lo tanto, a medida que aumenta la velocidad aumenta I_p , tanto en el barrido directo como en el barrido inverso. Esto se observó a todos los valores de pH estudiados. En la figura 5.6 se muestran los voltagramas a pH 6,8 correspondiente a Ch-Wh 0,40% P/V a diferentes velocidades de barrido.

En la figura 5.7-A se muestra la relación lineal entre la intensidad de pico (proceso p(+)) y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido. Este comportamiento se corresponde con un proceso de transferencia controlado por la difusión del polímero desde el seno de la solución a la interfaz, lo cual se observa a todos los valores de pH analizados. Además, el potencial del pico no varía con la velocidad de barrido a los distintos pH estudiados (figura 5.7-B), indicando que se trata de un proceso de transferencia reversible.

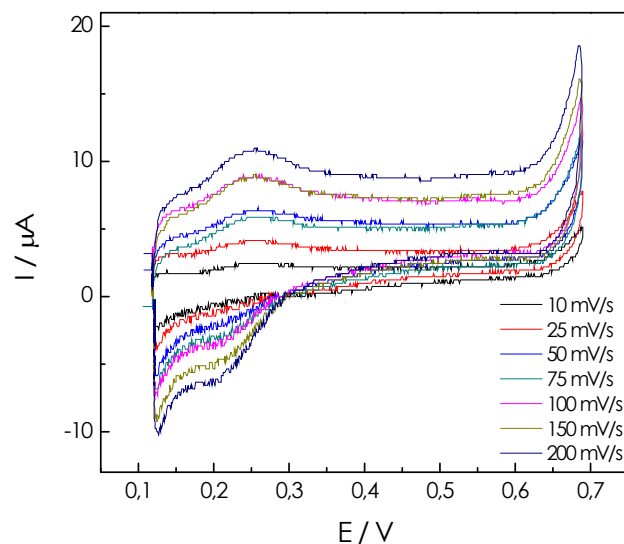


Figura 5.6. Voltagramas obtenidos para la transferencia de Ch-Wh a través de la interfaz agua/1,2 DCE a diferentes velocidades de barrido. Fase acuosa: Ch-Wh 0,4% + LiCl 1×10^{-2} M, pH 6,8. Fase orgánica: TPATCIPhB 1×10^{-2} M.

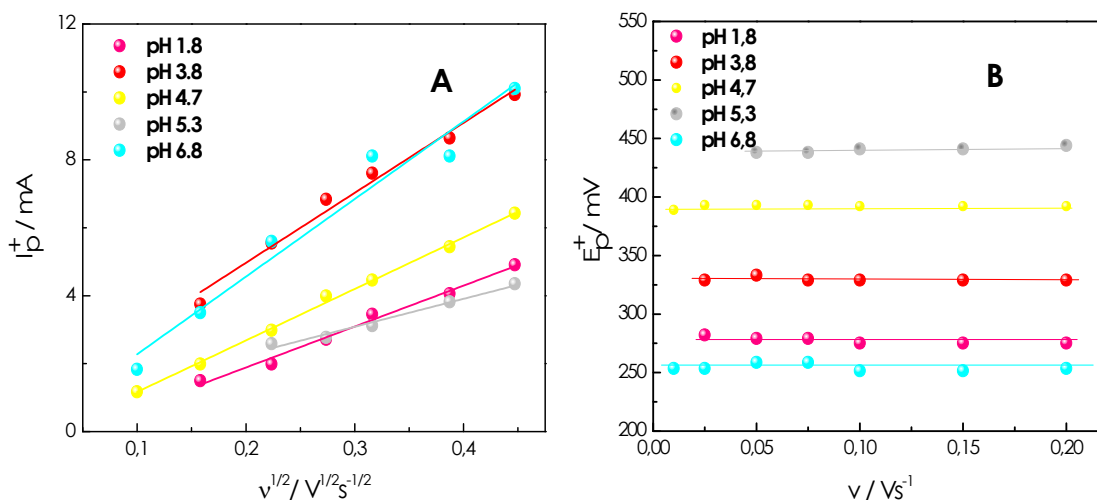


Figura 5.7. Valores de corriente de pico positivo vs la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (A), y valores de potencial de pico vs velocidad de barrido (B); obtenidos de los voltagramas de la transferencia de Ch-Wh a través de la interfaz agua/1,2 DCE a diferentes valores de pH. Fase acuosa: Ch-Wh 0,4% + LiCl 1×10^{-2} M. Fase orgánica: TPATCIPhB 1×10^{-2} M.

En la figura 5.8 se muestra la variación de I_p^+ con el pH. Como se observa en el mismo, disminuye la intensidad de la corriente a medida que aumenta el pH hasta un valor de 5,3. La intensidad de corriente de pico depende de la concentración de especies cargadas que se transfieren de la interfaz. Esta carga disminuye debido a la desprotonación de los grupos amino cargados en la estructura del polímero. Mientras que a pH 6,8, aumenta debido a la ionización de los grupos ácido. Es importante destacar que, el pKa de los grupos amino de Ch se encuentra en el intervalo de valores de pH donde se produce este cambio. Como se mencionó anteriormente, se corrobora que la intensidad de la corriente de pico (I_p) aumenta con la velocidad de barrido.

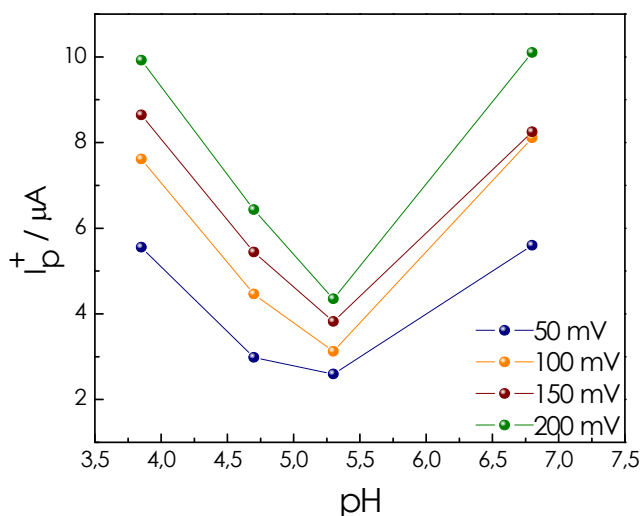


Figura 5.8. Valores de corriente de pico positivo vs pH, obtenidos de los voltogramas de la transferencia de Ch-Wh 0,4% P/V a través de la interfaz agua/1,2 DCE. Fase orgánica: TPATCIPhB $1 \times 10^{-2} M$.

Mediante el estudio del comportamiento electroquímico de los polímeros, Ch-W y Ch-Wh, se determinó el cambio en el balance hidrofóbico-hidrofílico en la estructura respecto al polímero original. Cabe destacar que, Ch un polímero muy hidrofílico, que no presenta procesos de transferencia dentro de la ventana de trabajo. El polímero Ch-W, menos hidrofílico, modifica la carga interfacial aumentando la corriente capacitiva debido a la adsorción del mismo en la interfaz líquido/líquido. En tanto, Ch-Wh al presentar grupos

ionizables en el dendrón, se transfiere hacia la fase orgánica a través de un proceso reversible controlado por difusión.

5.2. QUITOSANO y gtmac

Se estudió los comportamientos electroquímicos de los polímeros Ch-gtmac, sintetizados con relación molar 1:3 y 1:0,6 de grupos amino del Ch a grupos epóxidos de gtmac, descritos en los incisos 4.2.1 y 4.2.2.1, respectivamente. Además, se realizaron algunos estudios con Ch-MA-AB-gtmac, cuya síntesis se describió en el punto 4.2.2.2.

5.2.1- Ch-gtmac (1:3)

El comportamiento voltamétrico del Ch-gtmac resultó muy diferente al del polímero original.

5.2.1.1. Efecto de la concentración del polímero en fase acuosa

En la figura 5.9, se compara la respuesta voltamétrica de Ch-gtmac a varias concentraciones y pH 7,2. Se observó que los potenciales de pico (E_p), tanto en el barrido directo como en el inverso, cambian con la concentración del polímero. Este comportamiento resulta de diferentes procesos de transferencia y absorción en la región interfacial.

Durante el barrido positivo, se observa la transferencia del polímero a la fase orgánica, donde interacciona con el anión del electrolito soporte presente en la misma. Esta interacción favorece el proceso de transferencia y depende de la concentración de polímero presente en fase acuosa. Riva y col. estudiaron la respuesta voltamétrica de *polyquaternium 4*,⁷⁵ polímeros con grupos amino cuaternario, observando un comportamiento semejante.

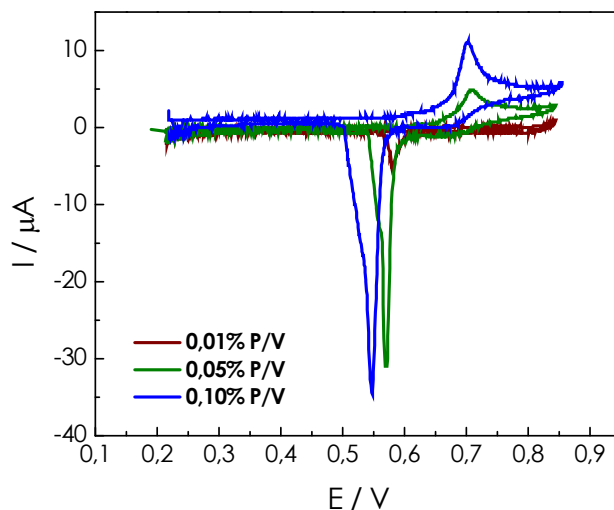


Figura 5.9. Voltagramas obtenidos para la transferencia de Ch-gtmac a través de la interfaz agua/1,2 DCE. Fase acuosa: polímero + LiCl 1×10^{-2} M, pH 7,2. Fase orgánica: TPATCIPhB 1×10^{-2} M. ν : 0,025 V/s.

Con respecto al proceso en el barrido inverso, se observa un pico agudo correspondiente a un proceso de desorción del polímero, desde la fase orgánica a la fase acuosa. Además, los cambios en el E_p^- se asocian a procesos de desorción que requieren diferente energía, debido a las distintas conformaciones que puede adoptar el polímero en la interfaz a una determinada concentración.

5.2.1.2. Efecto de la naturaleza del electrolito soporte

Cambiando la naturaleza del electrolito soporte de la fase orgánica se observan respuestas diferentes, como se muestra en la figura 5.10. En este caso se compara la transferencia de Ch-gtmac 0,05% P/V utilizando dos electrolitos soportes: dicarbonilcobaltato de tetrafenilarsonio (TPhAsDCC) y tetraclorofenilborato de tetrapentilamonio (TPATCIPhB). Los aniones de estas sales se representaron como DCC^- y $TCIPhB^-$, respectivamente.

Tanto los picos obtenidos en el barrido directo como en el inverso, muestran una dependencia con la naturaleza del anión del electrolito soporte de la fase orgánica. La diferencia observada en los voltagramas obtenidos se

debe a la interacción entre el polímero y el anión de la fase orgánica. De acuerdo a las respuestas voltamétricas, se determina la formación de pares iónicos entre el anión y el polímero.

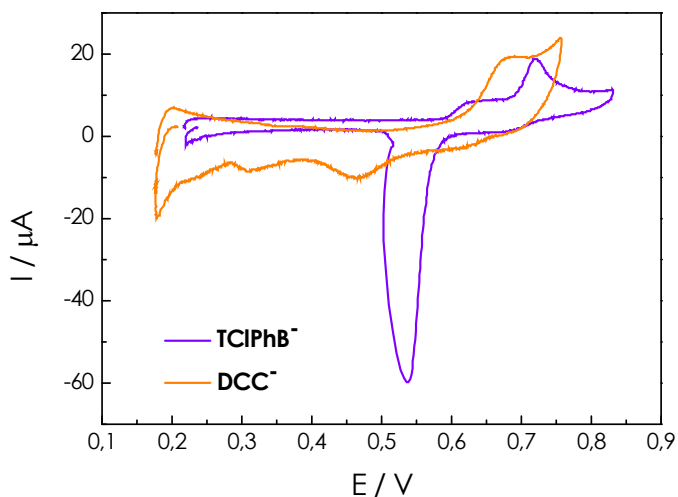


Figura 5.10. Voltagramas obtenidos para la transferencia de Ch-gtmac a través de la interfaz agua/1,2 DCE. Fase acuosa: Ch-gtmac 0,05% + LiCl 1×10^{-2} M, pH 5,3. Fase orgánica: TPATCIPhB 1×10^{-2} M ó TPhAsDCC 1×10^{-2} M. ν : 0,050 V/s.

Diferentes autores han concluido que polímeros catiónicos en interfaces líquido/líquido interaccionan con el electrolito soporte de la fase orgánica y, esta interacción se ve afectada por la naturaleza hidrofóbica del anión.

El barrido inverso del potencial de TCIPhB⁻, en la figura 5.10, presenta un pico más agudo que el correspondiente para DCC⁻. Esto indica que el proceso de desorción en el primer caso es mucho más rápido, debido a una baja estabilidad del par iónico, formado por el anión y los grupos amino ionizados del polímero en el lado orgánico de la interfaz.

5.2.1.3. Efecto del pH

El polímero Ch-gtmac presenta los grupos amino primarios ionizables sobre la cadena del quitosano y los grupos amino cuaternarias en gtmac, con carga permanente. Por esta razón, la carga total del polímero depende del pH de la fase acuosa. Con el objetivo de estudiar el efecto del pH en la

respuesta electroquímica se realizaron experimentos variando los valores de pH entre 2,3 y 10,2 y la concentración del polímero en la fase acuosa.

A modo de resumen se muestra en la figura 5.11 el perfil voltamétrico del polímero Ch-gtmac 0,02% P/V a diferentes valores de pH.

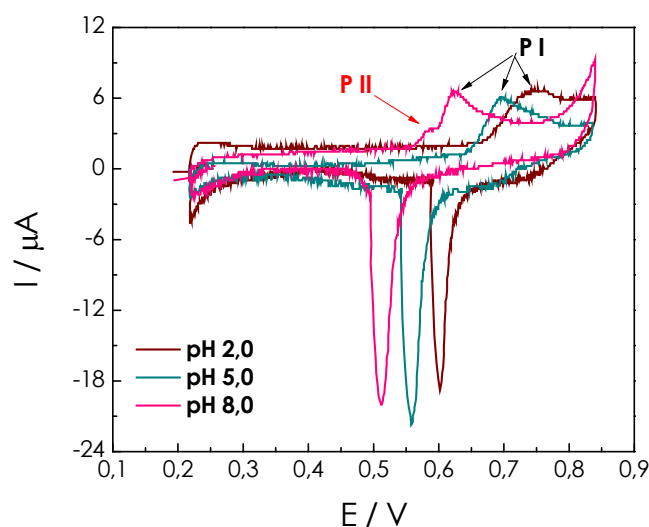


Figura 5.11. Voltagramas obtenidos para la transferencia de Ch-gtmac 0,02% a través de la interfaz agua/1,2 DCE, a diferentes valores de pH. Fase orgánica: TPATCIPhB $1 \times 10^{-2} M$. v : 0,050 V/s. P I y P II corresponden a los procesos de transferencia I y II, respectivamente.

De los perfiles voltamétricos obtenidos, se diferencian dos procesos. A medida que aumenta el pH, se observa un corrimiento del pico positivo (P I) a valores de potencial menores. Este comportamiento se debe al cambio en la carga del polímero, el cual se vuelve más hidrofóbico a medida que aumenta el pH por la desprotonación del grupo $-NH_3^+$ y, por lo tanto, se necesita menos energía para transferirlo a la fase orgánica. Por otro lado, se observa la aparición de un segundo pico (P II) a potenciales menores cuando el pH aumenta. Esta transferencia se corresponde con un proceso diferente al P I.

Para caracterizar ambos procesos, se realizó el análisis de la variación de I_p^+ con la velocidad de barrido. Para el proceso I, el cual ocurre a todos los valores de pH, se observa una dependencia lineal de I_p^+ con $v^{1/2}$ (figura 5.12-

A) correspondiente a procesos controlados por difusión. Mientras que, el segundo pico de corriente (P II) depende linealmente con la velocidad de barrido (figura 5.12-B), correspondiente con procesos de adsorción interfacial. Por lo tanto, los polímeros ionizados presentan procesos mixtos de transferencia en el barrido directo, donde ocurre la transferencia del polímero disuelto en la fase acuosa, a la fase orgánica (P I) y la adsorción en la interfaz acuosa (P II).

En cuanto al proceso inverso, como ya se mencionó, corresponde al proceso de desorción desde la fase orgánica a la acuosa, que ocurre en una sola etapa. La energía involucrada en la desorción también depende de la carga del polímero y de la concentración. Al aumentar el pH, se observa el corrimiento de E_p^- a valores menores, indicando que se requiere más energía para que retorne a la fase acuosa, debido al carácter más hidrofóbico del polímero. A mayores valores de concentración del polímero de 0,05% P/V, el segundo proceso de transferencia P II, aparece a valores de pH menores de 8,0.

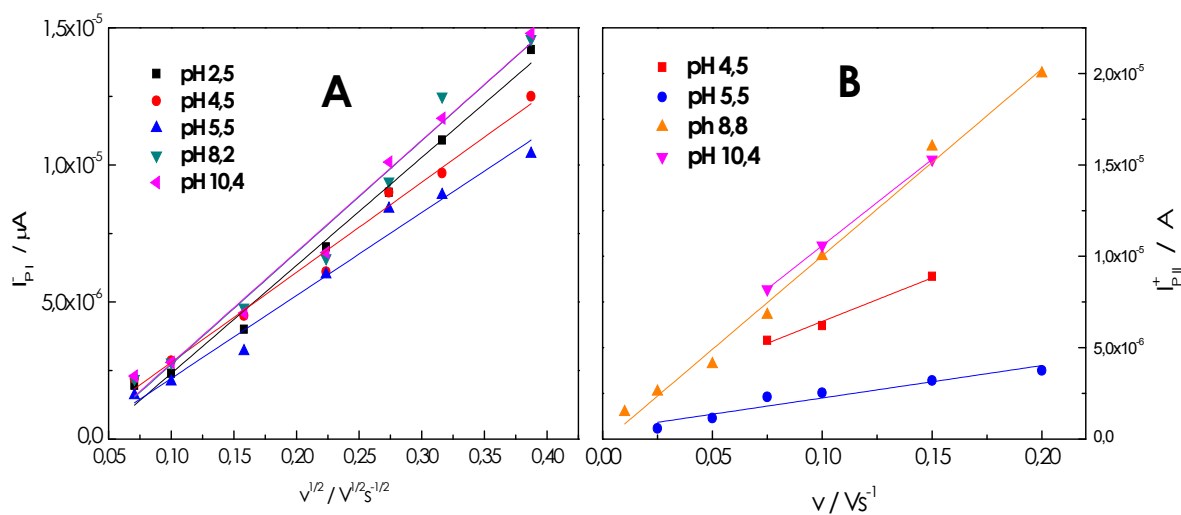
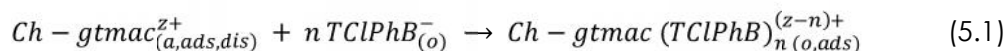


Figura 5.12. Valores de corriente de: P I vs la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (A), y P II vs la velocidad de barrido (B); obtenidos de los voltogramas de la transferencia de Ch-Wh a través de la interfaz agua/1,2 DCE a diferentes valores de pH. Fase acuosa: Ch-Wh 0,4% + LiCl 1×10^{-2} M. Fase orgánica:

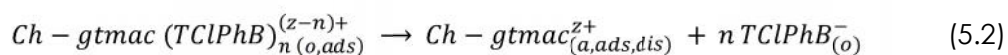
TPATCIPhB 1×10^{-2} M

De estos resultados, se puede decir que la transferencia de Ch-gtmac es un proceso mixto complejo, que presenta procesos de difusión y de adsorción interfacial, y dependen tanto de la concentración del polímero como del pH del sistema.

En resumen, los resultados descriptos permiten postular las siguientes reacciones durante el barrido directo:



Y durante el barrido inverso:



donde z es en número de cargas positivas de la cadena polimérica, n el número de moles del anión del electrolito soporte, y (z-n) un valor distinto de cero.

5.2.1.4. Efecto del potencial de corte

En la figura 5.13 se muestran los perfiles corriente vs potencial de pico (i/E) resultantes de invertir el barrido a potenciales de corte (E_λ), cada vez más positivos. Se evidenció que a medida que aumenta el potencial de corte positivo de la ventana de trabajo, aumenta la corriente del pico negativo correspondiente a la desorción del complejo interfacial, formado por el polímero y el anión de la fase orgánica, hasta alcanzar un valor constante cuando el potencial positivo de la ventana es igual o mayor a 0,800 V. Esto se puede asociar con la saturación de la interfaz.

5.2.1.5. Efecto de los pulsos de potencial, variación del tiempo

Se realizaron experimentos variando el tiempo de pulso ($\Delta\tau$) de acuerdo al perfil de potencial que se observa en la figura 5.14-B, con el objetivo de analizar en detalle el proceso de desorción, del barrido inverso.

En la figura 5.14-A, se muestran los perfiles voltamétricos obtenidos para el polímero Ch-gtmac (0,02%), a pH 4. A medida que aumenta el tiempo de pulso de potencial, aumenta la corriente de pico negativo, la cual

corresponde a la desorción del complejo formado en la interfaz durante dicho pulso.

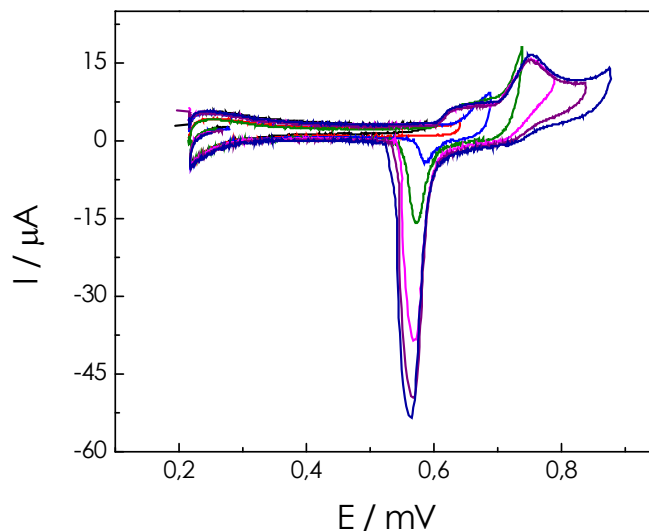


Figura 5.13. Voltagramas obtenidos para la transferencia de Ch-gtmac 0,05% P/V a través de la interfaz agua/1,2 DCE, a diferentes potenciales de corte, a pH 6,5. Fase orgánica: TPATCIPhB 1×10^{-2} M. v : 0,050 V/s.

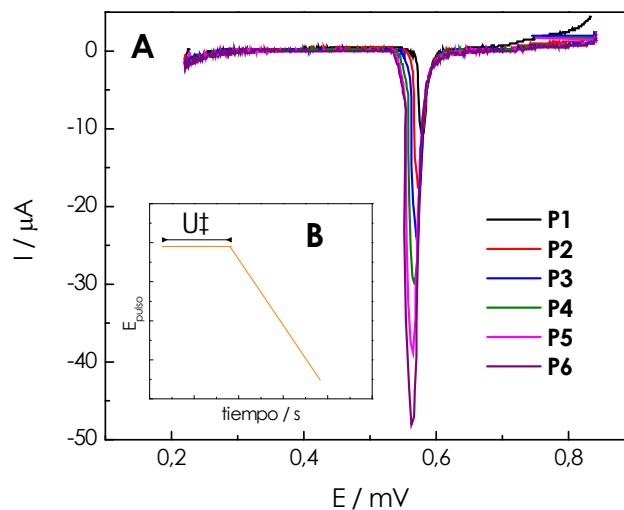


Figura 5.14. Voltagramas obtenidos para la transferencia de Ch-gtmac 0,02% P/V a través de la interfaz agua/1,2 DCE, a diferentes tiempo de pulso y pH 4,0. Fase orgánica: TPATCIPhB 1×10^{-2} M. v : 0,010 V/s (A). Perfil de potencial vs tiempo aplicando un potencial de 0,850 V (B). $\Delta\tau$ = P1: 0s; P2: 10 s, P3: 30 s, P4: 50 s, P5: 75 s, P6: 120 s.

A medida que el pulso es más largo, mayor es la cantidad de polímero que se adsorbe en la interfaz. Este comportamiento se observó a todos los pH y a todas las concentraciones de polímeros estudiados.

Para poder caracterizar el proceso de desorción, se analizó I_p^- y E_p^- con la velocidad de barrido (v), figura 5.15-A y B, respectivamente. Como se muestra en el gráfico, existe una dependencia lineal de I_p^- con v , lo cual confirma que se trata de un proceso de desorción interfacial. Con respecto a E_p^- , se observa que el valor se mantiene prácticamente constante en todo el intervalo de velocidades analizadas y a todos los tiempos de pulso registrados. Este comportamiento nos indica que se trata de un proceso de adsorción, en el cual no hay interacciones laterales entre los adsorbatos.

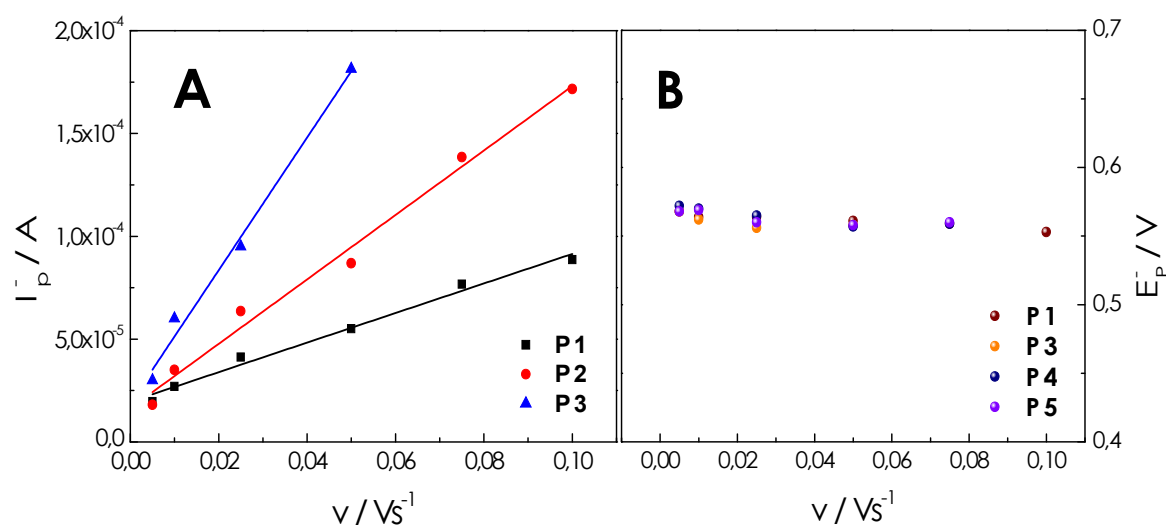


Figura 5.15. Valores de corriente de pico negativo (A) y valores de potencial de pico negativo vs velocidad de barrido (B); obtenidos para la transferencia de Ch-gtmac 0,02% P/V a través de la interfaz agua/1,2 DCE, a diferentes Δt y pH 4,0. Fase orgánica: TPATCIPhB $1 \times 10^{-2} M$.

A partir de estos resultados, se calcularon los valores de carga para el proceso de desorción (Q), luego de mantener el sistema a 0,850 V un determinado tiempo, a los diferentes valores de pH estudiados (figura 5.16.)

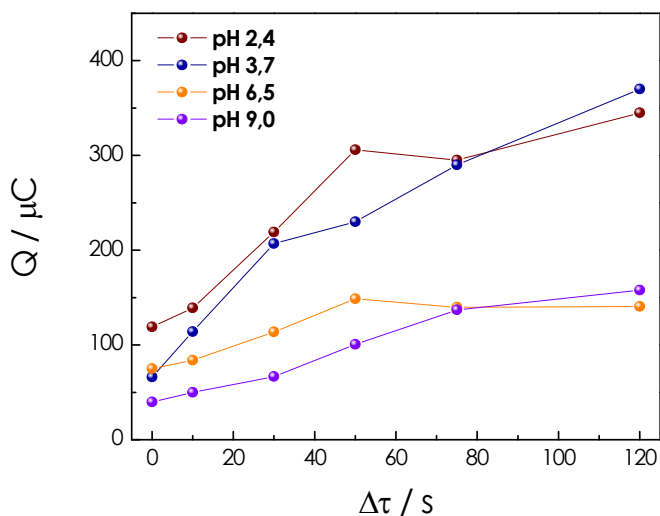


Figura 5.16. Valores de carga del pico negativo vs tiempo de pulso; obtenidos para la transferencia de Ch-gtmac 0,02% P/V a través de la interfaz agua/1,2 DCE a diferentes valores de pH. Fase orgánica: TPATCIPhB $1 \times 10^{-2} M$.

Donde Q se obtiene a partir de la integración del pico de corriente en función del tiempo. A valores de pH mayores a 5,3, se alcanza un *plateau* debido a la saturación de la interfaz, lo cual corresponde a una carga de 150 μC (micro Coulomb). Como se discutió anteriormente, a pH mayores de ese valor las únicas cargas del polímero se deben al grupo amino cuaternario de gtmac. Por el contrario, a valores de pH menores se alcanza esa saturación con valores de cargas mayores, 350 μC . En este caso, la carga del polímero está dada por todas los grupos amino de Ch-gtmac.

A partir de estas diferencias de carga en el polímero cuando se varía el pH, se calculó el porcentaje de sustitución del polímero, es decir, el porcentaje de gtmac adicionado a la cadena polimérica. Se determinó un 33,5 % de sustitución de aminas primarias. Este resultado es semejante al obtenido por titulación potenciométrica ácido-base (inciso 4.2.1), por lo tanto, se podría decir que esta metodología voltamétrica permite cuantificar porcentaje de sustitución de polímeros modificados a través de sus grupos funcionales ionizables.

Por otro lado, el análisis de los voltagramas obtenidos a los diferentes tiempos de pulso y pH, permitió caracterizar el proceso de desorción. En la figura 5.17, se muestra la respuesta experimental obtenida a partir del análisis de E_{p}^{-} , donde el ancho de medio pico $\Delta E_{P/2}$ corresponde a la diferencia de potencial cuando la corriente es la mitad de la corriente de pico, y la pseudocapacitancia C_s es el cociente entre I_p^{-} y la velocidad de barrido. Se compararon los resultados con los estudios teóricos desarrollados por Angerstein-Kosłowska y col.,^{76,77} concluyendo que el proceso de adsorción es quasireversible. Esto indica que los procesos de adsorción y desorción ocurren con una cinética compleja.

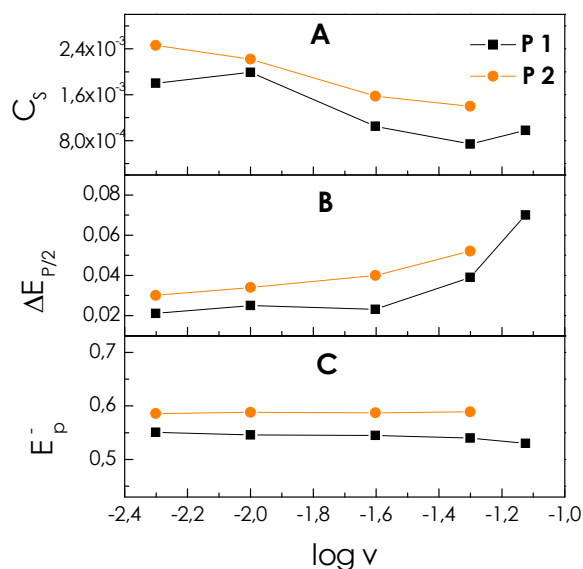


Figura 5. 17. Valores de pseudocapacitancia C_s (A), ancho de medio pico $\Delta E_{P/2}$ (B) y potencial de pico E_p (C), vs logaritmo de la velocidad de barrido, obtenidos para la transferencia de Ch-gtmac 0,02% P/V a través de la interfaz agua/1,2 DCE, pH 5,3. Fase orgánica: TPATCIPhB $1 \times 10^{-2}M$.

5.2.2. Ch-gtmac (1:0,6)

Este sistema, al poseer una menor cantidad de grupos amonio cuaternario presentó una menor solubilidad y, en consecuencia, se acotó el intervalo de pH estudiados a valores entre 3,0 y 6,0. El polímero presenta un

comportamiento diferente al observado en el de mayor grado de sustitución de la cadena polimérica con gtmac (Ch-gtmac 1:3), figura 5.18. En este caso, sólo se observa un pico de transferencia [proceso p(+)], de la fase acuosa a la orgánica y un proceso en el barrido negativo, el cual por la asimetría del pico puede tratarse de la desorción del polímero desde la fase orgánica, como el proceso discutido en el inciso anterior.

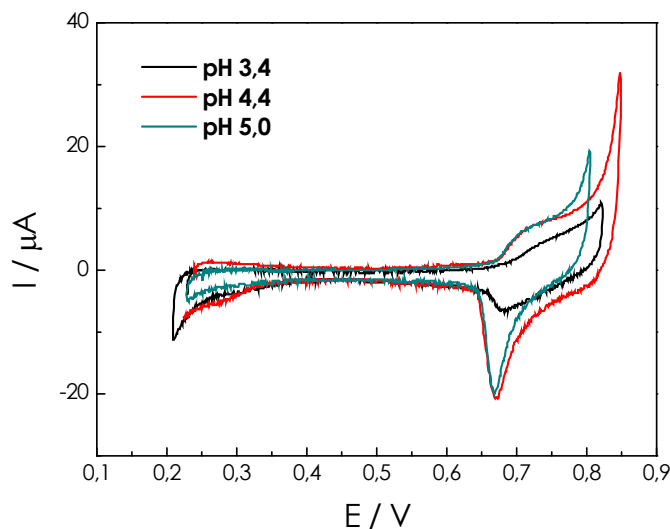


Figura 5.18. Voltagramas obtenidos para la transferencia de Ch-gtmac (1:0,6) 0,4% a través de la interfaz agua/1,2 DCE, a diferentes valores de pH. Fase orgánica: TPATCIPhB 1×10^{-2} M. ν : 0,050 V/s.

Con la variación de pH, se observan cambios tanto en la corriente de pico como en el potencial de pico. A pH 3,4, cuando se encuentran en el polímero todos los grupos amino cargados, presenta una mayor hidrofiliidad transfiriéndose una menor fracción de Ch-gtmac a la fase acuosa. Por lo tanto, la corriente de pico observada es menor. El mismo comportamiento se observa en el proceso inverso, donde disminuye la intensidad de corriente debido a una menor cantidad de polímero adsorbido.

Mientras que, a medida que se aumenta el pH disminuye la carga del polímero (menor cantidad de grupos amonio de Ch). Por lo tanto, se favorecen procesos de adsorción del polímero, en consecuencia, aumenta la

intensidad de los picos p(+) y p(-). Se observa un leve corrimiento de E_p^+ y E_p^- , asociados a un aumento de la hidrofobicidad de la macromolécula.

Del análisis del estudio voltamétrico realizado a Ch-gtmac con ambos grados de modificación, es importante destacar que la presencia de gtmac en la cadena polimérica genera un cambio estructural que se refleja en la respuesta obtenida. Para favorecer los procesos de adsorción interfacial es importante la presencia de las aminas cuaternarias proveniente de gtmac. Por otro lado, es relevante la mayor solubilidad de Ch-gtmac con mayor porcentaje de sustitución, a un amplio intervalo de valores de pH, respecto a Ch.

5.2.3. Ch-MA-AB-gtmac

El sistema Ch-MA-AB-gtmac resulto soluble en medio acuoso hasta pH 7,5, a diferencia del sistema sin gtmac insoluble, el cual no pudo ser estudiado electroquímicamente. En la figura 5.19 se compara la respuesta voltamétrica de Ch modificado con gtmac (Ch-gtmac) y con AB y gtmac (Ch-MA-AB-gtmac).

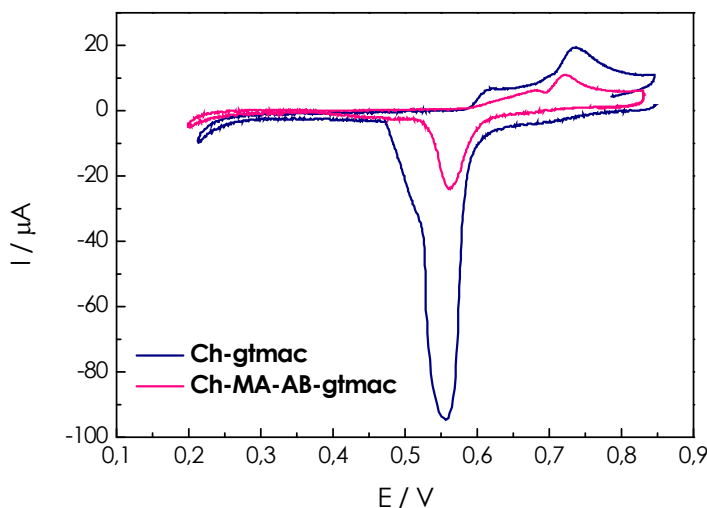


Figura 5.19. Voltagramas obtenidos para la transferencia de Ch-gtmac y Ch-MA-AB-gtmac a través de la interfaz agua/1,2 DCE. Fase acuosa: polímero 0,05%+ LiCl 1×10^{-2} M, pH 7,5. Fase orgánica: TPATClPhB 1×10^{-2} M. ν : 0,050 V/s.

Como se puede observar, el perfil no cambia significativamente, sin embargo, se observa una corriente mucho menor cuando el polímero está modificado con ambas estructuras. Este efecto puede deberse a dos factores: la cantidad de gtmac asociado al polímero y la presencia de grupos periféricos hidrofóbicos del dendrón.

En el primer caso, la cantidad de gtmac unido al polímero podría ser menor debido a que muchos de los grupos amino han sido modificados previamente con el dendrón. Esto se correlaciona con lo propuesto anteriormente, ya que la presencia de gtmac en la estructura polimérica afecta considerablemente los procesos interfaciales. Con respecto a la incorporación de dendrones en la estructura, produce cambios en la naturaleza del polímero debido al carácter hidrofóbico de W, generando cambios en los procesos que ocurren en la interfaz líquido-líquido y, en consecuencia, varía la respuesta voltamétrica.

5.3. INTERACCIÓN DE POLÍMEROS CON FÁRMACOS

5.3.1. Estudios con ibuprofeno

Se estudió la transferencia de ibuprofeno (IBU, figura 5.20) en presencia del polímero modificado con gtmac (**Ch-gtmac**). Este fármaco tiene un valor de pKa de 6,5, por lo que al pH de estudio (7,5 – 8) se encuentra ionizado favoreciendo la interacción polímero-IBU.

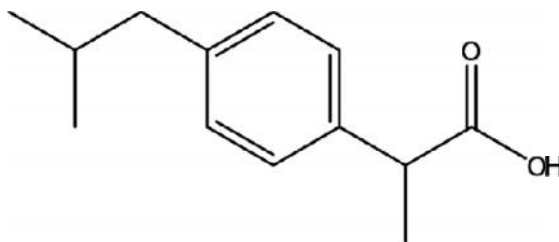


Figura 5.20. Estructura de ibuprofeno IBU.

En los estudios de interacción con IBU, la variación de potencial en función del tiempo es comparativa a la aplicada en el caso de los pulsos de potencial (inciso 5.2.1.3), donde el potencial inicial es 0,850 V y el potencial de corte es de 0,200 V, retornando al potencial inicial nuevamente. En este caso, al fijar el potencial a 0,850 V, por un intervalo de tiempo conocido e igual en

todos los casos analizados, se produce la adsorción del polímero en la fase orgánica y en el barrido inicial se estudia la desorción de éste, desde dicha fase a la fase acuosa. Por tal motivo, las modificaciones en la carga del polímero en la solución acuosa o la interacción polímero-fármaco, antes del proceso de adsorción, afectan la respuesta electroquímica.

5.3.1.1. Interacción Ch-gtmac con IBU

En la figura 5.21 se muestran a modo comparativo los voltagramas obtenidos de Ch-gtmac, en presencia y ausencia del fármaco. El perfil voltamétrico del fármaco no es afectado significativamente por la presencia del polímero. Sin embargo, el perfil de Ch-gtmac si cambia en presencia del mismo.

Debido a la naturaleza de las cargas involucradas, se puede plantear la formación de pares iónicos entre IBU y el polímero en fase acuosa, una vez que ambos se encuentran en contacto. Por este motivo, la carga del polímero estaría disminuida y en consecuencia, disminuye la adsorción del polímero en la interfaz. Existe una competencia entre el anión de la fase orgánica y el anión de IBU, en la formación del par iónico con Ch-gtmac.

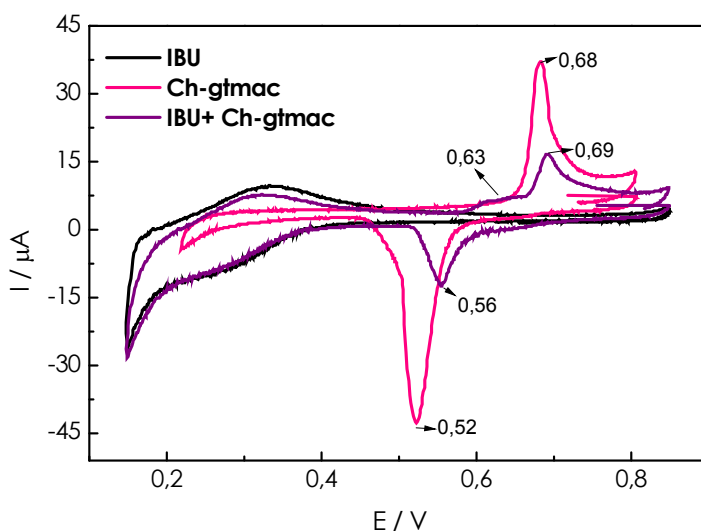


Figura 5.21. Voltagramas obtenidos por la transferencia de IBU a través de la interfaz agua/1,2 DCE, en presencia y ausencia de Ch-gtmac. Fase acuosa: Ch-gtmac 0,05% + IBU 5×10^{-4} M + LiCl 1×10^{-2} M, pH: 7,5. Fase orgánica: TPATCIPhB 1×10^{-2} M. ν : 0,025 V/s.

Con el objetivo de establecer la importancia de IBU en la formación de pares iónicos en la fase acuosa, se realizaron experimentos a pH 7,5, variando la concentración de polímero. Los voltagramas registrados se muestran en la figura 5.22. De estos resultados se puede decir que, a concentraciones bajas de polímero, la disminución de la adsorción es mucho más marcada. Este hecho sustenta la hipótesis planteada, de que existe una clara interacción del fármaco con el polímero en la fase acuosa. El perfil de la transferencia de IBU no presenta cambios significativos, independientemente de la concentración de polímero en fase acuosa. Esto evidencia que la interacción fármaco-polímero es débil y una vez que el sistema tiene la energía suficiente, se produce la transferencia de IBU a la fase orgánica.

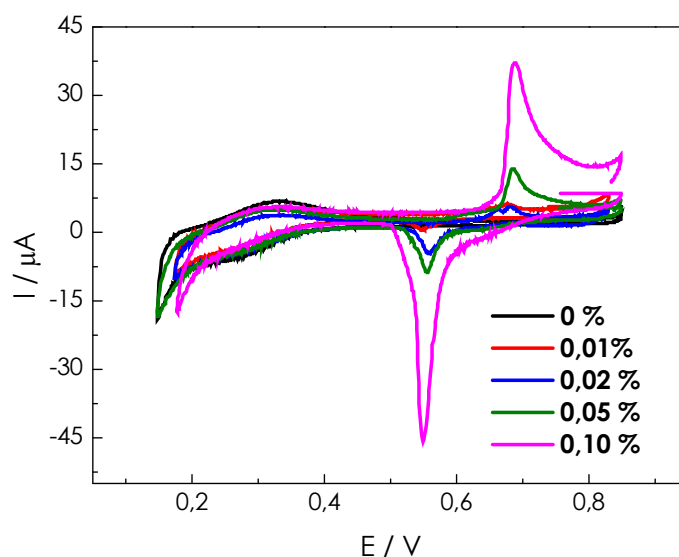


Figura 5.22. Voltagramas de IBU en presencia de diferentes concentraciones de Ch-gtmac a través de la interfaz agua/1,2 DCE. Fase acuosa: Ch-gtmac (concentraciones expresadas en % P/V) + IBU 5×10^{-4} M + LiCl 1×10^{-2} M, pH: 7,5. Fase orgánica: TPATCIPhB 1×10^{-2} M. ν : 0,025 V/s.

5.3.1.2. Interacción Ch-MA-AB-gtmac con IBU

Se analizó la interacción de Ch-MA-AB-gtmac con IBU, y este polímero a diferencia del anterior presenta en la cadena dendrones con grupos ésteres periféricos (AB). En la figura 5.23 se muestra la respuesta voltamétrica de IBU y la de Ch-MA-AB-gtmac, en presencia y ausencia de IBU.

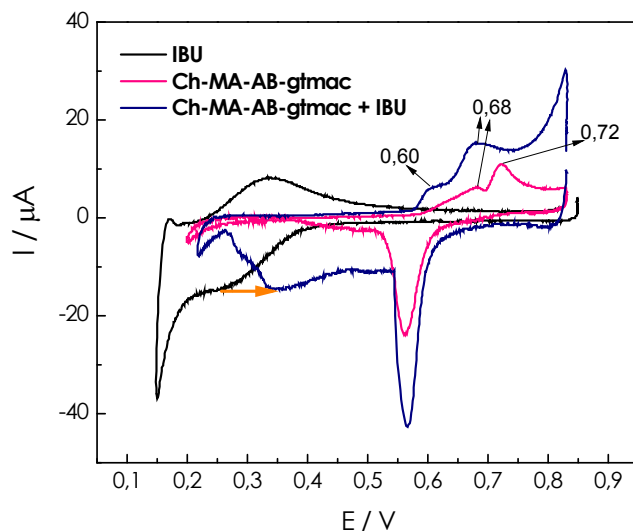


Figura 5.23. Voltagramas obtenidos por la transferencia de IBU en presencia y ausencia de polímero Ch-MA-AB-gtmac a través de la interfaz agua/1,2 DCE. Fase acuosa: polímero 0,05% + IBU 5×10^{-4} M, pH: 7,5. Fase orgánica: TPATCIPhB 1×10^{-2} M. ω : 0,050 V/s.

En este caso, se evidencia una clara interacción del polímero con el fármaco, ya que el perfil voltamétrico cambia significativamente. En el proceso directo, se observa que la transferencia de IBU ocurre a potenciales más positivos. Este corrimiento de E_p a valores más positivos, solapado con otros procesos, indica que se requiere menor energía y por lo tanto, la presencia del polímero favorece dicho proceso. En este caso, se pueden plantear dos tipos de interacciones entre el polímero y el fármaco: hidrofóbicas, debidas principalmente a los dendrones presentes en la estructura, y electrostáticas debidas a gtmac.

En el barrido inverso de potencial, no se observa el pico de transferencia del fármaco desde la fase orgánica a la fase acuosa, sino un aumento en la intensidad de corriente y un desplazamiento del potencial de los procesos de transferencia del polímero. Esto se debe a un solapamiento de los mismos, observándose un sólo proceso global. Este comportamiento sugiere que el fármaco se transfiere encapsulado en la estructura del polímero.

5.3.2. Estudios con propranolol

Propranolol (PROP) es un fármaco beta adrenérgico usado principalmente en el tratamiento de la hipertensión. En su estructura (figura 5.24) presenta un grupo amino secundario con un pKa igual a 9,4. Por lo tanto, se trabajó con soluciones acuosas a pH menores de 9.⁷⁸

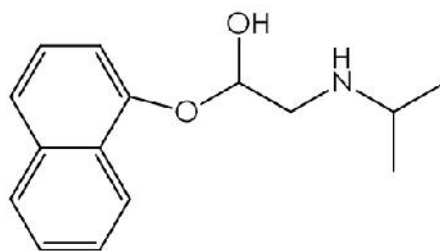


Figura 5.24. Estructura de propranolol PROP.

5.3.2.1. Interacción Ch-gtmac con PROP

Se estudió la interacción que presenta PROP con el polímero, Ch-gtmac. En este caso, los perfiles voltamétricos no cambiaron, observándose dos procesos individuales, lo cual indica que no hay interacción entre ambas estructuras. Estos resultados se deben a que tanto el fármaco como el polímero presentan carga positiva.

5.3.2.2. Interacción Ch-W con PROP

Se analizó el sistema Ch-W con propranolol. Como se mencionó en la sección 5.1.2, este polímero se acumula en la interfaz, por lo que se esperaba que la interacción entre el polímero y el fármaco impida o modifique la transferencia de éste, desde la fase acuosa a la orgánica. En la figura 5.25 se muestra la respuesta obtenida. En este caso, el perfil voltamétrico no cambia con respecto a PROP, sólo se observa un corrimiento de potencial de transferencia a valores más negativos, lo cual indicaría una activación del proceso. También se puede ver un aumento en la corriente en todo el intervalo de potencial, lo cual está asociado a la acumulación de carga en la interfaz, como se mencionó anteriormente. Este comportamiento fue observado en el estudio la transferencia de una molécula tetraetilamonio, en presencia de una monocapa de fosfolípidos.⁷⁹ Por lo tanto, la presencia del polímero en la interfaz permite una acumulación del fármaco, debido a

interacciones PROP-polímero, y esta acumulación facilita la transferencia a la fase orgánica.

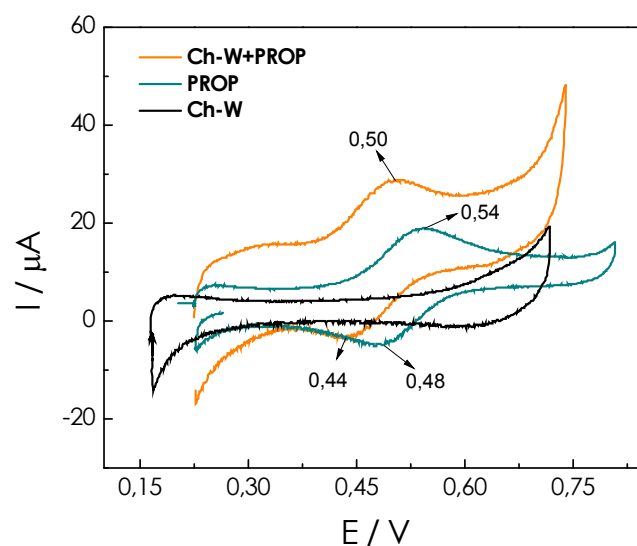


Figura 5.25. Voltagramas obtenidos por la transferencia de PROP a través de la interfaz agua/1,2 DCE, en presencia y ausencia de Ch-W. Fase acuosa: Ch-W 0,4% + PROP 5×10^{-4} M + LiCl 1×10^{-2} M, pH: 1,2. Fase orgánica: TPATCIPhB 1×10^{-2} M. ν : 0,05 V/s.

CONCLUSIONES PARCIALES DE POLVOS



- ∅ La activación de Ch con acrilato de metilo (MA) permitió obtener matrices con grupos ésteres libres, los que pueden unirse covalentemente con los dendrones con punto focal amino.

- Ø La dendronización de Ch y Ch-MA, permitió obtener nuevos polímeros dendronizados sobre la base de un polímero natural. Por diferentes metodologías, se corroboró tanto la unión de los dendrones a la matriz, como la variación de las propiedades del mismo, principalmente en el balance hidrofílico/hidrofóbico.
- Ø Tanto la hidrólisis de Ch-W como la unión de clorhidrato de glicidiltrimetilamonio (gtmac) a Ch y Ch-MA-AB, aumentaron la solubilidad de los mismos a pH próximo a 7. El sistema Ch-gtmac resultó soluble a mayor intervalo de pH (incluso básicos), que el resto de los polímeros.
- Ø Además, la modificación efectiva de las matrices con ácido fólico podría conferirle a estos sistemas la característica de transporte activo al sitio de unión.
- Ø A partir del estudio de la transferencia de los polímeros a través de la interfaz líquido/líquido, fue posible evidenciar que los dendrones cambian el comportamiento de quitosano.
- Ø La presencia del dendrón aumenta el carácter hidrofóbico de quitosano, facilitando la transferencia del polímero a través de la interfaz líquido/líquido. La transferencia de Ch-Wh es un proceso reversible controlado por difusión.
- Ø Las medidas en la balanza de Langmuir, permitieron corroborar la capacidad de Ch-W para formar una monocapa en la interfaz líquido/aire, indicando que la presencia del dendrón cambia la conformación del polímero.
- Ø Los estudios voltamétricos con fármacos, mostraron que la presencia del dendrón en Ch-MA-AB-gtmac y Ch-W, aumenta la interacción con IBU y PROP, respectivamente, favoreciendo la transferencia del mismo a través

de la interfaz. Particularmente, el polímero Ch-MA-AB-gtmac estaría encapsulando al fármaco para su transferencia entre la fase acuosa y orgánica.

Bibliografía

- (1) Newkome, G. R.; Yoo, K. S.; Kabir, A.; Malik, A. Synthesis of benzyl-terminated dendrons for use in high-resolution capillary gas chromatography, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7537.
- (2) Kabir, A.; Hamlet, C.; Soo Yoo, K.; Newkome, G. R.; Malik, A. Capillary microextraction on sol-gel dendrimer coatings, *J. Chrom. A* **2004**, *1034*, 1.
- (3) Tsubokawa, N.; Ichioka, H.; Satoh, T.; Hayashi, S.; Fujiki, K. Grafting of 'dendrimer-like' highly branched polymer onto ultrafine silica surface, *React. Funct. Polym.* **1998**, *37*, 75.
- (4) Kijak, A. M.; Moller, J. C.; Cox, J. A. Strengthening Silica Prepared by Sol-Gel Chemistry by Inclusion of a Polyamidoamine Dendrimer, *J. Sol-Gel Sci. Tech.* **2001**, *21*, 213.
- (5) Wu, X. Z.; Liu, P.; Pu, Q. S.; Sun, Q. Y.; Su, Z. X. Preparation of dendrimer-like polyamidoamine immobilized silica gel and its application to online preconcentration and separation palladium prior to FAAS determination, *Talanta* **2004**, *62*, 918.
- (6) Hassan, M. L.; Moorefield, C. N.; Kotta, K.; Newkome, G. R. Regioselective combinatorial-type synthesis, characterization, and physical properties of dendronized cellulose, *Polymer* **2005**, *46*, 8947.
- (7) Östmark, E.; Lindqvist, J.; Nyström, D.; Malmström, E. Dendronized Hydroxypropyl Cellulose: Synthesis and Characterization of Biobased Nanoobjects, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3815.
- (8) Sashiwa, H.; Shigemasa, Y.; Roy, R. Chemical Modification of Chitosan. 3. Hyperbranched Chitosan-Sialic Acid Dendrimer Hybrid with Tetraethylene Glycol Spacer, *Macromolecules* **2000**, *33*, 6913.
- (9) Zhao, Y.; Chen, J.; Zeng, E.; Hu, X.; Liu, A.; Dong, Y. Synthesis and characterization of hydroxyethyl chitosan grafted by carboxyl ending DOVOB dendrimer: A novel liquid crystalline polymer, *Carbohydr. Polym.* **2008**, *74*, 828.
- (10) Singh, R.; Lillard, J. W. Nanoparticle-based targeted drug delivery, *Exp. Mol. Path.* **2009**, *86*, 215.
- (11) Yang, X.; Grailer, J. J.; Pilla, S.; Steeber, D. A.; Gong, S.; Shuai, X. Multifunctional polymeric vesicles for targeted drug delivery and imaging, *Biofabrication* **2010**, *2*, 025004.
- (12) Astruc, D.; Blais, J.-C.; Daniel, M.-C.; Martinez, V.; Nlate, S.; Ruiz, J. Nano-scale metallodendritic complexes in electron-transfer processes and catalysis, *Macromol. Symp.* **2003**, *196*, 1.
- (13) Astruc, D. Electron and Proton Reservoir Complexes: Thermodynamic Basis for C-H Activation and Applications in Redox and Dendrimer Chemistry, *Accounts of Chem. Research* **2000**, *33*, 287.
- (14) Kawa, M.; Fréchet, J. M. J. Self-Assembled Lanthanide-Cored Dendrimer Complexes: Enhancement of the Luminescence Properties of Lanthanide Ions through Site-Isolation and Antenna Effects, *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 286.
- (15) Bohrer, M. P.; Deen, W. M.; Robertson, C. R.; Troy, J. L.; Brenner, B. M. Influence of molecular configuration on the passage of macromolecules across the glomerular capillary wall, *J. Gen. Physiol.* **1979**, *74*, 583.
- (16) Ohlson, M. Effects of filtration rate on the glomerular barrier and clearance of four differently shaped molecules, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2001**, *281*, F103.
- (17) Mammen, M.; Choi, S. K.; Whitesides, G. M. Polyvalent interactions in biological systems: implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors, *Angew. Chem. Int. Edn Engl.* **1998**, *37*, 2754.

- (18) Jayakumar, R.; Menon, D.; Manzoor, K.; Nair, S. V.; Tamura, H. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review, *Carbohydr. Polym.* **2010**, *82*, 227.
- (19) Amidi, M.; Mastrobattista, E.; Jiskoot, W.; Hennink, W. E. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 59.
- (20) Mourya, V. K.; Inamdar, N. N. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore, *React. Funct. Polym.* **2008**, *68*, 1013.
- (21) Mormann, W.; Michel, U. Improved synthesis of cellulose carbamates without by-products, *Carbohydr. Polym.* **2002**, *50*, 201.
- (22) Kalsi, P. S. *Spectroscopy Of Organic Compounds*; New Age International (P) Limited, 2004.
- (23) Leane, M. M.; Nankervis, R.; Smith, A.; Illum, L. Use of the ninhydrin assay to measure the release of chitosan from oral solid dosage forms, *Int. J. Pharm.* **2004**, *271*, 241.
- (24) Souza, N. L. G. D.; Brandão, H. M.; de Oliveira, L. F. C. Spectroscopic and thermogravimetric study of chitosan after incubation in bovine rumen, *J. Mol. Struct.* **2011**, *1005*, 186.
- (25) Hierlemann, A.; Campbell, J. K.; Baker, L. A.; Crooks, R. M.; Ricco, A. J. Structural Distortion of Dendrimers on Gold Surfaces: A Tapping-Mode AFM Investigation, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5323.
- (26) Betley, T. A.; Banaszak Holl, M. M.; Orr, B. G.; Swanson, D. R.; Tomalia, D. A.; Baker, J. R. Tapping Mode Atomic Force Microscopy Investigation of Poly(amidoamine) Dendrimers: Effects of Substrate and pH on Dendrimer Deformation, *Langmuir* **2001**, *17*, 2768.
- (27) Grebikova, L.; Maroni, P.; Muresan, L.; Zhang, B.; Schlüter, A. D.; Borkovec, M. Interactions between Individual Charged Dendronized Polymers and Surfaces, *Macromolecules* **2013**, *46*, 3603.
- (28) Muresan, L.; Maroni, P.; Popa, I.; Porus, M.; Longtin, R. m.; Papastavrou, G.; Borkovec, M. Conformational Changes of Polyamidoamine (PAMAM) Dendrimers Adsorbed on Silica Substrates, *Macromolecules* **2011**, *44*, 5069.
- (29) Zhang, B.; Wepf, R.; Kroger, M.; Halperin, A.; Schluter, A. D. Height and Width of Adsorbed Dendronized Polymers: Electron and Atomic Force Microscopy of Homologous Series, *Macromolecules* **2011**, *44*, 6785.
- (30) Ding, Y.; Ottlinger, H. C.; Schluter, A. D.; Kroger, M. From atomistic simulation to the dynamics, structure and helical network formation of dendronized polymers: The Janus chain model, *J. Chem. Phys.* **2007**, *127*, 094904.
- (31) Sashiwa, H.; Shigemasa, Y.; Roy, R. Chemical modification of chitosan. Part 9: Reaction of N-carboxyethylchitosan methyl ester with diamines of acetal ending PAMAM dendrimers, *Carbohydr. Polym.* **2002**, *47*, 201.
- (32) Tsubokawa, N.; Takayama, T. Surface modification of chitosan powder by grafting of 'dendrimer-like' hyperbranched polymer onto the surface, *React. Funct. Polym.* **2000**, *43*, 341.
- (33) Yang, S.-J.; Lin, F.-H.; Tsai, K.-C.; Wei, M.-F.; Tsai, H.-M.; Wong, J.-M.; Shieh, M.-J. Folic Acid-Conjugated Chitosan Nanoparticles Enhanced Protoporphyrin IX Accumulation in Colorectal Cancer Cells, *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 679.
- (34) Mekahlia, S.; Bouzid, B. Chitosan-Copper (II) complex as antibacterial agent: synthesis, characterization and coordinating bond- activity correlation study, *Physics Procedia* **2009**, *2*, 1045.
- (35) Cho, J.; Grant, J.; Piquette-Miller, M.; Allen, C. Synthesis and Physicochemical and Dynamic Mechanical Properties of a Water-Soluble Chitosan Derivative as a Biomaterial, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 2845.
- (36) Kim, J. Y.; Lee, J. K.; Lee, T. S.; Park, W. H. Synthesis of chitooligosaccharide derivative with quaternary ammonium group and its antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*, *Int. J. Biol. Macromol.* **2003**, *32*, 23.
- (37) Chan, P.; Kurisawa, M.; Chung, J. E.; Yang, Y.-Y. Synthesis and characterization of chitosan-g-poly(ethylene glycol)-folate as a non-viral carrier for tumor-targeted gene delivery, *Biomaterials* **2007**, *28*, 540.

- (38) Lu, Y.; Low, P. S. Immunotherapy of folate receptor-expressing tumors: review of recent advances and future prospects, *J. Control. Release* **2003**, *91*, 17.
- (39) Wang, S.; Luo, J.; Lantrip, D. A.; Waters, D. J.; Mathias, C. J.; Green, M. A.; Fuchs, P. L.; Low, P. S. Design and Synthesis of [¹¹¹In]DTPA-Folate for Use as a Tumor-Targeted Radiopharmaceutical, *Bioconjug. Chem.* **1997**, *8*, 673.
- (40) Lee, R. J.; Low, P. S. Folate-mediated tumor cell targeting of liposome-entrapped doxorubicin in vitro, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1233*, 134.
- (41) Morris, V. B.; Sharma, C. P. Folate mediated histidine derivative of quaternised chitosan as a gene delivery vector, *Int. J. Pharm.* **2010**, *389*, 176.
- (42) Hwa Kim, S.; Hoon Jeong, J.; Chul Cho, K.; Wan Kim, S.; Gwan Park, T. Target-specific gene silencing by siRNA plasmid DNA complexed with folate-modified poly(ethylenimine), *J. Control. Release* **2005**, *104*, 223.
- (43) Hwa Kim, S.; Hoon Jeong, J.; Joe, C. O.; Gwan Park, T. Folate receptor mediated intracellular protein delivery using PLL-PEG-FOL conjugate, *J. Control. Release* **2005**, *103*, 625.
- (44) Liang, B.; He, M.-L.; Xiao, Z.-P.; Li, Y.; Chan, C.-y.; Kung, H.-F.; Shuai, X.-T.; Peng, Y. Synthesis and characterization of folate-PEG-grafted-hyperbranched-PEI for tumor-targeted gene delivery, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *367*, 874.
- (45) Reymond, F.; Fermin, D.; Lee, H. J.; Girault, H. H. Electrochemistry at liquid/liquid interfaces: methodology and potential applications, *Electrochim. Acta* **2000**, *45*, 2647.
- (46) Monzón, L. M. A.; Yudi, L. M. Voltammetric analysis of lipophilicity of benzodiazepine derivatives at the water/1,2-dichloroethane interface, *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *495*, 146.
- (47) Monzón, L. M. A.; Yudi, L. M. Effect of electron acceptor groups on partition coefficient of phenothiazine derivatives at the water/1,2-dichloroethane interface, *J. Electroanal. Chem.* **2006**, *591*, 46.
- (48) Akgemci, E. G.; Bingol, H.; Atalay, T.; Ersoz, M. Effect of N(4)-substituent groups on transfer of 2-benzoylpyridine thiosemicarbazone derivatives at the water/1,2-dichloroethane interface, *Electrochim. Acta* **2007**, *53*, 673.
- (49) Calderon, M.; Monzon, L. M. A.; Martinelli, M.; Juarez, A. V.; Strumia, M. C.; Yudi, L. M. Electrochemical Study of a Dendritic Family at the Water/1,2-Dichloroethane Interface, *Langmuir* **2008**, *24*, 6343.
- (50) González-Fuentes, M. A.; Manríquez, J.; Antaño-López, R.; Godínez, L. A. Kinetic and thermodynamic study of the transfer of anionic polyamidoamine dendrimers across two immiscible liquids, *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 8299.
- (51) González-Fuentes, M. A.; Manríquez, J.; Antaño-López, R.; Godínez, L. A. Electrochemically driven transfer of carboxyl-terminated PAMAM dendrimers at the water/dichloroethane interface, *Electrochem. Commun.* **2010**, *12*, 137.
- (52) Riva, J. S.; Juarez, A. V.; Beltramo, D. M.; Yudi, L. M. Interaction of Chitosan with mono and di-valent anions in aqueous solution studied by cyclic voltammetry at a water/1,2-dichloroethane interface, *Electrochim. Acta* **2012**, *59*, 39.
- (53) Riva, J. S.; Bierbrauer, K.; Beltramo, D. M.; Yudi, L. M. Electrochemical study of the interfacial behavior of cationic polyelectrolytes and their complexation with monovalent anionic surfactants, *Electrochim. Acta* **2012**, *85*, 659.
- (54) Riva, J. S.; Iglesias, R.; Yudi, L. M. Electrochemical adsorption of a cationic cellulosic polymer by ion pair formation at the interface between two immiscible electrolyte solutions, *Electrochim. Acta* **2013**, *107*, 584.
- (55) Zhang, L.; Kitazumi, Y.; Kakiuchi, T. Potential-Dependent Adsorption and Transfer of Poly(diallyldialkylammonium) Ions at the Nitrobenzene | Water Interface, *Langmuir* **2011**, *27*, 13037.
- (56) Guo, J.; Amemiya, S. Voltammetric Heparin-Selective Electrode Based on Thin Liquid Membrane with Conducting Polymer-Modified Solid Support, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 6893.
- (57) Rodgers, P. J.; Jing, P.; Kim, Y.; Amemiya, S. Electrochemical Recognition of Synthetic Heparin Mimetic at Liquid/Liquid Microinterfaces, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7436.

- (58) Jing, P.; Kim, Y.; Amemiya, S. Voltammetric Extraction of Heparin and Low-Molecular-Weight Heparin across 1,2-Dichloroethane/Water Interfaces, *Langmuir* **2009**, *25*, 13653.
- (59) Yuan, Y.; Amemiya, S. Facilitated Protamine Transfer at Polarized Water/1,2-Dichloroethane Interfaces Studied by Cyclic Voltammetry and Chronoamperometry at Micropipet Electrodes, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6877.
- (60) Kivlehan, F.; Lanyon, Y. H.; Arrigan, D. W. M. Electrochemical Study of Insulin at the Polarized Liquid-Liquid Interface, *Langmuir* **2008**, *24*, 9876.
- (61) Herzog, G.; Nolan, M.-T.; Arrigan, D. W. M. Haemoglobin unfolding studies at the liquid-liquid interface, *Electrochem. Commun.* **2011**, *13*, 723.
- (62) Herzog, G.; Eichelmann-Daly, P.; Arrigan, D. W. M. Electrochemical behaviour of denatured haemoglobin at the liquid|liquid interface, *Electrochem. Commun.* **2010**, *12*, 335.
- (63) O'Sullivan, S.; Arrigan, D. W. M. Electrochemical behaviour of myoglobin at an array of microscopic liquid-liquid interfaces, *Electrochim. Acta* **2012**, *77*, 71.
- (64) Shinshi, M.; Sugihara, T.; Osakai, T.; Goto, M. Electrochemical Extraction of Proteins by Reverse Micelle Formation, *Langmuir* **2006**, *22*, 5937.
- (65) Osakai, T.; Yuguchi, Y.; Gohara, E.; Katano, H. Direct Label-free Electrochemical Detection of Proteins Using the Polarized Oil/Water Interface, *Langmuir* **2010**, *26*, 11530.
- (66) Herzog, G.; Kam, V.; Arrigan, D. W. M. Electrochemical behaviour of haemoglobin at the liquid/liquid interface, *Electrochim. Acta* **2008**, *53*, 7204.
- (67) Hartvig, R. A.; Mendez, M. A.; Weert, M. v. d.; Jorgensen, L.; Østergaard, J.; Girault, H. H.; Jensen, H. Interfacial Complexes between a Protein and Lipophilic Ions at an Oil-Water Interface, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 7699.
- (68) Kivlehan, F.; Lefoix, M.; Moynihan, H. A.; Thompson, D.; Ogurtsov, V. I.; Herzog, G.; Arrigan, D. W. M. Interaction of acridine-calix[4]arene with DNA at the electrified liquid|liquid interface, *Electrochim. Acta* **2010**, *55*, 3348.
- (69) Riva, J. S.; Juarez, A. V.; Yudi, L. M. Prometrine-Humic Acids Interactions Studied at a Water/1,2-Dichloroethane Interface, *Electroanalysis* **2010**, *22*, 413.
- (70) Camenisch, G.; Folkers, G.; van de Waterbeemd, H. Shapes of membrane permeability-lipophilicity curves: Extension of theoretical models with an aqueous pore pathway, *Eur. J. Pharm. Sci.* **1998**, *6*, 321.
- (71) Camenisch, G.; Alsenz, J.; van de Waterbeemd, H.; Folkers, G. Estimation of permeability by passive diffusion through Caco-2 cell monolayers using the drugs' lipophilicity and molecular weight, *Eur. J. Pharm. Sci.* **1998**, *6*, 313.
- (72) Gillies, E. R.; Frechet, J. M. J. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery, *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 35.
- (73) Boas, U.; Heegaard, P. M. H. Dendrimers in drug research, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 43.
- (74) Gillies, E.; Frechet, J. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery, *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 35.
- (75) Riva, J. S., Comportamiento electroquímico de polímeros catiónicos en una interfaz agua/1,2-dicloroetano, Universidad Nacional de Córdoba, **2013**.
- (76) Angerstein-Kozłowska, H.; Conway, B. E. Evaluation of rate constants and reversibility parameters for surface reactions by the potential-sweep method, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1979**, *95*, 1.
- (77) M.Bockris, J. O.; Khan, U. M. S. In *Surface electrochemistry: a molecular level approach*; Plenum press, New York, 1993.
- (78) Gasco, M. R.; Trotta, M.; Eandi, M. The influence of bile salts on the absorption in vitro and in vivo of propranolol, *J. Pharm. Biol. Anal.* **1984**, *2*, 425.
- (79) Quiroga, M. V. C., Comportamiento electroquímico de sistemas que permiten modelar la interacción de componentes de membranas biológicas con electrolitos y fármacos., Universidad Nacional de Córdoba, **2012**.

Consideraciones generales

Uno de los mayores desafíos de los últimos 50 años en investigación química, ha sido la posibilidad de modificar la superficie de un polímero inerte a través de reacciones simples o complejas. Los materiales resultantes con nuevas propiedades físico-químicas, como los polímeros, tienen un amplio campo de aplicaciones tecnológicas. Dentro de los compuestos orgánicos más comúnmente empleados se encuentran la celulosa, los poliésteres y el quitosano.

El objetivo buscado al modificar polímeros, los cuales son llamados soportes, es obtener un agente modificador que mantenga una efectiva unión con la superficie, de tal forma que si el soporte es involucrado en una serie de reacciones, la estructura del polímero original permanezca inalterada. Desde este punto de vista, los progresos y los avances en el diseño de soportes se han dirigido hacia la obtención de nuevos materiales multifuncionales. En consecuencia, el incremento en la demanda de macromoléculas ha llevado a los científicos a focalizarse en la síntesis de estructuras dendríticas altamente ramificadas. Estas estructuras son plataformas ideales para estudiar el efecto multivalente, debido a la presencia uniforme de grupos terminales en su periferia.^{1,2} A diferencia de los polímeros clásicos, los dendrímeros han atraído el interés a través de diferentes clases de disciplinas como resultado de sus estructuras, formas y tamaños bien definidos. La principal característica de las estructuras dendríticas es la multivalencia, la cual genera complejos con alta afinidad de unión.³

Cabe destacar que, la obtención de matrices poliméricas en forma de esferas aumenta el área superficial, la cual es de gran utilidad en diversas aplicaciones como sistemas transportadores de fármacos, soportes para cromatografía de afinidad y catálisis. En el primer caso, la forma de dosificación multiparticulada ha atraído considerable atención con respecto a formulaciones unitarias (como comprimidos), debido a una dispersión más uniforme en el tracto gastrointestinal, absorción más uniforme, menos variabilidad inter- e intra-individual, y procesamiento de formulaciones más

flexibles.⁴ En cuanto a su potencial como soporte para catálisis, las principales ventajas de estos sistemas heterogéneos son, fácil separación del producto, fácilmente reciclables mediante simple filtración, y además, tienen potencial uso en procesos continuos.⁵

En esta sección se presentan los trabajos de investigación desarrollados durante esta Tesis Doctoral, con relación a la obtención de soportes en forma de esferas basadas en quitosano (Ch), modificados con moléculas dendríticas. A continuación, se encuentran organizados los resultados de esta sección en tres capítulos: obtención y caracterización de esferas dendronizadas (capítulo 7), modificación de esferas dendronizadas (capítulo 8) y estudio de las potenciales aplicaciones de las esferas obtenidas (capítulo 9). En este último capítulo, se muestran estudios realizados para evaluar el potencial empleo de los polímeros obtenidos como soporte en afinidad de metales inmovilizados y en transporte de fármacos.

OBTENCIÓN DE ESFERAS DENDRONIZADAS



Con el objetivo de obtener esferas de quitosano (Ch) modificadas con dendrones, se planteó la siguiente estrategia sintética: 1- síntesis de dendrones, 2- obtención de esferas, 3- modificación de Ch con espaciadores, y 4- unión covalente de los dendrones al polímero. Las etapas llevadas a cabo se detallan a continuación.

7.1. SÍNTESIS DE DENDRONES: BISAMINA DE BEHERA BB

Los dendrones usados para la modificación de Ch fueron tris[(*t*-butoxicarbonil)etil]aminometano (conocido como amina de Behera, AB) y *N,N'*-bis[Tris((*t*-butoxicarbonil)etil)metil]-5-aminoftalamida (denominado bis amina de Behera, BB), los cuales tienen un grupo amino como punto focal para la unión covalente a la matriz polimérica. Estos dendrones fueron seleccionados con el fin de evaluar la influencia de la cantidad de los grupos periféricos de la estructura dendrítica sobre el polímero natural. Los dendrones AB y BB poseen 3 y 6 grupos *tert*-butilo periféricos, respectivamente. AB fue adquirido comercialmente y BB fue obtenido mediante la ruta sintética que se describe en la figura 7.1.

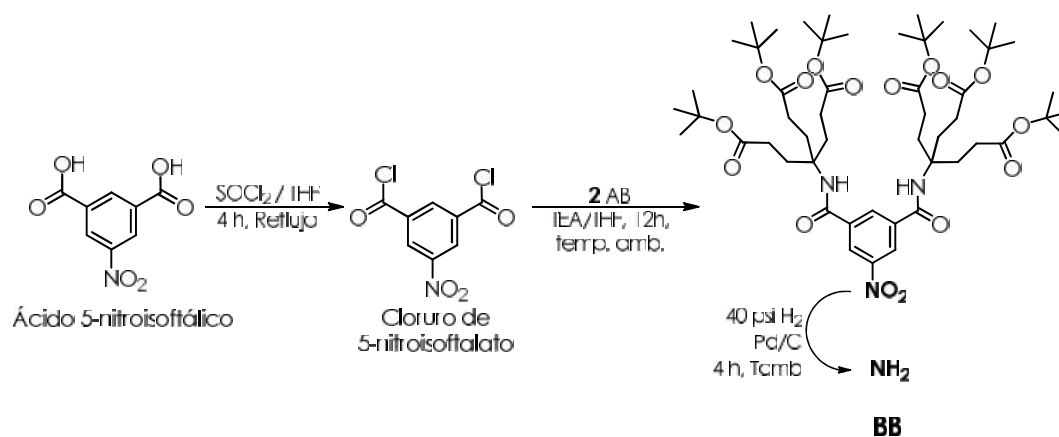


Figura 7.1. Ruta sintética de BB.

La síntesis del BB involucra los siguientes pasos: activación de grupos ácido del ácido 5-nitroisoftálico, reacción de amidación y reducción del grupo nitro (en sección experimental se encuentran detallados los reactivos empleados). El ácido 5-nitroisoftálico fue primero activado, formando el cloruro de diácido, para su posterior amidación con AB. Luego, se realizó la reducción del grupo nitro a amina por hidrogenación catalítica usando Pd/C. Se caracterizó por espectroscopia FT-IR y resonancia magnética nuclear.

La figura 7.2-A muestra el espectro FT-IR del dendrón BB, en el cual se observan las bandas del estiramiento C=O a 1668 cm^{-1} (banda I del grupo amida) y de torsión del grupo N-H a 1535 cm^{-1} (banda II del grupo amida), correspondientes a la unión de AB al cloruro de diácido. Además, se evidenció la banda del carbonilo del éster a 1727 cm^{-1} . Por RMN- ^{13}C se corroboró la reducción del grupo nitro a grupo amino por el corrimiento químico de las señales a 116,0 ppm (C_4 aromático) y 118,0 ppm ($\text{C}_{2,6}$ aromático), figura 7.2 -B.

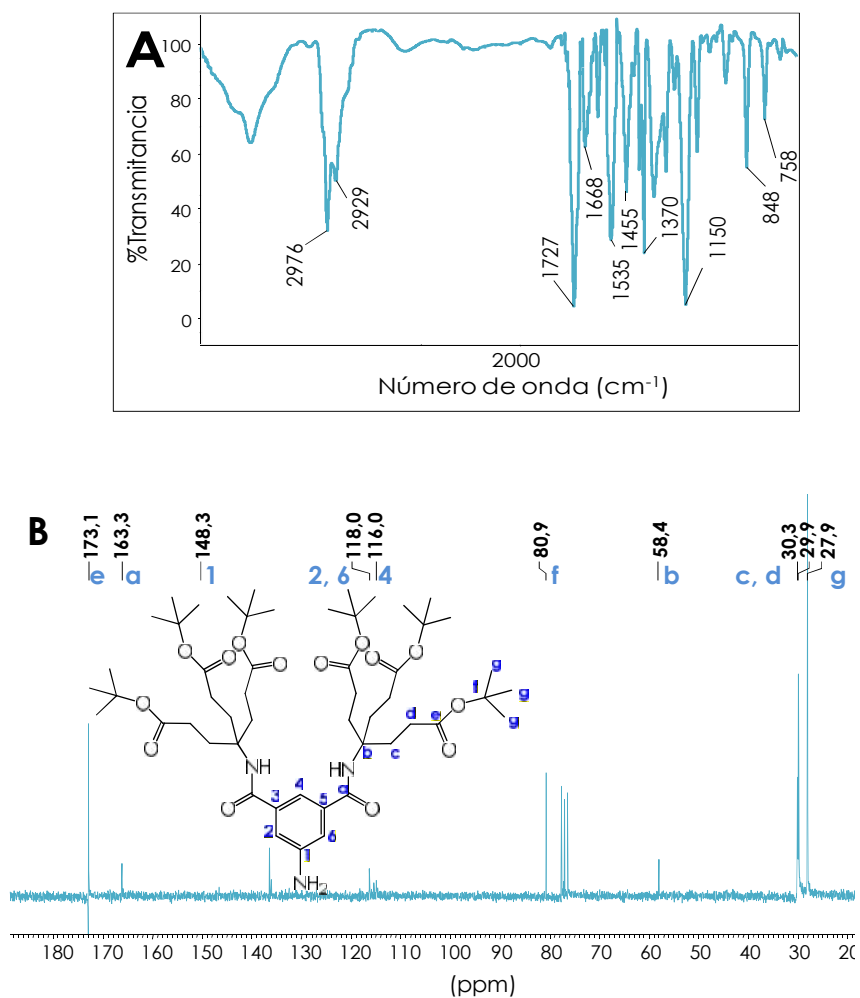


Figura 7.2. Espectro IR (A) y RMN- ^{13}C (B) del dendrón BB.

7.2. OBTENCIÓN DE ESFERAS

Las esferas de quitosano se obtuvieron mediante el método de coacervación-precipitación. En un primer paso, se preparó una solución de Ch al 2,85% P/V en una solución de ácido acético al 5,00% V/V. La disolución de Ch se produce gracias a los grupos amino primario que posee la cadena del polímero, que en medio ácido se encuentran ionizados. Luego de disolver completamente el polímero, se gotea dicha solución de Ch en una solución de NaOH 0,5 M, empleando una jeringa como se muestra en la figura 7.3. La formación de esferas a partir de la solución ácida se debe a que el cambio de pH provoca el rápido colapsamiento de las cadenas de Ch que se encuentran en la superficie de la gota, obteniendo hidrogeles esféricos de varias cadenas de Ch.

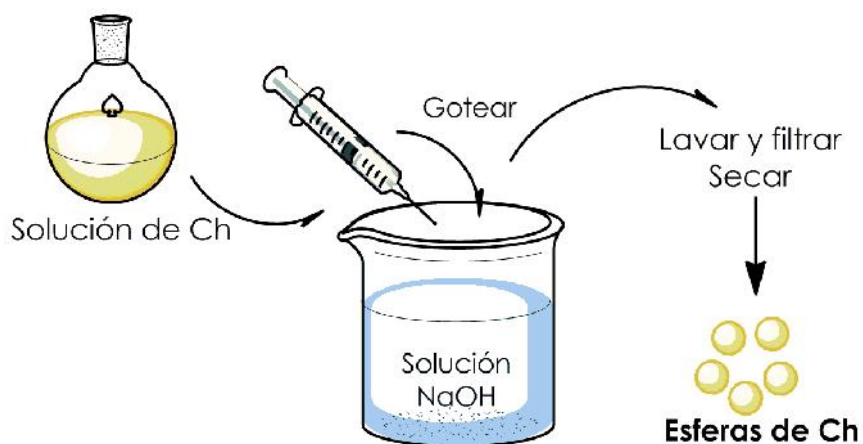
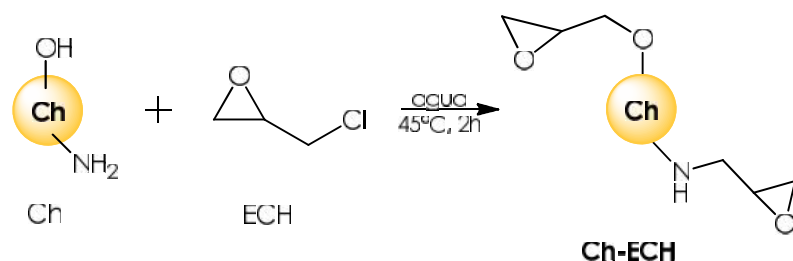


Figura 7.3. Esquema de formación de esferas.

7.3. OBTENCIÓN DE MATRICES ACTIVADAS: Ch-ECH y Ch-BDGE

Las esferas de Ch se modificaron con dos espaciadores, epiclorhidrina (ECH) y butilendiglicidiléter (BDGE), figuras 7.4 y 7.5, respectivamente. De esta forma, se incorporaron a la matriz grupos epóxido, que pueden reaccionar con el punto focal de los dendrones. Se emplearon estos dos espaciadores a

fin de analizar el efecto del largo de los mismos en la posterior unión con el dendrón.



Mecanismo de reacción

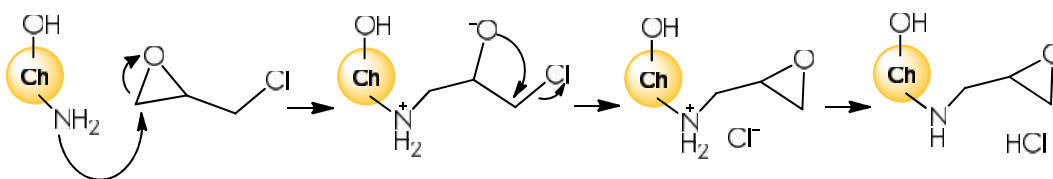


Figura 7.4. Esquema de reacción de Ch con ECH y mecanismo de reacción entre grupo epóxido de ECH y grupo amino de Ch.

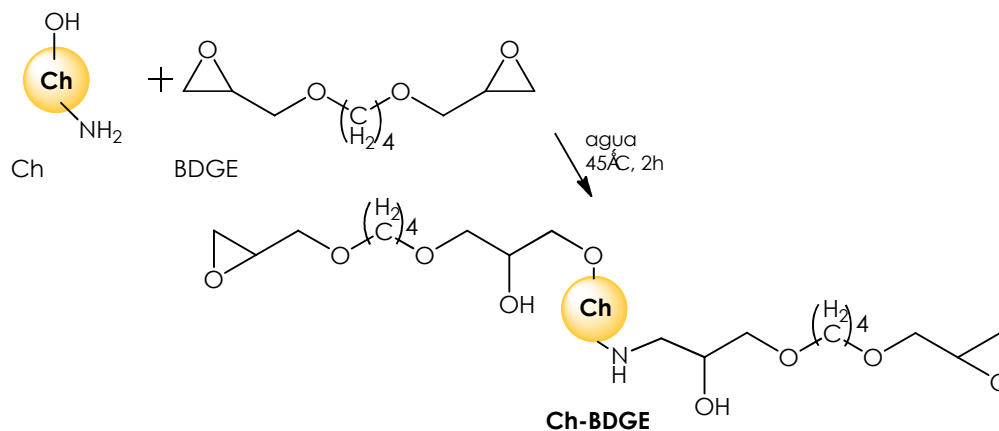


Figura 7.5. Esquema de reacción de Ch con BDGE.

Tanto ECH como BDGE reaccionan con los grupos amino y/o hidroxilo de Ch, dejando libre un grupo epóxido en la matriz polimérica. La reacción transcurre por el ataque nucleofílico del grupo amino y/o hidroxilo de Ch al grupo epóxido del espaciador, generando la unión amino secundaria o éter,

respectivamente. En el caso de ECH, se forma un nuevo grupo epóxido por ataque intramolecular del átomo de oxígeno al carbono vecino al átomo de Cl. Las reacciones de activación fueron llevadas a cabo en medio básico.

La modificación de la superficie de las microesferas se evidenció por espectroscopia IR de reflectancia difusa (DRI-FTIR). El espectro de DRI-FTIR del Ch-ECH mostró una nueva señal a 3027 cm^{-1} (estiramiento del enlace C-H del grupo epóxido), y otras señales correspondientes al grupo éter a 1033 , 1249 y 827 cm^{-1} (estiramiento asimétrico y simétrico C-O-C), además de las características del Ch. El espectro DRI-FTIR de Ch-BDGE presentó un patrón de bandas similares. Por titulación con HCl en piridina, se determinó la cantidad de grupos epóxidos libres en las esferas Ch-ECH y Ch-BDGE.⁶ A partir de estos datos, se estimó la presencia de $1,80 \times 10^{-4}$ moles de ECH y $3,78 \times 10^{-4}$ moles de BDGE por gramo de matriz. Estos valores indican una mayor reactividad de BDGE que de ECH con la matriz.

7.4. OBTENCIÓN DE ESFERAS DENDRONIZADAS: Ch-ECH-AB, Ch-ECH-BB, Ch-BDGE-AB y Ch-BDGE-BB

La modificación de las esferas activadas (Ch-ECH y Ch-BDGE) con los distintos dendrones fue realizada a 60°C durante 36 horas, usando una relación molar de grupos amino a grupos epóxido de 6:10. Los dendrones AB y BB fueron seleccionados por su bien conocida propiedad como nucleófilos para la apertura de los grupos epóxido. Así, la unión de los dendrones a Ch (figura 7.6) se produce por ataque nucleofílico del grupo amino del punto focal de los dendrones, a los grupos epóxido de la matriz activada, de manera semejante a la unión de espaciadores a Ch (inciso 7.3).

La incorporación de dendrones fue estimada por titulación de los grupos epóxidos siguiendo la metodología del inciso anterior (tabla 7.1). Por espectroscopia FT-IR se confirmó la unión de las moléculas dendríticas, donde la aparición de la banda de estiramiento característica del grupo C=O (grupos éster periféricos) alrededor de 1729 cm^{-1} , es la evidencia más clara de la unión del dendrón. Las otras bandas no pudieron ser elucidadas, debido a la alta intensidad de las señales del quitosano.

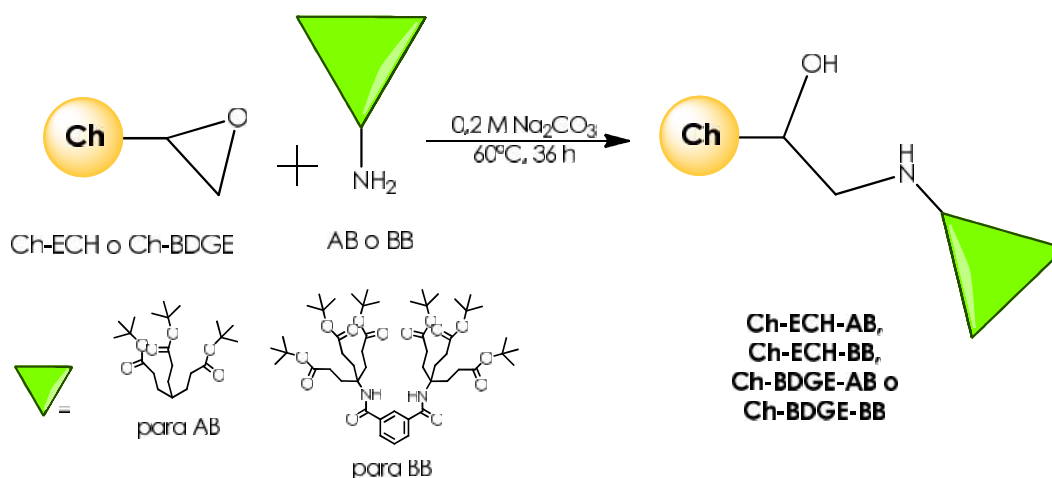


Figura 7.6. Esquema de síntesis de esferas dendronizadas.

Tabla 7.1. Grupos funcionales en los diferentes sistemas obtenidos.

Matriz	Grupos epóxido (mol/g matriz)	Dendrón (mol/g matriz)	Rendimiento ^a : unión de dendrón (%)
Ch-ECH-AB	$1,80 \times 10^{-4}$	$1,08 \times 10^{-4}$	100
Ch-ECH-BB	$1,80 \times 10^{-4}$	$2,70 \times 10^{-5}$	25
Ch-BDGE-AB	$3,78 \times 10^{-4}$	$2,27 \times 10^{-4}$	100
Ch-BDGE-BB	$3,78 \times 10^{-4}$	$8,00 \times 10^{-5}$	35

^aCalculado en función de la relación molar 1:0.6 de grupos epóxido y dendrones.

En todos los casos la incorporación del dendrón AB fue mayor que el dendrón BB. Esto puede ser el resultado de dos factores principales: el impedimento estérico dado por la presencia de mayor cantidad de grupos periféricos en la superficie de la estructura dendrítica de BB, y a la mayor reactividad del grupo amino alquílico de AB que del grupo amino aromático de BB. Además, la activación con BDGE (espaciador de cadena más larga) permite una mayor incorporación de dendrones a la matriz que con ECH, demostrando así que el factor estérico es importante para un mayor rendimiento de la reacción.

7.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS ESFERAS DENDRONIZADAS

Se caracterizaron las matrices, Ch-ECH-AB, Ch-ECH-BB, Ch-BDGE-AB y Ch-BDGE-BB, para evaluar el comportamiento de los nuevos materiales

desarrollados para su posible aplicación como potenciales matrices para cromatografía de afinidad, catálisis y transporte de fármacos.

7.5.1. Microscopía electrónica de barrido

Desde el punto de vista biológico, la forma y el tamaño de una partícula representa un factor importante para evaluar las matrices empleadas como transporte en liberación controlada de fármacos. Por esta razón, las esferas de Ch fueron caracterizadas por SEM (figura 7.7). El diámetro medio fue entre 0,8 y 1,2 mm. Las esferas fueron homogéneas y no presentaron una variación significativa con las modificaciones realizadas. Además, los tamaños de esferas obtenidos son relevantes tanto para emplearlos como soportes en cromatografía de afinidad como en su empleo para el transporte de fármacos vía tracto-gastrointestinal.

7.5.2. Análisis térmico

El análisis térmico de las esferas obtenidas se realizó empleando análisis térmico gravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Los perfiles de TGA en la figura 7.8 revelaron dos etapas de pérdida de masa. Las temperaturas informadas, a la cual se presenta el máximo de pérdida de masa, se obtuvieron a partir de la primera derivada de la masa en función de la temperatura. La primera etapa de degradación alrededor de 100-150°C, con una pérdida de masa de 2-10%, probablemente correspondiente al agua físicamente adsorbida en la superficie de las esferas.

De acuerdo a bibliografía,⁷ Ch presenta un proceso de degradación alrededor de 296°C, asociada a la pérdida de un 50% de su masa. Este segundo evento de degradación, para las esferas Ch-ECH y Ch-ECH-AB, se observa desplazado a 264°C y 296°C, respectivamente; y con una pérdida del 40% de su masa. Estos valores representan la temperatura de máxima pérdida de masa del material polimérico determinados a partir de la derivada primera de los perfiles termogravimétricos.

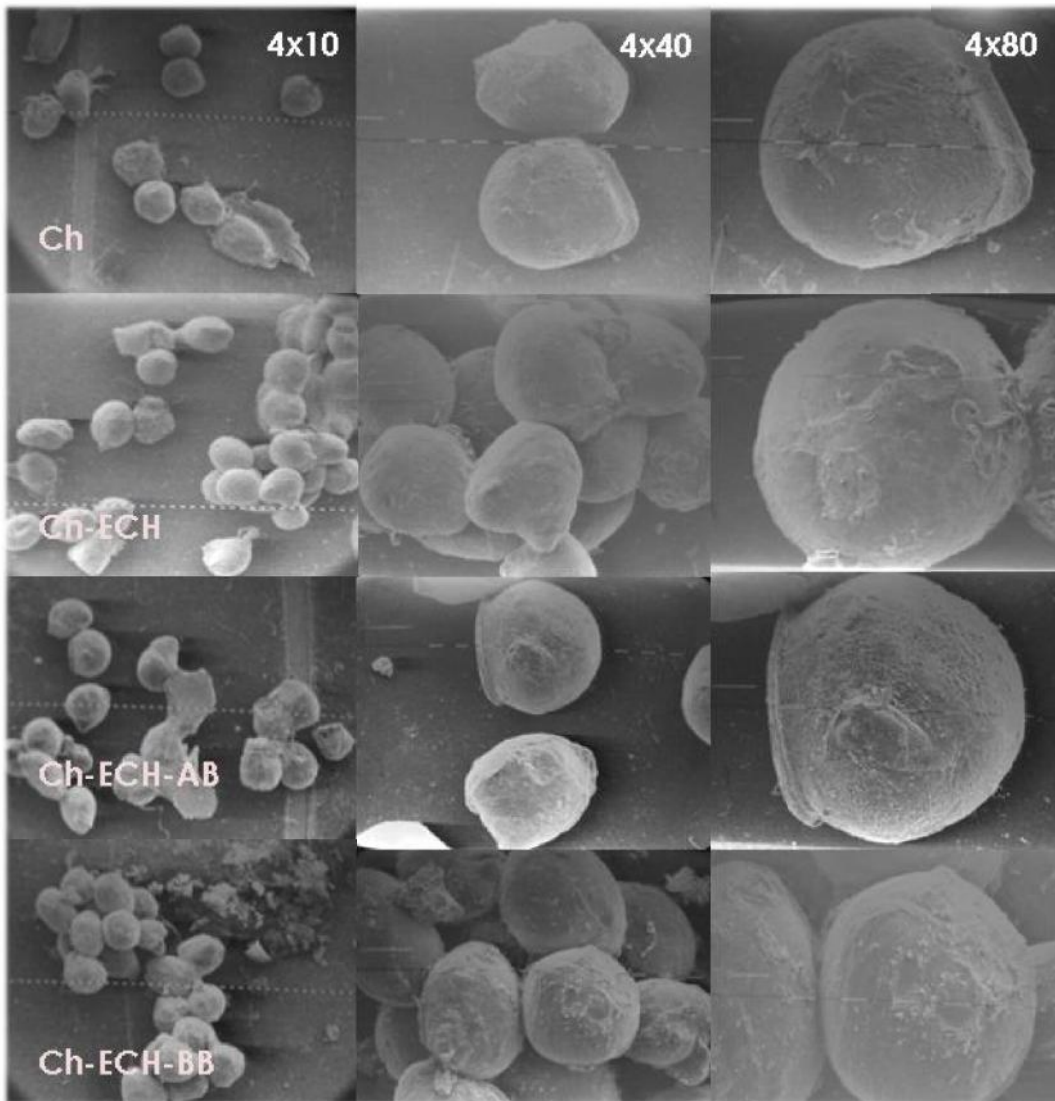


Figura 7.7. Imágenes SEM de las diferentes esferas de Ch modificadas.

A partir del análisis TGA se determinó que la nueva matriz con estructuras dendríticas, es térmicamente más estable debido a que la temperatura del segundo evento de degradación de Ch-ECH-AB es mayor que Ch-ECH.

La figura 7.9 muestra los termogramas de DSC de Ch-ECH y Ch-ECH-AB. Ch-ECH muestra tres picos exotérmicos a 256,6; 266,7 y 279,0 °C, mientras que, en el de Ch-ECH-AB aparecen a 277,4; 288,9 y 300,6 °C. Estos picos exotérmicos se atribuyen a la degradación térmica de los materiales.

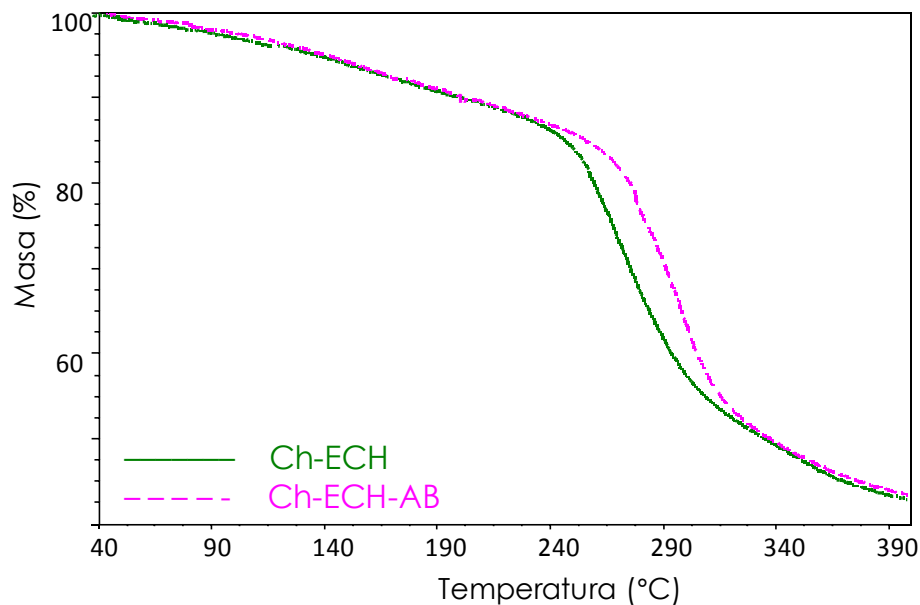


Figura 7.8. Perfiles termogravimétricos (TGA) de las esferas de Ch-ECH y Ch-ECH-AB.

El desplazamiento de los picos para Ch-ECH-AB con respecto a Ch-ECH, indicaría que la modificación con AB ocurre sobre la superficie de las microesferas, teniendo en cuenta referencias bibliográficas.⁸

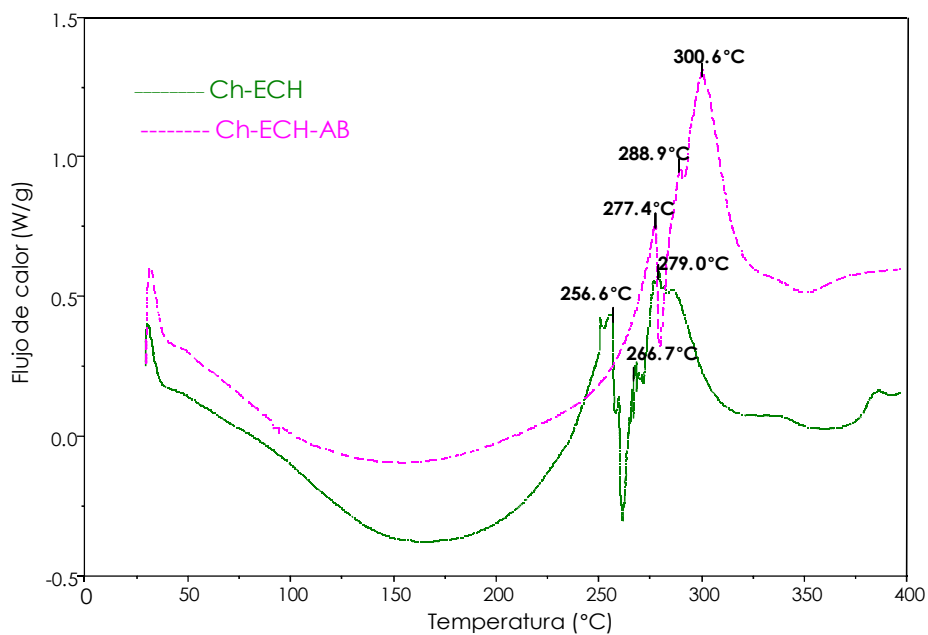


Figura 7.9. Perfiles calorimétricos (DSC) de las esferas de Ch-ECH y Ch-ECH-AB.

Por otra parte, se realizaron los análisis de TGA para Ch, AB y la mezcla física de Ch, ECH y AB (figura 7.10). A partir de los perfiles de derivada primera de masa en función de la temperatura, se observa que presentan un comportamiento diferente al de Ch-ECH-AB, demostrando la formación de una unión química entre quitosano, ECH y dendrón.

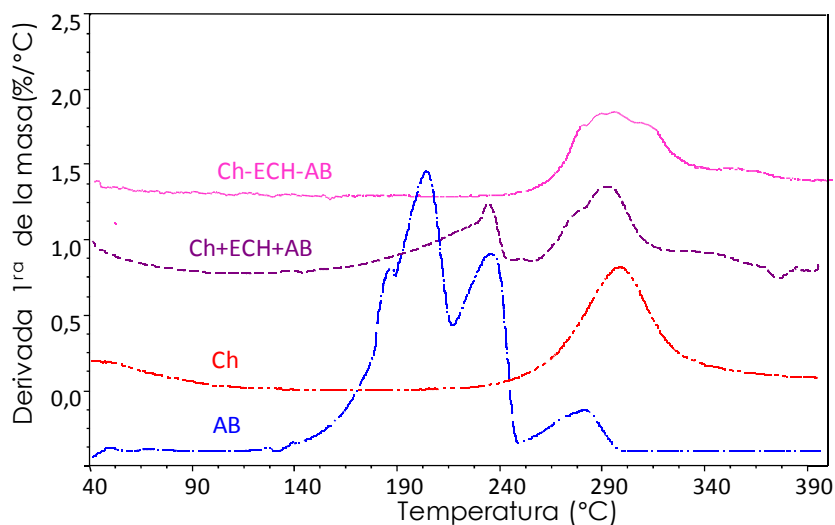


Figura 7.10. Derivada 1ª del masa en función de la temperatura de las siguientes muestras: AB; Ch; mezcla física Ch, ECH y AB; y unión covalente de Ch-ECH-AB.

Las matrices Ch-ECH-BB, Ch-BDGE-AB y Ch-BDGE-BB presentaron un patrón semejante de comportamiento térmico al de Ch-ECH-AB, figura 7.11.

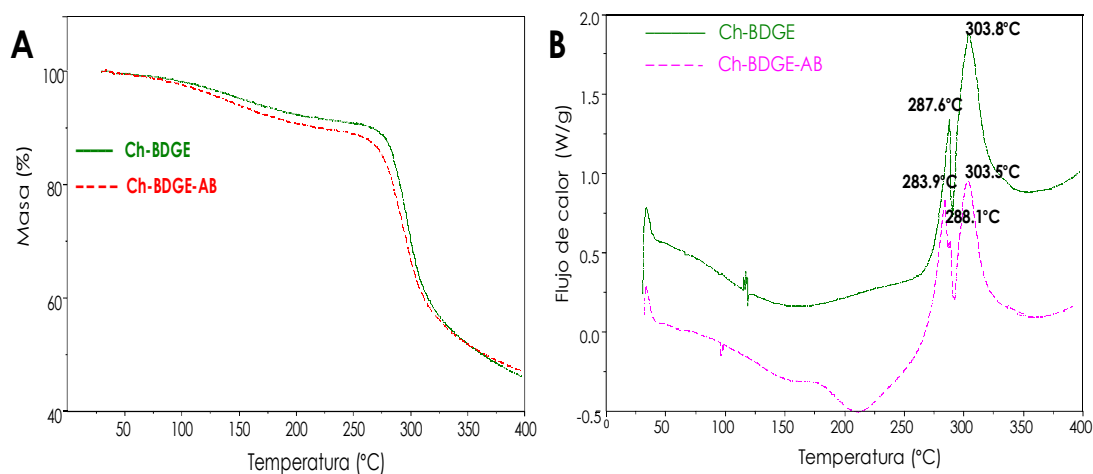


Figura 7.11. Esferas Ch-BDGE y Ch-BDGE-AB: perfiles TGA (A) y DSC (B).

En conclusión, la caracterización térmica de las matrices confirma la obtención de un nuevo material, es decir, que la dendronización ocurrió exitosamente.

7.5.3. Estudios de Hinchamiento

El estudio del comportamiento de hinchamiento de las microesferas a diferentes pH es importante, debido a que la entrada y el pasaje de agua a través de los poros de un sistema polimérico estarían influenciados, principalmente, por la forma y el grado de flexibilidad de la arquitectura de la matriz polimérica. Por ello, es una herramienta muy útil para evaluar estos sistemas como transportadores de fármacos.^{9,10}

Se realizaron estudios a dos valores de pH: 1,2 y 7,4, teniendo en cuenta las consideraciones del inciso 3.2.3.

En la figura 7.12 se observan los valores de hinchamiento máximos (E_{sw}) para los sistemas basados en Ch y ECH a pH 1,2 y 7,4. En general, los valores de hinchamiento de los productos dendronizados a pH 1,2 fueron mayores que a pH 7,4. Este comportamiento probablemente se debe a la protonación de los grupos amino libres en la cadena de Ch, a pH 1,2 se encuentra el polímero cargado positivamente y el hinchamiento aumenta debido a la repulsión electrostática entre las cadenas del quitosano que constituyen la esfera.¹¹

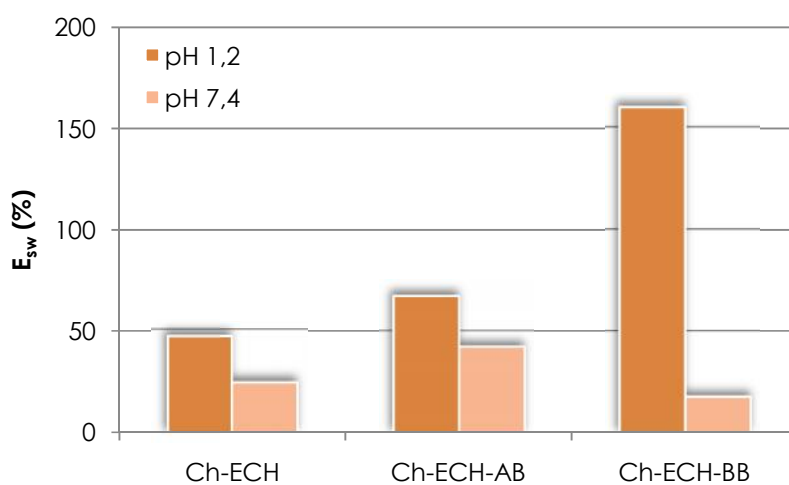


Figura 7.12. Hinchamiento de Ch-ECH con AB y BB.

Teniendo en cuenta que todas las esferas con ECH presentan la misma cantidad de grupos amino libres en su estructura, el mayor valor de hinchamiento de Ch-ECH-BB con respecto a Ch-ECH-AB se debería al aumento del tamaño del dendrón, que interfiere en la interacción de las cadenas del polímero.

Sin embargo, cuando los grupos amino de Ch no se encuentran protonados (pH 7,4), se observa que el valor de E_{sw} para Ch-ECH-AB aumenta ligeramente con respecto a Ch-ECH y para Ch-ECH-BB prácticamente no varía. Este comportamiento se debe probablemente al mayor grado de dendronización de la red Ch-ECH-AB, es decir, las cadenas poliméricas de Ch al tener más cantidad de dendrones en su estructura disminuyen la interacción intermolecular a través de los grupos amino libres de Ch.

Los estudios de hinchamiento para las esferas de Ch y BDGE mostraron un comportamiento diferente con relación a las esferas de Ch y ECH, como se observa en la figura 7.13.

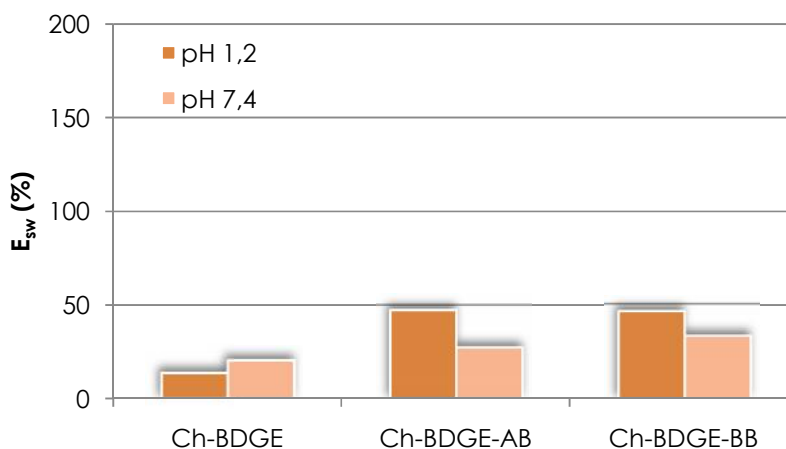


Figura 7.13. Hinchamiento de Ch-BDGE con AB y BB.

Por una parte, se puede observar que Ch-BDGE no presenta variación en el hinchamiento con respecto al pH, indicando que las esferas se encuentran altamente entrecruzadas y poseen menos cantidad de grupos amino libres en la cadena de Ch. En segundo lugar, cuando las esferas están modificadas con los dendrones, se observa un ligero incremento en los valores de hinchamiento a ambos valores de pH y para las dos esferas, Ch-BDGE-AB y Ch-BDGE-BB. Esto

se debe probablemente a la presencia de las estructuras dendríticas entre las cadenas de Ch, generan una mayor separación entre las mismas. Los valores semejantes de hinchamiento a pH 1,2 y 7,4, resultan de la suma de dos efectos opuestos: el grado de dendronización (mayor Ch-BDGE-AB que Ch-BDGE-BB) y el tamaño de la estructura dendrítica (mayor BB que AB). De todas formas, la presencia del dendrón parece no ser el factor determinante en el hinchamiento de estas esferas (Ch-BDGE-dendrones).

En conclusión, en base al análisis de los valores de hinchamiento de las esferas, se puede inferir que:

- la reactividad y la afinidad de BDGE con quitosano estarían generando un mayor entrecruzado entre las cadenas de Ch dentro y fuera de las esferas, generando índices de hinchamiento bajos a ambos pH;
- ECH fue el mejor espaciador, dado que presentó mayores valores de hinchamiento que indicarían un menor entrecruzamiento, permitiendo principalmente la modificación de la superficie de la esfera; y
- el valor de hinchamiento está determinado tanto por el grado de dendronización y por el tamaño de la estructura dendrítica, teniendo mayor influencia uno u otro factor dependiendo si los dendrones se encuentran principalmente en la superficie o en el interior de las esferas.

Capítulo 8

MODIFICACIÓN DE ESFERAS DENDRONIZADAS



En el presente capítulo se presenta la hidrólisis de los grupos *tert*-butilo periféricos de las estructuras dendríticas (inciso 8.1) y la unión de ácido fólico sobre la cadena polimérica (inciso 8.2).

8.1. HIDRÓLISIS DE GRUPOS *tert*-BUTILO PERIFÉRICOS DE LAS ESTRUCTURAS DENDRÍTICAS. OBTENCIÓN DE Ch-ECH-ABh, Ch-ECH-BBh, Ch-BDGE-ABh Y Ch-BDGE-BBh

A partir de las matrices obtenidas (Ch-ECH-AB, Ch-ECH-BB, Ch-BDGE-AB y Ch-BDGE-BB), se realizó la hidrólisis de los grupos *tert*-butilo periféricos. Dicha modificación permitió cambiar la polaridad de la periferia de la molécula dendrítica y además, tener grupos funcionales para inmovilizar moléculas de interés (fármacos o ligandos específicos,) para evaluar así los sistemas como transportadores de fármacos y como matrices para cromatografía de afinidad.

8.1.1. Obtención de Ch-ECH-ABh, Ch-ECH-BBh, Ch-BDGE-ABh y Ch-BDGE-BBh

La reacción de hidrólisis (figura 8.1) se realizó colocando las esferas en un medio ácido para promover la formación del grupo carboxílico, en la superficie de las moléculas dendríticas. El mecanismo de reacción fue descrito en el inciso 4.1. Las modificaciones fueron evidenciadas por espectroscopia Infrarroja, donde se observó el corrimiento de la banda de vibración del grupo carbonilo de 1726 a 1714 cm^{-1} correspondientes a un grupo éster y un grupo ácido, respectivamente.

En la tabla 8.1, se muestran los porcentajes de hidrólisis alcanzados para cada sistema, que fueron determinados por titulación ácido-base de grupos ácido en la matriz. Se puede observar un menor porcentaje de conversión a grupos ácido en las matrices Ch-BDGE-dendrones que en Ch-ECH-dendrones. Estos resultados, se correlacionan con los obtenidos en la determinación de los índices de hinchamiento (E_{sw}), los cuales mostraron que BDGE estaría modificando tanto la superficie como el interior de la microesfera. Por lo tanto, probablemente se vea dificultada la hidrólisis de los dendrones que se encuentran en el interior de la esfera.

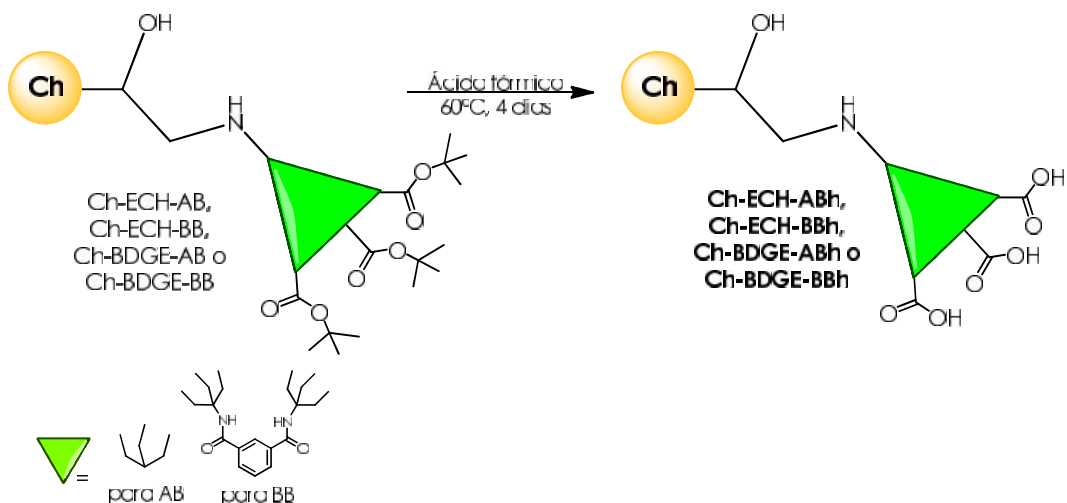


Figura 8.1. Reacción de hidrólisis de AB y BB.

Tabla 8.1. Porcentajes de hidrólisis.

Matriz	Dendrón (mol/g matriz)	Porcentaje de dendrones hidrolizados (%)
Ch-ECH-ABh	$1,08 \times 10^{-4}$	45,7
Ch-ECH-BBh	$2,70 \times 10^{-5}$	97,4
Ch-BDGE-ABh	$2,27 \times 10^{-4}$	18,9
Ch-BDGE-BBh	$8,00 \times 10^{-5}$	60,4

Por otro lado, se observa una mayor hidrólisis de BB que de AB; esto podría indicar una mayor disposición de los dendrones en la superficie de la esfera para la hidrólisis de los grupos periféricos. Considerando la posibilidad de dendronización en el interior y en la superficie de la esfera, el mayor tamaño de BB podría dificultar su difusión del dendrón hacia el interior de la esfera, disminuyendo así la cantidad de BB unido al interior de la matriz. Esta hipótesis se correlaciona tanto con los resultados de grado de hidrólisis como los comportamientos de hinchamiento de las esferas de Ch-ECH-BB respecto a Ch-ECH-AB y de Ch-BDGE-BB respecto Ch-BDGE-AB.

8.1.2. Estudios de hinchamiento

A fin de evaluar cómo afecta la modificación de los grupos terminales de las moléculas dendríticas al comportamiento de absorción de agua, se realizaron estudios de hinchamiento a los valores de pH 1,2 y 7,4. En las figuras

8.2 y 8.3, se muestran los índices de hinchamiento de los sistemas Ch-ECH-dendrones y Ch-BDGE-dendrones, respectivamente.

El hinchamiento de las esferas, como se discutió en el inciso 7.5.3, se encuentra afectado por varios factores: el espaciador usado (ECH y BDGE) que determina el número de grupos amino libres y el entrecruzamiento de la esfera; el grado de dendronización y el tamaño de la estructura dendrítica (AB y BB) que interfieren en la interacción de las cadenas de Ch. Al cambiar la polaridad de la periferia del dendrón (dendrones hidrolizados), el hinchamiento estará influenciado además por el grado de hidrólisis de las estructuras dendríticas.

En la figura 8.2, se observan los valores de máximo hinchamiento E_{sw} para las esferas basadas en Ch y ECH con dendrones con grupos periféricos hidrofóbicos (-COO-*tert*-butilo en Ch-ECH-AB y Ch-ECH-BB) e hidrofílicos (-COOH en Ch-ECH-ABh y Ch-ECH-BBh).

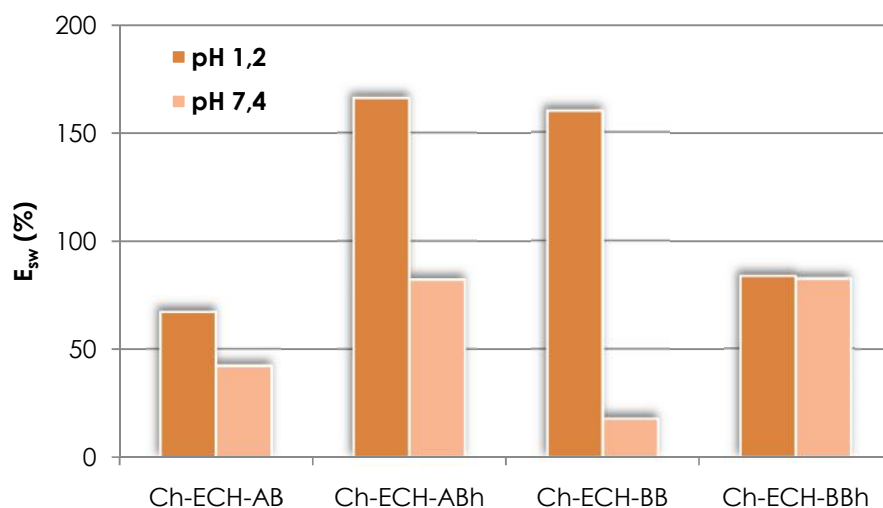


Figura 8.2. Máximos de hinchamiento de esferas con ECH.

Para las esferas Ch-ECH-ABh se observa un aumento del índice de hinchamiento respecto a Ch-ECH-AB debido, probablemente, a la mayor polaridad de la estructura dendrítica. Sin embargo, a pH 1,2 se observa un comportamiento diferente con respecto a Ch-ECH-BBh y Ch-ECH-BB. El valor de E_{sw} disminuye con la hidrólisis de BB. Este comportamiento hace evidente

que los grupos ácidos periféricos del dendrón son determinantes para el hinchamiento de las esferas. Así, los grupos -COOH interaccionan fuertemente por puentes hidrógeno entre sí, disminuyendo el hinchamiento de la esfera con respecto Ch-ECH-BB. Este efecto es más relevante que la repulsión electrostática de los grupos amonio de Ch en las esferas Ch-ECH-BBh. Por lo tanto, esta diferencia observada entre el comportamiento de Ch-ECH-ABh con respecto a Ch-ECH-AB y de Ch-BDGE-BBh con respecto a Ch-BDGE-BB, se debe probablemente al mayor porcentaje de hidrólisis de BB (97,4%) con respecto a AB (45,7%) y a la cantidad de grupos periféricos en la estructura dendrítica

A pH 7,4, se pueden encontrar los grupos carboxilato (-COO⁻), generando repulsión electrostática entre las estructuras dendríticas que aumentan el valor de hinchamiento de la esfera. Tanto para Ch-ECH-ABh como Ch-ECH-BBh se observa que este factores de mayor relevancia en el índice de hinchamiento resultante, que la atracción entre grupos amino de Ch por puente hidrógeno.

Cabe destacar que, el menor grado de dendronización con BB en relación a AB en las esferas Ch-ECH, hace más relevante los resultados obtenidos. La menor cantidad de dendrones en la esfera, ejerce una gran influencia en los valores de hinchamiento, debido al aumento del número de los grupos periféricos del dendrón. A partir de la comparación del valor de E_{sw} de Ch-ECH-ABh y Ch-ECH-BBh a pH 7,4, es posible observar que la esfera con BBh llega a valores semejantes de hinchamiento que con ABh, con un menor número de estructuras dendríticas en la esfera (menor grado de dendronización) y mayor cantidad de grupos funcionales periféricos (6 y 3 grupos funcionales periféricos en BB y AB, respectivamente). Éste es el conocido "efecto dendrítico".

Por otra parte, las esferas modificadas con BDGE y dendrones presentan una menor variación en los valores de hinchamiento (figura 8.3), a pesar de su mayor grado de dendronización.

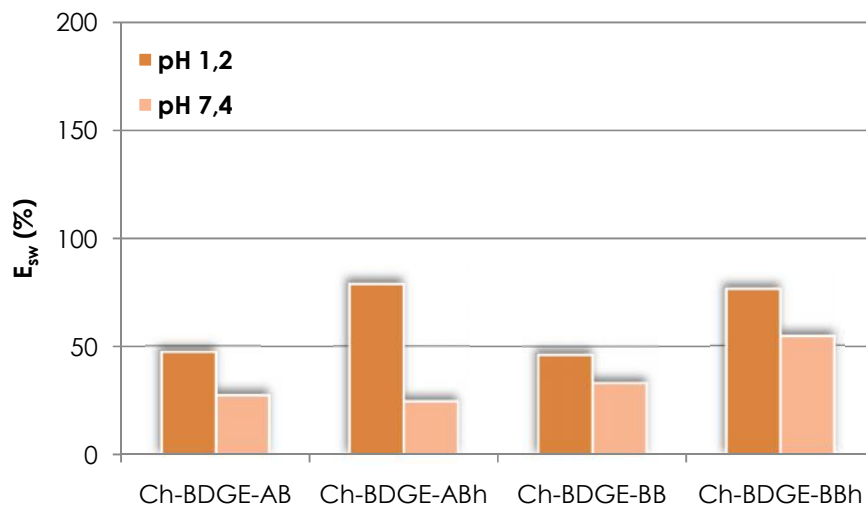


Figura 8.3. Maximos de hinchamiento de esferas con BDGE.

Estos resultados se deben a que la modificaci3n con BDGE ocurri3 tanto en la superficie de la esfera como en el interior de la misma, como se mencion3 anteriormente. Por lo tanto, la conversi3n a grupos ácido perif3ricos en Ch-BDGE-AB y Ch-BDGE-BB fue menor que en las esferas Ch-ECH-dendrones. Como resultado de la hidr3lisis en Ch-BDGE-ABh (18,9%) y en Ch-BDGE-BBh (60,4%), el valor de hinchamiento aumenta a pH 1,2 con respecto a Ch-BDGE-AB y Ch-BDGE-BB, respectivamente, debido a la naturaleza más hidrofílica de la periferia dendrítica. Sin embargo, a pH 7,4 s3lo el sistema Ch-BDGE-BBh aumenta el valor de E_{sw} , debido a varios factores que pueden influir: el mayor grado de hidr3lisis de la periferia dendrítica, la mayor cantidad de grupos funcionales perif3ricos, y la mayor cantidad de dendrones en la superficie que en el interior de las esferas, como se discuti3 anteriormente.

En conclusi3n, el índice de hinchamiento depende del valor del pH de estudio, debido al diferente balance entre cargas positivas (NH_3^+) y negativas (COO^-) en la estructura polim3rica. El grado de dendronizaci3n, tamaño del dendr3n, cantidad y naturaleza química de los grupos funcionales en la periferia del dendr3n, son los factores que controlan el comportamiento de las matrices. Los resultados discutidos demostraron la presencia del conocido "efecto dendrítico".

8.2. UNIÓN DE ÁCIDO FÓLICO

Teniendo en cuenta la posibilidad de emplear las esferas como transporte de fármacos, es de gran importancia la unión de ácido fólico (inciso 4.3) a las mismas, para obtener sistemas de liberación controlada de fármacos activos, es decir, con un transporte dirigido y específico a determinados sitios de acción. En este contexto, se estudió la unión de ácido fólico a las esferas de Ch, Ch-ECH-AB y Ch-BDGE-AB, evaluando las condiciones óptimas de reacción con proyección hacia una futura aplicación de estos sistemas realizados a escala nanométrica.

El ácido fólico (F) se unió a Ch a través de la reacción del grupo amino de Ch y del grupo ácido de F activado, figura 8.4. Primero, se activa el grupo ácido fólico con clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC), generando deficiencia electrónica en el carbono de F. Así, el grupo amino de Ch ataca nucleofílicamente al C del grupo ácido de F, produciendo un nuevo enlace amida. La reacción se llevó a cabo en dimetilsulfóxido (DMSO) y, posteriormente, se goteó en una solución alcalina para formar las esferas Ch-F siguiendo la metodología de coacervación-precipitación, anteriormente descrita (capítulo 7.2).

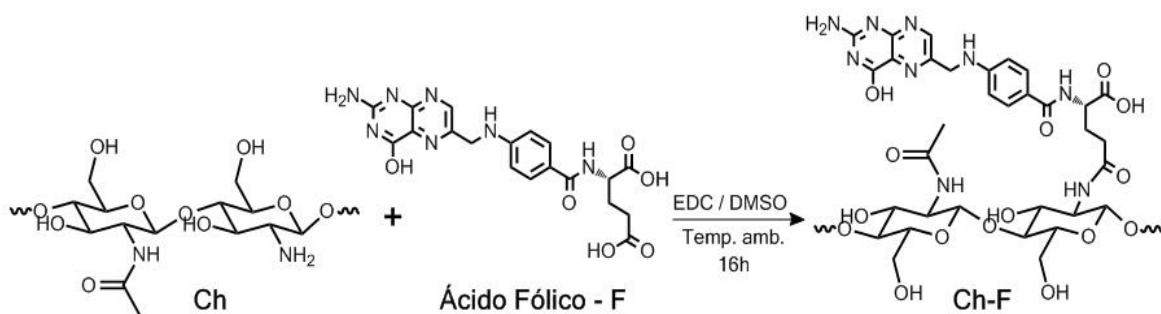


Figura 8.4. Esquema de reacción de Ch con ácido fólico.

Por espectroscopia IR de reflectancia difusa se analizó la formación de Ch-F. En el espectro DRI-FTIR (figura 8.5) de Ch-F se observa la aparición de los picos de absorción característicos del ácido fólico a 1455, 1505 y 1604 cm^{-1} . Las bandas de absorción a 1455 y 1604 cm^{-1} fueron asignadas a las vibraciones de

estiramiento del C=C del anillo aromático. Además, tanto el Ch como el producto Ch-F contienen grupos amida. Las bandas a 1633 y 1716 cm^{-1} corresponden a los estiramiento del enlace C=O de los grupos amida y ácido carboxílico libre del ácido fólico, respectivamente.^{12,13} La banda II del grupo amida se observa alrededor de 1569 cm^{-1} , probablemente debido a la formación de puentes hidrógeno.

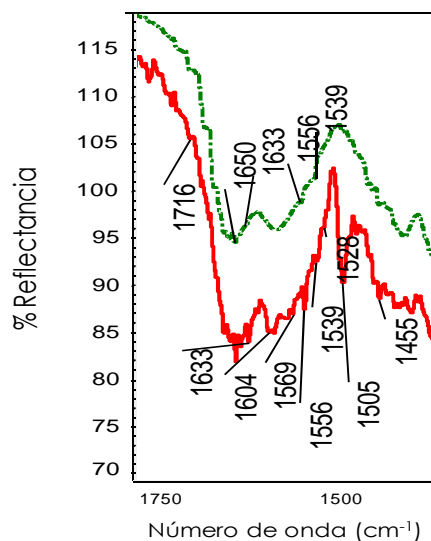


Figura 8.5. Espectro IR de esferas de Ch (verde) y Ch-F (roja).

El siguiente paso fue la unión de ácido fólico a las esferas modificadas con estructuras dendríticas. Se seleccionaron las matrices Ch-ECH-AB y Ch-BDGE-AB debido a que el menor tamaño de AB genera un menor impedimento estérico para que el ácido fólico reaccione con los grupos amino libres de Ch. La reacción transcurre de igual forma que se explicó anteriormente, con el esquema de la figura 8.4. La unión se evidenció por espectroscopia IR de reflectancia difusa (figura 8.6), donde se observó en los productos las bandas características de la unión del ácido fólico: alrededor de 1613 (ó 1618), 1514 (ó 1518) y 1466(ó 1465) cm^{-1} . Se determinó por gravimetría los moles de ácido fólico por gramo de matriz, obteniéndose $7,03 \times 10^{-4}$ y $2,06 \times 10^{-4}$ para Ch-ECH-AB y Ch-BDGE-AB, respectivamente. El mayor porcentaje de modificación en la matriz con ECH podría deberse a la mayor cantidad de

grupos amino libres que en la matriz con BDGE y al menor grado de dendronización de la matriz Ch-ECH-AB con respecto a Ch-BDGE-AB.

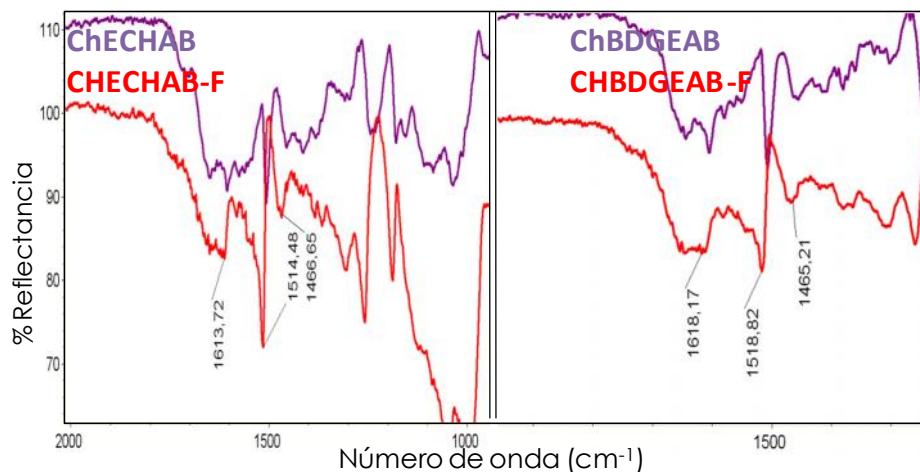


Figura 8.6. Espectros IR de esferas de Ch-ECH-AB y Ch-BDGE-AB con y sin ácido fólico.

Estos resultados, junto a los obtenidos en el inciso 5.3, confirman la exitosa unión del ácido fólico al quitosano, generando así novedosos materiales basados en un polímero natural dendronizado, con potencialidad para dirigir el sistema a un sitio específico y, por otro lado, con dendrones que podrían interaccionar específicamente con un fármaco o molécula de interés.

APLICACIONES DE LAS ESFERAS DENDRONIZADAS



En este capítulo se presenta los estudios realizados sobre las diferentes esferas obtenidas, con el objetivo de evaluar el potencial de las mismas como soporte en afinidad de metales inmovilizados (inciso 9.1) y como transporte en liberación controlada de fármacos (inciso 9.2).

9.1. AFINIDAD DE METALES INMOVILIZADOS

La cromatografía de afinidad es una metodología que se basa en interacciones bio-específicas entre una molécula biológica y un “ligando específico” unido a una matriz polimérica, como se muestra en la figura 9.1.

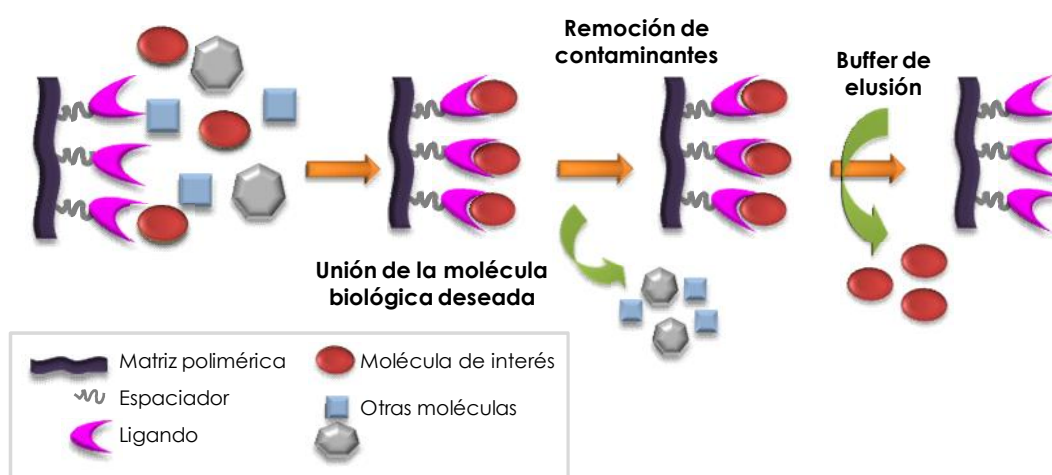


Figura 9.1. Esquema del principio de cromatografía de afinidad.

El empleo de los ligandos proteicos clásicos (por ejemplo anticuerpos), posee grandes desventajas como alto costo, baja capacidad de unión en la inmovilización, y labilidad con los agentes usados para regenerar los soportes. En consecuencia, surge en 1975¹⁴, el empleo de un metal como ligando unido a la matriz polimérica. Esta técnica es conocida como cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (conocido por sus siglas en inglés *IMAC*). Desde su primera utilización, ha llegado a ser un método de separación preparativo y analítico ampliamente empleado para proteínas terapéuticas, péptidos, ácido nucleicos, hormonas y enzimas.¹⁴ La separación está basada en la interacción selectiva entre los electrones del grupo donador de ciertos aminoácidos de proteínas y los iones de metales de transición [Cu(II), Ni(II), Zn(II), Co(II)]. Entre los aminoácidos que poseen grupos donores de electrones fuertes en sus cadenas laterales, se encuentran histidina, cisteína, triptófano y arginina. La presencia de tales residuos expuestos, es un importante factor para las propiedades de inmovilización en los soportes *IMAC*.¹⁵

La inmovilización de iones metálicos sobre soportes poliméricos ofrecen varias ventajas entre las que se encuentran el bajo costo, la alta estabilidad química y física, y el fácil acoplamiento a las matrices con alta densidad, resultando en adsorbentes de alta capacidad.¹⁵ Además, la elusión de la molécula adsorbida puede ser efectuada bajo condiciones no corrosivas y la separación selectiva puede realizarse mediante la selección del ión metálico y el *buffer* de elusión empleado.¹⁶

Hasta el presente, los soportes cromatográficos comúnmente usados para retener el ión metálico fueron diferentes polímeros sintéticos o polisacáridos acoplados a ligandos orgánicos como ácido iminodiacético (IDA) y ácido nitrilotriacético (NTA). Estos tipos de adsorbentes son relativamente costosos y pueden sufrir una lenta liberación de los quelantes unidos covalentemente a la matriz, durante el proceso de purificación. Por lo tanto, se limita su aplicación a la purificación de productos, especialmente, para fines farmacéuticos y alimenticios. Como una posible alternativa, surgió la utilización de polímeros no tóxicos quelantes de metales, como matrices para IMAC.¹⁷

Cabe destacar que, las matrices poliméricas con metales inmovilizados presentan diferentes aplicaciones como soportes para catálisis de transformaciones químicas específicas, remoción de contaminantes y sistemas biosensores, donde se retiene una enzima determinada para emplear en inmunoensayos.

En este contexto, se planteó el uso de las esferas Ch-ECH-dendrones y Ch-BDGE-dendrones como soporte de un ión metálico Cu(II) para ser empleado, posteriormente, en cromatografía de afinidad (9.1.1.2) y en catálisis (9.1.1.3). Se propusieron las esferas, debido a la gran área superficial (espacios entre esferas y poros dentro de la misma), rigidez y mayor resistencia mecánica, tamaños uniformes y, en particular, la insolubilidad y estabilidad a los valores de pH estudiados.

9.1.1. Afinidad de metales inmovilizados

Las esferas de quitosano modificadas con estructuras dendríticas con grupos periféricos ácido (Ch-ECH-ABh, Ch-ECH-BBh, Ch-BDGE-ABh y Ch-BDGE-BBh) y *tert*-butilo (Ch-ECH-AB, Ch-ECH-BB, Ch-BDGE-AB y Ch-BDGE-BB), se estudiaron como soportes de afinidad de metales inmovilizados. Se seleccionó cobre (II), como ión metálico a retener, debido a que se emplea comúnmente para purificación de aguas contaminadas,¹⁸ como catalizador de reacciones¹⁹ y para purificación de proteínas.¹⁷

Las esferas se pusieron en contacto con soluciones de nitrato de cobre durante de 4 días. A partir de la determinación de cobre (II) en solución, por espectroscopia de absorción atómica, se obtuvieron los valores de cobre (II) retenido en la matriz, como se muestra en la tabla 9.1.

Tabla 9.1. Valores de cobre (II) retenido y recuperado de las esferas modificadas.

Matriz	Cu(II) retenido (mg/g matriz)	Cu(II) recuperado (%)	Matriz	Cu(II) retenido (mg/g matriz)	Cu(II) recuperado (%)
Ch-ECH	10,4±0,5	100,00	Ch-BDGE	8,3±0,6	100,00
Ch-ECH-AB	50,4±0,5	23,59	Ch-BDGE-AB	47,9±0,4	18,93
Ch-ECH-ABh	62,4±0,7	24,06	Ch-BDGE-ABh	50,7±0,5	11,69
Ch-ECH-BB	62,3±0,6	24,15	Ch-BDGE-BB	63,0±0,6	19,27
Ch-ECH-BBh	51,7±0,6	18,80	Ch-BDGE-BBh	95,7±0,9	11,06

Las esferas de quitosano sin modificaciones presentaron un valor de retención de 43,31mg de cobre (II) por gramo de matriz. Cuando las esferas son modificadas con ECH y BDGE, se observa una importante disminución en la retención del metal. Este comportamiento podría ser atribuido a la rigidez de las matrices debida al entrecruzamiento, (característica evidenciada en los valores de índice de hinchamiento, discutidos en el punto 7.5.3), lo que dificultaría la interacción entre el ion metálico y los grupos funcionales del interior de la matriz. En consecuencia, solo los grupos presentes en la superficie de las esferas estarían disponibles para interaccionar con el ion cobre (II).

Los valores de retención de cobre (II) fueron significativamente mayores para los sistemas Ch-ECH-dendrones y Ch-BDGE-dendrones, respecto a Ch-ECH y Ch-BDGE, respectivamente. La presencia del dendrón aporta cambios en la estructura química de la superficie de las esferas, aportando grupos carbonilo (éster o ácido) y grupos amino secundario, que presentarían un arreglo estructural adecuado para una óptima coordinación con el ión cobre (II).

En la figura 9.2, se compara la máxima cantidad de Cu(II) retenido para las matrices Ch-ECH-AB, Ch-ECH-BB, Ch-BDGE-AB y Ch-BDGE-BB.

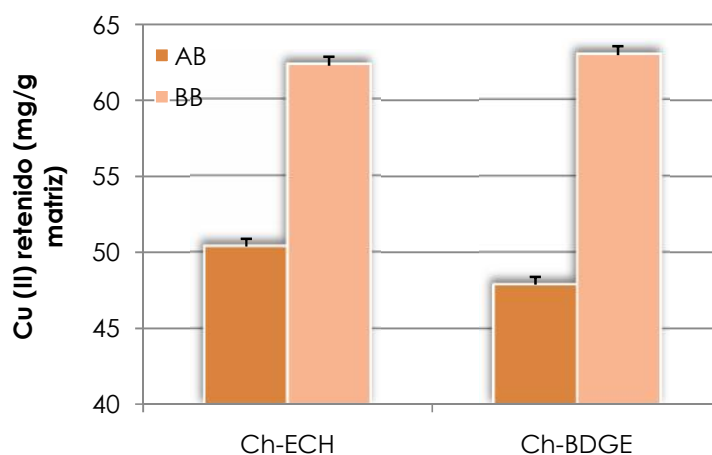


Figura 9.2. Comparación de cobre II retenido entre matrices.

A mayor número de grupos periféricos en el dendrón mayores valores de cobre (II) retenido. Considerando que, el grado de dendronización fue mayor con AB respecto a BB; el aumento de retención de cobre (II) por las matrices dendronizadas con BB que posee 6 grupos funcionales periféricos, es mucho más significativo.

Para observar mejor el efecto de la estructura del dendrón, se realizó una normalización de los valores de retención del metal asociados a los dendrones. Para lo cual, se restó la cantidad de Cu(II) retenido por las esferas sin dendrón (Ch-ECH y Ch-BDGE) a los valores correspondientes a las esferas con dendrón

(Ch-ECH-dendrones y Ch-BDGE-dendrones). De esta manera, se atribuye el incremento observado a los dendrones. Luego, se dividieron dichos valores por los moles de dendrón en un gramo de matriz y se multiplicaron por $2,27 \times 10^{-4}$ (el máximo valor de dendronización alcanzado), obteniendo los valores que se muestran en la tabla 9.2. Cabe aclarar que, dichos valores sólo deben tenerse en cuenta para el análisis comparativo de los resultados.

Además, los valores normalizados de cobre (II) retenido evidencian la mayor modificación en la superficie de las esferas Ch-ECH-dendrones que en Ch-BDGE-dendrones, la cual se correlaciona con los estudios de hinchamiento.

Tabla 9.2. Valores normalizados de cobre (II) retenido de las esferas.

Matriz	Cu(II)retenido (mg/g matriz)	D6/D3 ^a
Ch-ECH-AB	84,1	
Ch-ECH-ABh	109,3	
Ch-ECH-BB	436,3	5
Ch-ECH-BBh	347,2	3
Ch-BDGE-AB	39,6	
Ch-BDGE-ABh	42,4	
Ch-BDGE-BB	155,2	4
Ch-BDGE-BBh	248,0	6

^a Cociente entre valor de Cu(II) retenido con el dendrón de 6 (BB y BBh) y 3 (AB y ABh) grupos funcionales periféricos.

Como se observa en la tabla, hay un incremento significativo, entre 3 y 6 veces, cuando se tienen dendrones con 6 grupos periféricos respecto al de 3 grupos periféricos. Estos resultados evidencian claramente el denominado efecto dendrítico, donde la cantidad y disposición de los grupos periféricos afectan la retención del metal.

Por otro lado, se analizó el efecto de la naturaleza química de los grupos periféricos del dendrón. En la figura 9.3 se muestra la retención de cobre (II) en función de la cantidad de grupos ésteres y ácido periféricos.

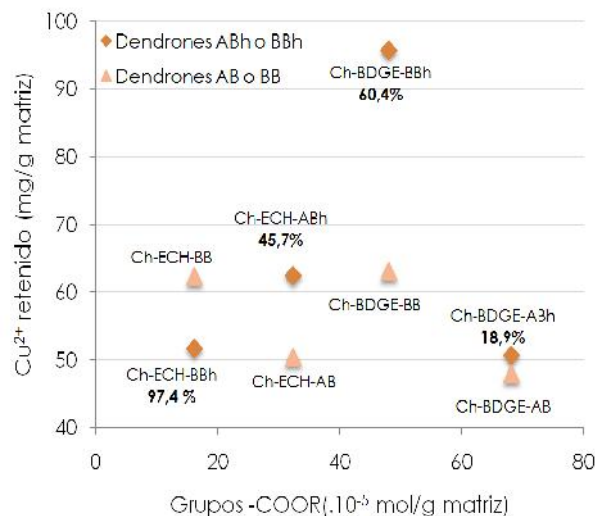


Figura 9.3. Máximos de Cu(II) retenido en función de: los grupos funcionales totales (R= ésteres y/o ácido).

Cuando se hidrolizan los grupos terminales *tert*-butilo, en general, no hay una variación importante en la retención del metal con el grado de hidrólisis de la matriz. Sin embargo, el sistema Ch-ECH-BBh (con un 97,4% de grupos periféricos hidrolizados) presenta una disminución significativa de retención del metal con respecto a Ch-ECH-BB. Probablemente, la disposición de los grupos periféricos es tal que se favorece la interacción entre ellos por puente hidrógeno y es lo suficientemente fuerte como para evitar la coordinación con el cobre (II). Estos resultados se correlacionan con las determinaciones de índice de hinchamiento (inciso 8.1.2). Por el contrario, el sistema Ch-BDGE-BBh (con un 60,4% de hidrólisis) presentó un incremento significativo en la captación del metal con respecto a Ch-BDGE-BB. En este caso, la menor cantidad de grupos ácidos disminuirían la probabilidad de formar uniones puente hidrógeno entre ellos (al no encontrarse próximos) y estarían disponibles para alcanzar un arreglo estructural adecuado, favoreciendo la coordinación con Cu(II).

Por otro lado, se realizó el estudio de recuperación del cobre (II) retenido en las esferas. En la tabla 9.1, se presentan los porcentajes de ión cúprico recuperado de las matrices. Las esferas de Ch-ECH y Ch-BDGE presentaron una recuperación total del metal retenido, mientras que, las matrices

dendronizadas presentaron porcentajes de recuperación significativamente menores.

A partir del análisis de los resultados obtenidos, es posible decir que, la modificación con dendrones aporta grupos funcionales y un arreglo estructural adecuado que permite mejorar la retención con el metal respecto a las matrices Ch-ECH y Ch-BDGE.

9.1.1.1. Estudio del complejo esfera-cobre (II) por espectroscopia IR

La interacción entre cobre (II) y las esferas fue confirmada por espectroscopia IR de reflectancia difusa (DR-FTIR), figura 9.4.

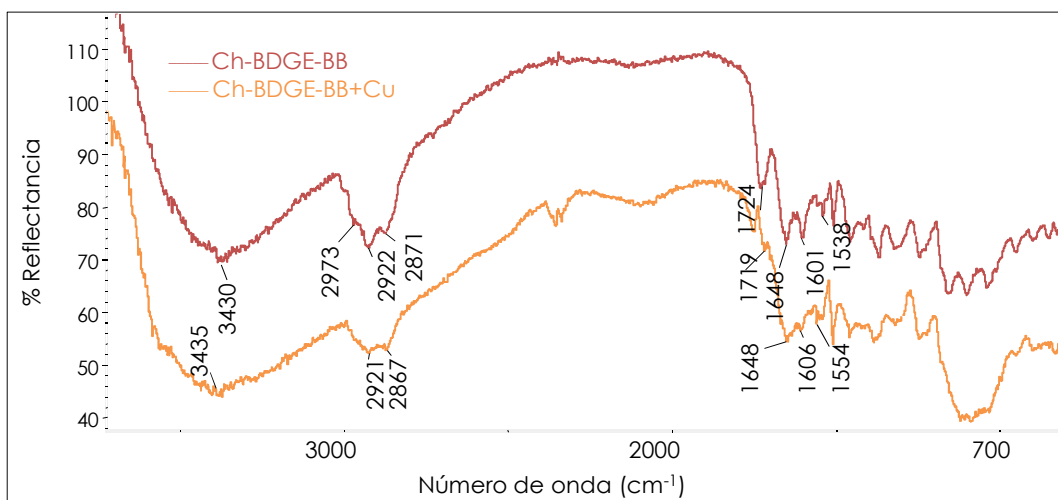


Figura 9.4. Espectro DR-FTIR de Ch-BDGE-BB y Ch-BDGE-BB+Cu.

La banda de absorción a 1724 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del enlace C=O (grupos ésteres periféricos del dendrón) disminuye su intensidad y se desplaza a un número de onda menor. Esta modificación se debe a la interacción de los grupos periféricos del dendrón con cobre (II). En consecuencia, la pérdida de intensidad de la banda a 2973 cm^{-1} , luego de la retención del metal, se debe al cambio en el entorno de los grupos CH_3 (grupos ésteres periféricos del dendrón). Mientras que, el ancho de las bandas entre 3300 y 3570 cm^{-1} correspondientes a las bandas de estiramiento de los

grupos -OH y -NH no varían significativamente. Este resultado indica una interacción débil entre los grupos funcionales hidroxilo y amino con el ión metálico.²⁰

9.1.1.2. Adsorción de albúmina bovina

La albúmina de suero bovina (BSA por sus siglas en inglés) es una proteína con peso molecular de 66411 g.mol^{-1} , y es empleada como molécula biológica modelo para evaluar la retención de la misma en diferentes soportes cromatográficos.²¹

Se evaluó la capacidad de las esferas con cobre (II) retenido, como posibles soportes para cromatografía de afinidad. Para ello, se seleccionó como proteína modelo a BSA, debido a que posee sitios de unión al ión cúprico en su secuencia de aminoácidos. Las matrices que se emplearon en este ensayo fueron Ch-BDGE-ABh, Ch-BDGE-ABh+Cu y Ch-BDGE-AB+Cu, dado a sus buenos porcentajes de retención de cobre (II).

En la figura 9.5, se observa que las distintas matrices poseen valores semejantes de retención de BSA. Este comportamiento se debe a que existe una interacción entre el soporte y BSA, el cual aparentemente es importante que la cantidad de cobre (II) retenido en la matriz. La menor adsorción observada en la matriz Ch-BDGE-AB con cobre (II), se podría deber al mayor carácter hidrofóbico de la matriz dado por los grupos *tert*-butilo terminales de las estructuras dendríticas, ya que en este caso la presencia del metal es menor.

Al comparar estos resultados con los publicados por otros autores,^{22,23} donde la presencia del cobre (II) inmovilizado en soportes de quitosano es fundamental para una adsorción de BSA, nos indican que la presencia de dendrones favorece e interactúa con BSA. En dichos trabajos, los mejores soportes, en las mejores condiciones, adsorben un máximo de 45 y 190 mg BSA por gramo de matriz, respectivamente. Por lo tanto, las nuevas matrices resultan interesantes al representar un nuevo ligando en retención de proteínas, el dendrón AB unido a la esfera de Ch.

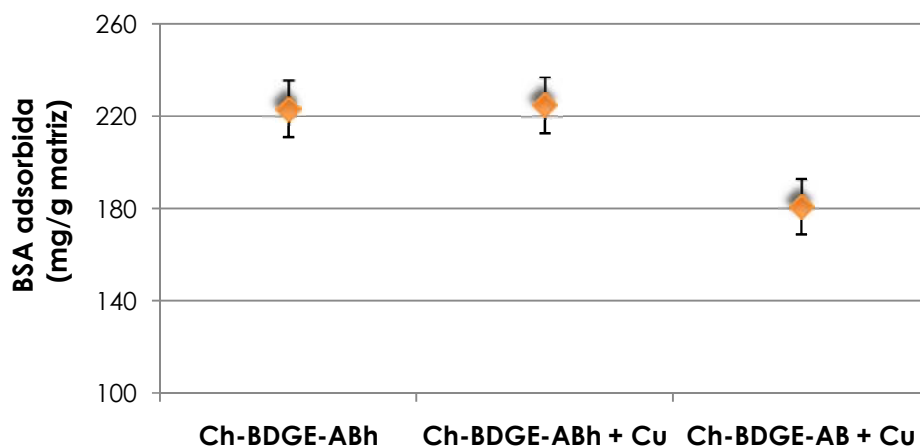


Figura 9.5. Gráfico de BSA adsorbida en las diferentes matrices estudiadas.

Por otro lado, se ha descrito por bibliografía que la interacción de BSA con dendrímeros,^{24,25} está influenciada por la naturaleza química de los grupos periféricos de la estructura dendrítica. A partir de estas referencias, se podría decir que los dendrones estarían actuando como ligando de la proteína. Además, la naturaleza química de la estructura dendrítica estaría afectando a la unión de BSA, como se observó en la figura 9.5, hay una mayor retención en las matrices con ABh que con AB.

Debido a que no se encuentran en bibliografía sistemas semejantes al desarrollado en esta Tesis, este estudio preliminar alienta a la investigación del uso de estos sistemas como soportes para cromatografía de afinidad.

9.1.1.3. Catálisis de peróxido de hidrógeno

La descomposición catalítica de H_2O_2 (figura 9.6) ha sido estudiada extensivamente, debido a su gran aplicabilidad en diferentes tecnologías para el tratamiento de agua; varios contaminantes orgánicos del suelo y del agua pueden ser oxidados y degradados exitosamente.^{19,26,27} El radical hidroxilo, producido en la descomposición del peróxido de hidrógeno en presencia de $Cu(II)$, es una de las principales especies que puede reaccionar con compuestos orgánicos no saturados, conduciendo a su degradación parcial o completa.^{27,28}

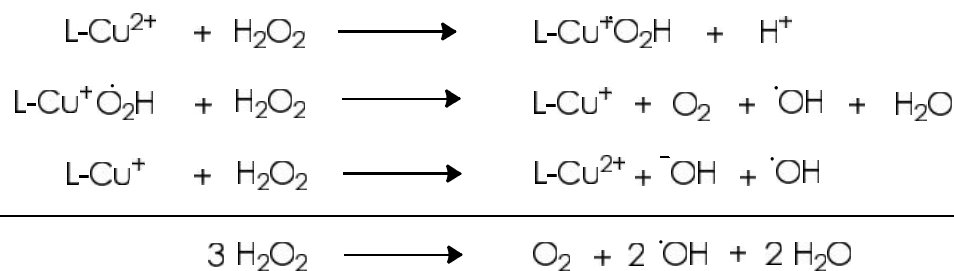


Figura 9.6. Esquema del mecanismo de descomposición de peróxido de hidrógeno en presencia de ión cúprico retenido en una matriz (L).²⁶

La cinética de descomposición de peróxido de hidrógeno depende, principalmente de las condiciones experimentales, como el pH del medio, concentración de peróxido de hidrógeno y catalizador empleado. Cuando se emplean catalizadores heterogéneos, las propiedades estructurales y de superficie tienen gran influencia en la actividad catalítica. Hermanek y col.²⁷ estudiaron el efecto de las características estructurales de nanopartículas de óxido de hierro (III) (hematita) en la catálisis de la descomposición de peróxido de hidrógeno. Los resultados demostraron que la eficiencia catalítica está más fuertemente influenciada por la cristalinidad de las partículas que por su área superficial. Estos resultados implican que la actividad catalítica depende no sólo del área superficial del catalizador sino también, de la organización estructural y morfología de la superficie del mismo.

Dentro de los metales acoplados al H_2O_2 para la remoción de contaminantes del agua, se encuentra el hierro (II), el cual es conocido como reactivo de Fenton. Sin embargo, este compuesto es activo entre pH 2 y 5, su capacidad catalítica declina rápidamente fuera de este intervalo de pH. Debido a que el pH de la mayoría de aguas contaminadas está comprendido entre 6 y 8, surge el uso de otros metales como el cobre (II), que permitan generar radicales hidroxilo en medios con pH neutro.²⁹ La actividad catalítica del cobre (II) en la descomposición de peróxido de hidrógeno para generar el radical hidroxilo se mejora notablemente complejando el ión con piridina, ácidos orgánicos, aminoácidos y otros agentes quelantes. Cabe destacar que, la recuperación de estos compuestos es muy costosa, dado que son solubles en agua.³⁰ Con el fin de recuperar el catalizador luego de la reacción y, no

generar contaminantes secundarios, el uso de metales inmovilizados en soportes sólidos representan una alternativa interesante.

En función de evaluar la posibilidad de emplear las esferas sintetizadas con cobre (II) inmovilizado, como catalizadores de la descomposición de peróxido de hidrógeno, se estudió la matriz de Ch-BDGE-BBh+Cu, la cual retuvo mayor cantidad de Cu (II), y se comparó con las matrices de Ch-BDGE, Ch-BDGE+Cu, Ch-BDGE-BBh y Ch-BDGE-BBh+Cu. En la figura 9.7, se muestra los moles de peróxido de hidrógeno por mililitro de solución, determinados para cada sistema en contacto con la solución de peróxido de hidrógeno, y la solución de H_2O_2 sin esferas (blanco).

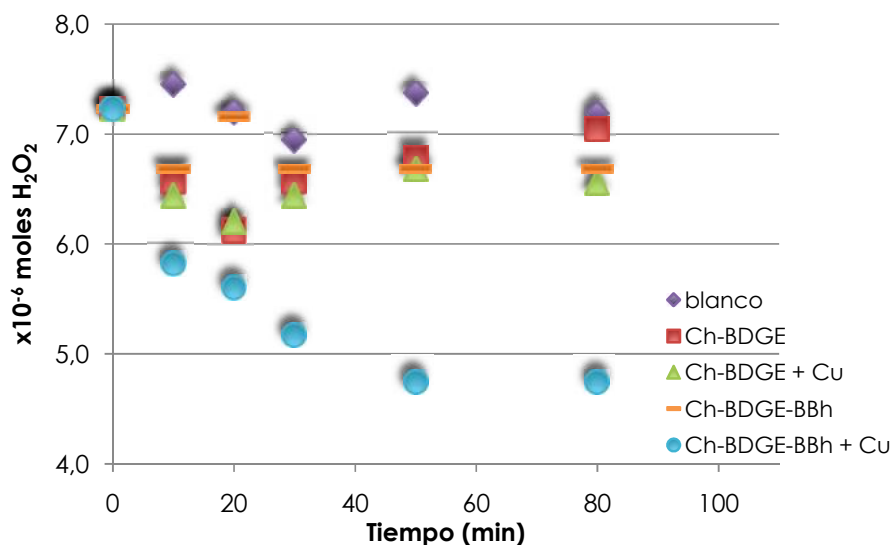


Figura 9.7. Gráfico de descomposición de peróxido de hidrógeno.

Las matrices no presentaron actividad catalítica, a excepción de Ch-BDGE-BBh+Cu. Estos resultados indican que las matrices sin cobre no afectan al peróxido de hidrógeno y que la matriz Ch-BDGE+Cu no tiene al cobre (II) accesible para la catálisis de la descomposición de H_2O_2 . Los porcentajes de descomposición de H_2O_2 para estas matrices fueron alrededor del 8% (empleando 6,6 mg de matriz).

Por otro lado, en las esferas Ch-BDGE-BBh con cobre (II) retenido se observó una marcada diferencia en la catálisis de la reacción estudiada, con respecto al resto de esferas. La matriz con cobre (II) adsorbido favoreció la descomposición de H_2O_2 , alcanzando un 35% de descomposición a los 50 minutos de contacto con 6,6 mg de la muestra y 0,6 mg de cobre II (calculado en función del porcentaje de cobre retenido). Probablemente, el ión cobre se encuentre coordinado con los grupos funcionales periféricos del BBh, de tal forma que sea más accesible para favorecer la actividad catalítica del metal.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se destaca la importancia de la presencia del dendrón como ligando para cobre (II), al generar una disposición espacial del ligando metálico la cual es fundamental para la catálisis de la reacción de descomposición de peróxido de hidrógeno. Dado que no existen antecedentes bibliográficos de matrices basadas en polímeros naturales con estructuras dendríticas, empleadas como ligando para soporte de iones metálicos, es importante mencionar la relevancia de este estudio al postular el uso de estos novedosos materiales como soportes catalíticos.

9.2. MATRICES PARA EL TRANSPORTE DE FÁRMACOS

Las nano/micropartículas poliméricas, biodegradables y biocompatibles, han atraído considerable atención como potenciales vehículos para liberación controlada y sitio específico de fármacos. Como se mencionó anteriormente, este tipo de formulaciones presentan varias ventajas con respecto a los sistemas unitarios, entre ellas se puede mencionar una dispersión uniforme en el tracto gastro-intestinal, absorción más uniforme del fármaco, menor variabilidad inter e intra-individual y procesos de formulación más flexible.⁴ Por otro lado, hay diferentes trabajos que postulan el alto potencial de las esferas de quitosano para el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos, dado que combina tanto propiedades de bioadhesión como de biocompatibilidad.^{11,31}

Además, hay distintos estudios que conducen a la conclusión que la respuestas de organismos huésped a la presencia de nanomateriales es diferente y evidentemente, muy superior comparada con los materiales convencionales usados.^{3,32} Para que un injerto de hueso sea exitoso, se ha observado que un biomaterial con rasgos superficiales a escala nanométrica, poseen mayor capacidad para inmovilizar factores de crecimiento y otras biomoléculas, lo cual podría representar avances destacables.

Desde este punto de vista, las moléculas dendríticas con múltiples grupos funcionales periféricos, podrían permitir una incorporación simultánea de fármacos y ligandos biológicos para un *targeting* activo a sitios específicos.

En función de estudiar la posible aplicación de las esferas Ch-ECH-dendrones, como sistema de transporte de fármacos, se evaluó la retención y liberación de nimodipina (Nimo). Este fármaco, figura 9.8, se empleó como modelo para estudiar el comportamiento de las esferas, debido a la dificultad del transporte de este tipo de moléculas altamente hidrofóbicas dentro del tracto gastrointestinal. Se seleccionaron las matrices de Ch-ECH-dendrones, que presentaron una mayor respuesta al pH del medio.

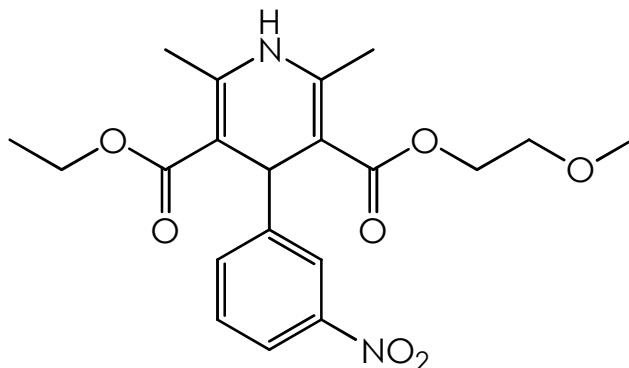


Figura 9.8. Estructura de Nimodipina (Nimo).

En la tabla 9.3 se presentan los resultados tanto de retención como de liberación del fármaco estudiado. Cabe destacar que, la retención de Nimo se realizó colocando en contacto las esferas con una solución del fármaco en etanol, y la liberación del mismo en contacto con una solución *buffer* fosfato, pH 6,8.

Tabla 9.3. Valores de retención y liberación de Nimo.

Matriz	Retención de Nimo		Liberación de Nimo
	mg/g matriz	%	mg/g matriz
Ch-ECH	16,5±0,5	53±3	2,2±0,3
Ch-ECH-AB	21,9±0,5	71±3	11,7±0,5
Ch-ECH-ABh	22,1±0,7	54±3	3,9±0,3
Ch-ECH-BB	22,5±0,6	69±4	4,1±0,1
Ch-ECH-BBh	18,5±0,6	58±3	4,6±0,3

Los valores de retención del fármaco son mayores para Ch-ECH-dendrones respecto a Ch-ECH, lo cual indica que la presencia de los dendrones es favorable para la retención. Por otro lado, se observa que los porcentajes de retención de Nimo es mayor para los sistemas con dendrones con grupos periféricos hidrofóbicos (Ch-ECH-AB y Ch-ECH-BB), con respecto a los correspondientes dendrones que poseen grupos periféricos hidrofílicos (Ch-ECH-ABh y Ch-ECH-BBh). Esto se debe probablemente, a la naturaleza hidrofóbica del fármaco estudiado.

Es importante destacar que, Ch-ECH-BB alcanza porcentajes de retención semejante a Ch-ECH-AB, con menor grado de dendronización y mayor cantidad de grupos periféricos por molécula dendrítica (6 grupos periféricos).

Por otro lado, los máximos de liberación del fármaco alcanzado al cabo de 7 horas son semejantes para todos los sistemas. La matriz que presento una mayor liberación del fármaco fue Ch-ECH-AB y, a su vez, mayor porcentaje liberado en relación al fármaco retenido.

Los resultados de liberación muestran que las esferas de Ch-ECH-AB presentaron un mejor comportamiento para emplearlos en el transporte del fármaco hidrofóbico, el cual presento un mayor porcentaje de fármaco liberado desde la matriz durante 7 horas (tiempo evaluado).

CONCLUSIONES PARCIALES DE ESFERAS



- ∅ Se sintetizó y caracterizó exitosamente el dendrón de primera generación *N,N'*-bis[Tris(*t*-butoxicarbonil)etil]metil]-5-aminoftalamida (BB), con un punto focal amino y seis grupos periféricos *tert*-butilo.
- ∅ Se obtuvo a través de una técnica sencilla y eficiente esferas de quitosano de tamaño y forma homogénea, las cuales fueron modificadas

exitosamente con distintas moléculas dendríticas, previa activación de la matriz con espaciadores.

- Ø La activación de las esferas se realizó con dos tipos de espaciadores: ECH y BDGE, los cuales permitieron obtener matrices con grupos epóxido activos para la unión covalente de los dendrones. A partir de la diferencia en el largo de la cadena carbonada de estas moléculas, se observó que el espaciador más largo, BDGE, favorece una mayor unión con los dendrones. Además, BDGE es más afín a la matriz, modificando no sólo la superficie sino también el interior de las esferas, actuando tanto como espaciador como entrecruzante. En tanto, ECH permitió una modificación principalmente en la superficie de las esferas.
- Ø Se unieron exitosamente dendrones a las esferas basadas en quitosano. El grado de dendronización se encuentra afectado por impedimento estérico, generado por el tamaño de la estructura dendrítica (BB mayor que AB) y el largo del espaciador empleado (BDGE mayor que ECH).
- Ø A partir de la caracterización fisicoquímica de las esferas se corroboró la formación de la unión química en las distintas reacciones involucradas y se evaluaron diferentes características de las mismas para sus potenciales usos.
- Ø Los distintos estudios realizados para evaluar las posibles aplicaciones, demostraron la importancia de la multifuncionalidad de la estructura dendrítica: la naturaleza química y cantidad de los grupos periféricos. Se evidenció el conocido efecto dendrítico o multivalente en estudios de hinchamiento y retención de moléculas de interés (cobre (II) y nimodipina).
- Ø La retención del ión cobre (II) fue efectiva en las esferas modificadas con los dendrones estudiados, y es afectada por la cantidad y naturaleza química de los grupos funcionales periféricos. Además, se vio afectado por el tipo de activador empleado y el grado de dendronización.

- Ø El empleo de las esferas como catalizadores de la reacción de descomposición de peróxido de hidrógeno, demostró la importancia de la estructura dendrítica para proveer la superficie adecuada para que transcurra la reacción y acelerar dicho proceso.

- Ø En cuanto al uso como retención de una biomolécula (BSA como modelo), se obtuvieron valores de adsorción de BSA óptimos comparando con datos bibliográficos.

- Ø Los estudios realizados como transportadores de fármacos demostraron que las esferas estudiadas fueron capaces de retener el fármaco empleado como modelo (Nimodipina) y luego liberarlo durante un periodo de 7 horas, presentando el sistema Ch-ECH-AB un mejor comportamiento.

- Ø La modificación efectiva de las matrices con ácido fólico podría conferirle a estos sistemas la característica de transporte activo al sitio de unión. Esto permite predecir el potencial de estos sistemas a escala nanométrica, como *carriers* para transporte de fármacos oncológicos, por ejemplo.

Bibliografía

- (1) Bagul, R. S.; Jayaraman, N. Efficacies of multivalent vs monovalent poly(ether imine) dendritic catalysts within a generation in multiple C–C bond forming reactions, *J. Organomet. Chem.* **2012**, *701*, 27.
- (2) Aldana, A. A.; Toselli, R.; Strumia, M. C.; Martinelli, M. Chitosan films modified selectively on one side with dendritic molecules, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 22670.
- (3) Östmark, E.; Lindqvist, J.; Nyström, D.; Malmström, E. Dendronized hydroxypropyl cellulose: synthesis and characterization of biobased nanoobjects, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3815.
- (4) Alaa Eldeen B. Yassin, I. A. A. a. A. M. A.-M. Chitosan beads as a new gastroretentive system of verapamil, *Sci. Pharma.* **2006**, *74*, 175.
- (5) Hagen, J. *Industrial Catalysis: A Practical Approach*; Wiley, 2006.
- (6) Lee, H.; Neville, K. *Handbook of epoxy resins*; McGraw-Hill, 1967.
- (7) Souza, N. L. G. D.; Brandão, H. M.; de Oliveira, L. F. C. Spectroscopic and thermogravimetric study of chitosan after incubation in bovine rumen, *J. Mol. Struct.* **2011**, *1005*, 186.
- (8) Laus, R.; Costa, T. G.; Szpoganicz, B.; Fávère, V. T. Adsorption and desorption of Cu(II), Cd(II) and Pb(II) ions using chitosan crosslinked with epichlorohydrin-triphosphate as the adsorbent, *J. Hazard. Mater.* **2010**, *183*, 233.
- (9) Lee, C. C.; MacKay, J. A.; Frechet, J. M. J.; Szoka, F. C. Designing dendrimers for biological applications, *Nat. Biotech.* **2005**, *23*, 1517.
- (10) Lee, C. C.; Yoshida, M.; Frechet, J. M. J.; Dy, E. E.; Szoka, F. C. In vitro and in vivo evaluation of hydrophilic dendronized linear polymers, *Bioconjug. Chem.* **2005**, *16*, 535.
- (11) Mourya, V. K.; Inamdar, N. N. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore, *React. Funct. Polym.* **2008**, *68*, 1013.
- (12) Yang, S.-J.; Lin, F.-H.; Tsai, K.-C.; Wei, M.-F.; Tsai, H.-M.; Wong, J.-M.; Shieh, M.-J. Folic Acid-Conjugated Chitosan Nanoparticles Enhanced Protoporphyrin IX Accumulation in Colorectal Cancer Cells, *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 679.
- (13) Chan, P.; Kurisawa, M.; Chung, J. E.; Yang, Y.-Y. Synthesis and characterization of chitosan-g-poly(ethylene glycol)-folate as a non-viral carrier for tumor-targeted gene delivery, *Biomaterials* **2007**, *28*, 540.
- (14) Porath, J.; Olin, B. Immobilized metal affinity adsorption and immobilized metal affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions, *Biochemistry* **1983**, *22*, 1621.
- (15) Z. Y. Ma, Y. P. G., X. Q. Liu and H. Z. Liu Synthesis of Magnetic Chelator for High-Capacity Immobilized Metal Affinity Adsorption of Protein by Cerium Initiated Graft Polymerization, *Langmuir* **2005**, *21*, 6987.
- (16) Susan M. O'Brien, O. R. T. T., Peter Dunnill Non-porous magnetic chelator supports for protein recovery by immobilised metal affinity adsorption, *J. Biotechnol.* **1996**, *50*, 13.
- (17) Xi, F.; Wu, J. Macroporous chitosan layer coated on non-porous silica gel as a support for metal chelate affinity chromatographic adsorbent, *J. Chromatogr. A* **2004**, *1057*, 41.
- (18) Popuri, S. R.; Vijaya, Y.; Boddu, V. M.; Abburi, K. Adsorptive removal of copper and nickel ions from water using chitosan coated PVC beads, *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 194.
- (19) Šuláková, R.; Hrdina, R.; Soares, G. M. B. Oxidation of azo textile soluble dyes with hydrogen peroxide in the presence of Cu(II)-chitosan heterogeneous catalysts, *Dyes Pigmen.* **2007**, *73*, 19.

- (20) Rajiv Gandhi, M.; Kousalya, G. N.; Viswanathan, N.; Meenakshi, S. Sorption behaviour of copper on chemically modified chitosan beads from aqueous solution, *Carbohydr. Polym.* **2011**, *83*, 1082.
- (21) Valstar, A.; Almgren, M.; Brown, W.; Vasilescu, M. The Interaction of Bovine Serum Albumin with Surfactants Studied by Light Scattering, *Langmuir* **2000**, *16*, 922.
- (22) Xi, F.; Wu, J. Macroporous chitosan layer coated on non-porous silica gel as a support for metal chelate affinity chromatographic adsorbent, *J. Chromatogr. A* **2004**, *1057*, 41.
- (23) Shi, Q. H.; Tian, Y.; Dong, X. Y.; Bai, S.; Sun, Y. Chitosan-coated silica beads as immobilized metal affinity support for protein adsorption, *Biochem. Eng. J.* **2003**, *16*, 317.
- (24) Klajnert, B.; Stanisławska, L.; Bryszewska, M.; Patecz, B. Interactions between PAMAM dendrimers and bovine serum albumin, *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1648*, 115.
- (25) Klajnert, B.; Bryszewska, M. Fluorescence studies on PAMAM dendrimers interactions with bovine serum albumin, *Bioelectrochem.* **2002**, *55*, 33.
- (26) Lázaro Martínez, J. M.; Rodríguez-Castellón, E.; Sánchez, R. M. T.; Denaday, L. R.; Buldain, G. Y.; Campo Dall'Orto, V. XPS studies on the Cu(I,II)-polyampholyte heterogeneous catalyst: An insight into its structure and mechanism, *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2011**, *339*, 43.
- (27) Hermanek, M.; Zboril, R.; Medrik, I.; Pechousek, J.; Gregor, C. Catalytic Efficiency of Iron(III) Oxides in Decomposition of Hydrogen Peroxide: Competition between the Surface Area and Crystallinity of Nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10929.
- (28) Watts, R. J.; Teel, A. L., *J. Environ. Eng. (Reston, Va.)* **2005**, *131*, 612.
- (29) Hu, X.; Lam, F. L. Y.; Cheung, L. M.; Chan, K. F.; Zhao, X. S.; Lu, G. Q. Copper/MCM-41 as catalyst for photochemically enhanced oxidation of phenol by hydrogen peroxide, *Catal. Today* **2001**, *68*, 129.
- (30) Lázaro Martínez, J. M.; Leal Denis, M. F.; Piehl, L. L.; de Celis, E. R.; Buldain, G. Y.; Campo Dall'Orto, V. Studies on the activation of hydrogen peroxide for color removal in the presence of a new Cu(II)-polyampholyte heterogeneous catalyst, *Appl. Catal. B: Environ.* **2008**, *82*, 273.
- (31) Jayakumar, R.; Menon, D.; Manzoor, K.; Nair, S. V.; Tamura, H. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review, *Carbohydr. Polym.* **2010**, *82*, 227.
- (32) Duarte, M. L.; Ferreira, M. C.; Marvão, M. R.; Rocha, J. An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy, *Int. J. Biol. Macromol.* **2002**, *31*, 1.

Consideraciones generales

Un biomaterial puede ser definido como un material destinado a interactuar con sistemas biológicos, para diagnosticar, tratar, regenerar o substituir tejidos, órganos o funciones del cuerpo.¹ Los biomateriales desempeñan un papel importante en la salud humana. En los últimos años, una revolución en ingeniería de tejidos, medicina regenerativa, terapia génica y liberación controlada de fármacos promovieron la necesidad de preparar biomateriales con nuevas propiedades y control de su biodegradabilidad. La tendencia actual, predice que en los próximos años, muchos de los soportes permanentes utilizados para aplicaciones terapéuticas temporarias, sean substituidos por soportes biodegradables que puedan ayudar al cuerpo a reparar y regenerar los tejidos dañados.²

Los polímeros naturales y sus derivados han atraído considerablemente su atención para su empleo como biomateriales. Entre los biopolímeros más empleados se pueden mencionar a alginato, quitina, quitosano, ácido hialurónico, celulosa, dextrano y heparina.³⁻⁷ Las matrices poliméricas pueden ser obtenidas como geles, esponjas y películas, entre otras. Estas últimas, tienen una gran importancia para su aplicación en el campo de la biomedicina.

El empleo de quitosano como biomaterial, se debe a sus conocidas ventajas de biocompatibilidad, biodegradabilidad, no tóxicos y capacidad antibacteriana. Hay numerosos trabajos que proponen el empleo del mismo y sus derivados^{6,8-11} como soportes para aplicaciones biomédicas. Además, estos polímeros naturales han atraído considerablemente la atención debido a que generalmente, no son costosos, hay una alta disponibilidad de fuentes renovables y pueden ser modificados químicamente.¹² Sin embargo, los soportes basados en polímeros naturales presentan muchas limitaciones en cuanto a su procesamiento, debido a las malas propiedades mecánicas. Para superar estos inconvenientes surgen diferentes alternativas, como la combinación de polímeros naturales y sintéticos, el entrecruzamiento de los biopolímeros, la inclusión de agentes plastificantes, etc. Por ejemplo, se ha

reportado que las propiedades hidrofílicas y mecánicas pueden ser modificadas mezclando quitosano con polietilenglicol (PEG) y polivinilalcohol (PVA).¹³El quitosano también ha sido combinado con diferentes polímeros como poliamidas, poli(ácido acrílico), gelatina y celulosa.^{12,14-16}

Por otro lado, la superficie de un biomaterial es de gran importancia debido a que es el primer punto de contacto con otros sistemas. Una interacción inadecuada entre los polímeros utilizados como soportes y las células, conducen a reacciones típicas como inflamación, infección, fibrosis, embolia, trombosis, alergia, encapsulamiento del implante, hasta pueden llegar a inducir cáncer; debido a que los materiales poliméricos se reconocen como cuerpos extraños.^{17,18} A fin de aumentar la biocompatibilidad y, en particular, las funcionalidades de los materiales usados en ingeniería de tejidos, el empleo creciente de técnicas de modificación de superficie está siendo realizada utilizando diversas metodologías. Estas modificaciones de superficies tienen como primer objetivo superar la baja energía superficial de las matrices poliméricas a fin de mejorar su eficiencia en aplicaciones médicas, biotecnológicas e industriales.^{19,20}

Una forma de modificar la superficie de materiales, es la introducción de moléculas determinadas. Los dendrones tienen dimensiones nanométricas y su inmovilización en superficies podría conducir a características estructurales en esta dimensión. De esta manera, las superficies nanoestructuradas empleando diferentes tipos de dendrones, podrían ser obtenidas con un buen control sobre la morfología y las propiedades de superficie, tal como la mojabilidad, rugosidad, reactividad química y dureza. En consideración del control sobre la geometría, el tamaño y la funcionalidad, los dendrones son interesantes para la modificación de la superficie y la ampliación de la superficie activa. Al mismo tiempo, una alta densidad de grupos funcionales en la periferia de estructuras dendríticas, le confiere a los mismos la posibilidad de emplearlos como candidatos ideales como espaciadores y entrecruzantes entre la superficie del sustrato y las macromoléculas biológicas. Un ejemplo del empleo de dendrones como mediadores, es la electrocatálisis de la oxidación de adenina dinucleótidonicotinamida sobre electrodos de carbón.²¹ Las propiedades electroquímicas están directamente relacionadas con el número de grupos funcionales electroactivos incorporados en la molécula dendrítica,

la cual puede ser controlada mediante la síntesis del mismo.²² Otro ejemplo interesante ha sido establecido por Haag y col.,¹⁸ quienes demostraron que la presencia de grupos flexibles e hidrofílicos, combinados con una arquitectura altamente ramificada, pueden conducir a una mayor resistencia a la adsorción de proteínas.

En los últimos años, se ha despertado el interés en el empleo de estructuras dendríticas en el estudio de adhesión celular y en aplicaciones de ingeniería tisular.^{23,24} Un ejemplo relevante, ha sido el incremento significativo en la afinidad de células epiteliales sobre superficies dendronizadas, donde los periodos de incubación prolongados aumentaron la densidad celular sobre las mismas.²⁴ La dendronización de superficies de biomateriales podría introducir propiedades específicas para una aplicación concreta, resultando importante los avances que puedan realizarse en esta área.

En este contexto, el principal objetivo de esta sección fue el desarrollo de películas basadas en quitosano, con la modificación de la superficie con estructuras dendríticas, a fin de obtener superficies dendronizadas nano-estructuradas con potenciales aplicaciones biomédicas. Se empleó un dendrón tipo Newkome con antecedentes de biocompatibilidad.²⁵

Cabe destacar que, la dendronización se realizó sobre una sola cara de las películas, con el objetivo de obtener matrices con diferentes características hidrofílicas/hidrofóbicas en cada cara, y evaluar la influencia en las propiedades del polímero.

Capítulo 11

OBTENCIÓN DE PELÍCULAS DENDRONIZADAS



En el presente capítulo se presenta la síntesis de películas de quitosano Ch-PVP y Ch-Gen (inciso 11.1), la dendronización de las películas con weisociano, Ch-PVP-W y Ch-Gen-W (inciso 11.3) y su caracterización (inciso 11.3).

11.1. PREPARACIÓN DE PELÍCULAS DE QUITOSANO

Las modificaciones químicas de quitosano fueron propuestas para mejorar las propiedades mecánicas y la estabilidad química del polímero natural en medio ácido, dado que el polímero se disuelve a valores de pH menores a 6. Además, los materiales resultantes podrán tener una mayor resistencia a la degradación bioquímica y microbiológica.

Se emplearon dos tipos de entrecruzantes: polivinilpirrolidona (PVP) y genipina (Gen). El primero tiene la capacidad de formar uniones físicas con el quitosano, a través de uniones puente hidrógeno, mientras que, la genipina forma uniones covalentes con los grupos amino del quitosano.

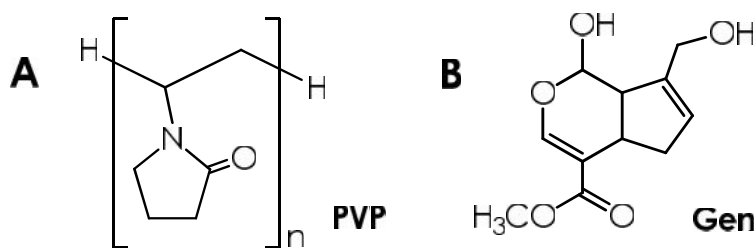


Figura 11.1. Estructuras química de polivinilpirrolidona (A) y genipina (B).

PVP es un polímero vinílico lineal no iónico con grupos laterales polares, debido al enlace lactama (figura 12.1- A). Este polímero ha sido ampliamente empleado en diferentes áreas como medicina, farmacia, cosmética, alimentos y muchos otros, debido a su buena solubilidad, excelente afinidad con diversos polímeros y resinas, por ser no tóxico, biodegradable y biocompatible.²⁶

Por otra parte, Gen (figura 11.1- B) se aísla del fruto de la planta *Gardenia jasminoides Ellis*. Este compuesto es conocido por su bajísima toxicidad y por ser ideal para uso clínico.²⁷ Sung y col.²⁸ compararon la citotoxicidad de la genipina con la de glutaraldeído usando ensayos *in vitro* con fibroblastos. Los resultados demostraron que, la genipina fue alrededor de 10.000 veces menos citotóxica que el entrecruzante de origen sintético.

Además, la genipina ha demostrado ser un agente entrecruzante natural efectivo, el cual puede reaccionar espontáneamente con grupos amino de proteínas u otros compuestos, para formar pigmentos de color azul oscuro.¹⁵

11.1.1. Obtención de Ch-PVP

Para obtener la unión física entre Ch y PVP se procedió al mezclado de ambos polímeros en medio ácido, el cual es uno de los métodos más efectivos para obtener nuevos materiales, adecuados para uso biomédico.^{9,10,12} Luego, la película Ch-PVP fue obtenida por el método *casting*, que consiste en colocar una solución en un molde, placas de Petri en este caso, y posteriormente, dejar evaporar lentamente el solvente (inciso 14.2.4). Se empleó una relación de 18 g de PVP cada 100 g de Ch. Se obtuvo una película de Ch-PVP traslúcida, constituida por una red entrecruzada físicamente por uniones puente hidrógeno entre Ch y PVP (figura 11.2). Se determinó un entrecruzamiento del 93,7 % por el *test* de ninhidrina.²⁹

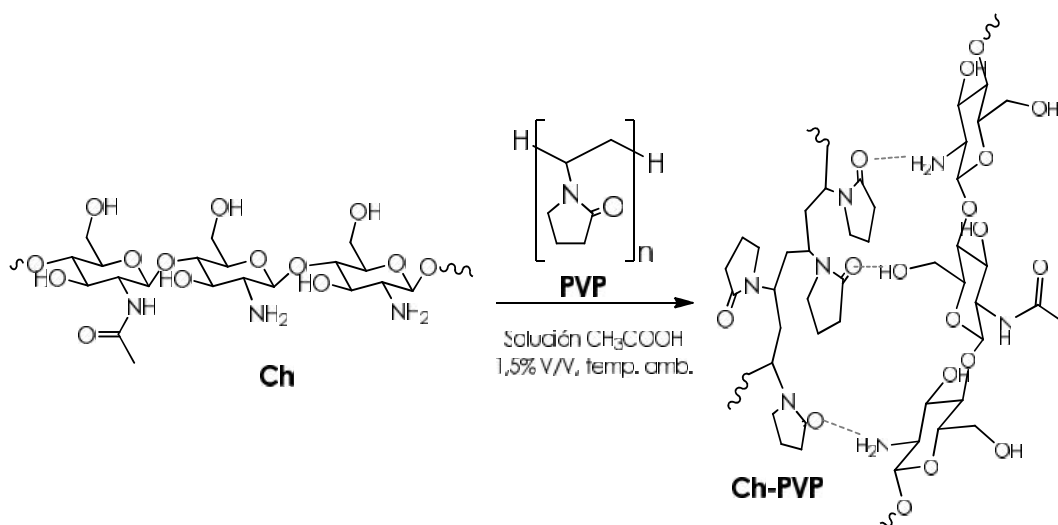


Figura 11.2. Esquema de entrecruzamiento físico entre Ch y PVP.

Se caracterizó la película obtenida por espectroscopia de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR). El espectro (figura 11.3) presenta a 1649 y 1400 cm^{-1} las bandas del enlace C=O y el enlace C-N del grupo lactama de la cadena de PVP. Además, se observó una disminución en la intensidad relativa de la banda a 894 cm^{-1} correspondiente al grupo amino de Ch.³⁰

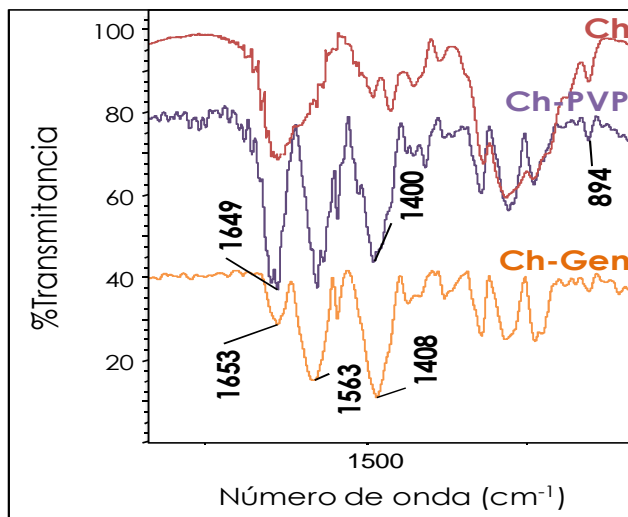


Figura 11.3. Ampliación del espectro ATR-FTIR de Ch, Ch-PVP y Ch-Gen.

11.1.2. Obtención de Ch-Gen

La película fue preparada usando una relación de 0,1 g de genipina por cada 100 g de Ch. Gen entrecruza químicamente sólo los grupos amino de la cadena de quitosano (figura 11.4-A).³¹ La reacción de entrecruzamiento entre genipina y quitosano ocurre a través de dos ataques nucleofílicos de los grupos amino de dos cadenas de Ch.³² El primer ataque es al carbono 3 (figura 11.4-B) de Gen, que da lugar a la formación de un compuesto heterocíclico de Gen unida al residuo de glucosamina en quitosano. La segunda reacción, más lenta, es el ataque nucleofílico del grupo amino de Ch al grupo éster de Gen, liberando metanol y formándose un enlace amida. En la figura 11.4 A y B se muestra un esquema de la primera y segunda reacción, respectivamente.

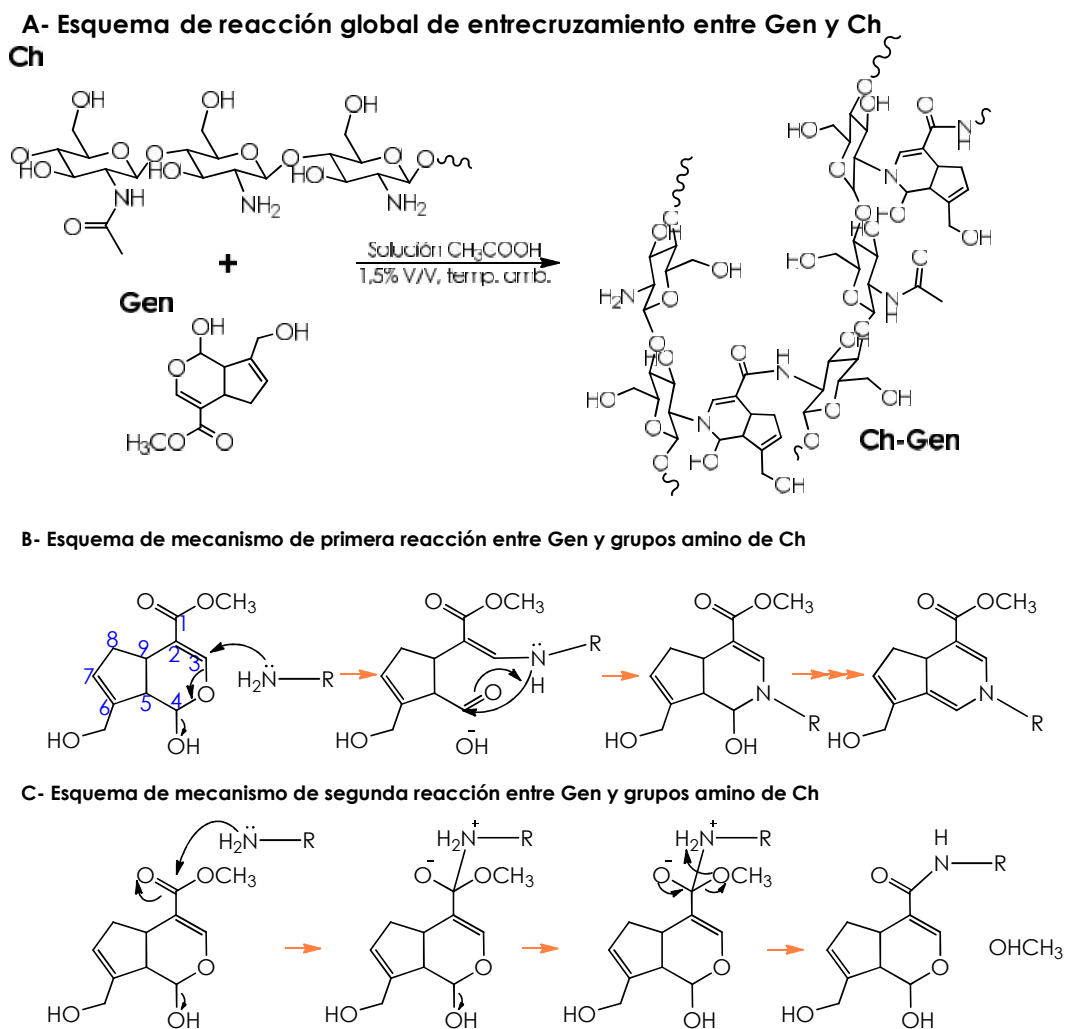


Figura 11.4. Esquema de entrecruzamiento entre Ch y Gen: reacción global (A), mecanismo de primera reacción (B) y segunda reacción (C).

Se obtuvo por el método *casting* (descrito anteriormente), una película de Ch-Gen, traslúcida celeste claro. Se determinó un grado de entrecruzamiento del 75,0% de acuerdo al *test* de ninhidrina.²⁹

El espectro ATR-FTIR de la película de Ch-Gen (figura 11.3), muestra la aparición a 1653 cm^{-1} de la banda del enlace $\text{C}=\text{O}$ del grupo amida, evidenciando la unión de Gen a Ch. Además, a 1563 cm^{-1} se observa el solapamiento de las bandas de vibración del enlace $\text{N}-\text{H}$ correspondiente al grupo amino de Ch y del grupo amida de la unión Ch-Gen.³² La señal de absorción del enlace $\text{C}-\text{N}$ del grupo amida aparece a 1408 cm^{-1} .

11.2. DENDRONIZACIÓN DE LAS PELÍCULAS. OBTENCIÓN DE Ch-PVP-W y Ch-Gen-W

Esta etapa fue llevada a cabo con el empleo de weisocianato, el cual es un dendrón tipo Newkome biocompatible, con un punto focal isocianato y con tres grupos periféricos hidrofóbicos.²⁵

Se diseñó un equipo para dendronizar selectivamente una sola cara de la película como se muestra en la figura 11.5.

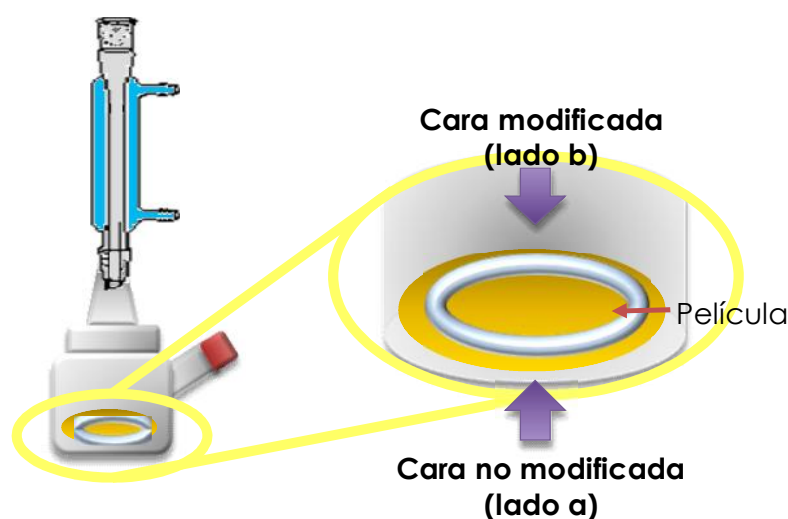


Figura 11.5. Esquema del equipo de dendronización y posición de la película dentro del mismo, para dar un lado no modificado (lado a) y otro modificado (lado b).

Las películas de quitosano dendronizadas fueron exitosamente preparadas por unión covalente del dendrón weisocianato (W), para obtener las películas Ch-PVP-W y Ch-Gen-W. La reacción ocurre por ataque nucleofílico de los grupos amino o hidroxilo libres de Ch al grupo isocianato del punto focal de W (figura 11.6), formándose la unión urea o uretano, respectivamente. La reacción se llevó a cabo de manera semejante a la descrita en el inciso 3.1.1.

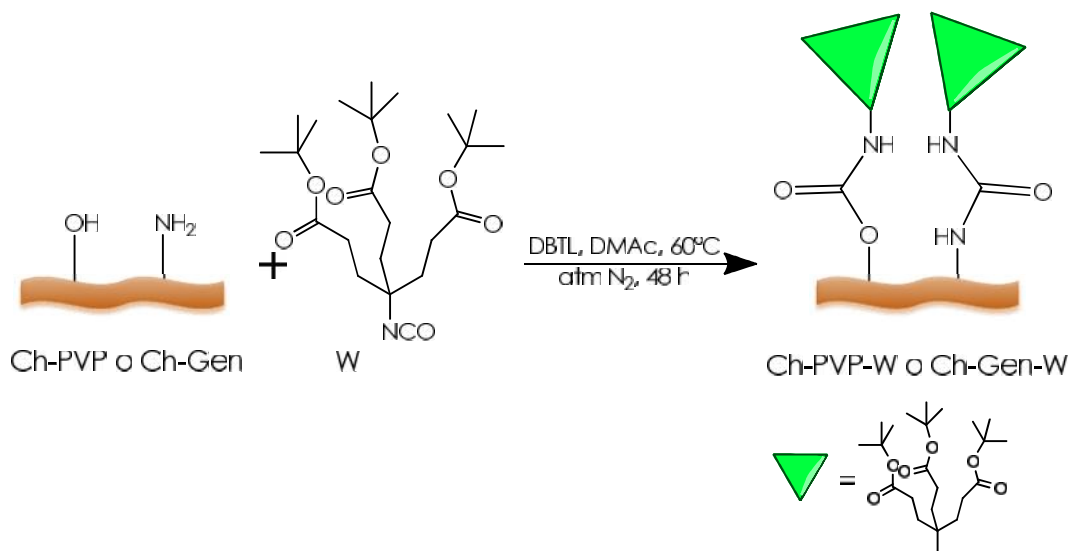


Figura 11.6. Esquema de reacción de películas de Ch (Ch-PVP y Ch-Gen) con weisocianato (W).

La dendronización sobre una de las caras de cada película, se evidenció por espectroscopia ATR-FTIR (figura 11.7).

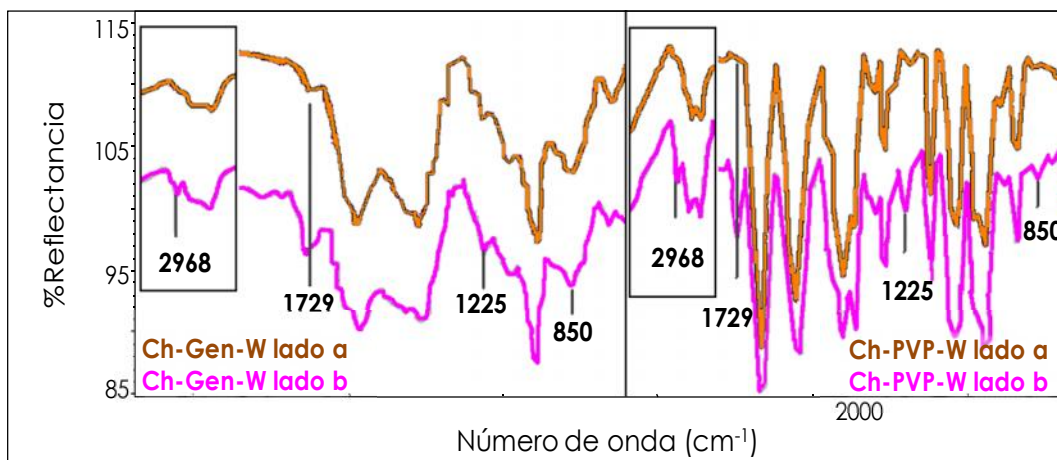


Figura 11.7. Espectro ATR/FT-IR de las películas obtenidas: a) Ch-Gen y Ch-Gen-W lado a y b; b) Ch-PVP y Ch-PVP-W lado a y b.

Claramente, el espectro correspondiente a una cara no mostró cambios luego del proceso de dendronización (lado a). Mientras que, el espectro de la

cara de las películas en contacto con el dendrón (lado b), presentó la aparición de las bandas características de W. Se asignaron las siguientes señales al dendrón: a 2968 cm^{-1} , señal de estiramiento del enlace C-H (de los grupos metilos periféricos); a 1225 cm^{-1} , señal de estiramiento del enlace C-O (del grupo éster $\text{O}=\text{C}-\text{O}$); y a 850 cm^{-1} , señal característica de la deformación del enlace C-O [del grupo $\text{O}-\text{C}-(\text{CH}_3)_3$]. Además, a 1729 cm^{-1} se observa la señal de estiramiento del enlace C=O del dendrón, que se superpone a las señales de los grupos urea o uretano, resultante de la unión de W a las películas.

Teniendo en cuenta que el espectro ART-FTIR se obtiene por la penetración de $2\text{ }\mu\text{m}$ del haz infrarrojo sobre la muestra, se concluyó que la modificación ocurrió en la superficie de las películas, dado a que el espesor de las mismas es entre 60 y $110\text{ }\mu\text{m}$.

Se determinó el grado de dendronización por titulación de los grupos aminos libres (*test* de ninhidrina); los valores fueron $8,67 \times 10^{-5}$ y $1,29 \times 10^{-5}$ mol por gramo de película para Ch-PVP-W y Ch-Gen-W, respectivamente.

Las películas de Ch-PVP a pesar de tener un mayor entrecruzamiento que las de Ch-Gen, mostraron un mayor grado de dendronización. Este comportamiento se podría explicar teniendo en cuenta las características estructurales de cada red. En la película Ch-PVP, las uniones puente hidrógeno son las responsables de la disminución de grupos amino de Ch. Sin embargo, al ser uniones físicas, pueden ser reversibles y permitir la unión covalente con W. Además, es importante destacar la capacidad de adsorción y de complejamiento a diferentes tipos de moléculas que posee PVP.³⁰ En contraste, las películas de Ch-Gen son redes entrecruzadas covalentemente, dejando únicamente los grupos aminos libres, disponibles para la reacción de dendronización. Por lo tanto, un mayor entrecruzamiento en estas películas, dificulta la unión del dendrón.

11.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS PELÍCULAS OBTENIDAS

11.3.1. Análisis térmico

El comportamiento térmico de las películas fue analizado por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termo-gravimétrico (TGA), como se muestra en la tabla 11.1 y la figura 11.8.

Tabla 11.1. Análisis térmico de películas obtenidas.

Películas	TGA	DSC	
	Picos de máxima degradación (°C)	Agua adsorbida (°C)	Degradación (°C)
Ch-Gen	268,8	169,9	285,8
Ch-Gen-W	279,6	140,3 y 197,7	292,6
Ch-PVP	285,6	155,5	288,9
Ch-PVP-W	290,1	143,5	296,3

En el análisis de TGA, la temperatura de inicio de la degradación termo-oxidativa de las películas se observó aproximadamente 280°C y alcanza un máximo de pérdida de masa cercano al 100% aproximadamente a 400°C. Comparando los termogramas y los máximos de pérdida de masa, se puede decir que la dendronización de las películas (Ch-PVP-W y Ch-Gen-W) aumenta levemente la estabilidad térmica de las mismas. La presencia del dendrón crea nuevas interacciones entre las cadenas del polímero y probablemente, induce a una mayor organización de las cadenas a nivel molecular, conduciendo al aumento observado del máximo de temperatura de degradación.

En cuanto a la curva de DSC (figura 11.8-B), se observa un pico exotérmico, correspondiente al agua adsorbida, a 140°C y 143°C en Ch-Gen-W y Ch-PVP-W, respectivamente.

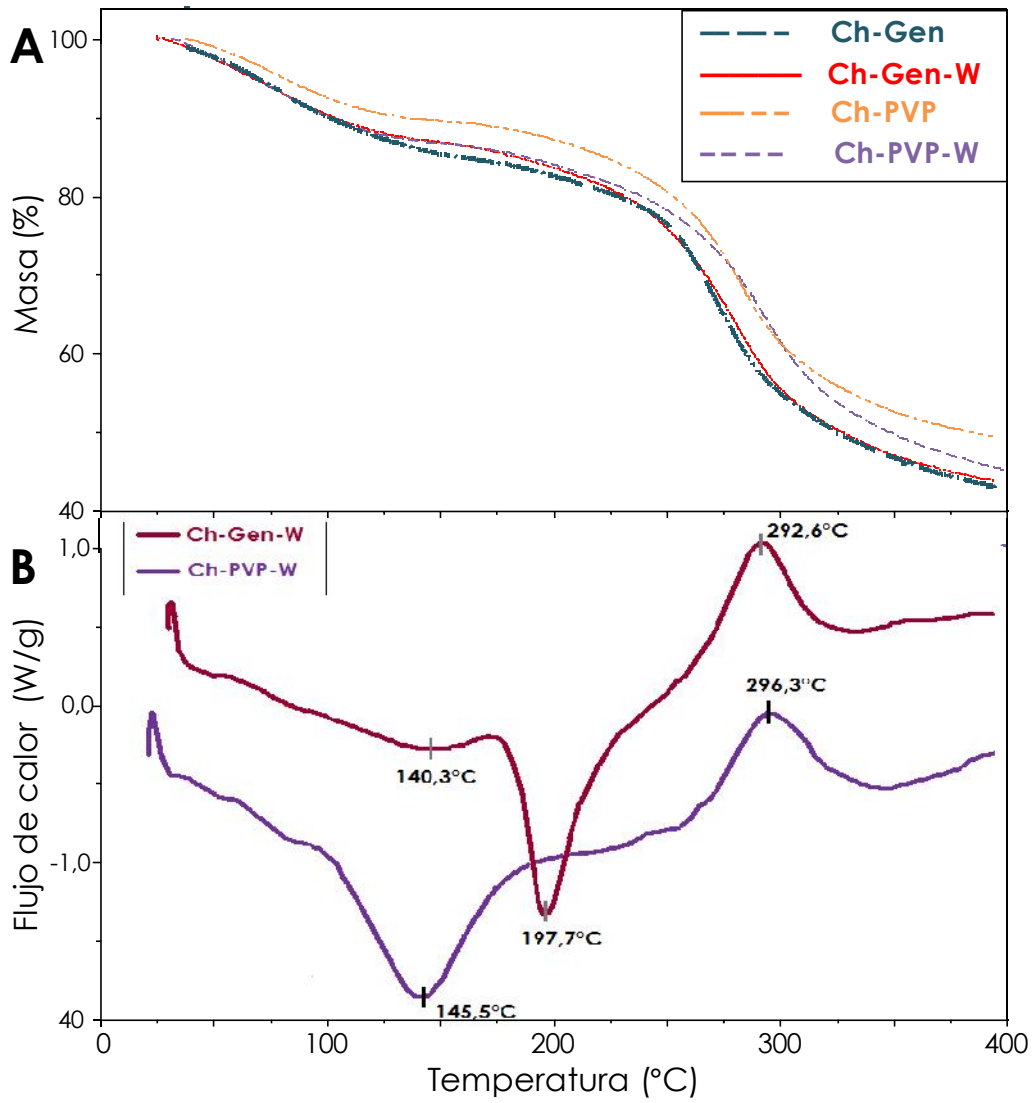


Figura 11.8. Curvas de TGA (A) y DSC (B) de las películas obtenidas.

En la curva de DSC de Ch-Gen-W, otro pico exotérmico aparece a 198°C, probablemente, debido al agua adsorbida en la red entrecruzada covalentemente. Además, la curva de DSC muestra un pico endotérmico a 292 (Ch-Gen-W) y 296°C (Ch-PVP-W) correspondiente probablemente a la degradación del polímero, incluyendo anillos sacáridos, deshidratación, despolimerización, descomposición, y desacetilación de quitosano. Estos picos han sido reportados por Silva *et al.*³³

Los picos endotérmicos y exotérmicos del análisis por DSC, han sido asignados a procesos de degradación, fusión cristalina y desnaturalización, y el área debajo del pico representa una medida de las propiedades de la muestra.^{5,34} Por lo tanto, el incremento en la estabilidad térmica de las películas dendronizadas podría indicar que hay una distribución de tamaños cristalinos en las películas, es decir, los dendrones podrían estar ordenados cristalinamente sobre una de las caras de estas películas.

11.3.2. Técnicas microscópicas

Las técnicas de microscopía se emplean para conocer la arquitectura y estructura de películas. La microscopía óptica y la microscopía de fuerza atómica (AFM) son dos de las técnicas más usadas por los investigadores para la caracterización de la estructura y topografía de películas a escala micro- y nano-métricas, respectivamente.

11.3.2.1. Microscopía óptica y análisis de la imagen

Se realizó un análisis de las imágenes obtenidas por microscopía óptica (figura 11.9), comparando ambas caras de la película Ch-PVP-W con Ch-PVP. Se muestran las imágenes ópticas en escala de grises (figura 11.9- I), los gráficos tridimensionales de superficie en pixeles en función de intensidad de luz reflejada (II), y un gráfico del perfil de una sección de cada película (III).

En la figura 11.9-II-A, se observa una diferencia significativa de la intensidad de la luz reflejada entre ambas caras de la película (lado a y b). Una de las caras (lado b de Ch-PVP-W), presentó una mayor reflexión de la luz incidente con respecto a la superficie de Ch-PVP.

Además, el perfil (figura 11.9-III-A) de la superficie de Ch-PVP-W (lado b), entre 300 y 400 pixeles, es más irregular que la superficie de Ch-PVP, entre 0 y 180 pixeles. Cabe aclarar que la región entre 180 y 300 pixeles, gráfico III de la figura 12.9-A, corresponde a una zona donde no hay película y al efecto del borde generado por el programa empleado (ver parte experimental).

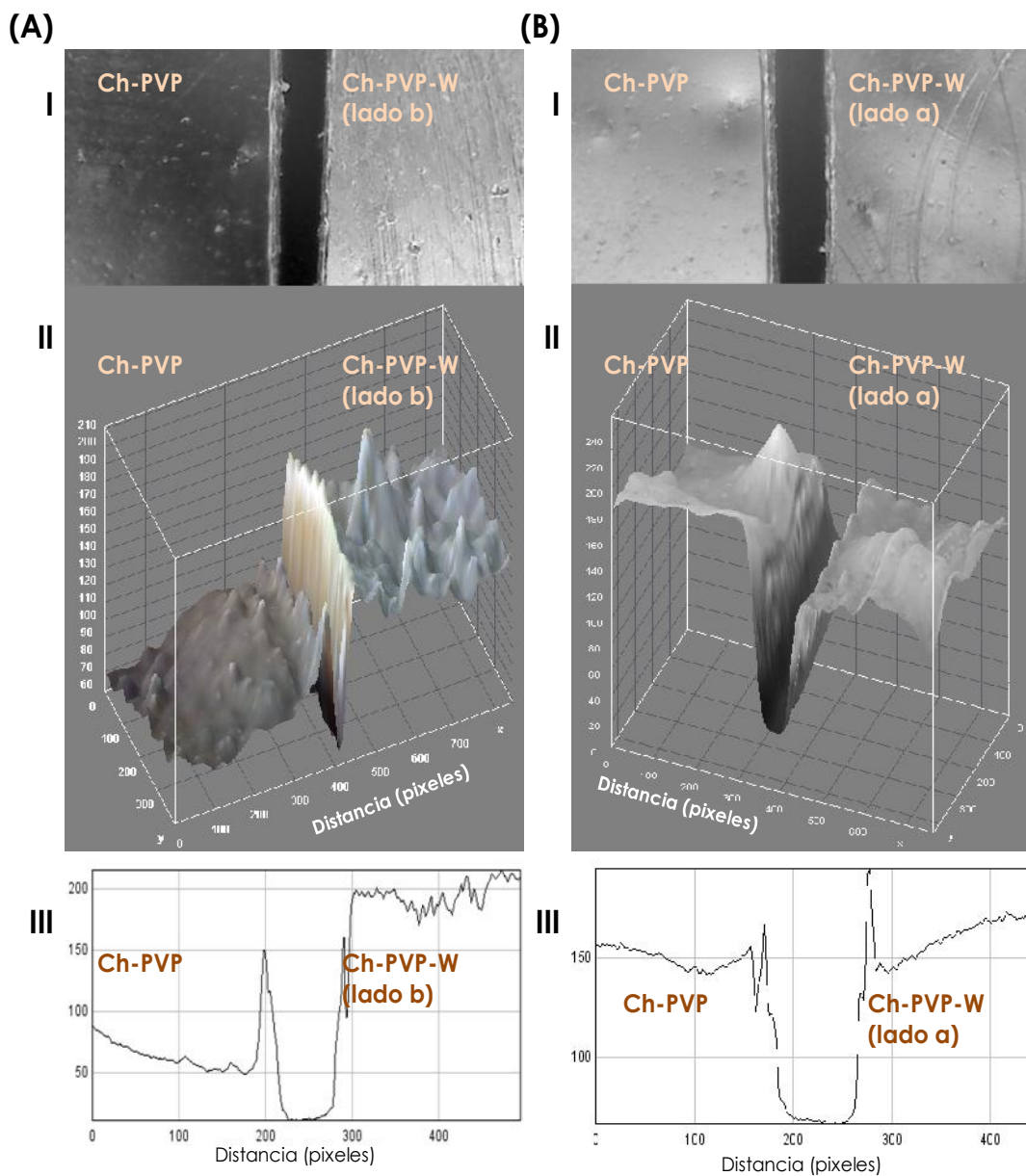


Figura 11.9. Imágenes ópticas (I), gráfico 3D de superficie vs Intensidad de luz reflejada (II) y perfiles (III) de las películas: Ch-PVP y lado modificado de Ch-PVP-W (lado b) (A), y Ch-PVP y lado no modificado de Ch-PVP-W (lado a) (B).

Es importante destacar que, la imagen formada es resultado de dos efectos: topográfico (rugosidad de superficie) y químico (cristalinidad y grupos funcionales del material). A partir de esto, los resultados evidenciarían la presencia del dendrón sobre una de las caras de la película Ch-PVP,

generando una superficie más rugosa. Por otra parte, el aumento en la reflexión de luz es el resultado de dos factores: una superficie más cristalina y la naturaleza química de la molécula incorporada.³⁵ En consecuencia, se podría inferir que hay un cierto orden en la disposición de los dendrones sobre la película Ch-PVP debido a la superficie más brillante.

De acuerdo a las figuras 11.9-B-I, II y III, las superficies de las películas Ch-PVP y lado no modificado Ch-PVP-W (lado a), no presentan diferencias significativas. Es importante destacar que, estos resultados son una evidencia más de la dendronización selectiva en una sola cara de la película Ch-PVP-W.

En conclusión, la caracterización de la microestructura y topografía de la superficie mediante microscopía óptica evidenció la dendronización de la película Ch-PVP. A su vez, se postuló que los dendrones se unen a una sola de las caras de la película y con un cierto orden (superficie más cristalina).

En cuanto a las películas de Ch-Gen y Ch-Gen-W mostraron un patrón similar de comportamiento.

11.3.2.2. Microscopía de fuerza atómica

La microscopía de fuerza atómica (AFM) se empleó para obtener información más detallada de las características superficiales y rugosidad de las películas obtenidas. En la figura 11.10, se muestran las imágenes de AFM de las películas Ch-PVP y Ch-PVP-W.

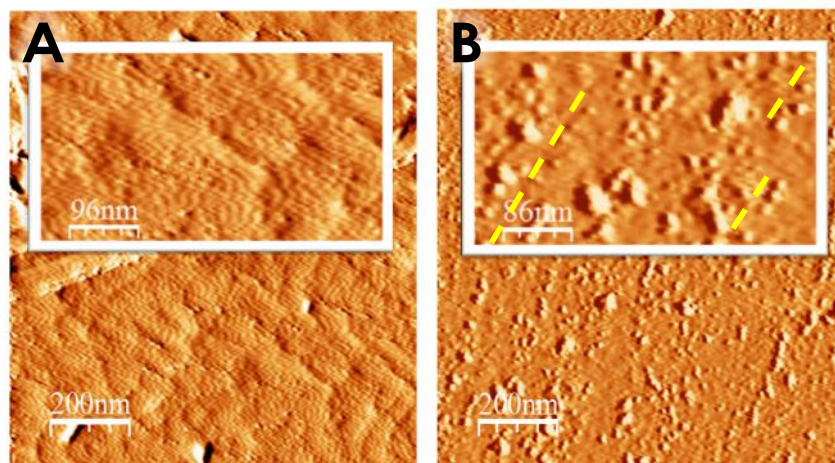


Figura 11.10. Imágenes de AFM: Ch-PVP (A) y Ch-PVP-W (B).

Como se observa en la figura, la superficie de Ch-PVP es mucho más lisa que la otra. La película Ch-PVP-W presenta puntos brillantes, es decir, una superficie rugosa donde las claridades representan zonas sobresalientes de la superficie. Estos cúmulos tienen un cierto orden sobre la superficie, como se señala con líneas amarillas en la figura 11.10.

Si bien no hay antecedentes bibliográficos de estos sistemas, se ha estudiado que la organización de dendrones y dendrímeros sobre diferentes soportes (orgánicos e inorgánicos), se encuentra controlada por la rigidez, estructura química, interacciones estéricas, forma y tamaño de las estructuras dendríticas.³⁶ En base a esto, se propuso que la unión de W se organiza en cúmulos alineados sobre una de las películas observadas. Además, estos resultados se correlacionan con los estudios térmicos, un sistema con dendrones dispuestos ordenadamente sobre la superficie de la película.

Para analizar la rugosidad de la superficie, se calculó el índice de rugosidad el cual es un valor estadístico obtenido del registro de perfiles de altura y determina las irregularidades de la superficie. Los valores obtenidos fueron 0,52 y 5,84 para el Ch-PVP y Ch-PVP-W (lado b), respectivamente. Estos valores indicarían que la diferencia de rugosidad se debería a la unión de los dendrones a la película, donde los puntos altos observados en la superficie de Ch-PVP-W corresponderían a la formación de pequeños aglomerados de W.

En el caso de las películas de Ch-Gen y Ch-Gen-W, se observó un patrón semejante a las imágenes de AFM descritas anteriormente (figura 11.11).

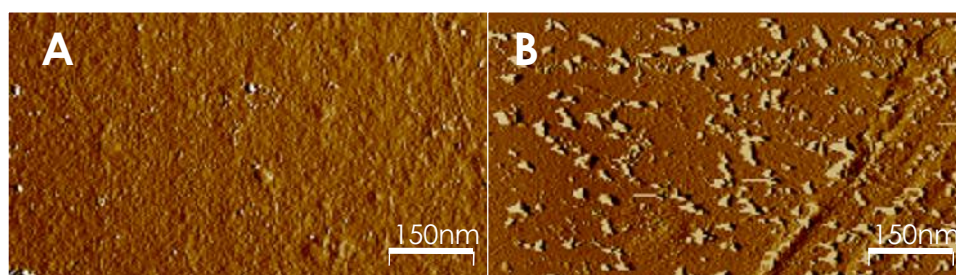


Figura 11.11. Imágenes de AFM de Ch-Gen (A) y Ch-Gen-W lado b (B)

A partir de los estudios de microscopía, tanto a escala nano como micrométrica, se corroboró la dendronización de una cara de las películas. En la determinación de la diferencia entre la cara no modificada (lado a) y modificada (lado b) de la película Ch-PVP-W, resultó relevante el análisis de microscopía óptica. Además, el ordenamiento de las estructuras dendríticas determinado mediante AFM, se correlaciona con la superficie más reflexiva observada por microscopía óptica.

11.3.3. Espectroscopia UV-Visible

Se tomaron los espectros UV-visible de Ch-PVP y Ch-PVP-W. Para realizar una mejor comparación y análisis de los datos obtenidos, la absorbancia fue normalizada por el espesor de la película, figura 11.12.

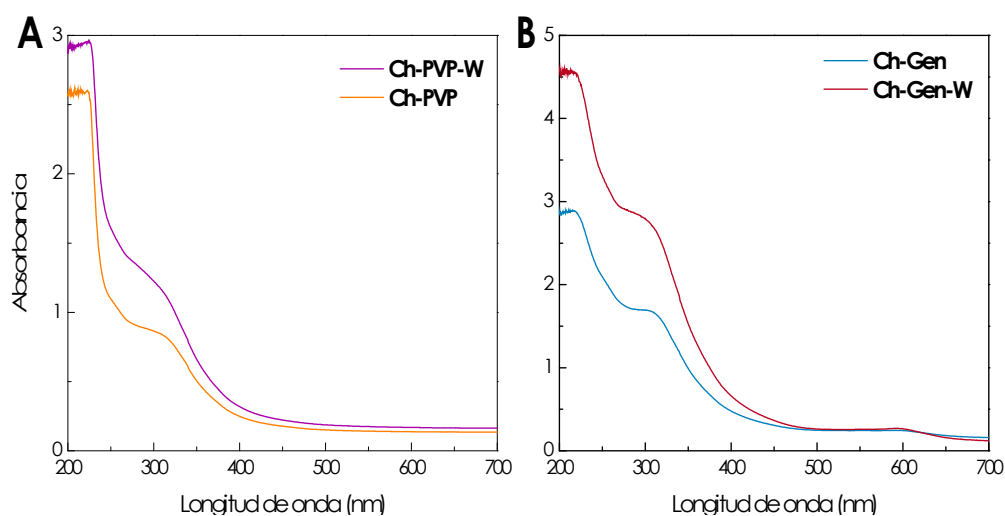


Figura 11.12. Espectros UV-visible de Ch-PVP y Ch-PVP-W (A), y Ch-Gen y Ch-Gen-W (B).

El máximo de absorbancia del sistema Ch-PVP es alrededor de 310 nm, y corresponde a las transiciones electrónicas del grupo C=O presentes en los polímeros.³⁷ La presencia del dendrón en la matriz polimérica, aumenta la absorbancia de la banda y del máximo, observando que se desplaza a menor longitud de onda, corrimiento hipsocrómico, debido a la presencia de nuevos

grupos funcionales. La película Ch-PVP-W tiene los grupos éster del dendrón y los de urea y uretano, correspondientes a la unión del grupo isocianato (dendrón) con el grupo amino y hidroxilo de Ch, respectivamente.

Los resultados de espectroscopia indican que la película Ch-PVP-W deja pasar menos luz que la película Ch-PVP. Por lo tanto, la interacción de Ch-PVP-W con la luz UV-visible aumenta con respecto a la película sin dendrón. Esta diferencia entre la interacción de luz y la presencia del dendrón (figura 11.12), se observó también en los estudios de microscopia óptica. Es importante destacar que, en el análisis microscópico la luz interacciona con la superficie y la imagen se forma de la luz reflejada. Los espectros UV-visible resultan de la interacción con toda la muestra, la luz atraviesa la película. Las películas de Ch-Gen y Ch-Gen-W mostraron un comportamiento semejante a las descritas anteriormente.

PELÍCULAS COMO APÓSITOS PARA HERIDAS



El tratamiento de heridas ha evolucionado desde tiempos ancestrales. Los vendajes y dispositivos para heridas forman parte de un segmento del amplio mundo del mercado para el cuidado médico y farmacéutico de heridas. A pesar que la disponibilidad de diferentes tipos de apósitos para heridas ha incrementado notablemente en la última década, no existe en el mercado un apósito apropiado para su uso en todos los tipos de heridas crónicas, y hay

muy pocos para tratamientos de heridas simples, que se empleen durante todos los estadios del ciclo de curación.^{38,39}

- *Las fases de curación de una herida*

Independientemente del tipo de herida de que se trate y de la extensión que abarque la pérdida de tejido, la curación discurre en fases que se solapan en el tiempo y no se pueden disociar unas de otras. La subdivisión en fases, está orientada a las modificaciones morfológicas básicas que se producen durante el proceso de reparación, sin que refleje la complejidad intrínseca de los procedimientos.⁴⁰ Por regla general, la curación se divide en tres fases (figura 12.1):

- Fase inflamatoria y/o exudativa: hemostasia y limpieza de la herida.
- Fase de proliferación: reconstrucción de los tejidos de granulación.
- Fase de diferenciación: maduración, cicatrización y epitelización.

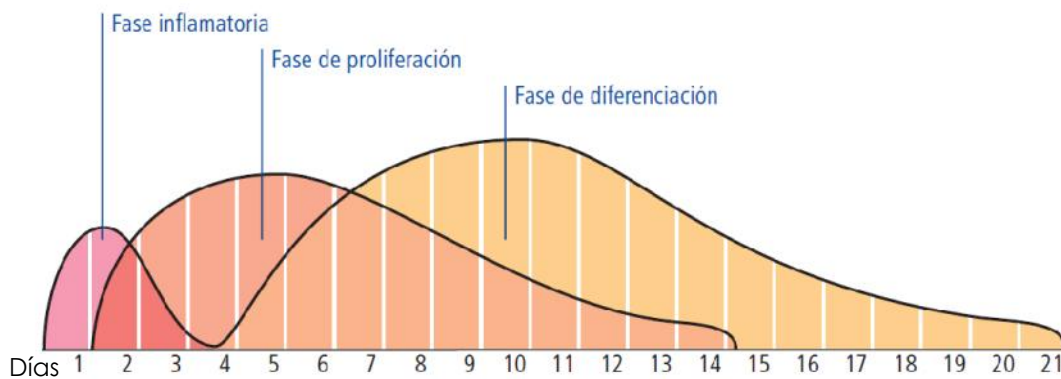


Figura 12.1. Fases del proceso de curación.

El proceso de curación normal de la piel requiere la restauración del epitelio y la formación de colágeno. Lo primero ocurre por migración y proliferación de los queratinocitos, desde el borde de la herida, y por diferenciación de células madres de los bulbos restantes del folículo piloso. Lo segundo ocurre por afluencia de los factores de crecimiento secretados por plaquetas, macrófagos y fibroblastos; por la proliferación de fibroblastos y,

posteriormente, la síntesis y la remodelación de la matriz dérmica de colágeno. Sin embargo, en el caso de lesiones por quemaduras de espesor completo y heridas crónicas, como las úlceras por presión, venosas y de origen diabético, estos procesos para formar el colágeno están dañados, en consecuencia, nuevas tecnologías se han desarrollado para mejorar la cicatrización en estas condiciones.⁴¹

- *Apósitos para heridas: características y tendencias.*

Un sistema de vendaje de heridas debería presentar ciertas propiedades que sean adecuadas para su aplicación final como barrera de microorganismos, permitiendo el intercambio gaseoso, manteniendo un ambiente húmedo en la interface de la herida, mostrando capacidad de absorber los fluidos exudados del área de la herida y simultáneamente, controlar la pérdida de agua.⁴² Además, este vendaje debería ser no tóxico, no alergénico, no adherente y fácilmente removible sin trauma. Por otro lado, el vendaje debería ser un biomaterial disponible que requiera un mínimo procesamiento, con propiedades antimicrobianas y con capacidad de promover la curación de la herida.

En años recientes, un número grande de grupos de investigación han dedicado mucho esfuerzo a diseñar vendajes de heridas nuevos y mejorados, por síntesis y modificación de materiales biocompatibles.^{38,41} Los vendajes híbridos, biológicos-sintéticos son en su mayoría del tipo bicapa (figura 12.2) y contienen polímeros naturales y sintéticos.^{41,43-45} El vendaje tiene una capa en contacto con la piel y la otra permite la permeación a gases y protege la herida de infecciones y deshidratación. Una película asimétrica para ser empleada como apósito, podría ser diseñada con capacidad de absorber los exudados de la herida - la cara hidrofílica- y, simultáneamente, de controlar la pérdida de agua - la cara hidrofóbica.

Por ello, en este capítulo se presenta la caracterización de las películas de Ch-PVP, Ch-PVP-W, Ch-Gen y Ch-Gen-W, con el fin de evaluar sus potenciales como apósitos para heridas. En este contexto, se discuten los resultados de hinchamiento (inciso 12.1), permeabilidad al vapor de agua (inciso 12.2), reología (inciso 12.3), ángulo de contacto (inciso 12.4), actividad

antimicrobiana (inciso 12.5) y ensayos de regeneración de tejidos (inciso 12.6), de las películas mencionadas.

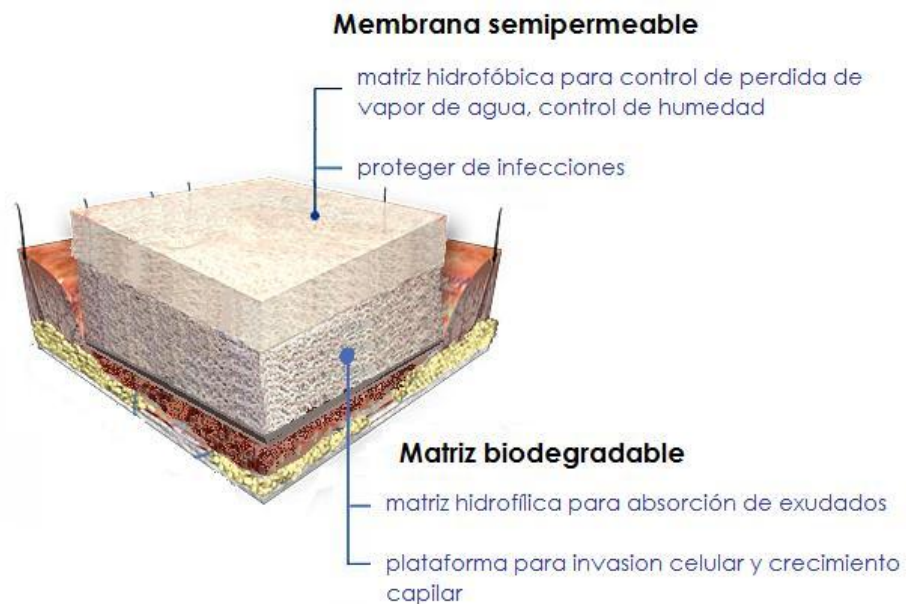


Figura 12.2. Esquema de vendaje de heridas bicapa.

12.1. ESTUDIOS DE HINCHAMIENTO

Se analizó el hinchamiento en el equilibrio (E_{sw}) de las películas a pH 6,8 y 3,4, los cuales simulan el pH de la piel, en un estado normal de piel y del exudado de heridas, respectivamente.⁴⁰ En las figuras 12.3-A y B se presentan los valores de E_{sw} en función del tiempo para las películas Ch-PVP, Ch-PVP-W, Ch-Gen y Ch-Gen-W a pH 6,8 y 3,4, respectivamente.

En general, los valores de hinchamiento son marcadamente mayores a menor pH, debido a la protonación de los grupos amino de quitosano, lo cual genera repulsión electrostática entre las cadenas poliméricas.

A pH 3,4, se observó que la película Ch-PVP tiene un mayor índice de hinchamiento que el sistema Ch-Gen. Este comportamiento podría ser el resultado del tipo de entrecruzamiento físico entre Ch y PVP y covalente entre

Ch y Gen. Además, la naturaleza hidrofílica de PVP es un factor importante para la interacción con el agua.^{15,30}

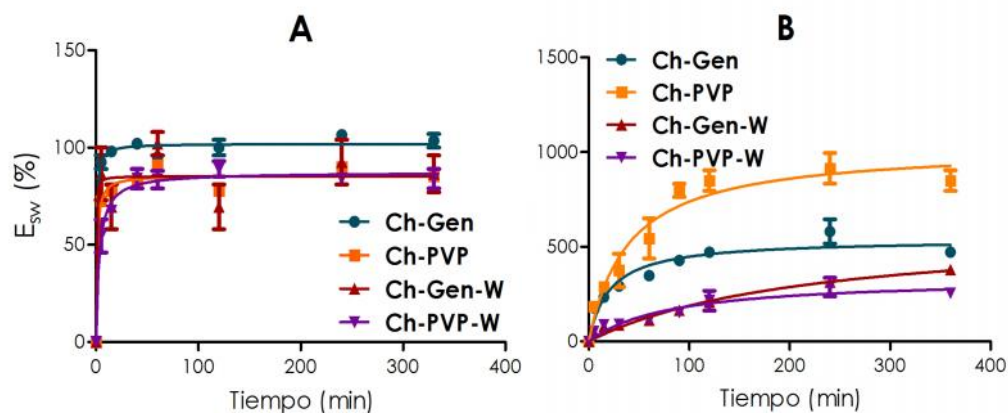


Figura 12.3. Gráfico de E_{sw} en función de tiempo a pH 6,8 (A) y 3,4 (B).

Las películas de Ch-PVP-W y Ch-Gen-W muestran un índice de hinchamiento similar; sin embargo, es importante destacar que los valores de hinchamiento disminuyen marcadamente al dendronizar las películas. Además, el mayor grado de dendronización involucra una mayor disminución del hinchamiento debido a dos factores: la disminución de grupos amino libres de Ch y la presencia de grupos hidrofóbicos en la estructura dendrítica.

A pH 6,8, los valores de hinchamiento de las distintas películas no presentaron una diferencia significativa. A este valor de pH, disminuye significativamente la cantidad de grupos amino protonados del quitosano y pueden interactuar entre sí mediante puente hidrógeno. Además, tanto el entrecruzamiento químico como el físico (puente hidrógeno), evitan la entrada de agua en las películas de Ch-Gen y Ch-PVP, respectivamente. Las películas dendronizadas (Ch-PVP-W y Ch-Gen-W) presentan menos grupos amino pero más grupos hidrofóbicos (grupos *tert*-butilo periféricos del dendrón), que da como resultado valores de hinchamiento semejantes para ambas películas.

Por otro lado, se evaluó la estabilidad de las películas dejando las mismas sumergidas en las soluciones a los valores de pH estudiados, durante un mes. Luego de ese tiempo, las películas no se degradaron, siendo esto

particularmente importante, considerando el potencial uso como material para vendaje de heridas.

12.2. PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA

Un vendaje para heridas debe tener una determinada permeabilidad al vapor de agua (WVP por sus siglas en inglés), para prevenir una excesiva deshidratación y contener los exudados. La velocidad de pérdida de agua del tejido dañado debería proveer un adecuado nivel de humedad sin riesgo de deshidratación. Si la herida es mantenida demasiado seca, el proceso de curación podría demorarse. Sin embargo, el exceso de acumulación de fluidos podría causar la maceración o infección de la herida. Esto significa que, las películas con una permeabilidad apropiada podrían ser empleadas para proveer las condiciones óptimas de la herida, dependiendo del nivel de exudación de la misma.^{42,44,45} La velocidad de transmisión de vapor de agua (WVRT por sus siglas en inglés) de películas de quitosano y mezclas de quitosano-celulosa han sido reportadas,⁴⁶ con valores de 1063 y 816-864 g.m⁻² por día, respectivamente.

En la tabla 12.1 se muestran los resultados de velocidad de permeación al vapor de agua (WVTR) y de coeficientes de permeabilidad al vapor de agua (WVP) para las distintas películas. Los lados **a** y **b** representan la cara no modificada y la cara dendronizada, respectivamente, de las películas Ch-Gen-W y Ch-PVP-W. Las mediciones se realizaron según la metodología descrita en la sección experimental (inciso 14.2.14), donde se encuentran las ecuaciones empleadas para el cálculo de WVRT y WVP.

La permeación del vapor de agua a través de una película implica: la absorción de las moléculas de agua sobre la superficie de la película (cara externa) y la difusión de las moléculas absorbidas en el material hacia el lado opuesto de la película. Los valores de WVRT y WVP, representan la velocidad con la cual el vapor de agua atraviesa la membrana, con la diferencia que el último valor es independiente del espesor de la película estudiada.

Tabla 12.1. Valores de WVTR y WVP de las películas obtenidas.

Película	WVTR (g/m ² .día)		WVP (x10 ⁻¹² g/ m. s. Pa)	
	Lado a al aire	Lado b al aire	Lado a al aire	Lado b al aire
Ch-Gen	546	509	3,23	3,10
Ch-Gen-W	555	464	2,06	1,74
Ch-PVP	559	526	2,10	2,00
Ch-PVP-W	581	463	1,75	1,41

Como se muestra en la tabla 12.1, los valores de pérdida de agua (WVTR) para las películas de quitosano modificadas son aproximadamente de 500 g.m⁻² por día. Las películas Ch-PVP, Ch-Gen y las caras no modificadas (lado a) de Ch-PVP-W y Ch-Gen-W presentan valores semejantes de velocidad de permeabilidad de agua. En contraste, al realizar el experimento colocando en contacto al aire la cara dendronizada (lado b), las películas Ch-PVP-W y Ch-Gen-W disminuyen los valores de WVTR en relación a Ch-PVP y Ch-Gen, respectivamente. Estos resultados muestran claramente como la dendronización afecta a la interacción con las moléculas de agua. Probablemente, la presencia de las estructuras dendríticas provoca una ligera disminución en la solubilidad y difusión del vapor de agua a través de las películas. La disminución en la difusión con la dendronización, podría deberse a un movimiento restringido de las moléculas de agua entre las cadenas del polímero, dado a la presencia de los dendrones. Es importante destacar que, se alcanzan valores de WVTR semejantes para Ch-PVP-W y Ch-Gen-W, siendo mayor la disminución de velocidad para la película de mayor grado de dendronización (Ch-PVP-W).

Además, los valores de WVP revelan el mismo comportamiento de las películas. La cara dendronizada de las películas, muestran menores coeficientes de permeabilidad respecto a aquellas sin modificar (tabla 12.1), indicando que la naturaleza hidrofóbica de los dendrones disminuye la absorción de agua.

Los valores de WVP, de la cara no modificada, se correlacionan con los resultados de hinchamiento a pH 6,8, donde las películas de Ch-PVP, Ch-PVP-W y Ch-Gen-W presentaron comportamientos similares, es decir, tienen una capacidad semejante de absorción de agua. Por otro lado, Ch-Gen presenta

un ligero aumento en WVP e hinchamiento respecto al resto de películas. Probablemente, esto se deba a la formación de una red polimérica que permita una mayor absorción de agua.

Los resultados de permeabilidad de agua revelan que, la cara dendronizada podría prevenir la acumulación de fluidos por absorción de agua del ambiente y controlar la humedad de la herida. Además, la superficie dendronizada se vuelve más hidrofóbica y, por ende, menos adherente.¹⁹

Los materiales obtenidos son considerados membranas semi-permeables los cuales podrían ser usados en la manipulación de heridas superficiales, quemaduras menores, heridas post-operatorias, abrasiones y laceraciones menores. Por lo tanto, se podría decir que las películas aquí obtenidas presentan un potencial uso como vendajes, para proteger la piel de fricción o exposición continua a humedad, previniendo el desprendimiento producido por excesivas cantidades de exudados.⁴⁷

12.3. REOLOGÍA EXTENSIONAL

Las figuras 12.4-A, B y C muestran la variación del módulo de almacenamiento E' en función de la deformación tensil. Se observa que la unión del dendrón, aumenta el módulo E' evidenciando que las películas son más rígidas, es decir, para una misma deformación se necesita más energía (E').

En los gráficos de fuerza tensil en función de la deformación tensil (figura 12.4-D), la pendiente representa el módulo de Young, el cual es una medida de la elasticidad de las películas (inciso 14.2.15). La película Ch-Gen es más rígida y más quebradiza (se rompe con un menor estiramiento) que la película Ch-PVP. Estos resultados evidencian el tipo de entrecruzamiento, siendo las uniones covalentes y físicas, respectivamente, las responsables del comportamiento de la película.

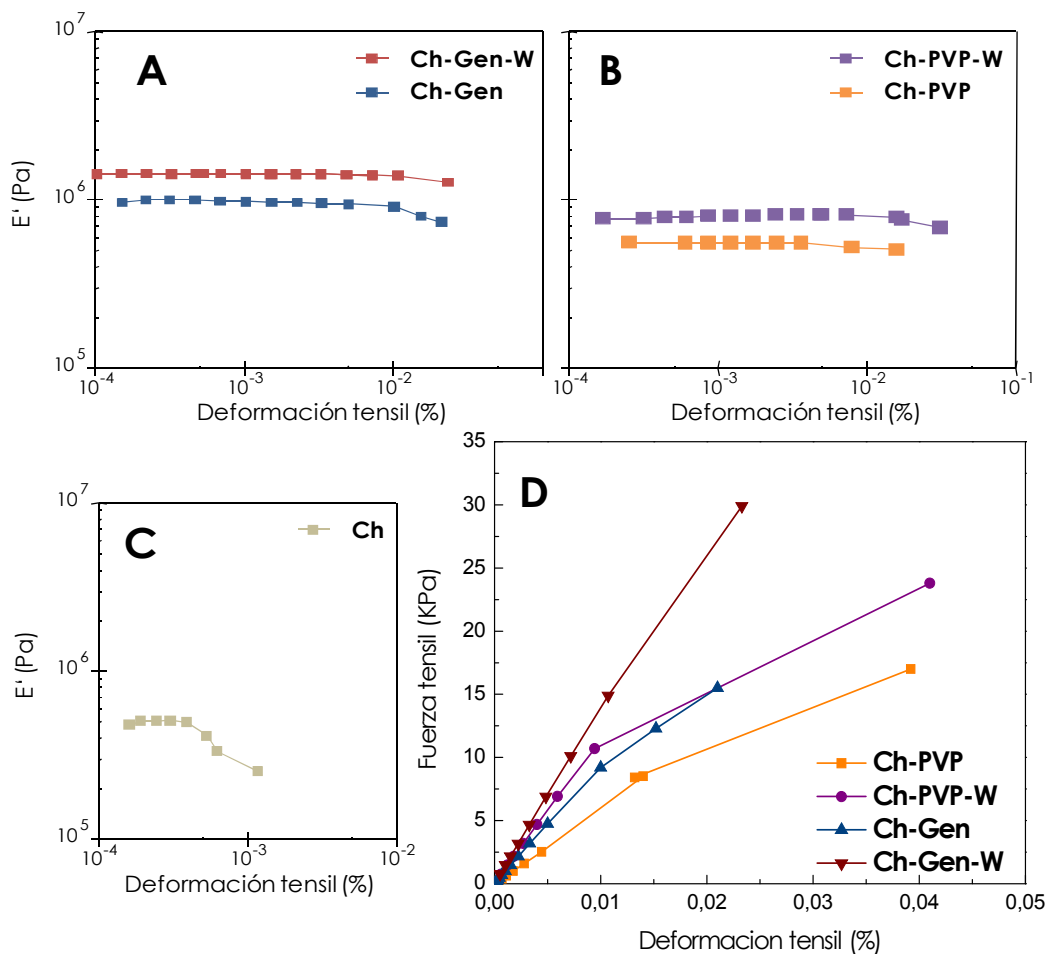


Figura 12.4. Curvas de módulo elástico (E') vs deformación tensil de las películas: Ch-Gen y Ch-Gen-W (A), Ch-PVP y Ch-PVP-W (B), y Ch (C). Gráfico de fuerza tensil vs deformación de Ch-Gen, Ch-Gen-W, Ch-PVP y Ch-PVP-W (D).

Por otro lado, se observó un incremento significativo en el módulo de Young de las películas dendronizadas, siendo más importante en la película de Ch-PVP-W (figura 12.4-D). Probablemente, los dendrones de distintas cadenas de Ch interactúan (fuerzas de Van der Waals) entre sí, evitando el desplazamiento de una cadena de polímero respecto a la otra. En consecuencia, la película es más rígida. Asimismo, el mayor aumento de rigidez en Ch-PVP-W se correlaciona con el mayor grado de dendronización. Estos resultados se correlacionan con las medidas de hinchamiento y de

permeabilidad al vapor de agua donde esta película presentó mayores cambios en su comportamiento.

En cuanto a la fragilidad, las películas dendronizadas son tan quebradizas como las películas sin dendronizar. Esto podría estar relacionado al hecho que el efecto del entrecruzamiento es más importante que el efecto dendrítico.

Es importante destacar que, se realizó el mismo estudio para una película de Ch, figura 12.4-C. Se observó que las películas resisten muy poco estiramiento y fuerza tensil antes de quebrarse. Esto se debe a que no hay una interacción fuerte entre las cadenas de Ch, como sí ocurre cuando se encuentran entrecruzadas.

Estos resultados sugieren que las películas obtenidas presentan mejores propiedades mecánicas que las películas de quitosano nativo. Además, la dendronización aumenta la rigidez y la resistencia a fuerza tensil alta. Las características de las películas indican que podrían ser usadas como apósitos para heridas, debido a su resistencia mecánica, las que permanecerían en la herida sin romperse.

12.4. ÁNGULO DE CONTACTO

En la tabla 12.2 y la figura 12.5, se muestran los resultados del estudio de ángulo de contacto de las películas obtenidas.

Tabla 12.2. Valores de ángulo de contacto.

Película	Ángulo de contacto (°)
Ch-Gen	84,6±0,2
Ch-Gen-W	89,9±0,3
Ch-PVP	81,7±0,2
Ch-PVP-W	111,5±0,4

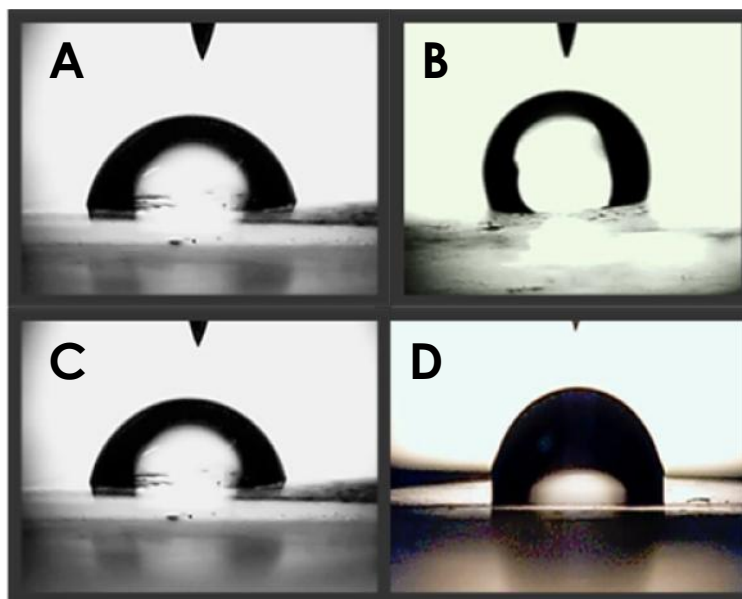


Figura 12.5. Imágenes de ángulo de contacto: (A) Ch-PVP, (B) Ch-PVP-W, (C) Ch-Gen y (D) Ch-Gen-W.

El ángulo de contacto de las películas de quitosano sin modificar ⁴⁷ es menor que el de las películas Ch-PVP y Ch-Gen, indicando que la incorporación de entrecruzantes hace que la superficie sea menos mojable, es decir, tiene menor afinidad con el agua. Ch-PVP presentó el menor ángulo de contacto, probablemente, debido a la naturaleza hidrofílica de PVP.

Luego de la dendronización, se observó que los valores de ángulo de contacto de las películas Ch-PVP-W y Ch-Gen-W aumentaron respecto de los valores correspondientes a Ch-PVP y Ch-Gen, respectivamente. Esto indica una superficie más hidrofóbica debido a dos factores: disminución de los grupos amino e hidroxilo de Ch (unidos a W) y presencia de los grupos *tert*-butilo hidrofóbicos en la periferia de W. Una vez más, se ha observado un mayor aumento en la propiedad estudiada de Ch-PVP-W con respecto a Ch-Gen-W, como resultado del mayor grado de dendronización.

Estos resultados de ángulo de contacto, evidencian que la dendronización modifica las propiedades de la superficie de la película. A su vez, con el mayor grado de dendronización aumenta la hidrofobicidad de la película. Por lo tanto, mediante esta reacción es posible obtener una película

con una cara hidrofóbica (presencia de dendrones) y una cara hidrofílica (dada por el polímero). Esto resulta óptimo para exponer el lado hidrofílico hacia la herida, favoreciendo la adsorción del exudado, y el lado opuesto hacia el exterior, regulando la humedad de la zona lesionada.

12.5. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

El estudio de la capacidad antimicrobiana de las películas se realizó con el objetivo de evaluar la influencia de la dendronización sobre las conocidas propiedades antibacterianas del quitosano.^{48,49} Para este estudio se seleccionaron dos cepas de bacterias: *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). La primera es una bacteria anaerobia facultativa gram negativa. Y la segunda, es una bacteria aerobia gram positiva, comúnmente responsable de infecciones en heridas de piel. Teniendo en cuenta las características de ambas, se seleccionaron y diseñaron los experimentos para descartar una posible inhibición por ausencia de oxígeno.

El primer diseño experimental consistió en sembrar por rastrillado, en una placa de Petri con medio de cultivo (agar cerebro-corazón), un inóculo de cada uno de los microorganismos, colocando inmediatamente sobre las placas las películas correspondientes a ensayar.

El contacto con las películas Ch-PVP y Ch-PVP-W, inhibió completamente el desarrollo de *E. coli* y *S. aureus* sobre la placa de Petri (figura 12.6). Sin embargo, en las películas Ch-Gen y Ch-Gen-W se observa una inhibición ligeramente menor, dada al desarrollo de colonias debajo de los bordes de las películas. En esta prueba, no se observó ningún halo de inhibición de desarrollo microbiano alrededor de cada película, evidenciando que el efecto bacteriostático del polímero se ejerció por contacto directo del mismo con la superficie, previamente inoculada y que no hubo difusión alguna desde la película que contribuyera a esta inhibición.

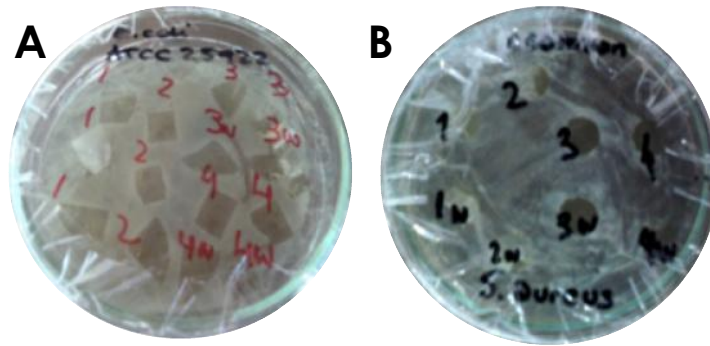


Figura 12.6. Imágenes de ensayo actividad antibacteriana del primer diseño experimental: primer ensayo realizado con *E. coli* (A) y *S. aureus* (B). Para las películas: Ch-Gen (1), Ch-PVP (2), lados a de Ch-PVP-W (3) y de Ch-Gen-W (4), y lados b de Ch-PVP-W (3w) y Ch-Gen-W (4w).

Es posible que esta inhibición completa del desarrollo de microorganismos, entre el agar inoculado y la película adherida a la superficie, se deba en parte a cierto impedimento físico de desarrollar colonias en la interfaz agar-película. Por ello, y en función de cuantificar en términos de porcentaje el efecto inhibitorio de cada película se utilizó el segundo diseño experimental descrito en la sección V- Parte experimental.

Tabla 12.3. Valores de inhibición bacteriana correspondiente al segundo diseño experimental.

Películas	% Inhibición	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Ch-PVP	35±2	36±6
Ch-PVP-W	68±4	77±2
Ch-Gen	46±4	-
Ch-Gen-W	23±5	-

En este caso, en todas películas utilizadas se cuantificó el porcentaje de inhibición que produjo cada una en el desarrollo de colonias. Es importante decir que, la capa de agar cerebro-corazón con el inoculo de bacterias se vertió sobre las películas asentados sobre un agar sin inoculo. Los valores de inhibición se muestran en la tabla 12.3. Como se muestra en la tabla, la

película Ch-PVP presentó el mayor porcentaje de inhibición. Probablemente, en este diseño la capa de agar cerebro-corazón, al no ser lo adecuadamente delgada, permitió que se desarrollen las bacterias (unitarias formadoras de colonias) suficientemente alejadas de las películas.

La actividad antimicrobiana del quitosano es el resultado de una serie de reacciones que tienen lugar por el contacto entre las moléculas de Ch y la pared celular. Por lo tanto, la morfología del polímero es responsable de la eficiencia de las reacciones.⁴⁹ Los valores de inhibición de *E. coli* para las películas entrecruzadas con Gen no fueron detectables. Una posible razón para la baja actividad antibacteriana de las películas con Gen comparada con las películas con PVP, es que la unión covalente del entrecruzante puede obstruir la interacción entre el quitosano y las células bacterianas.

Cabe destacar que, la actividad inhibidora de películas de Ch depende de diferentes factores, incluyendo las características de la superficie y la morfología. Entre estos factores, una característica importante es la hidrofiliidad/hidrofobicidad de la superficie. Kong *et al*⁵⁰ estudiaron el efecto de variarla hidrofobicidad de Ch (estado sólido) en la actividad inhibitoria de *E. coli*, demostrando que quitosano modificado con ácido oleico muestra un mayor efecto inhibitorio respecto a quitosano (grado de desacetilación de 83,7 y 62,6%). Por lo tanto, modificando la hidrofiliidad de la superficie varía la capacidad antimicrobiana.

La dendronización del Ch-PVP aumentó la inhibición bacteriana. Teniendo en cuenta los factores que afectan a la actividad antibacteriana, probablemente, el aumento de la hidrofobicidad de la superficie y, en menor medida, los cambios estructurales de la película mejoraron la interacción con las células bacterianas.

Los resultados obtenidos demuestran que las diferentes películas inhiben el desarrollo normal *in vitro* de las dos bacterias estudiadas, *S. aureus* y *E. coli*, en este ensayo. Si bien los resultados del primer diseño experimental pueden estar sobreestimados, por razones físicas, y en el segundo diseño, subestimadas. Es evidente que la capacidad antibacteriana de Ch se mantiene más allá de las modificaciones realizadas, entrecruzamiento y dendronización. Estos resultados son relevantes, debido a que en bibliografía

se encuentra que Ch en forma de películas disminuye su capacidad inhibitoria con respecto a Ch en solución.^{49,51}

Considerando la aplicación de las películas en heridas, esta propiedad antibacteriana de las mismas es muy importante ya que evitaría posibles infecciones.

12.6. REGENERACIÓN CELULAR

Como se mencionó al comienzo del capítulo, los macrófagos y fibroblastos cumplen un rol preponderante en distintas fases del proceso de curación de una herida.

Los fibroblastos tienen la capacidad de migrar hacia la zona lesionada, proliferar y producir los componentes de la matriz extracelular. Estos procesos son estimulados y regulados por citocinas y factores de crecimiento.

Los macrófagos son indispensables para la curación de las heridas, debido a los diferentes perfiles que adoptan en las distintas fases del proceso de curación. Estas células muestran diferentes grados de activación funcional en condiciones homeostáticas y patológicas; dependiendo del estímulo, los macrófagos activados adquieren actividades antimicrobianas, pro-inflamatorias, y antitumorales, pero también pueden contribuir a la reparación de tejidos y la disminución de la inflamación.⁵² Estos dos extremos del espectro de la activación de los macrófagos se han denominado "clásico" (M1) y "alternativo" (M2) ⁵³ y desempeñan roles opuestos durante la respuesta inmune e inflamatoria (figura 12.7).⁵⁴

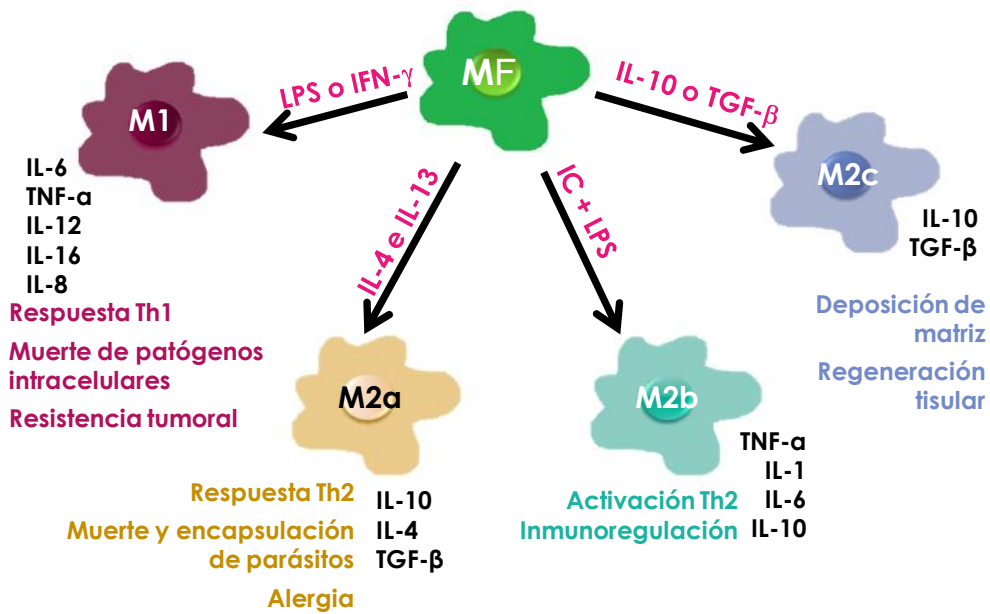


Figura 12.7. Plasticidad y perfiles funcionales del macrófago (M ϕ): clásico (M1) y alternativo (M2a, b o c). En las flechas se representan los diferentes estímulos que inducen a los macrófagos a adoptar los distintos perfiles y debajo de cada célula se encuentran los compuestos que se generan. LPS es lipopolisacárido, IC son inmuno-complejos, y los términos IL-1 a IL-16, TNF- α , TGF- β , INF-g corresponden a distintas citoquinas.

El perfil de activación de los macrófagos se encuentra vinculado con la vía metabólica de la arginina. El metabolismo de este aminoácido es relevante tanto para los fenómenos de defensa como para los de crecimiento y diferenciación celular.⁵⁵ Se favorecerá uno u otro proceso según la vía metabólica de la arginina, las cuales pueden ser mediadas por la forma inducida de óxido nítrico sintetasa (iNOS) o la arginasa. Mediante el primer mecanismo, se produce citrulina y óxido nítrico, el cual es tóxico para microbios y parásitos y es antiproliferativo. Mientras que, la activación de la vía de la arginasa, produce urea y ornitina que estimula la producción de colágeno y la proliferación celular. Por lo tanto, cuando hay una mayor actividad de iNOS, se activa el perfil clásico de los macrófagos (M1) y, al aumentar la actividad de la arginasa, estas células adoptan un perfil alternativo (M2).⁵⁶

Por lo tanto, se realizaron ensayos con macrófagos (Raw) y fibroblastos (NiH) en contacto con las películas obtenidas, para evaluar cómo afectan las mismas al comportamiento de las células. Se seleccionaron las películas de

Ch-PVP y Ch-PVP-W, ya que debido a su mayor capacidad antibacteriana con respecto a las películas entrecruzadas con Gen, presentan una gran potencial como apósito para heridas. A continuación, se presentan los resultados obtenidos en la determinación de óxido nítrico y actividad de arginasa para evaluar el mecanismo de metabolismo de la L-arginina (inciso 12.6.1). Además, se determinó la citotoxicidad (inciso 12.6.2) y la adhesión de fibroblastos en las películas (inciso 12.6.3). En los siguientes estudios se llama control a la ausencia de películas, y basal a la ausencia de estímulos.

12.6.1. Determinación del metabolismo de L-arginina

Se evaluó el efecto de las películas Ch-PVP y Ch-PVP-W en el metabolismo de L-arginina en células Raw (macrófagos) y NiH (fibroblastos).

12.6.1.1. Macrófagos

La actividad de arginasa, enzima involucrada en el metabolismo alternativo de L-arginina, se evaluó en células lisadas. Los valores de actividad en los ensayos basales (figura 12.8-A, barras verdes) y en presencia del estímulo lipopolisacárido LPS (figura 12.8-A, barras bordo) no presentaron diferencias significativas mediante el *test* estadístico empleado. Cabe aclarar que, LPS es conocido por activar el metabolismo de la L-arginina vía iNOS en los macrófagos.

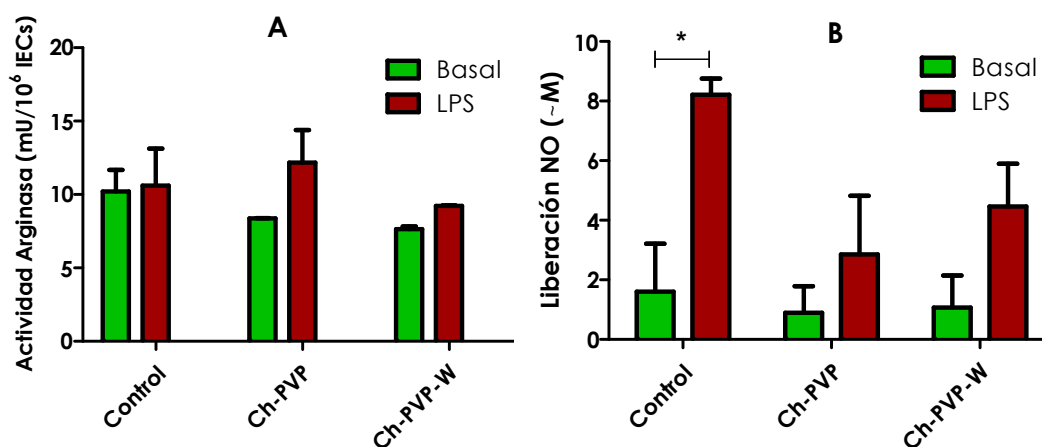


figura 12.8. NIVELES DE ACTIVIDAD DE ARGINASA (A) Y PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO (B) DE MACRÓFAGOS EN CONTACTO CON PELÍCULAS, Ch-PVP Y Ch-PVP-W, O SIN PELÍCULA (basal), SIN ESTÍMULO (basal ■) O CON ESTÍMULO (LPS ■).

Sin embargo, es posible observar un ligero incremento de la actividad de arginasa en presencia del estímulo. Además, la actividad de arginasa no incrementó en aquellos cultivos realizados con el agregado de la película.

Los niveles de óxido nítrico (NO) cambiaron con la presencia de LPS. Como se mencionó anteriormente, este compuesto estimula la vía metabólica iNOS. Como se muestra en la figura 12.8-B (barras verdes), no hay diferencia entre los valores obtenidos para los basales de cultivos control y con las películas. La presencia de LPS incrementó significativamente el nivel de NO en el control. Por el contrario, las películas Ch-PVP y Ch-PVP-W disminuyeron alrededor del 40% la producción de óxido nítrico. Estos datos se correlacionan con el leve incremento de la actividad de la arginasa.

Estos resultados sugieren una atenuación en el perfil inflamatorio de los macrófagos.

12.6.1.2. Fibroblastos

Se observó que ambas vías metabólicas de la L-arginina no se ven afectadas significativamente por la presencia de las películas, figura 12.9.

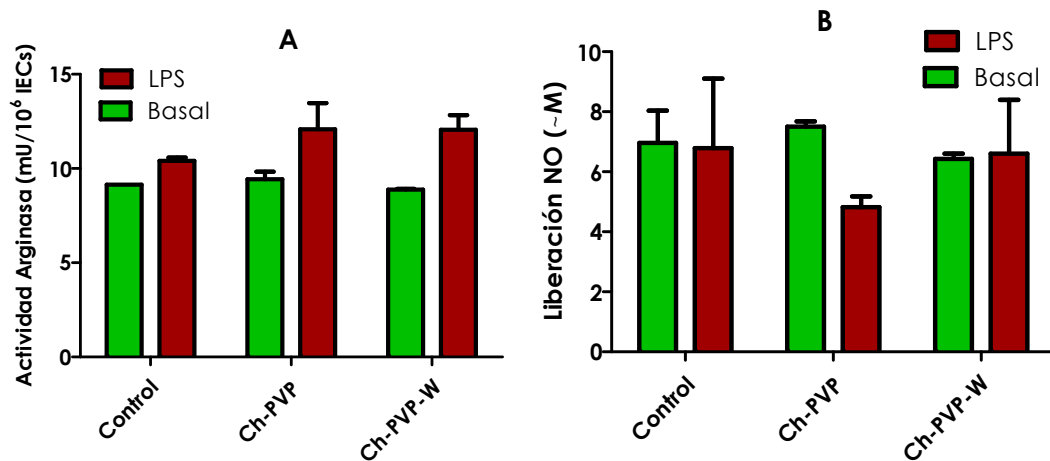


Figura 12.9. Niveles de actividad de arginasa (A) y producción de óxido nítrico (B) de fibroblastos en contacto con películas, Ch-PVP y Ch-PVP-W, o sin película (basal), sin estímulo (basal ■) o con estímulo (LPS ■).

Los fibroblastos no son estimulados con LPS, por lo tanto, observando que en los ensayos basales con y sin estímulo, son semejantes los niveles de NO. Cuando las células están en contacto con las películas, en presencia de LPS, se puede observar una tendencia a disminuir la producción de óxido nítrico y, en consecuencia, aumenta la actividad de arginasa. Este efecto es más notable en presencia de la película Ch-PVP.

Estos resultados indican, principalmente, que los fibroblastos no se ven afectados en su funcionamiento normal, en presencia de las películas Ch-PVP-W y Ch-PVP.

Es importante destacar, que los experimentos *in vitro* (48 horas de cultivo) de las dos líneas celulares empleadas no muestran la activación del perfil inflamatorio. Además, en los macrófagos se observó una tendencia a disminuir la actividad de iNOS e incrementar la actividad de arginasa, lo cual sugiere la activación de un perfil alternativo favoreciendo la proliferación celular y, en consecuencia, la curación de la herida; mientras que los fibroblastos cumplen su funcionamiento normal.

12.6.2. Citotoxicidad: ensayo LDH

Cualquier daño en la membrana plasmática celular se puede determinar indirectamente por la liberación de la enzima intracelular lactato deshidrogenasa (LDH). Este ensayo se utilizó para evaluar el efecto de las películas sobre la membrana plasmática.¹⁷

En las figuras 12.10-A y B, se muestran los niveles de LDH para las células NiH y Raw, respectivamente, en contacto con las películas Ch-PVP y Ch-PVP-W en presencia o no, de LPS, uno de los estímulos estudiados. También, se presentan los controles correspondientes, células sin contacto con películas.

El contacto de las películas con fibroblastos presentó una tendencia a aumentar los valores de LDH, indicando un leve daño sobre la membrana plasmática de las células, aunque no se encontró una diferencia significativa mediante el *test* estadístico empleado.

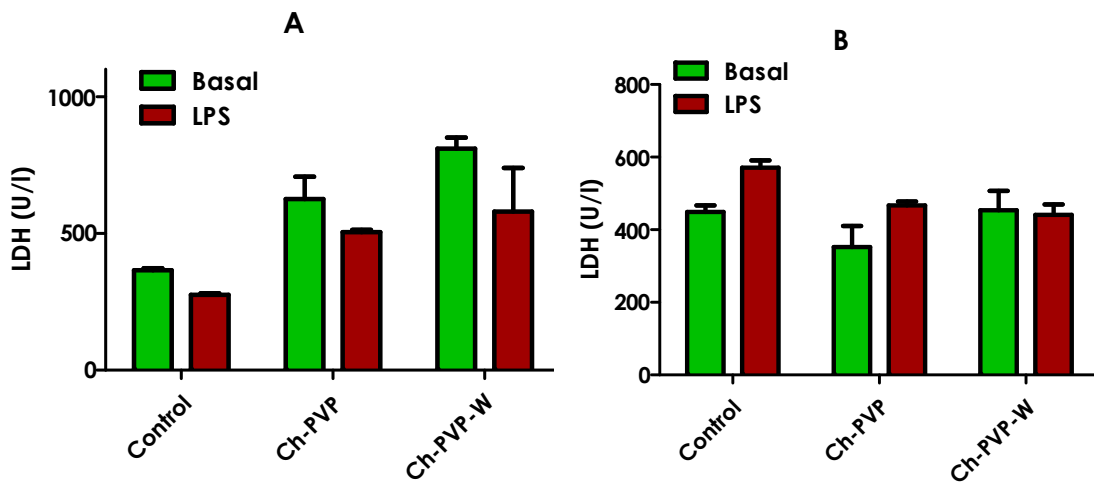


Figura 12.10. Niveles de LDH en fibroblastos (A) y macrófagos (B), en contacto con películas, Ch-PVP y Ch-PVP-W, o sin película (basal), sin estímulo (basal ■) o con estímulo (LPS ■).

Por otro lado, es importante destacar que los niveles de LDH en macrófagos en contacto con las películas Ch-PVP y Ch-PVP-W son semejantes al control celular.

Estos resultados son relevantes para demostrar que las películas Ch-PVP y Ch-PVP-W no alteran la integridad de la membrana plasmática de macrófagos, lo cual evidencia la biocompatibilidad de ambas películas.

12.6.3. Ensayo de adhesión celular

Dado la menor viabilidad de fibroblastos en contacto con las películas, se realizó un ensayo de adhesión celular para evaluar si existe interacción de las películas con las membranas plasmáticas de las mismas. Las películas de Ch-PVP y Ch-PVP-W permitieron la adhesión de los fibroblastos (NiH) sobre su superficie (figura 12.11), siendo mayor la cantidad de células adheridas sobre la superficie de Ch-PVP respecto a la superficie de Ch-PVP-W. Probablemente, el cambio en la rugosidad y la naturaleza química por la dendronización influye en esta adherencia.

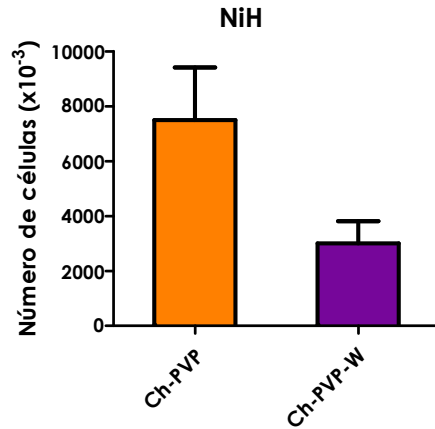


Figura 12.11. Número de células adheridas a películas Ch-PVP y Ch-PVP-W.

Corrales y col.¹⁷ estudiaron diferentes matrices de policaprolactona y arcillas comparadas con una película control comercial. Observaron que las células aumentan la adhesión con el tiempo (1, 4 y 6 días), y los máximos encontrados no superaron las 2 células por película (inclusive el control), siendo el tamaño de estas membranas 16 veces más grandes que Ch-PVP y Ch-PVP-W.

Por lo tanto, las películas Ch-PVP y Ch-PVP-W son superficies favorables para la adhesión de fibroblastos (NiH), demostrando que estos biomateriales tienen un gran potencial en el área de ingeniería de tejidos, en particular, como apósitos para heridas.

CONCLUSIONES PARCIALES DE PELÍCULAS



- Se obtuvieron películas basadas en quitosano a través de una técnica sencilla y eficiente. El entrecruzamiento con PVP y Gen resultaron materiales más resistentes a mayores esfuerzos y deformación tensil que la película de Ch.

- Ø La dendronización se realizó exitosamente en una de las caras de las películas, Ch-PVP-W y Ch-Gen-W, siendo el equipo diseñado de gran utilidad para el fin deseado.
- Ø A través de las diferentes metodologías se corroboró la modificación con dendrones sobre una de las caras de las películas, generando superficies de diferente topografía y balance hidrofílico/hidrofóbico.
- Ø Los estudios de permeabilidad al vapor de agua, ángulo de contacto e hinchamiento evidenciaron la mayor hidrofobicidad de la cara dendronizada, dado que el dendrón presenta grupos *tert*-butilo terminales.
- Ø Las técnicas microscópicas empleadas permitieron distinguir el cambio en la topografía con la dendronización, demostrando que los dendrones se ubican en cúmulos sobre la superficie de las películas y de forma ordenada especialmente para Ch-PVP-W. El estudio de reflexión de luz y el análisis térmico, fundamentaron este postulado.
- Ø El mayor grado de dendronización influye en una mayor diferenciación entre las caras de las películas.
- Ø Las propiedades de permeabilidad al vapor de agua, reológicas, hinchamiento y actividad antibacteriana, hacen de las matrices obtenidas potenciales biomateriales para ser empleados como apósitos en heridas. La película Ch-PVP-W presentó las mejores características para este fin.
- Ø Los experimentos *in vitro* (48 horas de cultivo) realizados con dos líneas celulares (NiH y Raw) no muestran la activación del perfil inflamatorio. Además, en los macrófagos, los resultados del metabolismo de la L-arginina sugieren la activación de un perfil alternativo, favoreciendo la proliferación celular y, en consecuencia, la curación de la herida.

- Ø Las películas Ch-PVP y Ch-PVP-W no alteraron la membrana plasmática de macrófagos, mostrando ser materiales biocompatibles.
- Ø Sería posible emplear la película Ch-PVP-W exponiendo la cara no modificada hacia la herida y la dendronizada hacia el exterior. A esta conclusión se arribó, luego de evaluar distintas propiedades de dichas películas, siendo las más relevantes: la cara hidrofílica permite absorber mayor cantidad de exudado, la cara dendronizada permite controlar la permeabilidad de vapor de agua, la mayor inhibición de bacterias de la película Ch-PVP-W con respecto a Ch-PVP y la mayor adherencia de células en la cara Ch-PVP.
- Ø En general, las características de las películas y sus propiedades de inhibición de bacterias e interacción con células (macrófagos y fibroblastos) hacen a estos biomateriales, potencialmente útiles en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa.
- Ø La principal relevancia de este trabajo, es el empleo de la dendronización de películas basadas en quitosano para obtener materiales biocompatibles y con marcadas diferencias en sus propiedades.

Bibliografía

- (1) Tian, H.; Tang, Z.; Zhuang, X.; Chen, X.; Jing, X. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application, *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 237.
- (2) Nair, L. S.; Laurencin, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials, *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 762.
- (3) Altman, A. M.; Gupta, V.; Ríos, C. N.; Alt, E. U.; Mathur, A. B. Adhesion, migration and mechanics of human adipose-tissue-derived stem cells on silk fibroin–chitosan matrix, *Acta Biomaterialia* **2010**, *6*, 1388.
- (4) Amidi, M.; Mastrobattista, E.; Jiskoot, W.; Hennink, W. E. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens☆, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 59.
- (5) Balaji, S.; Kumar, R.; Sriprya, R.; Kakkar, P.; Ramesh, D. V.; Reddy, P. N. K.; Sehgal, P. K. Preparation and comparative characterization of keratin–chitosan and keratin–gelatin composite scaffolds for tissue engineering applications, *Mater. Sci. Eng., C* **2012**, *32*, 975.
- (6) Jayakumar, R.; Menon, D.; Manzoor, K.; Nair, S. V.; Tamura, H. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review, *Carbohydr. Polym.* **2010**, *82*, 227.
- (7) Macneil, S. Biomaterials for tissue engineering of skin, *Mater. Today* **2008**, *11*, 26.
- (8) Ueno, H.; Mori, T.; Fujinaga, T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *52*, 105.
- (9) Ravi Kumar, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications, *React. Funct. Polym.* **2000**, *46*, 1.
- (10) Kim, I.-Y.; Seo, S.-J.; Moon, H.-S.; Yoo, M.-K.; Park, I.-Y.; Kim, B.-C.; Cho, C.-S. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications, *Biotech. Adv.* **2008**, *26*, 1.
- (11) Muzzarelli, R. A. A. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone, *Carbohydr. Polym.* **2009**, *76*, 167.
- (12) Mourya, V. K.; Inamdar, N. N. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore, *React. Funct. Polym.* **2008**, *68*, 1013.
- (13) Zhang, M.; Li, X. H.; Gong, Y. D.; Zhao, N. M.; Zhang, X. F. Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PEG, *Biomaterials* **2002**, *23*, 2641.
- (14) Wu, Y.-B.; Yu, S.-H.; Mi, F.-L.; Wu, C.-W.; Shyu, S.-S.; Peng, C.-K.; Chao, A.-C. Preparation and characterization on mechanical and antibacterial properties of chitsoan/cellulose blends, *Carbohydr. Polym.* **2004**, *57*, 435.
- (15) Aldana, A. A.; González, A.; Strumia, M. C.; Martinelli, M. Preparation and characterization of chitosan/genipin/poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) films for controlled release drugs, *Mater. Chem. Phys.* **2012**, *134*, 317.
- (16) Zhu, N.; Li, M. G.; Cooper, D.; Chen, X. B. Development of novel hybrid poly(l-lactide)/chitosan scaffolds using the rapid freeze prototyping technique, *Biofabrication* **2011**, *3*, 034105.
- (17) Corrales, T.; Larraza, I.; Catalina, F.; Portolés, T.; Ramírez-Santillán, C.; Matesanz, M.; Abrusci, C. In Vitro Biocompatibility and Antimicrobial Activity of Poly(ε-caprolactone)/Montmorillonite Nanocomposites, *Biomacromolecules* **2012**, *12*, 128090442006.
- (18) Wyszogrodzka, M.; Haag, R. Synthesis and Characterization of Glycerol Dendrons, Self-Assembled Monolayers on Gold: A Detailed Study of Their Protein Resistance, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1043.

- (19) Kessler, F.; Kühn, S.; Radtke, C.; Weibel, D. E. Controlling the surface wettability of poly(sulfone) films by UV-assisted treatment: benefits in relation to plasma treatment, *Polym. Int.* **2013**, *62*, 310.
- (20) Rajajeyaganthan, R.; Kessler, F.; de Mour Leal, P. H.; Kühn, S.; Weibel, D. E. Surface Modification of Synthetic Polymers Using UV Photochemistry in the Presence of Reactive Vapours, *Macromol. Symp.* **2011**, 299-300, 175.
- (21) Paez, J. I.; Strumia, M. C.; Passeggi Jr, M. C. G.; Ferrón, J.; Baruzzi, A. M.; Brunetti, V. Spontaneous adsorption of 3,5-bis(3,5-dinitrobenzoylamino) benzoic acid onto carbon, *Electrochim. Acta* **2009**, *54*, 4192.
- (22) Appoh, F. E.; Kraatz, H.-B. Voltammetric studies of dendrimer multilayers: Layer-by-layer assembly of metal-peptide dendrimers multilayers, *J. App. Polym. Sci.* **2009**, *111*, 709.
- (23) Yang, M.; Tsang, E. M. W.; Wang, Y. A.; Peng, X.; Yu, H.-Z. Bioreactive Surfaces Prepared via the Self-Assembly of Dendron Thiols and Subsequent Dendrimer Bridging Reactions, *Langmuir* **2005**, *21*, 1858.
- (24) Benhabbour, S. R.; Sheardown, H.; Adronov, A. Cell adhesion and proliferation on hydrophilic dendritically modified surfaces, *Biomaterials* **2008**, *29*, 4177.
- (25) Williams, A. A.; Sugandhi, E. W.; Macri, R. V.; Falkinham, J. O.; Gandour, R. D. Antimicrobial activity of long-chain, water-soluble, dendritic tricarboxylate amphiphiles, *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *59*, 451.
- (26) Wang, W.; Wang, A. Synthesis and swelling properties of pH-sensitive semi-IPN superabsorbent hydrogels based on sodium alginate-g-poly(sodium acrylate) and polyvinylpyrrolidone, *Carbohydr. Polym.* **2010**, *80*, 1028.
- (27) Yuan, Y.; Chesnutt, B. M.; Utturkar, G.; Haggard, W. O.; Yang, Y.; Ong, J. L.; Bumgardner, J. D. The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release, *Carbohydr. Polym.* **2007**, *68*, 561.
- (28) Sung, H.-W.; Huang, R.-N.; Huang, L. L. H.; Tsai, C.-C. In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **1999**, *10*, 63.
- (29) Leane, M. M.; Nankervis, R.; Smith, A.; Illum, L. Use of the ninhydrin assay to measure the release of chitosan from oral solid dosage forms, *Int. J. Pharm.* **2004**, *271*, 241.
- (30) Lewandowska, K. Miscibility and interactions in chitosan acetate/poly(N-vinylpyrrolidone) blends, *Thermochim. Acta* **2011**, *517*, 90.
- (31) Fujikawa, S.; Yokota, T.; Koga, K.; Kumada, J.-i. The continuous hydrolysis of geniposide to genipin using immobilized β -glucosidase on calcium alginate gel, *Biotech. Lett. Biotechnol Lett* **1987**, *9*, 697.
- (32) Butler, M. F.; Ng, Y.-F.; Pudney, P. D. A. Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2003**, *41*, 3941.
- (33) Silva, C. L.; Pereira, J. C.; Ramalho, A.; Pais, A. A. C. C.; Sousa, J. J. S. Films based on chitosan polyelectrolyte complexes for skin drug delivery: Development and characterization, *J. Membr. Sci.* **2008**, *320*, 268.
- (34) Spei, M.; Holzem, R. Thermoanalytical determination of the relative helix content of keratins, *Colloid Polym. Sci. Colloid & Polymer Sci* **1989**, *267*, 549.
- (35) de Mesquita Sá Junior, J. J.; Ricardo Backes, A. A simplified gravitational model to analyze texture roughness, *Pattern Recognition* **2012**, *45*, 732.
- (36) Paez, J. I.; Martinelli, M.; Brunetti, V.; Strumia, M. C. Dendronization: A Useful Synthetic Strategy to Prepare Multifunctional Materials, *Polymers* **2012**, *4*, 355.
- (37) Wu, T.; Zivanovic, S. Determination of the degree of acetylation (DA) of chitin and chitosan by an improved first derivative UV method, *Carbohydr. Polym.* **2008**, *73*, 248.
- (38) Schreml, S.; Szeimies, R.-M.; Prantl, L.; Landthaler, M.; Babilas, P. Wound healing in the 21st century, *J. Am. Aca. Derma.* **2010**, *63*, 866.
- (39) DiPietro, L. A.; Burns, A. L. *Wound Healing: Methods and Protocols*; Humana Press Incorporated, 2003.

- (40) Gethin, G. The significance of surface pH in chronic wounds, *Wound healing Sci.* **2007**, 3, 52.
- (41) Weller, C.; Sussman, G. Wound dressing uptake, *J. Pharm. Pract. Res.* **2006**, 36, 318.
- (42) Dias, A. M. A.; Braga, M. E. M.; Seabra, I. J.; Ferreira, P.; Gil, M. H.; de Sousa, H. C. Development of natural-based wound dressings impregnated with bioactive compounds and using supercritical carbon dioxide, *Int. J. Pharm.* **2011**, 408, 9.
- (43) Palec, D. Use of bilayer matrix wound dressing to improve healing in patients with complex mixed etiology lower extremity wounds, *J. Vasc. Nursing* **2008**, 26, 87.
- (44) Boateng, J. S.; Matthews, K. H.; Stevens, H. N. E.; Eccleston, G. M. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review, *J. Pharm. Sci.* **2008**, 97, 2892.
- (45) Moura, L. I. F.; Dias, A. M. A.; Carvalho, E.; de Sousa, H. C. Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment—A review, *Acta Biomaterialia* **2013**, 9, 7093.
- (46) Martínez-Camacho, A. P.; Cortez-Rocha, M. O.; Ezquerro-Brauer, J. M.; Graciano-Verdugo, A. Z.; Rodríguez-Félix, F.; Castillo-Ortega, M. M.; Yépiz-Gómez, M. S.; Plascencia-Jatomea, M. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties, *Carbohydr. Polym.* **2010**, 82, 305.
- (47) Enescu, D.; Hamciuc, V.; Ardeleanu, R.; Cristea, M.; Ioanid, A.; Harabagiu, V.; Simionescu, B. C. Polydimethylsiloxane modified chitosan. Part III: Preparation and characterization of hybrid membranes, *Carbohydr. Polym.* **2009**, 76, 268.
- (48) Raafat, D.; Sahl, H.-G. Chitosan and its antimicrobial potential – a critical literature survey, *Microbial Biotech.* **2009**, 2, 186.
- (49) Kong, M.; Chen, X. G.; Xing, K.; Park, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review, *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, 144, 51.
- (50) Kong, M.; Chen, X. G.; Liu, C. S.; Liu, C. G.; Meng, X. H.; Yu, L. J. Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli*, *Colloids Surf., B* **2008**, 65, 197.
- (51) Jayakumar, R.; Prabakaran, M.; Sudheesh Kumar, P. T.; Nair, S. V.; Tamura, H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications, *Biotech. Adv.* **2011**, 29, 322.
- (52) Gordon, S.; Taylor, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity, *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, 5, 953.
- (53) Gordon, S. Alternative activation of macrophages, *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, 3, 23.
- (54) Puig-Kröger, A.; Sierra-Filardi, E.; Domínguez-Soto, A.; Samaniego, R.; Corcuera, M. T.; Gómez-Aguado, F.; Ratnam, M.; Sánchez-Mateos, P.; Corbí, A. L. Folate Receptor β Is Expressed by Tumor-Associated Macrophages and Constitutes a Marker for M2 Anti-inflammatory/Regulatory Macrophages, *Cancer Res.* **2009**, 69, 9395.
- (55) Ulland, A. E.; Shearer, J. D.; Coulter, C.; Caldwell, M. D. Altered Wound Arginine Metabolism by Corticosterone and Retinoic Acid, *J. Surgical Res.* **1997**, 70, 84.
- (56) Porporatto, C.; Bianco, I. D.; Riera, C. M.; Correa, S. G. Chitosan induces different L-arginine metabolic pathways in resting and inflammatory macrophages, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2003**, 304, 266.

PARTE EXPERIMENTAL



14.1. MATERIALES Y EQUIPOS

14.1.1. Materiales

Quitano (Ch, bajo peso molecular LMW, 85% de desacetilación, Sigma Aldrich); genipina (Gen, Wako); polivinilpirrolidona (PVP, Todo Droga); tris[(t-butoxicarbonil)etil]aminometano (AB, Frontier Sci); tris[(t-butoxicarbonil)etil]metilsocianato (W, Frontier Sci); acrilato de metilo (MA, Todo Droga);

epiclorhidrina (ECH, Riedel-de Hen); butilendiglicidil éter (BDGE, Sigma Aldrich); clorhidrato de glicidiltrimetilamonio (gtmac, Sigma Aldrich); cido fólico (F, Todo Droga); propranolol (PROP, Sigma Aldrich); ibuprofeno (IBU, Sigma Aldrich); nimodipina (Nimo, Sigma Aldrich); carbonato de sodio (Cicarelli); cloruro de tionilo (Merck); cido 5-nitroisoftálico 99% (Anedra); paladio activado sobre carbono 10% (Aldrich); silica gel 60 (Merck); bromuro de potasio 99%, grado FT-IR (Aldrich); cloroformo deuterado 99,8% D (Aldrich); sulfato de cobre pentahidrato (Aldrich); peróxido de hidrógeno 98% (Aldrich); permanganato de potasio (Aldrich); oxalato de sodio (Aldrich); cido nítrico (Sintorgan).

Los solventes anhidros se destilaron, agregando sodio metálico y benzofenona en el caso de tetrahidrofurano grado HPLC (THF). Estos solventes se conservaron con hilos de sodio o con tamices moleculares 4 , según corresponda. Los solventes de grado HPLC, así como los solventes deuterados, y todos los reactivos comerciales se usaron sin purificación. Todas las reacciones que involucraron compuestos sensibles al aire y a la humedad, se realizaron en equipos bajo atmósfera de ntrgeno (5,0, Indura). En todas las soluciones acuosas se empleó agua ultrapura (MilliQ RiOs 16, Millipore).

14.1.2. Equipos

Los **espectros de infrarrojo** con transformada de Fourier (FT-IR) de las muestras se obtuvieron en un espectrómetro Nicolet Avatar 360 FT-IR en discos de KBr (1% muestra) o empleando una pastilla de AgBr. Para los espectros de **reflectancia difusa** con transformada de Fourier (DR-FTIR), se empleó el accesorio de Smart Diffuse Reflectance FT-IR Thermo Scientific, utilizando el *kit* Si-carb para tomar la muestra (raspando la superficie de la misma). Para los espectros de **reflectancia total atenuada** (ATR-FTIR) de las películas, se utilizó el accesorio Thermo Scientific Smart ATR, empleando una celda de ZnSe⁴⁵ para sólidos de índice de refracción 2,4 a 1000 cm⁻¹, intervalo de medición 4000 a 650 cm⁻¹ y profundidad de penetración 2 m. Todos los espectros IR se obtuvieron con 32 escaneos y una resolución de 4 cm⁻¹.

Los espectros de **resonancia magnética nuclear** de ^1H y ^{13}C se realizaron en un equipo Bruker Advance-400 MHz. Los corrimientos químicos (δ) son informados en ppm relativo al tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Las muestras se disolvieron o hincharon en solventes deuterados (D_2O , CDCl_3 , d^4 -ácido acético 40% V/V o DCI 35 % V/V en D_2O), a temperatura ambiente. Los espectros de **RMN- ^{13}C en estado sólido** de las partículas, se adquirieron usando el equipo RMN Bruker Advance II-300 con una celda de 4 mm a temperatura ambiente. Se empleó el experimento *cross-polarization and magic angle spinning* (CP-MAS por sus siglas en inglés),¹ con una frecuencia de operación de 75,46 MHz y adamantano como referencia externa.

Las mediciones de **calorimetría diferencial de barrido** (DSC) se realizaron en un equipo Modulated-DSC 2920, TA-Instruments, con 2 mg de muestra. Se evaluó el comportamiento de la muestra entre 40 y 400°C con una rampa de calentamiento de 10°C. Los **análisis de termogravimetría** (TGA) se realizaron en el equipo High-Res. TGA 2950, TA-Instruments, en cápsulas de aluminio con 5 mg de muestra, no herméticas, empleando la misma rampa e intervalo de calentamiento que en TGA, en atmósfera de nitrógeno. El programa TA Universal Analysis® se utilizó para analizar las curvas resultantes de dichos estudios.

Se empleó el **microscopio electrónico de barrido** marca Philips 501B (Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI, Córdoba). Las esferas se colocaron en el porta muestras de aluminio previamente pulido y con un recubrimiento de oro con un equipo *Sputtering, Desk II, Denton Vacuum* durante 120 s. El microscopio se opera en modo de alto vacío (HV por sus siglas en inglés), a un voltaje de 12 kV.

Las imágenes de **microscopía de fuerza atómica** de las partículas se tomaron con un equipo *UltraObjective - Surface Imaging Systems GmbH* (Laboratorio de Nanoscopías, INTI, Buenos Aires). Las películas fueron evaluadas en el microscopio de fuerza atómica Bruker Innova (Laboratorio Cemetro, UTN, Córdoba). Se empleó el modo no contacto (*tapping*), cantiléver de Si con una constante de fuerza nominal de 48 N/m (*NanoProbes GmbH*), y puntas modelo MPP-1123 Veeco. Se utilizaron velocidades de barrido en el intervalo de 2-3 Hz. Los parámetros, especialmente la altura de partida, la

amplitud y la retroalimentación se ajustaron para obtener la mejor resolución. Para cada muestra se tomaron imágenes en diferentes puntos para obtener datos confiables y reproducibles. Se tomaron las señales de salida correspondientes a la altura y al contraste de fases. Los análisis de rugosidad de las imágenes se realizaron con el software Nanoscope 1.40®. Para la descripción de la topografía de las superficies, frecuentemente, se emplea la medición de la desviación cuadrática media de la rugosidad (RSM por sus siglas en inglés). Este parámetro es calculado a partir de la ecuación 14.1,

$$RSM = \sum_{i=1}^N \left[\frac{(z_i - \langle z \rangle)^2}{N} \right]^{1/2} \quad (14.1)$$

donde, z_i representa la altura en un punto del perfil superficial, z es la altura media del perfil superficial, y N es el número de puntos analizados.

RSM es ampliamente utilizada debido tanto a la simplicidad de su estimación, como a su capacidad de caracterizar la superficie con un único valor. En el presente Trabajo de Tesis, se calculó mediante la utilización del programa Nanoscope 1.40®.

Las imágenes ópticas de las películas se tomaron en un microscopio digital CMOS, del cual se adquiere una imagen que es digitalizada con el programa ImageJ 1.40g®. Para el **análisis de las imágenes**, se realizan dos transformaciones, la primera, a escalas de grises y, luego, se aplica *watershed*. La imagen resultante es un gráfico tridimensional (figura 11.9), en el cual cada punto representa una posición espacial (coordenada x e y) en píxeles, y el valor de amplitud (eje z).² Además, se analizó el perfil del gráfico empleando el mismo programa. Estos ensayos fueron realizados con la colaboración del Dr. Marcelo Romero (investigador del Grupo de Polímeros, Dpto. Qca. Orgánica, FCQ, UNC).

14.2. METODOLOGÍAS

14.2.1. Síntesis del dendrón Bisamina de Behera, BB (correspondiente al capítulo 7.1)

Se obtuvo el dendrón BB siguiendo el esquema que se muestra en la figura 7.1 (capítulo 7). Inicialmente, el ácido 5-nitroisoftálico (di-ácido) fue convertido en cloruro de diácido con cloruro de tionilo SOCl_2 (10 mL). Luego, el cloruro de di-ácido (0,47 g, 2,00 mmol) y trietanolamina (0,5 mL) en THF anhidro (50 mL), se hicieron reaccionar con el dendrón AB (1,66 g, 4,00 mmol) por 24 h a temperatura ambiente con agitación. Cuando la reacción se completó, se procedió al lavado y secado del producto, BB- NO_2 (dendrón BB con grupo nitro como punto focal). Se purificó el producto por cromatografía en columna empleando sílica gel 60 Merck y la mezcla cloruro de metileno-agua en distintas proporciones como fase móvil, obteniéndose un sólido blanco. Posteriormente, la molécula dendrítica (0,80 g, 0,80 mmol) disuelta en metanol (20 mL) fue reducida durante 4 h a 40 psi H_2 y temperatura ambiente con 100 mg de Pd/C 10%, empleando un hidrogenador S-1914 Parr®. Se obtuvo el dendrón BB (grupo amino como punto focal) con un rendimiento del 95% (0,7418 g).

RMN- ^{13}C (CDCl_3) (δ ppm): 116,0 (C_4 aromático); 118,0 ($\text{C}_{2 \text{ and } 6}$ aromático); 173,1 ($\text{C}=\text{O}$ éster); 163,3 ($\text{C}=\text{O}$ amida); 148,3 (CNO_2); 136,9 ($\text{C}_{3 \text{ and } 5}$ aromático); 80,9 (OCCH_3); 58,4 (CONHC); 30,3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 29,9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$) y 27,9 (OCCH_3).

RMN- ^1H (CDCl_3) (δ ppm): 7,25 (s, 2H, CH aromático); 7,38 (s, 1H, CH aromático); 2,25 (m, 12H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 2,08 (m, 12H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$) y 1,36 (s, 54H, $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$).

14.2.2. Obtención de polvos dendronizados (correspondiente al capítulo 3).

14.2.2.1. Dendronización. Obtención de Ch-W.

Se hizo reaccionar quitosano (100 mg) con weisocianato (290 mg), relación molar 1:2 moles de grupos amino de Ch y grupos isocianato de W, en

dimetilacetamida a 60°C, en atmósfera de nitrógeno durante 48 h. Se empleó como catalizador dilaurato de dibutilestano (0,02 mL), para favorecer la reacción del grupo isocianato con los grupos amino e hidroxilo de Ch, evitando reacciones secundarias. Se obtuvo un producto sólido beige, luego de la evaporación del solvente hasta sequedad, el lavado exhaustivo con cloroformo para extraer el dendrón sin reaccionar, y finalmente, el secado al vacío obteniendo un rendimiento del 56%. Se determinó por *test* de ninhidrina $5,27 \times 10^{-4}$ moles de W/g de matriz.

FT-IR (cm^{-1}): 1727 (estiramiento C=O), 848 y 757 (estiramiento O-C-O-*tert*-butilo), 2973 (estiramiento CH₃), 1662 (estiramiento C=O) y 1457 (estiramiento N-C-O); estas últimas señales se atribuyen a los grupos urea y/o uretano (unión Ch-W).

RMN-¹³C sólido (ppm): ausencia de la señal a 125 (C isocianato de W) y la aparición de una nueva señal en 156 (C de urea y/o uretano). Se observó la superposición de bandas de W y Ch (detalladas en figura 4.10, capítulo 4).

RMN-¹H d⁴-ácido acético (δ ppm): aparición a 1,3 (CH₃ *tert*-butilo de W). Se asignaron las señales características de Ch a 1,9 (CH₃ acetilo de Ch), y a 3,0, 3,6 y 3,8 (CH, anillo glucopiranososa de Ch).

14.2.2.2. Obtención de Ch-MA-AB

- Activación de Ch con acrilato de metilo (Ch-MA)

Se hizo reaccionar quitosano (500 mg) con acrilato de metilo (0,10 mL, 0,95 g.mL⁻¹), en metanol a 45°C durante 24 h. Luego, se procedió a purificar el producto, agregando metanol (30 mL), centrifugando (40 min. 5×10^3 rpm) y separando el sobrenadante. Se repitió 3 veces la operación, para eliminar restos de MA. Posteriormente, se procedió a secar al vacío el producto. De esta manera, se obtuvo un producto particulado blanco, con rendimiento del 68%. Se determinó por el *test* de ninhidrina $7,78 \times 10^{-4}$ moles MA/g matriz.

FT-IR (cm^{-1}): 1735 (estiramiento C=O, de MA). Además, señales características de Ch a 3414 (estiramiento O-H), 3215 (estiramiento NH₂), 2926 (estiramiento C-H), 1664 (tensión del C=O), 1574 (torsión NH₂), 1423 (torsión CH₂) y 1.316 (tensión C-N).

RMN-¹H DCI (δ ppm): 3,8 (H 3, 4 y 6), 3,6 (H 5 y 6'), 3,1 (H 2) y 2,0 (H 7); aparición de la señal a 2,9 ppm correspondiente al protón del grupo metileno (-CH₂-).

- Dendronización. Obtención de Ch-MA-AB y Ch-MA-BB

Se hizo reaccionar Ch-MA (75,0 mg) con el dendrón correspondiente (100,0 mg de AB ó 220,0 mg de BB) en metanol y atmósfera de nitrógeno a 50°C durante 24 h. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se procedió a filtrar los productos, lavar con metanol y cloroformo (tres veces) para eliminar los dendrones que no reaccionaron, y finalmente, secar los productos obtenidos, Ch-MA-AB y Ch-MA-BB (polvo color beige).

FT-IR (cm⁻¹): señales características de Ch y a 1726 (estiramiento C=O), 840 y 757 (deformación O-C del grupo O-C-*tert*-butilo) correspondiente a los dendrones. Se observa a 1662 cm⁻¹ (estiramiento del grupo C=O, banda I de la amida) y aumento en la intensidad relativa de la señal a 1313 cm⁻¹ (deformación C-N).

14.2.3. Obtención de esferas dendronizadas (correspondiente al capítulo 7)

14.2.3.1. Obtención de esferas

Las microesferas de quitosano se prepararon por disolución del polímero (2,85% P/V) en una solución de ácido acético al 5,00% V/V (100 mL). Luego de agitación constante durante 24 h a temperatura ambiente, la solución de Ch se hizo gotear con una jeringa sobre una solución de NaOH (0,5 M) con agitación magnética continua, figura 14.1. Este paso implica la neutralización del ácido acético en el gel de Ch y en consecuencia, la formación de esferas de cadenas de Ch. Las mismas se filtraron y lavaron exhaustivamente con agua destilada para remover el exceso de NaOH. Posteriormente, se secaron a temperatura ambiente para remover el agua de la estructura porosa.

14.2.3.2. Obtención de matrices activadas: Ch-ECH y Ch-BDGE

- Ch-ECH

Se adicionaron esferas de Ch (500 mg) a una solución de epíclorhidrina (ECH) 0,1 M (50 mL), de modo de obtener una relación molar 1:1 de grupos amino y epóxido, a 45°C durante 2 h, con agitación constante a 200 rpm (figura 14.1). Después de este período, las esferas Ch-ECH se filtraron, se lavaron con agua destilada (3 veces) y se secaron al vacío. Se determinó por titulación de grupos epóxido $1,80 \times 10^{-4}$ moles de ECH/g de matriz.

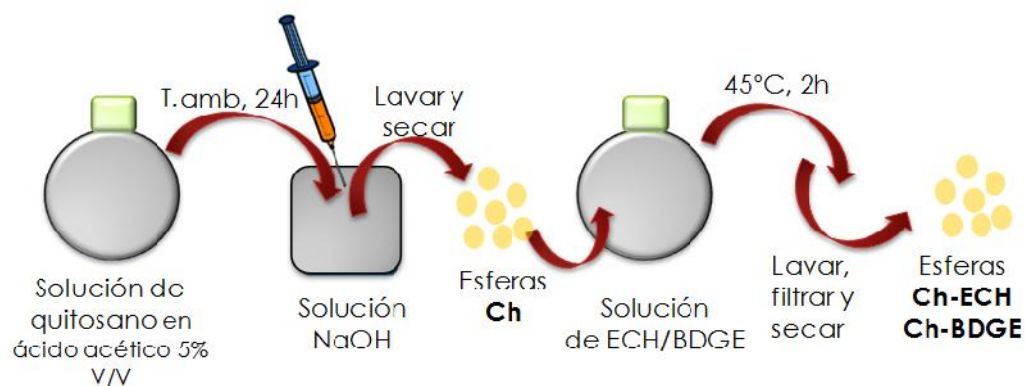


Figura 14.1. Obtención de esferas de Ch y su activación con ECH y BDGE.

DR-FTIR (cm^{-1}): aparición de señal a 3035 (estiramiento C-H epóxido), y las señales a 1249 y 827 (estiramiento simétrico y asimétrico C-O-C, grupo éter). También se observan las demás señales características de Ch.

- Ch-BDGE

Se obtuvieron esferas de Ch con butanodioldiglicidil éter (BDGE), Ch-BDGE, siguiendo un procedimiento semejante que para las esferas de Ch-ECH, descrito anteriormente. Se determinó por titulación de grupos epóxidos $3,78 \times 10^{-4}$ moles de BDGE/g de matriz.

DR-FTIR (cm^{-1}): aparición de señal a 3027 (estiramiento C-H epóxido), y las señales a 1240 y 824 (estiramiento simétrico y asimétrico C-O-C, grupo éter). También se observan las demás señales características de Ch.

14.2.3.2. Obtención de esferas dendronizadas: Ch-ECH-AB, Ch-ECH-BB, Ch-BDGE-AB y Ch-BDGE-BB

Las matrices de Ch-ECH y Ch-BDGE activadas con grupos epóxido se colocaron en agua ($100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) durante 24 h. Por otro lado, se preparó una solución 18 mM de los dendrones AB y BB, en Na_2CO_3 0,2 M, que se adicionaron a las microesferas (100,0 mg), manteniendo una relación molar 1:0,6 de grupos epóxido y dendrón. Se mantuvo la agitación a 200 rpm durante 36 h a 60°C . Una vez transcurrido el tiempo de reacción se obtuvieron los diferentes productos, Ch-ECH-AB, Ch-ECH-BB, Ch-BDGE-AB y Ch-BDGE-BB. Las esferas fueron filtradas y lavadas con agua destilada, solución de ácido acético 0,1 M y nuevamente con agua destilada. Finalmente, se secaron al vacío. Se determinó por titulación de grupos epóxido los moles de dendrón unido por gramo de matriz, estos valores fueron $1,80 \times 10^{-4}$ (Ch-ECH-AB), $2,79 \times 10^{-5}$ (Ch-ECH-BB), $2,27 \times 10^{-4}$ (Ch-BDGE-AB) y $8,00 \times 10^{-5}$ (Ch-BDGE-BB), con rendimientos de reacción de 100, 25, 100 y 35 %, respectivamente.

DR-FTIR (cm^{-1}): En los diferentes productos se observó una banda a 1729 correspondiente al grupo carbonilo de los grupos éster de los dendrones, confirmando así la presencia de los mismos. Debido a la intensa absorción de las bandas de Ch, fue difícil identificar otros cambios en los espectros de las esferas dendronizadas.

14.2.4. Obtención de películas dendronizadas (correspondiente al capítulo 11)

14.2.4.1. Obtención de películas Ch-PVP y Ch-Gen

Las películas se prepararon a partir de una solución de quitosano (500,0 mg) en ácido acético al 1,5% V/V (50 mL). Se dejó agitando a 400 rpm durante toda una noche. Posteriormente, se adicionó uno de los entrecruzantes empleados, en una proporción en masa respecto de Ch de 18% y 0,1% para PVP y Gen, respectivamente. Luego de 2 h, se vertieron las soluciones sobre

placas de Petri de 10 cm de diámetro, (figura 14.2). Se dejó secar a temperatura ambiente, hasta peso constante. Se obtuvieron así dos películas translúcidas, Ch-PVP y Ch-Gen con un porcentaje de entrecruzamiento de 93,7 y 75,0%, respectivamente, determinado por *test* de ninhidrina.

ATR-FTIR (cm^{-1}) Ch-PVP: 1649 y 1400 (estiramiento C=O y C-N, respectivamente, del grupo lactama de PVP). Además, se observó una disminución en la intensidad de la banda a 894 cm^{-1} correspondiente al grupo amino de Ch.

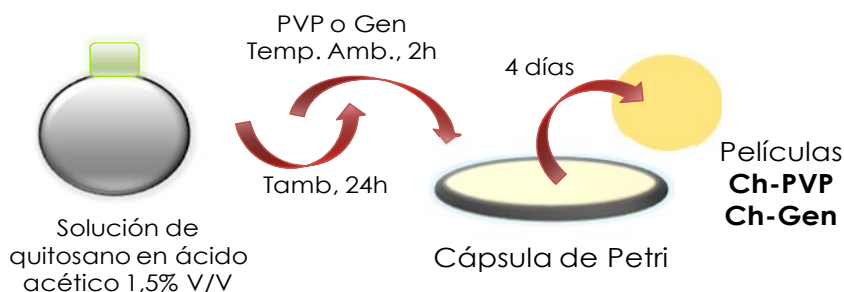


Figura 14.2. Esquema de obtención de películas Ch-PVP y Ch-Gen.

ATR-FTIR (cm^{-1}) Ch-Gen: 1408 (estiramiento C-N) y 1653 (estiramiento C=O del grupo amida), evidencian la unión de Gen al Ch. Además, a 1564 cm^{-1} se observa el solapamiento de las bandas de vibración del enlace N-H de Ch y del grupo amida de la unión Ch-Gen.³

14.2.4.2. Dendronización de las películas. Obtención de Ch-PVP-W y Ch-Gen-W

En la base del recipiente (diseñado durante esta Tesis Doctoral), figura 11.5, capítulo 11), se colocaron las películas Ch-PVP o Ch-Gen (100 mg) en 5 mL de dimetilacetamida (DMAc) durante 1 h a temperatura ambiente y atmósfera de nitrógeno. Posteriormente, se adicionó el dendrón (150 mg) y el catalizador dilaurato de dibutilestaño (DBTL, 0,02 mL), y se mantuvo la agitación durante 48 h a 60°C , en atmósfera de nitrógeno. Una vez transcurrido este periodo, se retiraron las películas del equipo y se procedió a

lavarlas con metanol para remover el dendrón sin reaccionar. Las películas obtenidas, Ch-PVP-W y Ch-Gen-W, se secaron al vacío y se determinó, mediante el *test* de ninhidrina, una unión de $8,67 \times 10^{-5}$ y $1,29 \times 10^{-5}$ moles de W por gramo de matriz, respectivamente.

ART-FTIR (cm^{-1}) caras modificadas (lado b) de Ch-PVP-W y Ch-Gen-W: 2968 (estiramiento C-H), 1225 (estiramiento C-O) y 850 (estiramiento C-O) característicos del dendrón. Además, las bandas correspondientes a las matrices, descritas en el inciso anterior.

ART-FTIR (cm^{-1}) caras no modificadas (lado a) de Ch-PVP-W y Ch-Gen-W: sólo presentan las señales correspondientes a las matrices (descritas anteriormente), sin evidencia del dendrón.

14.2.5. Modificaciones de los productos dendronizados (correspondientes al capítulo 4 y 8).

14.2.5.1. Hidrólisis de grupos periféricos de los dendrones AB y BB

Se llevó a cabo colocando 0,50 g de los polvos (Ch-W y Ch-MA-AB) o esferas dendronizadas (Ch-ECH-AB, Ch-ECH-BB, Ch-BDGE-AB y Ch-BDGE-BB) en 3 mL ácido fórmico 85% V/V, a 60°C durante 4 días. Transcurrido dicho tiempo, los sistemas se filtraron, lavaron exhaustivamente y secaron, para obtener los sistemas Ch-Wh, Ch-MA-ABh, Ch-ECH-ABh, Ch-ECH-BBh, Ch-BDGE-ABh y Ch-BDGE-BBh. Se determinó por titulación ácido-base el número de moles de dendrón hidrolizado por gramo de matriz, estos valores fueron $7,56 \times 10^{-4}$ (Ch-Wh), $4,61 \times 10^{-4}$ (Ch-MA-ABh), $4,94 \times 10^{-5}$ (Ch-ECH-ABh), $2,63 \times 10^{-5}$ (Ch-ECH-BBh), $4,29 \times 10^{-5}$ (Ch-BDGE-ABh) y $4,83 \times 10^{-5}$ (Ch-BDGE-BBh).

Los espectros infrarrojo revelaron la hidrólisis de los grupos periféricos, por el corrimiento de la banda a 1726 a 1714 cm^{-1} , correspondientes a un grupo éster y ácido, respectivamente. Además, disminuyó la banda a 2968 cm^{-1} (estiramiento C-H, del grupo *tert*-butilo).

14.2.5.2. Unión de clorhidrato de glicidiltrimetilamonio a Ch

Se colocaron 0,50 g de quitosano en agua destilada (10 mL), y a continuación, clorhidrato de glicidiltrimetilamonio (gtmac) en una relación molar de 1:3 entre grupos amino de Ch y grupos epóxidos de gtmac. La reacción se llevó a cabo bajo atmósfera de nitrógeno a 70°C durante 10 h. Después, la solución se vertió en acetona/etanol (50/50 V/V) para obtener el precipitado (polímero-gtmac), que se filtró y lavó con acetona varias veces. Al sólido obtenido, se lo secó a temperatura ambiente. De esta manera se obtuvo Ch-gtmac (descrito en el inciso 4.2.1), con un $1,99 \times 10^{-3}$ moles de gtmac por gramo de matriz, determinado por titulación potenciométrica ácido-base. El procedimiento semejante se realizó para obtener Ch-W con gtmac (inciso 4.2.2.1) y Ch-MA-AB-gtmac (inciso 4.2.2.2).

Por otro lado, se realizó el mismo procedimiento para obtener Ch-gtmac con un menor grado de sustitución, empleando una relación molar de 1:0,6 entre moles de grupos amino de Ch y moles de gtmac. El producto de esta síntesis corresponde al descrito en el punto 4.2.2.1.

Por espectrofotometría infrarroja se evidenció la unión de gtmac a los polímeros, aparición de las bandas a 1484 cm^{-1} , correspondiente a la deformación angular C-H, metilos de amonio cuaternario de gtmac. Además, la disminución considerable en la intensidad relativa de la banda a 1590 cm^{-1} , correspondiente al grupo amino de Ch que reacciona con gtmac.

RMN- ^1H (ppm) del Ch-gtmac: 3,1 (CH_3 unidos al amonio cuaternario) evidencia la unión de gtmac. Además, aparecen las señales características de Ch, anteriormente descritas.

14.2.5.3. Unión de ácido fólico

- Formación de esferas de quitosano y ácido fólico: Ch-F.

Se preparó una solución de ácido fólico (F) y clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) en 20 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), con una relación molar 1:1 de F y EDC. Por otro lado, se colocó 500,0 mg de Ch en una solución de ácido acético 1,5% V/V. Una vez disuelto el polímero, se le agregó la solución de ácido fólico y se mantuvo en agitación a

temperatura ambiente durante 16 h. Posteriormente, la solución amarilla resultante, se goteo en una solución de NaOH (0,5 M) como se describió en el proceso de formación de esferas de quitosano (inciso 14.2.3.1). Las esferas Ch-F fueron filtradas y lavadas exhaustivamente con solución de *buffer* fosfato y agua. Finalmente, se secaron y se evidenció la unión del ácido fólico al Ch por espectrofotometría IR, donde se observó la aparición de las bandas características de F a 1455 y 1604 cm^{-1} (vibraciones del enlace C=C, aromático).

- Unión de ácido fólico a los materiales dendronizados: Ch-W-F, Ch-MA-AB-F, Ch-ECH-AB-F y Ch-BDGE-AB-F.

Se realizó un procedimiento semejante al descrito anteriormente, con la diferencia que los sistemas Ch-W, Ch-MA-AB, Ch-ECH-AB y Ch-BDGE-AB se colocaron previamente en una solución de ácido acético. Después de la reacción con ácido fólico durante 16 h, se procedió a la purificación. Los productos resultantes tornaron de color amarillento, por la unión de F, y sus espectros de infrarrojo evidenciaron la unión del vector a las matrices.

14.2.6. Determinación de grupos funcionales

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado, y se informó el valor promedio en cada caso.

14.2.6.1. Test de ninhidrina

Se empleó este *test* para la determinación de grupos amino presentes en los diferentes polímeros. Una solución de ninhidrina (0,02 M) se preparó en el día del ensayo. Para cada experimento, se agregó 1 mL del reactivo a 2,0 mg de muestra contenida en un tubo de ensayo con 3 mL de agua. Luego, se llevó a ebullición durante 10 min para favorecer la formación del complejo coloreado de Ruhemann.⁴ Posteriormente, se midió la absorbancia de cada solución en un espectrofotómetro UV (Shimadzu AEU-210) a 570 nm. Previamente, se realizó una curva de calibración con glucosamina.

Los números de moles de grupos amino que reaccionaron por gramo de matriz, se calcularon comparando cada sistema con el blanco correspondiente (previo a la modificación), ecuación 14.2.

$$\text{moles}_{NR}^{PM} = \text{moles}_{NH_2}^{PB} - \text{moles}_{NH_2}^{PM} \quad (14.2)$$

donde, los subíndices NR y NH₂ representan los grupos amino modificados y libres, respectivamente; y los superíndices PM y PB corresponden a los polímeros modificados y blancos, respectivamente.

Además, se calcularon los porcentajes de modificación de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ modificación} = \left[\frac{\text{moles}_{NH_2}^{PB} - \text{moles}_{NH_2}^{PM}}{\text{moles}_{NH_2}^{PB}} \right] \times 100 \quad (14.3)$$

14.2.6.2. Titulación de grupos epóxido

La determinación de grupos epóxido en las esferas se realizó empleando HCl en piridina (previamente estandarizado).⁵ En este medio, el HCl produce la apertura del anillo. Se procedió a colocar 50,0 mg de polímero en 1,5 mL de HCl 0,05 M en piridina. Posteriormente, el exceso de ácido es titulado con NaOH 0,04 M (previamente estandarizado), en presencia de fenolftaleína (indicador ácido-base). Se evidenció el punto de inflexión por el cambio de color de incoloro a fucsia. De esta manera, empleando el volumen consumido de NaOH, se calculó el número de moles de HCl en exceso y así, el número de moles de grupo epóxido en la matriz, ecuación 14.4. Se realizó un blanco de esferas de quitosano.

$$\text{moles}_{epóxido} = \text{moles}_{HCl \text{ total}} - \text{moles}_{HCl \text{ exceso}} \quad (14.4)$$

14.2.6.3. Titulación de grupos ácido

La determinación de grupos ácidos en los polímeros se realizó mediante la titulación por retroceso, colocando un exceso de NaOH. Para ello, 30,0 mg de muestra en contacto con una solución de NaOH 0,04 M (3 mL), y el exceso de base, se tituló con HCl 0,01 M (estandarizado). El punto final de titulación se detectó con fenolftaleína. Se calcularon los valores de dendrón hidrolizado por gramo de matriz, en función de la siguiente ecuación:

$$\text{moles Dh/g matriz} = \frac{\text{moles}_{\text{NaOH total}} - \text{moles}_{\text{NaOH exceso}}}{\text{n}^{\circ} \text{ grupos periféricos} \times 30,0 \times 10^{-3} \text{ g}} \quad (14.5)$$

donde, Dh corresponde a los moles de dendrón AB o BB hidrolizado; NaOH total es el colocado en contacto con el polímero (3 mL, 0,04 M); NaOH exceso es el determinado por titulación; y n° de grupos periféricos serán 3 ó 6 según sea AB o BB, respectivamente.

En el caso particular de la titulación potenciométrica de Ch-gtmac (inciso 4.2.1), se registró la variación del potencial (mV) en función del volumen agregado de NaOH, para determinar el grado de modificación de gtmac y cuantificar los moles de grupos amino libre en la matriz, respecto al Ch.

14.2.7. Estudios de hinchamiento

La capacidad de adsorción de agua y la estabilidad de los distintos sistemas fue determinada por sus índices de hinchamiento en distintas soluciones *buffer* (diferentes valores de pH) de acuerdo al sistema, a temperatura ambiente. Los valores de pH de las soluciones fueron 1,2; 3,4; 6,8; y 7,4. Para los polvos (inciso 3.2.3), se determinaron los índices de hinchamiento (E_{sw}) en función del cambio de volumen (14.2.6.1). Mientras que, los índices de hinchamiento (E_{sw}) determinados para esferas y películas se realizaron a partir de la variación en masa (14.2.6.2). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado, y se informó el valor promedio de E_{sw} en cada caso.

14.2.7.1. Determinación de E_{sw} por variación de volumen

Se colocó en un tubo cónico graduado 0,1 mL de muestra con 5 mL de solución *buffer*. Durante un intervalo de 7 h, se registró la variación de volumen hasta llegar a un *plateau*. A partir de estos datos, se calculó el índice de hinchamiento de acuerdo a la ecuación 14.6, el cual indica la máxima capacidad de absorción de agua del sistema.

$$E_{sw}(\%) = \frac{V_h - V_s}{V_s} \times 100 \quad (14.6)$$

donde, V_h y V_s son los volúmenes de los sistemas en estado hinchado y seco, respectivamente.

14.2.7.2. Determinación de E_{sw} por variación en masa

Se sumergió 200 mg de muestra en un recipiente con la solución buffer (10 mL). Luego de cierto periodo de tiempo, se retiró la muestra del recipiente, se secó la superficie con papel absorbente y se pesó. Se siguió la variación de masa durante 7 h. El máximo hinchamiento alcanzado en cada sistema se calculó mediante la siguiente ecuación:

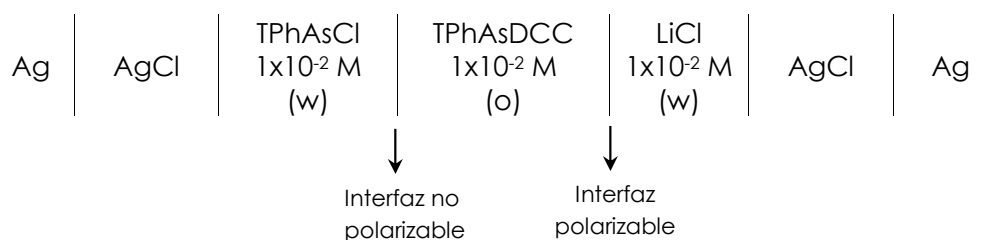
$$E_{sw}(\%) = \frac{M_h - M_s}{M_s} \times 100 \quad (14.7)$$

donde, M_h y M_s son las masas de los sistemas en estado hinchado y seco, respectivamente.

14.2.8. Estudios del comportamiento electroquímico. Voltametría cíclica. ITIES (corresponde al capítulo 5)

Los siguientes estudios se realizaron con el asesoramiento de la Dra. Valeria Juárez, investigadora del grupo de la Dra. Yudi (Dpto. de Físicoquímica, FCQ, UNC).

Las soluciones utilizadas fueron siempre electrolitos conductores en fase acuosa o en 1,2-dicloroetano (esquema 14.1). Para la fase acuosa se empleó LiCl $1,0 \times 10^{-2}$ M, mientras que como fase orgánica se utilizó la sal dicarbonilcobaltato de tetrafenilarsonio (TPhAsDCC) o la sal tetraclorofenilborato de tetrapentilamonio (TPATCIPhB) disueltos en 1,2-dicloroetano en una concentración igual a $1,0 \times 10^{-2}$ M. La solución acuosa en contacto con la fase orgánica dentro del compartimiento del electrodo de referencia fue cloruro de tetrafenilarsonio (TPhAsCl) $1,0 \times 10^{-2}$ M.



Esquema 14.1. Celda empleada.

Se empleó un potenciostato que tiene un sistema de compensación automática, para evitar el efecto de la caída de tensión óhmica (iR_{Ω}), debida a la gran resistencia del solvente orgánico. La eliminación de la caída iR_{Ω} se consigue a través de la interrupción de la corriente y el muestreo y posterior aplicación del potencial interfacial durante la interrupción del circuito.⁶ Para aplicar la señal de potencial se utilizó un generador de ondas L y P Electrónica Argentina. Los voltamperogramas se obtuvieron en un registrador BAS X-Y (Modelo MF – 9044) o con una placa de conversión D/A de Computer Boards conectada a una computadora.

En esta tesis se emplearon diferentes concentraciones de polímero en la fase acuosa (w), de acuerdo a la solubilidad de los mismos (tabla 14.1). Debido a la presencia de grupos funcionales ionizables en los polímeros estudiados, el valor del pH determina la cantidad de carga del polímero. De esta manera, se varió el pH de la fase acuosa (tabla 14.1) por adición de HCl y LiOH, para analizar el efecto de la carga del polímero en su comportamiento interfacial.

Tabla 14.1. Condiciones de experimentos realizados con distintos polímeros y fármacos [ibuprofeno (IBU) y propranolol (PROP)]c.

Polímeros	Concentración (% P/V)	Intervalo de pH	Fármaco, concentración (M)
Ch	0,40	1,2 – 5,3	-
Ch-W	0,40	1,2 – 3,5	PROP, 5×10^{-4}
Ch-Wh	0,40	1,2 – 6,8	-
Ch-gtmac (1:3)	0,01- 0,50	3,0 – 9,3	PROP e IBU, 5×10^{-4}
Ch-gtmac (1:0,6)	0,2-0,4	3,0 – 6,5	-
Ch-MA-AB-gtmac	0,05	5,0 – 7,5	IBU, 5×10^{-4}

Para llevar a cabo el estudio de la interacción de fármacos iónicos con los distintos polímeros, se añadieron a la fase acuosa los polielectrolitos y el fármaco, ibuprofeno (IBU) o propranolol (PROP). Los valores de pKa informados en la literatura para IBU y PROP (pKa 6,5 y 9,4, respectivamente), aseguran que las especies iónicas IBU⁻ y PROP⁺ predominan en los valores de pH estudiados, 7,5 y 1,2, respectivamente.

Se realizaron diferentes estudios de voltametría cíclica, variando la velocidad de barrido, el potencial de corte, el número de ciclos y el tiempo de pulso.

14.2.9. Comportamiento interfaz agua/aire. Balanza de Langmuir (corresponde al inciso 5.1.2.2)

Estos estudios se realizaron con la colaboración de la Lic. Candelaria Cámara, y el asesoramiento de la Dra. Valeria Juárez, quienes pertenecen al grupo de investigación de la Dra. Yudi (Dpto. Fisicoquímica, FCQ, UNC).

Para realizar las isotermas de presión superficial/área molecular, se depositaron cuidadosamente 35 μ L de solución de Ch-W 0,025% P/V (en metanol), sobre la superficie de la subfase. La subfase consistió en una solución de LiCl 1,0x10⁻²M.

Antes de agregar la solución, la superficie de la subfase acuosa se limpió cuidadosamente, realizando un barrido previo, y a continuación, los contaminantes de la superficie se eliminaron por succión desde la interfaz. La limpieza de la superficie se comprobó mediante la realización de una isoterma en ausencia de polímero y verificando que el valor de la presión superficial sea inferior a 0,1 mN / m. Después de depositar la solución de polímero, se esperó 10 min para que se evapore el solvente, y luego se comprimió la película mediante las dos barreras, a una velocidad de compresión de 5 mm / min, mientras que se registra la presión lateral (π) de la superficie.

14.2.10. Retención de cobre (II) (corresponde al inciso 9.1.1, sección III)

Se incubaron 10 mg de las correspondientes esferas [Ch-ECH, Ch-ECH-dendrones, Ch-BDGE y Ch-BDGE dendrones], en una solución de CuSO₄ 25 ppm (3 mL) a pH 5,0 durante 4 días. Posteriormente, se separó el sobrenadante y se determinó la concentración de cobre en solución por espectrofotometría de absorción atómica (determinación por F-AAS, en Instituto Superior de Investigación Desarrollo y Servicio en Alimentos ISIDSA). Luego, las esferas fueron puestas en contacto con una solución de HNO₃ 1M (3 mL) durante 24 h

para desorber el metal. De esta manera se determinó la concentración de cobre recuperado de cada matriz empleando la misma metodología espectroscópica. La figura 14.3 muestra un esquema del procedimiento realizado.

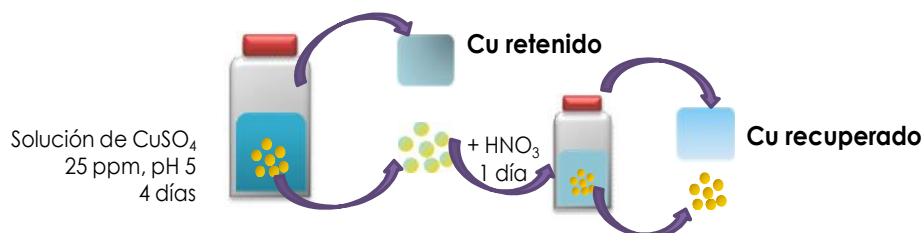


Figura 14.3. Esquema de retención y recuperación de cobre.

Los experimentos se realizaron por duplicado y la determinación de cobre (II) en solución por triplicado. La masa de cobre (II) informado por gramo de matriz, se calculó empleando la ecuación 14.8, y el porcentaje de cobre recuperado de la matriz, con la ecuación 14.9.

$$mg \text{ Cu/g matriz} = \frac{(C_{\text{Cu}}^m - C_{\text{Cu}}^e) \times V_{\text{sol}} \times PM_{\text{Cu}}}{m_e} \quad (14.8)$$

$$\% \text{ Cu recuperado} = \left[\frac{C_{\text{Cu}}^e - C_{\text{Cu}}^{e2}}{C_{\text{Cu}}^e} \right] \times 100 \quad (14.9)$$

donde, C_{Cu}^m , C_{Cu}^e y C_{Cu}^{e2} son las concentraciones de cobre (II) determinadas en las soluciones inicial (sin esferas), en contacto con esferas antes y luego del agregado de ácido nítrico, respectivamente. Además, V_{sol} , PM_{Cu} y m_e , corresponden al volumen de solución en contacto con las esferas, masa atómica del cobre y la masa de las esferas puestas en contacto.

14.2.11. Adsorción de BSA (corresponde al inciso 9.1.1.2, sección III)

Se preparó una solución de albúmina de suero bovino (BSA) $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, y se pusieron en contacto $6,0 \text{ mg}$ (m_e) de esferas (Ch-BDGE-ABh, Ch-BDGE-

ABh+Cu, Ch-BDGE-AB+Cu) con 3 mL (V_0) de la solución de BSA. Se determinó los mg de BSA adsorbidos a las 12 h, empleando el protocolo de Bradford.⁷

14.2.11.1. Protocolo de Bradford

Se agregó 1,5 mL del reactivo de Bradford a los tubos conteniendo 50,0 μ L de la solución de BSA en contacto con las esferas. Se realizó una curva de calibración para cada determinación, como se indica en la tabla 14.2. Se dejó a temperatura ambiente durante 30 min y se midió la absorbancia a 595 nm, con el blanco correspondiente.

Tabla 14.2. Ensayo de determinación de proteínas empleando 50 μ L de muestra y 1,5 mL del reactivo de Bradford.

N° tubo	Conc. BSA (mg/mL)
1	0,00
2	0,10
3	0,25
4	0,50
5	1,00
6, 7 y 8	Desconocida

A partir de la curva de calibración, se realizó una regresión lineal para conocer la concentración de BSA en la solución y, por último, se calcularon los mg de BSA por gramo de matriz, con la ecuación 14.10.

$$mg\ BSA/g\ matriz = \frac{(C_{BSA}^m - C_{BSA}^e) \times V_0}{m_e} \quad (14.10)$$

donde, C_{BSA}^m y C_{BSA}^e son las concentraciones de BSA (mg/mL) de la solución madre y en contacto con las esferas, respectivamente; y m_e es la masa de la esfera.

14.2.12. Catálisis de H_2O_2 (corresponde al inciso 9.1.1.3, sección III)

Se colocaron 6,6 mg de las correspondientes esferas [Ch-BDGE y Ch-BDGE-BBh con y sin cobre (II)], en 4 mL (V_0) de solución de peróxido de

hidrógeno 5 mM (en buffer fosfato a pH 7,4). Se tomaron muestras durante 2 h. Las muestras se filtraron, y se determinó la concentración de peróxido de hidrógeno en solución (ecuación 14.11) por titulación con una solución de permanganato de potasio $9,5 \times 10^{-3}$ M (estandarizado con oxalato de sodio).

$$\text{moles } H_2O_2 = \frac{C_{KMnO_4}^t \times V_0 \times 2/5}{m_e} \quad (14.11)$$

donde, $C_{KMnO_4}^t$ es la concentración de permanganato de potasio a un determinado tiempo, $2/5$ es un factor que tiene en cuenta los coeficientes estequiométricos (relación entre H_2O_2 y $KMnO_4$), y m_e es la masa de la esferas.

14.2.13. Retención y liberación de nimodipina (corresponde al inciso 9.2, sección III)

Para evaluar la retención de nimodipina (Nimo), se preparó una solución del fármaco $2,70 \times 10^{-4}$ M (C_{Nimo}^o) en etanol al 20% V/V, y se colocaron las esferas dentro de la misma (5,0 mg en 3 mL de solución), manteniendo una agitación constante durante 24 h. Posteriormente, se filtró la solución y se evaluó la cantidad de Nimo retenido (C_{Nimo}^f) en las esferas por espectrofotometría UV. Previamente, se realizó una curva de calibración de Nimo en etanol al 20% V/V a 358 nm. De esta manera, se calcularon los moles de Nimo retenidos por gramo de matriz como la diferencia de moles de fármaco entre la solución madre (sin esferas) y la solución en contacto con las esferas, dividida por la masa de las esferas empleados. Además, se informó el porcentaje de Nimo retenido a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Nimo retenida} = \left[\frac{C_{Nimo}^o - C_{Nimo}^f}{C_{Nimo}^o} \right] \times 100 \quad (14.12)$$

Una vez retenido Nimo en las esferas, se evaluó su liberación desde las matrices. Para cada ensayo, se colocó el sistema dentro de un tubo de vidrio (figura 14.4) en contacto con 10 mL de solución de *buffer* fosfato (a pH 6,8), a través de una membrana de diálisis; durante siete h (intervalo óptimo de dosage), a 37°C con agitación constante, y se tomaron muestras manteniendo siempre el volumen inicial de *buffer*. Se prepararon diluciones con las muestras extraídas, para tener soluciones en etanol al 20% V/V y determinar la

concentración de Nimo mediante espectrofotometría UV (absorbancia a 358 nm). Se calculó la masa de Nimo liberada por gramo de matriz (ecuación 14.13) y se informó el máximo de liberación alcanzado en el *plateau*.

$$mg\ Nimo_{lib}/g\ matriz = \frac{C_{Nimo}^t \times FD \times V_l \times PM_{Nimo}}{m_e} \quad (14.13)$$

donde, C_{Nimo}^t corresponde a la concentración de Nimo (M) a un determinado tiempo; FD, el factor de dilución; V_l , el volumen de solución en contacto con las esferas; PM_{Nimo} , el peso molecular del fármaco; y m_e , la masa de esferas empleadas.

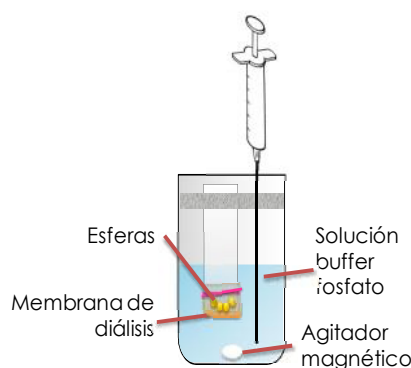


Figura 14.4. Equipo de liberación de droga.

14.2.14. Permeabilidad al vapor de agua (corresponde al inciso 12.2, sección IV)

La permeabilidad al vapor de agua se determinó, por duplicado, en todas las películas obtenidas, de acuerdo al método del disecante descrito en el método estándar ASTM E96M-10.⁸ Cada película con un diámetro de 3,14 cm² (sin defectos físicos como perforaciones o burbujas) se sujetó a la cámara de prueba (figura 14.5), colocando el bastidor y sellando con silicona para mantener las condiciones de hermeticidad dentro de la caja de prueba y 0 % de humedad relativa (RH), adicionando previamente cloruro de calcio anhidro (CaCl₂) tamizado y secado a masa constante a 200 °C.

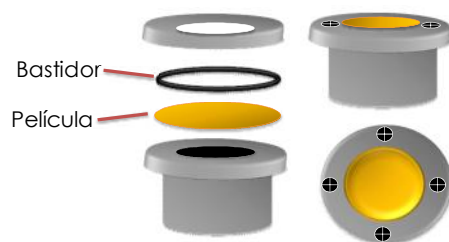


Figura 14.5. Esquema de cámara de prueba.

La cámara de prueba se diseñó especialmente para esta Tesis (siguiendo el método ASTM), con un diámetro interno de 2,0 cm y una profundidad de 2,5 cm. Una vez confeccionado el equipo para cada película, se colocaron dentro de un recipiente cerrado, junto con un cristalizador con solución saturada de NaCl y un detector de humedad y temperatura. Después de 2 h, se comenzó a registrar la ganancia de masa cada 1 h, hasta alcanzar las 7 h. Las condiciones del ensayo fueron $(25,7 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ y $(71 \pm 1)\% \text{RH}$.

A partir de los datos de variación de masa con el tiempo se realizó un análisis de regresión lineal para cada película y, empleando las ecuaciones 14.14 y 14.15, se calculó la velocidad de transmisión del vapor de agua (WVRT por sus siglas en inglés) y la permeabilidad al vapor de agua (WVP por sus siglas en inglés). Estas medidas fueron informadas en $\text{kg}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ y $\text{kg}\cdot\text{m}\cdot\text{Pa}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$, respectivamente.

$$WVRT = \frac{F}{A} \quad (14.14)$$

$$WVP = \frac{WVRT \times e}{S_p \times (RH_2 - RH_1)} \quad (14.15)$$

donde, F es la pendiente del gráfico de masa (CaCl_2) vs tiempo ($\text{kg}\cdot\text{s}^{-1}$), A es el área de la película expuesta, e es el espesor de la película (m), S_p es la presión de saturación (Pa) a la temperatura del ensayo, y RH_1 y RH_2 son las humedades relativas dentro del recipiente del ensayo y la cámara de prueba, respectivamente.

Estos ensayos se realizaron exponiendo la cara modificada con dendrones (lado b) hacia el interior de la cámara de prueba, y

posteriormente, del lado inverso (exponiendo "lado a" hacia el interior del recipiente).

14.2.15. Reología extensional (corresponde al inciso 12.3, sección IV)

Las propiedades reológicas fueron medidas en un reómetro Antor Paar Physica MCR 301, equipado con un accesorio P-PTD 200/I. Se seleccionó este accesorio para realizar mediciones extensionales en todas las películas obtenidas. Se realizaron experimentos a velocidad de extensión constante de 0,001 s y se incrementó la deformación extensional hasta la ruptura de las películas, a temperatura ambiente. Se registraron los siguientes datos: módulo elástico (E'), fuerza tensil (σ), deformación tensil (γ) y viscosidad extensional.

14.2.16. Ángulo de contacto (corresponde al inciso 13.4, sección IV)

Las medidas de ángulo de contacto se realizaron sobre las películas obtenidas. Se utilizó agua milliQ para volcar la gota sobre cada superficie estudiada, de acuerdo al método de "sessile drop" con un instrumento desarrollado en el laboratorio por el Dr. Marcelo Romero.⁹ El análisis de la forma de la gota y los valores de ángulo de contacto fueron determinados utilizando un programa de análisis de imágenes (sección III.1.4). Se realizaron tres medidas para cada muestra.

14.2.17. Actividad antimicrobiana (corresponde al inciso 12.5, sección IV)

Estos estudios se realizaron en el Centro de Química Aplicada (CEQUIMAP, UNC) bajo la dirección del Mgter. Ricardo Toselli.

La actividad inhibitoria del desarrollo microbiano de todas las películas obtenidas, se evaluó con una bacteria Gram negativa y una Gram positiva. Para ello, se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 (*E. coli*) y de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (*S. aureus*), respectivamente, pertenecientes al cepario del CEQUIMAP. Los cultivos de 24 h de estas bacterias, obtenidos sobre agar cerebro-corazón, se suspendieron en *buffer* fosfato (pH 6,8-7,2) ajustando la absorbancia a 620 nm de las respectivas

suspensiones, de modo de obtener inóculos de aproximadamente 1000 UFC/mL. Las películas se esterilizaron por exposición a luz UV sobre ambas caras de las películas durante 15 min, y su actividad antimicrobiana se evaluó utilizando dos modelos experimentales. En el primero de ellos, las películas se depositaron en la superficie de placas de agar cerebro-corazón, previamente inoculadas por rastrillado con 200 μ L de las suspensiones bacterianas de *E. coli* y *S. aureus*. En un diseño alternativo, las películas se depositaron sobre agar para recuento en placa (PCA) y se vertió sobre ellas una segunda capa de agar cerebro-corazón, en la que previamente se incorporó el inóculo bacteriano correspondiente. En ambos modelos, las placas se incubaron durante 48 h a 37°C. Transcurrido el periodo de incubación, la actividad antimicrobiana fue evaluada comparando el desarrollo de colonias en el medio de cultivo en contacto con la película, con el desarrollo microbiano observado en una superficie equivalente de medio de cultivo de la misma placa sin películas. En el segundo diseño experimental, se determinó el porcentaje de inhibición a partir de la diferencia de colonias contadas en presencia y ausencia de la película considerando áreas semejantes. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

En la siguiente figura se muestra un esquema de los diseños experimentales.

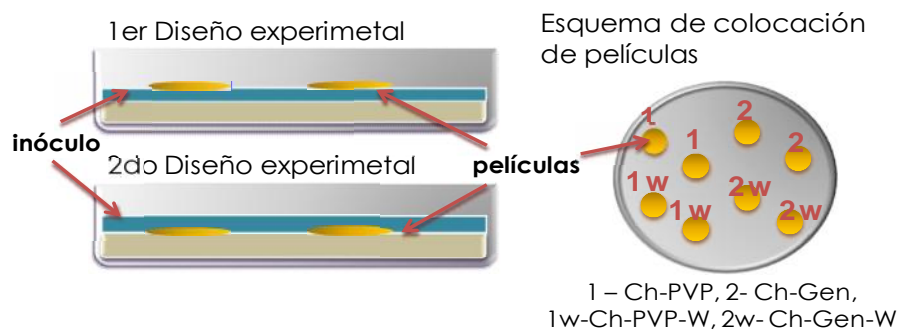


Figura 14.6. Esquema de diseño experimental empleado.

14.2.18. Regeneración celular (corresponde al inciso 12.6, sección IV)

Los siguientes estudios se realizaron en colaboración con el grupo de Inmunología (Dpto. de Bioquímica Clínica, FCQ, UNC) con la colaboración de la Biól. Bibiana Barrios y la dirección de la Dra. Silvia Correa.

Se realizaron estudios con dos líneas celulares Raw (macrófagos) y NiH (fibroblastos), a fin de evaluar la influencia de todas las películas obtenidas sobre estas células. Primero, se esterilizaron las películas (4 mm de diámetro) por exposición a lámpara UV, 15 min de cada lado, trabajando dentro de una campana de flujo laminar. Se emplearon 12 películas en total por cada tipo (Ch-PVP y Ch-PVP-W), dado que se realizó por triplicado con cada estímulo (lipopolisacárido LPS, polimixina A PMA, y polimixina B PMB, el cuál fue un control de LPS) y el basal (sin estímulo). Luego, se colocaron las películas en una placa de cultivo donde se lavaron con 200 μ L de medio de cultivo durante 15 min. Una vez extraído el medio, se colocaron 100.000 células/well sobre las películas y el control, y posteriormente, se agregó LPS, PMA y PMB para llegar a una concentración final de 0,5, 1,0 y 1,0 μ g/mL, respectivamente, alcanzando un volumen final de 200 μ L/well. El medio empleado fue RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) con 10% de suero fetal bovino (SFB). Se dejó la placa en estufa a 37°C durante 48 h. Posteriormente, se tomaron alícuotas para determinación de óxido nítrico, actividad de arginasa y LDH.

Además, se realizó un estudio de adhesión de fibroblastos a las películas Ch-PVP y Ch-PVP-W. Para ello, se realizó un procedimiento semejante al descrito anteriormente, donde las células se colocaron sobre las películas durante 48 h. Luego de este tiempo, se quitó el sobrenadante del cultivo y se lavó dos veces cada well con PBS. Dado que las células NiH se adhieren a la superficie en contacto, se empleó 50 μ L de tripsina al 10% (enzima proteasa) para digerir las proteínas de membrana implicadas en la adhesión celular al soporte, dejando actuar durante 5 min. Por último, se agregó medio de cultivo suplementado con suero bovino (RPMI con 10% SFB, por sus siglas en inglés) para detener la reacción. El recuento de células, se realizó en cámara de Neubauer tiñendo las células con azul de tripán, que permite distinguir las células viables de las que no lo son. Las no viables pierden su permeabilidad selectiva y se tiñen de azul, mientras que las células viables, se ven brillantes,

refringentes y no coloreadas (permanecen incoloras). Se informaron el promedio del número de células viables adheridas a cada película (ensayo por cuatuplicado).

14.2.18.1. Determinación de óxido nítrico (NO). Reacción de Griess

Se preparó una solución 1/10 a partir de la solución madre de NaNO_2 (10 mM) en solución *buffer* fosfato (PBS por sus siglas en inglés). Se emplearon 23 *well* de una placa de cultivo para preparar la curva de calibración, donde en los primeros dos se colocaron 50 μL de solución preparada. Al segundo *well*, se agregó 50 μL de PBS, se mezcló y se trasvasó la mitad del volumen al tercer *well*. En este último, se adicionó 50 μL de PBS, se procedió con las diluciones seriadas hasta el *well* número 21. En la posición 22 y 23, se realizaron los blancos con 50 μL de PBS, cada uno. De esta forma, se obtuvo un intervalo de concentraciones entre 2 y 125 μM de NO.

Por otro lado, se prepararon los reactivos A (sulfamida 1,5 % V/V en HCl 1M) y B (naftilamida 5,5 M). Se agregaron 100 μL de la mezcla de reactivos A y B (1:1) a cada *well* de la curva de calibración y del sobrenadante del ensayo (medio en contacto con las películas y los controles). Se mantuvo en lugar oscuro durante unos min. Por último, se midió la absorbancia a 540 nm.

A partir de los datos de la curva y las correspondientes absorbancias se calculó la producción de NO en μM , empleando el programa Prism 5.

14.2.18.2. Determinación de actividad arginasa

Se descartó el sobrenadante de la placa (centrifugar 10 min a 2500 rpm) y se lavó 3 veces con solución *buffer* fosfato PBS (agregar PBS y centrifugar). Luego, se agregó 50 μL de tritón 0,1% más inhibidores de proteasas (1 mL cada 100 mL de solución), se agitó 30 min a temperatura ambiente. Al lisado de células (25 μL), se agregó 25 μL de MnCl_2 10 mM con Tris-HCl 1 M y se dejó 10 min en baño a 55°C, para activar la enzima. La hidrólisis de Arginasa se realizó en *ependorf* agregando 25 μL de arginina 0,5 M pH= 9,7 a una alícuota de 25 μL del lisado de células activadas, incubando 1 h a 37°C en estufa. Se frenó la reacción enzimática con 400 μL de solución ácida ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{O}$) (1:3:7). Se realizó la curva de calibración.

Posteriormente, se agregó 25 μL de ISPF (α -isocitro-propiofenol) 9% y se llevó a ebullición (100°C) durante 45 min. Por último, se dejó 10 min en oscuridad y se midió la absorbancia a 540 nm (usando alícuotas de 200 μL).

La curva de calibración empleada fue en el intervalo de 1,5-3 μg . Para lo cual, se agregó a un tubo 50 μL del estándar (urea 6%) y en otros recipientes, 50 μL de agua realizando una dilución seriada (de manera semejante a la descrita en el inciso anterior). El blanco se hizo con agua MilliQ.

A partir de los datos de la curva y de las absorbancias medidas, se calculó la actividad de arginasa, en mU por millón de células. Donde U es la unidad internacional de actividad enzimática definida como 1 μmol de urea en 1 min de actividad.

14.2.18.3. Determinación de actividad de lactato deshidrogenasa LDH

Se incubaron el reactivo único (LDH-P UV Wiener®) y las muestras (medio en contacto con células del ensayo) en *ependorf*, a 37°C en un baño termostatzado. Se colocó en la cubeta de cuarzo 1 mL de reactivo único y 20 μL de muestra. A los 30, 90, 150 y 210 s, se midieron las absorbancias en el espectrofotómetro a 340 nm. Se calculó la actividad de LDH (U/L) a partir de la diferencia promedio de absorbancia/minuto ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$) restando cada lectura de la anterior y promediando los valores (ecuación 14.16).

$$LDH = \frac{\Delta Abs}{min} \times F \quad (14.16)$$

Donde F es el factor que depende de la técnica y temperatura empleada, siendo 8095 en este método.

Bibliografía

- (1) Lázaro Martínez, J. M.; Chattah, A. K.; Monti, G. A.; Leal Denis, M. F.; Buldain, G. Y.; Campo Dall'Orto, V. New copper(II) complexes of polyampholyte and polyelectrolyte polymers: Solid-state NMR, FTIR, XRPD and thermal analyses, *Polymer* **2008**, *49*, 5482.
- (2) Romero, M. R.; Igarzabal, C. Á. *IX Simposio Argentino de Polímeros SAP2011* Bahía Blanca, Buenos Aires, 2011, p 1.
- (3) Butler, M. F.; Ng, Y.-F.; Pudney, P. D. A. Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2003**, *41*, 3941.
- (4) Leane, M. M.; Nankervis, R.; Smith, A.; Illum, L. Use of the ninhydrin assay to measure the release of chitosan from oral solid dosage forms, *Int. J. Pharm.* **2004**, *271*, 241.
- (5) Lee, H.; Neville, K. *Handbook of epoxy resins*; McGraw-Hill, 1967.
- (6) Baruzzi, A. M; Ühlken, J., Current interruption potentiostat of elimination of the IR drop in four-electrode systems, *J. Electroanal. Chem.* **1990**, *282*, 267.
- (7) Compton, S. J.; Jones, C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay, *Anal. Biochem.* **1985**, *151*, 369.
- (8) ASTM E96M-10 Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials ed. ASTM International West Conshohocken PA, 2003.
- (9) Romero, M. R., Estudios químicos y electroquímicos de interacciones entre biomoléculas y sus aplicaciones en biosensores, Universidad Nacional de Córdoba, **2011**.

CONCLUSIONES Y PROYECCIONES



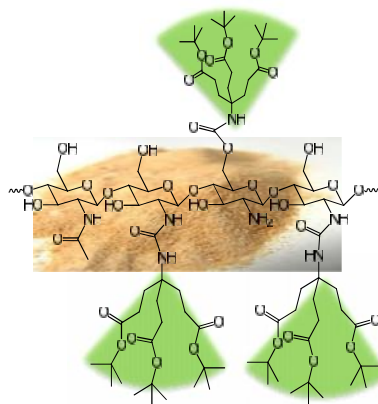
15.1. CONCLUSIONES GENERALES

El objetivo principal de esta Tesis fue obtener nuevas arquitecturas dendríticas, que sean relevantes biológicamente y contribuyan a los últimos desarrollos de matrices en biomedicina, catálisis y cromatografía de afinidad. Se planteó la combinación de polímeros dendríticos (dendrones) con biopolímeros (quitosano), considerando las ventajas que aportan cada uno de ellos. Las

principales características atractivas para la aplicación de estructuras dendríticas, está dada por la multifuncionalidad y la arquitectura molecular (descriptas en el capítulo 1). En cuanto al quitosano, su biocompatibilidad, biodegradabilidad y al ser un recurso natural renovable, han dado origen a diversas derivatizaciones para el área de biomateriales.

Con el desarrollo de esta Tesis, se han obtenido resultados muy interesantes y relevantes, en cuanto al empleo de la dendronización como una herramienta para lograr cambios en el polímero. A continuación se resumen las características destacadas en los tres sistemas estudiados: polvos, esferas y películas.

Polvos

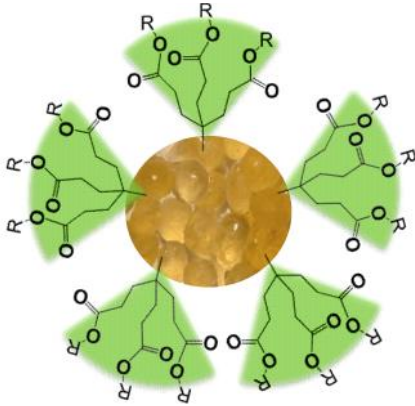


- Se obtuvieron nuevos sistemas de quitosano dendronizado, con dendrones de primera generación, con o sin la presencia de espaciador.

- La introducción de dendrones en la cadena polimérica genera cambios en el balance hidrofílico/hidrofóbico del sistema.

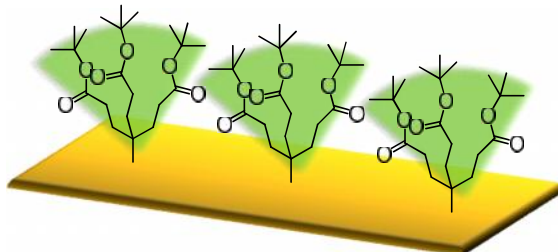
- Los dendrones mejoran la interacción con fármacos.
- La nueva estructura (polímero-dendró) puede adoptar diferentes conformaciones, siendo posible la formación de monocapas.
- La voltametría cíclica permitió estudiar la influencia de la dendronización en las propiedades del polímero original, representando una nueva forma de caracterizar estos materiales.
- Se logró aumentar la solubilidad de los polímeros (Ch y Ch-MA-AB) modificados con gtmac a un mayor intervalo de valores de pH. Ch-Wh también resultó soluble a pH neutro, siendo relevante para su aplicación como transporte de fármacos.

- La unión efectiva de ácido fólico al polímero resulta de gran importancia en el transporte direccionado de fármacos o moléculas de interés.



Esferas

- Se sintetizaron microesferas dendronizadas, con diferentes espaciadores y cantidad de grupos funcionales en la periferia (3 y 6) con tamaños homogéneos.
- Los estudios de retención de cobre (II) revelaron la influencia de la multifuncionalidad de la superficie dada por la dendronización y de la naturaleza de los grupos periféricos.
- La catálisis de peróxido de hidrógeno fue efectiva sólo cuando el cobre (II) se encuentra retenido en la matriz dendronizada.
- Las esferas dendronizadas presentan gran potencial como soportes para catálisis de transformaciones químicas específicas, remoción de contaminantes y purificación de proteínas.
- La retención de nimodipina (de carácter muy hidrofóbico) y su liberación es de gran interés para considerar su empleo como transportadores de fármacos hidrofóbicos. Adicionalmente, la unión efectiva de ácido fólico, incrementa el potencial de las esferas desarrolladas.



Películas

- Se obtuvieron películas basadas en quitosano, con

una sola cara modificada con dendrones.

- La dendronización de una cara de las películas se reflejó en diferentes estudios, como microscopía de fuerza atómica, análisis de imagen (microscopía óptica), ángulo de contacto y permeabilidad al vapor de agua. Se evidenciaron diferencias significativas entre la cara modificada y la no modificada, las cuales incrementan con el aumento del grado de dendronización.
- Según los resultados obtenidos, la unión del dendrón genera una superficie más cristalina, como resultado de un aparente orden de los dendrones sobre la película.
- La película Ch-PVP-W presenta gran potencialidad como apósito para heridas, exponiendo la cara no modificada hacia la herida y la dendronizada hacia el exterior.
- Ch-PVP-W mantiene las propiedades antibacterianas de Ch, e incluso la presencia del dendrón podría estar favoreciendo su actividad bactericida.
- Los experimentos *in vitro* (48 h de cultivo) realizados con dos líneas celulares (NiH y Raw) no muestran la activación del perfil inflamatorio. Además, en los macrófagos, los resultados del metabolismo de la L-arginina sugieren la activación de un perfil alternativo favoreciendo la proliferación celular y, en consecuencia, la curación de la herida.
- Si bien se realizaron estudios en función de la aplicación de las películas dendronizadas como apósito para herida, la biocompatibilidad y la interacción con células (bacterias, macrófagos y fibroblastos) hacen de estos sistemas, novedosos biomateriales para ser aplicados en ingeniería de tejidos en general.

Por lo tanto, todo el trabajo realizado con los polímeros dendronizados en esta Tesis, son innovadores tanto en las metodologías empleadas para la dendronización de quitosano, como en las potenciales aplicaciones de los

nuevos sistemas desarrollados. A partir de los resultados de los tres sistemas desarrollados, es posible extraer las siguientes conclusiones generales:

- ✓ Se han obtenido diferentes sistemas de quitosano dendronizado, con estructuras dendríticas de primera generación y diferente cantidad (3 ó 6) y naturaleza química (hidrofílica ó hidrofóbica) de los grupos funcionales periféricos. A partir de lo cual, se puede afirmar que la dendronización es una herramienta eficiente para modificar cadenas poliméricas individuales o superficies poliméricas.
- ✓ Mediante el control de los dendrones unidos a la cadena polimérica, tanto la naturaleza química, la cantidad de grupos periféricos, el grado de dendronización y los espaciadores empleados, fue posible obtener sistemas en los que se reflejaron las importantes características de los polímeros dendríticos, es decir, se evidenciaron cambios conformacionales (topografía y arquitectura) y el efecto de la multifuncionalidad.
- ✓ Los sistemas de quitosano dendronizado obtenidos, representan nuevos materiales con grandes potenciales en diversas áreas como catálisis, cromatografía y biomedicina. Con relación a esta última, tienen una relevancia importante debido a las propiedades evidenciadas de biocompatibilidad, capacidad antimicrobiana e interacción con macrófagos y fibroblastos, y fármacos.

15.2. PROYECCIONES

El amplio estudio realizado durante esta Tesis Doctoral en el campo de polímeros naturales dendronizados, abre innumerables alternativas de investigación a nivel científico y tecnológico.

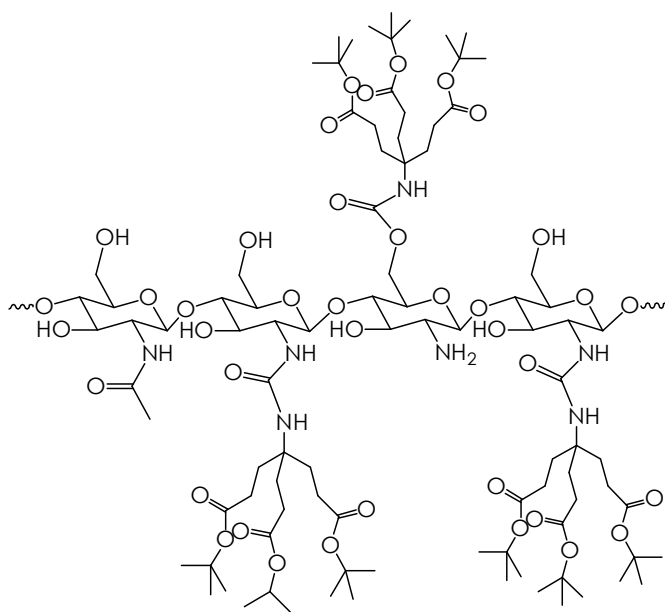
Considerando que los resultados obtenidos surgieron de diferentes metodologías, algunas por primera vez empleadas en el estudio de polímeros dendronizados, se propone continuar investigando distintos aspectos relacionados con la caracterización y aplicación de los materiales obtenidos. Entre los aspectos más destacables se mencionan los siguientes:

- ✓ Estudiar el mecanismo de asociación de fármaco-polímero dendronizado por voltametría cíclica.
- ✓ Evaluar la biodistribución de los polímeros dendronizados modificados con ácido fólico.
- ✓ Profundizar el estudio de retención de metales de las esferas dendronizadas, evaluando el tipo de asociación que ocurre entre ión metálico y matriz polimérica.
- ✓ Investigar la unión de proteínas a esferas dendronizadas, estudiando el rol que cumple la estructura dendrítica en la adsorción de BSA.
- ✓ Evaluar la aplicación de las esferas dendronizadas (Ch-ECH-dendrones y Ch-BDGE-dendrones) en la retención y liberación de otros fármacos, con diferentes estructuras químicas (variando hidrofiliicidad, solubilidad, entre otros).
- ✓ Realizar ensayos de retención y liberación controlada de fármacos con las películas dendronizadas.
- ✓ Estudiar la interacción de las películas dendronizadas con otras cepas bacterianas y otras líneas celulares de interés en su aplicación como biomateriales en biomedicina.
- ✓ Estudiar la biodegradación de los materiales dendronizados.

ANEXO I: Glosario de estructuras

A continuación se muestran los esquemas de las estructuras obtenidas en el presente trabajo de tesis Doctoral, separados según aparecen en las secciones II, III y IV, correspondientes a polvos, esferas y películas, respectivamente.

SECCIÓN II. Polvos

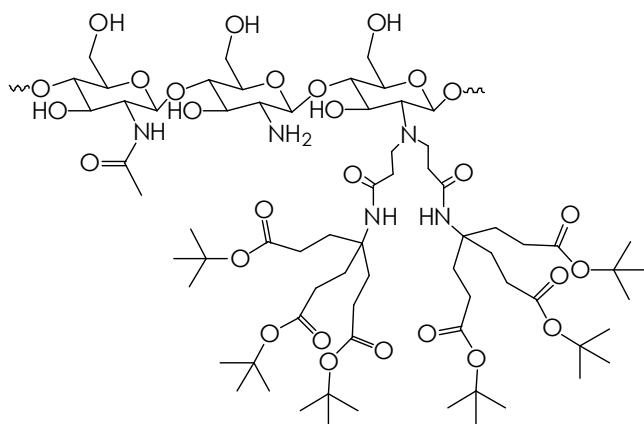
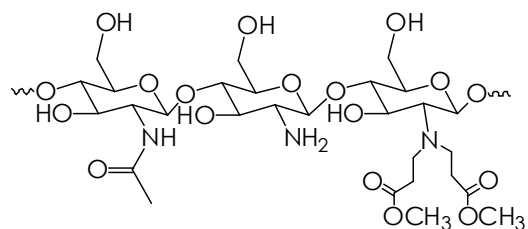


Quitosano-weisocianato

Ch-W

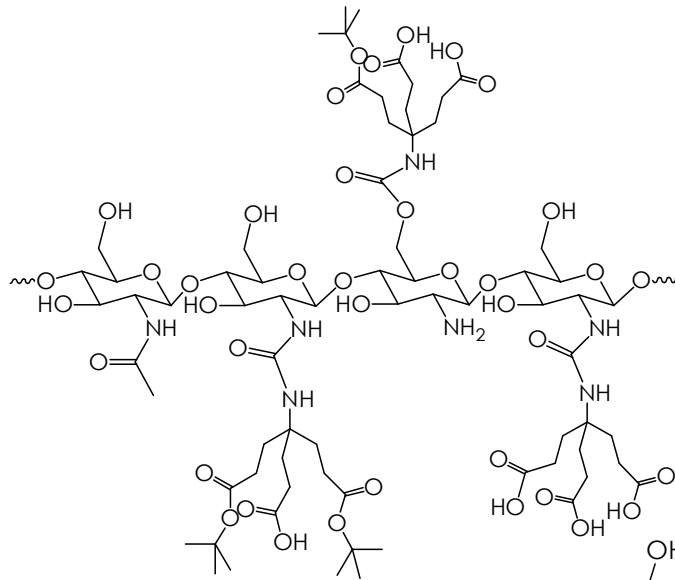
Quitosano-acrilato de metilo

Ch-MA



Quitosano-acrilato de metilo-amina de Behera

Ch-MA-AB

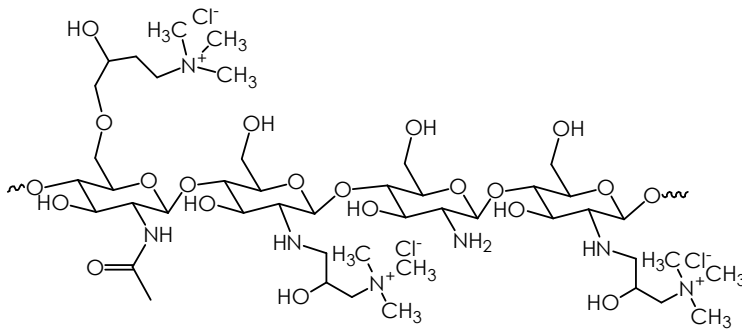
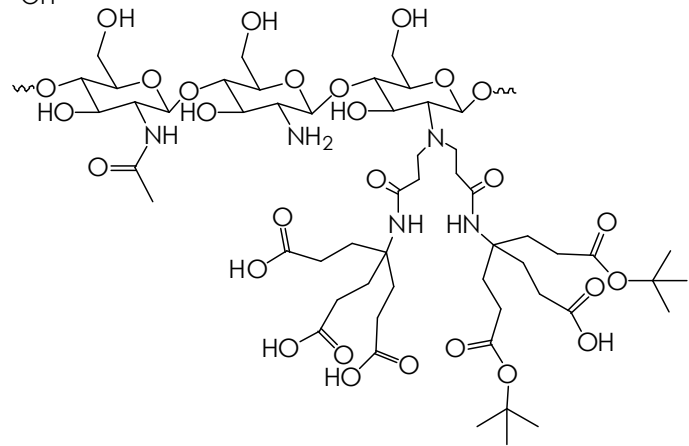


Quitosano-weissocianato
hidrolizado (parcialmente)

Ch-Wh

Quitosano-acrilato de metil-
amina de Behera hidrolizada
(parcialmente)

Ch-MA-ABh

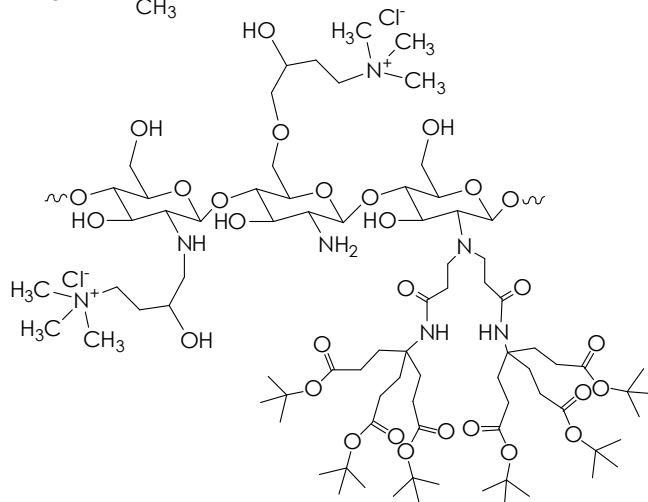


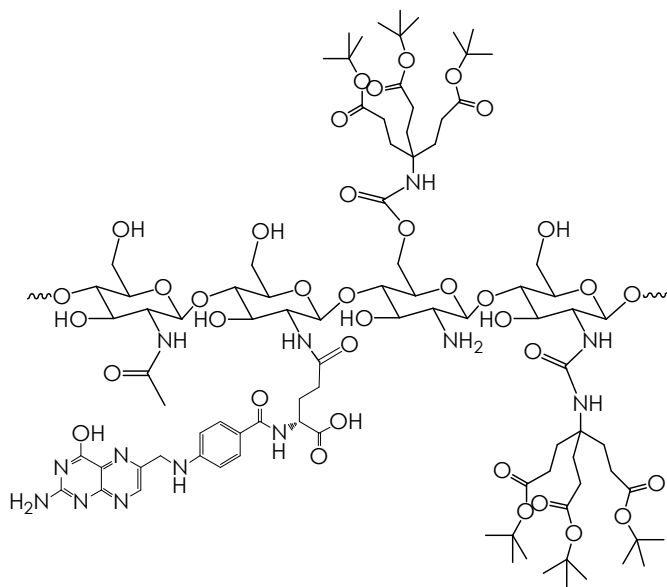
Quitosano-clorhidrato
de glicidiltrimetilamonio

Ch-gtmac

Quitosano-acrilato de metil-
clorhidrato de glicidiltrimetilamonio

Ch-MA-AB-gtmac



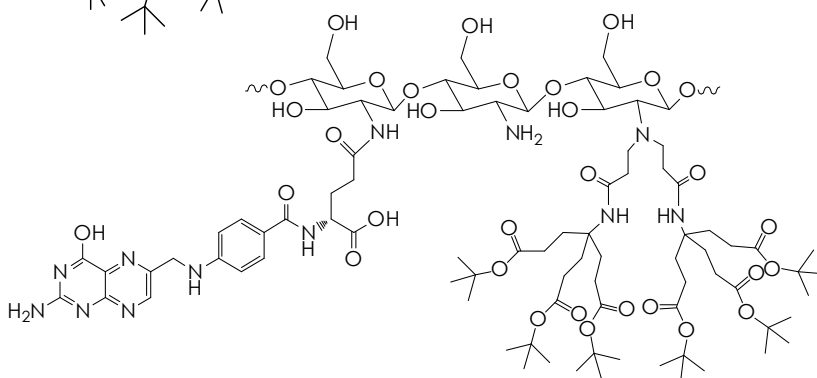


Quitosano-weisocianato-ácido fólico

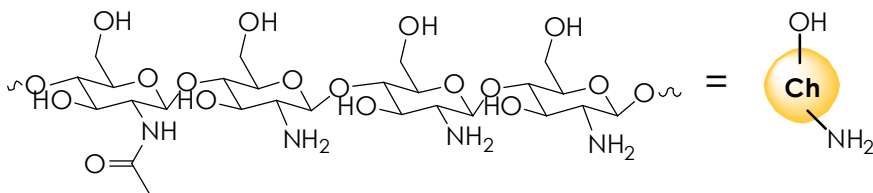
Ch-W-F

Quitosano-acrilato de metilo-amina de Behera-ácido fólico

Ch-MA-AB-F

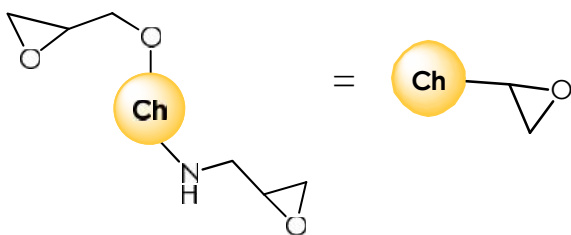


SECCIÓN III. Esferas



Esferas de quitosano

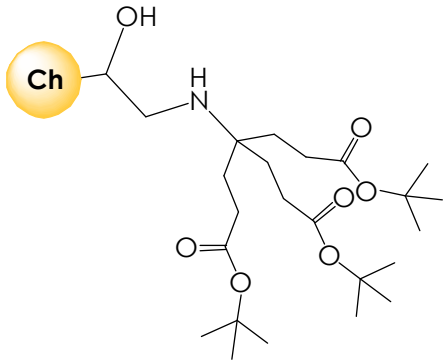
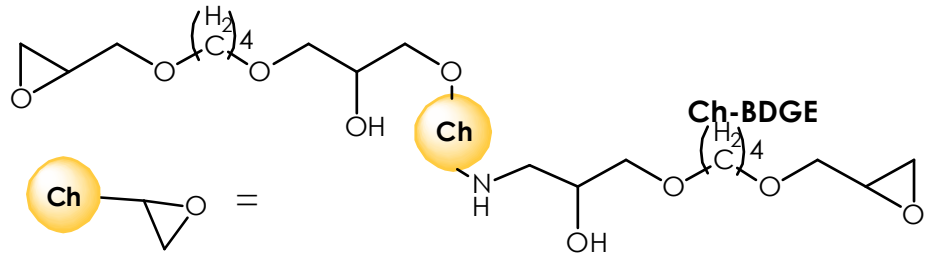
Ch



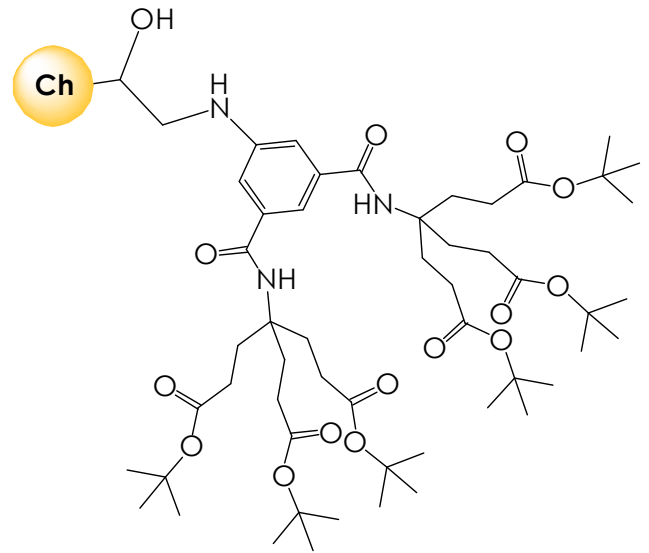
Quitosano-epiclorhidrina

Ch-ECH

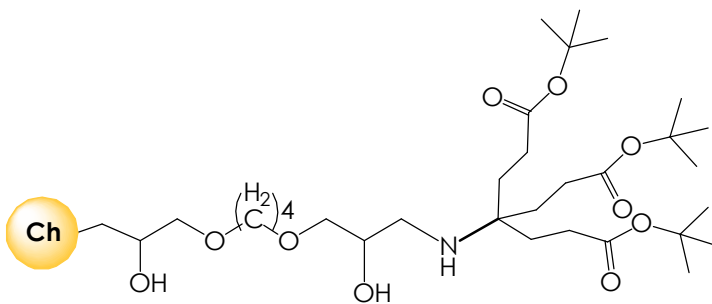
Quitosano-
butilendiglicidiléter
Ch-BDGE



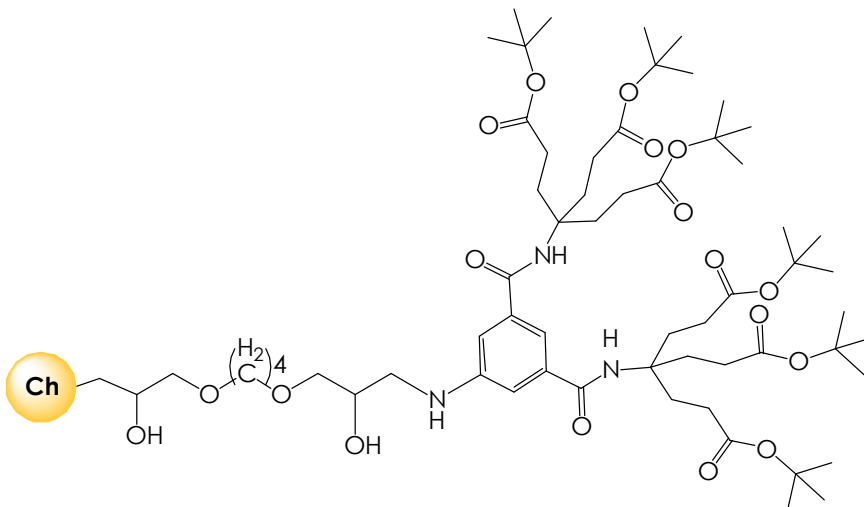
Quitosano-epiclorhidrina-amina de Behera
Ch-ECH-AB



Quitosano-epiclorhidrina-bis amina de
Behera
Ch-ECH-BB



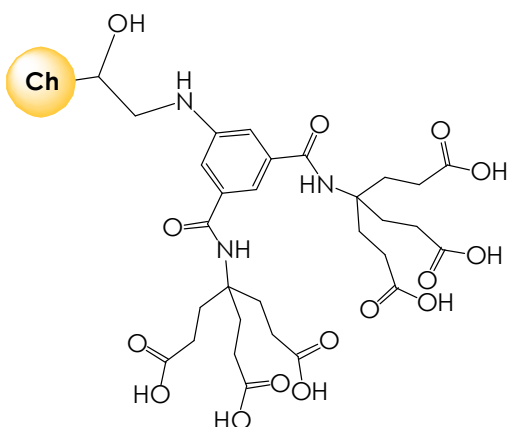
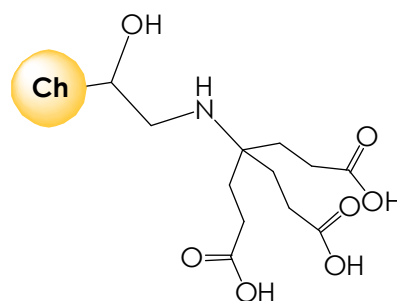
Quitosano-
butilendiglicidiléter-
amina de Behera
Ch-BDGE-AB



Quitosano-
butilendiglici
diléter-bis
amina de
Behera
Ch-BDGE-BB

Quitosano-epiclorhidrina-amina de Behera hidrolizada

Ch-ECH-ABh

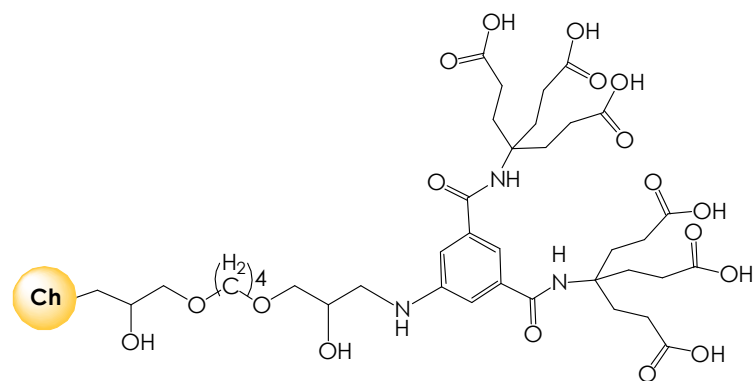
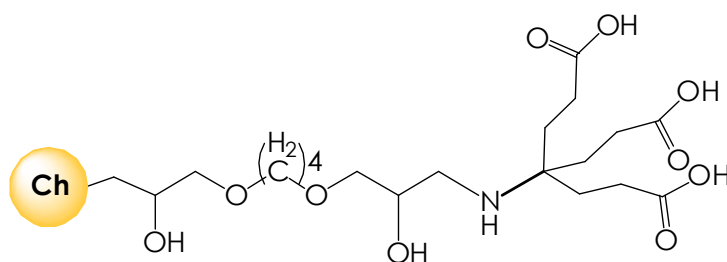


Quitosano-epiclorhidrina-bis amina de Behera hidrolizada

Ch-ECH-BBh

Quitosano-butilendigicidiléter-amina de Behera hidrolizada

Ch-BDGE-ABh

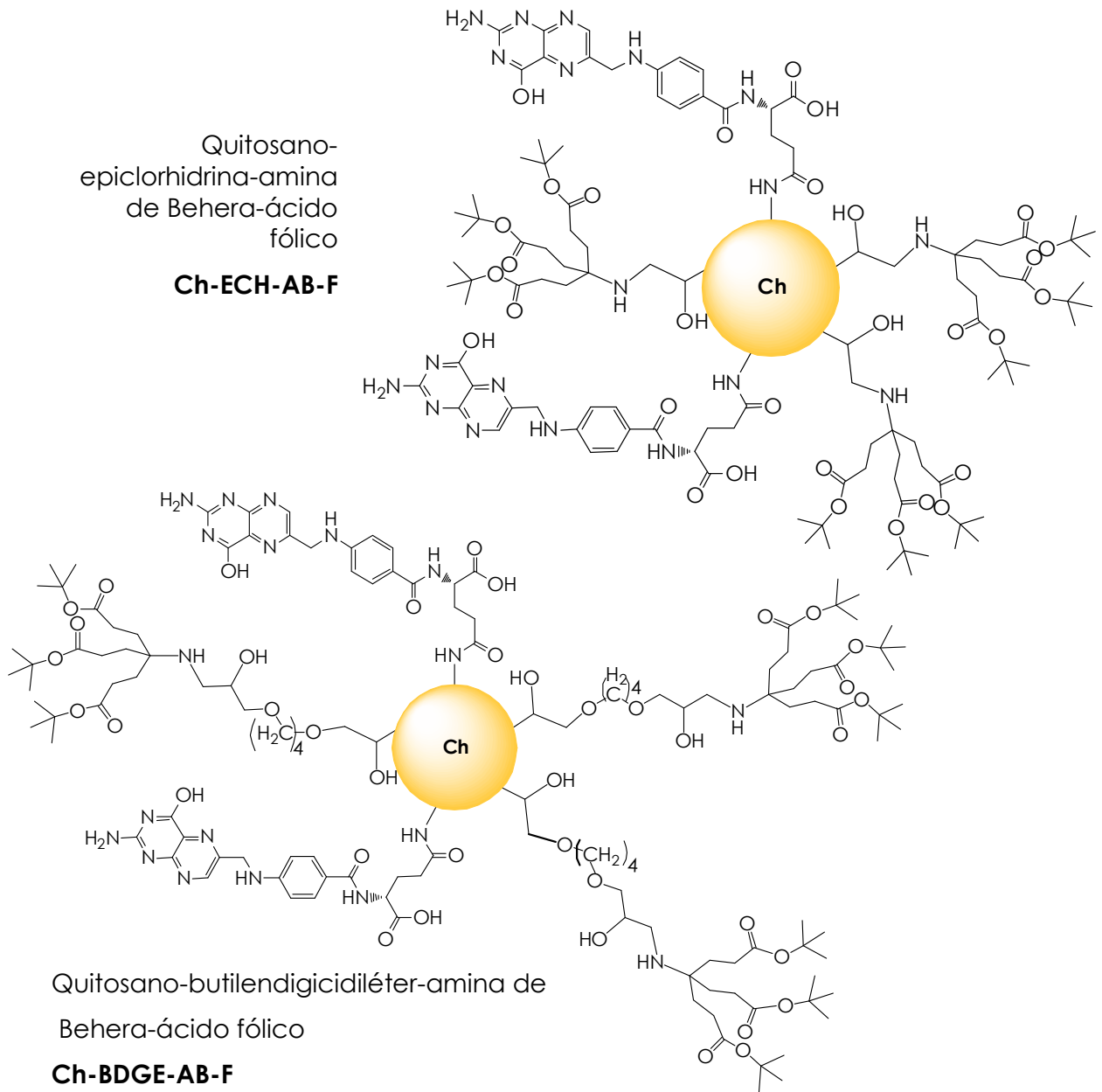


Quitosano-butilendigicidiléter-bis amina de Behera hidrolizada

Ch-BDGE-BBh

Quitosano-epiclorhidrina-amina de Behera-ácido fólico

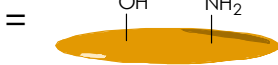
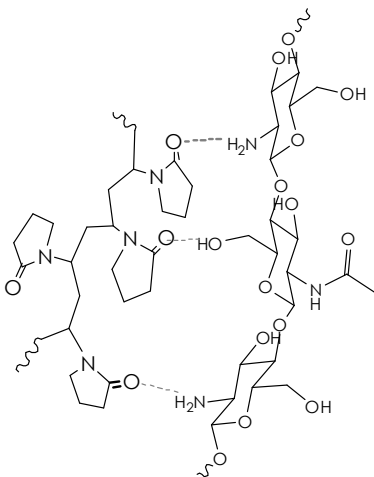
Ch-ECH-AB-F



Quitosano-butilendigicidiléter-amina de Behera-ácido fólico

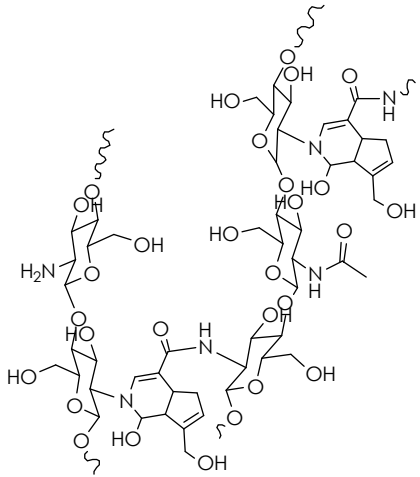
Ch-BDGE-AB-F

SECCIÓN IV. Películas

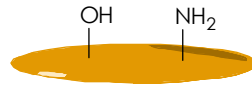


Película quitosano-polivinilpirrolidona

Ch-PVP



=



Película quitosano-genipina

Ch-Gen

Quitosano-polivinilpirrolidona-weisocianato o quitosano-genipina-weisocianato

Ch-PVP-W ó Ch-Gen-W

