



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA QUÍMICA – INGENIERÍA DE PROCESOS

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE
POLICARBONATOS CÍCLICOS

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN INGENIERÍA

PRESENTA:
YANET ELISED AGUIRRE CHAGALA

TUTOR PRINCIPAL
DR. RAFAEL HERRERA NÁJERA, FACULTAD DE QUÍMICA
COMITÉ TUTOR
DRA. MARGARITA HERRERA ALONSO,
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
DRA. MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD, FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D. F. AGOSTO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: DRA. SOFIA GUILLERMINA BURILLO AMEZCUA

Secretario: DR. MODESTO JAVIER CRUZ GÓMEZ

Vocal: DR. EMILIO BUCIO CARRILLO

1 er. Suplente: DRA. MARGARITA HERRERA ALONSO

2 do. Suplente: DR. RAFAEL HERRERA NÁJERA

Lugares donde se realizó la tesis:

LABORATORIO 213, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.
LABORATORIO 136, DEPARTAMENTO CIENCIA E INGENIERÍA EN
MATERIALES, UNIVERSIDAD JOHNS HOPKINS

TUTOR DE TESIS:

DR. RAFAEL HERRERA NÁJERA

FIRMA

AGRADECIMIENTOS

Antes que todo, quisiera agradecer a Dios por permitirme haber concluido esta etapa en mi vida y brindarme todo lo que tengo.

Al CONACYT por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado y por la beca mixta para realizar una estancia de investigación en JHU.

Al Dr. Rafael Herrera por confiar en mí y por guiarme en la realización de la tesis.

A la Dra. Margarita Herrera por su paciencia, tiempo y apoyo durante mi estancia para culminar el proyecto.

A la Dra. Josefa Bernad por haber sido parte de mi comité tutorial y por sus comentarios.

A los miembros del jurado: Dra. Sofía Burillo, Dr. Javier Cruz y Dr. Emilio Bucio, por su tiempo en la revisión de la tesis y sus acertadas observaciones.

A mis compañeros del LAB-136 de JHU, por brindarme su ayuda, amistad y compañía durante mi estancia.

También quisiera agradecer al personal del LAB-213 de la Facultad de química y a mis compañeros de laboratorio, pero en especial a Vladimir por su amistad y ayuda.

*A mi madre Martha por su gran cariño, consejos y
por ser una fuente de inspiración.*

*A mis hermanos: Eduardo, Juan Carlos,
Enrique, Miguel Ángel y Germán[†].*

A cada uno de mis sobrinos por alegrarme mis días.

ARTÍCULOS PUBLICADOS

Aguirre-Chagala Y. E., Santos J. L., Herrera-Nájera R., Herrera-Alonso M. “Organocatalytic copolymerization of a cyclic carbonate bearing protected 2,2-bis(hydroxymethyl) groups and D,L-lactide. Effect of hydrophobic block chemistry on nanoparticle properties”. *Macromolecules* 2013, 46, 5871–5881.

Aguirre-Chagala Y. E., Santos J. L., Aguilar-Castillo B. A., Herrera-Alonso M. “Synthesis of copolymers from phenylboronic acid-installed cyclic carbonates”. *ACS Macro Lett.*, 2014, 3 (4), pp 353–358

Aguirre-Chagala Y. E., Santos J. L., Herrera-Alonso M. “Phenylboronic acid-installed polycarbonates for the delivery of diol-containing drugs”. Enviado a *Biomacromolecules*, 20 mayo de 2014.

CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS	i
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABLAS	x
1 ANTECEDENTES.....	1
1.1 Micelas poliméricas	1
1.2 Policarbonatos.....	2
1.3 Polimerización por apertura de anillo	4
1.3.1 Catalizadores organometálicos	4
1.3.2 Catalizadores orgánicos	6
1.3.2 Catalizadores orgánicos bifuncionales	7
1.3 Nanoprecipitación súbita	8
2 OBJETIVOS	10
3 DESARROLLO EXPERIMENTAL	11
3.1 Polimerización organocatalítica de un carbonato cíclico funcionalizado con 1,3-diol.....	11
3.1.1 Materiales	11
3.1.2 Síntesis de 9-fenil-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5,5]undecano-3-ona ...	11
3.1.3 Síntesis de 1-(3,5-bis-(trifluorometil)-fenil)-3-ciclohexil-2-tiourea.	12
3.1.4 Síntesis de homopolímero PTO	12
3.1.5 Síntesis del terpolímero mPEG- <i>b</i> -P(PTO- <i>co</i> -DLLA).....	13
3.1.6 Síntesis del terpolímero en tribloque mPEG- <i>b</i> -PPTO- <i>b</i> -PDLLA..	13
3.1.7 Desprotección de PPTO	14
3.1.8 Determinación de la concentración micelar crítica.....	14
3.1.9 Ensamblado de los polímero anfifílicos	14
3.1.10 Medición de la hidrofobicidad de las partículas	16

3.2	Síntesis de polímeros derivados de ácidos fenilborónicos	6
3.2.1	Materiales	16
3.2.2	Síntesis de ácido 4-hidroxifenilborónico pinacol éster	16
3.2.3	Síntesis de MTC-4-hidroxifenilborónico pinacol éster PBC	16
3.2.4	Polimerización de PBC	17
3.2.5	Desprotección de PPBC	17
3.2.6	Fluorescencia de rojo de alizarina	18
3.3	Nanopartículas de policarbonato para liberación controlada.....	18
3.3.1	Materiales	18
3.3.2	Conjugación de capecitabina.....	18
3.3.3	Liberación in-vitro	19
3.3.4	Estudios de conjugación de capecitabina mediante fluorescencia de ARS.....	19
3.3.5	Cultivo celular MDA-MB-231	20
3.3.6	Estudios de citotoxicidad.....	21
3.3.7	Estudios de captación celular	22
3.4	Nanopartículas entrecruzadas.....	23
3.4.1	Materiales	23
3.4.2	Reacción de injerto	23
3.4.3	Medición de la hidrofobicidad de las partículas	23
3.4.4	Estabilidad de nanopartículas entrecruzadas en disolvente orgánico.....	23
3.4.5	Estabilidad de nanopartículas entrecruzadas en solución buffer	24
3.5	Polimerización organometálica de un carbonato cíclico funcionalizado Con 1,3 dioles, alternativo al PPTO	24
3.5.1	Materiales	24
3.5.2	Síntesis de 2,2-dimetil-5,5-bis(hidroximetil)-1,3-dioxano	25
3.5.3	Síntesis de polímeros de DM.....	26
3.5.4	Formación de micelas	26

3.5.5	Reacción de desprotección	26
3.6	Caracterización	27
3.6.1	Cromatografía de permeación en gel	27
3.6.2	Resonancia magnética nuclear	27
3.6.3	Dispersión dinámica de luz y potencial zeta.....	27
3.6.4	Calorimetría diferencial de barrido.....	28
3.6.5	Espectroscopia de fluorescencia	28
3.6.6	Espectroscopia de UV-vis.....	28
3.6.7	Microscopía electrónica de transmisión.....	28
4	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	30
4.1	Polimerización organocatalítica de un carbonato cíclico funcionalizado con 1,3-diol	30
4.1.1	Homopolimerización de PTO.....	31
4.1.2	Copolimerización de PTO y LA.....	37
4.1.3	Desprotección del bloque de PTO-LA	43
4.1.4	Propiedades térmicas.....	46
4.1.5	Formación de las nanopartículas.....	51
4.2	Síntesis de polímeros derivados de ácidos fenilborónicos	51
4.2.1	Síntesis de policarbonatos con grupos ácido fenilborónico	54
4.2.2	Estudio cinético de la polimerización	45
4.2.3	Formación de las nanopartículas.....	56
4.3	Nanopartículas de policarbonato para la liberación controlada	59
4.3.1	Conjugación del fármaco	61
4.3.2	Formación de los ensamblados con capecitabina.....	62
4.3.3	Estudio competitivo con rojo de alizarina	64
4.3.4	Estudio de la liberación in vitro	66
4.3.5	Captación celular	68
4.3.6	Citotoxicidad	70
4.4	Nanopartículas entrecruzadas.....	72
4.4.1	Reacción de injerto	72

4.4.2	Estabilidad de partículas en medio orgánico	75
4.4.3	Estabilidad de partículas en medio acuoso	78
4.5	Polimerización organometálica de un carbonato cíclico funcionalizado	
	Con 1,3 dioles, alternativo al PPTO	83
4.5.1	Síntesis de polímeros con bis 2-etilhexanoato de estaño (II)	83
4.5.1.1	Efecto de la cantidad de catalizador	85
4.5.1.2	Efecto del tiempo de polimerización	86
4.5.1.3	Análisis térmico	88
4.5.1.4	Formación de micelas.....	89
4.5.2	Síntesis de polímeros con trietilaluminio	91
4.5.2.1	Efecto de la cantidad de catalizador	91
4.5.2.2	Efecto de la cantidad de iniciador.....	91
4.5.2.3	Formación de micelas.....	94
4.5.2.4	Desprotección de polímeros	95
5	CONCLUSIONES	98
	REFERENCIAS	100
APENDICE A	ESPECTROS DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR.....	105
APENDICE B	CROMATOGRAMAS DE GPC	114
APENDICE C	TERMOGRAMAS DE DSC Y TGA.....	119
APENDICE D	MICROGRAFÍAS DE TEM	127
APENDICE E	ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y UV-VIS.....	129
APENDICE F	DISTRIBUCIONES DE DLS	135
APENDICE G	GRAFICAS DE CINÉTICA	136

LISTA DE ABREVIATURAS

Al(Et)₃	Trietilaluminio
ARS	Rojo de alizarina
ATRP	Polimerización radicalica por transferencia de átomo
CAPE	Capecitabina
CMC	Concentración micelar crítica
Cumarina	2H-cromen-2-ona
Cumarina-6	3-(2-benzotiazolil)- <i>N,N</i> -dietilumbelliferilamina, 3-(2-benzotiazolil)-7-(dietilamino) coumarina
DBA	Ácido diborónico 1,4-bencénico
DBU	1,8-diazabicycloundecano-7-eno
DCC	<i>N,N'</i> -Diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
D_h	Diámetro hidrodinámico
DLS	Dispersión dinámica de luz
DM	2,2-dimetil-5,5-bis(hidroximetil)-1,3-dioxano
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
GPC	Cromatografía de permeación en gel
IPD	Índice de polidispersidad
LA	D,L-lactida
MeOH	Metanol
MIVM	Mezclador multi-entrada de vórtice
mPEG	Metoxipolietilenglicol
MTBD	<i>N</i> -metil-1,5,7-triazabicyclododeceno
MTC	Carbonato de 5-metil-5-benziloxycarbonil-1,3-trimetileno
NPs	Nanopartículas
NPSB	Nanoprecipitación súbita
PBA	Ácido 4-hidroxifenilborónico
PBC	5-metil-5-benziloxycarbonil-1,3-trimetileno 4-hidroxifenilborónico, dimetil-2,3-propanodiol éster
PBE	5-metil-5-benziloxycarbonil-1,3-trimetileno 4-hidroxifenilborónico, dimetil-1,3-propanodiol éster
PBS	Buffer fosfato salino
PC	Polycarbonato
Pd(OH)₂/C	Hidróxido de paladio sobre carbón

PDM	Poli(2,2-dimetil-5,5-bis(hidroximetil)-1,3-dioxano)
PLA	Poli(D,L-ácido láctico) o Poli(D,L-lactida)
PPTO	Poli(9-fenil-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5,5]undecano-3-ona)
PTO	9-fenil-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5,5]undecano-3-ona
RAFT	Polimerización por adición, fragmentación y transferencia reversible
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROP	Polimerización por apertura de anillo
Sn(Oct)₂	2-etilhexanoato de estaño (II) u octanoato de estaño
TBD	1,4,7-triazabicyclodeceno
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TGA	Análisis termogravimétrico
THF	Tetrahidrofurano
TU	1-(3,5-bis-(trifluorometil)-fenil)-3-ciclohexil-2-tiourea

RESUMEN

En la presente tesis se describe la síntesis, caracterización y uso de copolímeros anfífilicos lineales basados en policarbonatos funcionales. Los policarbonatos son materiales interesantes para aplicaciones biomédicas. Aparte de presentar buenas propiedades mecánicas y térmicas, son particularmente útiles porque no generan productos ácidos como resultado de su biodegradación (hidrólisis), y son fácilmente funcionalizables. En el presente trabajo nos enfocamos en dos tipos de policarbonatos funcionales: aquellos que contienen grupos 1,3-diol y aquellos que contienen ácidos fenilbóronicos. Estos grupos funcionales son de interés por su capacidad de funcionar como sitios para la conjugación química de una variedad de compuestos, como se demuestra a continuación. En ambos casos, su polimerización se estudió usando polietilenglicol como macroiniciador, con el propósito de generar moléculas anfífilicas que pudiesen ser auto-ensambladas como nanopartículas con una estructura 'núcleo-capa', donde el policarbonato constituyese el 'núcleo'.

Por otro lado, se describe la polimerización organometálica de un carbonato cíclico con grupos hidroxilos protegidos alternativo. Usando trietilaluminio como catalizador se obtuvieron polímeros con menores índices de polidispersidad de 1.04 y más altos pesos moleculares de ~14,000 g/mol, que con respecto a aquellos sintetizados con 2-etilhexanoato de estaño (II). La variación del peso molecular afectó la morfología de los agregados en medio acuoso, generando ensamblados micelares de morfología esférica y ovalada. Los materiales obtenidos, podrían funcionar como acarreadores eficientes ya que poseen la capacidad de encapsular en su centro hidrofóbico.

ABSTRACT

The present thesis describes the synthesis, characterization and use of lineal amphiphilic copolymers based on functional polycarbonates. Polycarbonates are interesting materials for biomedical applications. Apart from having good mechanical and thermal properties, they are particularly useful due to generate acid products as result of its biodegradation (hydrolysis reaction), and are easily functionalizables. In the present work, we focused on two types of functional polycarbonates: those containing 1,3-diol groups and those containing phenyl boronic acid. These functional groups are of interest because the capacity of work as sites for chemical conjugation of variety compound. In both cases, the polymerization was studied using polyethyleneglycol as macroinitiator with the purpose to obtain amphiphilic molecules that could be assembled as nanoparticles with 'core-shell', where the polycarbonate is the 'core'.

By other side, it is describes the organometallic polymerization of an alternative cyclic carbonate with hydroxyl groups protected. Using tryetilaluminium as catalyst, it was obtained polymers with lower polydispersity index of 1.04 and higher molecular weight of ~14,000 g/mol, than those ones synthetized with tin 2-ethylhexanoate. Where, different molecular weights impact the morphology of aggregates in aqueous media, producing spherical and oval assembled. The materials could function as efficient carriers since having the capacity to encapsulate inside its hydrophobic core.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág.
1.1 Mecanismo de acumulación de nanopartículas en tumores sólidos.....	2
1.2 Monómeros disponibles comercialmente para biomateriales	3
1.3 Hidrólisis de (A) un éster y (B) un carbonato.	3
1.4 Monómeros usados para ROP en la preparación de policarbonatos alifáticos.....	4
1.5 Catalizadores organometálicos de 2-etilhexanoato de estaño (II), dietilzinc, lactato de zinc y trietilaluminio.....	5
1.6 Ruta de polimerización por coordinación-inserción del carbonato de trimetileno (TMC) catalizada por un metal	5
1.7 Catalizadores orgánicos	6
1.8 Ruta de polimerización por apertura de anillo mediante un catalizador orgánico.....	7
1.9 Polimerización aniónica de TMC catalizada mediante DBU.....	7
1.10 Polimerización por ROP de TMC a través de una activación dual por un catalizador TU-DBU	8
1.11 Proceso de nanoprecipitación súbita.....	8
3.1 Mezclador para NPSB.	15
3.2 Cultivo de las células MDA-MB-231	21
4.1 Síntesis y polimerización de PTO.....	31
4.2 Ruta de polimerización por apertura de anillo de PTO catalizada mediante DBU-TU.....	32
4.3 Reacciones de transesterificación para PTO.....	33
4.4 Peso molecular por RMN ¹ H y cromatogramas de GPC de PTO.	34
4.5 Cinética de polimerización de PTO iniciada con PEG.....	35
4.6 Cinética de polimerización de PTO iniciada con 1-dodecanol	36
4.7 Copolimerización DLLA y PTO	37
4.8 Ruta de polimerización por ROP entre PTO y LA.....	38
4.9 Cinética de copolimerización de DLLA-PTO y cromatogramas	40
4.10 Espectros de RMN ¹³ C para mPEG- <i>b</i> -PPTO.....	41
4.12 Cromatogramas de mPEG- <i>b</i> -P(PTO-co-DLLA).....	43
4.13 (A) Ruta de desprotección del grupo colgante bencilideno. (B) Porcentaje de la desprotección a diferentes condiciones de la reacción ..	44
4.14 Espectros de RMN ¹ H después de la desprotección.	45
4.15 Cromatograma después de la desprotección del bloque poli(éster carbonato).....	46

4.16	DSC de polímeros.....	47
4.17	Micrografías de TEM de las nanopartículas.	49
4.18	DLS de nanopartículas con pireno y rojo de nilo	49
4.19	Fluorescencia de nanopartículas preparadas con rojo de nilo.....	50
4.20	Síntesis de policarbonatos a base de ácido borónico.....	52
4.21	Polimerización de PBC iniciada con PEG.....	54
4.22	Cinética de polimerización de PBC	55
4.23	DLS y TEM de los ensamblados de PEG ₄₄ - <i>b</i> -PBC _x	56
4.24	DLS y micrografía de TEM después de la desprotección	58
4.25	Conjugación de rojo de alizarina (ARS) en el polímero	58
4.26	Espectro de fluorescencia de rojo de alizarina conjugada.....	59
4.27	Esquema de reacción de la obtención de la molécula activa 5-fluorouracilo a partir de CAPE.	60
4.28	Preparación de capecitabina conjugada en el policarbonato.....	61
4.29	Espectro de RMN ¹ H de capecitabina injertada en PBC	62
4.30	DLS y TEM de las nanopartículas con capecitabina.	64
4.31	Ensayo competitivo entre ARS y ácido 4-hidrofenilborónico	64
4.32	Intensidad de fluorescencia de ARS con ácido borónico.	65
4.33	Ensayo competitivo de Wang, de ácido borónico con capecitabina usando rojo de alizarina.....	66
4.34	Intensidad de fluorescencia de ARS con ácido borónico y capecitabina....	66
4.35	Perfil de liberación in vitro de capecitabina injertada variando el pH.....	67
4.36	Liberación de capecitabina encapsulada a pH 7.5.	68
4.37	Citrometría en células MDA-MB con cumarina-6.....	69
4.38	Fluorescencia de cumarina-6 encapsulada dentro de las células.	69
4.39	Micrografía de fluorescencia de las células MDA-MB-23 con cumarina-6..	70
4.40	Citotoxicidad in vitro determinado por WST-1	71
4.41	Reacción de injerto de DBA.....	72
4.42	Cromatograma de GPC después del injerto de DBA.....	74
4.43	Espectro de RMN ¹ H del polímero injertado	75
4.44	Monitoreo del cambio del diámetro por DLS de las partículas.....	76
4.45	Distribuciones del diámetro hidrodinámico mediante DLS de las nanopartículas.....	77
4.46	Micrografías de TEM de las partículas con ácidos borónicos en medio orgánico	78
4.47	Monitoreo del diámetro mediante DLS de las partículas en buffer.	79
4.48	Ilustración del equilibrio entre el ácido borónico y glucosa, en solución acuosa	80
4.49	Diámetros mediante DLS en buffer fosfato salino a pH 7.4 con glucosa y H ₂ O ₂	81

4.50	Intensidad de fluorescencia de rojo de nilo encapsulado a diferentes pH. .82	82
4.51	Síntesis y polimerización de DM.....84	84
4.52	Ruta de polimerización por apertura de anillo de DM, mediante un catalizador organometálico.85	85
4.53	Cromatograma de mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₁₀88	88
4.54	Relación del calor de fusión a distintas longitudes del bloque hidrofóbico .89	89
4.55	Micrografía de TEM de las micelas.....90	90
4.56	Espectro de RMN ¹ H de las nanopartículas90	90
4.57	Peso molecular observado variando la relación molar de DM a mPEG ₁₁₄ .93	93
4.58	Cromatograma de GPC del polímero mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₁₀ , sintetizado con trietilaluminio.....94	94
4.59	Micrografía de TEM de las micelas formadas a partir de mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₁₀95	95
4.60	Desprotección de mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM en condiciones ácidas.....95	95
4.61	Espectros de RMN ¹ H antes y después de la remoción del grupo cetal....96	96
A1	Espectro de RMN ¹ H de TU.105	105
A2	Espectro de RMN ¹ H de BTO.....105	105
A3	Espectro de RMN ¹ H del monómero PTO.....106	106
A4	Espectro de RMN ¹ H de mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -P(PTO _{0.22} - <i>co</i> -LA _{0.78}) ₄₉106	106
A5	Espectro de RMN ¹³ C de mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -P(PTO _{0.22} - <i>co</i> -LA _{0.78}) ₄₉107	107
A6	Espectro de RMN ¹ H del carbonato de 5-metil-5-benziloxicarbonil-1,3-trimetileno.....107	107
A7	Espectro de RMN ¹ H de MTC.108	108
A8	Espectro de RMN ¹ H de ácido 4-hidroxifenilborónico pinacol éster.108	108
A9	Espectro de RMN ¹ H de PBC109	109
A10	Espectro de RMN ¹³ C de PBC109	109
A11	Espectro de RMN ¹ H ácido 4-hidroxifenilborónico dimetil-1,3-propanodiol éster.110	110
A12	Espectro de RMN ¹ H MTC-ácido 4-hidroxifenilborónico, dimetil-1,3-propanodiol éster.110	110
A13	Espectro de RMN ¹ H del copolímero protegido con pinacol.111	111
A14	Espectro de RMN ¹ H del copolímero pinacol desprotegido.111	111
A15	Espectro de RMN ¹ H del monómero DM diol.....112	112
A16	Espectro de RMN ¹³ C del monómero DM.112	112
A17	Espectro de RMN ¹³ C del polímero mPEG ₁₄₄ - <i>b</i> -PDM ₁₀113	113
B1	Cromatograma de GPC del polímero y capecitabina.....114	114
B2	Cromatogramas de GPC para los polímeros iniciados por DBU.....114	114
B3	Cromatogramas de terpolímeros en bloque mPEG- <i>b</i> -PPTO- <i>b</i> -DLLA.115	115
B4	Cromatogramas de PPTO iniciado con 1-dodecanol116	116
B5	Cromatogramas de mPEG- <i>b</i> -P(PTO- <i>co</i> -DLLA) por GPC, mostrando el	

	efecto del contenido de DBU	117
B6	Cromatograma de GPC del terpolímero con ϵ -caprolactona.....	117
B7	Cromatogramas de GPC para el aumento del bloque PPTO.....	118
C1	Termograma de DCS del hopolímero PDM.	119
C2	DSC del polímero mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₁₀ a 5 h de reacción.....	119
C3	DSC del polímero mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₁₀₀ a 5 h de reacción.....	120
C4	DSC del polímero mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₁₀ a 24 h de reacción.....	120
C5	DSC del polímero mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₁₀ a 1 h de reacción.....	121
C6	DSC del polímero mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₂₅ a 1 h de reacción.....	121
C7	DSC del polímero mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₂₅ a 5 h de reacción.....	122
C8	DSC del polímero mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₂₅ a 24 h de reacción.....	122
C9	DSC del polímero mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₃₅ a 1 h de reacción.....	123
C10	DSC del polímero mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₅₀ a 1 h de reacción.....	123
C11	TGA del polímero mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₅	124
C12	TGA del polímero mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₁₀	124
C13	TGA del polímero mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₂₅	125
C14	TGA del polímero mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₅₀	125
C15	TGA del polímero mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₇₅	126
D1	Micrografías de TEM de las vesículas formadas a partir del polímero entrecruzado, usando como número de Reynolds 7,781	127
D2	Micrografías de TEM de las vesículas formadas a partir del polímero entrecruzado, usando como número de Reynolds 648	127
D3	Micrografía de TEM de micelas preparadas del polímero PDM, con peso molecular de 6,212 g/mol.....	128
D4	Micrografías de TEM de las partículas formadas a partir de PDM, con peso molecular 14,000 g/mol	128
E1	CMC para polímero de PPTO	129
E2	CMC antes y después de la desprotección de grupos éster boronato	129
E3	CMC conjugación del fármaco capecitabina.	130
E4	Espectro de emisión de pireno encapsulado en el rango de 360 a 500 nm.....	130
E5	Espectro de emisión de rojo de nilo encapsulado en el rango de 560 a 800 nm, a una excitación de longitud de onda de $\lambda_{ex}=550$ nm.....	131
E6	Espectro de emisión de rojo de alizarina S [9×10^{-6} M] con ácido 4-hidroxifenilborónico en buffer fosfato salino a pH 7.5, $\lambda_{ex}=480$ nm.....	131
E7	Espectro de emisión de rojo de alizarina S [9×10^{-6} M] con ácido 4-hidroxifenilborónico y capecitabina en buffer fosfato salino a pH 7.5, $\lambda_{ex}=480$ nm.....	132
E8	Curvas de calibración de capecitabina por UV-vis.....	132

E9	Espectros de UV-vis de las nanopartículas cargada, no cargadas y el fármaco libre en agua	133
E10	Monitoreo de la intensidad de fluorescencia de ARS en las nanopartículas incubadas en las células MDA-MB-231... ..	133
E11	CMC de mPEG- <i>b</i> -P(HPTODBA- <i>co</i> -DLLA).....	134
F1	Distribución de diámetros de mPEG- <i>b</i> -PLA.... ..	135
F2	Estabilidad de nanopartículas formadas a partir de mPEG ₄₄ - <i>b</i> -PPBC ₁₁	135
G1	Cinética de homopolimerización y copolimerización de PTO	136
G2	Cinética de polimerización de PTO a mayor peso molecular del bloque hidrofóbico.....	136

LISTA DE TABLAS

Tabla	Pág.
3.1 Parámetros para obtener el No. de Reynolds usando el MIVM.....	15
4.1 Longitud media de la secuencia de lactida ($\overline{L_L}$) y ($\overline{L_P}$)	42
4.2 Polímeros de PTO y DLLA a diferentes relaciones molares de alimentación	43
4.3 Análisis térmico de los polímeros anfífilicos mediante DSC	46
4.4 Propiedades de los polímeros anfífilico usados para nanoprecipitación súbita.....	48
4.5 Nanopartículas preparadas mediante NPSB	48
4.6 Diferentes condiciones de desprotección para mPEG- <i>b</i> -PPBC	53
4.7 Polímeros de PBC sintetizados con bloque hidrofóbico variable	53
4.8 Propiedades fisicoquímicas de los polímeros y nanopartículas.....	63
4.9 Preparación de los polímeros injertados.....	73
4.10 Propiedades de los copolímeros anfífilicos.....	74
4.11 Polímeros mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM _x , variando la relación molar de monómero a catalizador octanoato de estaño	85
4.12 Propiedades de polímeros mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM _x , variando el tiempo de reacción	86
4.13 Polímeros sintetizados variando la relación iniciador a catalizador	90
4.14 Polímeros sintetizados con diferentes longitudes del bloque hidrofóbico..	91
4.15 Resultados obtenidos de los polímeros desprotegidos.....	95
B1 Polímeros sintetizados en ausencia de iniciador y catalizados mediante DBU.....	114
B2 Datos de GPC para la polimerización secuencial de D,L-lactida	115
B3 Datos de copolímeros sintetizados variando la cantidad de catalizador ..	117
B4 Polímeros con ϵ -caprolactona.....	118

Capítulo 1. ANTECEDENTES

1.1 Micelas poliméricas

Las nanopartículas y micelas poliméricas están formados a partir de la interacción hidrofóbica de copolímeros anfifílicos, estos sistemas sirven como eficientes acarreadores para el suministro de agentes terapéuticos o de contraste al aumentar su biodistribución y farmacocinética¹⁻⁵. Idealmente, el acarreador debe: i) poseer largos tiempos de circulación, ii) encapsular suficiente agente activo y/o de contraste para lograr un efecto terapéutico o de visualización, iii) (auto) localizarse en la región a tratar, iv) ser internalizado por células malignas, v) liberar el agente terapéutico intracelularmente con una rapidez controlada, y vi) ser (bio) degradado a especies no-tóxicas^{3,5-9}. Los centros hidrofóbicos de las micelas sirven como reservas, donde la capa hidrofílica forma la barrera estérica para la agregación micelar y asegurar la solubilidad de la micela en ambiente acuoso¹⁰. El bloque hidrofílico más comúnmente utilizado es polietilenglicol (PEG)¹¹. Los bloques de PEG previenen la opsonización, es decir, reduce el reconocimiento micelar por las células del sistema reticuloendotelial (RES), el cual aumenta el tiempo de residencia¹². Para evitar la acumulación de micelas y macromoléculas en el cuerpo se necesita sintetizar polímeros biodegradables o que la excreción renal suceda con polímeros de pesos moleculares <40 kDa.

El autoensamblaje de copolímeros anfifílicos en bloque tipo AB puede ser un fenómeno termodinámico y un proceso reversible¹. Este proceso ocurre en presencia de agua y un disolvente selectivo, en donde el componente hidrofóbico B se agrega en el centro de la partícula, protegido por el bloque A, el cual se segrega a la superficie para minimizar la energía libre del sistema¹³. A bajas concentraciones, las moléculas del copolímero existen en una solución acuosa como moléculas individuales (término en inglés “*unimer*”)¹. El autoensamblado inicia cuando la concentración del polímero alcanza un valor específico, conocida como concentración micelar crítica (CMC), este valor depende de la naturaleza química y la relación de la longitud del bloque hidrofóbico/hidrofílico¹². Las micelas son especies formadas bajo equilibrio termodinámico, mientras que las nanopartículas se forman mediante asociación cinética frenada, es decir, lejos del equilibrio termodinámico^{14,15}.

La liberación de fármacos en micelas poliméricas se usa para la focalización pasiva en células de tumores^{12,16}. Esta focalización pasiva se basa en el aumento de la

permeabilidad de vasos sanguíneos tumorales, observar la Figura 1.1. Usualmente la microvasculatura de tumores sólidos es caracterizada por grandes espacios entre las células endoteliales de 380-780 nm hasta $1.2 \mu\text{m}^{8,12}$, por los cuales circula el fluido intersticial que es conocido por tener un pH 6.5, más bajo que el tejido normal (pH 7.49). La internalización por endocitosis puede conducir a las micelas a un ambiente ácido de pH 5.0-5.5¹². Algunas ventajas de estos sistemas acarreadores son: la mejora de la biodisponibilidad de los fármacos de absorción pobre, la alta dispersión a nivel molecular y en consecuencia una liberación sostenida, además de una focalización de los agentes terapéuticos a un órgano en particular y por lo tanto, la reducción de la toxicidad¹⁷.

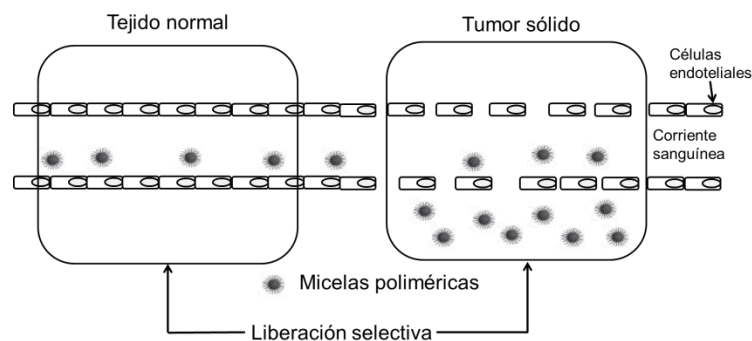


Figura 1.1 Mecanismo de acumulación de nanopartículas en tumores sólidos.

1.2 Policarbonatos

El uso de acarreadores biodegradables como biomateriales, disminuye la citotoxicidad debido a una menor acumulación en sistemas biológicos. Los poliésteres y policarbonatos alifáticos son una clase de polímeros sintéticos degradables, los cuales sirven como soportes para la ingeniería de tejido y la liberación de fármacos. La degradabilidad de estos materiales es debida a la susceptibilidad de sus enlaces éster a la hidrólisis. Actualmente existen cierto número disponible de monómeros para la producción de biomateriales degradables, los cuales se presentan algunos ejemplos en la Figura 1.2.

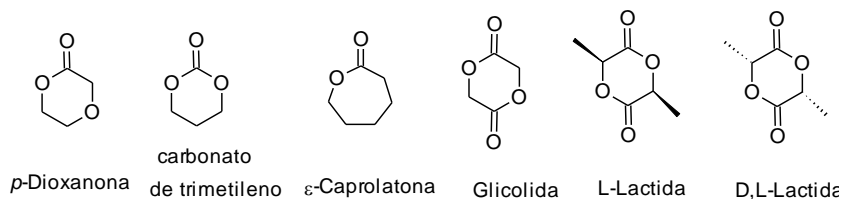


Figura 1.2 M3nmeros disponibles comercialmente para biomateriales.

Los policarbonatos alif3ticos son un tipo de pol3meros biodegradables que han tenido un gran inter3s por su buena procesabilidad y funcionalidad espec3fica^{18,19}. En diversos estudios se ha demostrado su baja toxicidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad. Estos materiales son atractivos debido a que pueden ser aplicados en el campo farmac3utico¹¹, con los que se pueden producir materiales funcionales tales como, implantes artificiales y sistemas de liberaci3n para f3rmacos¹⁸. Los poli3steres, son otro tipo de pol3meros biodegradables mayormente usados debido a que se pueden degradar en especies no t3xicas y se pueden eliminar in vivo²⁰. El policarbonato de trimetileno ha sido el m3s usado de los policarbonatos, este y otros policarbonatos han sido copolimerizados con lactida, glicolida y otras mol3culas biodegradables²¹. Sin embargo, los productos de la degradaci3n de los poli3steres puede aumentar el nivel de acidez, a diferencia de los policarbonatos no existe este inconveniente (Figura 1.3)^{21,22}. Otra caracter3stica, es la adici3n de alguna funcionalidad en la estructura del policarbonato, que no solo puede cambiar las propiedades f3sicas de los pol3meros, sino tambi3n la incorporaci3n de nuevas mol3culas²³.

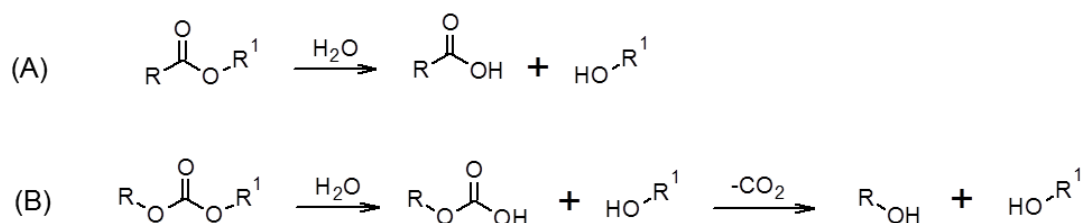


Figura 1.3 Hidr3lisis de (A) un 3ster y (B) un carbonato.

Durante la degradaci3n de los policarbonatos alif3ticos hay una ausencia de compuestos 3cidos^{21,24} y generalmente esta es m3s lenta que los poli3steres^{22,25}. En la preparaci3n de policarbonatos funcionales, se pueden sintetizar previamente los mon3meros con grupos funcionales espec3ficos que son usualmente protegidos

previo a la polimerización (Figura 1.4), los cuales pueden ser fácilmente removidos después de la polimerización con ninguna o muy poca alteración en la arquitectura del polímero^{18,19}.

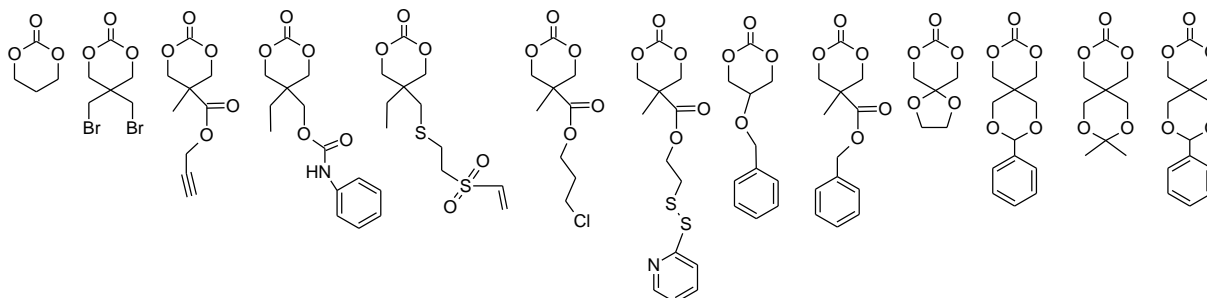


Figura 1.4 Monómeros usados para ROP en la preparación de policarbonatos alifáticos^{18,19,26}.

1.3 Polimerización por apertura de anillo

La capacidad de los monómeros de carbonato cíclicos a la polimerización por apertura de anillo depende de factores cinéticos y termodinámicos. La ROP de carbonatos cíclicos ha sido iniciada principalmente por diferentes clases de catalizadores e iniciadores, catiónicos, aniónicos, de coordinación y enzimáticos²⁷.

1.3.1 Catalizadores organometálicos

Los alcóxidos metálicos son ampliamente usados como catalizadores para la polimerización por apertura de anillo de ésteres cíclicos, y son típicamente operados por un mecanismo de “coordinación-inserción”. La polimerización de coordinación-inserción ha sido ampliamente usada para la síntesis de poliésteres y policarbonatos^{28,29}. Los catalizadores organometálicos más comúnmente usados son compuestos a base de estaño, aluminio y zinc, tal y como se representan en la Figura 1.5³⁰.

En la Figura 1.6 se muestra la ruta para ROP, esta reacción de polimerización es iniciada por el ataque nucleofílico de un iniciador cargado negativamente en el carbono del grupo carbonilo o en el oxígeno-alkilo, luego procede vía división del enlace. En la polimerización ROP, los carboxilatos son nucleófilos más débiles en comparación a los alcóxidos y son considerados que actúan más como un catalizador que un iniciador. Los carboxilatos metálicos son por lo tanto, usados junto con un compuesto que actúa como co-iniciador (ej., alcoholes).

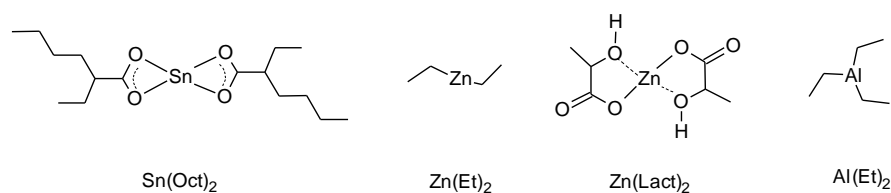
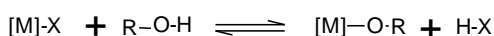


Figura 1.5 Catalizadores organometálicos de 2-etilhexanoato de estaño (II), dietilzinc, lactato de zinc y trietilaluminio.

Generación general del alcóxido



Ruta general

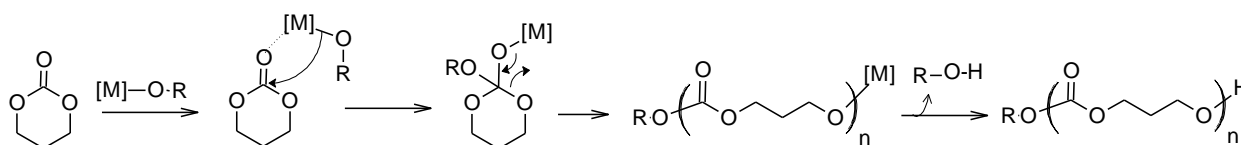


Figura 1.6 Ruta de polimerización por coordinación-inserción de carbonato de trimetileno (TMC) catalizada por un metal.

El compuesto bis 2-etilhexanoato de estaño (II) es el catalizador/iniciador más usado para ROP. Este es un catalizador efectivo y versátil, el cual es fácil de manejar y es soluble en disolventes orgánicos y en lactonas. La ROP procede vía ataque nucleofílico del alcohol dando a la inserción del monómero dentro del enlace oxígeno-metal mediante el reacomodo de electrones. Durante la propagación, la funcionalidad del alcohol y el monómero son coordinados al complejo de $\text{Sn}(\text{Oct})_2$. La reacción es terminada por hidrólisis, formando un grupo terminal hidroxilo.

Trialcóxidos de aluminio $(\text{AlOR})_3$ y alquil dialcóxidos de aluminio han sido usados para la iniciación de ROP³¹. La alta selectividad de alcóxidos de aluminio produce polímeros bien definidos. Se ha reportado en la literatura, el uso de trietilaluminio en la polimerización de carbonato de 5-bencil trimetileno iniciado por metoxipoli(etilenglicol) (5 kDa), estos copolímeros resultantes catalizados presentaron polidispersidades de 1.5-1.6 utilizando como catalizador $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ y polidispersidades de 1.3-1.2 para los catalizados con trietilaluminio.

1.3.2 Catalizadores orgánicos

Las reacciones de polimerización viviente han sido usadas para sintetizar polímeros de peso molecular determinado con una alta fidelidad del grupo terminal y baja polidispersidad³², por lo que, este control es útil para la síntesis de copolímeros anfífilicos. Existen estudios de polimerización libre de metales en polifosfoésteres, poliésteres y policarbonatos³³⁻³⁵. En aplicaciones médicas es ideal que no existan residuos metálicos ya que puede afectar la calidad del material. Por lo tanto, se ha estudiado la ROP libre de metales (polimerización organocatalítica). Las moléculas tales como amidinas, guanidinas y fofazenos, llamadas “superbases” han sido investigadas en el estudio de la polimerización por apertura de anillo (Figura 1.7)³⁶, un ejemplo es la amidina 1,8-diazabicycloundecano-7-eno (DBU) que ha sido usada para ROP de monómeros de carbonatos cíclicos y lactonas³⁷. La guanidina cíclica, tal como 1,4,7-triazabicyclodeceno (TBD) ha presentado un menor control en la ROP debido a mayores polidispersidades de pesos moleculares obtenidos en comparación con DBU.

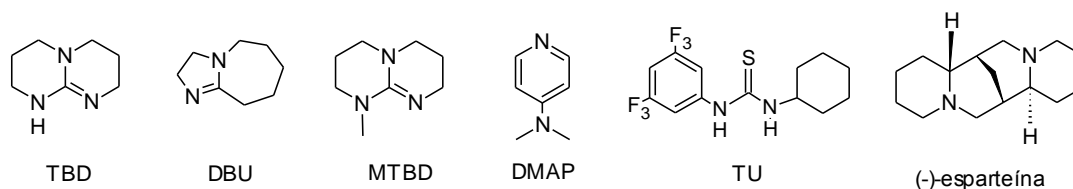


Figura 1.7 Catalizadores orgánicos.

El uso de catalizadores orgánicos como es el caso de DBU, no solo provee una ruta de polimerización por apertura de anillo (Figura 1.8), sino que también actúa como iniciador para polimerizaciones aniónicas, como se ilustra en la Figura 1.9³⁸. La etapa de iniciación de la polimerización aniónica es la reacción entre DBU y PTO para formar un anión alcóxido que ataca al grupo carbonilo de PTO. Se han reportado en la literatura, estudios mediante espectroscopia de masas que demostraron la incorporación de DBU en el policarbonato sugiriendo así una doble función, es decir, como un catalizador pseudo-aniónico y como un iniciador³⁹.

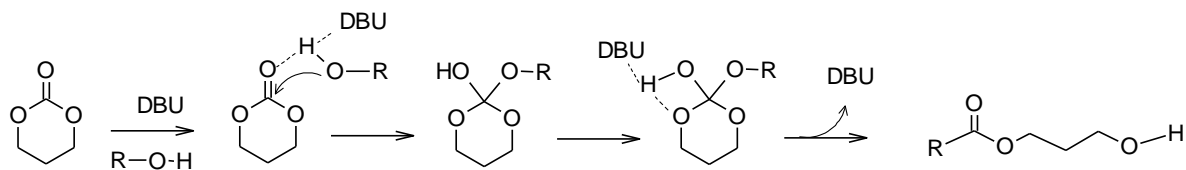


Figura 1.8 Ruta de polimerización por apertura de anillo mediante un catalizador orgánico.

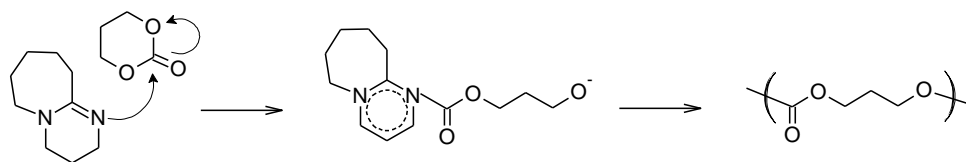


Figura 1.9 Polimerización aniónica de TMC catalizada mediante DBU.

1.3.3 Catalizadores orgánicos bifuncionales

Existe otra clase de catalizadores que son bifuncionales, los cuales consisten en la incorporación al sistema catalítico de otra molécula orgánica como las tiourea aminas. En la Figura 1.10 se representa la ruta de ROP mediante estos catalizadores. La polimerización ROP se inicia cuando el grupo carbonilo del monómero es activado por un ataque electrofílico de la tiourea vía puente de hidrógeno, la propagación se da por la activación del alcohol como nucleófilo con una amina terciaria (ej. DBU). Sin embargo, se ha demostrado que funcionalidad de tiourea y la amina terciaria, no son necesariamente ligadas en una misma molécula. En el caso para la polimerización de lactida usando como catalizador DBU-TU, como se reportó en la literatura, se observó la ausencia de reacciones de transesterificación, obteniéndose distribuciones de peso molecular estrechas (≤ 1.08)⁴⁰.

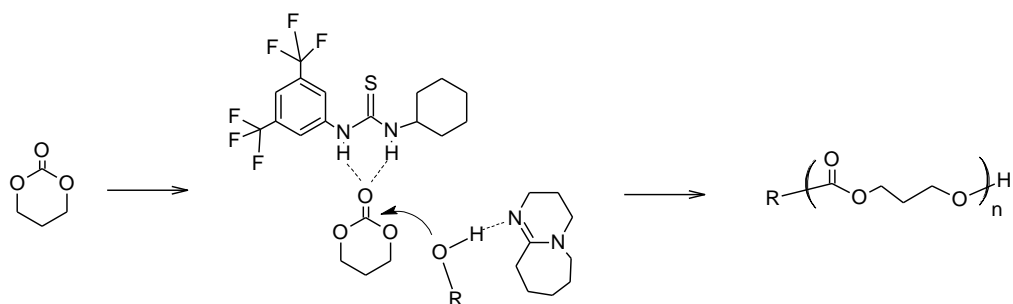


Figura 1.10 Polimerización por ROP de TMC a través de una activación dual por un catalizador TU-DBU.

1.4 Nanoprecipitación súbita (NPSB)

Es una técnica en la cual un fármaco hidrofóbico es disuelto con el copolímero anfifílico en un disolvente orgánico miscible en agua. Esta solución es inyectada dentro de una cámara pequeña a una alta velocidad junto con una corriente de agua. La alta velocidad genera un mezclado turbulento, causando que el fármaco y el polímero precipiten muy rápidamente, formando partículas de escala nanométrica. En la Figura 1.11 se muestra el mecanismo de formación de nanopartículas por medio de esta técnica.

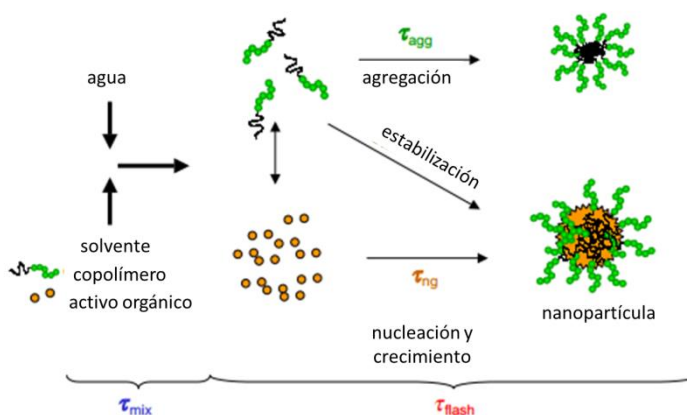


Figura 1.11 Proceso de nanoprecipitación súbita.

Durante este proceso, el bloque hidrofóbico del polímero anfifílico precipita con el fármaco, el crecimiento de las partículas es frenado, mientras que el bloque

hidrofílico (PEG) estabiliza las partículas de la agregación entre ellas. Así como también, como resultado del proceso, el tiempo de mezclado es más rápido que el tiempo de formación τ_{mix} , para una nanopartícula. Esto corresponde al número de Damköler para la precipitación, Da_p , la relación de estos 2 tiempos es menor a uno. Por lo tanto, el tiempo de mezclado deber ser menor que el de inducción para la formación de la partícula^{15,41,42}. Este proceso permite estudiar la incorporación de diversos fármacos y agentes de contrastes; teniendo como gran ventaja el que resulte simple y rápido, además de que puede ser reproducible a mayores volúmenes

Capítulo 2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es el estudio de la síntesis, caracterización y propiedades fisicoquímicas de copolímeros basados en policarbonatos funcionales y polietilenglicol. La naturaleza anfifílica de estos materiales se utilizó para la formación de nanopartículas mediante la asociación hidrofóbica del policarbonato, y sus aplicaciones.

Objetivos particulares

- i. Estudio de la síntesis de policarbonatos funcionalizados con grupos 1,3-dioles usando catalizadores organometálicos, así como su caracterización y formación micelar.
- ii. Estudio cinético de la reacción de polimerización de un policarbonato funcionalizado con grupos 1,3-dioles mediante un organocatalizador y el estudio de la formación de nanopartículas.
- iii. Estudio de la formación de nanopartículas entrecruzadas a partir de los polímeros con grupos hidroxilos.
- iv. Estudio de la síntesis de policarbonatos sintetizados a partir de ácidos fenilborónicos.
- v. Investigar la liberación de un agente terapéutico en nanopartículas basadas en policarbonatos.

Capítulo 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 Polimerización organocatalítica de un carbonato cíclico funcionalizado con 1,3-diol

3.1.1 Materiales

Diclorometano fue destilado a partir de hidruro de calcio, inmediatamente antes de usarse. 9-fenil-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5,5]undecano-3-ona (PTO) y 1-(3,5-bis(trifluorometil)-fenil)-3-ciclohexil-2-tiourea (TU) fueron sintetizados de acuerdo a métodos previamente publicados y almacenados en el desecador bajo atmósfera inerte. D,L-Lactida fue recristalizada de acetato de etilo anhidro y almacenada a 15°C. 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undecano-7-eno fue conservado en malla molecular (3 Å). Pireno, rojo de nilo, 1-dodecanol, benzaldehído, ácido clorhídrico concentrado, ciclohexilamina, 3,5-bis(trifluorometil)fenil isotiocianato, Pd(OH)₂/C, Pd/C y ácido benzoico, fueron adquiridos en sigma. Agua desionizada fue purificada en un sistema Barnstead Nanopure a una resistencia terminal de 18.2 mΩ; que será referido como agua nanopura.

3.1.2 Síntesis de 9-fenil-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5,5]undecano-3-ona

Se pesó 20 g (0.147 mol) de pentaeritritol en un matraz redondo de 250 mL, seguido se añadieron 147 mL de agua y se dejó disolviendo con un agitador magnético durante 1 h a 35°C, en baño de agua. Al observarse la completa dilución de pentaeritritol, se permitió que la mezcla se enfriara a temperatura ambiente. Posteriormente, 15.58 g (0.147 mol) de benzaldehído se añadió lentamente con agitación a temperatura ambiente. Al término de la adición, se agregó 0.73 mL de ácido clorhídrico concentrado, observándose la precipitación la cual indicó la presencia de productos. La mezcla fue agitada durante 5 h a temperatura ambiente. Los productos fueron colectados y lavados con agua fría (ligeramente alcalina con carbonato de sodio). El siguiente paso fue la recristalización a 100°C con agua alcalina, luego el matraz con el sólido se equilibró a temperatura ambiente y se colocó en un baño de hielo durante varias horas. Se colectaron los sólidos y se lavaron con agua alcalina fría para remover el subproducto dibenzalpentaaeritritol. Una segunda recristalización se realizó en tolueno⁴³, obteniéndose 25.6 g de benzalpentaaeritritol puro. El rendimiento fue de 78%. RMN ¹H (400 MHz, DMSO) δ 7.52 – 7.26 (m, 5H), 5.40 (s, 1H), 4.63 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 4.54 (t, J = 5.2 Hz, 1H),

3.90 (d, J = 11.5 Hz, 2H), 3.79 (d, J = 11.5 Hz, 2H), 3.67 (d, J = 5.3 Hz, 2H), 3.24 (d, J = 5.2 Hz, 2H).

En un matraz redondo de tres bocas seco fueron transferidos 400 mL de THF, después se adicionó 9.5 g (42 mol) de benzapentaeritritol y 8.1 mL de etil cloroformiato (82 mol). La mezcla fue agitada a 0 °C en atmósfera de nitrógeno durante 30 min. Trietilamina (12 mL, 86 mmol) fue adicionada con un embudo de goteo en un periodo de 30 min. El matraz de la reacción fue removido del baño de hielo y agitado a temperatura ambiente durante 12 h. El precipitado sólido fue filtrado y concentrado a vacío para obtener el producto. Finalmente fue recristalizado con THF/dietiléter (50:50 v/v) para dar cristales blancos de PTO⁴³. El rendimiento fue de 70%. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.65 – 7.34 (m, 1H), 5.52 (s, 1H), 4.72 (s, 1H), 4.23 (dd, J = 10.6, 1.4 Hz, 1H), 4.11 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 3.90 (dd, J = 10.6, 1.4 Hz, 1H).

3.1.3 Síntesis de 1-(3,5-bis-(trifluorometil)-fenil)-3-ciclohexil-2-tiourea (TU)

Ciclohexilamina (1.85 g, 18.5 mmol) fue adicionada gota a gota a temperatura ambiente a una solución con agitación magnética de 3,5-bis(trifluorometil)fenil isotiocianato (5.0 g, 19 mmol) en THF anhidro (20 mL) contenido en un matraz redondo. Esta reacción se dejó durante 4 horas y posteriormente el disolvente fue evaporado a vacío. El residuo blanco fue recristalizado de cloroformo para dar cristales blancos en forma de agujas, se filtró y secó a vacío a 50 °C durante 12 h⁴⁴. El rendimiento fue de 70%. RMN ¹H (400 MHz, DMSO) δ 9.85 (s, 1H), 8.23 (s, 2H), 8.15 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 4.11 (s, 1H), 1.92 (d, J = 9.6 Hz, 2H), 1.70 (dd, J = 8.8, 3.8 Hz, 2H), 1.58 (d, J = 12.5 Hz, 1H), 1.46 – 0.98 (m, 5H).

3.1.4 Síntesis de homopolímeros PTO

PTO (303 mg, 0.782 mmol) y mPEG-OH (195 mg, 0.06 mmol) fue secado por destilación azeotrópica a vacío para prevenir la polimerización térmica inducida del carbonato cíclico. El matraz fue puesto a vacío (60 m Torr) durante 4 h para remover completamente el disolvente y rellenado con nitrógeno. Diclorometano anhidro (5 mL) fue adicionado con una jeringa y los reactantes se disolvieron completamente previo a la adición de TU (14.46 mg, 0.039 mmol) y DBU (5.8 μL, 0.039 mmol). Las polimerizaciones procedieron a temperatura ambiente en atmósfera inerte con agitación continua. Alícuotas (~0.2 mL) fueron extraídas a determinados intervalos y la polimerización fue detenida por adición de ácido benzoico (1.1 mg, 9 μmol). La muestra final mPEG-*b*-PPTO fue finalizada con ácido benzoico (15.9 mg, 0.13 mmol), se precipitó en dietiléter, se filtró y secó a vacío a

50°C durante 12 h. El rendimiento fue del 60%. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.51 – 7.29 (m, 55H), 5.43 (d, $J = 4.4$ Hz, 11H), 4.57 (s, 22H), 4.15 (dd, $J = 12.8, 3.6$ Hz, 22H), 4.08 – 3.97 (m, 22H), 3.94 – 3.78 (m, 22H), 3.64 (s, 456H), 3.37 (s, 3H).

3.1.5 Síntesis de terpolímeros mPEG-*b*-P(PTO-co-DLLA)

PTO (586 mg, 2.35 mmol) y mPEG-OH (909 mg, 0.18 mmol) fueron secados mediante destilación azeotrópica a vacío. D,L-Lactida (505 mg, 3.51 mmol) fue adicionada en el matraz y colocado a alto vacío durante 4 h. Diclorometano (11 mL) fue alimentado mediante jeringa de vidrio de 100 μL y los reactivos fueron disueltos para disolver completamente previo a la adición de TU (43.3 mg, 0.12 mmol) y DBU (17.5 μL , 0.12 mmol). Las polimerizaciones procedieron a temperatura ambiente bajo atmósfera inerte con agitación continua. Se adicionó ácido benzoico a las alícuotas extraídas y a la muestra final, para detener la polimerización. Los polímeros fueron precipitados en diétil éter, filtrados, y secados a vacío a 50°C durante 12 h. El rendimiento fue del 80%. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.51 – 7.31 (m, 55H), 5.42 (s, 11H), 5.17 (dd, $J = 11.2, 6.9$ Hz, 38H), 4.55 (s, 22H), 4.12 (s, 22H), 4.02 (s, 22H), 3.92 – 3.78 (m, 22H), 3.64 (s, 456H), 3.37 (s, 3H), 1.64 – 1.38 (m, 114H). NMR ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 169.60, 154.59, 137.52, 128.34, 126.11, 102.10, 71.95, 70.58, 69.01, 59.05, 37.47, 16.66.

El catalizador DBU fue previamente preparado dentro de una bolsa de atmósfera inerte en un matraz de 10 mL con malla molecular de 3 Å. Para la síntesis de terpolímeros mPEG₁₁₄-*b*-PLA_x, se utilizó 1% en mol de DBU a 1 h de reacción^{40,45}. La conversión fue del 100%.

3.1.6 Síntesis de terpolímeros en bloque mPEG-*b*-PPTO-*b*-PDLLA

El terpolímero en bloque (500 mg, 0.0769 mmol) fue secado por destilación azeotrópica. D,L-Lactida (213 mg, 1,48 mmol) fue entonces adicionada y el matraz fue puesto a alto vacío durante 4 h. Ambos reactivos fueron disueltos en diclorometano (2.1 mL) previo a la adición de DBU (2.22 μL , 0.0149 mmol). La polimerización fue realizada durante 1 h a temperatura ambiente bajo atmósfera inerte con agitación continua. Las alícuotas de la reacción y la muestra final fueron detenidas con ácido benzoico y purificado como se mencionó previamente. El rendimiento fue del 85%.

3.1.7 Desprotección de PPTO

mPEG-*b*-P(PTO-*co*-DLLA) (700 mg) fue disuelto en metanol o mezclas de THF:MeOH (12mL de 1:3 vol.), y a estas soluciones fue adicionado Pd(OH)₂/C. Las mezclas fueron colocadas a reflujo durante 24 h, después se dejaron equilibrar a temperatura ambiente, y filtradas a través de una capa delgada de zeolita la cual fue lavada con THF. La solución fue concentrada a vacío y precipitada en dietil éter, las muestras resultantes fueron secadas a 50°C durante 12 h. El rendimiento fue del 60%. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 5.15 (d, J = 7.0 Hz, 38H), 4.33 (d, J = 30.4 Hz, 44H), 3.64 (s, 500H), 3.37 (s, 3H), 1.65 – 1.21 (m, 114H).

3.1.8 Determinación de la concentración micelar crítica

Para conocer la concentración mínima necesaria para la formación de nanopartículas, es necesario primero conocer la CMC, arriba de esta concentración se puede estudiar la formación de ensamblados estables.

La concentración micelar crítica de los copolímeros anfifílicos en bloque fueron determinadas mediante espectroscopia de fluorescencia usando pireno como fluoróforo. Pireno (6.0×10^{-5} M en acetona, 10 μ L) fue adicionado a un vial de 5 mL y el disolvente se dejó evaporar completamente previo a la adición de 50 μ L de solución de copolímero en bloque (en acetona) de concentración conocida. Fue entonces adicionada 1 mL de agua, las muestras fueron agitadas con un mezclador de vórtice durante 1 min. Las concentraciones finales del copolímero en bloque fueron de 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 75 μ g/mL, 0.1, 0.5 y 1 mg/mL, colocadas en 12 viales cada solución. El disolvente se dejó evaporar y las muestras fueron equilibradas durante 12 h a 25°C previo a cada medición. La concentración final de pireno en cada muestra fue 6.0×10^{-5} M. La excitación de pireno fue barrido de 300 a 360 nm a una emisión de longitud de onda de 390 nm. El ancho de banda fue ajustado 2 nm. La relación de intensidad de las señales a 336 y 334 nm (I_{336}/I_{334}) del espectro fue analizada como una función de la concentración del polímero. Valores de CMC fueron obtenidos de la intersección entre las tangentes de las curvas a baja y altas concentraciones.

3.1.9 Preparación de los ensamblados

El copolímero en bloque y el soluto hidrofóbico fueron ensamblados mediante nanoprecipitación súbita en un mezclador MIVM de 4 corrientes (Figura 3.1). El copolímero en bloque (5 mg/mL) y el soluto de interés (pireno o rojo de nilo) se dejaron disolviendo en THF por un periodo de 12 h a temperatura ambiente. Las soluciones fueron filtradas a través de filtros para jeringa 0.22 μ m PVDF (Millipore).

La relación volumétrica THF:agua fue de 1:9, con una velocidad mínima de 12 mL/min y 108 mL/min (36 mL/min por corriente) para la fase orgánica y acuosa, respectivamente, resultando en suspensiones con una concentración de 0.05% (w_p/w). Las suspensiones de nanopartículas fueron posteriormente dializadas (6-8 kDa MWCO, Spectrapor) contra agua nanopura durante 8 horas. El agua fue reemplazada cinco veces a través del proceso de diálisis. Las suspensiones fueron almacenadas en viales para su posterior uso.

En la ecuación (I) se define el número de Reynolds para la cámara de mezclado y en la Tabla 3.1 se presentan los valores del experimento para obtener un número de Reynolds 8,195.

$$Re = \sum_{i=1}^4 Re_i = \frac{D_e}{A_r} \sum_{i=1}^4 \frac{\rho_i Q_i}{\mu_i} = \frac{\rho_{H_2O} Q_{H_2O} D_e}{A_r \mu_{H_2O}} + 3 * \left(\frac{\rho_{THF} Q_{THF} D_e}{A_{re} \mu_{THF}} \right) \quad (I)$$

Tabla 3.1 Parámetros para obtener el No. de Reynolds usando el MIVM.

Parámetro	Símbolo	Valor a 25 °C
Diámetro del reactor	D_r	0.006 m
Diámetro de entrada al reactor	D_e	0.0015 m
Área del reactor ($A = \pi r^2$)	A_r	$1.77 \times 10^{-6} \text{ m}^2$
Densidad del agua	ρ_{H_2O}	1000 kgm^{-3}
Viscosidad dinámica del agua	μ_{H_2O}	$0.00089 \text{ kgm}^{-1}\text{s}^{-1}$
Densidad de tetrahidrofurano	ρ_{THF}	898.65 kgm^{-3}
Viscosidad dinámica de tetrahidrofurano	μ_{THF}	$0.00046 \text{ kgm}^{-1}\text{s}^{-1}$

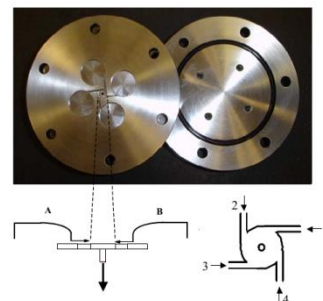


Figura 3.1 Mezclador multi-entrada de vórtice (MIVM) para producir micromezclado para nanoprecipitación súbita. La cámara principal tiene 4 entradas tangenciales, la salida está en el centro de la cámara y son perpendiculares a las entradas.

3.1.10 Medición de la hidrofobicidad de las partículas

La hidrofobicidad del centro de las nanopartículas fue determinado mediante encapsulamiento de rojo de nilo usando nanoprecipitación súbita. La emisión de rojo de nilo en las nanopartículas cargadas fue medida de 560 a 800 nm a una excitación de longitud de onda de 250 nm. Los anchos de banda de excitación y emisión fueron ajustados a 2.5 nm.

3.2 Síntesis de copolímeros de un carbonato cíclico con grupos ácido fenilborónico

3.2.1 Materiales

2,3-dimetil-2,3-butanodiol (Pinacol), N,N'-Diciclohexilcarbodiimida (DCC), 4-Dimetilaminopiridina (DMAP), 4-(N,N-dimetilamino)piridinio-4-p-toluensulfonato (DTPS), 2,2-dimetil-1,3-propanediol fueron adquiridos de Sigma Aldrich o Fisher Scientific y se usaron como se recibieron. Ácido 4-hidroxifenilborónico fue adquirido de Alfa Aesar y Rojo de Alizarina (ARS) fue adquirido de Sigma Aldrich. MTC-OH fue sintetizado como se describe previamente en la literatura^{46,47}.

3.2.2 Síntesis de ácido 4-hidroxifenilborónico pinacol éster (HPE)

Acido 4-(hidroximetil)fenilborónico (10 g, 0.0658 mol) y pinacol (8.16 g, 0.0691 mol) fueron adicionados a un matraz redondo de 200 mL conteniendo tolueno anhidro (100 mL). Una trampa Dean-Stark fue montada arriba del matraz y posteriormente la mezcla de la reacción fue calentada bajo reflujo durante 12 h. La mezcla de la reacción fue equilibrada a temperatura ambiente y el disolvente fue removido a vacío (15.25 g, 99% de rendimiento). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7.80 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.36 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 4.71 (s, 2H), 1.35 (s, 12H).

3.2.3 Síntesis de MTC-4-hidroxifenilborónico pinacol éster (PBC)

HPE (5 g, 0.0213 mol) fue disuelto en una mezcla de DCM anhidro y THF (50:50, v/v). DMAP (0.2 equiv.), DTPS (1 equiv.) y MTC-OH (3.408 g, 0.213 mol) fueron adicionados y la mezcla de reacción fue enfriada a 0°C usando un baño de hielo. DCC (4.83 g, 0.0234 mol) fue disuelto en DCM previamente (20 mL), luego fue adicionado gota a gota sobre un periodo de 30 min. La reacción fue entonces

procedida durante 18 h a temperatura ambiente. Las sales de N,N-diciclohexilurea (DCU, subproducto) fueron filtradas y el disolvente fue removido con rotaevaporador. El crudo sólido fue purificado por cromatografía de columna usando gel de sílice y acetato de etilo:DCM de 100% DCM a una mezcla 80:20. El producto fue más tarde recristalizado de acetato de etilo:hexano (80:20, v/v) para obtener el producto deseado (4.08 g, 60%). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.82 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 5.22 (s, 2H), 4.69 (d, J = 10.9 Hz, 2H), 4.20 (d, J = 10.9 Hz, 2H), 1.34 (s, 12H), 1.32 (s, 3H). RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 170.80, 147.35, 137.59, 135.17, 127.38, 83.94, 72.89, 67.78, 40.19, 24.84, 17.60.

3.2.4 Polimerización de MTC-HPE

mPEG (0.285 g, 0.14 mmol) y MTC-HPE (0.714 g, 1.89 mmol) fueron adicionados a un matraz schlenk de 10 mL con un agitador magnético. El matraz fue inmerso en un baño de aceite a 50°C a alto vacío (50 mTorr) durante 1 h. El matraz fue enfriado a temperatura ambiente bajo argón. DCM (6.3 mL) fue adicionado mediante jeringa y los reactivos fueron disolviéndose completamente previo a la adición de DBU (14.9 μL , 0.099 mmol). La reacción fue procedida a temperatura ambiente bajo argón, y las alícuotas fueron extraídas a determinados tiempos para monitorear las conversiones y peso moleculares. Las alícuotas y muestra final (colectada a 7 h) fueron terminadas con un exceso de ácido benzoico. Finalmente, se purificaron mediante diálisis con metanol durante 24 h (MWCO 1KDa). El rendimiento fue de 80%. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7.77 (d, J = 7.6 Hz, 52H), 7.29 (d, J = 6.4 Hz, 52H), 5.14 (s, 52H), 4.28 (s, 104H), 3.64 (s, 176H), 3.38 (s, 3H), 1.31 (s, 312H), 1.22 (s, 78H). PDI: 1.08.

3.2.5 Desprotección de PEG₄₄-b-PBC₁₁

Los copolímeros en bloque protegidos (0.5 g, 0.115 mmol) fueron disueltos en THF/MeOH (60/40 v/v, 40 mL) y agitado con una cantidad en exceso de ácido diborónico 1,4-bencénico (3 equiv/mol de pinacol) a 40 °C durante 48 h. Luego, la reacción fue concentrada hasta 10 mL aproximadamente y dializada contra metanol (MWCO 1KDa) durante 48 h. El disolvente fue evaporado y los polímeros desprotegidos fueron obtenidos con un rendimiento del 85%. RMN ^1H (400 MHz, DMSO) δ 7.77 (d, 52H), 7.27 (d, 52H), 5.10 (s, 52H), 4.22 (s, 104H), 3.51 (s, 176H), 3.24 (s, 3H), 1.20 (s, 78H).

El método de autoensamblaje de los copolímeros anfífilicos fue realizado mediante el método de nanoprecipitación súbita descrito previamente en secciones

anteriores. La concentración micelar crítica se determinó como ya se conoce de las secciones anteriores.

3.2.6 Fluorescencia de rojo de alizarina

Para confirmar los grupos borónicos disponibles en el centro de las nanopartículas, se llevó a cabo un método fluorescente con rojo de alizarina. La reacción de esterificación se llevó a cabo mediante la solubilización del polímero mPEG₄₄-b-DPPBC₂₆ en THF anhidro a una concentración de 5 mg/mL, así como también en el mismo vial se adicionó rojo de alizarina con una relación molar de diol a ácido borónico de 1:1, la solución se agitó durante 12 h a temperatura ambiente. Se observó un cambio en la coloración de la solución de rojo a anaranjado. La intensidad de la excitación fue registrada a longitud de onda 468 nm, explorando un rango de emisión de 480 a 750 nm. Los anchos de banda de excitación fue ajustado a 2.5 nm.

3.3 Nanopartículas de policarbonatos para liberación controlada

3.3.1 Materiales

Los reactivos y disolventes fueron adquiridos en Sigma Aldrich o Fisher, fueron usados como se recibieron. Rojo de Alizarina fue adquirido de Sigma Aldrich. Ácido 4-hidroxifenilborónico fue adquirido de Alfa Aesar. El copolímero anfifílico PEG₄₄-b-PBC₁₁ se sintetizó como se describe en la sección 3.2.4⁴⁸. Buffer fosfato salino (PBS) 10X pH 7.4 fue adquirido de Ambion. Capecitabina (CAPE) fue adquirida de Ark Pharm. Cumarina-6 y las células de cáncer de mama MD-MB-231 fueron amablemente proporcionadas por el Laboratorio del Dr. Hai-Quan Mao de JHU.

3.3.2 Conjugación de capecitabina

0.2 g del copolímero PEG₄₄-b-PBC₂₆ desprotegido fue disuelto en 10 mL de THF anhidro y 1.5 o 3 equivalentes (por ácido borónico) de CAPE se adicionaron. La reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 14 h con atmósfera de nitrógeno. La mezcla se dializó contra metanol durante 24 h para remover el exceso de CAPE. El producto fue obtenido por la evaporación de metanol hasta obtener un peso constante. La eficiencia de la conjugación fue calculada a través del análisis de RMN ¹H resultante usando la ecuación: $(2H * \text{área CAPE} \delta_{4.79} / 1H * \text{área polímero} \delta_{7.77}) * 100$. El rendimiento fue

del 80%. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.77 (d, 52H), 7.26 (d, 70H), 5.64 (s, 18H), 5.13 (s, 52H), 4.79 (s, 18H), 4.22 (m, 106H), 3.64 (m, 176H), 3.38 (s, 3H), 1.71 (m, 36H), 1.48 (d, 54H), 1.34 (m, 73H), 1.23 (m, 22H), 0.91 (d, $J = 6.4$ Hz, 54H).

La concentración micelar crítica se determinó como ya se conoce de las secciones anteriores. Las nanopartículas de CAPE-PBC fueron preparadas mediante nanoprecipitación súbita usando el procedimiento anteriormente descrito. Para propósito de comparación, el profármaco libre (5 mg/mL) se encapsuló con nanopartículas PEG₄₄-*b*-PBC₂₆ (5 mg/mL) usando el mismo método anterior.

3.3.3 Liberación in-vitro de capecitabina

Para el estudio de la liberación in vitro de CAPE, 3 mL de suspensión conteniendo nanopartículas con CAPE, fueron inyectadas dentro de casetes (MWCO 3.5 KDa, Pierce Chemical Inc.). Las soluciones de nanopartículas se dializaron contra PBS 0.01 M a diferentes valores de pH (7.4, 6.5 y 5.5) a 37 °C. El medio de liberación fue agitado a 200 rpm. Alícuotas de 1 ml se extrajeron a diferentes tiempos y 1 mL de medio fue adicionado. La concentración de CAPE liberada fue determinada mediante UV-Vis a 310 nm. Se elaboró la curva de calibración para cada valor de pH. Los valores son reportados como la media de triplicados independientes.

La capacidad de carga (CC) y la eficiencia de encapsulamiento (EE) del fármaco de CAPE fueron calculadas de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$\text{Capacidad de carga (\% peso)} = \frac{\text{peso del fármaco cargado}}{\text{peso del polímero}} \times 100$$

$$\text{Eficiencia de encapsulamiento (\% peso)} = \frac{\text{peso del fármaco cargado}}{\text{peso del fármaco alimentado}} \times 100$$

3.3.4 Estudios de conjugación de capecitabina mediante fluorescencia de ARS

Los análisis de la conjugación fueron mediante el uso de fluorescencia de rojo de alizarina-ácido borónico. Rojo de alizarina (ARS) es un catecol colorante que presenta un cambio significativo en la intensidad de fluorescencia de la conjugación del ácido borónico. Para las mediciones fluorescentes de ARS-ácido borónico, una solución de ARS (9.0×10^{-6} M) en una solución buffer fosfato de sodio 0.01 M (pH 7.4, 6.5 y 5.5) fue preparado (solución A). Una solución B fue preparada adicionando ácido 4-hidroxifenilborónico (PBA) a una porción de una solución A para preparar una solución 9.0×10^{-6} M ARS y una solución de PBA 1.8×10^{-3} M.

Solución B fue entonces titulada con una solución A para obtener mezclas de concentración constante de ARS y concentraciones de PBA variable. Cada solución se equilibró durante 10 min antes de cada medición. La intensidad de fluorescencia fue registrada a 572 nm con una excitación ajustada a 470 nm. Todos los experimentos se hicieron por triplicado y las constantes de conjugación fueron calculadas usando el método Benesi-Hildebrand:

$$\frac{[S]}{P} = \frac{K_{eq1}}{K_{eq}} Q + 1.$$

K_{eq1} = constante de equilibrio del complejo ARS – PBA

K_{eq} = constante de equilibrio del complejo fármaco – PBA

[S] = concentración del fármaco

El estudio competitivo de conjugación involucrando una mezcla de 3 componentes (ARS, PBA y CAPE) fue realizada de una forma similar descrita en el párrafo anterior. Capecitabina fue disuelta en una porción a una solución B, el cual da una concentración final de CAPE de 1.56×10^{-3} M, ARS 9.0×10^{-6} M, y PBA de 6.58×10^{-3} M en buffer de fosfato de sodio 0.010 M (solución C). Diferentes volúmenes de solución C fueron adicionadas a una solución B para lograr soluciones de concentración constante de ARS y PBA, en un rango de concentración de CAPE (7.82×10^{-5} M – 1.56×10^{-2} M). Cada solución fue agitada y equilibrada al menos durante 10 min antes de cada medición.

3.3.5 Cultivo celular MDA-MB-231

Para realizar los ensayos se utilizaron células provenientes de la línea celular humana de cáncer de mama MDA-MB-231 (Figura 3.2), las cuales son ampliamente utilizadas en los estudios biológicos. Inicialmente se colocaron las células en placas de cultivo junto con 15 mL de medio (DMEM, Dulbecco's Modified Tagle Medium, Gibco) sin rojo de fenol, el cual fue suplementado previamente con un 10% de suero bovino fetal (FCS, Gibco), un 1% de penicilina/estreptomicina, un 1% de piruvato y un 1% de L-glutamina, todos Sigma. Las células se mantuvieron a 37° C en una incubadora bajo una atmósfera humidificada con 5% CO₂. El medio de cultivo fue cambiado cada dos días, cuando la monocapa creció a 80% de confluencia.

Para la realización del subcultivo, es decir, el traspaso de las células a los pocillos con los materiales a ensayar, se procedió a lavar las monocapas celulares con 5 mL de una solución salina tamponada PBS (sin Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺) y luego fueron tripsinizadas con 2 mL de tripsina-EDTA durante cinco minutos a 37° C para separarlas de la placa. La tripsina es una enzima proteólica que actúa degradando

las proteínas que sirven de unión entre las células de cultivo. Una vez tripsinizadas, se procedió a añadir medio fresco para neutralizar la reacción de tripsinización. Luego se concentraron las células mediante centrifugación durante 5 min a 300 rpm, para eliminar así la tripsina y añadir ~5mL de medio fresco. Luego, las células fueron resuspendidas y contabilizadas. Se colocaron ~20 μ L del medio celular sobre el portamuestra para su conteo. La densidad celular fue determinada por conteo de células viables bajo el microscopio, el promedio fue obtenido de 4 conteos. Partiendo del número de células totales se realizaron las diluciones necesarias para obtener la cantidad de células por pozo deseada.

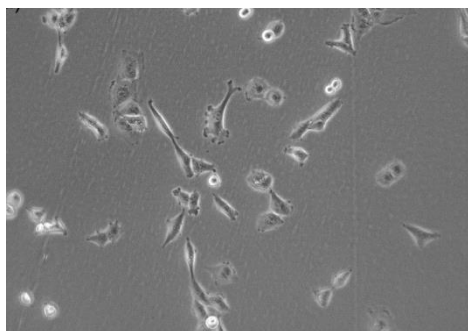


Figura 3.2 Cultivo de las células MDA-MB-231.

3.3.6 Citotoxicidad

Fue evaluada la citotoxicidad de las nanopartículas con CAPE usando el método WST-1. La WST es una sal de tetrazolio (4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-3H-5-tetrazolio]-1,3 disulfonato de benceno) la cual es transformada en formazán mediante un complejo sistema mitocondrial-succinato-tetrazolio-reductasa y es activo sólo en el caso de células viables. Por lo tanto, la cantidad de formazán producida durante el ensayo, se evalúa mediante medidas de absorbancia en un espectrofotómetro. Esto está relacionado con el número de células viables, es decir, el número de células metabólicamente activas dentro del cultivo.

Previo al estudio, las células de cáncer de mama MDA-MB-231 fueron cultivadas en platos de 96 pozos con una densidad celular de 5×10^3 células/pozo, se dejaron reposar durante 24 h. El medio sobrenadante fue reemplazado cuidadosamente por medio fresco y 10 μ L de NPs con CAPE fue inmediatamente adicionado para alcanzar concentraciones finales de 0.01-100 μ g/mL. 100 μ L del medio celular fueron expuestas a las concentraciones correspondientes de CAPE libre y nanopartículas basadas en policarbonato, durante 48 h de incubación. Entonces, la viabilidad celular fue estudiada usando el método WST-1, donde se añadieron 10

μL en cada pozo. Debido a la actividad de las deshidrogenasas de la mitocondria celular se produce formazán. Para conseguir un buen nivel de reacción se deja incubar el conjunto durante una hora. Después de ese tiempo se ha producido un cambio de color que se puede medir utilizando un espectrofotómetro a una absorbancia de 450 nm. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de células metabólicamente activas de células expuestas al fármaco y las no expuestas a este. Los datos son presentados como la media \pm SD de N = 6 por grupo.

La viabilidad celular (%) fue calculado con la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad celular} = (A_{\text{muestra}}/A_{\text{control}}) \times 100$$

Donde A_{muestra} es la absorbancia de las células tratadas con las nanopartículas poliméricas, CAPE conjugada a las nanopartículas y a CAPE libre. A_{control} se refiere a las células no tratadas.

3.3.7 Estudios de la captación celular

Las células MDA-MB-231 fueron incubadas en una caja de 24 pozos, siendo expuestas a las NPs conteniendo en su centro hidrofóbico 30 μM de cumarina-6. Las células fueron crecidas a una densidad de 5×10^4 células/mL previamente, enseguida fueron expuestas al medio conteniendo nanopartículas con cumarina-6 encapsulada durante 0.5, 1, 2 y 4 h, y se colocaron en la incubadora a 37 °C. La concentración final de cumarina-6 en el medio celular fue de 0.3 μM . Después de la incubación de las nanopartículas en el medio celular, se aspiró de cada pozo el medio sobrenadante. Las células se tripzizaron con 400 μL y se adicionaron 400 μL de paraformaldehído, hasta formar un pellet, luego fueron resuspendidas, y posteriormente analizadas mediante citometría de flujo usando un equipo FACS Calibur (Becton Dickinson, NJ, USA). Fueron medidos 200 eventos por triplicado. Los datos fueron procesados usando el software FlowJo Software.

Para el análisis de microscopía, se usó una caja de fondo negro esterilizada de 12 pozos. En cada pozo se añadió 1 mL del medio celular, los cuales se colocaron cuidadosamente mediante una pipeta esterilizada, y fueron tratadas con nanopartículas cargadas con cumarina-6 a una concentración final del polímero de 50 $\mu\text{g/mL}$ y 0.1 $\mu\text{g/mL}$ de cumarina-6 encapsulado. Antes de capturarse las imágenes, el medio conteniendo las nanopartículas fue removido y las células se lavaron con PBS (2x). Las imágenes fueron entonces adquiridas usando un microscopio fluorescente JENCO (JENCO,OR).

3.4 Nanopartículas de poli(éster carbonato) entrecruzadas

3.4.1 Materiales

Ácido diborónico 1,4-bencénico (DBA) fue adquirido de Biotecnología Santa Cruz. D-(+)- glucosa y peróxido de hidrógeno 30%(w/w) H₂O fue obtenido de Sigma. Buffer fosfato salino (PBS) 10X pH 7.4 fue adquirido de Ambion. Ácido acético glacial y acetato de sodio (tri-hidratado) de Fisher. Metanol fue destilado a partir de CaH₂ y almacenado en malla molecular (3 Å). Los terpolímeros mPEG-*b*-P(PTO-co-LA) y mPEG-*b*-P(HPTO-co-LA) fueron sintetizados como se describió en la sección 3.1.5.

3.4.2 Reacción de injerto

En un matraz redondo de 100 mL se adicionó mPEG-*b*-P(HPTO-co-LA) (100 mg, 0.0111 mmol) fue disuelto en THF (48.529 mL), después se añadió una solución de DBA (1.471 mL, 0.03M) bajo agitación. La reacción fue llevada a cabo a temperatura ambiente durante 24 h, posteriormente el disolvente fue removido a vacío, el polímero fue precipitado en diétil éter y secado a vacío a 50°C durante 12h. El producto final obtenido fue un sólido blanco, su rendimiento fue de 60% calculado de las áreas de las señales $10 * \text{área } \delta_{7.73} / \text{área } \delta_{4.32} * 100$. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7.73 (s, 21H), 5.16 (d, J = 6.7 Hz, 38H), 4.32 (d, J = 30.3 Hz, 43H), 3.64 (s, 500H), 3.38 (s, 3H), 1.58 (d, J = 7.1 Hz, 114H). PDI=1.07

3.4.3 Medición de la hidrofobicidad de las NPs

La hidrofobicidad del centro de las nanopartículas entrecruzadas y no entrecruzadas, fue determinado mediante el encapsulamiento de rojo de nilo. La emisión de las nanopartículas cargadas fue medida de 560 a 800 nm a una excitación de longitud de onda 250 nm. Los anchos de banda de excitación y emisión fueron fijados a 2.5 nm. Se midió la fluorescencia después de 24 h de incubación en medio PBS pH 7.4 y acetato buffer a pH 4, 5 y 6, a 37 °C. Otro estudio similar fue llevado a cabo a las mismas condiciones añadiendo cierta cantidad de peróxido de hidrógeno.

3.4.4 Pruebas de estabilidad de las nanopartículas en THF

A 1 mL de suspensión de nanopartículas con concentración 0.5 mg/mL, se concentró a aproximadamente 1 mg/mL, mediante la evaporación de agua a alto

vacío. Para investigar el entrecruzamiento de las nanopartículas, se tomaron alícuotas de 100 μL para cada prueba y se colectaron en viales de 1.5 mL, posteriormente se adicionaron 900 mL de THF. En seguida, se realizaron mediciones mediante DLS a determinados tiempo.

3.4.5 Estabilidad de las nanopartículas entrecruzadas en buffer

El estudio de la estabilidad de las nanopartículas entrecruzadas se realizó in vitro bajo condiciones fisiológicas. 1 mL de solución de nanopartículas en PBS 0.1 M pH 7.4 fue colocado en un vial de 1.5 mL, inmediatamente después fueron incubadas a 37 °C con agitación ligera. Además del estudio de la estabilidad en medio buffer, se realizó otro estudio similar en medio buffer y peróxido de hidrógeno con una concentración final de 70 μM de H_2O_2 ; otro fue en medio buffer y glucosa a una concentración de 36.6 mM a 37°C. Los medios buffer utilizados fueron fosfato buffer salino a pH 7.4 libre de Ca^{++} y buffer acetato de sodio a pH 5. A determinados tiempos se extrajeron las alícuotas e inmediatamente se realizaron mediciones de tamaño de partículas mediante DLS.

Para la determinación de concentración micelar crítica, se utilizó el mismo procedimiento descrito previamente en secciones anteriores, mediante el encapsulamiento de pireno. El método de autoensamblaje de los copolímeros anfífilicos fue realizado mediante nanoprecipitación súbita.

3.5 Polimerización organometálica de un carbonato cíclico

3.5.1 Materiales

Pentaeritritol (98%), ácido p-toluensulfónico monohidratado (98.5%), N,N-dimetilformamida (99.8%, anhidra), 2,2-dimetoxipropano (98%, GR) y etilcloroformiato (>98.0%) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich y utilizados sin previa purificación. Trietilamina (99.5%) y tetrahidrofurano (99.9%) también fueron adquiridos de Sigma Aldrich y destilados a partir de CaH_2 y sodio metálico, respectivamente, previo uso. Los siguientes reactivos: 2-etilhexanoato de estaño (II), trietilaluminio 1.0 M, diclorometano (DCM), cloroformo, cloroformo deuterado, dimetilsulfóxido deuterado, monometoxipoli(etilén glicol) [mPEG, $M_n=5000$], metanol, diétil éter y acetona fueron adquiridos de Sigma Aldrich y se utilizaron sin

previa purificación; Tolueno (99.5%), adquirido también de Sigma Aldrich, se destiló a partir de CaH_2 ; Nitrógeno (99.99%) fue adquirido en Praxair.

3.5.2 Síntesis de 2,2-dimetil-5,5-bis(hidroxiometil)-1,3-dioxano (DM)

En un matraz de 500 mL se introdujeron 24.57 g (180 mmol) de pentaeritritol, 0.3 g (1.6 mmol) de ácido p-toluensulfónico monohidratado y un agitador magnético. Mediante una cánula se transfirieron 250 mL de N,N-dimetilformamida. El matraz se colocó en un baño de aceite, a una temperatura de 85 °C y se mezcló durante una hora. Una vez transcurrida la hora de mezclado, se detuvo la agitación y se dejó enfriar la mezcla hasta alcanzar 40 °C. Una vez alcanzada dicha temperatura, se inició nuevamente la agitación y se agregaron 18.40 mL (180 mmol) de 2,2-dimetoxipropano. Se dejó mezclar durante 10 minutos. Enseguida se retiró el matraz del baño, manteniéndose la agitación durante 24 h a temperatura ambiente. Transcurridas las 24 h y con el fin de neutralizar la solución, se agregaron 0.47 mL (3.37 mmol) de trietilamina y se dejó mezclar durante una hora. La eliminación del disolvente se llevó a cabo mediante destilación a presión reducida a una temperatura de 80 °C, hasta obtener un sólido blanco. La purificación del producto se llevó a cabo disolviéndolo en 700 mL de tetrahidrofurano. La solución se mezcló durante dos días en un baño de aceite a 35 °C, se filtró el subproducto insoluble, después se evaporó mediante destilación atmosférica y/o reducida. Finalmente se secó a vacío a 40 °C y se obtuvo un sólido blanco. RMN ^1H (400 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$) δ 4.45 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 3.55 (s, 2H), 1.26 (s, 3H).

En un matraz de 1000 mL se colocaron 20.04 g (114 mmol) de 2,2-dimetil-5,5-bis(hidroxiometil)-1,3-dioxano, un agitador magnético y mediante una cánula se agregaron 656 mL de THF. El matraz se introdujo dentro de una cámara de atmósfera inerte donde le fueron agregados 22.77 mL (239 mmol) de etil cloroformiato. El matraz se introdujo enseguida en hielo y se dejó mezclar durante 15 min. A continuación, se agregaron gota a gota 35.12 mL (252 mmol) de trietilamina durante aproximadamente 40 min. La mezcla se mantuvo a 0 °C y con agitación constante durante 2 h. El subproducto, hidrocloreuro de trietilamina, se eliminó mediante filtración y el producto se aisló mediante destilación a presión reducida, a una temperatura menor a 55 °C. Se obtuvo un sólido ligeramente amarillento, el cual se secó a vacío a 35 °C. La purificación del monómero se llevó a cabo recristalizando con THF. En un vaso de precipitados de 500 mL se disolvió el monómero en una mínima cantidad de tetrahidrofurano anhidro, a una temperatura de 55 °C. Una vez disueltos todos los cristales, se retiró el vaso de precipitados de la parrilla y se introdujo en hielo. Se obtuvieron cristales blancos y el disolvente fue eliminado mediante filtración. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 4.35 (s,

2H), 3.84 (s, 2 H), 1.49 (s, 3H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 148.02, 99.30, 71.21, 31.72, 23.41.

3.5.3 Síntesis de polímeros de DM

La copolimerización se llevó a cabo mediante apertura de anillo por coordinación-inserción. Primero se introdujo el iniciador al matraz con 10 mL de tolueno anhidro. Se destiló el tolueno a partir de este matraz a presión reducida y se purgó el matraz con N_2 . Al matraz se introdujo cierta cantidad de monómero, seguido bajo atmósfera inerte se adicionó el catalizador mediante una jeringa de vidrio. El catalizador organometálico fue previamente preparado con tolueno anhidro. Una vez adicionada el catalizador, el matraz se introdujo en un baño de aceite a cierta temperatura con agitación con flujo de N_2 . Una vez finalizada la reacción se enfrió a temperatura ambiente. El producto sólido se disolvió en 10 mL de diclorometano, Luego, se precipitó en 100 mL de éster, se filtró a vacío y se secó a 35°C también a vacío durante aproximadamente 1 día. RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 154.67, 98.67, 70.55, 66.60, 61.80, 37.56, 37.51, 23.58, 22.64.

3.5.4 Formación de micelas

Para la preparación de las micelas se utilizó el método de desplazamiento de disolvente. Se pesó 100 mg del polímero y se disolvió en 5 ml de acetona (20 mg/mL) durante 6 h a temperatura ambiente. La solución fue adicionada gota a gota en 20 ml de agua desionizada con agitación durante 24 h para lograr la formación micelar, dejándose con agitación magnética y a vacío durante 8 h. Después se removió el disolvente obteniéndose una concentración final de 5 mg/mL. Finalmente la solución fue filtrada a través de microfiltros para jeringa de $0.45\mu\text{m}$ PVDF.

3.5.5 Reacción de desprotección

Para la desprotección se realizó el siguiente procedimiento. 100 mg de copolímero se disolvieron en 1 mL de diclorometano, una vez disuelto el copolímero se añadió 0.0186 mL (80%) de solución de ácido trifluoroacético, es decir, una relación molar de $\text{DM}/\text{CF}_3\text{COOH} = 2$. Después, se agitó durante cierto tiempo a temperatura ambiente. Posteriormente el producto de la reacción se precipitó en 10 mL de éter frío, se filtró a vacío y se secó a 35°C a vacío.

3.6 Caracterización

3.6.1 Cromatografía de permeación en gel (GPC)

En la determinación de pesos moleculares e índices de polidispersidad, se utilizó un cromatógrafo de líquidos HP-1090, equipado con una columna GPC (7.8x300mm, 106 Å y 105 Å) y un detector de índice de refracción Agilent 1100, usando THF como eluyente (1 mL/min a 40 °C y 60 mbar). Las muestras se prepararon disolviendo 5 mg de polímero en 2 mL de THF. La solución se filtró a través de filtros para jeringa (Millipore, Nylon 0.45 µm) previo al análisis. Otro equipo GPC usado fue con un HPLC isocrático Waters 1515 con 2 columnas Styragel (HR4 y HR3, 300 nm ×7.8 mm) conectado en serie a un detector de índice refractivo diferencial (Waters 2424) y un detector UV-visible (Waters 2489). THF grado HPLC fue usado como eluyente, a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Pesos moleculares son reportados referenciados a estándares de poliestireno (Shodex SL-105). Se disolvieron muestras de polímero a 5 mg/mL en THF. Las soluciones fueron filtradas a través de filtros para jeringa 0.22 µm PVDF (Millipore)

3.6.2 Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros RMN ^1H y ^{13}C de los polímeros fueron obtenidos en un espectrómetro Varian (Unity Inova) operando a 400 MHz y 26°C. Otro equipo utilizado fue un espectrómetro Bruker AV 400 MHz (software SpinWorks) en CDCl_3 (7.26 ppm) o DMSO-d_6 (2.5 ppm). Para RMN ^1H , las muestras fueron preparadas previamente disolviendo 12 mg de polímero en 0.7 mL de disolvente deuterado en un vial para centrífuga de 1.5 mL y enseguida fueron transferidas en tubos de vidrio de 5 mm (diámetro externo), se realizaron 12 barridos en ~5 min. Para las muestras de ^{13}C se pesó ~40 mg y se disolvieron con 0.7 mL de disolvente deuterado, se realizaron 1536 barridos en 8.7 h.

3.6.3 Dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial zeta

Experimentos de dispersión dinámica de luz fueron realizados en un equipo Malvern Instruments Nano-ZS Zetasizer equipado con un láser 4 mW He-Ne operando a 633 nm. Todos los experimentos fueron llevados a cabo a 25°C con un ángulo de dispersión de 173°. Función de autocorrelación de luz retrodispersada fueron analizadas usando un programa DTS 6.12. El método “*cumulant*” fue usado para obtener el radio hidrodinámico y polidispersidad. Las mediciones fueron llevadas a cabo 5 veces con una duración de 150 s cada una. Las suspensiones de

nanopartículas fueron filtradas a través de filtros para jeringa 0.45 μm PVDF (Millipore). Para la medición de partícula se ocupó un volumen de ~ 1 mL.

El potencial zeta fue medido bajo las mismas condiciones usando celdas capilares, en las cuales se alimentó 1 mL de muestra mediante jeringa.

3.6.4 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Esta técnica fue llevada a cabo en un DSC Perkin- Elmer 8000, Software Pyris service y un enfriador Intracooler 2. Cada muestra fue sometida a 2 ciclos de barrido, con una velocidad de calentamiento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de -40 a 150 $^{\circ}\text{C}$, equilibrando a 150 $^{\circ}\text{C}$ para 1 min, y enfriamiento de 150 a -40 $^{\circ}\text{C}$ a 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Los termogramas reportados corresponden al segundo ciclo. Para cada medición se pesó ~ 5 mg de muestra en una platillo de aluminio, posteriormente se cubrió cuidadosamente bajo presión con una cubierta también de aluminio.

3.6.5 Espectroscopia de Fluorescencia

La espectroscopia de fluorescencia fue llevada a cabo en un sistema Fluorolog-3 (HORIBA Jobin Yvon Inc., NJ). En cada experimento se establecieron previamente los parámetros correspondientes para cada fluoróforo. Para cada medición fue necesario ~ 0.8 mL de solución y cada barrido tardó ~ 1 min.

3.6.6 Espectroscopia de UV-vis

La espectroscopia UV-vis se realizó en un equipo CARY 50 versión 3, con un software versión 2. Para cada medición fue necesario ~ 0.8 mL de muestra con una celda de cuarzo. El escaneo fue de 600 a 200 nm.

3.6.7 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La morfología de las micelas fue analizada por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) con un microscopio electrónico JEM-2010 (JEOL) de 181 kV. Las muestras se prepararon con 5 mg de micelas en 0.5 mL de agua destilada, se depositó una gota sobre una rejilla de cobre cubierta de carbono. Se permitió a que se evaporara el agua para formar una película sobre la rejilla. Otra caracterización similar fue realizada en campo claro con un microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai 12 TWIN operado a una aceleración de voltaje de 100 kV. Todas las imágenes de TEM se registraron con una cámara CCD SIS Megaview III de ángulo amplio. Las rejillas de TEM se trataron bajo plasma, resultando películas de carbón

hidrofílicas. Las muestras fueron preparadas colocando una rejilla de cobre cubierta de carbón (Electron Microscopy, Hatfield, PA) sobre una gota de suspensión de las nanopartículas (30 μ L). Después de 5 min, la rejilla fue lavada con 8 gotas de agua nanopura y colocada sobre una gota de una solución de acetato de uranilo acuoso de 2 wt% durante 20 s. Las rejillas fueron entonces secadas con un papel filtro a temperatura ambiente previo a cada medición.

Capítulo 4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Polimerización organocatalítica de un carbonato cíclico funcionalizado con 1,3-diol

Existen diversos trabajos presentados en la literatura con el monómero carbonato 9-fenil-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5,5]undecano-3-ona (PTO), llevándose a cabo su polimerización con ciertos catalizadores metálicos, no obstante su análisis no se ha ampliado para polímeros anfifílicos^{43,49}. Un aspecto importante es la síntesis directa de este monómero, como ya ha sido reportado en algunos trabajos, haciéndolo aún más atractivo para el estudio de su aplicación. En particular, este carbonato cíclico presenta grupos 1,3-dioles protegidos, que podrían servir potencialmente para la incorporación covalente de ciertas moléculas⁵⁰. Otro aspecto a señalar, es la modulación en el carácter hidrofóbico de las nanopartículas que pueden resultar de este material⁵¹.

Los estudios realizados por Xiu en 2008, reportan la polimerización de PTO mediante un catalizador organometálico de octanoato de estaño en masa a 120°C³³. En dicho trabajo fue reportada una polidispersidad de 1.11 con un menor porcentaje molar incorporado de PTO de aproximadamente 5 % molar, siendo el máximo reportado en su copolimerización con DLLA y mPEG⁵². También ha sido reportada por otros autores la síntesis de este carbonato cíclico con diétil zinc⁴³. En el presente trabajo se sintetizaron polímeros lineales en bloque, además se investigó el comportamiento cinético de la polimerización del poli(éster carbonato) usando un organocatalizador, el estudio de la microestructura y el efecto del bloque hidrofóbico en las propiedades de las nanopartículas. Se observó un cambio cinético con la copolimerización con D,L-lactida, así como un marcado aumento en la incorporación molar de PTO de un 20 % en mol para polímeros iniciados con mPEG.

Las nanopartículas poliméricas formadas por 'autoensamblaje' de polímeros en bloque anfifílicos son importantes para liberación de agentes terapéuticos y bioimágen. Las nanopartículas en este estudio fueron producidas por nanoprecipitación súbita, una forma de precipitación controlada y crecimiento del núcleo por adsorción de un polímero en bloque estabilizante para generar partículas en el rango de nanómetros.

4.1.1 Homopolimerización de PTO

En la Figura 4.1 se presenta la ruta para la obtención del policarbonato basado en PTO, usando como catalizador DBU-TU. Previamente, la tiourea se sintetizó con un alto grado de pureza (observar Figura A1). Con respecto a la síntesis el monómero, primeramente se obtuvo el compuesto benzalpentaeirtritol libre de impurezas como se observa el espectro de RMN ^1H de la Figura A2. En la última etapa de la síntesis del carbonato cíclico, se obtuvo el monómero PTO con alto grado de pureza (Figura A3). La homopolimerización de PTO (1) fue estudiada a 25 °C usando un sistema bifuncional DBU(2)-TU(3) como catalizador y mPEG₁₁₄ como macroiniciador. La reacción fue monitoreada durante 24 h mediante GPC y RMN ^1H .

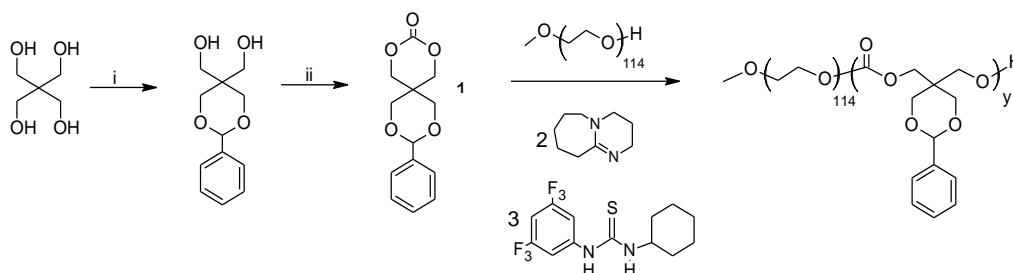
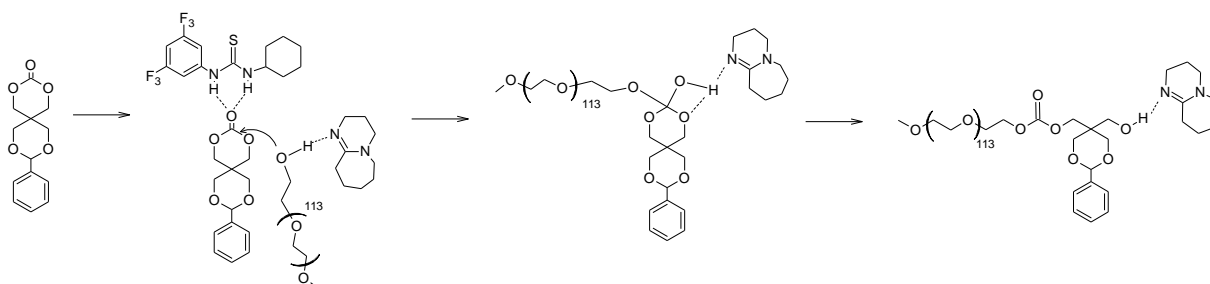


Figura 4.1 Se sintetizó benzalpentaeirtritol (i) a partir de benzaldehído, HCl y agua, a 25 °C. Monómero PTO de (ii) etilcloroformiato, trietilamina, THF, a 0°C. La polimerización fue llevada a cabo a 25 °C en DMC a una concentración de relaciones molares de [PTO]:[OH]:[DBU]:[TU]=20:1.5:1:1

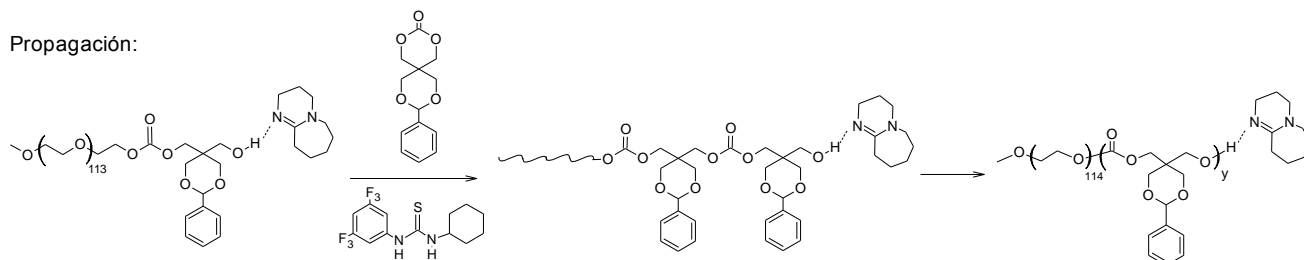
En la Figura 4.4 B se presentan los cromatogramas obtenidos a diferentes tiempos en donde se puede apreciar el aumento del peso molecular conforme avanza la reacción, notándose la ausencia de trazas del macroiniciador. Sin embargo, un pequeño pico fue creciendo a mayores tiempos de elución, probablemente sea derivado de la oligomerización de PTO. La máxima conversión alcanzada fue de 75% a ~15 h, como se presenta en la Figura 4.4 A. El catalizador DBU puede actuar como iniciador en la polimerización aniónica de carbonatos cíclicos y ésteres. Se ha mostrado recientemente, que en la ausencia de alcoholes (iniciadores) los organocatalizadores derivados de amidinas (ej., DBU) pueden intermediar polimerizaciones zwitterónicas^{53,54}. En la Figura B2 y Tabla B1, se presentan algunos datos derivados de la polimerización aniónica de PTO y LA, el cual puede servir como un claro ejemplo de éste tipo de polimerización. Otra reacción

secundaria es la transesterificación durante la polimerización de carbonatos. De los resultados de estos experimentos sugieren que existe una combinación de mecanismos (Figura 4.2 y 4.3). Las condiciones de reacción y los reactivos elegidos influyen fuertemente en la selectividad y polimerización con este sistema de catalizadores orgánicos. La oligomerización de PTO se muestra más pronunciadamente a mayores tiempos de reacción, esto podría ser el resultado de la combinación de polimerización ROP y aniónica mediada por DBU. Por lo tanto, para alcanzar un control preciso sobre el peso molecular en polímeros basados en PTO, la conversión debe ser limitada a ~61.4% en 6 horas.

Iniciación:



Propagación:



Terminación:

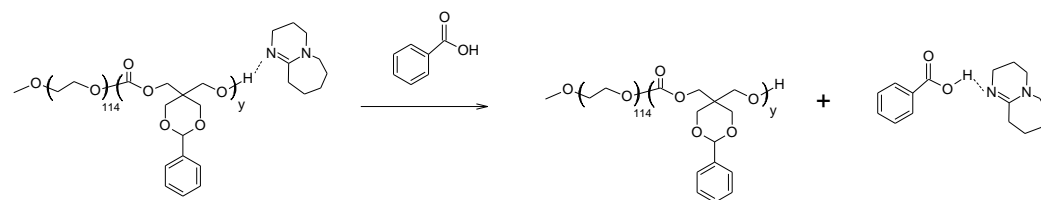
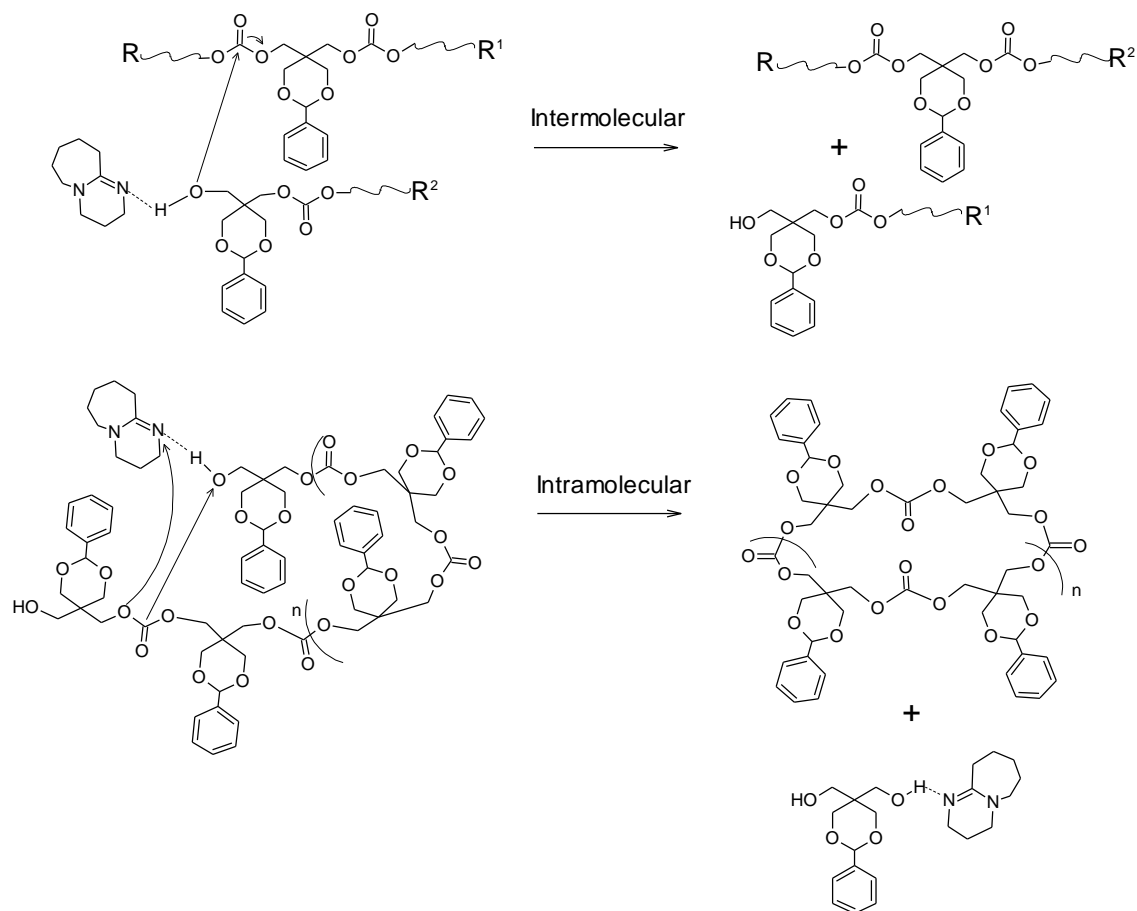


Figura 4.2 Ruta de polimerización por apertura de anillo de PTO catalizada mediante DBU-TU.

Reacciones de transesterificación:



Polimerización aniónica

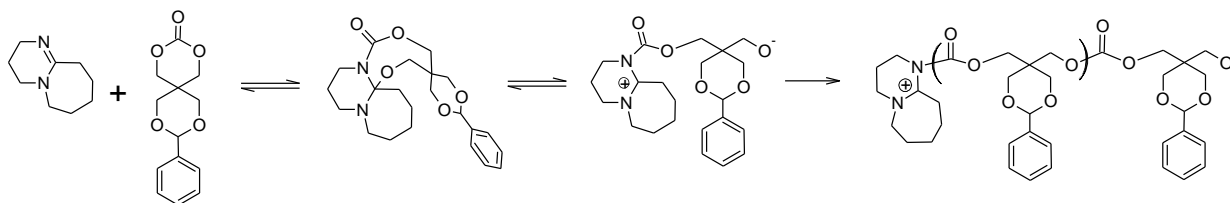


Figura 4.3 Rutas posibles de reacciones de transesterificación y polimerización aniónica para PTO.

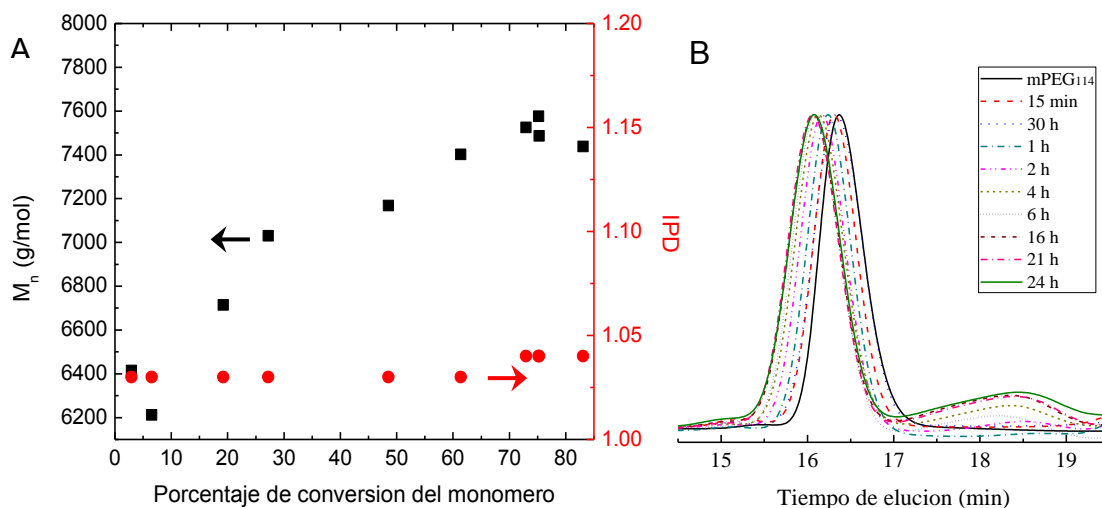


Figura 4.4 (A) Dependencia del peso molecular y polidispersidad determinado mediante GPC con respecto a la conversión determinada por RMN ^1H . (B) Cromatogramas de GPC mostrando el aumento del peso molecular y el incremento del oligómero PPTO a ~ 18.5 min.

En la Figura 4.5 A se presenta el estudio cinético, donde se observa la relación lineal de la polimerización de PTO entre el consumo del monómero ($\ln(1/1-x)$) y tiempo de reacción (Figura 4.5 B). Indicando esto que la reacción obedece una cinética de pseudo-primer orden, además de que se sugiere una polimerización ROP viviente de PTO. Esto también concuerda con los resultados de GPC observándose bajas polidispersidades y en un estudio anterior de la polimerización de carbonato de trimetileno. La velocidad de reacción aparente fue determinada de la función lineal de ($\ln(1/1-x)$) resultando $k_{app} = 0.16 \text{ h}^{-1}$. El menor valor de la velocidad de reacción aparente PTO en contraste con otros carbonatos derivados de carbonato de trimetileno como 5,5-bis(azidometil)-1,3-dioxano-2-ona se debe a que presenta grupos más flexibles disustituidos y menos voluminosos, teniendo una mayor constante de velocidad de reacción ($k_{app} = 5.04 \text{ h}^{-1}$). En el caso de PTO, la rigidez se debe principalmente al anillo bencénico, pero también al ciclo de 6 miembros. Con esto se puede decir que el impedimento estérico influye fuertemente en la cinética de polimerización. Particularmente, para este tipo de monómeros se requiere un estudio cinético para minimizar las reacciones secundarias que se puedan presentar.

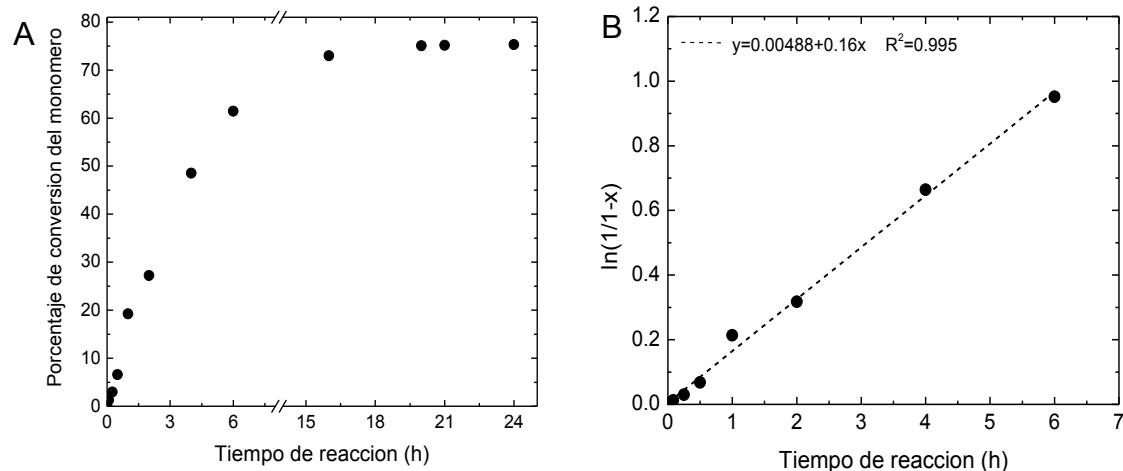


Figura 4.5 (A) Cinética de polimerización de PTO iniciada mediante mPEG₁₁₄ y catalizada por DBU-TU. Monitoreada por RMN ¹H durante 24 h. (B) Dependencia lineal de la conversión con el tiempo de reacción.

Como se explicó anteriormente en la homopolimerización, se producen oligómeros de PTO durante su homopolimerización. Para llevarse a cabo la polimerización secuencial, fue necesario remover los oligómeros residuales mediante la precipitación fraccionada con metanol. Mediante GPC se observó la eliminación de estos subproductos en el polímero mPEG-*b*-PPTO, el cual puede funcionar como macroiniciador en la formación de polímeros en tribloque. La confirmación del grupo terminal -OH de los polímeros fue examinada mediante la polimerización secuencial de D,L-Lactida (DLLA), caracterizada por una polidispersidad todavía estrecha de 1.09. No se detectó macroiniciador residual no reaccionado en el cromatograma de GPC (Figura B3 y Tabla B2). El aumento del índice de polidispersidad (IPD) del polímero en tribloque puede ser atribuida a la presencia de trazas de polímeros de mayores pesos molecular resultante de las reacciones de transesterificación a 14.7 min de elución, cabe destacar que la distribución fue monomodal.

Para comprobar si existe alguna influencia en el uso de diversos macroiniciadores, se estudió la homopolimerización de PTO con un iniciador de menor peso molecular, tal como 1-dodecanol. El seguimiento de la reacción fue llevada a cabo de manera similar que con mPEG, como ya se explicó en párrafos anteriores. La reacción entre PTO y 1-dodecanol mostrada en la Figura 4.6 A, exhibió una cinética de pseudo-primer orden y una constante de reacción aparente de $k_{app} = 0.12 \text{ h}^{-1}$ hasta 6 horas. Este valor es muy similar al sistema iniciado con mPEG ($k_{app} = 0.16 \text{ h}^{-1}$), el cual indica que no hay un apreciable efecto del iniciador en la cinética

de polimerización. En la Figura 4.6 B se puede apreciar un mayor IPD en el sistema con 1-dodecanol comparado con el macroiniciador, siendo de 1.2 y 1.03 respectivamente.

En la Figura B4 A se presentan los perfiles de GPC obtenidos a diferentes tiempos de polimerización. Se puede notar que durante un periodo de 1 h a 6 h de reacción fue creciendo la cadena del polímero y el peso molecular aumentó; sin embargo, a 7 h de reacción se observó que el peso molecular se mantuvo aproximadamente constante. La polimerización de PTO no fue completa, ya que la señal a 21 min de tiempo de elución indica que quedó todavía monómero sin reaccionar, aunque se puede notar la disminución de esa señal hasta 7 horas y el aumento de la señal correspondiente al polímero. Por su parte, en la Figura B4 B se aprecia que a tiempos de polimerización largos (15 h) se presenta notablemente un cambio drástico en la distribución, esto podría indicar posiblemente que se trate de una depolimerización. Probablemente, a largos tiempos se favorezcan otras reacciones con este catalizador, ya que como se ha reportado en la literatura, también se puede dar la depolimerización aniónica debido a la naturaleza en equilibrio que presentan algunos carbonatos cíclicos, principalmente los que contienen un mayor grado de sustitución³⁸. Es decir, podría darse un ataque nucleofílico del nitrógeno de la imina (de la molécula de DBU) al grupo carbonilo de PTO para producir un alcóxido, generándose un rompimiento en las cadenas del polímero.

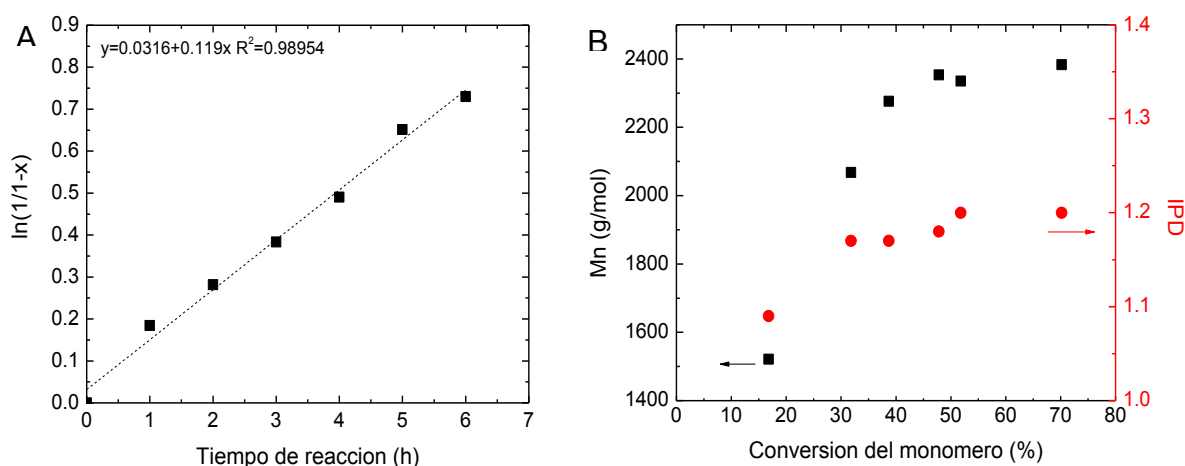


Figura 4.6 Cinética de polimerización de PTO usando 1-dodecanol como iniciador, y catalizada mediante DBU-TU. La reacción se llevó a cabo a 25 °C en diclorometano con relaciones molares de [PTO]:[OH]:[DBU]:[TU]=20:1.5:1:1. (A) Cinética de la reacción monitoreada mediante RMN ¹H. (B) Variación del peso molecular e índice de polidispersidad del monómero con respecto a la conversión.

4.1.2 Copolimerización de PTO y LA

Con el fin de controlar el carácter hidrofóbico de PPTO después de su desprotección, se decidió copolimerizar PTO con lactida (LA). En este estudio se monitoreó la copolimerización durante 7 h, a una relación molar de 75% DLLA y 25% PTO. A continuación se discuten los resultados obtenidos usando como catalizador el sistema DBU-TU de la reacción mostrada en la Figura 4.7. Como ya se tiene conocimiento, generalmente el aumento de la cantidad de catalizador favorece el aumento de la velocidad de polimerización. Sin embargo, esto podría conducir a un incremento de reacciones secundarias, tales como la transesterificación inter- e intramolecular, resultando polímeros de menor peso molecular y de mayor polidispersidad. Se utilizaron 2 diferentes contenidos de DBU-TU para la polimerización de 75% mol DLLA y 25% mol PTO. En el cual para el caso de mayor contenido de catalizador M/C=20, el polímero exhibió un mayor PDI comparado con el sintetizado con menor contenido de DBU-TU. A una relación molar de monómero a catalizador M/C=50 se produjo mejor control del peso molecular (Figura B5 y Tabla B3).

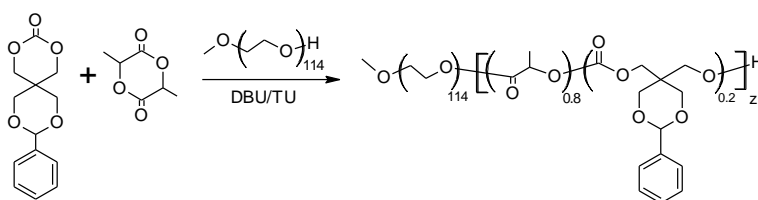


Figura 4.7 (A) Copolimerización de D,L-lactida (DLLA) y PTO iniciada por mPEG₁₁₄ y catalizada por DBU-TU (2+3). La polimerización fue llevada a cabo a 25 °C en diclorometano con relaciones molares de [M]:[OH]:[DBU]:[TU]=50:1.5:1:1. La relación molar de [LA]:[PTO] fue de 3:1.

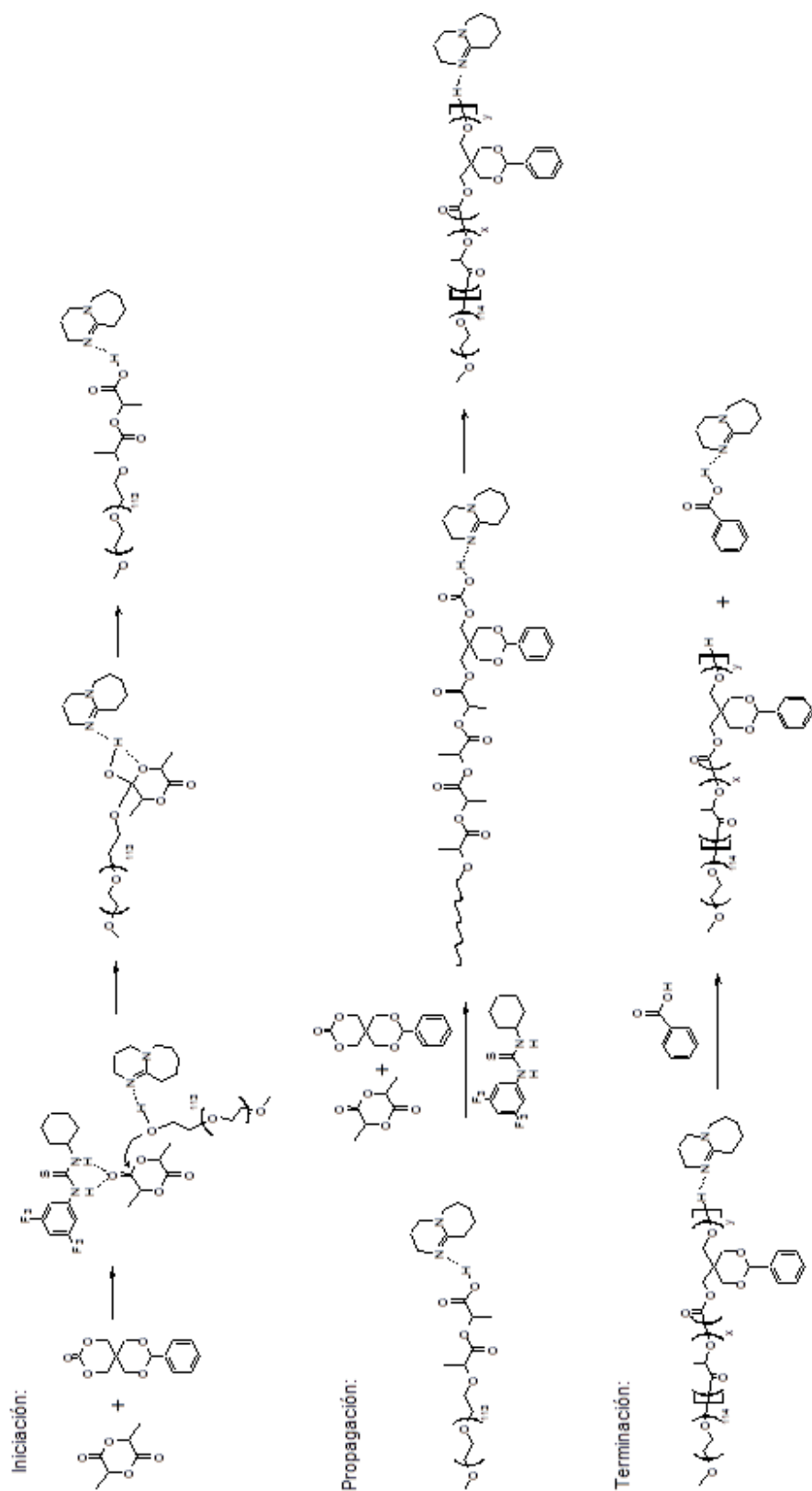


Figura 4.8 Ruta de polimerización por ROP entre PTO y LA, catalizada mediante DBU-TU.

De acuerdo a los resultados de GPC de la Figura 4.9 B en la copolimerización de PTO y DLLA, se obtuvieron distribuciones de pesos moleculares estrechas y se observó claramente el desplazamiento a altos pesos moleculares. Otro punto importante, es que en el sistema PTO-LA iniciadas mediante mPEG se observó un mejor control de la distribución (IPD=1.09) a diferencia de la iniciada con 1-dodecanol (IPD=1.28). No se detectó la presencia de macroiniciador residual. Sin embargo en la homopolimerización de PTO y su copolimerización con DLLA, mostraron la existencia de especies oligoméricas. Sugiriendo nuevamente la presencia de reacciones secundarias con DBU⁵⁵. De acuerdo a los resultados de RMN ¹H (Figura 4.9 A), las conversiones máximas alcanzadas a 7h fueron del 70% para el carbonato cíclico y para DLLA del 90%, esto indica claramente que LA favorece un mejor control de la distribución de pesos moleculares. La cinética señala que a 1 min de reacción la conversión de LA es de 53.2% y PTO de 9.7%, es decir a los primeros tiempos de la reacción se va formando un bloque principalmente de LA. Esto también es debido a la diferencia de reactividades entre PTO y LA, ya que se han determinado reactividades menores de los carbonatos cíclicos comparado con LA^{26,30}. Otro punto interesante es que la conversión de PTO durante la copolimerización fue del 26% mayor con respecto a su homopolimerización iniciada por mPEG.

En las Figuras A4 y A5, se presentan las señales correspondientes al poli(éster carbonato) mediante RMN ¹H y ¹³C, detectándose las señales características de los protones del grupo fenilo a 7.51-7.31 ppm de PTO, confirmándose así la estructura química del poli(éster carbonato). La cinética de copolimerización de PTO con DLLA muestra aparentemente 2 regímenes diferentes, iniciando el segundo lineal a 2 h. La constante de velocidad aparente del régimen más rápido fue de $k_{app} = 0.31 h^{-1}$, siendo aproximadamente el doble de su homopolimerización $k_{app} = 0.16 h^{-1}$ (Figura G1). Esta disparidad puede ser explicada en términos de reactividad de los grupos hidroxilos terminales, explicando así, que la incorporación de lactida en la cadena polimérica disminuiría las limitaciones estéricas del grupo terminal, aumentando la adición del monómero y facilitando así la polimerización⁵⁶. En el segundo régimen la constante de velocidad fue de $k_{app} = 0.10 h^{-1}$ relativamente cercano a la homopolimerización sugiriendo que la incorporación de unidades repetitivas de PTO al final de la cadena dificulta la polimerización.

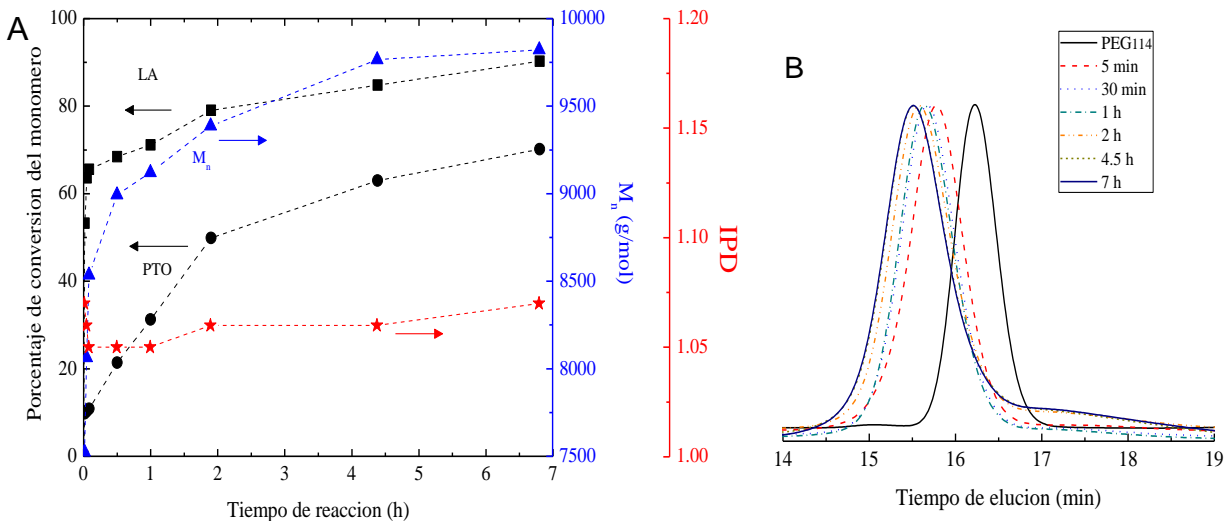


Figura 4.9 (A) Cinética de polimerización monitoreada por RMN ¹H y GPC durante 7 h. (B) Cromatogramas realizadas por GPC.

Por otro lado, se conoce que DLLA alcanza una conversión del 99% a 1 h de reacción, en contraste PTO presenta una máxima polimerización a 7 h. Sin embargo, en la literatura se ha reportado una distribución aleatoria de las unidades monoméricas. En este trabajo se investigó detalladamente la microestructura del terpolímero, explicándose los resultados a continuación.

Los arreglos de los monómeros a lo largo de cadena fueron examinados mediante la determinación de las longitudes media de la secuencia de las unidades repetitivas de PTO y DLLA, a través del análisis de las triadas del espectro de resonancia de RMN ¹³C (Figura 4.10). Las 8 posibles triadas del sistema binario DLLA (L) y PTO (P) son: PPP, PPL, PLP, LPP, PLL, LPL, LLP y LLL. Se registraron los espectros de RMN ¹³C para los homopolímeros de mPEG-*b*-PPTO y mPEG-*b*-PDLLA, con el fin de asignar las triadas PPP y LLL. El resto de las demás señales fue de acuerdo a lo reportado previamente al estudio de la cristalinidad del carbonato de trimetileno y L-lactida⁵⁷. Se aprecia a los 3 min de reacción, que las señales de DLLA son más intensas a 169-170 ppm comparadas con PTO a 154.3 ppm, sin embargo se nota un aumento notable a 7 h y el surgimiento de otra señal a 154.6 ppm.

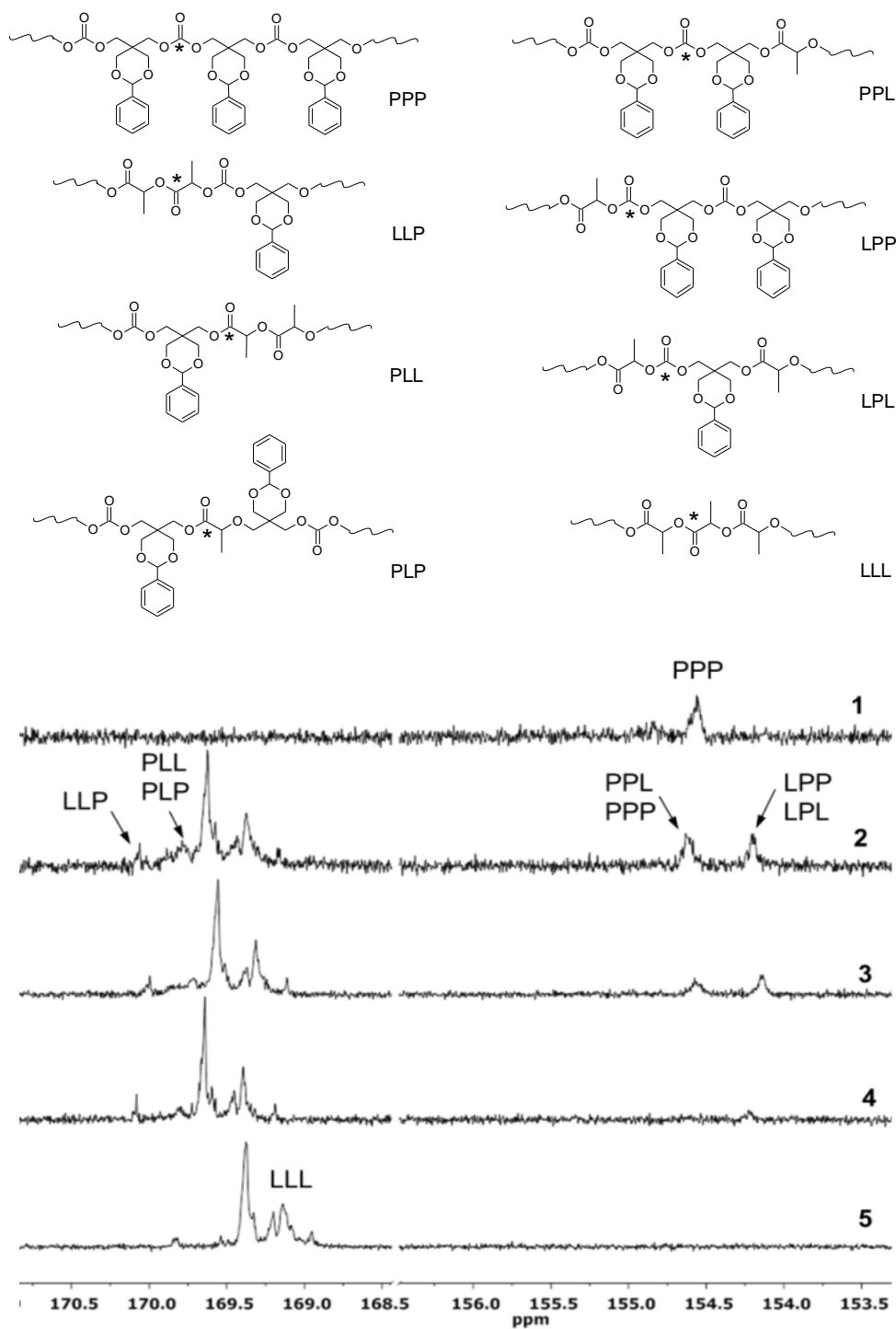


Figura 4.10 Espectros de RMN ^{13}C para mPEG-*b*-PPTO (1), mPEG₁₁₄-*b*-P(PTO-co-DLLA) (2-4), y mPEG-*b*-PDLLA (5) mostrando las asignaciones de las triadas. Espectros 2, 3 y 4 corresponden a los tiempos de copolimerización a 7, 0.5 y 0.05 horas, respectivamente.

Las longitudes promedio de la secuencia de las unidades repetitivas del éster \bar{L}_L y carbonato \bar{L}_P fueron calculadas para diferentes tiempos de reacción, basadas en las intensidades de las triadas, de acuerdo a las ecuaciones I y II.

$$\bar{L}_L = \frac{I_{LLL} + I_{LLP}}{I_{PLL} + I_{PLP}} + 1 \quad (I)$$

$$\bar{L}_L = \frac{I_{PPP} + I_{PPL}}{I_{LPP} + I_{LPL}} + 1 \quad (II)$$

En la Tabla 4.1 se observa que la longitud media de la secuencia de lactida disminuye con el tiempo de reacción, particularmente dentro de las 2 primeras horas. Los valores muestran un consumo inicial preferencial de DLLA, con una relación molar a 3 min de ~18. Lo contrario ocurre con la longitud media de la secuencia de PTO, la cual aumenta en las primeras 2 h de reacción. El análisis sugiere que el terpolímero tiene una microestructura tipo “gradiente”. La relación molar final de DLLA/PTO para a 7 h es de ~3.8, más cercano al valor teórico de 3.

Tabla 4.1 Longitud media de la secuencia de lactida (\bar{L}_L) y PTO (\bar{L}_P).

Tiempo de reacción (h)	\bar{L}_L^a	\bar{L}_P^a	DLLA/PTO (mol) ^a	
			RMN ¹³ C	RMN ¹ H
0.05	29.05	1.51	19.12	18.58
0.5	15.12	1.79	8.41	9.62
2	9.20	1.97	4.67	4.71
7	8.60	2.09	4.09	3.84

^aRelación molar de DLLA y PTO.

En la Figura 4.12 y Tabla 4.2, se presentan los cromatogramas y valores de GPC para los terpolímeros a diferentes contenidos de PTO. El incremento molar del carbonato favorece a un incremento en el IPD de 1.02 a 1.08³⁴. A un menor porcentaje molar de alimentación de PTO se verificó claramente un mejor control en la polimerización, esto puede deberse a un menor impedimento estérico de los sitios terminales de las cadenas poliméricas para incorporarse mayor número de unidades de PTO. El efecto del impedimento estérico puede observarse también al intentar aumentar el peso del bloque hidrofóbico, como se aprecia en la Figura B7.

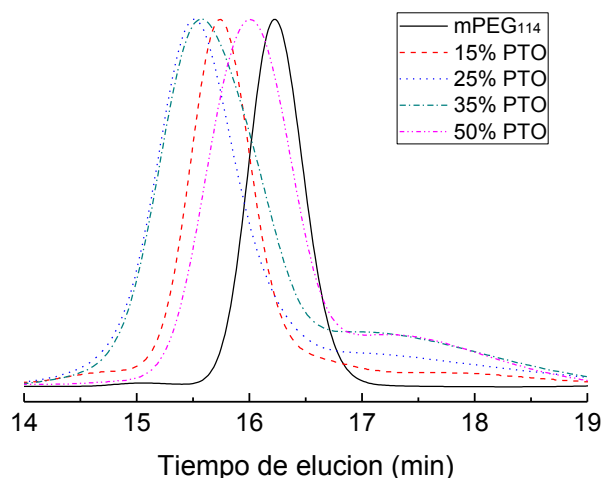


Figura 4.12 Cromatogramas de polímeros en bloque de mPEG-*b*-P(PTO-*co*-DLLA) con diferentes contenidos de PTO alimentado.

Tabla 4.2 Datos de GPC de polímeros de PTO y DLLA a diferentes relaciones molares de alimentación.

PTO alimentado (% mol)	M_n^a	M_w^a	IPD ^a
15	9,788	10,079	1.02
25	11,844	12,318	1.04
35	11,998	12,938	1.07
50	10,982	11,354	1.08

^aDeterminado mediante GPC con estándares de poliestireno.

4.1.3 Desprotección del bloque PTO-LA

La versatilidad de policarbonatos con grupos protegidos provee una herramienta útil para la posterior modificación de las propiedades de polímeros biodegradables. En esta sección se explicará el estudio realizado para definir las mejores condiciones de dicha reacción de desprotección del bloque policarbonato. La desprotección del grupo acetal del bencilideno de PTO resulta en 1,3-dioles, identificándose más adelante como HPTO. Se intentó previamente la desprotección mediante el uso de Pd/C y Pd(OH)₂/C a 30 psi H₂ lo cual resultó en solamente <5% de desprotección. Generalmente se describen procedimientos a altas presiones de H₂ (217 psi)^{31,33,51}.

Sin embargo, se exploró otro procedimiento de desprotección en la presente tesis. Este consistió en mantener una solución agitada del polímero y el catalizador $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ a reflujo con metanol/THF a presión atmosférica. Siendo esta la más efectiva para la remoción de los grupos acetales de bencilideno⁵⁸. De acuerdo a los resultados obtenidos, se encontró que el avance de la desprotección es influida por la concentración del catalizador y la polaridad del disolvente. En la Figura 4.14 se presentan los espectros de resonancia, los cuales se usaron para calcular el porcentaje de desprotección y sobre los que se puede observar claramente la presencia de un cambio en la estructura química del polímero. Donde la señal *c* corresponde al protón de $-\text{CH}$ del grupo protector a 5.42 ppm, disminuyendo considerablemente a 64% avance de desprotección y una completa desaparición de la señal a 100% de desprotección. Por otro lado, se observó el desplazamiento de las señales derivadas de los grupos $-\text{CH}_2-\text{O}-$ a 4.5 y 3.7 ppm a campos más altos en el espectro.

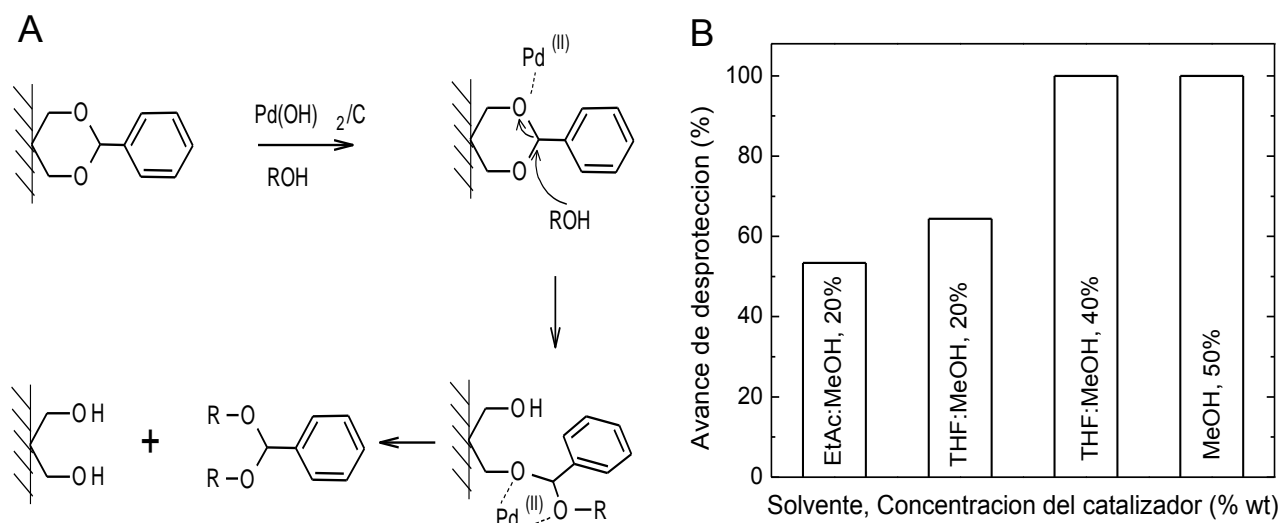


Figura 4.13 (A) Ruta de desprotección del grupo colgante acetal de bencilideno. (B) Porcentaje de la desprotección a diferentes condiciones de la reacción.

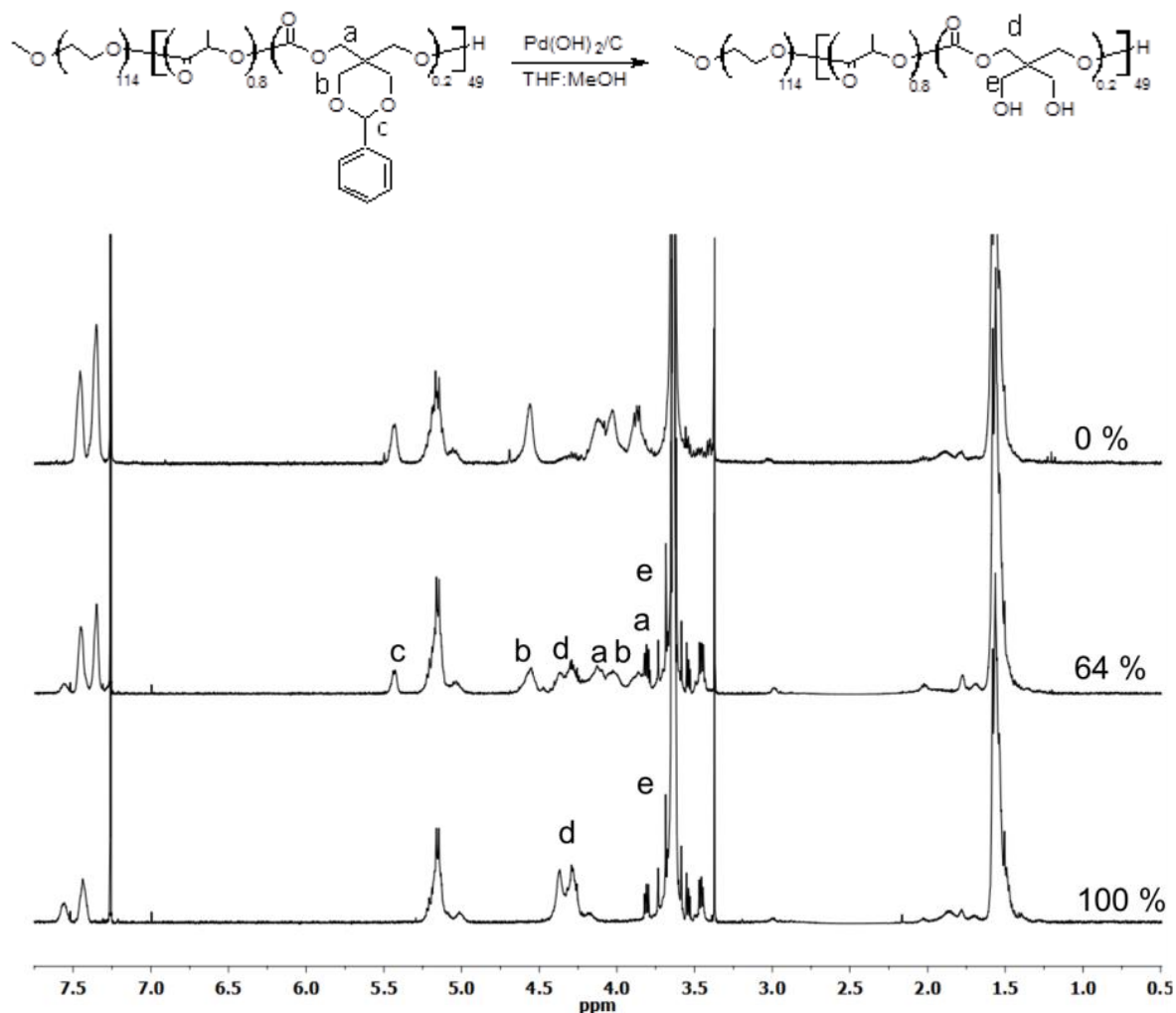


Figura 4.14 Arriba: Esquema de reacción de la desprotección del bloque poli(éster carbonato). Abajo: el espectro de RMN ^1H antes de la desprotección, a 64% y 100% avance de la desprotección.

En la Figura 4.15 se muestra el cromatograma derivado del polímero desprotegido, se observa un ligero desplazamiento a menores tiempos de elución, esto debido a que se removió solo el 6.35 % en peso⁵⁹. Confirmándose que el procedimiento fue el más conveniente para esta clase de policarbonatos, ya que en condiciones más drásticas se podrían alterar la arquitectura y rompimiento de las cadenas.

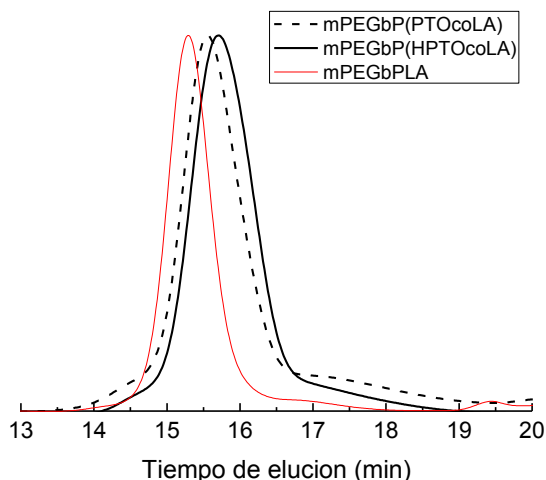


Figura 4.15 Cromatograma de GPC mostrando la disminución del peso molecular después de la desprotección del bloque poli(éster carbonato).

4.1.4 Propiedades térmicas

Las propiedades térmicas de los polímeros fueron analizadas mediante DSC. Como se puede apreciar en la Figura 4.16, a pesar de la naturaleza química del bloque hidrofóbico, solamente se observó la transición térmica asociada con la cristalización de PEG. Las transiciones vítreas de PDLLA y PPTO no fueron evidentes para ninguno de los polímeros en el rango de temperaturas examinadas; los homopolímeros de DLLA y PTO exhiben temperaturas de transición vítrea a 59°C y 124°C, respectivamente⁴³. Su ausencia puede ser explicada por el bajo contenido de PTO en los polímeros y a la superposición de la fusión de PEG (entre 40°C y 60°C)³⁷.

Tabla 4.3 Análisis térmico de los polímeros medidos por DSC.

Polímero	T _c (°C)	T _f (°C)	ΔH _c (J/g)	ΔH _f (J/g)
mPEG- <i>b</i> -PDLLA	2.33	54.7	2.60	87.75
mPEG- <i>b</i> -P(PTO- <i>co</i> -DLLA)	14.24	54.6	21.03	101.81
mPEG- <i>b</i> -P(HPTO- <i>co</i> -DLLA)	-20.99	55.9	1.58	141.15

*Los datos fueron tomados del segundo ciclo de calentamiento.

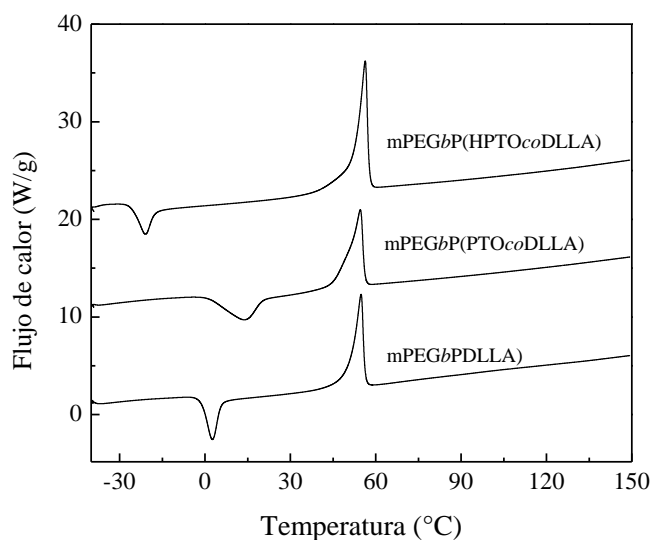


Figura 4.16 Transiciones térmicas de los polímeros mediante DSC.

La temperatura, la amplitud de cristalización y los picos de fusión proveen conocimiento sobre el efecto de la química del bloque hidrofóbico en la movilidad de las cadenas. El volumen de los grupos protectores acetales de bencilideno presentaron en mPEG-*b*-P(PTO-*co*-LA), mayor limitación en la movilidad y habilidad para cristalizar, resultando en temperaturas de cristalización más altas y exotermas de fusión más amplias. El aumento de la movilidad de la cadena en la desprotección es observada por una disminución de la temperatura de cristalización y picos estrechos. La temperatura de cristalización intermedia de mPEG-*b*-P(PTO-*co*-DLLA) sugiere que la forma desprotegida del carbonato tiene mucho mayor movilidad que lactida atribuida a los grupos colgantes (-OH vs -CH₃) o a los grupos metilenos del carbonato.

4.1.5 Formación de las nanopartículas

Para asegurar la formación de las nanopartículas bajo condiciones de supersaturación primero se determinó la concentración micelar crítica mediante fluorescencia de pireno encapsulado. Esto se calculó comparando la relación de las intensidades I_{336}/I_{334} (Figura E1)^{33,37}. En la Tabla 4.4 se presentan las propiedades de los polímeros, en la cual no se nota un cambio considerable en los datos de CMC exclusivamente de DLLA y PTO-DLLA (4 vs 2.9 µg/mL) del mismo peso molecular, esto debido al bajo contenido incorporado de ~20% mol de PTO. Por otro lado la desprotección produjo un aumento de la CMC de 14.4 µg/mL, esto se podría deber a la polaridad de los grupos 1,3-dioles.

Tabla 4.4 Propiedades los polímeros usados para nanoprecipitación súbita de pireno y rojo de nilo.

Polímero	M _n ^a	M _n ^b	M _w ^b	PDI	CMC (µg/mL)
mPEG- <i>b</i> -P(PTO- <i>co</i> -DLLA)	9,615	11,998	12,938	1.07	2.9
mPEG- <i>b</i> -P(HPTO- <i>co</i> -DLLA)	9,004	10,981	11,785	1.07	14.4
mPEG- <i>b</i> -PDLLA	9,906	15,111	16,263	1.07	4.0

^aPesos moleculares estimados mediante RMN ¹H, referenciando la señal de PEG metóxido ($\delta=3.35$ ppm); ^bPesos moleculares mediante GPC.

Las nanopartículas con pireno y rojo de nilo -solutos hidrofóbicos, fluorescentes- fueron preparados con mPEG₁₁₄-*b*-P(PTO_{0.2}-*co*-DLLA_{0.8})₄₉ y su equivalente completamente desprotegido mPEG₁₁₄-*b*-P(PTO_{0.2}-*co*-DLLA_{0.8})₄₉ como anfifilos estabilizantes^{60,61}. Se examinaron la formación de nanopartículas a 2 diferentes concentraciones de cada soluto: 0.05% y 0.1% en peso para rojo de nilo, y 0.1% y 2% en peso para pireno. Los diámetros de las nanopartículas permanecieron relativamente pequeños (≤ 40 nm) después de la carga de los solutos hidrofóbicos. El encapsulamiento de los solutos hidrofóbicos fue confirmado mediante el análisis de fluorescencia (Figuras E4 y E5).

Tabla 4.5 Nanopartículas preparadas mediante NPS.

Polímero	Diámetro de partícula (nm)[IPD] ^d				
	Sin carga	0.05% peso Rojo de Nilo	0.1% peso Rojo de Nilo	0.1% peso Pireno	2.0% peso Pireno
mPEG- <i>b</i> -P(PTO- <i>co</i> -DLLA)	26.6[0.11]	40.5[0.18]	36.7[0.15]	24.8[0.11]	26.5[0.15]
mPEG- <i>b</i> -P(HPTO- <i>co</i> -DLLA)	30.5[0.08]	38.9[0.16]	34.6[0.14]	29.4[0.08]	29.5[0.07]

^dDiámetro hidrodinámico de las nanopartículas (por intensidad) y polidispersidades medidos por DLS.

Las nanopartículas fluoróforas resultaron ser esféricas con un diámetro entre 35-48 nm, confirmado por TEM y DLS. Mediante TEM (Figura 4.17) se corroboró una mejor estabilización y homogeneidad de las nanopartículas después de la desprotección del policarbonato.

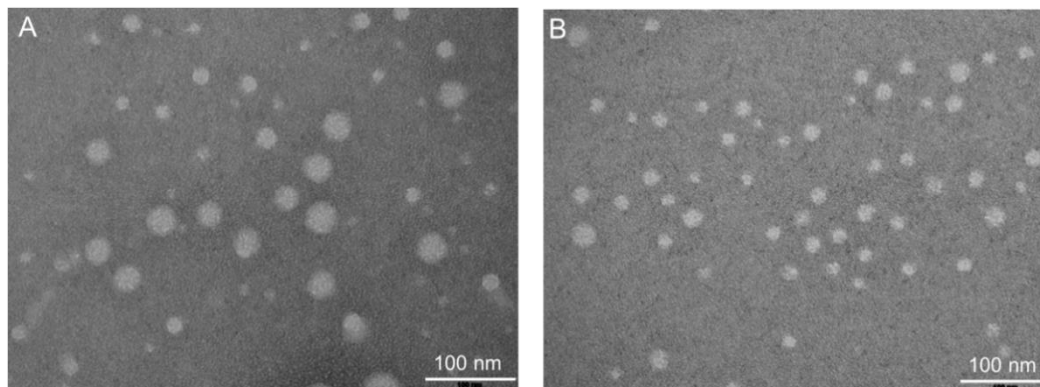


Figura 4.17 Micrografías de TEM de las nanopartículas de (A) mPEG-*b*-P(PTO-co-LA) y (B) mPEG-*b*-P(HTO-co-LA).

El diámetro de las partículas con la más alta concentración de rojo de nilo presentaron menores diámetros, esto podría ser atribuido a que exista una mayor nucleación hidrofóbica obteniéndose así un menor tamaño de diámetros. Todas las nanopartículas presentaron distribuciones de tamaño monomodales (Figura 4.18), con una formación controlada de tamaños para los anfífilos, sin embargo, para el poliéster anfífilico mPEG-*b*-PLA no se consiguió una distribución controlada de diámetros (Figura F1). La modificación de estos anfífilos de mPEG-*b*-PLA con unidades de carbonato mejoró marcadamente la estabilización de las nanopartículas para la encapsulación de moléculas.

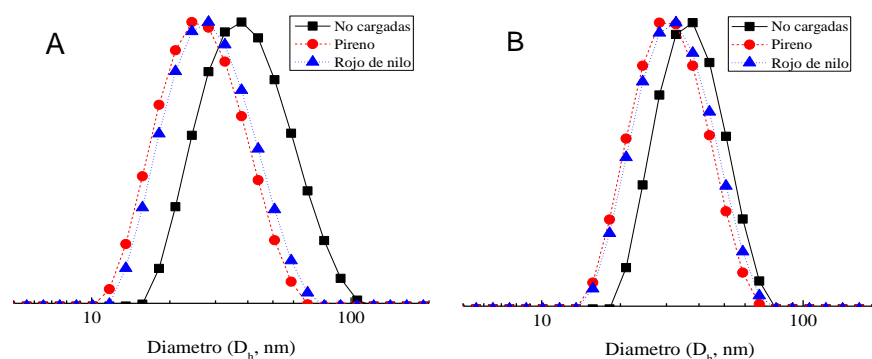


Figura 4.18 Distribución de tamaño de partículas estabilizadas por anfífilos basados en (A) PTO y (B) HPTO medidas por DLS. La concentración alimentada de rojo de nilo fue de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en ambos casos.

El rojo de nilo es un soluto hidrofóbico utilizado para probar la polaridad del microambientes químicos, esta propiedad se puede cuantificar mediante microscopia de fluorescencia. La emisión de fluorescencia en las nanopartículas fue medida de 560 a 800 nm, con una excitación de longitud de onda de $\lambda_{ex}=550$ nm (Figura 4.19 A). Las intensidades de las nanopartículas con rojo de nilo, resultaron altamente dependientes de la naturaleza hidrofóbica del bloque poli(éster carbonato). Para el bloque conteniendo PTO la intensidad fue mayor que el bloque desprotegido expuesto con los grupos 1,3-dioles, como era de esperarse. En la Figura 4.19 B, se puede observar directamente la fluorescencia de las nanopartículas a la misma concentración de rojo de nilo, confirmándose así el efecto químico de los grupos expuestos en el centro de la nanopartícula.

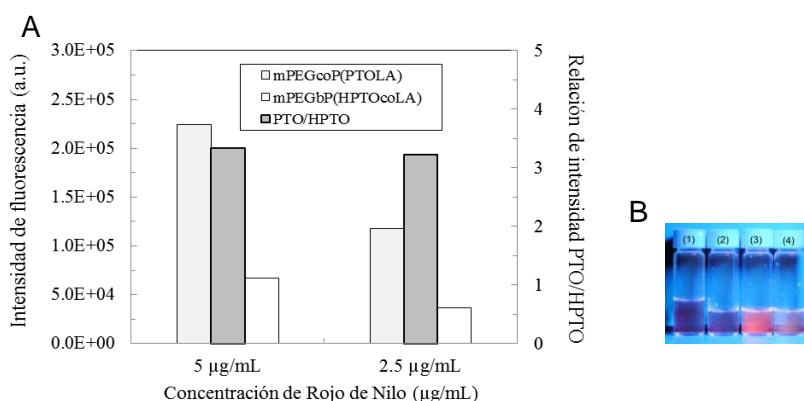


Figura 4.19 (A) Fluorescencia de nanopartículas preparadas con rojo de nilo usando 2 diferentes concentraciones ($\lambda_{em}=600$ nm). (B) Fluorescencia de las nanopartículas con rojo de nilo.

En esta parte de la tesis, se puede concluir que la cinética de polimerización para una relación molar LA/PTO=3, LA presentó un efecto acelerativo en la polimerización de PTO. El avance de desprotección pudo ser controlada de acuerdo a la concentración del catalizador. Los resultados de TEM y DLS, mostraron nanopartículas esféricas con polidispersidades estrechas. La intensidad de fluorescencia de Rojo de Nilo fue dependiente de la química del bloque hidrofóbico con el valor más bajo para poli(éster carbonato) basado en HPTO. La polimerización por apertura de anillo organocatalítica de PTO y DLLA resultó ser un método eficiente para la síntesis de polímeros. Los polímeros presentaron mejor control de peso molecular a un máximo de 25% en mol incorporado del carbonato, ya que a mayores contenidos la distribución de pesos moleculares aumenta. Finalmente, se puede decir que el control obtenido por el método de polimerización y desprotección, permite la síntesis de policarbonatos con estructura molecular bien

definida y fácilmente se puede variar las propiedades fisicoquímicas de este tipo de materiales.

4.2 Síntesis de polímeros derivados de ácidos fenilborónicos

El uso de polímeros organoborónicos tiene una importancia en el campo biomédico debido a que estos pueden ser aplicados como biosensores, detección de agentes oxidantes, de glucosa y materiales supramoleculares. La importancia de tales materiales radica en su naturaleza química, ya que permite la reversibilidad para enlazarse a 1,2 y 1,3 cis-dioles^{62,63}. Una amplia gama de monómeros con grupos borónicos han sido sintetizados, algunos de ellos han sido a partir de acrilamidas, acrilatos y estirenos funcionalizados con ésteres boronatos, los cuales han sido polimerizados mediante polimerización por adición, fragmentación y transferencia reversible (RAFT) y polimerización radicalica por transferencia de átomo (ATRP)^{64,65}. Un amplio número de policarbonatos han sido modificados postpolimerización con ácidos carboxílicos, aminas, hidroxilos, etc.; sin embargo la instalación de grupos borónicos en este tipo de polímero aún no ha sido investigada^{18,66}.

En esta sección se describe la síntesis de un nuevo carbonato cíclico derivado de grupos borónicos, así como también el estudio cinético de la polimerización de este nuevo monómero. Particularmente, el estudio de la postmodificación y el estudio de la morfología fueron de interés en esta parte de la tesis.

4.2.1 Síntesis de policarbonatos

En la Figura 4.20, se presenta la ruta de síntesis para la polimerización. Primeramente se llevó a cabo la síntesis del nuevo carbonato cíclico con ácidos borónicos protegidos. En las Figuras A6-A12 se presentan los espectros de resonancia de los monómeros obtenidos, en los cuales se puede detectar la ausencia de impurezas. Ambos monómeros fueron purificados mediante cromatografía en columna y subsecuente recristalización con hexano/acetato de etilo (80:20 v/v), obteniéndose un 60% en rendimiento.

La polimerización por apertura de anillo del policarbonato a base de ácido borónico (PBC), se realizó de manera exitosa, usándose como catalizador DBU y como macroiniciador mPEG (2 kDa). La estructura de estos polímeros se comprobó mediante la caracterización de RMN ¹H y ¹³C. El desplazamiento del grupo

protector pinacol en otros monómeros ha sido realizado en otros trabajos mediante una combinación de ácido trifluoroacético y poliestireno funcionalizado, e incluso a altas temperaturas (80° C)^{67,68}. En este caso la degradación hidrolítica puede llevarse a cabo en el policarbonato, lo cual no es deseable. Para preservar intacta las cadenas poliméricas y no inducir una degradación, se exploraron diferentes condiciones de desprotección del polímero, ya que los grupos protectores pinacol tienen una mayor afinidad con los ácidos borónicos,

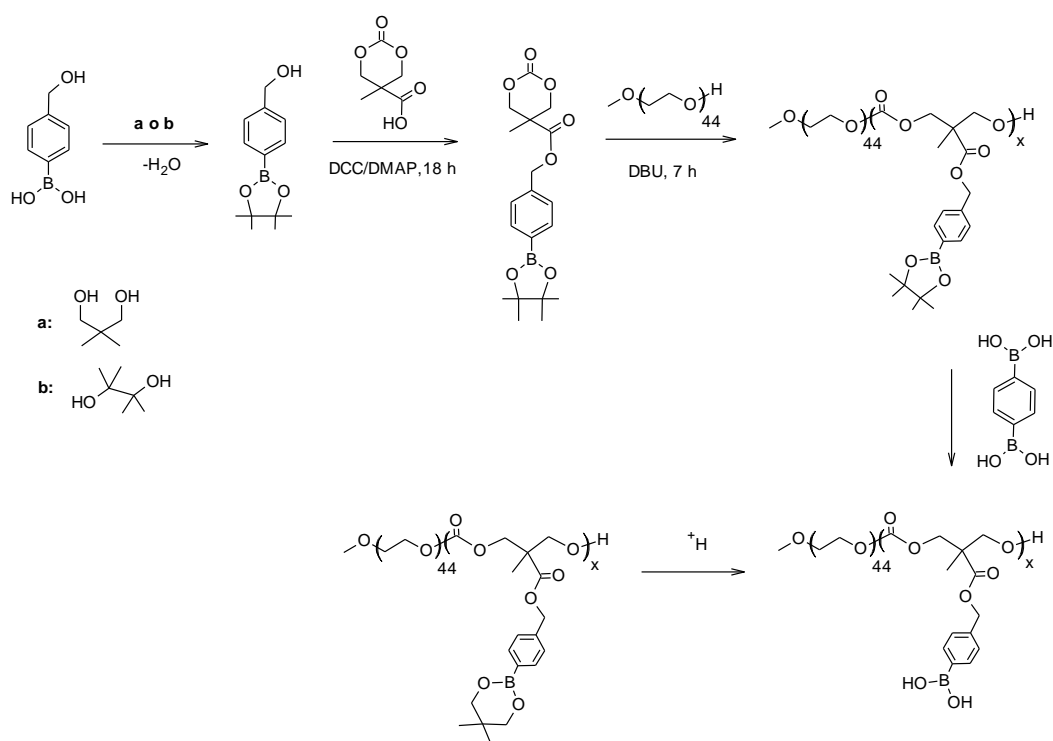


Figura 4.20 Ruta de síntesis de policarbonatos a base de ácido borónico, a: 2,2-dimetil-1,3-propanodiol para PBE y b: pinacol para PBC.

En la Tabla 4.6 se presentan las diferentes condiciones usadas para la desprotección del ácido. La más adecuada fue con un exceso de ácido diborónico 1,4-bencénico, es decir, mediante una reacción de esterificación del grupo pinacol del polímero hacia el ácido borónico. El tiempo de reacción fue de 48 h a 40°C, donde finalmente se purificó mediante diálisis. Otro grupo protector potencialmente atractivo por tener menor afinidad con los ácidos borónicos y mayor facilidad de remoción en condiciones ácidas más ligeras que pinacol, es el 2,2-dimetil-1,3-propanodiol⁶⁹. Igualmente se trabajó con este grupo en la síntesis de estos carbonatos, para demostrar la versatilidad de estos materiales a base de grupos borónicos. No se observó ninguna degradación del polímero a estas condiciones y

se detectó la desaparición de la señal de los protones del metilo provenientes del grupo protector pinacol a 1.25 ppm (Figura A13 y A14). La caracterización del polímero desprotegido mediante GPC, no fue posible debido a que puede existir una fuerte absorción de los grupos borónicos libres en la columna en gel del equipo.

Tabla 4.6 Diferentes condiciones de desprotección para PEG-*b*-PPBC.

Polímero	P:B ^a	Condiciones	Tiempo (h)	T (°C)	Desprotección ^b
PEG ₄₄ - <i>b</i> -PPBC ₂₆	1:4	TFA	7	25	Degradación
PEG ₄₄ - <i>b</i> -PPBC ₁₁	---	DOWEX	12	40	0
PEG ₄₄ - <i>b</i> -PPBC ₁₁	1:8	DOWEX	12	40	48.6
PEG ₄₄ - <i>b</i> -PPBC ₁₁	1:8	DOWEX	36	25	Degradación
PEG ₄₄ - <i>b</i> -PPBC ₂₆	1:8	----	24	50	70
PEG ₄₄ - <i>b</i> -PPBC ₂₆	1:8	----	48	50	100

^aRelación molar de pinacol a ácido diborónico 1,4-bencénico (P:B), ^bgrado de desprotección determinado mediante por RMN ¹H basado en los protones del metilo del pinacol éster ($\delta=1.25$ ppm).

Se sintetizaron una serie de polímeros a base de PBC variando la relación molar monómero a iniciador alimentado (M/I). Los índices de polidispersidad no fueron mayores a 1.12, en general la conversión alcanzada fue de 86% (Tabla 4.7). En este caso, se podría decir que el número alimentado de moles de PBC no afectó en la polimerización, aunque en este estudio solo se alimentó un máximo de 42 moles de carbonato por 1 mol de iniciador. Otro dato importante por mencionar es la CMC, la cual solo fue determinado para 2 muestras, para 26 y 42 moles incorporadas. Las CMCs fueron de 1.22 y 1.42 $\mu\text{g/mL}$. La remoción de los grupos protectores pinacol del ácido borónico colgante condujo a un significativo aumento en la CMC (3 veces mayor).

Tabla 4.7 Polímeros de PBC sintetizados con bloque hidrofóbico variable.

Polímero	M/I ^a alimentado	Mn ^b	Mw ^b	IPD ^b	Mn ^c	Conversión ^c (%)	CMC ($\mu\text{g/mL}$)
mPEG ₄₄ - <i>b</i> -PPBC ₁₁	13	5,006	5,581	1.11	4,323	85	--
mPEG ₄₄ - <i>b</i> -PPBC ₂₆	30	8,022	8,924	1.11	10,218	86	1.22
mPEG ₄₄ - <i>b</i> -PPBC ₄₂	50	8,537	9,568	1.12	16,506	84	1.45

^aRelación molar monómero a iniciador mPEG 5,000 ^bDeterminado mediante GPC. ^cEstimado mediante RMN ¹H, tomando como referencia los protones metilo ($\delta=3.35$ ppm) y los protones de CH₂O del polímero ($\delta=4.1-4.4$ ppm).

4.2.2 Estudio cinético de la polimerización

El estudio cinético de la polimerización fue llevado a cabo mediante el monitoreo de la conversión por RMN ^1H . El aumento del peso molecular y el índice de polidispersidad fueron detectados mediante GPC. En la Figura 4.21 A se pueden apreciar los desplazamientos de las distribuciones de pesos moleculares, observándose claramente estrechas (<1.09) y monomodales. Se detectó un cambio del peso molecular de 2,200 a 4,529, con una conversión máxima de 86.4% del monómero. No se detectaron trazas de macroiniciador remanentes, con lo que se puede decir que existe un buen control en la polimerización para este tipo de materiales.

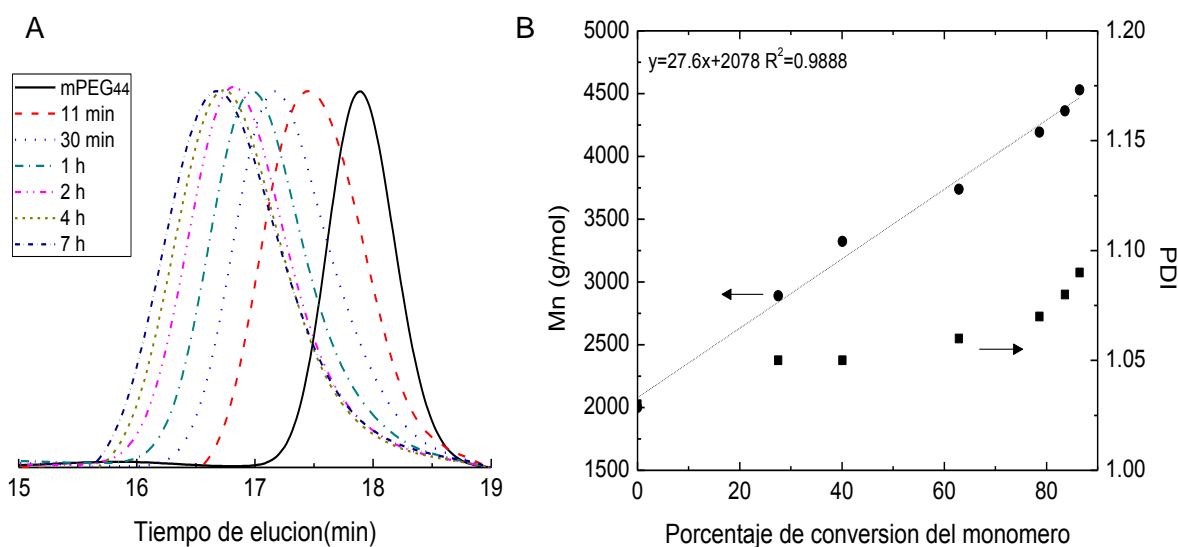


Figura 4.21 Polimerización de PBC iniciada mediante mPEG₄₄ a 25 °C en DCM, usando DBU como catalizador, con relaciones molares [PBC]:[OH]:[DBU]=[12.7]:[1]:[0.67]. (A) Cromatogramas de GPC. (B) Variación del peso molecular por GPC con respecto a la conversión del monómero.

En la Figura 4.22 B, se observa un notable aumento del peso a los primeros tiempos de reacción hasta ~60% de conversión observándose un aumento menos significativo aunado a un mayor aumento del IPD de 1.06 a 1.09. Probablemente, esto se deba al crecimiento de las cadenas poliméricas, originando un mayor impedimento estérico, como ya se mencionó en el estudio del monómero PTO o probablemente se deba a las reacciones secundarias tales como la transesterificación. Sin embargo, comparado con los monómeros DM y PTO, PBC

mostró un mejor control en la polimerización sin mostrar todavía la presencia de especies oligoméricas.

El estudio cinético de polimerización se determinó mediante el consumo del monómero PBC $\ln(1/1-x)$, observándose un comportamiento lineal de pseudoprimer orden hasta 1 h de reacción (Figura 4.22). Como se explicó en el párrafo anterior, un avance considerable de polimerización (a 60% de conversión) fue detectada también mediante RMN ^1H , con un crecimiento de las cadenas en las próximas 6 horas. Se examinó el control de la polimerización variando la cantidad de iniciador, en donde los pesos moleculares experimentales fueron cercanos al calculado. Además de que se demostró una distribución estrecha mediante GPC.

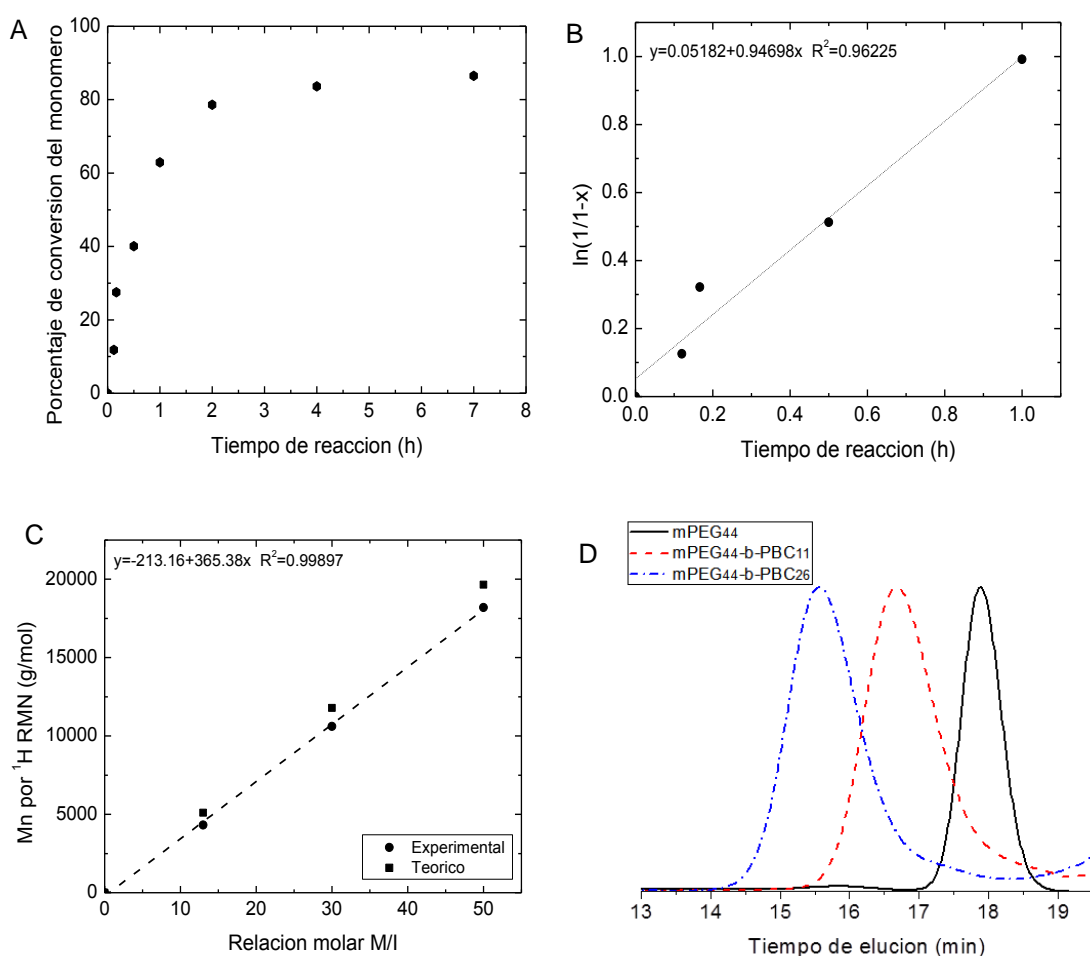


Figura 4.22 (A) Monitoreo de la cinética de polimerización mediante RMN ^1H . (B) Dependencia lineal de la cinética a 1 h de polimerización. (C) Dependencia lineal del peso molecular con la cantidad de iniciador. (D) Distribución de pesos moleculares.

4.2.3 Formación de las nanopartículas

El autoensamblaje de la serie de polímeros fue llevado a cabo mediante el método de nanoprecipitación súbita, es decir, con un cambio rápido en la calidad del disolvente. Se disolvieron previamente los polímeros anfifílicos en THF a una concentración de 5 mg/mL. La relación de mezclado usado en el MIVM fue de 1:9 ($V_{\text{THF}}/V_{\text{gua}}$). Después de la formación de las nanopartículas, se eliminó el 10% de disolvente mediante diálisis, y la caracterización se llevó a cabo mediante DLS y TEM. Los diámetros hidrodinámicos fueron de 28.3, 34,73 y 50.22 nm, con distribuciones estrechas de 0.224, 0.199 y 0.0998 (Figura 4.23 B, C y D respectivamente). En la Figura 4.23 A, se presentan todas las distribuciones monomodales previo a la desprotección.

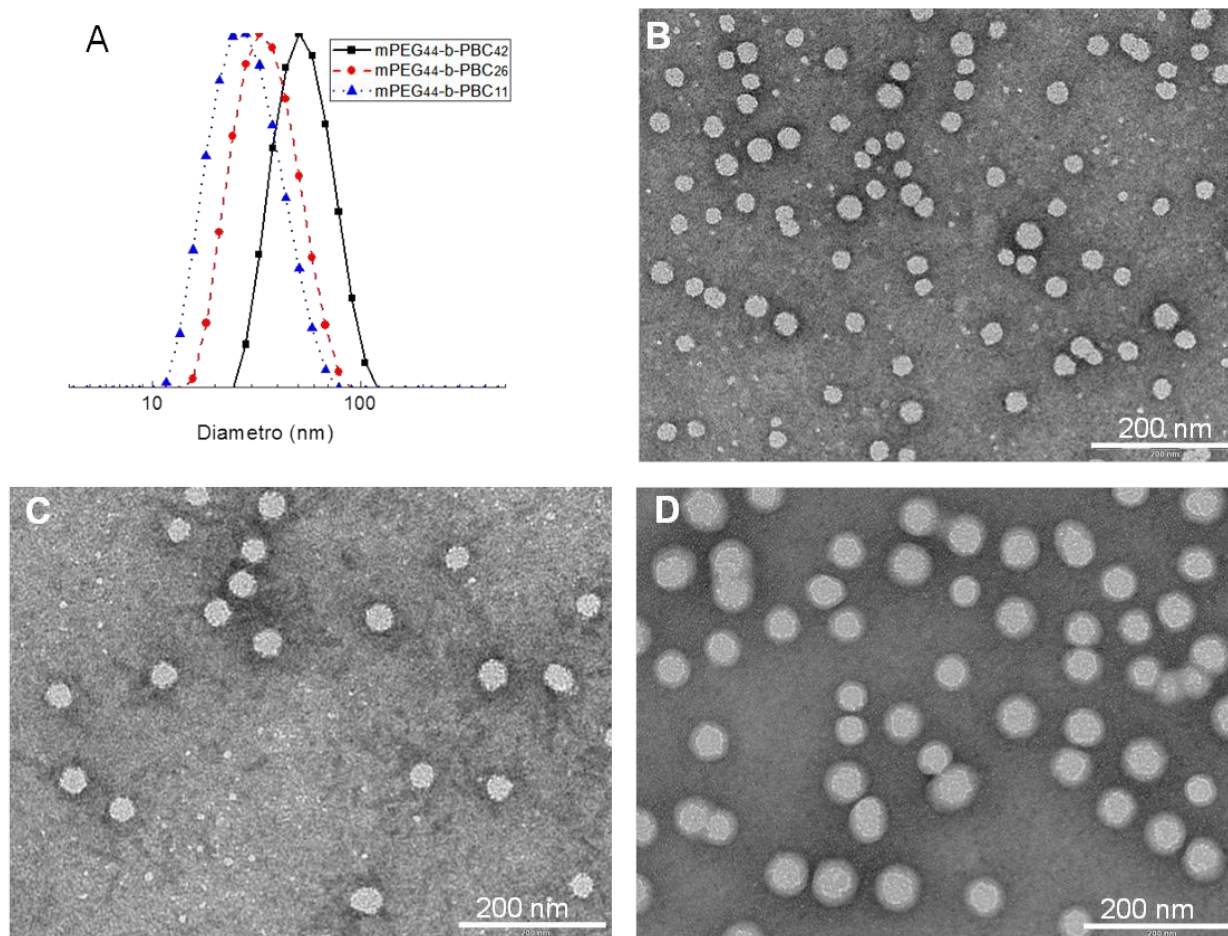


Figura 4.23 (A) Distribución de tamaño de nanopartículas por DLS, usando diferentes longitudes de bloque hidrofóbico de $\text{PEG}_{44}\text{-}b\text{-PBC}_x$. (B-D) Micrografías de TEM de los ensamblados.

El tamaño y la morfología mostraron diferencias al variar la longitud del bloque hidrofóbico. Los bloques de PBC de peso molecular 4,323 y 10,218 g/mol formaron nanopartículas esféricas (Figura 4.23 B y C). Mientras que para el bloque más largo de PBC de 16,506 g/mol se observan posiblemente la formación de vesículas mediante TEM (Figura 4.23 D). Otra posible referencia es la CMC obtenido para el bloque de PBC₄₂ comparado con el otro bloque PBC₂₆, ya que se esperaría una menor CMC con lo se podría deducir que tal discrepancia se deba a las diferentes estructuras que se forman de nanopartículas a vesículas huecas.

El polímero mPEG₄₄-*b*-DPPBC₂₆ es el resultante de la desprotección del polímero mPEG₄₄-*b*-PPBC₂₆, el cual se hará referencia más adelante. Los resultados de distribución de tamaños y morfología después de la desprotección se presentan en la Figura 4.24. Claramente se aprecia un efecto considerable ya que, como se conoce, los grupos ácidos borónicos son más hidrofílicos los cuales desestabilizan la formación de las nanopartículas, originando así una mayor facilidad de penetración de agua en el centro de las partículas. La distribución mediante DLS presenta un comportamiento bimodal, con un 82.3% de nanopartículas con diámetro hidrodinámico de $D_h=25.33$ nm y 17.7% de partículas con $D_h=358.5$ nm, con una polidispersidad de 0.335. Con respecto al polímero antes de la desprotección la distribución es más estrecha, con $D_h=34.73$ nm y polidispersidad de 0.199. Después de la desprotección, se observan formas esféricas bien definidas de menor tamaño y partículas de mayor tamaño que poseen una capa difusa debida al mayor carácter hidrofílico de estos anfifilos. Otro dato a señalar es el aumento de la CMC después de la desprotección, que inicialmente fue de 1.45 $\mu\text{g/mL}$ a 3.64 $\mu\text{g/mL}$, con los que se podría reafirmar un aumento en la hidrofiliidad ya que explica que es necesaria una mayor cantidad para iniciar una formación micelar.

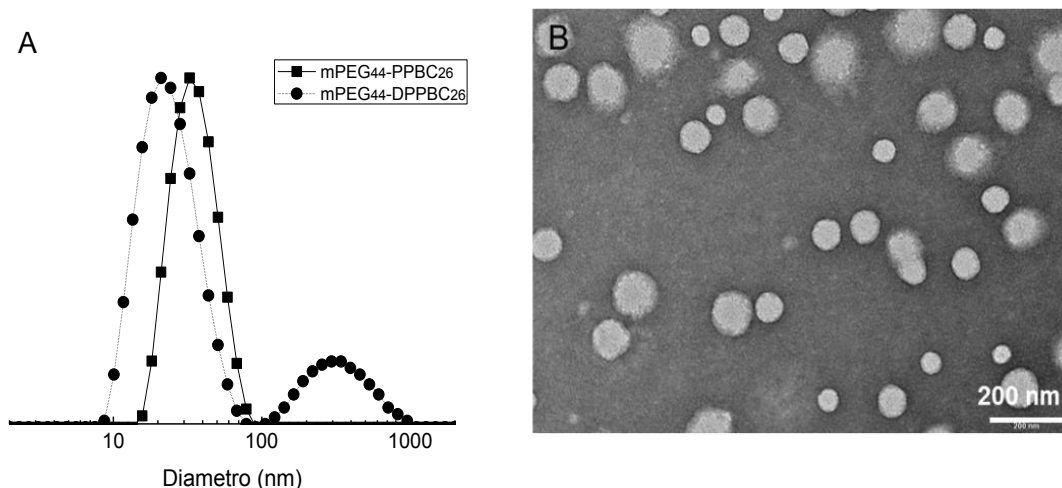


Figura 4.24 (A) Distribución de tamaños de las partículas antes y después de la remoción del grupo pinacol. (B) Micrografía de TEM de las nanopartículas con el polímero mPEG₄₄-*b*-DPPBC₂₆.

Un análisis realizado para corroborar los grupos borónicos colgantes existentes en el bloque del policarbonato, fue mediante la esterificación de rojo de alizarina, la cual esta molécula posee un grupo 1,2-cis-diol (Figura 4.25). Esta molécula fluoresce cuando se encuentra enlazado químicamente a un grupo borónico. En la Figura 4.26 se presenta el espectro de fluorescencia de rojo de alizarina, observándose una máxima intensidad a 550 nm. Cabe señalar que rojo de alizarina libre no fluoresce, solamente se logró detectar esta alta intensidad solubilizando la molécula dentro del centro hidrofóbico enlazada covalentemente⁷⁰. Mediante esta técnica, se puede fundamentar la aplicación futura en el campo biomédico de estos materiales para encapsular moléculas terapéuticas o de contraste.

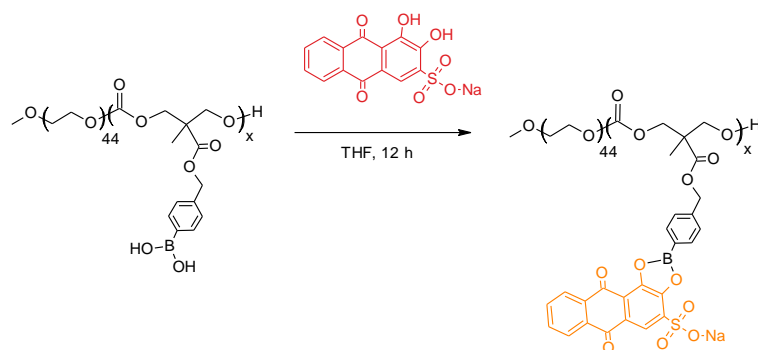


Figura 4.25 Conjugación de rojo de alizarina (ARS) en el polímero.

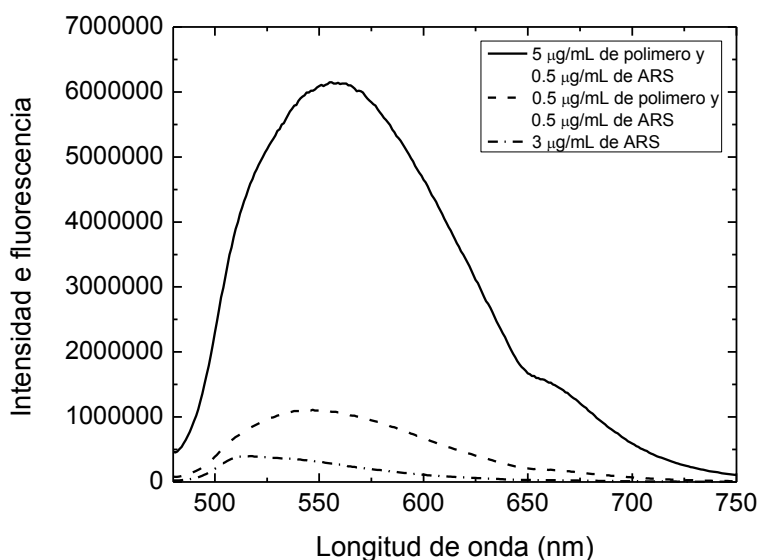


Figura 4.26 Espectro de fluorescencia de rojo de alizarina conjugada a las nanopartículas de mPEG₄₄-*b*-DPPBC₂₆.

En esta parte del trabajo se puede concluir, que el uso de ácidos borónicos en aplicaciones biomédicas requiere el desarrollo de nuevos métodos para la funcionalización de polímeros biológicamente relevantes. En esta investigación, se consiguió una polimerización controlada, variando la relación monómero a iniciador (M/I). Se obtuvieron conversiones relativamente altas de 70% en las 1.5 h de reacción, con una conversión máxima de 86% a 7 h. Para esta nueva clase de policarbonatos, el grupo protector define las condiciones de postmodificación, ya que pueden ser solamente variando el pH o con reacciones de desplazamiento, logrando mantener intacta la arquitectura del polímero. Otra observación es que dependiendo del peso molecular del bloque de policarbonato se pueden modular también la morfología de los ensamblados, partiendo de nanopartículas para Mn=11,782 a vesículas para Mn=17,800, con una distribución homogénea en ambos casos. Estos ensamblados poliméricos pueden conducir a una aplicación directa para encapsular diversos fármacos, proteínas o simplemente solubilizar nuevos agentes de contrastes con grupos afines a estos materiales.

4.3 Nanopartículas de policarbonatos para la liberación controlada

Capecitabina es un agente quimioterapéutico oralmente administrado en el tratamiento de cáncer de mama metastásico, gástrico, colorectal y tumores sólidos⁷¹. Se encuentra comercialmente disponible como Xeloda®. Después de ser

administrada, este profármaco es convertido en 5-fluorouracilo (5-FU) en el hígado y en el tumor, por una ruta enzimática de 3 etapas con metabolitos intermediarios. El tiempo de vida media es de aproximadamente 45 a 60 min (Figura 4.27). El 95.5% de ellos son excretados en la orina, detectándose una purificación de 5-FU en el plasma de 6 h. Debido a la alta dosis de 2.5 g/m², existen efectos adversos asociados con CAPE incluyendo cardiotoxicidad, diarrea, náuseas y vómito, estomatitis y dermatitis⁷². Las nanopartículas poliméricas pueden ser utilizadas para mejorar la liberación, el cual proveería una mayor actividad en vivo, además de que podría disminuir los efectos secundarios. Existen pocos trabajos relacionados con la encapsulación de este profármaco. Capecitabina es altamente soluble en agua y posee una alta actividad anticancerígena. Un adecuado sistema acarreador para esta molécula, podría ser desarrollado mediante cierta funcionalidad en el polímero para así conjugar el profármaco, evitar la rápida difusión y llegar al sitio objetivo.

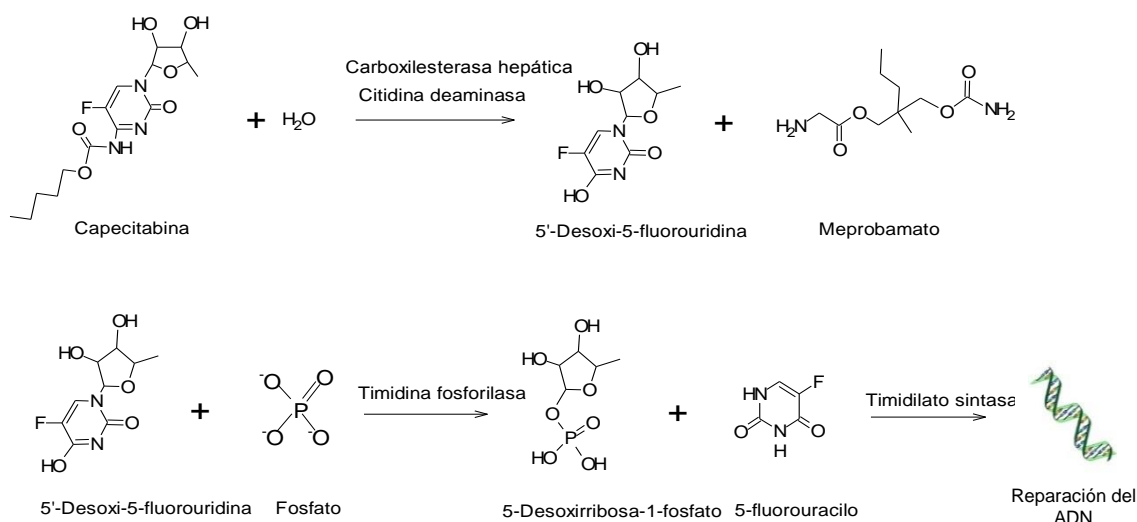


Figura 4.27 Esquema de reacción de la molécula activa 5-fluorouracilo a partir de CAPE.

Una ventaja de la formación de ésteres boronatos cíclicos de 5 y 6 miembros es la reversibilidad química, produciendo consecuentemente sistemas sensibles al pH, a agentes oxidantes y azúcares, estas propiedades dependen del pKa y constantes de enlace del ácido fenil borónico y alcoholes⁷³. Para el caso de sistema sensible al pH, el equilibrio de la reacción puede ser cambiado a menores pH para especies éster borónico en forma trigonal cargadas negativamente a otras especies éster boronato en una disposición geométrica tetraedral a pH arriba del pKa. Tomando en cuenta este mecanismo la constante de enlace puede ser calculada usando el

método Benesi-Hildebrand. Esto se consigue registrando el cambio drástico de la intensidad de fluorescencia del colorante rojo de alizarina, lo cual indica el boro acomplexado.

Esta parte de la presente tesis consiste en la viabilidad que pueden tener estos policarbonatos funcionales como vehículos para moléculas terapéuticas⁷⁴. Donde se describe la incorporación física y química del profármaco capecitabina, preparación de las nanopartículas y la biocompatibilidad explorada en células cancerígenas.

4.3.1 Conjugación del fármaco capecitabina

Los policarbonatos con grupos funcionales colgantes pueden ser fácilmente sintetizados además de ser atractivos en el campo biomédico, estos pueden ser usados para cambiar sus propiedades o atacar otras moléculas funcionales. Capecitabina es un profármaco, conocido en el mercado como Xeloda[®], la cual fue elegida como el fármaco modelo debido a su marcada actividad anticancerígena, terapéuticamente CAPE puede ser combinada con doxorubicina en tratamientos más agresivos. La funcionalidad de sus cis-dioles puede ser usado para establecer un enlace covalente dinámico con grupos ácidos borónicos. En la Figura 4.28, se presenta la ruta para la preparación de estos conjugados, siendo este procedimiento directo y sencillo.

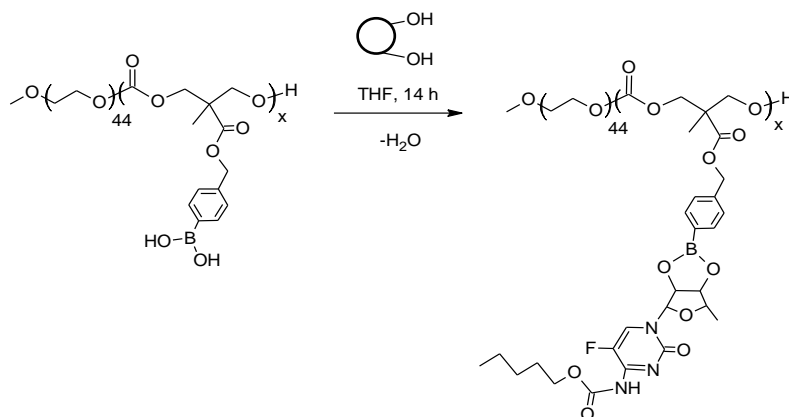


Figura 4.28 Ruta de preparación conjugados de policarbonatos derivados de PBC y CAPE.

La síntesis del copolímero de PBC fue fácilmente lograda mediante la polimerización por apertura de anillo como se explicó en la sección 4.2. Como se muestra en la Figura 4.29, se presenta el espectro de RMN ¹H, CAPE fue injertada

en el policarbonato de PBC a través de la reacción de esterificación usando la funcionalidad cis-diol. La reacción fue llevada a cabo en condiciones anhidras y el avance de injerto pudo ser controlado por la cantidad de CAPE adicionada. Por ejemplo, 1.5 equivalentes de CAPE a ácido borónico disponible resultó en 75% de eficiencia del injerto, mientras para 3 equivalentes de CAPE a ácido borónico, permitió alcanzar el 100% de injerto. La purificación se realizó mediante diálisis, las muestras fueron caracterizadas por resonancia magnética y GPC. Para determinar la eficiencia del injerto, se calculó el área de las señales de los protones -CH (señal i) de CAPE a 4.79 ppm y los protones -CH del bencilideno del grupo colgante a 7.70 ppm (señal h). El cromatograma de GPC de CAPE injertada del copolímero presentó un comportamiento monomodal y un claro cambio hacia menores tiempos de elución comparado con el copolímero en bloque protegido PEG₄₄-*b*-PBC₂₆ (Figura B1). El copolímero en bloque tuvo 20 moles de CAPE injertada el cual corresponde al 55% en peso del peso total.

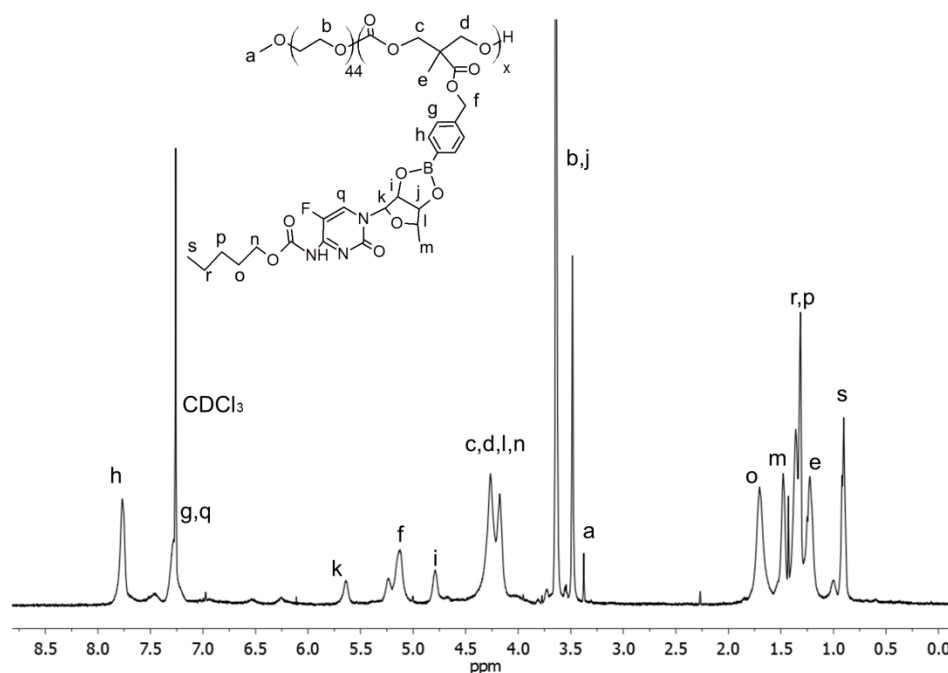


Figura 4.29 Espectro de RMN ¹H de CAPE injertada en PBC.

4.3.2 Formación de las nanopartículas con capecitabina

En este estudio, la formación de los ensamblados fue realizado por nanoprecipitación súbita. Para encontrar las condiciones adecuadas de autoensamblaje, primero se determinó la concentración micelar crítica. Los valores

de CMC se encontraron entre 1.20-3.60 $\mu\text{g/mL}$, el cual corresponde a valores en el orden de 10^{-7} M. Por otro lado, CAPE es altamente soluble en agua (25 mg/mL), los agregados formados del copolímero anfifílico mPEG₄₄-*b*-DPBC₂₈-*g*-CAPE exhibió un valor similar de CMC para el polímero desprotegido mPEG₄₄-*b*-DPPBC₂₆ de 3.69 $\mu\text{g/mL}$. La estabilidad de los agregados podría deberse a la interacción de puentes de hidrógeno entre grupos carbonilos del fármaco (carbonilos adyacentes) en el esqueleto del policarbonato y los grupos aminos secundarios del fármaco (Figura 4.28).

Tabla 4.8 Propiedades fisicoquímicas de los polímeros y nanopartículas.

Polímero	Mn ^a	CMC ^b ($\mu\text{g/mL}$)	Dh(nm) [dispersidad] ^c	Potencial Zeta (mV)	EE %	LC %
mPEG ₄₄ - <i>b</i> -PPBC ₂₆	10,212	1.45	34.73 [0.199]	-39.7 \pm 4.1		
mPEG ₄₄ - <i>b</i> -DPBC ₂₆	6,420	3.64	25.68 [0.335]	-51.5 \pm 6.1		
mPEG ₄₄ - <i>b</i> -CAPEDPBC ₂₆	12,968	3.69	21.24 [0.150]	-17.5 \pm 3.7	64.3 ^a	25 ^d
mPEG ₄₄ - <i>b</i> -DPBC ₂₆ - <i>e</i> -CAPE			34.09 [0.095]	-7.8 \pm 6.2	27.5 ^d	21.5 ^d

^aEstimado de RMN ¹H. ^bCalculado por fluorescencia. ^cDeterminado por DLS. ^dEstimado por espectroscopia Uv-Vis. Una curva de calibración fue generada para medir la absorbancia de capecitabina en función de la concentración.

El autoensamblaje del polímero injertado se llevó mediante un cambio rápido en la calidad del disolvente usando el equipo MIVM. La concentración del anfifilo se mantuvo igual que en las secciones anteriores, de 5 mg/mL en la fase orgánica (THF), mientras que la relación de mezclado del disolvente fue de 1:9 ($V_{\text{THF}}/V_{\text{agua}}$) resultando en suspensiones de 0.5% en peso. Finalmente, la eliminación del disolvente THF se realizó usando el método de diálisis. Se caracterizó la distribución de tamaños y morfología (Figura 4.30), así como también se calculó la eficiencia de encapsulamiento y capacidad de carga (Tabla 4.8). Los análisis de DLS mostraron que los agregados con CAPE tienen un tamaño de diámetro hidrodinámico promedio de 35 nm, por TEM se observaron nanopartículas esféricas y uniformes, mientras que antes del injerto los agregados mostraron una distribución bimodal. Con respecto a los valores del potencial zeta, mPEG₄₄-*b*-DPPBC₂₆ presentó un valor más negativo de -51 mV comparado con el polímero injertado de -39 mV.

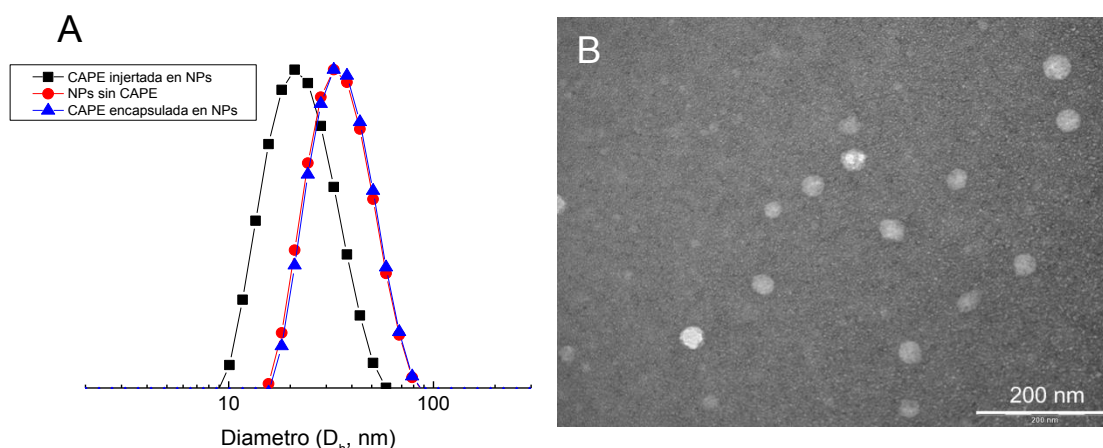


Figura 4.30 (A) Distribución de diámetros de las partículas antes y después de conjugación de CAPE. (B) Micrografía de TEM de las nanopartículas con CAPE conjugada.

4.3.3 Estudio competitivo con rojo de alizarina

En las Figuras 4.31 y 4.33 se presenta el ensayo competitivo reportado en la literatura, el cual ha sido usado para calcular las constantes de afinidad de ácidos borónicos^{75,76}. Este estudio fue realizado en 0.01 M buffer fosfato salino a 3 distintos pHs a 25°C, usando una concentración constante de 9×10^{-6} M de ARS y variando la concentración de CAPE. Primeramente, se llevó a cabo el estudio competitivo entre ARS y ácido 4-hidroxifenilborónico (Figura 4.31).

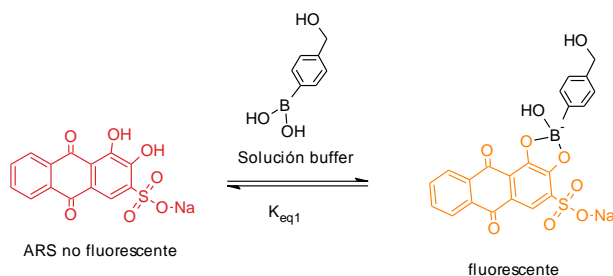


Figura 4.31 Ensayo competitivo entre ARS y ácido 4-hidroxifenilborónico.

En la Figura 4.32 A, se observa que la formación del éster boronato promueve un aumento en la intensidad de fluorescencia de ARS, mostrando también una

dependencia de la fluorescencia con el pH. Con el uso del método Benesi-Hilderbrand, se puede obtener las gráficas lineales con las cuales se pueden calcular las constantes de equilibrio. En la Figura 4.32 B se graficó el efecto del pH durante la reacción de esterificación, a partir de ésta gráfica se calculó la constante de equilibrio. Resultando a un pH 7.5 el valor de K_{eq1} fue 3500 M^{-1} mientras que para pH 6.5 fue de 500 M^{-1} y a pH 5.5 resultó ser 200 M^{-1} , probando la reversibilidad del éster boronato a ácido borónico en pH ácidos.

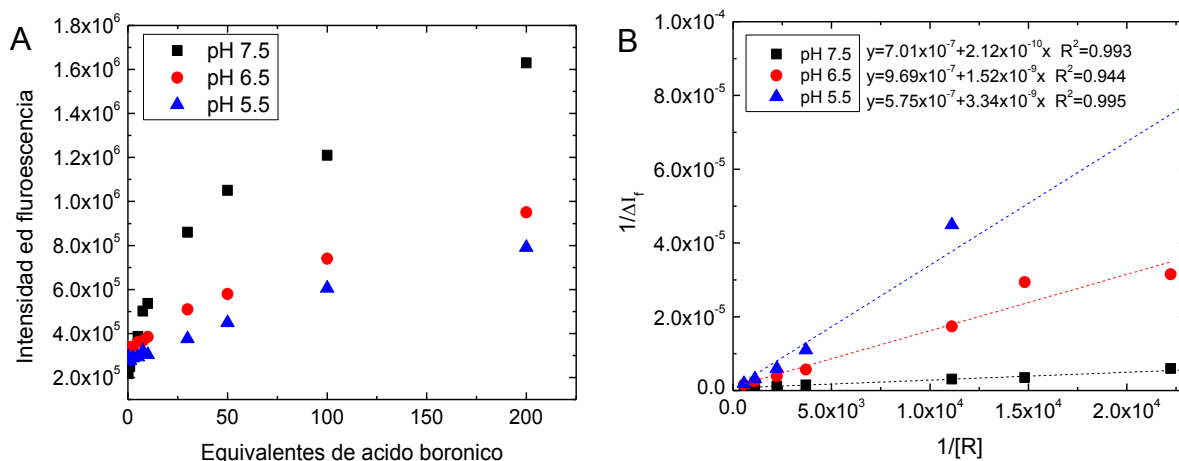


Figura 4.32 (A) Intensidad de fluorescencia a un máximo de emisión de 578 nm de ARS a $9 \times 10^{-6} \text{ M}$, en un rango de concentración de ácido borónico de $2.23 \times 10^{-6} \text{ M}$ a $1.8 \times 10^{-6} \text{ M}$. (B) Datos de correlación lineal obtenidos de la ecuación Benesi-Hilderbrand. Datos registrados en PBS 0.01M

El estudio competitivo con ácido 4-hidroxifenilborónico, ARS y CAPE fueron llevados a cabo por un método similar. De acuerdo a las constantes de equilibrio obtenidas, se estudió la constante del segundo equilibrio entre los 3 compuestos. A partir de las gráficas de la Figura 4.34, se determinaron los valores para la afinidad de enlace. Los cuales resultaron ser 500 M^{-1} a pH 7.5, 26.7 M^{-1} para pH 6.5 y finalmente para pH 5.5 fue de 11.1 M^{-1} . Estos estudios nos indica el pH apropiado para una conjugación eficiente y una liberación controlada. Se concluye que a pH 7.5 existe una mayor afinidad del profármaco.

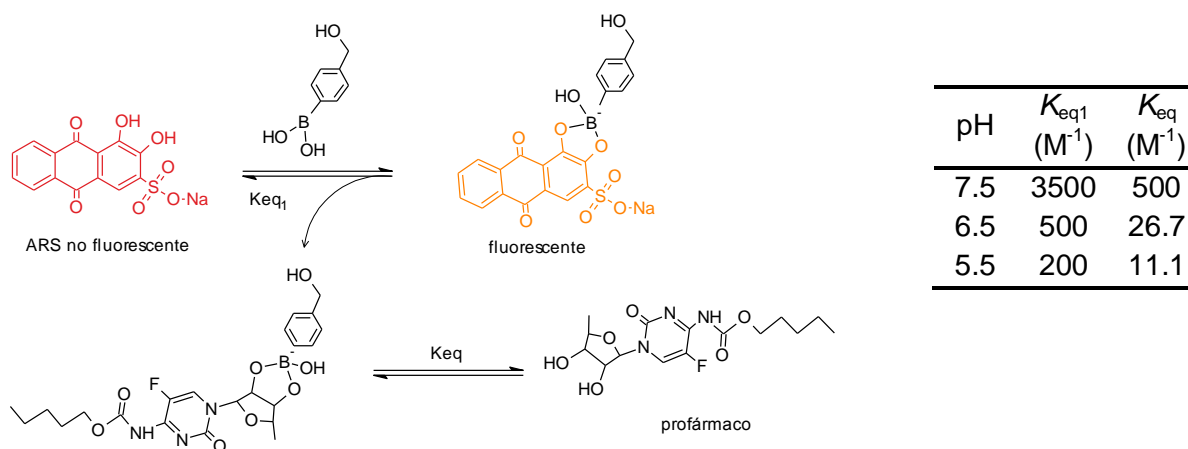


Figura 4.33 Ensayo competitivo de Wang de ácido borónico con CAPE usando rojo de alizarina y los valores de las constantes de afinidad variando el pH.

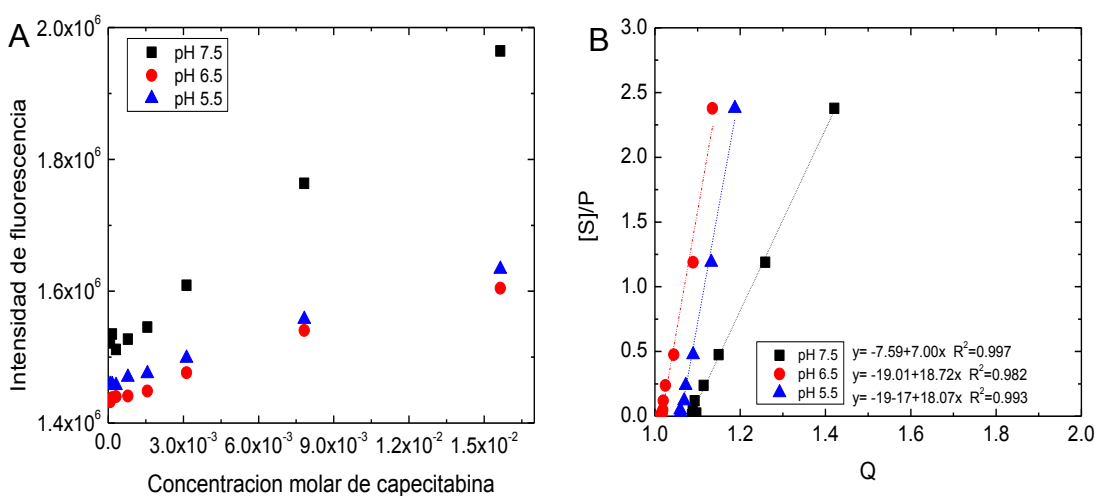


Figura 4.34 Intensidad de fluorescencia de ARS [9×10^{-6} M] a un máximo de emisión de 578 nm, para 3 componentes. (B) Datos de correlación lineal obtenidos de la ecuación Benesi-Hilderbrand, variando el pH. Todas las mediciones fueron registrados en PBS 0.01M.

4.3.4 Estudio de la liberación in vitro

El perfil de la liberación in vitro de las nanopartículas de mPEG₄₄-b-BPC₂₆ con el fármaco injertado se investigó bajo 3 diferentes pH. Estos valores fueron elegidos debido a importantes razones: i) el ambiente fisiológico normal tiene pH 7.4, ii) el

ambiente extracelular de tumor es de pH 6.5, iii) los compartimentos endosomales poseen un pH 5.5^{64,77,78}. Por otro lado, para probar una mejor liberación controlada, se encapsuló CAPE y se formaron partículas de diámetro de 34 nm con distribución estrecha de 0.095. Sin embargo, debido al carácter hidrofílico de CAPE, la eficiencia de encapsulamiento resultó ser 27.5% y la capacidad de carga de 21%. De acuerdo con estos resultados, la eficiencia de encapsulamiento es menor en el atrapamiento físico (Tabla 4.8). El porcentaje de liberación acumulativa de CAPE fue resultado de la suma de cada tiempo específico dividido entre la cantidad de CAPE cargada en la nanopartícula. En la Figura 4.35 A, se nota que a pH 7.4 aproximadamente el 15% de CAPE fue liberada de las nanopartículas dentro de 24 h de incubación, sugiriendo que las nanopartículas presentan una buena estabilidad a pH fisiológico. En la Figura 4.35 B, se presentan las suspensiones de las nanopartículas con el prófarma conjugado al polímero, comprobándose después de 24 h de incubación a pH 7.5 (PBS) resultaron ser más estables y a pH 5.5 (PBS) son más inestables formando agregados macroscópicos.

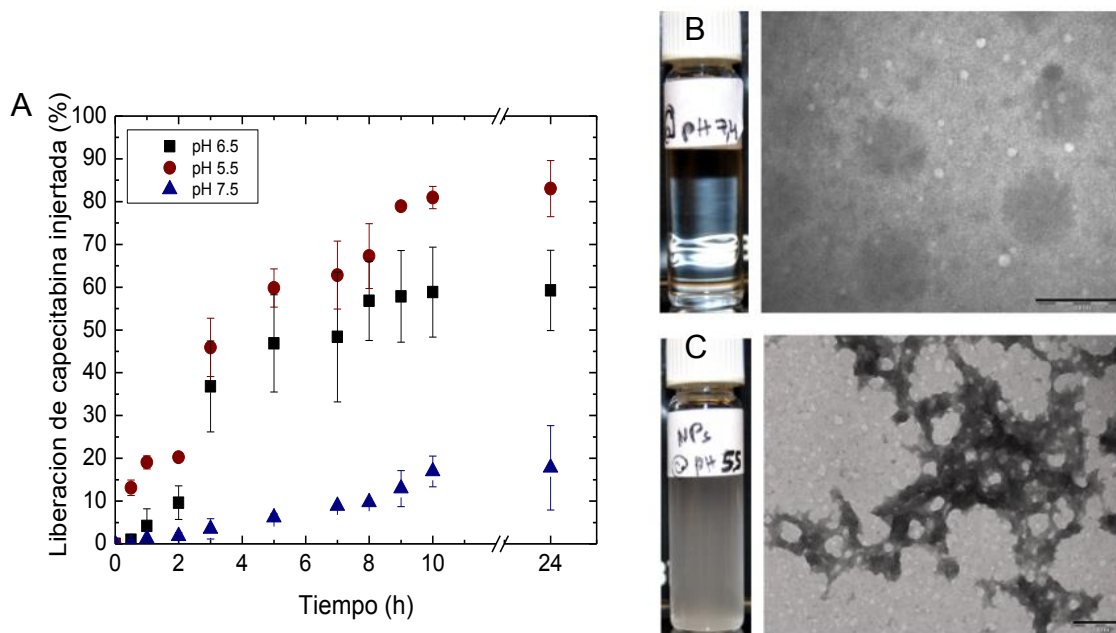


Figura 4.35 Perfil de liberación in vitro de CAPE, (A) injertada en mPEG₄₄-b-DPPBC₂₆. (B) Suspensión de nanopartículas a pH 7.5 y (C) pH 5.5, después de 24 h de incubación, para cada muestra se presenta su micrografía de TEM (escala de la barra=200nm).

En la Figura 4.36, la liberación fue del 80% para CAPE encapsulada en el mismo periodo de tiempo 24 h, debida a la rápida difusión. Cabe notar, que las

nanopartículas con CAPE encapsulada son más inestables en buffer fosfato salino, resultando en agregados macroscópicos en menos de 30 min, siendo estas inapropiadas para su aplicación en la liberación de fármacos. A pH 6.5 casi el 55% de CAPE injertada fue liberada, mientras que a pH 5.5 un 85% fue liberado a 24 horas. En este caso, durante el proceso de liberación se observaron agregados macroscópicos a 30 minutos aproximadamente.

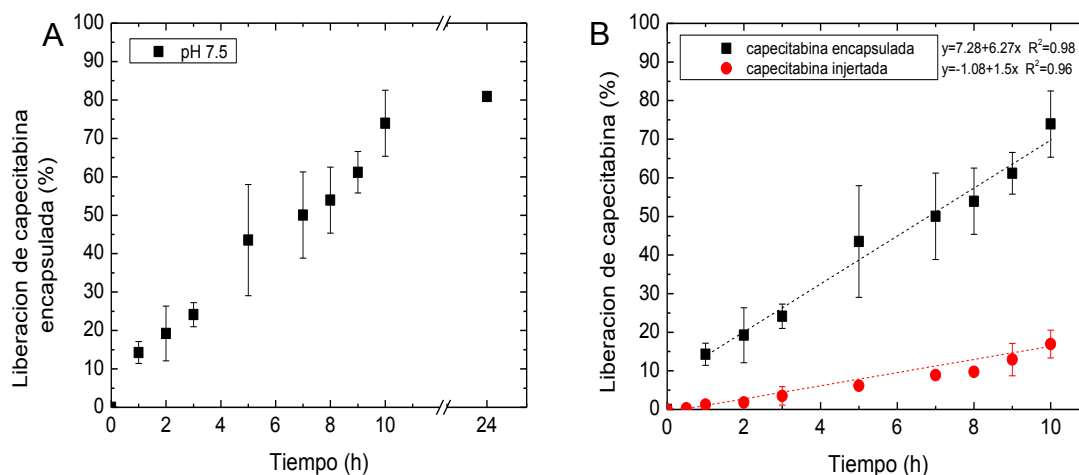


Figura 4.36 Liberación de CAPE encapsulada a pH 7.5. Las nanopartículas fueron incubadas a 37°C en buffer fosfato salino (PBS 10 mM). Los experimentos fueron hechos por triplicados.

4.3.5 Captación celular

La internalización y captación de las nanopartículas fueron demostradas, como se puede observar en las Figuras 4.37 a 4.39. Para este estudio se usó la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231. Cumarina-6 fue usada para las mediciones de fluorescencia y así conocer la distribución celular. Un color verde intenso fue observado bajo microscopía de fluorescencia^{79,80}. Después de 30 min de incubación, la internalización fue efectiva en la mayoría de las células, pero algunas nanopartículas todavía permanecían en el citoplasma.

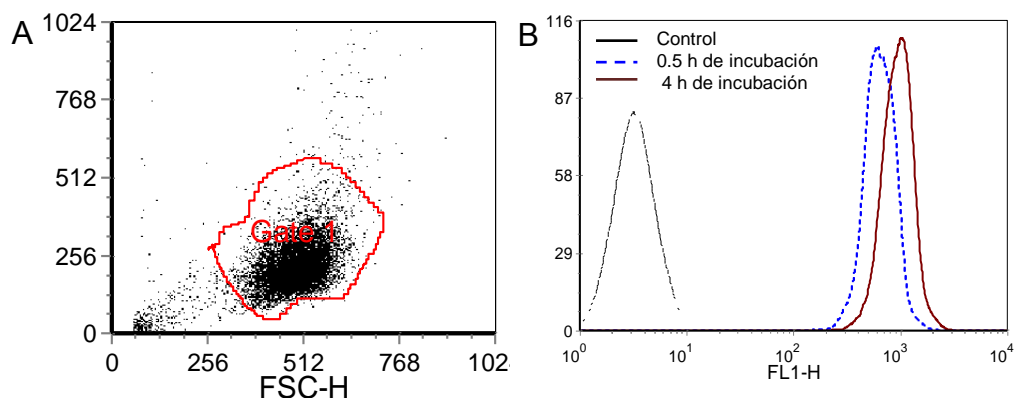


Figura 4.37 Perfiles de citometría en flujo en células MDA-MB-23 que fueron incubadas con cumarina-6 encapsulada.

En la Figura 4.38, se presentan los histogramas asociados a la intensidad de fluorescencia dentro de las células. Este estudio nos sirve para conocer cuantitativamente la captación celular de las nanopartículas. De acuerdo a lo observado, la intensidad de fluorescencia fue aumentando gradualmente con el tiempo, de 15 min a 4 h la intensidad fue aumentada un 40%. Las nanopartículas basadas en policarbonato muestran una internalización rápida, esto puede ser debido a que el diámetro de las nanopartículas fue de 21 nm, por lo tanto, el tamaño es muy importante debido a que la internalización en las células fue relativamente rápida.

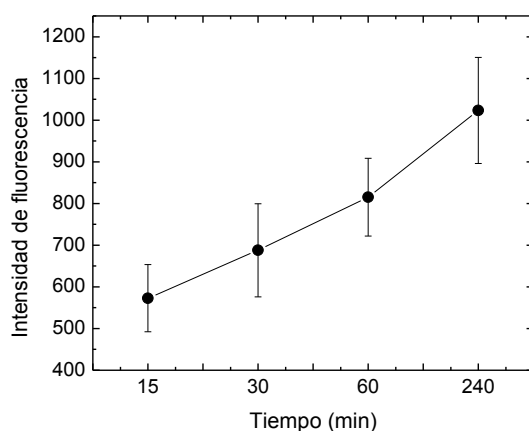


Figura 4.38 Fluorescencia de cumarina-6 encapsulado dentro de las células.

Los imágenes de microscopía de fluorescencia presentadas en la Figura 4.39, sugieren que las nanopartículas mPEG₄₄-b-PPBC₂₆ cargadas podrían ser

internalizadas a través de endocitosis, entonces las moléculas de cumarina-6 son liberadas y difundidas a través de los compartimentos endocíticos (endosomas y lisosomas) al núcleo. Asimismo, partículas de mPEG₄₄-b-CAPEDPBC₂₆ podrían ser capaces de encapsular coumarina-6, ya que el valor de solubilidad calculado entre (cumarina-6) C6 y CAPE-DPBC es de $\Delta_{C6-CAPEDPBC}=2.11$, en donde valores $\Delta < 5$ indican buena solubilidad entre solutos. A partir de estos datos, se podría acentuar la eficacia de estos sistemas acarreadores para C6.

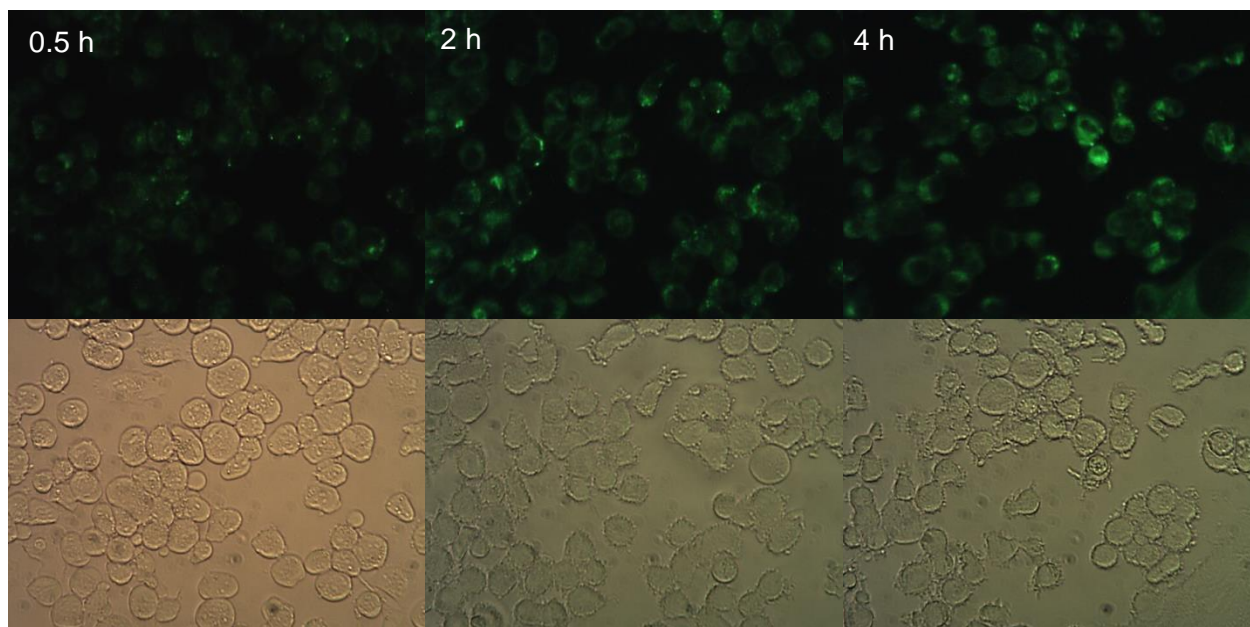


Figura 4.39 Micrografía de fluorescencia de las células MDA-MB-231 con cumarina-6 encapsulada a diferentes tiempo de incubación.

4.3.6 Citotoxicidad

Se investigó la citotoxicidad de las nanopartículas sin CAPE, CAPE libre y conjugada al polímero en células de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7 (Figura 4.40). El polímero exhibió menor toxicidad en ambas líneas celulares. CAPE libre y CAPE-PPBC exhibieron iguales toxicidades a concentraciones de 10, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$, sin embargo se observaron todavía el 40% de células vivas después de 48 horas de incubación, esto se podría atribuir a la falta de acción enzimática para convertirla en la molécula activa 5-FU. En la línea celular MDA-MB-231 se observó una toxicidad de aproximadamente 10% a 48 h y 72 h de incubación, para una concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$. En la línea celular MCF-7, el polímero no presentó toxicidad significativa a 48 h de incubación. Para la línea celular MDA-MB-231 con

10 $\mu\text{g/mL}$ de CAPE-PPBC se presentan los máximos efectos anticancerígenos de CAPE sin sufrir efectos secundarios provenientes del polímero. Demostrándose así una efectividad para la liberación y baja toxicidad de estos sistemas poliméricos.

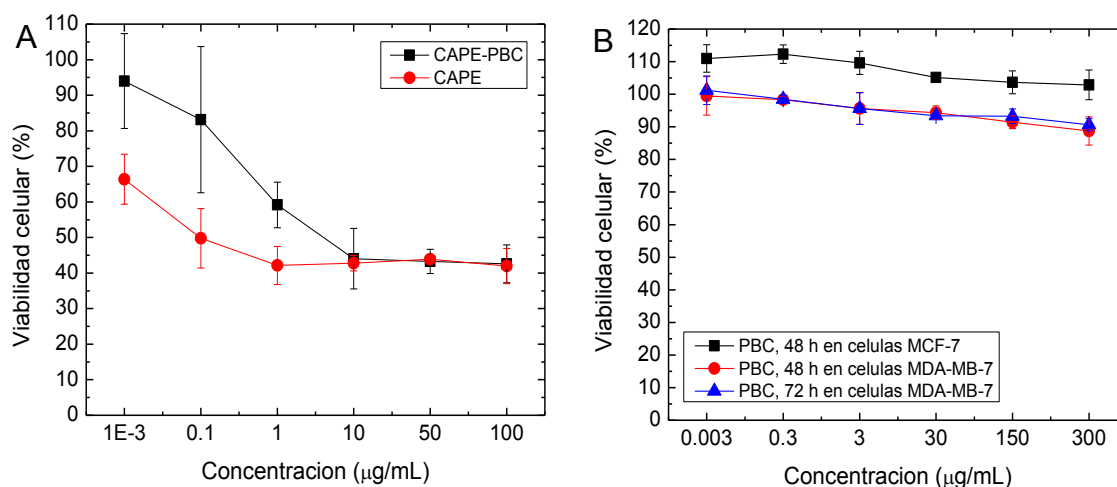


Figura 4.40 Citotoxicidad in vitro determinado por WST-1, en 48 h de incubación con (A) CAPE libre como blanco, CAPE injertada en nanopartículas y (B) nanopartículas poliméricas. Media \pm SD (n=6).

De acuerdo a los resultados se considera que la liberación es estrechamente dependiente del pH, debido a la labilidad del enlace covalente dinámico del éster boronato bajo condiciones ácidas. Se realizó una prueba presentada en la literatura por Wang⁶² para cuantificar la afinidad de enlace de CAPE para el grupo funcional ácido borónico. La constante de enlace fue determinada a pH 7.5, 6.5 y 5.5, los cuales se usaron para los estudios de liberación. La constante de asociación pK_a del ácido borónico fue obtenida midiendo la disminución en la intensidad de fluorescencia del complejo PBA-ARS, obtenido del reemplazamiento de ARS enlazada a moléculas de PBA por CAPE. Como se esperaba, CAPE se enlaza con mayor afinidad al ácido borónico a pH fisiológico. En contraste, la afinidad del enlace de CAPE a PBA es drásticamente reducida al disminuir el pH a 5.5, su constante de afinidad calculada fue de 45 veces menor que a pH 7.5, por lo tanto, la rápida liberación de CAPE bajo ambiente ácido es debido a la más rápida escisión del fármaco injertado. El material polimérico no presentó una toxicidad considerable a concentraciones $\leq 0.3 \mu\text{g/mL}$, además de que la internalización celular fue en aproximadamente 30 minutos.

4.4 Nanopartículas entrecruzadas de poli(éster carbonato)

Las partículas entrecruzadas son interesantes y han sido estudiadas en el campo biomédico como transportadores. Sin embargo, una propiedad muy importante es su estabilidad de permanecer íntegra antes de llegar a un órgano en específico. Las partículas entrecruzadas, son preferidas debido al largo tiempo de circulación que puedan presentar. Estas nanopartículas se pueden estimular con diferentes factores fisiológicos, tales como el cambio en el pH, temperatura, sacáridos y especies oxidantes^{81,82}. En otros trabajos se ha demostrado que la incorporación de grupos borónicos responde a cambios de pH, las cuales se han probado en la liberación de insulina y en el reconocimiento de glucosa^{83,84}. Los polímeros biodegradables y biocompatibles tales como policarbonatos con grupos borónicos no han sido ampliamente estudiados. Se conoce de la literatura que los ácidos borónicos con 1,2 y 1,3-dioles forman ésteres boronatos en disolventes orgánicos y medio acuoso⁸⁵. Esta reacción es conocida por ser reversible, por lo tanto se puede inducir la disociación de estos ésteres vía intercambio competitivo de sacáridos^{64,65,86}. Los ácidos borónicos también han funcionados en el campo de los polímeros en autoensamblajes supramoleculares, formando de ésteres boronatos cíclicos de 5 y 6 miembros⁸⁷.

4.4.1 Reacción de injerto

Se exploraron diferentes condiciones de reacción de injerto en el polímero mPEG-*b*-P(HPTO-*co*-LA) con la molécula DBA (Figura 4.41). La eficiencia se determinó mediante RMN ¹H, alcanzándose un máximo del 50%. En condiciones completamente anhidras se detectó físicamente un entrecruzamiento del polímero, ya que su solubilidad disminuyó drásticamente en disolventes orgánicos.

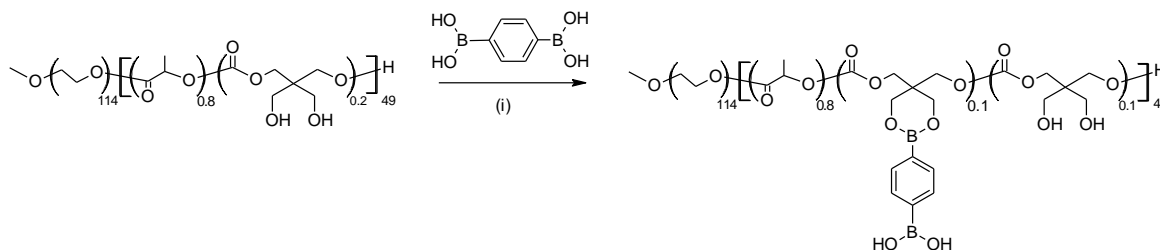


Figura 4.41 Reacción de injerto de DBA en mPEG-*b*-P(HPTO-*co*-LA), (i) reacción de esterificación a 25 °C en THF.

La eficiencia del 50% origina la exposición de dioles libres capaces de poderse conjugar con los ácidos borónicos. En la Tabla 4.9 se presentan las condiciones exploradas para la formación de ésteres boronato. De la condición 4 de la Tabla 4.9, usando como metanol como disolvente, se formaron vesículas de las cuales se alcanza a observar entrecruzamiento en la membrana, para la micrografía de la Figura D1 el material fue ensamblado a un número de Reynolds de 7,781 y para la Figura D2 fue de 648. Bajo estos 2 diferentes valores de No. de Reynolds, el tamaño varió significativamente de ~200 nm a 1 μ m.

Tabla 4.9 Preparación de los polímeros injertados⁸⁸.

	Polímero	T(°C)	Tiempo (h)	Relación molar diol:DBA	Eficiencia de injerto (%) ^a
1	THF	50	2	1:0.4	40
2	THF	50	2	1:4	40
3	THF	25	24	1:4	50
4	MeOH	25	48	1:2	50
5	MeOH	50	2	1:4	40
6	MeOH	25	2	1:0.5	40

^aLa eficiencia de DBA conjugado fue estimado mediante RMN ¹H.

La desprotección del polímero mPEG-*b*-P(PTO-*co*-LA) permitió la instalación de ácido diborónico 1,4-bencénico (DBA), el cual funciona como agente de entrecruzamiento⁸⁹. El valor de la CMC se presenta en la Figura E11 y Tabla 4.10, detectándose una disminución de la CMC después de la remoción del grupo bencilideno. Para los grupos hidroxilos colgantes la CMC cambia de 14.4 μ /mL a 9.0 μ /mL para los grupos borónicos. El cual es razonable de acuerdo a la disminución de la polaridad final del bloque hidrofóbico.

Los diámetros hidrodinámicos de las nanopartículas formadas a partir de estos copolímeros fueron analizados mediante DLS, conservándose aproximadamente el mismo diámetro entre ellas de 26 nm con dispersidades estrechas de 0.15. El potencial zeta disminuyó drásticamente de -9.96 a -24,7 mV, indicando esto que la repulsión electrostática entre las partículas con ácidos borónicos provocó una mejor estabilización entre ellas.

Tabla 4.10 Propiedades de los copolímeros anfifílicos.

Polímero	M _n ^a	M _n ^b	M _w ^b	IPD ^b	CMC (μg/mL)	D _h [dispersidad] ^c	Potencial zeta (mV)
mPEG- <i>b</i> -P(PTO- <i>co</i> -LA)	9,615	11,998	12,938	1.07	2.9	23.17[0.129]	22
mPEG- <i>b</i> -P(HPTO- <i>co</i> -LA)	9,004	10,981	11,785	1.07	14.4	24.94[0.111]	-9.96
mPEG- <i>b</i> -P(BAHPTO- <i>co</i> -LA)	9,813	9,906	10,693	1.07	9.0	26.37[0.148]	-24.7

^aPeso molecular por RMN ¹H, referenciado por el metóxido de PEG (δ=3.35 ppm); ^bDeterminado por GPC; ^c Diámetro hidrodinámico determinado por DLS

En la Figura 4.42, se presenta el cromatograma de GPC derivado del polímero injertado usando las condiciones 3 de la Tabla 4.9, donde se visualiza un ligero desplazamiento a mayores pesos moleculares, no observándose ningún tipo de pico extra del cromatograma original. La polidispersidad se mantuvo estrecha de 1.07 y un Mn=9,906, con lo cual se podría sugerir la ausencia de algún entrecruzamiento de las cadenas poliméricas durante la reacción.

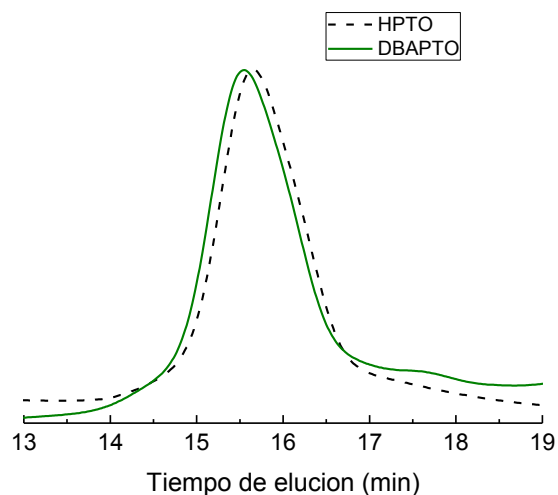


Figure 4.42 Cromatograma de GPC después del injerto de DBA.

Con el espectro de RMN ¹H se determinó la eficiencia de la reacción, además de comprobar la incorporación química del ácido diborónico, detectándose la señal correspondiente a los protones del grupo bencilo a 8.0-7.5 ppm.

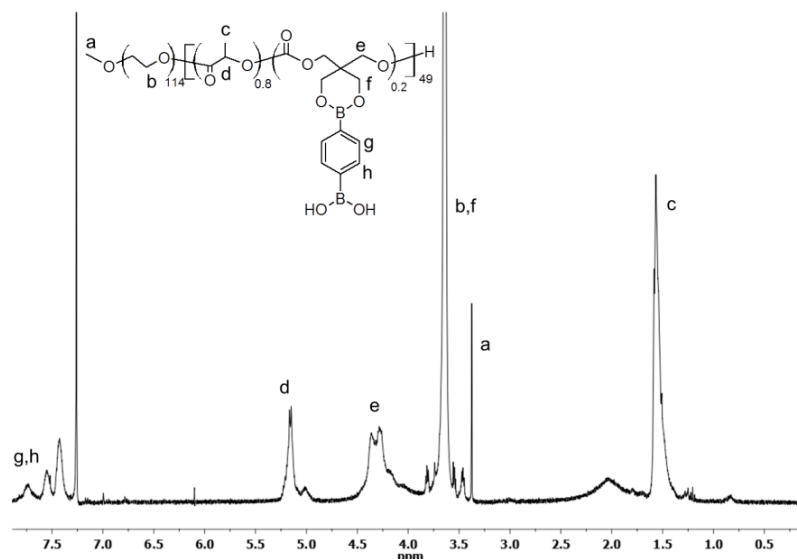


Figure 4.43 Espectro de RMN ^1H del polímero injertado con DBA.

4.4.2 Estabilidad de las partículas en medio orgánico

Para confirmar el centro hidrofóbico entrecruzado, se examinó diluyendo las suspensiones de nanopartículas en THF durante 30 min, monitoreando el cambio de diámetros mediante DLS. Para estas pruebas se utilizaron los 3 polímeros presentados en la Tabla 4.10, con fines de comparación de los centros hidrofóbicos. Las partículas derivadas de PTOLA mostraron una desintegración a macromoléculas aisladas (término en inglés “*unimers*”) a 1 min de dilución y durante los 30 minutos se notó un comportamiento constante (Figura 4.44). Las partículas con el centro hidrofóbico HPTOLA presentaron un incremento pronunciado en el diámetro de la partícula de 24.94 a 400 nm, con lo que se podría decir que existe un hinchamiento de la partícula o posiblemente agregación entre ellas. Quizá se deba a que existan puentes de hidrógeno en el centro hidrofóbico entre los grupos $-\text{OH}$ y $-\text{C}=\text{O}$. Para las partículas formadas de BAHPTO, se detectó un mayor incremento del diámetro de partícula de 26 nm hasta casi 550 nm, descartándose que se deba a hinchamiento ya que el diámetro incrementó 21 veces y en la literatura se ha reportado hinchamiento de hasta 7 veces del diámetro original⁹⁰.

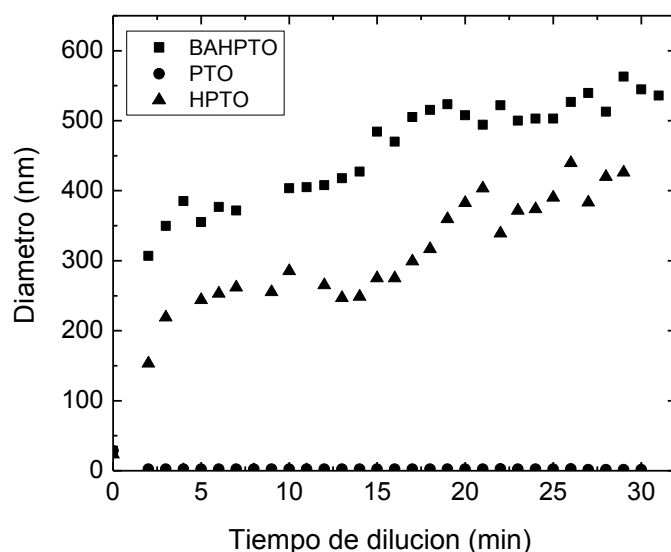


Figura 4.44 Monitoreo del cambio del diámetro por DLS en THF a 25°C. (A) mPEG-*b*-P(PTO-*co*-LA), (B) mPEG-*b*-P(HPTO-*co*-LA) y (C) mPEG-*b*-P(BAHPTO-*co*-LA).

En la Figura 4.45 se muestran las distribuciones de DLS de las nanopartículas. Partículas formadas de PTOLA disminuyeron su diámetro drásticamente de 23.17 nm, 3.3 nm y 0.73 nm para 100% agua, 80% THF y 60% THF respectivamente; indicando desintegración a “*unimers*”. Para el centro hidrofóbico HPTOLA, DLS indicó una interacción más fuerte, probablemente debido a la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos –OH y –C=O, esto se considera debido al cambio en diámetro de la partícula que fue de 24.94 nm a 338.1 nm para 60% de THF con una polidispersidad de 0.111 y 0.259, respectivamente. Cuando se exponen las partículas a 80% THF el D_h disminuye a 279.2 nm con una polidispersidad de 0.361.

La presencia de los grupos –OH dotaron a las partículas de cierta estabilidad, ya que el estudio con ésteres borónicos incorporados las partículas tardaron en desintegrarse en aproximadamente 40 min. El diámetro de estas partículas aumentaron de 26.37 nm a 338.1 nm y en 642.5 nm. Al parecer con 60% y 80% de THF, se podría considerar que no tan solo el excesivo incremento del diámetro se deba a un hinchamiento de las partículas, sino a la agregación entre ellas. Otra característica en este experimento es que todas las distribuciones de tamaño son monomodales. Además de que los ácidos borónicos forman enlaces covalente con dioles, resultando en ésteres borónicos. Estos también podrían formar puentes de hidrógeno del par enlazado O-H-O-B, dando un ensamble dimérico. Las

nanopartículas bajo el estímulo de disolventes orgánicos, en este caso THF, resultaron en agregados de mayores tamaños para BAHPTOLA.

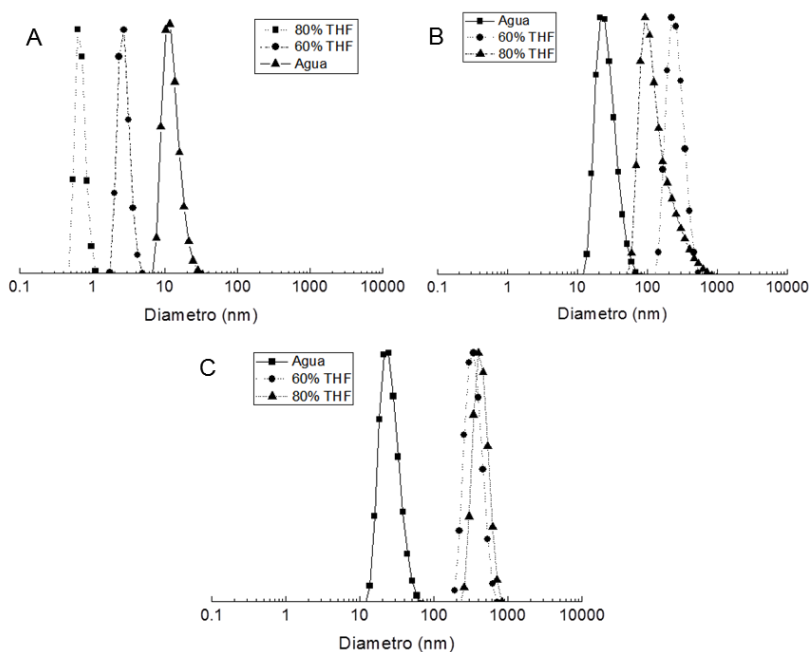


Figure 4.45 Distribuciones del D_h mediante DLS de las nanopartículas diluidas en THF. (A) PTOLA, (B) HPTOLA y (C) BAHPTO, todas las mediciones fueron a 25°C.

Para determinar la morfología de las partículas con grupos borónicos, se realizó TEM (Figura 4.46). En las micrografías se observa claramente una formación esférica de los anfifilos, bajo dilución en 80% de THF, se puede confirmar que existen formaciones todavía esféricas después de la dilución en medio orgánico, además también se encontraron agregados de las estructuras poliméricas. Sin embargo, a pesar de diluirlas en un mayor porcentaje en volumen del disolvente orgánico, permanecen todavía partículas con estructura ordenada de aproximadamente 150 nm. Un ejemplo reportado de partículas entrecruzadas, es que pueden aumentar hasta ~3 veces su tamaño original en 90% DMF para polímeros con peso molecular de entre 9,000 y 15,000⁹¹, descartándose con este hecho que pueda existir el hinchamiento de la nanopartícula.

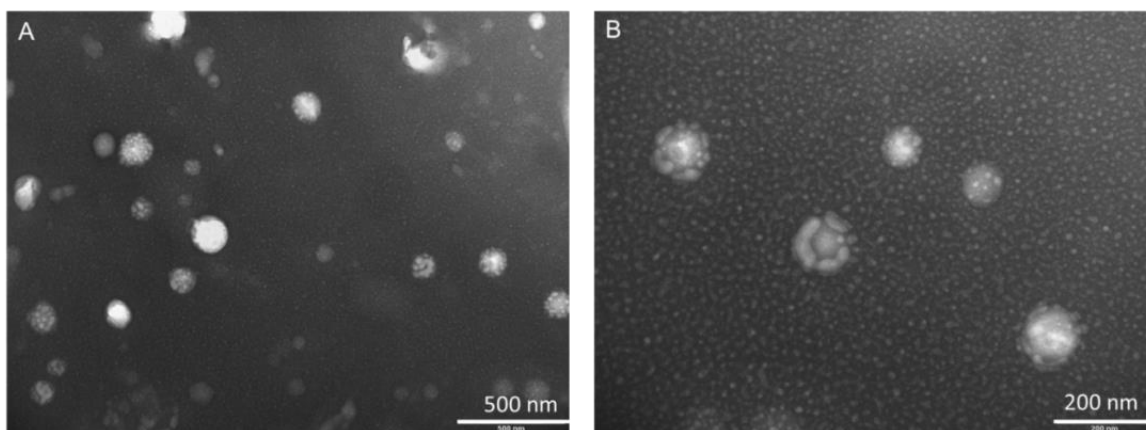


Figura 4.46 Micrografías de TEM de las partículas con ácidos borónicos en THF.

4.4.3 La estabilidad de las partículas en medio acuoso

La estabilidad de las nanopartículas fueron estudiadas en condiciones fisiológicas *in vitro*, esto fue realizado con el monitoreo del D_h mediante DLS. Se espera que las nanopartículas con el centro hidrofóbico conteniendo BAHPTOLA mantengan su estructura⁷⁰. Los resultados de este estudio demostraron que durante 60 horas de incubación la interacción intramolecular del éster boronato BAHPTOLA y los puentes de hidrógeno de HPTOLA, tuvieron la misma estabilidad en pH 5 a 37°C, es decir, el diámetro permaneció prácticamente igual < 30nm (Figura 4.47 A).

Los copolímeros con grupos colgantes bencilo formaron partículas menos estables, esto quiere decir que el efecto hidrofóbico no es suficiente para mantener la arquitectura de la partícula. Los agregados de HPTOLA y BAHPTOLA en buffer acetato fueron más estables comparada con PTOLA, el cual solo mantuvo su diámetro original a 1 h. El ácido diborónico 1,4-bencénico tiene una $pK_a=8.4$, después de la formación del éster boronato con dioles la pK_a disminuye. La probable explicación para la menor estabilidad de las nanopartículas BAHPTOLA en pH 7.4 que a pH 5, es que tiene una estructura planar triangular en condiciones ácidas y consecuentemente el carácter hidrofóbico aumenta. Cuando el pH se encuentra por arriba de su pK_a regresa a éster boronato, es decir a su forma tetraédrica más hidrofílica.

En el caso de la estabilidad de las nanopartículas que forman puentes de hidrógeno, a pH ácidos es más favorable la preservación del diámetro. Los polímeros no iónicos pueden ser influenciados por el efecto del pH, promoviendo la

formación de puentes de hidrógenos. Esto podría darse con la débil ionización en los grupos $-\text{OH}^{92}$. En efecto, la introducción de los grupos hidroxilo y éster boronato, generarían un mejor control en la liberación de diversos agentes terapéuticos y en la formación de nanopartículas estructuralmente más estables. De la Figura 4.47 (A) se puede percibir que a pH 7.4 se favoreció la estabilidad de partículas PTO, y a pH 5 las partículas de HPTO y BAHPTO.

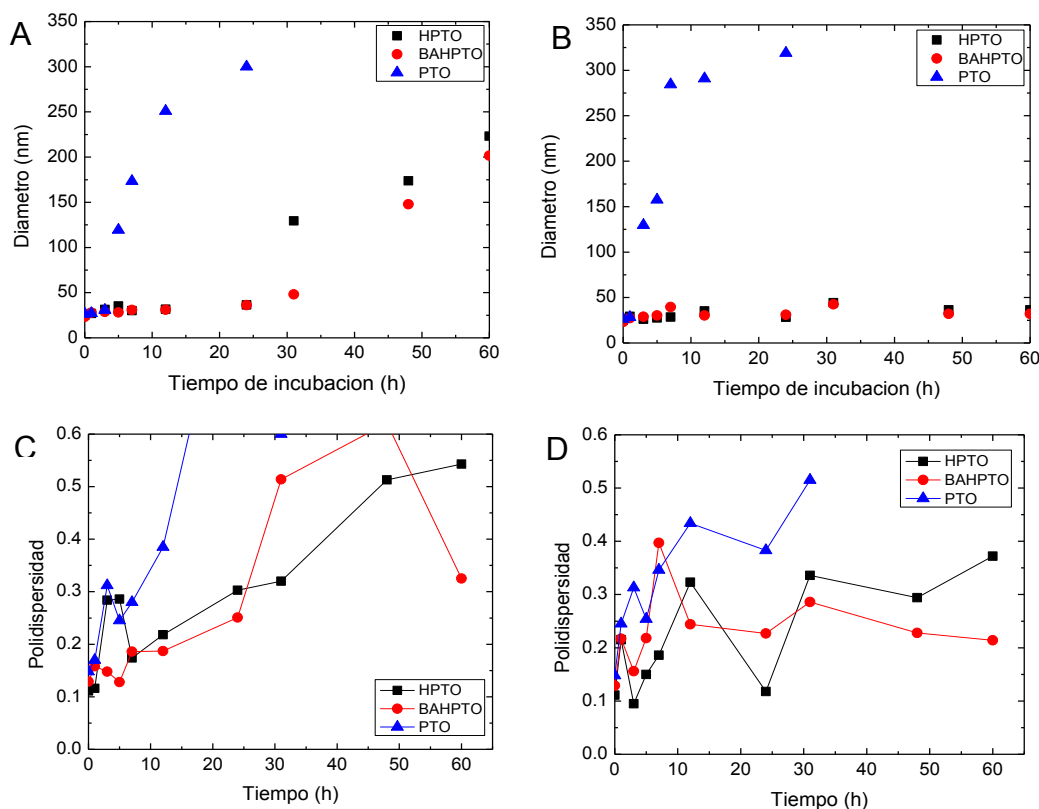


Figura 4.47 Monitoreo del D_h mediante DLS de las partículas (A) en buffer fosfato salino 0.1 M a pH 7.4 y (B) en buffer acetato 0.1 M a pH 5. Polidispersidades en (C) pH 7.4 y (D) pH 5.0. En ambos casos se incubaron a 37°C

Existen cis-dioles en sacáridos que poseen una más alta afinidad de enlazarse con los ácidos borónicos que con los con dioles alifáticos. Se puede tomar ventaja del mecanismo competitivo entre glucosa, 1,3-dioles y ácidos borónicos, con esto se podría inducir al desensamblado de las partículas. Para ver este efecto en partículas entrecruzadas, se incubaron en presencia de glucosa y $\text{H}_2\text{O}_2^{93,94}$.

La concentración de glucosa presente en la sangre humana está en el rango normal de 4.4-6.6 mM. Otra molécula presente, es la fructosa, la cual tiene una mayor

constante de afinidad que la glucosa, 160 M^{-1} y 4.6 M^{-1} respectivamente, a pH 7.4 en 0.1 M buffer fosfato salino. En pacientes diabéticos la concentración de glucosa es mayor de $\geq 10 \text{ mM}$. En el presente trabajo se investigó el rompimiento de agregados anfífilos a una concentración de 36.6 mM para HPTOLA y BAHPTOLA, la cual está arriba de la concentración en el cuerpo humano. La complejación de glucosa y 1,3-dioles colgantes en el centro de la partícula incrementa la hidrofiliidad, este proceso característico resulta en un hinchamiento que va de 26 nm a 48 nm en 20 h, obteniéndose distribuciones bimodales.

La presencia de agente oxidantes en el cuerpo humano se ha asociado con enfermedades, con los cual el uso de este tipo de compuestos podría servir como especies promotoras. La química de ácidos borónicos permite su uso no solo como sensores de azúcares sino también de la detección de sobreproducción de especies oxidantes en la detección de algunas enfermedades. Como se demuestra en la Figura 4.49 (A) y (B), se monitoreó el cambio del diámetro a pH 7.4. A una concentración de $50 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$, para partículas de BAHPTOLA el cambio del D_h fue pronunciado de 26 nm a casi 60 nm. En 10 h la distribución cambió a bimodal, es decir, se promueve la ruptura del éster boronato. El proceso de ruptura por oxidación es iniciada por el ataque nucleofílico de H_2O_2 , provocando la oxidación del enlace carbono-boro, seguido por la desboronación y originando como productos quinona, fenol y ácido bórico⁹⁵.

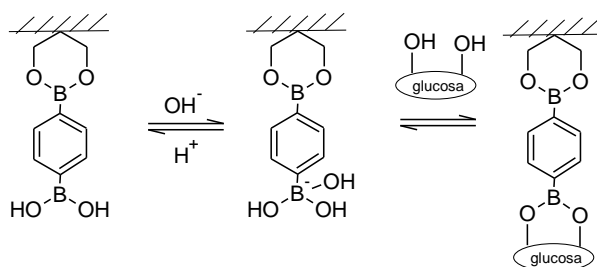


Figura 4.48 Ilustración del equilibrio entre el ácido borónico y glucosa, en solución acuosa.

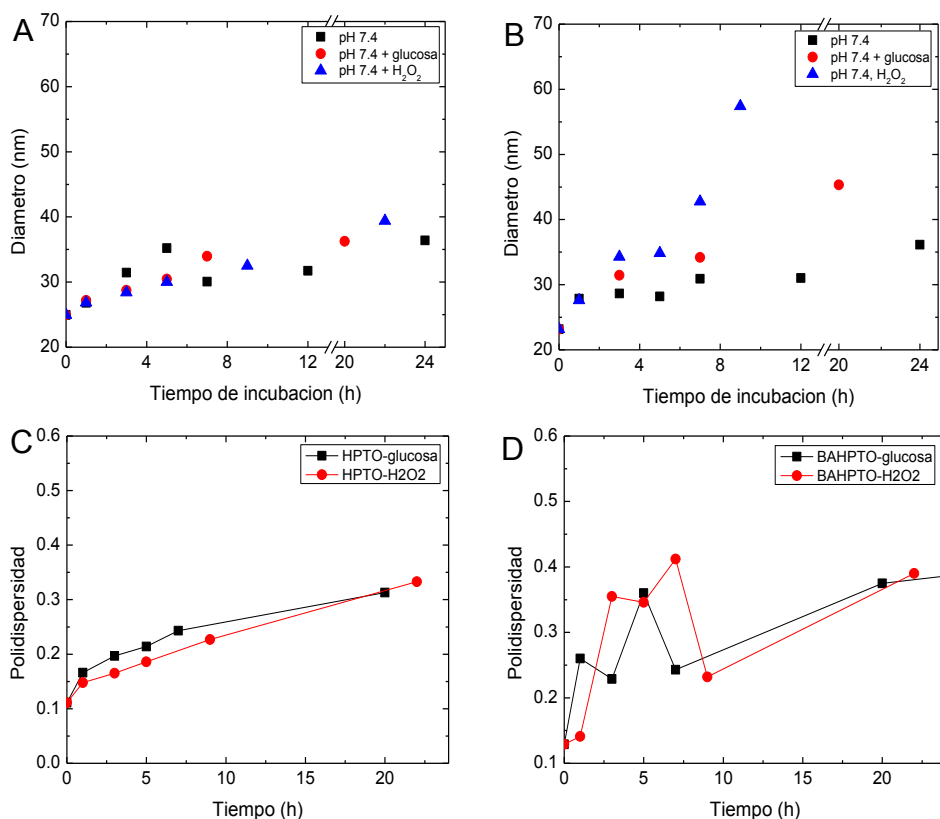


Figura 4.49 Diámetros mediante DLS en buffer fosfato salino a pH 7.4 a 37°C, en presencia de 36.6 mM de glucosa y 50 μM de H₂O₂, (A) HPTOLA y (B) BAHPTOLA. Polidispersidades de (C) HPTO y (D) BAHPTO.

Para confirmar el efecto del pH en las nanopartículas de HPTOLA Y BAHPTOLA, se llevó a cabo un estudio mediante espectroscopia de fluorescencia de rojo de nilo encapsulado. Los resultados sugieren que para ambos centros BAHPTO y HPTO, la intensidad de fluorescencia permanece prácticamente igual a pH 4, 5 y 6, pero se encontró una diferencia solo a pH 7.4 (Figura 4.50 A y B). La intensidad de emisión de la fluorescencia de rojo de nilo es dependiente del microambiente químico. Puede observarse claramente, que la más alta intensidad de rojo de nilo proviene de las partículas BAHPTOLA. La interacción de los grupos -OH en el centro hidrofóbico también presenta el mismo efecto y la disminución de la intensidad a pH 7.4 podría indicar que la estabilidad de las partículas fue menor, induciendo una liberación del rojo de nilo. Sin embargo, para ambos casos, el efecto de H₂O₂ fue prácticamente el mismo.

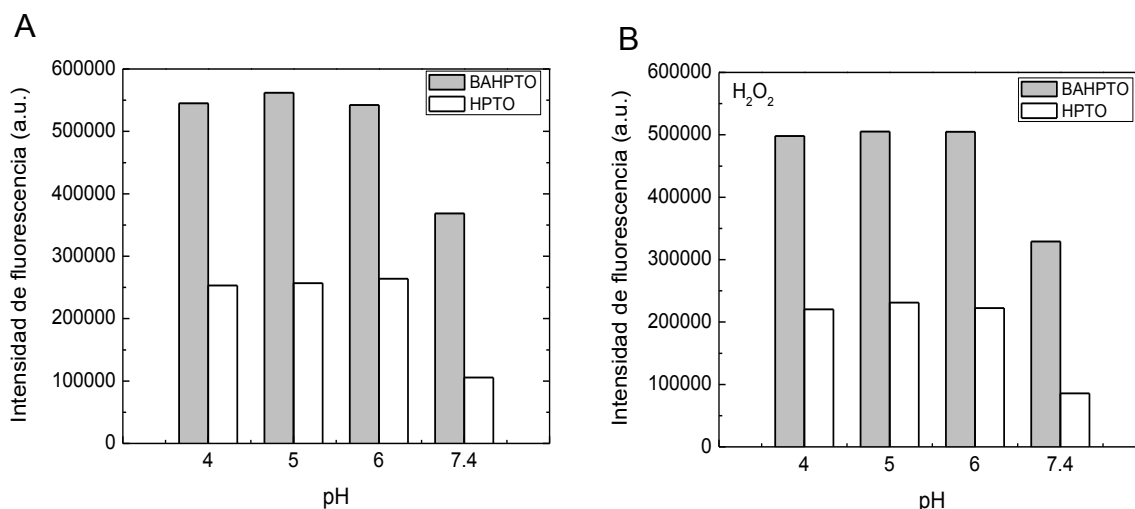


Figura 4.50 Intensidad de fluorescencia de rojo de nilo encapsulado variando el pH usando (A) buffer 0.1 M y (B) buffer + H₂O₂ [5 μM]. Todas las mediciones fueron realizadas después de 24 h de incubación a 37° C.

Algunas observaciones derivadas de este estudio son las siguientes. Estas partículas poliméricas basadas en poli(éster carbonato)s conteniendo BAHPTO, favorece la estabilidad estructural de las partículas y esto podría tomarse en cuenta para el control liberado de fármacos. Aprovechando las propiedades fisicoquímicas de estas nanopartículas, también se podría estimular la liberación de solutos hidrofóbicos en presencia de diversos agentes, ya sean estos compuestos dioles u oxidantes, los cuales podrían servir además para modificar sistemas acarreadores y crear sensores de ciertas enfermedades. Finalmente, dependiendo de los grupos colgantes del bloque hidrofóbico y del pH, se puede modular la estabilidad de ensamblados a base de policarbonatos.

4.5 Polimerización organometálica de un carbonato cíclico funcionalizado con 1,3-dioles, alternativo a PPTO.

Tanto los poliésteres alifáticos como los policarbonatos alifáticos son sintetizados mediante el mecanismo de apertura de anillo, catalizada por derivados de estaño, aluminio o zinc. Este tipo de polimerización pseudo-aniónica es usualmente llamada polimerización por apertura de anillo por coordinación-inserción, debido a que la propagación procede por la coordinación del monómero a las especies activas, seguido por la inserción del monómero dentro del enlace oxígeno-metal.

Los policarbonatos alifáticos y sus copolímeros han sido ampliamente investigados para aplicaciones biomédicas. El policarbonato alifático más comúnmente utilizado es el policarbonato de trimetileno (PTMC); películas de PTMC implantadas subcutáneamente en ratas mostraron una pérdida de masa del 21% y una disminución de peso molecular del 50% transcurrida 30 semanas. El policarbonato de 2,2-dimetil trimetileno otro policarbonato alifático tiene una rapidez de degradación aún más lenta que el PTMC, por lo que ha sido copolimerizado con ϵ -caprolactona, lactida y/o glicolida para aumentar su rapidez de degradación e hidrólisis. En un intento de ajustar la rapidez de degradación de los policarbonatos, se les han incorporado grupos colgantes polares, de tal forma que estos modifiquen la hidrofobicidad, cristalinidad, y por lo tanto, la rapidez de degradación, sin afectar la estructura del polímero. Algunos ejemplos recientemente reportados son: poli(carbonato de 5-metilén-trimetileno), poli(carbonato de 5-benciloxi trimetileno), poli(carbonato de 5-metil-5-carboxil-trimetileno), poli[carbonato de 5,5-bis(hidroximetil-trimetileno)] y el poli(carbonato 5-etil-5-hidroximetil-trimetileno).

4.5.1 Síntesis de polímeros con bis 2-etilhexanoato de estaño (II)

La síntesis de 2,2-dimetil-5,5-bis(hidroximetil)-1,3-dioxano (DM), un carbonato cíclico, se realizó siguiendo el procedimiento anteriormente reportado en la literatura⁹⁶. El monómero fue sintetizado a partir del pentaeritritol en dos etapas, la primera etapa da como resultado un diol con un grupo cetal y la segunda etapa consiste en cerrar el anillo para dar lugar al carbonato cíclico (Figura 51). Como se observa en las Figuras A15 y A17, se obtuvieron los espectros de RMN ¹H y ¹³C, resaltando las señales características del carbonato cíclico, dando la relación 1:1:1.5 derivada de las áreas de los protones de los metilenos y metilo. Confirmando así la estructura y un compuesto libre de impurezas. Para la preparación de los copolímeros se utilizó el catalizador organometálico 2-

etilhexanoato de estaño (II) (SnOct_2), se ha reportado que es un catalizador eficiente para la polimerización por apertura de anillo pseudo aniónica, usualmente llamada polimerización por apertura de anillo por coordinación-inserción. Sin embargo, el mecanismo sugiere que SnOct_2 es mezclado con un co-iniciador, que en este caso es metoxipolietilenglicol (mPEG 5000) para formar un complejo y originar al iniciador.

La polimerización se llevó a cabo en masa a 160°C , se escogió esta temperatura ya que es la de temperatura de fusión de DM y porque además arriba de esta temperatura el macroiniciador mPEG se degradaría fácilmente. Se estudió la polimerización de DM a varias condiciones, diferentes cantidades de catalizador, variando el tiempo de reacción y cambiando la cantidad de iniciador. La caracterización se realizó mediante RMN ^1H y ^{13}C , DSC, TGA, GPC y rendimientos por gravimetría.

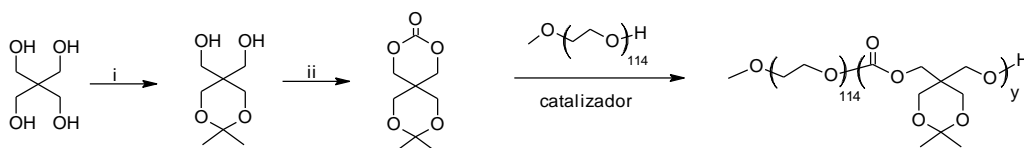


Figura 4.51 Síntesis y polimerización de 2,2-dimetil-5,5-bis(hidroxiometil)-1,3-dioxano (DM), (i) 2,2-dimetoxipropano, DMF, ácido p-toluensulfónico, a 25°C . Monómero (ii) etilcloroformiato, trietilamina, THF, a 0°C . Polimerización por ROP iniciada por mPEG₁₁₄ ($M_n=5000$) y catalizada por $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ a 160°C durante 1 h en masa.

La ruta de polimerización propuesta en la literatura, inicia de la siguiente manera (Figura 4.52). El alcóxido de estaño formado de octanoato de estaño y mPEG, inicia la polimerización. La etapa determinante sería el ataque nucleofílico del alcóxido en el carbono del carbonilo del monómero, seguido por la inserción del monómero dentro del enlace oxígeno-metal, mediante un reacomodo de electrones. Para la formación de copolímeros en bloque se utilizó mPEG que posee un grupo terminal hidroxilo para formar el macroiniciador con el cual inicia la propagación, y posteriormente se forme el bloque de carbonato.

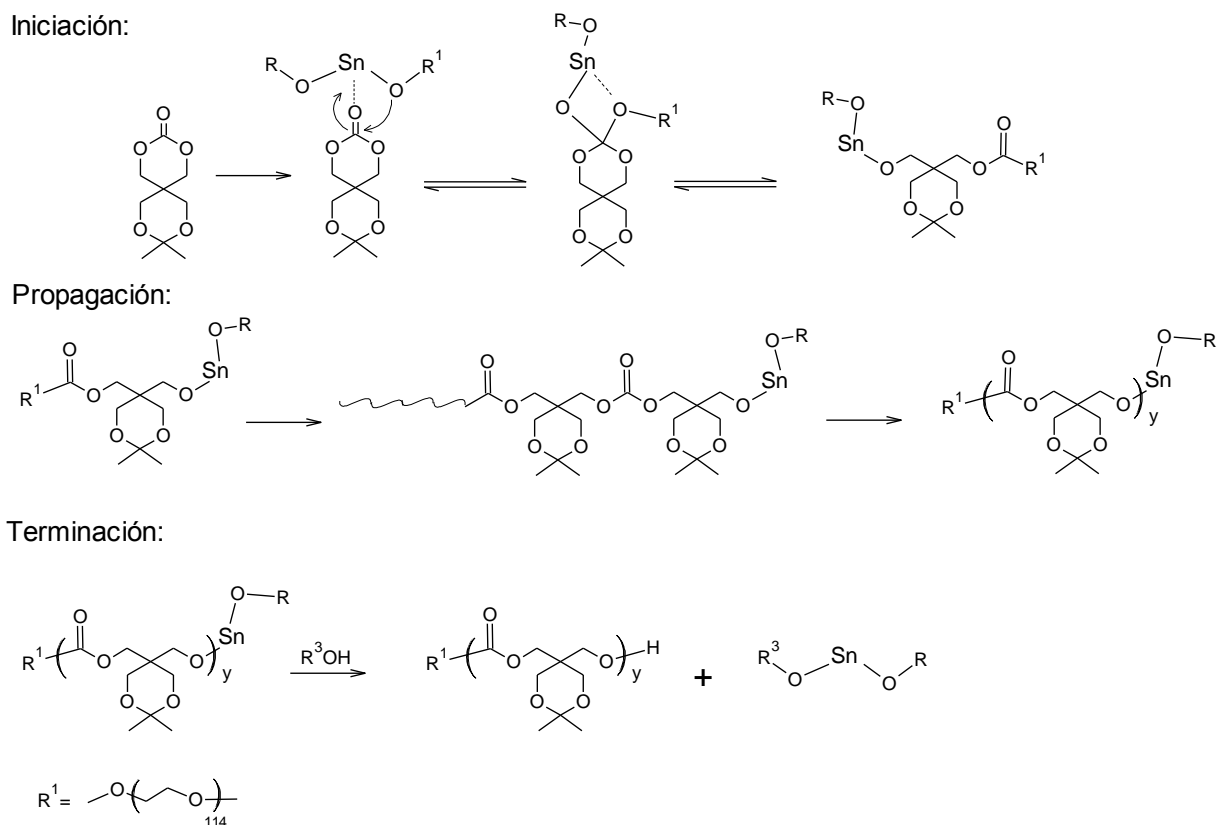


Figura 4.52 Ruta de polimerización por apertura de anillo de DM, mediante un catalizador organometálico.

4.5.1.1 Efecto de la cantidad de catalizador

Se realizó un breve estudio del efecto de la relación molar monómero-catalizador. Los anfifilos presentados en la Tabla 4.11 fueron sintetizados a 160°C en masa. A menor relación molar de catalizador M/C=1000, se obtuvieron menores pesos moleculares. Esto podría deberse a que existe una mayor cantidad de moléculas de catalizador disponibles para formar el alcóxido con los grupos -OH de mPEG, iniciando así a la polimerización. Para 25 moles alimentadas de DM se obtuvo un mayor peso molecular de 13,720 para M/C=500 y 11,730 para M/C=1000. El rendimiento fue de ~70% en general. La distribución de los pesos moleculares fue más estrecha a M/C=500 manteniéndose a ≤ 1.17 , con lo que se puede concluir que existe un mejor control de polimerización a esta relación y se favorece a una más

rápida formación de cadenas. La estructura química fue determinada mediante resonancia de ^1H y ^{13}C (Figuras 4.61 y A17).

Tabla 4.11 Polímeros mPEG₁₁₄-*b*-PDM_x, variando la relación molar de monómero a catalizador octanoato de estaño, a 1 h de reacción.

Polímero	M/C ^a	Mn ^b	IPD ^b	Rendimiento (% en peso)
mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₁₀	500	11,990	1.13	72
mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₁₀	1000	8,850	1.23	77
mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₂₅	500	13,720	1.17	78
mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₂₅	1000	11,730	1.29	19

^aM:monómero DM y C:2-etilhexanoato de estaño (II). ^bPeso molecular e índice de polidispersidad determinado mediante GPC.

4.5.1.2 Efecto del tiempo de polimerización

Las propiedades de los copolímeros variando algunas condiciones de reacción se presentan en la Tabla 4.12. Los resultados de GPC obtenidos de la variación molar de monómero a mPEG alimentado, mostró un ligero aumento en el índice de polidispersidad, debido a reacciones secundarias como transesterificación durante la polimerización. Se encontró que a 1 h fue el tiempo más apropiado para la polimerización ya que a 5 y 24 h, se observó un aumento en el índice de polidispersidad y un desplazamiento a bajos pesos moleculares, como consecuencia de las degradaciones de algunas cadenas poliméricas. Por ejemplo, para 25 moles de carbonato alimentado aumenta de 1.17 a 1.52 para 1 h y 24 h, respectivamente. Observándose también una disminución en los pesos moleculares por GPC, de 13,720 para 1 h de reacción y 7,002 g/mol para 24 h. Por otra parte, el peso molecular calculado mediante RMN ^1H resultó ser 7,828 g/mol para 1 h y 24 horas de reacción, detectándose una disparidad con respecto a los calculados por GPC. Los mejores rendimientos obtenidos por gravimetría fueron entre 72-80% a 1 h, a 24 h disminuyó significativamente el rendimiento, ciertamente indicando alguna degradación del polímero formado, lo cual solo precipitaron las cadenas más largas mediante éter dietílico.

Tabla 4.12 Propiedades de polímeros mPEG₁₁₄-*b*-PDM_x, variando el tiempo de reacción a una relación molar constante de monómero a catalizador Sn(Oct)₂ de 500 a 160°C.

Polímero	Tiempo (h)	Conversión ^a (%)	DP ^a	Mn ^a	Mn ^b	IPD ^b	T _f ^c	ΔH _f (J/g) ^c	Rendimiento (% en peso)
mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₁₀	1	60	6	6,212	11,990	1.13	56.4	560.6	72
mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₁₀	5	30	3	5,606	8,850	1.23	55.5	240.7	77
mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₁₀	24	30	3	5,606	5,474	1.55	49.1	243.5	43
mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₂₅	1	56	14	7,828	13,720	1.17	54.4	235.0	78
mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₂₅	5	67	16	8,232	11,730	1.29	59.5	465.2	19
mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₂₅	24	56	14	7,828	7,002	1.52	51.2	492.5	28
mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₃₅	1	--	--	--	14,355	1.29	54.1	186.0	80
mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₅₀	1	54	27	10,454	14,450	1.32	57.9	134.3	59
mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₁₀₀	5	--	--	--	--	--	59.0	331.7	53

^aPeso molecular determinado mediante RMN ¹H, referenciado de mPEG (δ=3.35 ppm). ^bPeso molecular e índice de polidispersidad determinado mediante GPC. ^dDeterminados mediante DSC. *Datos no incluidos, fue debido a la baja solubilidad en THF, cloroformo y DMSO.

El rendimiento máximo obtenido en general fue del 67%. En este tipo de sistema utilizado no se encontraron mejores condiciones de polimerización en masa. Sin embargo, al alimentar 58.6% en peso de DM la solubilidad disminuye drásticamente en la mayoría de disolventes orgánicos, siendo un inconveniente para las caracterizaciones de GPC y RMN. Para calcular el peso molecular del copolímero en bloque, primeramente se tomó como base la señal de -O-CH₃ a 3.37 ppm en donde se referenció con un área de 3 y la ecuación para el peso molecular promedio resultó ser la siguiente $Mn=5,000 + (202/6)*A_{1.41}$.

En la Figura 4.53 se presenta el cromatograma característico del polímero mPEG₁₁₄-*b*-PDM₁₀ sintetizado a 1 h, en la cual se puede apreciar un desplazamiento a mayores pesos moleculares, sin embargo se puede apreciar un pico de menor área a 15 min de elución, lo cual significa que existen otras especies de alto peso molecular, pero sin observarse trazas remanentes de macroiniciador. El índice de polidispersidad para la distribución de la Figura 4.53 fue de 1.13 con un peso molecular de 11,990.

Al aumentar el tiempo de reacción, se obtuvieron distribuciones amplias, ya que se podría deber al rompimiento de las cadenas del macroiniciador, ya que mPEG se degrada térmicamente más rápido que el bloque de PDM, siendo 1 hora de reacción la más adecuada para este sistema.

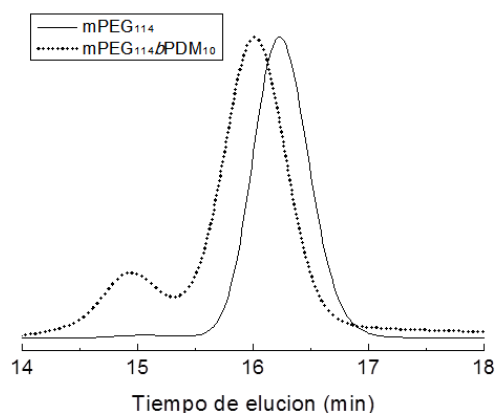


Figura 4.53 Cromatograma de permeación en gel del polímero $m\text{PEG}_{114}\text{-}b\text{-PDM}_{10}$, sintetizado a 1 h de reacción usando como catalizador $\text{Sn}(\text{Oct})_2$.

4.5.1.3 Análisis térmico

Las propiedades térmicas fueron analizadas mediante DSC (Figuras C2-C10), observándose solamente el pico de fusión. No se observó ninguna temperatura de transición vítrea (T_g) del bloque hidrofóbico PDM en todos los casos, lo cual podría deberse a la superposición con el punto de fusión de mPEG, debido a que la T_g correspondiente al homopolímero de DM se encuentra a $63.45\text{ }^\circ\text{C}$ (Figura C1). Otra razón sería al bajo contenido de 16.8% en peso del policarbonato. La temperatura de fusión en las muestras a 1 h se encuentra entre $40\text{ }^\circ\text{C}$ y $59\text{ }^\circ\text{C}$. En la Figura 4.54 se representa diferentes pesos moleculares del bloque hidrofóbico, la cual muestra una tendencia con la entalpía de fusión, en donde a mayores pesos moleculares de PDM la ΔH_f disminuyó de 560.6 J/g a 134.3 J/g . Esto se debe al efecto de mPEG, ya que su mayor contenido en estos materiales, disminuye la ΔH_f a una temperatura de fusión de $\sim 58\text{ }^\circ\text{C}$. Sin embargo, alimentando mayor contenido de policarbonato de 16.8% a 52.1% en peso, no fue suficiente para observar con claridad la temperatura de fusión de este bloque PDM, ya que se encuentra alrededor de $137\text{ }^\circ\text{C}$, aunque se hubiese esperado visualizar alguna T_g en estos materiales. En el trabajo reportado por Vandenberg, se reportó una temperatura de fusión de $190\text{ }^\circ\text{C}$ de PDM, sin embargo no se reportó el peso molecular y las condiciones de reacción fueron diferentes a este proyecto. Los homopolímeros de DM se reportan como semicristalinos, en este trabajo los polímeros iniciados con PEG resultaron también ser semicristalinos mediante DSC.

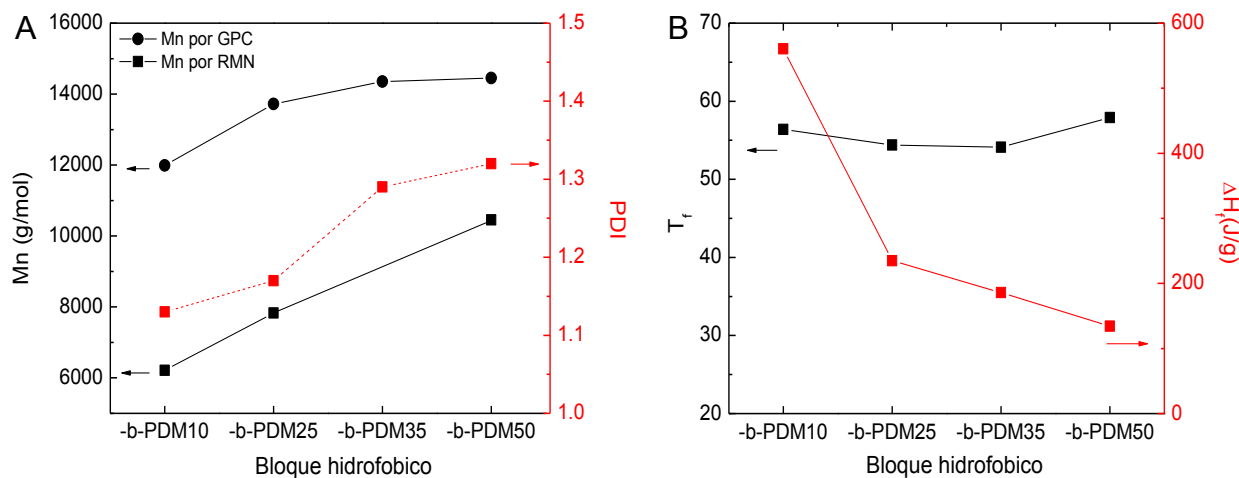


Figura 4.54 (A) Pesos moleculares de los copolímeros. (B) Relación del calor de fusión a distintas longitudes del bloque hidrofóbico de PDM, polímeros sintetizados a 1 h de reacción.

4.5.1.4 Formación de micelas

Se examinó la propiedad de ensamblaje de estos copolímeros en bloque para formar micelas. El método de evaporación del disolvente fue el utilizado con un sistema acetona-agua⁹⁷. En este caso la acetona es un disolvente orgánico miscible en agua que tiene aceptación farmacéutica de acuerdo a su toxicidad. Mediante la técnica DLS se determinó el diámetro hidrodinámico promedio de 166 nm con una polidispersidad de 0.397 (Figura 4.55 B). En estas mediciones de DLS, un haz de luz es dispersado por la solución de las micelas, las fluctuaciones causadas por la difusión Browniana de las partículas y la ecuación Stokes-Einstein relaciona la escala de tiempo de la difusión equivalente con el diámetro hidrodinámico. Otra técnica para determinar el tamaño y la morfología es la microscopía electrónica de transmisión, en la cual se observaron tamaños de aproximadamente 200 nm a 950 nm, posiblemente sean aglomeraciones, confirmándose además formas esféricas de las micelas (Figura 4.55 A y D3). Las mediciones mediante DLS proporcionan diferentes medidas de TEM, ya que es una técnica más sensible a moléculas poliméricas, sin embargo no provee información sobre la forma de las micelas o partículas presentes. Mediante el estudio de las micrografías, se observaron micelas esféricas aunque bajo TEM no se observó una polidispersidad homogénea.

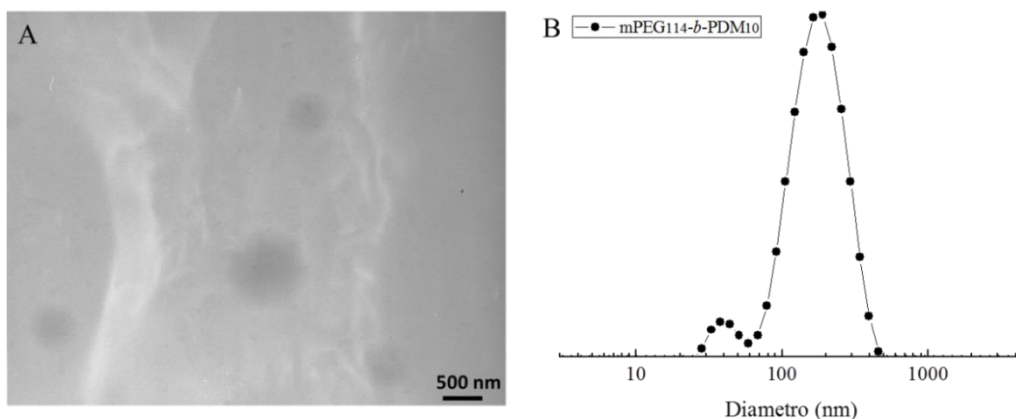


Figura 4.55 (A) Micrografía de TEM de las micelas formadas de mPEG₁₁₄-PDM₁₀. (B) Distribución de tamaños de partícula mediante DLS de las micelas formadas mediante el método de evaporación de disolvente.

En la Figura 4.56 se presenta el espectro de resonancia de las micelas formadas, con esto se comprueba que la capa expuesta de la micela es el bloque hidrofílico PEG y el bloque PDM permaneció en el centro, ya que hubo evidencias de las señales correspondientes del policarbonato, descartando así la posibilidad de ser un simple soluto sin disolver o algún otro material contaminante presentes en las muestras.

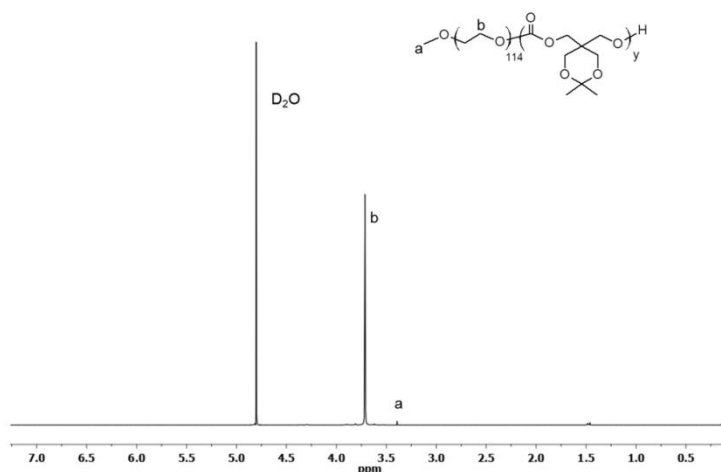


Figura 4.56 Espectro de RMN ¹H de las nanopartículas, en donde las señales corresponden a la capa hidrofílica de las micelas.

4.5.2 Síntesis de polímeros con trietilaluminio

4.5.2.1 Efecto de la cantidad de catalizador

A continuación se describen los resultados derivados de la síntesis con el catalizador trietilaluminio $-Al(C_2H_5)_3$ o $Al(Et)_3$, llevándose a cabo de igual manera que en la sección 3.5.2. En la Tabla 4.13 se presentan los polímeros sintetizados con trietilaluminio, en la cual se exponen las relaciones molares $mPEG/Al = 2, 1, 0.7$ y 0.5 , y como se puede notar la mejor relación fue de 1 mol de catalizador por 1 mol de mPEG, como ya se ha descrito en la literatura (es la relación estequiométrica para formar el macroiniciador alcóxido de dietil aluminio). La ruta de reacción es similar a aquella con octanoato de estaño. El índice de polidispersidad de estos polímeros fueron de ≤ 1.15 , es decir, ligeramente más estrecha que con los de octanoato de estaño. Esto nos indica que el alcóxido de aluminio [formado a partir de mPEG y $Al(C_2H_5)_3$] tiene una mayor reactividad para la copolimerización por apertura de anillo para DM con mPEG.

Tabla 4.13 Polímeros sintetizados variando la relación iniciador a catalizador.

Polímero	I/C ^a	Mn ^b	IPD ^b	Rendimiento (% en peso)
mPEG ₁₁₄ - b-PDM ₁₀	2.0	11,355	1.11	66
mPEG ₁₁₄ - b-PDM ₁₀	1.0	14,700	1.15	54
mPEG ₁₁₄ - b-PDM ₁₀	0.7	13,143	1.15	51
mPEG ₁₁₄ - b-PDM ₁₀	0.5	13,111	1.15	15

^aRelación molar de iniciador mPEG₁₄₄ a catalizador. ^bPeso molecular e índice de polidispersidad determinado mediante GPC.

4.5.2.2 Efecto de la cantidad de iniciador

Las propiedades de polímeros variando la relación monómero DM a iniciador mPEG (M/I) se encuentran en la Tabla 4.14. Estudiar el efecto del peso molecular de cada bloque y la hidrofobicidad de PDM, es importante ya que afecta directamente a las propiedades de las partículas. La conversión fue de 40% para 5, 10 y 25 unidades de carbonato, para 50 y 75 las conversiones fueron mayores (de 60 y 70% respectivamente). La polidispersidad de los copolímeros en general fue estrecha, de 1.04. La solubilidad en disolventes orgánicos disminuyó considerablemente en polímeros conteniendo ≤ 54.79 % en peso.

El estudio de las propiedades térmicas sobre en estos materiales se determinaron mediante análisis termogravimétrico. Esta técnica permitió conocer el comportamiento térmico a altas temperaturas al aumentar la composición del carbonato. El intervalo de degradación térmica para polímeros con tan solo 2 a 4 unidades incorporadas empieza de 160°C a 420°C, no obstante para bloques de policarbonato de mayor longitud el intervalo incrementó de 120°C a 420°C. En la literatura, se reportó que la temperatura de degradación de mPEG₁₄₄ es de 378.7°C. En este trabajo, el bloque hidrofílico PEG presentó una degradación a 278°C en presencia de 2 moles de carbonato. La incorporación del 13.9% en peso de DM, aumentó notablemente la estabilidad térmica de 278°C a 387°C. Sin embargo, a partir de este porcentaje en peso antes señalado, se observaron 2 temperaturas de transición, la primera etapa de degradación detectada fue a una T_d = 305°C con una pérdida en peso de 27% y una segunda degradación a 387°C con una pérdida en peso de 66%. Esta característica podría relacionarse a la secuencia en bloque, aunque el incremento de T_d del bloque hidrofílico de 278°C a 305°C fue notable, se podría considerar que se debe a la ausencia de los grupos terminales -OH. Para el policarbonato con 10 moles incorporadas de DM, es decir con un 28.77 % en peso, aumentó notablemente la estabilidad térmica. En su proceso de degradación, se observó una primera pérdida de masa de 45% a 36°C y una segunda a 390°C. A un mayor incremento en peso del policarbonato de 54.79% y 60.72%, no hay mayor cambio considerable en la estabilidad térmica de las muestras.

Tabla 4.14 Polímeros sintetizados con diferentes longitudes del bloque hidrofóbico.

Polímero	Conversión ^a (%)	DP ^a	Mn ^b	IPD ^b	T _d (°C) ^c	% masa ^c	Rendimiento (% en peso)
mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₅	40	2	14,539	1.04	278	98.8	18
mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₁₀	40	4	15,009	1.04	305,387	27,66	36
mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₂₅	40	10	19,909	1.04	360, 390	45,50	42
mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₅₀	60	30	14,409*	1.05*	230,280,370	53,25,25	60
mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PDM ₇₅	76	57	14,570*	1.04*	220,380	57,40	72

^aPeso molecular y grado de polimerización determinado mediante RMN ¹H, referenciado de mPEG (δ=3.35 ppm). ^bPeso molecular e índice de polidispersidad determinado mediante GPC. ^cTemperatura de estabilidad térmica y pérdida de masa, determinados mediante TG y DTG. *Polímeros con baja solubilidad en THF y cloroformo.

Como ya se mencionó en el párrafo anterior, se sintetizó una serie de polímeros a diferentes relaciones de M/I alimentados y el peso molecular resultante se examinó

mediante GPC (Tabla 4.14). En la Figura 4.57 se presentan los pesos moleculares experimentales por RMN ^1H comparados con los esperados, observándose una tendencia casi lineal. En contraste con los obtenidos mediante GPC, se observó un decremento del Mn al 54.79% en peso del policarbonato, probablemente se deba a la baja solubilidad en THF y a la posterior microfiltración. El rendimiento calculado por gravimetría aumenta conforme se incorpora mayor número de moles del carbonato. Esto es de acuerdo a que los polímeros de mayor peso precipitan más fácilmente, resultando en un sólido blanco.

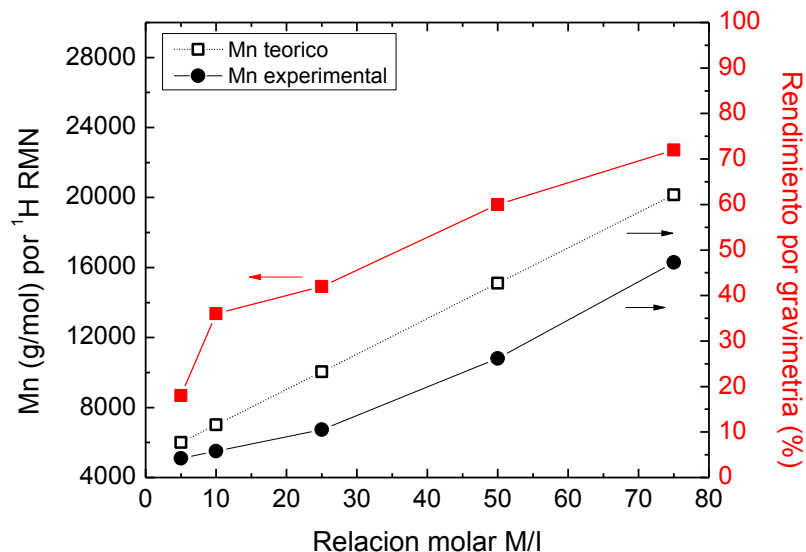


Figura 4.57 Peso molecular observado variando la relación molar de DM a mPEG₁₁₄ comparado con el teórico, presentando sus respectivos rendimientos.

En el cromatograma de GPC de la Figura 4.58, se puede observar la distribución bimodal del polímero, sin embargo, aún con este tipo distribución el índice de polidispersidad resultó ser relativamente estrecha de 1.05. En todos los casos el uso de trietilaluminio generó un aumento en el peso molecular y un menor índice de polidispersidad comparado con los catalizados por octanoato de estaño⁹⁸. Se descarta, que este tipo de distribución se deba a trazas de macroiniciador libre, ya que no se observa en la Figura 4.58. Probablemente, se deba a que no existe un buen control en el crecimiento de las cadenas y existan reacciones de transesterificación. Por otro lado, se llevó a cabo la copolimerización de DM con ϵ -caprolactona, obteniéndose distribuciones monomodales, aunque la polidispersidad fue de 1.47 logrando una conversión del 88% para DM y del 100% para ϵ -caprolactona. Considerando que posiblemente en el futuro se podría pensar en una copolimerización con algún otro monómero, ya que se podría mejorar la distribución

de pesos moleculares de bimodal a monomodal, aunque la polidispersidad resultó ser ligeramente mayor (Figura B6 y Tabla B4).

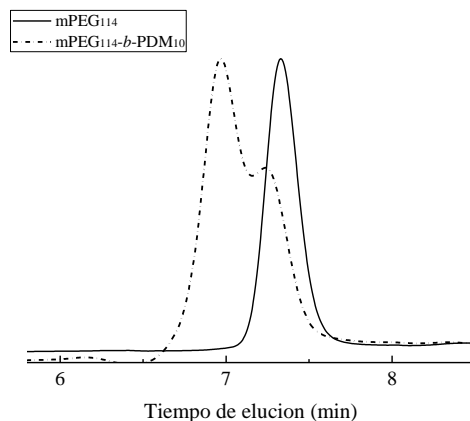


Figura 4.58 Cromatograma de GPC del polímero $m\text{PEG}_{114}\text{-}b\text{-PDM}_{10}$, sintetizado a 1 h de reacción usando como catalizador trietilaluminio.

4.5.2.3 Formación de micelas

En una prueba preliminar para comprobar la aplicación de estos polímeros sintetizados a partir de trietilaluminio, se formaron micelas por el método de evaporación de disolvente con un sistema acetona-agua, el mismo procedimiento de la sección 1.2.1.4. Para determinar el tamaño y la morfología de las micelas, se realizó microscopía electrónica de transmisión en la cual se pudieron observar formas ovaladas en su mayoría, encontrándose en su mayoría micelas de tamaños de 120 nm de longitud (Figura 4.59 A y D4). Un tamaño aceptable ($d < 300\text{nm}$) para el posterior uso en la liberación de fármacos, puede ser obtenido de estos polímeros. Probablemente la razón de estas distintas morfologías se deba al mayor peso molecular obtenido en esta muestra con respecto a las de octanoato de estaño.

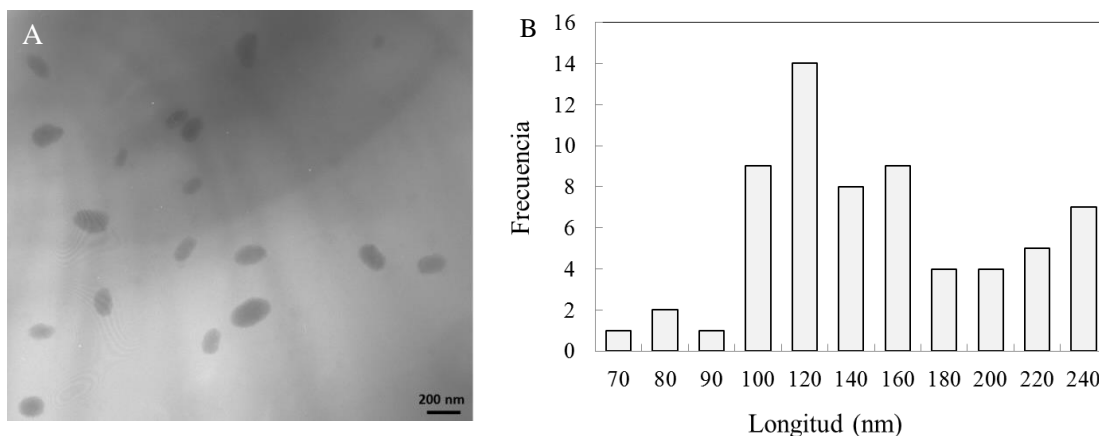


Figura 4.59 (A) Micrografía de TEM de las micelas formadas a partir de mPEG₁₁₄-PDM₁₀. (B) Histograma de distribución de la longitud de las micelas ovaladas.

4.5.2.4 Desprotección de los copolímeros

La postmodificación química es importante en diversas aplicaciones biomédicas. Micelas conteniendo policarbonatos funcionales son útiles como eficientes acarreadores en los cuales se puede conjugar moléculas bioactivas. En la presente sección, se expone el uso de un carbonato con grupos hidroxilos protegidos mediante grupos cetales (Figura 4.60). Esta reacción se llevó a cabo en condiciones ácidas, las cuales se analizaron a diferentes tiempos de hidrólisis, considerando que esta reacción pueda provocar una degradación en las cadenas del polímero. El carácter hidrofílico/hidrofóbico, puede variar dependiendo del grado de desprotección, es decir, esto a su vez afectaría la liberación de la molécula hidrofóbica encapsulada y la velocidad de degradación del polímero.

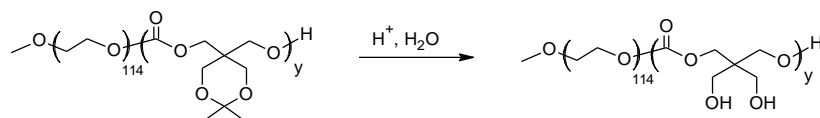


Figura 4.60 Desprotección de mPEG₁₁₄-b-PDM en condiciones ácidas.

La remoción del grupo cetal se realizó con ácido trifluoroacético disolviendo previamente el polímero bajo agitación magnética en THF, es decir, una relación molar de DM/CF₃COOH=2, a 25 °C. Un estudio de este tipo de desprotección previene la degradación de estos polímeros. Se presenta en la Tabla 4.15 las

desprotecciones realizadas durante 5, 10, 15 y 20 min. El polímero utilizado en este estudio antes de la desprotección presentó un peso de 15,009 e IPD = 1.04. En estas reacciones realizadas, no se notó un efecto considerable del tiempo en el grado de desprotección de los grupos cetales. El máximo grado de desprotección alcanzado fue de 76% a los 20 minutos.

Tabla 4.15 Resultados obtenidos de los polímeros desprotegidos.

Tiempo (min)	Grado de desprotección ^a	Mn ^b	IPD ^b	Rendimiento (% en peso)
5	73.4	10,974	1.11	39.6
10	75.4	11,539	1.09	45.9
15	74.3	11,818	1.07	43.9
20	76.7	12,627	1.13	53.5

^aDeterminado mediante RMN ¹H. ^bPeso molecular e índice de polidispersidad determinado mediante GPC.

Para comprobar la estructura química de los polímeros se obtuvieron los espectros por RMN ¹H y ¹³C. Antes de la reacción de desprotección del polímero mPEG-*b*-PDM se presenta su espectro RMN en la parte superior de la Figura 4.61, las señales características del policarbonato son en 4.19, 3.75 y 1.4 ppm, con una relación correcta de 1:1:1.5 (señales c, d y e) respectivamente. El cálculo del peso molecular fue determinado tomando como base la señal de los protones del grupo metilo –O-CH₃ del metóxido terminal (señal a), además de que se corroboró la presencia del bloque mPEG. El grado de desprotección fue calculado mediante RMN ¹H, después de la desprotección se detectó un triplete a 4.19 ppm correspondiente a los grupos –OH (señal f). Observándose, además la disminución en la intensidad de los grupos metilos (señal e).

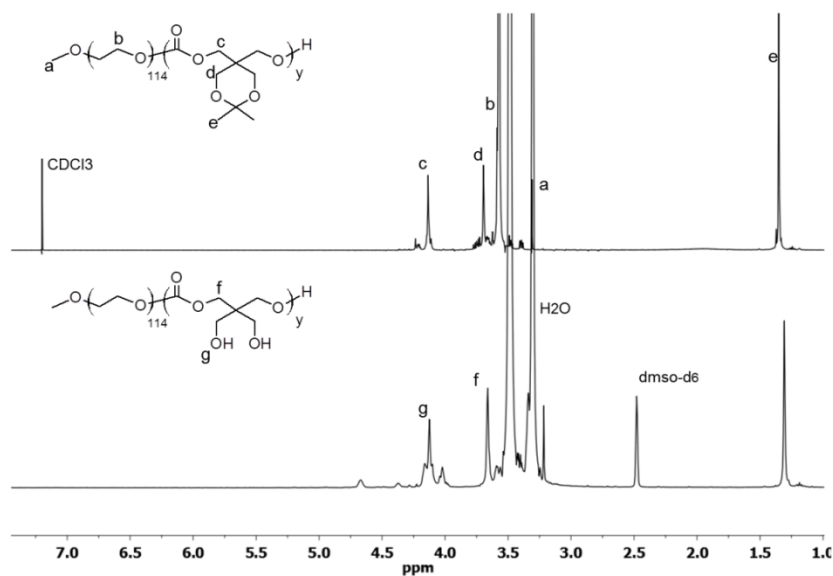


Figura 4.61 Espectros de RMN ¹H de mPEG₁₁₄-*b*-PDM, (arriba) antes de la desprotección y (abajo) después de la remoción del grupo cetal.

En el breve estudio realizado con octanoato de estaño, se puede concluir que a una hora fue la más adecuada para la realizar la polimerización en masa con mPEG. A partir de estos polímeros anfífilicos se formaron agregados micelares con morfología esférica por el método evaporación de disolvente de diámetros $D_h = 166$ nm, con polímeros de peso molecular 6,212 g/mol. Usando como catalizador trietilaluminio se obtuvieron polímeros con menores índices de polidispersidad (1.04) y más altos pesos moleculares de 14,000 g/mol, esto podría deberse a la más alta reactividad del trietilaluminio, generándose micelas de diferentes morfologías, ovaladas y elongadas, las cuales tuvieron una longitud promedio de 200 nm y de ancho ~100 nm.

La variación del peso molecular, afecta la morfología de los agregados en medio acuoso. La reacción de hidrólisis en condiciones ácidas pudo desproteger los grupos cetales, sin embargo el grado de desprotección fue de 76 % en 20 min a 25 °C, aunque se obtuvo una disminución del peso molecular mediante GPC. Las micelas obtenidas en ambos casos, podrían funcionar como eficientes acarreadores ya que además de poseer la capacidad de encapsular en su centro hidrofóbico, tienen grupos funcionales (hidroxilo) colgantes a partir de la cadena principal. Estos grupos hidroxilo pueden servir como reactivos para futuras modificaciones estructurales, así como la conjugación de fármacos y otras moléculas bioactivas, ampliando su aplicabilidad en el campo biomédico.

Capítulo 5. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se sintetizaron carbonatos cíclicos con grupos hidroxilos protegidos DM, PTO y ácidos borónicos protegidos PBC y PBE. A continuación se exponen las conclusiones generadas de la presente investigación.

- La copolimerización de DLLA con PTO resultó ser más eficiente para la obtención de polímeros anfifílicos que con únicamente la incorporación de PTO iniciada por mPEG. Los grupos colgantes –OH ofrecieron un incremento en la estabilidad de las partículas y una disminución en su polidispersidad de 0.110 a 0.07. A su vez, estas partículas producidas de mPEG₁₁₄-*b*-P(PTO_{0.22}-*co*-LA_{0.78})₄₉ resultaron ser más estables con respecto al polímero mPEG₁₁₄-*b*-PLA₆₉. Las partículas con PTOLA incorporado presentaron polidispersidades más estrechas de 0.110, que con únicamente LA la cual fue de 0.404.
- Se lograron obtener nanopartículas fluoróforas encapsulando rojo de nilo con morfologías bien definidas con el sistema mPEG₁₁₄-*b*-P(HTO_{0.22}-*co*-LA_{0.78})₄₉. Además también fue posible la incorporación química de un agente de entrecruzamiento, el cual mejoró la estabilidad de las nanopartículas en medio PBS a 37 °C durante 60 h de incubación.
- Con respecto a las condiciones de polimerización, se puede concluir que el catalizador DBU ofrece un mejor control en la polimerización de los carbonatos cíclicos que los organometálicos. Una ventaja de estos catalizadores, es que la reacción de polimerización puede llevarse a cabo a 25 °C, a diferencia de los catalizadores organometálicos donde la reacción se llevó a cabo a 160 °C. Otro aspecto a señalar con DBU, es que se obtuvieron polidispersidades de ~1.07 y distribuciones monomodales. En cambio con octanoato de estaño se obtuvieron polidispersidades de 1.17 y con Al(Et)₃ de PDI=1.15.
- La reacción de desprotección de los polímeros se llevó a cabo de manera eficiente en todos los casos. Mediante GPC y RMN, se comprobó que la estructura de los polímeros permaneció intacta, reportándose condiciones adecuadas en esta tesis ya sea para desproteger grupos colgantes –OH o para grupos ácidos borónicos.

- En general, cabe mencionar que el ensamble de los policarbonatos mediante nanoprecipitación súbita generaron nanopartículas esféricas menores a 100 nm de diámetros, las cuales son ideales para la focalización de células específicas. La morfología puede variar de acuerdo a la relación del peso molecular hidrofóbico e hidrofílico, es decir, a mayor peso molecular del bloque PBC (16,506) se pueden producir vesículas esféricas, las cuales pueden servir en un futuro como sistemas de encapsulamiento para moléculas hidrofílicas.
- Por otro lado, mediante el método de evaporación del solvente, el copolímero mPEG₁₁₄-*b*-PDM_x formó micelas ovaladas en su mayoría, con el cual en un futuro se podría mejorar las condiciones en el proceso de ensamblado para estos materiales, y estudiar sus diversas morfologías y aplicaciones.
- El monómero PBC mostró un mejor control en su polimerización con respecto a PTO y DM, ya que de acuerdo a los estudios de GPC y RMN, fue posible incorporar mayor número de unidades repetitivas, obteniéndose también mejores distribuciones de pesos moleculares. El sistema polimérico mPEG₄₄-*b*-PBC₂₆ facilitó la liberación controlada dependiendo del pH. Otra característica a resaltar es la baja toxicidad del polímero mPEG₄₄-*b*-PBC₂₆, durante 48 horas de incubación en células MDA-MB-231. Este sistema resultó ser efectivo para la conjugación del profármaco capecitabina, presentando una actividad anticancerígena proveniente de CAPE transportada mediante la matriz polimérica.

REFERENCIAS

- (1) Gaucher, G.; Dufresne, M. H.; Sant, V. P.; Kang, N.; Maysinger, D.; Leroux, J. C. *J Control Release* **2005**, *109*, 169.
- (2) Nair, L. S.; Laurencin, C. T. *Adv Biochem Eng Biot* **2006**, *102*, 47.
- (3) Aliabadi, H. M.; Mahmud, A.; Sharifabadi, A. D.; Lavasanifar, A. J. *J Control Release* **2005**, *104*, 301.
- (4) Subedi, R. K.; Kang, K. W.; Choi, H. K. *Eur J Pharm Sci* **2009**, *37*, 508.
- (5) Hans, M. L.; Lowman, A. M. *Curr Opin Solid St M* **2002**, *6*, 319.
- (6) Kang, S. I.; Na, K.; Bae, Y. H. *Colloid Surface A* **2003**, *231*, 103.
- (7) Lin, R. Y.; Ng, L. S.; Wang, C. H. *Biomaterials* **2005**, *26*, 4476.
- (8) Moghimi, S. M.; Hunter, A. C.; Murray, J. C. *Pharmacol Rev* **2001**, *53*, 283.
- (9) Uhrich, K. E.; Cannizzaro, S. M.; Langer, R. S.; Shakesheff, K. M. *Chem Rev* **1999**, *99*, 3181.
- (10) Kumari, A.; Yadav, S. K.; Yadav, S. C. *Colloid Surface B* **2010**, *75*, 1.
- (11) Tyrrell, Z. L.; Shen, Y. Q.; Radosz, M. *Prog Polym Sci* **2010**, *35*, 1128.
- (12) Rapoport, N. *Prog Polym Sci* **2007**, *32*, 962.
- (13) Murphy, A.; Taggart, G. *Colloid Surface A* **2002**, *205*, 237.
- (14) Gindy, M. E.; Ji, S. X.; Hoye, T. R.; Panagiotopoulos, A. Z.; Prud'homme, R. K. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 2705.
- (15) Johnson, B. K.; Prud'homme, R. K. *Aust J Chem* **2003**, *56*, 1021.
- (16) Ulbrich, K.; Subr, V. *Advanced drug delivery reviews* **2004**, *56*, 1023.
- (17) Mittal, G.; Sahana, D. K.; Bhardwaj, V.; Kumar, M. N. V. R. *J Control Release* **2007**, *119*, 77.
- (18) Tempelaar, S.; Mespouille, L.; Coulembier, O.; Dubois, P.; Dove, A. P. *Chem Soc Rev* **2013**, *42*, 1312.
- (19) Feng, J.; Zhuo, R. X.; Zhang, X. Z. *Prog Polym Sci* **2012**, *37*, 211.
- (20) Elvira, C.; Gallardo, A.; San Roman, J.; Cifuentes, A. *Molecules* **2005**, *10*, 114.
- (21) Acemoglu, M. *International journal of pharmaceutics* **2004**, *277*, 133.
- (22) Zhu, K. J.; Hendren, R. W.; Jensen, K.; Pitt, C. G. *Macromolecules* **1991**, *24*, 1736.
- (23) Rokicki, G. *Prog Polym Sci* **2000**, *25*, 259.
- (24) Fu, K.; Pack, D. W.; Klibanov, A. M.; Langer, R. *Pharmaceut Res* **2000**, *17*, 100.
- (25) Zurita, R.; Franco, L.; Puiggali, J.; Rodriguez-Galan, A. *Polym Degrad Stabil* **2007**, *92*, 975.
- (26) Xu, J. W.; Prifti, F.; Song, J. *Macromolecules* **2011**, *44*, 2660.

-
- (27) Albertsson, A. C.; Varma, I. K. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1466.
- (28) Danquah, M.; Fujiwara, T.; Mahato, R. I. *Biomaterials* **2010**, *31*, 2358.
- (29) Lai, K. L.; Ji, L. J.; Long, C. Y.; Li, L.; He, B.; Wu, Y.; Gu, Z. W. *J Appl Polym Sci* **2012**, *123*, 2204.
- (30) Chen, W.; Meng, F. H.; Li, F.; Ji, S. J.; Zhong, Z. Y. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1727.
- (31) Li, Z. M.; Yan, G. P.; Ai, C. W.; Zhang, Q.; Li, L.; Liu, F.; Yu, X. H.; Zhao, B. A. *J Appl Polym Sci* **2012**, *124*, 3704.
- (32) Helou, M.; Miserque, O.; Brusson, J. M.; Carpentier, J. F.; Guillaume, S. M. *Chem-Eur J* **2010**, *16*, 13805.
- (33) Hu, X. L.; Liu, S.; Chen, X. S.; Mo, G. J.; Xie, Z. G.; Jing, X. B. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 553.
- (34) Clement, B.; Grignard, B.; Koole, L.; Jerome, C.; Lecomte, P. *Macromolecules* **2012**, *45*, 4476.
- (35) Lu, J.; Shoichet, M. S. *Macromolecules* **2010**, *43*, 4943.
- (36) Kiesewetter, M. K.; Shin, E. J.; Hedrick, J. L.; Waymouth, R. M. *Macromolecules* **2010**, *43*, 2093.
- (37) Li, F.; Danquah, M.; Mahato, R. I. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 2610.
- (38) Endo, T.; Kakimoto, K.; Ochiai, B.; Nagai, D. *Macromolecules* **2005**, *38*, 8177.
- (39) Murayama, M.; Sanda, F.; Endo, T. *Macromolecules* **1998**, *31*, 919.
- (40) Lohmeijer, B. G. G.; Pratt, R. C.; Leibfarth, F.; Logan, J. W.; Long, D. A.; Dove, A. P.; Nederberg, F.; Choi, J.; Wade, C.; Waymouth, R. M.; Hedrick, J. L. *Macromolecules* **2006**, *39*, 8574.
- (41) Johnson, B. K.; Prud'homme, R. K. *Phys Rev Lett* **2003**, *91*.
- (42) Zhu, Z. X.; Margulis-Goshen, K.; Magdassi, S.; Talmon, Y.; Macosko, C. W. *Journal of pharmaceutical sciences* **2010**, *99*, 4295.
- (43) Xie, Z. G.; Lu, C. H.; Chen, X. S.; Chen, L.; Wang, Y.; Hu, X. L.; Shi, Q.; Jing, X. B. *J Polym Sci Pol Chem* **2007**, *45*, 1737.
- (44) Pratt, R. C.; Lohmeijer, B. G. G.; Long, D. A.; Lundberg, P. N. P.; Dove, A. P.; Li, H. B.; Wade, C. G.; Waymouth, R. M.; Hedrick, J. L. *Macromolecules* **2006**, *39*, 7863.
- (45) Qian, H. T.; Wohl, A. R.; Crow, J. T.; Macosko, C. W.; Hoyer, T. R. *Macromolecules* **2011**, *44*, 7132.
- (46) Pratt, R. C.; Nederberg, F.; Waymouth, R. M.; Hedrick, J. L. *Chem Commun* **2008**, 114.
- (47) Shi, M.; Wosnick, J. H.; Ho, K.; Keating, A.; Shoichet, M. S. *Angew Chem Int Edit* **2007**, *46*, 6126.
- (48) Aguirre-Chagala, Y. E.; Santos, J. L.; Aguilar-Castillo, B. A.; Herrera-Alonso, M. *Acs Macro Lett* **2014**, *3*, 353.
-

-
- (49) Mei, L. L.; Yan, G. P.; Yu, X. H.; Cheng, S. X.; Wu, J. Y. *J Appl Polym Sci* **2008**, *108*, 93.
- (50) Yang, L. X.; Wei, J. Z.; Yan, L. S.; Huang, Y. B.; Jing, X. B. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2032.
- (51) Xu, J.; Liu, Z. L.; Zhuo, R. X. *J Appl Polym Sci* **2006**, *101*, 1988.
- (52) Hu, X. L.; Liu, S.; Huang, Y. B.; Chen, X. S.; Jing, X. B. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 2094.
- (53) Haba, O.; Tomizuka, H.; Endo, T. *Macromolecules* **2005**, *38*, 3562.
- (54) Parzuchowski, P. G.; Jaroch, M.; Tryznowski, M.; Rokicki, G. *Macromolecules* **2008**, *41*, 3859.
- (55) Brown, H. A.; De Crisci, A. G.; Hedrick, J. L.; Waymouth, R. M. *Acs Macro Lett* **2012**, *1*, 1113.
- (56) Matsuo, J.; Aoki, K.; Sanda, F.; Endo, T. *Macromolecules* **1998**, *31*, 4432.
- (57) Agarwal, S.; Puchner, M.; Greiner, A.; Wendorff, J. H. *Polym Int* **2005**, *54*, 1422.
- (58) Murali, C.; Shashidhar, M. S.; Gopinath, C. S. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 4149.
- (59) Yang, J.; Hao, Q. H.; Liu, X. Y.; Ba, C. Y.; Cao, A. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 209.
- (60) Li, Y. M.; Qian, Y. F.; Liu, T.; Zhang, G. Y.; Liu, S. Y. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 3877.
- (61) Park, J.; Moon, M.; Seo, M.; Choi, H.; Kim, S. Y. *Macromolecules* **2010**, *43*, 8304.
- (62) Springsteen, G.; Wang, B. H. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 5291.
- (63) He, L. H.; Fullenkamp, D. E.; Rivera, J. G.; Messersmith, P. B. *Chem Commun* **2011**, *47*, 7497.
- (64) Ren, J.; Zhang, Y. X.; Zhang, J.; Gao, H. J.; Liu, G.; Ma, R. J.; An, Y. L.; Kong, D. L.; Shi, L. Q. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 3434.
- (65) Bapat, A. P.; Roy, D.; Ray, J. G.; Savin, D. A.; Sumerlin, B. S. *J Am Chem Soc* **2011**, *133*, 19832.
- (66) Aguirre-Chagala, Y. E.; Santos, J. L.; Herrera-Najera, R.; Herrera-Alonso, M. *Macromolecules* **2013**, *46*, 5871.
- (67) Roy, D.; Sumerlin, B. S. *Acs Macro Lett* **2012**, *1*, 529.
- (68) Cambre, J. N.; Roy, D.; Gondi, S. R.; Sumerlin, B. S. *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 10348.
- (69) Ma, W. M. J.; Morais, M. P. P.; D'Hooge, F.; van den Elsen, J. M. H.; Cox, J. P. L.; James, T. D.; Fossey, J. S. *Chem Commun* **2009**, 532.
- (70) Wang, Y. X.; Zhang, X. G.; Mu, J.; Li, C. X. *New J Chem* **2013**, *37*, 796.
-

-
- (71) Aprile, G.; Mazzer, M.; Moroso, S.; Puglisi, F. *Anti-Cancer Drug* **2009**, *20*, 217.
- (72) Poole, C.; Gardiner, J.; Twelves, C.; Johnston, P.; Harper, P.; Cassidy, J.; Monkhouse, J.; Banken, L.; Weidekamm, E.; Reigner, B. *Cancer Chemoth Pharm* **2002**, *49*, 225.
- (73) Kim, K. T.; Cornelissen, J. J. L. M.; Nolte, R. J. M.; van Hest, J. C. M. *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 13908.
- (74) Seow, W. Y.; Yang, Y. Y. *J Control Release* **2009**, *139*, 40.
- (75) Kim, H.; Kong, Y. J.; Jeong, E. S.; Kong, S.; Kim, K. T. *Acs Macro Lett* **2012**, *1*, 1194.
- (76) Scarano, W.; Duong, H. T. T.; Lu, H. X.; De Souza, P. L.; Stenzel, M. H. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 962.
- (77) Su, J.; Chen, F.; Cryns, V. L.; Messersmith, P. B. *J Am Chem Soc* **2011**, *133*, 11850.
- (78) Han, H.; Davis, M. E. *Bioconjugate Chem* **2013**, *24*, 669.
- (79) Wang, D. L.; Su, Y.; Jin, C. Y.; Zhu, B. S.; Pang, Y.; Zhu, L. J.; Liu, J. Y.; Tu, C. L.; Yan, D. Y.; Zhu, X. Y. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 1370.
- (80) Wolinsky, J. B.; Ray, W. C.; Colson, Y. L.; Grinstaff, M. W. *Macromolecules* **2007**, *40*, 7065.
- (81) Van de Bittner, G. C.; Dubikovskaya, E. A.; Bertozzi, C. R.; Chang, C. J. *P Natl Acad Sci USA* **2010**, *107*, 21316.
- (82) Ma, R. J.; Yang, H.; Li, Z.; Liu, G.; Sun, X. C.; Liu, X. J.; An, Y. L.; Shi, L. Q. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 3409.
- (83) Jin, X. J.; Zhang, X. G.; Wu, Z. M.; Teng, D. Y.; Zhang, X. J.; Wang, Y. X.; Wang, Z.; Li, C. X. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1337.
- (84) Wang, B. L.; Ma, R. J.; Liu, G.; Li, Y.; Liu, X. J.; An, Y. L.; Shi, L. Q. *Langmuir* **2009**, *25*, 12522.
- (85) Zhang, D.; Pelton, R. *Langmuir* **2012**, *28*, 3112.
- (86) Deshayes, S.; Cabral, H.; Ishii, T.; Miura, Y.; Kobayashi, S.; Yamashita, T.; Matsumoto, A.; Miyahara, Y.; Nishiyama, N.; Kataoka, K. *J Am Chem Soc* **2013**, *135*, 15501.
- (87) Rambo, B. M.; Lavigne, J. J. *Chem Mater* **2007**, *19*, 3732.
- (88) Matsushima, Y.; Nishiyabu, R.; Takanashi, N.; Haruta, M.; Kimura, H.; Kubo, Y. *J Mater Chem* **2012**, *22*, 24124.
- (89) Li, Y. P.; Xiao, W. W.; Xiao, K.; Berti, L.; Luo, J. T.; Tseng, H. P.; Fung, G.; Lam, K. S. *Angew Chem Int Edit* **2012**, *51*, 2864.
- (90) Basak, D.; Ghosh, S. *Acs Macro Lett* **2013**, *2*, 799.
- (91) Zhang, Z. H.; Yin, L. C.; Tu, C. L.; Song, Z. Y.; Zhang, Y. F.; Xu, Y. X.; Tong, R.; Zhou, Q.; Ren, J.; Cheng, J. J. *Acs Macro Lett* **2013**, *2*, 40.
- (92) Stockton, W. B.; Rubner, M. F. *Macromolecules* **1997**, *30*, 2717.
-

- (93) Kuang, Y. Y.; Baakrishnan, K.; Gandhi, V.; Peng, X. H. *J Am Chem Soc* **2011**, *133*, 19278.
- (94) Broaders, K. E.; Grandhe, S.; Frechet, J. M. J. *J Am Chem Soc* **2011**, *133*, 756.
- (95) Song, C. C.; Ji, R.; Du, F. S.; Liang, D. H.; Li, Z. C. *Acs Macro Lett* **2013**, *2*, 273.
- (96) Vandenberg, E. J.; Tian, D. *Macromolecules* **1999**, *32*, 3613.
- (97) Ribeiro, H. S.; Chu, B. S.; Ichikawa, S.; Nakajima, M. *Food Hydrocolloid* **2008**, *22*, 12.
- (98) Zhou, Y.; Zhuo, R. X.; Liu, Z. L. *Polymer* **2004**, *45*, 5459.

Apéndice A ESPECTROS DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

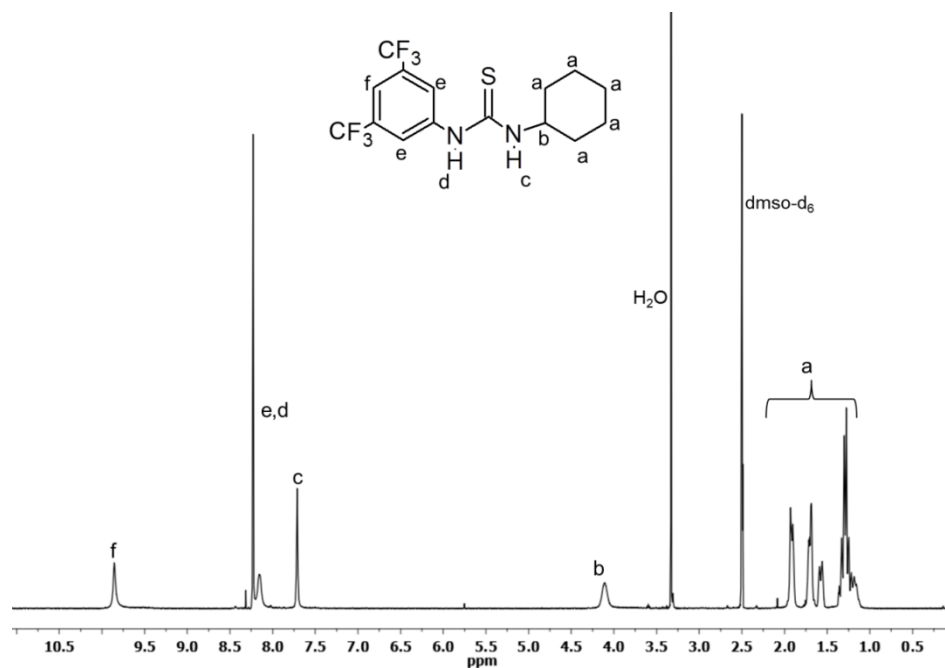


Figura A1 Espectro de RMN ^1H de 1-(3,5-bis-(trifluorometil)-fenil)-3-ciclohexil-2-tiourea (TU) en dimetilsulfóxido deuterado.

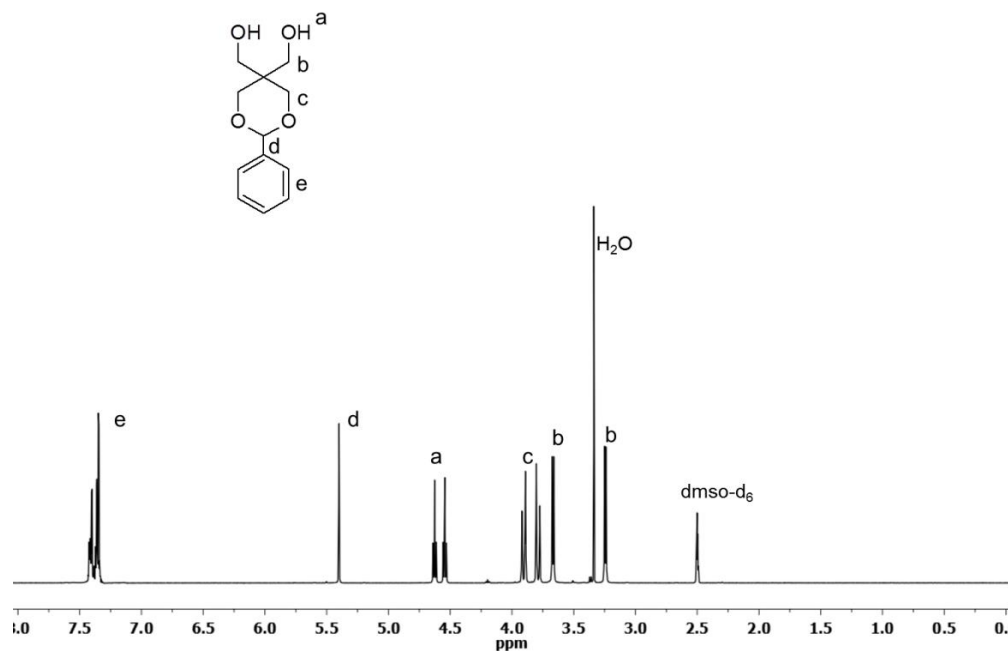


Figura A2 Espectro de RMN ^1H de benzalpentaeeritrol (BTO) en dimetilsulfóxido deuterado.

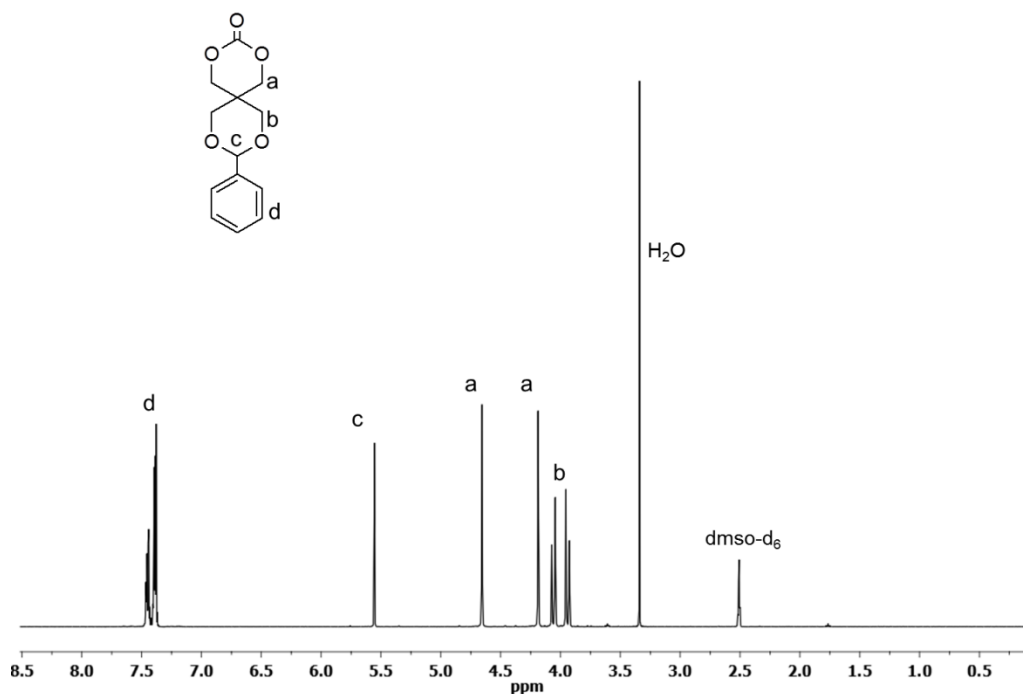


Figura A3 Espectro de RMN ^1H del monómero 9-fenil-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5,5]undecan-3-ona (PTO) en dimetilsulfóxido deuterado.

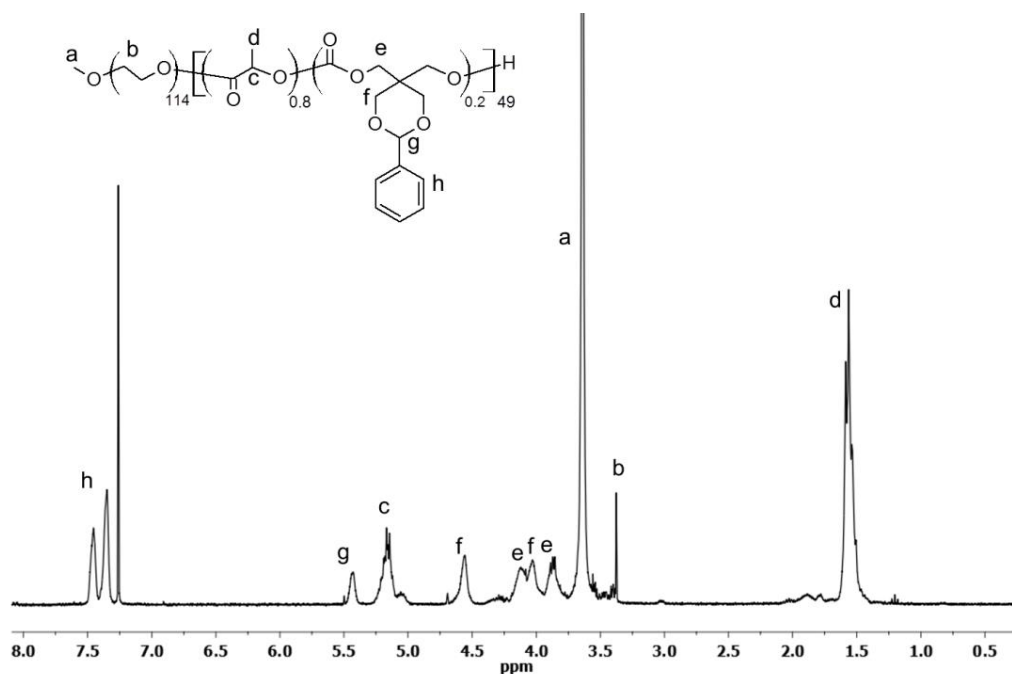


Figura A4 Espectro de RMN ^1H mostrando las señales características de $\text{mPEG}_{114}\text{-}b\text{-P}(\text{PTO}_{0.22}\text{-}co\text{-LA}_{0.78})_{49}$ a 7 h de polimerización en cloroformo deuterado.

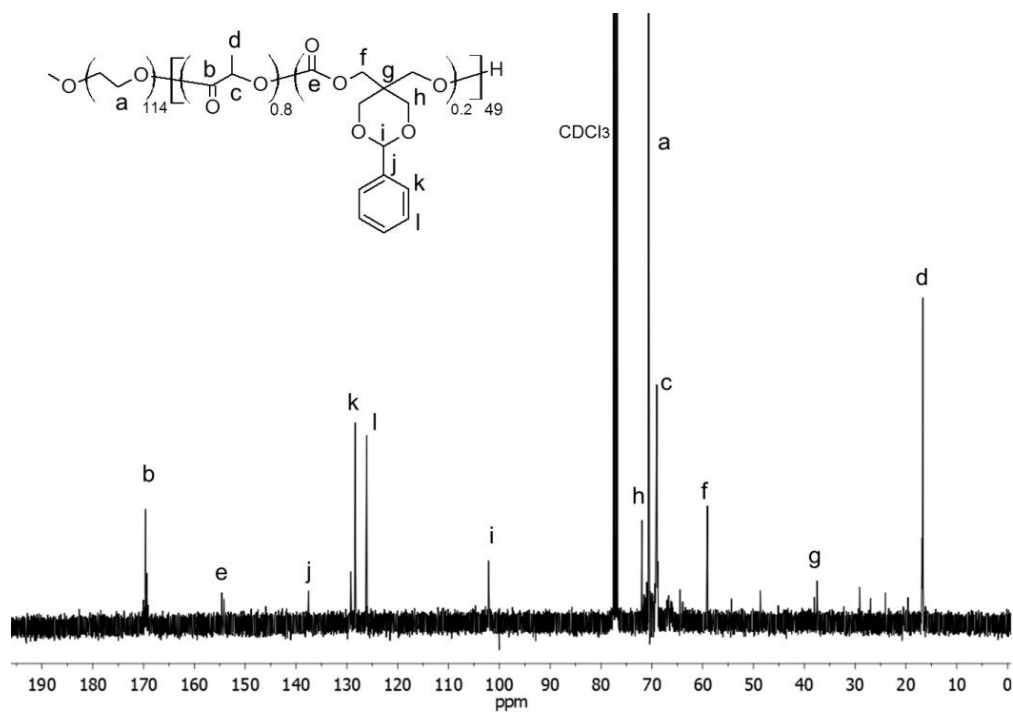


Figura A5 Espectro de RMN ^{13}C mostrando las señales características de $\text{mPEG}_{114}\text{-}b\text{-P}(\text{PTO}_{0.22}\text{-}co\text{-LA}_{0.78})_{49}$ a 7 h de polimerización.

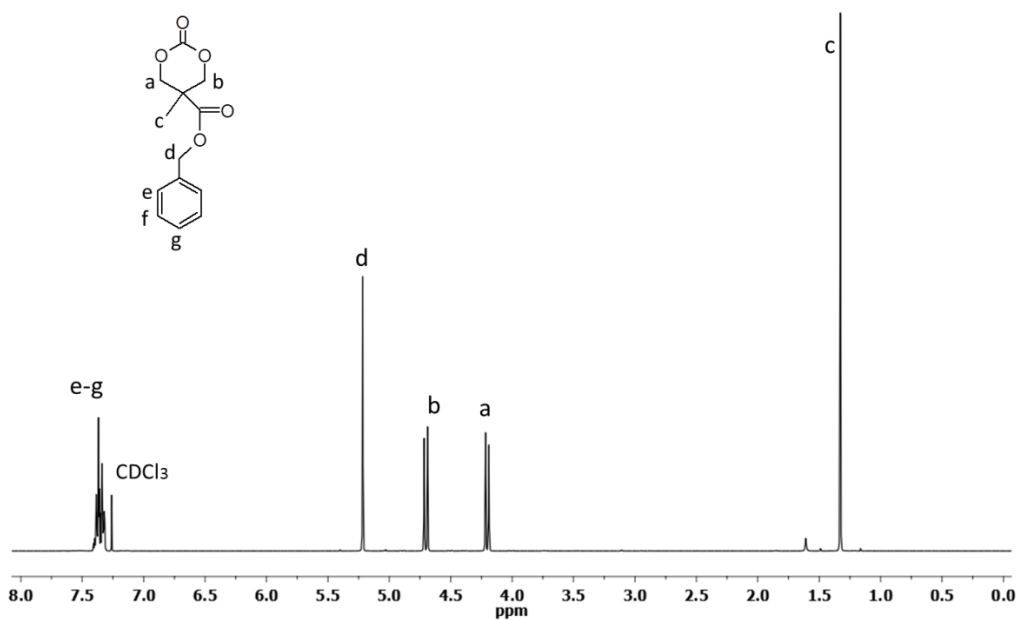


Figura A6 Espectro de RMN ^1H del carbonato de 5-metil-5-benziloxicarbonil-1,3-trimetileno.

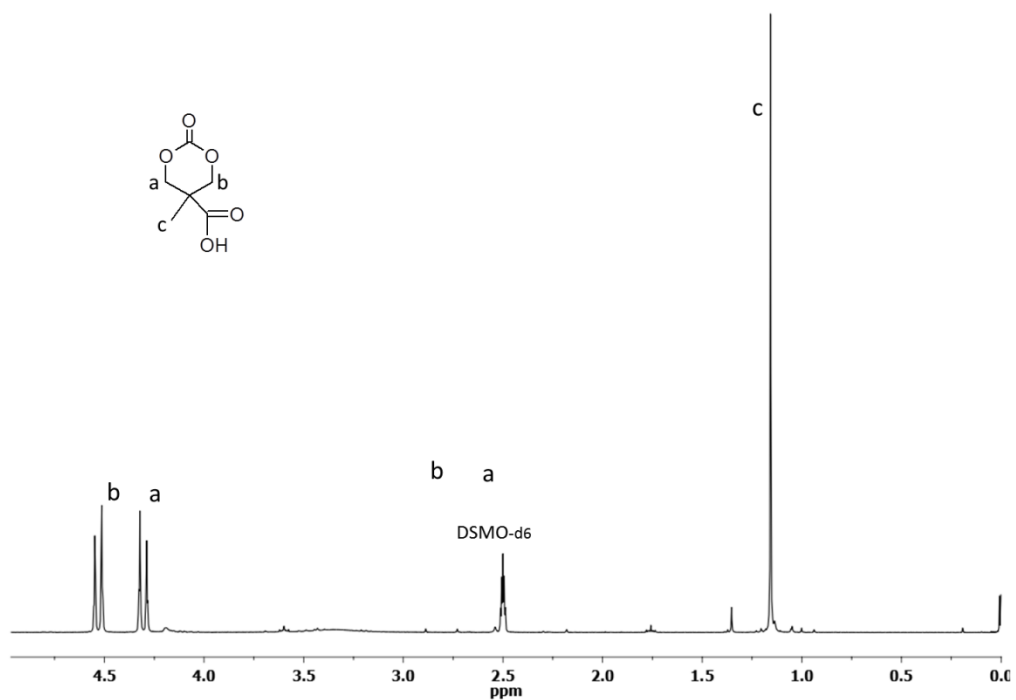


Figura A7 Espectro de RMN ¹H de MTC.

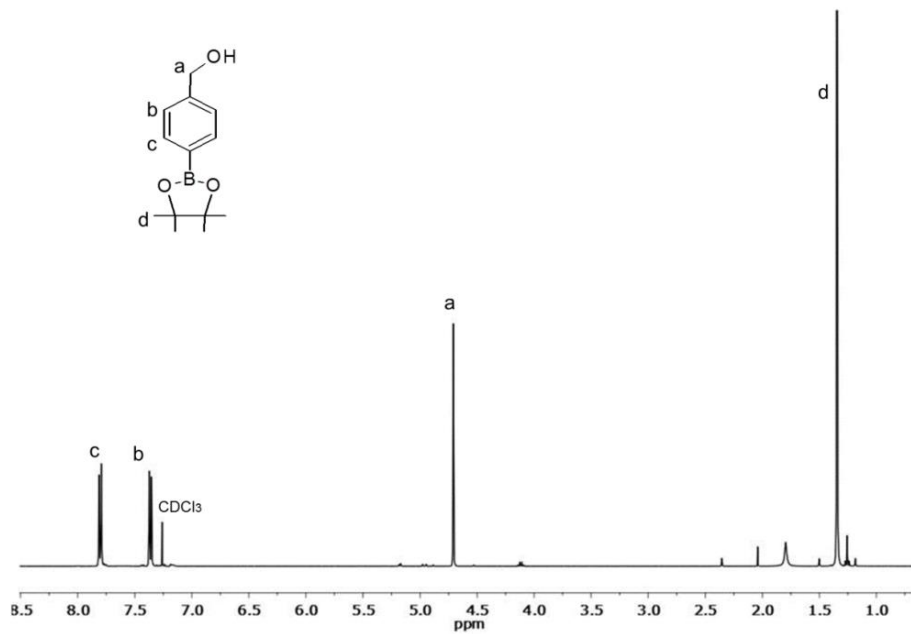


Figura A8 Espectro de RMN ¹H de ácido 4-hidroxifenilborónico pinacol ester.

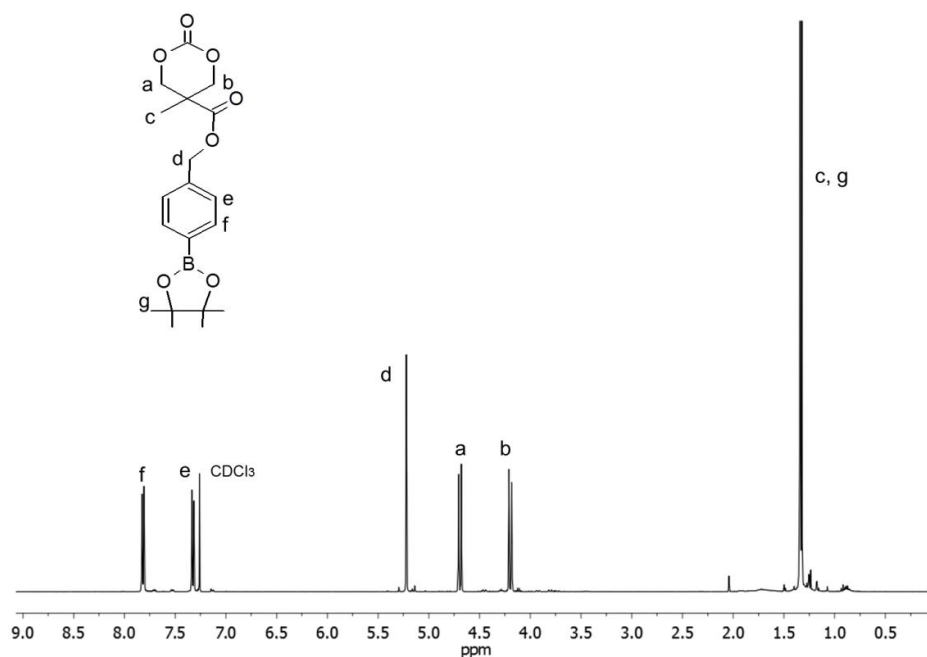


Figura A9 Espectro de RMN ^1H de MTC-ácido 4-hidroxifenilborónico, dimetil-2,3-propanediol ester (PBC).

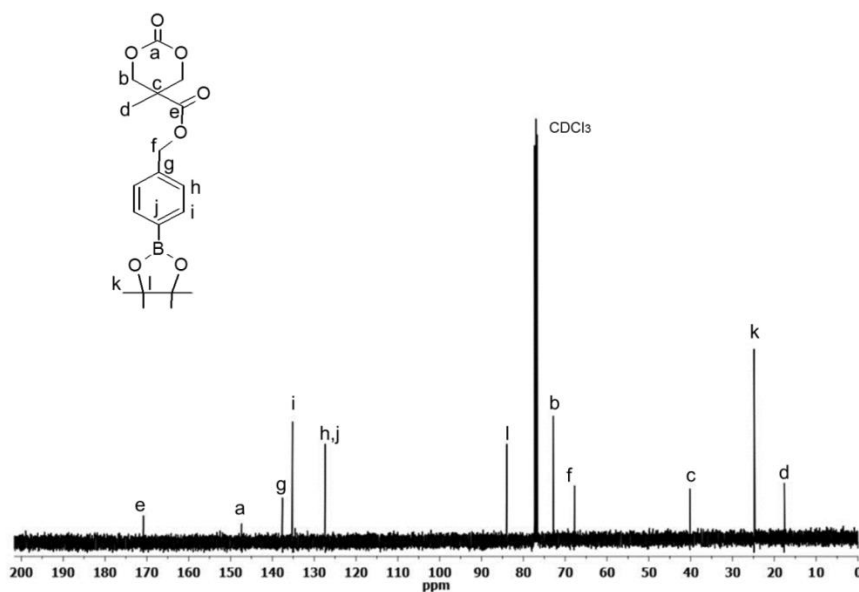


Figura A10 Espectro de RMN ^{13}C de PBC.

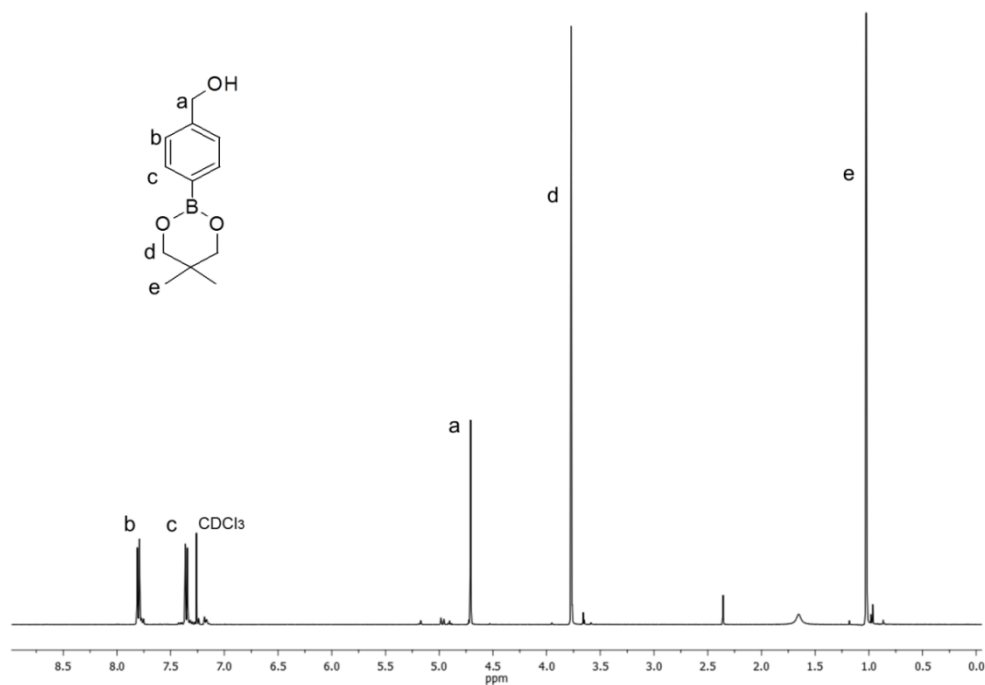


Figura A11 Espectro de RMN ^1H de ácido 4-hidroxifenilborónico dimetil-1,3-propanediol ester.

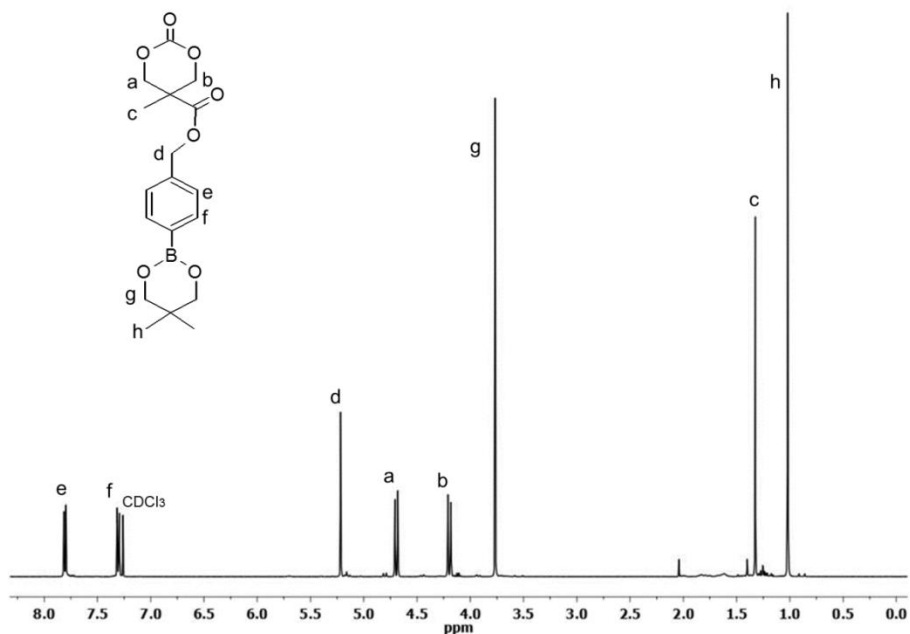


Figura A12 Espectro de RMN ^1H de ácido MTC-ácido 4-hidroxifenilborónico, dimetil-1,3-propanediol ester (PBE).

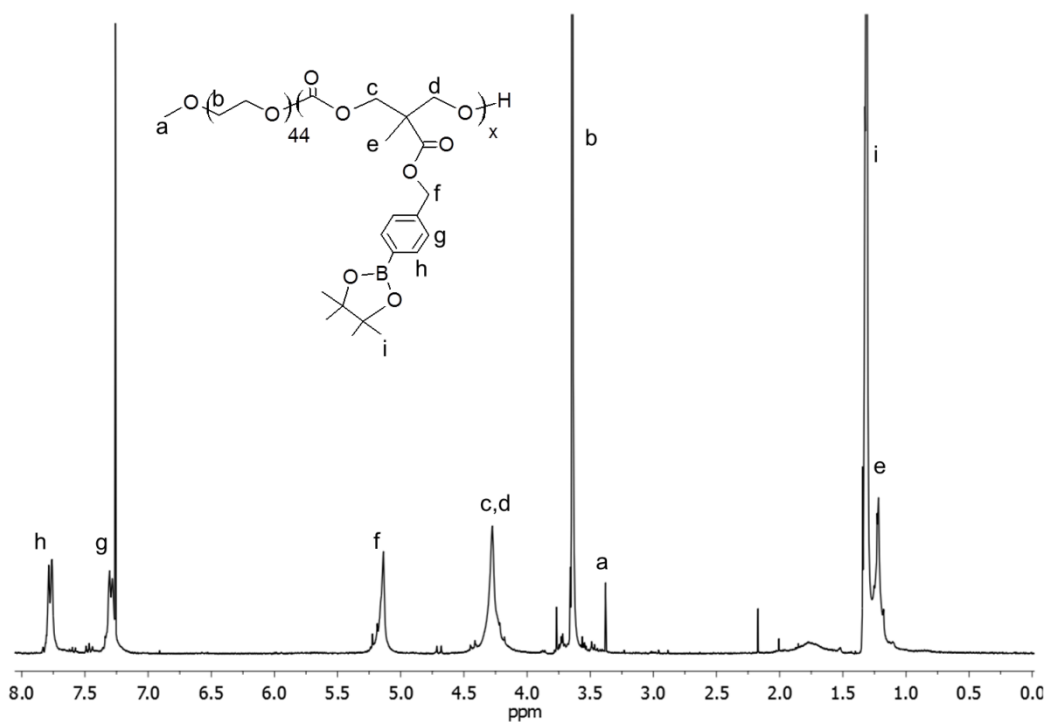


Figura A13 Espectro de RMN ^1H del copolímero mPEG-*b*-PPBC protegido con pinacol.

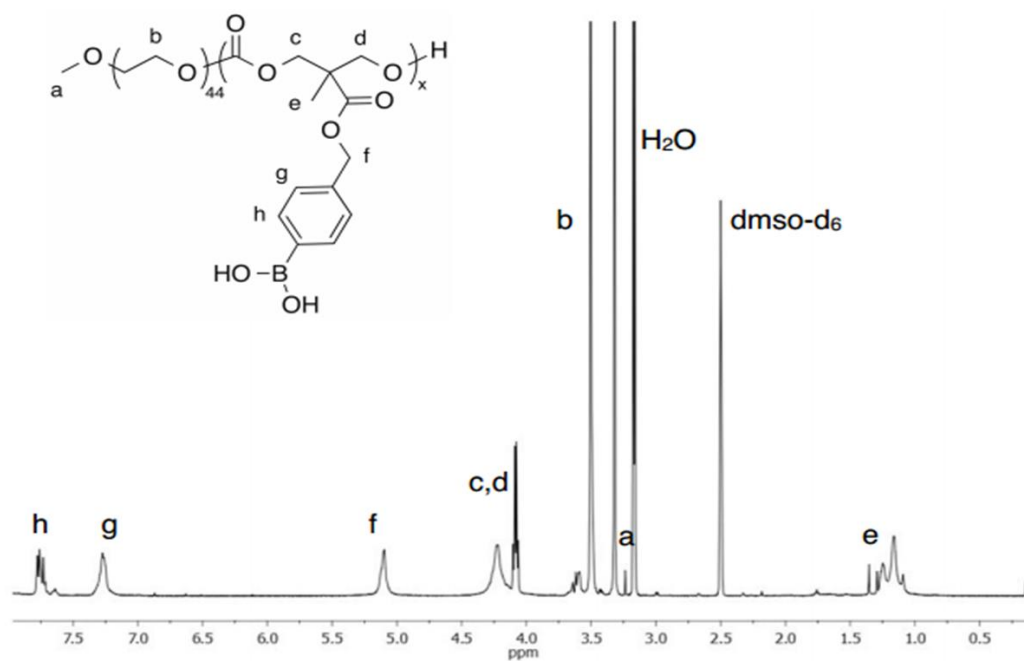


Figura A14 Espectro de RMN ^1H del copolímero mPEG-*b*-PPBC desprotegido.

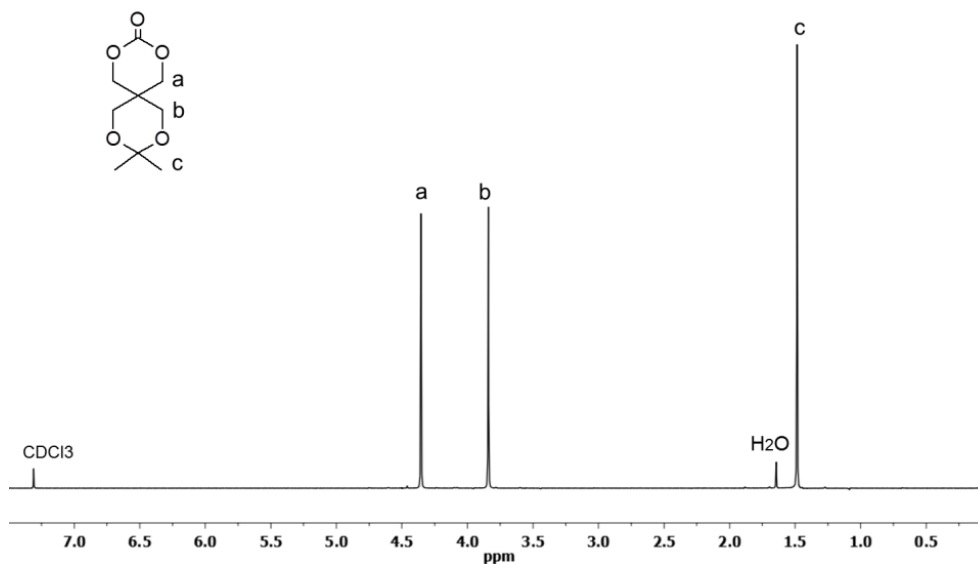


Figura A15 Espectro de RMN ^1H del monómero DM sintetizado.

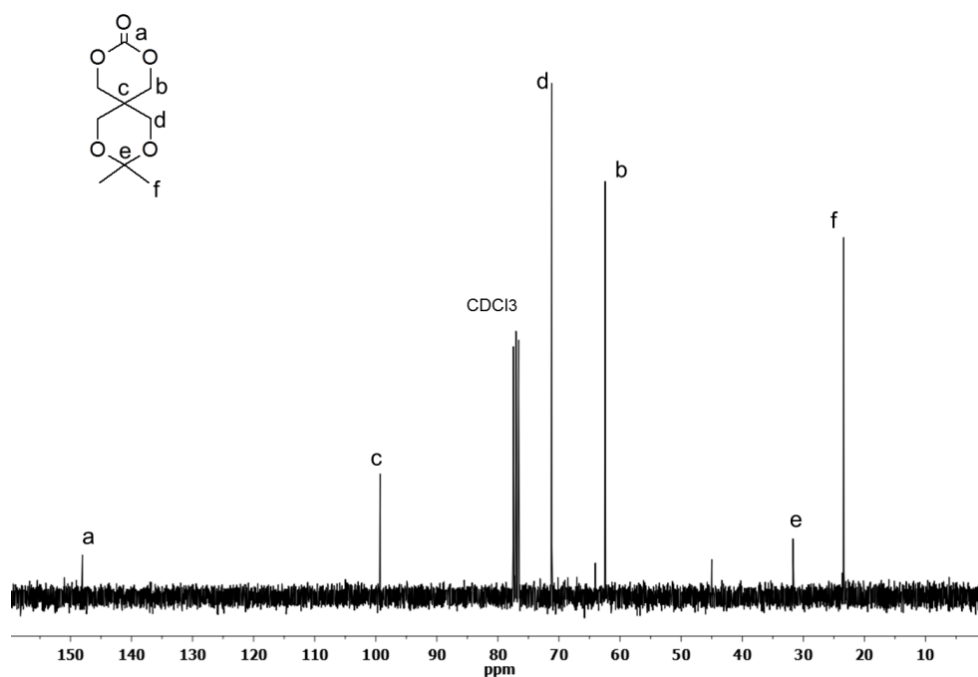


Figura A16 Espectro de RMN ^{13}C del monómero DM en cloroformo deuterado.

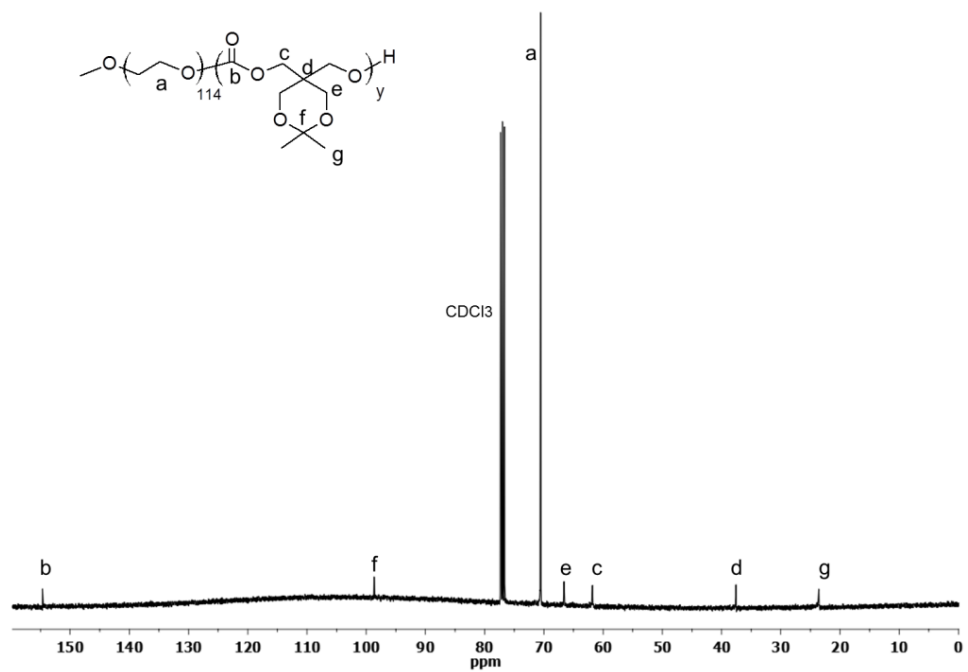


Figura A17 Espectro de RMN ¹³C del polímero mPEG₁₄₄-b-PDM₁₀ cloroformo deuterado.

Apéndice B CROMATOGRAMAS DE GPC

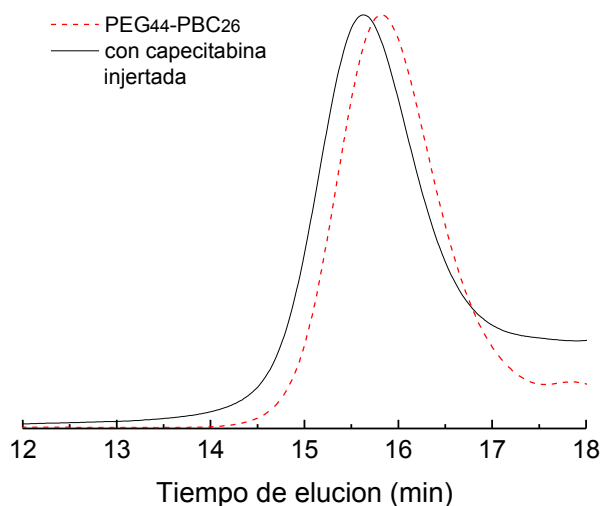


Figura B1 Cromatograma de GPC del polímero y CAPE. Valores de GPC $M_n=9,526$, $M_w=10,421$ e $IPD=1.10$.

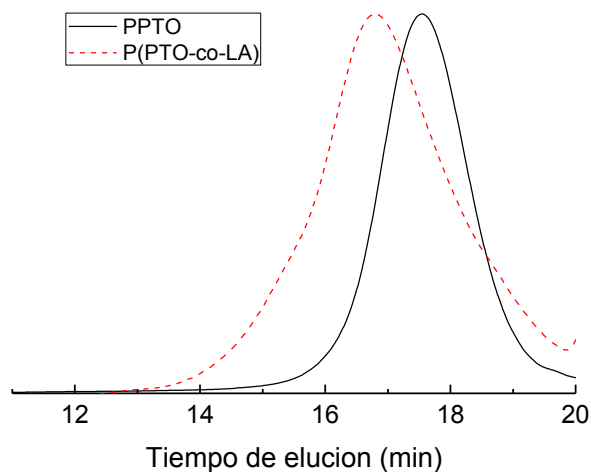


Figura B2 Cromatogramas de GPC para los polímeros iniciados por DBU.

Tabla B1 Polímeros sintetizados en ausencia de iniciador y catalizados mediante DBU, a temperatura ambiente en diclorometano.

Polímero	Tiempo (h)	M_n	M_w	IPD
PPTO	7	2,498	3,083	1.23
P(PPTO-co-LA)	7	3,430	5,451	1.58

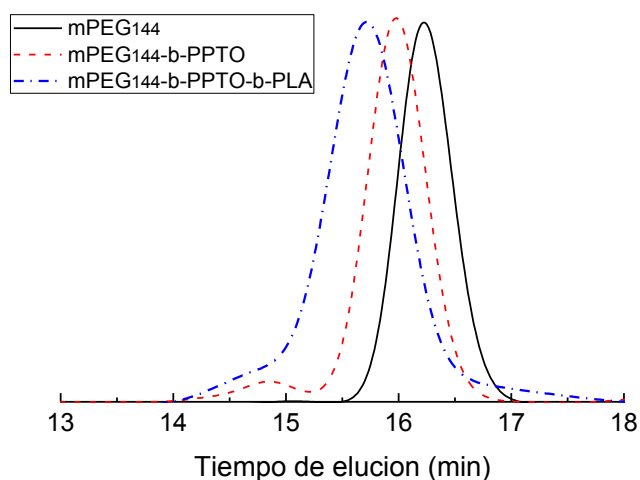


Figura B3 Cromatogramas de copolímeros en bloque mPEG-*b*-PPTO-*b*-DLLA de manera secuencial. La relación usada de M/C fue de 50. Mostrando la eficiencia del uso como macroiniciador del bloque mPEG₁₄₄-*b*-PPTO.

Tabla B2 Datos de GPC para la polimerización secuencial de D,L-lactida usando como macroiniciador mPEG-*b*-PPTO.

Polímero	Bloque hidrofóbico, M_n^a	M_n^b	M_w^b	IPD ^b
mPEG- <i>b</i> -PPTO	1,250	6,250	7,491	1.06
mPEG- <i>b</i> -PPTO- <i>b</i> -PLA	3,482	8,482	8,864	1.09

^aPeso molecular determinado mediante RMN ¹H, referenciado de mPEG ($\delta=3.35$ ppm).

^bPeso molecular e índice de polidispersidad determinado mediante GPC.

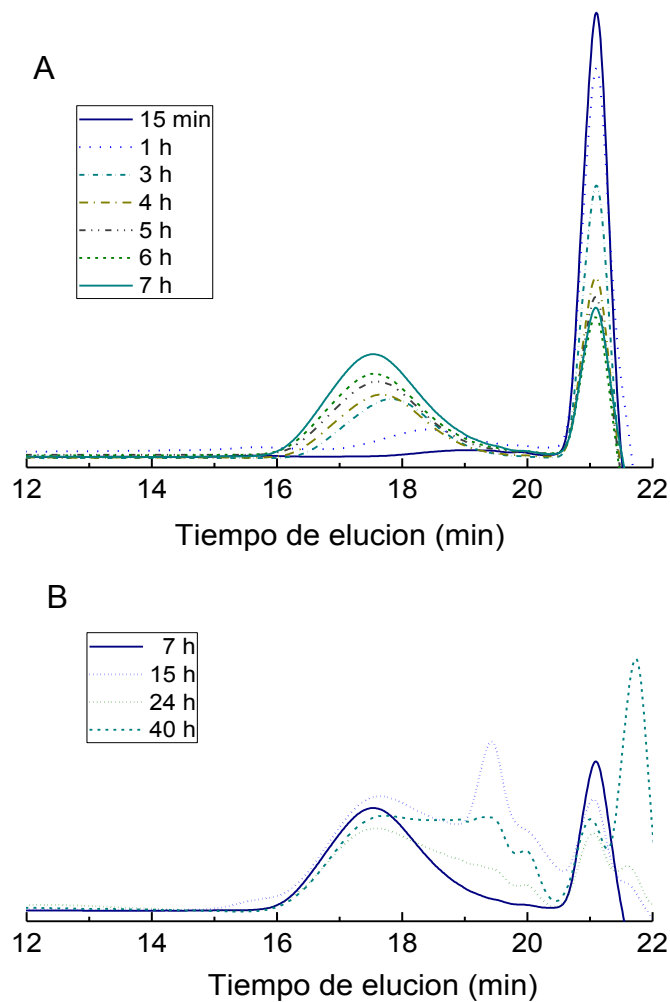


Figura B4 Cromatogramas de PPTO iniciado con 1-dodecanol, durante 40 horas de reacción. (A) Se observa un ligero desplazamiento a mayores pesos moleculares y la disminución de la señal del monómero a 21 min de elución. (B) Efecto de la degradación del polímero después de 7 horas de reacción.

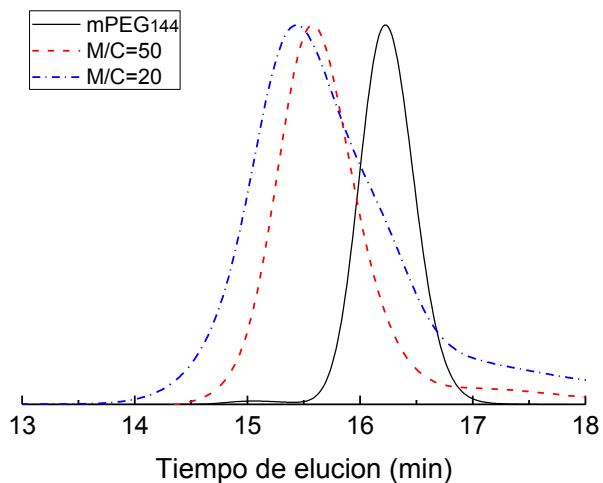


Figura B5 Cromatogramas de copolímeros en bloque mPEG-*b*-P(PTO-*co*-DLLA) por GPC, mostrando el efecto del contenido de DBU. Muestras tomadas a 2 h de polimerización.

Tabla B3 Datos de los copolímeros sintetizados variando la cantidad de catalizador.

M/DBU	M_n	M_w	IPD
20	2,498	3,083	1.23
50	3,430	5,451	1.58

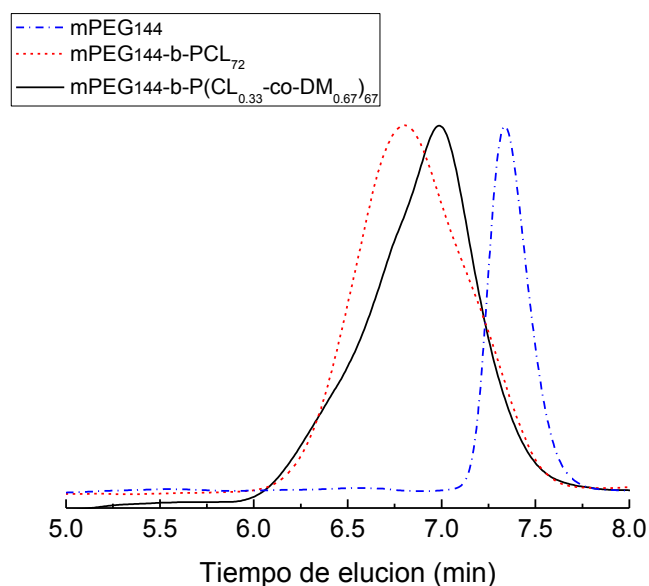


Figura B6 Cromatograma de GPC del copolímero con ϵ -caprolactona, sintetizado a 1 h de reacción usando como catalizador octanoato estaño.

Tabla B4 Polímeros con ϵ -caprolactona.

Polímero	Mn ^a	Mn ^b	IPD ^b
mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -PCL ₇₂	13,218	22,341	1.42
mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -P(CL _{0.33} -co-DM _{0.67}) ₆₇	14,580	20,722	1.47

^aPeso molecular determinado mediante RMN ¹H, referenciado de mPEG ($\delta=3.35$ ppm). ^bPeso molecular e índice de polidispersidad determinado mediante GPC.

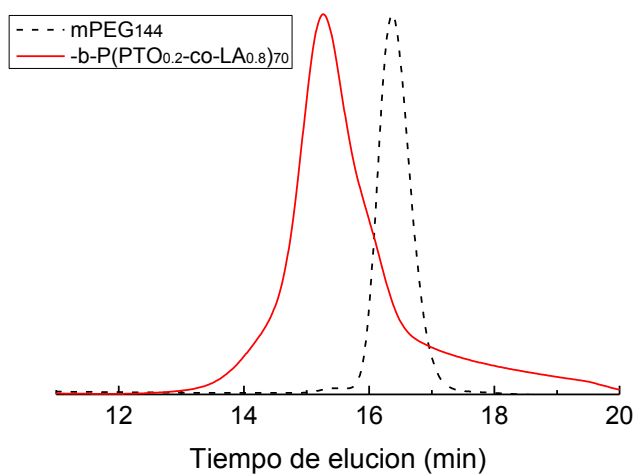


Figura B7 Cromatogramas de GPC para el aumento del bloque PPTO, Mn=12,190 y PDI=1.06.

Apéndice C TERMOGRAMAS DE DSC Y TGA

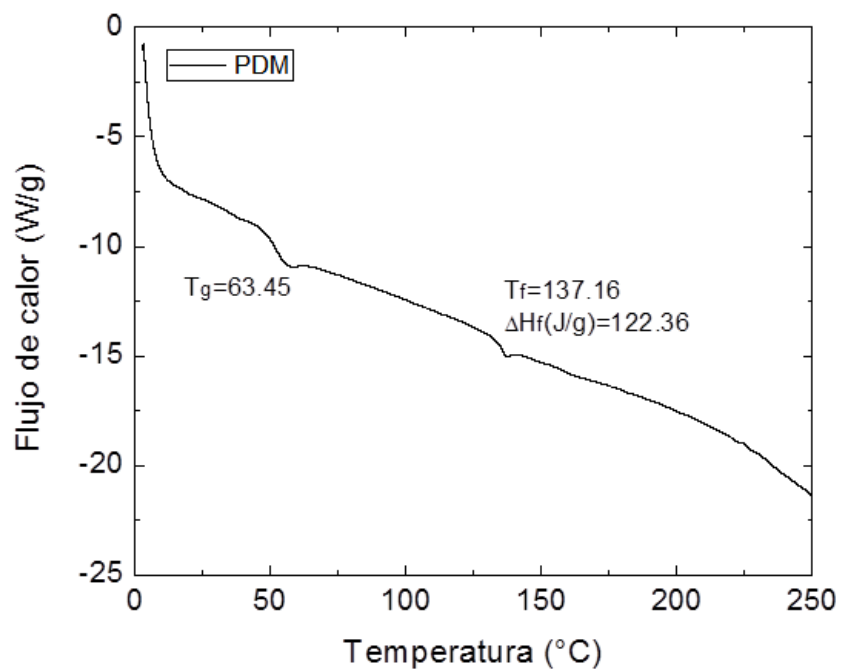


Figura C1 Termograma de DCS del hopolímero PDM.

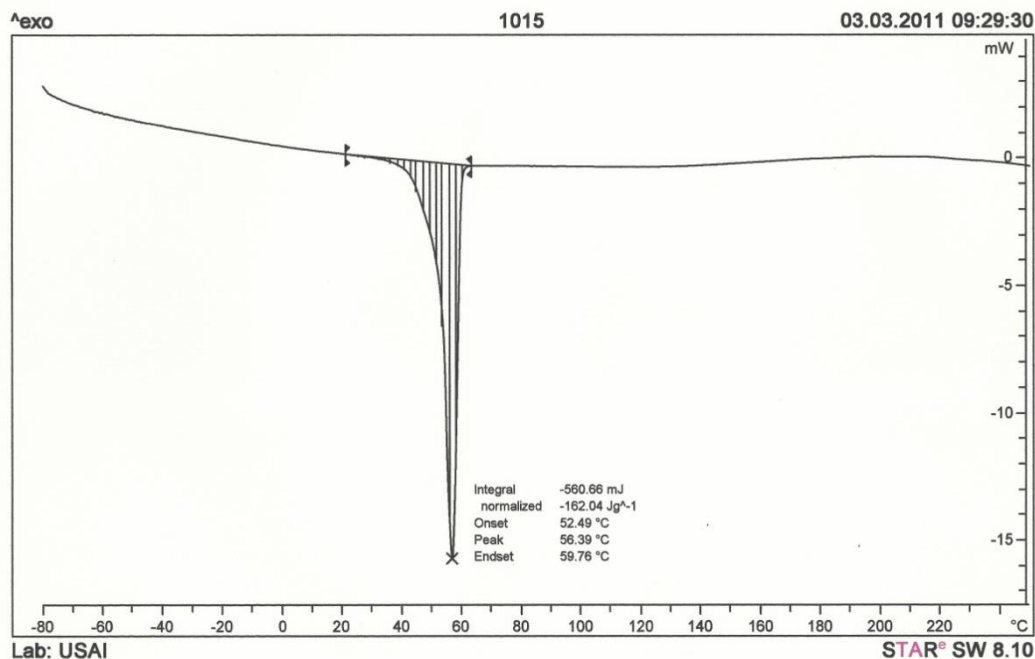


Figura C2 DSC del polímero mPEG₁₁₄-b-PDM₁₀ a 5 h de reacción.

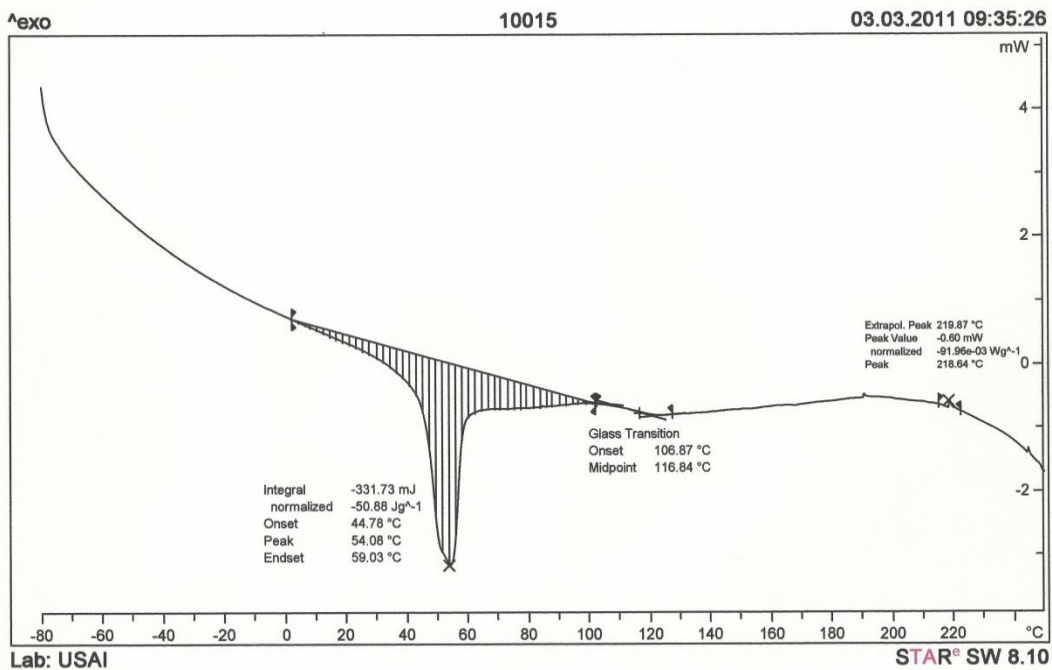


Figura C3 DSC del polímero mPEG₁₁₄- b-PDM₁₀₀ a 5 h de reacción.

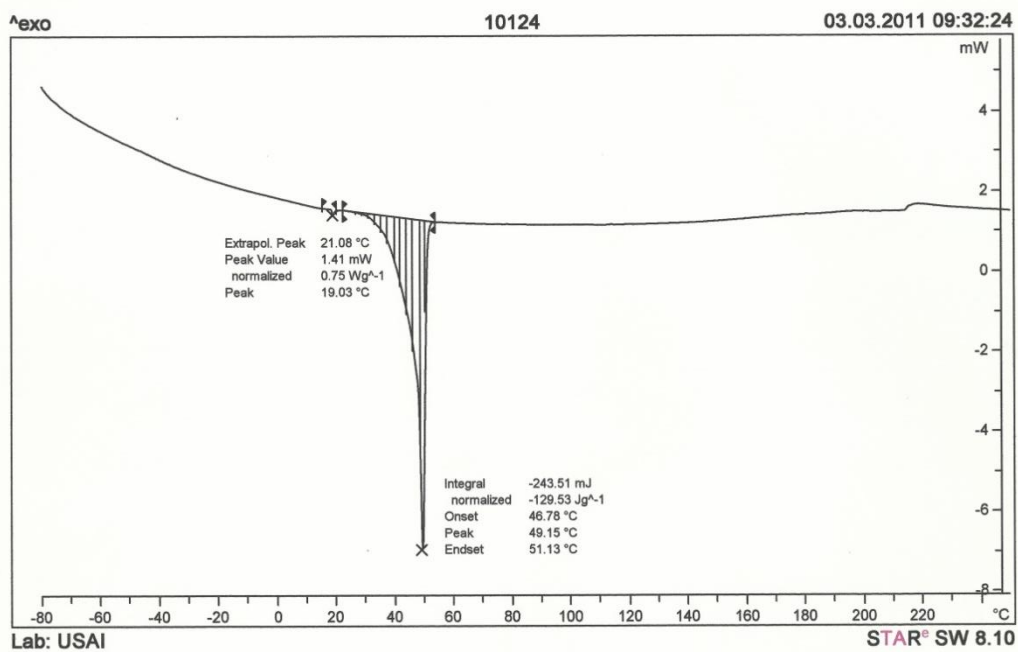


Figura C4 DSC del polímero mPEG₁₁₄- b-PDM₁₀ a 24 h de reacción.

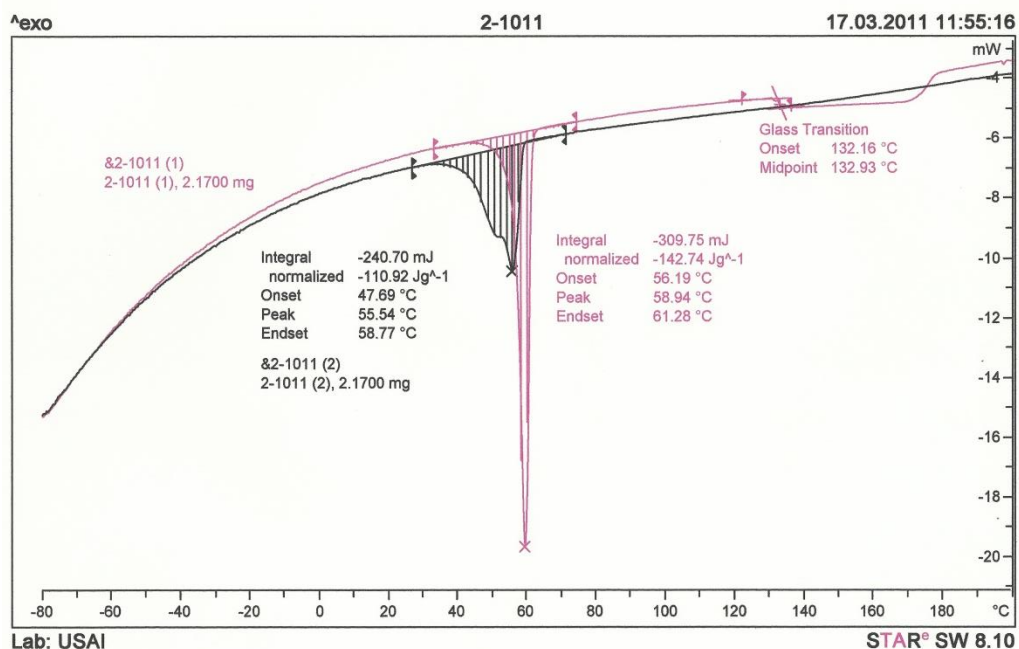


Figura C5 DSC del polímero mPEG₁₁₄- b-PDM₁₀ a 1 h de reacción.

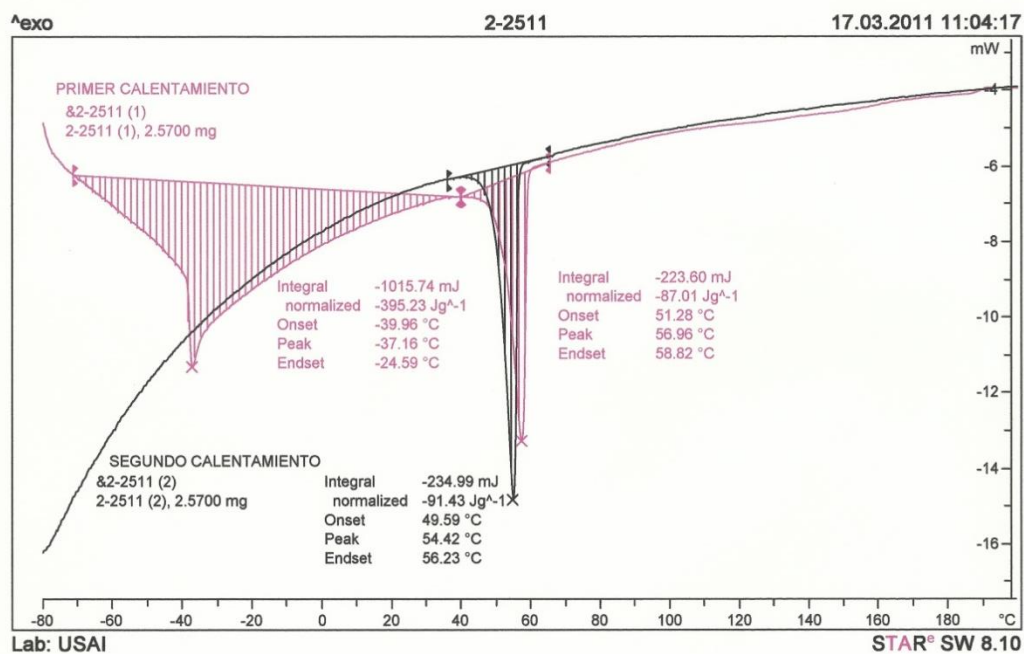


Figura C6 DSC del polímero mPEG₁₁₄- b-PDM₂₅ a 1 h de reacción.

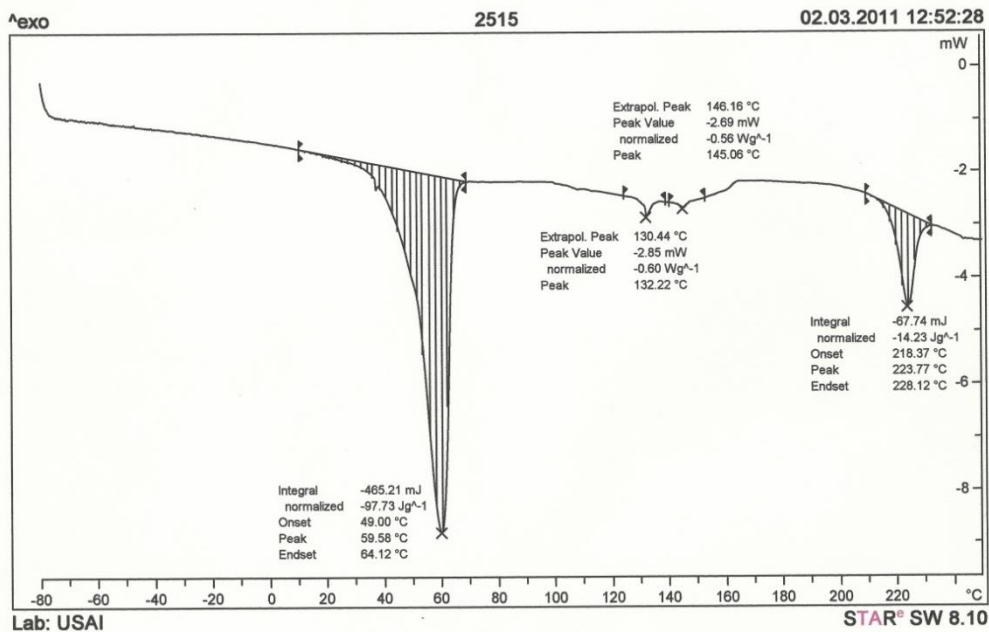


Figura C7 DSC del polímero mPEG₁₁₄- b-PDM₂₅ a 5 h de reacción.

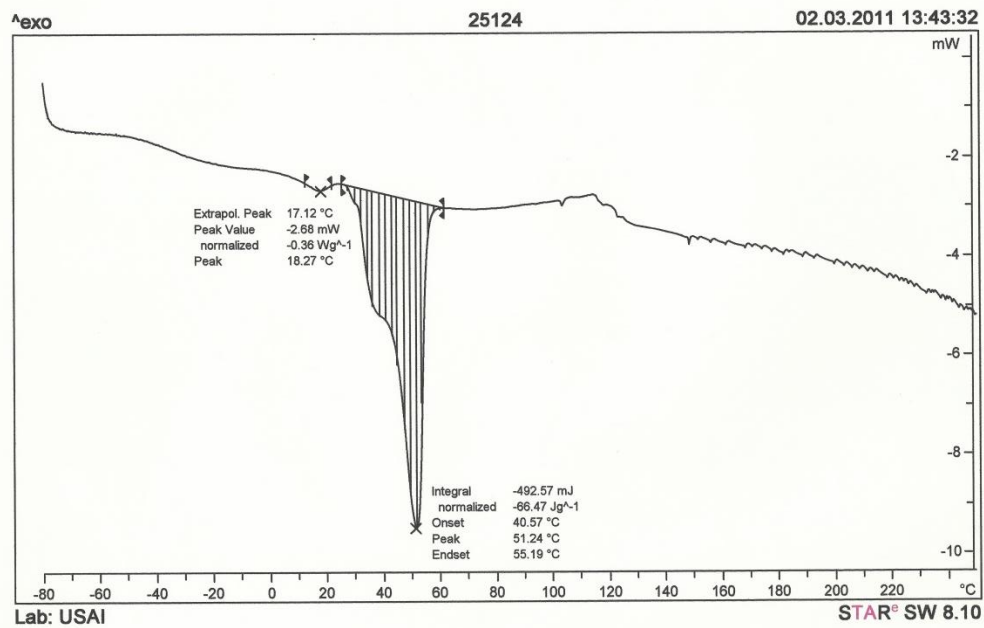


Figura C8 DSC del polímero mPEG₁₁₄- b-PDM₂₅ a 24 h de reacción.

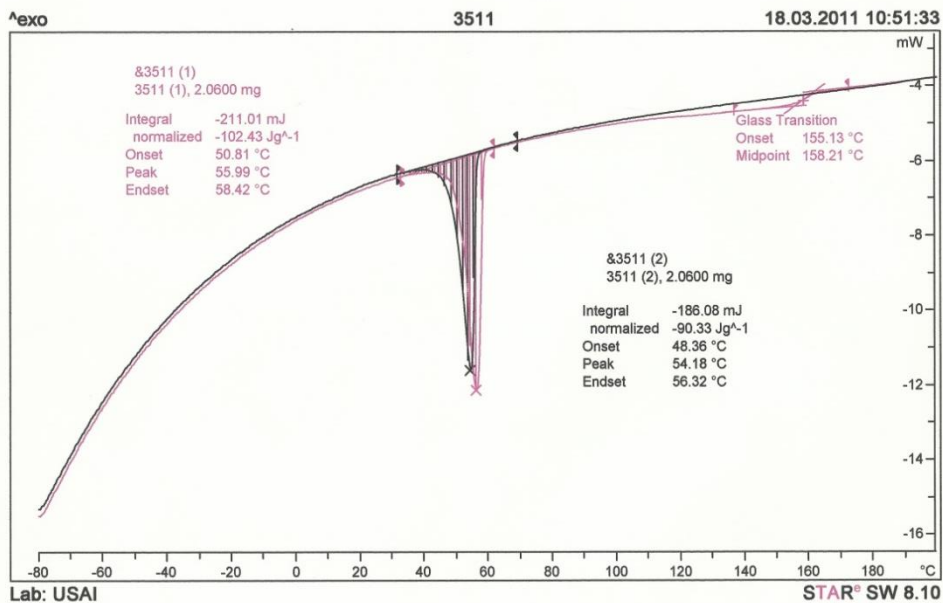


Figura C9 DSC del polímero mPEG₁₁₄- b-PDM₃₅ a 1 h de reacción.

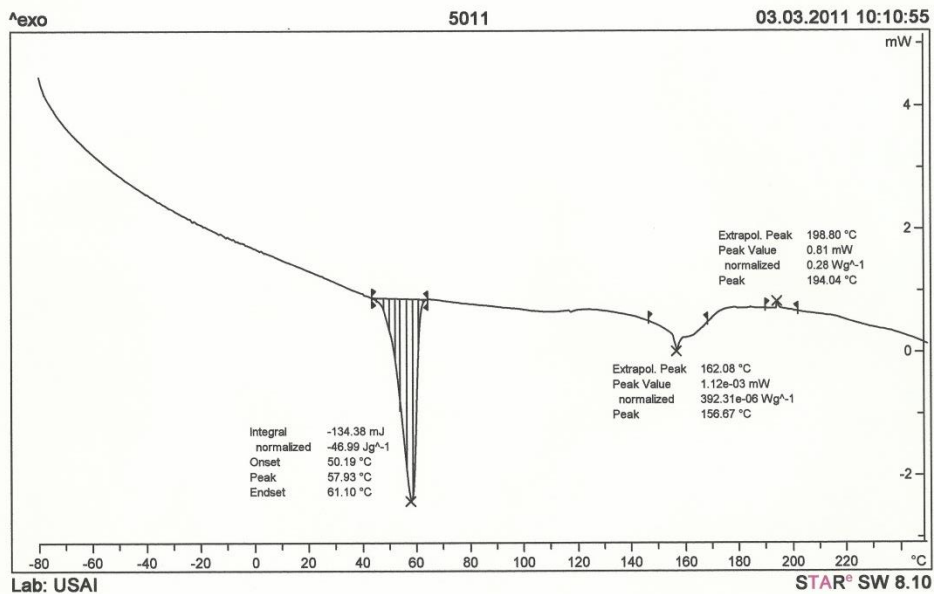


Figura C10 DSC del polímero mPEG₁₁₄- b-PDM₅₀ a 1 h de reacción.

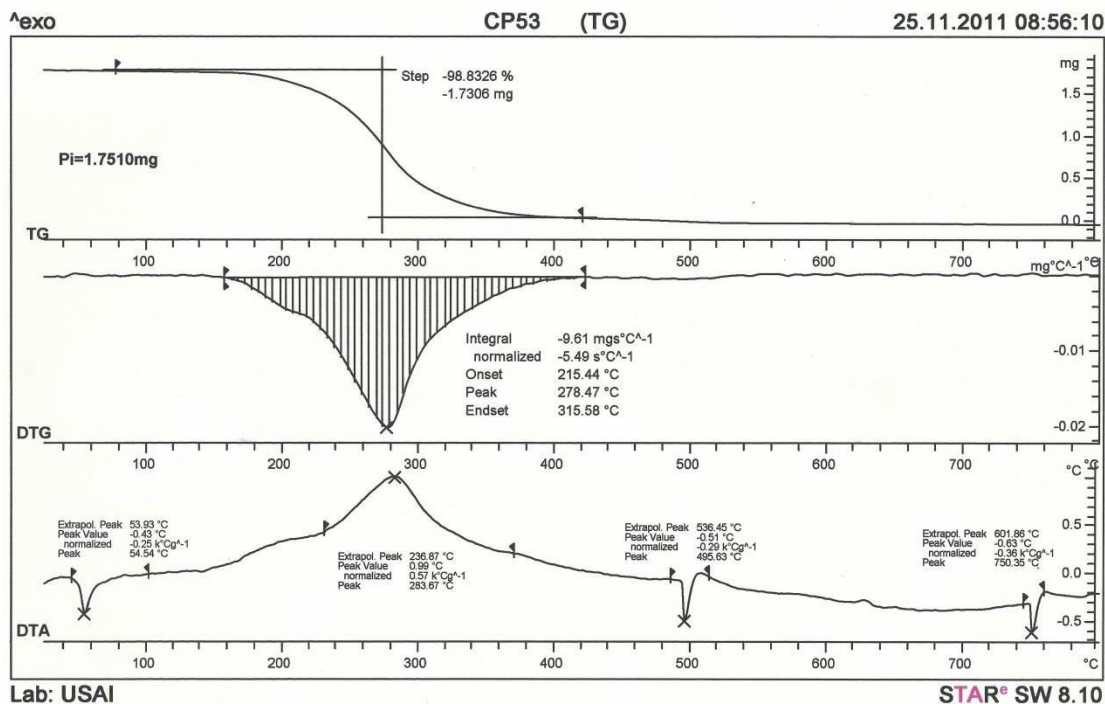


Figura C11 TGA del polímero mPEG₁₁₄- b-PDM₅.

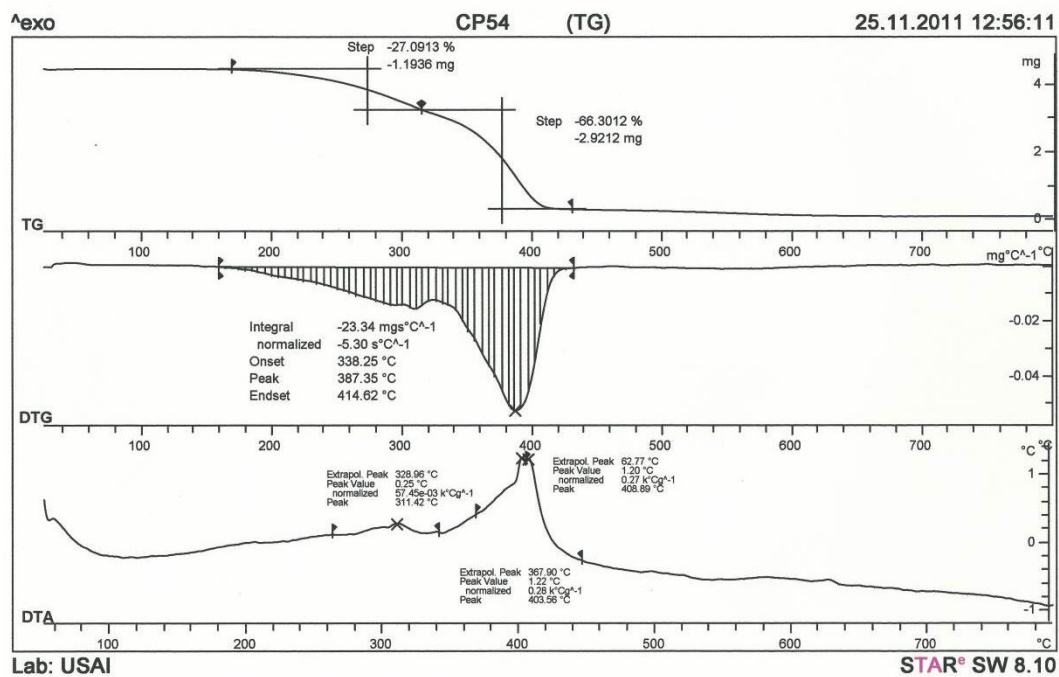


Figura C12 TGA del polímero mPEG₁₁₄- b-PDM₁₀.

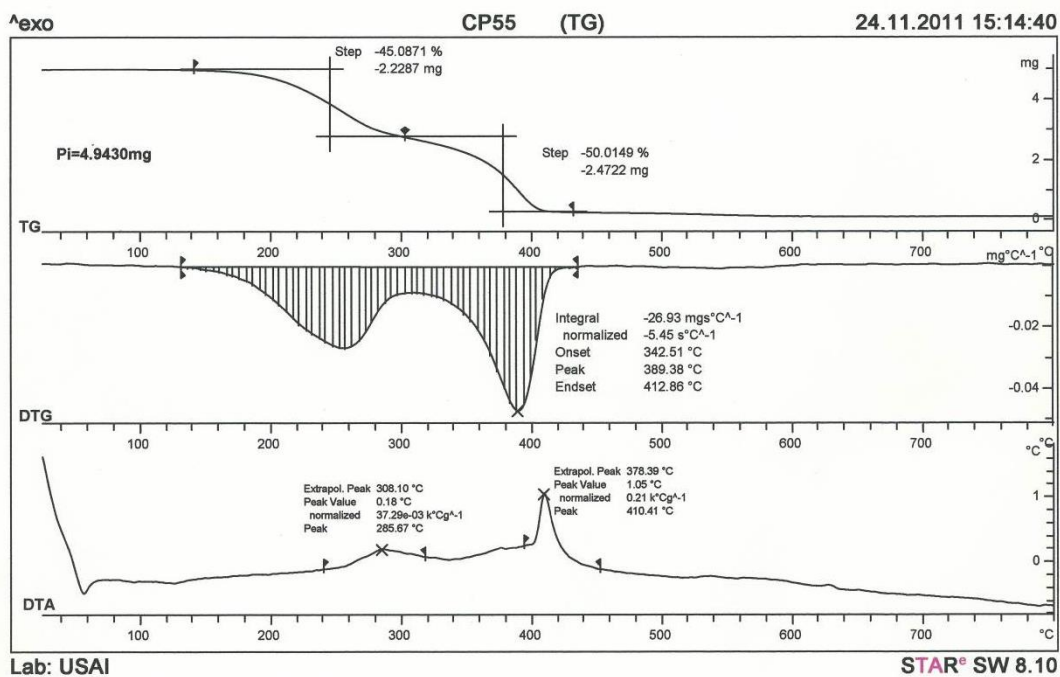


Figura C13 TGA del polímero mPEG₁₁₄- b-PDM₂₅.

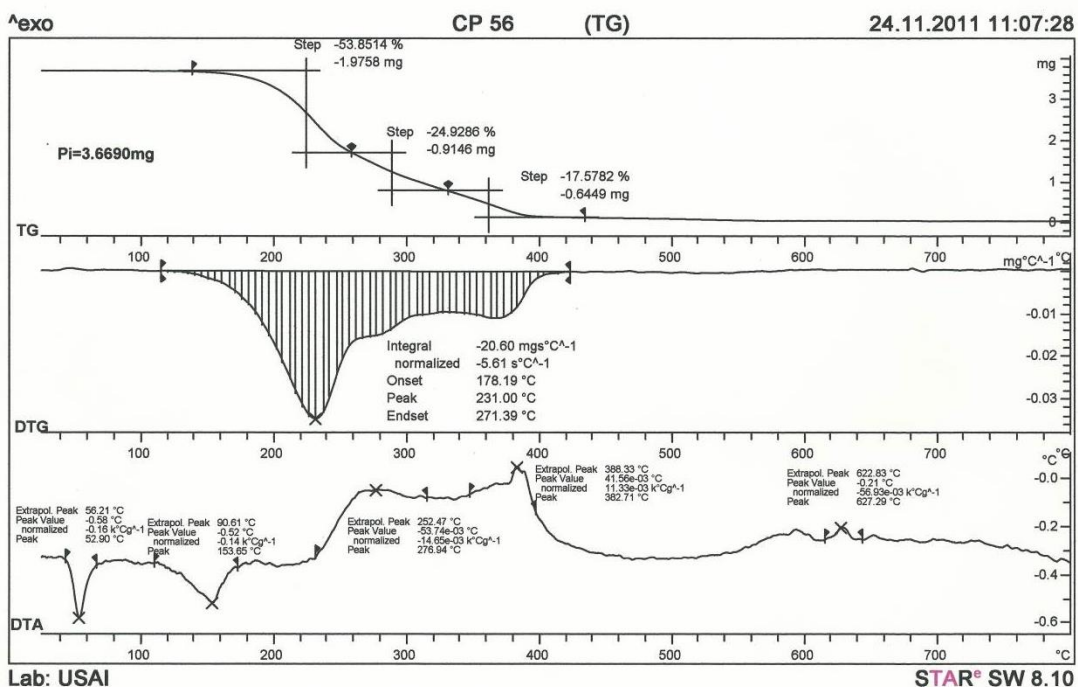


Figura C14 TGA del polímero mPEG₁₁₄- b-PDM₅₀.

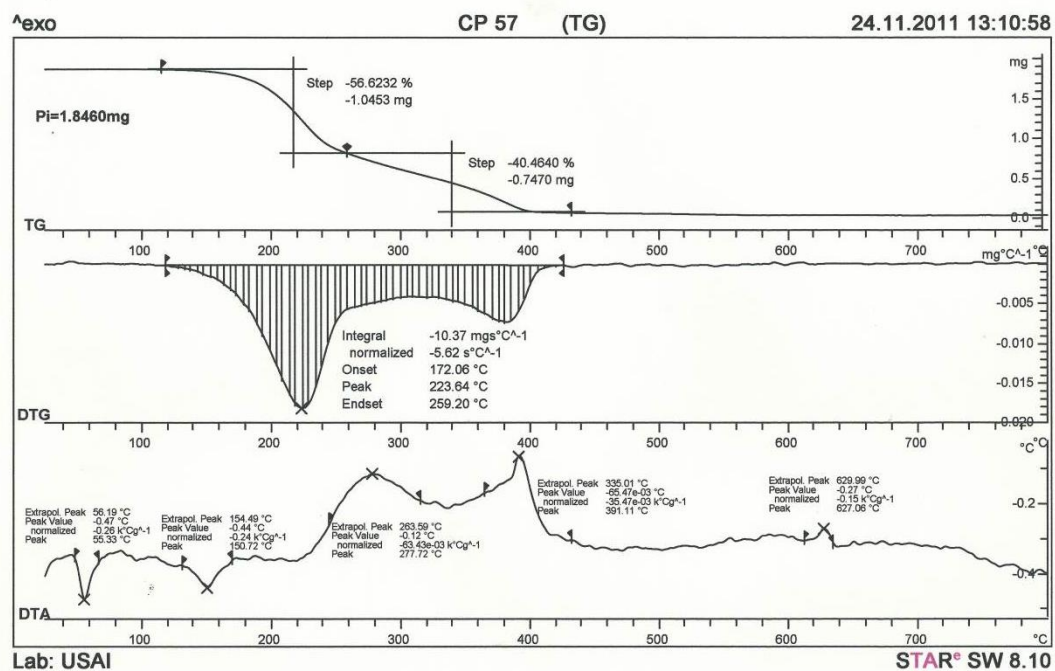


Figura C15 TGA del polímero mPEG₁₁₄- b-PDM₇₅.

Apéndice D MICROGRAFÍAS DE TEM

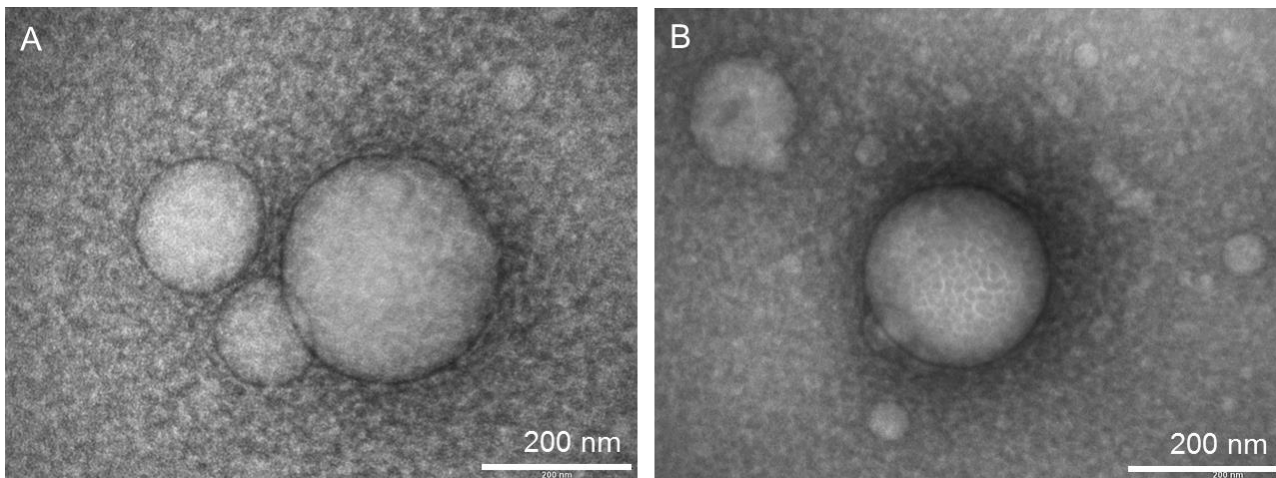


Figura D1 Micrografías de TEM de las vesículas formadas a partir del polímero entrecruzado, usando como número de Reynolds 7,781.

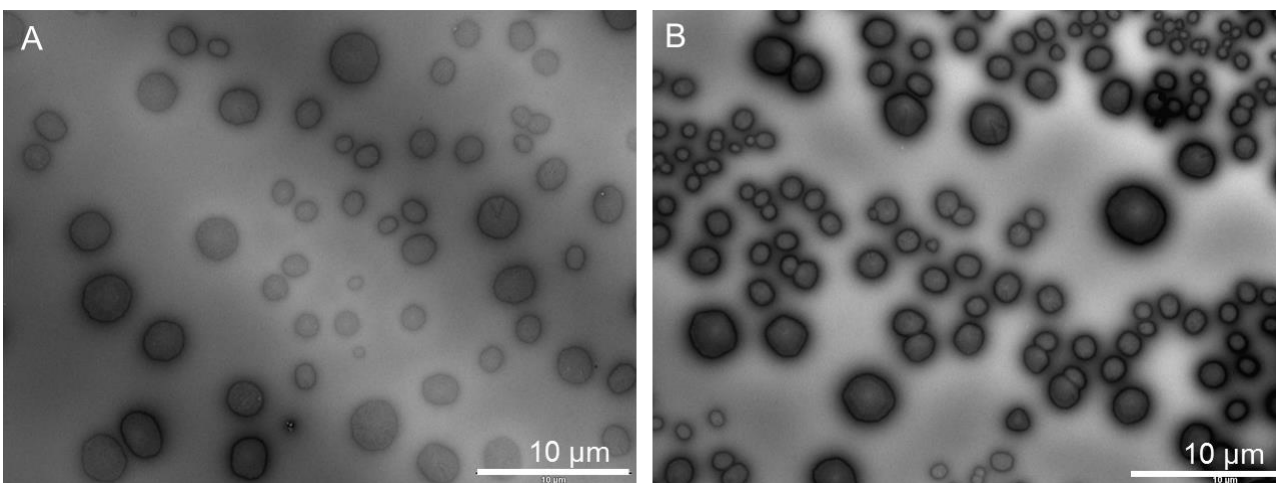


Figura D2 Micrografías de TEM de las vesículas formadas a partir del polímero entrecruzado, usando como número de Reynolds 648.

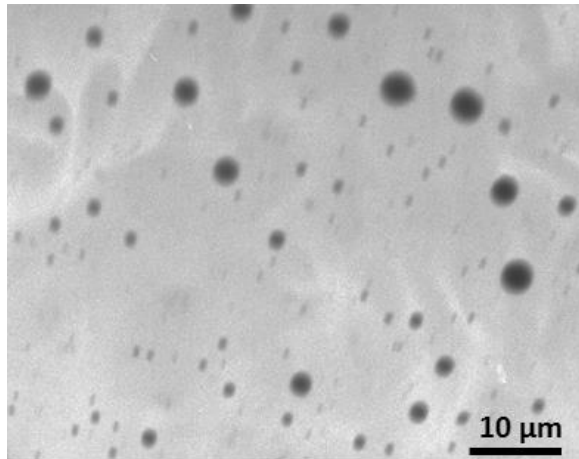


Figura D3 Micrografía de TEM de micelas preparadas del polímero PDM, con peso molecular de 6,212 g/mol.

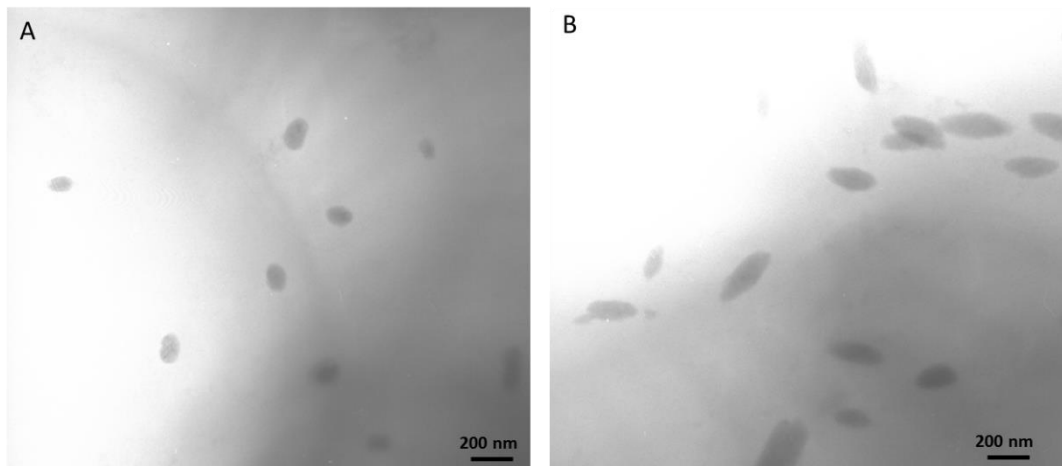


Figura D4 Micrografías de TEM de las partículas formadas a partir de PDM, 14,000 g/mol

Apéndice E ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y UV-VIS

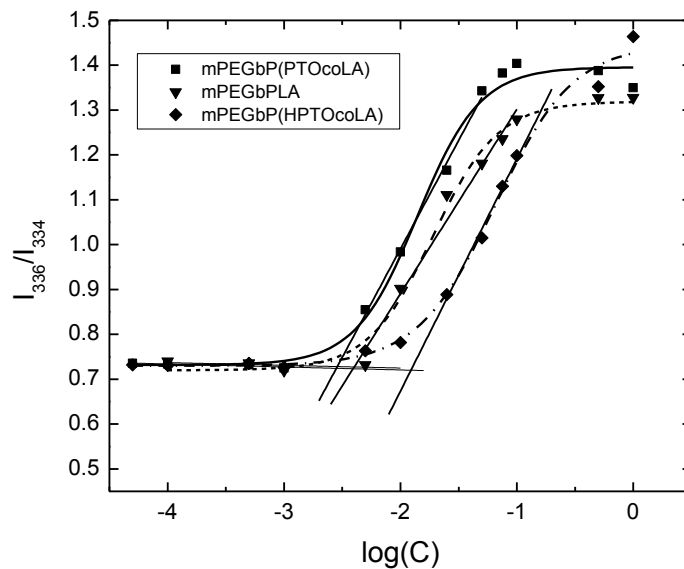


Figura E1 Dados de espectroscopia de fluorescência de pireno encapsulado com los copolímeros anfífilos para determinar la CMC.

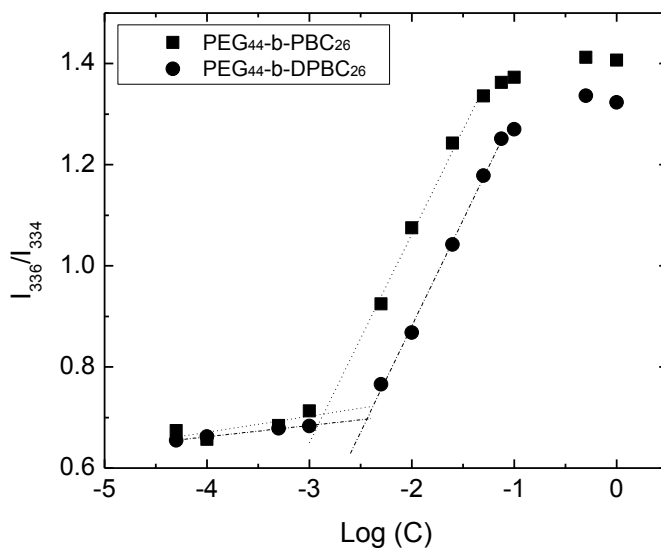


Figura E2 Dados de espectroscopia de fluorescência de pireno encapsulado com PBC, antes y después de la desprotección de grupos ester boronato. La CMC fue determinada de la intersección entre las pendientes trazadas.

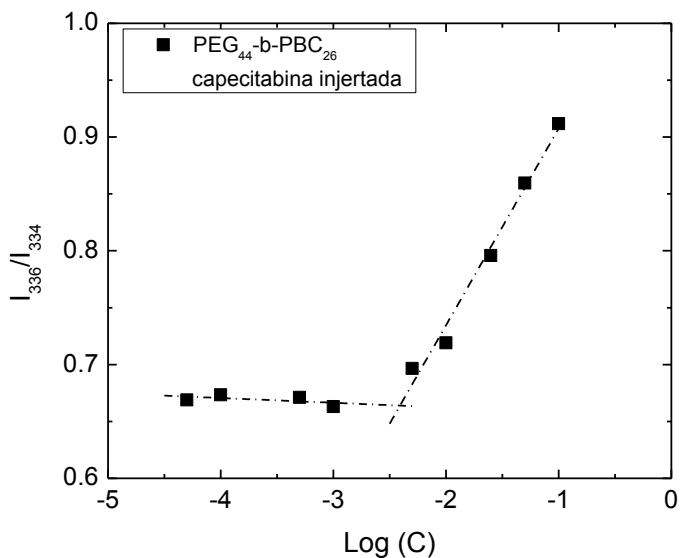


Figura E3 Datos de espectroscopia de fluorescencia de pireno encapsulado después de la conjugación del fármaco capecitabina.

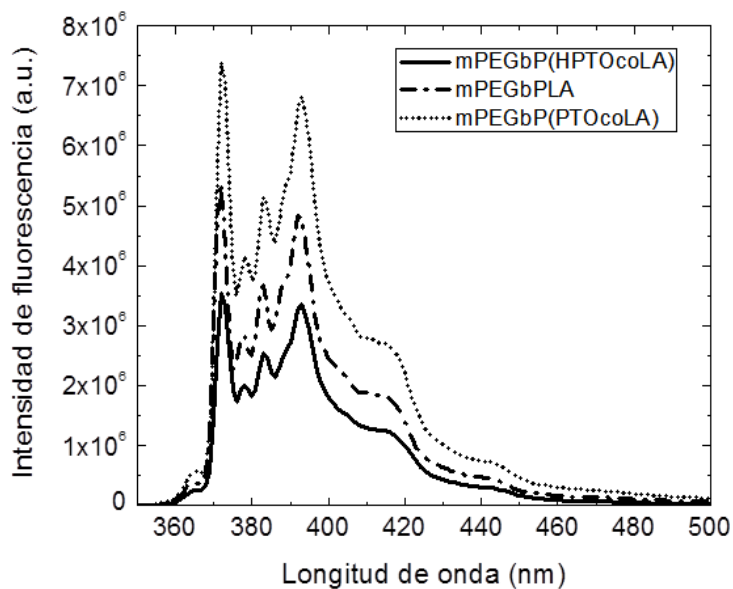


Figura E4 Espectro de emisión de pireno encapsulado en el rango de 360 a 500 nm.

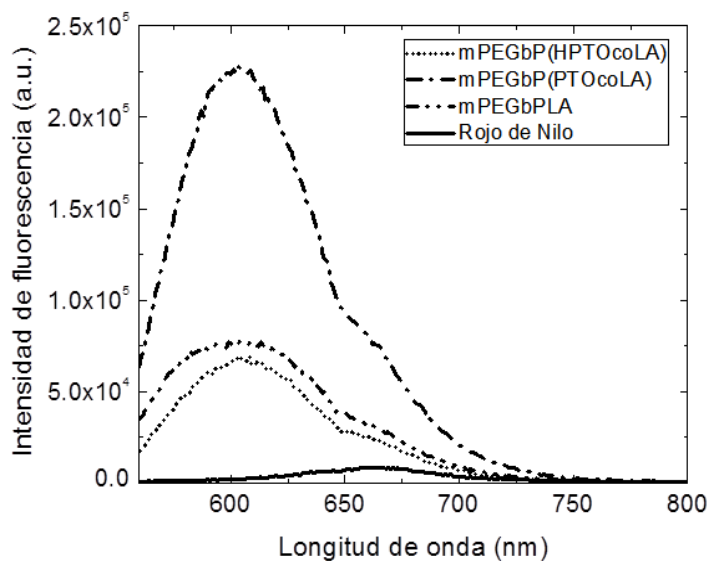


Figura E5 Espectro de emisión de rojo de nilo encapsulado en el rango de 560 a 800 nm, a una excitación de longitud de onda de $\lambda_{ex}=550$ nm.

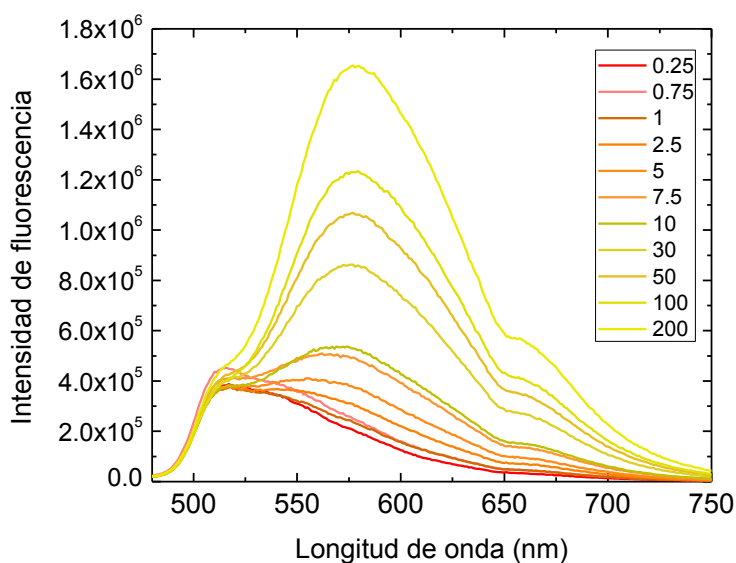


Figura E6 Espectro de emisión de rojo de alizarina S [9×10^{-6} M] variando el número de equivalentes de ácido 4-hidroxifenil borónico en buffer fosfato salino 0.01 M a pH 7.5, $\lambda_{ex}=480$ nm.

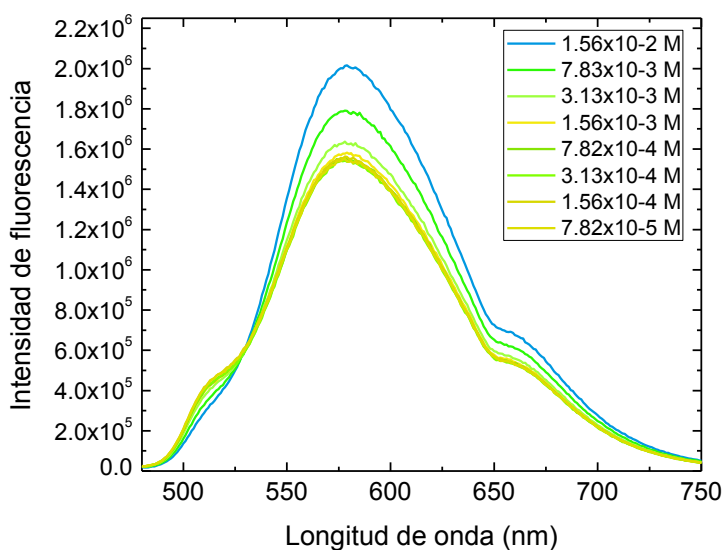


Figura E7 Espectro de emisión de rojo de alizarina S [9×10^{-6} M] con ácido 4-hidroxifenilborónico 6.58×10^{-3} M y variando la concentración molar de CAPE en buffer fosfato salino 0.01 M a pH 7.5, $\lambda_{ex}=480$ nm.

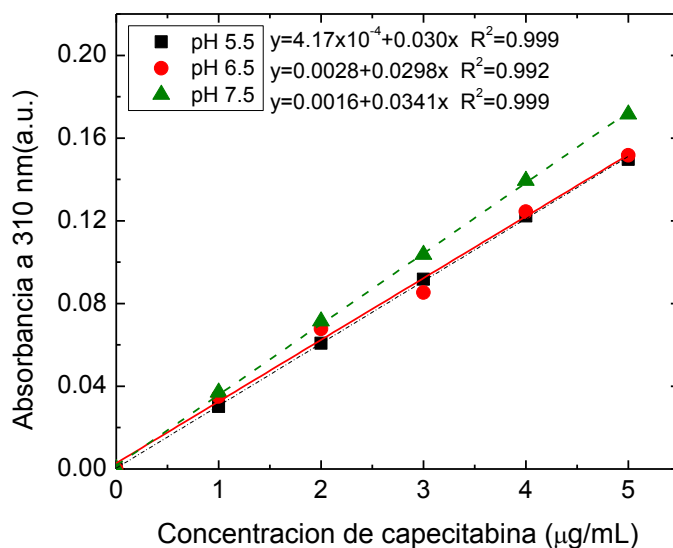


Figura E8 Curvas de calibración de CAPE por UV-vis.

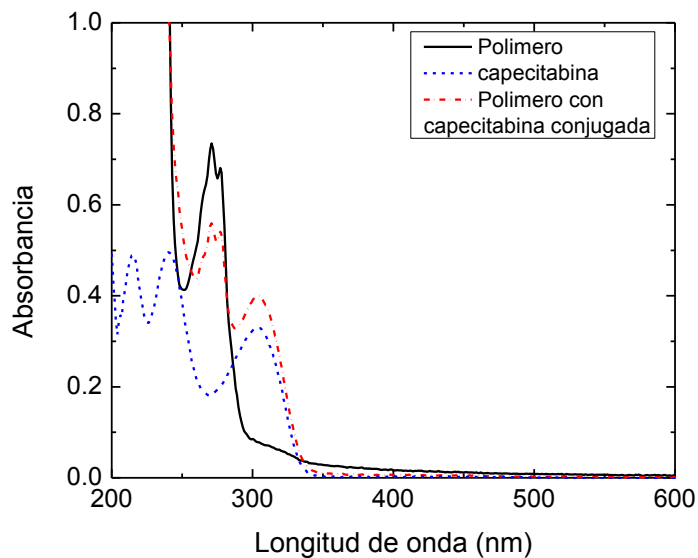


Figura E9 Espectros de UV-vis de las nanopartículas cargadas, no cargadas y el fármaco libre en agua.

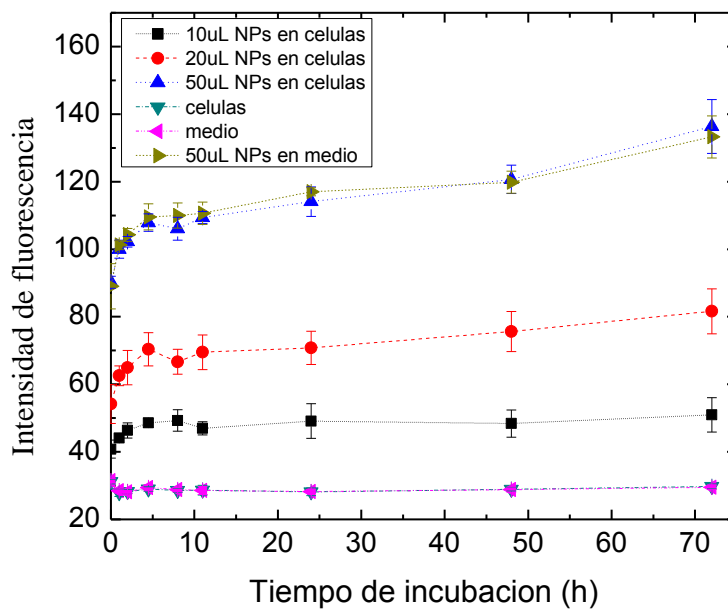


Figura E10 Monitoreo de la intensidad de fluorescencia de ARS en las nanopartículas incubadas en las células MDA-MB-231.

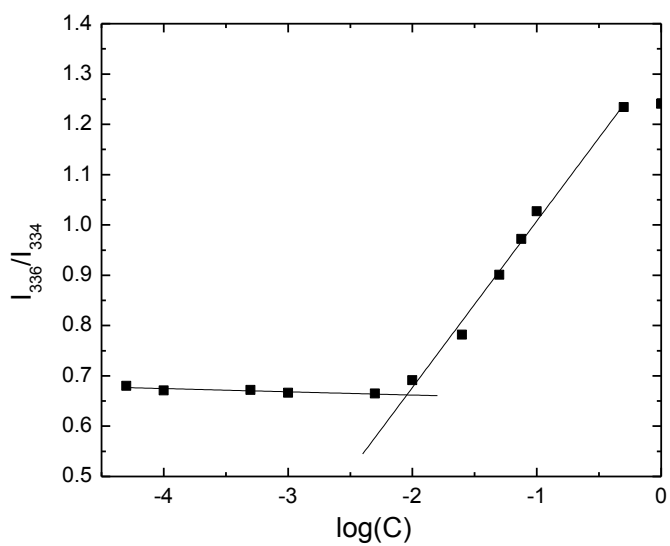


Figura E11 Espectroscopia de fluorescencia de pireno encapsulado en mPEG-*b*-P(HPTODBA-co-DLLA), usado para determinar la CMC.

Apéndice F DISTRIBUCIONES DE DLS

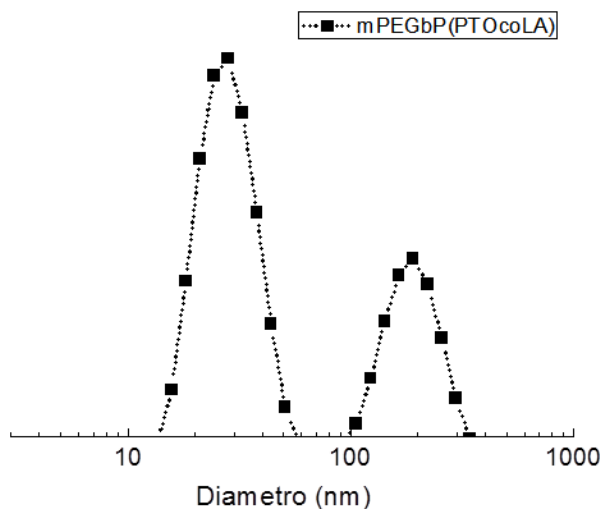


Figura F1 Distribución de diámetros de mPEG-*b*-PLA, con un $D_h=22.07$ nm y una dispersidad de 0.404.

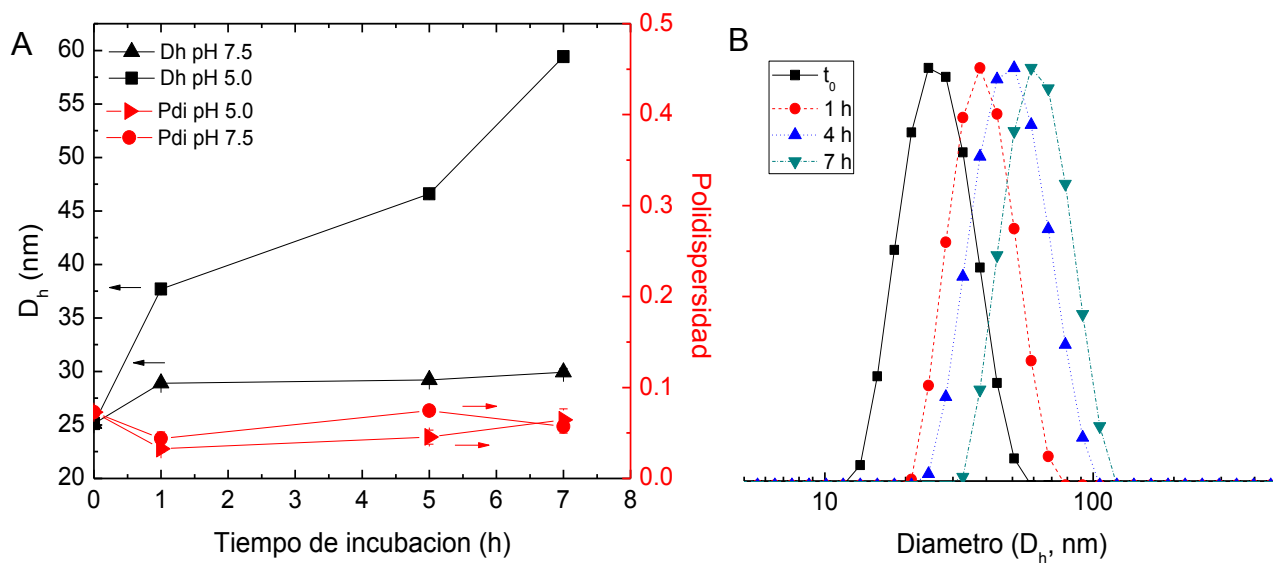


Figura F2 (A) Estabilidad de nanopartículas formadas a partir de mPEG₄₄-*b*-PPBC₁₁, incubadas en buffer fosfato salino (PBS) 0.1 M a pH 7.4 y 5.5 a 37 °C. (B) Distribución de tamaños por DLS en pH 5 a 37°C a diferentes tiempos de incubación.

Apéndice G GRÁFICAS DE CINÉTICA

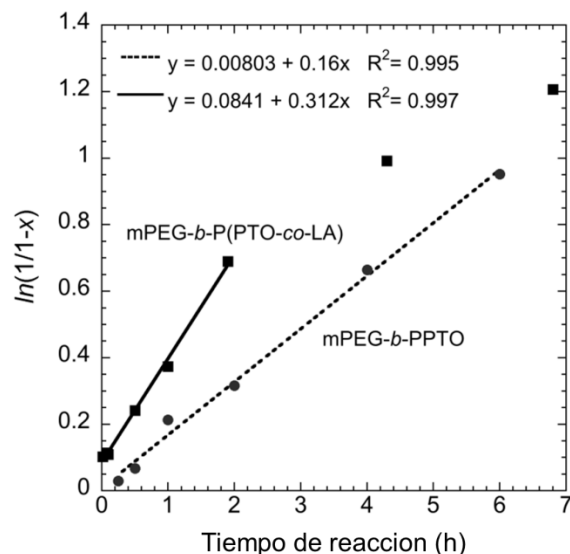


Figura G1 Consumo de PTO durante la homopolimerización y copolimerización con DLLA, mostrando una cinética de pseudo-primer orden. La diferencia en las reactividades es atribuida a los efectos estéricos. Conversión del monómero fue estimada de RMN ^1H .

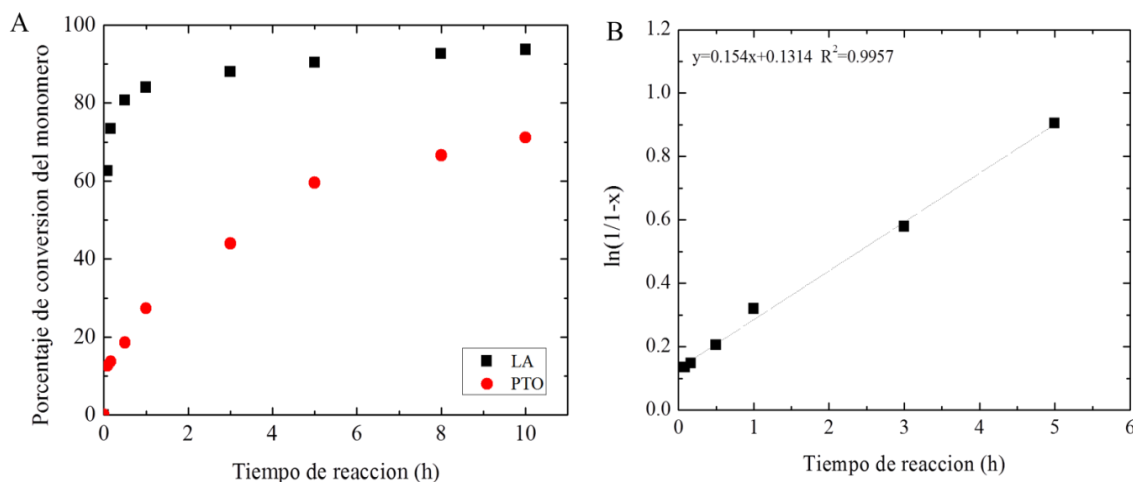


Figura G2 (A) Cinética de polimerización de PTO con un incremento del bloque hidrofóbico iniciada mediante mPEG₁₁₄ y catalizada por DBU-TU. (B) Dependencia lineal en la conversión con el tiempo de reacción.