



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**SÍNTESIS Y ESTUDIO FÍSICOQUÍMICO DE CONJUGADOS COPOLÍMERO ANFIFÍLICO-
AZÚCAR PARA SU USO EN SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. ELIZABETH URÍA CANSECO



TUTOR: Dra. Silvia del Socorro Pérez Casas,
Facultad de Química, UNAM.

AÑO: 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.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Silvia del Socorro Pérez Casas, por su ayuda, ejemplo, amistad y lo mucho que me ha impulsado en el camino al éxito. Ha sido un honor trabajar bajo su tutoría.

Al Doctor Alejandro Sosnik de la Universidad de Buenos Aires por haberme recibido en su laboratorio, enseñarme nuevas técnicas de trabajo, por su talento, sus ideas y conocimientos transmitidos. Es un privilegio haber realizado una estancia académica con un investigador tan reconocido en el campo de los nanomateriales.

Al Posgrado en Ciencias Químicas.

Este proyecto fue financiado por:

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).
Número de Becaria: 270969

La dirección General de Apoyo Académico de la UNAM.
Proyecto PAPIIT IN118511.

Recursos de la Facultad de Química, UNAM.

El presente trabajo se llevó a cabo en:

Laboratorio 301, Departamento de Biofísicoquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Bajo la tutoría de la Doctora Silvia del Socorro Pérez Casas

Laboratorio de Farmacotecnia II, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Bajo la asesoría del Dr. Alejandro Sosnik y apoyo técnico de Romina Glisoni.

Los resultados obtenidos se presentaron en International Conference on Polymers and Advanced Materials, "POLYMAT"/ Simposio Latinoamericano de Química de Coordinación y Organometálica "SILQCOM" 2013 del 13 al 17 de Octubre en Huatulco, México.

*A mi familia, amigos y todas esas personas que formaron parte de este proyecto.
Por mi raza hablará el espíritu ¡Goya!...*

**SÍNTESIS Y ESTUDIO FISICOQUÍMICO
DE CONJUGADOS COPOLÍMERO
ANFIFÍLICO-AZÚCAR PARA SU USO
EN SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE
FÁRMACOS**

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	4
OBJETIVOS DEL PROYECTO	5
CAPITULO 1. ANTECEDENTES	6
COPOLÍMEROS DE BLOQUE	7
POLOXAMINAS.....	7
MODIFICACIÓN SINTÉTICA	9
Reconocimiento Molecular.....	10
Cuantificación de Carbohidratos.....	10
LEISHMANIA.....	11
Fármacos Antileishmania	13
CAPÍTULO 2. MARCO EXPERIMENTAL.....	15
SÍNTESIS.....	16
Descripción del equipo utilizado.....	16
DIÁLISIS MOLECULAR	17
Membranas de diálisis molecular	18
LIOFILIZACIÓN.....	18
Descripción del equipo utilizado.....	19
DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ ¹⁷	19
Tamaño de Partícula.....	21
Determinación de la Concentración Micelar Crítica	24
TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN.....	26
Ultravioleta (UV) ¹⁹	26
Infrarrojo (IR) ²⁰	27
Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	27
MATERIALES Y REACTIVOS	28
Reactivos.....	28
Materiales.....	30
ESQUEMA GENERAL DEL PROYECTO.....	31
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA Y RESULTADOS.....	32

CARACTERIZACIÓN DE TETRONIC T701	33
Punto de Enturbiamiento	33
Determinación de la CMC de T701.....	33
Dependencia de la CMC de T701 en función del pH	39
Determinación de CMC de T701 nativo en PBS A 37°C	42
MODIFICACIÓN SINTÉTICA	45
Síntesis de T701-Lman.....	46
Síntesis de T1107-Lman.....	50
CARACTERIZACIÓN DE LOS CONJUGADOS POLOXAMINA-LMAN	51
Caracterización por ATR/FTIR	52
Caracterización por RMN.....	56
Ensayo de Reconocimiento molecular por Concanavalina A.....	59
Determinación de contenido de L-man.....	61
Determinación de CMC de las poloxaminas modificadas	63
ENCAPSULACIÓN DE FÁRMACOS EN MICELAS POLIMÉRICAS	79
Curva de calibración de amiodarona.....	79
Solubilidad Intrínseca de Amiodarona	83
Encapsulación de amiodarona en T1107 nativo	84
Encapsulación de amiodarona en T1107-Lman	88
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	92
CONCLUSIONES.....	93
PERSPECTIVAS.....	93
REFERENCIAS	94

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de formulaciones más efectivas para mejorar el tratamiento de enfermedades ha llevado al desarrollo e investigación de nuevos materiales, conocidos como nanoacarreadores moleculares, que sean efectivos para administrar el principio activo, asegurando que éste llegue más fácilmente al sitio de acción evitando el rechazo por el organismo y libere el material de manera controlada y eficiente por un periodo de tiempo que reduzca las dosis de administración y los efectos adversos del fármaco cuando se administra de manera sistémica.

La investigación se ha enfocado en materiales biodegradables y compatibles con el cuerpo humano. Aparentemente sólo un número limitado de polímeros sintéticos cumplen con estos requisitos¹.

Una vez conocidas las propiedades del nanoacarreador es posible mejorarlas mediante una modificación sintética basada en el reconocimiento molecular, dirigiendo el fármaco a órganos o tejidos dañados exclusivamente.

La obtención de este tipo de moléculas debe ser escalable para que pueda rebasar la barrera entre la aplicación y la investigación básica; es decir, es necesario que las materias primas sean fáciles de conseguir, el método de síntesis debe ser en pocos pasos y con un buen rendimiento, lo cual se traduce en bajo costo de la formulación farmacéutica.

El diseño y síntesis de biomateriales que puedan ser utilizados para encapsular fármacos ha revolucionado la investigación científica y favorece el panorama de millones de pacientes alrededor del mundo diagnosticados con enfermedades crónicas, degenerativas o menospreciadas que hoy en día no cuentan con terapias eficaces, mejorando el tratamiento y disminuyendo los efectos secundarios del mismo.

En esta investigación se modificaron químicamente dos poloxaminas disponibles comercialmente, T701 y T1107, que pueden ser utilizadas como nanoacareadores de fármacos con posible actividad antileishmania: amiodarona y nimodipina, éstos son actualmente utilizados para tratar enfermedades del corazón, por lo tanto es más fácil que superen la barrera entre la investigación y la fase clínica. La encapsulación de los fármacos aumenta su solubilidad de manera que una alternativa de dosificación podría ser la cutánea, que hasta ahora no existe para dicha enfermedad. La modificación sintética en el polímero puede dirigir los fármacos encapsulados a macrófagos que son reservorio de leishmania si se suministrara el medicamento vía intravenosa.

La leishmaniasis es una enfermedad menospreciada debido a que es propia de comunidades marginadas que no tienen acceso a tratamientos más efectivos de ahí la importancia de ofrecer alternativas de formulaciones que sean económicas, eficientes y fácilmente escalables de la investigación a la industria farmacéutica.

OBJETIVOS DEL PROYECTO

El objetivo principal de este estudio es ofrecer una alternativa de formulación tópica y/o intravenosa para fármacos que pueden ser utilizados en el tratamiento para combatir la Leishmaniasis.

Los objetivos particulares son:

- 1) Caracterizar una poloxamina disponible comercialmente (Tetronic T701) que puede ser utilizada como nanotransportador de fármacos.
- 2) Sintetizar conjugados copolímero anfifílico-manosa (T701-Lman y T1107-Lman) mediante el uso de radiación de microondas para dirigirlos a macrófagos que pueden ser reservorio de Leishmania.
- 3) Caracterizar las propiedades fisicoquímicas, térmicas y de autoagregación del conjugado.
- 4) Encapsular dos fármacos con posible actividad antileishmania, nimodipina y amiodarona, dentro de micelas poliméricas del copolímero anfifílico nativo y modificado.

CAPITULO 1. ANTECEDENTES

COPOLÍMEROS DE BLOQUE

Los polímeros más ampliamente estudiados como encapsuladores de principios activos son los llamados copolímeros de bloque comercialmente distribuidos bajo el nombre de Pluronic[®], los cuales consisten de bloques de polióxido de propileno (POP) y polióxido de etileno (POE), dispuestos en una secuencia lineal (figura 1). Este tipo de macromoléculas posee propiedades tensoactivas y forma distintas clases de asociaciones tales como micelas poliméricas y estructuras líquido cristalinas que pueden actuar como excipientes farmacéuticos.²

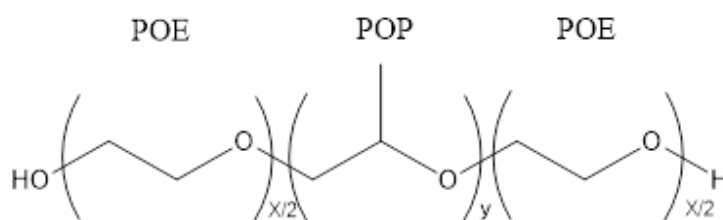


Figura 1. Representación de un copolímero de bloque (Pluronic[®]).

Las micelas poliméricas consisten en un núcleo densamente poblado por bloques poco solubles en el líquido y una cubierta flexible consistente de bloques altamente solubles (figura 2). Generalmente son esféricas y con poca dispersión de tamaños.

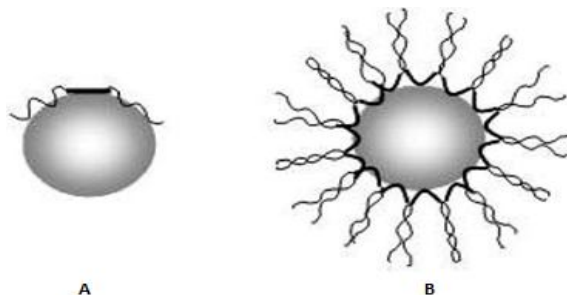


Figura 2. A) Polímero antes de la formación de micelas. B) Representación de una micela polimérica.

Estudios de estos agregados han sugerido que pueden emplearse como acarreadores de fármacos direccionados a un sitio específico de acción³. Moléculas hidrofóbicas pueden ser cargadas en las micelas poliméricas, permitiendo que sean solubilizados en medios acuosos.

POLOXAMINAS

Las poloxaminas, conocidas comercialmente como Tetronic[®], son copolímeros de bloque anfifílicos formados por cuatro brazos de polióxido de etileno-polióxido de propileno enlazados a una molécula central de etilendiamina. Tal estructura, representada en la figura 3, les confiere propiedades dependientes de la temperatura y pH⁴.

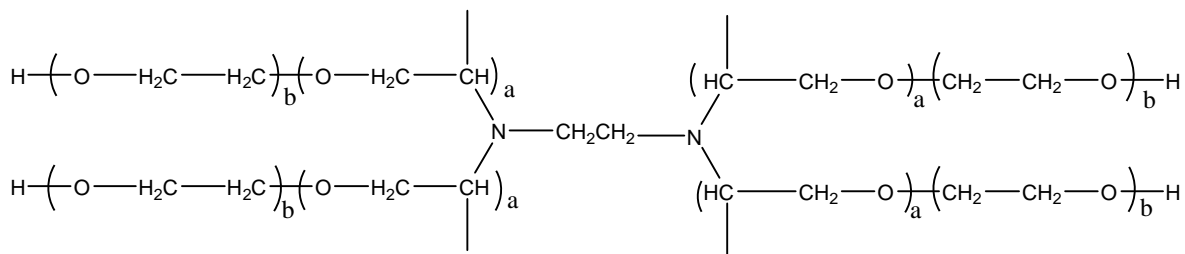


Figura 3. Estructura de las poloxaminas (Tetronic®)

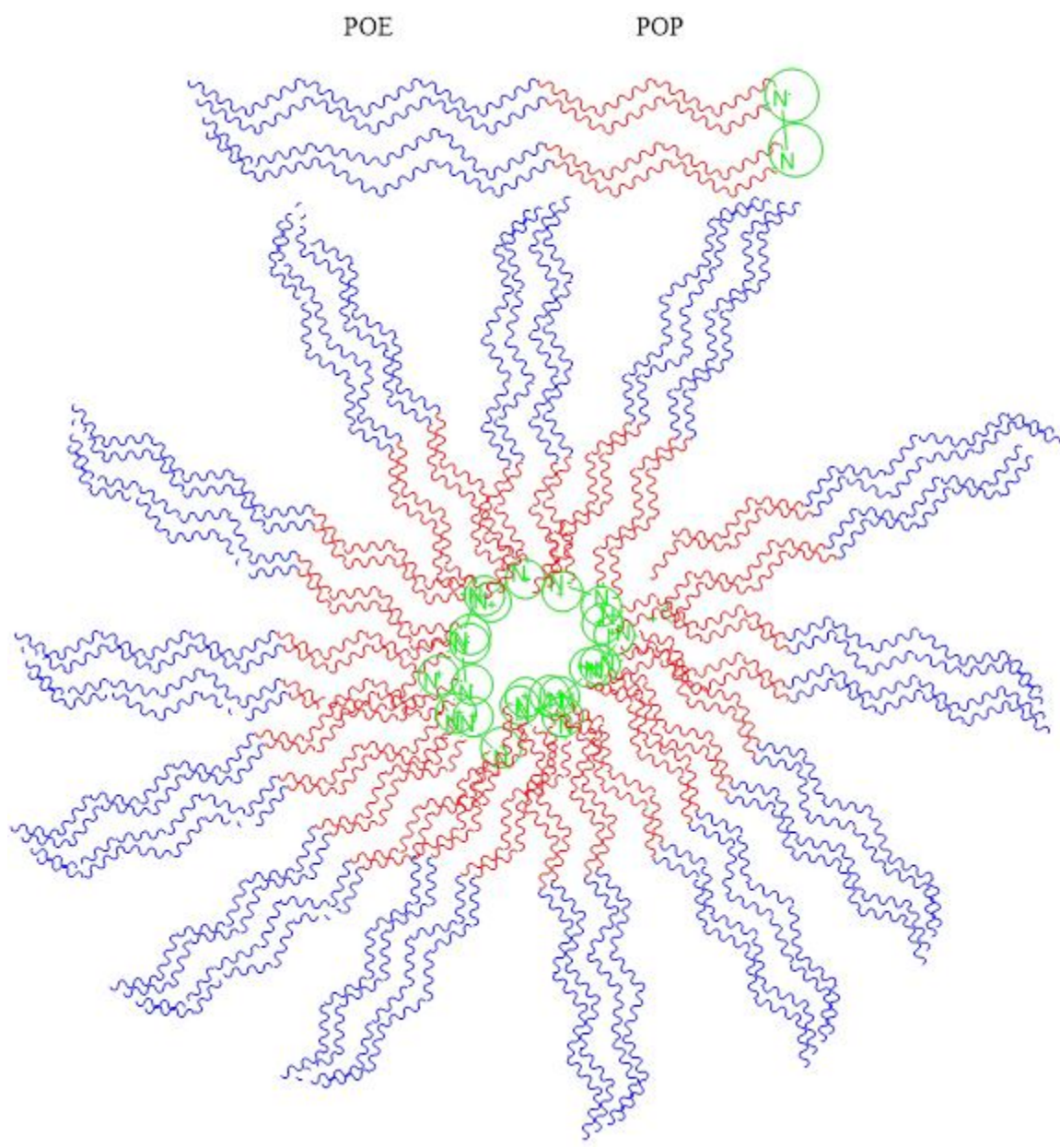


Figura 4. Esquematización de una micela polimérica formada por un Tetronic a ciertas condiciones de pH y temperatura⁵.

Este tipo de surfactantes fueron introducidos por primera vez en los años 50 por BASF. Tienen un amplio uso en la industria debido a la facilidad de modificación del tamaño de los bloques de manera independiente y, en consecuencia, del balance hidrofílico-lipofílico y el peso molecular⁵.

Las poloxaminas pueden ser utilizadas como emulsificantes, desemulsificantes, antiespumantes e inhibidores de corrosión.

En este estudio, el interés de este tipo de polímeros radica en la posibilidad de ser empleados como sistemas de liberación de fármacos debido a sus propiedades anfífilas y a la presencia del grupo amino en la molécula, que sugiere que bajo condiciones de pH apropiado, la presencia de un grupo catiónico localizado en el centro de los bloques de PO podría prevenir la agregación hasta que la temperatura y la concentración del polímero es tal que se forman micelas poliméricas (figura 4)⁵.

MODIFICACIÓN SINTÉTICA

La modificación sintética de nanoacarreadores farmacéuticos es normalmente usada para mejorar o controlar sus propiedades biológicas y darles funciones terapéuticas o diagnósticas importantes. Los principales resultados de tales modificaciones incluyen un incremento en la estabilidad y vida media del acarreador en el torrente sanguíneo, biodistribución requerida, direccionamiento a la zona patológica, respuesta a un estímulo fisiológico como pH o temperatura⁶.

Carbohidratos de origen natural, glicoproteínas y glicolípidos presentes en la superficie de casi todas las células en los sistemas vivos desempeñan papeles cruciales en eventos biológicos como sitios de reconocimiento entre las células y los factores que se unirán a ellas. Ellos pueden desencadenar varios fenómenos, tales como el crecimiento celular, respuestas inflamatorias o infecciones virales.

Algunos ligandos de carbohidratos, tales como galactosa, manosa, lactosa, fructosa y otros oligosacáridos/polisacáridos han demostrado una gran afinidad con asialoglicoproteínas receptoras (proteínas a las que se les ha quitado enzimáticamente el ácido siálico presente en el componente glicídico)⁷.

Una gran variedad de interacciones que ocurren entre células, hormonas, enzimas y anticuerpos con bacterias, virus o toxinas están mediadas por carbohidratos. Restos de azúcares expuestos en la superficie celular que son características de un microbio dado pueden servir como llave de biomarcadores para las bacterias y la identificación de patógenos, diagnóstico clínico, y desarrollo de vacunas.

Los carbohidratos como una plataforma de detección ya han demostrado un enorme potencial para lograr sensibilidad y selectividad superior, encontrando aplicaciones importantes en sistemas de liberación controlada de fármacos. La biofuncionalidad y biocompatibilidad lograda mediante la introducción de moléculas naturales a los nanomateriales permite la combinación de interacciones biológicas ligando-receptor con propiedades intrínsecas de éstos.⁸

Reconocimiento Molecular

El concepto del Reconocimiento Molecular abarca un conjunto de fenómenos controlados por interacciones específicas y de naturaleza no covalente. Su campo de acción viene limitado por la forma en que las entidades químicas se reconocen e interaccionan selectivamente entre sí dentro de un entorno químico complejo. Así por ejemplo, la asociación anticuerpo-antígeno y las interacciones enzima-proteína son fenómenos del Reconocimiento Molecular.

La concaivalina A (Con A) es una lectina de origen vegetal. Fue aislada y cristalizada por Sunimer y Howellz a partir de la semilla de *Canavalia ensiformis*. Las lectinas son capaces de fijar residuos glucídicos específicos; la concaivalina A fija manósidos, ha sido usada como herramienta de identificación de carbohidratos en solución y en la superficie celular⁹.

Cuantificación de Carbohidratos

Al calentar pentosas y hexosas en presencia de un ácido fuerte, éstas se deshidratan produciendo furfural y derivados de hidroximetilfurfural respectivamente, los grupos aldehído pueden condensarse con un compuesto fenólico dando lugar a un producto coloreado¹⁰. La reacción colorimétrica para medir la concentración de carbohidratos solubles por espectrofotometría se basa en la utilización de un compuesto llamado antrona que se disuelve en ácido sulfúrico concentrado (figura 5).

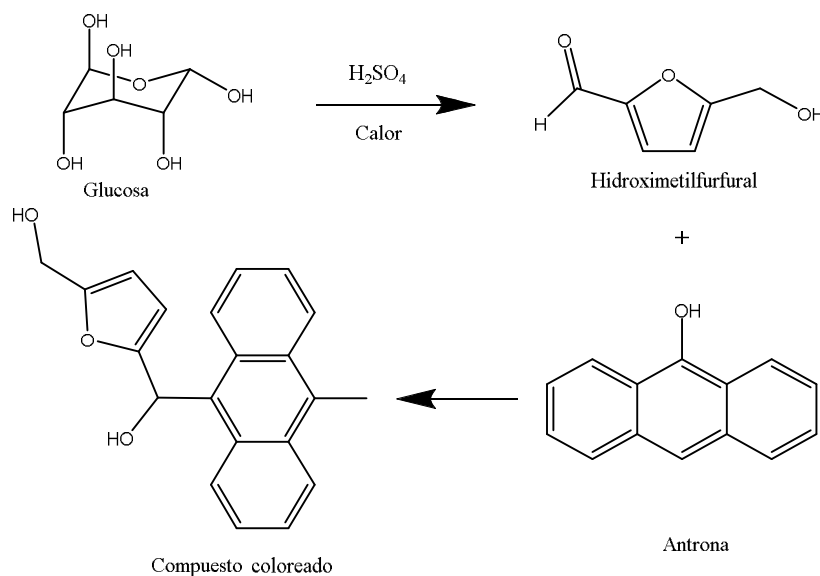


Figura 5. Formación de hidroximetilfurfural a partir de glucosa y condensación con el reactivo de antrona.

El medio ácido hidroliza el enlace glucosídico de los oligosacáridos. Los monosacáridos resultantes reaccionan con la antrona produciendo un color verde – azulado que presenta un máximo de absorción en 620 nm.

Utilizando este método es posible cuantificar los carbohidratos presentes en una muestra, en particular en este trabajo se pretendía conocer el grado de conjugación de las poloxaminas modificadas.

LEISHMANIA

La leishmaniasis es producida por la infección de varias especies de Leishmania, un parásito protozoario de la familia Trypanosomatidae (orden Kinetoplastida). Aproximadamente 30 especies han sido identificadas, al menos 20 de estos organismos son patogénicos para los mamíferos. El género Leishmania incluye dos subgéneros, Leishmania y Viannia, que se diferencian por el lugar en el que se multiplican dentro del tracto digestivo del insecto vector.¹¹

La mayoría de las especies de Leishmania causan leishmaniasis cutánea en las personas. El tipo de lesiones cutáneas, la eficacia del tratamiento, la rapidez en la cicatrización y otros factores varían según las especies.

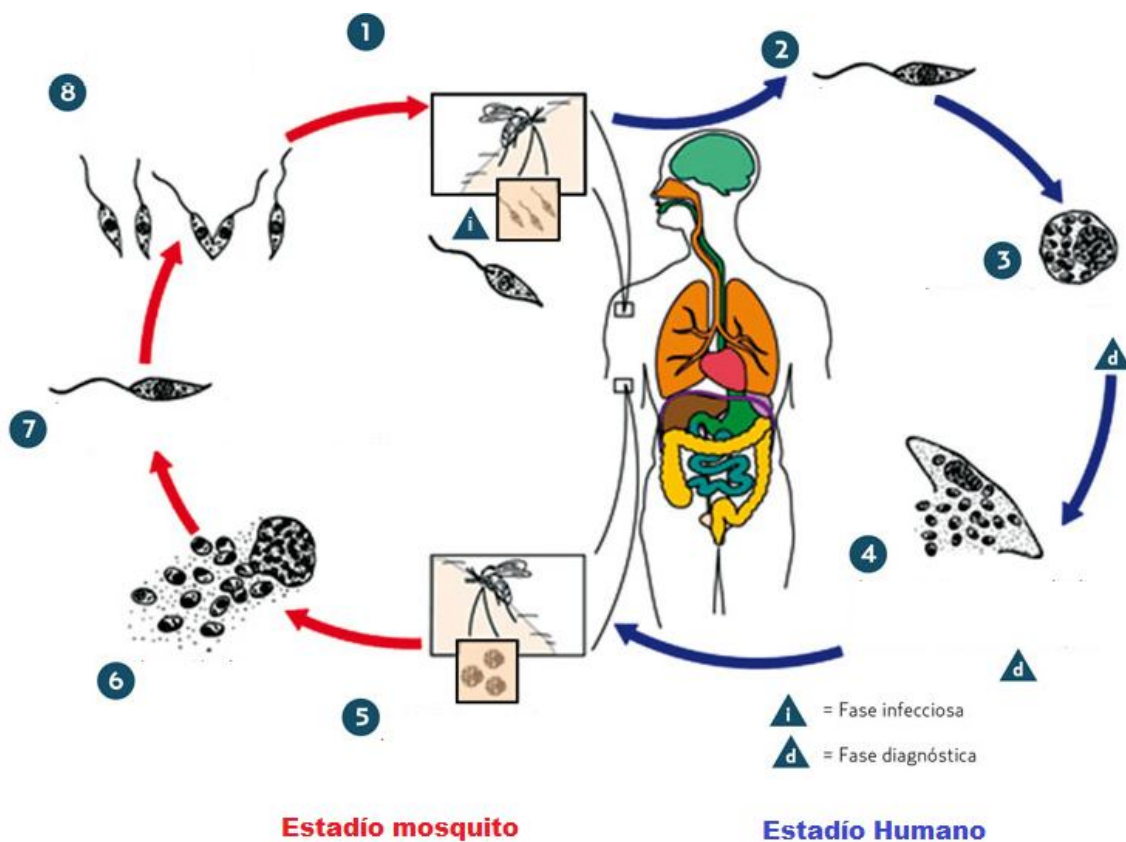


Figura 6. Ciclo de vida de Leishmania¹².

En general, la *Leishmania* se transmite indirectamente entre huéspedes por medio de moscas de arena del género *Phlebotomus* y *Lutzomyia*, que son vectores biológicos. Sólo las hembras se alimentan con sangre¹³. La actividad de las moscas ocurre cuando el clima es húmedo y no hay viento ni lluvia. Otros artrópodos como las garrapatas y las pulgas caninas (*Dermacentor variabilis* y *Rhipicephalus sanguineus*) también pueden actuar como vectores mecánicos. En la figura 6 se esquematiza el ciclo de biológico del parásito.

Estadio humano

- 1) El mosquito infectado pica al individuo (se inyecta el promastigote en la piel).
- 2) El promastigote es fagocitado por el macrófago.
- 3) El promastigote se transforma en amastigote dentro del macrófago.
- 4) El amastigote se multiplica en diversos tejidos incluyendo el macrófago.

Estadio mosquito

- 5) El mosquito toma la sangre de un individuo infectado.
- 6) Ingestión de la célula infectada.
- 7) El amastigote se transforma en estado promastigote en el intestino del mosquito.
- 8) Se divide en el intestino y migra hacia la proboscis.

Los mamíferos pueden infectarse, sin presentar síntomas durante largos períodos de tiempo, con frecuencia permanecen infectados en forma crónica aun después de que se curan clínicamente. En los humanos, el período de incubación informado para leishmaniasis cutánea, puede ser tan breve como de 1 a 2 semanas o tan prolongado como de varios meses y de hasta 3 años. El período de incubación para leishmaniasis visceral es de 10 días a varios años; la mayoría de los casos se hacen evidentes en 2 a 6 meses. En los humanos se observan dos formas de leishmaniasis: cutánea y visceral.

La leishmaniasis cutánea (LC) generalmente involucra sólo la piel y puede estar caracterizada por la presencia de una a doce lesiones. Según la especie de *Leishmania*, se pueden observar úlceras, nódulos lisos, placas planas o lesiones hiperqueratósicas similares a las verrugas¹⁴.

Las lesiones iniciales que aparecen en la piel que estuvo expuesta a moscas de arena generalmente son pápulas. Muchas lesiones permanecen localizadas, pero en algunos casos, los parásitos pueden propagarse a través de los vasos linfáticos y producir lesiones secundarias en la piel o, en ocasiones, en la mucosa de otras partes del cuerpo. La LC es generalmente indolora a menos que haya infecciones secundarias en las lesiones, las úlceras permanecen limitadas a la piel y no afectan los tejidos subcutáneos.

La mayoría de las lesiones cutáneas se curan espontáneamente; sin embargo, la velocidad de cicatrización varía según las especies de *Leishmania*. En algunos casos, puede llevar varios meses a un año o más. Algunas formas dejan cicatrices permanentes.

La leishmaniasis visceral (LV) es generalmente una enfermedad insidiosa y crónica entre los habitantes de áreas endémicas; sin embargo, el comienzo puede ser agudo en los viajeros que derivan de áreas libres de *Leishmania*. En algunos casos (especialmente en África), aparece un granuloma primario sobre la piel antes de que aparezcan los signos sistémicos. Los síntomas más comunes de LV son fiebre ondulante prolongada, pérdida de peso, disminución del apetito, signos de anemia y distensión abdominal con esplenomegalia y hepatomegalia. Los casos leves, que presentan pocos síntomas pueden resolverse espontáneamente. A menos que sean tratados, la mayoría de los otros casos son eventualmente mortales, con frecuencia debido a infecciones secundarias y otras complicaciones¹⁵.

Se han informado casos de *Leishmania* en todos los continentes, excepto en la Antártida. Estos organismos son endémicos principalmente en las regiones tropicales y subtropicales.

Los principales agentes causales en América son *Leishmania mexicana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*. Existen casos autóctonos en Texas, EUA, se considera endémica en Latinoamérica, hasta el norte de Argentina, con las excepciones de Chile y Uruguay. Se le ha encontrado al menos en 20 estados de la República Mexicana, con las principales zonas endémicas en: Chiapas, Oaxaca, Campeche, Quintana Roo, Tabasco, Yucatán y Veracruz¹².

La leishmaniasis se encuentra distribuida en unos 100 países, en trópicos, subtrópicos y regiones templadas. Se considera que 350 millones de personas en el mundo están en riesgo de infección. La prevalencia estimada es de 12 millones de casos¹⁵.

Fármacos Antileishmania

Todos los tratamientos convencionales implican un elevado costo, falta de efectividad en muchos casos, tratamiento por tiempos muy prolongados, resistencia, inyección dolorosa, toxicidad y diversos efectos secundarios tales como alteraciones en la función hepática, pancreatitis bioquímica, daños renales y otros.

Los bloqueadores de los canales de calcio, sodio o potasio son fármacos ampliamente utilizados para tratar las enfermedades del corazón, usado en la terapia de la hipertensión, los espasmos vasculares cerebrales. Esta clase de compuestos inhibe la acción de los canales de calcio en las membranas celulares y las indicaciones potenciales no se limitan a enfermedades cardiovasculares¹⁶.

Teniendo en cuenta que las drogas de reutilización, también conocido como reposicionamiento de fármacos, es un enfoque prometedor para descubrir nuevos principios activos candidatos para el tratamiento de las enfermedades olvidadas, los antagonistas del calcio se han considerado aspirantes prometedores antiparasitarios, pudiendo revertir parcialmente la resistencia a múltiples fármacos, presumiblemente por la acumulación cada vez mayor de medicamentos celulares. Algunos de estos compuestos están siendo estudiados por su posible actividad antileishmania^{12, 14}, sin embargo su baja solubilidad es una limitación para ser dosificados en algunas formulaciones farmacéuticas, por ejemplo tópica.

En este estudio pretendemos encapsular en micelas poliméricas amiodarona y nimodipina, dos fármacos bloqueadores de los canales de calcio, para incrementar su solubilidad y, mediante una modificación sintética del polímero, direccionarlos a macrófagos que son reservorios de leishmania, de esta manera se puede ofrecer un tratamiento efectivo a las personas que padecen esta enfermedad.

Amiodarona

La amiodarona (figura 7a) es un fármaco antiarrítmico comúnmente usado para tratar algunas cardiomiopatías. En los últimos años ha sido objeto de estudio como un antimicótico y agente parasiticida debido a sus propiedades farmacocinéticas y bajo costo.

Algunas investigaciones sugieren que la amiodarona afecta la viabilidad de *Leishmania mexicana* por desestabilización de la homeostasis de calcio en mitocondria.¹⁷

Nimodipina

La 1,4- dihidropiridina o nimodipina (figura 7b) es un bloqueador de canales de calcio, originalmente desarrollada para el tratamiento de la hipertensión arterial, que actúa por la relajación del músculo liso. Aunque no suele ser de uso frecuente como indicación para la hipertensión, ha demostrado buenos resultados en la prevención de una de las principales complicaciones de una hemorragia subaracnoidea, una forma de hemorragia cerebral, ya que atraviesa la barrera sangre-cerebro (hematoencefálica) y puede dilatar las arteriolas cerebrales¹⁸

La nimodipina resultó eficaz *in vitro* contra promastigotes y amastigotes intracelulares de *Leishmania (L.) chagasi*, lo que resulta en un fuerte daño estructural a la membrana plasmática y las mitocondrias¹⁹.

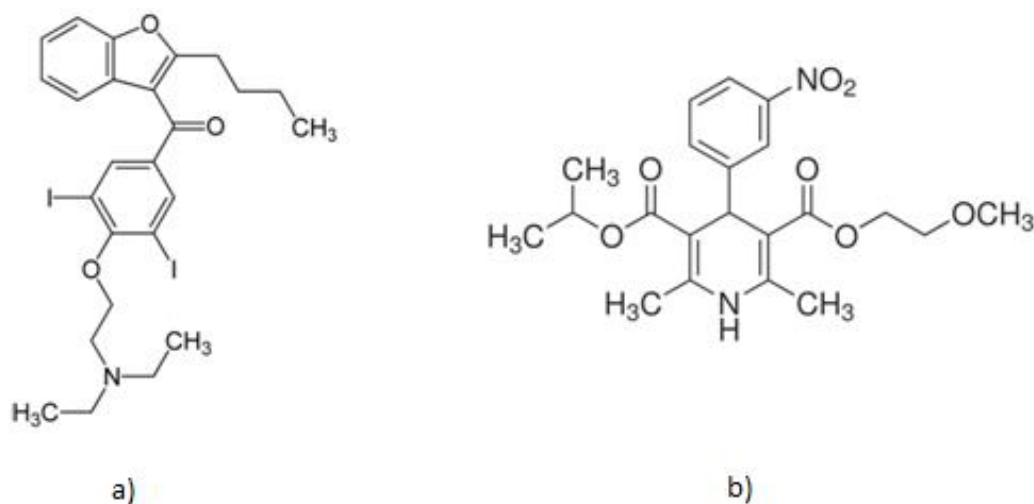


Figura 7. Estructura de a) amiodarona b) nimodipina

CAPÍTULO 2. MARCO EXPERIMENTAL

SÍNTESIS

El primer trabajo de aplicación de microondas en síntesis fue realizada por Vanderhoff en 1966 para la polimerización de monómeros vinílicos solubles en agua. Aunque no fue hasta 1986 cuando aparecieron las primeras publicaciones en síntesis orgánica realizadas por R. Gedye y R.J. Giguere²⁰.

La síntesis por microondas representa una técnica alternativa para proporcionar energía térmica a una reacción con ventajas interesantes como el ahorro de tiempo y energía, la generación de menos subproductos, la optimización de rendimientos y la obtención de productos en un menor número de pasos, por lo que es una alternativa que apoya el desarrollo de nuevas líneas de investigación mediante la optimización de condiciones. La combinación de esta serie de factores constituye un acercamiento a la Química Verde.

La radiación por microondas, como cualquier otra radiación electromagnética está constituida por un campo eléctrico y uno magnético, aunque sólo el primero tiene la energía para inducir el calentamiento de las sustancias.

Para realizar la modificación química de las poloxaminas T1107 y T701 se utilizaron hornos de microondas caseros adaptados con un sistema de reflujo para síntesis orgánica.

Descripción del equipo utilizado

En la síntesis llevada a cabo en el Laboratorio de Tecnología Farmacéutica II de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (UBA), bajo la asesoría del Dr. Alejandro Sosnik, se utilizó un horno de microondas convencional Electrolux con 10 niveles de potencia, modificado para síntesis química, con una perforación en la parte superior donde se adaptó un refrigerante con un matraz de reacción en condiciones de reflujo.

Tabla 1. Características del equipo de síntesis utilizado en Facultad de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires.

Alimentación	222V≈50Hz
Potencia máxima	1450 W
Potencia de salida IEC-705	900W
Frecuencia de Microondas	2450 mHz
Potencia de Grill	1000W
Modelo	FMWA253D2PW

En la síntesis que se llevó a cabo en el laboratorio 108 del Conjunto D, Facultad de Química, UNAM, cuyo responsable es el Dr. Joaquín Palacios Alquisira, se empleó un horno de microondas casero también adaptado para síntesis orgánica, marca Panasonic con 9 niveles de Potencia, modelo DMR-141 con 700 W de potencia de salida.

Es importante mencionar que si un horno de microondas tiene un número determinado de niveles de potencia (NP), la Potencia Total o de salida (PT) se divide entre el número de potencias y se calcula el porcentaje de radiación (%R) o la potencia real (PR) que recibe una muestra en cada potencia programada en el microondas.

La siguiente ecuación se utiliza para calcular la potencia por nivel (PPN):

$$PPN = \frac{PT}{NP}$$

Por ejemplo, en un horno de 700W con 9 niveles de Potencia

$$PPN = \frac{700 W}{9} = 77.8 W \text{ por nivel de potencia}$$

Si programamos el horno a Potencia 8, el horno utilizará prácticamente el 89% de la potencia total:

$$PR = 77.8 \times 8 = 622.4 W$$

$$\%R = \frac{622.4}{700} \times 100 = 88.9\%$$

Este razonamiento es importante para conocer realmente la potencia que se irradia durante una síntesis en microondas.

DIÁLISIS MOLECULAR

Los polímeros disponibles comercialmente presentan una distribución de masas molares debido a que pueden contener cadenas con mayor o menor número de monómeros. Para poder tener una muestra más homogénea, en este trabajo se llevó a cabo una filtración utilizando membranas semipermeables, las cuales permiten el paso de moléculas en función de su tamaño. Estas membranas están dotadas de poros microscópicos y dependiendo de las dimensiones de los poros únicamente las partículas de menor tamaño pueden atravesar la membrana.

El transporte que se va a establecer entre dos soluciones separadas por membrana semipermeable podrá ser de solutos y de disolvente. Algunos factores que intervienen en este proceso son descritos a continuación.

Transporte difusivo. Es un transporte pasivo que no consume energía. El movimiento de solutos por difusión es el resultado del movimiento al azar que tienen las moléculas dentro de esta solución. Un soluto en una disolución, en su movimiento aleatorio, de vez en cuando impacta contra la membrana. Si la molécula de soluto encuentra un poro de tamaño adecuado podrá pasar al otro

lado de la membrana. De igual manera en la solución existente al otro lado de la membrana podrá ocurrir lo mismo y otro soluto podrá pasar en dirección contraria.

Diferencia o gradiente de concentración: la cantidad de soluto que pase de una solución X a una solución Z y viceversa va a depender del número de impactos o colisiones contra la membrana. La frecuencia de colisiones contra la membrana está relacionada con la concentración de solutos a cada lado ésta. Por tanto la transferencia neta de soluto de una solución X a la solución Z va a ser mayor mientras más grande sea el gradiente de concentración entre las dos soluciones.

Masa molar: cuanto mayor sea la masa molar de un soluto, menor será su tasa de transporte a través de una membrana semipermeable, esto debido a la velocidad y al tamaño de la molécula. La velocidad de una molécula en una solución está inversamente relacionada con su masa. Las moléculas pequeñas se mueven a una velocidad elevada e impactan con gran frecuencia contra la membrana por lo que su transporte difusivo va a ser alto. Las grandes moléculas, aunque pudieran pasar fácilmente por los poros, van a difundir poco ya que al ir a una velocidad más lenta van a colisionar con menos frecuencia contra la membrana. El tamaño de una molécula se relaciona con su masa molar. La membrana va a impedir parcial o totalmente el paso de un soluto que sea de un tamaño aproximado o mayor que el del poro de la membrana.

Presión osmótica: provocada por solutos de mayor tamaño que el poro que al no poder pasar la membrana van a generar un gradiente de concentración que va a arrastrar agua para igualar las concentraciones a ambos lados de la membrana.

Para asegurar una diálisis exitosa de los polímeros utilizados, se realizó con agitación moderada por al menos 72 horas con frecuentes cambios del medio. Esta técnica también se utilizó para eliminar el disolvente de la reacción cuando se modificaron los polímeros nativos con microondas.

Membranas de diálisis molecular

Tabla 2. Descripción de las membranas de diálisis molecular utilizadas.

Proveedor	Material	Masa Molar de corte (D)	Volumen/Longitud(mL/cm)	Ancho (mm)	Diámetro (mm)
Spectra/Por® Biotech	Celulosa Regenerada	3500	9.3	54	34
Spectra/Por® Biotech	Celulosa éster	500 a 1000	0.79	16	10

LIOFILIZACIÓN

Es un método de desecación en el que se elimina el agua por congelación del producto húmedo y posterior sublimación del hielo en condiciones de vacío. Al suministrar calor el hielo sublima evitando el paso por la fase líquida. Las ventajas de este proceso son que los productos biológicos y

farmacéuticos, relativamente inestables en solución acuosa, pueden procesarse y conservarse en estado seco en el que hay menos problemas de inestabilidad²¹.

Descripción del equipo utilizado

En la tabla 3 se presentan las principales características de los equipos utilizados en la Universidad de Buenos Aires (UBA) y en el laboratorio 312, Conjunto E, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM, con el apoyo del Dr. Guillermo Aguilar.

Tabla 3. Características de los equipos de liofilización utilizados en este estudio.

UNIVERSIDAD	UBA	UNAM
MARCA	CHRIST®	Labconco
MODELO	Freeze Dryer Unit GAMMA A	Freezer Dry System
NO. DE SERIE	No disponible	409188

DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ¹⁷

Este equipo provee la habilidad para medir tres características de partículas o moléculas en un medio líquido en un amplio rango de concentraciones: tamaño de partícula, potencial zeta y masa molar. En la figura 8 se esquematizan los principales componentes del equipo utilizado:

1. Equipo zetasizer nano
2. Computadora con el software del equipo.
3. Celda de medición.
4. Cámara de medición.



Figura 8. Esquema del DLS utilizado en el laboratorio del Dr. Sosnik en la UBA.

El Zetasizer Nano series es un equipo que realiza mediciones usando una técnica llamada Dispersión Dinámica de Luz (DLS, por sus siglas en inglés) en la cual las partículas de una muestra son iluminadas con un láser y se analiza la intensidad de las fluctuaciones de la luz dispersada.

Un sistema típico de DLS comprende 6 componentes principales (figura 9):

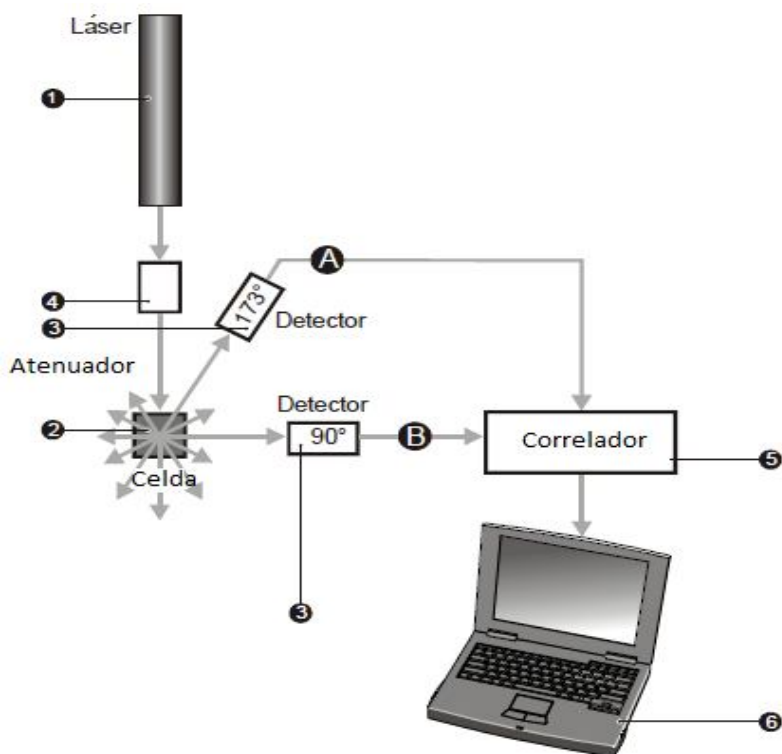


Figura 9. Principales componente de un DLS.

- 1) Un láser que es usado para proveer un haz de luz para iluminar las partículas de una muestra dentro de una celda.
- 2) Un compartimento para colocar la muestra.
- 3) Un detector que mide la intensidad de la luz dispersada.
- 4) Un atenuador. La intensidad de la luz dispersada debe estar dentro de un específico rango del detector para que éste realice una medida exitosa; si demasiada luz es dispersada entonces el detector sería sobrecargado, por lo que el atenuador es usado para reducir la intensidad del láser y por lo tanto disminuir la señal. Para muestras que no dispersan mucha luz, como son partículas muy pequeñas o muestras diluidas, la cantidad de luz debe ser aumentada; en tal situación permitirá que una mayor cantidad de luz pase a través de la muestra
- 5) La señal de dispersión de luz del el detector se hace pasar a un tablero de procesamiento digital llamado correlador. El correlador compara la intensidad de dispersión en intervalos de tiempo sucesivos para derivar la velocidad a la que la intensidad es variable.
- 6) Esta información del correlador se hace pasar a continuación a una computadora, donde el software Zetasizer analizará los datos y arrojará resultados.

Tamaño de Partícula

Es determinado por la medición del movimiento Browniano de las partículas y su velocidad es utilizada para calcular el tamaño. Se sabe que las partículas pequeñas se mueven rápidamente en un líquido y las más grandes lentamente.

Si una partícula pequeña es iluminada por un haz de luz láser, la partícula dispersará la luz en todas direcciones. Si una pantalla es mantenida cerca de la partícula, la pantalla será iluminada por la luz dispersada²², si consideramos cientos de partículas estacionarias, en la pantalla se mostrará un patrón moteado como el que se muestra en la figura 10, consistente de áreas de luz y de oscuridad donde la luz no es detectada.

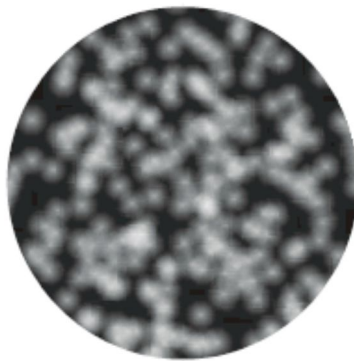


Figura 10. Patrón de luz dispersada después de irradiar una muestra con luz láser.

En el diagrama de la figura 11 se muestran las ondas propagadas desde la luz dispersada por las partículas. Las áreas brillantes corresponden a la luz dispersada que llega al detector con la misma fase e interfieren constructivamente para formar una mancha brillante. Las áreas oscuras están donde la adición de fases es mutuamente destructiva y se cancelan unas a otras.

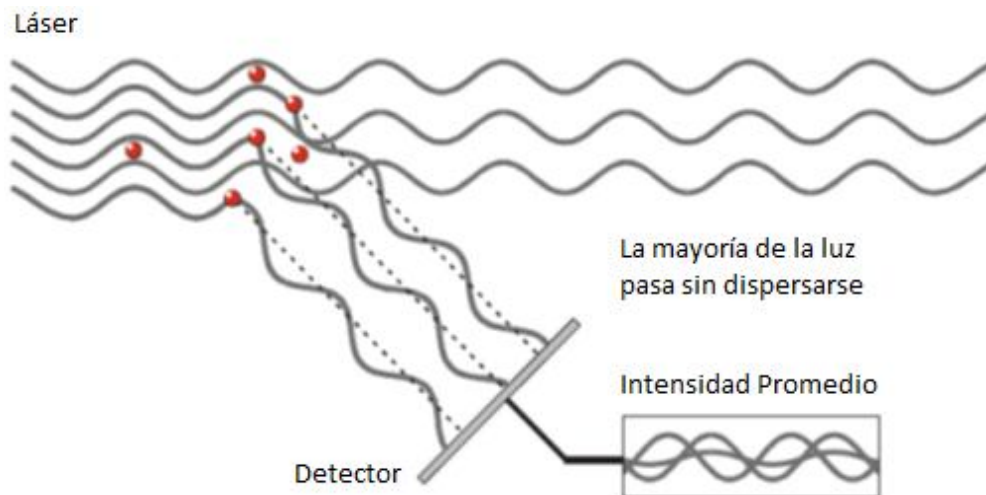


Figura 11. Representación de las ondas propagadas de la luz dispersada cuando una partícula es irradiada con luz.

En la práctica, las partículas suspendidas en un líquido nunca están estacionarias sino en constante movimiento. El movimiento browniano es el movimiento de las partículas debido a la colisión aleatoria con las moléculas del líquido que rodea la partícula.

Cuando las partículas están constantemente en movimiento el patrón moteado también parece moverse. Como las partículas se mueven alrededor, la adición de fases constructiva y destructiva de la luz dispersada hará que las áreas brillantes y oscuras crezcan y disminuyan en intensidad, o dicho de otra manera, la intensidad parece fluctuar. El sistema de Zetasizer Nano mide la velocidad de fluctuación de la intensidad y luego utiliza esto para calcular el tamaño de las partículas.

Dentro del instrumento hay un componente llamado un correlador digital, el cual básicamente mide el grado de similitud entre dos señales durante un período de tiempo.

Si comparamos la intensidad de la señal de una parte en particular del patrón moteado en un momento en el tiempo (digamos el tiempo = t) contra la intensidad de la señal muy poco tiempo después ($t + \Delta t$) veríamos que las dos señales son muy similares (o fuertemente correlacionadas). Si se compara la señal original un poco más adelante en el tiempo ($t + 2\Delta t$), todavía habría una relativamente buena comparación entre las dos señales, pero no va a ser tan buena como en $t + \Delta t$. Por tanto, la correlación es la reducción con el tiempo.

Consideremos ahora la intensidad de la señal en ' t ' con la intensidad en un tiempo mucho más largo, las dos señales no tendrán ninguna relación entre sí ya que las partículas se están moviendo en direcciones al azar (debido al movimiento browniano). En esta situación se dice que no existe una correlación entre las dos señales.

Con un equipo de DLS se trata de escalas de tiempo muy pequeños. En un típico patrón moteado la longitud de tiempo que se tarda para reducir la correlación a cero es del orden de uno a diez milisegundos. El "tiempo corto después" (Δt) estará en el orden de nanosegundos o microsegundos.

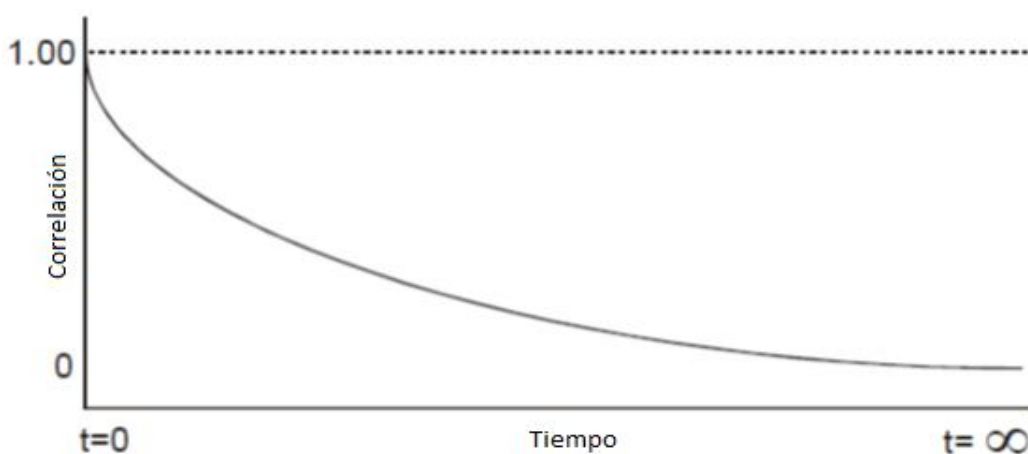


Figura 12. Correlación de la intensidad de la luz dispersada en función del tiempo.

Si se compara la intensidad de la señal en (t) consigo misma entonces tendríamos una correlación perfecta por ser las señales idénticas. Una perfecta correlación se indica como 1 y ninguna correlación se indica como 0.

Si continuamos midiendo la correlación en $(t + 3\Delta t)$, $(t + 4\Delta t)$, $(t + 5\Delta t)$, $(t + 6\Delta t)$, etc., la correlación con el tiempo llegará a cero. Una función de correlación típica contra el tiempo se muestra en la figura 12.

Si una partícula grande está siendo medida, entonces, al moverse despacio, la intensidad del patrón moteado fluctuará lentamente. Por lo tanto con una partícula pequeña ocurrirá lo contrario. En la figura 13 podemos apreciar el ritmo de decaimiento de la función de correlación relacionado con el tamaño de la partícula.

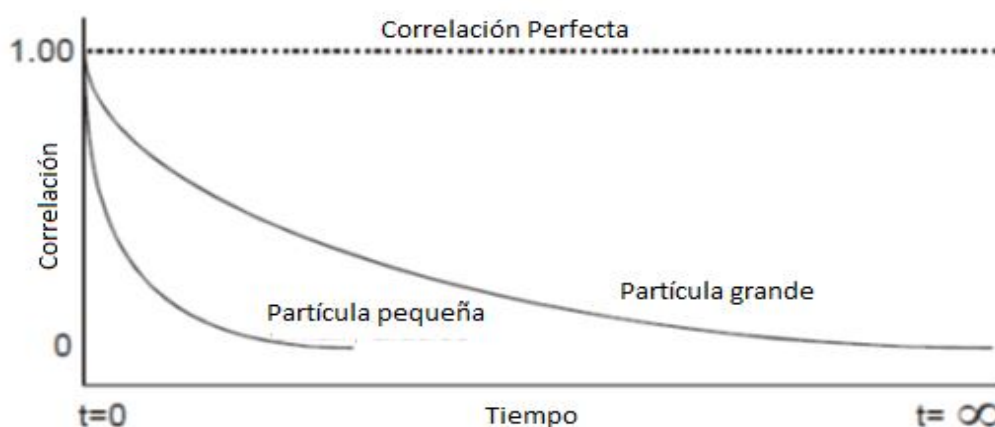


Figura 13. Variación de la intensidad de la luz dispersada en función del tamaño de la partícula.

Después de que la función de correlación ha sido medida, esta información puede ser usada para calcular la distribución de tamaños. El software del equipo utiliza algoritmos para extraer los índices de decaimiento para un número de clases de tamaño que produce una distribución de tamaños.

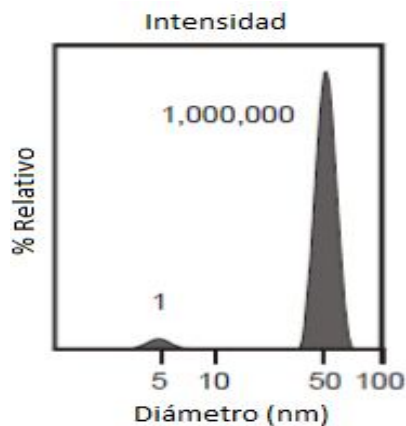


Figura 14. Gráfico típico de distribución de tamaños medido en el DLS.

En la figura 14, el eje "x" muestra una distribución de clases de tamaños, mientras que el eje de las ordenadas muestra la intensidad relativa de la luz dispersada.

La velocidad de conteo muestra el número de fotones detectados por segundo en kilocuentas por segundo (Kcps). Este parámetro es útil para monitorear la calidad de la muestra (figura 15).

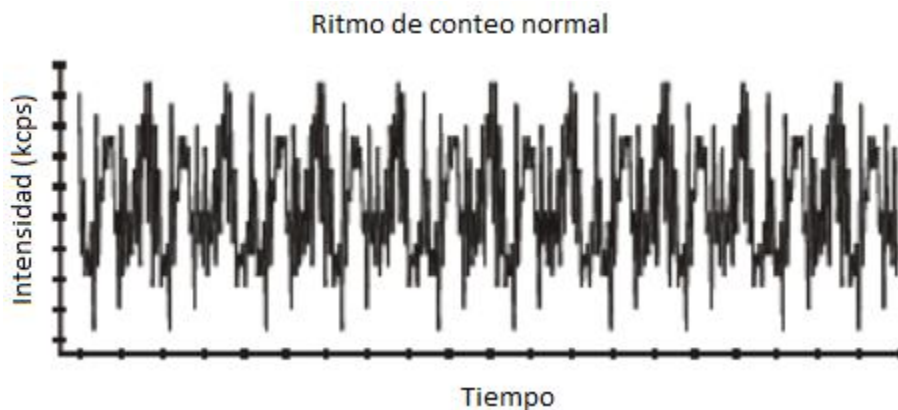


Figura 15. Velocidad de conteo efectuado por el DLS (fotones detectados por segundo).

Un incremento constante en la velocidad de conteo indica agregación de la muestra, mientras que una disminución en el ritmo de conteo indica sedimentación (figura 16).

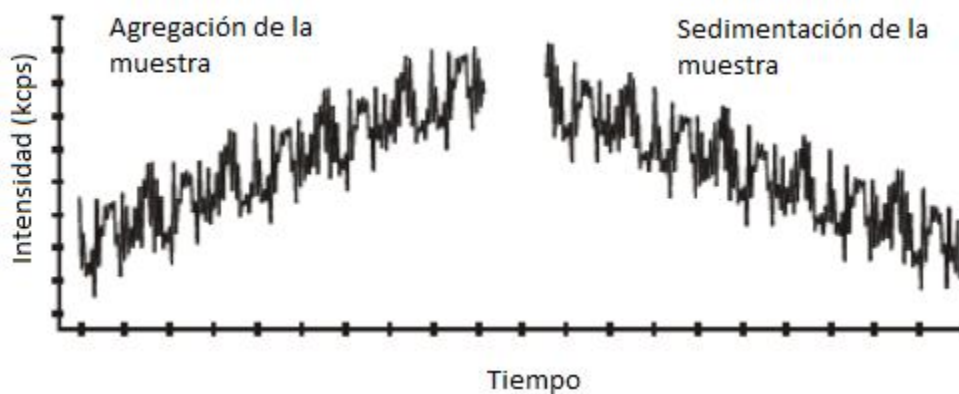


Figura 16. Velocidad de conteo del equipo para partículas muy grandes o sedimentadas.

Determinación de la Concentración Micelar Crítica

Se ha estudiado la concentración micelar crítica (CMC) de los surfactantes mediante el uso de diversas técnicas, tales como la conductividad, la tensión superficial y las mediciones de fluorescencia²³.

La dispersión dinámica de luz es una técnica muy adecuada para la determinación de la CMC²⁴.

Malvern Instruments, proveedores de equipos para determinar tamaño de partícula, realizó un estudio para demostrar las diferentes aplicaciones del Zetasizer Nano utilizando un surfactante comercial llamado Tritón X-100. A partir de mediciones de diferentes concentraciones del surfactante, preparadas en agua desionizada, muestran que por debajo de la CMC la intensidad de la luz dispersada que se detecta en cada concentración fue similar a la obtenida con agua. Sin embargo, una vez que la CMC es alcanzada, la intensidad de la luz dispersada aumenta debido a la presencia de micelas.

En la Figura 17 podemos ver en el eje de las ordenadas, la intensidad de la luz dispersada en kilo cuentas por segundos (kcps) del lado izquierdo del gráfico y del lado derecho, el tamaño de las micelas o radio hidrodinámico en nanómetros (nm), en el eje de las abscisas se grafica la concentración del tensoactivo (mM).

Los datos de intensidad (línea roja) muestran que la luz dispersada para bajas concentraciones de tritón X-100 son similares a los resultados del agua desionizada sola. Cuando se alcanza la CMC, la intensidad muestra un aumento lineal con la concentración. La intersección entre las 2 líneas rectas que se ajusta a los datos experimentales, en 0.25 mM, corresponde a la CMC de Tritón X-100, este resultado concuerda con los valores reportados en la literatura. Este modelo servirá como base para determinar la CMC de los poloxaminas en estudio.

Por otro lado podemos observar que el tamaño registrado por el equipo (línea azul) cambia drásticamente una vez que se alcanza la CMC, de 0 a 8 nm aproximadamente, lo cual también es indicio de la formación de micelas.

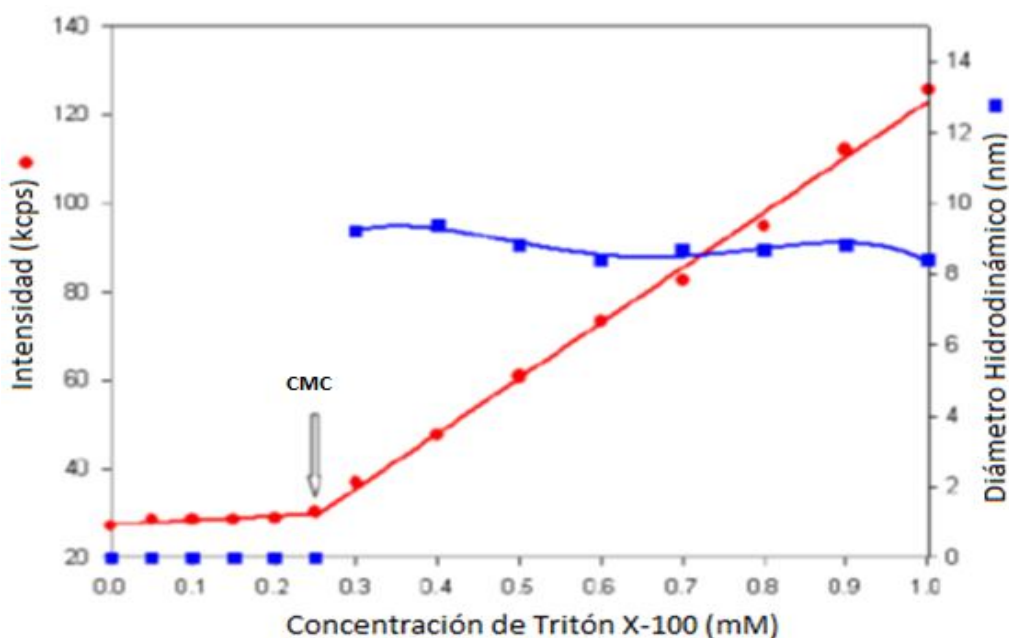


Figura 17. Intensidad de la luz dispersada (kcps) y radio hidrodinámico (nm) en función de la concentración de Tritón X-100 (mM).

TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

La espectroscopia de masas, infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear (RMN) y ultravioleta (UV), son técnicas aplicables a todas las moléculas orgánicas.²⁵ Cuando se irradia una molécula con energía electromagnética, la radiación pasa a través de la muestra o es absorbida. Con radiación IR, la energía absorbida corresponde a la cantidad necesaria para aumentar las vibraciones moleculares. Con la radiación UV, la energía corresponde a la necesaria para promover un electrón de un orbital de baja energía a otro orbital de alta energía en una molécula conjugada.

Con ayuda de estas técnicas es posible describir o caracterizar compuestos de interés aprovechando sus propiedades y grupos funcionales presentes.

Los estudios realizados en este trabajo de IR y RMN se hicieron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación de la Facultad de Química (USAI), UNAM.

Ultravioleta (UV)¹⁹

Se registra un espectro ultravioleta irradiando la muestra con luz UV que cambia continuamente su longitud de onda. Cuando la longitud de onda corresponde al nivel de energía requerido para excitar un electrón desde el orbital molecular de mayor energía ocupado (HOMO) a un nivel más alto llamado orbital molecular de menor energía desocupado (LUMO), se absorbe energía, la cual es detectada y graficada como absorbancia (A) en función de la longitud de onda, definida como

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

Donde I_0 es la intensidad de la luz incidente e I es la intensidad de la luz transmitida a través de la muestra. La longitud de onda necesaria para efectuar la transición de un orbital a otro en una molécula conjugada depende de la naturaleza del sistema conjugado. Un compuesto que contiene un mayor número de dobles enlaces conjugados absorbe a mayores longitudes de onda.

La cantidad de luz UV absorbida se expresa como la absorptividad molar (ϵ) de la muestra, ésta es una constante física característica de la sustancia que se observa. Se define por la ecuación:

$$\epsilon = \frac{A}{C \cdot l}$$

Donde

A=Absorbancia

C= concentración de la muestra en mol/L

l= longitud de la trayectoria de la muestra en cm.

En esta investigación se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible Varian Cary 50 bio.

Infrarrojo (IR) ²⁰

El infrarrojo permite conocer la estructura de un compuesto al informar de los grupos funcionales presentes en la molécula.

Una molécula vibra constantemente, las vibraciones de enlaces con momentos dipolares generalmente ocasionan absorciones infrarrojas. Cuando un campo eléctrico está en la misma dirección que el momento dipolar de una molécula, se comprime el enlace y disminuye su momento dipolar. Cuando el campo se opone al momento dipolar, el enlace se estira y aumenta el momento dipolar. Si esta extensión y compresión alternas del enlace ocurre a la frecuencia de vibración natural de una molécula, se absorberá energía.

Un grupo de átomos determinado da origen a bandas de absorción características debido a que absorbe a una frecuencia de luz específica.

El ATR (Attenuated Total Reflection) es una técnica de muestreo utilizada en el IR, la cual se produce cuando una radiación infrarroja entra en un cristal ATR transmisor y de alto índice de refracción. El cristal está diseñado para permitir una reflexión interna total que crea una onda evanescente sobre la superficie del cristal. Esta onda se extiende a la muestra que se mantiene en contacto íntimo con el cristal, registrándose el espectro de infrarrojo del analito. La composición de los materiales poliméricos puede ser fácilmente determinada mediante su espectro infrarrojo usando una transformada de Fourier (FT-IR).

En este estudio se aprovechó la presencia o ausencia del grupo carbonilo en las moléculas nativas y modificadas de los polímeros para poder determinar si hubo conjugación o no. El enlace C=O absorbe a una longitud entre 1690-1760 cm^{-1} .

Resonancia Magnética Nuclear (RMN)²⁶

Varios tipos de núcleos atómicos se comportan como si estuvieran girando alrededor de un eje. Debido a que tienen carga positiva, estos núcleos giratorios actúan como pequeños imanes en forma de barra e interactúan con un campo magnético externo (B_0), en ausencia de dicho campo los espines de los núcleos magnéticos se orientan al azar; sin embargo cuando se coloca una muestra que contiene éstos núcleos entre los polos de un imán poderoso (>2 Teslas), los núcleos adoptan orientaciones específicas. Los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo (estado de espín α), mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético (estado de espín β) de tal manera que el campo efectivo sentido por el núcleo es un poco más débil que el campo aplicado. La diferencia de energía entre los dos

estados de espín α y β , depende de la fuerza del campo magnético aplicado (B_0). Cuanto mayor sea el campo magnético, mayor diferencia energética habrá entre los dos estados de espín.

Si se irradian los núcleos orientados con radiación electromagnética de la frecuencia apropiada, la absorción de energía ocurre y el estado de menor energía invierte su espín al estado de mayor energía. Cuando ocurre la inversión de spin se dice que los núcleos magnéticos están en resonancia con la radiación aplicada.

La frecuencia exacta necesaria para la resonancia depende de la fuerza del campo magnético externo y de la identidad de los núcleos. Si se aplica un campo magnético muy fuerte, es mayor la diferencia de energía entre los dos estados de espín y se requiere radiación con mayor frecuencia (mayor energía) para invertir el spin. Si se aplica un campo magnético más débil, se requiere menos energía para efectuar la transición entre los estados de espín nuclear.

Si la frecuencia de la radiación se mantiene constante y se varía la intensidad del campo magnético aplicado, cada núcleo se pone en resonancia a una fuerza de campo ligeramente diferente, estas diferencias pueden detectarse en los campos efectivos experimentales y por lo tanto, podemos ver una señal distinta en la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para cada uno de los núcleos de ^1H y ^{13}C químicamente distintos en un compuesto.

La ^{13}C -RMN hace posible contar el número de átomos de carbono diferentes en una molécula. Los carbonilos son particularmente distinguibles y se encuentran siempre en el extremo del campo bajo del espectro de 160 a 220 ppm.

MATERIALES Y REACTIVOS

Para este estudio se utilizaron materiales disponibles comercialmente ya que se pretende que los resultados obtenidos en el laboratorio sean fácilmente escalables a nivel industrial. En las siguientes tablas se describen las características principales de los reactivos.

Reactivos

Tabla 4. Características de los reactivos utilizados

REACTIVO	NO. DE LOTE	CAS*	Pureza (%)	PROVEEDOR
Ácido L-manónico- γ -Lactona	1447094V	22430-23-5	97	SIGMA-ALDRICH
Dimetilformamida	34542	68-12-2	100	SINTORGAN
TIN (II) 2-Etil-hexanoato	074K0113	301-10-0	95	SIGMA-ALDRICH
Etanol	N09A26	64-17-5	95	J.T. BAKER

*Número de identificación de los compuestos químicos (Chemical Abstrac Service)

Poloxaminas

Tabla 5. Características de las poloxaminas utilizadas

Nombre comercial	Proveedor	Lote	CAS	PM (g/mol)	Pureza
T701	Sigma-Aldrich	07505EDV	26316-40-5	3600	No disponible
T1107	BASF	WPE2SC3B	No disponible	15000	No disponible

Tabla 6. Propiedades de las poloxaminas utilizadas.

Nombre comercial	Unidades de PO por bloque	Unidades de EO por bloque	Balance hidrofílico - lipofílico (HLB)	pka ₁	pka ₂
T701	13	4	1-7	4.0	7.9
T1107	19	60	18-23	5.6	7.9

Fármacos

Tabla 7. Características de los fármacos utilizados.

Nombre Comercial	Proveedor	Lote	CAS	PM (g/mol)	Pureza (%)
Clorhidrato de amiodarona	Parafarm, Droguria Saporiti	091108	19774-82-4	681.77	98-99
Nimodipina	Parafarm, Droguria Saporiti	120307	66085-59-4	418.45	≥ 99

Tabla 8. Propiedades de los fármacos utilizados.

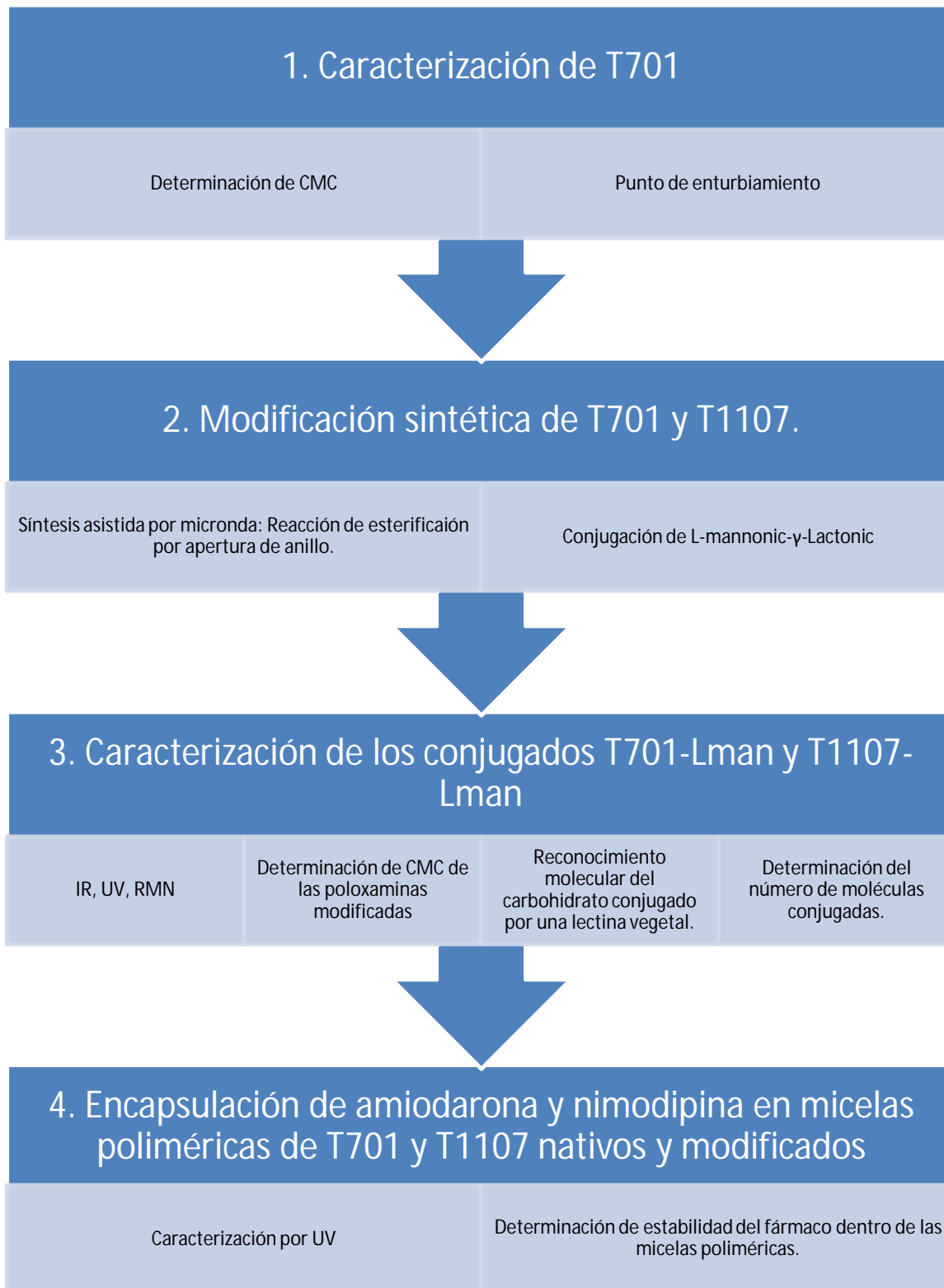
Fármaco	Punto de fusión (°C)	Solubilidad (mol/L)	Toxicidad DL ₅₀ (mg/kg)	Coefficiente de reparto Log P	Pka
Clorhidrato de amiodarona ²⁷	159	3.57x10 ⁻⁴	3000*	7.24	6.95
Nimodipina ²⁸	125	6.1x10 ⁻⁶	2738*	3.05	5.41

*Oral en rata.

Materiales

- Balanza Analítica Acculab Sartorius Group ALC-210 (26150036)
- Agitador Magnético Digital IKA C-MAG HS4
- Micropipetas de 20, 100, 200 y 1000 μL
- Matraz de bola de 250 mL
- Tubos Falcón de 50 mL
- Frascos viales de 10 mL
- Vasos de precipitados de 20 mL
- Barra magnética
- Espátula
- Vasos de precipitados de 20 y 50 mL
- Tubos eppendorf
- Jeringa de plástico de 5 mL
- Filtros para jeringa con membrana de celulosa regenerada de 0.45 μm
- Agua destilada, agua milliQ.
- Membranas de diálisis molecular de 500-1000 y 3500 D.

ESQUEMA GENERAL DEL PROYECTO



CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA Y RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN DE TETRONIC T701

El Tetronic T701 es una poloxamina que a pesar de estar disponible comercialmente ha sido poco estudiada y por lo tanto se conocen pocas de sus propiedades fisicoquímicas. La primera parte de la investigación consistió en la caracterización de este compuesto.

El principal interés de este tipo de moléculas es la formación de micelas poliméricas por lo que se determinó su CMC a 25 y 35 °C en dos medios diferentes: agua milliQ y una solución salina de fosfatos (PBS) con pH amortiguado de 7.4.

Punto de Enturbiamiento

El punto de enturbiamiento o "cloud point" de un líquido es la temperatura a la que los sólidos disueltos ya no son completamente solubles, precipitando como una segunda fase, dando al fluido un aspecto turbio. Para encontrar el punto de enturbiamiento de la poloxamina T701 se siguió el método descrito a continuación:

- 1.- Se preparó una disolución al 1% m/m en agua destilada en un tubo de ensayo.
- 2.-Se enfrió la disolución en un baño de hielo a 0°C.
- 3.-Se sumergió un termómetro en el tubo y se dejó aumentar la temperatura de la mezcla hasta temperatura ambiente determinando la temperatura a la cual se empezaron a formar las primeras señales de turbidez. El experimento se repitió cinco veces. En la tabla 7 se reporta el resultado obtenido.

Tabla 9. Determinación del "cloud point" de T701 nativo.

Punto de enturbiamiento	(°C)
	21.6±0.1

Conocer el punto de enturbiamiento es importante para determinar la estabilidad de almacenaje y el límite de temperatura de trabajo.

Determinación de la CMC de T701

Para eliminar fracciones de peso molecular muy bajo y tener una menor distribución de tamaños fue necesario dializar la materia prima utilizando una membrana de diálisis molecular de 500-1000 Daltons, de esta manera se obtuvo un reactivo más homogéneo.

Se pesaron 3.1025 g de T701 en un vaso de precipitados de 100 mL y se agregaron 10mL de agua milliQ, se agitó manualmente obteniendo una disolución heterogénea. Se colocó el vaso de precipitados en un refrigerador a 4°C hasta obtener una disolución homogénea, se dividió el contenido del mismo en dos membranas de diálisis molecular las cuales se mantuvieron en hidratación con agua destilada durante 48 horas con agitación moderada. Transcurridas las 48 horas de diálisis se transfirió el contenido de las membranas a 4 tubos Falcon. Las muestras se congelaron a -20°C para posteriormente ser liofilizadas durante 48 horas, después de este tiempo se obtuvo el polímero seco que se utilizó para la determinación de CMC. Se perdió a través del poro de la membrana el 48.92% del polímero nativo, lo cual indica hay una gran cantidad de cadenas cortas en la poloxamina T701 utilizada.

Determinación de CMC de T701 nativo en agua milliQ a 25 y 37°C

A partir de un estándar al 1% del polímero dializado y liofilizado, como se describió anteriormente, se prepararon disoluciones en agua milliQ de diferente concentración. Para tener homogénea la mezcla fue necesario mantener en un baño de hielo la disolución madre.

Para determinar la CMC se empleó un equipo de dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés). Las mediciones se realizaron por quintuplicado con lo que se obtuvo un promedio de intensidad en kilo cuentas por segundo (kcps) de cada una de las muestras.

Tabla 10. Datos experimentales T701 nativo a 25°C en agua milliQ.

MUESTRA	Concentración % p/V	Concentración mM	Intensidad de la Luz Dispersada (kcps)
1	0.0005	0.0014	485.2
2	0.0008	0.0023	164.4
3	0.0011	0.0029	107.3
4	0.0021	0.0058	413.4
5	0.0042	0.0116	457.6
6	0.0063	0.0174	711.6
7	0.0085	0.0233	2368.4
8	0.0159	0.0437	1297.1
9	0.0318	0.0874	911.4
10	0.0530	0.1456	1305.5
11	0.0795	0.2185	2191.6
12	0.1060	0.2913	5802.4
13	0.2120	0.5827	27267.6
14*	0.4240	1.1654	27049.8
15*	0.6360	1.7481	12587.7
16*	0.8480	2.3308	1944.9
17*	1.0600	2.9135	2096.5

*Muestras turbias a 25°C.

Las muestras se dejaron reposar durante 24 horas en un horno de secado a 25°C, después de este tiempo se midieron en el DLS para realizar la determinación de CMC; los estándares con una concentración mayor a 0.25% p/v presentaron turbidez. En algunos casos estas mismas muestras se calentaron en un baño a 37°C y se dejaron reposando durante 24 horas para determinar la dependencia de CMC con la temperatura utilizando la misma técnica. En estas muestras por encima de 0.05% p/v se presentó turbidez. Los resultados obtenidos se presentan en las tablas 10 y 11 y en las figuras 18 a la 23.

De cada una de las determinaciones primero se muestra el gráfico de la intensidad en función de la concentración. Posteriormente se presenta el tratamiento de datos.

La figura 18 muestra los datos obtenidos para el T701 nativo en agua milliQ a 25°C. A bajas concentraciones la intensidad de la señal se mantiene prácticamente constante y posteriormente aumenta bruscamente debido a la formación de micelas. Podemos observar que a concentraciones más altas hay un decaimiento en la intensidad de la señal lo cual puede atribuirse a que la mezcla no es homogénea debido al bajo punto de enturbiamiento del polímero, es decir que a ciertas concentraciones y temperatura habrá una separación de fases, en tal situación el equipo arroja valores similares a los de bajas concentraciones, como si únicamente hubiera agua.

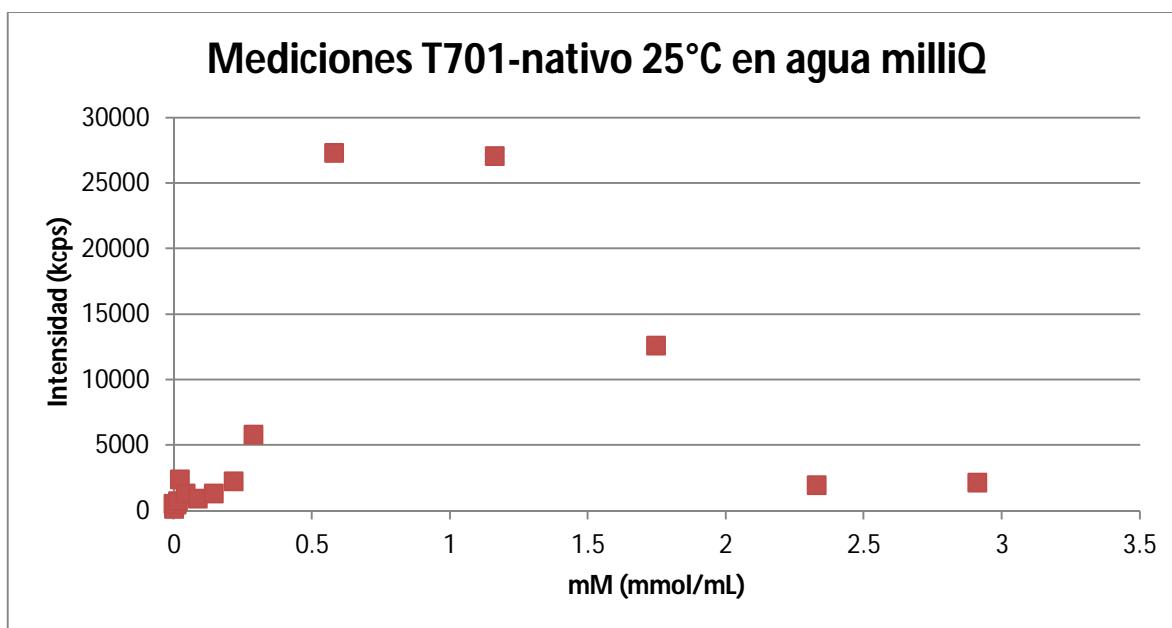


Figura 18. Intensidad de la luz dispersada en función de la concentración.

La figura 19 es una ampliación de la figura 18 que va desde 0 hasta 0.6 mM de T701 nativo en agua milliQ a 25°C. En ella se puede apreciar claramente que la señal va aumentando paulatinamente y posteriormente presenta un cambio en la pendiente. Para determinar el punto de quiebre se ajustan dos líneas rectas y se considera que el punto de intersección corresponde a la CMC, que este caso resultó ser de 0.2251 mM.

En todos los gráficos de CMC se muestra la regresión lineal de las rectas ajustadas a los datos experimentales, el caso ideal es que la primera línea tenga una pendiente cercana a cero, debido a

que no hay micelas las lecturas serán muy similares entre sí, por lo tanto el coeficiente de correlación o R^2 tenderá a cero, por el otro lado una vez que la CMC se alcanza debe haber un incremento lineal en la intensidad y la de la segunda recta R^2 se acercará a 1.

La figura 20 corresponde a la determinación de la CMC del mismo sistema en las mismas condiciones pero expresado en %p/V. En este caso resultó ser de 0.0818 %p/V.

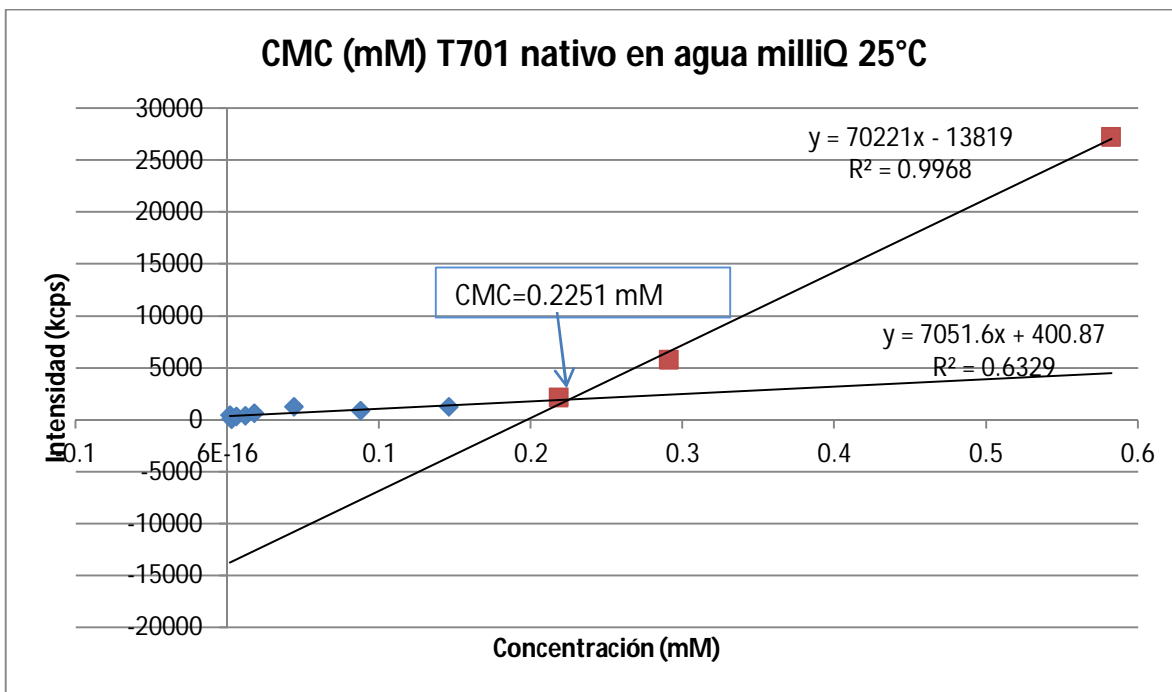


Figura 19. Ajuste de datos para determinar CMC T701 25°C (mM). CMC= 0.2251 mM

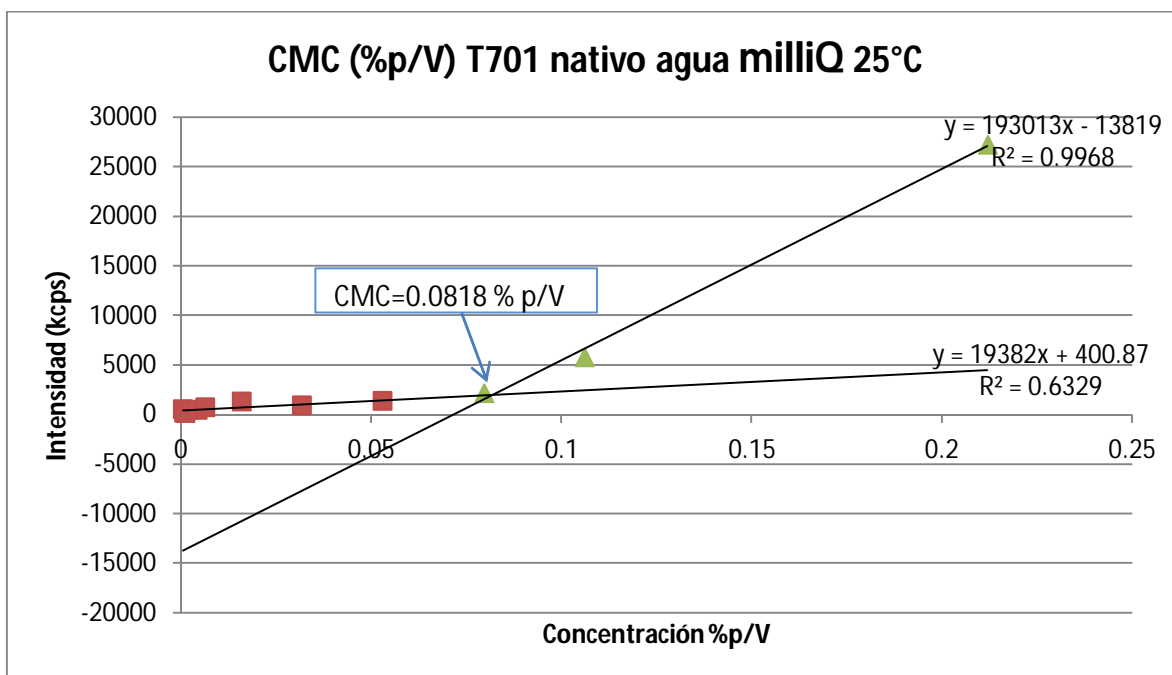


Figura 20. Ajuste de datos para determinar la CMC T701 25°C (% p/V). CMC= 0.0818 % p/V

El mismo procedimiento descrito anteriormente fue utilizado para determinar la CMC de T701 en agua milliQ a la temperatura del cuerpo humano: 37°C. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 11 y en las figuras 21 a la 23.

Tabla 11. Datos experimentales para determinar CMC de T701 nativo en agua milliQ a 37°C.

MUESTRA	Concentración % p/V	Concentración mM	Intensidad de la Luz Dispersada (kcps)
1	0.0005	0.0015	1548.7
2	0.0008	0.0023	1640.5
3	0.0011	0.0029	908.1
4	0.0021	0.0058	2175.4
5	0.0042	0.0117	1029.6
6	0.0064	0.0175	1996.1
7	0.0085	0.0233	4082.9
8	0.0159	0.0437	8486.9
9	0.0318	0.0874	16940.8
10	0.0530	0.1457	9016.7
11*	0.0795	0.2185	2986.9
12*	0.1060	0.2913	1575.0
13*	0.2120	0.5827	886.5
14*	0.4240	1.1654	1020.5
15*	0.6360	1.7481	1174.5
16*	0.8480	2.3308	1297.3
17*	1.0600	2.9136	1565.1

*Muestras turbias a 37°C.

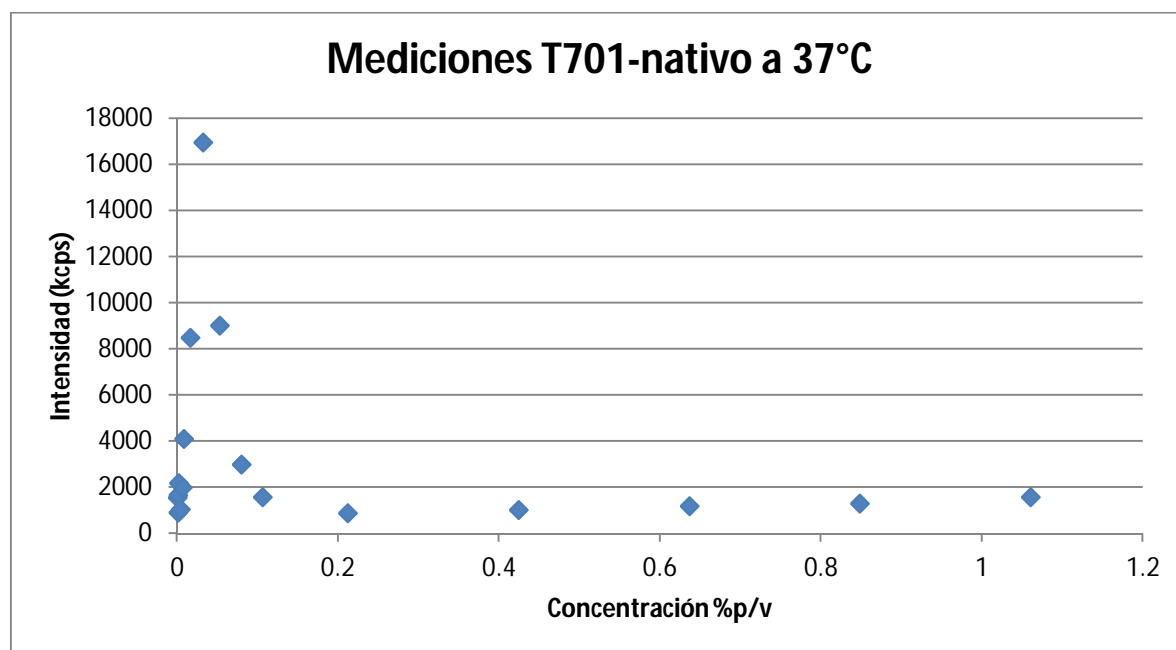


Figura 21. Intensidad de la luz dispersada en función de la concentración (%p/V).

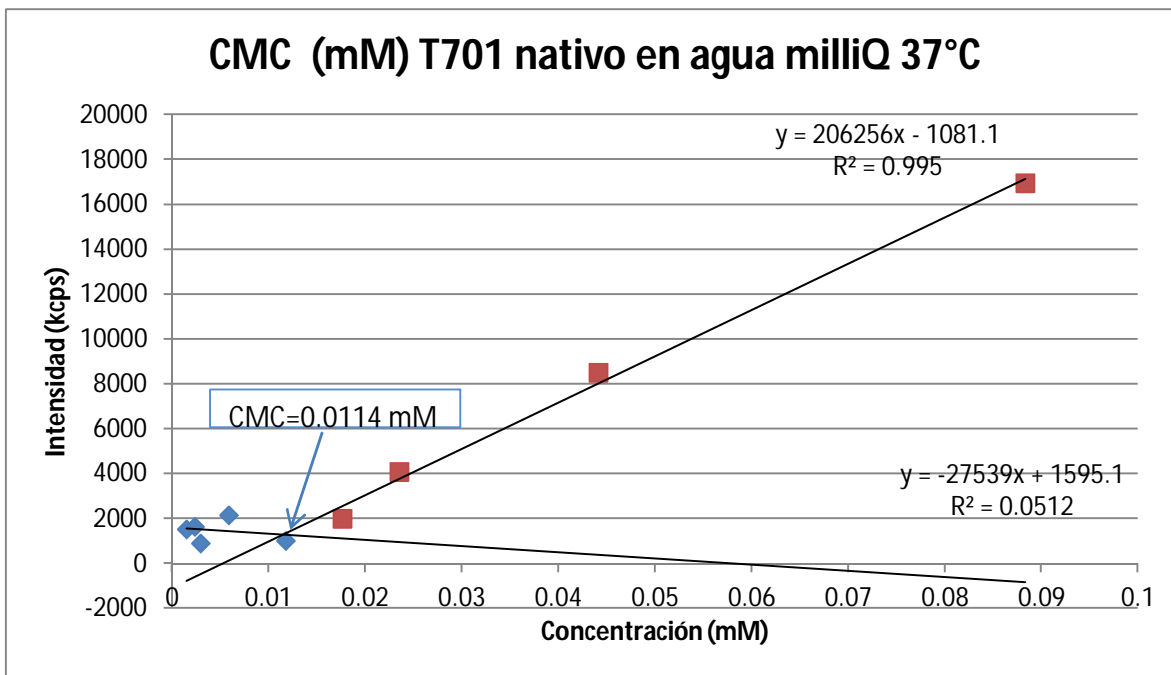


Figura 22. Ajuste de datos para determinar CMC T701 37°C (mM). CMC=0.0114 mM

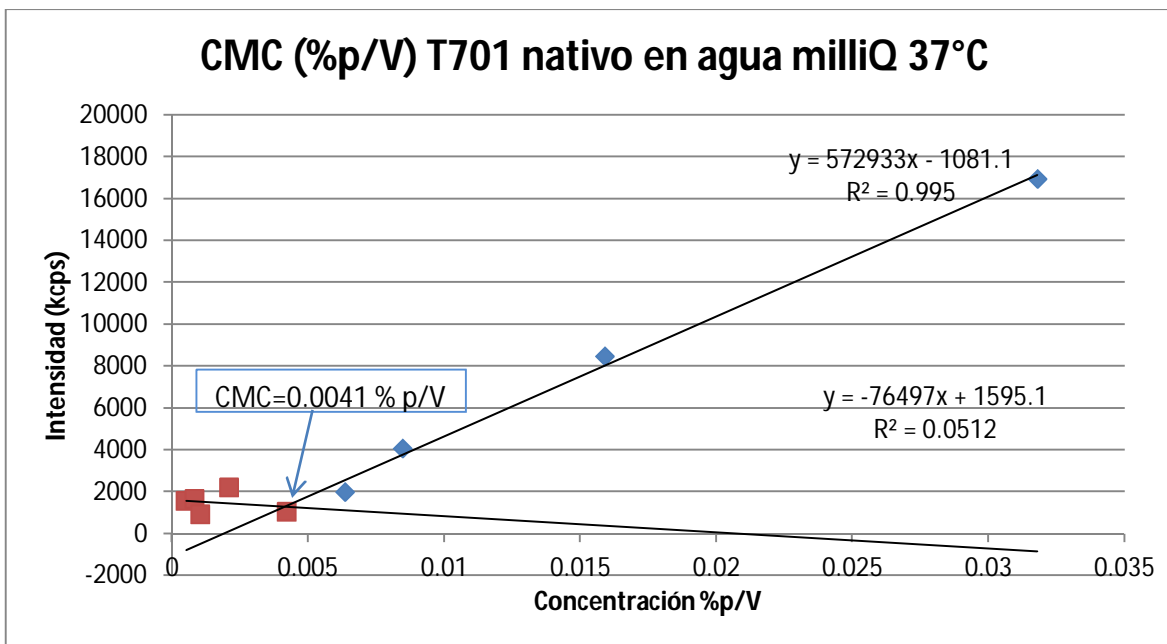


Figura 23. Ajuste datos para determinar CMC T701 37°C (%p/V). CMC= 0.0041 % p/V

La tabla 12 presenta la comparación entre los resultados obtenidos para la CMC del T701 nativo en agua milliQ a 25 y 37°C.

A 37°C podemos observar que la formación de micelas se induce a muy bajas concentraciones, lo cual coincide con los datos reportados en la literatura²⁹. La CMC de este sistema disminuye en un factor de 20 al elevar la temperatura de 25 a 37°C. En particular con este polímero la influencia de

la temperatura es alta debido al contenido de bloques de POP que al ser hidrofóbicos buscan la mejor forma de acomodarse en el medio. Conforme la temperatura es aumentada, los bloques de POP pierden progresivamente su esfera de hidratación resultando en un aumento en las interacciones de diferentes cadenas de estos bloques. Por el otro lado, los bloques de POE retienen su fuerte interacción con el agua. Este fenómeno es común para muchas moléculas anfifílicas⁶. Las preferencias de los bloques presentes por diferentes fases conducen a la formación de micelas.

Tabla 12. Influencia de la Temperatura en la formación de micelas de T701 nativo en agua milliQ.

Temperatura °C	CMC		Factor de cambio
	mM	% p/V	
25	0.2251	0.0819	20
37	0.0114	0.0041	

Dependencia de la CMC de T701 en función del pH

Como ya se había establecido, la molécula central de etilendiamina en las poloxaminas les confiere propiedades dependientes del pH. Estos polímeros tienen dos valores de pKa asociados a los dos átomos de nitrógeno presentes. Los valores de pKa de T701 son 4.0 y 7.9, por lo tanto es de esperarse que a mayor pH la formación de micelas se dé a menores concentraciones debido a que los dos átomos de nitrógeno se encontrarán desprotonados y no existirán cargas electrostáticas que desfavorezcan la agregación. Dicho de otra manera, si hay grupos cargados en el centro de la molécula, éstos impedirán la formación de micelas por la repulsión electrostática entre ellos. En la figura 24 se esquematizan las especies presentes en una disolución de la poloxamina T701 a diferentes pH.

En este trabajo se utilizó un buffer de fosfatos (PBS) con un pH de 7.4, al igual que la sangre en el cuerpo humano, para determinar la influencia del pH en la formación de micelas y así demostrar la hipótesis planteada.

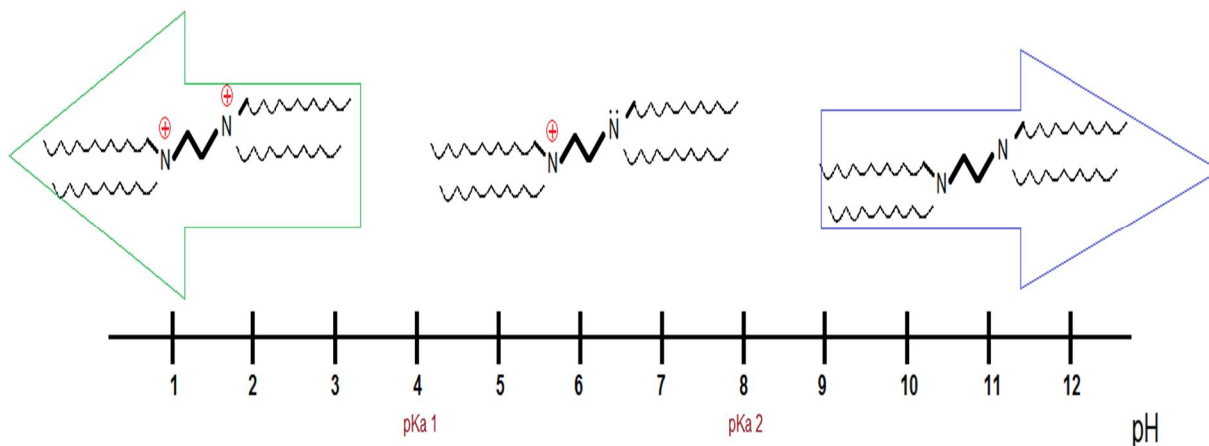


Figura 24. Esquematización de las especies presentes de T701 de acuerdo al pH.

Determinación de CMC de T701 nativo en PBS A 25°C

En las tablas 13 y 14 se muestran los resultados obtenidos mediante DLS para determinar la CMC de T701 nativo en PBS a 25°C y 37°C respectivamente.

En el medio amortiguado, la turbidez de las disoluciones se presenta por encima de 0.1% p/V a 25°C. En el caso de 37°C se prepararon estándares con una concentración máxima de 0.08% p/V para mantener homogéneas las disoluciones.

Tabla 13. Datos experimentales para determinar CMC T701 en PBS a 25°C

MUESTRA	Concentración % p/V	Concentración mM	Intensidad de la Luz Dispersada (kcps)
1	0.0010	0.0029	2356.8
2	0.0021	0.0058	744.2
3	0.0042	0.0116	435.6
4	0.0063	0.0174	220.5
5	0.0084	0.0232	763.3
6	0.0157	0.0436	547.1
7	0.0314	0.0872	444.9
8	0.0523	0.1453	1905.0
9	0.0785	0.2179	2550.2
10	0.1046	0.2906	5471.6
11*	0.2092	0.5811	16134.5
12*	0.4184	1.1622	9051.7
13*	0.6276	1.7433	1353.1

*Muestras turbias.

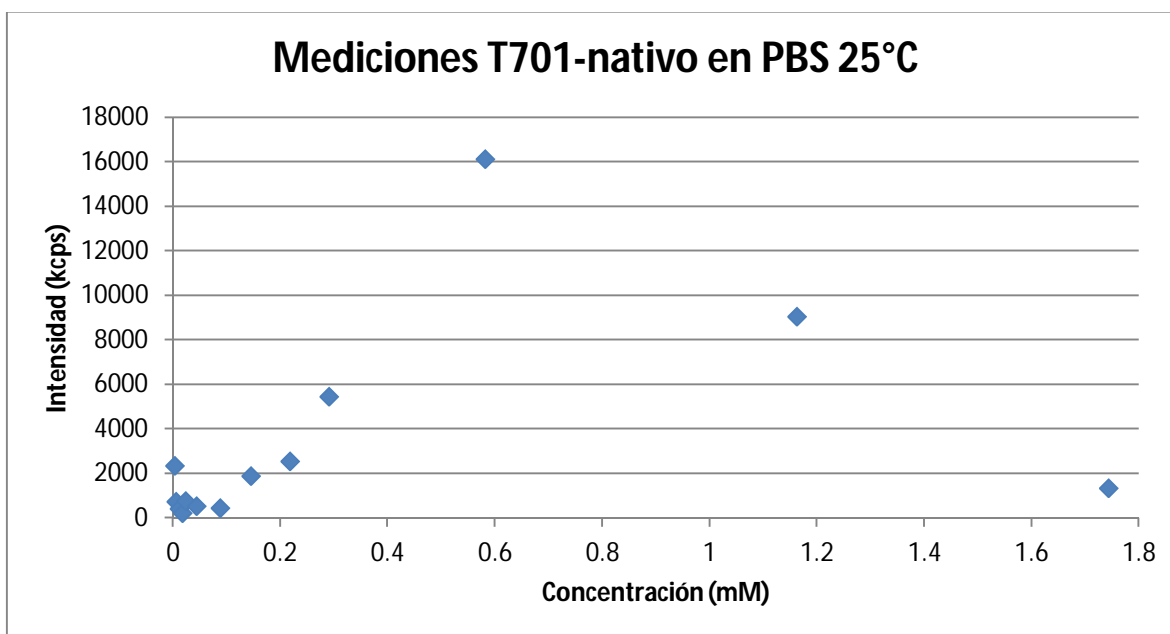


Figura 25. Mediciones de intensidad en función de la concentración T701 en PBS a 25°C

El procedimiento para determinar la CMC fue el mismo que el descrito anteriormente con T701 en agua milliQ.

Las figuras 25 y 28 muestran la intensidad de luz dispersada para T701 nativo en PBS a 25 y 37°C respectivamente. Las figuras 26, 27, 29 y 30 corresponden al tratamiento de los datos.

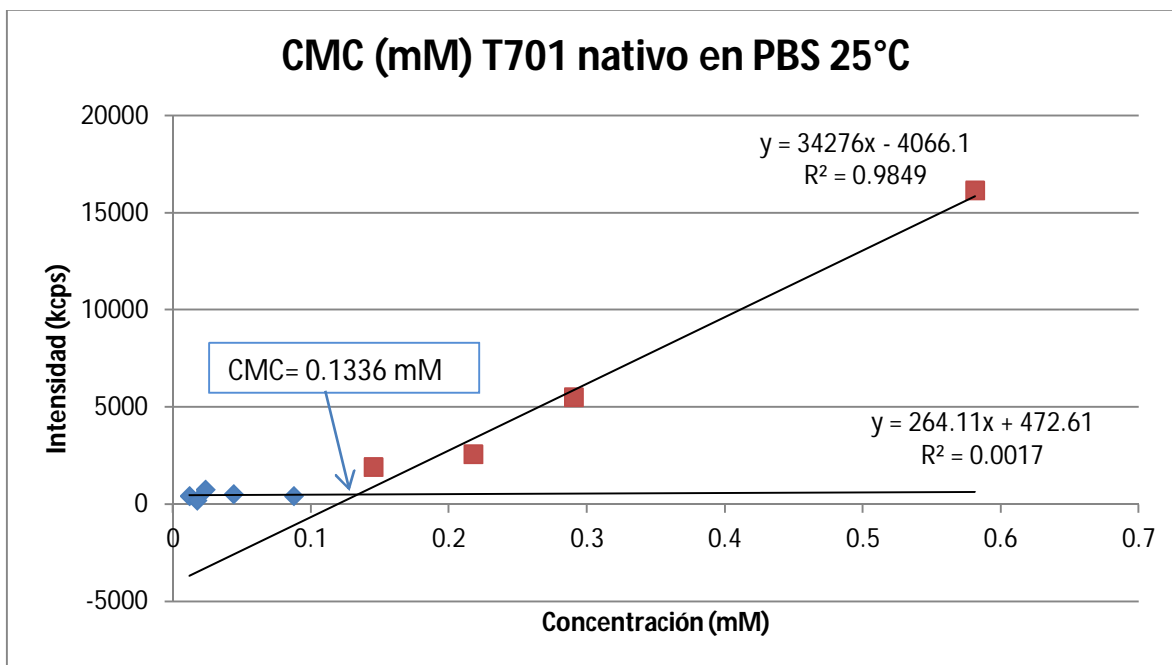


Figura 26. Ajuste de datos para determinar CMC de T701 en PBS a 25°C (mM). CMC=0.1336 mM

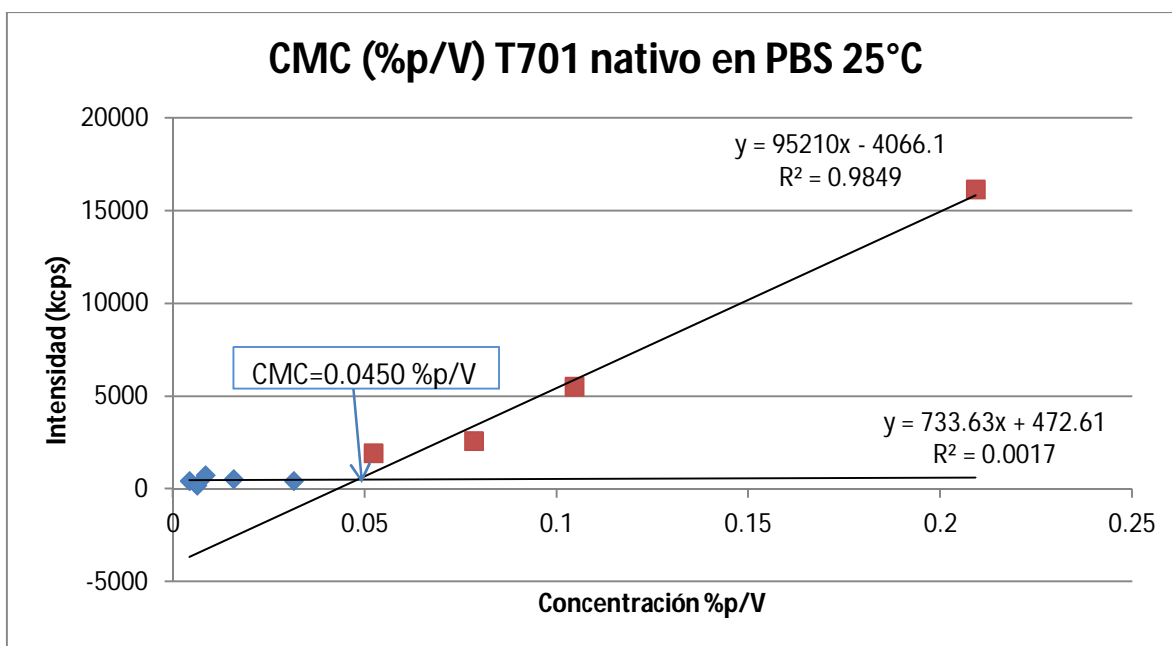


Figura 27. Ajuste de datos para determinar T701 en PBS a 25°C (%p/V). CMC= 0.0480 % p/V

Determinación de CMC de T701 nativo en PBS A 37°C

Tabla 14. Datos experimentales para determinar CMC T701 en PBS 37°C.

MUESTRA	Concentración % p/V	Concentración mM	Intensidad de la Luz Dispersada (kcps)
1	0.0005	0.0015	344.32
2	0.0009	0.0024	390.64
3	0.0011	0.003	300.96
4	0.0022	0.006	404.98
5	0.0032	0.009	373.04
6	0.0043	0.012	986.24
7	0.0065	0.018	948.68
8	0.0086	0.024	1992.54
9	0.0108	0.03	2664.66
10	0.0216	0.06	21771.98
11	0.0432	0.12	21938.7
12	0.0648	0.18	23416.82
13	0.0864	0.24	19662.3

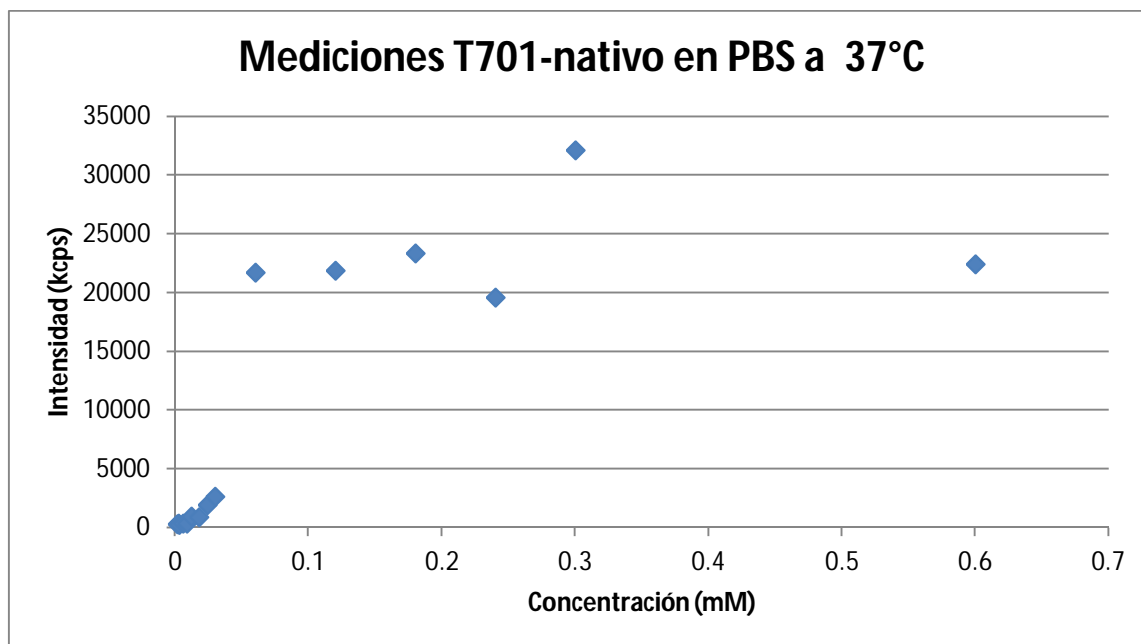


Figura 28. Mediciones de intensidad en función de la concentración T701 en PBS a 37°C

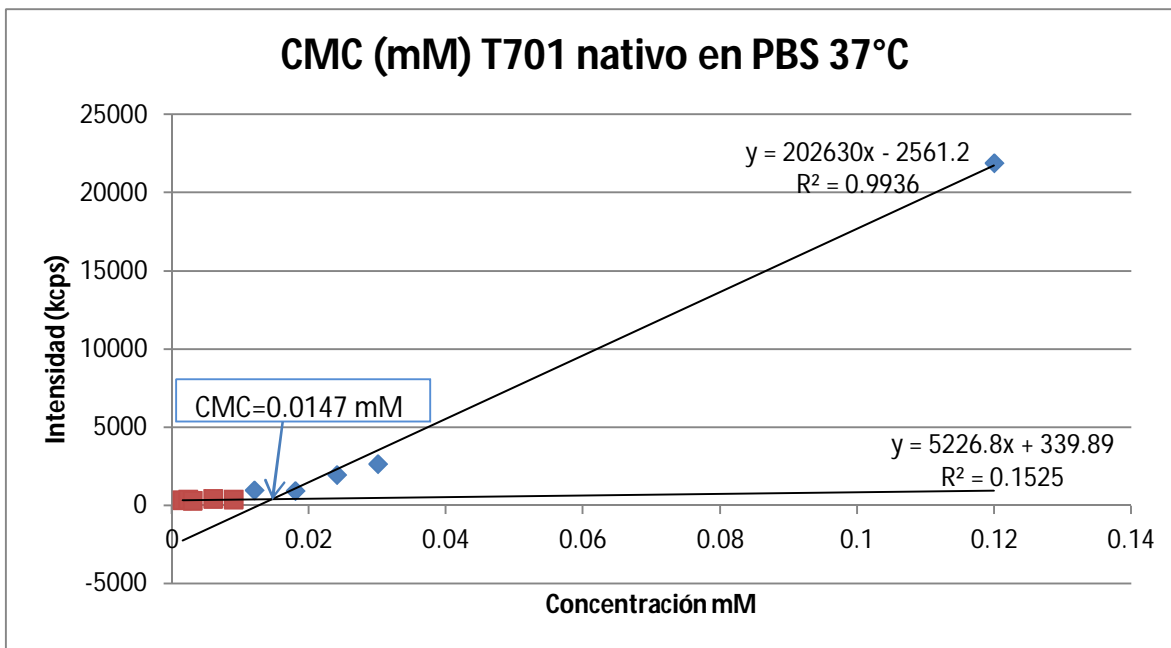


Figura 29. Ajuste de datos para determinar T701 en PBS 37°C (mM). CMC= 0.0147 mM

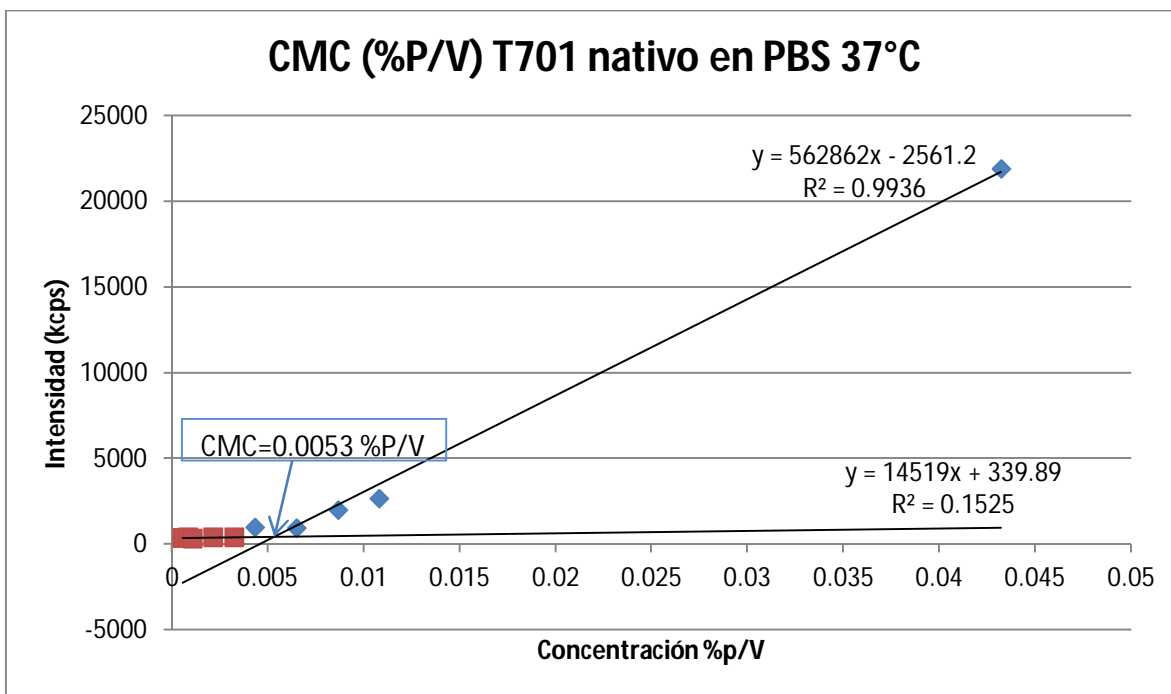


Figura 30. Ajuste de datos para determinar T701 en PBS 37°C (%p/V). CMC= 0.0053 % p/V

La tabla 15 compara los resultados obtenidos para la CMC de T701 nativo en PBS a 25 y 37°C. En buffer con pH 7.4 también observamos la misma tendencia que en agua milliQ en la formación de micelas; cuando se aumenta la temperatura se forman agregados a menor concentración. Aunque

en este caso el factor de cambio es sólo 9. Como ya se mencionó, el efecto de la temperatura está relacionado con la pérdida de moléculas de agua alrededor de la parte hidrofóbica del polímero, en el medio amortiguado las poloxaminas pueden encontrarse menos solvatadas debido a las interacciones electrostáticas del agua con las sales del amortiguador, por lo tanto el cambio en la CMC es menor.

Tabla 15. Influencia del pH en medio amortiguado pH=7.4

Temperatura °C	CMC		Factor de cambio
	mM	% p/V	
25	0.1336	0.0480	9
37	0.0147	0.0053	

Por otro lado tenemos la influencia del pH. Debido a que las poloxaminas tienen un carácter básico por la presencia de los nitrógenos centrales en la molécula, el pH de la solución puede variar cuando no se trabaja en medio amortiguado. En la tabla 16 se presentan los resultados obtenidos, se resaltan las concentraciones cercanas a la CMC en agua milliQ a 25 y 37 °C además del pH que tiene la disolución a dicha concentración. Como puede observarse el pH disminuye conforme aumenta la temperatura lo cual se debe a la separación de fases al estar por encima del punto de enturbiamiento de T701.

Tabla 16. pH en función de la concentración y temperatura de T701 nativo en agua milliQ.

Concentración (%p/V)	pH	
	25°C	37°C
1	7.99	7.02
0.5	7.70	7.08
0.1	7.56	6.83
0.05	7.07	6.75
0.025	6.86	6.52
0.005	6.28	6.22

Tabla 17. CMC de T701 en agua milli Q y PBS a 25 y 37°C

Temperatura	CMC 25°C		pH	CMC 37°C		pH
	mM	% p/V		mM	% p/V	
Agua Milli Q	0.2251	0.0819	7.56	0.0114	0.0041	6.22
PBS	0.1336	0.0480	7.44	0.0147	0.0053	7.44

Con ayuda de la tabla 17 podemos notar que a 25°C el pH del sistema en agua milliQ en concentraciones cercanas a la CMC es muy parecido al del amortiguador utilizado, sin embargo hay un cambio apreciable en la CMC, esto puede atribuirse a las interacciones electrostáticas entre el T701 con las sales de fosfato que forman el PBS, es decir hay un efecto salino³⁰.

El punto de enturbiamiento de un polímero es fuertemente dependiente de los cosolutos. Al aumento de la solubilidad debido a la presencia de una sal se le llama efecto salino primario (salting-in). A la disminución de la solubilidad debido a la creciente fuerza iónica de la solución se le llama efecto salino secundario (salting-out)³¹. Los polímeros pueden incrementar o disminuir su punto de enturbiamiento y por tanto su CMC en presencia de sales, debido a la interacción entre el polímero y el cosoluto. Algunos estudios sugieren que los fosfatos favorecen el efecto salting-out³². En investigaciones recientes con la poloxamina T904 también se ha observado que la presencia de NaCl favorece el autoensamblaje³³.

A 37°C el efecto salting-out disminuye al aumentar la temperatura porque en este caso el efecto dominante es el aumento de la energía interna del sistema, anulando las interacciones polímero cosoluto.

Aunque en este estudio no se verificó, de acuerdo a los resultados obtenidos la fuerza iónica también podría jugar un papel importante en la formación de micelas, debido a que cambiarían las interacciones electrostáticas entre las especies presentes en el medio lo cual repercutiría en el autoensamblaje del polímero. Alvarez-Lorenzo y Sosnik señalan que particularmente el pH y la fuerza iónica pueden alterar el grado de protonación de la etilendiamina central en las poloxaminas perturbando las interacciones hidrofóbicas que gobiernan el proceso de micelización³⁴.

MODIFICACIÓN SINTÉTICA

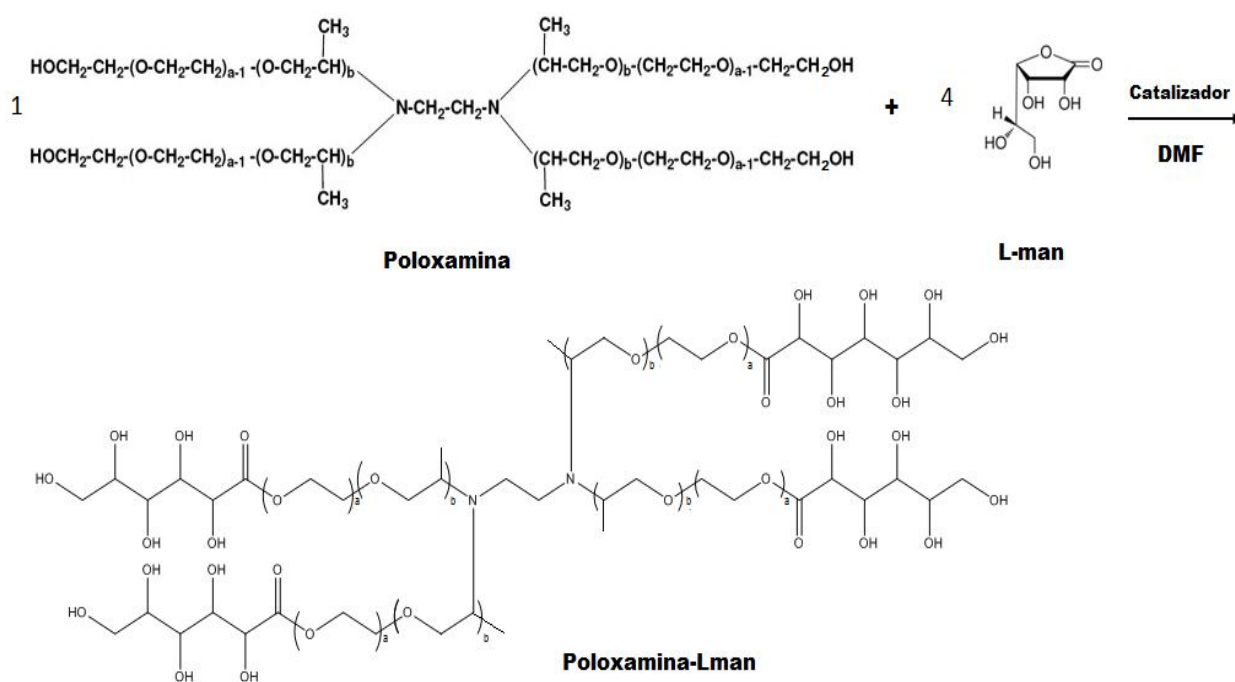


Figura 31. Reacción general.

Se realizó una reacción de esterificación por apertura de anillo mediante una síntesis asistida por microondas, los hidrógenos terminales de la poloxamina fueran sustituidos por ácido L-manónico- γ -lactona (L-man) en su forma abierta. En la figura 31 se muestra el esquema general de reacción.

Para poder realizar la conjugación del derivado de glucosa en la molécula del polímero, se siguió el protocolo empleado por el grupo de investigadores que trabajan bajo la asesoría del Doctor Alejandro Sosnik en el laboratorio de Farmacotecnia II, en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires³⁵.

Debido a que se han llevado a cabo estudios previos modificando diferentes polímeros empleando la misma técnica, las condiciones de reacción y elección del disolvente son elementos ya probados, sin embargo se deben adecuar dichas condiciones a las características de los reactivos utilizados.

Síntesis de T701-Lman

Reacción

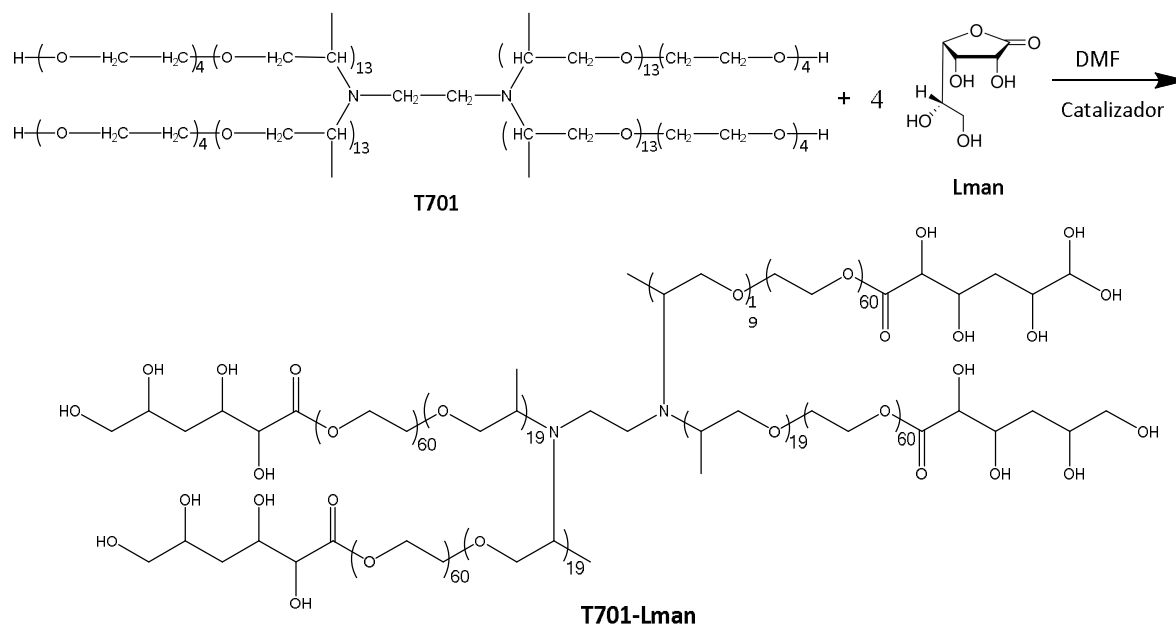


Figura 32. Esquema de reacción de T701.

Antes de realizar la síntesis se hicieron pruebas de solubilidad de las materias primas que serían empleadas en la síntesis. Considerando que es necesario 1 mol de polímero por cada 4 de L-man se calculó las cantidades necesarias para obtener 3g de polímero conjugado, las pruebas se hicieron en una escala 1:10 con la mínima cantidad de solvente posible. El disolvente elegido fue la dimetilformamida (DMF) ya que es transparente a las microondas.

Solubilidad de ácido L-manónico- γ -lactona: La prueba se realizó con 0.0116 g del reactivo y 0.5 ml de DMF. El derivado de manosa es totalmente soluble.

Solubilidad de T701: Se pesaron 0.3088 g de polímero y se agregaron desde 0.5 hasta 3 mL de DMF. Se obtiene una mezcla heterogénea ligeramente opalescente.

A la mezcla de polímero T701 en DMF se le agregó 0.6590 g de ácido L-manónico- γ -lactona, siendo éste dispersado en el medio.

Con estos resultados se procedió a llevar a cabo una prueba de síntesis para tratar de obtener 3 gramos de polímero modificado.

El catalizador utilizado en este estudio fue Sn (II) 2-Etil-hexanoato. Este catalizador ha sido aprobado por la Administración de Fármacos y Alimentos de Estados Unidos de Norte América (FDA, por sus siglas en inglés) para su uso en dispositivos biomédicos y como estabilizador en la industria alimenticia³⁶.

Se conocen, según la bibliografía, diferentes formas de realizar el cálculo del catalizador necesario en la reacción:

- i) Relación molar 1:40 respecto al peso molecular de la (s) lactona (s) utilizada (s)³⁷
- ii) Relación molar 1:1 respecto al PEG³⁸

Para asegurar que la reacción se realiza se utiliza el criterio que corresponde a la mayor cantidad calculada, de esta forma disminuye el error de pesada debido a que se trata de cantidades muy pequeñas de catalizador.

Primera Síntesis de T701-Lman

Antes de utilizar el polímero se secó en un baño de glicerina con vacío durante 2 horas a una temperatura no mayor a 80°C.

La modificación sintética se llevó a cabo con las cantidades de reactivos descritas en la tabla 18.

Tabla 18. Condiciones de reacción de la primera síntesis de T701-Lman.

Reactivo	Cantidad (g)	PM (g/mol)	Cantidad (moles)
T701	3.0727	3600	8.5×10^{-4}
L-mann	0.6535	178	36.7×10^{-4}
Tin (II)	0.0358	405	0.9×10^{-4}
DMF	30	73	0.4

Las condiciones para realizar la reacción fueron las descritas en la figura 33.

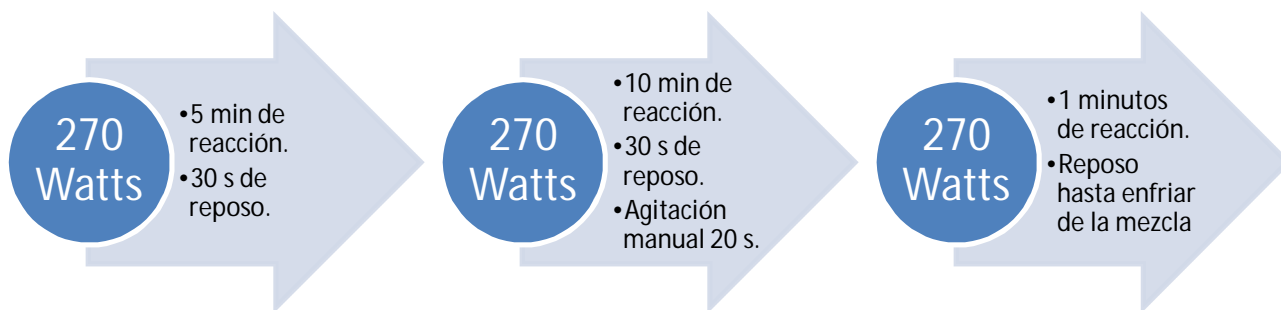


Figura 33. Condiciones de reacción de la primera prueba de síntesis de T701-Lman.

El tiempo total de la reacción en el microondas fue de 16 min. Se obtuvo una dispersión opaca amarillenta.

Después de la síntesis se dializó la mezcla de reacción con agua destilada durante 76 horas, cambiando frecuentemente el agua de diálisis.

Al finalizar la diálisis se trasvasó la mezcla a tubos Falcon y se mantuvieron en refrigeración a -20°C para su posterior liofilización durante 48 h. El producto no se recuperó debido a que las membranas no fueron compatibles con DMF y el poro de ésta pudo haber sido dañado dejando salir su contenido.

Segunda Síntesis de T701-Lman

Para asegurar la obtención del producto tratando de reproducir las condiciones experimentales, se mantuvieron los primeros quince minutos a 270 W pero esta vez de manera continua y se aumentaron 4 minutos de síntesis con una mayor potencia. En esta ocasión el tiempo total de reacción fue de 20 minutos. También se disminuyó el volumen de disolvente para evitar dañar las membranas.

Tabla 19. Condiciones experimentales en la segunda síntesis de T701-Lman.

Reactivo	Cantidad (g)	PM (g/mol)	
T701	3.0175	3600	8.4×10^{-4}
L-mann	0.6508	178	36.6×10^{-4}
Tin (II)	0.1256	405	3.1×10^{-4}
DMF	15	73	0.2

La cantidad de reactivos utilizados y las condiciones de reacción aparecen en la tabla 19 y figura 34 respectivamente.

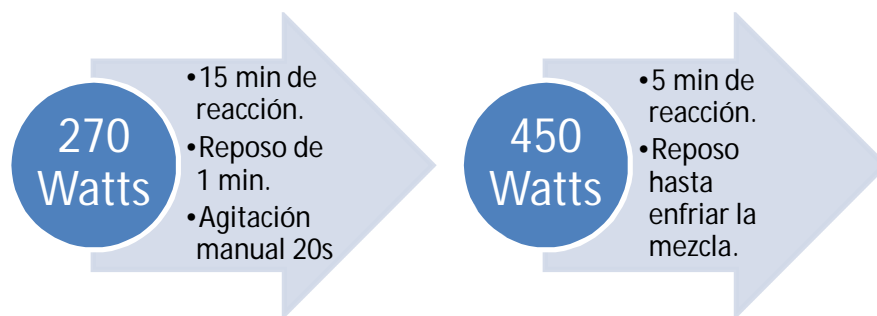


Figura 34. Condiciones de reacción de la segunda prueba de síntesis de T701-Lman

Se obtiene una mezcla opaca amarillenta, a la cual se agregaron 35 mL de agua destilada para diluir la DMF, se dividió en tubos Falcon para ser congelado a -20°C ; posteriormente se liofilizó durante 30 horas.

Después de la liofilización se obtuvo 0.7373 g de producto seco, el cual presentó el mismo estado físico que la materia prima: líquido viscoso pero color café. Se obtuvieron 0.74 g de poloxamina modificada.

Tercera Síntesis de T701-Lman

El tercer intento de conjugación se realizó con mayores cantidades de reactivos (tabla 20) para aumentar la cantidad de producto recuperado, poder caracterizarlo y hacer algunas pruebas de encapsulación. Las condiciones de reacción se muestran en la figura 35.

Tabla 20. Condiciones de reacción de la tercera síntesis de T701-Lman.

Reactivo	Cantidad (g)	PM (g/mol)	Cantidad (moles)
T701	15.1045	3600	4.2×10^{-3}
L-mann	3.2514	178	18.2×10^{-3}
Tin (II)	0.6380	405	1.6×10^{-3}
DMF	45	73	0.6

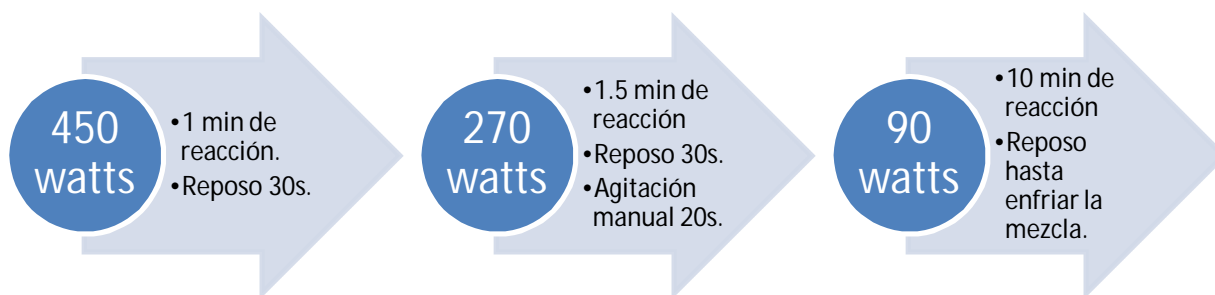


Figura 35. Condiciones de reacción de la tercera prueba de síntesis de T701-Lman.

En este caso al aumentar la cantidad de DMF no fue posible repetir las condiciones de reacción anteriores, debido a que en los hornos de microondas caseros no se controla la temperatura de la reacción y un sobrecalentamiento del disolvente puede provocar una explosión. Se aumentó la potencia para asegurar que se efectúe la modificación del polímero pero una vez que se observó reflujo de la DMF ésta se disminuyó al igual que el tiempo de reacción.

El tiempo total de reacción fue de 12.5 minutos. Se obtuvieron 9.06 gramos de polímero modificado.

Síntesis de T1107-Lman

A continuación se realizó la modificación de otra poloxamina, Tetronic T1107, que previamente había sido caracterizada por el equipo de trabajo del Dr. Sosnik²¹. Este polímero es más soluble que T701 al tener mayor cantidad de bloques hidrofílicos (POE) y su punto de enturbiamiento se encuentra por encima de los 100°C por lo que la temperatura no fue una limitante en el trabajo experimental⁴. La reacción se describe en la figura 36.

Reacción

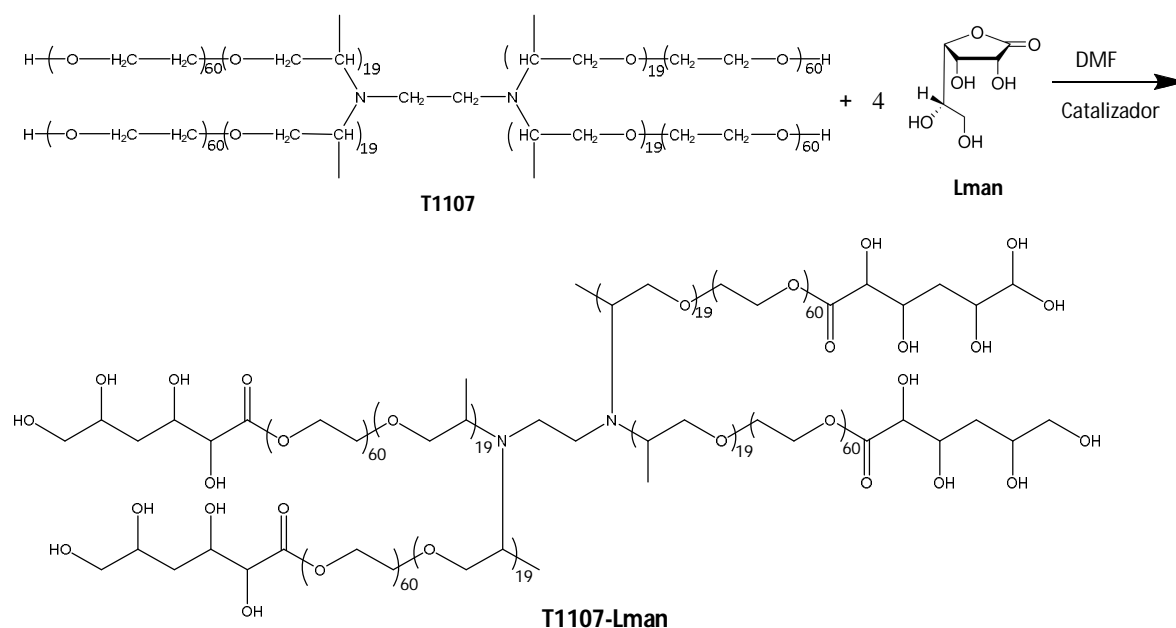


Figura 36. Esquema de síntesis de T1107-Lman.

Primera síntesis de T1107-Lman

Las condiciones de reacción se presentan en la figura 36, fueron las mismas que en la segunda síntesis de T701-Lman, de esta manera se podría probar que el método es reproducible. La cantidad de reactivos utilizados se presenta en la tabla 21.

Tabla 21. Condiciones de reacción en la síntesis de T1107-Lman.

Reactivo	Cantidad (g)	PM (g/mol)	Cantidad (moles)
T1107	3.1647	15000	2.1×10^{-4}
L-mann	0.1670	178	9.4×10^{-4}
Tin (II)	0.0358	405	0.88×10^{-4}
MDF	15 ml	73	0.2

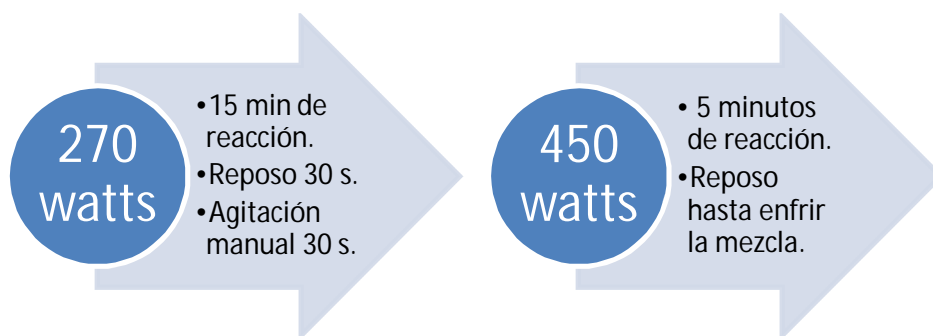


Figura 37. Condiciones de reacción de la primera prueba de síntesis de T1107-Lman.

Tiempo de reacción total 20 minutos. Se obtuvo una dispersión opaca amarillenta. Ésta se diluyó al 50% con agua destilada y se dializó durante 48 horas utilizando una membrana de 3.5 kD, el agua de diálisis se cambió frecuentemente.

Se trasvasó el producto dializado en tubos Falcon, se mantuvieron en refrigeración a -20°C para su posterior liofilización durante 96 horas, el tiempo de secado de polímero fue mayor debido a que se logró sintetizar mayor cantidad de producto.

Después de la liofilización se obtuvo un polvo fino blanco con aspecto de algodón.

Se obtuvieron 2.82 g de polímero modificado.

CARACTERIZACIÓN DE LOS CONJUGADOS POLOXAMINA-LMAN

Una vez obtenidos los polímeros modificados se realizaron diversos estudios para corroborar que el derivado de glucosa se encontrara unido químicamente a la poloxamina.

Las técnicas empleadas fueron infrarrojo, resonancia magnética nuclear y ultravioleta. Además se utilizó un ensayo cualitativo de reconocimiento molecular de manosa por Concanavalina A y se intentó conocer cuantitativamente el grado de conjugación de manosa mediante la formación de un complejo colorido para su posterior cuantificación por espectroscopia UV-VIS.

Caracterización por ATR/FTIR

En las figuras siguientes se muestran los espectros ATR/FTIR de T701, T701-Lman, T1107 y T1107-Lman, respectivamente. Con esta espectroscopia se intentó encontrar las bandas características de los principales grupos funcionales presentes en las moléculas, en particular la presencia del grupo carbonilo una vez que el polímero se modificó.

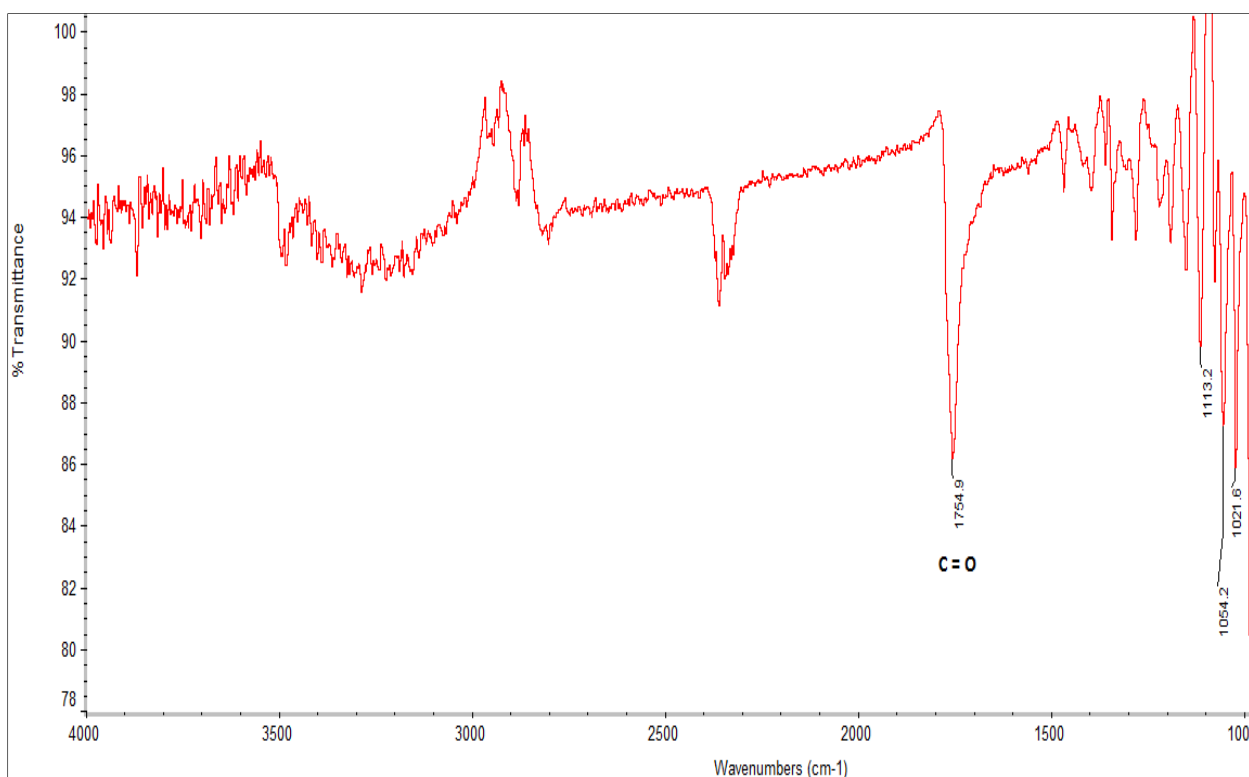


Figura 38. Espectro ATR/FTIR de ácido L-manónico-γ-Lactona (materia prima).

La figura 38 corresponde al IR de ácido L-manónico-γ-Lactona, la principal característica del espectro es la presencia de la vibración C=O a 1754 cm⁻¹. Una vez realizada la síntesis esta banda debería aparecer en el espectro del polímero conjugado.

En la figura 39 se muestra el espectro IR de T701 nativo, a 3457 cm⁻¹ aparecen las bandas características de los grupos hidroxilo terminales de la molécula y a 2970 cm⁻¹ están las señales correspondientes a la vibración del enlace C-H.

Si observamos el espectro de T701 modificado (figura 40), a diferencia del nativo, están presentes las bandas de absorción del grupo carbonilo a 1787 cm⁻¹ de esta manera se comprueba la conjugación de manosa en el polímero, sin embargo también se ven nuevamente vibraciones de los grupos -OH a 3457 cm⁻¹ por lo que suponemos que no todos los brazos de la poloxamina fueron sustituidos.

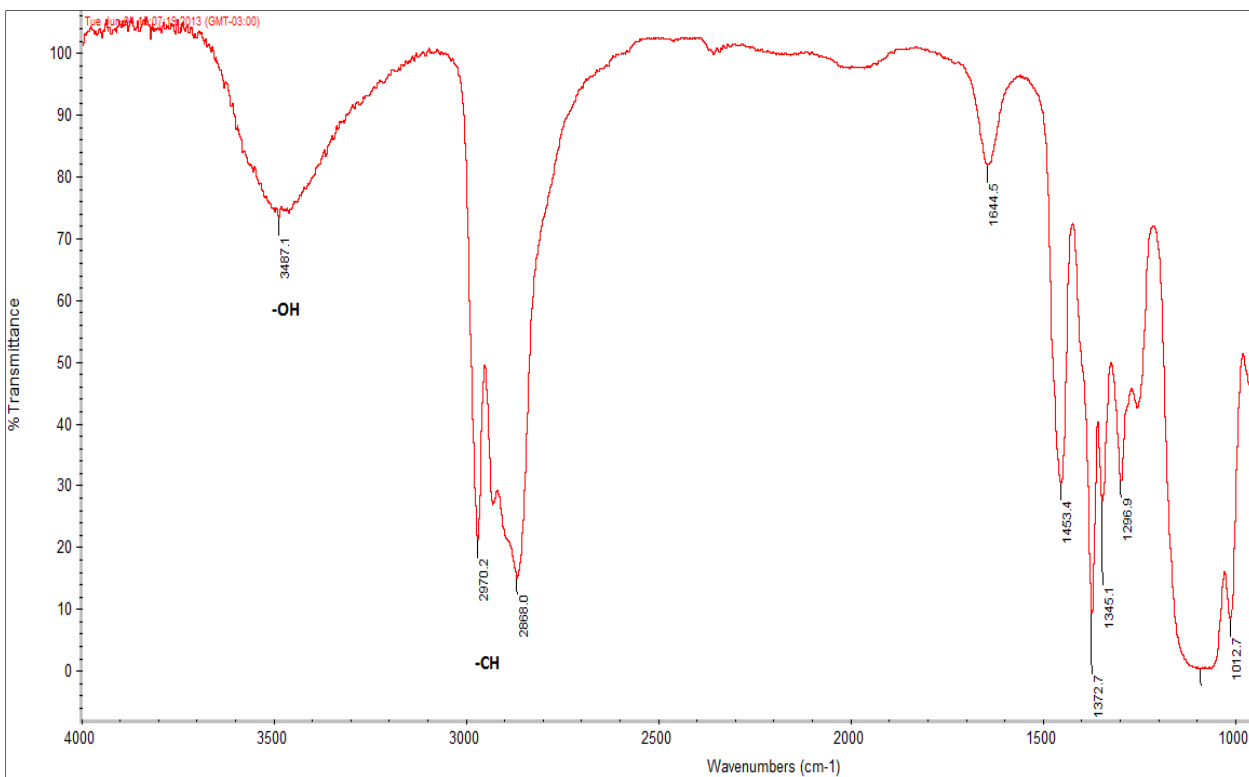


Figura 39. Espectro ATR/FTIR de T701 nativo

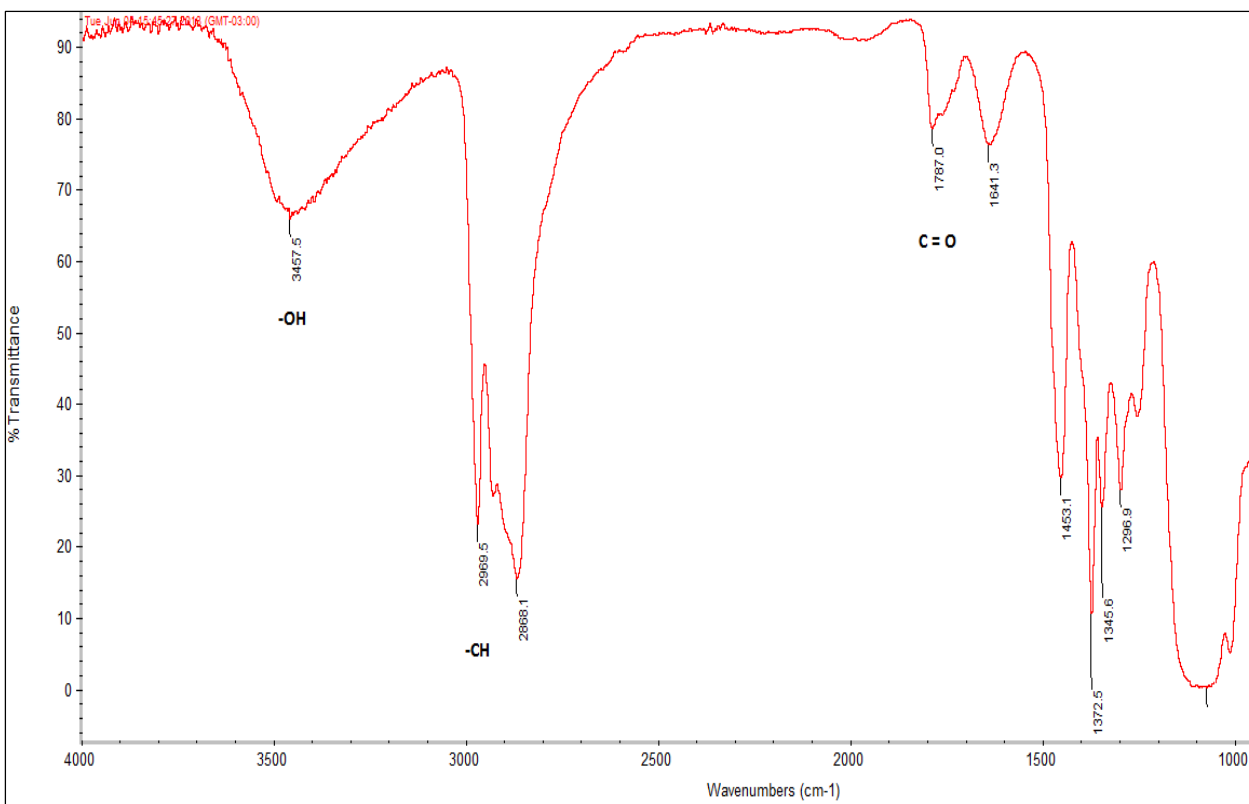


Figura 40. Espectro ATR/FTIR de T701 modificado.

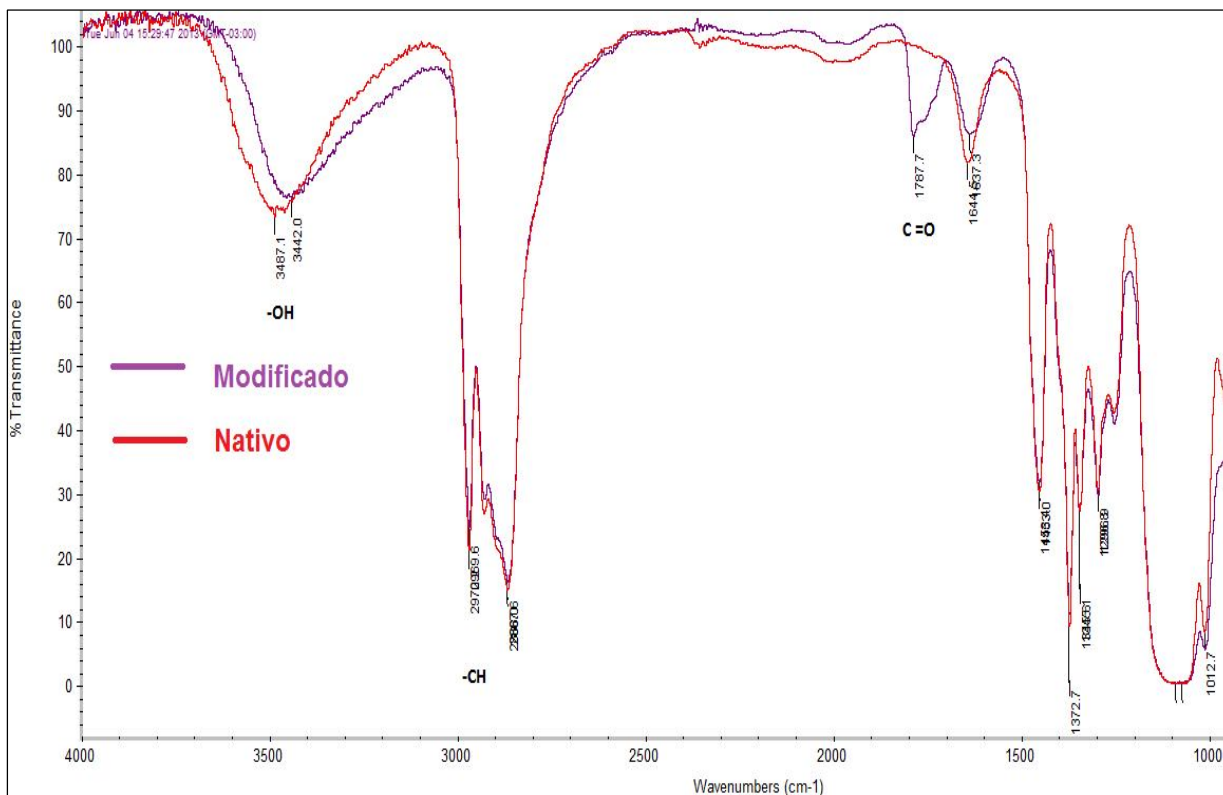


Figura 41. Superposición de los Espectros ATR/FTIR de T701 nativo y modificados.

En la figura 41 se hace una superposición de los espectros para apreciar mejor el efecto de la modificación sintética.

En los espectros de IR de T1107 nativo y T1107-Lman, figuras 42 y 43 respectivamente, nuevamente podemos observar las vibraciones C-H cerca de 2800 cm^{-1} y por encima de 3500 cm^{-1} las vibraciones del grupo -OH, éstas últimas disminuidas en intensidad debido a que se trata de un polímero de 15000 g/mol con tan solo cuatro grupos hidroxilo terminales por molécula. Sin embargo en el espectro del compuesto modificado se alcanza a apreciar una señal en 1732 cm^{-1} y un ligero aumento en la señal del grupo -OH a 3500 cm^{-1} , la cual puede ser indicio de conjugación de manosa en la molécula. En la figura 44 se muestra una superposición de los espectros de T1107 nativo y modificado para resaltar las pequeñas diferencias entre ellos.

En el caso de la modificación sintética de T1107, la relación molar entre la manosa conjugada y el polímero es 1 a 21 prácticamente (PM de L-man: 176 g/mol , PM polímero: 15000 g/mol), por lo que el porcentaje en peso de manosa representa menos del 3% de la masa total de polímero modificado, además considerando que es muy probable que no todos los hidroxilos terminales hayan sido modificados la relación podría ser menor, por lo tanto las diferencias entre los espectros son mínimas, en este caso la técnica de IR no es adecuada para concluir que se realizó la síntesis. Sin embargo podemos suponer que la conjugación de manosa en las dos poloxaminas estudiadas debe ser similar debido a que se trata moléculas de la misma familia química pero de diferente tamaño.

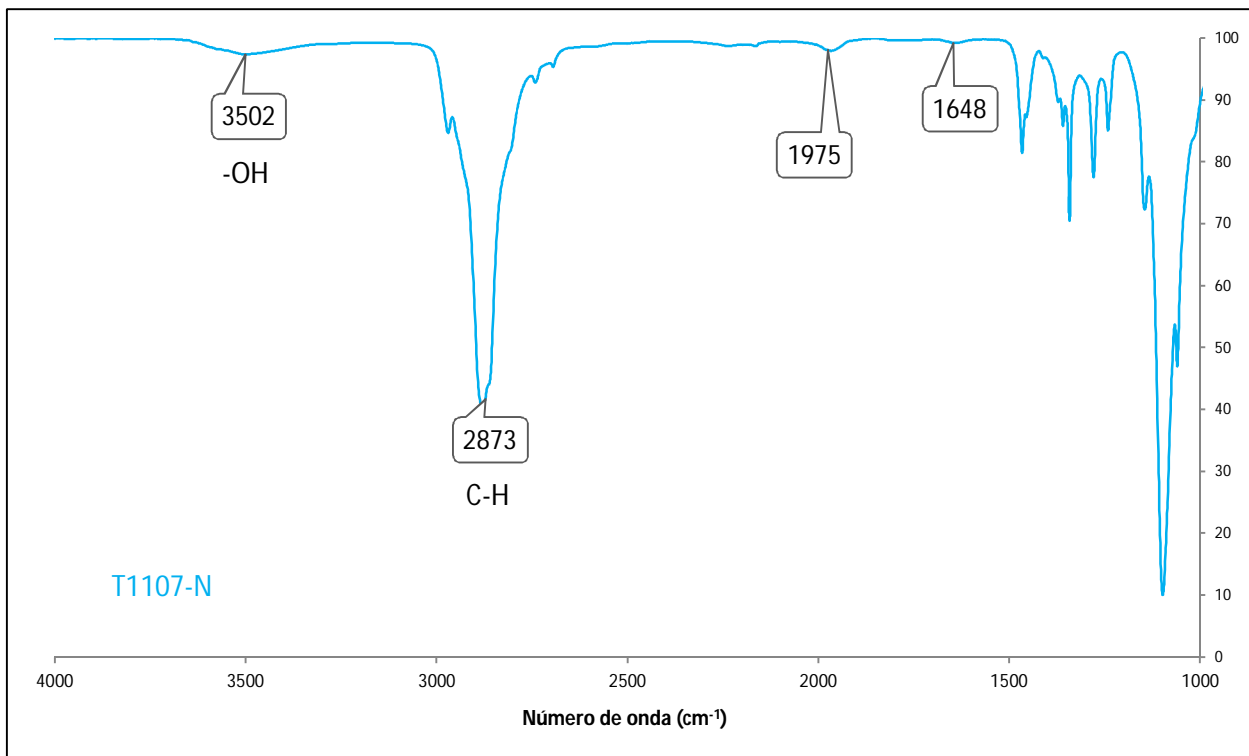


Figura 42. Espectro ATR/FTIR T1107 nativo

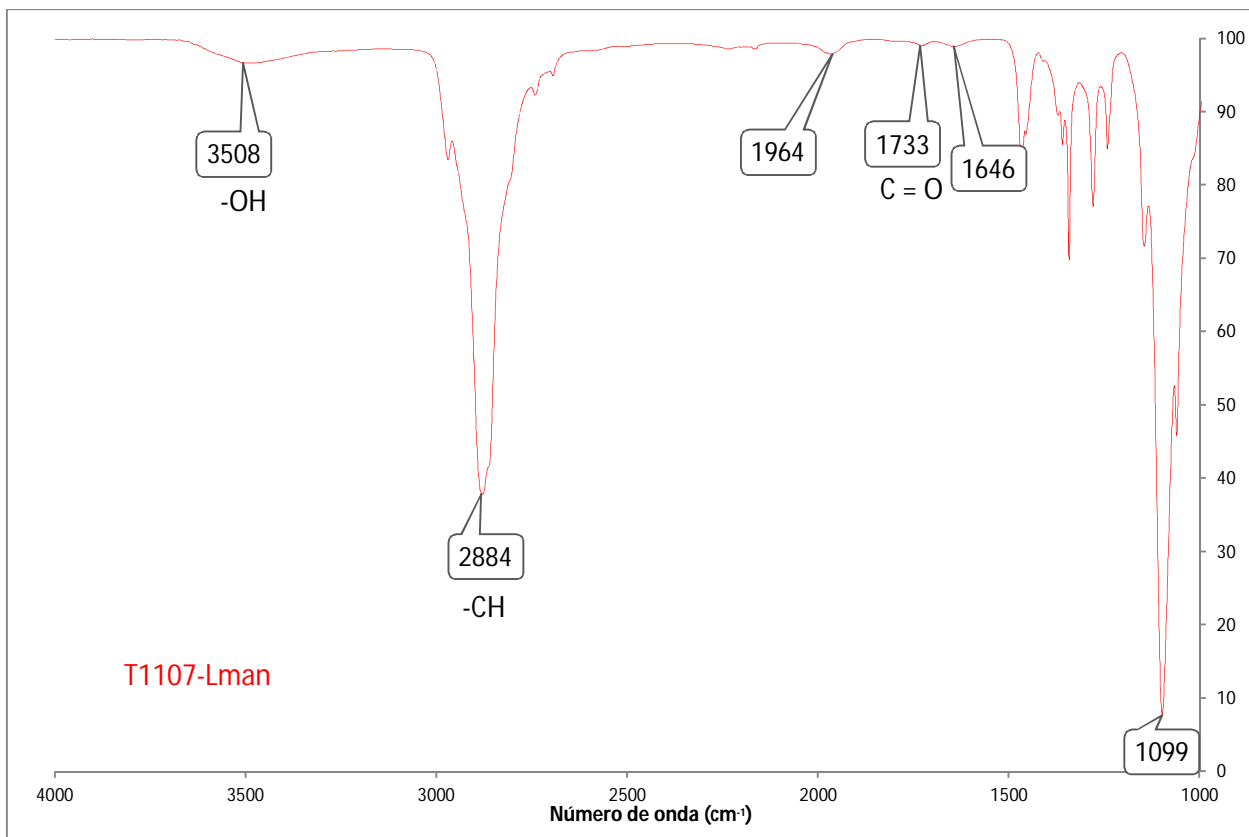


Figura 43. Espectro ATR/FTIR de T1107 modificado.

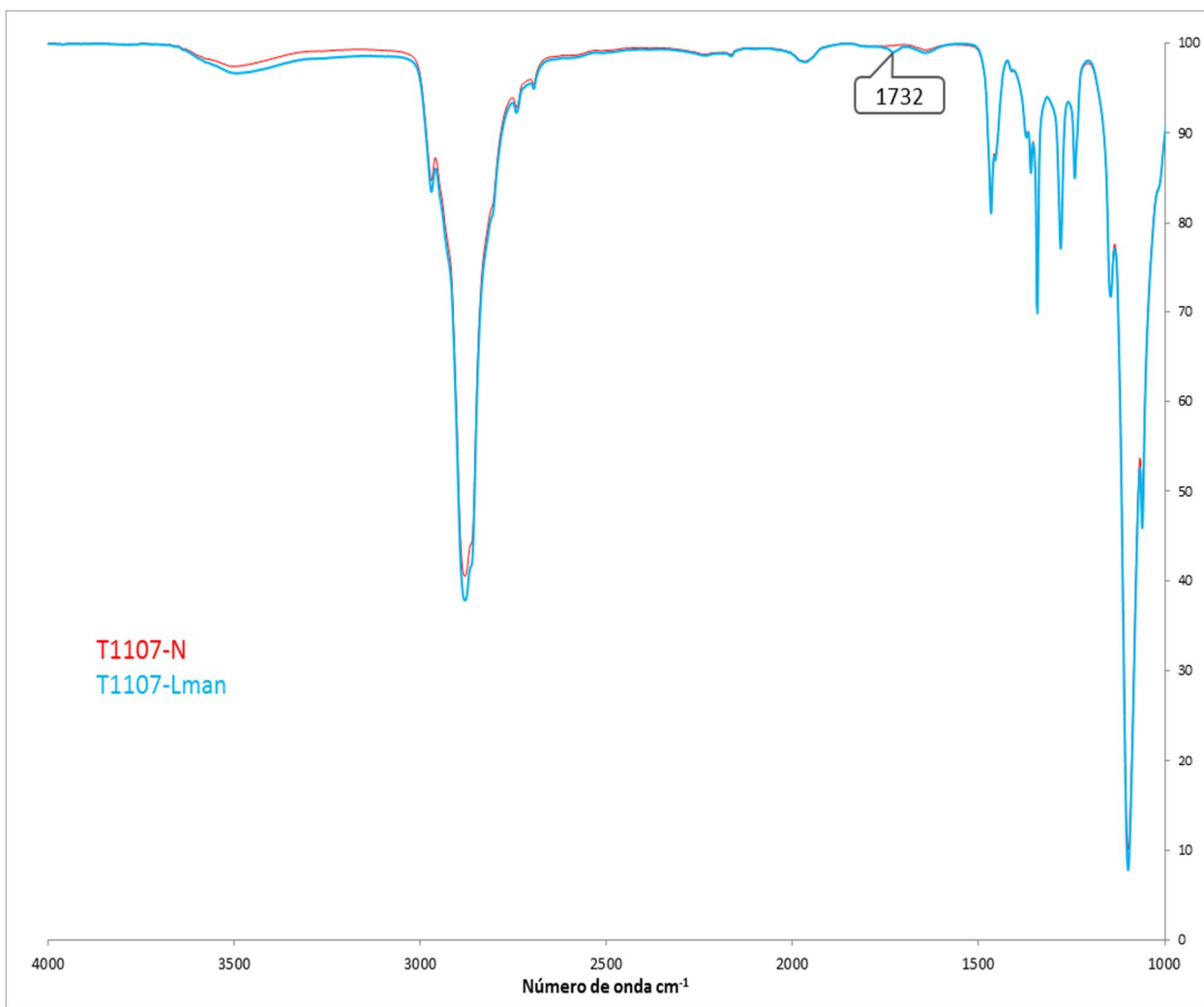


Figura 44. Superposición de los espectros ATR/FTIR de T1107-N y T1107-Lman.

Caracterización por RMN

La siguiente caracterización que se llevó a cabo fue RMN de ^1H y ^{13}C en dimetilsulfóxido (DMSO).

Debido a la conjugación de manosa en los polímeros, la presencia del grupo carbonilo en la poloxamina modificada fue un elemento clave en la caracterización.

En la figura 45 se muestra el espectro de ^{13}C -NMR de T701 nativo y en la figura 46 el del modificado. La principal diferencia entre estas dos imágenes son las señales que aparece a 176 ppm y corresponde al enlace $\text{C}=\text{O}$ por lo que se puede concluir que la conjugación de manosa sobre el polímero nativo sí se llevó a cabo. La presencia de cadenas con diferentes tamaños puede conducir a la aparición de señales desplazadas con menor intensidad pero que corresponden al mismo carbono. De 60 a 80 ppm hay nuevas señales por la presencia de Lman en la molécula conjugada.

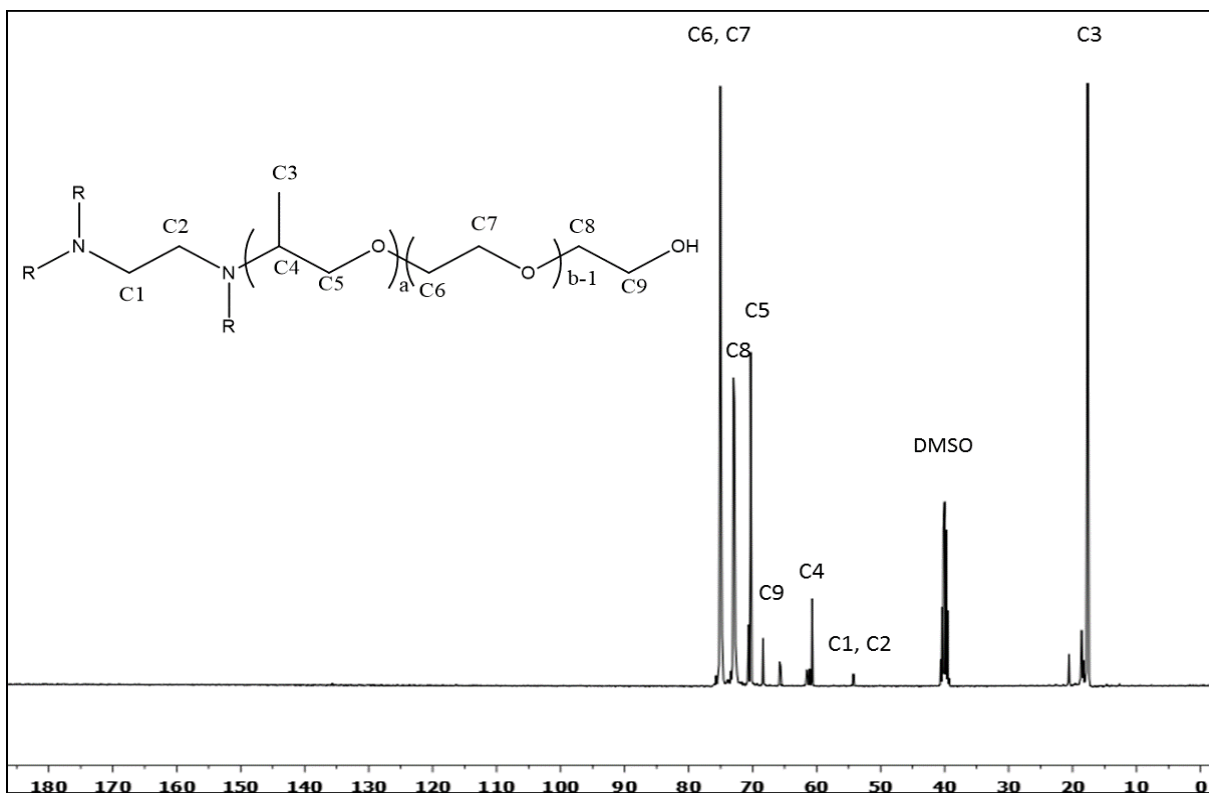


Figura 45. Espectro de ^{13}C -NMR de T701 nativo en DMSO. $R = (POP)_a-(POE)_b$

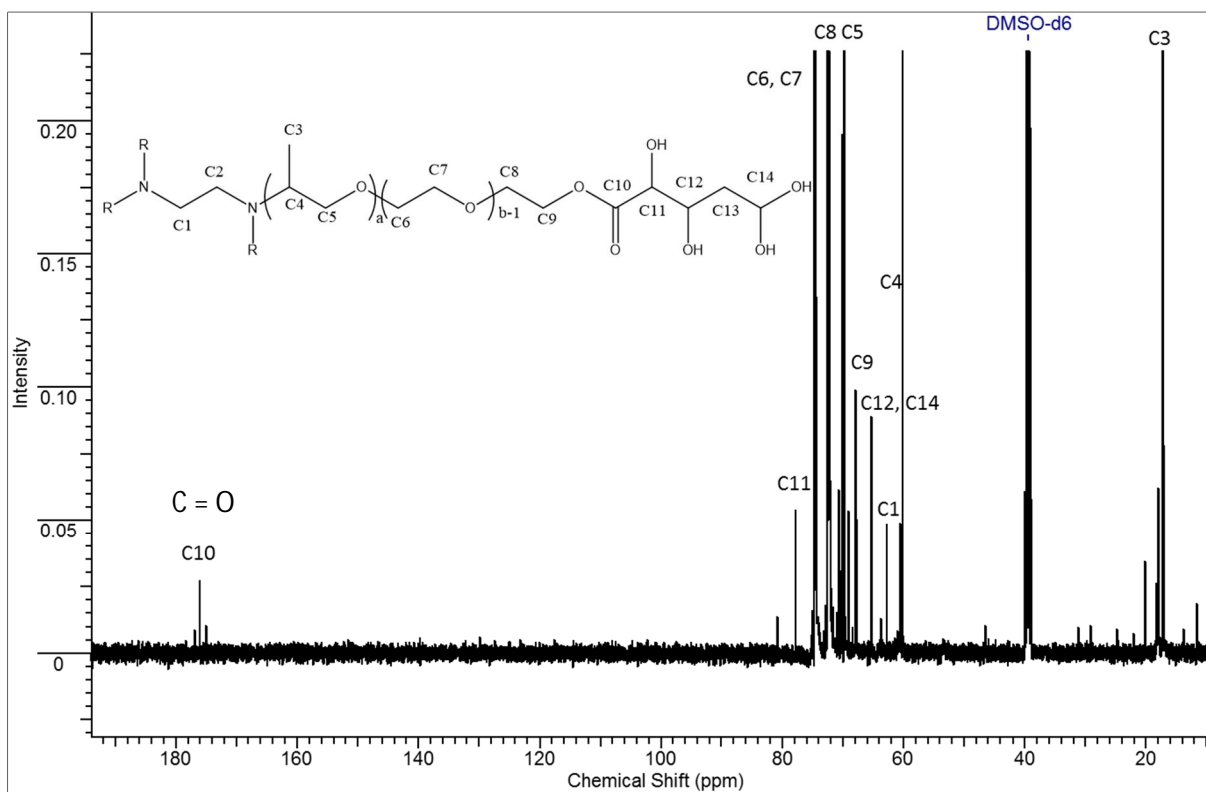


Figura 46. Espectro de ^{13}C -NMR de T701-Lman. $R = (POP)_a-(POE)_b$

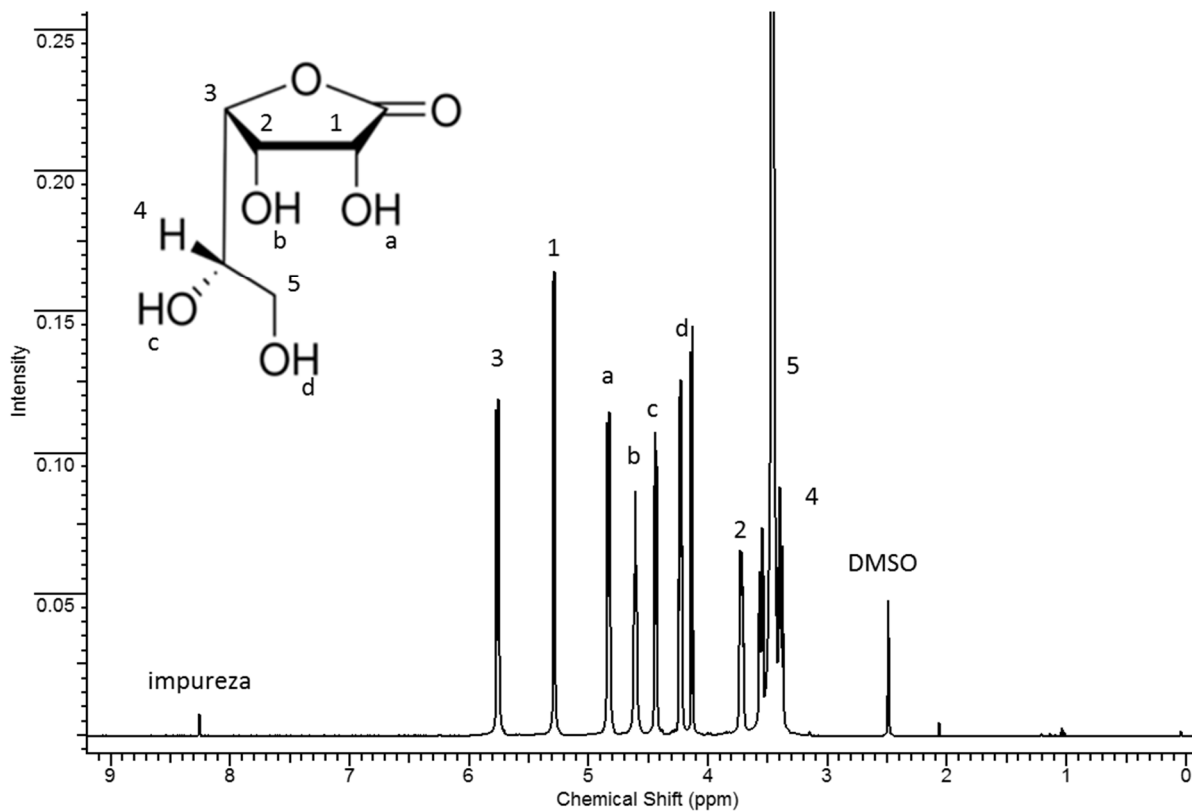


Figura 47. Espectro de ¹H-NMR de ácido L-manónico-γ-Lactona (materia prima)

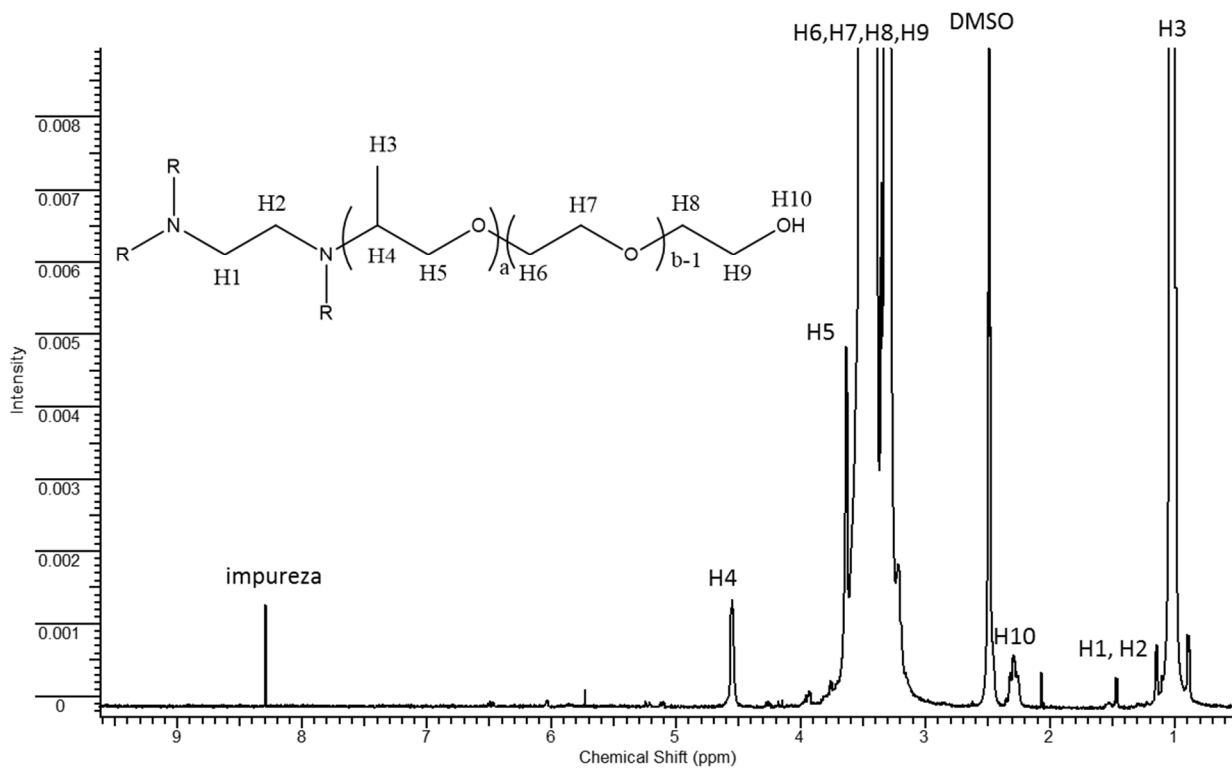


Figura 48. Espectro de ¹H-NMR de T1107 nativo.

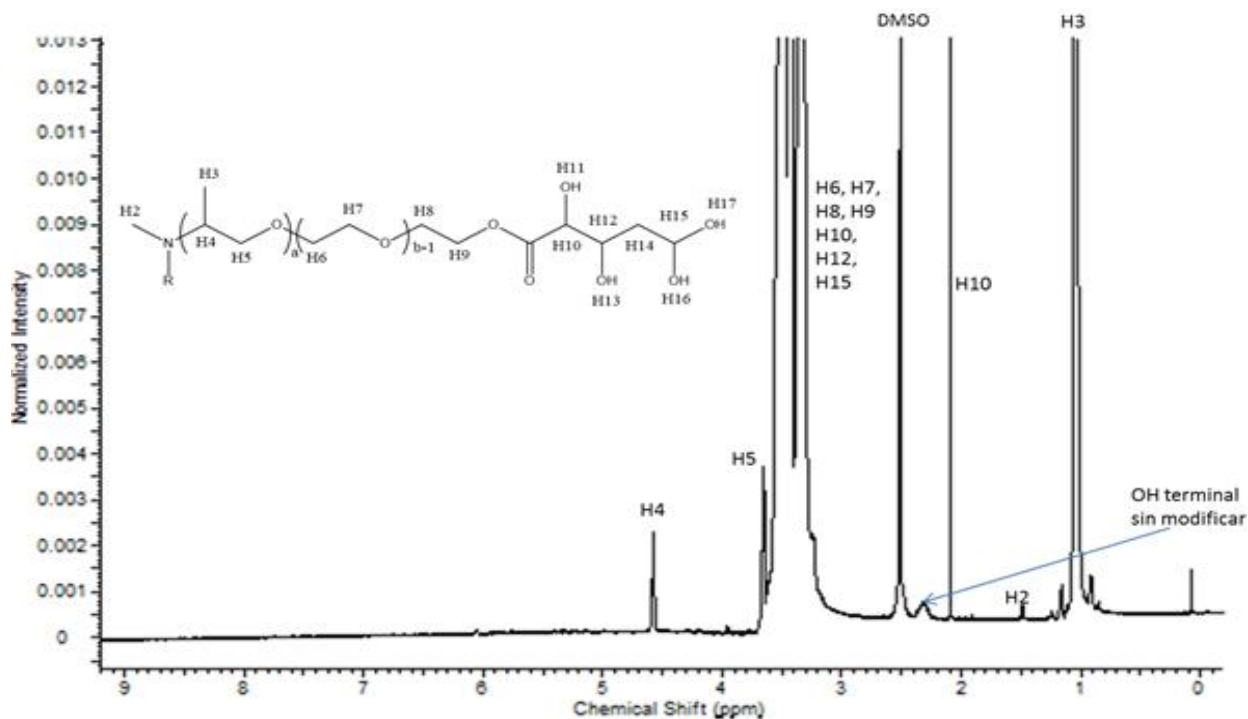


Figura 49. Espectro de ^1H -NMR de T1107-Lman.

Las figuras 47, 48 y 49 corresponden a los espectros de ^1H de L-man, T1107 y T1107-Lman, respectivamente. Las diferencias entre los espectros 48 y 49 corresponden al área bajo los picos (integración) entre 3 y 4 ppm lo cual indica que aumenta el número de protones presentes en la muestra. Para las señales de los protones correspondientes a Lman conjugado hay un efecto de apantallamiento por la abundancia de los protones de los bloques POP y POE, por lo cual la conjugación puede no ser tan evidente por lo que se realizaron más pruebas de caracterización.

Ensayo de Reconocimiento molecular por Concanavalina A

Se utilizó Con A para realizar una prueba cualitativa de la conjugación del carbohidrato en los polímeros bajo la hipótesis de que el tamaño de las moléculas aumentaría debido a la aglutinación de la lectina en presencia del residuo de manosa, esta diferencia podría ser detectada en el equipo de DLS. También se utilizó albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) debido a su capacidad para estabilizar otras proteínas en solución.

Protocolo

1. Se preparó una disolución de BSA al 6% p/V en PBS (pH=7.4)
2. Con la disolución de BSA se prepararon disoluciones al 10% p/V de T701, T701-Lmann, T1107-Lmann por duplicado (control y ensayo)
3. Se preparó una disolución de Con A de concentración 1 mg/mL.

4. Para evidenciar la presencia del azúcar en la molécula de los polímeros modificados, se tomó una alícuota de 500 μL de cada disolución de polímero y se agregó a cada control 500 μL de PBS y a cada ensayo 500 μL de disolución de Con A.
5. Se utilizó como control general una disolución preparada con 500 μL de solución de Con A y 500 μL de solución de BSA.
6. Se encubaron las muestras a 37°C durante dos horas y transcurrido este tiempo se midieron los tamaños de las partículas en disolución en un equipo de DLS.

Las concentraciones finales de las disoluciones preparadas, una vez que se realizó el ensayo se muestran en la tabla 22.

Tabla 22. Concentraciones finales de los reactivos utilizados en el ensayo de concanavalina A

Compuesto	Concentración final
BSA	3%
Polímero	5%
Concanavalina A	0.5 mg/ml

En la tabla 23 se presentan los tamaños de las diferentes poblaciones en la disolución (pico 1, 2 y 3), el % de intensidad corresponde a la proporción de partículas en la muestra que tienen dicho tamaño; PDI (índice de polidispersidad, por sus siglas en inglés) es una medida de la polidispersidad de la muestra, un valor cercano a 1 indica que hay una gran cantidad de poblaciones con tamaños variados.

El control general que contiene únicamente las dos proteínas en PBS, presenta tamaños máximos de casi 300 nm.

Los datos reportados de T1107 fueron tomados de un estudio previo realizado por el grupo de trabajo del Dr. Sosnik²¹. En este caso vemos un aumento discreto en el tamaño en presencia de Con A, hasta 379 nm. Pero cuando se trata del polímero modificado se tienen partículas con un tamaño de hasta 4650 nm lo cual es evidencia de la conjugación de manosa y el reconocimiento molecular por parte de la lectina. Con los resultados obtenidos mediante esta técnica se puede concluir que efectivamente se efectuó la reacción de conjugación entre T1107 y L-man.

En el caso de T701 también hay diferencias en los tamaños de las poblaciones presentes en la muestra, en ausencia de Con A el polímero nativo tiene tamaños máximos de 4684 nm mientras que el modificado de 5137.4, cuando se agrega la lectina los tamaños registrados para T701 y T701-Lman son de 3217 y 3544 nm respectivamente, por lo que la prueba no es concluyente ya que se esperaría que al agregar con A haya aglutinación por la presencia de la manosa conjugada, como ocurrió con T1107. Con esta poloxamina la técnica no es adecuada para detectar la presencia de producto conjugado T701-Lman, estos resultados pueden explicarse porque a 37°C hay separación de fases debido al punto de enturbiamiento de la poloxamina, en este caso el equipo no estaría midiendo una muestra homogénea y la lectina no está en contacto con parte del polímero

modificado que podría contener manosa, por lo tanto la aglutinación es menor o dicho de otro modo el reconocimiento molecular no es efectivo.

Tabla 23. Resultados del ensayo cualitativo de reconocimiento molecular con concanavalina A

Muestra	Con A (mg/mL)	Pico 1 Dh (nm) (±SD)	% Intensidad (±SD)	Pico 2 Dh (nm) (±SD)	% Intensidad (±SD)	Pico 3 Dh (nm) (±SD)	% Intensidad (±SD)	PDI (±SD)
Control General	0.5	9.5 (0.8)	14.8 (1.6)	29.4 (5.4)	9.2 (1.9)	299.5 (16.8)	76.0 (0.9)	1 (0)
T1107-nativo	0	20.0 (2.5)	54.8 (8.7)	225.9 (2.6)	45.2 (8.7)	----	----	0.3 (0.1)
	0.5	9.2 (0.2)	21.3 (0.3)	379.2 (25.7)	78.7 (0.3)	----	----	0.8 (0.1)
T1107-Lman	0	11.5 (0.6)	19.0 (1.3)	48.7 (11.3)	18.0 (2.2)	393.7 (13.4)	63.0 (3.8)	1 (0)
	0.5	99.4 (59.6)	9.4 (2.4)	1202.8 (388.6)	75.2 (8.4)	4650.8 (633.5)	15.4 (8.5)	1 (0)
T701-nativo	0	8.2 (1.2)	5.4 (0.7)	723.1 (159.4)	81.8 (7.9)	4684.9 (386.7)	12.8 (3.8)	0.4 (0.1)
	0.5	241.6 (10.5)	5.4 (0.6)	1386.0 (516.1)	54.8 (25.2)	3217.2 (461.7)	39.8 (14.6)	0.4 (0.2)
T701-Lman	0	12.5 (1.6)	7.1 (1.1)	1675.3 (310.8)	87.1 (6.9)	5137.4 (250.6)	5.8 (4.1)	0.5 (0.2)
	0.5	214.8 (84.0)	8.0 (1.2)	2334.7 (556)	65.4 (13.8)	3544.9 (0)	26.6 (0)	0.5 (0.2)

Determinación de contenido de L-man

Para conocer el grado de sustitución de los conjugados se probó un método cuantitativo indirecto en el cual se forma un complejo entre el residuo de manosa presente en el polímero modificado con antrona. En el conjugado, una fracción de éste corresponde a la poloxamina y la otra a L-Man, si teóricamente la conjugación se realiza en los cuatro brazos y tenemos una cantidad conocida del conjugado, entonces sabremos qué proporción corresponde a manosa y cuanto complejo se formará obteniendo la diferencia entre el valor teórico y el experimental.

Para cuantificar la cantidad del complejo manosa-antrona se utilizó la espectroscopía UV-visible. Utilizando un reactivo de antrona en ácido sulfúrico³⁹. Se siguió el protocolo empleado por Xin Wang en su estudio de nanopartículas de oro funcionalizadas con carbohidratos.⁴⁰ Una solución de ácido sulfúrico-antrona reacciona con los carbohidratos formando un complejo azul-verde que se puede medir al espectrofotómetro.

La primera parte de la prueba consistió en realizar una curva de calibración del complejo ácido L-manónico- γ -lactona con antrona.

1. Se prepararon soluciones de diferente concentración de ácido L-manónico- γ -Lactona.
2. El reactivo de antrona/ ácido sulfúrico fue preparado un poco antes de realizar el experimento y se mantuvo en un baño de hielo hasta ser utilizado.
3. Se adicionó el reactivo de antrona a las disoluciones previamente preparadas de L-man y se calentaron simultáneamente durante 3 minutos a 90°C.
4. Transcurrido el tiempo de reacción se mantuvieron las disoluciones en un baño de hielo hasta ser medidas en el UV.
5. Se determinó la concentración de cada una de las disoluciones preparadas por espectrofotometría a 630 nm, se utilizaron los resultados para realizar una curva de calibración.
6. Se prepararon 5 disoluciones acuosas frescas del polímero modificado con concentración 0.5mg/0.5 mL, fueron tratadas con el reactivo de antrona siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente.
7. El polímero no modificado fue tratado de la misma manera y la absorbancia medida a 630 nm fue utilizada como blanco.

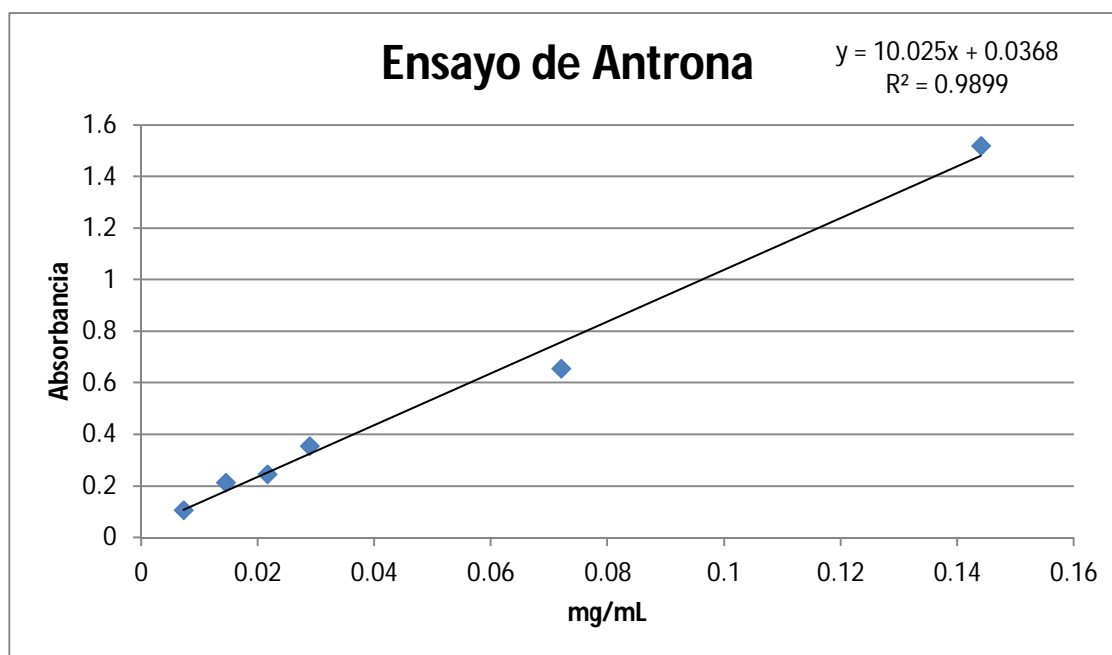


Figura 50. Absorbancia en función de la concentración del complejo antrona-Lman.

Aunque la curva de calibración del complejo manosa-antrona muestra una buena regresión lineal (figura 50), cuando se realizó el experimento con los polímeros modificados, los resultados obtenidos mostraban en su mayoría una conjugación de más del 100% en los brazos de la poloxamina, por lo que se puede suponer que en lugar de haber una complejación, los grupos-OH de las moléculas fueron oxidados en presencia de ácido sulfúrico, por lo tanto la técnica no fue adecuada para determinar el contenido de manosa en el polímero conjugado.

Determinación de CMC de las poloxaminas modificadas

La siguiente etapa de la investigación consistió en estudiar la manera en que la modificación sintética afecta la formación de micelas poliméricas, se realizaron nuevamente mediciones en el DLS para determinar la CMC de los conjugados poloxamina-manosa.

A continuación se presentan los resultados para T701 y T1107 modificados. Se determinó su CMC en agua milliQ y medio amortiguado con un pH de 7.4 a 25 y 37°C.

Determinación de CMC de T701-Lman en agua milliQ a 25 y 37°C.

En las tablas 24 y 25 se presentan las concentraciones de T701-Lman en agua milliQ para determinar su CMC a las dos temperaturas de estudio.

Tabla 24. Datos experimentales para determinar CMC de T701-Lman a 25°C.

MUESTRA	Concentración % p/V	Intensidad de la Luz Dispersada (kcps)
1	0.0050	217.32
2	0.0081	198.9
3	0.0101	255.3
4	0.0302	600.5
5	0.0504	825.04
6	0.0706	1137.5
7	0.0907	1601.6
8	0.1008	1625.4
9	0.2016	3351.9
10	0.3024	6644.3
11	0.4032	8864.5
12	0.5040	10541.3
13	0.6048	17602.4
14	0.8064	24754.5
15	1.0080	31156.8

Las figuras 51 y 52 presentan los resultados de intensidad de luz dispersada en función de la concentración de las muestras, nuevamente podemos observar que a bajas concentraciones la

intensidad de la luz dispersada es muy similar entre sí, después hay un aumento en la señal debido a la presencia de micelas.

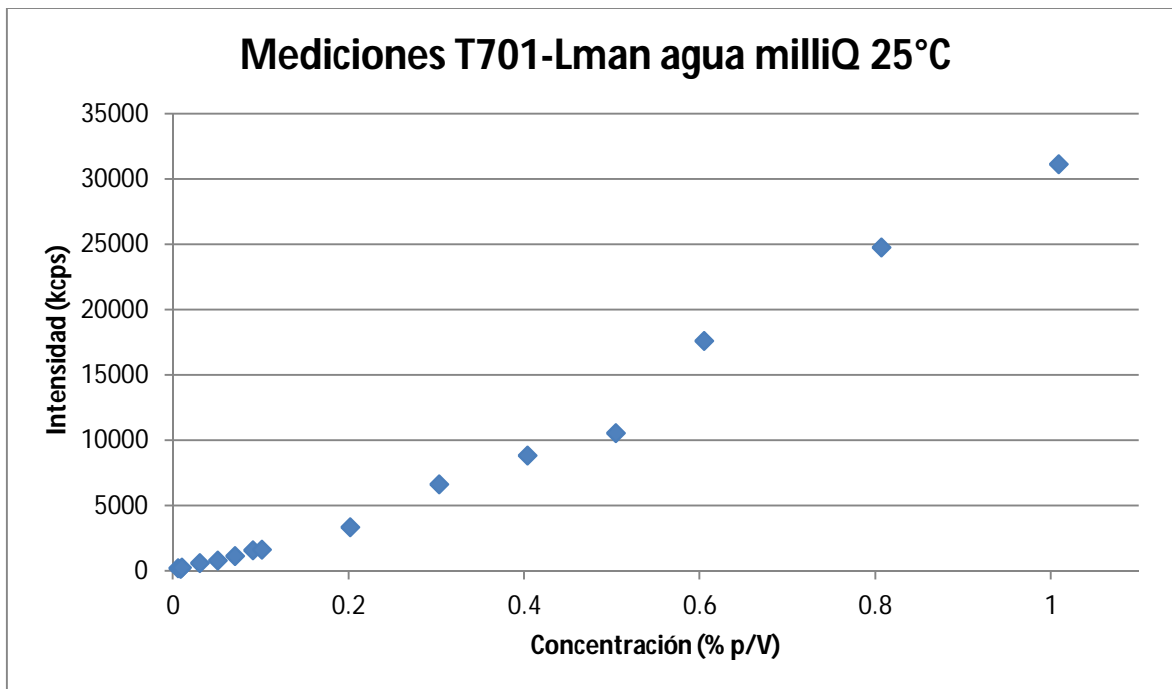


Figura 51. Intensidad en función de la concentración T701-Lman en agua milliQ 25°C.

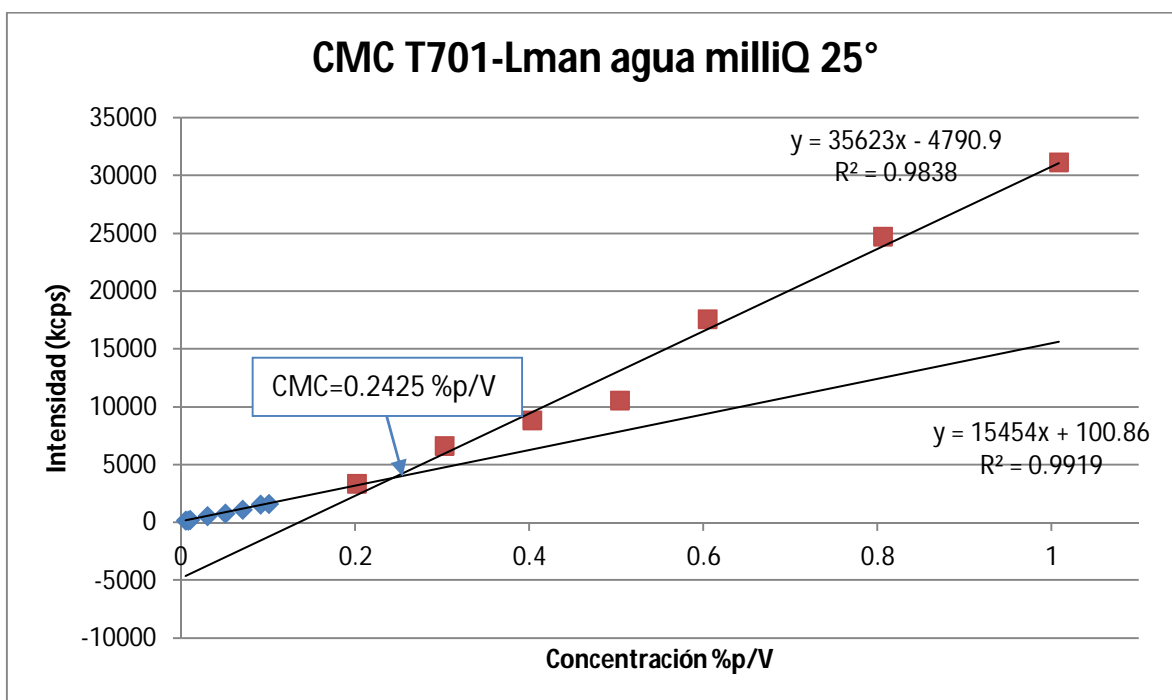


Figura 52. Determinación de CMC T701-Lman agua milliQ 25°C. CMC= 0.2425 % p/V.

En estos experimentos se muestran únicamente las concentraciones en %p/V debido a que es necesario determinar el grado de sustitución del polímero para poder calcular la concentración en mM. El tratamiento de los datos para encontrar la CMC fue igual al descrito para los polímeros nativos.

Tabla 25. Datos experimentales para determinar CMC T701-Lman agua milliQ 37°C.

MUESTRA	Concentración % p/V	Intensidad de la Luz Dispersada (kcps)
1	0.0103	1322.3
2	0.0310	3961.6
3	0.0517	3356.3
4	0.0724	3085.3
5	0.0931	2539.1
6	0.1034	5096.4
7	0.1551	7407.9
8	0.2068	6720.9
9	0.2585	11541.3
10	0.3102	19455.6
11	0.3619	15935.7

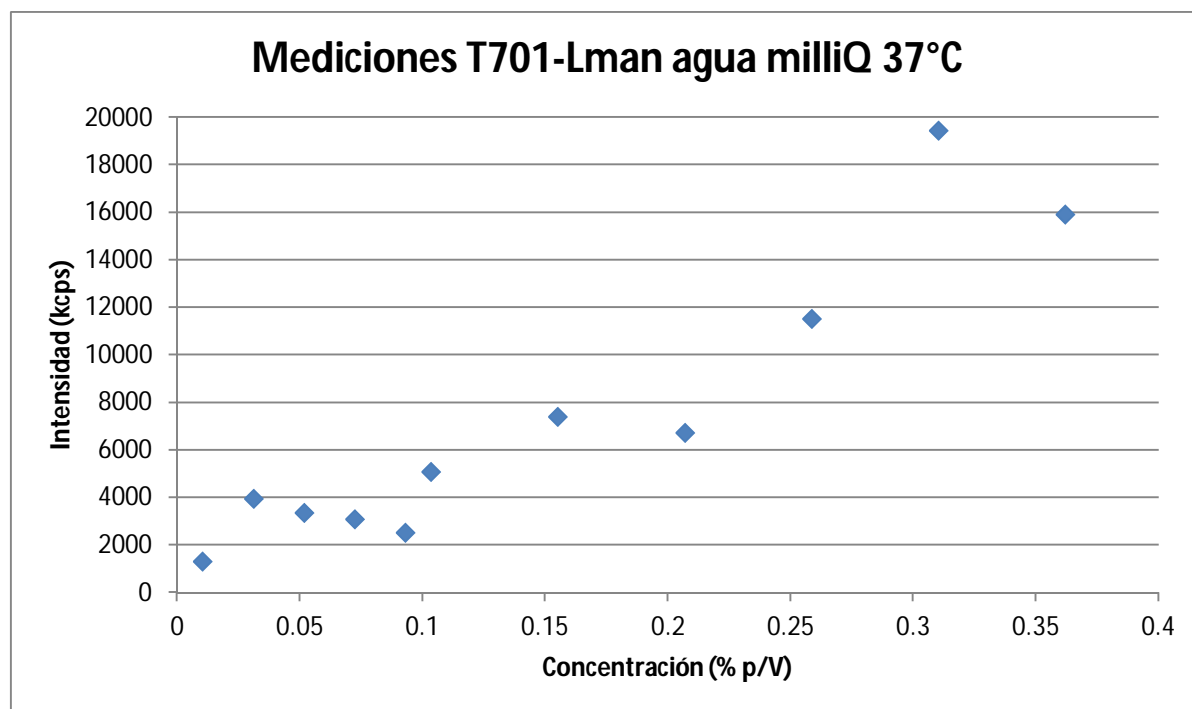


Figura 53. Intensidad en función de la concentración T701-Lman agua milliQ 37°C.

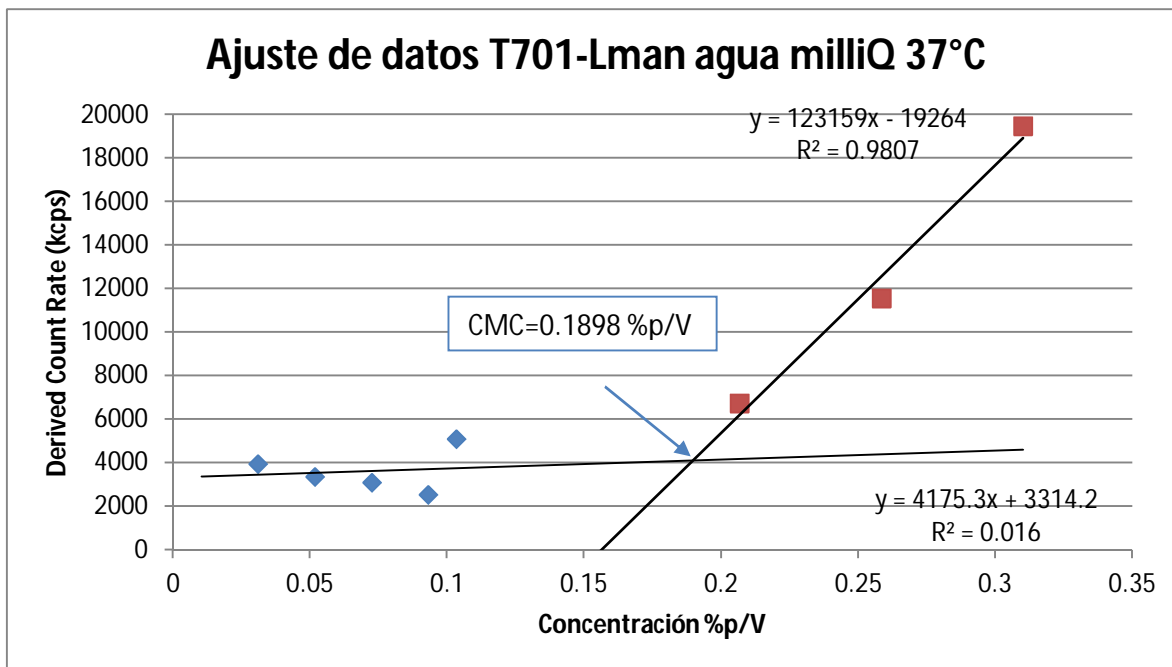


Figura 54. Determinación de CMC T701-Lman agua milliQ 37°C. CMC= 0.1898 % p/V.

Como se dijo en un principio, el decaimiento de la señal a 37°C (figura 53) puede deberse a que el punto de enturbiamiento se encuentra cercano y por lo tanto estos datos no son tomados en cuenta en el ajuste para la determinación de la CMC. Este fenómeno ocurre en prácticamente todos los experimentos realizados con T701 nativo y modificado.

Los resultados muestran que a mayor temperatura las micelas se forman a menor concentración, al igual que con el polímero nativo.

Para estudiar el efecto de la modificación del polímero los resultados se muestran en la tabla 26. Podemos notar que la modificación sintética desfavorece la micelización ya que la CMC se alcanza a mayores concentraciones; esto puede deberse a que la conjugación de manosa favorece la solubilidad y solvatación del polímero por lo que puede permanecer más cómodamente en el medio sin autoensamblarse.

Tabla 26. CMC de T701 nativo y modificado a 25 y 37°C.

Medio	CMC (%p/V) Agua milli Q	
Temperatura (°C)	25	37
T701 nativo	0.0819	0.0041
T701-Lman	0.2425	0.1898

A continuación se presentan los resultados para determinar la CMC de T701-Lman en PBS. En las tablas 27 y 28 se muestran los datos experimentales de la medición a 25 y 37°C, respectivamente.

Tabla 27. Datos experimentales para determinar CMC de T701-Lman en PBS 25°C

MUESTRA	Concentración % p/V	Intensidad de la Luz Dispersada (kcps)
1	0.0051	599.9
2	0.0082	732.2
3	0.0102	656.3
4	0.0307	1054.6
5	0.0512	1272.2
6	0.0717	1460.0
7	0.0922	1516.9
8	0.1024	1580.9
9	0.2048	4128.0
10	0.3072	7878.9
11	0.4096	11041.7
12	0.5120	16871.1
13	0.6144	18162.2
14	0.8192	17221.5
15	1.0240	9935.3

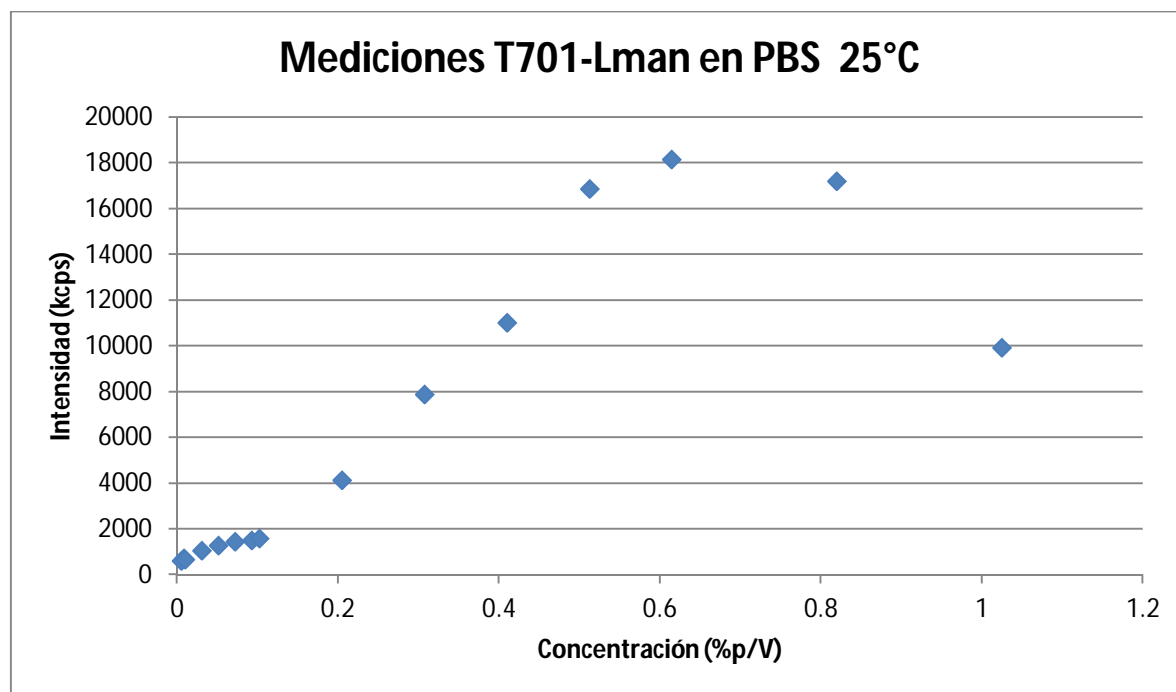


Figura 55. Intensidad en función de la concentración de T701-Lman en PBS a 25°C.

En la figura 55, nuevamente los puntos donde la intensidad de la luz decae no son tomados en cuenta en el ajuste.

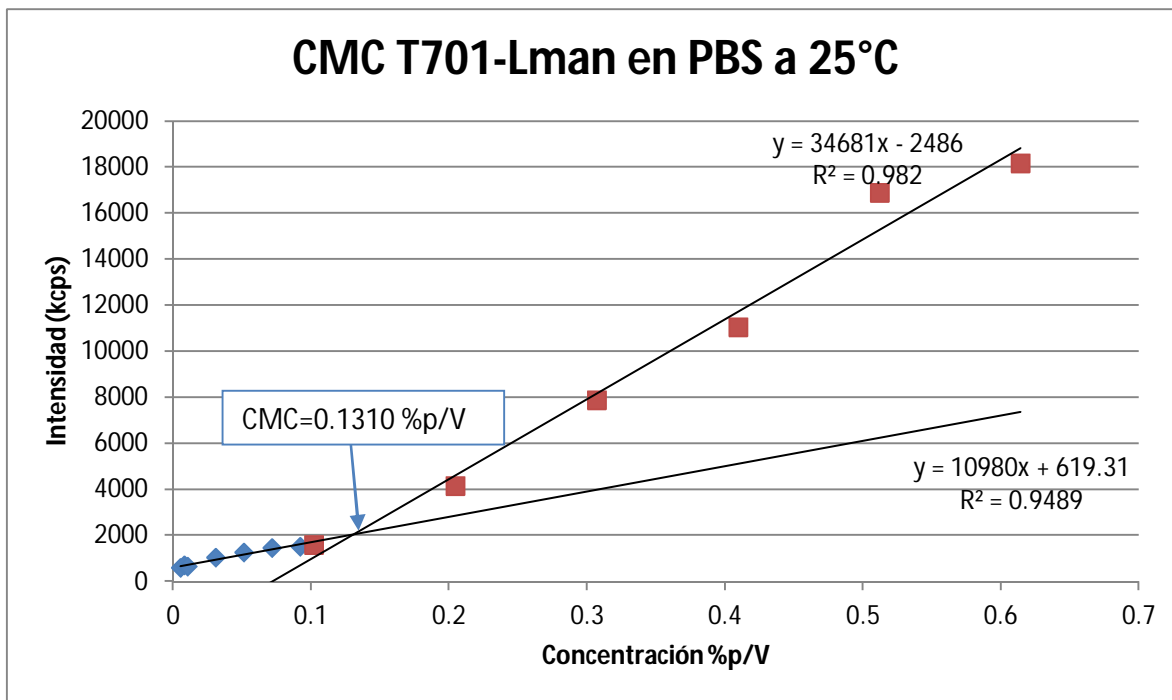


Figura 56. Determinación de CMC T701-Lman en PBS a 25°C. CMC= 0.1310 % p/V.

Tabla 28. Datos experimentales para determinar CMC de T701-Lman en PBS a 37°C

Muestra	Concentración % p/V	Intensidad de la Luz Dispersada (kcps)
1	0.0010	1919.9
2	0.0031	2737.7
3	0.0051	5967.2
4	0.0072	5963.8
5	0.0093	4773.5
6	0.0103	5000.0
7	0.0206	14799.4
8	0.0411	21071.9
9	0.0617	14392.3

Como se observa en la figura 57, en algunos experimentos a 37°C, no es fácil determinar la CMC debido a la dispersión de los datos obtenidos. En particular la poloxamina T701 es fuertemente dependiente de la temperatura, como ya se ha mencionado anteriormente, lo mismo ocurre con su conjugado, el punto de enturbiamiento es un factor importante para poder estudiar la molécula. En este caso la disponibilidad del material fue una limitante para repetir los experimentos y poder tener un resultado más confiable.

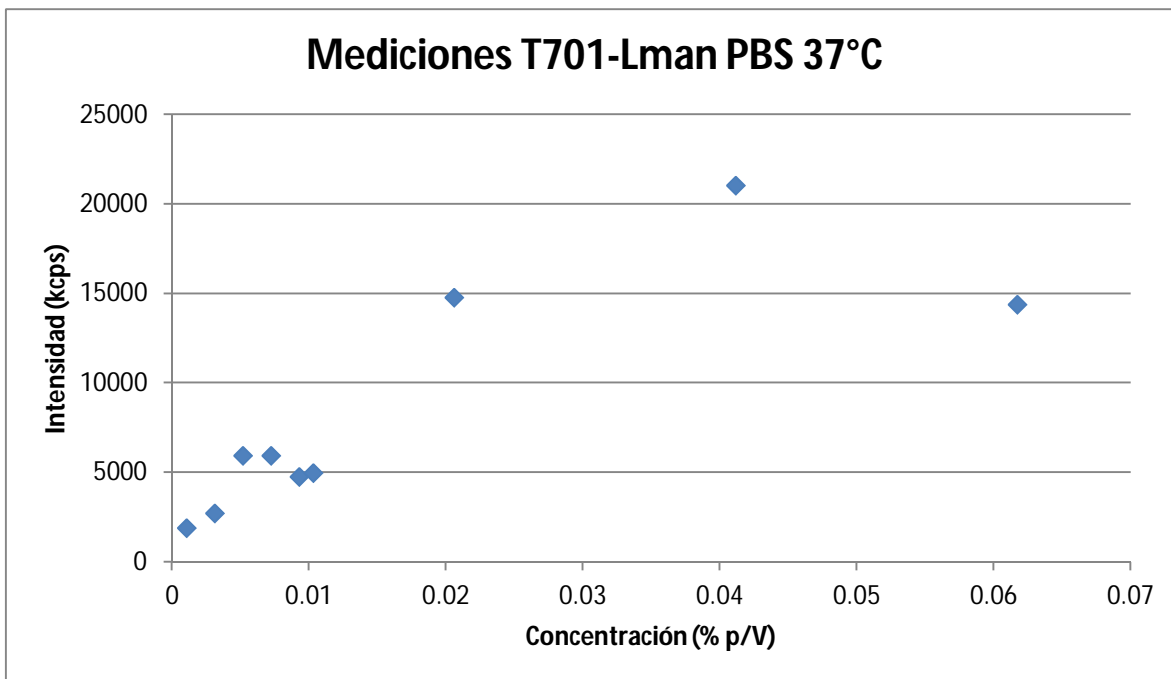


Figura 57. Mediciones de T701-Lman para determinar su CMC en PBS a 37°C.

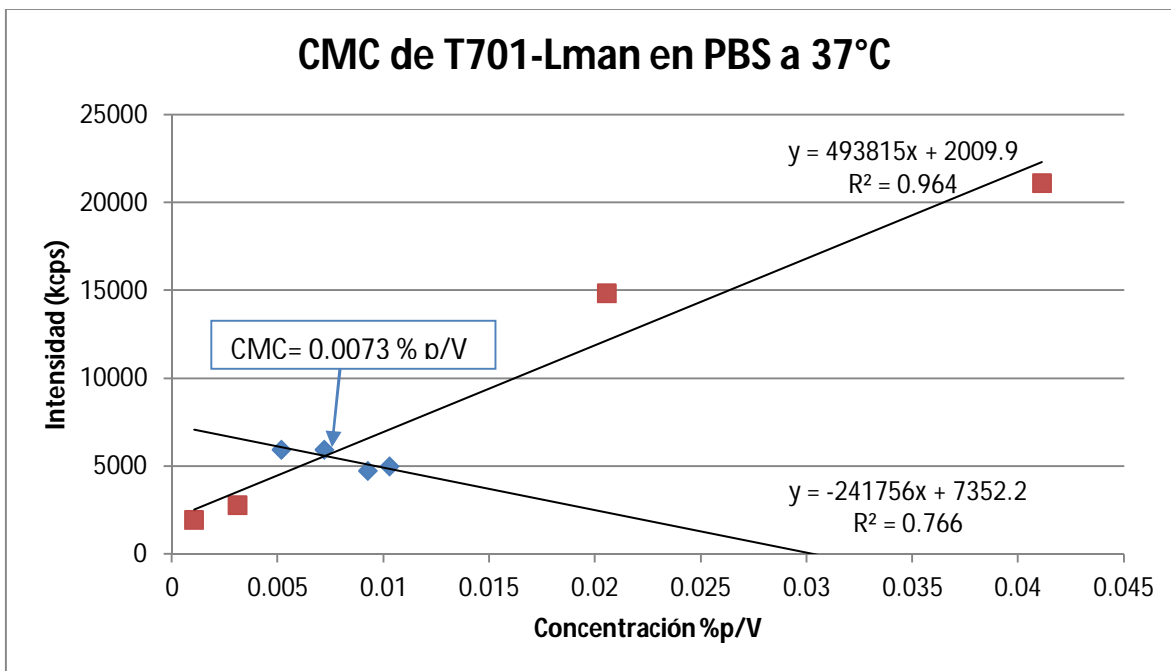


Figura 58. Determinación de CMC de T701-Lman en PBS a 37°C. CMC= 0.0073 % p/V.

En la tabla 29 observamos los resultados de CMC para T701 nativo y modificado en PBS a las dos temperaturas de medición.

La temperatura tiene el mismo efecto sobre este polímero en medio amortiguado, al cambiar de 25 a 37°C, disminuye la CMC.

Con la modificación sintética la micelización en PBS ocurre a mayor concentración como se observó en agua milliQ lo cual también puede deberse al aumento de solubilidad de esta poloxamina cuando se conjuga el derivado de manosa.

Tabla 29. Efecto de la conjugación en la CMC de T701 en PBS a 25 y 37°C.

Polímero	PBS	
	25°C	37°C
T701-nativo	0.0480	0.0053
T701-Lman	0.1310	0.0073

Para estudiar el efecto del cambio en el pH del medio se realizaron mediciones a concentraciones cercanas a la CMC. Los resultados se resumen en la tabla 30.

Tabla 30. Medición de pH en función de la concentración de T701-Lman a 25 y 37°C

Concentración	pH	
	25°C	37 °C
1	6.69	5.33
0.5	6.82	5.70
0.25	6.96	5.80
0.1	6.40	5.82

Con ayuda de la tabla 31 podemos comparar el efecto en la formación de micelas al trabajar en medio amortiguado. A 25°C observamos que a mayor pH la CMC ocurre a menores concentraciones lo cual coincide con la primera hipótesis que se planteó respecto al cambio de pH. La protonación en los grupos centrales de las poloxaminas modificadas disminuye, por lo tanto hay menor repulsión electrónica entre los nitrógenos presentes, favoreciendo la micelización. El mismo comportamiento se repite a 37°C de una manera más marcada posiblemente porque la diferencia de pH también es mayor.

Tabla 31. Efecto del pH en la formación de micelas de T701-Lman.

Temperatura (°C)	25		37	
	pH	CMC	pH	CMC
Agua milliQ	7.0	0.2425	5.8	0.2061
PBS	7.4	0.1310	7.4	0.0073

Tabla 32. Determinación de CMC de T701 en agua milliQ y PBS a 25 y 37°C.

Polímero	Agua MilliQ (pH<7.4)		PBS (pH=7.4)	
	25°C	37°C	25°C	37°C
T701-nativo	0.0819	0.0041	0.0480	0.0053
T701-Lman	0.2425	0.1898	0.1310	0.0073

En la tabla 32 se muestran los resultados en la determinación de CMC de T701 nativo y modificado en agua milliQ y PBS a las dos temperaturas estudiadas.

En general se puede concluir que la conjugación de manosa ayuda a que el polímero sea más soluble y por lo tanto la formación de agregados se dé a mayores concentraciones en comparación con el polímero nativo. Al aumentar la temperatura de 25 a 37°C la formación de micelas se favorece. A mayor pH la CMC disminuye por la disminución de especies cargadas en el centro de la micela.

Determinación de CMC de T1107-Lman en agua milliQ a 25 y 37°C

Con la poloxamina T1107-Lman se realizaron estudios para determinar su CMC en agua milliQ a 25 y 37°C. El tratamiento de los datos se realizó de la manera ya descrita anteriormente. Los datos experimentales se muestran en las tablas 33 y 34 respectivamente y las figuras 59 a la 62.

Tabla 33. Datos experimentales para determinar CMC de T1107-Lman en agua milliQ a 25°C.

Muestra	Concentración % p/V	Intensidad de la Luz Dispersada (kcps)
1	0.0012	218.4
2	0.0024	117.9
3	0.0048	180.8
4	0.0096	165.7
5	0.0240	331.9
6	0.0481	348.4
7	0.0962	587.3
8	0.1924	787.5
9	0.2886	1708.9
10	0.3848	1476.2
11	0.4810	1469.9
12	0.7215	2415.2
13	0.9620	2396.9
14	1.4430	3250.8
15	1.9241	3948.9
16	2.4051	6191.3
17	2.8861	7332.2
18	3.8481	9822.0
19	4.8101	8530.4

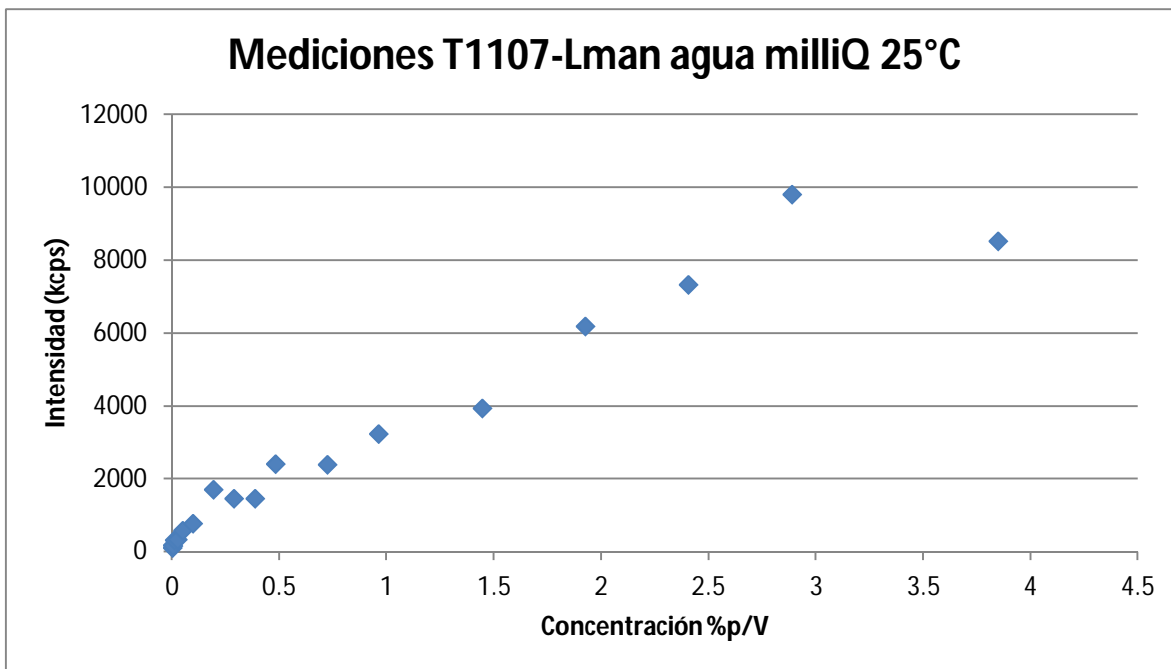


Figura 59. Intensidad en función de la concentración de T1107-Lman en agua milliQ a 25°C.

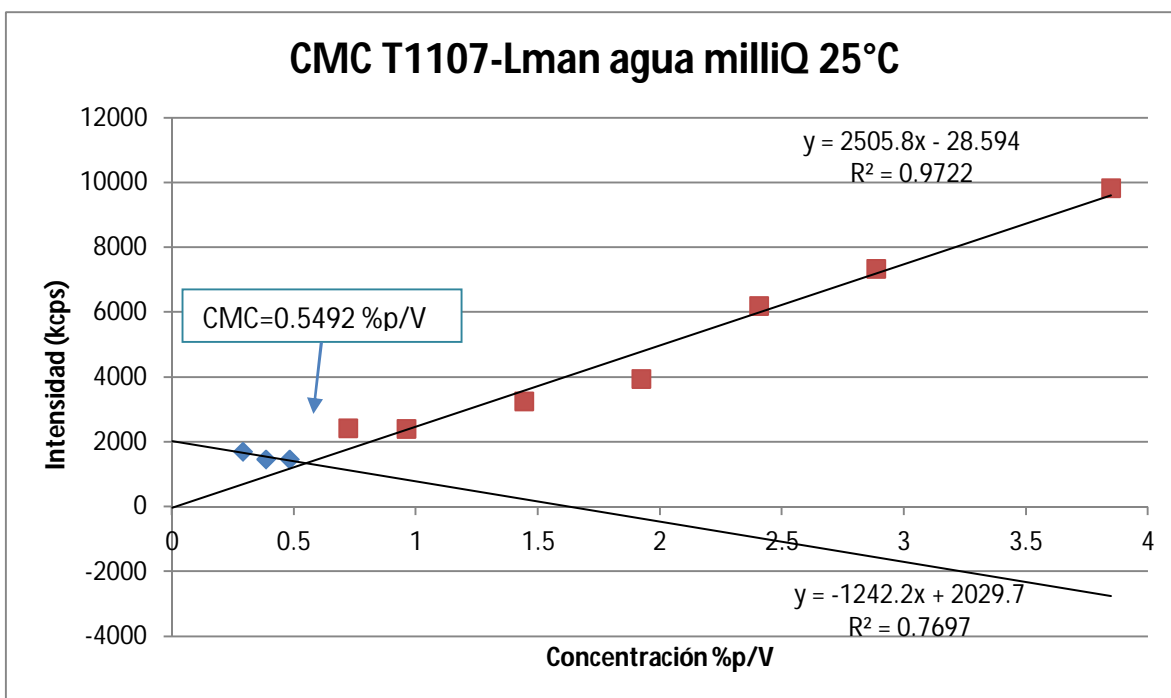


Figura 60. Determinación de CMC T1107-Lman en agua milliQ a 25°C. CMC=0.5492 %p/V.

Tabla 34. Datos experimentales para determinar CMC de T1107-Lman en agua milliQ a 37°C.

Muestra	Concentración % p/V	Intensidad de la Luz Dispersada (kcps)
1	0.0013	3414.6
2	0.0025	1235.0
3	0.0050	498.8
4	0.0100	150.4
5	0.0251	971.7
6	0.0502	3757.2
7	0.1004	2150.8
8	0.2007	696.3
9	0.3011	1886.1
10	0.4014	997.9
11	0.5018	1732.6
12	0.7527	2130.9
13	1.0036	3537.7
14	1.5054	3467.8
15	2.0072	6995.4
16	2.5090	6232.4
17	3.0108	7483.4
18	4.0144	9113.3
19	5.0180	9771.9

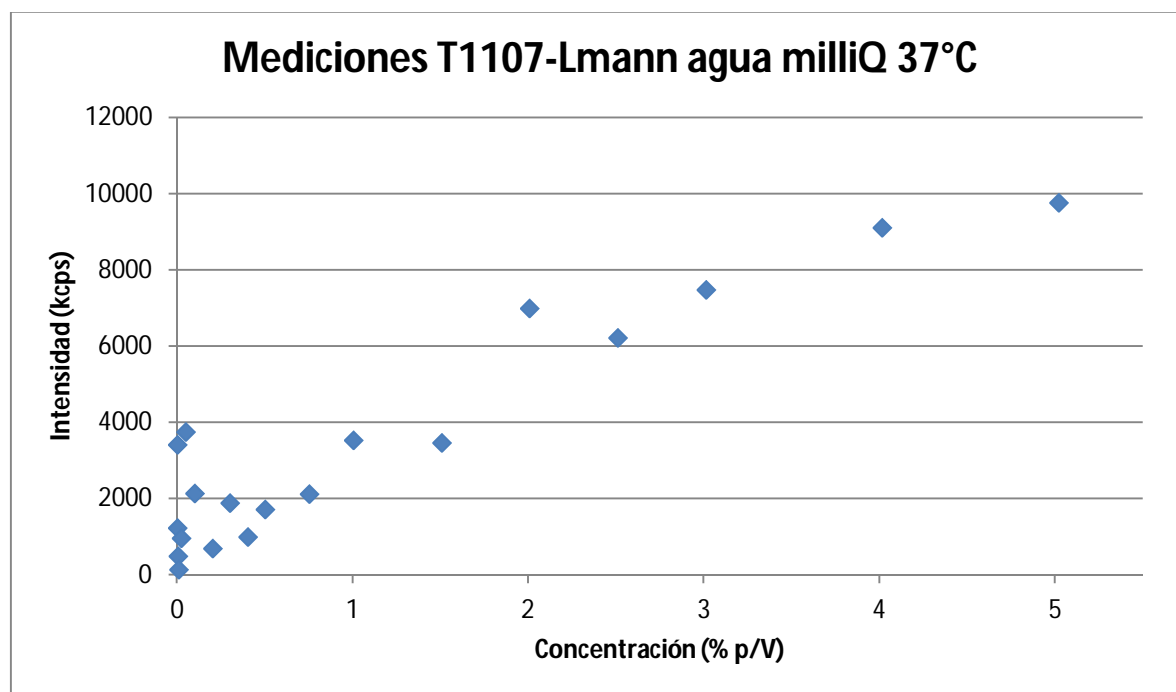


Figura 61. Intensidad en función de la concentración de T1107-Lman en agua milliQ a 37°C. CMC=0.1635 %p/V.

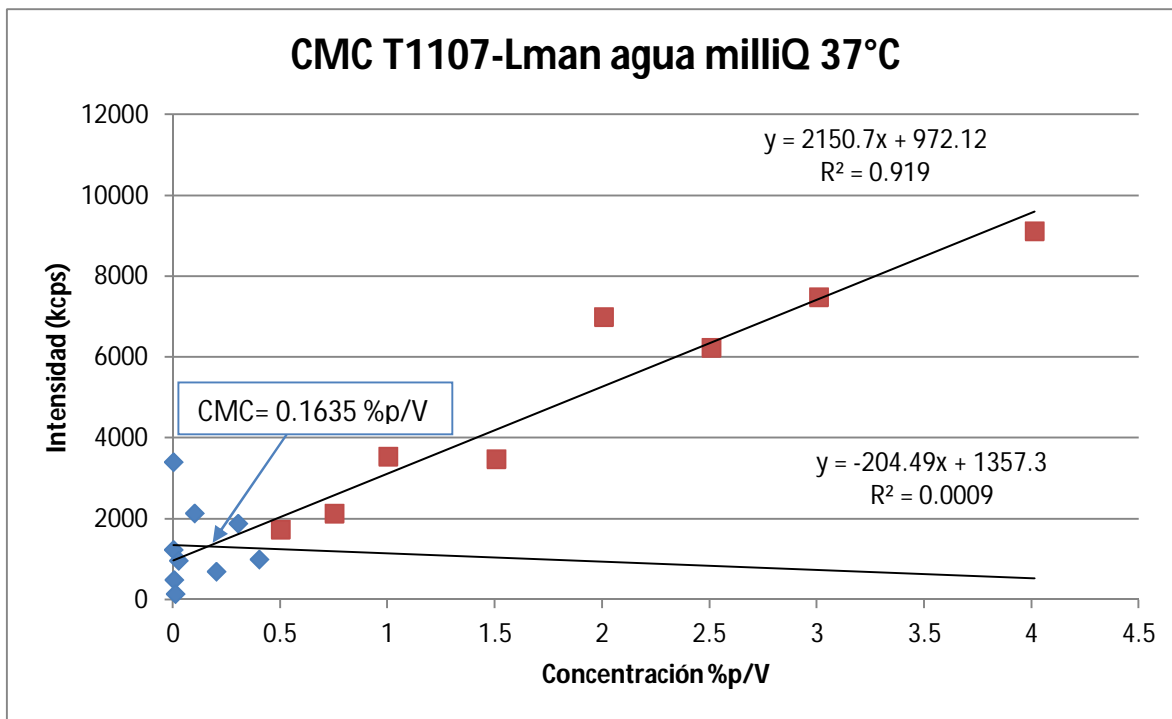


Figura 62. Determinación de CMC de T1107-Lman en agua milliQ a 37°C. CMC=0.1635 %p/V.

Una de las contribuciones a la dispersión de los datos que se observa en la figura 62 a bajas concentraciones puede ser debida al error asociado a la preparación de las mismas, ya que se parte de un estándar y se hacen hasta 20 diluciones del mismo.

En la tabla 35 es posible observar que con T1107-Lman la tendencia se mantiene igual que con T701, ante el aumento de temperatura disminuye la CMC. En este caso el factor de cambio es 3, lo cual indica que el polímero es poco sensible a la variación de temperatura probablemente por la presencia de los bloques POE que lo hacen altamente hidrofílico. Como se mencionó con T701, la solvatación de los bloques de POE permanece con el aumento de temperatura pero la de los bloques de POP se ve disminuida y las interacciones entre cadenas hidrofóbicas se favorece; sin embargo, al tener un bajo contenido de este tipo de boques no hay un cambio drástico en la formación de micelas.

Tabla 35. CMC de T1107-Lman en función de la temperatura

Temperatura	25°C	37°C	Factor de cambio
CMC (%p/V)	0.5492	0.1635	3

En la tabla 36 se muestran los resultados de intensidad y concentración de las disoluciones en la determinación de CMC de T1107-Lman en PBS a 25°C.

Tabla 36. Datos experimentales para determinar la CMC de T1107-Lman en PBS a 25°C.

Muestra	Concentración % p/V	Intensidad de la Luz Dispersada (kcps)
1	0.0012	431.5
2	0.0025	811.7
3	0.0050	538.8
4	0.0100	948.7
5	0.0250	1018.8
6	0.0500	719.8
7	0.1000	1245.1
8	0.2000	935.4
9	0.3001	1226.7
10	0.4001	1307.4
11	0.5002	1973.6
12	0.7503	1980.9
13	1.0004	2548.4
14	1.5006	3034.6
15	2.0008	3705.9
16	2.5010	4092.9
17	3.0012	6673.8
18	4.0016	6971.9
19	5.0020	8216.4

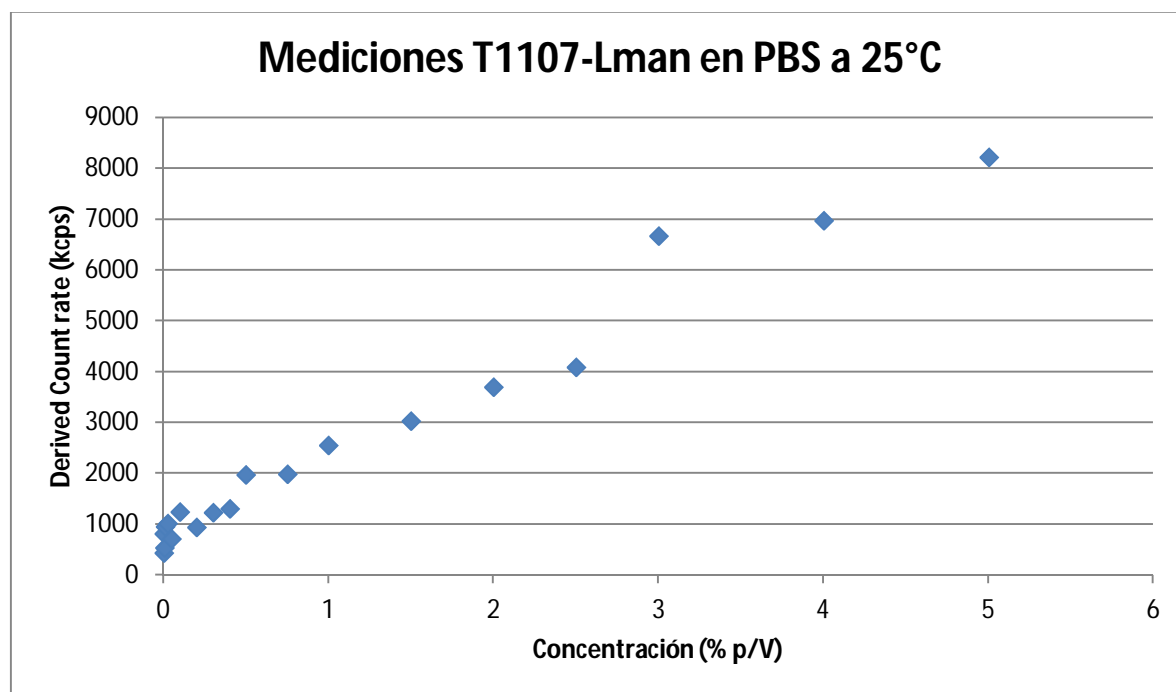


Figura 63. Intensidad en función de la concentración de T1107-Lman en PBS a 25°C.

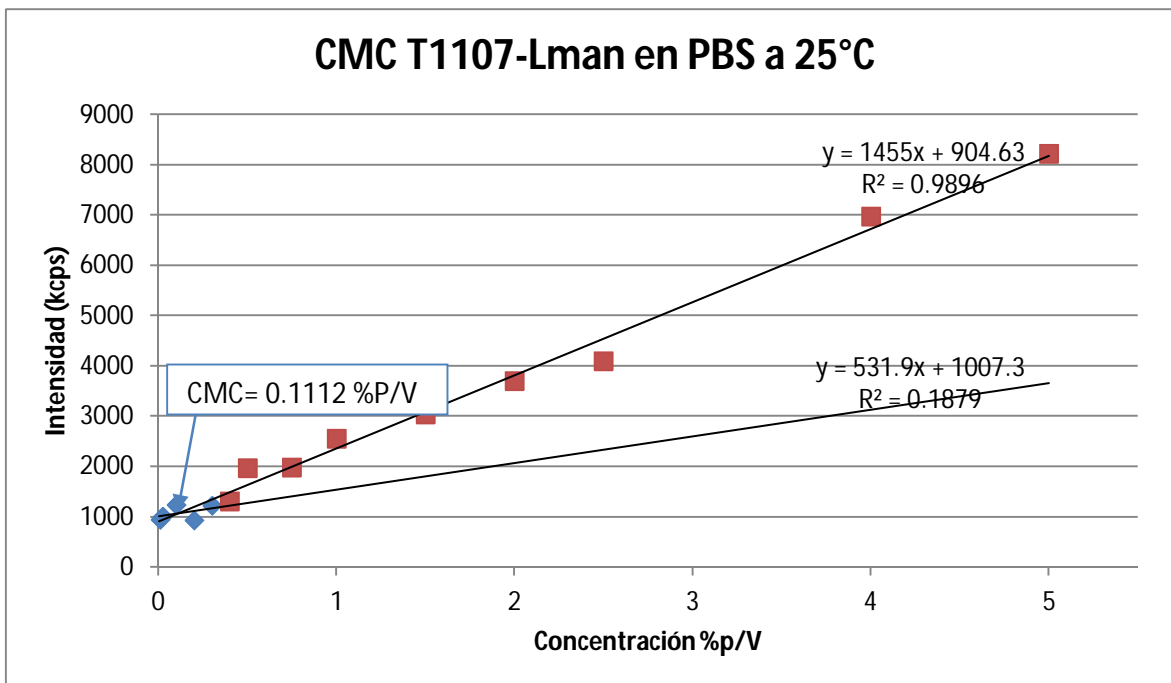


Figura 64. Determinación de CMC de T1107-Lman en PBS a 25°C. CMC =0.1112 %p/V.

Las figuras 63 y 65 corresponden a los datos experimentales de intensidad en función de la concentración. Las figuras 64 y 66 muestran el tratamiento de los datos para encontrar la CMC.

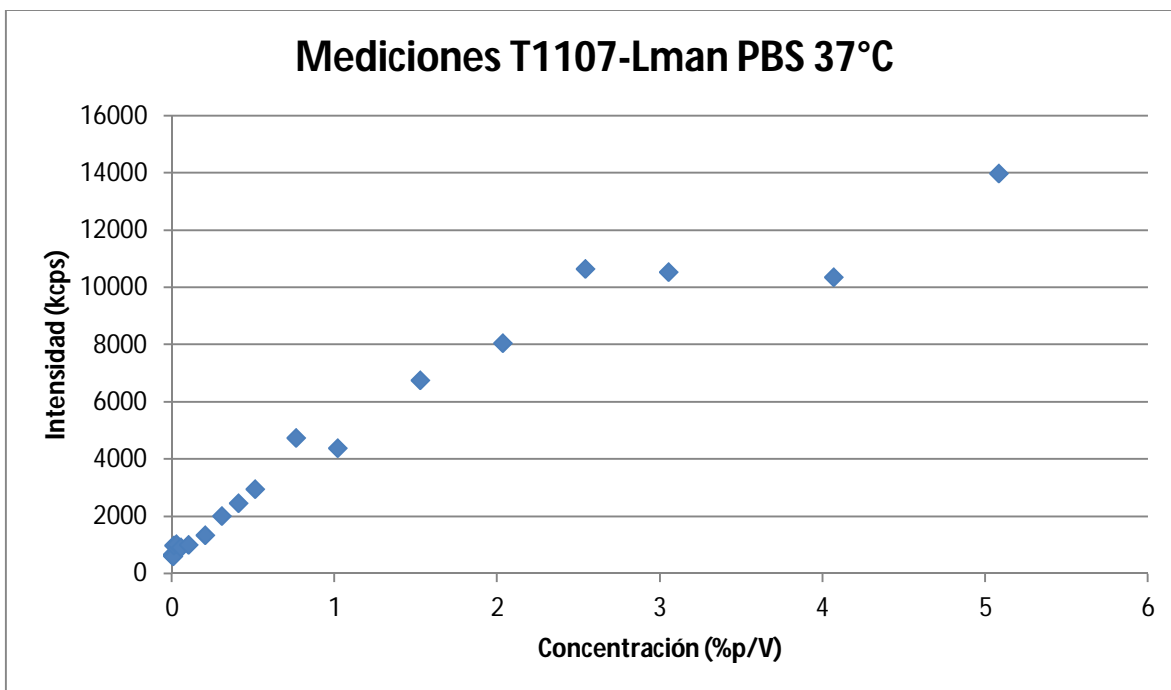


Figura 65. Intensidad en función de la concentración de T1107-Lman en PBS a 37°C.

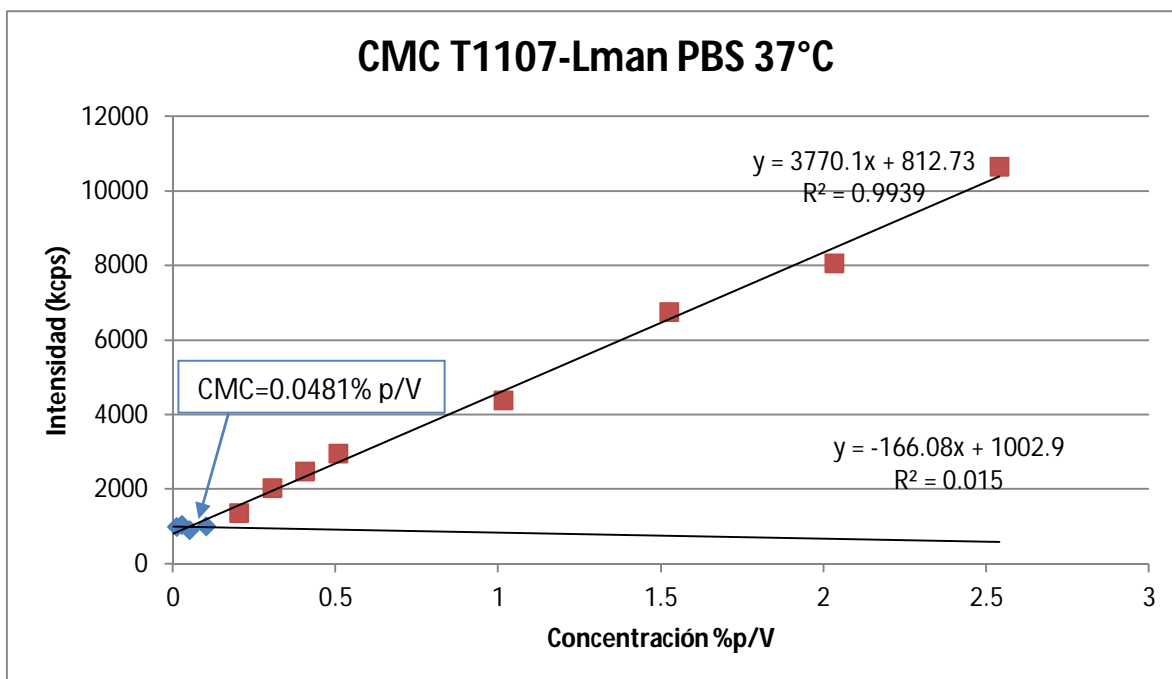


Figura 66. Determinación de CMC de T1107-Lman en PBS a 37°C. CMC=0.0481 %p/V.

Para poder estudiar el efecto del pH, también se realizaron mediciones de éste en función de la concentración de T1107 nativo y modificado a 25 y 37 °C. Los resultados se encuentran en las tablas 37 y 38, en donde se resaltan los valores cercanos a la CMC. Con esta poloxamina podemos observar que el pH no cambia drásticamente con la temperatura ya que su punto de enturbiamiento está por encima de los 100°C.

Tabla 37. pH en función de la concentración de T1107 nativo.

Concentración (%p/V)	25°C	37°C
5	8.74	7.80
1	8.64	7.82
0.5	8.16	7.82
0.25	8.04	7.21

Tabla 38. pH en función de la concentración de T1107-Lman.

Concentración (%p/V)	pH	
	25°C	37°C
1	6.77	6.15
0.5	6.60	6.15
0.25	6.61	6.15

En la tabla 39 se resumen los resultados de CMC de T1107-Lman en los dos medios de estudio. En este caso podemos notar que a mayor pH las micelas poliméricas se forman a menor concentración, como ocurrió con T701-Lman, tal como se ha dicho, la desprotonación del núcleo hidrofóbico juega un papel importante en la formación de micelas.

Tabla 39. CMC en agua milliQ y PBS de T1107-Lman.

Medio	CMC (%p/V)		CMC (%p/V)	
	25°C	pH	37°C	pH
Agua milliQ	0.5492	6.6	0.1635	6.15
PBS	0.1112	7.4	0.0481	7.4

Como se mencionó anteriormente, la poloxamina T1107 había sido estudiada previamente por Romina Glioni, del grupo de trabajo del Dr. Sosnik, quien lo caracterizó y conjugó con un derivado de lactosa²¹, para fines de comparación se tomaron los resultados que obtuvo de dicho estudio y se muestran en la tabla 40. Utilizando estos valores podemos analizar el efecto de la modificación en la poloxamina.

Tabla 40. Caracterización de T1107 realizada por Romina Glioni (datos copiados con su autorización).

Medio	CMC (%p/V)	
	25°C	37°C
Agua milliQ	0.3000	0.2900
PBS	0.1400	0.1200

Tabla 41. Efecto de la modificación en T1107-Lman.

Medio	Agua milliQ		PBS	
	25°C	37°C	25°C	37°C
T1107-nativo	0.3000	0.2900	0.1400	0.1200
T1107-Lman	0.5492	0.1635	0.1112	0.0481

En la tabla 41 se ve una disminución de la CMC de T1107-Lman en comparación con el polímero nativo, excepto en agua milliQ a 25°C, por lo cual se recomendaría repetir el experimento para confirmar o corregir el resultado. De esta forma podríamos concluir de qué forma afecta la conjugación en el autoensamblaje del polímero. Con los resultados mostrados, al parecer el derivado de manosa favorece la CMC posiblemente por los puentes de hidrógeno intermoleculares que se forman cuando el polímero se organiza formando micelas.

ENCAPSULACIÓN DE FÁRMACOS EN MICELAS POLIMÉRICAS

Una vez que sabemos la concentración a la cual comienzan a formarse micelas poliméricas, es posible tratar de encapsular un fármaco dentro del núcleo hidrofóbico de éstas.

La amiodarona y nimodipina son fármacos muy poco solubles, mediante la encapsulación se puede incrementar su solubilidad y favorecer su efecto terapéutico.

En este trabajo se intentó encapsular ambos fármacos en las poloxaminas T701, T701-Lman, T1107 y T1107-Lman, obteniéndose resultados exitosos con T1107 nativo y modificado con amiodarona. En los casos de T701 y T701-Lman se presentó precipitación del polímero que arrastró consigo el fármaco e impidió que se formara la nanocápsula probablemente porque la temperatura de trabajo (25°C) estaba por encima del punto de enturbiamiento.

En el caso de la nimodipina, la estadística de los resultados obtenidos sugiere que las condiciones de trabajo no fueron las adecuadas por lo que se recomendaría repetir los experimentos y optimizar la encapsulación. Investigaciones recientes sugieren que el pK_a y $\log P$ de los fármacos son dos factores importantes para evaluar su interacción electrostática e hidrofóbica con los polímeros. El modo de interacción, además de su intensidad, afectará la eficiencia de encapsulación y estabilidad micelar⁴¹. Mediante un estudio termodinámico es posible determinar si la encapsulación está guiada por fuerzas hidrofóbicas (entropía) o fuerzas electrostáticas (entalpía) de esta manera se pueden ajustar las condiciones experimentales, como pH, temperatura y relación molar hasta lograr la encapsulación.

El método de encapsulación consistió en preparar disoluciones del polímero que servirá como nanotransportador y agregar un exceso del fármaco a encapsular. La mezcla se agitó durante 48 horas a temperatura controlada, 25°C. Transcurrido el tiempo de agitación se filtra el exceso de fármaco y se cuantifica la cantidad encapsulada aprovechando alguna propiedad del mismo, en este caso se monitoreó mediante espectroscopia UV-visble. Otros autores han empleado esta misma técnica para formar nanocápsulas con diversos compuestos.⁴²

Curva de calibración de amiodarona

A partir de un estándar de amiodarona en etanol, se prepararon disoluciones desde 5 hasta 25 $\mu\text{g/mL}$, se midió su absorbancia en un equipo de espectroscopia UV. En las figuras 67 a la 71 se muestran los espectros obtenidos. En la literatura se reporta una absorción a 242 nm. En la práctica se hizo un barrido de 200 a 400 nm, encontrando la máxima absorción a 240 nm.

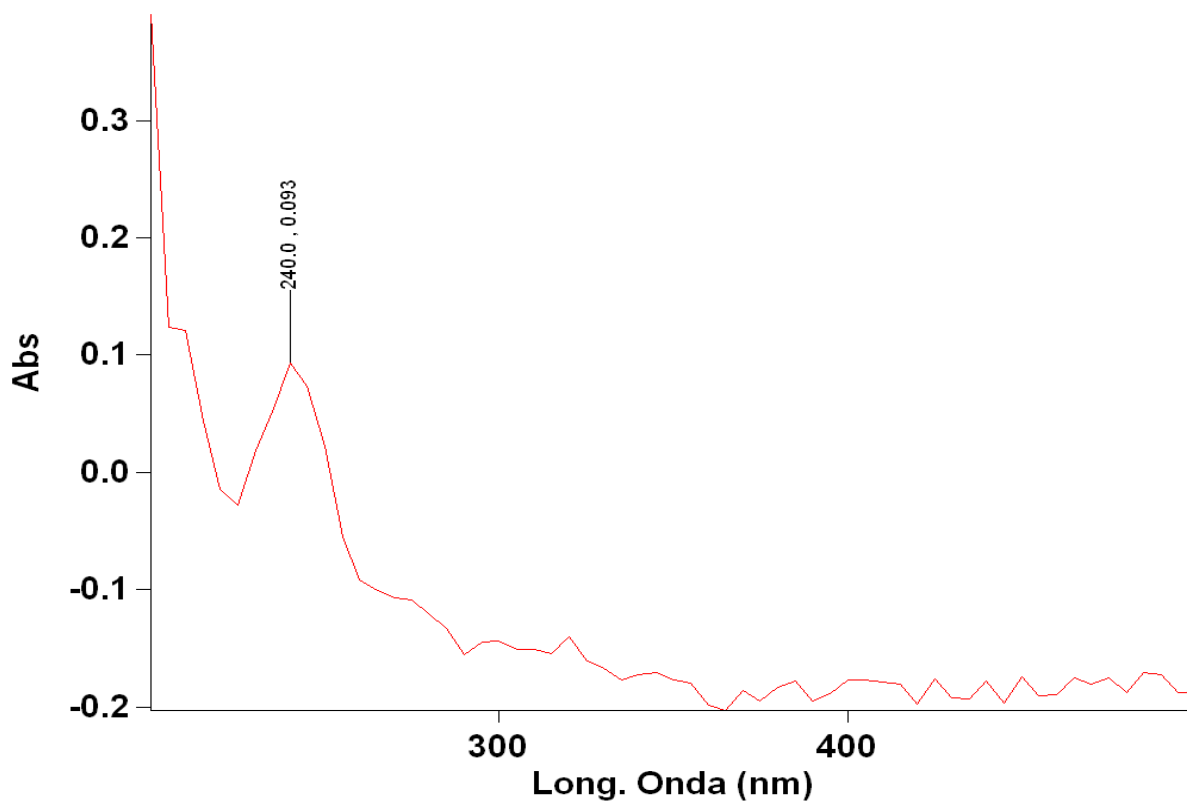


Figura 67. Espectro UV amiodarona 5 µg/mL.

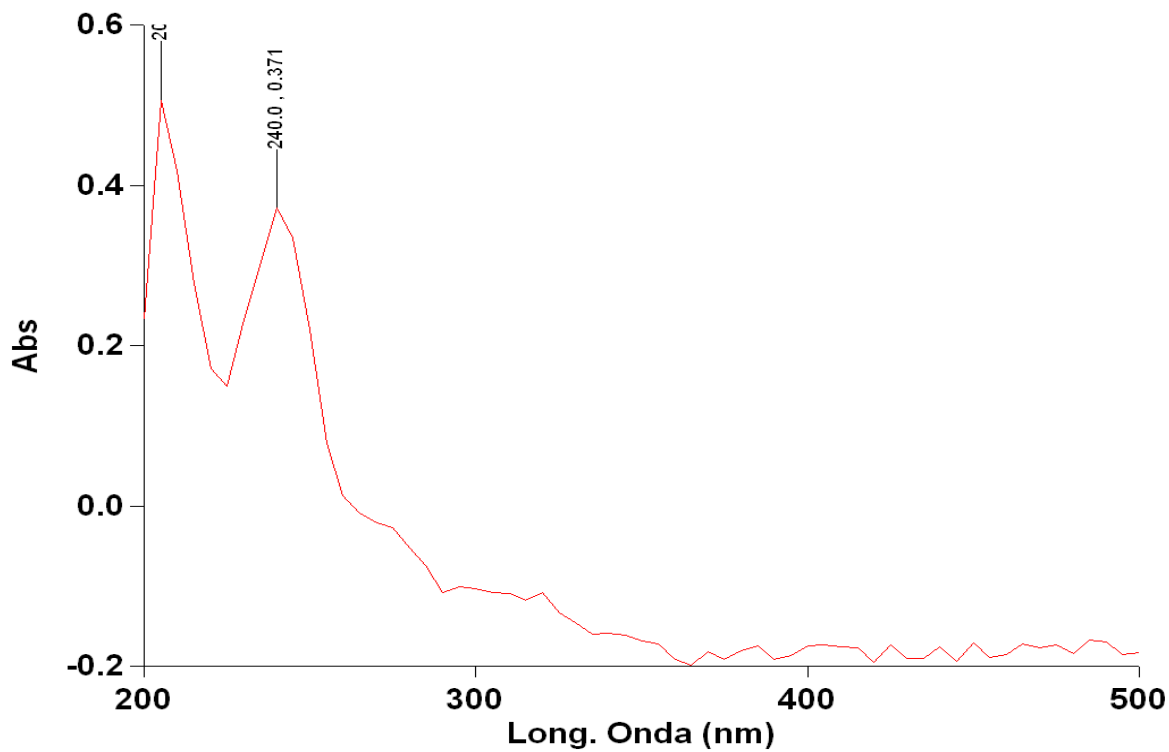


Figura 68. . Espectro UV amiodarona 10 µg/mL.

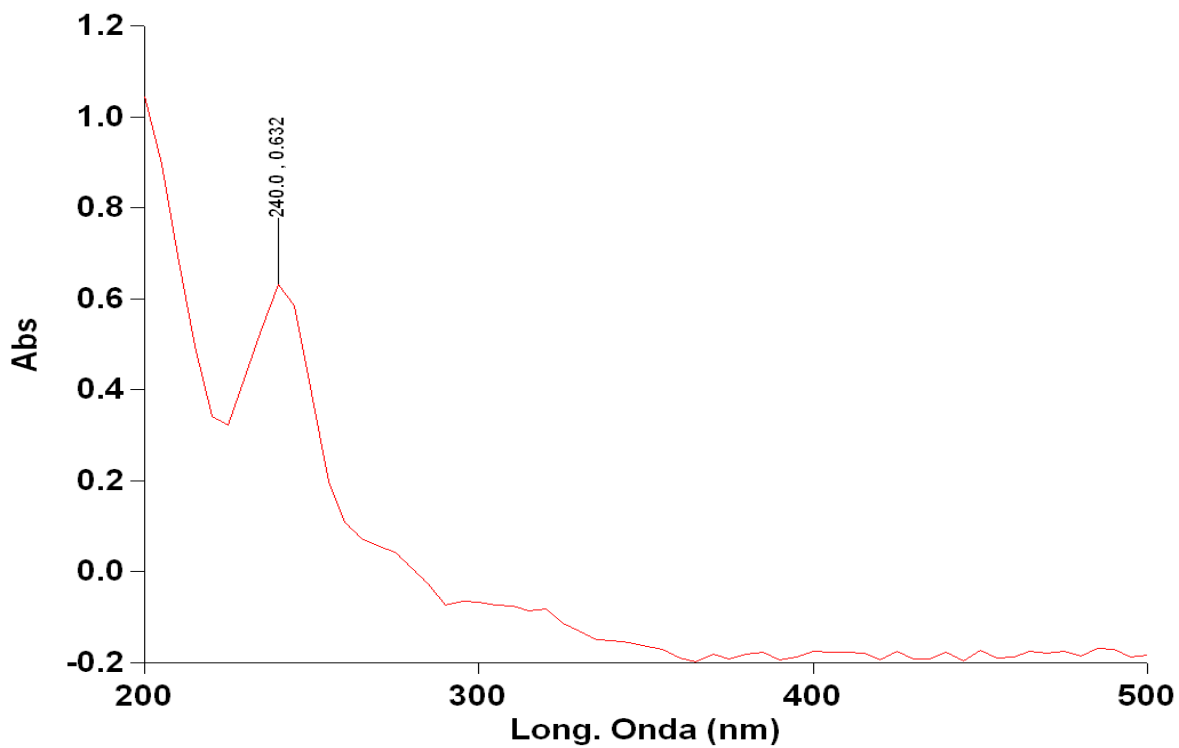


Figura 69. Espectro UV amiodarona 15 µg/mL.

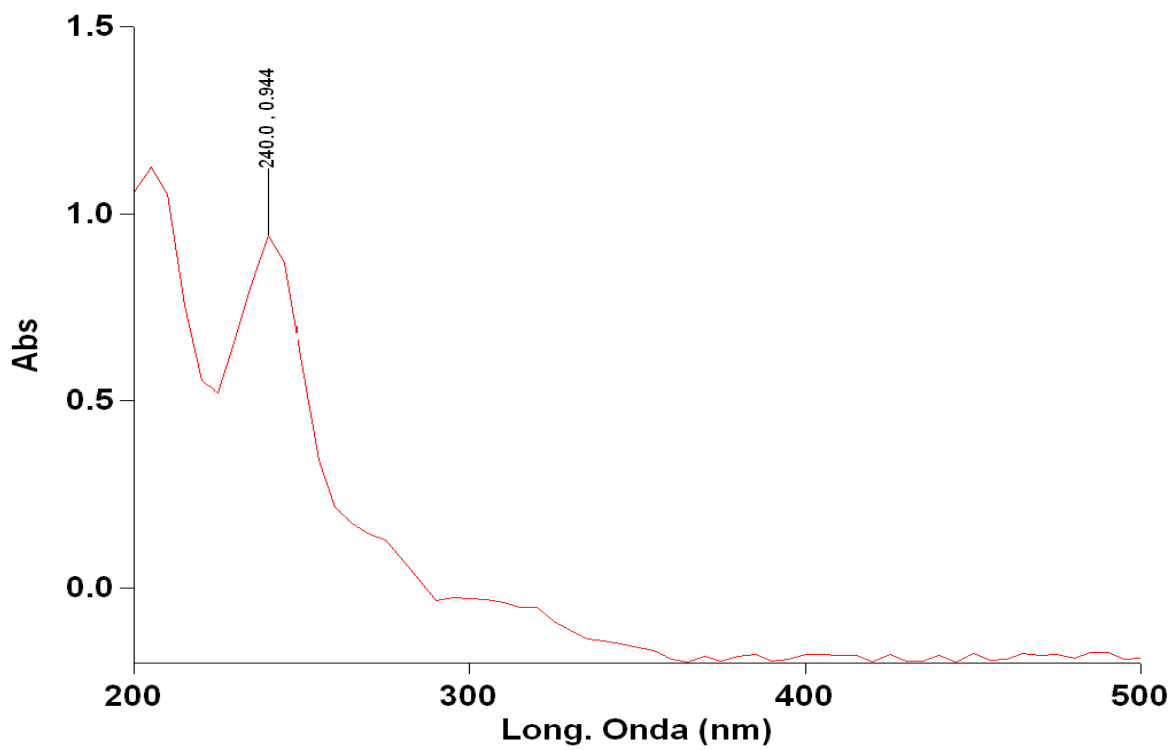


Figura 70. Espectro UV amiodarona 20 µg/mL.

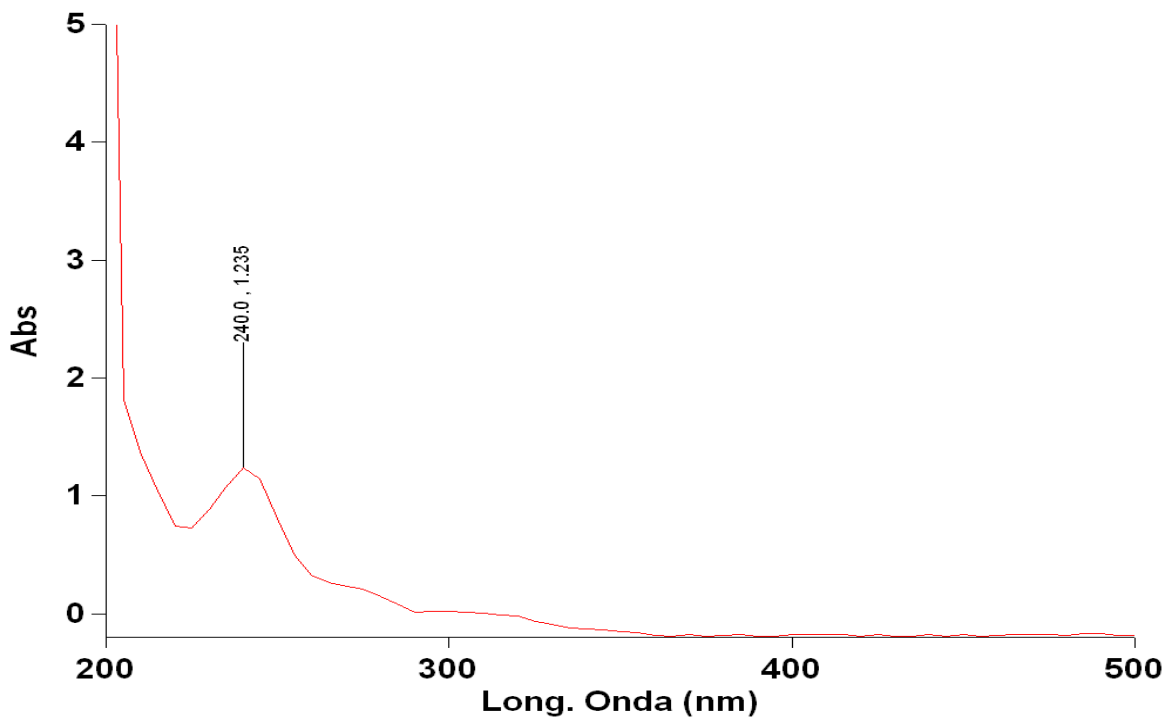


Figura 71. Espectro UV amiodarona 25 µg/mL.

Con los valores obtenidos se trazó una gráfica de absorbancia en función de la concentración, mediante una regresión lineal se obtuvo la ecuación de la línea recta para realizar los cálculos y conocer la solubilidad intrínseca del fármaco en agua y el aumento de solubilidad del mismo cuando se utilizan micelas poliméricas como nanoacarreadores.

La curva de calibración se realizó por triplicado y se muestra en la figura 72.

La función obtenida es la siguiente:

$$A = 0.055 Cx - 0.217 \quad (a)$$

Donde:

A= Absorbancia de la muestra

Cx= Concentración de la muestra

Si despejamos Cx

$$Cx = \frac{A + 0.2177}{0.055} \quad (b)$$

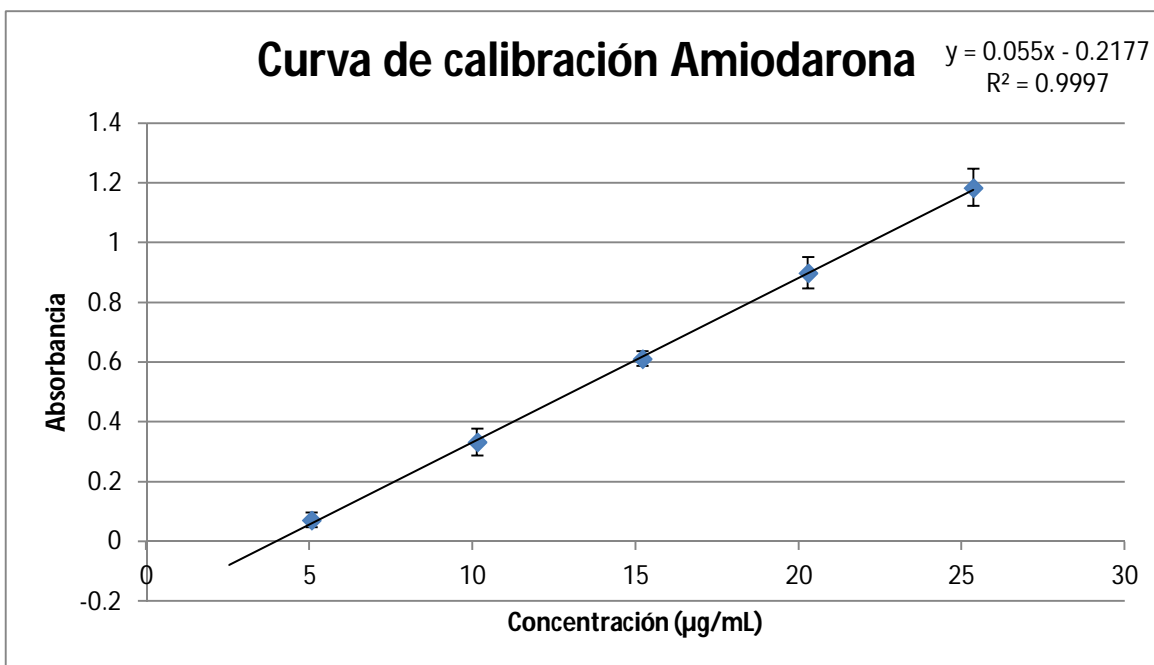


Figura 72. Absorbancia en función de la concentración de amiodarona en etanol. Curva de calibración.

Solubilidad Intrínseca de Amiodarona

Para conocer la solubilidad intrínseca de amiodarona en agua milliQ se pesaron 5g de agua y se le adicionó un exceso del fármaco. Se agitó la mezcla durante 48 horas a 25°C, transcurrido este tiempo se filtró la suspensión obteniendo una solución translúcida. Se tomó una alícuota de 20 µL y se le agregaron 980 µL de etanol, se agitó y se midió la muestra en el UV. El experimento se realizó por triplicado, los resultados se presentan en la tabla 42.

La figura 73 muestra el espectro UV del ensayo 3 para determinar la solubilidad intrínseca de amiodarona en agua milliQ.

Tabla 42. Determinación de solubilidad intrínseca de amiodarona.

Ensayo	1	2	3
Cantidad de agua	5.02006	5.02551	5.05380
Cantidad de fármaco	0.03121	0.03105	0.03139
Absorbancia 240 nm	0.237	0.240	0.219
Solubilidad amiodarona (µg/mL)	413	416	397

Utilizando la ecuación b, se calculó la cantidad de amiodarona presente por mL de agua.

Solubilidad de amiodarona en agua milliQ: 408.81 ± 10.32 µg/mL.

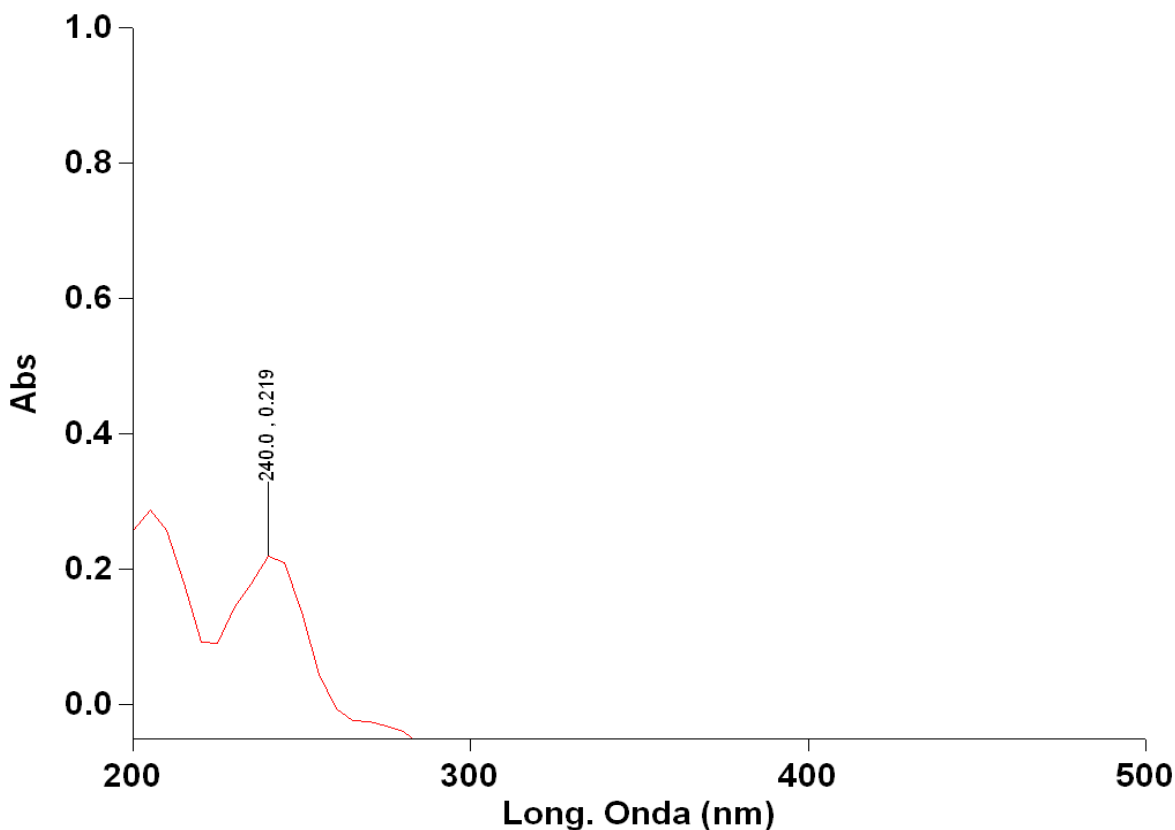


Figura 73. Espectro UV para determinar la solubilidad intrínseca de amiodarona en agua.

Encapsulación de amiodarona en T1107 nativo

Se prepararon disoluciones del polímero al 2.5, 5 y 10% m/m, se agregaron aproximadamente 30 mg de amiodarona. Se siguió el protocolo de encapsulación descrito anteriormente utilizando filtros de 0.45 μm . Las soluciones recién filtradas se midieron en el espectrofotómetro (día cero), se dejaron reposando durante dos semanas a temperatura ambiente, se midió su absorbancia a los 7 y 15 días para determinar la estabilidad de las nanocápsulas formadas.

En este estudio se considera estabilidad al tiempo que permanece el fármaco dentro de la micela desde el día cero hasta que empiezan a aparecer las primeras señales de turbidez lo cual indica que se está rompiendo la nanocápsula y el fármaco comienza a precipitar.

El aumento de solubilidad del fármaco se cuantificó utilizando la curva de calibración de amiodarona en etanol.

El factor de aumento de solubilidad se define como:

$$F_s = \frac{\text{Solubilidad del fármaco con el polímero}}{\text{Solubilidad Intrínseca del fármaco}}$$

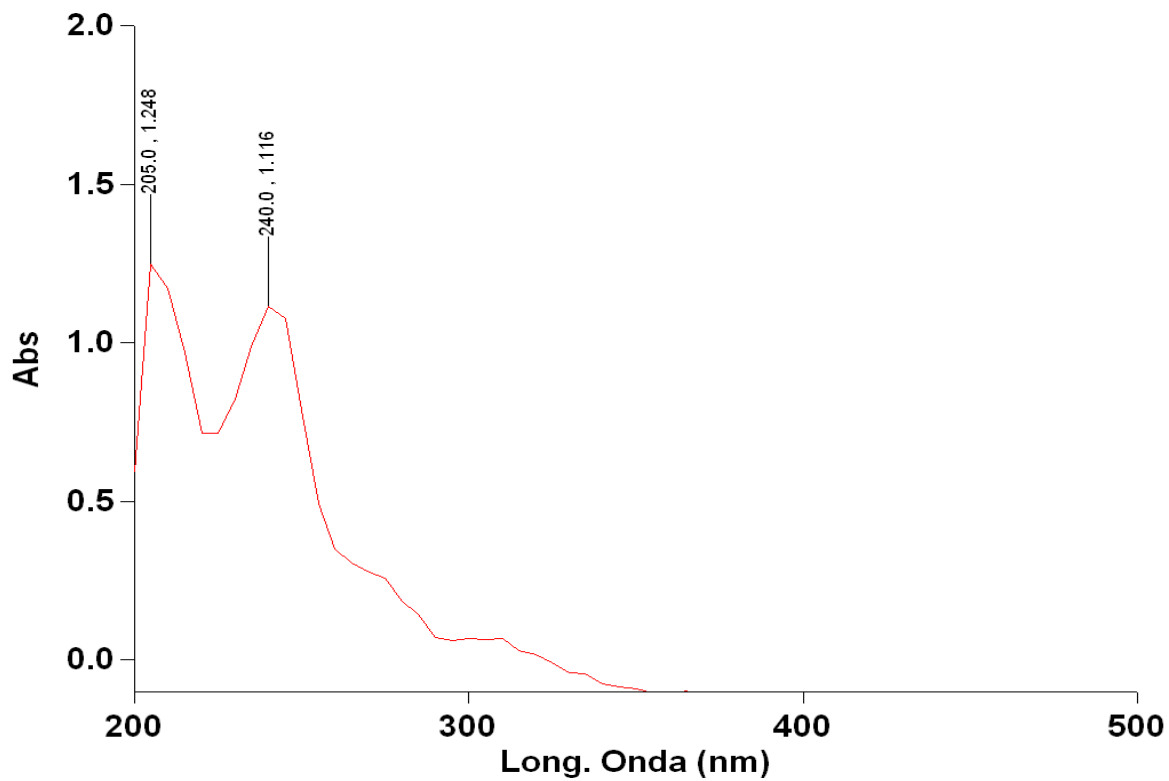


Figura 74. Aumento de solubilidad de amiodarona con T1107 al 2.5%

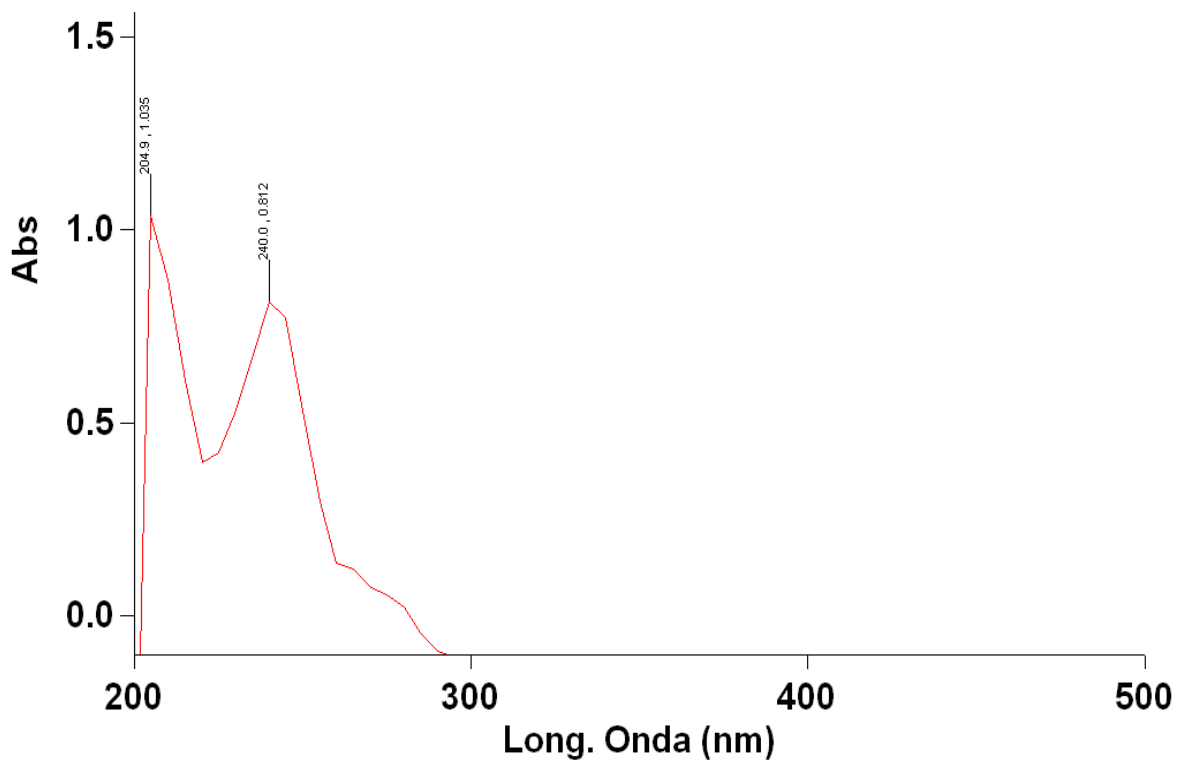


Figura 75. Estabilidad de amiodarona con T1107 nativo al 2.5% después de 7.

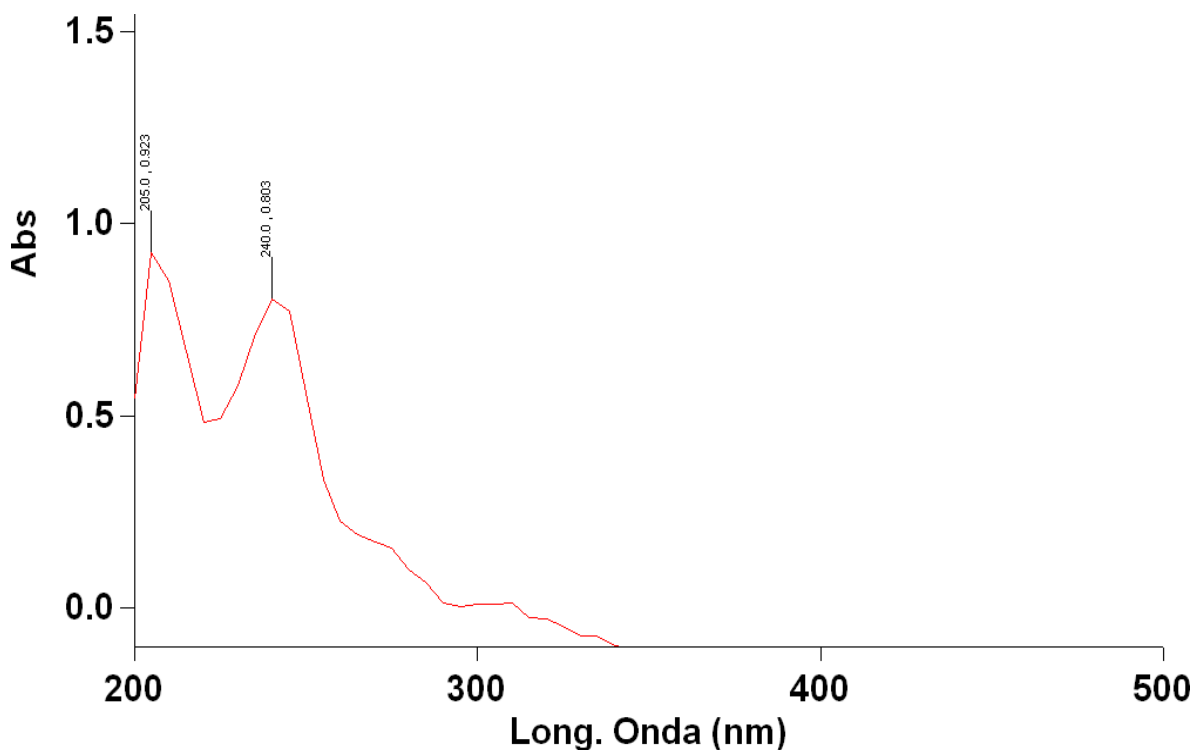


Figura 76. Estabilidad de amiodarona en T1107 nativo al 2.5% después de 15 días.

En las figuras 74, 75 y 76 se muestran, como ejemplo, los espectros del aumento de solubilidad y estabilidad de amiodarona con T1107 nativo al 2.5% m/m.

A partir de los resultados de absorbanza obtenidos para cada porcentaje de polímero en estudio se calculó el aumento de solubilidad, factor de aumento de solubilidad y estabilidad de amiodarona en las micelas poliméricas utilizando la curva de calibración de amiodarona en etanol. Los resultados se grafican en las figuras 77 y 78.

Como muestra la figura 77, con el 2.5% m/m de polímero se encapsulan aproximadamente 2.5 mg de fármaco, al aumentar a 5% prácticamente el doble, sin embargo la cantidad de fármaco encapsulado disminuye utilizando el 10% de T1107. En la figura 78 podemos ver que el Fs es de 6, 11 y 8 para 2.5, 5 y 10% de T1107 respectivamente. Este resultado puede explicarse porque al cambiar la relación molar poloxamina/amiodarona se atenúa el promedio de las fuerzas hidrofóbicas para cada fármaco y la habilidad de retención en las micelas disminuye.⁴¹

El punto de fusión relativamente alto de la amiodarona (159) revela la presencia de interacciones soluto-soluto fuertes, la encapsulación eficiente del fármaco dentro de las micelas poliméricas dependerá de la fuerza de las interacciones fármaco-núcleo hidrofóbico cuando se forma la nanocápsula⁴³.

La amiodarona es un fármaco muy hidrofóbico ($\log P=7.24$), sin embargo la poloxamina T1107 tiene un elevado balance hidrofílico-lipofílico (18-23), lo cual indica que tiene mayor carácter hidrofílico, por lo cual las interacciones hidrofóbicas entre estas dos moléculas pueden no ser lo

suficientemente fuertes para mantener el fármaco dentro de las micelas. Con estos resultados podría lograrse una liberación sostenida en una formulación, ya que interacciones muy fuertes limitarían la aplicación debido a que el fármaco no sería liberado en el cuerpo.

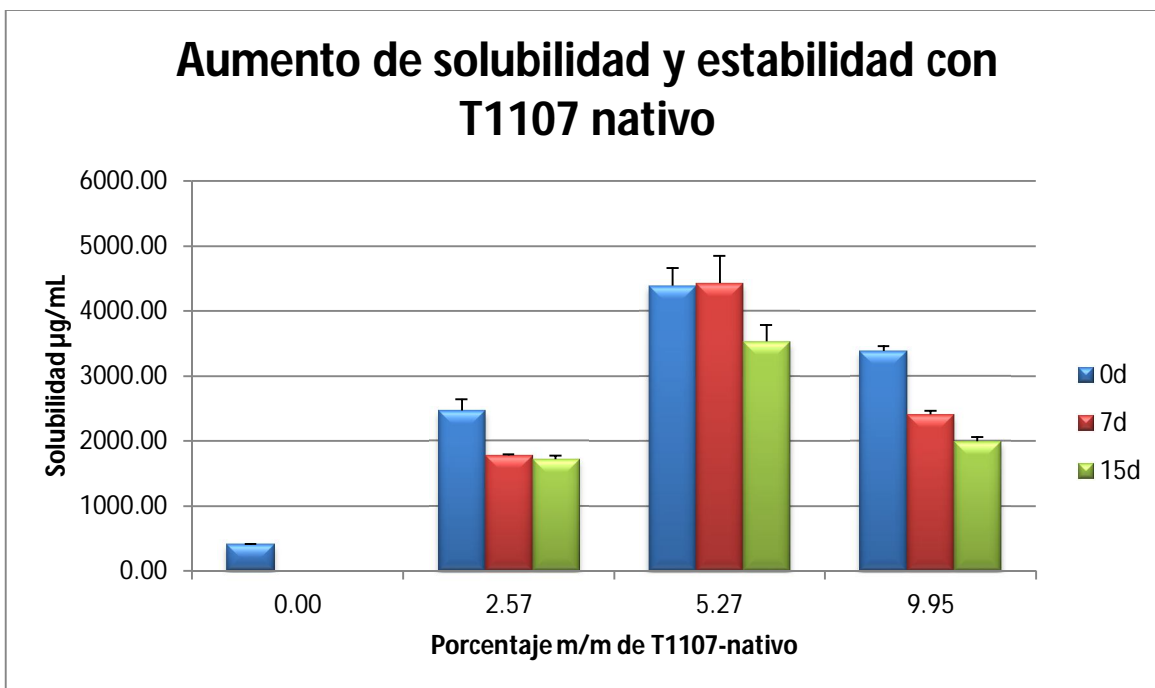


Figura 77. Aumento de solubilidad y estabilidad de amiodarona con T1107 nativo.

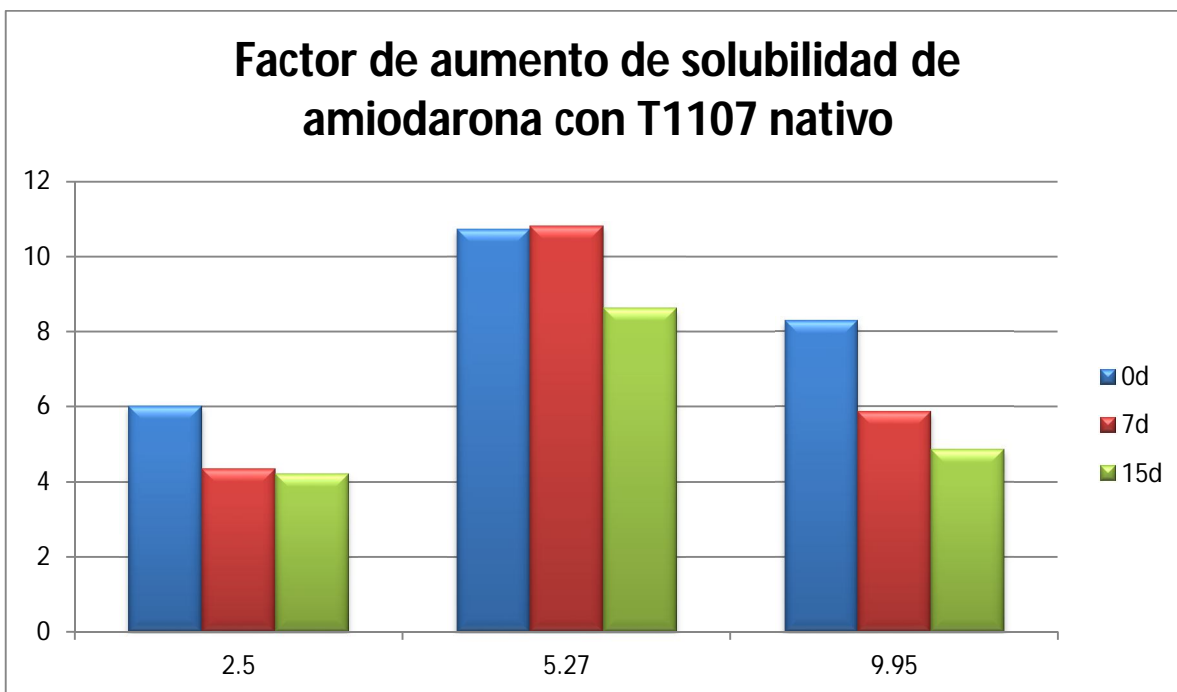


Figura 78. Factor de aumento de solubilidad de amiodarona cuando se encapsula en T1107 nativo.

Encapsulación de amiodarona en T1107-Lman

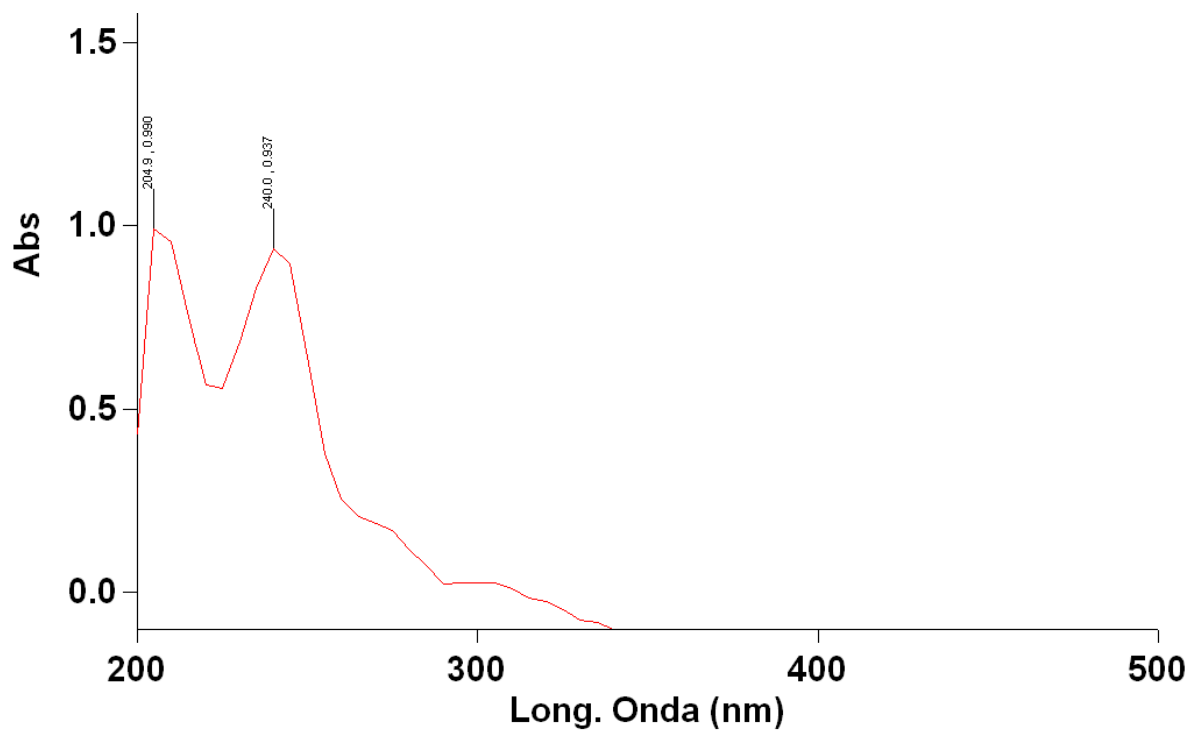


Figura 79. Espectro UV de la encapsulación de amiodarona en 2.5% de T1107-Lman.

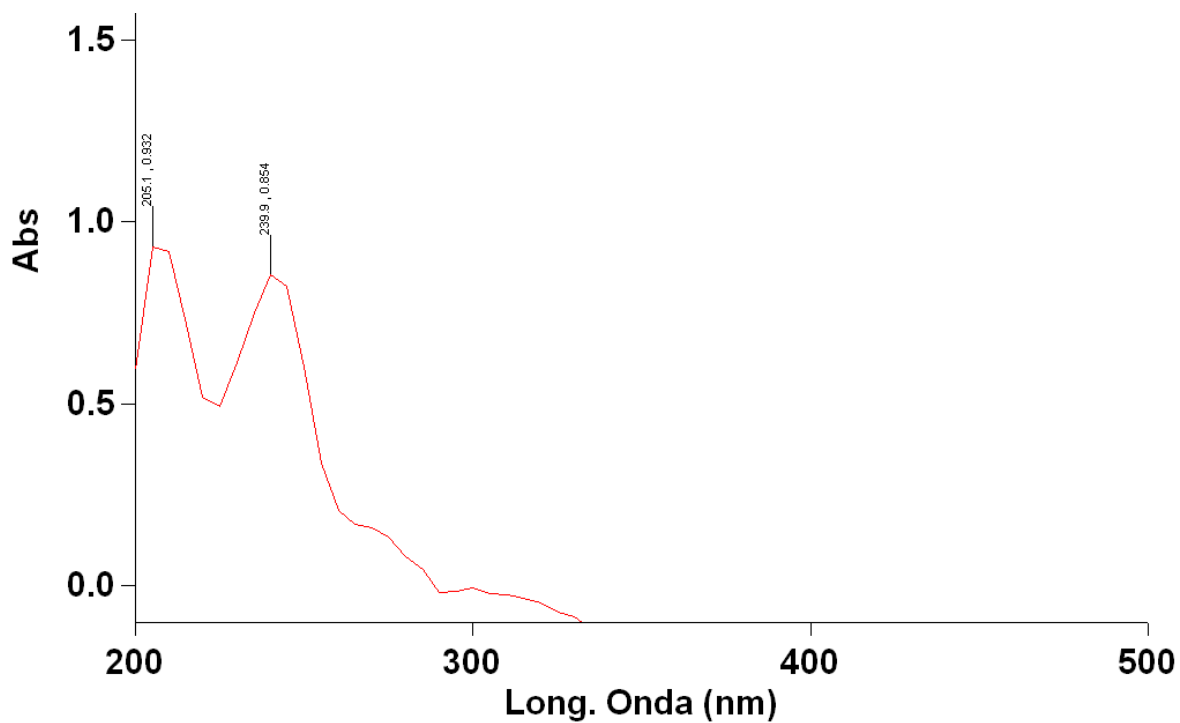


Figura 80. Estabilidad de amiodarona en 2.5% de T1107-Lman al día 15.

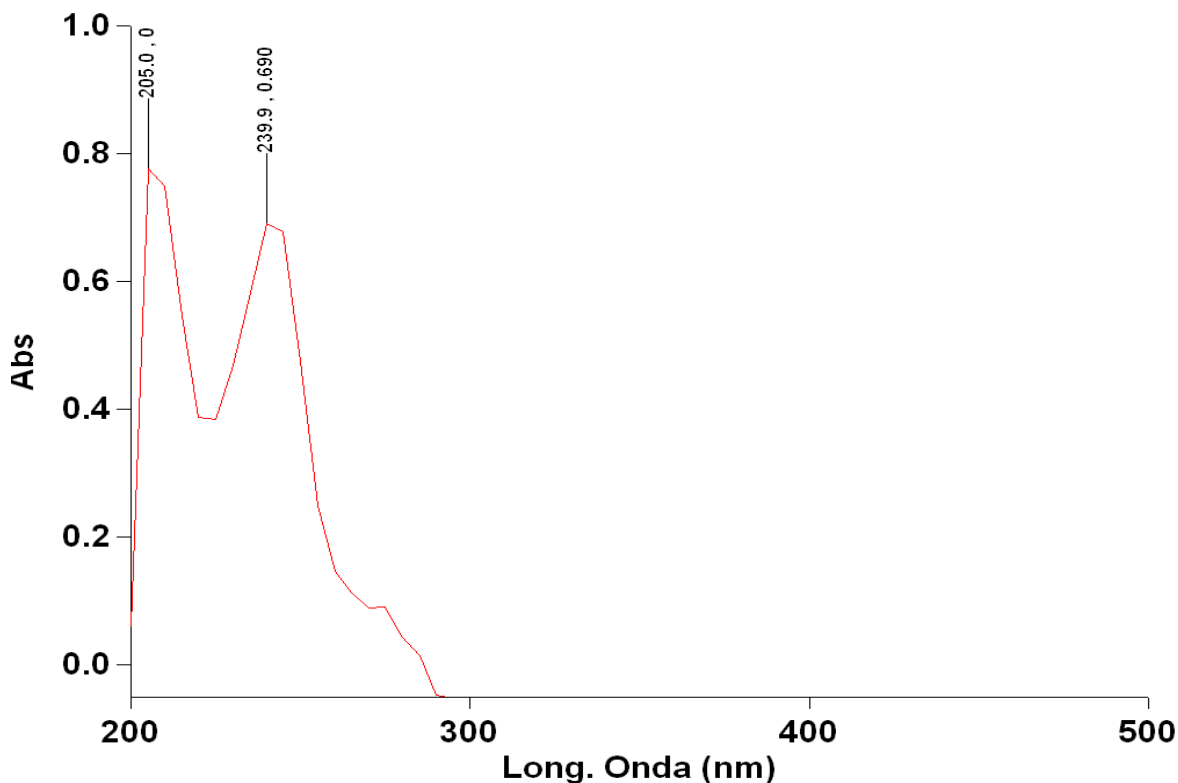


Figura 81. Estabilidad de amiodarona en 2.5% de T1107-Lman al día 30.

En las figuras 79, 80 y 81 se muestra los espectros UV obtenidos en el estudio de encapsulación de amiodarona en 2.5% de T1107-Lman.

En la figura 82 se muestran los resultados de incremento de solubilidad y estabilidad de amiodarona encapsulada en T1107-Lman. Podemos observar que con 2.5 y 10% de poloxamina se encapsula prácticamente la misma cantidad de fármaco y con el 5% se aumenta ligeramente la cantidad de fármaco encapsulado. Como se dijo con el polímero nativo al cambiar la relación fármaco-polímero también cambian las interacciones hidrofóbicas entre éstos, una menor cantidad de T1107-Lman disminuye la cantidad de micelas disponibles para la encapsulación pero un exceso del polímero conduce a un medio altamente hidrofílico poco favorable para el fármaco.

Las nanocápsulas más estables son aquellas cuya concentración de polímero es de 5 y 10% m/m. En este caso la estabilidad se siguió hasta el día 30, a diferencia del polímero nativo donde se observaba la ruptura de la nanocápsula desde el día 7, cuando comenzaba a cambiar la apariencia de la solución de traslúcida a opalescente, por el inicio de la precipitación del fármaco, con el polímero modificado la solución permaneció estable por más tiempo posiblemente por la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares que favorecen la estabilidad de la micela.

El Fs de amiodarona en micelas poliméricas de T1107-Lman se muestra en la figura 83, podemos ver que en los tres casos se aumentó la solubilidad 10 u 11 veces.

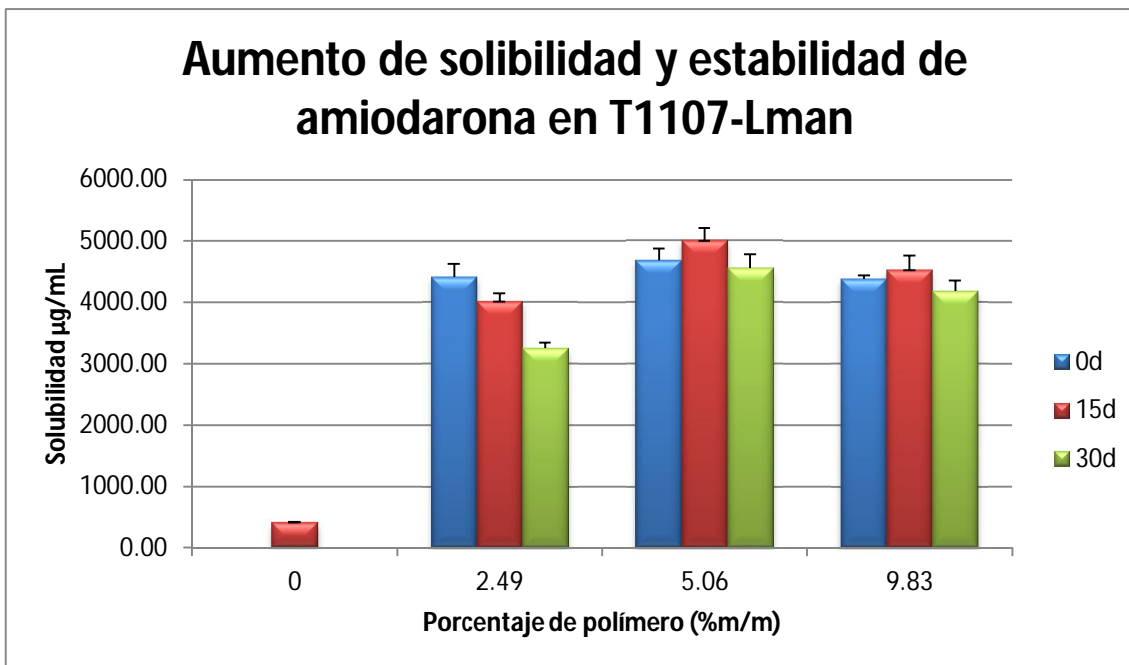


Figura 82. Aumento de solubilidad y estabilidad de amiodarona en micelas poliméricas de T1107-Lman.

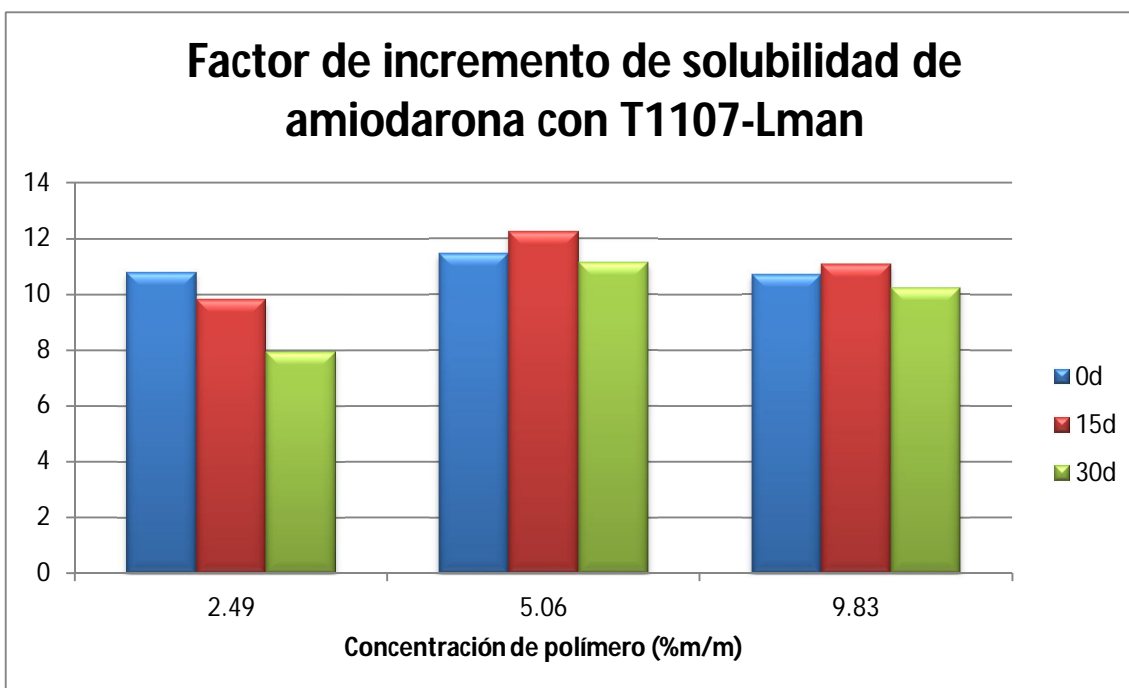


Figura 83. Factor de aumento de solubilidad de amiodarona cuando se encapsula en T1107-Lman.

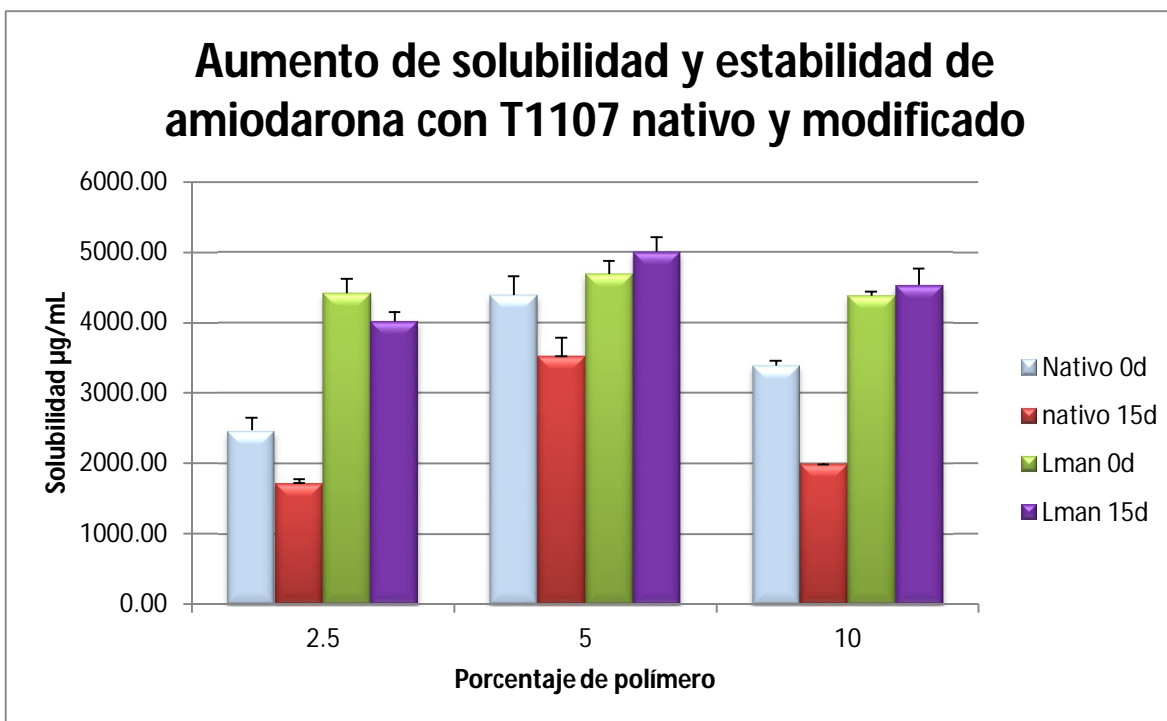


Figura 84. Aumento de solubilidad y estabilidad de amiodarona con T1107 nativo y modificado.

En la figura 84 se hace una comparación del aumento de solubilidad de amiodarona encapsulada en T1107-nativo y T1107-Lman, para fines prácticos se grafican concentraciones de 2.5, 5 y 10% p/V de la poloxamina, aunque los valores experimentales son ligeramente diferentes todos son comparables. Podemos apreciar que la modificación favorece encapsulación pero sobre todo la estabilidad de la nanocápsula.

La compatibilidad del fármaco y el acarreador polimérico está influenciado principalmente por la atracción electrostática (entalpía) e interacciones hidrofóbicas (entropía). Los resultados sugieren una mayor afinidad del fármaco por el centro micelar debido a la modificación en la estructura de la poloxamina (conjugación de L-man), lo cual ha sido observado en otros estudios para T1107 y su contraparte metilada³⁴. Como se explicó anteriormente, este resultado puede deberse al aumento de interacciones entre las cadenas de la poloxamina debido a la formación de puentes de hidrógeno las cuales mantienen ensamblada la micela por un tiempo mayor por lo cual se evita la salida del fármaco al medio acuoso.

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES

- Se determinó la CMC de T701 en agua milliQ y PBS pH=7.4.
- Se modificaron químicamente dos poloxaminas, T701 y T1107, conjugando un derivado de manosa en las moléculas mediante una síntesis asistida por microondas y se caracterizaron los productos obtenidos por RMN e IR.
- Se determinó la presencia del conjugado de manosa mediante una prueba cualitativa de reconocimiento molecular del carbohidrato conjugado por una lectina vegetal, encontrando que aún en su forma abierta, el residuo de manosa puede ser reconocido y por lo tanto las poloxaminas modificadas pueden ser dirigidas a células que son reservorio de leishmania.
- Se determinó la CMC de los conjugados T701-Lman y T1107-Lman utilizando un equipo de DLS. Los polímeros estudiados forman micelas a muy bajas concentraciones debido a su alto contenido de bloques hidrofóbicos.
- Al estudiar el efecto de la autoagregación de los polímeros nativos y modificados en función de la temperatura y el pH del medio, se encontró que al aumentar la temperatura disminuye la CMC en todos los casos. Cuando se cambia el pH, existen dos factores que modifican la CMC: el efecto salino "salting-out" y la carga de los nitrógenos centrales de la poloxamina.
- Se probó la encapsulación amiodarona y nimodipina, dos fármacos con posible actividad antileishmania, en las micelas poliméricas de los compuestos nativos y modificados. Se logró el aumento de solubilidad de amiodarona hasta 12 veces con lo que se podría mejorar su biodisponibilidad. No fue posible encontrar las condiciones adecuadas de encapsulación con nimodipina.

PERSPECTIVAS

- Realizar la modificación sintética en un horno de síntesis por microondas profesional para encontrar las condiciones de reacción óptimas y de esta manera hacer los experimentos reproducibles.
- Determinar el grado de conjugación en la poloxamina modificada.
- Repetición de algunos experimentos de CMC para confirmar o rechazar el resultado.
- Para complementar este estudio deben determinarse las condiciones adecuadas de encapsulación de nimodipina apoyados en un estudio termodinámico que indique las fuerzas que determinan el auto ensamblaje de las poloxaminas y las interacciones con el fármaco.
- Estudiar el efecto salino sobre la CMC utilizando otros buffer en el mismo intervalo de pH estudiado.
- Realizar pruebas de actividad *in vitro* e *in vivo* del fármaco encapsulado.

REFERENCIAS

- ¹ Kenji Yasugi, Yukio Nagasaki, Masao Kato, Kazunuro Kataoka, "Preparation and characterization of polymer micelles from poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymers as potential drug carrier", *Journal of Controlled Release* 62 (1999) 89-100.
- ² Ricardo C. Pasquali, Diego A. Chiappetta, Carlos Bregni, "Los Copolímeros en Bloques Anfífilicos y sus Aplicaciones Farmacéuticas", *Acta Farm Bonarense* 24 No. 4 (2005) 610-618.
- ³ Glen S. Kwon, Teruo Okano, "Polymeric micelles as nex drug carriers", *Advanced Drug Delivery Reviews* 21 (1996) 107-116.
- ⁴ Carmen Alvarez-Lorenzo, Ana Rey-Rico, Alejandro Sosnik, Pablo Taboada, Angel Concheiro, "Poloxamine-based nanomaterials for drug delivery", *Frontiers in Bioscience* 2(2010) 424-440.
- ⁵ J. K. Armstrong, Babur Z. Chowdhry, Martin J. Snowden, Jingfeng Dong, Stephen A. Leharne, "The effect of pH and concentration upon aggregation transitions in aqueous solutions of poloxamina T701", *International Journal of Pharmaceutics* 229 (2001) 57-66.
- ⁶ Vladimir P. Torchilin, "Multifunctional nanocarriers", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58 (2006) 1532–1555
- ⁷ Wen-Jen Lin, Ming Hsiung Chen, "Synthesis of multifunctional chitosan with galactose as a targeting ligand for glycoprotein receptor", *Carbohydrate Polymers* 67 (2007) 474-480.
- ⁸ Xin Wang, Li-Hong Liu, Olof Ramström and Mingdi Yan, "Engineering Nanomaterial Surfaces for Biomedical Applications", *Experimental Biology and Medicine* 234 (2009) 1128-1139.
- ⁹ Shier, W. "Concanavalina-A as a tool" John Wiley and Sons, Londres 1976.
- ¹⁰ Pilar Roca, Jordi Oliver, Ana María Rodríguez, *Bioquímica: Técnicas y Métodos*, Ed. Hélice, 2004.
- ¹¹ The Center for Food Security and Public Health, Iowa State University, College of Veterinary Medicine, <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/leishmaniasis.pdf>
- ¹² Dra. Teresa Uribarren Berrueta, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/leishmaniosis.html>
- ¹³ Anna Dostálová and Petr Volf, "Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview", *Parasites & Vectors* 5 (2012) 276.
- ¹⁴ Dhekra Chaaraa, Najoua Haouas, Jean Pierre Dedet, Hamouda Babba, Francine Pratlong, "Leishmaniasis in Maghreb: An endemic neglected disease", *Acta Tropica* 132 (2014) 80–93.
- ¹⁵ Laura Saporito, Giovanni M. Giammanco, Simona De Grazia, Claudia Colomba, "Visceral leishmaniasis: host–parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host", *International Journal of Infectious Diseases* 17 (2013) e572–e576.
- ¹⁶ Juliana Quero Reimão, André Gustavo, "Investigation into in vitro anti-leishmanial combinations of calcium channel blockers and current anti-leishmanial drugs", *Tempone Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 106 No. 8 (2011) 1032-1038.
- ¹⁷ Xenon Serrano-Martín, Yael García-Marchan, Alexis Fernandez, Noris Rodriguez, Hector Rojas, Gonzalo Visbal, Gustavo Benaim, "Amiodarone Destabilizes Intracellular Ca II Homeostasis and Biosynthesis of Sterols in *Leishmania mexicana*", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2009), 1403–1410.
- ¹⁸ André Gustavo Tempone & Noemi Nosomi Taniwaki & Juliana Quero Reimão, "Antileishmanial activity and ultrastructural alterations of *Leishmania* (L.) chagasi treated with the calcium channel blocker nimodipine", *Parasitol Res* 105 (2009) 499–505.
- ¹⁹ Juliana Q. Reimão, Marcus T. Scotti, André G. Tempone, "Anti-leishmanial and anti-trypanosomal activities of 1,4-dihydropyridines: In vitro evaluation and structure–activity relationship study", *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18 (2010) 8044–8053.
- ²⁰ Carballido Reboredo Ma. Raquel, "Síntesis asistida por microondas de compuestos de interés biológico e industrial: haloarenos, fulvenos, triclopirrolidonas, azoles y flavonoides. Modelado de espectros de absorción electrónica de flavonoides", Universidad Santiago de Compostela, España.
- ²¹ Genaro Alfonso Remington, *Farmacología*, 19ª Edición, Editorial Médica Panamericana.
- ²² ZETASIZER NANO USER MANUAL, MANO317 ISSUE 4.0 MAY 2008. MALVERN INSTRUMENTS LTD. 2003, 2004, 2006, 2007, 2008. IMPRESO EN INGLATERRA- MALVERN INSTRUMENTS LTD. ENIGMA BUSINESS PARK

GROVEWOOD ROAD, MALVERN, WORCESTERSHIRE WR14 1XZ REYNO UNIDO.

- ²³ Önder Topel, Burçin Acar Çakır, Leyla Budama, Numan Hoda, "Determination of critical micelle concentration of polybutadiene-block-poly(ethyleneoxide) diblock copolymer by fluorescence spectroscopy and dynamic light scattering", *Journal of Molecular Liquids* 177 (2013) 40–43.
- ²⁴ Surfactant Micelle Characterization using Dynamic Light Scattering, Zetasizer nano application note, "malvern Instruments.
- ²⁵ John McMurry, *Química Orgánica*, 5ª. Edición, Ed. International Thomson Editores, México 2001.
- ²⁶ Wade, L.G. Jr., *Química Orgánica*, 2ª. Edición, Ed. Prentice Hall Hispanoamericana, S.A. de C.V., México, 1993.
- ²⁷ Abolghasem Jouyban, Shadi H. Eghrary, Reza Zarghami, "Solubility of amiodarone HCl in propylene glycol + ethanol, propylene glycol + water and their ternary solvent mixtures at 25 and 37° C, *Journal of Molecular Liquids* 186 (2013) 52-55.
- ²⁸ Frantisek Kopecky, Bozena Kopecka, Pavol Kaclik, "Solubility Study of Nimodipine Inclusion Complexation with α and β Cyclodextrin and some Substituted Cyclodextrins" *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 39 (2001) 215-217.
- ²⁹ Cuestas ML, Glisoni RJ, Mathet VL, Sosnik A, "'Lactosylated poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymers for potential active targeting: Synthesis and physicochemical and self-aggregation characterization", *J Nanopart Res* 15, Art. 1389 (2013).
- ³⁰ K. Holmberg, B. Jönsson, B. Kronberg, B. Lindman, "Surfactants and Polymers in Aqueous Solution", 2nd Edition, John Wiley and Sons, England 2003.
- ³¹ Raymond Chang, *Fisicoquímica*, 3ra Edición, McGraw- Hill Interamericana, México 2000.
- ³² Teresa Mourao, Ana Filipa M. Claudio, Isabel Boal-Palheiros, Mara G. Freire, Joao A.P. Coutinho, "Evaluation of the impact of phosphate salts on the formation of ionic-liquid-based aqueous biphasic systems", *J. Chem. Thermodynamics* 54 (2012) 398–405.
- ³³ Arpan V. Parmar, Anita Bahadur, Ketan Kuperkar, "Pratap Bahadur, PEO–PPO based star-block copolymer T904 as pH responsive nanocarriers for quercetin: Solubilization and release study", *European Polymer Journal* 49 (2013) 12–21.
- ³⁴ Jaime González-López, Carmen Álvarez-lorenzo, Pablo Taboada, Alejandro Sosnik, Isabel Sandez Macho, Angel Cocheiro, "Self-Associative Behavior and Drug-Solubilizing Ability of Poloxamine (Tetronic) Block Copolymers", *Langmuir* 24 (2008) 10688-10697.
- ³⁵ Gustavo A. Gotelli, Pablo Bonelli, Gustavo A. Abraham, Alejandro Sosnik, "Fast and Efficient Syntesis of High Molecular Weight Poly(epsilon-caprolactone) Diols by Microwave-Assisted Polymer Synthesis", *Journal Of Applied Polymer Science* 121 (2011) 1321-1329.
- ³⁶ Schwach, G., Vert, M., "In vitro and in vivo degradation of lactic acid-based interference screws used in cruciate ligament reconstruction", *Int J Biol Macromol* 25 (1999) 283-291.
- ³⁷ Marcela A. Moretton, Romina J. Glisoni, Diego A. Chiappettaa, Alejandro Sosnik, "Molecular implications in the nanoencapsulation of the anti-tuberculosis drug rifampicin within flower-like polymeric micelles", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 79 (2010) 467–479.
- ³⁸ Tania Betancourt, James D. Byrne, Nicole Sunaryo, Spencer W. Crowder, Meena Kadapakkam, Shefali Patel, Shelly Casciato, Lisa Brannon-Peppas, "PEGylation strategies for active targeting of PLA/PLGA nanoparticles" *Journal of Biomedical Materials Research Part A Volume 91A, Issue 1, (2009)263–276.*
- ³⁹ Alexander Laurentin, Christine A Edwards, "A microtiter modification of the anthrone-sulfuric acid colorimetric assay for glucose-based carbohydrates", *Analytical Biochemistry* 315, Issue 1, (2003) 143-145.
- ⁴⁰ Xin Wang, Olof Ramström, Mingdi Yan, "A photochemically initiated chemistry for coupling underivatizedcarbohydrates to gold nanoparticles", *J. Mater. Chem.*, 19 (2009) 8944-8949.
- ⁴¹ Jing Wang, Xueqing Xing, Xiaocui Fang, Chang Zhou, Feng Huang, Zhonghua Wu, Jizhong Lou, Wei Liang, "Cationic amphiphilic drugs self-assemble to the core–shell interface of PEGylated phospholipid micelles and stabilize micellar structure", *Phil. Trans. R. Soc. A* 371 (2013).
- ⁴² Andreza Ribeiro, Isabel Sandez-Macho, Matilde Casas, Susana Alvarez-Perez, Carmen Alvarez-Lorenzo, Angel Concheiroa, "Poloxamine micellar solubilization of -tocopherol for topical ocular treatment", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 103 (2013) 550– 557.

⁴³ Andreza Ribeiro, Alejandro Sosnik, Diego A. Chiappetta, Francisco Veiga, Angel Concheiro y Carmen Alvarez-Lorenzo, "Single and mixed poloxamine micelles as nanocarriers for solubilization and sustained release of ethoxzolamide for topical glaucoma therapy", J. R. Soc. Interface 9 (2012) 2059-2069.