

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS**



**SÍNTESIS DE COPOLÍMEROS EN BLOQUE ANFIFÍLICOS Y SU APLICACIÓN
EN LA FABRICACIÓN DE MICELAS PARA LA LIBERACIÓN
CONTROLADA DE ANFOTERICINA B**

IVONNE LORENA DIAZ ARIZA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

BOGOTÁ D.C.

2014

**SÍNTESIS DE COPOLÍMEROS EN BLOQUE ANFIFÍLICOS Y SU APLICACIÓN
EN LA FABRICACIÓN DE MICELAS PARA LA LIBERACIÓN
CONTROLADA DE ANFOTERICINA B**

IVONNE LORENA DIAZ ARIZA

TRABAJO DE GRADO

**Presentado como requisito parcial
para optar al título de Magíster en Ciencias Biológicas**

Tutor: León Darío Pérez Pérez Ph.D.

Cotutora: Claudia Marcela Parra Giraldo Ph.D.

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
BOGOTÁ D.C.**

2014

NOTA DE ADVERTENCIA

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia".

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de julio de 1946.

SÍNTESIS DE COPOLÍMEROS EN BLOQUE ANFIFÍLICOS Y SU APLICACIÓN
EN LA FABRICACIÓN DE MICELAS PARA LA LIBERACIÓN
CONTROLADA DE ANFOTERICINA B

IVONNE LORENA DIAZ ARIZA

APROBADO

León Darío Pérez Ph.D.

Tutor

Víctor Hugo Orozco Ph.D.

Jurado 1

Freimar Segura Sánchez Ph.D.

Jurado 2

Juan José Torrado Ph.D.

Jurado 3

**SÍNTESIS DE COPOLÍMEROS EN BLOQUE ANFIFÍLICOS Y SU APLICACIÓN
EN LA FABRICACIÓN DE MICELAS PARA LA LIBERACIÓN
CONTROLADA DE ANFOTERICINA B**

IVONNE LORENA DIAZ ARIZA

Concepción Puerta Bula Ph.D.
Decana Facultad de Ciencias

Manuel Franco Cortes M.D. Ph.D.
Director de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera extender un agradecimiento al director de este trabajo de maestría, el profesor León Darío Pérez, por su dedicación, paciencia, tiempo y sugerencias que llevaron a la culminación exitosa de esta etapa de mi vida profesional. A la profesora Claudia Marcela Parra, por su orientación y por compartir sus conocimientos en la última fase de este proyecto de investigación.

Agradezco a mis compañeros del grupo de investigación por su compañía durante estos dos años de estudio. A mi familia por su apoyo en la decisión de continuar mi formación académica y por cultivar valores como la responsabilidad y laboriosidad que han hecho que logre esta nueva meta.

Y principalmente a Dios por permitirme vivir esta experiencia llena nuevos de aprendizajes, conocimientos y amigos.

Muchas gracias a todas aquellas personas que de alguna manera han estado involucradas en este proceso.

TABLA DE CONTENIDO

	pág
1. RESUMEN	15
2. ABSTRACT	17
3. INTRODUCCIÓN	19
4. MARCO TEÓRICO	22
4.1 Copolímeros en bloque	22
4.2 Síntesis de copolímeros en bloque	22
4.2.1 Polimerización Radicalaria por Transferencia de Átomos	23
4.3 Autoensamble de los copolímeros en bloque anfífilicos	25
4.4 Encapsulación y liberación controlada de fármacos	28
4.5 Anfotericina B	30
4.5.1 Actividad antifúngica y hemolítica de la anfotericina B	31
4.6 Antecedentes	32
5. OBJETIVOS	36
5.1 Objetivo general	36
5.2 Objetivos específicos	36
6. METODOLOGÍA	37
6.1 Determinación de las condiciones de síntesis de los copolímeros PDMAEMA-<i>b</i>-PCL-<i>b</i>-PDMAEMA	37
6.2 Estudio del efecto de la estructura de los copolímeros sobre las propiedades coloidales de las micelas	40
6.3 Determinación del efecto de la estructura de los copolímeros sobre su capacidad de encapsular y liberar anfotericina B	42
6.4 Evaluación de la actividad hemolítica y antifúngica de la	44

anfotericina B encapsulada en micelas

7. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	47
7.1 <u>Determinación de las condiciones de síntesis de los copolímeros PDMAEMA-<i>b</i>-PCL-<i>b</i>-PDMAEMA</u>	47
7.1.1 <u>Síntesis del macroiniciador Br-PCL-Br</u>	47
7.1.2 <u>Síntesis de los copolímeros tribloque PDMAEMA-<i>b</i>-PCL-<i>b</i>-PDMAEMA por ATRP</u>	49
7.1.3 <u>Estudio de la cinética de la reacción de polimerización</u>	54
7.2 <u>Estudio del efecto de la estructura de los copolímeros sobre las propiedades coloidales de las micelas</u>	58
7.2.1 <u>Preparación y caracterización de las micelas de copolímeros en bloque</u>	58
7.2.2 <u>Determinación de la CMC de los copolímeros en bloque</u>	63
7.2.3 <u>Efecto del pH sobre el tamaño de las micelas y la CMC</u>	68
7.3 <u>Determinación del efecto de la estructura de los copolímeros sobre su capacidad de encapsular y liberar anfotericina B</u>	73
7.3.1 <u>Encapsulación de Anfotericina B en las micelas</u>	73
7.3.2 <u>Estado de agregación de la anfotericina B</u>	75
7.3.3 <u>Liberación <i>in vitro</i> de anfotericina B</u>	79
7.4 <u>Evaluación de la actividad hemolítica y antifúngica de la anfotericina B encapsulada en micelas</u>	82
7.4.1 <u>Actividad hemolítica de anfotericina B encapsulada en micelas frente a glóbulos rojos humanos</u>	82
7.4.2 <u>Actividad antifúngica <i>in vitro</i></u>	84

8. <u>CONCLUSIONES</u>	89
9. <u>PERSPECTIVAS Y APLICACIONES</u>	92
10. <u>ANEXOS</u>	93
11. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	95

ÍNDICE DE TABLAS

	pág
Tabla 1. Factores que afectan la encapsulación de fármacos	29
Tabla 2. Factores que afectan la liberación de fármacos	30
Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de la anfotericina B	31
Tabla 4. Características de los copolímeros tribloque PDMAEMA- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PDMAEMA	50
Tabla 5. Composiciones y porcentajes de conversión de DMAEMA en muestras de copolímeros de 2 KDa sintetizados a diferentes tiempos	55
Tabla 6. Composiciones y porcentajes de conversión de DMAEMA en muestras de copolímeros de 14 KDa sintetizados a diferentes tiempos	55
Tabla 7. Propiedades de las micelas de copolímeros tribloque PDMAEMA- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PDMAEMA	58
Tabla 8. Concentraciones micelares críticas de los copolímeros tribloque de PDMAEMA- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PDMAEMA	67
Tabla 9. Tamaños promedio de las micelas de (DMAEMA) ₁₉ - (CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₁₉ y (DMAEMA) ₅₄ -(CL) ₁₂₂ -(DMAEMA) ₅₄ en función del pH del medio	70
Tabla 10. Concentraciones micelares críticas de los copolímeros (DMAEMA) ₁₉ -(CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₁₉ y (DMAEMA) ₅₄ -(CL) ₁₂₂ - (DMAEMA) ₅₄ en función del pH del medio	72
Tabla 11. Eficiencia de encapsulación y contenido de anfotericina B en las micelas de PDMAEMA- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PDMAEMA	73
Tabla 12. Relación de la intensidad de las bandas I y IV (I/IV) del espectro UV para la determinación del estado de agregación relativo de anfB	78
Tabla 13. Halos de inhibición en mm producidos por anfB libre y encapsulada en micelas de PDMAEMA- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PDMAEMA	86

ÍNDICE DE FIGURAS

	pág
Figura 1. Esquema general de la polimerización radicalaria por transferencia de átomo para la obtención de copolímeros en bloque de PCL y PDMAEMA	24
Figura 2. Estructuras químicas de PCL y PDMAEMA	25
Figura 3. Representación esquemática del proceso de micelización	27
Figura 4. Método de nanoprecipitación para la preparación de micelas	28
Figura 5. Diseño experimental del trabajo de investigación	37
Figura 6. Espectro FTIR de PCL-diol y del macroiniciador PCL-dibromo de 2 KDa.	47
Figura 7. Espectro FTIR de PCL-diol y del macroiniciador PCL-dibromo de 14 KDa.	48
Figura 8. Espectro RMN ¹ H de PCL-diol y del macroiniciador PCL-dibromo de 2 KDa.	49
Figura 9. Espectro RMN ¹ H de PCL-diol y del macroiniciador PCL-dibromo de 14 KDa.	49
Figura 10. Espectro FTIR del copolímero tribloque PDMAEMA- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PDMAEMA	51
Figura 11. Espectro RMN ¹ H del copolímero tribloque PDMAEMA- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PDMAEMA	52
Figura 12. Espectro RMN ¹³ C APT del copolímero PDMAEMA- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PDMAEMA	53
Figura 13. Trazas de GPC de los copolímeros tribloque de PCL de 2KDa (A) y copolímeros tribloque de PCL de 14 KDa (B).	54
Figura 14. Gráfica de $\ln[M_0]/[M]$ en función del tiempo para la polimerización del DMAEMA con PCL de 2 KDa.	57
Figura 15. Gráfica de $\ln[M_0]/[M]$ en función del tiempo para la	57

polimerización del DMAEMA con PCL de 14 KDa.

Figura 16. Distribución del tamaño de las micelas de los copolímeros tribloque PDMAEMA- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PDMAEMA	59
Figura 17. Efecto de la composición de los copolímeros sobre el tamaño de las micelas	60
Figura 18. Efecto de la composición del copolímero sobre el potencial zeta	61
Figura 19. Imágenes AFM de las micelas de copolímeros en bloque (DMAEMA) ₃₉ -(CL) ₁₂₂ -(DMAEMA) ₃₉ .	61
Figura 20. Imágenes TEM de las micelas de PDMAEMA- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PDMAEMA	62
Figura 21. Factores que afectan el tamaño de las micelas en las micrografías TEM	63
Figura 22. Espectro de emisión del pireno (6×10^{-7} M) en presencia de diferentes concentraciones del copolímero (DMAEMA) ₃₉ -(CL) ₁₂₂ -(DMAEMA) ₃₉ .	65
Figura 23. Espectro de excitación del pireno (6×10^{-7} M) en presencia de diferentes concentraciones del copolímero (DMAEMA) ₂₈ -(CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₂₈ .	65
Figura 24. Relación de las intensidades de fluorescencia I_3/I_1 en función de la concentración del copolímero (DMAEMA) ₁₉ -(CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₁₉	66
Figura 25. Relación de las intensidades de fluorescencia I_3/I_1 en función de la concentración de los copolímeros de 2 KDa (A) y 14 KDa (B) a pH 5.0	67
Figura 26. Distribuciones de tamaño de las micelas de (DMAEMA) ₁₉ -(CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₁₉ y (DMAEMA) ₅₄ -(CL) ₁₂₂ -(DMAEMA) ₅₄ en función del pH.	69
Figura 27. Dependencia del tamaño de las partículas con el pH.	70
Figura 28. Efecto del estado de protonación de las cadenas de	71

PDMAEMA sobre el tamaño de las partículas	
Figura 29. I_3/I_1 vs concentración de los copolímeros (DMAEMA) ₁₉ -(CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₁₉ (A) y (DMAEMA) ₅₄ -(CL) ₁₂₂ -(DMAEMA) ₅₄ (B) a diferentes valores de pH	71
Figura 30. Dependencia de la CMC con el pH del medio	72
Figura 31. Eficiencia de encapsulación de anfB en función de la composición de los copolímeros	74
Figura 32. Espectros UV-Vis de absorción de anfB en DMSO y en PBS (+DMSO 1% v/v)	76
Figura 33. Espectros UV-Vis de absorción de anfB encapsulada en micelas de PMAEMA- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PDMAEMA 2 KDa (A) y 14 KDa (B)	76
Figura 34. Perfiles de liberación de anfB de las micelas de PDMAEMA- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PDMAEMA (PCL 2 KDa)	79
Figura 35. Perfiles de liberación de anfB de las micelas de PDMAEMA- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PDMAEMA (PCL 14 KDa)	80
Figura 36. Actividad hemolítica en función de la concentración de anfB encapsulada en micelas de PDMAEMA- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PDMAEMA	83
Figura 37. Fotografías de los halos de inhibición inducidos por diferentes concentraciones de anfB encapsulada y libre en tres especies de <i>Candida</i>	85
Figura 38. Porcentajes de inhibición comparativos entre la anfB libre y encapsulada en las diferentes muestras de micelas	87

ÍNDICE DE ANEXOS

	pág
Anexo 1. Espectros UV-Visible de las micelas cargadas con anfB	93
Anexo 2. Espectros UV-Visible de anfB liberada de las micelas de copolímeros en bloque	93

1. RESUMEN

La investigación realizada constó de tres fases, en la primera se sintetizaron copolímeros tribloque anfifílicos compuestos por segmentos hidrófilos de poli(N,N-dimetilaminoetil metacrilato) (PDMAEMA) unidos a un bloque central hidrófobo de policaprolactona (PCL), utilizando polimerización radicalaria por transferencia de átomo (ATRP) y empleando PCL di-bromo como macroiniciador. Se obtuvieron copolímeros del tipo $(DMAEMA)_{m-}(CL)_{m-}(DMAEMA)_n$ con diferentes relaciones volumétricas de los segmentos y grados de polimerización, variando parámetros de síntesis tales como el peso molecular del macroiniciador, el tiempo de reacción y las relaciones molares de los reactantes.

La caracterización estructural de los materiales obtenidos se llevó a cabo empleando espectroscopia infrarroja (FTIR), resonancia magnética nuclear (RMN¹H y ¹³C) y cromatografía de permeación en gel (GPC). De acuerdo con los resultados obtenidos, la reacción sigue una cinética de primer orden que es característica de las polimerizaciones radicalarias controladas; adicionalmente, los valores de dispersión del peso molecular para los copolímeros fueron cercanos a la unidad.

En la segunda fase, se estudió el efecto de la composición de los copolímeros y su grado de polimerización sobre las características coloidales de las micelas obtenidas a partir de su autoensamble en medio acuoso. Las micelas se prepararon por el método de nanoprecipitación, empleando diferentes valores de pH del medio acuoso (5.0, 6.0, 7.0 y 7.5). Los sistemas coloidales obtenidos se caracterizaron empleando dispersión dinámica de luz (DLS) para conocer el tamaño promedio de las partículas y su distribución, medidas de potencial zeta para determinar su estabilidad, microscopia de fuerza atómica (AFM) y microscopia electrónica de transmisión (TEM) para conocer su morfología. Asimismo, se determinó la concentración micelar crítica a través del método de

fluorescencia empleando pireno como molécula prueba. Dependiendo de la composición del copolímero y de las características del medio, se obtuvieron micelas esféricas con tamaños promedio entre 46 y 85 nm y valores de CMC entre 0,86 y 7,4 mg/L.

En la tercera fase, las micelas obtenidas se evaluaron en la encapsulación y liberación controlada de Anfotericina B (anfB). La encapsulación se llevó a cabo a través de la partición del fármaco en micelas preformadas, en donde las moléculas de anfB se distribuyeron tanto en los núcleos de las micelas como en la fase acuosa, lográndose porcentajes de encapsulación mayores al 45%. Asimismo, se realizó un estudio de la liberación del fármaco *in vitro* a través del método de diálisis, encontrando velocidades de difusión lentas. La cuantificación de anfB encapsulada y liberada se realizó empleando espectroscopia UV-Visible. Finalmente se realizaron pruebas biológicas preliminares *in vitro*, con el fin de determinar el efecto de la encapsulación y liberación controlada de anfB sobre su actividad antifúngica y hemolítica, evidenciando una reducción en la toxicidad, en términos de hemólisis, y manteniendo la acción antifúngica del fármaco.

2. ABSTRACT

In this research, amphiphilic triblock copolymers with two hydrophilic poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate) (PDMAEMA) segments attached to an inner hydrophobic poly(ϵ -caprolactone) (PCL) block were synthesized via atom transfer radical polymerization (ATRP), using Br-PCL-Br as macroinitiator. In order to obtain $(DMAEMA)_m-(CL)_n-(DMAEMA)_n$ copolymers with different degrees of polymerization and volume ratio of the components, synthesis parameters such as molecular weight of the macroinitiator, polymerization time and molar feed ratio were controlled. The structural characterization of these copolymers was carried out by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Nuclear Magnetic Resonance (C^{13} - H^1 NMR) and Gel Permeation Chromatography (GPC). The results demonstrated that the polymerization exhibits a first order kinetics; additionally, in all the cases, the molecular weight dispersity was close to one.

The effect of the composition of triblock copolymers on the colloidal properties of micelles obtained from self-assembly in aqueous media were studied. The micelles were prepared by nanoprecipitation method, using different pH values (5.0, 6.0, 7.0 and 7.5). The colloidal systems were characterized by dynamic light scattering (DLS) to determine their mean size, zeta potential measurements to assess their colloidal stability, and atomic force microscopy (AFM) and transmission electron microscopy (TEM) for characterizing morphological features. Also, critical micelle concentration was determined by fluorescence probe method. Depending on the copolymer composition, spherical micelles with mean sizes between 46 and 85 nm and CMC values between 0,86 y 7,4 mg/L were obtained.

The micelles ability to encapsulate and controlled release amphotericin B (amB) was evaluated. The encapsulation was carried out by a partitioning of the drug into preformed nanoparticles, through distribution of amB molecules into micelles core and aqueous phase, with loading efficiency achievements higher than 45%. Also,

an *in vitro* drug release study was conducted by dialysis method, finding slow release rates. The amount of amB encapsulated and released was measured by UV-Vis spectroscopy. Finally, preliminary *in vitro* studies were performed, allowing determining the effect of the encapsulation and controlled release of amB on its antifungal and hemolytic activity. The results showed that when encapsulated, the amB is less toxic and present similar antifungal activity as compared to free amB.

3. INTRODUCCIÓN

La química de polímeros ha impulsado la investigación hacia la síntesis de materiales que conduzcan a nuevas aplicaciones. Dentro de estos materiales, se destacan los copolímeros en bloque anfifílicos debido a sus propiedades de asociación que dan lugar a sistemas con múltiples aplicaciones en campos como la liberación controlada de fármacos y la terapia genética, entre otros (Alexandridis and Lindman 2000; Torchilin 2001). Los copolímeros en bloque anfifílicos tienen la capacidad de autoensamblarse en medios acuosos para formar micelas, las cuales poseen la estructura, estabilidad y tamaños adecuados para su aplicación como nano-contenedores de compuestos hidrofóbicos en la entrega de fármacos (Loh, Wu et al. 2008). Para esta aplicación, las micelas poliméricas ofrecen múltiples ventajas frente a otros sistemas, como estabilidad coloidal con una baja CMC, capacidad de protección de los fármacos, preservación de su actividad durante la circulación, menor toxicidad y efectos secundarios (Yoon and Jang 2010). Es importante tener en cuenta que las propiedades de las micelas dependen de características moleculares de los copolímeros como la estructura química de cada segmento y su longitud, así que es fundamental establecer el efecto de la estructura y composición de los copolímeros sobre las propiedades de los sistemas micelares para optimizar sus características en función de la aplicación escogida.

Los copolímeros basados en PCL y PDMAEMA han atraído mucho interés debido a sus características adecuadas para aplicaciones farmacéuticas y biomédicas. La PCL es un polímero hidrófobo, que se caracteriza por ser biocompatible, biodegradable, con permeabilidad favorable a los fármacos y es aprobado por la FDA, además, los sistemas micelares que forma tienen una mayor estabilidad y capacidad para la encapsulación de fármacos altamente hidrofóbicos (Sinha, Bansal et al. 2004; Nair and Laurencin 2007). Por otro lado, el PDMAEMA se caracteriza por su biocompatibilidad y sensibilidad al pH, es un polímero

constituido por grupos amino terciarios, los cuales pueden ganar protones bajo condiciones ácidas y liberarlos bajo condiciones básicas (Xu, Neoh et al. 2009).

De esta manera las micelas de PCL y PDMAEMA tienen potencial aplicación en la encapsulación y liberación controlada de principios activos con baja solubilidad en agua, como la Anfotericina B (anfB). La anfB es un antifúngico poliénico de naturaleza anfifílica; sus moléculas están compuestas de una región hidrofóbica constituida por cadenas hidrocarbonadas y una zona hidrofílica constituida por cadenas polihidroxiladas. Este antifúngico de origen natural es el fármaco de elección contra micosis sistémicas debido a que se une al ergosterol de las membranas de células fúngicas, induciendo cambios en su permeabilidad y provocando la muerte celular del hongo (Gallis, Drew et al. 1990; Groll and Walsh 2001). Aunque es un antibiótico de amplio espectro, presenta inconvenientes como baja solubilidad en agua, debido a la formación de agregados y efectos secundarios como nefrotoxicidad (Deray 2002). Por esta razón se ha buscado desarrollar formulaciones alternativas de anfB, como el uso de micelas de copolímeros en bloque anfifílicos para su encapsulación y liberación, con el fin de superar las limitaciones que presenta, como su baja solubilidad en medios acuosos y su alta toxicidad.

Con el fin de abordar estos problemas, se sintetizaron copolímeros tribloque anfifílicos de PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA vía ATRP con diferentes longitudes del segmento hidrófobo e hidrófilo, con el fin de obtener micelas a partir de su autoensamble en medio acuoso. En este trabajo, se presenta el proceso de síntesis y la caracterización química estructural de los copolímeros por FTIR, RMN y GPC, como también el proceso de obtención de las micelas y su caracterización fisicoquímica a través de diferentes técnicas como DLS, potencial Z, AFM, TEM y fluorescencia. Asimismo se estudió el efecto de la composición de los copolímeros y el pH del medio sobre propiedades micelares como el diámetro hidrodinámico y la CMC.

Se evaluó la aplicación de las micelas obtenidas como una formulación alternativa de anfotericina B, investigando el efecto de la composición del copolímero sobre la eficiencia de encapsulación y la velocidad de liberación. Finalmente se realizaron pruebas biológicas de actividad hemolítica y antifúngica *in vitro* para determinar el efecto de la encapsulación del fármaco sobre la lisis de glóbulos rojos humanos y la inhibición del crecimiento de tres levaduras del género *Candida*.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Copolímeros en bloque

Los copolímeros en bloque son sistemas macromoleculares que presentan bloques poliméricos de distinta composición química enlazados covalentemente. (Pasquali, Chiappetta et al. 2005). Este tipo de materiales puede presentarse en dos estados diferentes: un estado desordenado, en donde se presenta miscibilidad de los segmentos y uno ordenado, que se caracteriza por la segregación en la escala nanométrica. Para la mayoría de las aplicaciones, el estado segregado es el más conveniente puesto que se establecen nanodominios (Lynd, Meuler et al. 2008). Los parámetros que determinan que se presente nanosegregación de los segmentos del copolímero son la afinidad química entre los segmentos, su relación volumétrica, la temperatura y el grado de polimerización (Castelletto and Hamley 2004). Dentro de este tipo de sustancias, se encuentran los copolímeros en bloque anfifílicos que consisten en segmentos hidrófilos e hidrófobos unidos covalentemente; el segmento hidrófilo genera dominios que permiten el almacenamiento de agua y sustancias hidrosolubles, en tanto el segmento hidrófobo es afín con sustancias liposolubles (He, Kim et al. 2008).

4.2 Síntesis de copolímeros en bloque

Entre las estrategias que se pueden emplear para la síntesis de copolímeros en bloque, las polimerizaciones radicalarias vivientes son las más promisorias, ya que permiten la obtención de copolímeros con un peso molecular predeterminado y una distribución de peso molecular estrecha. Este tipo de polimerización se caracteriza por un comportamiento cinético de primer orden, debido a la contribución insignificante de reacciones de terminación, de modo que la concentración de las especies propagantes activas es constante. Otra característica es el grado de polimerización predeterminado, es decir, el peso molecular promedio en número (M_n) es una función lineal de la conversión del monómero; este resultado proviene de mantener un número constante de cadenas

durante la polimerización, lo que requiere que la iniciación sea lo suficientemente rápida para que todas las cadenas se estén propagando antes de que la reacción se detenga y requiere, asimismo, una ausencia de reacciones de transferencia de cadena (Matyjaszewski and Xia 2001).

Existen varios enfoques utilizados para controlar la polimerización radicalaria, todos ellos emplean un equilibrio dinámico entre la propagación de los radicales libres y algún tipo de especies latentes, lo cual se establece a través de pasos de activación y desactivación (Matyjaszewski 1998). Uno de estos enfoques es la Polimerización Radicalaria por Transferencia de Átomo (ATRP).

4.2.1 Polimerización radicalaria por transferencia de átomo ATRP

La polimerización radicalaria por transferencia de átomo es uno de los procesos de polimerización controlada más potente y versátil. Permite un control sobre el peso molecular y su distribución y es especialmente utilizado para la síntesis de polímeros con aplicaciones biomédicas (Coessens, Pintauer et al. 2001). Las reacciones de ATRP requieren la adición, o formación *in situ*, de cuatro componentes fundamentales: un iniciador con al menos un átomo o grupo transferible, que con frecuencia es un halógeno; un compuesto de un metal de transición que pueda someterse a una reacción redox de un electrón; un ligando que forme un complejo con el metal de transición para modificar la solubilidad y actividad del catalizador y uno o más monómeros que puedan ser polimerizados a través de radicales libres (Matyjaszewski, Gaynor et al. 1998). El oxígeno debe ser eliminado del medio de reacción, pero una cantidad limitada de oxígeno puede ser tolerada, en particular en presencia de un agente reductor (Matyjaszewski, Coca et al. 1998).

En ATRP, los radicales se generan a través de un proceso redox reversible catalizado por un complejo de metal de transición, el cual sufre oxidación con la abstracción de un átomo de halógeno de una de las especies latentes. Este

proceso se produce con constantes de velocidad de activación K_a y desactivación k_d . Tras la adición de los radicales intermediarios a monómeros, las cadenas de polímero crecen con una constante de velocidad de propagación k_p . También ocurren reacciones de terminación (k_t), principalmente a través de acoplamiento de radicales y desproporción, pero en un bajo porcentaje debido a que se mantiene una baja concentración de radicales propagantes y una alta concentración de las especies en reposo (Siegwart, Oh et al. 2012). El mecanismo a través del cual transcurre la polimerización por ATRP se muestra en la Figura 1, tomando como base el copolímero sintetizado en este estudio.

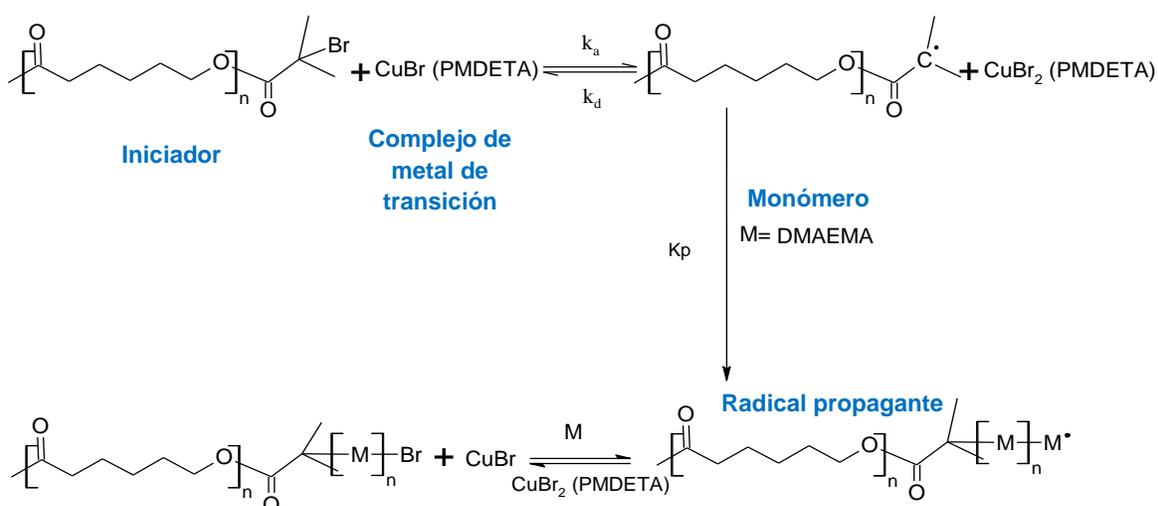


Figura 1. Esquema general de la polimerización radicalaria por transferencia de átomo para la obtención de copolímeros en bloque de PCL y PDMAEMA

El metal de transición más utilizado en ATRP es el cobre, pero también pueden emplearse metales como titanio, hierro, níquel, cobalto y paladio. Los ligandos que se utilizan son compuestos nitrogenados tipo amina e imina, que pueden ser bidentados, tridentados o tetradentados (Tang and Matyjaszewski 2006). Los iniciadores empleados son haluros de alquilo, siendo más reactivos los terciarios y aquellos que presentan grupos atrayentes de electrones (Braunecker and Matyjaszewski 2007).

En este estudio, se empleó policaprolactona-dibromo como macroiniciador; bromuro de cobre (I) (CuBr) como compuesto de metal de transición; N,N,N',N'',N''-pentametildietilentriamina (PMDETA) como ligando y 2-(dimetilamino)etil metacrilato (DMAEMA) como monómero, tal como se observa en la Figura 1. La PCL es un poliéster alifático hidrófobo que se caracteriza por ser biodegradable y biocompatible, asimismo presenta permeabilidad favorable a los fármacos y es aprobado por la FDA para aplicaciones biomédicas (Sinha, Bansal et al. 2004). Es soluble en cloroformo, diclorometano, benceno y tolueno e insoluble en alcohol, éter de petróleo y diétil éter. Por su parte, el PDMAEMA se caracteriza por ser biocompatible y sensible al pH; posee grupos amino terciarios que pueden ganar protones bajo condiciones ácidas y liberarlos bajo condiciones básicas. En medios acuosos de pH básico, se desprotona y asume un carácter hidrófobo, mientras que en medios de pH ácido, se somete a protonación para asumir una estructura hidrófila. Posee un pK_a entre 7.3 y 7.5. Es soluble en THF, cloroformo, tolueno y dioxano e insoluble en hexano, metanol y etanol (San Miguel, Limer et al. 2008; Xu, Neoh et al. 2009). Las estructuras químicas de los dos segmentos poliméricos son mostradas en la Figura 2.

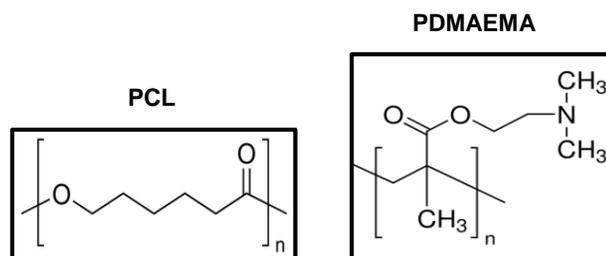


Figura 2. Estructuras químicas de PCL y PDMAEMA

4.3 Autoensamble de los copolímeros en bloque anfifílicos: Formación de micelas

Los copolímeros en bloque anfifílicos se autoensamblan en medios acuosos para formar partículas coloidales con estructuras core-shell y tamaños entre 10 y 100 nm, llamadas micelas (Kataoka, Harada et al. 2001). El autoensamble de estos copolímeros se debe a la diferente afinidad que presenta cada bloque con el

disolvente. Así, una micela consiste en un núcleo hidrófobo, capaz de encapsular principios activos insolubles en agua, rodeado por una corteza hidrófila, que asegura su solubilidad y biocompatibilidad (Yoon and Jang 2010). Estas nanopartículas presentan ventajas para su aplicación como sistemas en la entrega de fármacos, tales como tiempos de circulación prolongados debido a su tamaño y retención adecuada del principio activo debido a su estabilidad (Gaucher, Dufresne et al. 2005). Las propiedades físicas y químicas de las micelas son controladas a través de parámetros como el grado de polimerización, la composición molar de los bloques hidrófilo/hidrófobo y la estructura química de cada segmento (Letchford and Burt 2007; Li, Feng et al. 2012).

En soluciones diluidas, los copolímeros en bloque se encuentran como cadenas simples, pero cuando la concentración del copolímero alcanza el valor de concentración micelar crítica (CMC), las moléculas comienzan a asociarse para formar micelas (Gao and Eisenberg 1993). La CMC depende principalmente de la estructura química del polímero y la longitud de cada bloque. Asimismo, está relacionada con la estabilidad del sistema coloidal, valores de CMC bajos garantizan que la micela no se disuelve hasta alcanzar su blanco en sistemas *in vivo* (Tyrrell, Shen et al. 2010). Se ha demostrado que dicha estabilidad está relacionada con la longitud del segmento hidrofóbico del copolímero, a mayor longitud de este segmento se confiere una mayor estabilidad termodinámica a los sistemas micelares (Gaucher, Dufresne et al. 2005). Los valores de CMC pueden obtenerse usando diferentes técnicas como tensión superficial, dispersión de luz o medidas de fluorescencia (Loh 2002).

El mecanismo de formación de micelas, que se muestra en la Figura 3, incluye dos procesos fundamentales: primero, los unimeros se asocian rápidamente hasta que los agregados alcanzan un tamaño donde un mayor crecimiento aumentaría la energía libre; en el segundo proceso se alcanza un equilibrio termodinámico que incluye un cambio en el número de micelas, ya sea por intercambio de polímeros o

por fusión/fisión. De esta manera, las micelas son consideradas como sistemas dinámicos, en donde ocurre un intercambio de cadenas de polímero entre los agregados a determinadas velocidades (Nicolai, Colombani et al. 2010).

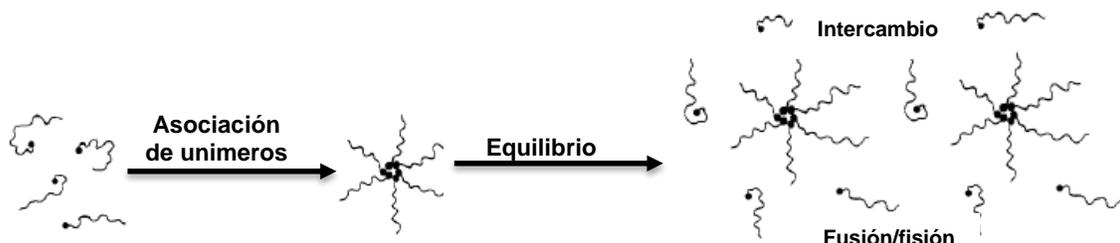


Figura 3. Representación esquemática del proceso de micelización

Los métodos utilizados para la formación de micelas dependen de la solubilidad del copolímero en bloque empleado. Si el copolímero es relativamente soluble en agua, se pueden emplear técnicas como disolución directa o disolución de película. En la disolución directa, el copolímero se agrega al medio acuoso a una concentración por encima de la CMC, mientras que en la disolución de película se utiliza una solución del copolímero en un solvente volátil, el cual se evapora para dejar una película en el fondo del recipiente, posteriormente un medio acuoso tibio se adiciona para disolver la película formada. Si el copolímero no es soluble en agua se pueden utilizar métodos como diálisis, emulsión de aceite en agua o nanoprecipitación. En diálisis, se emplea una solución del copolímero en un solvente orgánico miscible en agua, luego adiciona el medio acuoso y se dializa para remover el solvente. El método de emulsión consiste en la adición de una solución del copolímero en un solvente orgánico insoluble en agua a un medio acuoso bajo agitación rápida. Finalmente el método de nanoprecipitación, el cual es empleado en este estudio, se explica a través de la Figura 4 (Letchford and Burt 2007).

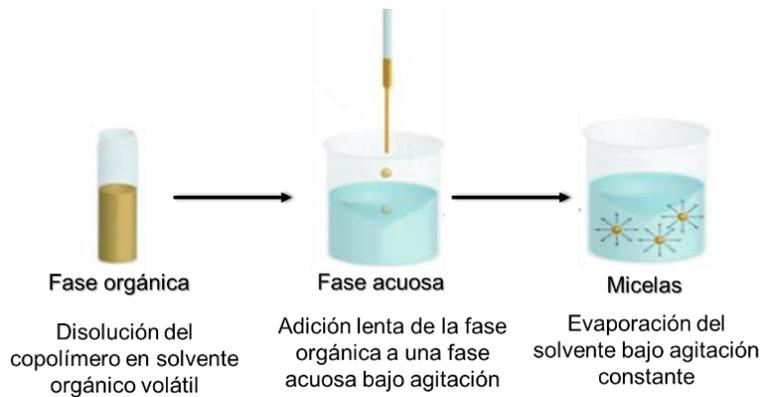


Figura 4. Método de nanoprecipitación para la preparación de micelas

4.4 Encapsulación y liberación controlada de fármacos

En la actualidad, una de las aplicaciones más relevantes de las micelas de copolímeros en bloque anfífilos es la encapsulación y liberación controlada de fármacos con baja solubilidad en medios acuosos; esto se debe a las múltiples ventajas que presentan como: fácil preparación, estabilidad coloidal con bajas CMC, distribución estrecha de tamaño, capacidad de protección de los fármacos, preservación de su actividad durante la circulación, mejoramiento de la farmacocinética y alta eficiencia de encapsulación sin modificación química del medicamento (Yoon and Jang 2010). Los requerimientos principales para el uso de micelas poliméricas como sistemas en la entrega de fármacos incluyen biocompatibilidad y biodegradabilidad, como también tamaños de partícula y valores de CMC bajos, relacionados con mayores periodos de circulación y estabilidad de las micelas al ser diluidas en fluidos biológicos (Kabanov and Alakhov 2000).

La encapsulación de sustancias hidrofóbicas se debe a que los núcleos micelares actúan como ambientes compatibles para las moléculas insolubles en agua (Riess 2003). Los factores que afectan la encapsulación de fármacos en las micelas se describen en la Tabla 1 (Xing and Mattice 1997; Aliabadi, Elhasi et al. 2007).

Tabla 1. Factores que afectan la encapsulación de fármacos

Factor	Descripción
Compatibilidad entre el núcleo micelar y el fármaco	Está relacionada con la miscibilidad entre el núcleo y el principio activo, controlando el contenido de fármaco en las micelas.
Longitud del bloque hidrofóbico	Afecta el contenido de fármaco en las micelas. Un mayor volumen del núcleo permite mayores niveles de encapsulación.
Cristalinidad del bloque hidrofóbico	Un incremento en la cristalinidad del núcleo afecta el contenido de fármaco disminuyendo su valor.
Concentración de polímero	Un incremento en la concentración de polímero aumenta el contenido de fármaco, existiendo una concentración en el que se logran los valores máximos posibles.

Los métodos de encapsulación más empleados incluyen diálisis, disolución de película y evaporación de solvente, todos ellos seguidos de pasos de purificación que incluyen centrifugación y liofilización. En diálisis, se utiliza una solución del polímero y el fármaco en un solvente orgánico miscible en agua, la cual se dializa contra un medio acuoso; por su parte en la disolución de película, el copolímero y el fármaco se disuelven en un solvente orgánico, el cual se evapora formando una película, la cual se disuelve posteriormente en agua caliente. El método de evaporación de solvente se emplea una solución del fármaco en un solvente orgánico miscible en agua el cual se adiciona a micelas, luego se remueve el solvente por evaporación (Tyrrell, Shen et al. 2010).

Los sistemas que utilizan micelas para la liberación controlada de medicamentos ofrecen ventajas como mayor eficacia, menor toxicidad y efectos secundarios y tienen como objetivo administrar el fármaco durante un tiempo determinado, manteniendo una concentración óptima en el sitio de acción. La liberación es controlada a través de diferentes mecanismos, como el uso de gradientes de

potencial osmótico a través de barreras semipermeables, difusión o erosión (Uhrich, Cannizzaro et al. 1999). Normalmente, el proceso de liberación se da en tres etapas que consisten en una salida inicial rápida, atribuida a la ubicación del fármaco tanto en el núcleo micelar como en la zona interfacial núcleo-corteza; un periodo de liberación lenta, que depende de la estructura molecular del copolímero y finalmente una liberación acelerada causada por erosión. Los factores que afectan la velocidad de liberación se describen en la Tabla 2 (Mansour, Sohn et al. 2010).

Tabla 2. Factores que afectan la velocidad de liberación de fármacos

Factor	Descripción
Tamaño de partícula	Al disminuir el tamaño se produce una liberación más rápida debido al incremento en el área de superficie.
Porosidad de las partículas	Una mayor porosidad induce a una velocidad de liberación más rápida debido al incremento en la entrada del medio de liberación a las partículas.
Características del polímero	La velocidad de liberación depende de la longitud de las cadenas del polímero y las interacciones entre el material y el fármaco.

4.5 Anfotericina B

La anfotericina B (anfB) es un antifúngico poliénico, producido a partir de cultivos de *Streptomyces nodosus*. Se caracteriza por ser insoluble en solución salina a pH normal y tener una vida media de eliminación larga por lo que se acumula en el hígado, pulmones y riñones (Vogelsinger, Weiler et al. 2006). A nivel químico, se caracteriza por su naturaleza anfótera, debido a la presencia del grupo carboxilo en el anillo principal y el grupo amino primario en el anillo de micosamina. Las propiedades fisicoquímicas de este fármaco se describen en la Tabla 3 (Taylor, Gilman et al. 1985).

hidrofílica (cadena polihidroxilada) que son importantes en su efecto antifúngico, ya que la parte hidrofóbica interactúa con las moléculas de ergosterol formando poros, mientras que la parte hidrofílica se ubica al interior de los poros, produciendo la salida de K^+ y Mg^{2+} , lo que causa acidificación al interior del hongo y la precipitación del citoplasma (Hamill 2013).

La acción permeabilizante de la anfB frente a células, tanto fúngicas como humanas, es el resultado de la alta afinidad de la zona poliénica del fármaco hacia los esteroides de las membranas. La afinidad hacia el ergosterol, presente en las membranas de células fúngicas, es mayor que hacia el colesterol de las células humanas, aunque la forma agregada del fármaco presenta una mayor actividad frente a estas últimas. La anfB forma con las moléculas de esteroles algunos complejos que se organizan en canales, los cuales provocan cambios en la permeabilidad de las membranas, induciendo la pérdida de algunos iones. Es por esta razón que la anfB, en su forma agregada, actúa sobre las membranas de eritrocitos humanos, causando la salida de K^+ e induciendo la hemólisis. (Baginski, Resat et al. 1997; Charbonneau, Fournier et al. 2001).

4.6 Antecedentes

Los copolímeros basados en PCL han atraído mucho interés debido a que son biocompatibles y biodegradables, por lo tanto, son candidatos ideales en la liberación controlada de medicamentos. A través de ATRP, se han preparado copolímeros en bloque anfífilos de PCL con poli(meta)acrilatos, incluyendo PDMAEMA (O'Reilly, Hawker et al. 2006). Mespouille, Degée y Dubois reportan la síntesis de un copolímero de injerto por ATRP entre un macromonómero preformado de PCL y DMAEMA como comonómero funcional, produciendo un material sensible al pH y a la temperatura (Mespouille, Degée et al. 2005). Yan y colaboradores sintetizaron copolímeros tribloque de etil celulosa-*g*-poli(N,N-dimetilaminoetil metacrilato)-*g*-policaprolactona (EC-*g*-PDMAEMA-*g*-PCL) por la combinación de polimerización por ruptura de anillo (ROP) y ATRP, estudiando su

autoensamble en la formación de micelas que podrían actuar como nanocontenedores en la liberación controlada de medicamentos (Yan, Yuan et al. 2009). La síntesis del copolímero tribloque de PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA es reportada por Motala-Timol y Jhurry, quienes utilizaron Br-PCL-Br como macroiniciador en la ATRP de DMAEMA produciendo copolímeros con PCL como bloque central y secuencias de PDMAEMA de diferentes longitudes (Motala-Timol and Jhurry 2007). Copolímeros dibloque de PDMAEMA-*b*-PCL se han sintetizado por Jakubowski utilizando una combinación de ROP y ATRP. En este método, 2-hidroxiethyl-2 bromoisobutirato, un iniciador con funcionalidad dual para ATRP y ROP, se utilizó para la polimerización de caprolactona en presencia de octanoato de estaño (II). El resultante PCL-Br se utilizó luego como macroiniciador en la ATRP de DMAEMA (Jakubowski, Lutz et al. 2005).

La PCL se ha convertido en uno de los polímeros hidrofóbicos más utilizados en la formación de micelas, debido a la gran estabilidad de los sistemas que forma y la mayor capacidad de encapsulamiento de sustancias hidrófobas, en comparación con polímeros como el óxido de polipropileno (Tyrrell, Shen et al. 2010). A través de diferentes técnicas de polimerización, se ha combinado con segmentos hidrófilos como polivinilpirrolidona (PVP), polietilenglicol (PEG), poli(N-isopropilacrilamida) (NIPAM), poliestireno (PS) y DMAEMA (Gaucher, Dufresne et al. 2005). Las micelas basadas en PCL se han utilizado para encapsular fármacos como doxorubicina, ciclosporina A, dihidrotestosterona, paclitaxel y amiodarona (Burt, Zhang et al. 1999; Shuai, Ai et al. 2004; Aliabadi, Elhasi et al. 2007). Loh y colaboradores estudiaron las características micelares de copolímeros anfífilicos de PCL y PNIPAM a través de técnicas como fluorescencia, dispersión dinámica de luz (DLS) y microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Loh, Wu et al. 2008). Lee y colaboradores reportan la obtención de micelas de copolímeros en bloque basadas en PCL para la encapsulación y liberación de fármacos como indometacina y taxol (Kim, Shin et al. 1998; Kim and Lee 2001).

El PDMAEMA se ha combinado con varios polímeros como polimetilmetacrilato (PMMA), poli(N,N-dietilaminoetil metacrilato) (PDEAEMA) y PCL, para formar estructuras micelares que responden a cambios en el pH del medio y que pueden solubilizar compuestos hidrofóbicos como dipiridamol. Asimismo las micelas que contienen PDMAEMA pueden ser utilizadas en terapia génica (Riess 2003). Lee y Gast estudiaron micelas de PDMAEMA-*b*-PDEAEMA por fluorescencia, DLS y dispersión de neutrones a ángulos pequeños (SANS) (Lee, Gast et al. 1999). Baines y colaboradores obtuvieron copolímeros en bloque de PDMAEMA-*b*-PMMA y evaluaron su comportamiento de autoensamble a diferentes valores de pH (Baines, Billingham et al. 1996). En la investigación realizada por Liu se estudió la síntesis de copolímeros tribloque de PEO-*b*-PDMAEMA-*b*-PDEAEMA y su proceso de micelización mostrando la dependencia de la morfología y el tamaño de las micelas con el pH (Liu, Weaver et al. 2002).

Zhang y He sintetizaron copolímeros tribloque de mPEG-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA por ATRP, estudiando el comportamiento de su autoensamble y la liberación *in vitro* de naproxeno (Zhang, He et al. 2010). Zhu y colaboradores reportan la síntesis de copolímeros tribloque de PCL y PDMAEMA por RAFT y su aplicación en la obtención de micelas para la entrega de ARNs y paclitaxel en células cancerosas. Los copolímeros se agregaron a una concentración mínima de 15,8 a 24 mg/L, dependiendo de su composición (Zhu, Jung et al. 2010). Guo y colaboradores obtuvieron nanopartículas de mPEG-*b*-(PCL-*g*-PDMAEMA) y estudiaron su aplicación en terapia génica (Guo, Huang et al. 2011). Bougard investigó el autoensamble de copolímeros dibloque de PCL-*b*-PDMAEMA en soluciones acuosas y en depósitos sólidos finos y su caracterización a través de técnicas como RMN¹H, DLS y microscopía de fuerza atómica (AFM) (Bougard, Jeusette et al. 2007). San Miguel y Limer reportan la síntesis de copolímeros tribloque de PCL y PDMAEMA por ATRP para la formación de micelas. Los valores de CMC de los copolímeros sintetizados estuvieron en el rango de 0,11 a 1,01 g/L. Para evaluar las propiedades de liberación controlada de los agregados de copolímero se utilizó

clorambucil, un medicamento contra el cáncer con muy baja solubilidad en agua. (San Miguel, Limer et al. 2008).

La utilización de micelas poliméricas para la encapsulación y liberación controlada de Anfotericina B ha sido investigada por varios grupos, debido a las limitaciones que presenta este antifúngico en cuanto a su solubilidad y toxicidad. Adams y Kwong reportaron el uso de poli(óxido de etileno)-*b*-poli acil-(N-hexil-l-aspartamida) (PEO-*b*-p(N-HA)) para encapsular anfotericina B y reportan una menor actividad hemotóxica relacionada con una menor agregación de esta sustancia (Adams and Kwon 2003). Zhang y colaboradores reportan el uso de copolímeros tribloque basados en óxido de polipropileno y óxido de polietileno encontrando un porcentaje de encapsulamiento del 87% (Zhang, Zhu et al. 2009). En las investigaciones realizadas por Lavasanifar se estudió el efecto de la sustitución de ácido esteárico en copolímeros de poli(óxido de etileno)-*b*-poli(N-hexil-estearato L-aspartamide) (PEO-*b*-PHSA) sobre la encapsulación y actividad antifúngica de la anfB, demostrando que un incremento en la sustitución de ácido graso mejora la encapsulación del fármaco, sin interferir en su actividad antifúngica. Asimismo comparó los métodos de encapsulación de diálisis y evaporación de solvente, encontrando que este último es más eficaz, puesto que produce mayores porcentajes de encapsulación y menor actividad hemolítica (Lavanifar, Samuel et al. 2001; Lavasanifar, Samuel et al. 2002).

Wang y Hsiue investigaron la obtención de micelas a partir de poli(2-etil-2-oxazolona)-*b*-poli(ácido aspártico) (PEOz-*b*-PAsp) y su aplicación en la encapsulación de anfB, encontrando que estos sistemas aumentan la solubilidad y potencia del fármaco y presentan una menor toxicidad que el antibiótico fungizon (Wang, Wang et al. 2009). Vandermeulen y colaboradores reportaron el uso de micelas basadas en poli(etilenglicol)-*b*-poli(caprolactona-co-trimetilencarbonato) (PEG-p(CL-co-TMC)), encontrando que las micelas incrementan la solubilidad de esta sustancia y disminuyen su citotoxicidad (Vandermeulen, Rouxhet et al. 2006).

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer las condiciones experimentales requeridas para la síntesis de copolímeros en bloque anfifílicos de poli(ϵ -caprolactona) y poli(N,N-dimetilaminoetil metacrilato) empleando polimerización radicalaria por transferencia de átomo y evaluar su aplicación en la obtención de micelas para la liberación controlada de Anfotericina B.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Determinar las condiciones para la obtención de copolímeros tribloque de PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA a través del método de polimerización radicalaria por transferencia de átomo.
- II. Evaluar el efecto de la estructura de los copolímeros sobre las propiedades coloidales de los sistemas micelares obtenidos a partir de su autoensamble.
- III. Determinar el efecto de la estructura de los copolímeros sobre su capacidad de encapsular y liberar anfotericina B.
- IV. Evaluar la actividad antifúngica y hemolítica de la anfotericina B encapsulada en micelas.

6. METODOLOGÍA

La investigación realizada constó de cuatro etapas fundamentales: la primera, consistió en la determinación de las condiciones para la síntesis de los copolímeros en bloque anfífilos de PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA vía ATRP; en la segunda, se estudió el efecto de la estructura de los copolímeros sobre las propiedades coloidales de las micelas obtenidas a partir de su autoensamble; en la tercera etapa, se determinó el efecto de la estructura de los copolímeros sobre su capacidad de encapsular y liberar anfotericina B y en la cuarta etapa, se evaluó la actividad hemolítica y antifúngica de las micelas cargadas con anfotericina B. El diseño experimental de este estudio se muestra en la Figura 5.

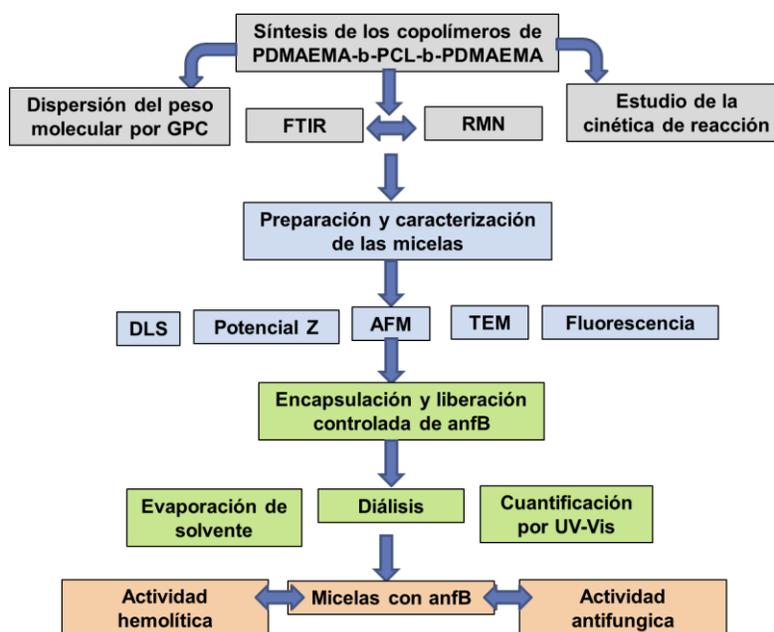


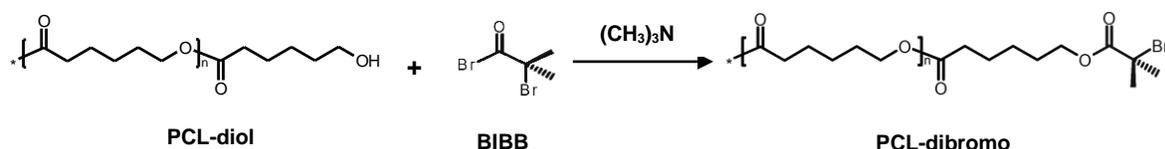
Figura 5. Diseño experimental del trabajo de investigación

6.1 Determinación de las condiciones de síntesis de los copolímeros PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA

En esta etapa se sintetizaron copolímeros tribloque anfífilos de PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA vía ATRP, empleando PCL-dibromo como macroiniciador.

6.1.1 Síntesis del macroiniciador Br-PCL-Br

En un balón de fondo redondo equipado con un agitador magnético, se disolvió PCL ($M_n = 2000$ g/mol, 14000 g/mol) (5 mmol, 0,71 mmol) en 50 mL de diclorometano, luego se adicionó una cantidad en exceso de trietilamina (50 mmol, 7,1 mmol). La reacción resultante se enfrió en un baño de hielo manteniendo una temperatura de 0 a 10°C y se adicionó, gota a gota, una cantidad en exceso de 2-bromo isobutiril bromuro (BIBB) (50 mmol, 7,1 mmol). Luego de la adición, la reacción se dejó proceder a temperatura ambiente por 24 horas con agitación constante (Dayananda, Pi et al. 2007). La solución resultante se redisolvió en tetrahidrofurano (THF) y se precipitó con un exceso de éter etílico/metanol (80:20 v/v), en el caso de la PCL de 2000 g/mol, y con un exceso de metanol, en el caso de la PCL de 14000 g/mol, luego se filtró y se secó al vacío. Este proceso se repitió tres veces más. El macroiniciador obtenido se analizó por FTIR y RMN¹H para corroborar la inserción del BIBB en las cadenas de PCL.



6.1.2 Síntesis de los copolímeros tribloque PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA por ATRP

Inicialmente, se purificó el monómero DMAEMA haciéndolo pasar por una columna corta de alúmina básica antes de su uso. Los copolímeros tribloque de PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA se sintetizaron utilizando diferentes relaciones molares de los reactivos (1:108:1:2; 1:40:1:2 y 1:215:1:2 de Br-PCL-Br:DMAEMA:CuBr:PMDTA). Las reacciones se llevaron a cabo disolviendo en un tubo Schlenk Br-PCL-Br ($M_n = 2000$ g/mol y 14000 g/mol) DMAEMA y PMDTA en anisol. Luego de la completa disolución de los reactivos, se burbujeó Argón sobre la mezcla durante 10 minutos. Posteriormente, la reacción se desgasificó a través de 3 ciclos de congelación-bombeo-descongelación. Se adicionó Cu(I)Br bajo

un flujo de 0.8 mL/min empleando una columna HR 4E. Para obtener la curva de calibración relativa se utilizaron estándares de poliestireno.

6.2 Estudio del efecto de la estructura de los copolímeros sobre las propiedades coloidales de las micelas

En esta etapa, se prepararon micelas a diferentes valores de pH a partir del autoensamble en medio acuoso de los copolímeros sintetizados, empleando el método de nanoprecipitación (Rao and Geckeler 2011) y se estudiaron sus propiedades coloidales a través de diferentes técnicas de análisis.

6.2.1 Preparación de las micelas de copolímeros en bloque

Las micelas se prepararon disolviendo 20 mg del copolímero en 2,5 mL de acetona. En un vaso de precipitados, se colocaron 5 mL de buffer pH 5.0, 6.0, 7.0 o 7.5 (acetato de sodio 0,1 M, citrato de sodio 0,1 M, fosfato de sodio 0,1 M, respectivamente) y se adicionó, gota a gota, la solución del copolímero a temperatura ambiente bajo agitación constante (1000 rpm). La solución resultante se dejó bajo agitación por 24 horas para remover la acetona. Los sistemas coloidales obtenidos se caracterizaron empleando dispersión dinámica de luz para conocer el tamaño promedio de las partículas y su distribución, medidas de potencial zeta para determinar su estabilidad, microscopia electrónica de transmisión y microscopia de fuerza atómica para conocer su morfología.

6.2.2 Determinación de la CMC de los copolímeros en bloque

La concentración micelar crítica de los copolímeros sintetizados se determinó a diferentes valores de pH por el método de fluorescencia, empleando pireno como molécula prueba (Maiti, Chatterji et al. 2001; Shim, Kim et al. 2006). Para esto, se preparó una solución stock de pireno disolviendo 20 mg de pireno en THF y adicionando esta solución a 100 mL de buffer (pH 5.0, 6.0, 7.0 y 7.5). La solución resultante se dejó en agitación por 4 horas a 40°C para evaporar el THF. Luego, se tomó 151 μ L de la solución stock y se llevó a un volumen de 10 mL con buffer,

obteniendo una concentración de $1,5 \times 10^{-5}$ M. Asimismo, se obtuvieron dispersiones micelares de 4 mg/mL. A partir de estas, se prepararon 15 diluciones desde 3,8 mg/mL hasta 8×10^{-6} mg/mL, las cuales contenían una concentración final de pireno de 6×10^{-7} M. Para cada una de las diluciones se registró el espectro de emisión y de excitación del pireno.

6.2.3 Caracterización de las micelas de copolímeros en bloque

6.2.3.1 Dispersión dinámica de luz (DLS): Las medidas del diámetro hidrodinámico promedio de las micelas y su distribución se realizaron en un equipo Horiba LB550 a 25°C con disoluciones acuosas de las muestras a diferentes valores de pH.

6.2.3.2 Potencial zeta: Las medidas de potencial zeta se realizaron a pH 5.0 en un equipo Malvern modelo Zetasizer Nano ZS. El potencial zeta se determinó seis veces para cada muestra a temperatura ambiente.

6.2.3.3 Microscopia de fuerza atómica (AFM): La morfología de las micelas fue observada a través de un microscopio Asylum Research MFP-3D-BIO. Las muestras se prepararon depositando una gota de una dispersión de micelas de 1 mg/mL sobre una superficie de mica, la cual se dejó secar a temperatura ambiente.

6.2.3.4 Microscopia electrónica de transmisión (TEM): La morfología y tamaño de las micelas en estado seco fue observada empleando un microscopio Jeol 1400 plus. Las muestras fueron preparadas depositando 2 μ L de una dispersión acuosa de los copolímeros (0,1 mg/mL) sobre rejillas de cobre recubiertas de película Formvar, las cuales se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas antes de la visualización.

6.2.3.5 Medidas de fluorescencia: La CMC se determinó utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse. El espectro de emisión del pireno fue registrado desde 360 nm hasta 460 nm a una longitud de onda de excitación de 339 nm. El espectro de excitación fue monitoreado a una longitud de onda de emisión de 390 nm desde 300 nm hasta 360 nm. La CMC se determinó

graficando la relación entre I_{335} e I_{332} en función del logaritmo de la concentración del copolímero.

6.3 Determinación del efecto de la estructura de los copolímeros sobre su capacidad de encapsular y liberar anfotericina B

En esta etapa, se realizó la encapsulación de Anfotericina B en las micelas obtenidas utilizando el método de evaporación de solvente (Tyrrell, Shen et al. 2010). Asimismo se estudió la liberación del fármaco *in vitro* a través del método de diálisis (Wang, Wang et al. 2009; Zhang, Zhu et al. 2009). Estos experimentos se realizaron por triplicado.

6.3.1 Encapsulación de Anfotericina B en las micelas

Inicialmente se prepararon micelas de 4 mg/mL de acuerdo a la metodología descrita anteriormente. En otro recipiente, se disolvieron 2 mg de anfotericina B (anfB) en 2 mL de metanol; esta solución se goteó lentamente (0,1 mL cada 10 minutos) en 10 mL de las correspondientes dispersiones micelares previamente preparadas (contenido de copolímero: 40 mg). La solución resultante se agitó suavemente durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se evaporó el metanol a presión reducida. Posteriormente, se procedió a centrifugar la mezcla obtenida a 5000 rpm durante 15 minutos para separar la anfB sin encapsular. Finalmente las muestras se liofilizaron y se almacenaron para su posterior uso. La cantidad de anfB encapsulada se determinó empleando espectroscopia UV-visible.

6.3.2 Estado de agregación de la anfotericina B

Para determinar el estado de agregación de anfB en las micelas de copolímero en bloque, se preparó una solución de anfB en dimetil sulfóxido (DMSO) y en buffer fosfato salino (PBS) pH 7.4 a una concentración de 10 ppm (la solución en PBS tuvo una concentración final de DMSO del 1% en volumen). Asimismo se obtuvieron dispersiones de 10 ppm de las diferentes muestras de micelas cargadas con anfB. Posteriormente se registraron los espectros UV-Visible de las

muestras desde 300 nm hasta 450 nm en un espectrofotómetro Varian Cary 100. La relación de la absorbancia del primer pico (I) y cuarto pico (IV) del espectro UV-Vis se usó para monitorear el estado de agregación de esta sustancia (Adams and Kwon 2003).

6.3.3 Liberación *in vitro* de Anfotericina B

Para el estudio de la liberación de anfB *in vitro* se emplearon membranas de diálisis (MWCO de 12000 Da), las cuales se activaron poniéndolas en una solución de EDTA 5 mM y NaHCO₃ 200 mM en ebullición por 5 minutos y posteriormente lavándolas con agua desionizada; este procedimiento se realizó dos veces. 4 mL de las dispersiones micelares cargadas con anfB se colocaron dentro de las membranas de diálisis y se dispusieron en 40 mL de PBS pH 7.4, a una temperatura de 37°C bajo agitación constante (100 rpm). A intervalos de tiempo específicos (1, 2, 4, 6, 8, 24, 48, 96, 166 h), se extrajeron 2 mL del medio de liberación para el análisis de concentración de fármaco por UV-Visible, el volumen del buffer se mantuvo constante, reemplazando la cantidad tomada a cada uno de los tiempos por buffer fresco.

6.3.4 Cuantificación de Anfotericina B encapsulada y liberada por espectroscopia UV-Visible

Las medidas de absorbancia de las muestras se realizaron en un espectrofotómetro Varian Cary 100. Para la cuantificación de anfB encapsulada, inicialmente se realizó una curva de calibración con soluciones de anfB en N,N-dimetilformamida (DMF) y buffer pH 5.0 (1:1 vol) desde 5 hasta 50 ppm. Se tomaron alícuotas de 300 µL de las muestras y se disolvieron en la misma cantidad de DMF, posteriormente, se registraron los espectros UV-Vis desde 300 nm hasta 450 nm; la concentración de anfB fue evaluada a 411 nm. Finalmente se determinó el contenido de fármaco y la eficiencia de encapsulación, empleando las siguientes fórmulas (Zhang, He et al. 2010):

$$\text{Eficiencia de encapsulación} = \frac{\text{Cantidad de anfB en las micelas}}{\text{Cantidad de anfB usada en la preparación}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Contenido de fármaco} = \frac{\text{Cantidad de anfB en las micelas}}{\text{Cantidad de copolímero usada en la preparación}} \times 100 \quad (2)$$

Para la cuantificación de anfB liberada, inicialmente se realizó una curva de calibración con soluciones de anfB en PBS pH 7.4 desde 0,1 hasta 2 ppm. Se tomaron alícuotas de las muestras extraídas en los diferentes tiempos (300 μ L) y se registraron los espectros UV-Vis. Se evaluó la concentración de anfB liberada a 411 nm, la cual se expresó en μ g/L.

6.4 Evaluación de la actividad hemolítica y antifúngica de la anfotericina B encapsulada en micelas

En esta etapa, se determinó el efecto de la encapsulación de anfB en micelas sobre la actividad hemolítica y antifúngica de éste fármaco (Lavasanifar, Samuel et al. 2002; Shim, Lee et al. 2011).

6.4.1 Actividad hemolítica de anfotericina B encapsulada frente a glóbulos rojos humanos

Se recolectó sangre humana, la cual se diluyó en PBS (pH 7.4) y se centrifugó a 2000 rpm, removiéndose posteriormente el sobrenadante y la capa leucocitaria. Los glóbulos rojos (GR) se diluyeron en PBS hasta obtener una muestra con una absorbancia entre 0,4 y 0,5. Se prepararon dispersiones de micelas cargadas con anfB de 5, 10, 15, 20 y 25 ppm de las diferentes muestras, asimismo se prepararon controles positivos con anfB libre en PBS de las mismas concentraciones y un control negativo sin anfB. Estas dispersiones se incubaron con la muestra diluida de GR a 37°C por 30 minutos y luego se pusieron en un baño de hielo para parar la hemólisis. Los glóbulos rojos sin lisar se removieron por centrifugación a 14000 rpm durante 20 segundos. Posteriormente se analizó la

hemoglobina en el sobrenadante a 576 nm por espectroscopia UV-Visible. El porcentaje de hemólisis se determinó empleando la siguiente fórmula (Lavasanifar, Samuel et al. 2002):

$$\text{Porcentaje de hemólisis} = \frac{100 (\text{Abs} - \text{Abs}_0)}{(\text{Abs}_{100} - \text{Abs}_0)} \quad (3)$$

Donde, Abs corresponde a la absorbancia de la muestra, Abs₀ es la absorbancia del control sin anfB y Abs₁₀₀ es la absorbancia del control en presencia de 20 ppm de anfB libre en PBS.

6.4.2 Actividad antifúngica *in vitro*

La actividad antifúngica de la anfB libre y encapsulada en micelas se evaluó frente a tres especies de levaduras del género *Candida*: *Candida albicans*, *Candida Krusei* y *Candida glabrata*. Los inóculos se prepararon sembrando con un asa estéril colonias de cada una de las levaduras, seguida de 24 horas de incubación en cajas Petri con agar de Sabouraud dextrosa. Luego de las 24 horas, las levaduras se resuspendieron en tubo con solución salina, ajustándolas a una densidad óptica 0,5 McFarland (concentración aproximada de 1x10⁶ - 5x10⁶ UFC/mL). Para la identificación de las levaduras se utilizó CHROMagar candida.

La determinación de la sensibilidad a la anfB se llevó a cabo empleando el método de difusión en pozos (Rojas, García et al. 2005; Luján and Pérez Corral 2008). Para ello, se prepararon dispersiones de anfB encapsulada en micelas de 90, 9, 0.9 y 0.09 µg/mL utilizando como disolvente PBS pH 7.4, asimismo se prepararon soluciones de anfB libre, disolviendo el fármaco en DMSO y diluyendo con PBS hasta obtener las mismas concentraciones (el nivel de DMSO en la solución final fue <1% v/v). Se tomaron cajas Petri con agar Mueller Hinton y se inocularon con un escobillón humedecido con la suspensión 0,5 McFarland de levaduras, se realizaron pozos de 5 mm de diámetro sobre el agar de forma equidistante (7

pozos por cada caja Petri), los cuales se llenaron con 50 μ L de las dispersiones de anfB y se incubaron a 37°C por 24 horas. Posteriormente se midieron los halos de inhibición de la anfB encapsulada y se compararon con los de la anfB libre.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Determinación de las condiciones de síntesis de los copolímeros PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA

7.1.1 Síntesis del macroiniciador Br-PCL-Br

Se realizó la síntesis de los macroiniciadores de PCL-dibromo por medio de la reacción entre PCL-diol comercial (2000 y 14000 g/mol) y BIBB. El rendimiento de la reacción, determinado gravimétricamente, fue del 74% y 76%, respectivamente. Los macroiniciadores obtenidos se analizaron por espectroscopia FTIR y RMN¹H para corroborar la inserción del BIBB en las cadenas del polímero. En las figuras 6 y 7, se muestran los espectros FTIR de la PCL-diol comercial y de la PCL-dibromo de 2000 y 14000 g/mol; en estos espectros se observan las bandas debidas a los grupos funcionales de esta sustancia: grupo metileno CH₂ (2940-2860 cm⁻¹), grupo carbonilo C=O (hacia 1720 cm⁻¹) y grupo C–O–C de éster (1300-1100 cm⁻¹), pero en los espectros de los macroiniciadores se observa la desaparición de la banda de estiramiento del grupo hidroxilo hacia 3400 cm⁻¹, debido a la reacción de acilación.

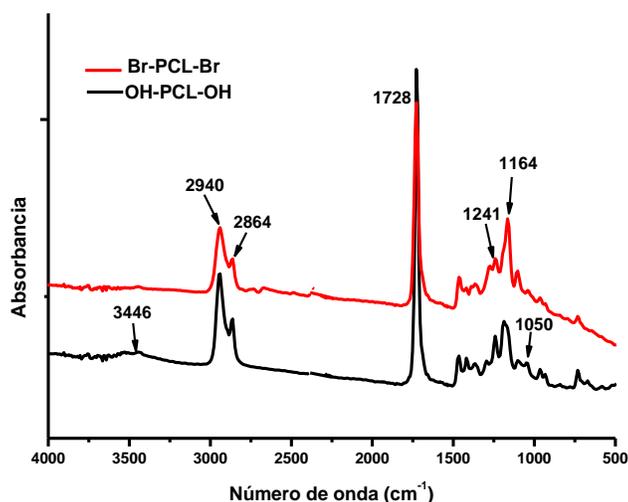


Figura 6. Espectro FTIR de PCL-diol y del macroiniciador PCL-dibromo de 2 KDa.

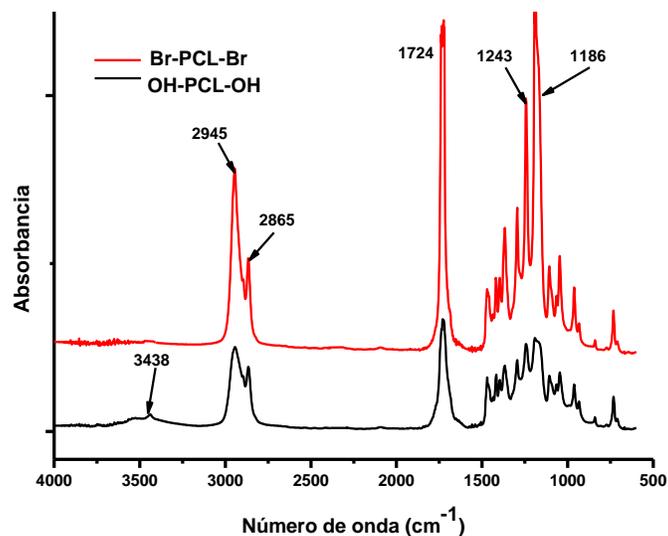


Figura 7. Espectro FTIR de PCL-diol y del macroiniciador PCL-dibromo de 14 KDa.

La funcionalización de la PCL con el BIBB se corroboró por medio de los espectros de RMN¹H mostrados en las Figuras 8 y 9; en ellos, se pueden observar las señales debidas a los protones de los grupos metileno de la PCL ($\delta \sim 1,4$ ppm, 1,6 ppm, 2,3 ppm y 4.1 ppm). Los espectros de los macroiniciadores indican el desplazamiento a campo bajo del hidroximetileno de la PCL-diol comercial desde 3,6 ppm hasta 4,1 ppm, además muestran la aparición de un singlete agudo a 1,94 ppm, que corresponde a la señal causada por los dos grupos metilo adyacentes al átomo de bromo, tal como se ha reportado previamente por otros autores (Dayananda, Pi et al. 2007; Motala-Timol and Jhurry 2007; Loh, Wu et al. 2008). A partir de estos espectros, se determinó el grado de acilación de la PCL a través de la integración de la señal en 1,4 ppm, correspondiente a los protones de uno de los grupos metileno de la PCL, y la señal en 1,94 ppm, correspondiente a los protones metilénicos del grupo 2-bromoisobutiril (Loh, Wu et al. 2008). El grado de acilación para la PCL en ambos casos fue superior al 80%.

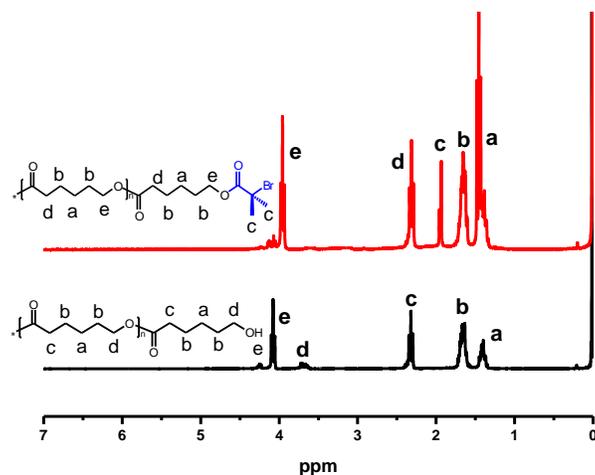


Figura 8. Espectro RMN¹H de PCL-diol y del macroiniciador PCL-dibromo de 2 KDa.

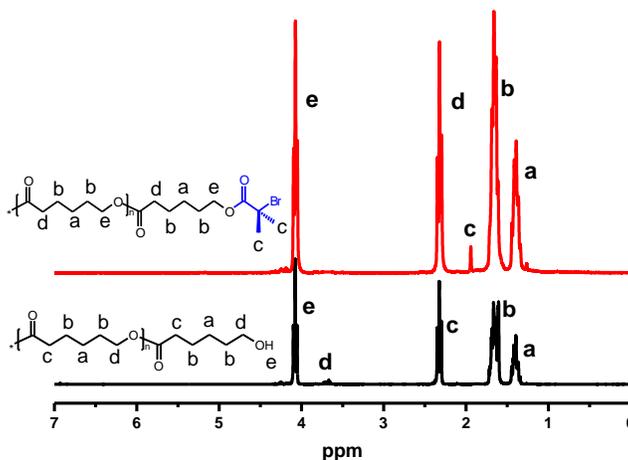
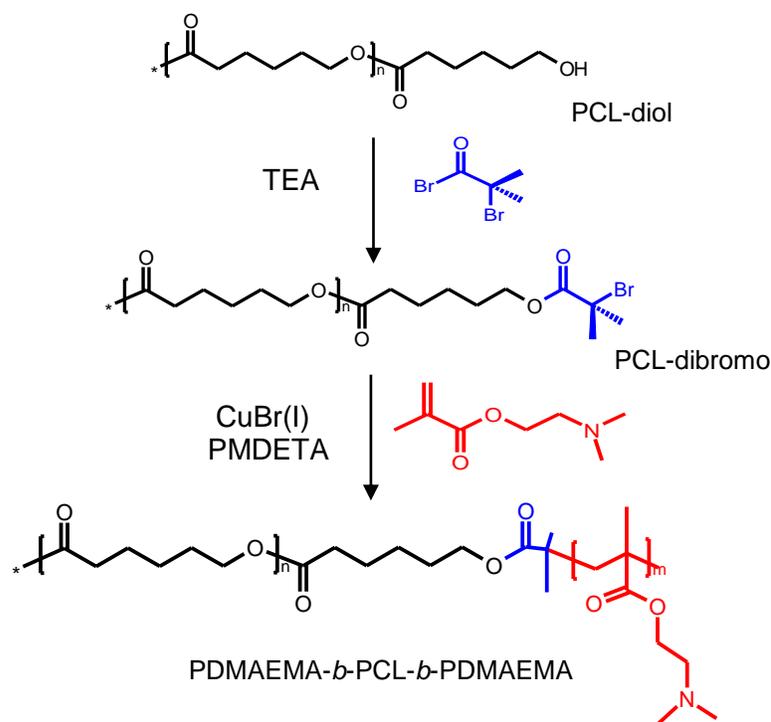


Figura 9. Espectro RMN¹H de PCL-diol y del macroiniciador PCL-dibromo de 14 KDa.

7.1.2 Síntesis de los copolímeros tribloque PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA por ATRP

Los copolímeros tribloque anfífilicos PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA se sintetizaron vía ATRP utilizando PCL-dibromo como macroiniciador y CuBr/PMDETA como sistema catalítico, tal como se observa en la ruta de síntesis presentada en el Esquema 1. Se obtuvieron copolímeros del tipo (DMAEMA)_{*n*}-(CL)_{*m*}-(DMAEMA)_{*n*} con diferentes grados de polimerización, manipulando parámetros de síntesis tales como el peso molecular del macroiniciador, el tiempo de reacción y las relaciones molares de los reactantes. Las composiciones, pesos

moleculares e índices de polidispersidad de los copolímeros sintetizados se resumen en la Tabla 4.



Esquema 1. Ruta general de síntesis del copolímero tribloque PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA.

Tabla 4. Características de los copolímeros tribloque PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA.

Relación molar ^a	Tiempo (h)	Composición del copolímero	M_n^b	M_w/M_n^c
1:40:1:2	21	(DMAEMA) ₁₁ -(CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₁₁	5,4	1,69
1:108:1:2	1	(DMAEMA) ₁₉ -(CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₁₉	7,9	1,09
1:108:1:2	6	(DMAEMA) ₂₈ -(CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₂₈	10,7	1,57
1:108:1:2	1	(DMAEMA) ₃₉ -(CL) ₁₂₂ -(DMAEMA) ₃₉	26,2	1,17
1:108:1:2	12	(DMAEMA) ₅₄ -(CL) ₁₂₂ -(DMAEMA) ₅₄	30,9	1,09
1:215:1:2	21	(DMAEMA) ₈₅ -(CL) ₁₂₂ -(DMAEMA) ₈₅	40,7	1,15

^a Relación molar de Br-PCL-Br:DMAEMA:CuBr:PMDETA en reacción ATRP

^b Calculado por RMN¹H en KDa

^c Determinado por GPC

Para determinar la estructura química, composiciones, pesos moleculares y distribución de pesos moleculares de los copolímeros se realizaron análisis por FTIR, RMN y GPC. En los espectros IR de los copolímeros se observan dos nuevas bandas en 2821 y 2770 cm^{-1} atribuidas a las vibraciones de tensión simétrica y asimétrica del enlace C-H del grupo $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ del PDMAEMA, como se ha reportado previamente en la investigación de Zhang (Ver Figura 5) (Zhang, He et al. 2010).

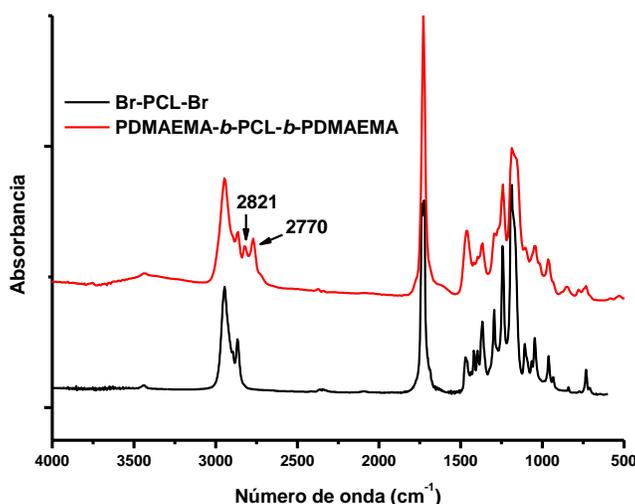


Figura 10. Espectro FTIR del copolímero tribloque PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA

La copolimerización se corroboró por medio de los espectros de RMN^1H , donde se pueden observar las señales debidas a las dos secuencias de polímeros. En la Figura 11 se muestra la asignación de cada señal a los átomos de hidrógeno correspondientes. Se conservan los picos debidos a los grupos $-\text{CH}_2-$ de la PCL ($\delta \sim 1,40 \text{ ppm}$, $1,67 \text{ ppm}$, $2,32 \text{ ppm}$ y $4,08 \text{ ppm}$) y se observan las señales debidas a los grupos $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CO})-\text{CH}_3$ ($\delta \sim 1,05 \text{ ppm}$), $-\text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_3$ ($\delta \sim 1,89$), $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ($\delta \sim 2,32 \text{ ppm}$), $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ($\delta \sim 2,61 \text{ ppm}$) y $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}$ ($\delta \sim 4,08 \text{ ppm}$) del PDMAEMA, tal como se ha reportado previamente (Motala-Timol and Jhurry 2007; San Miguel, Limer et al. 2008). Asimismo se observa la desaparición del pico en $1,94 \text{ ppm}$ debida al grupo 2-bromo-isobutiril y no se observan señales en la zona de protones olefínicos, lo cual permite inferir la ausencia de monómero residual.

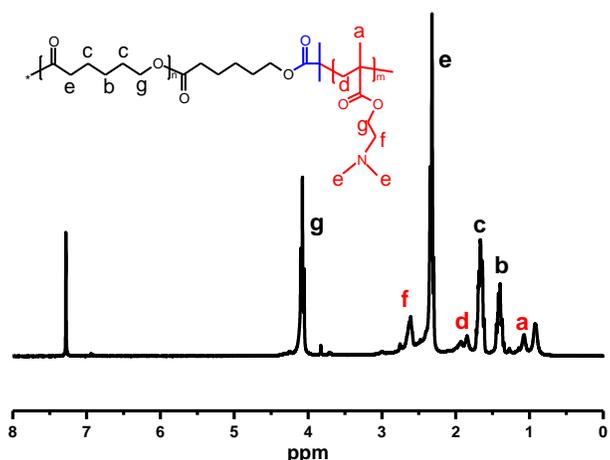


Figura 11. Espectro RMN¹H del copolímero tribloque PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA

A partir de los espectros de RMN¹H se determinó la composición y pesos moleculares (M_n) de los copolímeros a través de la integración de señales. Para esto, se comparó la intensidad de la señal en 1,40 ppm, correspondiente a los protones de uno de los grupos $-CH_2-$ de la PCL y la señal en 2,61 ppm, correspondiente a los protones del grupo $-CH_2-N$ del PDMAEMA. Los grados de polimerización de CL y DMAEMA se calcularon teniendo en cuenta las fórmulas (4) y (5):

$$N_{CL} = \frac{M_n \text{ PCL}}{\text{Peso molecular CL}} \quad (4)$$

$$N_{DMAEMA} = I_f \times N_{CL} \quad (5)$$

Donde, N_{CL} es el grado de polimerización de la ϵ -caprolactona (CL), N_{DMAEMA} es el grado de polimerización del N,N-dimetilaminoetil metacrilato (DMAEMA) e I_f corresponde a la relación en área de la señal f del espectro de RMN¹H ($\delta \sim 2,61$ ppm) y la señal a 1,4 ppm, previamente descrita.

Conociendo la composición de los copolímeros, se calcularon los pesos moleculares utilizando la fórmula (6):

$$M_n = (114,14 \times N_{CL}) + (157,21 \times N_{DMAEMA}) \quad (6)$$

Donde, M_n corresponde al peso molecular del copolímero, 114,14 y 157,21 son los pesos moleculares de los monómeros CL y DMAEMA, respectivamente.

También se registraron los espectros de RMN¹³C APT para identificar los átomos de carbono de los dos segmentos poliméricos. En la figura 12 se observan las señales debidas a los grupos -CH₂- ($\delta \sim 24,74$ ppm, 25,65 ppm, 28,48 ppm, 34,09 ppm, 64,25 ppm) y C=O ($\delta \sim 173,72$ ppm) de la PCL y los grupos -CH₂-C-CH₃ ($\delta \sim 44,77$ ppm), -N(CH₃)₂ ($\delta \sim 45,45$ ppm), -CH₂-C(CO)-CH₃ ($\delta \sim 55,17$ ppm), -CH₂-N(CH₃)₂ ($\delta \sim 57,08$ ppm), -O-CH₂-CH₂-N ($\delta \sim 63$ ppm) y C=O ($\delta \sim 177$ ppm) del PDMAEMA, tomando como referencia la publicación realizada por Motala-Timol (Motala-Timol and Jhurry 2007).

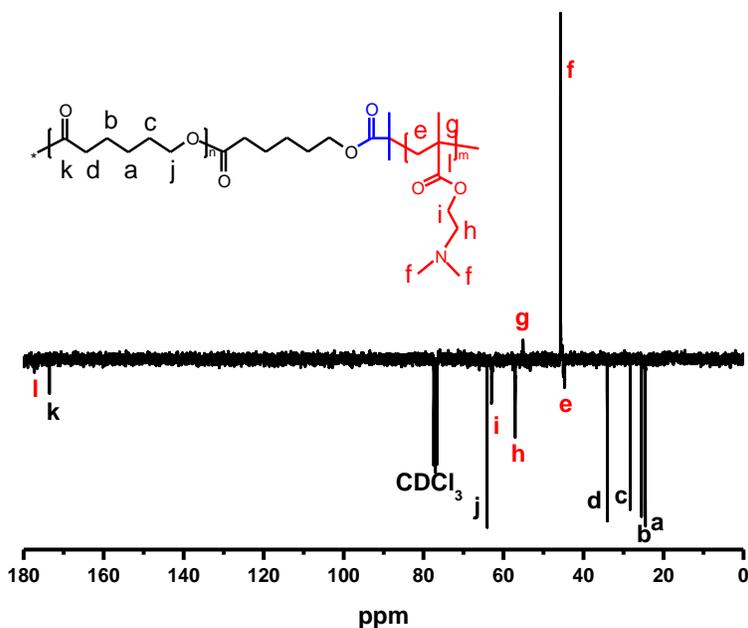


Figura 12. Espectro RMN¹³C APT del copolímero PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA

Se realizaron mediciones de la distribución del peso molecular de los copolímeros sintetizados empleando GPC. Los cromatogramas obtenidos se muestran en la Figura 13, en ellos se puede observar una distribución de pesos unimodal y estrecha con valores de dispersidad (M_w/M_n) bajos, entre 1,09 y 1,69 (Tabla 1).

Asimismo, se presenta un desplazamiento de los copolímeros hacia menores volúmenes de retención con respecto al macroiniciador, lo cual es un indicio de la copolimerización. Los valores de dispersión del peso molecular estuvieron cercanos a la unidad, lo cual permite inferir que se mantuvo un control sobre este parámetro durante la polimerización, lo cual es una característica representativa de las reacciones por ATRP (Coessens, Pintauer et al. 2001).

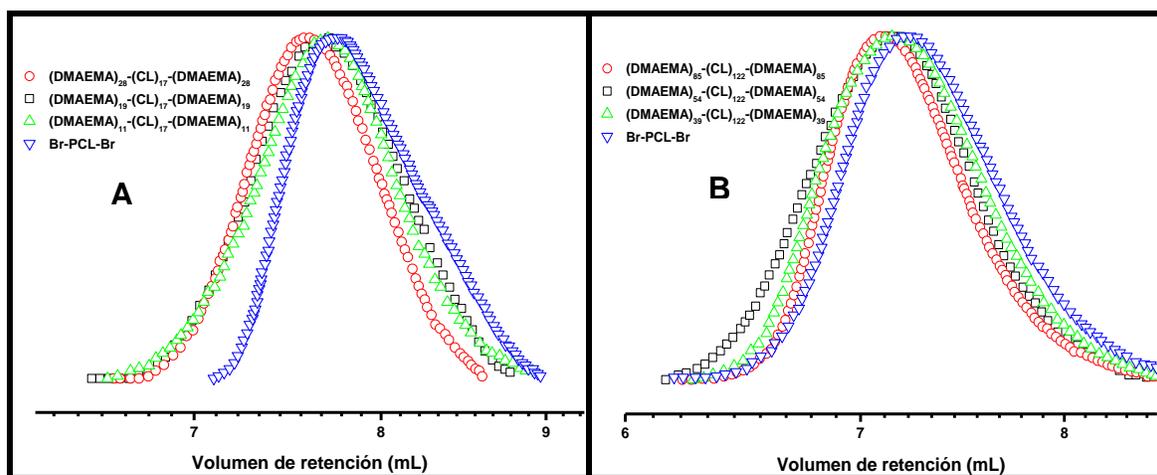


Figura 13. Trazas de GPC de los copolímeros tribloque de PCL de 2KDa (A) y copolímeros tribloque de PCL de 14 KDa (B).

7.1.3 Estudio de la cinética de la reacción de polimerización

Se realizó un estudio de la cinética de la reacción de copolimerización a través del análisis por RMN¹H de muestras extraídas a diferentes tiempos, teniendo en cuenta las dos relaciones molares utilizadas para los copolímeros de PCL de 2 KDa y 14 KDa. Los análisis por RMN¹H permitieron conocer la composición de los copolímeros y, de esta manera, establecer el porcentaje de conversión del monómero DMAEMA (Tablas 5 y 6).

Tabla 5. Composiciones y porcentajes de conversión de DMAEMA en muestras de copolímeros de 2 KDa sintetizados a diferentes tiempos

Relación molar ^a	Tiempo de reacción (h)	Composición ^b	Porcentaje de conversión de DMAEMA (%)
1:108	0,5	(DMAEMA) ₁₆ -(CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₁₆	29
	1	(DMAEMA) ₁₉ -(CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₁₉	34
	2	(DMAEMA) ₂₂ -(CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₂₂	40
	4	(DMAEMA) ₂₅ -(CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₂₅	46
	6	(DMAEMA) ₂₈ -(CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₂₈	52
1:40	0,5	(DMAEMA) ₅ -(CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₅	27
	1	(DMAEMA) ₈ -(CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₈	41
	2	(DMAEMA) ₉ -(CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₉	43
	4	(DMAEMA) ₁₀ -(CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₁₀	46
	6	(DMAEMA) ₁₁ -(CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₁₁	48

Tabla 6. Composiciones y porcentajes de conversión de DMAEMA en muestras de copolímeros de 14 KDa sintetizados a diferentes tiempos

Relación molar ^a	Tiempo de reacción (h)	Composición ^b	Porcentaje de conversión de DMAEMA
1:108	0,5	(DMAEMA) ₃₆ -(CL) ₁₂₂ -(DMAEMA) ₃₆	66
	1	(DMAEMA) ₃₉ -(CL) ₁₂₂ -(DMAEMA) ₃₉	72
	2	(DMAEMA) ₄₄ -(CL) ₁₂₂ -(DMAEMA) ₄₄	81
	4	(DMAEMA) ₅₀ -(CL) ₁₂₂ -(DMAEMA) ₅₀	92
	6	(DMAEMA) ₅₃ -(CL) ₁₂₂ -(DMAEMA) ₅₃	98
1:215	0,5	(DMAEMA) ₄₀ -(CL) ₁₂₂ -(DMAEMA) ₄₀	37
	1	(DMAEMA) ₄₅ -(CL) ₁₂₂ -(DMAEMA) ₄₅	42
	2	(DMAEMA) ₅₂ -(CL) ₁₂₂ -(DMAEMA) ₅₂	48
	4	(DMAEMA) ₅₈ -(CL) ₁₂₂ -(DMAEMA) ₅₈	54
	6	(DMAEMA) ₆₃ -(CL) ₁₂₂ -(DMAEMA) ₆₃	59

^a Relación molar de PCL:PDMAEMA, ^b Determinada por RMN¹H

Las polimerizaciones radicalarias realizadas por ATRP se caracterizan por ser controladas y mantener un carácter viviente, presentando un comportamiento cinético de primer orden, en donde la velocidad de polimerización (V_p) con respecto al logaritmo de la concentración de monómero ($[M]$) es una función lineal del tiempo. Esto es debido a la contribución insignificante de reacciones de terminación, de modo que la concentración de radicales propagantes ($[P^*]$) permanece constante. Este tipo de polimerizaciones siguen la expresión de velocidad mostrada en la ecuación (7) (Matyjaszewski and Xia 2001):

$$V_p = K_p [P^*][M] \quad (7)$$

Al realizar un gráfico semilogarítmico, la obtención de una línea recta revela una concentración de radicales propagantes constante, en donde la velocidad de polimerización depende solamente de la concentración de monómero.

En las figuras 14 y 15, se muestran las gráficas de cinética ($\ln[M_0]/[M]$ vs t) para la polimerización del DMAEMA utilizando diferentes relaciones molares. En estas gráficas se observa una relación lineal entre la velocidad de polimerización y el tiempo, lo cual indica un comportamiento cinético de primer orden, en donde la concentración de radicales propagantes se mantuvo constante durante toda la reacción. Esto demuestra que la polimerización fue controlada y mantuvo un carácter viviente.

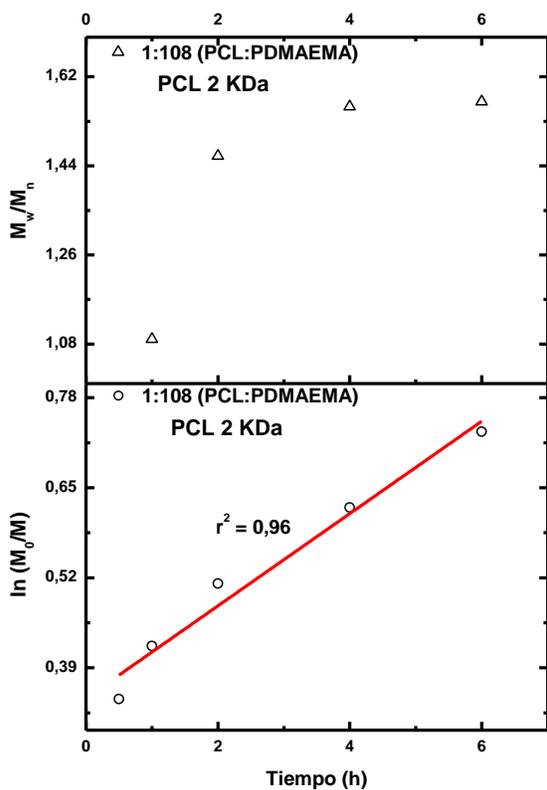


Figura 14. Gráfica de $\ln[M_0]/[M]$ en función del tiempo para la polimerización del DMAEMA con PCL de 2 KDa.

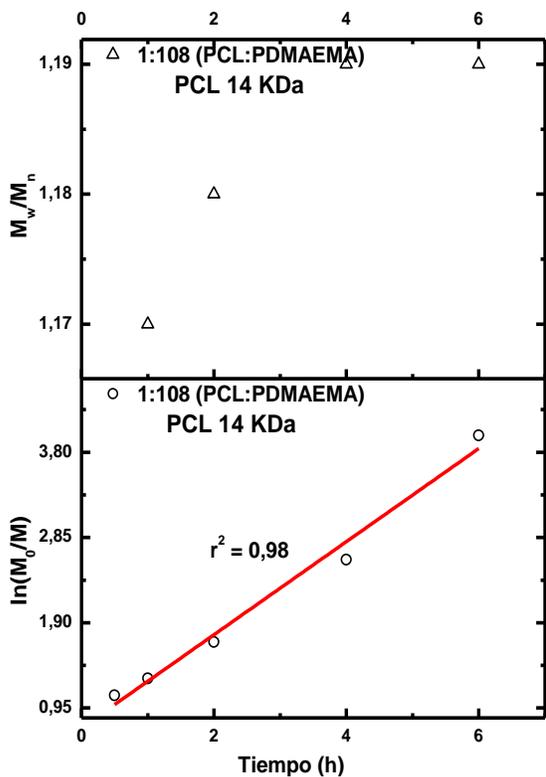
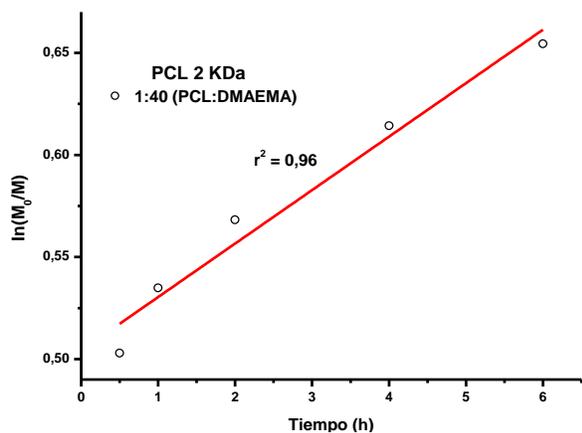
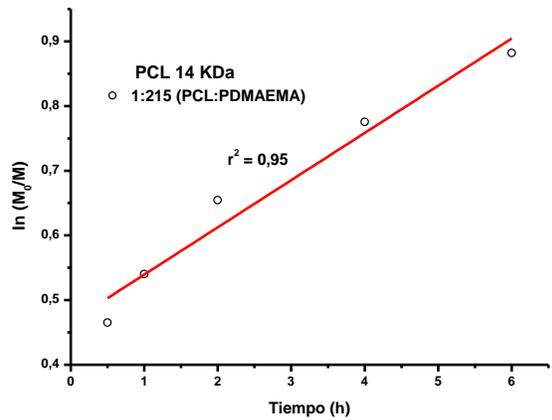


Figura 15. Gráfica de $\ln[M_0]/[M]$ en función del tiempo para la polimerización del DMAEMA con PCL de 14 KDa.



7.2 Estudio del efecto de la estructura de los copolímeros sobre las propiedades coloidales de las micelas

7.2.1 Preparación y caracterización de las micelas de copolímeros en bloque

Las micelas obtenidas a partir del autoensamble en medio acuoso de los copolímeros PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA, se prepararon utilizando el método de nanoprecipitación debido a la baja solubilidad de este copolímero en agua, por lo que se hizo necesario la utilización de un solvente orgánico, en este caso acetona. Asimismo se seleccionó por las ventajas que ofrece como facilidad, rapidez y formación de micelas con un tamaño bien definido y una distribución de tamaño estrecha (Rao and Geckeler 2011).

Se prepararon micelas con una concentración de copolímero de 4 mg/mL utilizando buffer de pH 5.0. Estos sistemas se caracterizaron empleando dispersión dinámica de luz para conocer el diámetro hidrodinámico promedio de las partículas y su distribución, medidas de potencial zeta para determinar su estabilidad, microscopia de fuerza atómica y microscopia electrónica de transmisión para establecer su morfología. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Propiedades de las micelas de copolímeros tribloque PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA

Composición	Diámetro hidrodinámico promedio (nm)	Potencial Zeta (mV)
(DMAEMA) ₃₉ -(CL) ₁₂₂ -(DMAEMA) ₃₉	46,4	40,5±9,9
(DMAEMA) ₅₄ -(CL) ₁₂₂ -(DMAEMA) ₅₄	46,8	29,8±11,7
(DMAEMA) ₈₅ -(CL) ₁₂₂ -(DMAEMA) ₈₅	53,5	36,9±14,7
(DMAEMA) ₁₁ -(CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₁₁	57,0	21,8±13,6
(DMAEMA) ₁₉ -(CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₁₉	81,8	24,5±19,5
(DMAEMA) ₂₈ -(CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₂₈	85,0	26,9±16,8

En la figura 16 se muestran los resultados obtenidos por dispersión dinámica de luz, observándose una distribución unimodal. Las micelas exhiben una distribución de tamaño diferente dependiendo de la composición del copolímero que las conforma. Para los copolímeros basados en PCL de 14 KDa se obtuvieron tamaños promedio entre 46 y 54 nm, mientras que para los copolímeros basados en PCL de 2 KDa se obtuvieron tamaños entre 57 y 85 nm.

Estos valores son más bajos que los reportados previamente por otras investigaciones para este mismo tipo de copolímero. San Miguel y Limer obtuvieron distribuciones de tamaño de micelas bimodales para copolímeros de composiciones $(\text{DMAEMA})_{25}-(\text{CL})_{17}-(\text{DMAEMA})_{25}$ y $(\text{DMAEMA})_{30}-(\text{CL})_{17}-(\text{DMAEMA})_{30}$, en donde la mayor parte de las micelas exhibían diámetros promedio cercanos a 150 nm, debido a la obtención de estructuras supramoleculares formadas a partir de un proceso de agregación (San Miguel, Limer et al. 2008). Zhu y Jung reportan la obtención de micelas de copolímeros con composiciones $(\text{DMAEMA})_8-(\text{CL})_{31}-(\text{DMAEMA})_8$, $(\text{DMAEMA})_{15}-(\text{CL})_{31}-(\text{DMAEMA})_{15}$ y $(\text{DMAEMA})_{29}-(\text{CL})_{31}-(\text{DMAEMA})_{29}$ con tamaños de partícula entre 53,6 y 132,2 nm (Zhu, Jung et al. 2010).

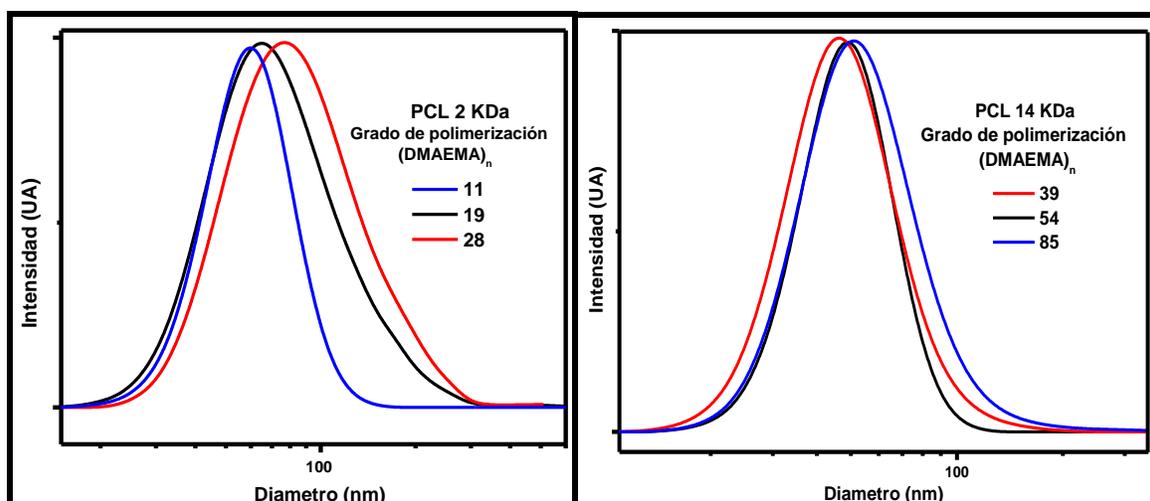


Figura 16. Distribución del tamaño de las micelas de los copolímeros tribloque PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA

En la Figura 17 se muestra el efecto de la composición de los copolímeros sobre el tamaño de las partículas, observándose que las tendencias obtenidas en este estudio son similares a las reportadas por otros autores (Loh, Wu et al. 2008; Li, Nakayama et al. 2011). Este comportamiento se debe a que el proceso de micelización para los copolímeros con el bloque de PCL más largo ocurre a una menor concentración y por lo tanto, las micelas formadas están compuestas por un número menor de cadenas agregadas.

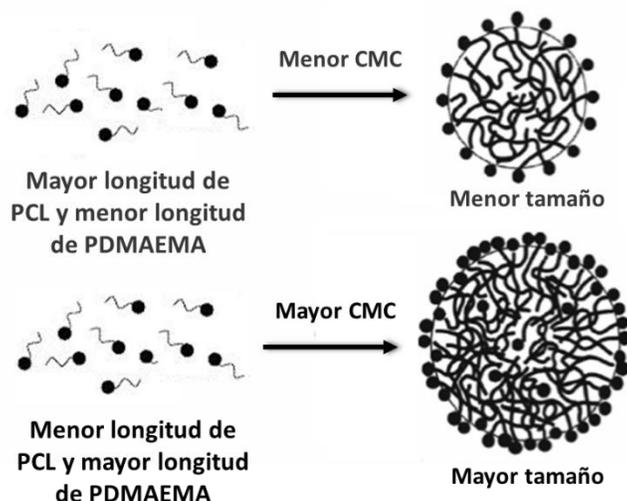


Figura 17. Efecto de la composición de los copolímeros sobre el tamaño de las micelas

Para la encapsulación de anfotericina B en micelas de copolímeros en bloque se han reportado diferentes valores de tamaño de partícula dependiendo del tipo de copolímero que se somete al autoensamble. En la investigación realizada por Shim se obtuvieron tamaños entre 65 y 85 nm para copolímeros de PCL-*b*-PDMAEMA (Shim, Lee et al. 2011). Para micelas de PEG-*b*-DSPEIcolesterol se reportan tamaños entre 16 y 65 nm, dependiendo del nivel de colesterol en el copolímero (Vakil and S. Kwon 2007). Lavasanifar y Samuel reportan diámetros promedio entre 15 y 25 nm para micelas de PEO-*b*-PHSA, de acuerdo al método de preparación utilizado (Lavanifar, Samuel et al. 2001). Se observa que los tamaños de las micelas obtenidos en este estudio son similares a los reportados para su aplicación en la encapsulación de anfB.

Se realizaron medidas del potencial zeta de las micelas para determinar la estabilidad del sistema coloidal, obteniendo los resultados que se observan en la Tabla 7. Estas medidas muestran que las micelas obtenidas presentan una carga superficial positiva debido a la protonación de los grupos amino del PDMAEMA en medio ácido (pH 5.0). Se obtuvieron valores mayores a +21mV, lo cual permite inferir que las dispersiones coloidales obtenidas son estables. Para este mismo tipo de copolímeros se reportan medidas de potencial zeta entre 29,3 y 35,5 mV (Zhu, Jung et al. 2010). En la Figura 18 se muestra el efecto de los segmentos hidrófobos e hidrófilos del copolímero sobre esta propiedad.

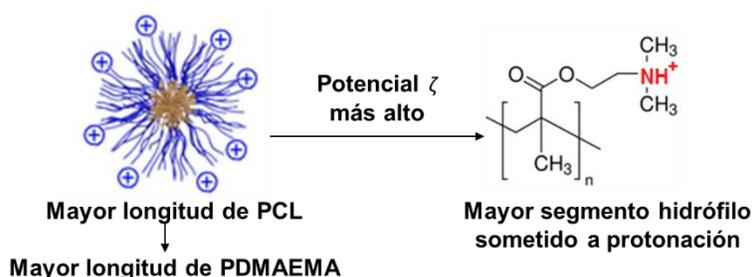


Figura 18. Efecto de la composición del copolímero sobre el potencial zeta

En cuanto a la morfología de las micelas, se emplearon análisis por AFM y TEM. Las imágenes AFM permitieron observar la formación de partículas esféricas, como se muestra en la Figura 19. Esta morfología es la más común para las micelas de copolímeros en bloque (Tuzar and Kratochvil 1993; Goldraich and Talmon 2000).

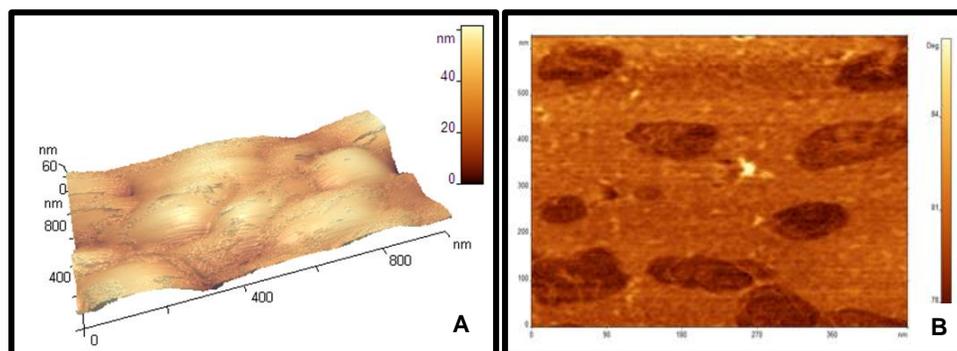


Figura 19. Imágenes AFM de las micelas de copolímeros en bloque (DMAEMA)₃₉-(CL)₁₂₂-(DMAEMA)₃₉ (A) y (DMAEMA)₁₁-(CL)₁₇-(DMAEMA)₁₁ (B)

La morfología de las micelas también fue estudiada por TEM. Las imágenes obtenidas se muestran en la Figura 20, en donde se puede observar que las partículas poseen una forma esférica con tamaños entre 30 y 100 nm aproximadamente. También es posible la visualización de un núcleo más oscuro, rodeado de una corteza menos densa, que permite corroborar la formación de una estructura del tipo core-shell.

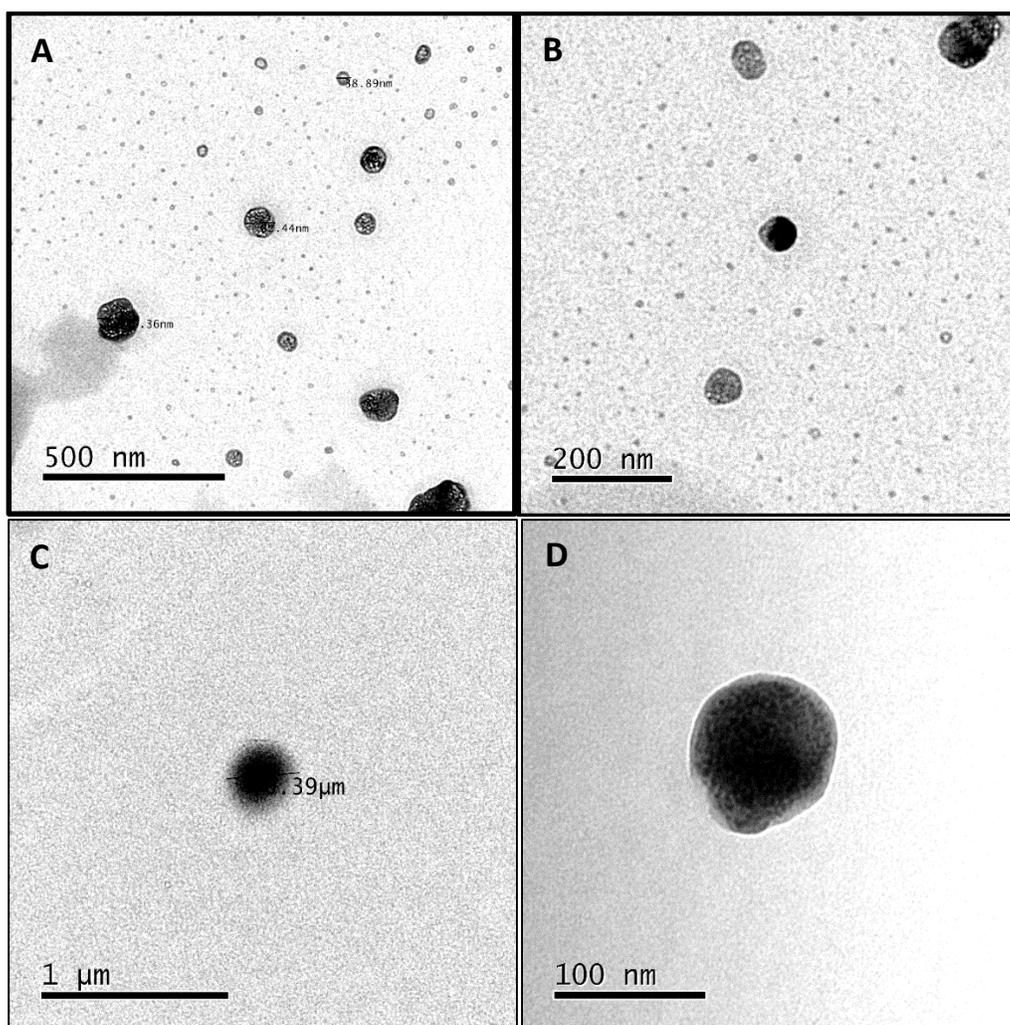


Figura 20. Imágenes TEM de las micelas A y C (DMAEMA)₁₉-(CL)₁₇-(DMAEMA)₁₉ y B y D (DMAEMA)₅₄-(CL)₁₂₂-(DMAEMA)₅₄

Los tamaños observados por esta técnica fueron heterogéneos, mostrando la formación de partículas pequeñas y algunos agregados de mayor tamaño; esto es debido a que las micrografías TEM corresponden a un estado deshidratado de las partículas, que puede llevar a alguna de las situaciones que se muestran en la Figura 21 (Loh, Wu et al. 2008; Zhang, Zhu et al. 2009). La formación de partículas agregadas producida por asociaciones intermicelares e interacciones hidrófobas entre los núcleos de las micelas ha sido reportada por varios autores (Allen, Yu et al. 1998; San Miguel, Limer et al. 2008).

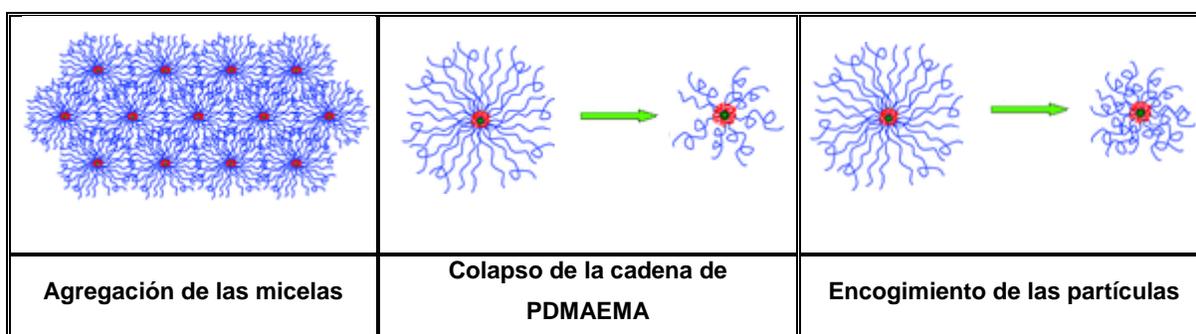


Figura 21. Factores que afectan el tamaño de las micelas en las micrografías TEM

7.2.2 Determinación de la CMC de los copolímeros en bloque

La CMC es un parámetro importante pues constituye una evidencia del proceso de micelización y además, está relacionado con la estabilidad coloidal y termodinámica de las micelas. Las sustancias anfífilicas con altos valores de CMC, como los surfactantes de bajo peso molecular, forman micelas que pueden disociarse antes de ser administradas en el cuerpo. Por otro lado, las micelas de copolímeros en bloque exhiben valores bajos de CMC, presentando una mayor estabilidad termodinámica, es decir al formarse las micelas se reduce la energía libre del sistema, alcanzando un equilibrio dinámico tanto, entre unimeros y agregados, como con el medio acuoso (Gaucher, Dufresne et al. 2005).

La formación de micelas a partir de los copolímeros en bloque de PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA se verificó por fluorescencia empleando pireno, ya que este

método presenta una mayor sensibilidad con respecto a otras técnicas como las medidas de tensión superficial o solubilización de colorantes (Zhang, He et al. 2010). Este método se basa en la sensibilidad de los espectros de emisión y excitación del pireno a la polaridad del ambiente que lo rodea (Mok, Thiagarajan et al. 2012). Cuando la concentración de copolímero incrementa en una solución acuosa de pireno, estos espectros se someten a cambios significativos debido a la formación de las micelas; los cambios son causados por la transferencia del pireno desde el entorno acuoso hacia los núcleos hidrofóbicos de las micelas (Wilhelm, Zhao et al. 1991).

Se registraron los espectros de emisión y excitación del pireno en presencia de diferentes concentraciones de copolímero en una solución acuosa de pH 5.0 (Figuras 22 y 23). En los espectros de emisión se observa que a medida que la concentración del copolímero aumenta, la intensidad de fluorescencia también incrementa, lo cual es debido a que el pireno tiene una alta actividad de fluorescencia en entornos no polares como los núcleos micelares, pero disolventes polares como el agua pueden aplacar su fluorescencia (Zhang, He et al. 2010). En los espectros de excitación se observa el desplazamiento hacia el rojo de una de las bandas del pireno desde 332 nm hasta 335 nm cuando la concentración del copolímero aumenta; estas dos bandas se denominan como I_1 e I_3 , respectivamente. La relación de las intensidades de estas dos bandas (I_3/I_1) es usada como una medida relativa de la polaridad, presentando en entornos menos polares valores más altos. Se ha reportado que este cambio en el espectro de excitación del pireno es más sensible al inicio de la agregación de los copolímeros que los cambios observados en el espectro de emisión (Li, Mya et al. 2006).

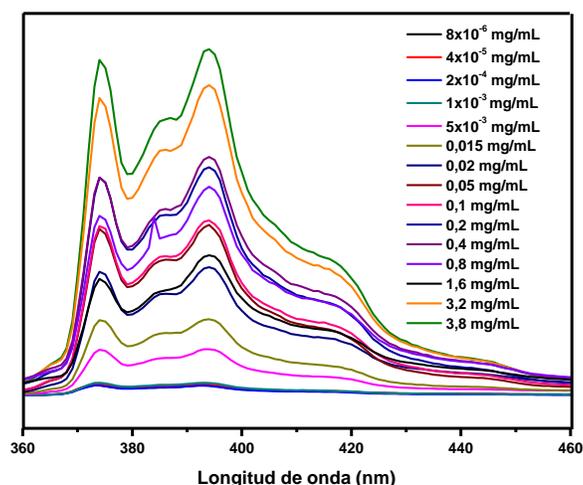


Figura 22. Espectro de emisión del pireno (6×10^{-7} M) en presencia de diferentes concentraciones del copolímero (DMAEMA)₃₉-(CL)₁₂₂-(DMAEMA)₃₉.

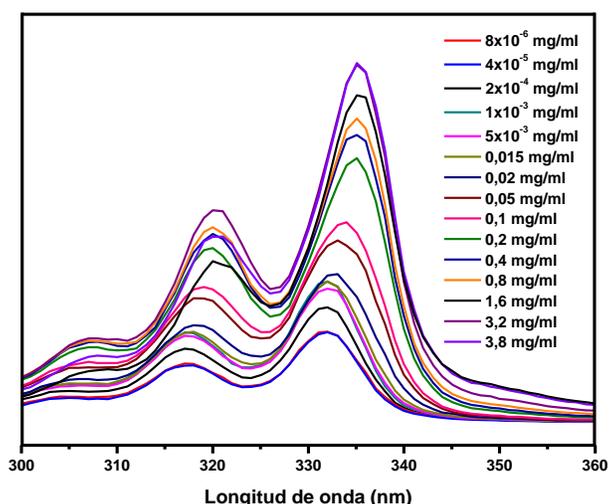


Figura 23. Espectro de excitación del pireno (6×10^{-7} M) en presencia de diferentes concentraciones del copolímero (DMAEMA)₂₈-(CL)₁₇-(DMAEMA)₂₈.

Los valores de CMC se determinaron, entonces, a partir de la relación de las intensidades de fluorescencia de las bandas I_3/I_1 en función del logaritmo de la concentración, como se muestra en la Figura 24. Se observa que al incrementar la concentración del copolímero, la relación de las intensidades estas dos bandas muestra un aumento significativo a una cierta concentración, la cual corresponde a la CMC, reflejando de esta manera, la incorporación del pireno en los núcleos de

las micelas. Los valores de CMC se obtuvieron a partir de la intersección de líneas rectas dibujadas sobre las regiones planas de la gráfica.

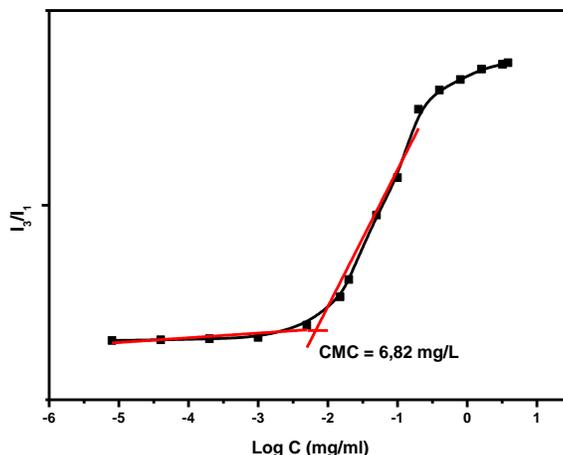


Figura 24. Relación de las intensidades de fluorescencia I_3/I_1 en función de la concentración del copolímero $(\text{DMAEMA})_{19}\text{-(CL)}_{17}\text{-(DMAEMA)}_{19}$

En la Figura 25 se muestran las gráficas obtenidas para la determinación de la CMC de los seis copolímeros sintetizados en este estudio. Se obtuvieron concentraciones micelares críticas entre 0,86 mg/L y 7,4 mg/L, dependiendo de las longitudes de los segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos del copolímero (Tabla 8). Las concentraciones micelares críticas más bajas se obtuvieron con los copolímeros basados en PCL de 14 KDa, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en otras investigaciones, en donde se reporta que la CMC decrece a medida que aumenta la longitud del segmento hidrofóbico (Gaucher, Dufresne et al. 2005; Zhang, He et al. 2010; Li, Nakayama et al. 2011). Esto es debido al costo de energía libre para transferir el bloque hidrofobo desde el núcleo de la micela hacia el solvente (Mok, Thiagarajan et al. 2012). De igual forma si el segmento hidrofobo de PCL permanece constante, la CMC incrementa a medida que aumenta el segmento hidrófilo de PDMAEMA, aunque la longitud de este segmento tiene un menor efecto sobre los valores de esta propiedad. En investigaciones realizadas por otros autores se obtienen resultados similares, en donde los copolímeros con las cadenas hidrofílicas más cortas y segmentos

hidrofóbicos más largos tienden a agregarse a una concentración más baja (Shim, Kim et al. 2006; Loh, Wu et al. 2008; Zhang, He et al. 2010).

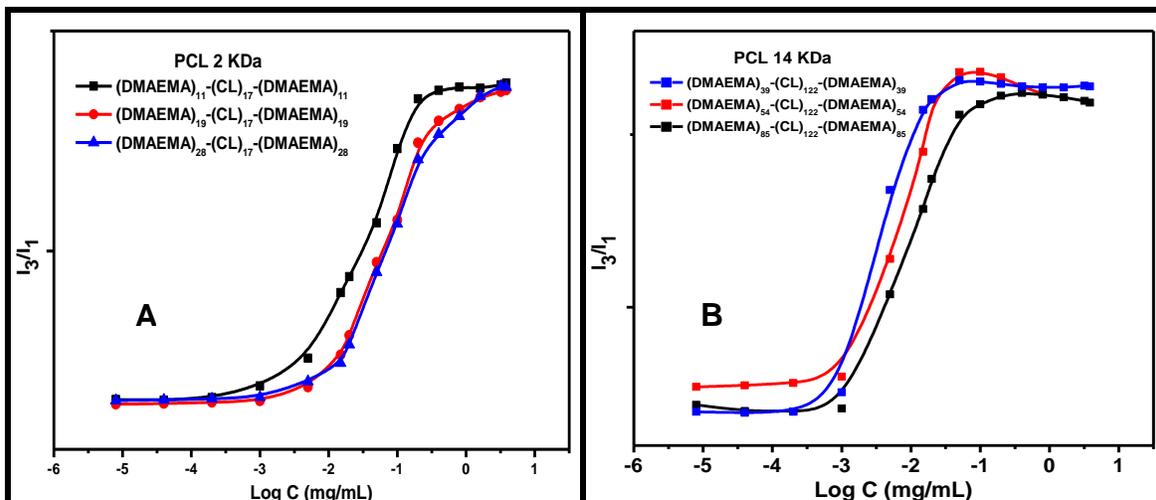


Figura 25. Relación de las intensidades de fluorescencia I_3/I_1 en función de la concentración de los copolímeros de 2 KDa (A) y 14 KDa (B) a pH 5.0.

Tabla 8. Concentraciones micelares críticas de los copolímeros tribloque de PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA

Composición	CMC (mg/L)
(DMAEMA) ₁₁ -(CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₁₁	4,9
(DMAEMA) ₁₉ -(CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₁₉	6,8
(DMAEMA) ₂₈ -(CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₂₈	7,4
(DMAEMA) ₃₉ -(CL) ₁₂₂ -(DMAEMA) ₃₉	0,86
(DMAEMA) ₅₄ -(CL) ₁₂₂ -(DMAEMA) ₅₄	1
(DMAEMA) ₈₅ -(CL) ₁₂₂ -(DMAEMA) ₈₅	1

Los valores de CMC obtenidos son más bajos que los reportados para este mismo tipo de copolímero. En la investigación realizada por San Miguel se determinó la CMC por el método de fluorescencia empleando 4-(N,N-dietil) amino-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol como molécula prueba, obteniendo valores de 0,11, 0,33 y 1,01 g/L para los copolímeros (DMAEMA)₃₀-(CL)₁₇-(DMAEMA)₃₀, (DMAEMA)₂₅-(CL)₁₇-

(DMAEMA)₂₅ y (DMAEMA)₂₀-(CL)₁₇-(DMAEMA)₂₀, respectivamente, observándose una tendencia contraria a la encontrada en este estudio (San Miguel, Limer et al. 2008). Por otro lado, Zhu y colaboradores determinaron la CMC por el método de fluorescencia con pireno, encontrando valores entre 15,8 y 24 mg/L para copolímeros de las siguientes composiciones: (DMAEMA)₈-(CL)₃₁-(DMAEMA)₈, (DMAEMA)₁₅-(CL)₃₁-(DMAEMA)₁₅ y (DMAEMA)₂₉-(CL)₃₁-(DMAEMA)₂₉ (Zhu, Jung et al. 2010).

Asimismo, los valores de CMC obtenidos en esta investigación son mucho más bajos que los obtenidos con sistemas micelares usados en estudios clínicos como las micelas de PEG-*b*-PBLA (5-10 mg/L) (Kwon, Naito et al. 1993) y el poloxamer (1-24 mg/mL) (Shim, Kim et al. 2006), lo cual indica una mayor estabilidad de los sistemas obtenidos. Para la encapsulación de anfotericina B, se reportan CMC de 20 mg/L para copolímeros de PEG-*p*(CL-*co*-TMC) (Vandermeulen, Rouxhet et al. 2006) y 8,9 mg/L para copolímeros tribloque de polirotaxano y PEGMA (Burt, Zhang et al. 1999).

7.2.3 Efecto del pH sobre el tamaño de las micelas y la CMC

Se realizó un estudio del efecto del pH sobre el tamaño de las micelas y la CMC, debido a la sensibilidad del bloque de PDMAEMA a cambios en el pH del medio; en medios de pH ácido se somete a protonación para asumir una estructura hidrófila, mientras que en medios de pH básico se desprotona y va asumiendo un carácter hidrófobo (Xu, Neoh et al. 2009). Para estos estudios se emplearon soluciones de los copolímeros de composición intermedia (DMAEMA)₁₉-(CL)₁₇-(DMAEMA)₁₉ y (DMAEMA)₅₄-(CL)₁₂₂-(DMAEMA)₅₄ en medios de pH 5.0, 6.0, 7.0 y 7.5.

Los tamaños de partícula de las micelas en función del pH se analizaron por DLS, obteniendo los resultados mostrados en la Figura 26, en donde se observan

distribuciones unimodales. Las nanopartículas exhiben diferentes distribuciones de tamaño dependiendo del valor de pH.

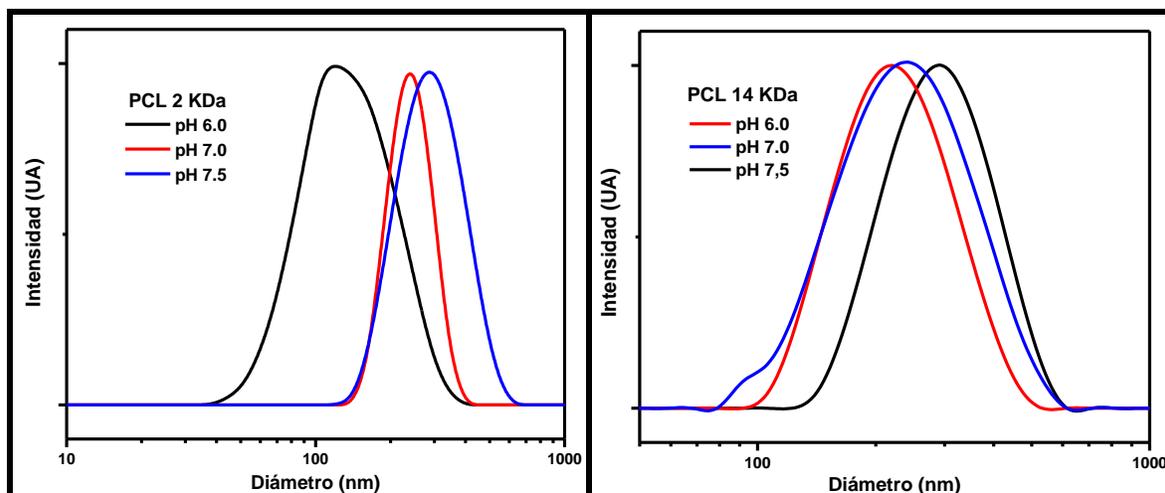


Figura 26. Distribuciones de tamaño de las micelas de $(\text{DMAEMA})_{19}\text{-(CL)}_{17}\text{-(DMAEMA)}_{19}$ y $(\text{DMAEMA})_{54}\text{-(CL)}_{122}\text{-(DMAEMA)}_{54}$ en función del pH.

En la tabla 9 y Figura 27 se resumen los diámetros hidrodinámicos promedio de las partículas, observándose un incremento del tamaño al aumentar el pH. A pH 5.0 se obtuvieron diámetros hidrodinámicos menores a 100 nm, que son los tamaños característicos de las micelas individuales, mientras que al aumentar el pH desde 6.0 hasta 7.5 se presentaron diámetros mayores a 100 nm que pueden indicar la formación de agregados de micelas. Este incremento en el tamaño se debe a la escasa dispersión de los copolímeros tribloque en los medios acuosos de pH neutros, lo cual hace que se produzca un proceso de agregación intermolecular y una asociación intermicelar, tal como se observa en la foto presentada en la figura 27, en donde las soluciones que se obtienen presentan un mayor grado de turbidez a medida que aumenta el valor de pH. Este comportamiento ha sido reportado en investigaciones previas que emplean PDMAEMA como bloque hidrófilo en la obtención de copolímeros en bloque anfifílicos (San Miguel, Limer et al. 2008; Zhang, He et al. 2010).

Tabla 9. Tamaños promedio de las micelas de (DMAEMA)₁₉-(CL)₁₇-(DMAEMA)₁₉ y (DMAEMA)₅₄-(CL)₁₂₂-(DMAEMA)₅₄ en función del pH del medio

pH	Tamaño promedio (nm) (DMAEMA) ₁₉ -(CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₁₉	Tamaño promedio (nm) (DMAEMA) ₅₄ -(CL) ₁₂₂ -(DMAEMA) ₅₄
5.0	81,8	46,8
6.0	151	233,3
7.0	242,3	249,9
7.5	297,8	299,1

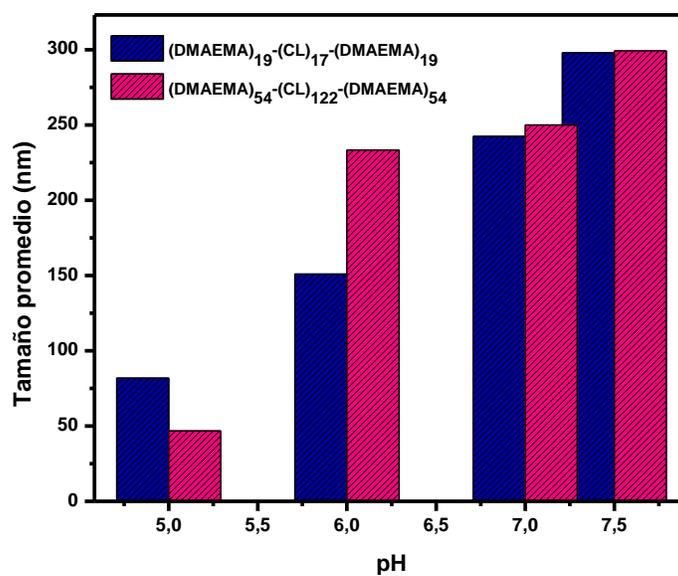
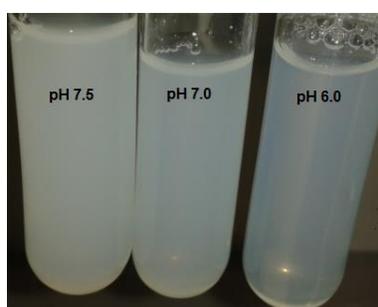


Figura 27. Dependencia del tamaño de las partículas con el pH.

La explicación de estos resultados se muestra en la Figura 28.

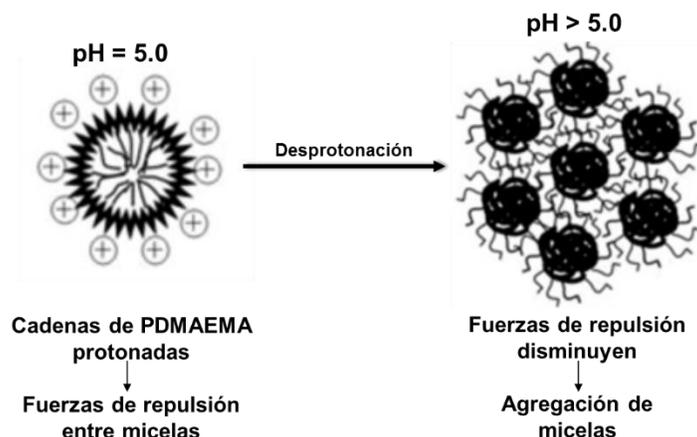


Figura 28. Efecto del estado de protonación de las cadenas de PDMAEMA sobre el tamaño de las partículas

Para estudiar el efecto del pH sobre la CMC, se registraron los espectros de excitación de las muestras a diferentes valores de pH, observándose el desplazamiento de la banda del pireno de 332 nm (I_1) hasta 335 nm (I_3), cuando la concentración del copolímero incrementa. La CMC se determinó a partir de la relación de las intensidades de fluorescencia de las bandas I_3/I_1 en función del logaritmo de la concentración, tal como se muestra en la Figura 29.

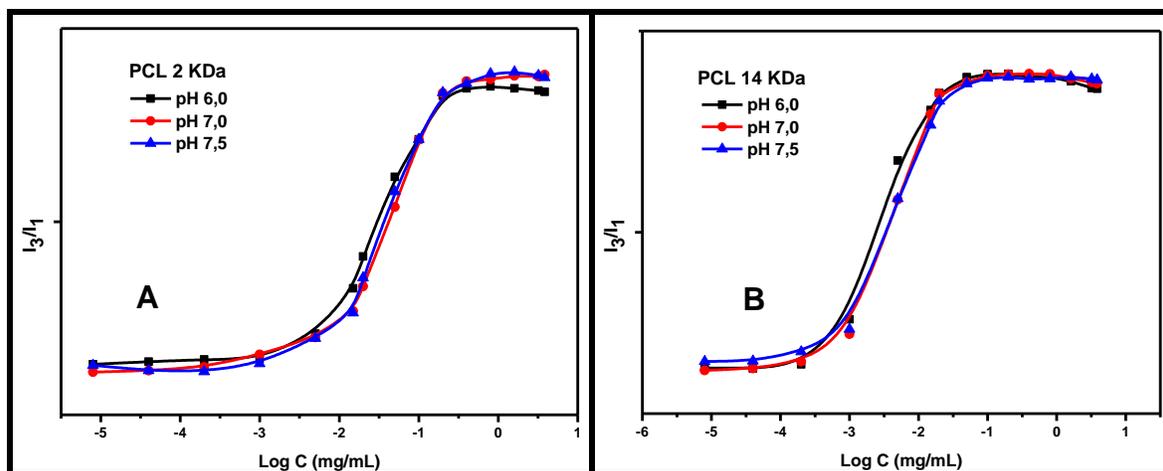


Figura 29. I_3/I_1 vs concentración de los copolímeros (DMAEMA)₁₉-(CL)₁₇-(DMAEMA)₁₉ (A) y (DMAEMA)₅₄-(CL)₁₂₂-(DMAEMA)₅₄ (B) a diferentes valores de pH

Los valores de CMC en función del pH se resumen en la Tabla 10 y Figura 30. Se observa que los valores más altos se obtienen con los copolímeros basados en PCL de 14 KDa, por su parte, la variación en el pH no tuvo un efecto significativo sobre el valor de esta propiedad. Esto es debido a que la CMC está determinada principalmente por la longitud del segmento hidrófobo y no por cambios en las condiciones del medio (Riess 2003; Gaucher, Dufresne et al. 2005; Mok, Thiagarajan et al. 2012).

Tabla 10. Concentraciones micelares críticas de los copolímeros $(DMAEMA)_{19}-(CL)_{17}-(DMAEMA)_{19}$ y $(DMAEMA)_{54}-(CL)_{122}-(DMAEMA)_{54}$ en función del pH del medio

pH	CMC (mg/L)	
	$(DMAEMA)_{19}-(CL)_{17}-(DMAEMA)_{19}$	$(DMAEMA)_{54}-(CL)_{122}-(DMAEMA)_{54}$
5.0	6,8	1
6.0	5,2	0,68
7.0	6,1	0,88
7.5	6,8	0,88

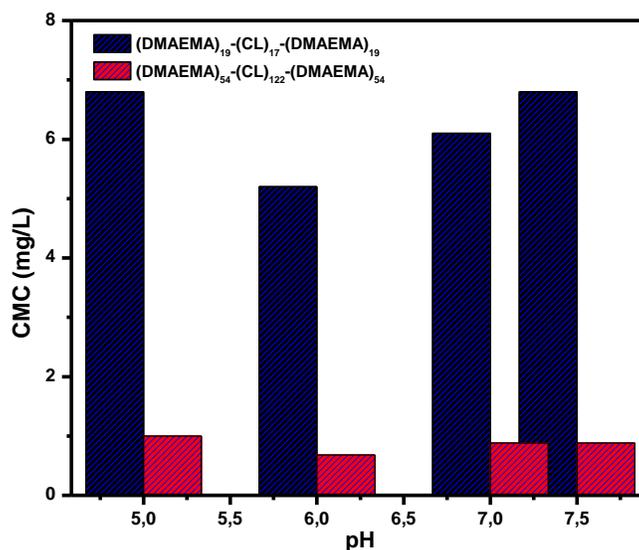


Figura 30. Dependencia de la CMC con el pH del medio

7.3 Determinación del efecto de la estructura de los copolímeros sobre su capacidad de encapsular y liberar anfotericina B

Las micelas de copolímeros en bloque tienen la capacidad de formar dispersiones estables con sustancias hidrofóbicas, debido a que los núcleos micelares actúan como un microambiente compatible para estas sustancias (Riess 2003); es por esta razón que la aplicación escogida para las nanopartículas obtenidas fue la encapsulación y liberación controlada de anfotericina B (anfB). La anfB es un antifúngico de amplio espectro, que a pesar de ser el antibiótico estándar contra infecciones fúngicas sistémicas, presenta limitaciones como baja solubilidad y toxicidad, debido a esto se ha buscado desarrollar nuevas formulaciones como la encapsulación en micelas de PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA.

7.3.1 Encapsulación de Anfotericina B en las micelas

La encapsulación de anfB en las micelas de PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA se llevó a cabo a través de la partición del fármaco en micelas preformadas. La concentración de anfB fue medida a 411 nm y se determinó empleando curvas de calibración (Anexo 1). Asimismo se determinó la eficiencia de encapsulación y el contenido de fármaco, empleando las ecuaciones (1) y (2). Los resultados se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11. Eficiencia de encapsulación y contenido de anfotericina B en las micelas de PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA ($n=3$)

Composición del copolímero	Concentración (ppm)	Eficiencia de encapsulación (%)	Contenido de fármaco (%)
(DMAEMA) ₃₉ -(CL) ₁₂₂ -(DMAEMA) ₃₉	97,3±4,7	48,6±2,3	2,4±0,1
(DMAEMA) ₅₄ -(CL) ₁₂₂ -(DMAEMA) ₅₄	92,9±3	46,4±1,5	2,3±0,07
(DMAEMA) ₈₅ -(CL) ₁₂₂ -(DMAEMA) ₈₅	90,4±4,5	45,2±2,3	2,3±0,1
(DMAEMA) ₁₁ -(CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₁₁	163,6±11,5	81,8±5,7	4,1±0,3
(DMAEMA) ₁₉ -(CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₁₉	136,8±9,7	68,4±4,9	3,4±0,2
(DMAEMA) ₂₈ -(CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₂₈	114,9±9,4	57,4±4,7	2,9±0,2

En la figura 31 se observa que las eficiencias de encapsulación de anfB en las micelas dependen de la composición del copolímero. Las eficiencias de encapsulación más altas se lograron con los copolímeros basados en PCL de 2 KDa y con las menores longitudes del segmento hidrofílico de PDMAEMA. Esto se puede deber al tamaño de los núcleos y las cortezas micelares. Los copolímeros basados en PCL de 2 KDa presentan diámetros hidrodinámicos más altos que los de 14 KDa según las mediciones realizadas por DLS (57-85 nm), con lo cual se puede inferir un mayor tamaño del núcleo micelar, lo que permitiría una mayor interacción hidrófoba entre las micelas y el fármaco. También se observa que un bloque hidrófilo de menor longitud favorece la encapsulación, lo cual se debe a que una corteza más corta disminuye la barrera energética para la transferencia del fármaco desde el entorno acuoso hacia el núcleo. Shim y colaboradores reportan que una mayor longitud del bloque de PDMAEMA induce a menores eficiencias de encapsulación, lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio (Shim, Lee et al. 2011).

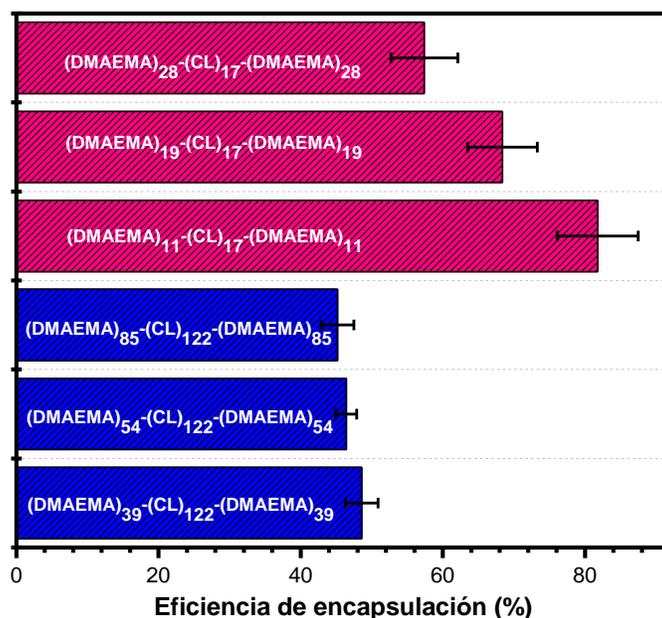


Figura 31. Eficiencia de encapsulación de anfB en función de la composición de los copolímeros

La encapsulación de anfB en micelas poliméricas se ha llevado a cabo por varios grupos de investigación obteniendo resultados diferentes, de acuerdo a la naturaleza del copolímero y al método de encapsulación utilizado. Lavasanifar reporta la encapsulación de anfB en micelas de PEO-*b*- PHSa a través del método de evaporación de solvente, obteniendo eficiencias de 51 a 77%, dependiendo del nivel de sustitución de ácido esteárico (Lavanifar, Samuel et al. 2002). En este mismo tipo de copolímero se evaluó el efecto del método de encapsulación, obteniendo un rendimiento del 73% empleando evaporación de solvente, mientras que con diálisis se produjo un rendimiento del 60% (Lavanifar, Samuel et al. 2001). Se han empleado micelas de PEG-DSPE|colesterol para encapsular este fármaco logrando un porcentaje de encapsulación de 24,2 % (Vakil and S. Kwon 2007). En la investigación realizada por Wang se logró una eficiencia de encapsulación del 97% cuando la proporción de fármaco/polímero fue de 0,47, mostrando que el contenido de fármaco era menor cuando disminuía esta proporción (Wang, Wang et al. 2009). Para copolímeros tribloque de polirotaxano y PEGMA se reportan eficiencias del 46 y 87%, dependiendo del contenido de ciclodextrinas (Zhang, Zhu et al. 2009). Para copolímeros dibloque de PCL-*b*-PDMAEMA se reportan porcentajes de encapsulación entre 46 y 60%, en función de la longitud del bloque de PDMAEMA y la proporción de fármaco/polímero (Shim, Lee et al. 2011). Al comparar las eficiencias de encapsulación obtenidas en esta investigación con las publicadas se observa que se encuentran dentro del rango reportado.

7.3.2 Estado de agregación de la anfotericina B

La toxicidad de la anfB está relacionada con su estado de agregación; cuando este antifúngico está agregado causa toxicidad en las células humanas y forma poros tanto en estas células como en las membranas de las células fúngicas (Bolard, Legrand et al. 1991). Así que una formulación que encapsule y libere la anfB en forma monomérica causa menor toxicidad, debido a que se une preferentemente con el ergosterol, y no con el colesterol (Dupont 2002; Choi, Bang

et al. 2008). Este estado de agregación puede ser determinado a partir del análisis del espectro UV-Vis de la anfB. En las figuras 32 y 33 se muestran los espectros UV-Vis de la anfB en DMSO, en PBS (DMSO 1%) y encapsulada en micelas poliméricas de PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA.

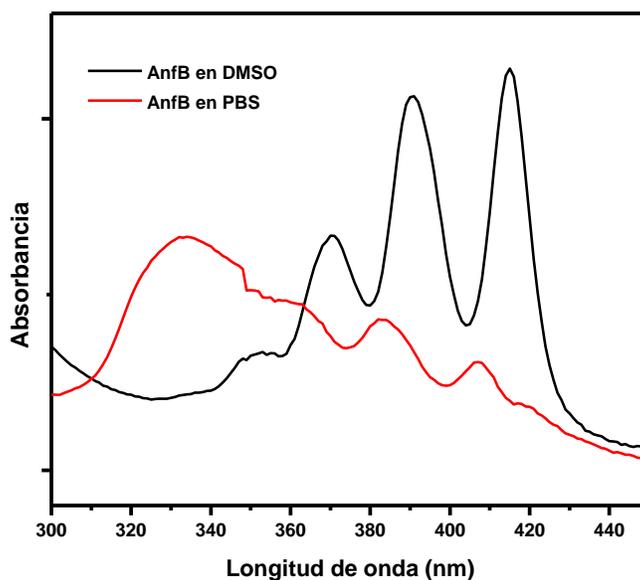


Figura 32. Espectros UV-Vis de absorción de anfB en DMSO y en PBS (+DMSO 1% v/v)

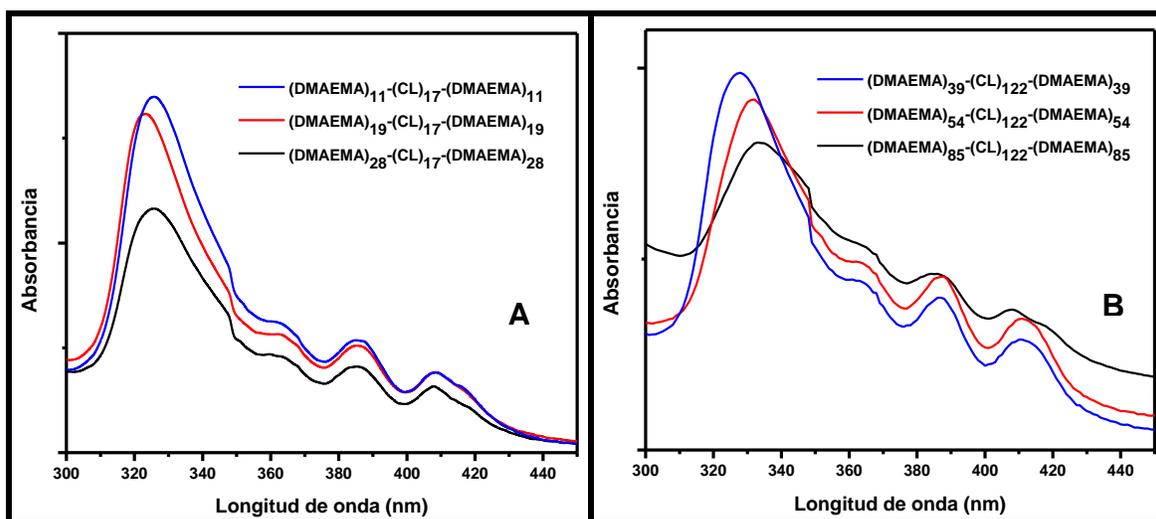


Figura 33. Espectros UV-Vis de absorción de anfB encapsulada en micelas de PMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA 2 KDa (A) y 14 KDa (B)

El espectro de la anfB disuelta en DMSO, en donde la sustancia no está agregada y se encuentra en forma monomérica, está compuesto por cuatro picos característicos en 351, 370, 391 y 415 nm (bandas I, II, III y IV), por otro lado el espectro de la anfB en PBS/DMSO 1% (v/v) muestra un pico ancho hacia 330 nm junto con tres picos en 361, 383 y 407 nm, los cuales son característicos de la agregación de esta sustancia. Al analizar los espectros del fármaco encapsulado en micelas se observan similitudes con espectro de la anfB en PBS, con lo cual se puede inferir que bajo estas condiciones el fármaco se encuentra de manera agregada. Esto puede ser debido a que la anfB está agregada hidrofóbicamente en el núcleo de las micelas. Un comportamiento similar se ha reportado en otras investigaciones en donde se utilizan micelas poliméricas para la encapsulación de este antifúngico (Lavasanifar, Samuel et al. 2002; Shim, Lee et al. 2011).

Como las posiciones e intensidades de las bandas del espectro UV varían de acuerdo a las condiciones utilizadas, la proporción de las intensidades de las bandas I y IV (I/IV) puede ser tomada como un indicativo del estado de agregación de la anfB; esta proporción es baja para el estado no agregado ($<0,3$) (Barwicz, Christian et al. 1992). En la tabla 12 se muestran las relaciones de intensidad de las bandas I y IV para el estado de agregación relativo de la anfB en DMSO, PBS y micelas de copolímero en bloque. Se observa que todas las muestras de anfB encapsulada en micelas se encuentran de manera agregada, pero dependiendo de la composición del copolímero se encuentra en mayor o menor grado. Estas diferencias en las mediciones están relacionadas con el contenido de fármaco inicial del copolímero (Tabla 11). Tal como se ha reportado previamente, a mayor contenido de fármaco, la banda I del espectro UV se hace más prominente aumentando, de esta manera, el estado de agregación. Esto es debido a que las sustancias hidrofóbicas se agregan y cristalizan más fácilmente en los núcleos de las micelas con mayores contenidos de fármaco (Gref, Minamitake et al. 1994; Vakil and S. Kwon 2007).

Tabla 12. Relación de la intensidad de las bandas I y IV (I/IV) del espectro UV para la determinación del estado de agregación relativo de anfB

Solvente de la anfB	Relacion I/IV	Estado de agregación
DMSO	0,29	No agregada
PBS/DMSO 1% v/v	2,16	Agregada
(DMAEMA) ₁₁ -(CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₁₁	4,44	Agregada
(DMAEMA) ₁₉ -(CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₁₉	4,21	Agregada
(DMAEMA) ₂₈ -(CL) ₁₇ -(DMAEMA) ₂₈	3,66	Agregada
(DMAEMA) ₃₉ -(CL) ₁₂₂ -(DMAEMA) ₃₉	3,41	Agregada
(DMAEMA) ₅₄ -(CL) ₁₂₂ -(DMAEMA) ₅₄	2,67	Agregada
(DMAEMA) ₈₅ -(CL) ₁₂₂ -(DMAEMA) ₈₅	2,19	Agregada

El estado de agregación de la anfB ha sido estudiado en varias investigaciones, en donde se ha podido lograr su disminución a través del uso de micelas de copolímeros en bloque. Micelas de PEG-DSPE mostraron a altos contenidos de anfB un estado agregado del fármaco, pero tras la adición de colesterol al copolímero, la relación de los picos I/IV mostró una disminución en el estado de agregación (Vakil and S. Kwon 2007). AnfB encapsulada en micelas de PEO-*b*-PHSA mostraron diferentes grados de agregación dependiendo del nivel de sustitución de ácido esteárico, produciendo su reducción al aumentar sustitución (Lavasanifar, Samuel et al. 2002). Vandermeulen estudió el efecto del método de preparación de las micelas sobre el estado de agregación, demostrando que al disolver la anfB en DMSO primero, seguida de la evaporación del solvente y la adición del polímero favorece la disolución de la anfB en estado monomérico (Vandermeulen, Rouxhet et al. 2006). En la investigación realizada por Shim, el estado de agregación de este fármaco bajo considerablemente al encapsularlo en nanopartículas de PCL-*b*-PDMAEMA (Shim, Lee et al. 2011).

A pesar de que la encapsulación de anfB en las micelas de PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA no afectó en gran medida su estado de agregación, los estudios de liberación *in vitro*, muestran que la liberación de esta sustancia se da en forma

monomérica teniendo en cuenta los espectros UV tomados en los diferentes tiempos (Anexo 2), lo cual favorece la selectividad de la anfB hacia el ergosterol de las células fúngicas, disminuyendo su toxicidad hacia las células humanas.

7.3.3 Liberación *in vitro* de anfotericina B

Se realizó el estudio de la liberación *in vitro* de anfotericina B en una solución acuosa de PBS pH 7.4 a 37°C. La concentración de anfB liberada fue medida a 411 nm empleando espectroscopia UV-Visible (anexo 2). En las figuras 34 y 35, se muestran los perfiles de liberación para los seis tipos de micelas, observándose que estos sistemas liberan el fármaco de manera controlada por más de 160 horas. Los perfiles se caracterizan por una liberación rápida en las primeras 24 horas seguida de una liberación lenta hasta la finalización del estudio. En los copolímeros (DMAEMA)₁₁-(CL)₁₇-(DMAEMA)₁₁ y (DMAEMA)₁₉-(CL)₁₇-(DMAEMA)₁₉ se libera el 60% de la cantidad de anfB medida en el experimento durante el primer día, (DMAEMA)₂₈-(CL)₁₇-(DMAEMA)₂₈ el 70%, (DMAEMA)₃₉-(CL)₁₂₂-(DMAEMA)₃₉ y (DMAEMA)₅₄-(CL)₁₂₂-(DMAEMA)₅₄ el 80% y (DMAEMA)₈₅-(CL)₁₂₂-(DMAEMA)₈₅ el 70% de la cantidad medida.

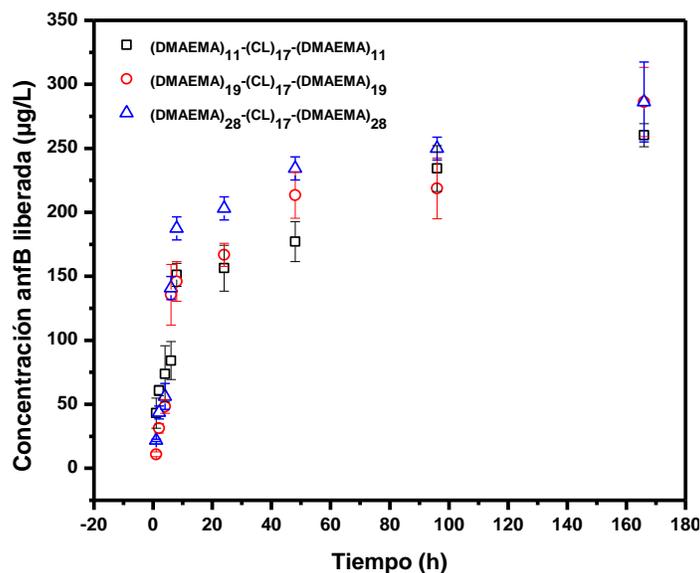


Figura 34. Perfiles de liberación de anfB de las micelas de PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA (PCL 2 KDa) ($n=3$)

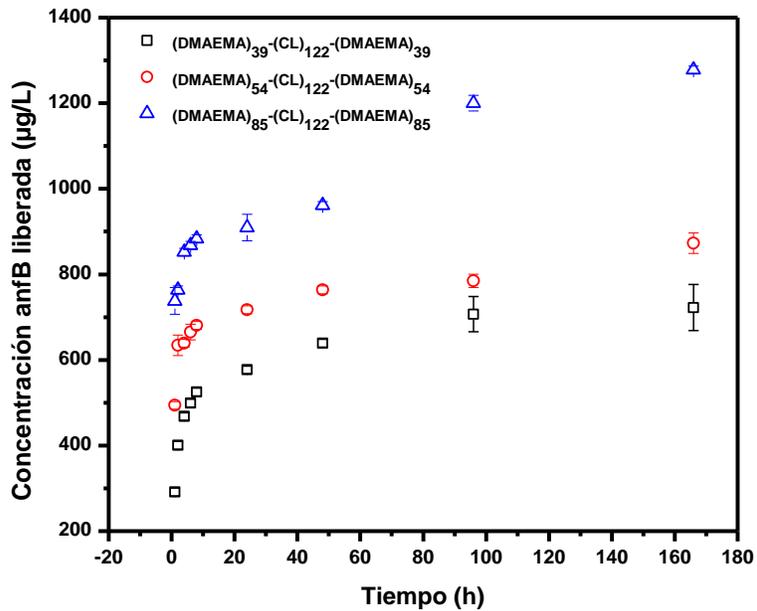


Figura 35. Perfiles de liberación de anfB de las micelas de PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA (PCL 14 KDa) ($n=3$)

Al relacionar los perfiles de liberación de las micelas con la composición del copolímero, se observa que las micelas de 2 KDa liberan una menor cantidad de anfB a lo largo del tiempo, es decir, presentan una liberación más lenta, a pesar de que el contenido de fármaco es mayor (Tabla 8). Este comportamiento ha sido observado por otros autores quienes reportan que las velocidades de liberación más lentas se presentan en las nanopartículas con mayores contenidos de principio activo hidrofóbico (Gref, Minamitake et al. 1994; Kwon, Naito et al. 1995; Jeong, Cheon et al. 1998). Esto se debe a que un mayor contenido de fármaco produce una mayor interacción hidrofóbica entre la sustancia y el núcleo de las micelas, lo cual induce a una liberación más lenta. Asimismo las micelas de 2 KDa presentan un mayor tamaño del núcleo, lo cual dificulta la salida de la anfB al medio.

También se observó que al variar la longitud del bloque hidrófilo de PDMAEMA, manteniendo constante el bloque de PCL, se presentan algunos cambios en los perfiles de liberación. A medida que disminuye la longitud del segmento de

PDMAEMA se libera una menor cantidad de anfB en el tiempo. Esto se debe al contenido de anfB en las micelas, considerando que un bloque hidrófilo corto favorece un mayor contenido de fármaco y por lo tanto, una velocidad de liberación más lenta, tal como se había indicado anteriormente. De esta manera se puede inferir que la longitud del bloque hidrófobo e hidrófilo afecta la velocidad de liberación. Asimismo se observó que la cantidad de anfB liberada por estos sistemas se encuentra por debajo de su concentración crítica de agregación (1.0 µg/mL) (Lavanoifar, Samuel et al. 2002), lo cual permite disminuir la toxicidad de estas formulaciones evitando la formación de agregados en el medio de liberación.

Las micelas de PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA se han empleado para estudios de liberación controlada de fármacos como clorambucil y paclitaxel. En la investigación realizada con clorambucil se encontró que las micelas liberaban de manera controlada el fármaco por más de 100 horas y su velocidad dependía de la longitud del bloque de PDMAEMA, encontrando que al aumentar su longitud se liberaba más rápidamente, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio (San Miguel, Limer et al. 2008). Estos sistemas micelares también fueron aplicados para la entrega de paclitaxel y ARNsi en carcinomas de próstata humano demostrando que las micelas cargadas con este anticancerígeno son más eficaces que el paclitaxel libre (Zhu, Jung et al. 2010).

Varios autores han investigado la liberación controlada de anfotericina B en micelas de copolímeros en bloque. Micelas de PEOz-*b*-PAsp liberaron anfB de manera controlada durante 120 horas alcanzando una liberación acumulada del 60% luego de este tiempo (Wang, Wang et al. 2009). Para micelas de polirotaxano y PEGMA se reporta el 90% de liberación de este antifúngico de manera controlada luego de 7 días (Zhang, Zhu et al. 2009). En la investigación realizada por Yang, el 80% de la anfB encapsulada en micelas de PEG-*b*-PLA fue liberada controladamente en un periodo de 80 horas, demostrando que el comportamiento de liberación depende de la composición química de las micelas poliméricas, ya

que al incrementar la longitud de la cadena de PLA se lograron liberaciones más lentas (Yang, Li et al. 2008).

En el estudio realizado por Vakil se comparó la liberación de AnfB encapsulada en micelas de PEG-DSPE en buffer HEPES y BSA al 4% mostrando una liberación más lenta en el buffer HEPES debido a una mayor formación de agregados en este medio, lo cual dificulta la difusión del fármaco fuera de la membrana de diálisis. Al adicionar colesterol a la estructura de las micelas se logró una liberación aún más lenta (Vakil and S. Kwon 2007). Nanopartículas de PCL-*b*-PDMAEMA exhibieron liberación controlada de anfB tras 4 días de estudio, mostrando que un contenido de fármaco mayor induce a velocidades de liberación más lentas (Shim, Lee et al. 2011), tal como se observó en esta investigación.

7.4 Evaluación de la actividad hemolítica y antifúngica de la anfotericina B encapsulada en micelas

Para desarrollar una nueva formulación de anfB es necesario la realización de pruebas biológicas *in vitro* e *in vivo* que comprueben la reducción de la toxicidad de esta sustancia, conservando su actividad antifúngica. En este estudio se realizaron pruebas biológicas preliminares *in vitro* en donde se evaluó la actividad hemolítica y antifúngica de la anfB encapsulada en micelas de PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA.

7.4.1 Actividad hemolítica de anfotericina B encapsulada en micelas frente a glóbulos rojos humanos

Para evaluar la toxicidad de la anfB encapsulada en micelas de PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA se realizaron experimentos de lisis de glóbulos rojos humanos utilizando diferentes concentraciones de las muestras encapsuladas y comparando los resultados con anfB libre. En la figura 36 se muestran los porcentajes de hemólisis obtenidos.

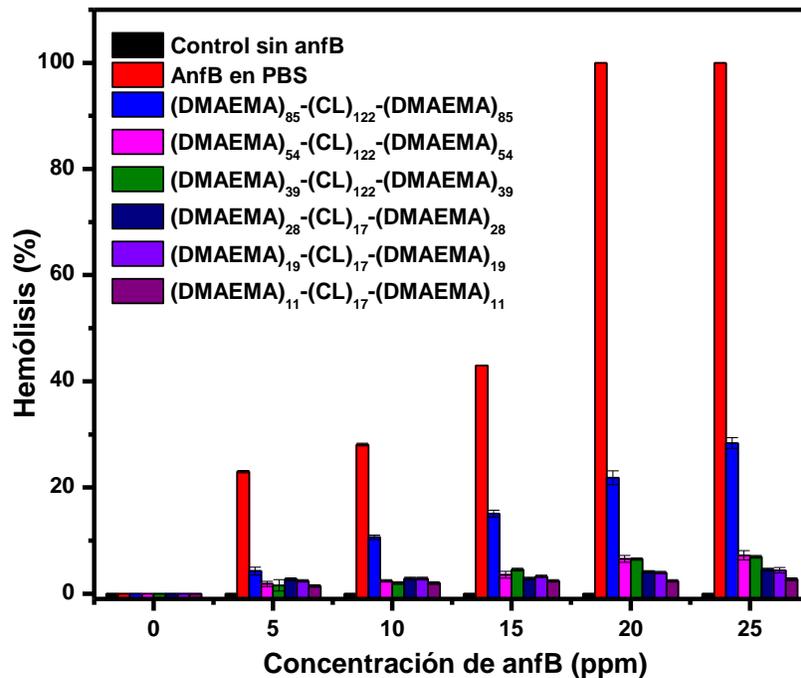


Figura 36. Actividad hemolítica en función de la concentración de anfB encapsulada en micelas de PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA ($n=3$)

Para todas las muestras se observa que la anfB encapsulada presenta porcentajes de hemólisis mucho más bajos que el fármaco libre, asimismo al incrementar su concentración aumenta la actividad hemolítica; en el caso de la anfB libre (en PBS) se presenta un 100% de hemólisis a 20 ppm, mientras que a 25 ppm, las micelas cargadas con anfB tuvieron porcentajes de hemólisis entre 2,7 y 28,4%.

Como se observa en la figura, la composición del copolímero afecta la actividad hemolítica de la anfB. Las micelas basadas en PCL de 2 KDa presentaron los porcentajes de hemólisis más bajos, asimismo se observa que al aumentar la longitud del bloque de PDMAEMA aumenta la lisis de glóbulos rojos. Esto se debe a la velocidad de liberación de la anfB durante el tiempo de incubación con los glóbulos rojos; los copolímeros con las longitudes más cortas del segmento hidrófobo e hidrófilo son los que presentan velocidades de difusión más lentas,

manteniendo una concentración baja del fármaco en el medio de liberación y evitando la formación de agregados, los cuales están relacionados con la toxicidad de esta sustancia frente a células humanas. Resultados similares han sido reportados por otros autores, en donde la toxicidad más baja se logra con las micelas que presentan una difusión más lenta de anfB en el medio (Lavasanifar, Samuel et al. 2001; Adams and Kwon 2003).

La actividad hemolítica de la anfB encapsulada en micelas poliméricas ha sido evaluada en diversas investigaciones. Vandermeulen comparó la hemólisis inducida por fungizon y anfB solubilizada en PEG-p(CL-co-TMC), encontrando un retraso en el inicio de la hemólisis con el uso del copolímero (Vandermeulen, Rouxhet et al. 2006). Adams estudió la actividad hemolítica de este fármaco en micelas de PEO-*b*-p(HASA) durante 24 horas, encontrando una baja toxicidad frente a eritrocitos bovinos, relacionada con una liberación controlada de la droga (Adams and Kwon 2003). Nanopartículas de PCL-*b*-PDMAEMA con anfB mostraron una baja actividad hemolítica al encontrarse el fármaco en estado monomérico (Shim, Lee et al. 2011). AnfB encapsulada en micelas de PEO-*b*-PHSA mostraron diferentes porcentajes de hemólisis dependiendo de la sustitución de ácido esteárico, no siendo toxica completamente hasta una concentración de 22 ppm en los copolímeros con los mayores niveles de sustitución (Lavasanifar, Samuel et al. 2002). Los porcentajes de hemólisis obtenidos en este estudio son más bajos que los reportados por estos autores (excepto Lavasanifar) a las mismas concentraciones de anfB, lo cual es un buen indicio de la posible utilización de las micelas de PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA como una formulación alternativa de anfB.

7.4.2 Actividad antifúngica *in vitro*

Para estudiar el efecto de la encapsulación de anfB en micelas poliméricas sobre su actividad antifúngica se empleó el método de difusión en pozos frente a tres especies de levaduras: *Candida albicans*, *Candida Krusei* y *Candida glabrata*. En

la Figura 37 se muestran las fotografías de los halos de inhibición inducidos por 90 (4,5 μg), 9 (0.45 μg), 0.9 (0,045 μg) y 0.09 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($4,5 \times 10^{-3}$ μg) de anfB encapsulada y libre. Los halos de inhibición se midieron a las 24 horas de incubación y se muestran en la Tabla 13.

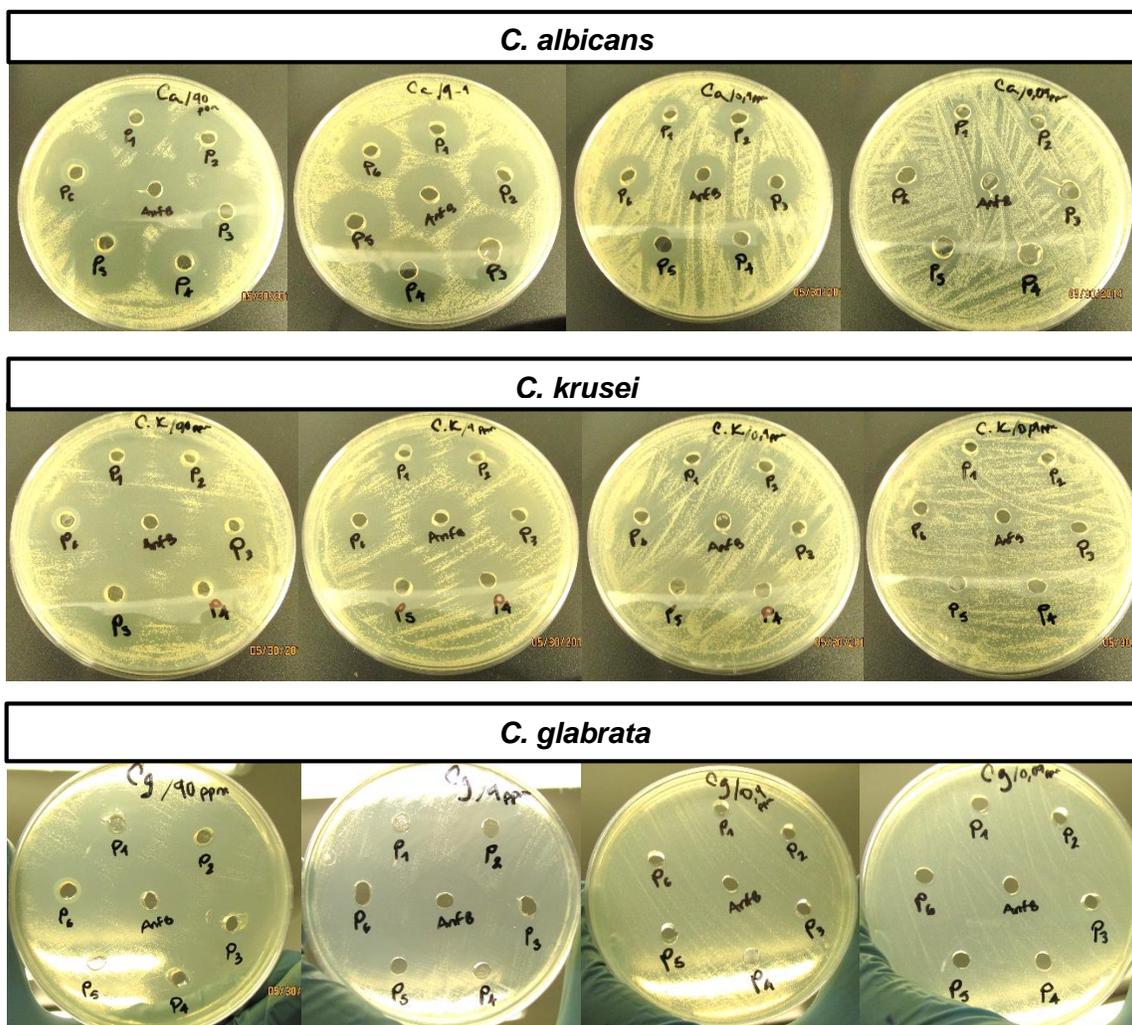


Figura 37. Fotografías de los halos de inhibición inducidos por diferentes concentraciones de anfB encapsulada y libre en tres especies de *Candida*

Tabla 13. Halos de inhibición en mm producidos por anfB libre y encapsulada en micelas de PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA

Levadura	<i>C. albicans</i>				<i>C. Krusei</i>				<i>C. glabrata</i>			
	4,5 µg	0,45 µg	0,045 µg	0,0045 µg	4,5 µg	0,45 µg	0,045 µg	0,0045 µg	4,5 µg	0,45 µg	0,045 µg	0,0045 µg
Libre	24	20	11	5	20	15	10	-	17	16	-	-
P1	19	17	8	3	17	14	9	-	16	16	-	-
P2	19	19	11	4	18	15	10	-	15	16	-	-
P3	19	17	11	4	17	15	10	-	16	15	-	-
P4	20	18	9	4	18	13	8	-	16	14	-	-
P5	20	18	10	5	19	14	9	-	15	16	-	-
P6	21	19	10	5	17	14	10	-	15	15	-	-

^a Libre: anfB en PBS + DMSO <1% v/v

P1: anfB en (DMAEMA)₃₉-(CL)₁₂₂-(DMAEMA)₃₉

P2: anfB en (DMAEMA)₅₄-(CL)₁₂₂-(DMAEMA)₅₄

P: anfB en (DMAEMA)₈₅-(CL)₁₂₂-(DMAEMA)₈₅

P4: anfB en (DMAEMA)₁₁-(CL)₁₇-(DMAEMA)₁₁

P5: anfB en (DMAEMA)₁₉-(CL)₁₇-(DMAEMA)₁₉

P6: anfB en (DMAEMA)₂₈-(CL)₁₇-(DMAEMA)₂₈

Se observa que la anfB encapsulada presenta una inhibición del crecimiento de las levaduras muy similar a la anfB libre, aumentando su potencia al incrementar la concentración. *C. albicans* fue la levadura que presentó mayor sensibilidad frente a las 4 concentraciones empleadas, seguida de *C. krusei*, que no presentó inhibición a 0,09 µg/mL; por otro lado, *C. glabrata* presentó cierta resistencia a la formulación produciendo inhibición del crecimiento solamente al utilizar las concentraciones más altas. Esto es debido a la susceptibilidad de las tres especies frente a la anfB; se ha reportado que *C. Krusei* y *C. glabrata* son menos sensibles a este fármaco en pruebas *in vitro* y muestran un retraso en la cinética de letalidad (Pfaller and Diekema 2007). Los mecanismos bajo los cuales estas especies de *Candida* generan resistencia frente a la anfB incluyen alteraciones en la biosíntesis del ergosterol, lo cual produce una disminución en la cantidad de esta sustancia en la membrana y el incremento en la producción de catalasas, lo que produce una reducción del daño oxidativo asociado al fármaco (Pfaller 2012).

Se realizó una comparación de la inhibición del crecimiento de los hongos producido por la anfB libre y las seis muestras de anfB encapsulada, tomando

como 100% el halo inducido por el fármaco libre. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 38. Se observa que los porcentajes de inhibición de las muestras encapsuladas no presentan diferencias significativas entre sí, que permitan establecer una relación entre la composición del copolímero y la actividad antifúngica; aunque se pueden realizar algunas observaciones generales en este aspecto.

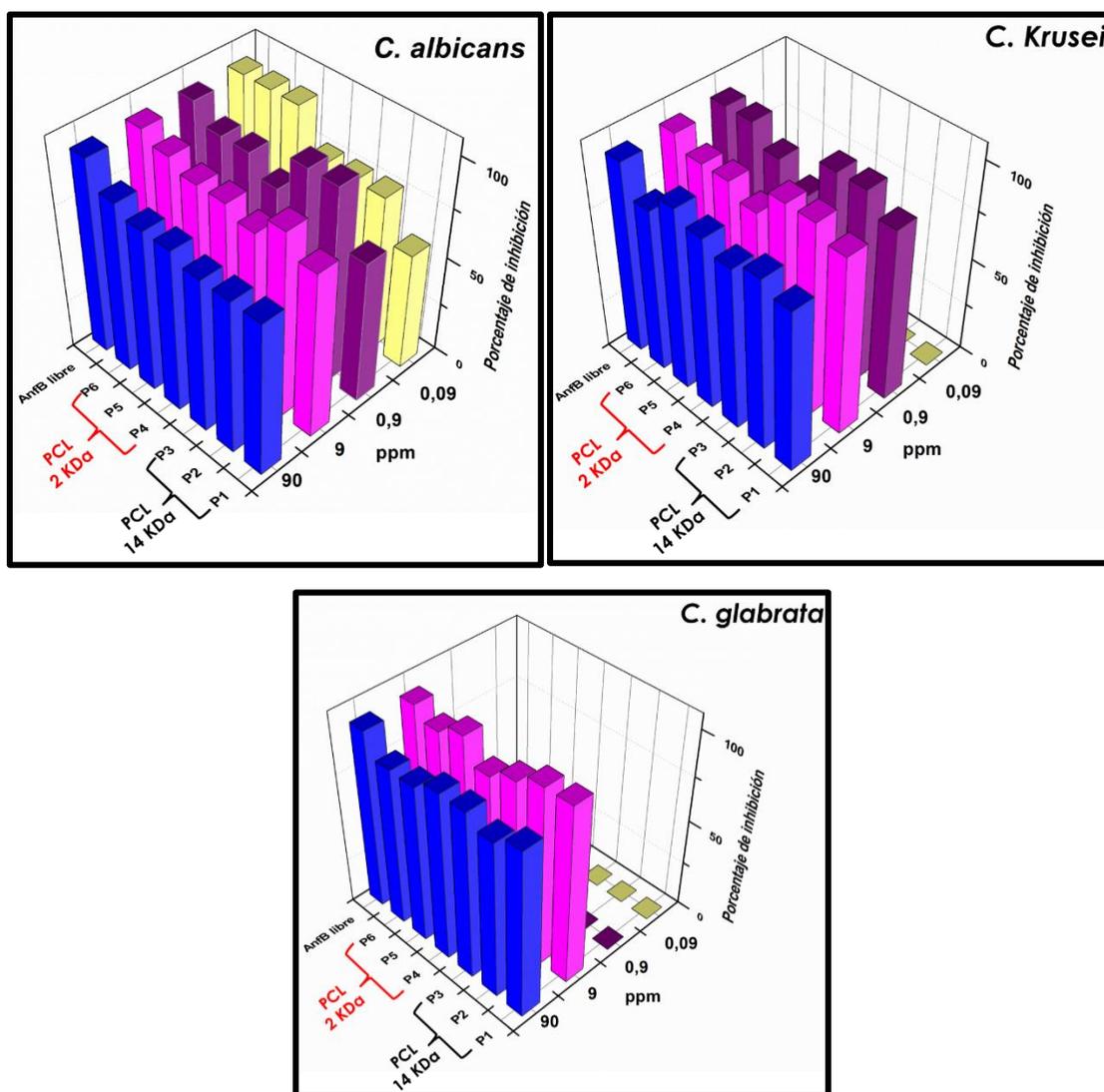


Figura 38. Porcentajes de inhibición comparativos entre la anfB libre y encapsulada en las diferentes muestras de micelas

En el caso de *C. albicans*, la anfB encapsulada en (DMAEMA)₂₈-(CL)₁₇-(DMAEMA)₂₈ (P6) tuvo el efecto antifúngico más alto en las cuatro concentraciones utilizadas; en *C. Krusei*, (DMAEMA)₅₄-(CL)₁₂₂-(DMAEMA)₅₄ (P2) presentó un porcentaje de inhibición del 97% comparado con la anfB libre y en *C. glabrata*, el copolímero que presentó mejores resultados fue (DMAEMA)₃₉-(CL)₁₂₂-(DMAEMA)₃₉ (P1). Para entender el efecto de la composición del copolímero sobre la actividad antifúngica de la anfB encapsulada en micelas poliméricas, es necesario la realización de nuevos experimentos que permitan establecer diferencias significativas entre las formulaciones propuestas.

El estudio de la actividad antifúngica de micelas cargadas con anfB se ha llevado a cabo por algunos investigadores, quienes reportan concentraciones mínimas inhibitorias variables. Potenciales antifúngicos más bajos, similares o mayores a la anfB libre han sido publicadas frente a hongos como *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus* (Lavasaniyar, Samuel et al. 2002; Vandermeulen, Rouxhet et al. 2006; Wang, Wang et al. 2009; Shim, Lee et al. 2011).

8. CONCLUSIONES

A través de esta investigación se sintetizaron copolímeros tribloque anfifílicos con dos segmentos hidrófilos de PDMAEMA unidos a un bloque central hidrófobo de PCL, utilizando polimerización radicalaria por transferencia de átomos y empleando PCL-dibromo como macroiniciador. Se obtuvieron copolímeros del tipo $(\text{DMAEMA})_n\text{-(CL)}_m\text{-(DMAEMA)}_n$ con diferentes grados de polimerización, variando parámetros de síntesis como el peso molecular del macroiniciador, el tiempo de reacción y las relaciones molares de los reactantes. Las composiciones y pesos moleculares de los copolímeros sintetizados se obtuvieron a partir de análisis por FTIR, RMN y GPC. Los valores de dispersión del peso molecular estuvieron cercanos a la unidad, demostrando de esta manera que se mantuvo un control sobre este parámetro. Asimismo, la reacción se caracterizó por seguir un comportamiento cinético de primer orden, indicando que la polimerización fue controlada y mantuvo un carácter viviente.

Los copolímeros tribloque obtenidos formaron micelas esféricas con estructuras del tipo core-shell a partir de su autoensamble en medio acuoso, según observaciones realizadas por AFM y TEM. Los análisis por DLS mostraron diámetros hidrodinámicos promedio entre 46 y 85 nm; por otro lado, las medidas por fluorescencia empleando pireno permitieron determinar la CMC, la cual estuvo en el rango de 0,86 a 7,4 mg/L.

Los resultados demostraron que las propiedades coloidales de las micelas poliméricas son afectadas por la composición de los copolímeros que las conforman; así, a mayor longitud del segmento hidrófobo de PCL, se obtienen menores tamaños promedio y valores de CMC, mientras que, a medida que aumenta el bloque hidrófilo de PDMAEMA, incrementa el valor de estas dos propiedades. Las nanopartículas mostraron sensibilidad a cambios en el pH del medio al analizar su tamaño y CMC. El diámetro hidrodinámico promedio de las

micelas incrementó progresivamente al aumentar el pH desde 5.0 hasta 7.5 debido a la agregación de las partículas; por su parte, los valores de CMC no presentaron diferencias significativas al variar el pH.

El antifúngico anfotericina B pudo ser incorporado en los núcleos de las micelas debido a interacciones hidrófobas, logrando eficiencias de encapsulación entre 45 y 82% dependiendo de la composición del copolímero. La eficiencia de encapsulación incrementa a medida que disminuyen los segmentos hidrófobos e hidrófilos del copolímero, debido a los tamaños de los núcleos y las cortezas micelares. La longitud de los bloques de PCL y PDMAEMA también afectó el estado de agregación de la anfB encapsulada, mostrando que al aumentar su longitud se obtiene un menor grado de agregación del fármaco. Aunque la encapsulación de anfB en micelas de PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA no afectó en gran medida su estado de agregación, los estudios de liberación *in vitro*, mostraron que la liberación de esta sustancia se da en forma monomérica, debido a que las velocidades de difusión son lentas y controladas, además la cantidad de fármaco liberado se encuentra por debajo de su concentración crítica de agregación. Asimismo, la liberación de la anfB encapsulada en micelas puede ser controlada variando la composición del copolímero, a menor longitud de la cadena hidrofóbica e hidrofílica se presentan velocidades de liberación más lentas.

Las pruebas biológicas preliminares *in vitro* mostraron que las micelas cargadas con anfB exhiben una baja toxicidad en comparación con el fármaco libre, teniendo en cuenta los resultados de su actividad hemolítica. Este comportamiento se debe a la liberación de la anfB en forma monomérica, la cual es menos tóxica frente a células humanas, produciendo que el fármaco interactúe selectivamente con el ergosterol de las membranas de células fúngicas. Los porcentajes de hemólisis más bajos se lograron en las micelas con menores longitudes del bloque de PCL y PDMAEMA, lo cual está relacionado con las velocidades de liberación más lentas. La actividad antifúngica de la anfB encapsulada fue similar a la del

fármaco libre, inhibiendo el crecimiento de tres especies de levaduras *C. albicans*, *C. Krusei* y *C. glabrata*.

Este estudio demostró la aplicación potencial de las micelas de PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA como una formulación alternativa para la encapsulación y liberación controlada de anfotericina B, comprobando su estabilidad en términos de CMC y potencial zeta y su capacidad de liberar el fármaco lentamente a través del tiempo. De igual forma se observó una reducción en su toxicidad, sin alterar su acción antifúngica. Finalmente, se evidenció que el control sobre la composición del copolímero puede regular las propiedades fisicoquímicas de las micelas poliméricas, para que de esta manera se pueda mejorar su eficacia según la aplicación escogida.

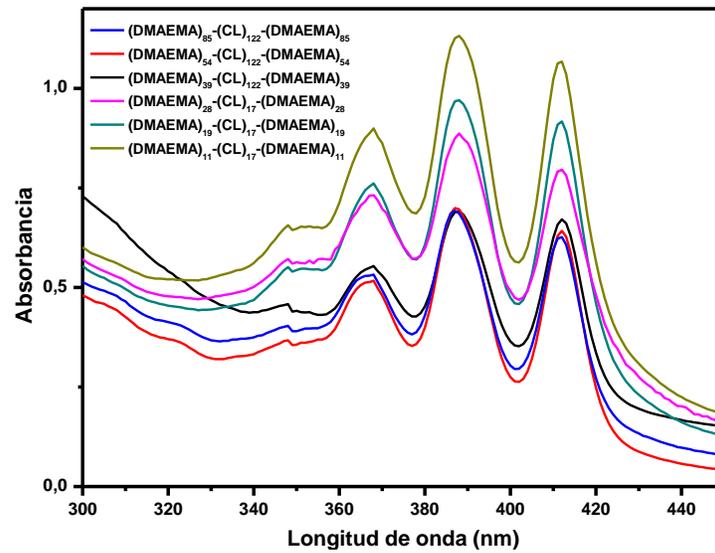
9. PERSPECTIVAS Y APLICACIONES

El estudio realizado es el inicio de nuevas investigaciones que permitan proponer una nueva formulación de anfotericina B. Para ello es necesario llevar a cabo nuevos experimentos, específicamente a nivel biológico, que permitan ampliar los resultados obtenidos. Como el interés primario es proponer una formulación tópica de anfB, se deben realizar estudios de toxicidad frente a cultivos de queratinocitos humanos; asimismo se debe profundizar en la evaluación de la actividad antifúngica del fármaco encapsulado, estableciendo concentraciones mínimas inhibitorias y ampliando las pruebas de sensibilidad hacia hongos dermatofitos y no dermatofitos. Además se podrían realizar pruebas *in vivo*, según los resultados obtenidos en los test *in vitro*. Por otro lado sería interesante comparar la formulación propuesta con las disponibles comercialmente como el desoxicolato sódico y AmBisome, en cuanto a perfiles de liberación, toxicidad y actividad antifúngica.

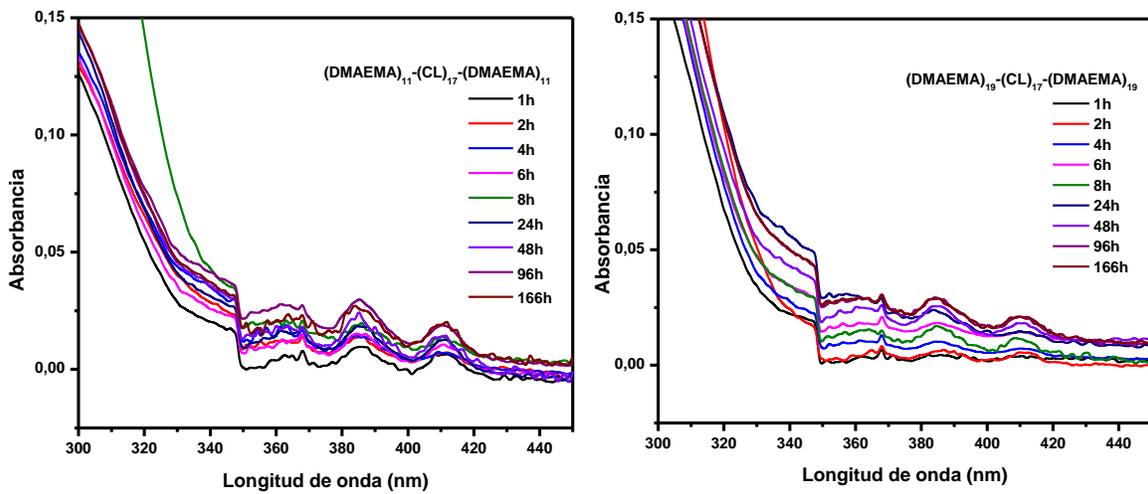
El uso de las micelas de copolímeros en bloque se podría emplear para la encapsulación y liberación de nuevos fármacos con baja solubilidad en agua, como también para principios activos aislados de fuentes naturales de grupos de investigación locales.

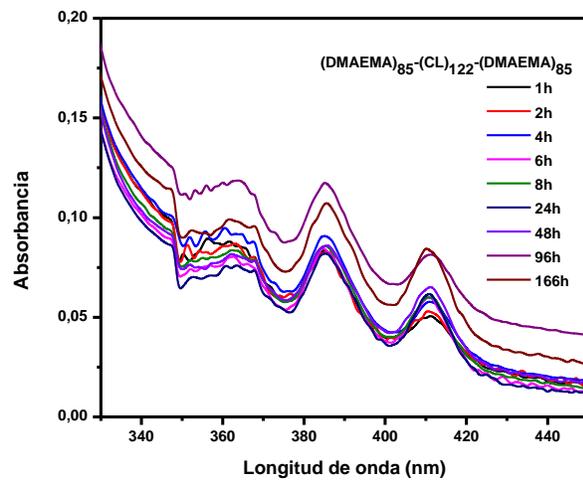
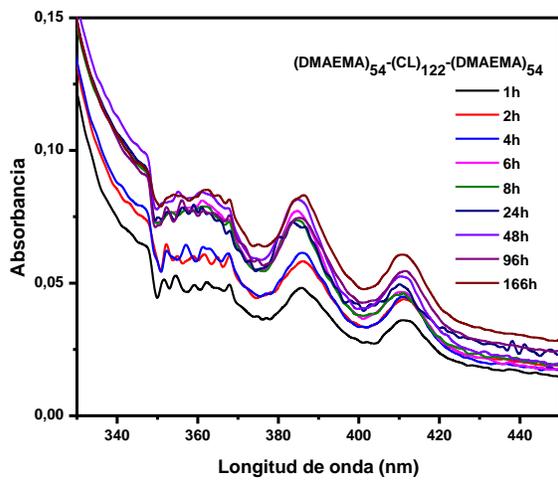
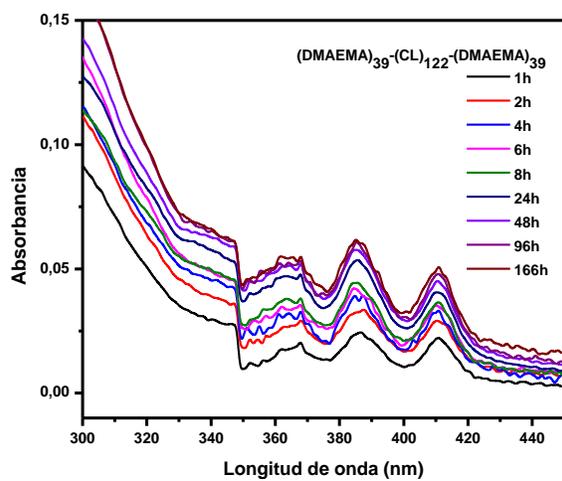
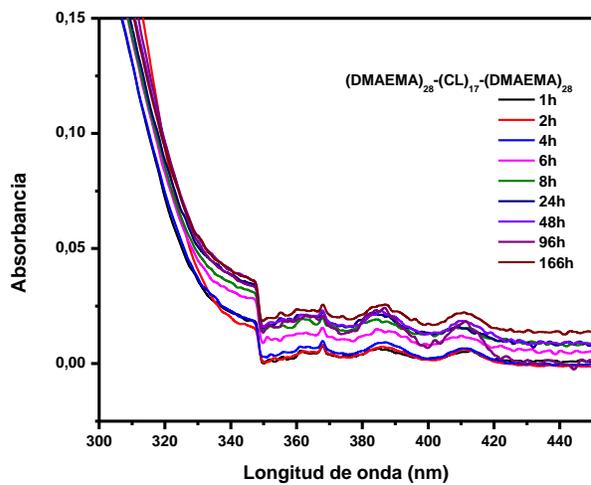
10. ANEXOS

Anexo 1. Espectros UV-Visible de las micelas cargadas con anfB.



Anexo 2. Espectros UV-Visible de anfB liberada de las micelas de copolímeros en bloque.





11. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M. L. and G. S. Kwon (2003). "Relative aggregation state and hemolytic activity of amphotericin B encapsulated by poly (ethylene oxide)-*b*-poly (N-hexyl-L-aspartamide)-acyl conjugate micelles: effects of acyl chain length." Journal of controlled release **87**(1): 23-32.
- Alexandridis, P. and B. Lindman (2000). Amphiphilic block copolymers: self-assembly and applications, Elsevier.
- Aliabadi, H. M., S. Elhasi, et al. (2007). "Encapsulation of hydrophobic drugs in polymeric micelles through co-solvent evaporation: the effect of solvent composition on micellar properties and drug loading." International journal of pharmaceutics **329**(1): 158-165.
- Allen, C., Y. Yu, et al. (1998). "Polycaprolactone-*b*-poly (ethylene oxide) block copolymer micelles as a novel drug delivery vehicle for neurotrophic agents FK506 and L-685,818." Bioconjugate chemistry **9**(5): 564-572.
- Baginski, M., H. Resat, et al. (1997). "Molecular properties of amphotericin B membrane channel: a molecular dynamics simulation." Molecular pharmacology **52**(4): 560-570.
- Baines, F., N. Billingham, et al. (1996). "Synthesis and solution properties of water-soluble hydrophilic-hydrophobic block copolymers." Macromolecules **29**(10): 3416-3420.
- Barwicz, J., S. Christian, et al. (1992). "Effects of the aggregation state of amphotericin B on its toxicity to mice." Antimicrobial agents and chemotherapy **36**(10): 2310-2315.
- Bolard, J., P. Legrand, et al. (1991). "One-sided action of amphotericin B on cholesterol-containing membranes is determined by its self-association in the medium." Biochemistry **30**(23): 5707-5715.
- Bougard, F., M. Jeusette, et al. (2007). "Synthesis and supramolecular organization of amphiphilic diblock copolymers combining poly (N, N-dimethylamino-2-ethyl methacrylate) and poly (ϵ -caprolactone)." Langmuir **23**(5): 2339-2345.
- Braunecker, W. A. and K. Matyjaszewski (2007). "Controlled/living radical polymerization: features, developments, and perspectives." Progress in polymer science **32**(1): 93-146.
- Burt, H. M., X. Zhang, et al. (1999). "Development of copolymers of poly (D, L-lactide) and methoxypolyethylene glycol as micellar carriers of paclitaxel." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **16**(1): 161-171.
- Castelletto, V. and I. Hamley (2004). "Morphologies of block copolymer melts." Current Opinion in Solid State and Materials Science **8**(6): 426-438.
- Coessens, V., T. Pintauer, et al. (2001). "Functional polymers by atom transfer radical polymerization." Progress in polymer science **26**(3): 337-377.
- Charbonneau, C., I. Fournier, et al. (2001). "The interactions of amphotericin B with various sterols in relation to its possible use in anticancer therapy." Biophysical chemistry **91**(2): 125-133.
- Choi, K.-C., J.-Y. Bang, et al. (2008). "Amphotericin B-incorporated polymeric micelles composed of poly (D, L-lactide-*co*-glycolide)/dextran graft copolymer." International journal of pharmaceutics **355**(1): 224-230.
- Dayananda, K., B. S. Pi, et al. (2007). "Synthesis and characterization of pH/temperature-sensitive block copolymers via atom transfer radical polymerization." Polymer **48**(3): 758-762.
- Deray, G. (2002). "Amphotericin B nephrotoxicity." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **49**(suppl 1): 37-41.

Dupont, B. (2002). "Overview of the lipid formulations of amphotericin B." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **49**(suppl 1): 31-36.

Gallis, H. A., R. H. Drew, et al. (1990). "Amphotericin B: 30 years of clinical experience." Review of Infectious Diseases **12**(2): 308-329.

Gao, Z. and A. Eisenberg (1993). "A model of micellization for block copolymers in solutions." Macromolecules **26**(26): 7353-7360.

Gaucher, G., M.-H. Dufresne, et al. (2005). "Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery." Journal of controlled release **109**(1): 169-188.

Goldraich, M. and Y. Talmon (2000). "Direct-imaging cryo-transmission electron microscopy in the study of colloids and polymer solutions." Amphiphilic block copolymers: self assembly and applications. Elsevier, Amsterdam.

Gref, R., Y. Minamitake, et al. (1994). "Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres." Science **263**(5153): 1600-1603.

Groll, A. and T. Walsh (2001). "Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats." Clinical Microbiology and Infection **7**(s2): 8-24.

Guo, S., Y. Huang, et al. (2011). "Amphiphilic and biodegradable methoxy polyethylene glycol-block-(polycaprolactone-graft-poly (2-(dimethylamino) ethyl methacrylate)) as an effective gene carrier." Biomaterials **32**(3): 879-889.

Hamill, R. J. (2013). "Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity." Drugs **73**(9): 919-934.

He, C., S. W. Kim, et al. (2008). "In situ gelling stimuli-sensitive block copolymer hydrogels for drug delivery." Journal of Controlled Release **127**(3): 189-207.

Hermans, P. and T. Keys (1983). Antifungal agents used for deep-seated mycotic infections. Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic.

Jakubowski, W., J. F. Lutz, et al. (2005). "Block and random copolymers as surfactants for dispersion polymerization. I. Synthesis via atom transfer radical polymerization and ring-opening polymerization." Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry **43**(7): 1498-1510.

Jeong, Y.-I., J.-B. Cheon, et al. (1998). "Clonazepam release from core-shell type nanoparticles in vitro." Journal of controlled release **51**(2): 169-178.

Kabanov, A. V. and V. Y. Alakhov (2000). "Micelles of amphiphilic block copolymers as vehicles for drug delivery." Amphiphilic Block Copolymers: Self Assembly and Applications: 134-148.

Kataoka, K., A. Harada, et al. (2001). "Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance." Advanced drug delivery reviews **47**(1): 113-131.

Kim, S. Y. and Y. M. Lee (2001). "Taxol-loaded block copolymer nanospheres composed of methoxy poly (ethylene glycol) and poly (ϵ -caprolactone) as novel anticancer drug carriers." Biomaterials **22**(13): 1697-1704.

Kim, S. Y., I. Shin, et al. (1998). "Methoxy poly (ethylene glycol) and-caprolactone amphiphilic block copolymeric micelle containing indomethacin.: II. Micelle formation and drug release behaviours." Journal of Controlled Release **51**(1): 13-22.

Kwon, G., M. Naito, et al. (1993). "Micelles based on AB block copolymers of poly (ethylene oxide) and poly (β -benzyl L-aspartate)." Langmuir **9**(4): 945-949.

Kwon, G. S., M. Naito, et al. (1995). "Physical entrapment of adriamycin in AB block copolymer micelles." Pharmaceutical research **12**(2): 192-195.

Lavasanifar, A., J. Samuel, et al. (2001). "Micelles self-assembled from poly (ethylene oxide)-block-poly (N -hexyl stearate l-aspartamide) by a solvent

evaporation method: effect on the solubilization and haemolytic activity of amphotericin B." Journal of controlled release **77**(1): 155-160.

Lavasanifar, A., J. Samuel, et al. (2002). "Block copolymer micelles for the encapsulation and delivery of amphotericin B." Pharmaceutical research **19**(4): 418-422.

Lee, A. S., A. P. Gast, et al. (1999). "Characterizing the structure of pH dependent polyelectrolyte block copolymer micelles." Macromolecules **32**(13): 4302-4310.

Letchford, K. and H. Burt (2007). "A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes." European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics **65**(3): 259-269.

Li, W., S.-S. Feng, et al. (2012). "Block copolymer micelles for nanomedicine." Nanomedicine **7**(2): 169-172.

Li, W., M. Nakayama, et al. (2011). "Effect of block compositions of amphiphilic block copolymers on the physicochemical properties of polymeric micelles." Polymer **52**(17): 3783-3790.

Li, X., K. Y. Mya, et al. (2006). "Dynamic and static light scattering studies on self-aggregation behavior of biodegradable amphiphilic poly (ethylene oxide)-poly [(R)-3-hydroxybutyrate]-poly (ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solution." The Journal of Physical Chemistry B **110**(12): 5920-5926.

Liu, S., J. V. Weaver, et al. (2002). "Synthesis of shell cross-linked micelles with pH-responsive cores using ABC triblock copolymers." Macromolecules **35**(16): 6121-6131.

Loh, W. (2002). "Block copolymer micelles." Encyclopedia of surface and colloid science: 802-813.

Loh, X. J., Y.-L. Wu, et al. (2008). "Micellization and phase transition behavior of thermosensitive poly (< i> N</i>-isopropylacrylamide)-poly (ε-caprolactone)-poly (< i> N</i>-isopropylacrylamide) triblock copolymers." Polymer **49**(23): 5084-5094.

Luján, M. C. and C. Pérez Corral (2008). "Cribado para evaluar actividad antibacteriana y antimicótica en plantas utilizadas en medicina popular de Argentina." Revista Cubana de Farmacia **42**(2): 0-0.

Lynd, N. A., A. J. Meuler, et al. (2008). "Polydispersity and block copolymer self-assembly." Progress in polymer science **33**(9): 875-893.

Maiti, S., P. R. Chatterji, et al. (2001). "Aggregation and polymerization of PEG-based macromonomers with methacryloyl group as the only hydrophobic segment." Journal of colloid and interface science **240**(2): 630-635.

Mansour, H. M., M. Sohn, et al. (2010). "Materials for pharmaceutical dosage forms: molecular pharmaceutics and controlled release drug delivery aspects." International journal of molecular sciences **11**(9): 3298-3322.

Matyjaszewski, K. (1998). "Controlled radical polymerization."

Matyjaszewski, K., S. Coca, et al. (1998). "Controlled radical polymerization in the presence of oxygen." Macromolecules **31**(17): 5967-5969.

Matyjaszewski, K., S. G. Gaynor, et al. (1998). "Controlled atom or group-transfer radical polymerization, coupling of molecules, multifunctional polymerization initiators, and formation of telechelic functional material. PCT Int Appl. Wo." PCT Int. Appl. WO **9840415**.

Matyjaszewski, K. and J. Xia (2001). "Atom transfer radical polymerization." Chemical Reviews **101**(9): 2921-2990.

Mespouille, L., P. Degée, et al. (2005). "Amphiphilic poly (< i> N</i>,< i> N</i>-dimethylamino-2-ethyl methacrylate)-g-poly (ε-caprolactone) graft copolymers: synthesis and characterisation." European Polymer Journal **41**(6): 1187-1195.

Mok, M. M., R. Thiagarajan, et al. (2012). "Apparent critical micelle concentrations in block copolymer/ionic liquid solutions: remarkably weak dependence on solvophobic block molecular weight." Macromolecules **45**(11): 4818-4829.

Motala-Timol, S. and D. Jhurry (2007). "Synthesis of PDMAEMA–PCL–PDMAEMA triblock copolymers." European Polymer Journal **43**(7): 3042-3049.

Nair, L. S. and C. T. Laurencin (2007). "Biodegradable polymers as biomaterials." Progress in polymer science **32**(8): 762-798.

Nicolai, T., O. Colombani, et al. (2010). "Dynamic polymeric micelles versus frozen nanoparticles formed by block copolymers." Soft Matter **6**(14): 3111-3118.

O'Reilly, R. K., C. J. Hawker, et al. (2006). "Cross-linked block copolymer micelles: functional nanostructures of great potential and versatility." Chemical Society Reviews **35**(11): 1068-1083.

Pasquali, R. C., D. A. Chiappetta, et al. (2005). "Los Copolímeros en Bloques Anfífilos y sus Aplicaciones Farmacéuticas." acta farmacéutica bonaerense **24**(4): 610.

Pfaller, M. and D. Diekema (2007). "Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem." Clinical microbiology reviews **20**(1): 133-163.

Pfaller, M. A. (2012). "Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment." The American journal of medicine **125**(1): S3-S13.

Rao, J. P. and K. E. Geckeler (2011). "Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters." Progress in polymer science **36**(7): 887-913.

Riess, G. (2003). "Micellization of block copolymers." Progress in polymer science **28**(7): 1107-1170.

Rojas, J., A. García, et al. (2005). "Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales." Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas **4**(2): 28-32.

San Miguel, V., A. Limer, et al. (2008). "Biodegradable and thermoresponsive micelles of triblock copolymers based on 2-(*N,N*-dimethylamino) ethyl methacrylate and ϵ -caprolactone for controlled drug delivery." European Polymer Journal **44**(11): 3853-3863.

Sawaya, B. P., J. P. Briggs, et al. (1995). "Amphotericin B nephrotoxicity: the adverse consequences of altered membrane properties." Journal of the American Society of Nephrology **6**(2): 154-164.

Shim, W. S., S. W. Kim, et al. (2006). "Novel pH sensitive block copolymer micelles for solvent free drug loading." Macromolecular bioscience **6**(2): 179-186.

Shim, Y. H., H. J. Lee, et al. (2011). "Amphotericin B Aggregation Inhibition with Novel Nanoparticles Prepared with Poly (ϵ -caprolactone)/Poly (N, N-dimethylamino-2-ethyl methacrylate) Diblock Copolymer." Journal of microbiology and biotechnology **21**(1): 28-36.

Shuai, X., H. Ai, et al. (2004). "Micellar carriers based on block copolymers of poly (ϵ -caprolactone) and poly (ethylene glycol) for doxorubicin delivery." Journal of controlled release **98**(3): 415-426.

Sieglwart, D. J., J. K. Oh, et al. (2012). "ATRP in the design of functional materials for biomedical applications." Progress in polymer science **37**(1): 18-37.

Sinha, V., K. Bansal, et al. (2004). "Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview." International journal of pharmaceutics **278**(1): 1-23.

Tang, W. and K. Matyjaszewski (2006). "Effect of ligand structure on activation rate constants in ATRP." Macromolecules **39**(15): 4953-4959.

Taylor, P., A. G. Gilman, et al. (1985). "The pharmacological basis of therapeutics." McMillan, New York: 211-219.

Torchilin, V. P. (2001). "Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems." Journal of controlled release **73**(2): 137-172.

Tuzar, Z. and P. Kratochvil (1993). "Micelles of block and graft copolymers in solutions." Surface and colloid science **15**: 1-83.

Tyrrell, Z. L., Y. Shen, et al. (2010). "Fabrication of micellar nanoparticles for drug delivery through the self-assembly of block copolymers." Progress in polymer science **35**(9): 1128-1143.

Uhrich, K. E., S. M. Cannizzaro, et al. (1999). "Polymeric systems for controlled drug release." Chemical Reviews **99**(11): 3181-3198.

Vakil, R. and G. S. Kwon (2007). "Effect of cholesterol on the release of amphotericin B from PEG-phospholipid micelles." Molecular pharmaceutics **5**(1): 98-104.

Vandermeulen, G., L. Rouxhet, et al. (2006). "Encapsulation of amphotericin B in poly (ethylene glycol)-block-poly (ϵ -caprolactone-co-trimethylenecarbonate) polymeric micelles." International journal of pharmaceutics **309**(1): 234-240.

Vogelsinger, H., S. Weiler, et al. (2006). "Amphotericin B tissue distribution in autopsy material after treatment with liposomal amphotericin B and amphotericin B colloidal dispersion." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **57**(6): 1153-1160.

Wang, C.-H., W.-T. Wang, et al. (2009). "Development of polyion complex micelles for encapsulating and delivering amphotericin B." Biomaterials **30**(19): 3352-3358.

Wilhelm, M., C. L. Zhao, et al. (1991). "Poly (styrene-ethylene oxide) block copolymer micelle formation in water: a fluorescence probe study." Macromolecules **24**(5): 1033-1040.

Xing, L. and W. L. Mattice (1997). "Strong solubilization of small molecules by triblock-copolymer micelles in selective solvents." Macromolecules **30**(6): 1711-1717.

Xu, F., K. Neoh, et al. (2009). "Bioactive surfaces and biomaterials via atom transfer radical polymerization." Progress in polymer science **34**(8): 719-761.

Yan, Q., J. Yuan, et al. (2009). "Cellulose-based dual graft molecular brushes as potential drug nanocarriers: stimulus-responsive micelles, self-assembled phase transition behavior, and tunable crystalline morphologies." Biomacromolecules **10**(8): 2033-2042.

Yang, Z. L., X. R. Li, et al. (2008). "Amphotericin B-loaded poly (ethylene glycol)-poly (lactide) micelles: Preparation, freeze-drying, and in vitro release." Journal of Biomedical Materials Research Part A **85**(2): 539-546.

Yoon, H.-J. and W.-D. Jang (2010). "Polymeric supramolecular systems for drug delivery." Journal of Materials Chemistry **20**(2): 211-222.

Zhang, W., J. He, et al. (2010). "Biocompatible and pH-responsive triblock copolymer mPEG-b-PCL-b-PDMAEMA: Synthesis, self-assembly, and application." Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry **48**(5): 1079-1091.

Zhang, X., X. Zhu, et al. (2009). "Preparation and self-assembly of amphiphilic triblock copolymers with polyrotaxane as a middle block and their application as carrier for the controlled release of Amphotericin B." Polymer **50**(18): 4343-4351.

Zhu, C., S. Jung, et al. (2010). "Co-delivery of siRNA and paclitaxel into cancer cells by biodegradable cationic micelles based on PDMAEMA-PCL-PDMAEMA triblock copolymers." Biomaterials **31**(8): 2408-2416.