



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LOS MATERIALES

ESTUDIO DE SISTEMAS MICELARES ORIGINADOS EN MEDIO ACUOSO POR
COPOLÍMEROS ANFIFÍLICOS EN BLOQUE Y RAMIFICADOS.

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN QUÍMICA

BETZABÉ ACEVEDO PIZARRO

PROFESOR GUÍA

Dr. FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ

MIEMBROS DE LA COMISION:

Dr. ANDRÉS OLEA CARRASCO

Dr. ALEXIS ASPEE LAMAS

Dr. CLAUDIO TERRAZA INOSTROZA

Dra. MARCELA URZÚA ACEVEDO

Dr. MEHRDAD YAZDANI-PEDRAM

SANTIAGO DE CHILE

2015

RESUMEN DE TESIS PARA OPTAR AL
GRADO DE: DOCTOR EN QUÍMICA.
POR: Betzabé Acevedo Pizarro
FECHA: 05/03/2015
Profesor Guía:
Dr. Francisco Martínez Díaz

ESTUDIO DE SISTEMAS MICELARES ORIGINADOS EN MEDIO ACUOSO POR COPOLÍMEROS ANFIFÍLICOS EN BLOQUE Y RAMIFICADOS.

En este trabajo de tesis se realizó un estudio sobre la formación de agregados por copolímeros en bloque lineales e hiper ramificados en disolución acuosa. Estos agregados proporcionan un medio no polar donde es posible solubilizar moléculas orgánicas, lo que podría ser usado para almacenar y/o transportar moléculas con actividad biológica.

Los copolímeros estudiados contienen un bloque polar de 2-hidroxietil metacrilato, HEMA, y bloques de poliglicidol, PG, o poli(metil metacrilato), PMMA. Los copolímeros en bloque PG-PHEMA y PMMA-PHEMA fueron sintetizados mediante polimerización radicalaria usando la técnica ATRP, cuya principal ventaja es la de poder controlar la composición, crecimiento y distribución del peso molecular de los sistemas polimerizados. Los homopolímeros y copolímeros sintetizados fueron obtenidos con distribuciones estrechas y monomodales de pesos moleculares. Las caracterizaciones se realizaron empleando técnicas de SEC, TGA, DSC, RMN-¹H, IR-FT, RMN-¹³C y MALDI-TOF.

El copolímero en bloque PG-PHEMA mantiene la estructura tipo dendrímero que posee el PG. Así, este copolímero en disolución acuosa genera micelas unimoleculares, es decir agregados formados por una única macromolécula. En cambio, el copolímero en bloque PMMA-PHEMA forma estructuras micelares en las que se agregan un número importante de macromoléculas.

Con el fin de comparar ambos sistemas se estudió el fenómeno de agregación en relación a parámetros tales como la concentración micelar crítica y tamaño de los agregados. El tamaño de los sistemas micelares se estudió en función de la naturaleza y largo relativo de los bloques. La micropolaridad de los microdominios formados se evaluó usando pireno como sonda fluorescente y midiendo su fluorescencia tanto en estado estacionario como resuelta en el tiempo. Los resultados muestran que los sistemas micelares formados por PMMA-PHEMA tienen valores de CMC del orden de 10^{-7} M. También se observó que en general la micropolaridad de los microagregados no depende drásticamente del número de unidades del grupo hidrofóbico que conforman el corazón de la micela.

Los estudios de solubilización y liberación de fármacos desde las micelas poliméricas se hicieron usando diferentes familias de compuestos. El primer grupo está formado por fármacos antibacterianos de origen comercial, Tinidazol, Ornidazol, y Metronidazol, y una serie de imidazoles modificados con cadenas alquílicas laterales de diferente largo. El segundo grupo es una familia de fenoles sustituidos con cadenas laterales de largo variable.

La evaluación de la capacidad de incorporación de estos compuestos a los agregados micelares, se hizo determinando las constantes de distribución entre la fase acuosa y la fase micelar. Los resultados muestran que la solubilización de fenoles y nitroimidazoles modificados, tanto en micelas multimoleculares de PMMA-PHEMA como en micelas unimoleculares de PG-PHEMA, está determinada principalmente por el grupo aromático y depende moderadamente de la longitud de los grupos alquilo presente en la cadena lateral. Finalmente, el estudio de liberación mostró que la velocidad de liberación depende del tipo de micela polimérica desde donde se produce la liberación. Para el caso de micelas formadas por PG-PHEMA las liberaciones muestran constantes de velocidad más grandes que para el caso de micelas formadas por PMMA-PHEMA.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	2
TABLA DE CONTENIDO	3
INTRODUCCIÓN	4
HIPÓTESIS	9
OBJETIVOS	10
OBJETIVOS GENERALES Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
2. MATERIALES Y MÉTODOS	11
2.1 MATERIALES USADOS	11
2.2 SINTESIS DE COPOLÍMEROS EN BLOQUE	11
2.3 CARACTERIZACIÓN DE COPOLÍMEROS EN BLOQUE	15
2.4 FORMACIÓN DE MICROAGREGADOS DE LOS COPOLÍMEROS EN BLOQUES ANFIFÍLICOS EN SOLUCIÓN ACUOSA	16
2.5 CARACTERIZACIÓN DE MICELAS DE COPOLÍMEROS EN BLOQUES ANFIFÍLICOS EN SOLUCIÓN ACUOSA	18
2.6 EXPERIMENTOS DE ULTRAFILTRACIÓN	19
2.7 ESTUDIO DE LIBERACIÓN DE MOLECULAS ORGÁNICAS DESDE LAS MICELAS POLIMÉRICAS	19
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4. CONCLUSIONES	78
5. BIBLIOGRAFÍA	80

INTRODUCCIÓN

Durante la última década, la aplicación de nanotecnología en medicina ha emergido como una nueva área, en la cual se utilizan nano materiales para la liberación de drogas, genes, y agentes de contraste. Nano partículas son entidades coloidales con tamaños por debajo de los submicrones, y debido a su tamaño similar al de los virus (<100 nm), pueden penetrar a través de capilaridades permeables, generando una acumulación en sitios específicos, y ser incorporados por células vía endocitosis. Las nano partículas que poseen una capa externa hidrofílica pueden evadir el reconocimiento por el sistema retículo endotelial (SRE) y así logran un tiempo de circulación prolongado. Estos materiales modulan la biodistribución y metabolismo de drogas antitumorales sin producir daño en el tejido sano. La acumulación en tejido canceroso se debe al efecto de mayor permeabilidad y retención, esto es, mayor permeabilidad de capilaridades en tumores y pobre drenaje linfático producen atrapamiento de macromoléculas y partículas coloidales en tejidos cancerosos.

A la fecha, los nano materiales usados como sistemas de liberación de drogas (SLD) incluyen liposomas, conjugados polímero/droga, complejos polímero/DNA, dendrímeros, y micelas poliméricas (Figura 1).

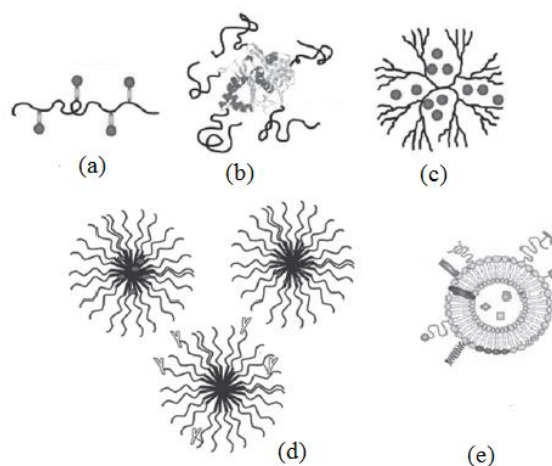


Figura 1. Sistemas nanoestructurados, micelas y vesículas: (a) Conjugado fármaco-polímero; (b) conjugado proteína-polímero; (c) dendrímeros; (d) micelas; (e) liposomas.

De los diversos sistemas para transporte de droga, las nano partículas formadas por polímeros han mostrado una cantidad de características y ventajas sobre los otros tipos de transportes: aplicabilidad a una gran variedad de agentes terapéuticos; fácil encapsulación sin modificación química de la droga; formación de agregados muy simple; alta capacidad de carga; y liberación controlada de la droga. Así, en los últimos años se ha visto un enorme esfuerzo en el desarrollo de nuevos sistemas SLD basados principalmente en polímeros anfifílicos¹⁻⁷. Entre éstos se puede nombrar polielectrolitos hidrofóbicos (PEH), polielectrolitos hidrofobicamente modificados (PEHM), y copolímeros en bloque anfifílicos.

Polímeros anfifílicos

Un polímero anfifílico es una macromolécula que posee regiones de diferente polaridad a lo largo de la cadena principal. Esto se puede lograr generando una carga formal sobre la cadena lateral o bien aumentando el número de grupos hidrofóbicos sobre la cadena principal o lateral.

El primer ejemplo de un PEH fue dado por Strauss⁸ al hacer reaccionar poli(vinilpiridina) con dodecilmuro. En este caso todas las unidades repetitivas con una piridina que ha reaccionado es anfifílica y por lo tanto su estructura es similar a la de surfactantes normales. Una gran variedad de PEH se ha obtenido a partir de copolímeros alternantes de anhídrido maléico con monómeros hidrofóbicos tales como: estireno⁹⁻¹¹, olefinas^{12,13}, *n*-alquilviniléteres^{14,15}. Estos copolímeros son transformados en PEH por hidrólisis del anhídrido en medio básico. Otros ejemplos de PEH son ácidos poli(carboxílicos) tales como poli(ácido metacrílico) PMA, los cuales generan una carga negativa al aumentar el pH de la disolución^{16,17}.

Por otra parte, la hidrofobicidad de un polielectrolito puede aumentarse incorporando grupos hidrofóbicos a la cadena principal o lateral. Esto puede lograrse por copolimerización directa de monómeros de distinta polaridad, injerto de polímeros hidrofílicos a polímeros hidrofóbicos, o reacción química de un grupo existente en la cadena. Esta última reacción genera polímeros modificados hidrofóbicamente PEMH en los cuales los grupos hidrofóbicos se distribuyen al azar a lo largo de la cadena de polímero. Por ejemplo, la reacción de poli(ácido acrílico) con aminas alquílicas lleva a la formación de PEMH con cadenas alquílicas de diferente largo unidas a la cadena principal¹⁸⁻²⁰. Copolímeros de anhídrido maléico han sido modificados por hidrólisis del anhídrido con alcoholes^{21,22} y aminas alifáticas²³ de diferente largo de cadena.

Los copolímeros en bloque están formados por dos o más bloques dispuestos en una secuencia lineal. Un bloque es una porción de una macromolécula que comprende varias unidades consecutivas, que tiene al menos una característica que no está presente en las porciones adyacentes. Existen copolímeros formados por dos o tres bloques a los que se suelen simbolizar, respectivamente como AB y ABA o BAB, donde A y B son los bloques poliméricos. Otros tipos de copolímeros formados por bloques son los copolímeros de injerto y los copolímeros estrella. Los copolímeros de injerto están constituidos por macromoléculas con uno o más tipos de bloques conectados a una cadena principal formando cadenas; estas cadenas laterales tienen características constitutivas o configuracionales diferentes a las de la cadena principal. Los copolímeros estrella, también conocidos como polímeros hiper ramificados o tipo dendrímeros, son macromoléculas que contienen un punto de ramificación del cual emanan cadenas lineales que terminan en grupos polares, tales como –OH, lo cual le confiere una alta solubilidad en agua. El punto de ramificación del cual emanan *f* cadenas lineales se designa como un punto de ramificación *f*-funcional, por ejemplo pentafuncional²⁴. A diferencia con los dendrímeros que poseen una estructura muy bien definida, estos polímeros hiper ramificados son estructuralmente menos definidos pero pueden ser sintetizados más fácilmente en una reacción de polimerización de una sola etapa^{25,26}.

Un copolímero en bloque A-B o A-B-A puede ser sintetizado de modo tal que la región A sea hidrofílica, mientras la región B sea hidrofóbica, generándose un sistema anfifílico que se caracteriza por tener regiones de diferente polaridad e incompatibles entre sí. Copolímeros en bloque que contienen bloques biodegradables son de mucho interés ya que al degradarse producen monómeros biocompatibles y por lo tanto pueden ser usados en aplicaciones biomédicas tales como SLD. La mayoría de las combinaciones usadas tienen como bloque polar al poli(óxido de etileno) PEO debido a su seguridad y variedad de diseños químicos disponibles. Algunos ejemplos son copolímeros dibloque PEO-poli(ésteres), PEO-poli(aminoácidos) y copolímeros tribloque de PEO y poli(óxido de propileno) PPO. Estos últimos están disponibles en un amplio rango de pesos moleculares y diferentes composiciones. Entre los polímeros que forman dendrímeros destacan poli(lisina), poli(ésteres) y poli(glicerol). Este último ha sido muy estudiado debido a su biocompatibilidad.

Autoagregación de Polímeros Anfifílicos

En disolución acuosa, las moléculas anfifílicas normales se agregan formando micelas. Las micelas pueden tener diferentes tamaños y formas, pero generalmente son esféricas, con un corazón hidrófobo y una corona hidrofílica. El número de agregación indica el número de moléculas que forman parte del agregado y en micelas pequeñas este número es del orden de 100. La formación de micelas es el resultado del balance entre la interacción hidrofóbica y la repulsión electrostática de los grupos cargados. El efecto hidrofóbico se origina en el cambio de entropía producido al localizar una molécula no polar en una cavidad acuosa^{27,28}. Un cambio de entropía positivo se atribuye a la reorganización del agua después que una molécula no polar ha sido removida. Así, la formación de micelas requiere de dos fuerzas que se contraponen: la interacción hidrofóbica que es la fuerza que impulsa la agregación y la repulsión electrostática que impide el crecimiento ilimitado de las micelas. En consecuencia, la formación de micelas es un proceso cooperativo donde un número de moléculas anfifílicas participa simultáneamente. La concentración a la cual ocurre la agregación se conoce como concentración micelar crítica CMC, y está relacionado al cambio de energía libre por monómero $\Delta G^0 = RT \ln CMC$.

En el caso de PEH y PEMH, la presencia de grupos no polares unidos a la cadena del polímero tiene dos efectos principales: efecto hidrofóbico e interacciones atractivas de largo alcance. Estas fuerzas atractivas se oponen a la repulsión electrostática de los grupos iónicos del polímero. Así, la conformación adoptada por la macromolécula es un balance delicado entre estas fuerzas opuestas. El balance entre estas dos fuerzas puede ser modulado reduciendo la interacción electrostática o bien aumentando el número de grupos no polares por reacción química en la cadena lateral. En PEHM la cantidad de grupos no polares puede ser aumentada por copolimerización, y así se han estudiado copolímeros al azar, copolímeros alternantes y copolímeros en bloque.

En disolución acuosa la autoagregación de PEH y PEHM puede llevar a agregados intra o interpoliméricos. Agregados intra poliméricos son formados a bajas concentraciones de polímero y han sido denominados micelas poliméricas o micelas unimoleculares. Micelas interpoliméricas son formadas por copolímeros en bloque a muy bajas concentraciones, y por PEH y PEHM a altas concentraciones. Para estas dos clases de agregados el significado del número de agregación y concentración de agregación crítica (CAC) es muy diferente. Para micelas unimoleculares el número de agregación corresponde al número de monómeros que forman parte del agregado, y como la formación de agregados es independiente de la concentración de polímeros, no existe una CAC. Para micelas interpoliméricas el número de agregación es el número de cadenas poliméricas que forman el agregado, y la CAC es la concentración de cadenas de polímero a la cual se forman los agregados.

Las micelas unimoleculares corresponden a una estructura globular relativamente compacta que adoptan las cadenas de PEH y PEMH cuando el efecto hidrofóbico es mayor que la repulsión electrostática entre los grupos cargados. Sin embargo, la repulsión puede crecer al aumentar la densidad de carga en la cadena a pH más alto (aumenta la disociación de ácidos carboxílicos débiles) y con esto, la cadena se estira. Esta transición entre la forma compacta y la forma estirada de una cadena polimérica ha sido observada para una variedad de PEH tales como poli(ácido metacrílico), copolímeros alternantes de anhídrido maléico con estireno, *n*-alquilvinil éteres, y olefinas. También ha sido observada en PEMH derivados de copolímeros alternantes de anhídrido maléico y estireno.

Un caso especial lo constituyen los copolímeros estrella en los cuales la macromolécula posee una estructura globular altamente ramificada.

Micelas Interpoliméricas

La autoagregación de un copolímero anfifílico en agua ocurre principalmente por el efecto hidrofóbico y lleva a la formación de micelas interpoliméricas. Para copolímeros en bloque los valores de la CAC son dos órdenes de magnitud menores que para detergentes normales.

En estas micelas, los bloques no polares se asocian generando una región no polar hidrocarbonada, la cual se encuentra separada del solvente polar por una corona formada por los bloques hidrofílicos que se orientan hacia el solvente acuoso exterior²⁹.

Los copolímeros en bloque forman agregados multimoleculares con diferentes morfologías dependiendo de parámetros tales como estructura química, composición y concentración de la proporción relativa de los bloques^{30,31}. Micelas tipo estrella se forman cuando el largo del bloque hidrofílico es mucho mayor que el bloque hidrofóbico. Para las micelas estrella, donde el bloque hidrofílico es PMA, la teoría predice dos regiones diferentes en la corona, esto es la corona interna que está formada por segmentos de PMA donde los grupos ácidos están no ionizados, y la corona externa compuesta por secciones de PMA con alta densidad de carga debido a la ionización de los grupos ácido³². En el caso contrario se forman agregados del tipo “crew-cut”³³ cuyo corazón es muy voluminoso comparado con la corona que es muy corta. Se han encontrado diversas morfologías para agregados *crew-cut* como micelas esféricas, micelas largas compuestas, vesículas^{34,35} y cilindros^{36,37}. En general, el tamaño de las micelas poliméricas es del orden de 10-100 nm.

Una característica única de las micelas formadas por copolímeros en bloque es la versatilidad de la estructura corazón/corona. Estudios con micelas formadas por copolímeros en bloque basados en PEO han demostrado que los bloques PEO previenen el reconocimiento de las micelas por el sistema retículo endotelial, aumentando el tiempo de residencia en el plasma. En disolución acuosa los copolímeros PEO-PPO-PEO originan micelas cuyo corazón está formado por el bloque PPO y la corona hidrofílica la constituye los grupos PEO.

Encapsulación de drogas por micelas poliméricas

La capacidad de las micelas poliméricas de disolver una gran variedad de sustratos ha llevado a su uso como sistemas de almacenamiento y liberación de drogas. La mayoría de las micelas poliméricas, que se han propuesto como sistemas transportadores de drogas STD, son de forma esférica donde los segmentos no polares forman un corazón hidrofóbico, mientras los segmentos hidrofílicos forman la corona o capa exterior de la micela. El corazón hidrofóbico sirve como medio para la incorporación de drogas lipofílicas, mientras que la corona polar evita la agregación micelar y asegura la solubilidad de las micelas. La ubicación de la droga en el agregado depende de las interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y específicas entre la droga y las unidades monoméricas. Así, una droga se incorpora a un agregado polimérico por atrapamiento físico o por reacción para formar un conjugado.

Micelas Intrapoliméricas.

La mayoría de los estudios de incorporación de drogas a nano contenedores han sido realizados con copolímeros en bloque anfifílicos. Sin embargo, algunos ejemplos de solubilización de drogas en PEHM han sido reportados^{38,39}. Copolímeros de anhídrido maleico han sido utilizados en medicina y farmacia como drogas *per se*, y transportadores de droga^{38,39}. Las principales razones de su uso potencial son: biocompatibilidad, estructura dependiente del pH, la hidrofobicidad puede ser modulada cambiando el comonomero o por reacción del grupo anhídrido con aminas o alcoholes alifáticos. Además, la reactividad del grupo anhídrido proporciona una ruta para la formación de conjugados por reacción con drogas^{40,41} o proteínas⁴². Finalmente, se ha demostrado que copolímeros de vinilpirrolidona y MA son potenciales vehículos de drogas dirigidas al hígado⁴³.

Micelas Interpoliméricas

Copolímeros tribloque. El uso de micelas formadas por PEO-PPO-PEO como STD fue inicialmente propuesto por el grupo de Kabanov⁵, al cual siguieron muchos otros⁶. El grupo de Kabanov demostró que el transporte de drogas al cerebro es favorecido por micelas de Pluronic (P85)⁴⁴. También han demostrado que la encapsulación de DOX (Doxorrubicina) en micelas de Pluronic (L61 y F127) aumenta los efectos antitumorales de esta droga⁴⁵.

Copolímeros dibloque.

Para las micelas estrella, donde el bloque hidrofílico es PMA, una molécula hidrofóbica se puede localizar tanto en el corazón de la micela como en su corona interna. Recientemente, se ha demostrado que el pireno se distribuye entre estas dos regiones micelares⁴⁶.

La aplicación de micelas formadas por copolímeros dibloque que contienen un corazón de poli(aminoácidos) ha sido desarrollada por el grupo de Kataoka⁴⁷. Las propiedades de micelas de PEO-PCL fueron estudiadas por fluorescencia, usando Rhodamina como sonda fluorescente⁴⁸.

La cinética de liberación de moléculas hidrofóbicas desde micelas poliméricas es un factor importantísimo en la posible aplicación de estos agregados como SLD⁴⁹. Si la micela es estable, la ubicación de las moléculas dentro de la micela afectará fuertemente la velocidad de salida. A pesar de que la mayoría de los copolímeros dibloque usados como SLD forman micelas tipo estrella, la incorporación de sustratos a la corona interna no ha sido estudiada.

En este trabajo se propone realizar un estudio sobre la capacidad de solubilizar moléculas orgánicas, y el posible uso como transporte de drogas, de copolímeros basados en 2-hidroxietil metacrilato, HEMA. Para ello se sintetizarán copolímeros en bloque formados por PG-PHEMA y PMMA-PHEMA. Estos sistemas formarán, en solución acuosa, dos tipos diferentes de agregados y esta diferencia se debe exclusivamente a su constitución química. En el caso de PG-PHEMA se originarán micelas unimoleculares donde el núcleo está formado por PG hiper ramificado. El PG es un poliéter y un polialcohol, que se prepara en una síntesis controlada y se caracteriza por su arquitectura globular y compacta semejante a un dendrímero bien definido⁵⁰. Los grupos hidroxilos terminales son factibles de funcionalizar en reacciones posteriores⁵¹. La principal característica de estos agregados es que existen en todo el intervalo de concentración del polímero y por lo tanto no existe una CMC.

Por otro lado, los agregados micelares formados por PMMA-PHEMA darán origen a micelas poliméricas intermoleculares cuyo núcleo hidrofóbico lo constituye el bloque PMMA, mientras que la corona está formada por el bloque PHEMA. Estos agregados se formarán por encima de una concentración de agregación crítica, CAC.

Así, en este trabajo se pretende comparar ambos tipos de agregados en términos de sus capacidades de solubilizar, transportar y liberar sustratos orgánicos del tipo droga farmacológica.

HIPÓTESIS

Las soluciones acuosas de copolímero en bloque y ramificados dan origen a diferentes sistemas micelares del tipo intermoleculares y unimoleculares respectivamente. Estos microdominios son capaces de incorporar compuestos orgánicos insolubles en agua.

Tanto los pesos moleculares de los bloques empleados en la formación de los copolímeros como la naturaleza de los grupos funcionales constitutivos de éstos, determinan la estructura y las propiedades de los agregados formados en agua. Factores tales como tamaño micelar, micropolaridad, capacidad de solubilizar sustratos, y velocidad de liberación dependen fuertemente de la estructura de los copolímeros en bloque anfifílicos. Junto a estos factores se deben sumar las propiedades fisicoquímicas que poseen los sustratos a incorporar, las cuales son función de su estructura química y juegan un rol fundamental en la interacción con el agregado micelar.

OBJETIVOS

Objetivos generales

Estudiar fisicoquímicamente las propiedades que presentan las soluciones micelares generadas por dos sistemas poliméricos estructuralmente diferentes, uno lineal y otro híper ramificado, con el fin de comparar y determinar la capacidad que presentan ambos agregados para solubilizar, transportar y liberar un fármaco.

Objetivos específicos

1. Sintetizar copolímeros lineales formados por poli(metacrilato de metilo) y poli(metacrilato de 2-hidroxietilo); PMMA-PHEMA.
2. Sintetizar polímero híper ramificado, poli(glicidol) PG, y de copolímeros de PG y PHEMA
3. Formar agregados de copolímeros en bloque anfífilicos en agua.
4. Caracterizar los agregados de copolímeros en bloque en solución. Determinar la concentración micelar crítica, micropolaridad y tamaño de los agregados.
5. Determinar las constantes de distribución de moléculas orgánicas entre la fase acuosa y la fase micelar.
6. Comparar los dos tipos de micelas generadas por los copolímeros en bloque en estudio en términos de su capacidad de almacenar y liberar los fármacos estudiados.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales usados

Los materiales usados para la síntesis de copolímeros en bloque PMMA-PHEMA y PG-PHEMA se detallan a continuación:

- Metacrilato de metilo (MMA), Fluka AG
- Metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA, 85%), Aldrich
- Glicidol (G), Aldrich
- Cloruro de *p*-toluensulfonilo, ($\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{Cl}$), Merck
- 1,1,4,7,7-pentamentildietiltriaina $\text{C}_9\text{H}_{23}\text{N}_3$, (PMDETA, 98%), Aldrich
- Cloruro de cobre (I), Merck
- Bromuro de Cobre (I), Merck
- Cloruro de *tert*-butil dimetil silano (TBDMS), Merck
- 2,2-Bipiridina, (BPy), Aldrich
- 1,1,1-Tri(hidroximetil) propano (TMP), Aldrich
- Fluoruro de tetrabutilamonio (C_4H_9)₄NF), Aldrich
- Metóxido de potasio, Aldrich
- Bromuro de 2-bromo-2-metilpropanoilo
- Hidróxido de sodio, Merck
- Hidróxido de potasio, Merck
- Hidruro de calcio, Merck
- Pentóxido de fósforo, Merck
- Sulfito de sodio, Merck
- Sulfato de magnesio, Merck
- Ácido acético glacial, Merck
- Piridina, Merck
- Tolueno, Merck
- Diclorometano, Aldrich,
- Tetrahidrofurano para HPLC (THF), Aldrich
- Imidazol, Merck
- Metanol, Merck
- Etanol, Merck
- Éter dietílico, Merck
- 1-Propanol, Merck
- 2- Butanona, Merck
- Nitrógeno (g)
- Argón
- Nitrógeno líquido

2.2 Síntesis de copolímeros en bloque

Con el fin de generar copolímeros monodispersos y de baja polidispersidad la síntesis del copolímero en bloque PMMA-PHEMA se realizó en dos etapas, ambas vía ATRP. La primera etapa consistió en la obtención del macroiniciador de metacrilato de metilo y en la siguiente etapa se procedió a la polimerización con el monómero HEMA obteniéndose así el respectivo copolímero en bloque.

La síntesis de PG-PHEMA se realizó en tres etapas. Primero se realiza la polimerización aniónica de glicidol para obtener el homopolímero PG. En una segunda etapa, y con el fin de obtener el macroiniciador ATRP se hace reaccionar el PG con 2-bromoisobutiril bromuro lo que asegura tener un halógeno terminal en cada rama de PG. El oxígeno del grupo hidróxilo realiza un ataque nucleofílico al $\text{BrCOC}(\text{CH}_3)_2\text{Br}$ formándose un éster con un bromo terminal. Por último, se procedió a la polimerización de HEMA vía ATRP usando este macroiniciador, obteniéndose así el copolímero en bloque PG-PHEMA.

La purificación, preparación de los reactivos y metodología de síntesis se describen a continuación.

2.2.1 Purificación de los reactivos para la polimerización

- Cloruro de cobre (I): Cloruro de cobre (I) se purificó mediante la reducción de cobre (II) con sulfito de sodio de acuerdo al siguiente procedimiento: Sobre una solución acuosa de CuCl_2 (43 % m/v) se añade lentamente y con agitación constante una solución acuosa de sulfito de sodio (17 % m/v). El CuCl sólido se obtiene mediante la adición de un exceso de ácido sulfuroso. El precipitado se lavó con ácido acético glacial y etanol y luego se secó al vacío durante 8 h.
- HEMA: Para eliminar el inhibidor que contiene el HEMA se adiciona a un embudo de decantación de 250 mL y se lava tres veces con una solución de NaOH al 5 %. Para eliminar el exceso de base se lava con agua destilada y se deja sobre MgSO_4 anhidro. Luego se destila bajo presión reducida utilizando un horno de vidrio B-585 Kugelrohr (Büchi) y finalmente se pasa a través de una columna de alúmina neutra. El monómero destilado es guardado en refrigerador para ser ocupado a la brevedad.
- MMA: Para eliminar el inhibidor que contiene el MMA se adiciona a un embudo de decantación de 250 mL y se lava tres veces con una solución de NaOH al 5 %. Luego para eliminar el exceso de base se hicieron lavados con agua destilada en la misma proporción y se deja sobre MgSO_4 anhidro. Después se filtra y destila a presión reducida sobre CaH_2 . El monómero destilado es guardado en refrigerador para ser utilizado a la brevedad.
- Piridina: La piridina se destila al vacío sobre KOH y se guarda sobre pentóxido de fósforo para luego ser usada.

2.2.2 Preparación de los reactivos para la polimerización

- Síntesis de HEMA-TBDMS: El monómero protegido HEMA-TBDMS se sintetizó siguiendo un método informado en literatura⁵². En un matraz de reacción de 250 mL de tres bocas equipado con termómetro, burbujeo de nitrógeno y un embudo de adición, se mezcla HEMA (5,37 g, 0,041 moles) en THF (50 mL) e imidazol (5,6 g, 0,082 moles). Haciendo uso del embudo de adición se añadió al balón de reacción, lentamente bajo agitación y enfriado a 0 °C, el cloruro de TBDMS (6,20 g, 0,041 mol) en CH_2Cl_2 (30 mL). Finalizada la adición de la mezcla, se reemplaza el embudo de adición por el condensador y se deja la reacción 18 h con agitación. Después de este tiempo, el precipitado formado se filtra, se vuelve a disolver en THF y se pasa a través de una columna de alúmina neutra. El disolvente fue eliminado bajo presión reducida y el producto se secó a 50 °C durante 24 h.

La caracterización de HEMA-TBDMS se llevó a cabo mediante IR-FT. Las bandas encontradas en el espectro son: (ν , cm^{-1}) 2957, 2927, 2854 (m, CH_3), 1718 (s, $\text{C} = \text{O}$), 1170, 1110 (CO-CH_2), 1,637 (s, $\text{C} = \text{C}$), 941 (s, O-Si-CH_3), 1250 y 836 (s, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$). El espectro IR-FT se puede ver en el Anexo.

- Síntesis de PMMA-Cl: En un tubo Schlenk de 150 mL se mezcló PMDETA (36,4 mg, 0,21 mmol), CuCl (10,4 mg, 0,105 mmol) y MMA (4,68 g, 46,7 mmol). Con el fin de eliminar el oxígeno, esta mezcla se somete a tres ciclos de congelación-descongelación-vacío ($1,33 \times 10^{-4}$ kPa). Se observa la formación de un sólido color verde oscuro característica de la formación del complejo de cobre con el ligando. A continuación, se añade *p*-TosCl (40 mg, 0,209 mmol) en 5 mL de THF bajo atmósfera de nitrógeno, y la mezcla se calentó a 90 °C durante 8 horas con agitación magnética. Después de este tiempo, la solución se expone al aire y se diluyó con THF. La solución se pasó a través de una columna de alúmina neutra para separar el catalizador de cobre. La solución resultante se precipitó dos veces vertiéndola en metanol, y luego se secó a 30 °C bajo vacío hasta un peso constante.

La caracterización de PMMA-Cl se llevó a cabo mediante IR-FT y RMN-¹H. Las siguientes asignaciones se muestran a continuación. IR-FT: (ν , cm^{-1}) 2952, 2995, 3006 (m, C-H), 1736 (s, $\text{C} = \text{O}$), 1231, 1172 (m $-\text{COO}-$)
RMN-¹H (acetona-d₆), 400 MHz: δ 8,0–7,5 (d, ArH), 3,5–3,8 (s, OCH_3), 2,5 (s, CH_3 -Ar), 2,0–1,7 (m, CH_2), 1,02–0,83 (s, CH_3). Los respectivos espectros se pueden ver en el Anexo.

2.2.3 Síntesis de copolímeros

2.2.3.1 Síntesis de PMMA-PHEMA-TBDMS

En un balón de reacción de 50 mL se disuelve el macroiniciador PMMA-Cl (473 mg, 0,0172 mmol $M_n = 2,75 \times 10^4$) en 3,0 mL de una mezcla 30:70 v/v de 1-propanol y 2-butanona. La solución se desgasifica por burbujeo de N_2 durante 15 min. La mezcla es relativamente densa y sin color, se pone en el vortex unos minutos para ayudar a su completa disolución.

Luego, en un tubo Schlenk de 100 mL se mezclaron con agitación magnética, Bpy, (0,011 g, 0,0704 mmol), CuCl (0,035 g, 0,354 mmol) y HEMA-TBDMS (1,07 g, 0,0412 mmol). La mezcla se desgasifica mediante tres ciclos de congelación-descongelación-vacío, y se observa un color rojo fuerte. El tubo Schlenk se calienta a 65 °C durante 5 min y luego se añade la solución de macroiniciador. La mezcla se hace reaccionar por 12 horas a 65 °C.

Esta mezcla se disuelve en 5,0 mL de THF y la solución correspondiente se hace pasar a través de una columna de alúmina neutra para eliminar completamente el catalizador. La solución resultante se precipita dos veces vertiéndola sobre metanol y luego se seca a 30 °C bajo vacío hasta alcanzar un peso constante. El sólido obtenido es de color blanco.

Los grupos TBDMS en el polímero resultante se hidrolizan añadiendo una solución de fluoruro de tetrabutilamonio, $(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{NF}$ en THF (0,028 mL, 0,028 mmol) a PMMA-PHEMA-TBDMS (0,1 g, 0,002 mmol)⁵²⁻⁵⁴. La reacción se deja en un baño termostataado a 25 °C con agitación constante por 24 h. Pasado este tiempo, el exceso de THF es eliminado usando evaporador rotatorio a presión reducida y el copolímero desprotegido se recupera por liofilización.

2.2.3.2 Síntesis de PG-PHEMA

2.2.3.2.1 Síntesis de PG^{55,56}

En un balón de reacción de dos bocas de 100 mL de capacidad provisto de agitación mecánica y atmósfera inerte de argón se pone TMP (2,78 g, 0,0207 moles) y metóxido de potasio (3,5 M en metanol, 0,7 mL, 2,45 mmol). Una de las bocas del balón se conecta a un sistema de destilación simple donde se destilará el exceso de metanol, la otra boca se tapa con un septum. El balón se sumerge parcialmente en un baño a 60 °C, a esta temperatura y pasado unos minutos comienza la destilación del metanol. Una vez destilado todo el solvente se retira el sistema de destilación, la temperatura se sube a 95 °C y en la salida vacante del balón se conecta un refrigerante que servirá para reflujo el sistema en la siguiente reacción. La salida libre del refrigerante se tapa con un septum.

Luego al balón de reacción se agrega el glicidol (27,9 g 0,377 moles) en forma de goteo controlado durante 12 h. Esto se logra haciendo uso de una bomba dosificadora a una velocidad de 0,035 mL/min.

Pasado el tiempo de reacción se observó la formación de un producto de color amarillo claro de notable viscosidad. Este producto es solubilizado en metanol y neutralizado haciéndolo pasar por una columna rellena con una resina de intercambio catiónico. Usando evaporador rotatorio se reduce el volumen de metanol y el producto obtenido es precipitado en acetona, filtrado y secado por 48 h a 35 °C en una estufa de vacío.

2.2.3.2.2 Esterificación de PG⁵⁷

En un balón de reacción de 250 mL, de dos bocas, provisto de agitación mecánica y de atmósfera inerte de nitrógeno se disuelve PG (5,0 g, 3,34 mmol, Mw 1497) en 60 mL de piridina previamente destilada. El balón de reacción es sumergido en un baño de glicerina a 50 °C y se agita energéticamente hasta que el PG esté completamente disuelto. Una vez que el sistema está homogéneo se adiciona lentamente 2-bromoisobutiril bromuro (6,7 mL, 54,2 mmol) desde un embudo de adición adosado a una de las bocas del balón. La otra boca del balón está tapada con un septum. Luego de agregar todo el reactivo esterificante se adiciona con el mismo embudo 40 mL más de piridina y se cierra el sistema dejando todo en atmósfera inerte. La mezcla de reacción se agita vigorosamente por un tiempo aproximado de 50 minutos. Pasado este tiempo, se observa la formación de un precipitado de color blanco y la fase líquida tiene una suave coloración amarilla. Una vez removido y lavado el precipitado, el producto formado permanece disuelto en un exceso de solvente y para ser aislado es necesario remover la piridina a través de una destilación azeotrópica con tolueno seco y desgasado. Para ello, se destila la piridina a presión reducida junto con tolueno en una proporción de 1:3 (v/v) respectivamente. Una vez destilada toda la piridina en el balón de reacción se observa la aparición de una sustancia de color café claro. Esta sustancia se disuelve en diclorometano y se precipita sobre éter dietílico. El producto es un líquido viscoso de color amarillo pálido que es secado en estufa de vacío a 30 °C por 48 h.

2.2.3.2.3 Síntesis de PG-PHEMA⁵⁸

En un tubo Schlenk de 100 mL se agregó PG-Br (0,25 g, 0,129 mmol, Mn: 1940), Bpy (0,152 g, 0,973 mmol), CuCl (0,048 g, 0,484 mmol) y 1,5 mL de metanol. Con el fin de eliminar el oxígeno. Esta mezcla se somete a tres ciclos de congelación-descongelación-vacío ($1,33 \times 10^{-4}$ kPa). Una vez realizado este proceso se agrega HEMA (3,4 mL, 26,1 mmol). El monómero es agregado con jeringa con embolo de teflón previamente ambientada y en atmósfera inerte.

El sistema se sumerge en un baño de glicerina a 25 °C con agitación magnética durante 3 h. Al desconectar el sistema se observa que el color de la mezcla es verde claro siendo su aspecto ligeramente viscoso.

Con el fin de retener los sólidos residuales del complejo de cobre, el producto se pasa por una columna de silica gel. Para ayudar a la elución se agregan 10 mL de metanol a los productos de la reacción y finalmente, para evitar que quede producto retenido en la columna, se pasa un exceso de solvente. Finalmente este exceso de solvente se elimina en un evaporador rotatorio. Una vez que queda un residuo líquido de 8 mL éste se precipita sobre éter dietílico. El producto obtenido es un sólido de color blanco que luego de ser filtrado al vacío se deja secar a 30 °C por 48 h en estufa de vacío.

2.3 Caracterización de los copolímeros

Con el fin de caracterizar los sistemas sintetizados se realizaron mediciones de pesos moleculares, espectrofotometría y se estudió la estabilidad térmica. A continuación se dan detalles de estas mediciones.

2.3.1 Pesos moleculares

Los pesos moleculares, \overline{Mn} y \overline{Mw} , así como la polidispersidad (PD) de los polímeros obtenidos fueron determinados por cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) frente a patrones de poliestireno y usando, THF, como solvente. Las mediciones se realizaron en un cromatógrafo Shimadzu modelo RID-10A con detector de IR. Los análisis se realizaron empleando una columna MZ-Gel SD Plus, de poli(estireno-divinilbenceno) cuya porosidad es de 10^3 Å. La muestra es disuelta en THF (2 mg/mL) y antes de ser inyectada es pasada por un microfiltro de 0,22 µm. Los 20 µL de muestra son inyectados a un flujo de 0,400 mL/min. La curva de calibración se realizó utilizando estándares de poliestireno monodisperso con PD entre 1,01-1,05 y pesos moleculares entre 2000 a 50000 Dalton. Los datos se almacenan y se procesan con un software de clase VP.

2.3.2 Espectrofotometría

Todos los productos obtenidos fueron caracterizados a través de espectroscopía IR-FT y RMN-¹H. En particular los sistemas hiper ramificados fueron caracterizados además por RMN-¹³C y espectroscopía de masa MALDI-TOF.

Los espectros de IR-FT se registraron en un espectrómetro Bruker Vector 22 (Bruker Óptica GmbH, Inc., Ettlingen, Alemania). En particular, los espectros de PG y PG-Br fueron medidos entre placas de NaCl.

Los espectros de RMN fueron registrados en un equipo BRUKER AVANCE 400 Digital NMR de 400,1 MHz para ¹H y 100,6 MHz para ¹³C. Para los análisis RMN-¹H las muestras se preparan a una concentración de 5 mg/mL y para RMN-¹³C de 25 mg/mL. Los solventes deuterados usados son: cloroformo, metanol y acetona.

También se realizó espectroscopía de masa MALDI-TOF, para las muestras de PG y sus copolímeros con PHEMA. Se prepara una solución madre de 10 mg/mL en metanol y a partir de ella se realizan diferentes diluciones. Para la obtención de espectros 1 µL de las muestras a una concentración de 10, 1, 0,1 y 0,01 mg/mL se mezcló con 1 µL de las matrices ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA; preparado a 10 mg/mL en acetonitrilo 50 % v/v y ácido fórmico 0,1 %

v/v), ácido sinapínico (SA; preparado a 10 mg/mL en acetonitrilo 25 % y ácido fórmico 0,1 % v/v) y ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB; preparado a 10 mg/mL en acetonitrilo 25 % y ácido fórmico 0,1% v/v) en una placa porta muestra micro scout (Bruker Daltonics Inc., MA-USA). Adicionalmente, se mezclaron 10 μ L de las muestras a una concentración de 10 y 1 mg/mL con 10 μ L de las matrices CHCA (10 mg/mL en metanol) o SA (10 mg/mL en metanol) y 1 μ L de trifluoroacetato de sodio (NaTFA) en un tubo Eppendorf y se depositó 1,0 μ L de cada mezcla en una placa porta muestra micro scout. Alternativamente, se mezclaron 10 μ L de las muestras a una concentración de 5 mg/mL con 10 μ L de las matrices CHCA (20 mg/mL en metanol) o SA (20 mg/mL en metanol) y 1 μ L de cloruro de litio (LiCl; 5 mg/mL en metanol) en un tubo Eppendorf y se depositó 0,6 μ L de cada mezcla en una placa porta muestra micro scout.⁵⁵ La adquisición de espectros de masas se realizó en un equipo MALDI-TOF Microflex (Bruker Daltonics Inc., MA-USA) en modo ion positivo mediante detección lineal. Previo a la obtención de los espectros se realizó una calibración del instrumento con un estándar externo correspondiente a una mezcla de proteínas de masas 5000-17500 Da (Bruker Daltonics Inc., MAUSA). Para el control del espectrómetro se utilizó el programa flexControl 3.0 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania). Los espectros finales corresponden a la suma de 15 barridos de 40 impactos de láser (600 impactos de láser en total) aplicados en diferentes puntos tomados al azar de cada muestra depositada en la placa porta muestra. El análisis de los espectros de masas se realizó por medio del programa DataAnalysis 3.2 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania). Para la detección de la señales m/z se utilizó el algoritmo Apex utilizando los parámetros por defecto y previo suavizamiento de los espectros por medio del algoritmo Gauss (ancho de procesamiento, 3 m/z; número de ciclos, 10).

2.3.3 Estabilidad Térmica

El estudio de estabilidad térmica se realizó mediante análisis térmico gravimétrico (TGA) haciendo uso de un equipo TGA Q50 (TA Instruments). El instrumento se calibró tanto para la temperatura y el peso por métodos habituales. El porcentaje de pérdida de peso se determinó en el intervalo de temperatura de 20 a 600 °C a una velocidad de barrido de 10 °C / min. El peso promedio de la muestra fue de 6 mg y la tasa de flujo de nitrógeno seco 40 mL/min.

La temperatura de transición vítrea de los polímeros se determinó por calorimetría diferencial de barrido (DSC) mediante el uso de un equipo ToledoStarSystem822e (Mettler). La Tg se midió a una velocidad de calentamiento de 10 °C / min en atmósfera de nitrógeno seco (25 mL/min) en un intervalo de temperatura de 30 a 200 °C. Para eliminar el efecto de la historia térmica en las transiciones de fase, todas las muestras se calentaron a 150 °C, se mantuvo a esa temperatura durante 5 min y después se enfrió a 30 °C.

2.4 Formación de los microagregados de copolímeros en bloque anfifílicos en solución acuosa

Para la preparación de las soluciones acuosas micelares, se debe distinguir entre las diferentes micelas que forman estos copolímeros. Los copolímeros que tienen el bloque hidrofóbico de mayor proporción que el bloque hidrofílico forman agregados denominados micelas *crew-cut*, en cambio las micelas que tienen un bloque hidrofílico de mayor tamaño que el bloque hidrofóbico forman agregados denominados micelas estrellas, las cuales se encuentran representadas en la Figura 2^{30,31,59}.

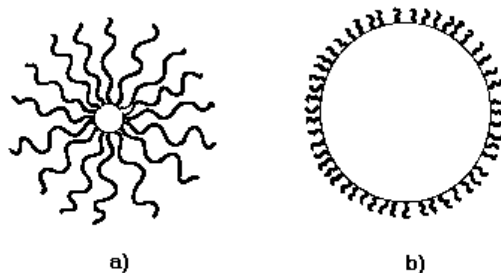


Figura 2. Tipos de micelas de CBA: a) Micela Estrella b) Micela *Crew-Cut*.

Los copolímeros que forman las micelas *crew-cut* no se solubilizan directamente en agua debido a que poseen un gran núcleo hidrofóbico en comparación con su corona hidrofílica.

Los sistemas poliméricos PMMA-PHEMA sintetizados en este trabajo son formadores de agregados micelares del tipo *crew-cut* y estrella. El primer tipo de agregado se forma en los copolímeros en que el grupo PMMA está en una mayor proporción que el grupo PHEMA.

2.4.1 Preparación de los agregados *crew-cut*

Dado que los agregados *crew-cut* provienen de copolímeros donde el bloque hidrofóbico es de mayor tamaño que el bloque hidrofílico, la metodología de preparación de estos agregados es indirecta y la descripción se detalla a continuación:

1. Primero se solubiliza el copolímero en un solvente orgánico común para ambos bloques, luego se deja agitando esta mezcla por unas 3 horas. El solvente empleado es *N,N'*-dimetilformamida.
2. Se adiciona agua lentamente a la mezcla polímero/solvente mediante un dispensador volumétrico, a una velocidad controlada (0,2 mL/ h). La aparición de una turbidez durante este proceso indica la formación de los agregados.
3. Después que se ha formado el agregado, se adiciona un exceso de agua con el fin de fijar su morfología. Para sistemas poliméricos anfifílicos, cuyos núcleos hidrofóbicos están formados por estireno, esto se ha atribuido a que el núcleo del agregado se encuentra bajo la temperatura de transición vítrea y no existen intercambios entre cadenas poliméricas pertenecientes al agregado y las cadenas uniméricas⁶⁰.
4. Se dializa la solución polimérica contra agua para eliminar el solvente orgánico. Con este fin se utiliza una membrana de diálisis de peso molecular de corte 5000 Dalton. El agua destilada se renueva dos veces al día, procedimiento que se desarrolla por tres días.

2.4.2 Preparación de los agregados tipo estrella

La metodología de preparación es directa, esto es, se adiciona una cierta cantidad de copolímero en un volumen determinado de agua, y se deja agitando hasta que la solución se torna completamente homogénea.

2.5 Caracterización de los microagregados de copolímeros en bloque anfifílicos en solución acuosa

2.5.1 Mediciones de Dispersión Dinámica de Luz DLS

El tamaño y la distribución de tamaños de las micelas poliméricas se determinó mediante dispersión dinámica de luz (DLS). Disoluciones acuosas de los polímeros (1 mg/mL) en ausencia y en presencia de diferentes sustratos (10 mM) fueron preparadas con agua deionizada proveniente de un sistema de agua ultrapura (EasyPure II, Barnstead), luego filtradas y termostatizadas a 25 °C por 10 m. Las mediciones de DLS se realizaron en un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd.) a un ángulo de 175° respecto del haz incidente que proviene de un láser de He-Ne (4mW, 633 nm). Los datos son analizados con el programa DTS proporcionado por el fabricante (v. 4.2, Malvern Instruments). Los resultados de radio hidrodinámico d_h e índice de polidispersidad PDI se obtuvieron promediando al menos tres mediciones.

2.5.2 Mediciones de fluorescencia en estado estacionario

Las mediciones de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro HORIBA JOBIN YVON modelo FLUORO MAX-4. Las mediciones se realizaron en cubetas de cuarzo que contienen la solución de polímero, y 3 μL de una solución madre de pireno, obteniéndose una concentración final de pireno en la muestra de $1,0 \times 10^{-7}$ M. Los espectros de fluorescencia se registraron en el intervalo de 350 nm a 450 nm, y usando una longitud de onda de excitación de 337 nm. En cambio, los espectros de excitación se registraron entre 300 y 350 nm, y usando una longitud de onda de emisión de 390 nm.

Para la medición experimental de las intensidades I_1 e I_3 para los sistemas ramificados fue necesario dar un tiempo de al menos 5 h para que los sistemas se reordenaran y así obtener valores reproducibles y estables para las intensidades. En el caso de los sistemas lineales se adiciona la sonda fluorescente a la cubeta, se agita vigorosamente y se realiza la medición.

2.5.3 Mediciones de tiempos de vida

Las mediciones de fluorescencia resuelta en el tiempo se realizaron usando un espectrofluorímetro Horiba Jobin Yvon Fluoromax-4 equipado con un NanoLED pulsado como fuente de excitación (IBH, FWHM~1 ns, 344 nm) operando a una velocidad de repetición de 1 MHz y un sistema de detección por conteo de fotones corelacionado en el tiempo (time-correlated single photon counting TCSPC, FluoroHub, Horiba Jovin Yvon). Los datos obtenidos fueron ajustados usando el paquete de programas para Análisis de Decaimiento de Fluorescencia (DAS6, Horiba Scientific IBH). La respuesta del instrumento se registra en cada medición usando una solución de partículas que dispersa la luz (Ludox) bajo las mismas condiciones instrumentales a las cuales se mide la muestra. Solo la longitud de onda de emisión es cambiada. El análisis de deconvolución del decaimiento se hizo usando dos exponenciales.

2.6 Experimentos de ultrafiltración

Los coeficientes de distribución (K_S) se obtuvieron mediante técnica de ultrafiltración. Estos experimentos fueron realizados en una celda de ultrafiltración marca Amicon[®] de 50 mL de capacidad, provista de una membrana Millipore de polietersulfona cuyo peso molecular de corte es 5000 Dalton, en virtud del peso molecular polimérico. En cada estudio de reparto se utilizaron 10 mL de solución polimérica de diferentes concentraciones dependiendo del polímero en estudio (las concentraciones van desde 1×10^{-6} a 8×10^{-7} M) a la que se le agrega inicialmente entre 50 y 100 μ L de la solución de fármaco 10 mM. Esta solución se pone en la celda de ultrafiltración y se le adicionan sucesivamente alícuotas de solución de polímero de la misma concentración inicial y libre de fármaco. Cada solución es forzada a pasar a través de la membrana, mediante la aplicación de 50 psi (3,4 atm) de presión en presencia de agitación continua, con el fin de evitar la obstrucción de los poros de la membrana. En cada experimento se ultrafiltró un volumen de 1 mL, que es la cantidad mínima necesaria para llenar una celda de UV-visible. Cabe mencionar, que en este proceso de ultrafiltración, cuando se cambia de una concentración a otra, siempre se produce un efecto de dilución debido a que en la parte inferior de la celda quedan restos de la disolución anterior. Por esta razón, en cada caso se repite el procedimiento devolviéndose a la celda el volumen ultrafiltrado, un mínimo de cinco veces para asegurar así, que la concentración en el ultrafiltrado corresponde a la situación de equilibrio. Esto se verificó midiendo la absorbancia de cada ultrafiltrado hasta que se alcanza un valor constante. La concentración de cada fármaco en la fase acuosa se determinó, a partir de una curva de calibración de absorbancia versus concentración que finalmente se ajustó a una línea recta. Estas mediciones fueron obtenidas en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. Las absorbancias del filtrado se midieron al valor correspondiente al máximo del espectro de absorción de cada sistema empleado. Los valores de K_S se obtuvieron a partir de la pendiente de la recta que se obtiene al graficar la concentración molar del sustrato incorporado a la micela [S_M] en función de la concentración molar del sustrato en agua [S_W].

2.7 Estudio de liberación de fármacos

Los estudios de liberación de fármacos *in vitro* fueron realizados utilizando celdas de difusión bicompartimentales, tipo Franz⁶¹⁻⁶³, como la que muestra la Figura 3. En la parte superior de la celda se pone el sistema en estudio, es decir el medio dador, que corresponde a 1 mL de una solución polimérica (0,01 M) conteniendo el fármaco en estudio a una concentración de $1,2 \times 10^{-2}$ M. El compartimiento inferior, receptor, tiene un volumen promedio de 15,4 mL, el cual se llenó con una solución amortiguadora de $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$, de pH 7,4. Separando ambos compartimientos se ubica una membrana semisintética de celulosa (Sigma, D9570 de 12 kD) cuyo paso de difusión tiene un área promedio de $2,3 \text{ cm}^2$. El compartimiento inferior posee un brazo de muestreo lateral, por donde se toman alícuotas para analizar la concentración acumulada de los activos liberados. La celda posee una camisa externa que puede conectarse a un baño termostático con recirculación, de manera de asegurar una temperatura constante de $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante los ensayos de liberación.

Cada celda cuenta con un sistema de agitación magnética y así con agitación constante se evitan gradientes de concentración. En todo momento es necesario mantener un contacto total entre el medio donador, la membrana y la solución contenida en el compartimiento receptor, de manera que el área de transferencia a través de la cual ocurre la permeación sea constante. Es por ello que después de la extracción de 1 mL de muestra desde el medio receptor, a tiempos prefijados, se repone el volumen tomado adicionando el mismo volumen de solución amortiguadora.

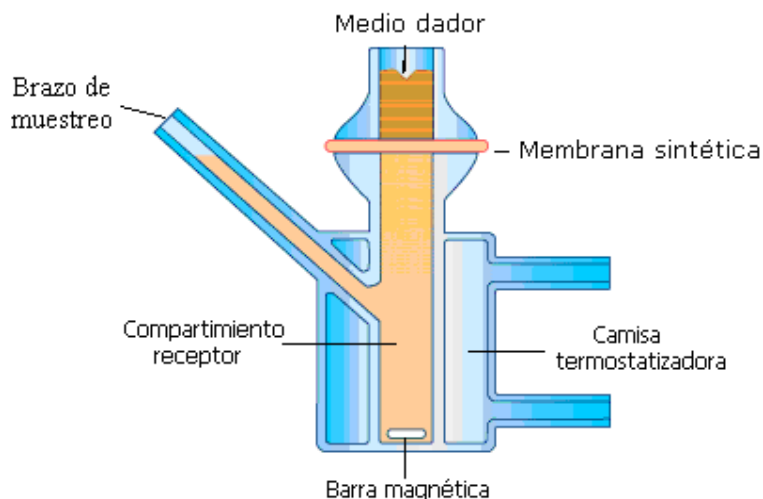


Figura 3. Esquema de celda tipo Franz.

Cada volumen extraído es guardado para luego cuantificar la concentración de fármaco liberado. La concentración de fármaco liberado se determina midiendo la absorbancia en el máximo de absorción UV del fármaco correspondiente y utilizando el respectivo coeficiente de extinción molar. Este coeficiente se obtiene de una curva de calibración, para lo cual se prepara una batería de soluciones cuyas concentraciones de fármaco van desde 10^{-5} a 10^{-8} M. Luego, haciendo uso de un espectrofotómetro UV-Visible, Shimadzu UV-1700, se midió la absorbancia de cada solución. Finalmente, desde una gráfica de absorbancia en función de la concentración molar se obtiene el coeficiente de extinción molar que corresponde a la pendiente de cada recta. La tabla 1 resume dichos valores.

Tabla 1: Absortividad molar y longitud de onda máxima (λ) de los fármacos empleados en este estudio.

Fármaco	Fórmula molecular	Absortividad Molar $L mol^{-1} cm^{-1}$	λ (nm)
Metronidazol	$C_6H_9N_3O_3$	10589	320,0
Ornidazol	$C_7H_{10}N_3O_3Cl$	9524	318,0
Tinidazol	$C_8H_{13}N_3O_4S$	9283	316,0
1,2-dimetil-4-nitroimidazol	$C_5H_7N_3O_2$	7763	313,5
1-etil-2-metil-4-nitroimidazol	$C_6H_9N_3O_2$	8075	313,5
1-propil-2-metil-4-nitroimidazol	$C_7H_{11}N_3O_2$	7732	314,0
1-butil-2-metil-4-nitroimidazol	$C_8H_{13}N_3O_2$	8336	314,4
1-pentil-2-metil-4-nitroimidazol	$C_9H_{15}N_3O_2$	8145	314,4
1-hexil-2-metil-4-nitroimidazol	$C_{10}H_{17}N_3O_2$	7811	314,4

Los perfiles de liberación de los fármacos fueron expresados como la fracción porcentual de fármaco liberado respecto al total colocado en el medio dador en función del tiempo. Adicionalmente, fueron realizados los estudios de difusión de los fármacos disueltos en la solución amortiguadora pero en ausencia de soluciones micelares.

A fin de conocer la concentración de activo acumulada a un tiempo determinado en el compartimiento inferior de la celda de Franz, se desarrolló un cálculo que tiene en cuenta las alícuotas de *buffer* agregadas después de cada extracción de muestra del compartimiento inferior a fin de mantener el volumen del líquido receptor constante y la masa de soluto liberado que se va eliminando del sistema como consecuencia de la extracción de muestra, ya que ésta no se repone.

También se hizo uso del programa computacional TableCurve con el fin de obtener los parámetros cinéticos los datos son ajustados a una ecuación cinética de liberación de primer orden.

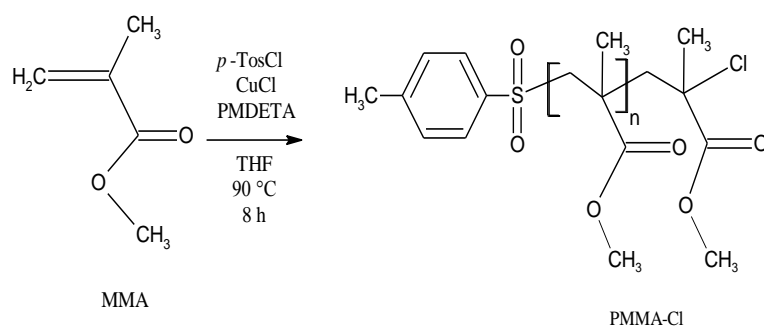
RESULTADOS Y DISCUSION

El objetivo de esta tesis es estudiar la capacidad de solubilizar compuestos con actividad farmacológica en agregados poliméricos formados por copolímeros anfipáticos lineales y por copolímeros hiper ramificados. Estos polímeros son PMMA-PHEMA y PG-PHEMA, respectivamente. Así, la primera parte de este trabajo estuvo dedicada principalmente a la síntesis y caracterización de los polímeros propuestos.

3.1 Síntesis de copolímeros lineales PMMA-PHEMA

Copolímeros anfifílicos lineales PMMA-PHEMA con diferentes proporciones y pesos moleculares fueron sintetizados siguiendo un procedimiento descrito en literatura y que consiste en dos polimerizaciones sucesivas, ambas vía ATRP.

En una primera etapa se polimerizó MMA usando el sistema *p*-TosCl/CuCl/PMDETA, como iniciador, catalizador y ligando respectivamente. Esta reacción de polimerización se describe en el Esquema 1.



Esquema 1. Reacción de polimerización de MMA vía ATRP.

Esta polimerización por ATRP da como producto cadenas de PMMA bien definidas con cloruros terminales. Así, una serie de PMMA-Cl con diferentes pesos moleculares se sintetizó mediante la variación de la concentración de iniciador. El peso molecular y el índice de polidispersidad PD se determinaron por SEC, y los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 2. Los datos de la tabla muestran que el peso molecular del polímero formado disminuye linealmente con el aumento de la concentración de *p*-TosCl. También se puede observar que los polímeros exhiben una relativa baja polidispersidad PD para los diferentes grados de polimerización, GP. Estos resultados indican que *p*-TosCl/PMDETA es un sistema iniciador/ligando eficaz y confirman que el sistema de ATRP utilizando proporciona polímeros con altos rendimientos y con estrecha distribución en su peso molecular⁵². Vale la pena mencionar que en experimentos preliminares y en la búsqueda de las mejores condiciones de reacción se utilizó 1-cloro-1-feniletano/PMDETA como sistema iniciador/ligando. Con este sistema se obtuvo solo un polímero, H6, cuyas mediciones de SEC dieron los siguientes resultados: Mn: 13045, Mw: 19002, PD: 1,45 y DP: 130. La cantidad de iniciador usado en la síntesis de H6 fue de 0,577 mmol. Debido al alto valor de PD obtenido se cambió el sistema iniciador/ligando a *p*-TosCl/PMDETA.

Tabla 2: Resultados de las mediciones de SEC para la polimerización ATRP de MMA en THF utilizando *p*-TosCl/PMDETA como sistema iniciador.

Polímero	Notación	<i>p</i> -TosCl (mmol)	Rendimiento (%)	Mn (g/mol)	Mw (g/mol)	PD	DP
PMMA ₆₇ -Cl	H1	0,525	85	6700	7360	1,09	67
PMMA ₂₀₇ -Cl	H2	0,399	92	20760	23380	1,13	207
PMMA ₂₇₅ -Cl	H3	0,266	94	27540	36850	1,33	275
PMMA ₃₃₀ -Cl	H4	0,199	77	33020	47650	1,44	330
PMMA ₅₆₂ -Cl	H5	0,133	93	56250	58830	1,05	562

El peso molecular del polímero PMMA-Cl se puede cambiar variando la concentración de iniciador utilizada en la reacción de polimerización. En la Figura 4 se grafica el peso molecular del polímero sintetizado versus la cantidad de iniciador utilizada. Se puede observar que hay una relación inversa entre ambos parámetros: el peso molecular del macroiniciador obtenido aumenta con la disminución de la concentración de iniciador.

Este resultado es totalmente esperable ya que se sabe que las cadenas poliméricas pueden crecer hasta pesos moleculares extremadamente elevados, especialmente si la concentración de iniciador es baja. Eso hace que la concentración de radicales y la velocidad de terminación también sean bajas.

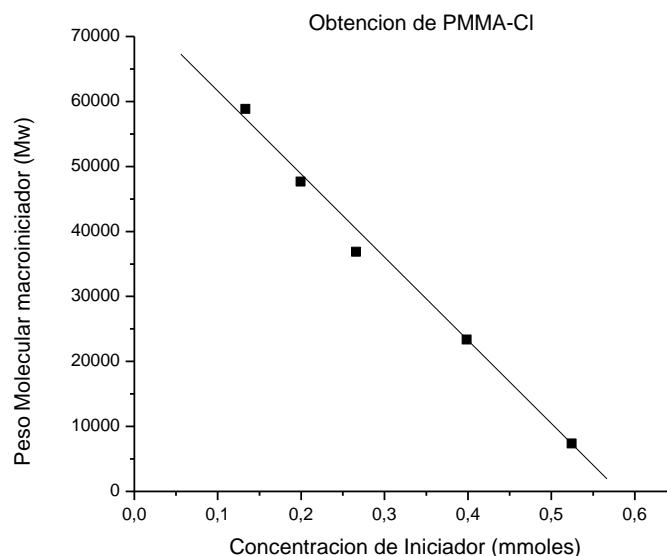
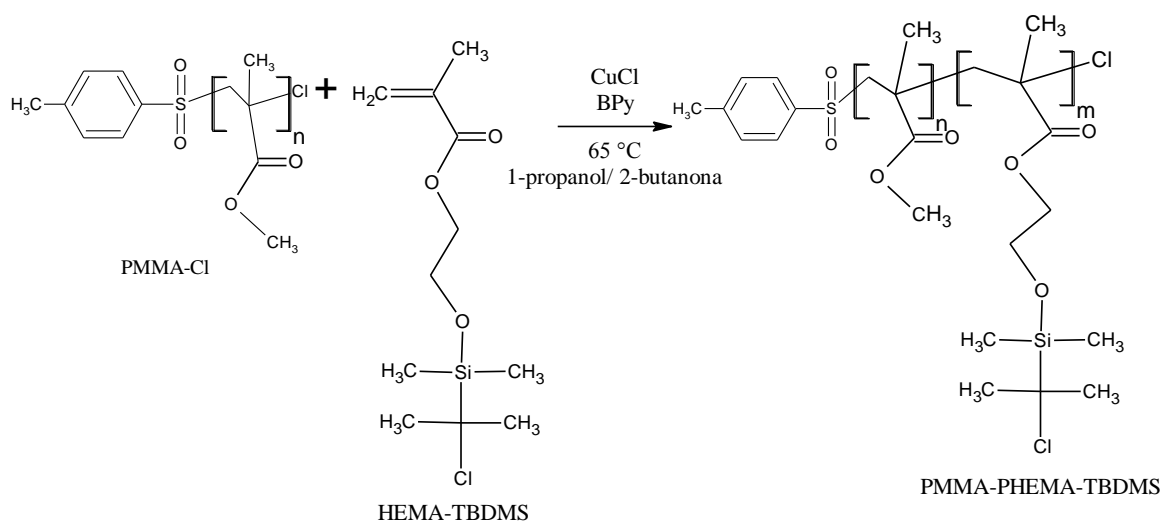


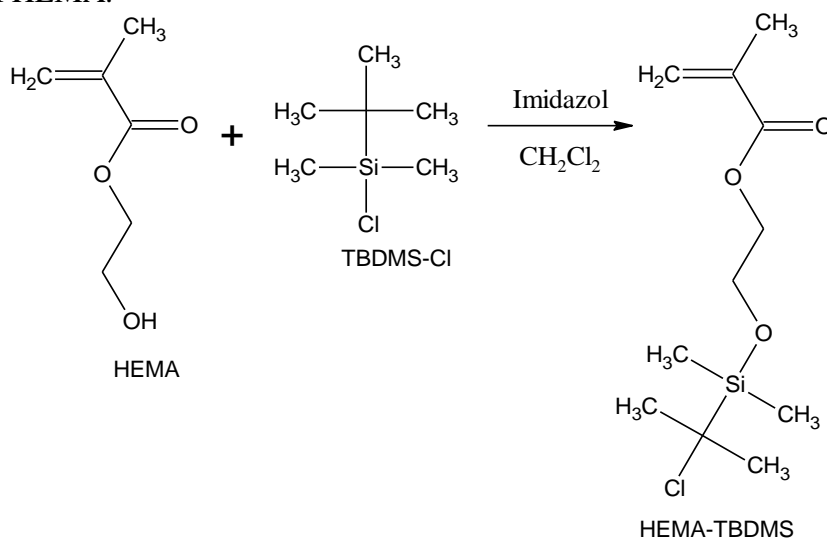
Figura 4. Relación entre el peso molecular obtenido y la cantidad de iniciador usada en la polimerización de MMA.

En la segunda etapa, se añadieron bloques hidrófilos de PHEMA a las cadenas poliméricas de PMMA mediante el uso de PMMA-Cl como parte del sistema de iniciador en una polimerización ATRP. La reacción de polimerización se muestra en el Esquema 2.



Esquema 2. Reacción de copolimerización de PMMA-Cl y HEMA-TBDMS vía ATRP.

En la reacción que se muestra en el Esquema 2, el monómero de HEMA aparece sustituido con un grupo TBDMS. Esto se debe a que en una primera instancia se polimerizó HEMA directamente y se obtuvieron copolímeros que contenía un número muy bajo de unidades HEMA, C5, C6, C7 y C8 en la Tabla 2. Probablemente esto se debe a una escasa solubilidad de PHEMA en disolventes orgánicos. Una forma de disminuir la polaridad del monómero y del polímero que se forma es hacer reaccionar los grupos hidroxilo con un grupo protector de baja polaridad. Los grupos protectores más empleados son el cloruro de trimetilsilano, TMS y cloruro de tert-butildimetilsilano, TBDMS-Cl, que es el usado en este trabajo. De esta manera, el monómero se polimeriza en su forma protegida usando TBDMS como grupo protector, ya que presenta mayor estabilidad en comparación con otros grupos protectores empleados como trimetilsilano⁵². Esta reacción de protección (Esquema 3) es una opción muy viable y ha sido utilizada para la preparación de PHEMA.



Esquema 3. Reacción de protección del grupo hidroxilo de HEMA.

Al proteger el grupo hidroxilo, la polaridad del monómero disminuye, adquiriendo una solubilidad similar a la de MMA, y por lo tanto su polimerización se realiza en condiciones

similares a las usadas en la obtención de PMMA vía ATRP. El grado de polimerización para el bloque de PHEMA se varió cambiando la relación de alimentación de HEMA protegido.

La evidencia de la copolimerización y la caracterización de los copolímeros PMMA-PHEMA obtenidos se hizo mediante técnicas de IR-FT, RMN-¹H, y SEC.

La Figura 5 muestra los espectros de RMN-¹H obtenidos para PMMA₂₇₅-Cl, y el copolímero PMMA₂₇₅-b-PHEMA₈₈, cuyos grupos HEMA están protegidos con TBDMS-Cl. Estos espectros fueron tomados en un equipo de 500 MHz y vale hacer notar que en ellos aparecen señales que no fue posible ver en los espectros de 400 MHz.

En el espectro (A) de la Figura 5 correspondiente a PMMA₂₇₅-Cl se pueden asignar las siguientes señales: (a) grupo metilo en torno a 3,5 ppm, señal que se observa desplazada a bajo campo debido al efecto electroatractor del grupo éster vecino; (b) corresponde a los grupos metilenos (CH₂) que forman parte de la cadena polimérica principal; (c) grupo metilo que se observa en 0,9 ppm.

En el espectro (B) de la Figura 5 correspondiente al copolímero protegido nuevamente se pueden apreciar las señales (a, b y c) correspondientes al macroiniciador, PMMA₂₇₅-Cl. Por otro lado, las señales correspondientes al metileno y metilo (d) y (e), respectivamente, se observa a igual campo que las señales (b) y (c), debido a que corresponden al esqueleto metacrílico proveniente del HEMA. Adicionalmente, se pueden apreciar dos señales a campo bajo (f) y (g) asignadas a los dos grupos metilenos del HEMA indicados en la Figura 5. Este desplazamiento se debe a la proximidad de grupos electroattractores en ambos extremos de la cadena. Se observa una diferencia entre ambas señales debido al diferente entorno químico propiciado por la presencia de átomo de silicio contiguo que afecta a la señal (g). Las señales (h) e (i) corresponden a los cinco metilos del grupo protector, si bien la señal (i) aparece en torno a 1 ppm, que es lo esperado para estos grupos, la señal (h) aparece muy desplazada a alto campo lo que se justifica por la cercanía al átomo de silicio.

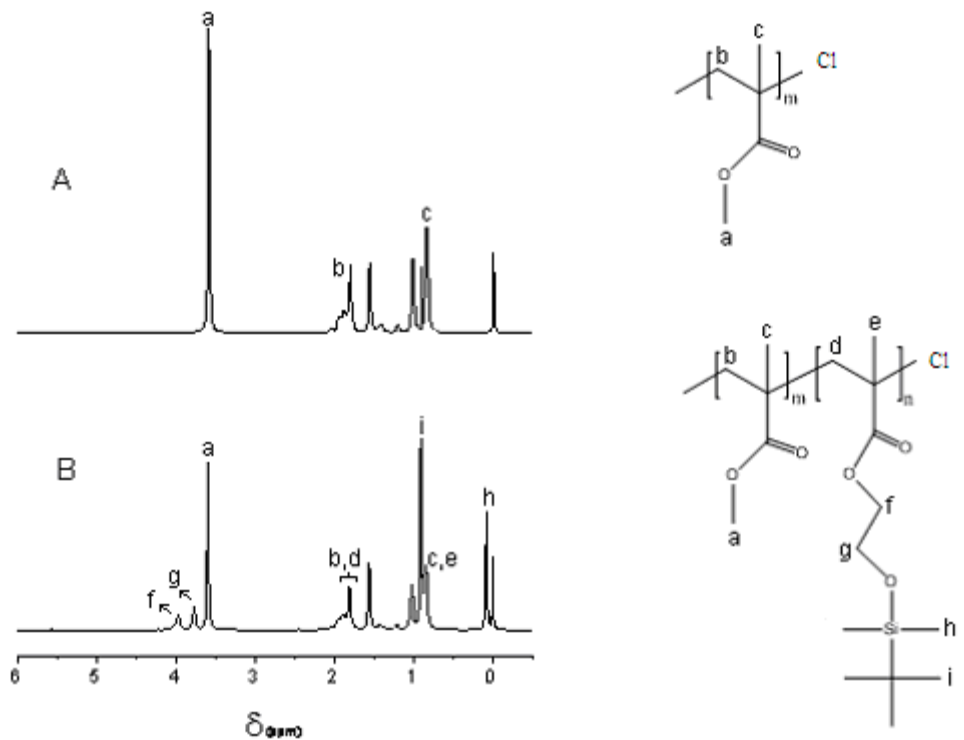


Figura 5. Espectro de RMN- ^1H (500 MHz) (A) macroiniciador, PMMA₂₇₅-Cl, H3 y (B) PMMA₂₇₅-PHEMA₈₈, C10.

En la Figura 6 se comparan los cromatogramas SEC obtenidos para el macroiniciador H2 y el copolímero en bloque C4. La diferencia de tiempos de retención y pesos moleculares entre el macroiniciador y el copolímero son una evidencia de la formación de este último.

También se puede observar que las distribuciones de masas molares de ambos polímeros son de tipo monomodal lo que asegura que no se formaron homopolímeros de HEMA.

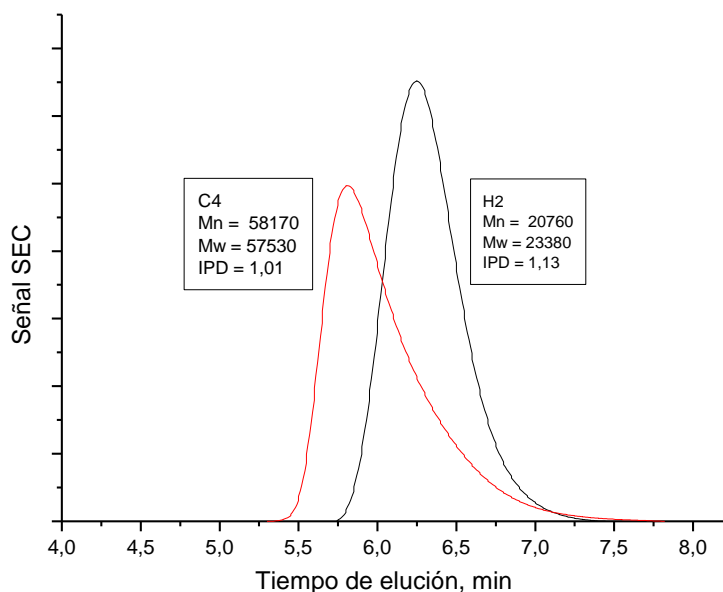


Figura 6. Cromatograma para PMMA₂₀₇-Cl H2 y PMMA₂₀₇-PHEMA₁₅₃ C4.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 2. Los datos de la tablas indican que esta polimerización permite la extensión de la cadena PMMA y el crecimiento en el peso molecular puede ser atribuido exclusivamente a formación de bloques PHEMA.

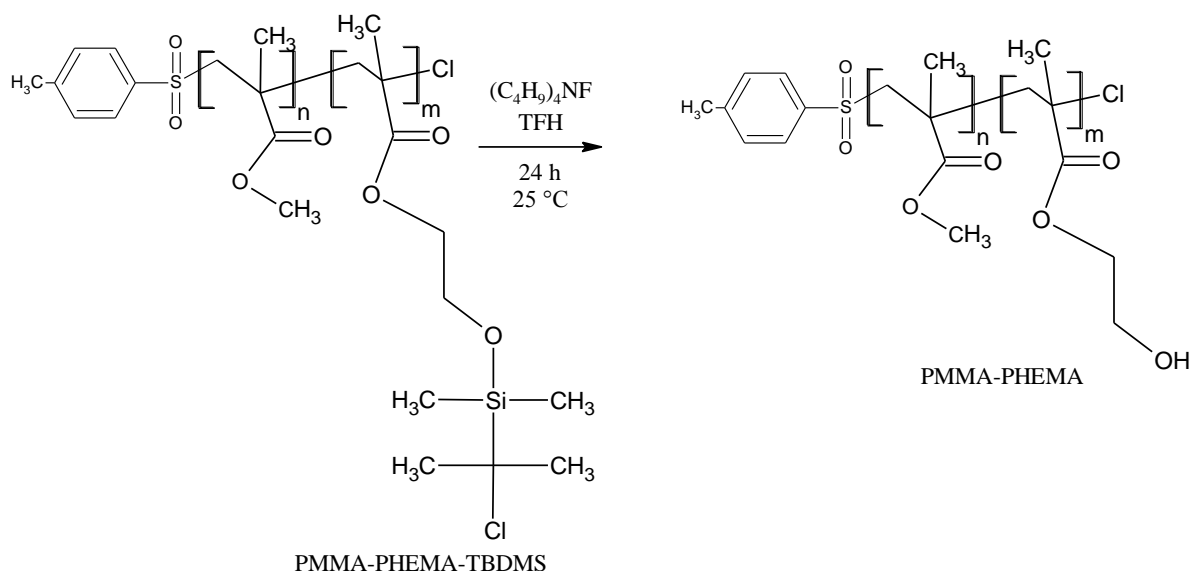
También se puede observar que los copolímeros muestran una relativa baja polidispersidad para los diferentes grados de polimerización tanto de HEMA como de MMA. También se puede decir que la copolimerización con HEMA protegida fue exitosa ya que se logró subir de 10 unidades de HEMA sin proteger a 154 cuando se usó HEMA-TBDMS.

Los diferentes grados de polimerización de estos bloques y los bajos valores de polidispersidad indican que el PMMA-Cl/BPy son una buena combinación de macroiniciador/ligando ATRP y permiten un control en la copolimerización. Por lo tanto, el carácter anfílico del copolímero en bloque puede ser modulado mediante el uso de PMMA-Cl de diferentes pesos moleculares como macroiniciador y/o variando el grado de polimerización de HEMA en el segundo bloque (Tabla 3).

Tabla 3: Pesos moleculares e índice de polidispersidad de los copolímeros PMMA-PHEMA sintetizados.

Polímero	Notación	PMMA-Cl	Mn (g/mol)	Mw (g/mol)	PD
PMMA ₆₇ -PHEMA ₁₅₂	C1	H1	43940	45220	1,03
PMMA ₆₇ -PHEMA ₁₅₄	C2	H1	44230	45260	1,02
PMMA ₂₀₇ -PHEMA ₁₃₅	C3	H2	53690	53210	1,01
PMMA ₂₀₇ -PHEMA ₁₅₃	C4	H2	58170	57530	1,01
PMMA ₂₇₅ -PHEMA ₇	C5	H2	28455	36450	1,28
PMMA ₂₇₅ -PHEMA ₁₀	C6	H2	28795	36915	1,28
PMMA ₂₇₅ -PHEMA ₁₀	C7	H3	28875	36845	1,27
PMMA ₂₇₅ -PHEMA ₁₂	C8	H3	29155	36995	1,27
PMMA ₂₇₅ -PHEMA ₆₅	C9	H3	43530	47240	1,08
PMMA ₂₇₅ -PHEMA ₈₈	C10	H3	49130	52820	1,07
PMMA ₁₃₀ -PHEMA ₃₀	C11	H6	17095	23320	1,36
PMMA ₁₃₀ -PHEMA ₃₈	C12	H6	18090	23970	1,32

Por último, los copolímeros en bloque se hicieron reaccionar con $(C_4H_9)_4NF$ con el fin de eliminar los grupos TBDMS que se utilizaron para proteger a los grupos hidroxilo de la porción HEMA. La reacción de desprotección se realiza a temperatura ambiente y usando THF como solvente tal como aparece indicado en el Esquema 4.



Esquema 4. Reacción de desprotección de los grupos hidroxilo en el copolímero PMMA-PHEMA-TBDMS.

La Figura 7 muestra los espectros de IR-FT del copolímero PMMA-PHEMA, C9. El espectro del copolímero con los grupos hidroxilo del HEMA protegidos con TBDMS-Cl (negro) se compara con el espectro del mismo copolímero luego de ser sometido a la reacción de desprotección (rojo).

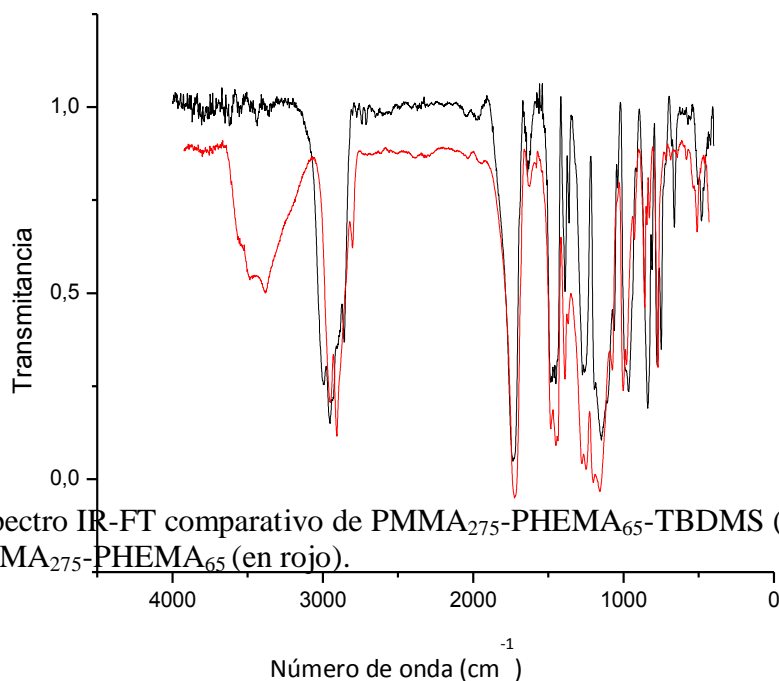


Figura 7. Espectro IR-FT comparativo de PMMA₂₇₅-PHEMA₆₅-TBDMS (en negro) y PMMA₂₇₅-PHEMA₆₅ (en rojo).

La pérdida de la totalidad de grupos protectores hace disminuir el peso molecular de cada polímero y suponiendo que la reacción de desprotección no altera el grado de polimerización es posible calcular Mn y Mw para cada polímero. Estos resultados se resumen en la tabla 4.

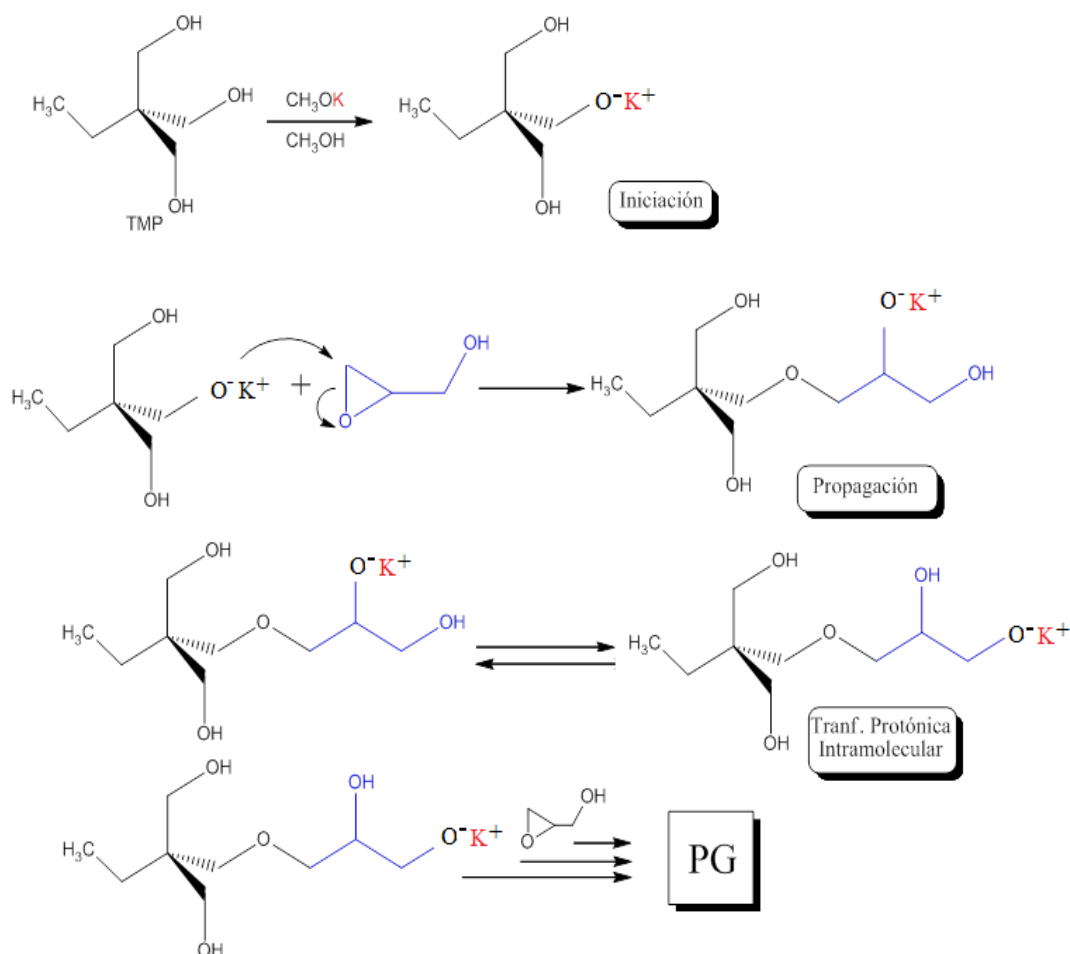
Tabla 4: Pesos moleculares de los copolímeros PMMA-PHEMA desprotegidos.

Polímero	Notación	Mn (g/mol)	Mw (g/mol)	PD
PMMA ₆₇ -PHEMA ₁₅₂	C1	26485	27280	1,03
PMMA ₆₇ -PHEMA ₁₅₄	C2	26745	27280	1,02
PMMA ₂₀₇ -PHEMA ₁₃₅	C3	38270	38655	1,01
PMMA ₂₀₇ -PHEMA ₁₅₃	C4	40615	41020	1,01
PMMA ₂₇₅ -PHEMA ₇	C5	28455	36450	1,28
PMMA ₂₇₅ -PHEMA ₁₀	C6	28795	36915	1,28
PMMA ₂₇₅ -PHEMA ₁₀	C7	28875	36845	1,27
PMMA ₂₇₅ -PHEMA ₁₂	C8	29155	36995	1,27
PMMA ₂₇₅ -PHEMA ₆₅	C9	35960	38840	1,08
PMMA ₂₇₅ -PHEMA ₈₈	C10	38955	41680	1,07
PMMA ₁₃₀ -PHEMA ₃₀	C11	17000	23127	1,36
PMMA ₁₃₀ -PHEMA ₃₈	C12	18045	23830	1,32

La eliminación completa de los grupos TBDMS y la formación de grupos hidroxilo fue confirmada por IR-FT a través de la observación de una ancha banda del OH polimérico entre 3400 y 3200 cm⁻¹ junto con no observar señales típicas de Si-O a 1100 y 810 cm⁻¹ y Si-CH₃ a 1265 cm⁻¹

3.2 Síntesis de polímeros hiper ramificados: PG y PG-PHEMA

La síntesis de poliglicidol hiper ramificado se realiza por un método descrito en la literatura y que básicamente consiste en la polimerización aniónica de glicidol usando un iniciador multiramificado⁵⁵. El glicidol es un hidroxi epóxido altamente reactivo y la polimerización procede por apertura del anillo usando como iniciador la forma deprotonada de 1,1,1-tris(hidroximetil) propano, TMP. Debido a la alta reactividad del glicidol la adición del monómero debe hacerse controladamente para evitar la polimerización sin iniciador y la ciclación. La reacción de polimerización se describe en el Esquema 5 y los detalles de la síntesis de PG se dan en la sección Materiales y Métodos.



Esquema 5. Reacción de polimerización de glicidol

La reacción de polimerización aniónica de glicidol ocurre con un porcentaje de rendimiento promedio de 80 %. El peso molecular absoluto del poliglicidol obtenido se determinó por MALDI-TOF y los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Resultados de las mediciones de Mw, Mn y PD realizadas mediante MALDI-TOF para poliglicidol sintetizado por apertura controlada de anillo.

Polímero	Notación	Mn	Mw	PD
PG ₂₀	H7	1260	1500	1,19

Los valores obtenidos para Mw y Mn son similares a los previamente reportados para los PG sintetizados por esta vía⁵⁸, y son concordantes con los obtenidos por RMN-¹³C.

En el espectro IR-FT de la Figura 8 es posible asignar la banda que se observa a 737 cm⁻¹ al estiramiento del enlace C-H de los grupos CH₂, mientras que las bandas que se observa entre 1050-1330 cm⁻¹ se asignan al estiramiento C-OH. La zona entre 1640 y 1620 cm⁻¹ se puede identificar con la vibración de estiramiento del enlace O-H presente en polímeros y, finalmente, la ancha banda a 3640 cm⁻¹ corresponde al grupo alcohol terminal, OH presente en el PG₂₀.

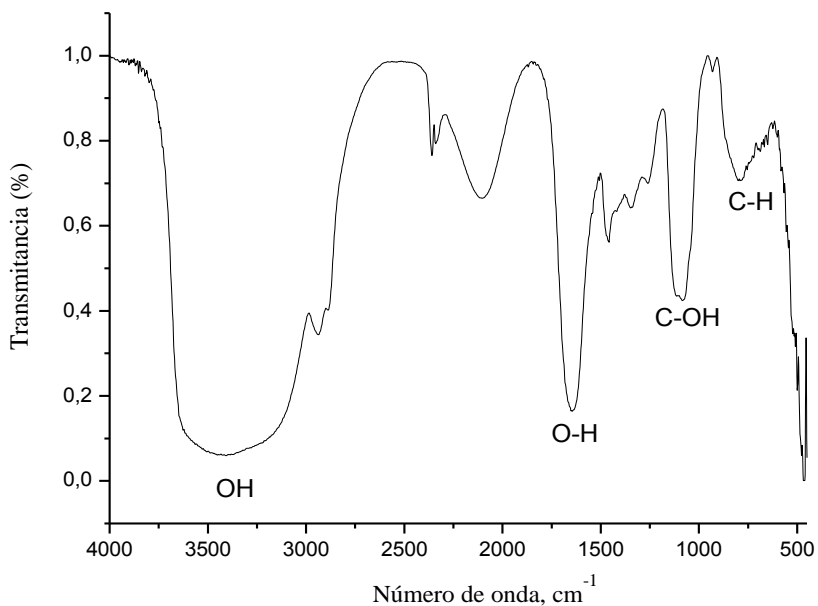


Figura 8. Espectro IR-FT de PG₂₀, H7.

También se realizaron espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C de los cuales se puede obtener valiosa información tanto del grado de polimerización como del grado de ramificación del polímero PG.

La Figura 9 muestra el espectro RMN-¹H donde es posible confirmar la incorporación del iniciador TMP, ya que las señales de CH₃- a 0,9 y CH₂- a 1,4 ppm se deben a este compuesto. Entre 3,3 y 4,0 ppm se encuentra una amplia señal correspondiente a los cuatro protones de los dos grupos CH₂- y al protón del CH- presentes en cada unidad monomérica. La señal en 4,8 ppm corresponde al protón del grupo hidroxilo.

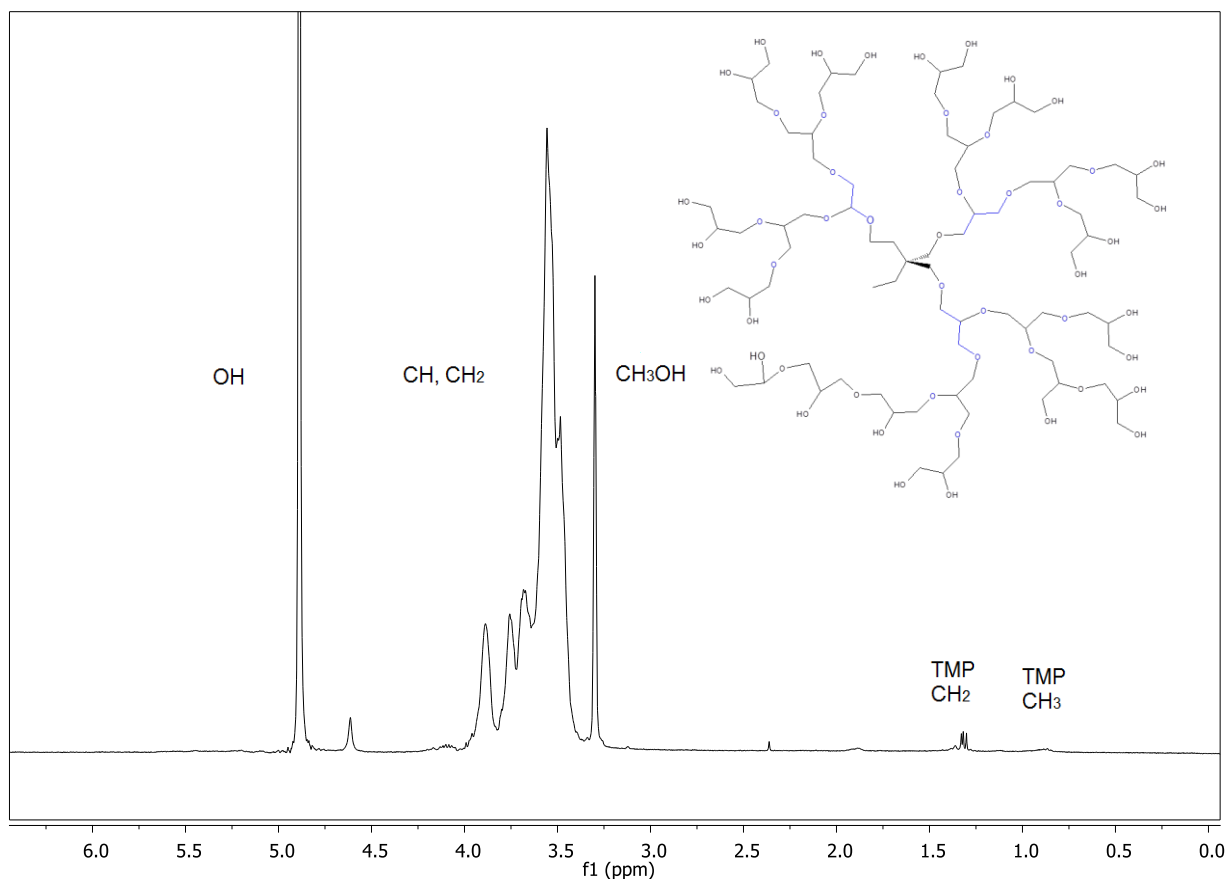


Figura 9. RMN- ^1H (400 MHz en CD_3OH) para PG_{20} .

Para poder analizar el espectro RMN- ^{13}C se debe considerar el esquema de la Figura 10 que muestra la estructura de una molécula de PG hiper ramificado. Acá se identifican tres tipos diferentes de unidades que se generan durante la polimerización debido a que todos los grupos hidroxilos obtenidos por la apertura del anillo de glicidol son potencialmente activos. Estas unidades son: dendríticas (D), lineales (L) y terminales (T).

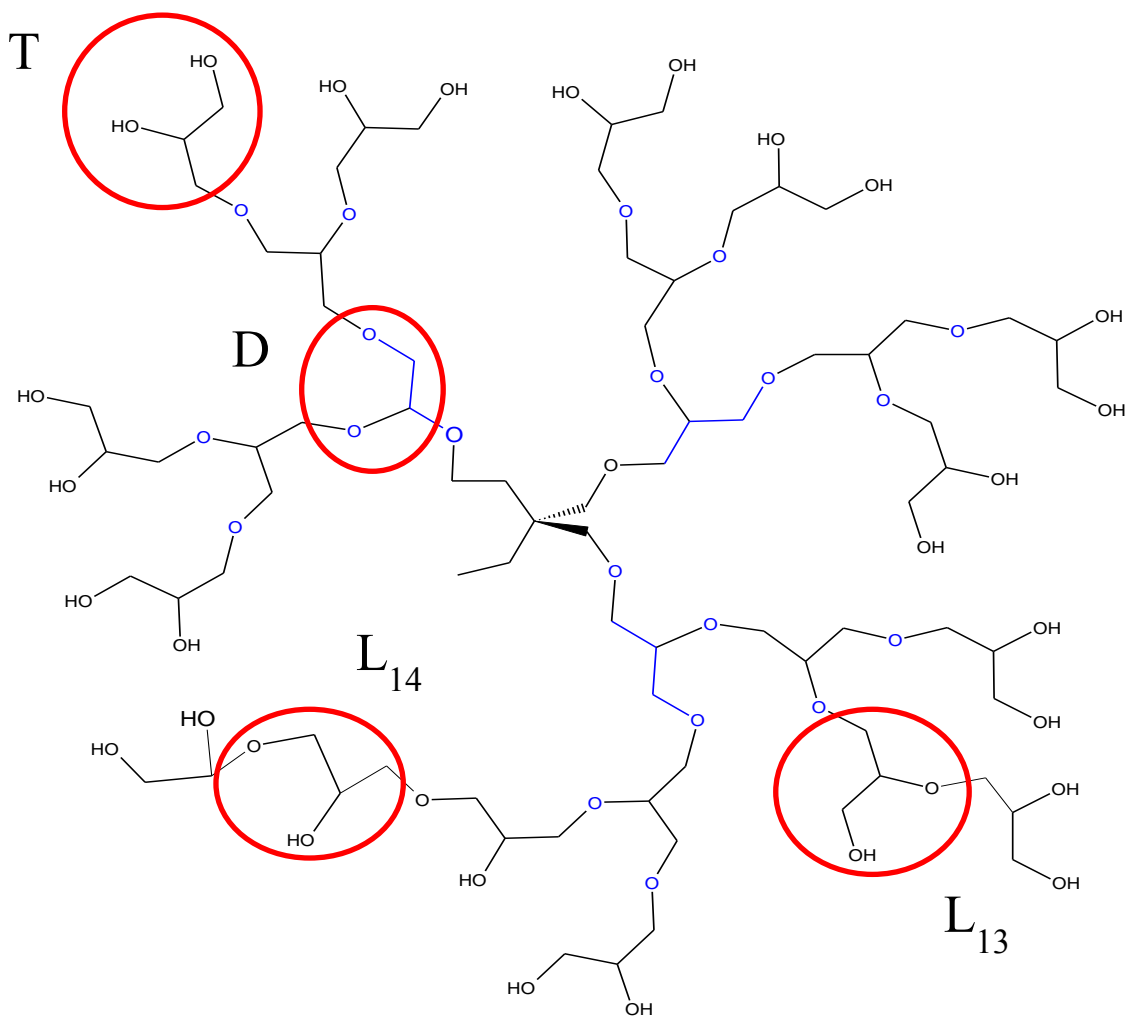
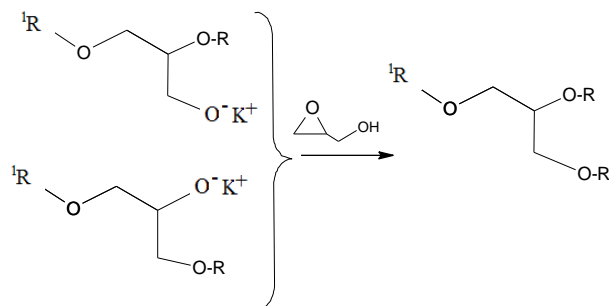


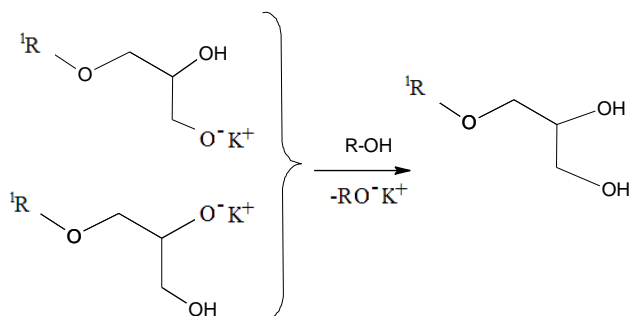
Figura 10. Esquema estructural del PG hiper ramificado, donde T es una unidad terminal, D una unidad dendrítica. L_{13} y L_{14} representa las unidades lineales.

La unidad dendrítica se puede formar cuando ambos grupos hidroxilos generados por la apertura del anillo de glicidol reaccionan con más monómero, como se muestra en el Esquema 6:



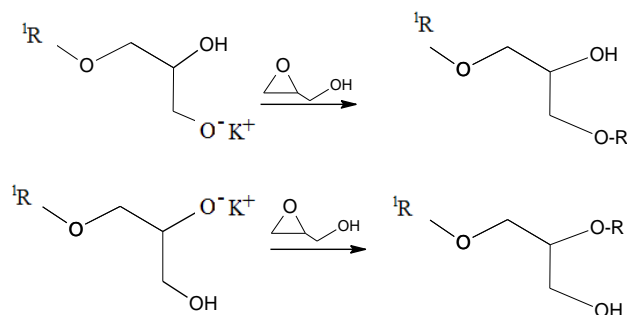
Esquema 6. Reacción de formación de unidades dendríticas en el PG.

La unidad terminal, Esquema 7, se genera cuando una unidad de monómero es desactivada por intercambio de protones generándose dos grupos hidroxilos terminales. Estas unidades se pueden generar en cualquier posición dentro de la estructura.



Esquema 7. Reacción de formación de unidades terminales en el PG.

Debido exclusivamente a la estructura asimétrica del glicidol en su polimerización se generan dos diferentes tipos de unidades lineales, L_{13} y L_{14} . Estas unidades se diferencian por el carbono por donde continúa la propagación, en el primer caso la cadena crece por el lado del grupo CH_2^- y en el segundo caso la cadena crece por el lado del grupo CH -



Esquema 8. Reacción de formación de unidades lineales L_{13} y L_{14} respectivamente en el PG.

La Figura 11 muestra el espectro de $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ para PG_{20} , donde es posible distinguir siete regiones de señales bien resueltas entre 60 y 85 ppm. La Tabla 6 resume los datos obtenidos desde el espectro de $\text{RMN-}^{13}\text{C}$.

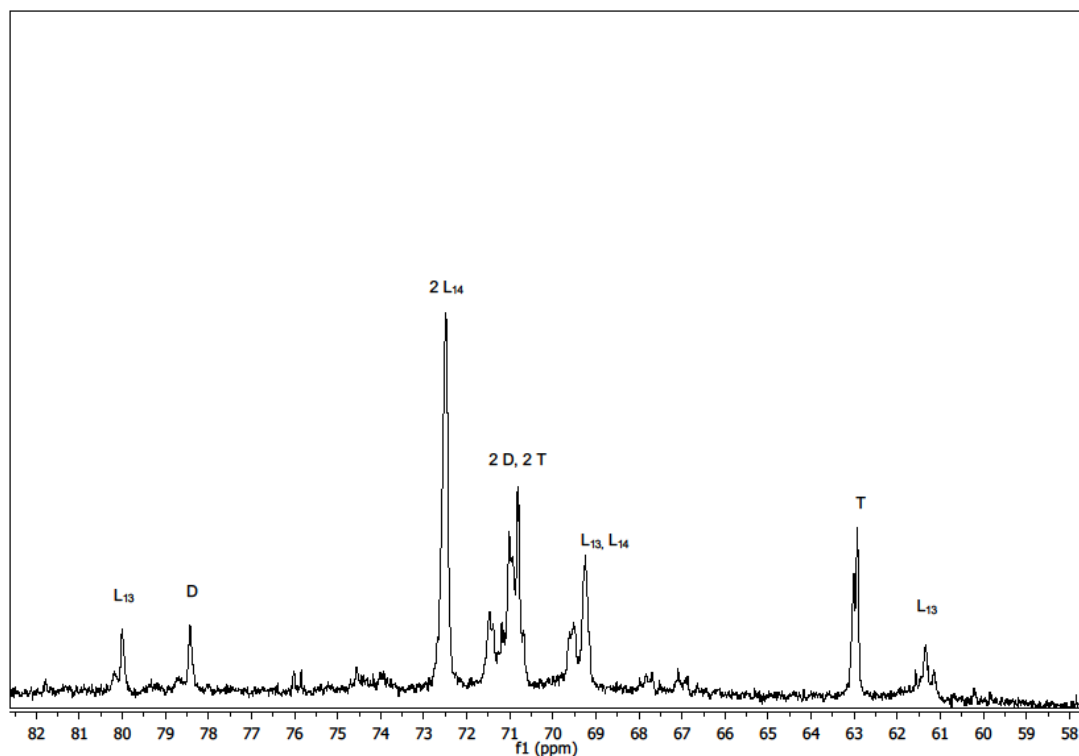


Figura 11. Espectro de RMN-¹³C (400 MHz en CD₃OD) para PG₂₀

Tabla 6: Interpretación de RMN-¹³C del espectro de PG₂₀. Distribución de unidades estructurales.

Unidad Estructural	Desplazamiento (ppm)	Integral relativa
L ₁₃	79,7-80,6	1,00
D	78,1-79,0	1,06
2 L ₁₄	72,0-73,0	3,72
2D, 2T	70,3-71,9	4,58
L ₁₃ , L ₁₄	68,9-70,0	2,45
T	62,1-63,4	1,72
L ₁₃	60,8-61,9	1,09
Unidad estructural		Abundancia relativa (%)
Terminal (T)		29
Lineal 1,3 (L ₁₃)		19
Lineal 1,4 (L ₁₄)		34
Dendrítico (D)		18

Con los datos de abundancia relativa y empleando las fórmulas 1 y 2 de literatura⁵⁵ es posible calcular el grado de ramificación DB, y el número promedio de polimerización \overline{DP}_n , para el polímero PG.

$$DB = \frac{2D}{2D + L_{13} + L_{14}} \quad (1)$$

$$DB = \frac{36}{36 + 53} = 0,404$$

$$\overline{DP}_n = \frac{T + L_{13} + L_{14} + D}{T - D} fc \quad (2)$$

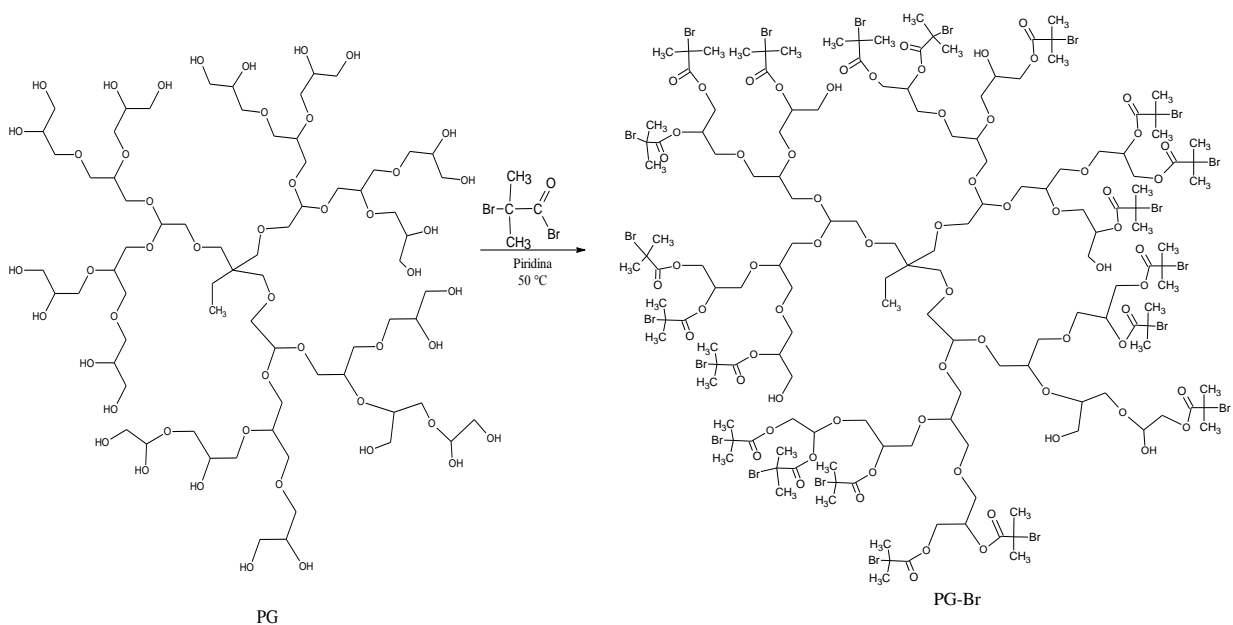
donde fc tiene un valor de tres y corresponde al grado de funcionalización que tiene el iniciador TMP usado en esta síntesis.

$$\overline{DP}_n = \frac{100}{29 - 18} 3 = 27,3$$

El parámetro DB da cuenta de la relativa perfección de la estructura ramificada, presentando un valor de 1 cuando se trata de un dendrímero perfecto y 0 cuando se trata de un polímero lineal. El valor calculado de DB es 0,404. Este resultado muestra que en la polimerización del glicidol se formaron menos unidades dendríticas de las esperadas para policondensaciones del tipo AB₂, cuyo valor máximo de DB es 0,66, y se observa un aumento de las unidades lineales del tipo L₁₃ y L₁₄. Esto quiere decir que el sistema presenta un mayor número de grupos hidroxilos que quedan dentro de la matriz globular que no se convirtieron en unidades dendríticas. Este aumento de grupos hidroxilo en la estructura puede tener un efecto favorable tanto en la solubilidad en agua como en la posible formación de puentes de hidrógeno con los sustratos estudiados en los estudios de liberación. El valor obtenido para \overline{DP}_n es 27,3. Este valor permite calcular el peso molecular Mn obteniéndose un valor igual a 2020 (g/mol), que, debido al error del método es más alto que el informado en la Tabla 5 (pág. 39) medido a través de MALDI-TOF.

3.2.1 Reacción de esterificación de PG

Una propiedad importante del PG es la alta funcionalidad que posee debido a la presencia de un gran número de grupos hidroxilo en su estructura. Estos grupos son susceptibles de ser transformados a través de una serie de reacciones orgánicas típicas. Así, el PG fue sometido a una reacción de esterificación y convertido en bromoéster con el fin de tener un iniciador eficaz para ATRP. En esta reacción los grupos OH de cada rama del polímero se hacen reaccionar con 2-bromoisobutiril bromuro, de modo que cada rama del polímero termine en un haluro alquilico⁵⁷. La esterificación se realizó en piridina como disolvente, añadiendo lentamente el bromuro de acilo, de acuerdo a la reacción descrita en el Esquema 9.



Esquema 9. Reacción de esterificación del PG.

La Figura 12 muestra el espectro IR-FT para PG y PG-Br. Al comparar ambos espectros se puede observar una disminución en la señal correspondiente a los hidroxilos. El grado de esterificación se puede obtener a partir de este cambio usando como estándar interno la banda que se observa a 737 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del enlace C-H de los grupos CH_2 . Comparando la razón de estas bandas en los espectros de PG y PG-Br fue posible estimar un porcentaje de esterificación igual a 78 %. Esta conversión de grupos hidroxilos es muy similar a la reportada⁵⁷ cuyos valores fluctúan entre 71 y 86 %.

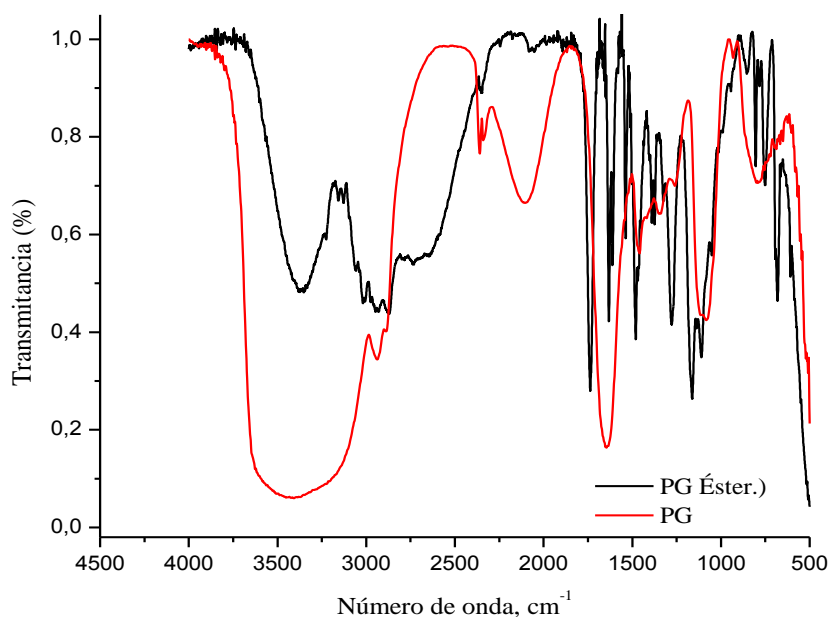


Figura 12. Espectro IR-FT comparativo entre PG₂₀, y PG₂₀-Br.

En la Figura 13 se muestra el espectro de RMN-¹H de PG-Br, donde es posible asignar las señales de los grupos hidroxilos terminales de PG hiper ramificado. Se observa en el espectro un corrimiento a bajo campo respecto de las señales del mismo espectro de PG, (Figura 8). Este desplazamiento se debe a la presencia del grupo éster proveniente de la reacción de esterificación de la molécula de PG. Se sabe que átomos más electronegativos son capaces de retirar carga de átomos vecinos, en este caso de los protones de grupos -CH₂ y -CH (A-E en la Figura 13) provocando una desprotección en éstos y su corrimiento a bajo campo.

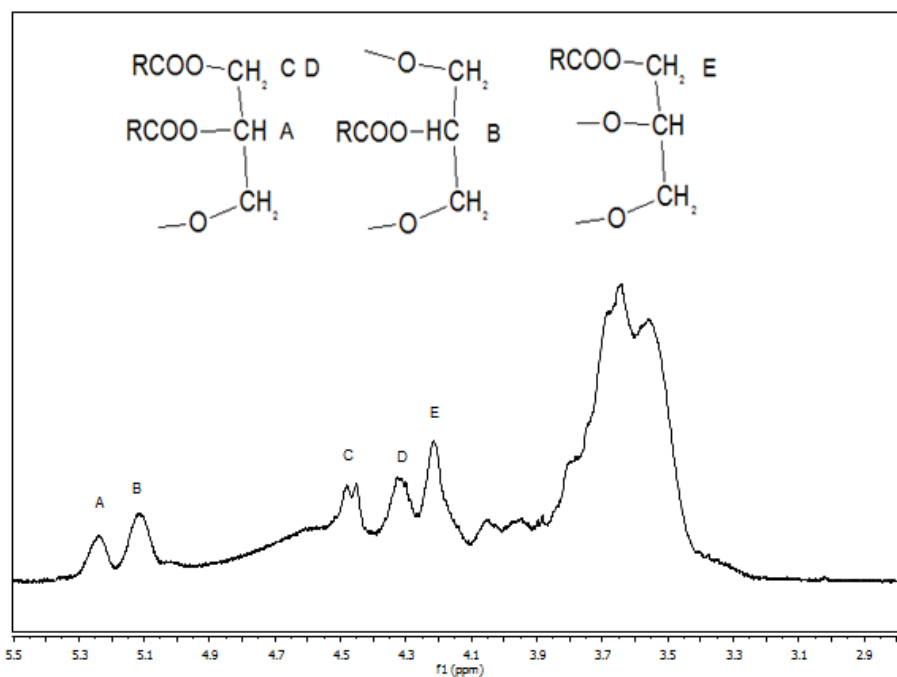
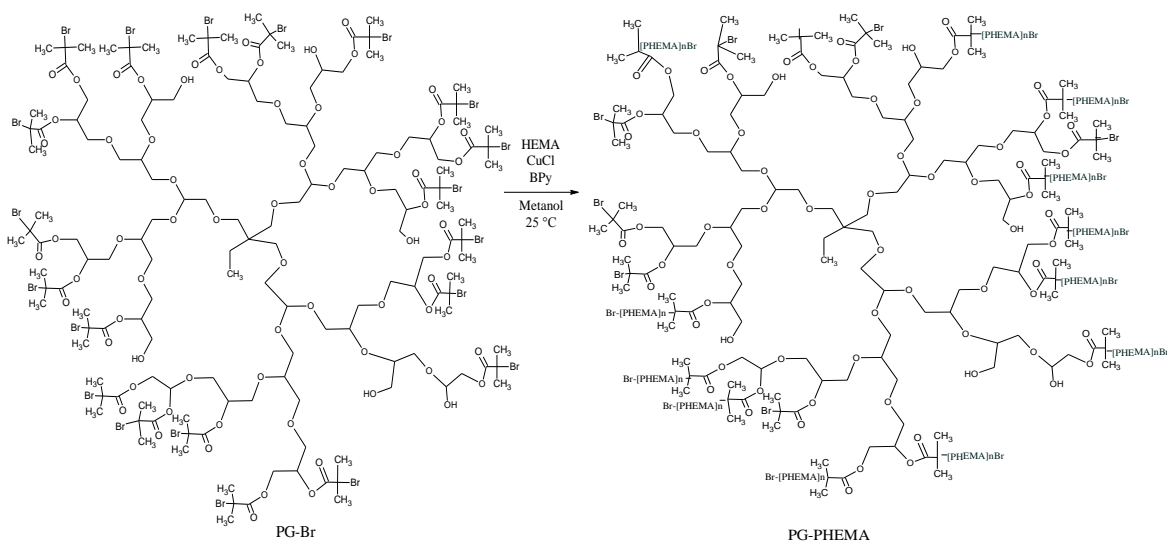


Figura 13. RMN-¹H (400 MHz en CD₃Cl₃) para poliglicidol esterificado.

3.2.2 Síntesis de PG-PHEMA

El PG-Br que se obtuvo por esterificación se usa como macroiniciador en la polimerización vía ATRP de HEMA de acuerdo a un método descrito en la literatura⁵⁸. La reacción de polimerización que se muestra en el Esquema 10 ocurre con un 25 % de rendimiento.



Esquema 10. Reacción de copolimerización de PG-Br con HEMA.

El peso molecular del copolímero PG-PHEMA fue determinado por MALDI-TOF. Los resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7: Peso molecular de los copolímeros PG-PHEMA, sintetizados vía ATRP, medidos por MALDI-TOF

Notación	PG	Mn	Mw	PD
C13	H7	3210	3640	1,13
C14	H7	3820	4385	1,15

Si se comparan estos valores con los pesos moleculares de PG de la Tabla 3 se ve que hay un aumento en el peso molecular que se puede atribuir a la reacción de copolimerización. Sin embargo, esta diferencia de masa no solo equivale a unidades de HEMA que podrían haber polimerizado sino que también a la presencia del grupo éster, que es el punto de unión de ambos polímeros. Considerando que la reacción de esterificación tuvo un rendimiento de un 78 %, se puede decir que de las 20 unidades 16 grupos hidroxilo se esterificaron y solo 4 grupos quedaron sin reaccionar. Por lo tanto, el copolímero resultante podría estar conformado por grupos hidroxilos libres, grupos hidroxilos esterificados que no copolimerizaron, y grupos hidroxilos esterificados que podrían tener uno o más grupos HEMA. Por cada grupo OH esterificado el peso molecular aumenta en 150 unidades lo que da un peso molecular de 3897 para PG-Br. Considerando que el peso molecular obtenido para C13 (Tabla 7) es menor que el peso esperado del PG-Br se puede concluir que en este caso no hubo formación de copolímero y que la esterificación fue menor al 78%. La diferencia entre los pesos moleculares obtenidos por MALDI-TOF corresponde a los grupos hidroxilo que fueron esterificados, y que en este caso es 14. Por lo tanto el sistema C13 corresponde a $PG_{20}Br_{14}$. A partir de esta diferencia de pesos moleculares obtenidos por MALDI-TOF se obtiene un grado de esterificación de un 70 % que será considerado como el porcentaje experimental de esterificación.

En el caso de C14, el aumento de peso molecular, una vez que se resta el peso molecular de $PG_{20}Br_{14}$, puede ser atribuido a la formación del copolímero que correspondería solo a 6 unidades de HEMA, por lo tanto el sistema C14, estará conformado por $PG_{20}Br_{14}HEMA_6$.

La razón por la cual se logró copolimerizar solo un bajo número de unidades de HEMA podría tener relación con que el medio de reacción no fue el más apropiado. El solvente usado para esta reacción es metanol, y es posible que después de la síntesis de PGBr haya quedado piridina ocluida en el poliglicidol esterificado, generando una mezcla de solventes cuya polaridad es menor que la que proporcionaría el metanol cuando se usa como único solvente.

3.3 Análisis Térmico

El comportamiento térmico de PMMA-Cl, PMMA-PHEMA y PG-PHEMA se investigó mediante análisis de TGA y DSC. Las curvas de TGA obtenidos para los diferentes macroiniciadores de PMMA-Cl y copolímeros de bloques se muestran en las Figuras 14 y 15 respectivamente.

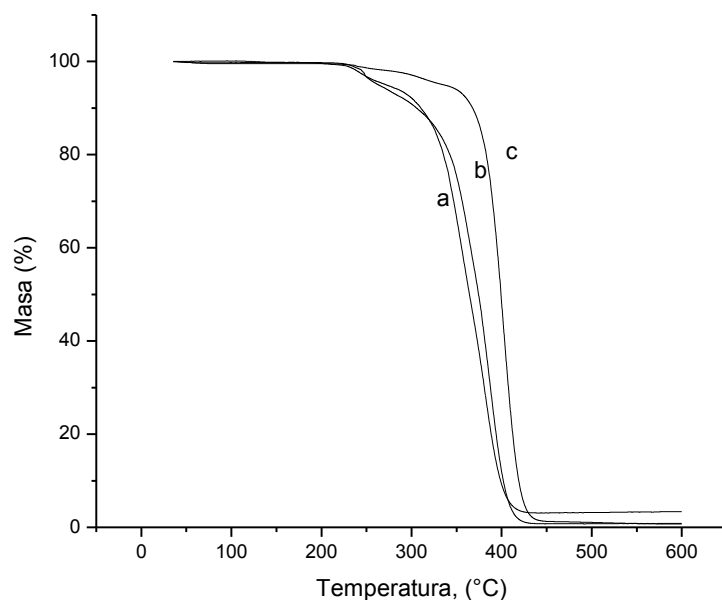


Figura 14. Análisis termogravimétrico de PMMA-Cl con diferentes grados de polimerización: (a) H1; (b) H2; (c) H3.

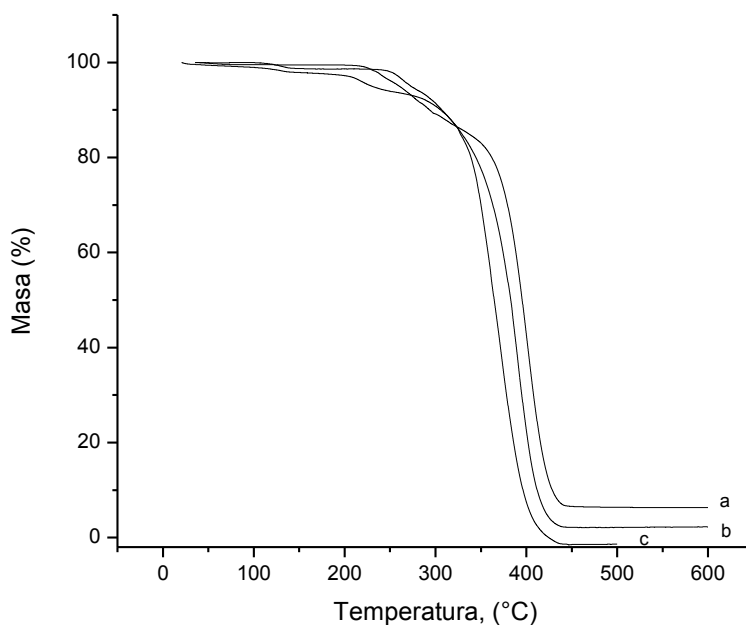


Figura 15. Análisis termogravimétrico, TGA, de copolímeros PMMA-PHEMA con diferente composición: (a) C2; (b) C4; (c) C6.

A partir de las curvas de TGA se obtuvieron las temperaturas $T_{5\%}$ y $T_{50\%}$ correspondientes al 5 % y 50 % de pérdida de masa respectivamente. También se trabajaron las derivadas de estas curvas

obteniéndose a partir de su máximo la temperatura más elevada, $T_{m\acute{a}x}$, donde la pérdida de masa es máxima para cada sistema medido. Los resultados se resumen en la Tabla 8. Las derivadas de las curvas de TGA muestran un solo máximo, lo que indica que la degradación térmica ocurre en una sola etapa. Para todos los sistemas estudiados la principal pérdida de masa se produce por encima de 350 °C, lo que sugiere que esta degradación se debe a la ruptura de cadenas en forma aleatoria⁶⁴ y no existe ninguna reacción de degradación previa a esta temperatura. Se puede observar en la Tabla 8 que los valores de porcentaje máximo de pérdida de masa para los copolímeros PMMA-PHEMA tienen una pequeña fluctuación mostrando un valor promedio de 64 %. Esto podría indicar que la estabilidad térmica de estos sistemas viene dada por la naturaleza química de los homopolímeros y no por el porcentaje de cada uno de ellos presente en el copolímero. Lo mismo ocurre en el sistema PG-PHEMA donde el valor máximo promedio de pérdida de masa es de 72,5 %.

Tabla 8: Temperatura de transición vítrea T_g , temperaturas de 5 % y 50 % de pérdida masa, $T_{5\%}$, $T_{50\%}$ y la temperatura máxima de pérdida de masa $T_{m\acute{a}x}$.

Polímero	Notación	T_g (°C)	$T_{5\%}$ (°C)	$T_{50\%}$ (°C)	$T_{m\acute{a}x}$ (°C)	masa perdida (%)
PMMA ₆₇	H1	116,3	335	399	399	48,7
PMMA ₂₀₇	H2	121,7	263	374	387	70,0
PMMA ₂₇₅	H3	122,9	272	364	384	74,8
PMMA ₆₇ -PHEMA ₁₅₄	C2	108,8	260	395	402	61,4
PMMA ₂₀₇ -PHEMA ₁₃₅	C3	115,6	136	372	388	74,7
PMMA ₂₀₇ -PHEMA ₁₅₃	C4	116,0	273	383	391	63,7
PMMA ₂₇₅ -PHEMA ₈₈	C10	113,9	176	371	376	56,4
PG ₂₀ - Br ₁₄	C13	84,0	210	400	414	70,2
PG ₂₀ -PHEMA ₆	C14	81,6	106	383	410	74,8

Por otra parte, las curvas de TGA obtenidas para algunos copolímeros en bloques PMMA-PHEMA exhiben una degradación inicial a temperaturas más bajas, que se puede atribuir a la pérdida de agua unida al bloque PHEMA que posee características higroscópicas. En los polímeros y copolímeros de HEMA el agua unida podría llegar hasta el 10 % de pérdida de masa^{65,66}.

Las curvas de DSC se muestran en las Figuras 16 y 17 y las temperaturas de transición vítrea que se obtuvieron están tabuladas en la primera columna de la Tabla 8. El análisis de los datos de temperatura de transición vítrea de los sistemas en estudio, muestra la existencia de una dependencia de la T_g con la composición y el peso molecular de los polímeros estudiados.

Respecto de la composición se puede decir que el factor más importante que determina el valor de la T_g , es la flexibilidad de la cadena polimérica considerada aisladamente y de las interacciones entre tales cadenas. La flexibilidad de la cadena viene determinada por la estructura química de los sistemas. Las cadenas formadas por enlaces C-C y C-O, son notablemente flexibles y así las poliolefinas tienen Tgs relativamente bajas. Esta flexibilidad no se observa en los sistemas preparados debido a la presencia de cadenas ramificadas que limitan la rotación alrededor del enlace C-C. Estas ramificaciones dan rigidez a la estructura lo que conduce a valores relativamente altos de Tgs. Por lo tanto, estos resultados sugieren que los homopolímeros tienen una estructura al azar.

Respecto a la dependencia con el peso molecular se sabe que por debajo de la Tg hay ciertos movimientos en las cadenas poliméricas que se ven obstaculizados, mientras que por encima de la Tg estos movimientos se ven beneficiados debido a un aumento en los grados de libertad locales del sistema y por ende una mayor interacción con cadenas vecinas. Por esta razón, se espera que a mayor peso molecular mayor sea el valor de la Tg. En el caso de los homopolímeros se observó que el valor de Tg aumenta 11,5 grados a medida que el peso molecular crece de 7360 (H1) a 58830 (H5).

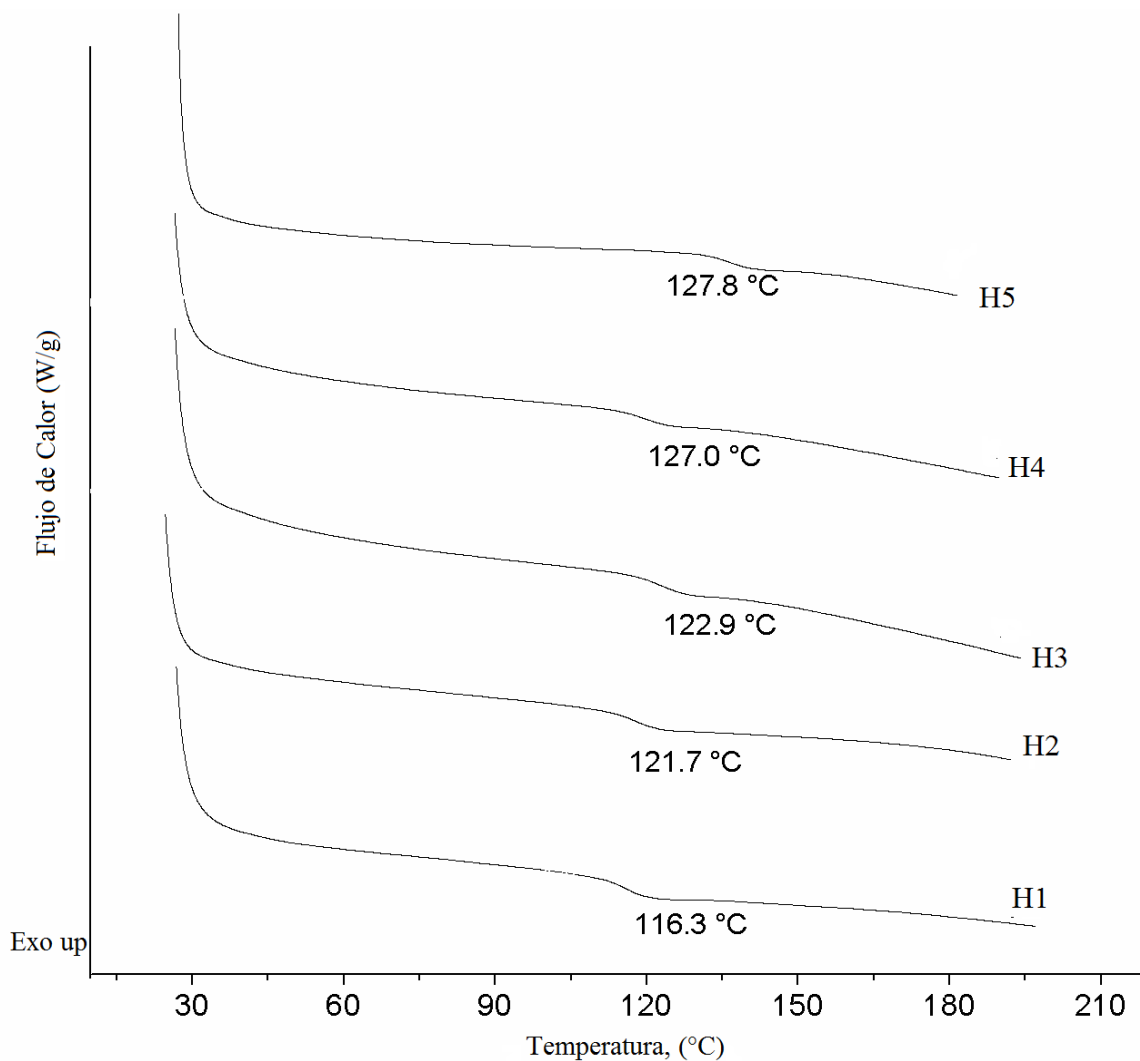


Figura 16. Análisis térmogravimétrico, DSC, de PMMA-Cl con diferentes grados de polimerización.

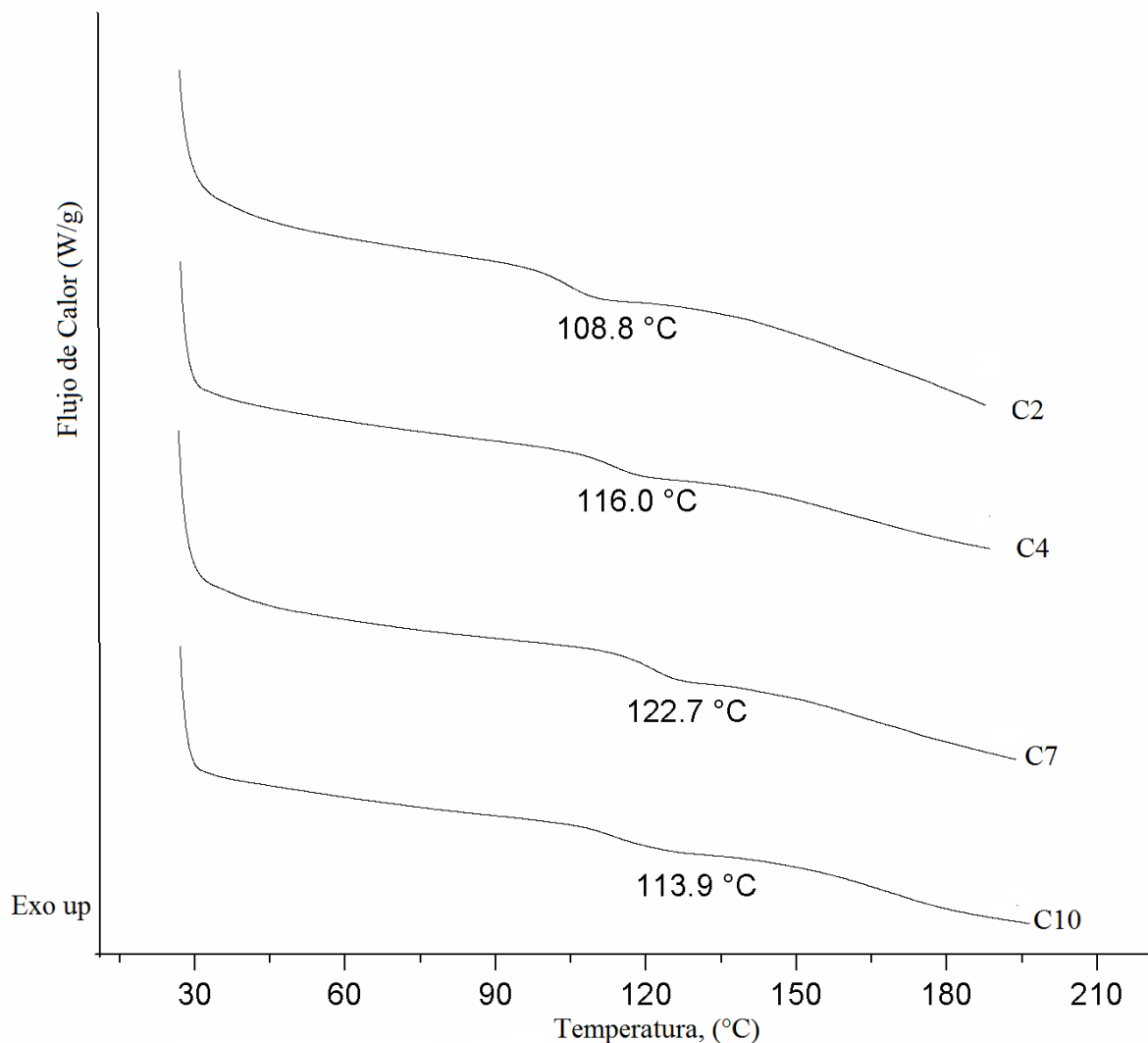


Figura 17. Análisis térmogravimétrico, DSC, de PMMA-PHEMA con diferente composición.

Otra cosa importante que se observa respecto de los valores de Tgs es que tanto para los copolímeros como para homopolímeros se detecta una sola temperatura de transición vítrea (figuras 16 y 17). Se sabe que los copolímeros en bloque podrían comportarse en forma similar a las mezclas físicas con dos distintos conjuntos de propiedades físicas y que cada fase podría presentar su propia y distinta Tg. En el caso de los sistemas PMMA-PHEMA y PG-PHEMA esto no se observó, y solo se aprecia un valor de Tg para cada sistema. Este comportamiento, en el caso de PMMA-PHEMA se puede explicar por la similitud estructural de ambos homopolímeros lo que otorga a cada sistema un comportamiento similar en términos de rigidez y flexibilidad. Por lo tanto, los copolímeros PMMA-PHEMA presentan una única fase y los valores de Tg medidos son más bajos que los medidos para su respectivo PMMA-Cl, y mayor que la Tg de PHEMA puro cuyo valor es de 87 °C⁶⁶. Estos resultados indican que en el estado vítreo las cadenas de polímero se distribuyen estadísticamente, y no hay formación de estructuras de microfases por parte del copolímero en bloques anfifílicos. Otro argumento para descartar la formación de microfases es que se sabe que polímeros que tienen componentes hidrófilos, tales como grupos

hidroxilo o amida, forman enlaces intermoleculares en presencia de agua que afectan fuertemente las características de la transición vítrea⁶⁷. Ciertos movimientos de la cadena principal están restringidos debido a estas interacciones intermoleculares y la temperatura de transición vítrea es más alta que la del polímero hidrófilo en el estado completamente seco. Los resultados obtenidos muestran justamente lo opuesto.

Por otro parte, la introducción de una pequeña cantidad de agua a un polímero hidrófilo puede interrumpir las interacciones intermoleculares mejorando así el movimiento de la cadena principal, en este caso la Tg se desplaza a temperaturas más bajas en presencia de agua. Los polímeros hidrófilos almacenados en condiciones ambientales contienen una cierta cantidad de agua ligada. En la mayoría de las aplicaciones prácticas las propiedades térmicas y mecánicas observadas del polímero reflejan la presencia de una cantidad nominal de agua.

Para el caso de PG-PHEMA, la Tg observada es mucho mayor que la correspondiente al PG solo cuyos valores son negativos. Este aumento en el valor de la Tg se debe principalmente al cambio de estructura inducido por los grupos éster usados en la esterificación dentro del proceso de copolimerización. La contribución de los grupos HEMA que forman parte del copolímero es mucho menor y por lo mismo los valores de Tg para PG₂₀-Br₁₄ y PG₂₀-PHEMA₆ son muy similares.

3.4 Caracterización de las micelas de copolímeros en bloque en solución acuosa

La caracterización de las micelas formadas por copolímeros en bloque en solución acuosa contempla:

1. Determinación de tamaño de las micelas formadas
2. Estudio de sistemas micelares mediante fluorescencia:
 - 2.1 Determinación de la concentración micelar crítica.
 - 2.2 Evaluación de la micropolaridad de las micelas formadas.

La determinación de la micropolaridad de los agregados y la concentración micelar crítica, se realiza mediante métodos fotofísicos utilizando pireno como sonda fluorescente.

3.4.1 Medición del tamaño de las micelas formadas.

El tamaño de las micelas poliméricas y su distribución se determinó mediante dispersión dinámica de luz (DLS). Los valores obtenidos para los sistemas estudiados se resumen en la tabla 9. La Figura 18 muestra la distribución de tamaños para las micelas formadas por los polímeros lineales y PG, y se puede apreciar que el diámetro promedio para las micelas de polímeros lineales está en torno a los 270 nm y la de PG alrededor de los 100 nm.

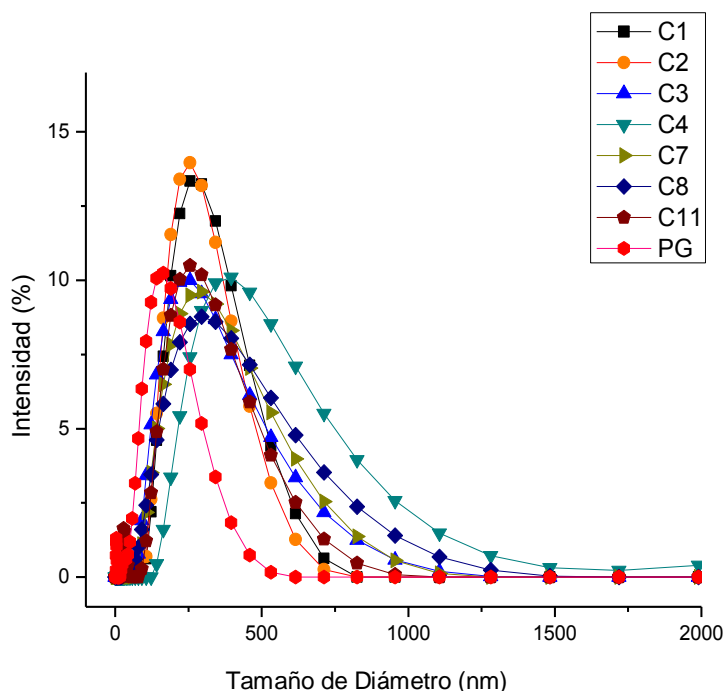


Figura 18. Comparación de tamaños de micelas formadas por PMMA-PHEMA y PG.

Los resultados de la tabla 9 serán analizados desde dos puntos de vista; primero se examinará la influencia del peso molecular en el tamaño de las micelas de cada familia de polímeros estudiados, y luego se buscará una correlación entre el tamaño micelar y el número de unidades monoméricas presentes en los polímeros lineales.

Para la familia de polímeros derivados de PG se encontró que el sistema micelar de menor tamaño está dado por PG (M_n : 1260), cuyo diámetro micelar es de 104 nm. Para los sistemas C13 y C14 (M_n : 3210 y 3820 respectivamente) se midieron diámetros mucho más grandes y similares entre sí; 180 y 182 nm respectivamente. Considerando que C13 corresponde a PG esterificado en un 70 % la diferencia de tamaño con PG viene dada por el aporte del grupo esterificador añadido. Para C14 que corresponde al polímero esterificado y posteriormente polimerizado con HEMA, se debe agregar la contribución de los grupos HEMA copolimerizados. Comparando los valores de diámetro entre C13 y C14 se puede concluir que el reducido número de grupos HEMA incorporados no son un aporte al tamaño micelar.

Tabla 9: Tamaño de micelas formadas por agregados acuosos de PMMA-PHEMA, PG, PGBr y PG-PHEMA medidos con DLS.

Polímero	Notación	Mn (g/mol)	Diámetro Promedio (nm)
PMMA ₆₇ -PHEMA ₁₅₂	C1	26485	249
PMMA ₆₇ -PHEMA ₁₅₄	C2	26745	243
PMMA ₂₀₇ -PHEMA ₁₃₅	C3	38270	295
PMMA ₂₀₇ -PHEMA ₁₅₃	C4	40615	328
PMMA ₂₇₅ -PHEMA ₁₀	C7	28875	270
PMMA ₂₇₅ -PHEMA ₁₂	C8	29155	267
PMMA ₂₇₅ -PHEMA ₈₈	C10	38955	295
PMMA ₁₃₀ -PHEMA ₃₀	C11	17000	221
PG ₂₀	H7	1260	104
PG ₂₀ -Br ₁₄	C13	3640	180
PG ₂₀ -PHEMA ₆	C14	4385	182

Para los polímeros lineales la relación entre el tamaño micelar y el peso molecular es lineal, esto se puede observar en la gráfica de la figura 19. El hecho de que el tamaño de la micela crezca en forma proporcional con el peso molecular del polímero sugiere que todas las micelas están formadas por un número igual de cadenas unimeras y el aumento de tamaño observado se debe al mayor número de unidades hidrofílicas e hidrofóbicas en cada cadena.

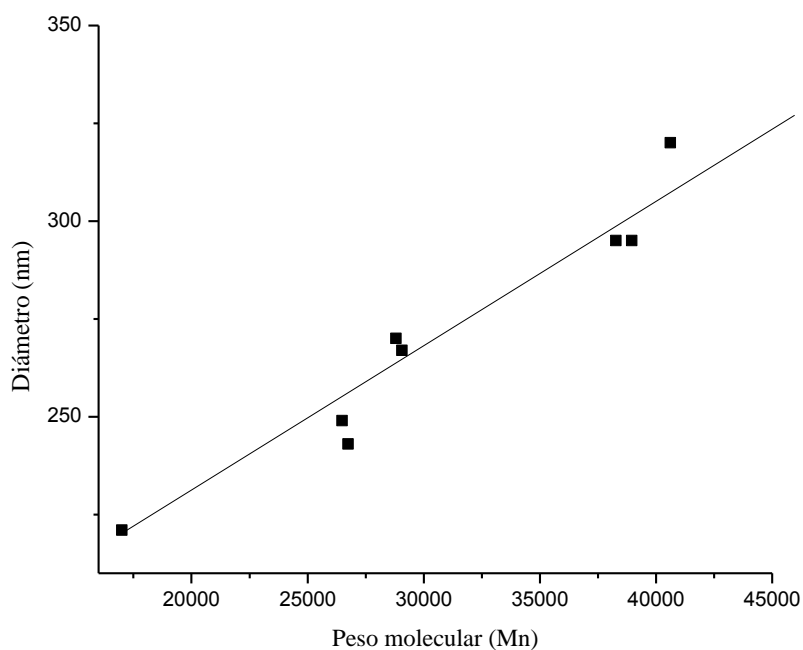


Figura 19. Efecto del peso molecular en el tamaño de micelas de PMMA-PHEMA.

El segundo criterio de análisis es el número de cada tipo de unidades presentes en los polímeros lineales. Aquí se puede agrupar los sistemas en dos subgrupos, el primero con igual número de unidades de HEMA (C1, C2 y C4 con 152, 154 y 153 unidades) y el segundo con igual número de unidades de MMA (C7, C8 y C10 todos con 275 unidades). Lo primero que llama la atención en estos subgrupos es que los tamaños micelares son relativamente similares con valores promedio de 273 y 277 unidades respectivamente, esto es indicativo que solo uno de los homopolímeros es el responsable del tamaño micelar. Para el primer grupo se puede observar que al pasar de 67 a 207 unidades de MMA, es decir al aumentar el peso molecular en 1,5 veces el diámetro aumenta 1,3 veces (crece 82 nm). Para el segundo grupo al pasar de 11 unidades promedio de HEMA a 88, equivalente a un cambio en el peso molecular de 1,35 veces, el diámetro solo aumentó 1,1 vez (27 nm). Por lo tanto, el efecto del tamaño de la unidad hidrofóbica de MMA es mucho más relevante en el tamaño micelar que un aumento de unidades HEMA.

En relación a la morfología de las micelas se puede decir que la mayoría de los sistemas lineales estudiados son del tipo *crew-cut* que se caracterizan por tener un corazón más grande que la corona y por lo tanto esta fracción hidrofóbica será la que determine el tamaño micelar. Solo los sistemas C1 y C2 forman micelas tipo estrella y se puede decir que el tamaño viene dado mayormente por los grupos HEMA.

Con el fin de estudiar el efecto de la incorporación de sustratos sobre el tamaño micelar se procedió a comparar los tamaños de las micelas en ausencia y en presencia de los diferentes fármacos empleados en este estudio.

En la figura 20 se puede apreciar el aumento de tamaño de la micela formada por PMMA₁₃₀PHEMA₃₀, al ser cargada con nitroimidazol con cadena lateral que va desde etilo a hexilo. Los tamaños medidos son: (A) micela sin cargar, 164 nm, (B) micela cargada con etil-nitroimidazol, 190 nm, (C) micela cargada con butil-nitroimidazol, 340 nm y (D) micelas cargadas con hexil-nitroimidazol, 530 nm.

Este efecto se puede explicar al considerar que las cadenas de unimeros que conforman la micela se van reacomodando a medida que el corazón hidrofóbico solubiliza el fármaco y en consecuencia el corazón de la micela crece. También es relevante ver que el tamaño de la micela crece en forma proporcional al largo de la cadena lateral del fármaco solubilizado. Este efecto se puede relacionar con la solubilidad del fármaco en el medio hidrofóbico proporcionado por el corazón micelar. El aumento de unidades metilénicas agrega un grado de hidrofobicidad a la molécula de fármaco aumentando su solubilidad en la micela, y por lo tanto, bajo las mismas condiciones experimentales de concentración se puede asumir que el aumento en el tamaño micelar se debe a un aumento en el número de moléculas incorporadas a la micela.

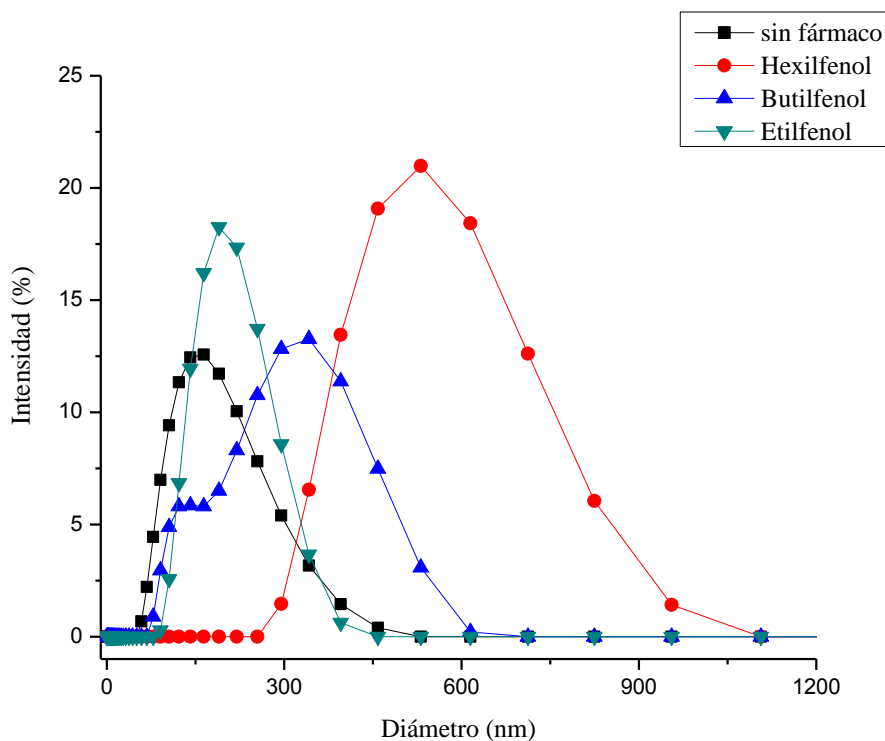


Figura 20. Comparación de tamaños de micelas de C11, PMMA₁₃₀PHEMA₃₀, cargadas con Alquil-NI 10⁻² M.

Este mismo experimento se realizó con micelas de PG en presencia de fenoles sustituidos con cadenas hidrocarbonadas de diferente largo, (figura 21). Los resultados muestran que al cargar la micela con fenoles sustituidos, cuya cadena lateral va desde metil a butil, el tamaño casi permanece invariable en torno a 180 nm. Como resultado de ambos experimentos se puede decir que al cargar micelas multimoleculares con sustancias hidrofóbicas, éstas son capaces de crecer en tamaño debido a que las cadenas de unimeros que las conforman pueden acomodarse o redistribuirse al solubilizar dicha sustancia. Por el contrario, en las micelas unimoleculares, la adición de un sustrato induce un aumento en la polidispersidad de tamaños, pero no cambia la estructura globular y el diámetro promedio sigue siendo el mismo. Este cambio se puede deber a la incorporación de diferentes números de moléculas a la estructura dendrítica.

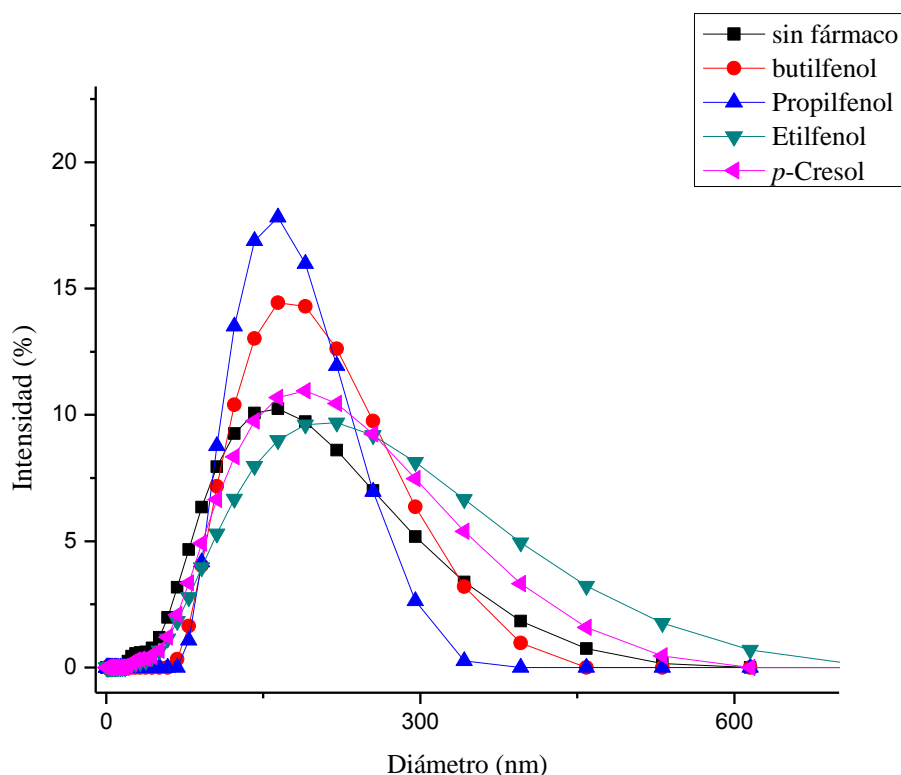


Figura 21. Comparación de tamaños de micelas de PG, cargadas con fenoles sustituidos con cadenas laterales de diferente largo. Soluciones de *p*-alquilfenoles 0,1 M.

3.4.2 Estudio de sistemas micelares mediante fluorescencia.

La mayoría de los copolímeros de interés, no son fluorescentes y su estudio por medio de esta técnica requiere la introducción de una molécula fluorescente o sonda. Esta sonda es agregada al sistema y, en la situación ideal, es completamente insoluble en el medio intermicelar y completamente soluble en el núcleo micelar. En estos casos, las propiedades fluorescentes de la sonda pueden ser usadas con el fin de obtener información acerca del sistema.

El pireno es un compuesto ampliamente usado como sonda para el estudio de sistemas micelares, debido a la dependencia de sus espectros de emisión y excitación con la polaridad del medio en el que se encuentra⁶⁸. El espectro de emisión del pireno consta de cinco bandas vibrónicas, las cuales presentan variaciones en su intensidad cuando cambia la polaridad de su entorno inmediato. Así, la razón de las intensidades de las bandas que aparecen a 370 nm (I_1) y 380 nm (I_3), I_1/I_3 , se ha utilizado para definir una escala de micropolaridad^{68,69}. Por ejemplo, la razón I_1/I_3 varía entre 1,79 para un medio altamente polar, y 0,58 para un medio altamente no-polar. Esta escala de polaridad se correlaciona directamente con la constante dieléctrica del solvente ya que este es un indicador cuantitativo de la polaridad de la sustancia. En la Tabla 10 se muestran algunos solvente y su constante dieléctrica, se puede ver que a mayor constante dieléctrica, mayor es la polaridad del medio y mayor es valor de la razón I_1/I_3 .

Tabla 10: Correlación entre la constante dieléctrica y el valor de la razón I_1/I_3 para algunos solventes.

Solvente	Constante Dielectrica (ϵ)	Razón I_1/I_3 de Pireno
n-Hexano	2,0	0,58
n-Butanol	18,0	1,06
Metanol	33,0	1,35
Acetonitrilo	37,0	1,79
Agua	80	1,84

La figura 22 muestra el espectro de fluorescencia del pireno para cuatro solventes diferentes, donde se señala la razones de bandas I_1/I_3 para cada uno de ellos⁷⁰.

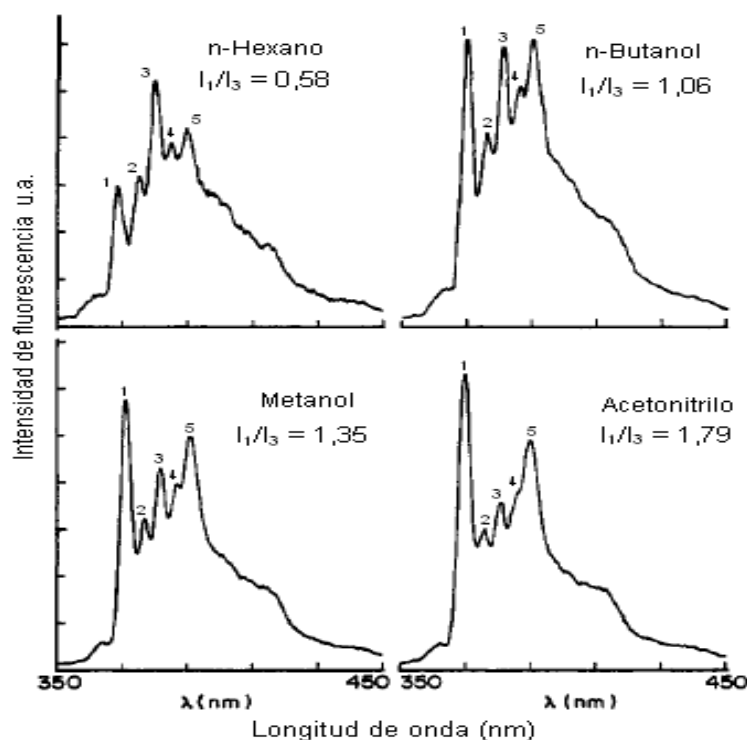


Figura 22. Dependencia de la razón I_1/I_3 de las bandas vibracionales de la fluorescencia del pireno con la polaridad de solvente.

En tanto en sistemas micelares la razón I_1/I_3 varía entre 0,99 para dodecil sulfato de sodio, SDS y 1,1 para micelas poliméricas⁷¹.

3.4.2.1 Determinación de la concentración micelar crítica (CMC)

Existen varios métodos para determinar la concentración micelar crítica, CMC, de copolímeros de bloque. Estos métodos están basados en los cambios de los espectros de emisión y de excitación del pireno en función de la concentración del polímero^{72,73}.

El método más aceptado ha sido propuesto por Wilhelm y colaboradores y utiliza el efecto de la concentración de polímero en los espectros de excitación de pireno⁴². En la Figura 23 se muestran los espectros de excitación de pireno obtenidos a diferentes concentraciones de PMMA₂₇₅-PHEMA₁₀.

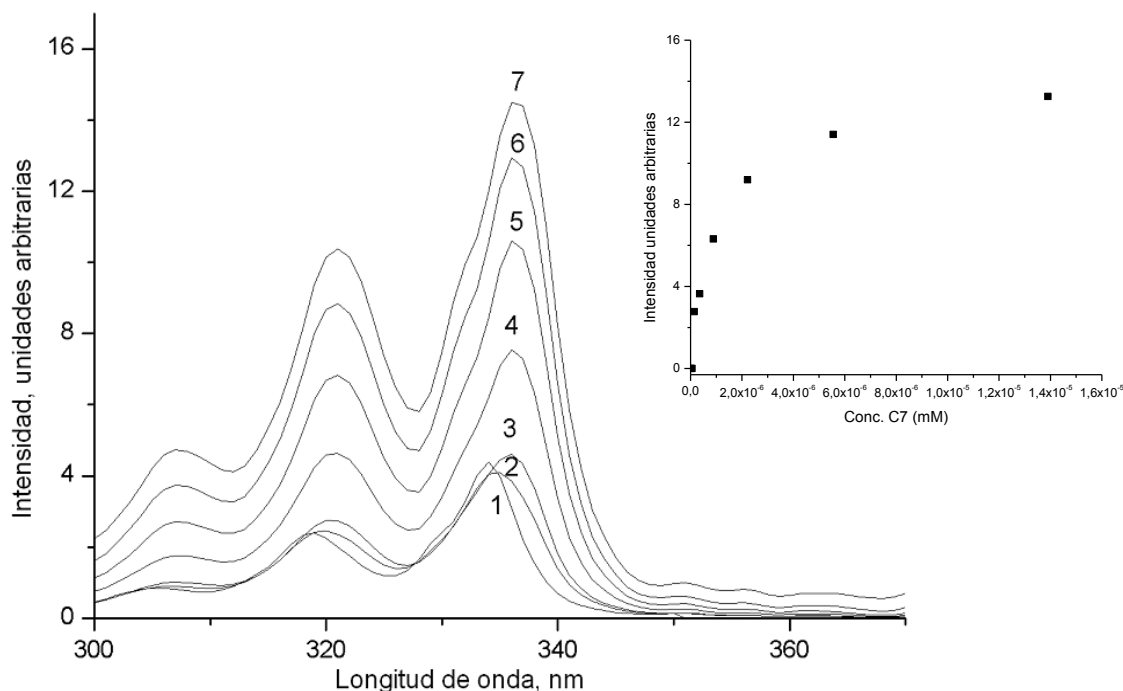


Figura 23. Espectro de excitación de pireno a diferentes concentraciones de C7. (1) 0 mM; (2) $2,9 \times 10^{-5}$ mM (3) $5,7 \times 10^{-5}$ mM; (4) $1,4 \times 10^{-4}$ mM; (5) $3,5 \times 10^{-4}$ mM; (6) $8,9 \times 10^{-4}$ mM; (7) $2,2 \times 10^{-3}$ mM. Recuadro: Intensidad de la excitación del pireno en función de la concentración.

Los espectros de excitación exhiben un desplazamiento hacia el rojo de la banda (0,0) (333 a 338 nm) con el incremento de la concentración de copolímero en bloque. Los valores extremos de la relación I_{338}/I_{333} permiten la medición de la razón de pireno solubilizado en la micela sobre la concentración de pireno en la fase acuosa de acuerdo con la ecuación 3.

Este método considera la distribución del pireno entre el medio acuoso y el medio micelar y hace uso de la siguiente relación:

$$\frac{[Py]_M}{[Py]_W} = \frac{F - F_{\min}}{F_{\max} - F} = KC \quad (3)$$

en donde $[Py]_W$ y $[Py]_M$ representan las concentraciones de pireno en la fase acuosa y la fase micelar, respectivamente; $F = I_{338}/I_{333}$. Los valores de F_{\min} y F_{\max} se calculan utilizando las intensidades de fluorescencia medidas a bajas y altas concentraciones de copolímero, respectivamente. K es un parámetro que incluye la constante de distribución del pireno entre la fase acuosa y micelar, y C representa la concentración de polímero.

A muy bajas concentraciones, por debajo de la CMC, la razón entre las concentraciones de pireno debiera ser cero, ya que al no haber micelas la contribución del pireno en el medio micelar $[Py]_M$ es nula. Al formarse las micelas el valor de $[Py]_M$ comenzará a crecer, reflejándose en un aumento del valor de F , llegando a un valor máximo cuando todo el pireno está solubilizado en el agregado micelar.

En un gráfico de la razón $[Py]_M/[Py]_W$ frente a la concentración de polímero, los datos pueden ser ajustados a dos líneas rectas, donde la CMC está dada por la intersección extrapolada con el eje x. En la figura 24 se muestran los resultados obtenidos por el trazado de la ecuación de Wilhelm para el copolímero PMMA₂₇₅-PHEMA₁₀.

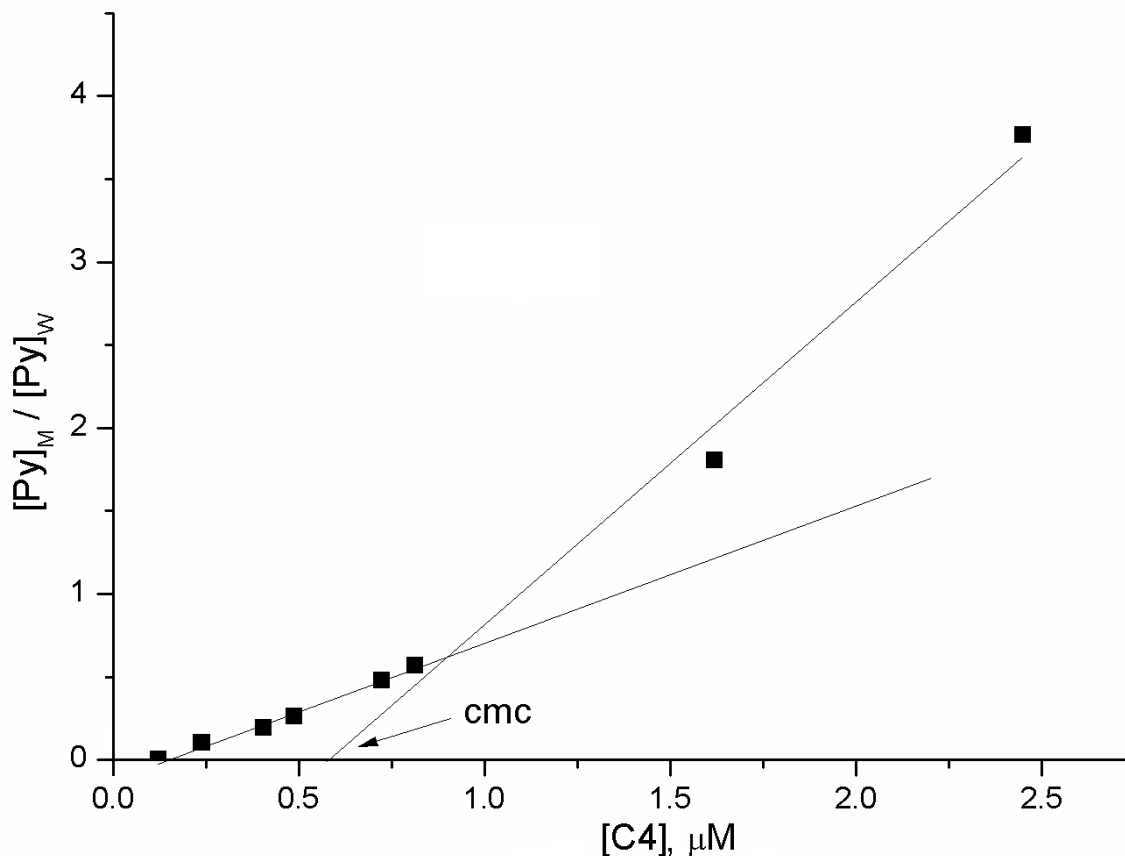


Figura 24. Gráfico de la razón $[Py]_M/[Py]_W$ para diferentes concentraciones de C7 de acuerdo a la ecuación de Wilhelm.

Los valores de CMC obtenidos con este método están en el intervalo de 10^{-6} - 10^{-7} M (Tabla 11), y son similares a los informados para los copolímeros de bloque a base de poliestireno PS^{46,72,73}.

Tabla 11: Concentración micelar crítica CMC para copolímeros en bloque lineales estudiados.

Polímero	Notación	PMMA-CI	CMC (M)
PMMA ₆₇ -PHEMA ₁₅₄	C2	H1	$9,0 \times 10^{-7}$
PMMA ₂₀₇ -PHEMA ₁₃₅	C3	H2	$6,9 \times 10^{-7}$
PMMA ₂₀₇ -PHEMA ₁₅₃	C4	H2	$8,2 \times 10^{-7}$
PMMA ₂₇₅ -PHEMA ₁₀	C7	H3	$5,8 \times 10^{-7}$
PMMA ₂₇₅ -PHEMA ₈₈	C10	H3	$5,0 \times 10^{-7}$

Los datos indican que la CMC depende del tamaño del bloque hidrófilo, es decir, para los copolímeros con el mismo bloque de PMMA, la CMC aumenta con el aumento de número de unidades de HEMA. En otras palabras, la agregación comienza a concentraciones más bajas en los copolímeros con el bloque hidrófilo más pequeño. Este resultado sugiere que, además del

efecto hidrófobo de las cadenas de PMMA, la interacción de los grupos de HEMA con agua hace una importante contribución a la fuerza motriz para el proceso de agregación.

3.4.2.2 Evaluación de la micropolaridad de los sistemas micelares formados

Con el fin de estudiar las micropolaridad de los sistemas micelares formados por los polímeros estudiados se realizaron las siguientes mediciones de fluorescencia:

- (a) Razón I_1/I_3
- (b) Desactivación de la fluorescencia en estado estacionario
- (c) Desactivación de la fluorescencia resuelta en el tiempo

3.4.2.2.1 Mediciones de la Razón I_1/I_3

Como se mencionó anteriormente, la relación I_1/I_3 de las intensidades de las bandas que se observan a 370 nm (I_1) y 380 nm (I_3), se ha propuesto como una escala empírica de polaridad. A una concentración alta de polímero, es decir sobre la CMC, el valor de la relación I_1/I_3 representa la polaridad detectada por pireno ubicado en los sitios hidrófobos que proporciona la micela polimérica. Por lo tanto, una comparación de estos valores proporciona una medida relativa de la micropolaridad de la micela.

En la tabla 12 se muestran los valores de la razón I_1/I_3 para los sistemas lineales y ramificados. Para los sistemas lineales, se puede observar que estos valores varían ligeramente con la composición de copolímero, es decir, 1,32 a 1,45. Este resultado sugiere que el aumento del número de unidades de MMA desde 67 hasta 275, o el número de unidades de HEMA de 10 hasta 154, no tiene un efecto determinante sobre la hidrofobicidad del núcleo. Por otro lado, la micropolaridad detectada por pireno en estas micelas es mayor que el determinado en los agregados formados por copolímeros de bloque en donde PS es el bloque hidrófobo^{46,64,73}.

Tabla 12: Razón I_1/I_3 para copolímeros en bloque lineales e hiper ramificados estudiados. $[Py] = 1,8 \times 10^{-7} M$

Polímero	Notación	I_1 / I_3
PMMA ₆₇ -PHEMA ₁₅₄	C2	1,33
PMMA ₂₀₇ -PHEMA ₁₃₅	C3	1,45
PMMA ₂₀₇ -PHEMA ₁₅₃	C4	1,31
PMMA ₂₇₅ -PHEMA ₁₀	C7	1,37
PMMA ₂₇₅ -PHEMA ₈₈	C10	1,32
PG ₂₀		1,44
PG ₂₀ -Br ₁₄	C13	1,45
PG ₂₀ -PHEMA ₆	C14	1,57

En la Tabla 12 se puede observar que los valores de la razón I_1/I_3 para los sistemas poliméricos lineales (PMMA-PHEMA) y polímeros ramificados (PG) son más o menos similares y mucho más bajos que el valor correspondiente al agua. En efecto el valor promedio de la razón I_1/I_3 medido en presencia de PMMA-PHEMA es 1,36, mientras que en presencia de PG este valor es 1,49 que es muy cercano al valor medido en acetato de etilo (1,45). En términos de polaridad, estos resultados indican que en presencia de estos polímeros el pireno se ubica claramente fuera

del medio acuoso. El microentorno proporcionado por la estructura hiper ramificada de PG y sus derivados es más polar que el que ofrecen las micelas de polímeros lineales.

La figura 25 muestra un gráfico de la razón I_1/I_3 en función de la concentración para PMMA₂₇₅-PHEMA₁₀, PMMA₂₀₇-PHEMA₁₅₃, y PMMA₂₇₅-PHEMA₈₈. En el gráfico se observa que a bajas concentraciones de copolímero, los valores de la razón I_1/I_3 son cercanos a 1,75. Este valor corresponde al pireno sensando un medio polar. A medida que la concentración del copolímero aumenta el valor de la razón disminuye. Esto indica que el pireno se ubica ahora en un medio no polar proporcionado por la micela polimérica. Este cambio en los valores de la razón I_1/I_3 ha sido ampliamente utilizado para determinar el valor de CMC de los detergentes corrientes. Para estos sistemas, la variación de la razón I_1/I_3 en función de la concentración presenta un quiebre muy notorio, que es atribuido a la concentración en la cual se forman los agregados intermoleculares.

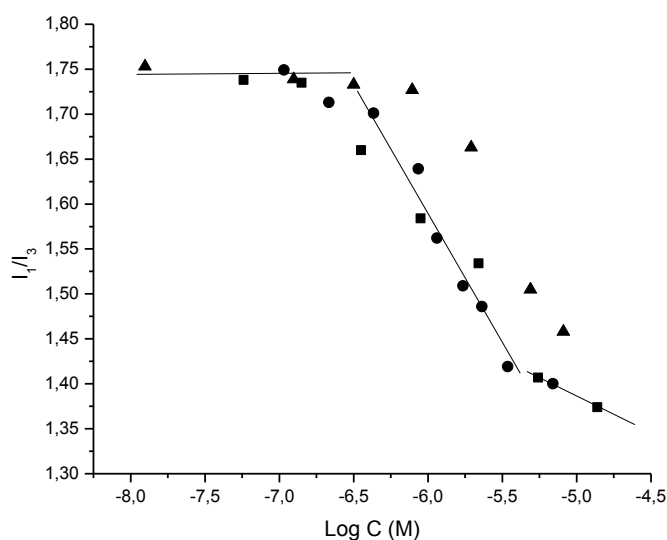


Figura 25. Gráfico de la razón I_1/I_3 del pireno en función del logaritmo de la concentración del copolímero. ▲ PMMA₂₇₅-PHEMA₈₈, ■ PMMA₂₇₅-PHEMA₁₀, ● PMMA₂₀₇-PHEMA₁₅₃.

El efecto de la concentración de pireno sobre la polaridad del agregado formado por los polímeros hiper ramificados se determinó bajo condiciones experimentales tales que la razón entre las concentraciones de polímero y pireno sea siempre mucho mayor que 10. Los resultados, dados en la tabla 13, muestran que a medida que aumenta la concentración de pireno la razón I_1/I_3 decrece. Esto se puede atribuir a un cambio de la polaridad del medio debido a un aumento en el número de moléculas de pireno. Este aumento en la concentración local de pireno se confirma por ya que es posible observar la banda correspondiente a la emisión excímera del pireno. Así, la formación de excímero indica que el pireno se ubica preferencialmente en las micelas que ya tienen incorporadas otra molécula de pireno. Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos para la concentración más baja de pireno, a la cual no se detecta formación de excímero, la polaridad detectada por el pireno cambia solo ligeramente al esterificar los grupos hidroxilo del PG. En otras palabras, al modificar el 70 % de los OH con un grupo mucho menos polar la polaridad del microentorno se mantiene.

Tabla 13: Razón I_1/I_3 para los sistemas PG, PGBr y PG-PHEMA para diferentes concentraciones de pireno.

Polímero	I_1 / I_3		
	[Py] $2,0 \times 10^{-5}$ M	[Py] = $2,0 \times 10^{-6}$ M	[Py] = $1,8 \times 10^{-7}$ M
PG ₂₀	1,22	1,30	1,44
PG ₂₀ -Br ₁₄	1,43	1,47	1,45
PG ₂₀ -PHEMA ₆	1,41	1,46	1,57

Este resultado sugiere que los grupos no polares no afectan la estructura del polímero hiper ramificado. Para obtener mayor información respecto a la estructura de estos microdominios se hicieron experimentos de desactivación de la fluorescencia y medidas de decaimiento de la fluorescencia del pireno.

3.4.2.2.2 Desactivación de la fluorescencia en estado estacionario

El fenómeno de desactivación o apagamiento de la fluorescencia se refiere a procesos que provocan una disminución de la fluorescencia de una sustancia dada llamada fluoróforo. Los procesos más comunes para producir la desactivación son el apagamiento colisional o dinámico y apagamiento estático. Si bien en ambos tipos de apagamiento se requiere contacto físico a nivel molecular entre el fluoróforo y el apagador, existen diferencias entre ambos mecanismos. En el proceso colisional el apagamiento ocurre cuando el fluoróforo en estado excitado colisiona con el apagador y le transfiere su energía, en el proceso estático el apagador reacciona con el fluoróforo en su estado fundamental lo que genera la formación de un complejo. El apagamiento dinámico es un proceso difusional, entonces cualquier efecto que varíe esta propiedad deberá afectarlo, como por ejemplo un aumento de la temperatura o de la viscosidad del medio. En general el proceso de desactivación es una valiosa herramienta metodológica que permite visualizar por ejemplo, cambios conformacionales de los sistemas estudiados en solución y entrega información acerca de la accesibilidad del fluoróforo al apagador.

En este trabajo la desactivación de la fluorescencia del pireno se midió usando nitrometano como apagador. Esta molécula es neutra, soluble en agua y desactiva eficientemente el estado excitado del pireno en un proceso dinámico. El esquema cinético para este proceso de desactivación lleva a la ecuación de Stern-Volmer

$$\frac{I^0}{I} = 1 + K_{SV}[\text{nitrometano}] \quad (4)$$

donde K_{SV} es la constante de Stern-Volmer y es igual al producto de la constante cinética bimolecular, k_q por el tiempo de vida del estado excitado del pireno τ , medido en ausencia de apagador. Experimentalmente, se mide el espectro de fluorescencia para concentraciones crecientes de apagador y se calcula I_0/I que corresponde a la intensidad de la fluorescencia en ausencia y presencia del apagador, respectivamente. Debido a la distribución física de la sonda dentro de la estructura micelar, es de esperar que la desactivación del pireno ocurra en forma diferencial. Es decir, se espera que el apagamiento de las moléculas de pireno situado en la corona sea más eficiente que el apagamiento del fluoróforo que reside en el núcleo micelar, ya que el primer contacto del nitrometano será con pireno más accesible. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 26 y se resumen en la tabla 14.

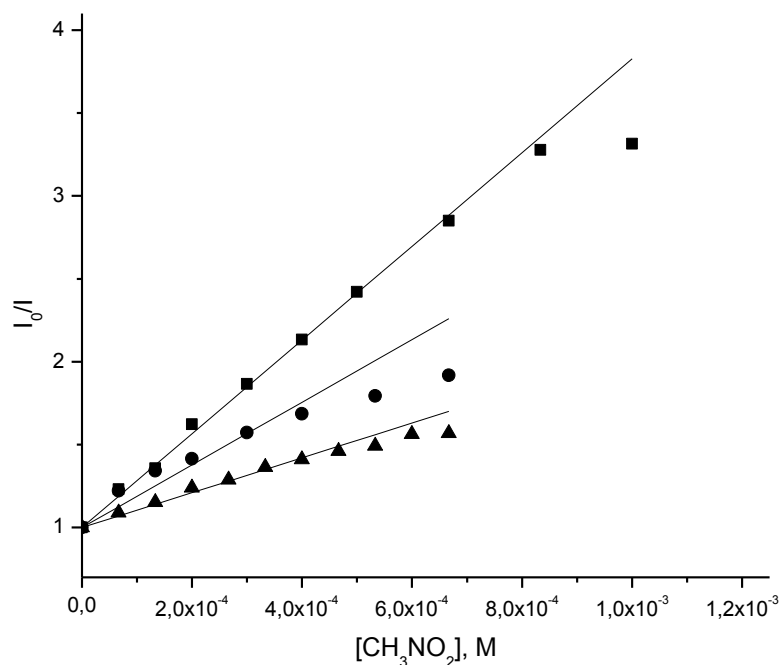


Figura 26. Gráfico de Stern-Volmer para la desactivación de pireno por nitrometano en soluciones acuosas de ■ PG, ● PGBr y ▲ PG-PHEMA. $[Py] = 1,8 \times 10^{-7}$ M

En la Figura 26 se ve que las gráficas de I_0/I no son completamente lineales y muestran una leve curvatura negativa, descartándose una combinación de apagamientos estático y dinámico que podrían haber ocurrido simultáneamente con el mismo apagador. Cuando se presentan ambos apagamientos la curva presenta una desviación positiva. Por lo tanto, se puede decir que en estas mediciones la desactivación solo tiene el componente dinámico.

Esta curvatura negativa se atribuye generalmente al apagamiento de dos poblaciones diferentes de fluoróforos ubicadas en lugares físicos distintos dentro de la micela y a las que el desactivador tiene diferente accesibilidad⁷⁴. Al observar este comportamiento en los sistemas hiper ramificados, se infiere que existe una desigual accesibilidad en el encuentro entre el apagador y el fluoróforo, debido a dos zonas diferentes dentro de la micela en que es posible ubicar pireno: en la zona más externa de la micela y en una zona más interna en que el pireno se encuentra más protegido. Un comportamiento similar al observado ha sido reportado para apagamiento de pireno por nitrometano en presencia de copolímeros en bloque de estireno y acrilamida⁷⁵ y de estireno y ácido polimetacrílico⁴⁶.

En la tabla 14 se resumen los valores de K_{sv} y k_q obtenidos al medir el apagamiento en estado estacionario para algunos sistemas micelares lineales y ramificados. A continuación se discutirán las claras diferencias en los valores de estos parámetros para ambas familias poliméricas.

Tabla 14: Tiempo de Vida, τ , Constante de Stern-Volmer, K_{SV} y constante de velocidad k_q para los sistemas PG, PGBr, PG-PHEMA y polímeros lineales de PMMA-PHEMA, con pireno $1,8 \times 10^{-7} M$.

Polímero	τ (ns)	K_{SV} (1/M)	k_q ($M^{-1}s^{-1}$)
PG ₂₀	132	3137	$2,4 \times 10^{10}$
PG ₂₀ -Br ₁₄	140	1796	$1,3 \times 10^{10}$
PG ₂₀ -PHEMA ₆	149	1766	$1,2 \times 10^{10}$
MMA ₂₀₇ PHEMA ₁₅₃ C4	188	121	$6,4 \times 10^8$
PMMA ₂₇₅ PHEMA ₁₀ C7	237	208	$8,8 \times 10^8$
PMMA ₂₇₅ PHEMA ₈₈ C10	242	40	$1,7 \times 10^8$

Se sabe que el valor de K_{sv} es una medida de la accesibilidad que tiene el apagador para contactarse con el fluoróforo. Los valores promedio medidos de K_{sv} son 18 veces más altos para los sistemas hiper ramificados que para los sistemas lineales, lo que quiere decir que el pireno está más oculto o protegido en la micela polimérica lineal que en la hiper ramificada. Por otro lado los valores de k_q reportados en la tabla 14 se pueden analizar considerando los valores de la razón I_1/I_3 de la tabla 13. Estos valores muestran que la familia de polímeros hiper ramificados en promedio, generan un microdominio más polar que la de los polímeros lineales y sus valores de k_q son 100 veces más altos en comparación con estos sistemas. Se puede decir entonces que el sistema que presenta la mayor polaridad promedio es el que tiene una mayor constante de apagamiento, por lo tanto la desactivación del pireno será más rápida en aquel sistema polimérico que proporcione un entorno más polar para la sonda.

Con el fin de encontrar mayor información respecto de los sistemas poliméricos y los entornos que estos les proporcionan al pireno, se realizaron experimentos de desactivación de la fluorescencia medidos en función del tiempo.

3.4.2.2.3 Decaimiento de la fluorescencia en función del tiempo

Los tiempos de vida se obtuvieron del decaimiento de la fluorescencia ajustando una función biexponencial. Una curva de decaimiento típico y el ajuste correspondiente se muestran en la figura 27.

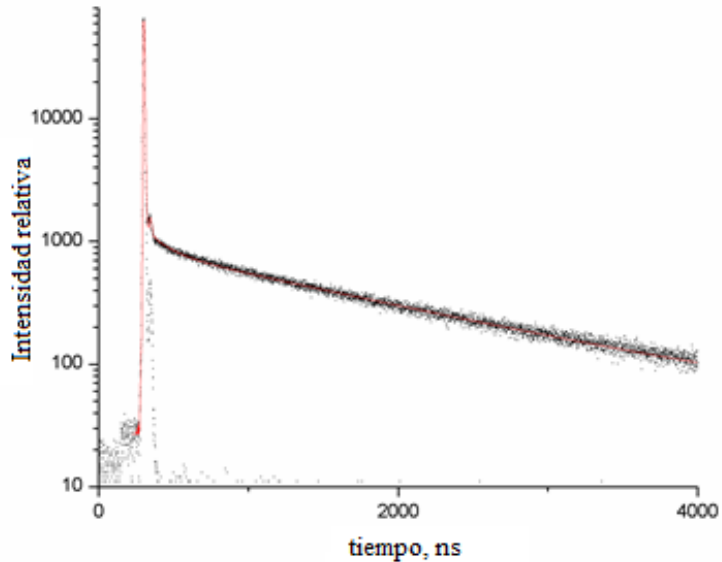


Figura 27. Curva de decaimiento de la fluorescencia del pireno en solución acuosa de PG-PHEMA con $[Py] = 1,8 \times 10^{-7} M$.

Es interesante observar que las curvas de decaimiento de pireno en presencia de los polímeros PG-Br y PG-PHEMA muestran claramente dos componentes que decaen a velocidades muy diferentes. El decaimiento rápido se atribuye a las moléculas de pireno que se localizan cercanas a los grupos que contienen átomos de Br, el cual es un eficiente desactivador de la fluorescencia. Este resultado muestra que en estos polímeros existen al menos dos entornos diferentes en los que se solubiliza el pireno. El tiempo de vida de la componente más lenta disminuye al aumentar la concentración de pireno debido a la formación de excímeros. Sin embargo, a la concentración más baja los tiempos de vida de pireno en PG-Br y PG-PHEMA son mayores que en PG, y este último es muy similar al tiempo de vida de pireno en agua. Usando los tiempos de vida y los valores de K_{SV} se obtuvieron las constantes de velocidad que aparecen en la tabla 14.

Las constantes de velocidad, para la concentración más baja de pireno, fueron también determinadas midiendo el tiempo de vida en función de la concentración de nitrometano. De acuerdo a la definición de tiempo de vida el inverso del tiempo de vida es igual a

$$\tau^{-1} = k_0 + k_Q[\text{nitrometano}] \quad (6)$$

donde k_0 representa la suma de todos los procesos de desactivación de la fluorescencia en ausencia de desactivador. Así, el valor de k_Q se obtiene de la pendiente de un gráfico de τ^{-1} versus la concentración de CH_3NO_2 . Este tipo de gráficos se muestra en la figura 28 y 29.

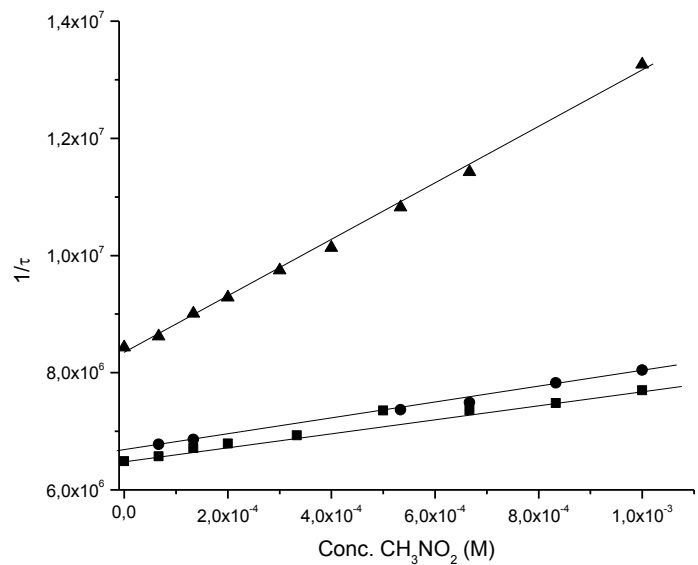


Figura 28: Inverso del tiempo de vida del estado excitado del pireno en función de la concentración de nitrometano para los sistemas: ▲PG, ●PGBr, ■PGPHEMA.

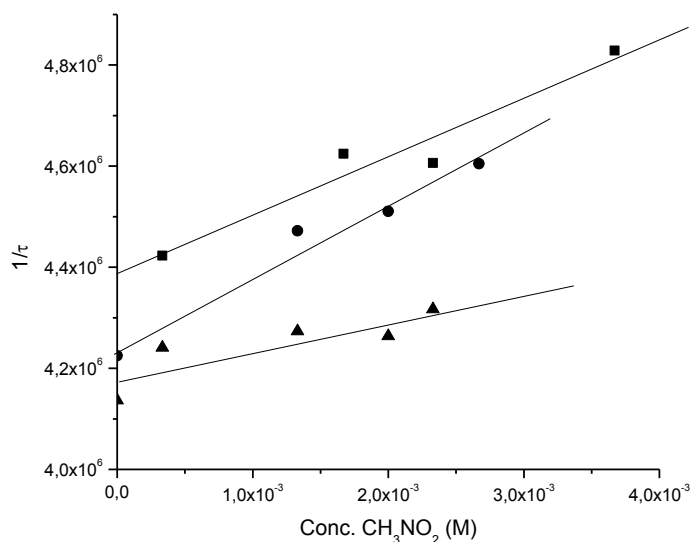


Figura 29: Inverso del tiempo de vida del estado excitado del pireno τ^{-1} en función de la concentración de nitrometano para los sistemas: ■C4, ●C7 y ▲C10.

Las gráficas muestran comportamientos lineales tanto para los sistemas hiper ramificados como para los lineales, lo que permite calcular las pendientes de cada recta. Esta pendiente corresponde a la constante de velocidad molecular intrínseca de cada proceso de desactivación k_Q y a diferencia de k_q obtenidas en la desactivación de la fluorescencia en estado estacionario. Esta constante no contempla otros procesos de desactivación, por lo que sus valores son más cercanos al proceso real. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 15, y se comparan con las constante k_q , obtenida en las mediciones en estado estacionario.

Tabla 15: Constantes de velocidad k_q (medida en estado estacionario) y k_Q (medida en función del tiempo) para los sistemas PG, PGBr, PG-PHEMA y polímeros lineales de PMMA-PHEMA.

Polímero	k_q (medida en estado estacionario)	k_Q (medidas resueltas en el tiempo)
PG ₂₀	$2,4 \times 10^{10}$	$4,9 \times 10^9$
PG ₂₀ -Br ₁₄	$1,3 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^9$
PG ₂₀ -PHEMA ₆	$1,2 \times 10^{10}$	$1,2 \times 10^9$
PMMA ₂₀₇ PHEMA ₁₅₃ C4	$6,4 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
PMMA ₂₇₅ PHEMA ₁₀ C7	$8,8 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$
PMMA ₂₇₅ PHEMA ₈₈ C10	$1,7 \times 10^8$	$2,1 \times 10^7$

Los valores de k_Q obtenidos en mediciones de fluorescencia resuelta en el tiempo y que se muestran en la tabla 15, son en todos los casos menores que las constantes k_q medidas por el método estacionario. Estas diferencias están directamente relacionadas con la medición experimental realizada para obtener cada constante. La constante k_q corresponde a la pendiente de la recta que resulta de medir la variación de la intensidad de fluorescencia a diferentes concentraciones de apagador. Los valores obtenidos en esta medición están sujetos a parámetros como la turbidez de la solución que afectan directamente la medición de la intensidad disminuyéndola. Esta disminución no se debe propiamente tal al fenómeno de apagamiento que se quiere medir, y no es posible hacer una separación de las contribuciones a la señal. Por otro lado, la medición del decaimiento de la intensidad de la fluorescencia no se ve afectado por la turbidez que podría o no presentar la solución ya que se mide la velocidad del decaimiento y esta velocidad no se ve afectada si la muestra absorbe o deja pasar más o menos luz debido a su turbidez, por lo tanto los valores de k_Q medidos corresponden directamente al fenómeno de apagamiento.

Al comparar los valores de k_Q para la familia de polímeros hiper ramificados se observa que el mayor valor de constante de velocidad es para PG y los sistemas PGBr y PG-PHEMA que tiene valores comparables entre sí pero más bajos que PG. Esto significa que para el caso de PG el pireno está más expuesto y accesible de tal manera que la velocidad a la que es apagado es mayor que para los otros sistemas hiper ramificados.

Finalmente, se puede observar que los valores de k_Q para los sistemas hiper ramificados en promedio son 25 veces más grandes que las k_Q medidas para los sistemas lineales. Este dato sugiere que en los sistemas hiper ramificados el pireno está más accesible para colisionar con el apagador que el pireno ubicado en las micelas de polímeros lineales. En otras palabras, en estos sistemas, el nitrometano, que es una molécula neutra, entra con mayor facilidad a las micelas formadas por polímeros hiper ramificados. Esta propiedad indica que la entrada y salida de moléculas desde agregados poliméricos es más fácil en los sistemas de PG. Este resultado se podrá verificar en los estudios de liberación.

3.5 Determinación de las constantes de reparto

Una de las propiedades más importantes de las micelas poliméricas es la capacidad de incorporar sustratos que son insolubles en agua. Esta propiedad está relacionada con el tamaño micelar y la constante de reparto que mide el grado de incorporación del sustrato en la micela. El estudio termodinámico del proceso de distribución de los sustratos, entre la fase continua y la microfase polimérica, involucra la medición de las constantes de reparto, y a través de ellas la determinación de la energía libre de transferencia del sustrato desde la fase acuosa hacia el microentorno polimérico. Estos parámetros termodinámicos se pueden obtener utilizando el modelo de pseudofase, el cual está representado por el equilibrio del sustrato entre la fase continua y la pseudo fase polimérica y que será analizado más adelante.

En este trabajo, y con el fin de estudiar la incorporación de drogas en las micelas poliméricas ya descritas, se considera una serie de derivados alquilados del 2-metil-4-nitroimidazol, con largos de cadena alquílica variable ($n = 1$ a 6), las cuales son moléculas que se han caracterizado por presentar propiedades antimicrobianas, antimicóticas y antiparasitarias y una familia de fenoles sustituidos. Todas estas moléculas presentan un carácter apolar y con ello una baja solubilidad en medio acuoso convirtiéndolas en modelo apropiados para este estudio.

Las fórmulas estructurales de estos sustratos se muestran en la Figura 30.

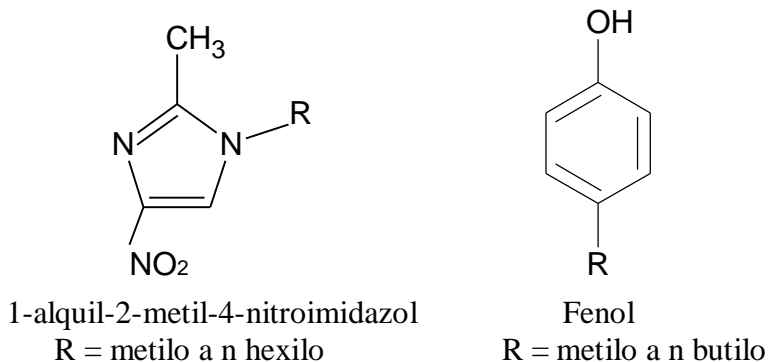
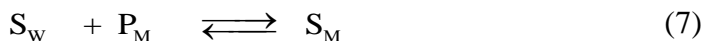


Figura 30. Fármacos y compuestos modelo empleados en estudio de solubilización.

Las constantes de reparto de estos compuestos fueron determinadas usando el modelo de pseudo-fase⁷⁶. Este modelo, que se describe a continuación, permite obtener la constante de equilibrio K_s , y la energía libre de transferencia.

Modelo de pseudo-fase

El proceso de solubilización de una droga en una micela polimérica está representado por el equilibrio:



de donde se obtiene la expresión para la constante de equilibrio K_s :

$$K_s = \frac{[S_M]}{[S_w][P_M]} \quad (8)$$

donde $[S_w]$ y $[S_M]$ corresponden a la concentración molar de sustrato en solución acuosa y en la pseudo-fase polimérica, respectivamente; $[P_M]$ es la concentración de cadenas de polímero que

forman los agregados hidrófobos. Si la concentración del sustrato se expresa en términos de fracción molar el coeficiente de partición se puede expresar por:

$$K_x = \frac{X_M}{X_W} \quad (9)$$

donde X_M y X_W son la fracción molar de sustrato en las fases micelares y acuosas, respectivamente. En soluciones diluidas, ambas cantidades están relacionadas por

$$K_X = 55,5 K_S \quad (10)$$

La constante de distribución K_S se obtiene de la pendiente del gráfico de $[S_M]$ versus $[S_W]$, considerando que dicha pendiente es igual al producto de K_S y $[P_M]$. Algunas curvas de solubilización se derivados de nitroimidazol en micelas formadas por PMMA-PHEMA se muestran en la Figura 31.

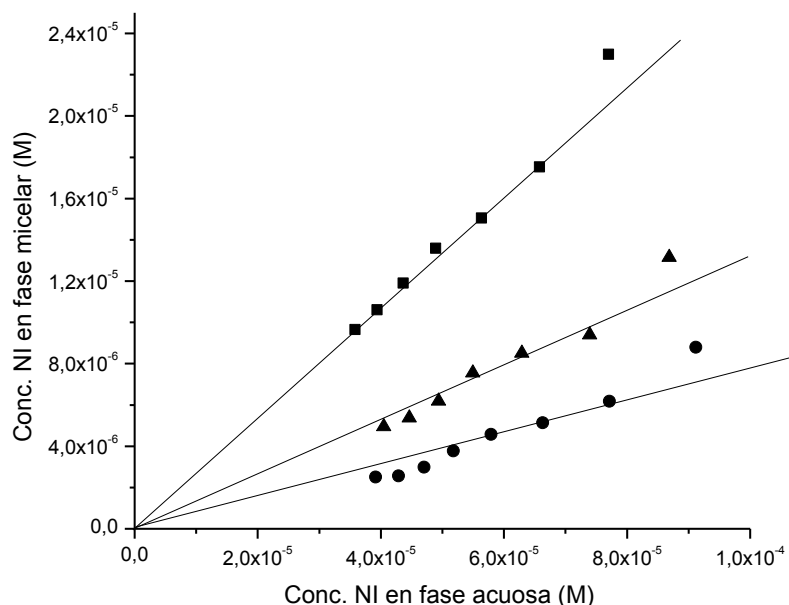


Figura 31. Reparto de *N*-alquil-NI entre fase acuosa y micelas formadas por PMMA₂₀₇-PHEMA₁₃₅, ●metil, ▲etil ■hexil.

En la figura 31 se puede apreciar que existe una relación lineal entre $[NI_W]$ y $[NI_M]$ para la distribución de los derivados nitroimidazólicos entre el agua y los microentornos hidrofóbicos formados por PMMA₂₀₇-PHEMA₁₃₅. A partir de las pendientes de curvas se determinaron los valores de las constantes de distribución K_S , y usando la ecuación 10 se calculó K_X .

En la tabla 16 se resumen los valores obtenidos para las constantes K_S y K_X en los repartos de *N*-alquil-NI, tanto en micelas de polímeros lineales como hiper ramificados.

Tabla 16: Constantes de reparto para *N*-alquil-NI en micelas de PMMA-PHEMA, PG, y PG-Br. K_s , K_x y $\Delta\mu_t^0$.

Polímero	Sustrato	Pendiente Gráfica	K_s	$K_x(\times 10^{-4})$	$\Delta\mu_t$ kJ/mol
PMMA ₂₀₇ -PHEMA ₁₃₅ C3	NI metil	0,0740	2860	15,88	-29,65
	NI etil	0,129	4986	27,67	-31,03
	NI propil	0,0858	3318	18,42	-30,02
	NI butil	0,0831	3212	17,83	-29,94
	NI hexil	0,2781	10750	59,66	-32,93
PMMA ₂₀₇ -PHEMA ₁₅₃ C4	NI metil	0,1848	7580	42,07	-32,07
	NI etil	0,1456	5973	33,15	-31,48
	NI butil	0,1124	4611	23,57	-30,63
	NI hexil	0,3845	15772	87,54	-33,88
PMMA ₆₇ -PHEMA ₁₅₂ C1	NI butil	0,186	5068	28,13	-31,07
	NI hexil	0,367	10000	55,50	-32,75
PG ₂₀	NI etil	0,060	90	0,50	-21,08
	NI butil	0,141	211	1,17	-23,20
	NI hexil	0,248	371	2,06	-24,60
PG ₂₀ -Br ₁₄	NI hexil	0,181	658	3,65	-26,02

Como se puede ver en la tabla 16 los valores de K_s , obtenidos para los repartos de *N*-alquil-NI entre la fase acuosa y las micelas formadas por PMMA₂₀₇-PHEMA₁₃₅, aumentan conforme se incrementa la longitud de la cadena alquílica del sustrato. Este resultado sugiere que a medida que crece la cadena alquílica unida al anillo nitroimidazólico del *N*-alquil-NI, se favorece el reparto de éstos hacia los microdominios hidrofóbicos. Este resultado tiene sentido si se considera que la solubilidad de moléculas orgánicas en medios no polares se ve favorecida conforme se incrementa el número de unidades metilénicas en su estructura. Una tendencia similar se observa para los valores de K_s obtenidos usando el polímero hiper ramificado PG. Esto es, K_s aumenta con el largo de la cadena en el NI. Sin embargo, para los otros polímeros lineales los valores de K_s no siguen ninguna tendencia excepto cuando se compara el NI-hexil con los demás sustratos con cadenas laterales más

cortas. Estos resultados anómalos se podrían relacionar directamente con la medición experimental de estos sistemas, ya que en estos casos la concentración de sustrato en la fase acuosa es tan baja que existe un gran error experimental en su determinación.

El otro punto de vista que se debe considerar para explicar los diferentes valores de las constantes de reparto medidas, es el tamaño de las micelas ya que esta constante depende de este parámetro. En el modelo de pseudo-fase la constante de reparto depende del tamaño de las fases involucradas. Así, una micela de mayor tamaño debería favorecer la solubilización del sustrato en la fase micelar. Esto implica que el sustrato puede ubicarse tanto en el núcleo como en la envoltura micelar. Este criterio se aplica tanto a los polímeros lineales como a los hiper ramificados. Al comparar las constantes de distribución de NI entre agua y polímeros lineales de distinta composición, PMMA₂₀₇-PHEMA₁₃₅ y PMMA₂₀₇-PHEMA₁₅₃, se puede ver que siempre la constante de reparto es mayor para el segundo sistema. En efecto su valor promedio es 1,7 veces más grande. Estos resultados pueden ser explicados considerando la constitución polimérica y micelar de estos dos sistemas. Como ambos sistemas tienen igual número de unidades de MMA y

solo difieren en el número de unidades de HEMA, que son las que conforman la corona micelar, la mayor solubilidad del sustrato se puede atribuir a la mayor cantidad de unidades de HEMA. Esto sugiere que la solubilización del fármaco no solo ocurre en el núcleo micelar sino que la envoltura también es capaz de albergar fármaco. Estos resultados coinciden con otros publicados en los cuales se muestra que en micelas de copolímeros en bloque, de estireno y ácido acrílico o ácido metacrílico, el pireno se solubiliza tanto en la corona como en el núcleo de la micela⁴⁶.

En la Tabla 9 se puede ver que las micelas de polímeros lineales poseen un diámetro promedio dos veces más grandes que las micelas de sistemas hiper ramificados. Al comparar los resultados obtenidos para todas las constantes de reparto medidas, a pesar de los errores ya comentados, se observa que los valores de K_s para los sistemas lineales son siempre más grande que para los sistemas poliméricos hiper ramificados. Esto indica que los polímeros lineales tienen una mayor capacidad para solubilizar estos sustratos, y que esta propiedad es consecuencia del mayor tamaño de los agregados formados.

El efecto del tamaño se ve también al comparar los resultados obtenidos en PG y PGBr. Las constantes de reparto son 1,8 veces mayores en PG-Br que en PG, lo cual está de acuerdo con el aumento de tamaño para estos sistemas, esto es 1,7 veces (Tabla 9).

Por otra parte, en la Tabla 17 se tabulan los valores de K_s y K_x para los repartos de *p*-alquilfenoles tanto para sistemas poliméricos lineales como para los hiper ramificados.

Tabla 17: Constantes de reparto para *p*-alquilfenoles sustituidos en micelas de PMMA-PHEMA, PG, y PG-Br. K_s , K_x y $\Delta\mu_t^0$.

Polímero	Sustrato	Pendiente gráfica	K_s	$K_x(x10^{-4})$	$\Delta\mu_t$ kJ/mol
PMMA ₂₀₇ -PHEMA ₁₅₃ C4	p-metilfenol	0,0515	2110	11,710	-28,90
	p-etilfenol	0,3140	12869	71,422	-33,38
	p-propilfenol	0,6180	25328	140,570	-35,06
	p-butilfenol	2,0333	83332	462,490	-38,00
PG ₂₀	p-metilfenol	0,0383	57	0,318	-19,97
	p-etilfenol	0,280	419	2,326	-24,90
	p-propilfenol	0,604	904	5,018	-26,80
	p-butilfenol	3,250	4865	27,002	-30,97
PG ₂₀ -Br ₁₄	p-metilfenol	0,281	1022	5,671	-27,11
	p-etilfenol	0,319	1159	6,430	-27,42
	p-propilfenol	0,718	2611	14,491	-29,43
	p-butilfenol	4,605	16745	92,937	-34,03

Los resultados muestran que tanto en los polímeros lineales como en los ramificados la K_s aumenta con el aumento del número de unidades metilénicas de la cadena lateral del fenol. Este efecto es el esperado ya que a medida que aumenta el número de grupos metilénicos de la cadena alquílica lateral del sustrato la hidrofobicidad crece y con ello se desfavorece su permanencia en la fase acuosa. Estos resultados son similares a los encontrados en el estudio de micelas formadas por detergentes normales y por otros sistemas poliméricos⁷⁷⁻⁷⁹.

Comparando los valores de K_s se puede decir que, al igual que para *N*-alquil-NI, los sistemas lineales son más eficientes en la solubilización de sustratos que los sistemas hiper ramificados, ya que su valor promedio de K_s es más grande.

En resumen, los valores de K_x varían de acuerdo al siguiente orden:

Polímeros lineales > Polímeros hiper ramificados	
(<i>p</i> -alquil fenol > <i>N</i> -alquil-NI)	(<i>p</i> -alquil fenol > <i>N</i> -alquil-NI)

El modelo de pseudo fase permite obtener también la energía libre estándar de transferencia de los compuestos desde la fase acuosa a la fase micelar. La relación entre la energía libre y K_x es

$$\Delta\mu_t^0 = \mu_M^0 - \mu_W^0 = -RT \ln K_x \quad (11)$$

donde $\Delta\mu_t^0$ es el cambio de energía libre estándar que se produce al pasar desde la fase acuosa a la fase micelar. Los valores obtenidos para $\Delta\mu_t^0$ se resumen en la tabla 15 y 16 para la solubilización de *N*-alquil-NI y *p*-alquilfenol respectivamente.

Se puede observar que todos los valores de $\Delta\mu_t^0$ calculados para los repartos, tanto de *N*-alquil-NI como de *p*-alquilfenoles, son negativos lo que indica que en todos los casos la transferencia de los sustratos desde la fase acuosa a la fase micelar es termodinámicamente favorable.

En promedio, los valores más negativos corresponden a la solubilización de *p*-alquilfenoles en micelas de polímeros lineales, con un valor promedio de -33,84 KJ/mol. Estos resultados están en línea con lo que se ha reportado previamente para la solubilización de estos compuestos en micelas formadas por compuestos de bajo peso molecular, y en micelas poliméricas unimoleculares e intermoleculares^{13,38,76,77,80}.

Se ha propuesto que este cambio de energía se puede descomponer en una suma de contribuciones provenientes de los diferentes grupos constitutivos de la molécula. Esta relación se escribe como

$$\Delta\mu_t^0 = \Delta\mu_{Ar}^0 + n_C \Delta\mu_C^0 \quad (12)$$

donde $\Delta\mu_{Ar}^0$ representa la contribución del grupo aromático, $\Delta\mu_C^0$ es la contribución por grupo metilénico, y n_C es el número de estos grupos unidos al anillo. Relaciones de energía libre similares han sido establecidas en estudios de reparto de solutos entre la fase acuosa y disolventes orgánicos, micelas y micelas poliméricas^{27,38,76,77,81}. En las Figura 32 y 33 se muestra la relación entre la energía libre de transferencia y el número de átomos de carbono de la cadena lateral en *N*-alquil-NI y *p*-alquilfenol respectivamente.

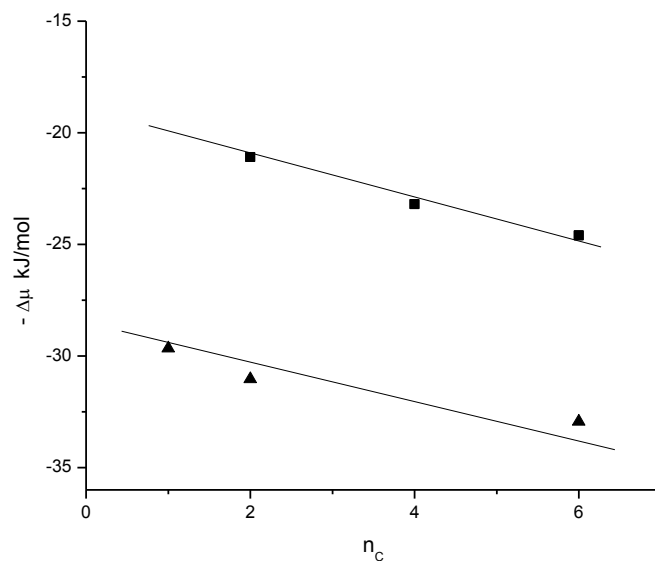


Figura 32. $\Delta\mu_t^0$ versus n_C en *N*-alquil-NI en micelas de ■ PG₂₀ y ▲ C3 PMMA₂₀₇-PHEMA₁₃₅.

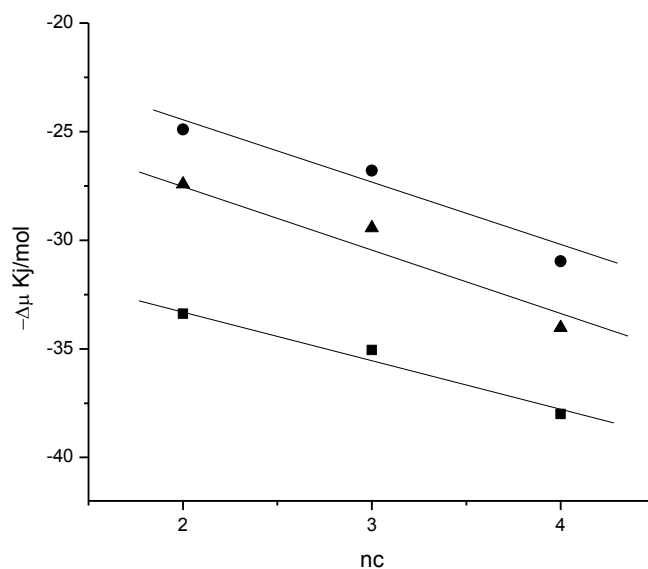


Figura 33. $\Delta\mu_t^0$ versus n_C en *p*-alquilfenoles en micelas de ■ C4 PMMA₂₀₇-PHEMA₁₅₃, ▲ PGBr y ● PG₂₀

Los gráficos muestran una tendencia lineal entre la energía libre de transferencia y el número de grupos metilénicos del sustrato. Esto indica que en ambos casos la solubilización de los fármacos en las micelas poliméricas aumenta al aumentar la longitud de la cadena alquílica lateral que cada sustrato posee.

A partir de estos gráficos se calcularon $\Delta\mu_C^0$ y $\Delta\mu_{Ar}^0$, que según la ecuación 12, corresponden a la pendiente e intercepto de la recta respectivamente, y cuyos valores se resumen en la tabla 18 y serán discutidos a continuación.

Tabla 18. $\Delta\mu_{Ar}^0$ y $\Delta\mu_c^0$ calculados para los repartos de *p*-alquilfenoles y *N*-alquil-NI en micelas de C3, C4, PGBr y PG.

Polímero	Sustrato			
	<i>p</i> -alquilfenoles		<i>N</i> -alquil-NI	
	$\Delta\mu_{Ar}^0$ kJ/mol	$\Delta\mu_c^0$ kJ/mol	$\Delta\mu_{Ar}^0$ kJ/mol	$\Delta\mu_c^0$ kJ/mol
PMMA ₂₀₇ -PHEMA ₁₃₅ C3	-	-	-29,39	-0,60
PMMA ₂₀₇ -PHEMA ₁₅₃ C4	-26,60	-2,90	-	-
PG	-16,94	-3,49	-19,45	-0,88
PGBr	-20,37	-3,31	-	-

Los valores obtenidos para $\Delta\mu_{Ar}^0$ representan las contribuciones a la energía libre de transferencia por parte del grupo heterociclo (2-metil-4-nitroimidazol), en el caso de los *N*-alquil-NI, y del anillo aromático en el caso de los *p*-alquilfenoles. Por otro lado, los valores de $\Delta\mu_c^0$ corresponden a la contribución de cada grupo metilénico, en la cadena alquílica lateral que está presente en ambos sustratos, a la energía libre de transferencia. El aporte de $\Delta\mu_{Ar}^0$ al $\Delta\mu_t^0$ es en ambos casos mayor que el $\Delta\mu_c^0$. En polímeros lineales el valor de $\Delta\mu_{Ar}^0$ es similar para NI y para fenoles, y ligeramente menor que la reportada para el reparto de NI entre agua y micelas unimoleculares formadas por copolímeros alternantes de anhídrido maléico (-24,2 kJ/mol)³⁸.

Se encontró que los valores de $\Delta\mu_{Ar}^0$ y $\Delta\mu_c^0$ obtenidos para los sistemas estudiados tienen similitudes con lo reportados en micelas de SDS. Por ejemplo los valores de $\Delta\mu_{Ar}^0$ en los repartos de *N*-alquil-NI en micelas de polímeros hiper ramificados son idénticos a los medidos en micelas de SDS cuyo valor -19,6 kJ/mol. Así también los valores de $\Delta\mu_c^0$ para el reparto de *p*-alquilfenol en polímeros hiper ramificados son en promedio idénticos a los determinados para heptano en micelas clásicas de SDS cuyo valor es de -3,27 kJ/mol.

Se observa en la tabla 18 que la contribución del $\Delta\mu_{Ar}^0$ al $\Delta\mu_t^0$, es en promedio 1,48 veces mayor para los poliméricos lineales que para los polímeros hiper ramificados. Este comportamiento se da en la solubilización de *p*-alquilfenoles y *N*-alquil-NI. Estos resultados son consistentes con lo obtenido en las mediciones de micropolaridad, (Tabla 11), que indican que los polímeros lineales proporcionan entornos más hidrofóbicos que los entornos generados por los polímeros hiper ramificados. Esta mayor interacción de la parte aromática del sustrato con la micela polimérica lineal se puede justificar asumiendo que esta micela es capaz de acomodar sus cadenas para generar espacios en los que interactúa de forma más favorable los anillos aromáticos que el polímero hiper ramificado.

Por otro lado, cuando se compara la contribución del $\Delta\mu_c^0$ al $\Delta\mu_t^0$ tanto en la solubilización de *p*-alquilfenoles como de *N*-alquil-NI, este comportamiento se invierte encontrándose que el aporte de $\Delta\mu_c^0$ es en promedio 1,45 veces más grande en polímeros hiper ramificados que en polímeros lineales. Se sabe que las micelas de sistemas hiper ramificados son más pequeñas que las lineales, (Tabla 9) por lo que a estos agregados les favorece la interacción con la cadena alquílica menos voluminosa que el anillo aromático. Por otro lado, el valor de $\Delta\mu_c^0$ (-0,60 kJ/mol) medido en la solubilización de *N*-alquil-NI en micelas de polímeros lineales, es mayor al encontrado en la solubilización del mismo sistema pero en micelas de polímero de anhídrido maleico-*co*-olefinas (-0,44 kJ/mol) lo cual indica que la contribución de estos grupos a la solubilidad es mayor en las micelas multimoleculares formadas por los copolímeros en bloque. Una forma de entender esta disminución para $\Delta\mu_c^0$ es que las micelas de ambos sistemas

poliméricos requieren una reorganización configuracional para la solubilización de la cadena alquílica del sustrato orgánico.

3.6 Liberación de fármacos desde micelas formadas por PMMA-PHEMA y PG-PHEMA

En esta última parte del estudio se realizaron experimentos cinéticos con el fin de comparar los porcentajes máximos de liberación y la velocidad con que ocurre el proceso desde las diferentes micelas poliméricas estudiadas. Estos experimentos se realizan utilizando las celdas tipo Franz ya descritas.

Los fármacos empleados en las liberaciones son Ornidazol, Metronidazol y Tinidazol (Figura 34) que corresponden a agentes nitroimidazólicos comerciales que presentan propiedades antibacterianas, antimicóticas y antiparasitarias; además su estructura posee un carácter apolar y con esto una baja solubilidad en medio acuoso. Además se emplearon derivados alquilados del 2-metil-4-nitroimidazol, con largos de cadena alquílica variable ($n = 1$ a 6), y una familia de fenoles sustituidos como compuestos modelos (Figura 30). Estas sustancias también fueron usadas en el estudio de reparto.

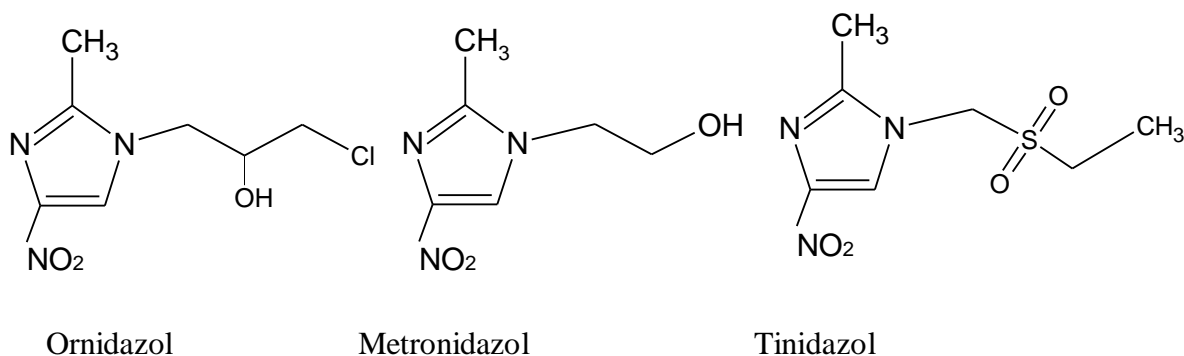


Figura 34. Fármacos empleados en los estudios de liberación.

3.6.1 Liberación de Metronidazol, Tinidazol y Ornidazol desde micelas de PMMA-PHEMA, PG y PG-PHEMA

En estos experimentos se mide la liberación de los fármacos Metronidazol, Ornidazol y Tinidazol desde micelas formadas con polímeros lineales e hiper ramificados y para ello se empleo PMMA₂₇₅-PHEMA₈₈, C10, PG₂₀PHEMA₆ y PG₂₀. Las figuras 35 y 36 muestran los perfiles de liberación y la tabla 19 los valores de las constantes de velocidad obtenidas a través de ajustes del tipo exponencial a cada curva.

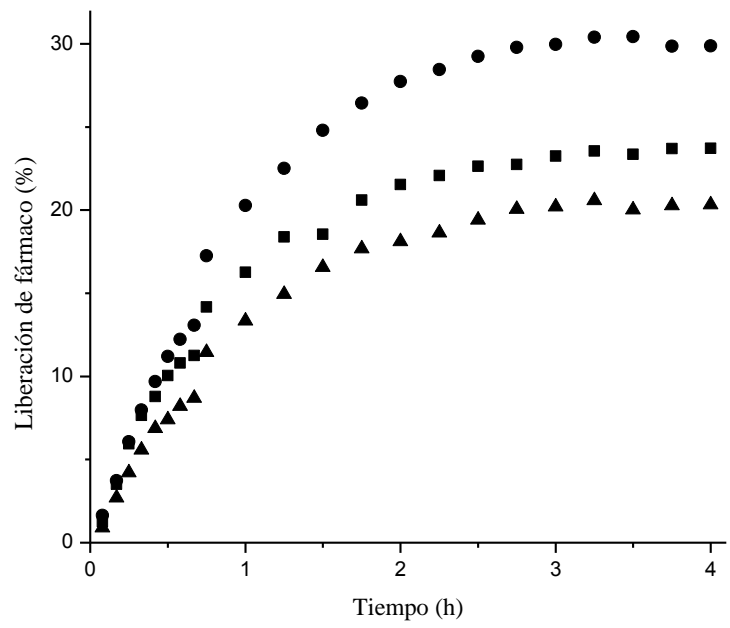


Figura 35. Perfil de liberación desde micelas formadas por $PMMA_{275}$ - $PHEMA_{88}$, C10 para los fármacos: ● Ornidazol, ■ Metronidazol y ▲ Tinidazol.

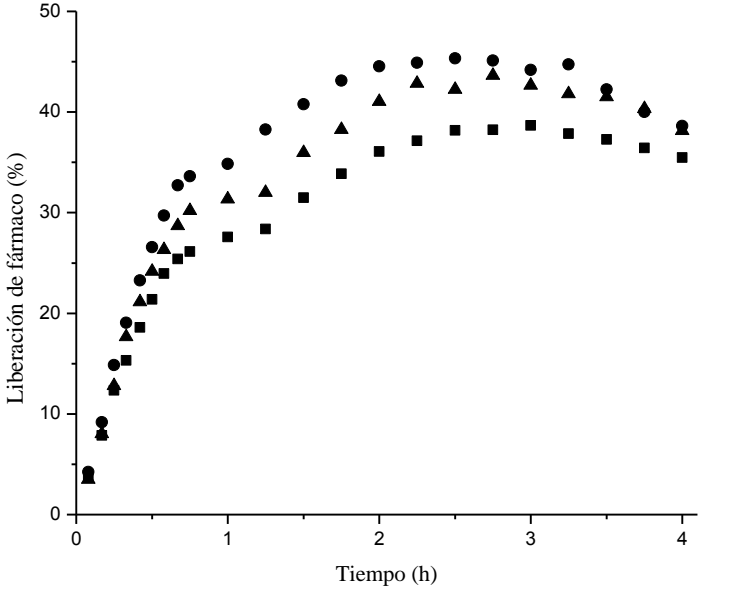


Figura 36. Perfil de liberación desde micelas formadas por PG para los fármacos: ● Metronidazol, ▲ Ornidazol y ■ Tinidazol

En ambas figuras se observa un comportamiento similar al transcurrir la primera hora de experimento en términos de que las curvas tienen una pendiente muy marcada, y pasado ese

tiempo tiende a estabilizarse hasta lograr una pendiente única. Se puede decir que en este tiempo se libera preferentemente el fármaco que reside en la interfase núcleo-corona o solo en la corona y que tiene interacción con estas dos zonas. Este fármaco, al no tener que difundir a través del núcleo, y por lo tanto no está influenciado por las posibles interacciones que se podrían generar en él, es liberado en un proceso rápido. Pasado este tiempo comienza a liberarse el fármaco ubicado en el núcleo micelar.

Al comparar las figuras se observan diferencias en los máximos de liberación así como en el orden en que los sistemas son liberados. En la liberación desde micelas C10 (PMMA₂₇₅PHEMA₈₈) la secuencia es Ornidazol, Metronidazol y Tinidazol con máximos de 30, 24 y 21 % respectivamente. En términos generales se puede decir que las interacciones entre la micela polimérica y los tres fármacos son del tipo puente de hidrógeno y además Tinidazol podrá presentar interacciones del tipo dipolo-dipolo a través del grupo sulfona. Estas interacciones se producen en el corazón micelar con el grupo éster del MMA, y en la corona con el grupo éster e hidróxilo terminal de HEMA.

Los resultados de máximos de liberación indican que la interacción entre Tinidazol y la micela son más fuerte que con Metronidazol y Ornidazol. Considerando valores reportados de constantes de reparto para estos fármacos medidos en micelas poliméricas (J. Chil. Soc, 52, 1, 2007) de los tres fármacos el Tinidazol es el que cuenta con la menor constante de reparto, K_s por lo tanto se esperaría que fuese el primero de los tres en liberarse hacia la fase acuosa, sin embargo se observa un efecto contrario. El efecto esperado se observa en la micela de C6 (PMMA₂₇₅-PHEMA₁₀) donde la secuencia de liberación es Tinidazol, Metronidazol y Ornidazol con máximos de 30, 19 y 13 % respectivamente, (Anexo).

Una posible explicación a este efecto se debe a que el grupo SO_2 de Tinidazol al formar puentes de hidrógeno con los grupos ésteres de MMA y HEMA e hidróxilo terminal del HEMA de manera más eficiente que los grupos OH de los otros fármacos, puede ser retenido en la micela de C10, con 88 unidades de HEMA en forma más efectiva que en la micela de C6 con solo 10 unidades de HEMA. Por lo tanto en las micelas de C10 la participación de la corona es relevante y limita la difusión del fármaco hacia el medio acuoso.

Al comparar los valores de las constantes de velocidad de C10 y C6 de la tabla 19 se observa que para C10 la constante de liberación para Tinidazol es menor ($0,938 \text{ h}^{-1}$) que para los otros dos fármacos cuyos valores de constantes son comparables (valor promedio $1,08 \text{ h}^{-1}$) y en C6 el valor de la constante de liberación para Tinidazol es 1,6 veces más grande que las constantes de velocidad promedio para Metronidazol y Ornidazol.

Para las liberaciones desde las micelas de PG, en la figura 36 se observa la siguiente secuencia de liberación: Metronidazol, Ornidazol y Tinidazol con máximos de 45, 44 y 39%. Estos valores en promedio son 1,72 veces más altos que los logrados en las liberaciones desde micelas del polímero lineal. También se observa que los valores de porcentaje máximos de liberación son muy parecidos entre sí, lo que indica que los tres fármacos interactúan de manera similar con la estructura globular de PG que está conformada por grupos hidroxilos tanto terminales como los presentes en las unidades lineales formadas.

Al comparar la liberación desde micelas de PG y desde micelas de polímeros lineales se observa que las constantes de velocidad k resumidas en la tabla 19, para el sistema hiper ramificado es 1,4 veces más rápida. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en polaridad de los microentornos donde se concluyó que los microdominios de polímeros hiper ramificados eran ligeramente más polares que las de los sistemas lineales. También en las mediciones de apagamiento de la fluorescencia los valores más altos de K_Q obtenidos en comparación con los medidos para micelas de polímeros lineales, indicaban que en el sistema hiper ramificado estaba menos impedido tanto la entrada como la salida de moléculas pequeñas, esto se ve reflejado en las liberaciones.

Tabla 19: Porcentaje máximo de liberación de fármacos comerciales y constantes de velocidad de liberación de fármacos desde micelas poliméricas de PMMA-PHEMA, PG y PG-PHEMA calculadas a partir un ajuste cinético de primer orden.

Polímero	Fármaco	Máximo de liberación (%)	Constante de velocidad k (h^{-1})	r^2
PMMA ₂₇₅ -PHEMA ₈₈ C10	Metronidazol	24	1,13	0,996
	Ornidazol	30	1,03	0,995
	Tinidazol	21	0,98	0,994
PMMA ₂₀₇ -PHEMA ₁₀ C6	Metronidazol	19	0,93	0,994
	Ornidazol	13	0,96	0,996
	Tinidazol	30	1,51	0,996
PMMA ₆₇ -PHEMA ₁₅₄ C2	Metronidazol	23	0,86	0,996
PG ₂₀ -PHEMA ₆ C14	Metronidazol	37	0,70	0,984
	Ornidazol	30	0,63	0,992
	Tinidazol	25	0,60	0,990
PG ₂₀	Metronidazol	45	1,859	0,993
	Ornidazol	44	1,568	0,981
	Tinidazol	39	1,46	0,981

Al comparar los porcentajes máximos de liberación de estos tres fármacos entre PG y PG₂₀PHEMA₆ (Tabla 19) se observa que para el sistema con HEMA el porcentaje promedio de liberación baja de 45 a 31 %. Este efecto se puede atribuir solo a presencia de las unidades de HEMA incorporadas a la corona en cuyo lugar podrían interactuar con los fármacos e impedir su salida al medio acuoso. También al comparar las constantes de velocidad entre estos dos sistemas se observan diferencias, para PG los valores en promedio es 1,6 y para C14 0,64, esta diferencia solo se puede atribuir a la escasa pero al parecer importante presencia de los grupos HEMA, que como se discutió arriba, tendrían un rol de retenedores de sustrato retardando su salida al medio acuoso.

En general al comparar las liberaciones de estos tres fármacos desde micelas de polímero lineales e hiper ramificados (23 y 37 % respectivamente) si bien los porcentajes de liberación en ninguno de los dos casos supera el 50 % este porcentaje siempre es más alto desde micelas de sistema hiper ramificado, lo que podría ser una ventaja comparativa importante.

3.6.2 Liberación de nitroimidazoles sustituidos y *p*-alquil fenoles sustituidos desde micelas de PMMA-PHEMA y PG

Con el fin de estudiar el tipo de interacción entre las estructuras micelares y fármacos con cadena lateral de diferente grado de hidrofobicidad se realizaron liberaciones de los derivados alquilados del 2-metil-4-nitroimidazol, con largos de cadena alquílica de 1 a 6 y los *p*-alquilfenoles sustituidos con radicales de etil, propil y butil, desde micelas formadas por C6, PMMA₂₇₅-PHEMA₁₀ y PG₂₀.

Los perfiles de liberación de las figuras 37 y 38 corresponden a las liberaciones de la familia de nitroimidazoles sustituidos, desde micelas de un polímero lineal.

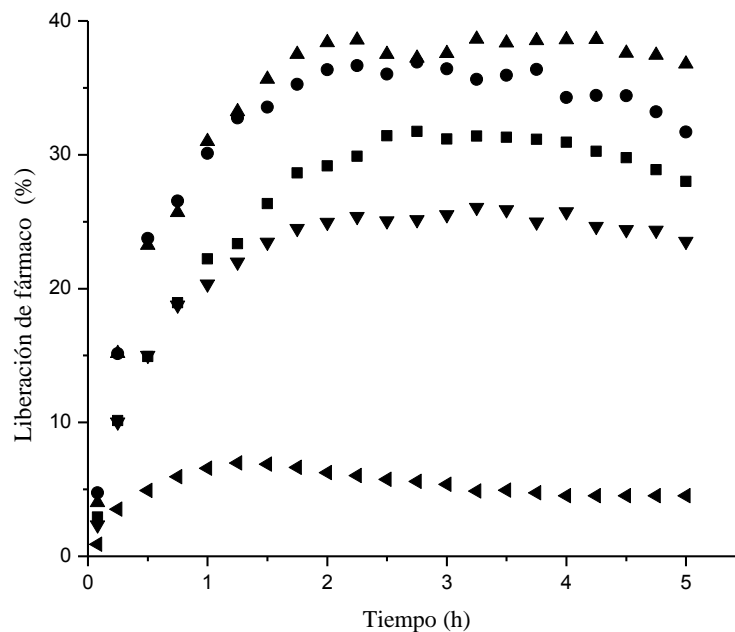


Figura 37. Perfil de liberación desde micelas formadas por PMMA₂₇₅PHEMA₁₀ C6, para los fármacos: ▲NI-Etil, ●NI-Metil, ■ NI-Butil, ▼NI-Propil y ◄NI-Pentil.

En los perfiles de liberación de la figura 37 se aprecia la capacidad que tiene la micela del copolímero en bloque de liberar los fármacos en forma diferenciada. Los primeros sustratos en liberarse al medio acuoso son aquellos con cadenas hidrofóbicas más cortas (etil y metil) que muestran un máximo de liberación promedio de 37 %. Luego los fármacos con cadenas más largas (butil, propil y pentil) con un máximo de liberación de 28 % y por último pentil con un 7 % de máximo de liberación. Vale mencionar que este comportamiento secuencial que da cuenta directa de la interacción del fármaco con la micela no se logró apreciar en forma clara en el estudio de repartos, sin embargo en la liberación es más evidente que a medida que crece la cadena alquílica unida al anillo nitroimidazólico del *N*-alquil-NI, se favorece la solubilización del sustrato en los microdominios hidrofóbicos. Por lo tanto el sustrato con la cadena alquílica más larga es el que menos se liberará al medio acuoso.

Esto se puede deber a que el estudio de reparto se requiere que el sistema logre su equilibrio y a pesar de que las mediciones toman tiempo, no es suficiente, las mediciones de liberación no requieren que el sistema alcance un estado de equilibrio.

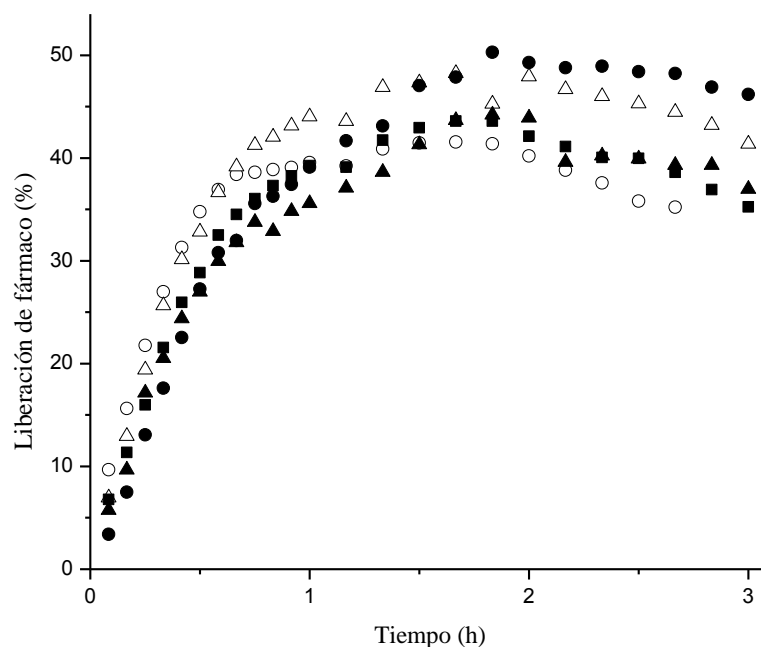


Figura 38. Perfil de liberación desde micelas formadas por PG para los fármacos:
 ● NI-Pentil, △ NI-Etil, ▲ NI-Propil, ■ NI-Butil y ○ NI-Metil.

Para el caso de la liberación desde micelas de PG₂₀ de la figura 38, no se aprecia ninguna secuencia relacionada con los largos de la cadena lateral, a diferencia de la liberación desde micelas de polímeros lineales donde la diferencia es marcada desde el inicio. La primera hora de experimento se observa que todos los sustratos tienen la misma pendiente y pasado ese tiempo la liberación prosigue sin ninguna secuencia preferencial. Este efecto de liberación uniforme se observa también en la liberación de los fármacos comerciales desde micelas de PG₂₀ a diferencia que en este se produce un puente de hidrógeno entre los grupos hidróxilos del polímero hiper ramificado y el grupo nitró del anillo imidazólico, NO₂ del sustrato y esa interacción es independiente del largo de la cadena lateral que este tenga.

Al observar las constantes de velocidad para estos sistemas (Tabla 19) se ve, por ejemplo, que NI-metil es liberado 1,9 veces más rápido desde micelas de PG que desde micelas de C6. El valor promedio de las constantes de velocidad de liberación desde micelas de polímero hiper ramificado es mayor que cada constante de velocidad medida en C6.

Finalmente se puede concluir que los sistemas micelares de polímeros hiper ramificados liberan los fármacos 1,5 veces más rápidos que los sistemas de micelas de polímeros lineales y por lo tanto, al igual que para los fármacos comerciales, las micelas de sistemas hiper ramificado son capaces de liberar al sustrato de una manera más eficiente.

Por último se analizarán las liberaciones de fenoles sustituidos desde micelas de polímero hiper ramificado y lineales. Las figuras 39 y 40 corresponden a liberaciones de los *p*-alquilfenoles sustituidos desde micelas de PG y C6 respectivamente.

En la figura 39 se ve que los máximos de liberación fluctúan entre un 36 y 57 % y que estos se logran transcurridas 3 h de experimentos, a diferencia de los perfiles de liberación de la figura 40 que presentan un único máximo en torno a 36 %, valores alcanzados antes de transcurridas 2 h. Las interacciones entre las micelas formadas por PG y los fenoles sustituidos son del tipo puente de hidrógeno generado entre el hidroxilo del fenol y los grupos hidroxilos del polímero. Considerando que esta interacción ocurre con el sustituyente del anillo fenólico debería ser independiente del largo de la cadena lateral, sin embargo se observa que el porcentaje de liberación es más bajo para butilfenol y además este valor es mucho menor que etilfenol y propilfenol. La retención del butilfenol en la micela de PG solo puede deberse que este sustrato presenta una constante de reparto 8,5 veces más grande que los otros dos sustratos favoreciendo así su permanencia en la micela.

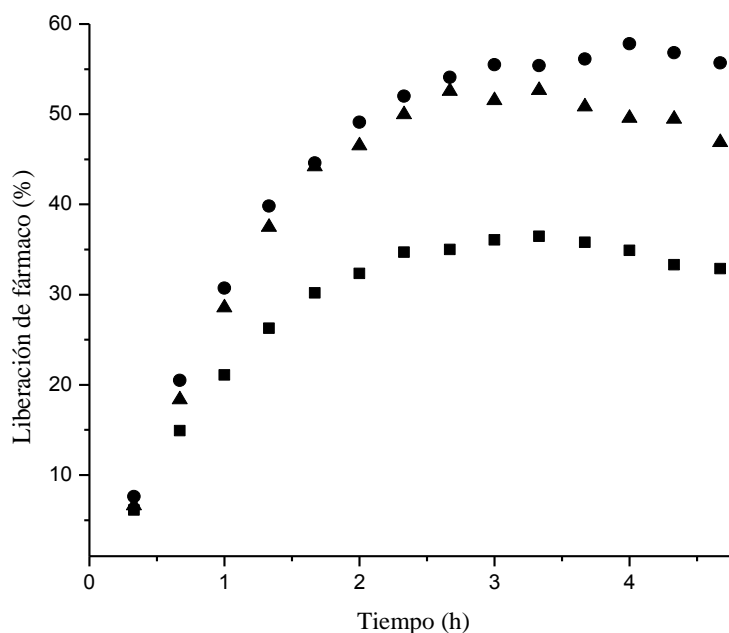


Figura 39. Perfil de liberación desde micelas formadas por PG₂₀ para lo familia de *p*-alquilfenoles
 ● Propilfenol, ▲ Etilfenol y ■ Butilfenol.

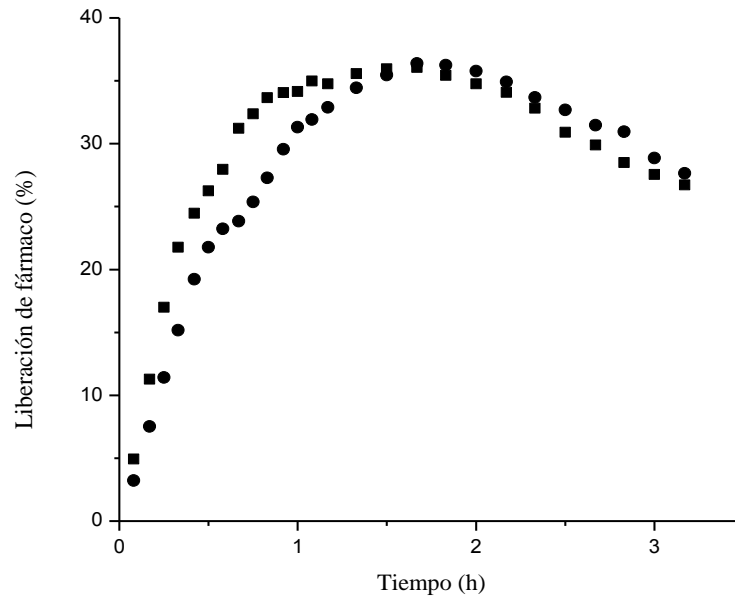


Figura 40. Perfil de liberación desde micelas formadas por C6 PMMA₂₇₅PHEMA₁₀ para lo familia de *p*-alquil fenoles ● Etilfenol y ■ Propilfenol.

En la Tabla 20 se encuentran reportados los valores de máximos de liberación, así como el respectivo coeficiente de correlación, para el ajuste a partir del modelo matemático.

Tabla 20: Porcentaje máximo de liberación, y constantes de velocidad de liberación de fármacos modelo *p*-alquilfenoles y *N*-alquil-NI, desde micelas poliméricas de PMMA-PHEMA, PG y PG-PHEMA calculadas a partir un ajuste cinético de primer orden.

Polímero	Fármaco	% máximo de liberación	Constante de velocidad k (h^{-1})	r^2
PMMA ₂₇₅ -PHEMA ₁₀ C6	NI-Metil	36	1,94	0,991
	NI-Etil	38	1,69	0,990
	NI-Propil	25	1,74	0,994
	N-Butil	31	1,17	0,993
	NI-Pentil	7	2,69	0,994
PG ₂₀	NI-Metil	41	3,71	0,987
	NI-Etil	48	2,70	0,989
	NI-Propil	44	2,82	0,987
	N-Butil	44	2,41	0,987
	NI-Pentil	50	2,27	0,987
PMMA ₂₀₇ -PHEMA ₁₅₃ C4	Etilfenol	6	0,66	0,981
	Propilfenol	10	0,33	0,981
	Butilfenol	7	0,31	0,996
PMMA ₂₇₅ -PHEMA ₁₀ C6	Etilfenol	37	1,68	0,995
	Propilfenol	36	3,05	0,995
PG ₂₀	Etilfenol	53	0,97	0,994
	Propilfenol	57	0,98	0,998
	Butilfenol	36	0,99	0,999

Al comparar las constantes de velocidad de la tabla 20 para las liberaciones de fenoles sustituidos se encuentra que los valores medidos para las constantes de velocidad para las liberaciones desde las micelas de PG son casi idénticas con un valor promedio de 0,979. Esto es congruente con lo que se ha discutido anteriormente en el sentido que la interacción de la micela con el sustrato es muy similar, por lo tanto sus velocidades de salida hacia el medio acuoso no debería cambiar. Donde sí se encuentran diferencias es en las velocidades de liberación desde las micelas de polímeros lineales, donde la diferencia la da el número de grupos HEMA presentes en la corona micelas. Para el caso de C4 el número de grupos HEMA es muy superior al del polímero C6, por lo que la corona formada por los HEMA se transforma en una barrera que impide y atrapa al alquilfenol a través de interacciones del tipo puente de hidrógeno. Los grupos HEMA de C6 no logran tener ese efecto y su constante de velocidad es 5 veces más grandes que las de C4. Por lo tanto la estructura micelar tanto de la corona como del corazón de esta son muy importantes en este tipo de procesos, pudiendo determinar la cantidad de sustrato que pasa o no al medio acuoso, es decir es liberado. Considerando que el peso molecular de C4 es 1,41 veces más grande que el de C6 podemos concluir que para estos sistemas y considerando las interacciones que se producen entre estos fármacos modelos y las micelas, la capacidad de retener al sustrato en la micela polimérica es proporcional al peso molecular del polímero.

CONCLUSIONES

Polímeros en bloque lineales e hiper ramificados que contienen un bloque de PHEMA fueron sintetizados usando la técnica de ATRP. El polímero lineal es PMMA-PHEMA y variando la cantidad de iniciador fue posible obtener polímeros con bloques de diferente peso molecular. Los valores de índice de polidispersidad, están por debajo de 1,44, lo que indica que se trata de polímeros monodispersos. En la reacción de copolimerización de PMMA-PHEMA la protección del monómero HEMA ayudó a mejorar el porcentaje de rendimiento de la reacción e hizo disminuir el índice de polidispersidad. En la síntesis de polímeros hiper ramificados se sintetizó en una primera etapa PG a través de una polimerización aniónica con abertura de anillo. Luego el PG se esterificó y posteriormente se copolimerizó con HEMA. El PG obtenido tiene un grado de ramificación de 0,404, que es menor al esperado en este tipo de sistemas, lo cual indica que el sistema presenta un mayor número de grupos hidroxilos que quedan dentro de la matriz globular y que no generaron unidades dendríticas. Los tres polímeros obtenidos fueron usados en este estudio: PG, PGBr y PG-PHEMA.

La CMC de las soluciones micelares de los polímeros lineales fue determinada por fluorescencia y sus valores están en el rango de 5×10^{-7} a 9×10^{-7} M. Las soluciones de polímeros hiper ramificados forman micelas en todo rango de concentración. El tamaño medido para las micelas formadas por polímeros lineales se ve influenciado tanto por el peso molecular como por el número de unidades hidrofílicas e hidrofóbicas, siendo estas últimas más relevantes. Al solubilizar sustratos orgánicos solo se ve afectado el tamaño de las micelas multimoleculares, mientras que las micelas unimoleculares permanecen casi inalteradas. Estos resultados indican diferencias en la estabilidad de ambos sistemas. La micropolaridad de los agregados se determinó a través de la razón I_1/I_3 de la fluorescencia del pireno. Los resultados muestran que ambos tipos de micelas presentan entornos apolares, lo cual asegura que ambos sistemas son capaces de proporcionar un entorno donde es posible la solubilización de sustratos farmacológicos de carácter apolar. Al comparar la micropolaridad de ambos sistemas se encontró que las micelas de los polímeros hiper ramificados generan entornos más polares que los polímeros lineales. La accesibilidad de moléculas neutras al interior de los agregados fue evaluada midiendo las constantes de desactivación de pireno por nitrometano. Los valores de k_Q calculados a partir de estas mediciones permiten afirmar que el pireno está más expuesto en las micelas unimoleculares que en las multimoleculares. Extrapolando estos resultados a lo que podría ocurrir en la incorporación y posterior liberación de fármacos se puede concluir que el sistema más favorable para que se realicen estos procesos serán los polímeros hiper ramificados. La capacidad de solubilización de las micelas de copolímeros en bloque depende de la estructura que éstas tengan. Al comparar los resultados de los repartos de nitroimidazoles y fenoles sustituidos se aprecia que los valores de K_s para los sistemas lineales son siempre más grandes que para los sistemas poliméricos hiper ramificados. Esto indica que los polímeros lineales tienen una mayor capacidad y son más eficientes para solubilizar estos sustratos. A partir de las constantes de reparto se pudo calcular la contribución a la energía libre de transferencia de los sustratos desde el medio acuoso a la pseudo fase micelar. Los resultados muestran que el aporte de los sistemas aromáticos de los sustratos es siempre mayor que la contribución por grupo metilénico en la cadena lateral. Este efecto se observó en mayor grado en las micelas de polímeros lineales que en las de polímeros hiper ramificados. Esto sugiere que ambas micelas son capaces de generar los espacios necesarios para acomodar favorablemente la porción aromática del sustrato.

El estudio de liberación mostró que las interacciones entre el sustrato orgánico y la micela juegan un rol importante en el proceso de liberación. Los valores de porcentaje de liberación máxima de fármacos son siempre más altos para las micelas unimoleculares, y todos los sustratos son liberados casi a la misma velocidad. Las micelas multimoleculares de PMMA-PHEMA son

capaces de diferenciar a los sustratos solubilizados por su grado de hidrofobicidad, es decir la liberación ocurre en forma selectiva siendo los sustratos más polares los que se liberan más rápidamente. Esto sugiere que los grupos funcionales y el carácter polar de ellos son variables interesantes a considerar ya que el tipo de interacciones con la micela y la fuerza de éstas podrían hacer que el sustrato quede tan anclado en la micela que no se logre el efecto deseado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Harada, A.; Kataoka, K. *Prog. Poly. Sci.* **2006**, 31, 949-982.
2. Kataoka, K.; Harada, A.; Nagasaki, Y. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 47, 113-131.
3. Yokoyama, M. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1992**, 9, 213-248.
4. Kwon, G. S. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, 54, 167.
5. Kabanov, A. V.; Alakhov, V. Y. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **2002**, 19, 1-72.
6. Bromberg, L. J. *Control. Release* **2008**, 128, 99-112.
7. Rapoport, N. *Prog. Poly. Sci.* **2007**, 32, 962-990.
8. Strauss, U. P.; Jackson, E. G. *J. Polym. Sci.* **1951**, 6, 649.
9. Ohno, N.; Nitta, K.; Makino, S.; Sugai, S. *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.* **1973**, 11, 413-425.
10. Sugai, S.; Ohno, N. *Biophys. Chem.* **1980**, 11, 387-395.
11. Sugai, S.; Nitta, K.; Ohno, N. Hydrophobic domains of maleic acid copolymers, in *Microdomains in polymer solutions*, 1st ed.; Dubin, P. L., editor; Plenum Press: New York, 1985; Vol. 30, Chapter 2, pp. 13-32.
12. Chu, D. Y.; Thomas, J. K. *Macromolecules* **1987**, 20, 2133-2138.
13. Barraza, R. G.; Olea, A. F.; Valdebenito, C. E.; Dougnac, V.; Fuentes, I. *J. Colloid Interf. Sci.* **2004**, 275, 434-438.
14. Dubin, P. L.; Strauss, U. P. *J. Phys. Chem.* **1970**, 74, 2842-2847.
15. Strauss, U. P.; Barbieri, B. W.; Wong, G. J. *J. Phys. Chem.* **1979**, 83, 2840-2843.
16. Chu, D. Y.; Thomas, J. K. *J. Phys. Chem.* **1985**, 89, 4065-4070.
17. Olea, A. F.; Rosenbluth, H.; Thomas, J. K. *Macromolecules* **1999**, 32, 8077-8083.
18. Wang, K. T.; Iliopoulos, I.; Audebert, R. *Polym. Bull.* **1988**, 20, 577-582.
19. Iliopoulos, I. *Curr. Opin. Colloid Int.* **1998**, 3, 493-498.
20. Magny, B.; Lafuma, F.; Iliopoulos, I. *Polymer* **1992**, 33, 3151-3154.
21. Hu, G. H.; Lindt, J. T. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **1993**, 31, 691-700.

22. Martinez, F.; Neculqueo, G.; Torres, M.; Olea, A. F. *Bol. Soc. Chil. Quim.* **2001**, 46, 137-141.
23. Kramer, M. C.; Steger, J. R.; Hu, Y. X.; McCormick, C. L. *Polymer* **1996**, 37, 4539-4546.
24. Hadjichristidis N.; Pispas S.; Floudas G. *Block Copolymers, Synthetic Strategies, Physical Properties, and Applications*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, New Jersey, 2003.
25. Kautz, H.; Sunder, A.; Frey, H. *Macromol. Symp.* **2001**, 163, 67-73.
26. Sunder, A.; Heinemann, J.; Frey, H. *Chemistry: A European Journal* **2000**, 6, 2499-2506.
27. Tanford, C. *The Hydrophobic Effect*; 2nd ed.; John Wiley: New York, 1988.
28. Blokzijl, W.; Engberts, J. B. F. N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, 32, 1545-1579.
29. Alexandridis, P.; Lindman, B. *Amphiphilic Block Copolymers, Self-Assembly and Applications*; Elsevier Science: Amsterdam, 2000.
30. Zhang, L. F.; Eisenberg, A. *Science* **1995**, 268, 1728-1731.
31. Zhang, L. F.; Eisenberg, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 3168-3181.
32. Teng, Y.; Morrison, M. E.; Munk, P.; Webber, S. E.; Prochazka, K. *Macromolecules* **1998**, 31, 3578-3587.
33. Gao, Z. S.; Varshney, S. K.; Wong, S.; Eisenberg, A. *Macromolecules* **1994**, 27, 7923-7927.
34. Choucair, A.; Lavigueur, C.; Eisenberg, A. *Langmuir* **2004**, 20, 3894-3900.
35. Choucair, A.; Lavigueur, C.; Eisenberg, A. *Langmuir* **2004**, 20, 3894-3900.
36. Yu, K.; Zhang, L. F.; Eisenberg, A. *Langmuir* **1996**, 12, 5980-5984.
37. Zhang, L. F.; Eisenberg, A. *Polymers For Advanced Technologies* **1998**, 9, 677-699.
38. Salamanca, C. H.; Barraza, R. G.; Acevedo, B.; Olea, A. F. *J. Chil. Chem. Soc.* **2007**, 52, 1025-1029.
39. Hernandez-Valdepena, I.; Domurado, M.; Coudane, J.; Braud, C.; Baussard, J. F.; Vert, M.; Domurado, D. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2009**, 36, 345-351.
40. Bacu, E.; Chitanu, G. C.; Couture, A.; Grandclaoudon, P.; Singurel, G.; Carpov, A. *Eur. Polym. J.* **2002**, 38, 1509-1513.
41. Kamada, H.; Tsutsumi, Y.; Yoshioka, Y.; Yamamoto, Y.; Kodaira, H.; Tsunoda, S.; Okamoto, T.; Mukai, Y.; Shibata, H.; Nakagawa, S.; Mayumi, T. *Clin. Cancer Res.* **2004**, 10, 2545-2550.

42. Maeda, H. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1991**, 6, 181-202.
43. Yamamoto, Y.; Tsutsumi, Y.; Yoshioka, Y.; Kamada, H.; Sato-Kamada, K.; Okamoto, T.; Mukai, Y.; Shibata, H.; Nakagawa, S.; Mayumi, T. *J. Control. Release* **2004**, 95, 229-237.
44. Miller, D. W.; Kabanov, A. V. *Colloids Surf. , B.* **1999**, 16, 321-330.
45. Batrakova, E. V.; Li, S.; Li, Y. L.; Alakhov, V. Y.; Elmquist, W. F.; Kabanov, A. V. *J. Control. Release* **2004**, 100, 389-397.
46. Olea, A. F.; Silva, P.; Fuentes, I.; Martinez, F.; Worrall, D. J. *Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2011**, 217, 49-54.
47. Kataoka, K.; Kwon, G. S.; Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y. *J. Control. Release* **1993**, 24, 119-132.
48. Luo, L.; Tam, J.; Maysinger, D.; Eisenberg, A. *Bioconjug. Chem.* **2002**, 1, 1259-1265.
49. Lavasanifar, A.; Samuel, J.; Kwon, G. S. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, 54, 169-190.
50. Frey, H.; Haag, R. *Reviews in Molecular Biotechnology* **2002**, 90, 257-267.
51. Sunder, A.; Mulhaupt, R.; Haag, R.; Frey, H. *Adv. Mater.* **2000**, 12, 235-239.
52. Yin, M.; Habicher, W. A.; Voit, B. *Polymer* **2005**, 46, 3215-3222.
53. Matsuo, A.; Watanabe, T.; Hirao, A. *Macromolecules* **2004**, 37, 6283-6290.
54. Mori, H.; Wakisaka, O.; Hirao, A.; Nakahama, S. *Macromol. Chem. Physics* **1994**, 195, 3213-3224.
55. Sunder, A.; Hanselmann, R.; Frey, H.; Mulhaupt, R. *Macromolecules* **1999**, 32, 4240-4246.
56. Sunder, A.; Turk, H.; Haag, R.; Frey, H. *Macromolecules* **2000**, 33, 7682-7692.
57. Maier, S.; Sunder, A.; Frey, H.; Mulhaupt, R. *Macrom. Rap. Comm.* **2000**, 21, 226-230.
58. Liu, H.; Chen, Y.; Shen, Z.; Frey, H. *React. Funct. Polym.* **2007**, 67, 156-164.
59. Gao, Z. S.; Varshney, S. K.; Wong, S.; Eisenberg, A. *Macromolecules* **1994**, 27, 7923-7927.
60. Lindman, B.; Thalberg, K. Polymer-surfactant interactions - Recent developments, in *Interactions of surfactants with polymers and proteins*, 1st ed.; Goddard, E. D.; Ananthapadmanabhan, K. P., editors; CRC Press: Boca Raton, 1993; Chapter 5, pp. 203-276.
61. Jimenez-Kairuz, A.; Allemandi, D.; Manzo, R. H. *J. Pharm. Sci.* **2002**, 91, 267-272.

62. Jimenez-Kairuz, A. F.; Llabot, J. M.; Allemandi, D. A.; Manzo, R. H. *Int. J. Pharm.* **2005**, 288, 87-99.
63. Ng, S. F.; Rouse, J.; Sanderson, F.; Meidan, V.; Eccleston, G. *AAPS PharmSciTech* **2010**, 11, 1432-1441.
64. de la Fuente, J. L.; Wilhelm, M.; Spiess, H. W.; Madruga, E. L.; Fernandez-Garcia, M.; Cerrada, M. L. *Polymer* **2005**, 46, 4544-4553.
65. Moreno-Villoslada, I.; Fuenzalida, J. P.; Tripailaf, G.; raya-Hermosilla, R.; Pizarro, G. D. C.; Marambio, O. G.; Nishide, H. *Journal Of Physical Chemistry B* **2010**, 114, 11983-11992.
66. Caykara, T.; Ozyurek, C.; Kantoglu, O. *J. Appl. Polym. Sci.* **2007**, 103, 1602-1607.
67. Hatakeyama, T.; Quinn, F. X. *Thermal Analysis: Fundamentals and Applications to Polymer Science*; John Wiley: NY, USA, 1999.
68. Kalyanasundaram, K.; Thomas, J. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 2039-2044.
69. Dong, D. C.; Winnik, M. A. *Photochem. Photobiol.* **1982**, 35, 17-21.
70. Kalyanasundaram, K. *Photochemistry in Microheterogeneous Systems*; 1st ed.; Academic Press: Orlando, 1987.
71. Basu Ray, G.; Chakraborty, I.; Moulik, S. P. *J. Colloid Interf. Sci.* **2006**, 294, 248-254.
72. Wilhelm, M.; Zhao, C. L.; Wang, Y. C.; Xu, R. L.; Winnik, M. A.; Mura, J. L.; Riess, G.; Croucher, M. D. *Macromolecules* **1991**, 24, 1033-1040.
73. Urbano, B.; Silva, P.; Olea, A. F.; Fuentes, I.; Martinez, F. J. *Chil. Chem. Soc.* **2008**, 53, 1507-1510.
74. Lakowicz; J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Plenum Press: New York, 1999.
75. Dowling, K. C.; Thomas, J. K. *Macromolecules* **1990**, 23, 1059-1064.
76. Sepulveda, L.; Lissi, E. A.; Quina, F. *Adv. Colloid Interf. Sci.* **1986**, 25, 1-27.
77. Olea, A. F.; Barraza, R. G.; Fuentes, I.; Acevedo, B.; Martinez, F. *Macromolecules* **2002**, 35, 1049-1053.
78. Olea, A. F.; Gamboa, C. J. *Colloid Interf. Sci.* **2003**, 268, 63-67.
79. Olea, A. F.; Carrasco, H.; Espinoza, L.; Acevedo, B. J. *Chil. Chem. Soc.* **2014**, 29, 2451-2454.
80. Olea, A. F. *Hydrophobic Polyelectrolytes, in Ionic Interactions in Natural and Synthetic Macromolecules*, Ciferri, A.; Perico, A., editors; John Wiley: 2012; Chapter 7.
81. Gamboa, C.; Olea, A. F.; Rios, H. E.; Henriquez, M. *Langmuir* **1992**, 8, 23-26.