

Trabajo Fin de Grado
Grado en Química

NANOGELES DE QUITOSANO PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE POLIOXOMETALATOS CON APLICACIONES BIOMÉDICAS

Autor:
JUAN MANUEL ARANGO RODRÍGUEZ
Directores:
BEÑAT ARTETXE ARRETXE
LEYRE PÉREZ ÁLVAREZ

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN QUÍMICA

**NANOGELES DE QUITOSANO PARA LA
LIBERACIÓN CONTROLADA DE
POLIOXOMETALATOS CON APLICACIONES
BIOMÉDICAS**

**MEMORIA PRESENTADA POR JUAN MANUEL ARANGO
RODRÍGUEZ**

FECHA DE MATRICULACIÓN Y DEFENSA: JUNIO/JULIO DE 2018

DIRECTORES: BEÑAT ARTETXE ARRETXE Y LEYRE PÉREZ ÁLVAREZ

DEPARTAMENTOS: QUÍMICA INORGÁNICA Y QUÍMICA FÍSICA

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 LOS HIDROGELES	1
1.2 EL QUITOSANO	1
1.3 LOS NANOGELES DE QUITOSANO. SÍNTESIS Y APLICACIONES ...	4
1.4 LOS POLIOXOMETALATOS.....	6
1.5 EL ANIÓN WELLS-DAWSON. TRATAMIENTOS ANTITUMORALES	9
1.6 PROCESOS DE CARGA Y LIBERACIÓN CONTROLADA.....	9
1.7 OBJETIVOS.....	11
2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	12
2.1 ETAPA DE SÍNTESIS.....	12
2.1.1 Síntesis del POM $K_6[P_2Mo_{18}O_{62}] \cdot 12 H_2O$	12
2.1.2 Síntesis de nanogeles de quitosano/PEGBCOOH	12
2.2 MÉTODOS E INSTRUMENTACIÓN.....	15
2.3 PROCESO DE CARGA Y LIBERACIÓN DEL POM	17
2.3.1 Proceso de carga de nanogeles de quitosano con POM.....	17
2.3.2 Proceso de purificación de los nanogeles y de liberación del POM ...	18
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
3.1 CARACTERIZACIÓN DEL POM $K_6[P_2Mo_{18}O_{62}] \cdot 12 H_2O$	19
3.1.1 Estudio vibracional del $K_6[P_2Mo_{18}O_{62}] \cdot 12 H_2O$	19
3.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS NANOGELES DE QUITOSANO.....	20
3.2.1 Resonancia magnética nuclear de 1H (RMN- 1H).	20
3.2.2 Microscopía de transmisión electrónica.....	22
3.3 CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA QUITOSANO/POM	23
3.3.1 Resonancia magnética nuclear de ^{31}P (RMN- ^{31}P).	23
3.3.2 Microscopía de transmisión electrónica(TEM).....	25
3.3.3 Estudio de la pH sensibilidad.....	26
3.4 CUANTIFICACIÓN DEL PROCESO DE CARGA Y LIBERACIÓN.....	29
4. CONCLUSIONES.....	31
5. TRABAJO FUTURO.....	31
6. AGRADECIMIENTOS	32
7. BIBLIOGRAFÍA.....	33

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LOS HIDROGELES

Durante muchos años, la utilización de polímeros de origen natural se ha visto limitada al uso de materiales de tipo cotidiano como la lana, la seda o el caucho natural.¹ No obstante, los biomateriales, tradicionalmente definidos como materiales de uso clínico, han presenciado un aumento en su grado de sofisticación y estos son el objeto de estudio de muchas líneas de investigación relacionadas con la medicina, biotecnología, genética y farmacia. Este desarrollo de nuevos biomateriales ha impulsado el uso de polímeros biodegradables para aplicaciones biomédicas.²

En este ámbito, los hidrogeles son de gran relevancia. La definición más completa y más utilizada de hidrogel viene de la mano de *N.A. Peppas*³ que los define como redes poliméricas tridimensionales entrecruzadas e hidrofílicas capaces de almacenar grandes cantidades de agua o fluidos biológicos. Estas cadenas están asociadas a través de enlaces covalentes por la reacción de homopolímeros o copolímeros y son insolubles debido a la presencia de entrecruzamiento químico o físico, como son enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals fuertes entre cadenas. En los hidrogeles existen, además, otros tipos de interacciones como son las fuerzas electrostáticas, tanto atractivas como repulsivas, uniones intermoleculares de componentes hidrófobos e interacciones iónicas.

Los hidrogeles pueden ser clasificados en función de su método de preparación, así como en función del grupo lateral. Atendiendo al método de preparación, se pueden diferenciar entre hidrogeles de red homopolimérica y copolimérica. En función de la naturaleza de los grupos laterales, los hidrogeles se pueden clasificar en neutros, aniónicos y catiónicos. Su capacidad de retener agua sin llegar a disolverse en ningún líquido y su consistencia elástica, hacen de estos materiales potenciales candidatos como vehículos de transporte y liberación de fármacos.⁴⁻⁵

1.2 EL QUITOSANO

La habilidad de ciertos polisacáridos para formar hidrogeles incluso a bajas concentraciones constituye una de sus propiedades más remarcables.⁶ Entre ellos, los geles basados en el quitosano han recibido especial atención desde el siglo XIX,

cuando Rouget⁷ estudiaba las formas desacetiladas de la quitina. Después de la celulosa, la quitina (Figura 1.a) es el segundo polisacárido más abundante en la tierra y es comúnmente encontrado en el exoesqueleto de algunos artrópodos como los crustáceos.⁸ Tal y como se ilustra en la Figura 1.b, en el quitosano las unidades acetiladas, 2-acetamido-D-glucosa (GlcNAc) y las unidades desacetiladas 2-amino-D-glucosa (GlcN) están combinadas a través de enlaces lineales β -(1 \rightarrow 4)-glicosídicos.

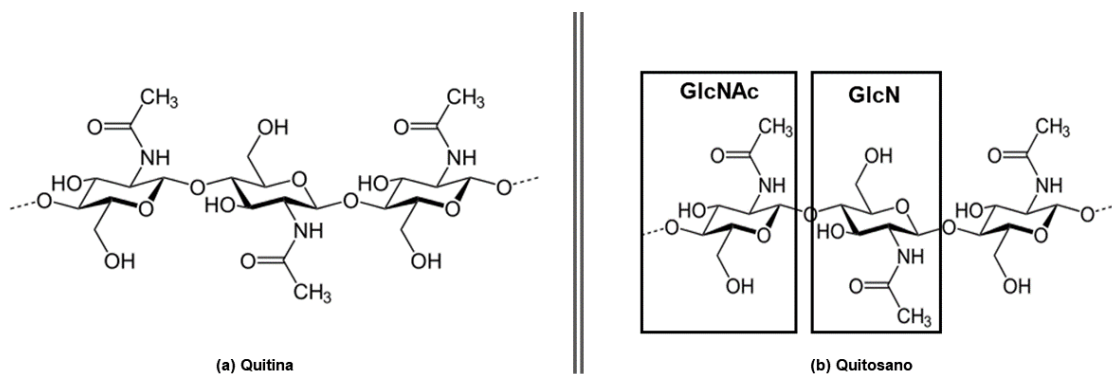


Figura 1.- Estructuras de la quitina (a) y del quitosano (b)

Respecto a su aplicabilidad, el uso de quitosano es más común debido a que tiene mayor solubilidad que la quitina. El quitosano posee una diversidad de propiedades funcionales tales como: biodegradabilidad, biocompatibilidad, autoadhesión (lo que le confiere la habilidad de abrir transitoriamente la estrecha unión de la barrera intestinal), acción antiinflamatoria, acción inmunoestimulante, actividad antimicrobiana, anticolesterolemica y antioxidante.⁹⁻¹⁰

Aunque se puede obtener de manera natural en la pared celular de algunos hongos, el quitosano, como se ha mencionado, se puede obtener principalmente a través de la desacetilación química o enzimática de la quitina. La desacetilación química se basa en la hidrólisis básica del grupo acetato de la quitina. Por otro lado, la desacetilación bioquímica requiere de la presencia de la enzima *quitina desacetilaza*.¹¹

Así, las propiedades físicas y químicas del quitosano dependerán mayoritariamente de su peso molecular y del grado de desacetilación. Del mismo modo, el valor intrínseco del pKa depende del grado de desacetilación, la fuerza iónica y la neutralización de la carga de los grupos amino (-NH₂). Prácticamente, para aminas totalmente

neutralizadas con un grado de desacetilación no mayor del 50%, el valor de pKa oscila entre 6.3 y 6.7.^{12,13}

No obstante, a valores de pH por encima de pKa= 6.5, los grupos amino se encuentran en estado neutro lo que favorece la formación de enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares. Por ello, las fuertes interacciones de enlace de hidrógeno así como las interacciones hidrofóbicas, generan dominios cristalinos que hacen del mismo insoluble en la mayoría de disolventes en condiciones neutras o básicas. Por este motivo, en condiciones fisiológicas (pH=7.4) el quitosano es insoluble, lo cual limita en cierta medida algunas de sus aplicaciones biomédicas. Por el contrario, a valores de pH ácidos, ocurre la protonación de los grupos -NH₂. Las repulsiones electrostáticas entre las cadenas provocan la rotura de los enlaces de hidrógeno y el hinchamiento de las cadenas. El enlace glicosídico es un hemiacetal el cual es susceptible a la hidrólisis en medio ácido. Esto genera una disminución de la viscosidad así como del peso molecular favoreciendo su solubilidad en estas condiciones.¹⁴ Como se puede observar en la Figura 2, el quitosano exhibe un comportamiento sensible al pH.

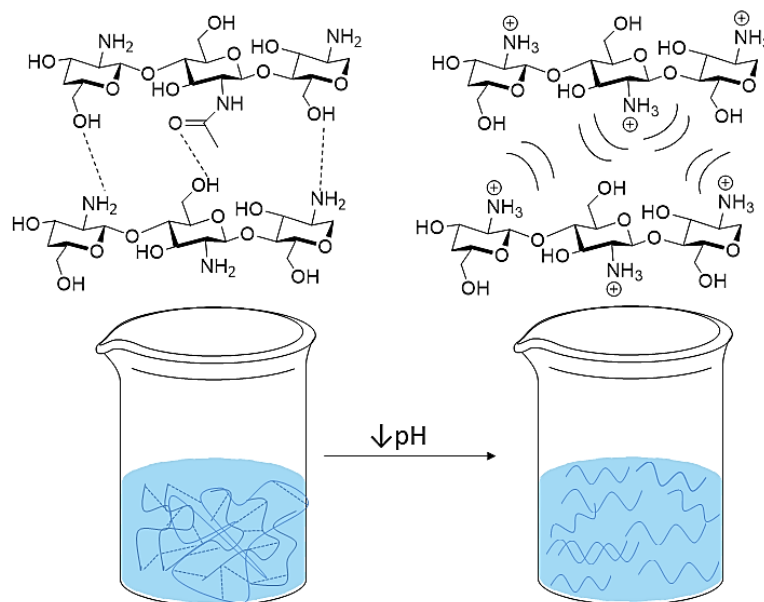


Figura 2.- Comportamiento sensible al pH del quitosano

1.3 LOS NANOGELES DE QUITOSANO. SÍNTESIS Y APLICACIONES

Con la llegada de la nanotecnología, la liberación controlada de fármacos se ha visto enormemente favorecida a través del desarrollo de sistemas transportadores de fármacos de escala nanométrica derivados de dichos polisacáridos.

La síntesis de nanogeles de quitosano se puede llevar a cabo a partir de tres formas generales: a) polimerización simultánea y entrecruzamiento, b) entrecruzamiento de polímeros previamente sintetizados (mecanismo propuesto en este trabajo) y c) conversión de macrogeles en nanogeles a través de técnicas de triturado y tamizado.

En cualquiera de los casos, es muy importante controlar y restringir el tamaño de partícula para mantener una distribución de tamaño coloidal. Por ello, es muy usual recurrir a procesos de polimerización heterogénea. Estos métodos se basan en llevar a cabo la polimerización confinada en un espacio nano/micrométrico, donde ocurre un entrecruzamiento intramolecular. De este modo, se proponen los métodos de polimerización por emulsión inversa, miniemulsión inversa y microemulsión inversa, así como los métodos de precipitación y dispersión.¹⁵ El método más sencillo y más utilizado es el de la microemulsión inversa (Figura 3).

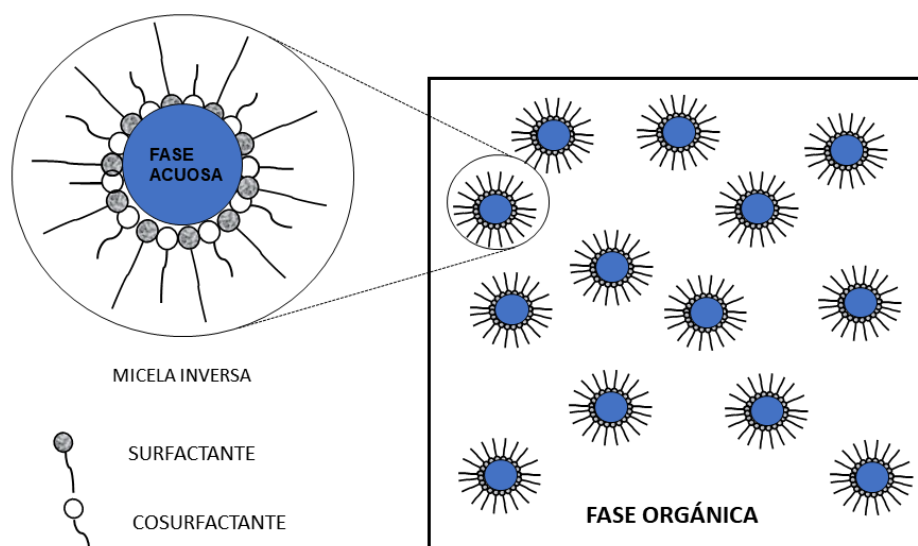


Figura 3.- Descripción gráfica de una microemulsión inversa y sus componentes

En una microemulsión inversa, un monómero hidrofílico, normalmente en disolución acuosa (fase dispersa), se emulsiona en una fase orgánica continua usando un

surfactante del tipo “agua/aceite”, un cosurfactante y un iniciador soluble tanto en la fase acuosa como en la fase continua. El resultado son partículas coloidales de un polímero hidrofílico suspendidas en una fase continua orgánica. Así, mientras las emulsiones inversas son cinéticamente estables, las microemulsiones inversas son termodinámicamente estables debido a que la gran cantidad de surfactante a añadir permite la formación de micelas de monómero de diámetros por debajo de los 20 nm. De este modo, las microemulsiones se pueden concebir como sistemas micelares donde las reacciones bien, de polimerización o entrecruzamiento ocurren en “nanoreactores” en la fase dispersa.^{16,17}

En lo que respecta a los hidrogeles de quitosano sintetizados mediante microemulsión inversa, primeramente, *Mincheva y colaboradores*¹⁸ propusieron un método utilizando polietilenglicol diácido (PEG(COOH)₂) como entrecruzante. Posteriormente *Chen y colaboradores*¹⁹ propusieron generar estas redes de quitosano/PEG con ayuda de *1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida* (EDC) y *N-hidroxisuccinimida* (NHS) permitiendo llevar a cabo el entrecruzamiento a temperatura ambiente.

La extensión de las aplicaciones del uso de nanogeles de quitosano como potenciales transportadores de fármacos o sustancias activas permite abarcar áreas de investigación tan representativas como la del cáncer. El cáncer supone uno de los mayores problemas de salud en la sociedad actual que continúa agravándose con el paso del tiempo. Concretamente, el cáncer de mama es el tumor más frecuente en mujeres occidentales.²⁰ Actualmente, la terapia hormonal con tamoxifeno es uno de los tratamientos más utilizados. No obstante, se ha determinado una cierta complicación en este tratamiento debida al desarrollo de resistencia al fármaco. Estudios recientes han determinado que esta se debe a la activación de la vía de señalización Wnt de las células madre cancerosas (*cancer stem cells; CSC*) a través del factor de transcripción Sox2.²¹

El éxito del Cisplatino en los tratamientos anticancerígenos ha estimulado la propuesta del uso de otros complejos metálicos con propiedades antitumorales.²² Recientes estudios *in vitro* indican que algunos polioxometalatos (POMs) son disruptores del circuito Wnt-Sox2, inhibiendo la acción del Sox2 mediante el bloqueo de la zona de unión con el ADN.²³

1.4 LOS POLIOXOMETALATOS

Los polioxometalatos forman una larga y distintiva clase de compuestos inorgánicos basados en clústeres aniónicos formados por metales de transición (normalmente en su estado de oxidación más alto) y oxígeno. Estos exhiben una gran versatilidad electrónica, así como una elevada diversidad estructural y topológica que les confieren un rango de propiedades físico-químicas incomparables.²⁴ Este amplio rango de propiedades hace que se presten para múltiples aplicaciones en las áreas de la catálisis, ciencia de los materiales, y medicina entre otras.²

A nivel estructural, los POMs pueden ser descritos a través de la condensación ácida de poliedros $\{MO_n\}$ unidos por compartición de vértices y aristas (Figura 4), donde M suele ser un metal de los grupos 5 y 6, principalmente Mo, W y V ó con menos frecuencia Nb, Ta y Cr, y $n=4-7$. Los elementos metálicos mencionados, comúnmente denominados metales *addenda*, se caracterizan por poseer una combinación favorable de radio iónico y carga, así como orbitales *d* vacantes y accesibles para la formación de enlaces π M-O.²⁶

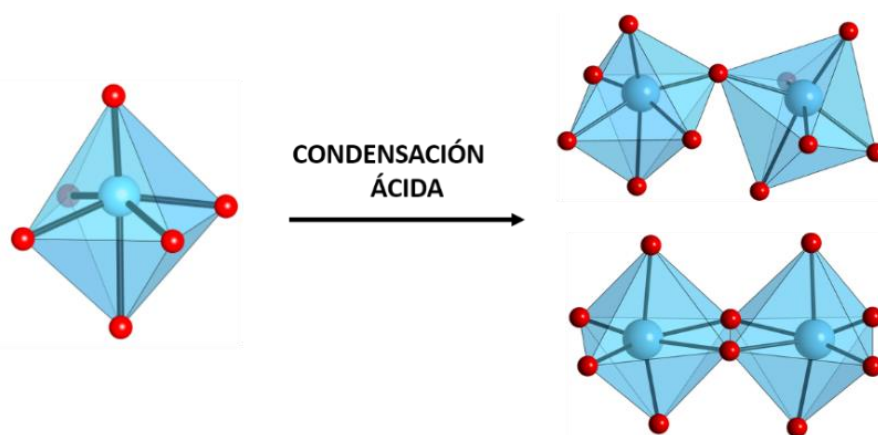


Figura 4.- Reacción de condensación ácida de unidades $\{MO_6\}$

Atendiendo a su composición, los POMs pueden dividirse en 2 grupos diferentes, los isopolioxometalatos y los heteropolioxometalatos (Figura 5).

Los isoPOMs cuya fórmula general es $[M_mO_y]^{q-}$ son aquellos que únicamente están constituidos por metal y oxígeno. Los heteroPOMs son clústeres de los metales de los grupos 5 y 6 con oxígeno, que además contienen otro elemento que actúa como

heteroátomo (que suele ser tradicionalmente un elemento de un grupo principal o un metal de transición), siendo $[X_xM_mO_y]^{q-}$ su fórmula general.^{27,28}

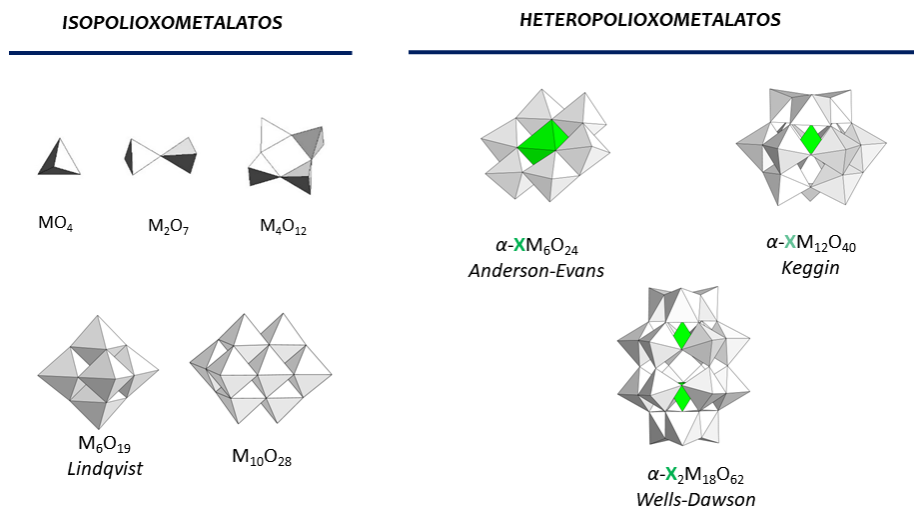


Figura 5.- Clasificación de los POM según su composición con diferentes ejemplos representativos para cada grupo.

Uno de los heteropolianiones más extensamente estudiados es el polianión tipo Keggin de fórmula general $[XM_{12}O_{40}]^n(XM_{12})$ donde $M = Mo^{VI}$, W^{VI} y $X = B^{III}$, Si^{IV} , Ge^{IV} , entre otros. La estructura del isómero alfa de dicho anión posee una simetría ideal T_d y consiste en un tetraedro central $\{XO_4\}$ rodeado por doce octaedros MO_6 acomodados en cuatro trímeros $\{M_3O_{13}\}$ donde los octaedros comparten aristas. Tal y como se observa en la Figura 6, los trímeros se unen entre sí con el tetraedro central a través de los vértices.

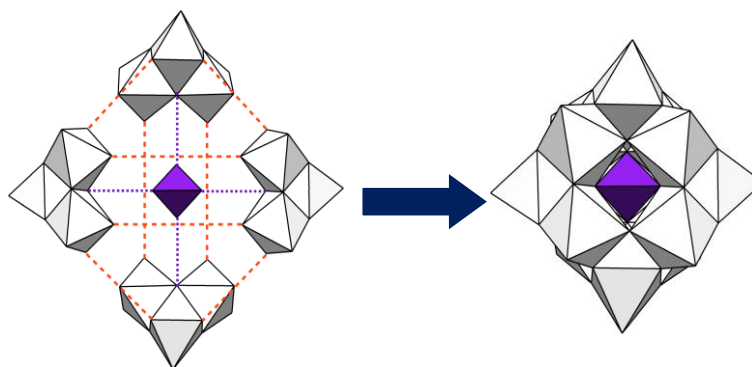


Figura 6.- Condensación de unidades M_3O_{13} resultando en una estructura tipo Keggin.

Algunos POMs provienen de estructuras más grandes donde uno o más metales *addenda* han sido retirados de la estructura plenaria por degradación en medio básico, dando lugar a un defecto en la estructura del clúster. Estas se denominan especies lacunarias. La incorporación de electrófilos (metales de transición, lantánidos, etc) en estas especies puede regenerar el polianión resultando en una especie sustituida. A partir del isómero α -Keggin, se pueden obtener tres especies lacunarias: la monovacante $\{\alpha\text{-XM}_{11}\text{O}_{39}\}$ por la pérdida de uno de los doce octaedros equivalentes, y las trivacantes $\{\text{A-}\alpha\text{-XM}_9\text{O}_{34}\}$ con la eliminación de una tríada M_3O_{15} (tres octaedros que comparten vértices) y la $\{\text{B-}\alpha\text{-XM}_9\text{O}_{34}\}$ por la pérdida de un trímero M_3O_{13} (tres octaedros que comparten aristas), respectivamente (Figura 7.a). En algunos casos, las especies lacunarias pueden llevar a cabo reacciones de condensación dando lugar a nuevos heteroPOMs. Por ejemplo, el clúster Wells-Dawson $\text{X}_2\text{M}_{18}\text{O}_{62}$ está formado por dos especies trilacunarias $\text{A-}\alpha\text{-XM}_9\text{O}_{34}$ (X = heteroátomos del grupo 15) compartiendo vértices^{29,30} (Figura 7.b).

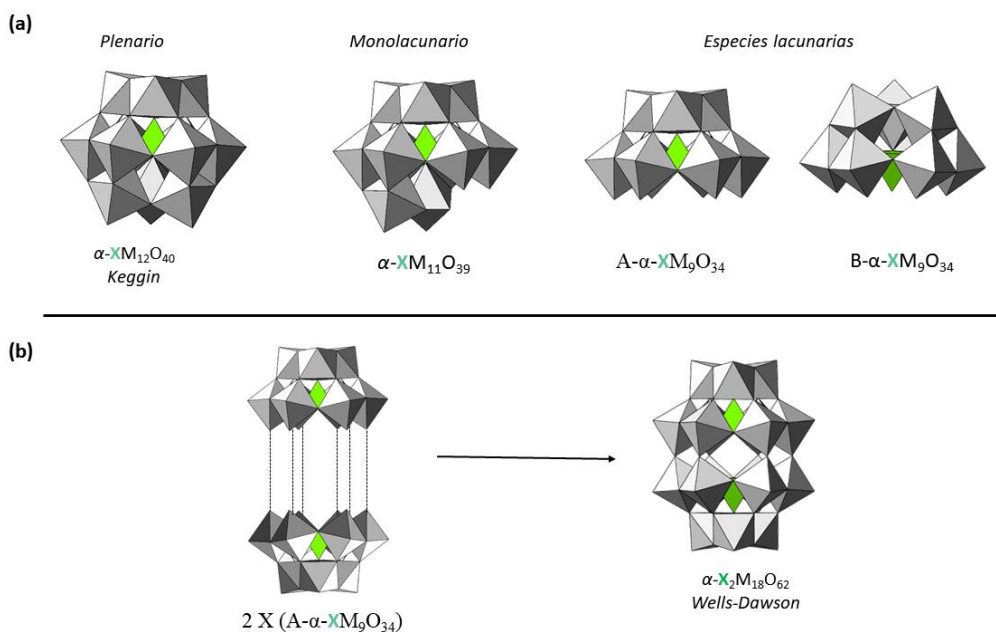


Figura 7.- a) posibles estructuras lacunarias del Keggin; b) composición estructural del POM Wells-Dawson.

1.5 EL ANIÓN WELLS-DAWSON. TRATAMIENTOS ANTITUMORALES

*Kamesh Narasimhan y colaboradores*³¹ han determinado que el polianión Wells-Dawson $[P_2Mo_{18}O_{62}]^{6-}$ actúa como inhibidor directo en la capacidad de unirse el Sox2 al ADN y por tanto su capacidad de oponer resistencia al tratamiento, tal y como se ilustra en la Figura 8.

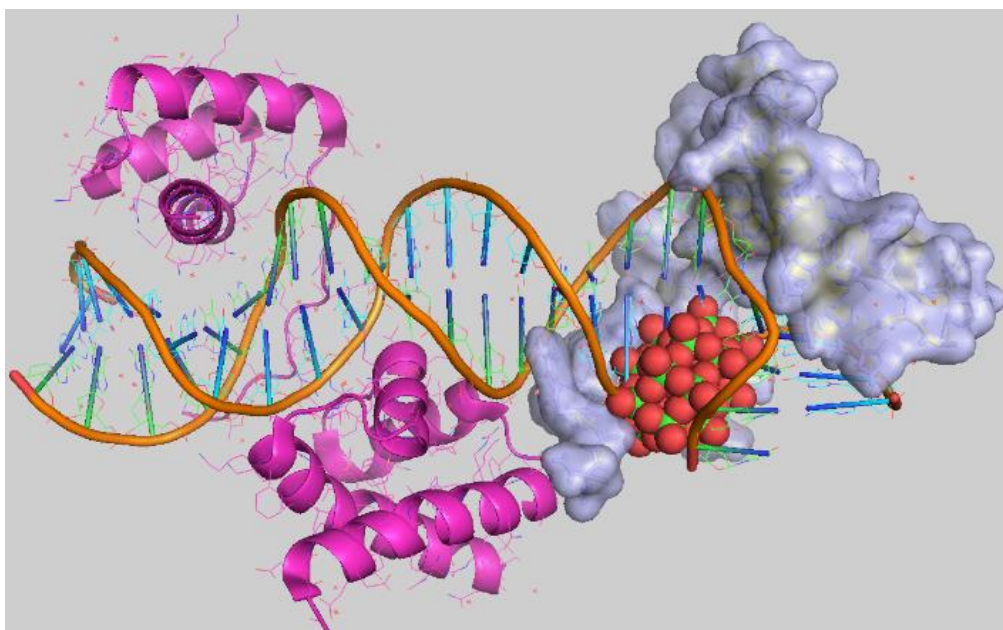


Figura 8.- Modelo de Sox2 mediante cálculos de “docking”(proteína g con POMs tipo Wells-Dawson(modelo de bolas rojo – O y verde-Mo) en competencia con el DNA.

Ahora bien, un factor fundamental a tener en cuenta en el tratamiento de un proceso fisiopatológico, es que es deseable que la administración de medicamentos se realice de tal forma que el fármaco alcance su lugar de actuación en un intervalo de dosis terapéutica efectiva. Dicha administración se ve limitada por la toxicidad del fármaco, la captura del medicamento por otras células del organismo, la incapacidad del fármaco para penetrar en las células deseables, etc.³²

1.6 PROCESOS DE CARGA Y LIBERACIÓN CONTROLADA

Los principales motivos por los cuales la aplicabilidad de los POMs en medicina se encuentra limitada es la estabilidad de algunas especies al pH fisiológico (resultando en su degradación de una mezcla de productos inorgánicos), su citotoxicidad así como su incorporación dentro de la célula.²⁵

La solución a estos problemas reside en introducir en el organismo estos agentes terapéuticos dentro de otra molécula biocompatible y biodegradable. Así, los nanogel de quitosano, se prestan como potenciales transportadores de POMs de manera que protegen al polianión del medio fisiológico y disminuyen su citotoxicidad.

La potencial capacidad para el transporte y liberación de los POMs por parte del quitosano, reside en su sensibilidad al pH. De acuerdo con lo comentado, a valores de pH bajos se producen las interacciones electroestáticas repulsivas y el consecuente el hinchamiento de la red. En presencia de la sustancia activa (POM) sucede el proceso de carga.³³

Los nanogel exhiben una capacidad de carga bastante alta lo cual es muy importante ya que permite minimizar la cantidad de gel empleado. La eficiencia de carga (EE) y la capacidad de carga (LC) expresadas en las correspondientes Ecuaciones 1 y 2 respectivamente, permiten cuantificar la carga de la sustancia activa:

$$EE(\%) = \frac{T-F}{T} \cdot 100 \quad (1)$$

,donde T es la concentración de polianión total en la disolución inicial y F es la concentración que permanece en el sobrenadante tras la carga de los nanogel.

$$LC(\%) = \frac{T-F}{M} \cdot 100 \quad (2)$$

, siendo M la cantidad total de quitosano añadido en peso.¹⁵

Estos compuestos activos se pueden incorporar en el nanogel de quitosano principalmente a través de dos mecanismos: Primeramente por conjugación covalente, donde el fármaco está unido covalentemente a la red de quitosano, lo que precisa que los enlaces químicos sean fácilmente hidrolizables para permitir la liberación del fármaco y atrapamiento físico, que es la forma más simple y utilizada ya que, en este caso, el fármaco está físicamente incrustado en la red y adsorbido en la superficie pudiéndose obtener porcentajes de carga cercanos al 100%.³⁴

El mecanismo de liberación se debe a una combinación de difusión (Figura 9.a), degradación de la red o hinchamiento (Figura 9.b) por la variación de un factor del medio como el pH (Figura 9.c).

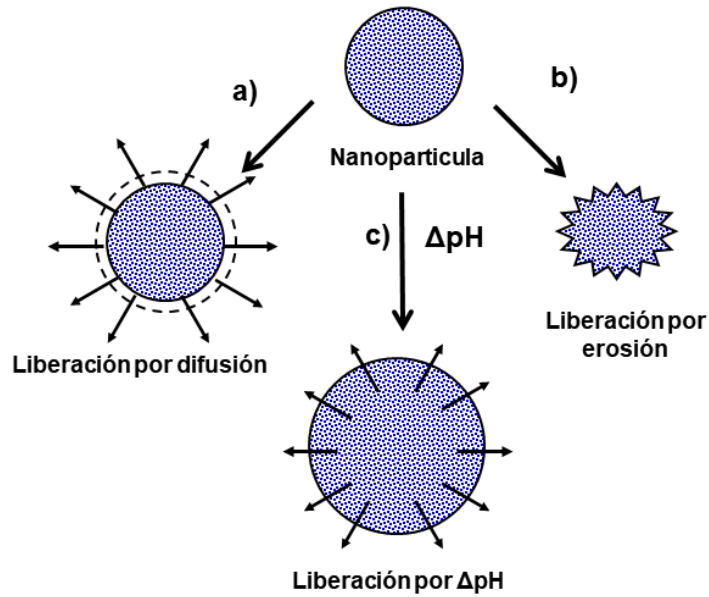


Figura 9.- Mecanismo de liberación por a) difusión del nanogel, b) erosión c) mecanismo y por variación del pH de un nanogel de quitosano.

1.7 OBJETIVOS

Los objetivos principales de este trabajos son los siguientes:

- La síntesis y caracterización del polioxometalato tipo Wells-Dawson $K_6[P_2Mo_{18}O_{62}] \cdot 12H_2O$.
- La síntesis y caracterización de nanogeles de quitosano entrecruzados con PEGBCOOH a través del método de la microemulsión inversa.
- Llevar a cabo los procesos de carga y liberación *in vitro* con el POM Wells-Dawson para examinar sus posibles aplicaciones en el área de investigación del cáncer de mama.

2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.1 ETAPA DE SÍNTESIS

La síntesis del POM precursor Wells-Dawson se llevó a cabo siguiendo la metodología recogida en la bibliografía³⁵. Así mismo, la de síntesis de nanogeles de quitosano entrecruzados con PEGBCOOH tuvo lugar a través del método de la microemulsión inversa tal y como establecen *Pujana y colaboradores*.³⁶

El quitosano comercial utilizado es de bajo peso molecular, purificado tal y como referencian *Signini R. y Campana F.*³⁷. El resto de reactivos han sido adquiridos de distintas casas comerciales sin haber sido sometidos a ningún proceso de purificación previo.

2.1.1 Síntesis del POM $K_6[P_2Mo_{18}O_{62}] \cdot 12 H_2O$

$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (20 g, 84 mmol) fue disuelto en 50 mL de agua destilada junto con H_3PO_4 concentrado (3 mL) y HCl concentrado (16.5 mL). La mezcla reactiva se mantuvo a reflujo durante 8h. Una vez fría, KCl (20g, 268mmol) fue añadido, dando lugar a un sólido de color verdoso. El precipitado y su sobrenadante se mantuvieron a 5°C toda la noche para favorecer la precipitación. El sólido resultante fue filtrado a vacío y redisolto en la mínima cantidad de agua destilada posible. Nuevamente KCl (10 mg, 134 mmol) fue añadido para dejarlo a 5°C toda la noche. Finalmente, los cristales fueron filtrados a vacío y sometidos a sucesivas etapas de limpieza con 3 porciones de EtOH (10 mL) y 3 porciones EtO₂ (10 mL). Los cristales color verde se secaron a vacío. Rendimiento: 1,52 g, 31%. FTIR ν (KBr, cm^{-1}): 1076(f), 1003(m), 941(f), 905(f), 779(F), 527(d), 450(d).

2.1.2 Síntesis de nanogeles de quitosano/PEGBCOOH

2.1.2.1 Activación del entrecruzante

Primeramente, se llevó a cabo la activación del agente entrecruzante (*PEGBCOOH*) dando lugar a la formación de ésteres de *N-hidroxisuccinimida* a partir de sus grupos ácidos, tal y como se observa en la Figura 10.

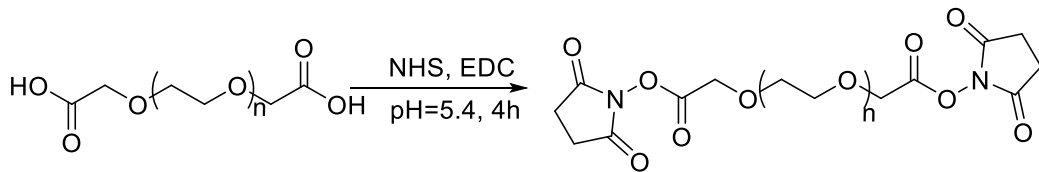


Figura 10.- Reacción de activación del entrecruzante (PEGBCOOH)

Para ello, NHS (220mg, 1.9 mmol) fue disuelto en 20 mL de agua destilada a temperatura ambiente. Tras la disolución completa del sólido, PEGBCOOH (287.5 mg) fue añadido manteniendo el valor del pH constante a pH= 5.4 con ayuda de una disolución de NaOH 2.0 M anteriormente preparada . Tras 15 minutos de agitación, EDC (750 mg, 3,91 mmol) fue añadido lentamente manteniendo el valor del pH mencionado constante con ayuda de una disolución de HCl 2,0 M previamente preparada. La mezcla reactiva se dejó en agitación constante a temperatura ambiente durante 4h. De este modo, la relación molar que establecen los reactivos utilizados PEGCOBOH: NHS: EDC es 1:4:10.

2.1.2.2 Microemulsión inversa

Una vez realizada la etapa de activación del entrecruzante, la reacción de polimerización entre el quitosano y el PEGBCOOH ocurre a temperatura ambiente tal y como se observa en la Figura 11.

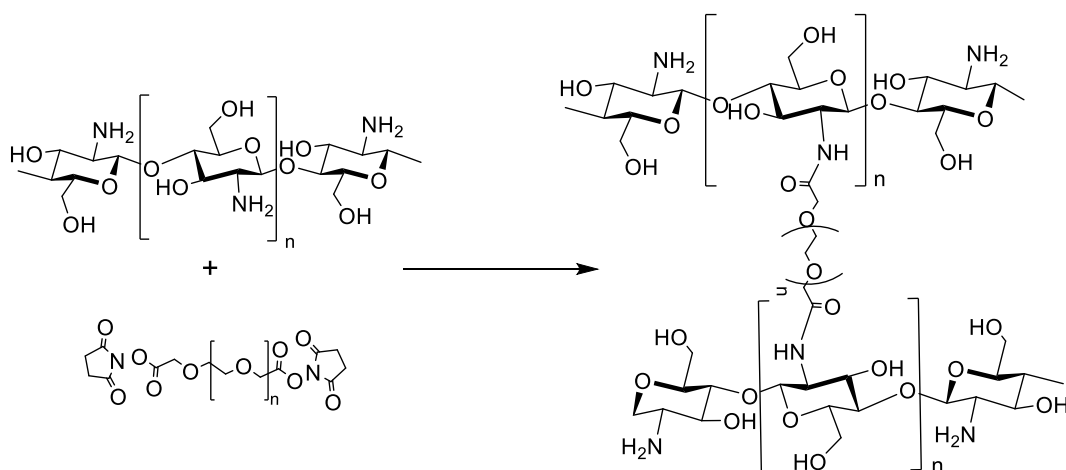


Figura 11.- Reacción de entrecruzamiento entre el PEGBCOOH activado y el quitosano

Para llevar a cabo la polimerización a escala nanométrica se empleó la técnica de la microemulsión inversa. En base a esto, se prepararon de manera simultánea 2

microemulsiones inversas; una para alojar el quitosano y otra para alojar el entrecruzante.

En sendos vasos de precipitados se añadieron ciclohexano (55 mL) y 1-hexanol (20 mL). En una de estas disoluciones se vierten los 20 mL de la disolución de entrecruzante activado y en la otra 20 mL de una disolución al 1%(1g en 100mL) de quitosano (AcOH,1%) previamente preparada. En ambas microemulsiones se fue añadiendo lentamente el surfactante, Tritón X hasta observar que las disoluciones se vuelven incoloras tras observar previamente una intensa turbidez blanca. Tras 1 h de agitación, la disolución que contiene el entrecruzante se vierte lentamente sobre la que contiene el quitosano tal y como se esquematiza en la siguiente Figura 12.

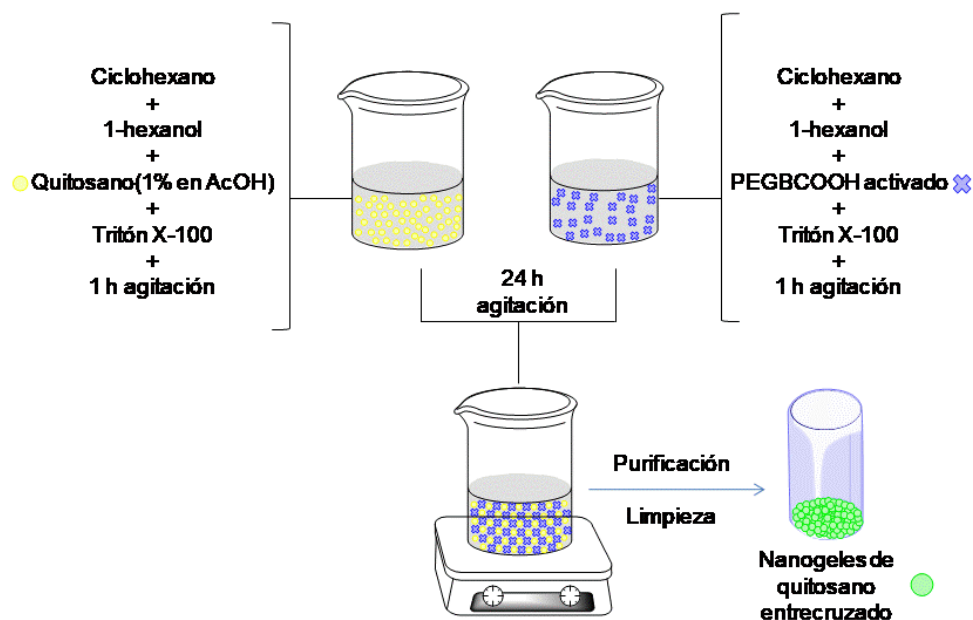


Figura 12.- Síntesis de los nanogeles de quitosano entrecruzado a través del método de la microemulsión inversa.

La microemulsión inversa se dejó bajo agitación constante durante 24h. Transcurrido este tiempo, se procedió a la precipitación de los nanogeles añadiendo la misma cantidad en volumen de EtOH que de volumen resultante de microemulsión. Una vez decantados los nanogeles, se lleva a cabo la purificación de los mismos realizando varias etapas de centrifugado (9500 rpm, 15°C y 15 min.) y de limpieza con EtOH. Finalmente, los nanogeles fueron dispersados en una disolución de AcOH(1%) y sometidos a diálisis en AcOH(1%) durante 2 semanas para finalizar con un 1 día de

diálisis en agua destilada. Como resultado de la reacción de síntesis los nanogeles de quitosano el rendimiento fue del $(27 \pm 3\%)$.

2.2 MÉTODOS E INSTRUMENTACIÓN

En esta sección se recogen las condiciones experimentales así como la instrumentación empleada para caracterizar el POM precursor, los nanogeles de quitosano tanto libres como cargados con POM, así como la cuantificación del proceso de carga de los últimos.

Las medidas de FT-IR, dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial Zeta fueron realizadas en el Departamento de Química Inorgánica. Las medidas por UV-VIS se llevaron a cabo en el Departamento de Química Física. Los experimentos de RMN- ^1H , RMN- ^{31}P y microscopía electrónica de transmisión (TEM) fueron realizados en los Servicios Generales de Investigación (SGIker) de la Universidad del País Vasco, UPV/EHU.

2.2.1 Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR)

El espectro infrarrojo se obtuvo en un espectrofotómetro *Shimadzu FT-IR 8400S*, empleando el software *IR Solutions* para el tratamiento de datos. Las medidas se realizaron con una resolución 4 cm^{-1} en el rango comprendido entre 400 y 4000 cm^{-1} . La muestras se prepararon en forma de pastillas de KBr en una prensa *Specac*. La intensidad de las señales se ha descrito como débil (d), moderada (m), fuerte (f) y muy fuerte (F).

2.2.2 Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-VIS)

El seguimiento y cuantificación de los proceso de carga y liberación se llevó a mediante espectroscopía UV-VIS. Todas las determinaciones se registraron en un equipo *Cintra 303 GBC* de doble haz utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm de espesor. El rango espectral de trabajo fue de $200\text{-}700\text{ nm}$. A través de la relación de *Lambert-Beer* se determinó la variación de la concentración de POM en las muestras haciendo uso de la siguiente calibración: $Abs=0.0092C(\mu\text{M})-0.0406$.

2.2.3 Dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial Zeta

Los estudios de pH sensibilidad para los nanogeles de quitosano se realizaron mediante Dispersión Dinámica de Luz (Dynamic Light Scattering, DLS). Simultáneamente se midió el potencial Z (ζ) para determinar la distribución de la carga superficial en la interfase sólido/agua. Así mismo, se midieron por ambas técnicas, muestras de nanogeles de quitosano cargadas con POM para determinar cómo varían el tamaño de partícula a distintos pH y la carga superficial en presencia de POM.

Sendas medidas, se llevaron a cabo a temperatura ambiente en un equipo *Zetasizer Nano Z (Malvern Instruments Ltd.)* con una cubeta especializada *Malvern Instruments (DTS1070)* de 1 cm de espesor.

En cuanto a la preparación de las muestras, los nanogeles de quitosano se dispersaron con una concentración de 0,5 mg/ml en una disolución acuosa de AcOH (1%). Antes de llevar a cabo la medida se realizó una dilución (1:10). Para el estudio de pH sensibilidad y las medidas del potencial Zeta, el pH de distintas alícuotas de la muestra fue modificado con una disolución de NaOH 0,1 M. El mismo procedimiento se llevó a cabo para los nanogeles de quitosano cargados con POM a partir de geles cargados previamente lavados tal y como se explica en el siguiente *apartado 2.3*.

2.2.4 Resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{31}P

Se llevo a cabo un espectro RMN- ^1H del quitosano purificado y otro de quitosano entrecruzado lo que nos permitirá calcular el grado de desacetilación (GD) y el grado de entrecruzamiento (GE). Se realizó un espectro RMN- ^{31}P para comprobar la presencia del polianión en los nanogeles cargados así como la existencia de otras especies producto de la degradación hidrolítica.

En cuanto a la preparación de las muestras, los geles se dispersaron con una concentración de 5 mg/ml en una disolución acuosa de ácido acético al 1% en volumen, siendo ambos disolventes deuterados. Los desplazamientos químicos (δ) fueron medidos en ppm en relación al agua deuterada (D_2O) ($\delta = 4,8$ ppm) para el RMN- ^1H y respecto al ácido ortofosfórico (H_3PO_4) ($\delta = 0$ ppm) para el RMN- ^{31}P .

2.2.5 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La caracterización morfológica a través de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM, de sus siglas en inglés, *Transmission Electron Microscopy*) nos permite a través de las micrografías obtenidas, confirmar la geometría y dispersión de los nanogeles sintetizados de forma cualitativa. El microscopio electrónico utilizado es un equipo *Philips CM120 Biofilter*, perteneciente al Servicio de Microscopía Analítica y de Alta Resolución en Biomedicina de los Servicios Generales de Investigación de la UPV/EHU.

Para la preparación de las muestras, los nanogeles sintetizados se dispersaron con una concentración de 1 mg/ml en una disolución acuosa de AcOH (1%) en volumen y se mantuvieron en agitación magnética constante durante una semana. La preparación de los nanogeles cargados y limpios es análoga a los nanogeles de quitosano.

Transcurrido el tiempo de agitación, la muestra preparada se dispersó en un baño de ultrasonidos, se depositó una gota de la dispersión en una rejilla de fibra de carbono y se secó mediante una descarga luminiscente.

2.3 PROCESO DE CARGA Y LIBERACIÓN DEL POM

2.3.1 Proceso de carga de nanogeles de quitosano con POM

Para realizar la carga del polianión Wells-Dawson en los geles de quitosano, primeramente se preparó una disolución de 50 mL de polianión de concentración 0,741 mM. A partir de esta, se prepararon 3 réplicas de 25 mL de concentración 63.75 μ M. Para cada una de estas réplicas, se ajustó el pH=3-4 para facilitar la disolución del quitosano, con una disolución de AcOH (1%).

Se registraron los espectros UV-VIS y se determinó que la longitud de óptima de medida era 310nm. Posteriormente, se midieron las absorbancias de cada una de las disoluciones para determinar la concentración de POM libre en disolución.

A partir de 10 mL de cada réplica, 5 mg de quitosano fueron dispersados con ayuda de un vórtex y se dejaron con agitación magnética durante 48 h. Pasado este tiempo los nanogeles fueron centrifugados (10500 rpm, 15 °C, 15 min.). Finalmente, se midió la

absorbancia de los sobrenadantes y los nanogeles se dejan colapsados para llevar a cabo la etapa de limpieza.

2.3.2 Proceso de purificación de los nanogeles y de liberación del POM

Una vez llevado a cabo el proceso de carga, a los nanogeles colapsados y cargados se someten a un proceso de limpieza a pH básico para eliminar la posible carga superficial. Para ello se le añade a cada réplica 10 mL de una disolución tampón 0,2 M de fosfatos ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$) de pH= 7,4 y se agita de manera consistente con ayuda de un vórtex, provocando así el potencial deshinchamiento de los geles. Se midió la absorbancia de los sobrenadantes para determinar la carga superficial respecto a la carga total de POM en los nanogeles. Antes de proceder a la etapa de liberación, se comprobó que a pH 7,4 no tenía lugar liberación del POM. Para ello, se dejaron las muestras durante 48h agitando con el tampón de fosfatos. Finalizado ese tiempo los nanogeles fueron centrifugados (10500 rpm, 15°C, 15min.) y los sobrenadantes fueron medidos por UV-VIS. Los nanogeles se lavan ligeramente con agua y se colapsan nuevamente. De este modo los nanogeles ya están listos para someterse a la liberación.

Dado que liberación se va a realizar provocando el hinchamiento de los nanogeles en medio ácido, estos se redispersaron en una disolución tampón (0,2M) de (AcOH/NaOH) a pH 5. Tras 48 h de agitación constante, estos fueron centrifugados (10500 rpm, 15 °C, 15min.) para medir la absorbancia del sobrenadante y así determinar la concentración de POM liberada. Se adicionan sobrenadantes nuevos y se repite todo el proceso. Se monitorizó la cinética de liberación por UV-VIS hasta que no se observaron más cambios en la concentración del sobrenadante, al cabo de 10días.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 CARACTERIZACIÓN DEL POM $K_6[P_2Mo_{18}O_{62}] \cdot 12 H_2O$

3.1.1 Estudio vibracional del $K_6[P_2Mo_{18}O_{62}] \cdot 12 H_2O$

El compuesto $K_6[P_2Mo_{18}O_{62}] \cdot 12H_2O$ fue analizado por espectroscopía FT-IR. El espectro de infrarrojo del POM se ilustra en la Figura 13.

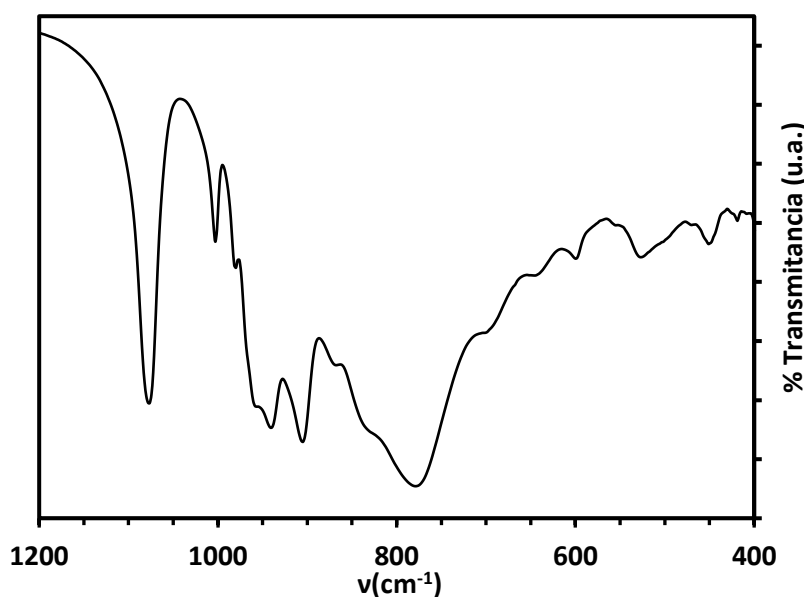


Figura 13.- Espectroscopia FTIR del $K_6[P_2Mo_{12}O_{62}] \cdot 12H_2O$

Las bandas fundamentales de los sistemas POM se encuentran en el rango espectral de por debajo de 1200 cm^{-1} .

A 1076 y 1006 cm^{-1} se registran las bandas de tensión asimétrica de la unidad tetraédrica PO_4 siendo estas las vibraciones $\nu_{as} (Mo=O_t)$ y $\nu_{as} (P-O)$ respectivamente. Debido a su carácter formal de doble enlace, las bandas de $Mo=O_t$ se observan a mayores valores de frecuencia que las correspondientes a los enlaces P-O.

Las bandas fundamentales correspondientes al esqueleto del Wells-Dawson se registran a 941 , 905 y 779 cm^{-1} , y provienen de las vibraciones de tensión asimétrica de los enlaces $Mo=O_t$ de oxígenos terminales y de los enlaces intermoleculares Mo-O-Mo resultantes de la compartición de vértices y aristas, respectivamente, siendo cada banda $\nu_{as} (P-O) + \nu_{as} (Mo=O_t)$, $\nu_{as} (Mo-O_v-Mo)$, $\nu_{as} (Mo-O_{ar}-Mo)$. Las bandas

registradas a 527 y 450 cm^{-1} corresponden a la vibración del enlace Mo-O de un oxígeno central siendo ambas originadas por el modo vibracional $\nu_{\text{as}}(\text{Mo-O}_c)$.³⁸⁻³⁹

3.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS NANOGELES DE QUITOSANO

3.2.1 Resonancia magnética nuclear de ^1H (RMN- ^1H).

Se comprobó la reacción de entrecruzamiento del quitosano llevada a cabo y se determinó cuantitativamente el grado de entrecruzamiento de los nanogeles de quitosano sintetizados mediante el análisis de la proporción de grupos $-\text{NH}_2$ comparativamente con el quitosano de partida. Este método es ampliamente utilizado para la determinación del grado de desacetilación de cualquier quitosano.

De entre todas las técnicas existentes para determinar el grado de desacetilación, el método utilizado ha sido la espectroscopía RMN- ^1H , que es la técnica referenciada como método estándar por la *American Estándard Test Method*.⁴⁰

En la Figura 14 se registra el espectro de RMN- ^1H del quitosano empleado.

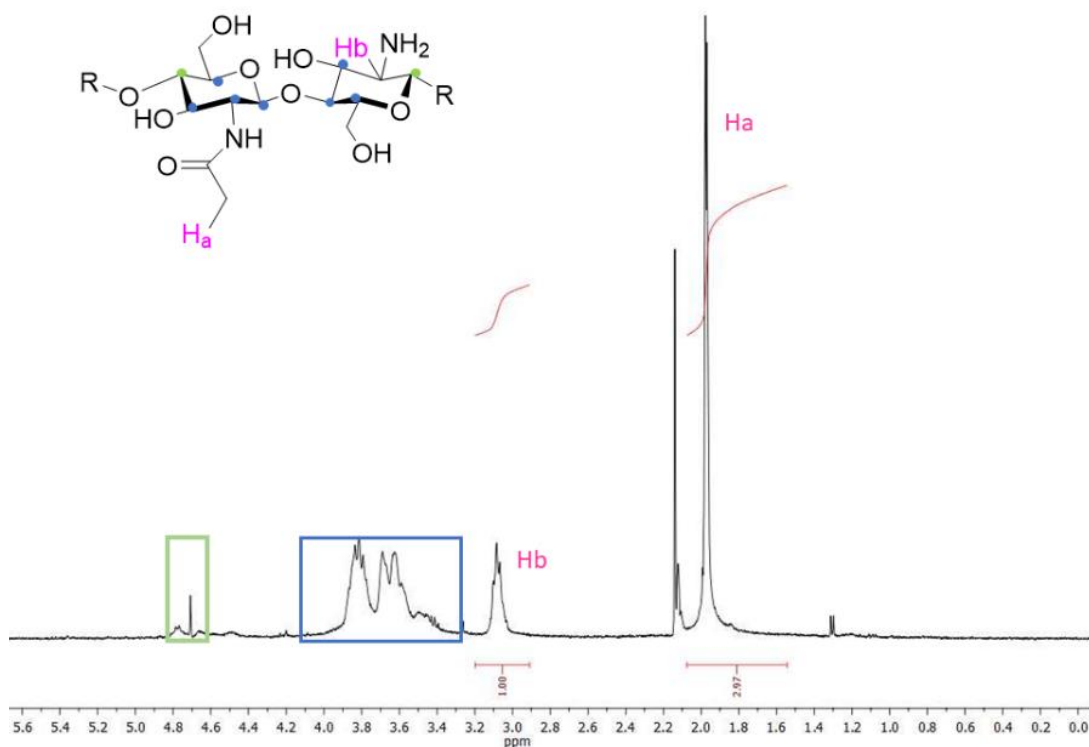


Figura 14.- Experimento de RMN- ^1H de quitosano de bajo peso molecular

RMN- ^1H (D_2O / 2% D_3CCOOD , 500 MHz, 20 °C): δ (ppm) = 4,80-4,70 (1-H de GlcN), (1-H de GlcNAc), 3,26-3,83 (3-H, 4-H, 5-H, 6-H, 2-H de GlcNAc), 3,08 (2-**H_b** de GlcN), 1,98 (2-**H_a** de N-COCH₃).

A continuación, se comentan las señales obtenidas:

Primeramente a 2,15 ppm se observa una señal perteneciente al ácido acético deuterado utilizado. En torno a (4,70-4,80) ppm aparece una señal que corresponde a los protones anoméricos tanto de las unidades GlcN como GlcNAc (color verde). Entre 3,30 y 3,40 ppm aparecen una serie de señales correspondientes a los protones de los enlaces glucosídicos (color azul). A 3,08 ppm aparece la señal que pertenece a los protones denominados H_b de las unidades GlcN y, por último, a 1,98 ppm se encuentran los protones metílicos del grupo acetamido denominados Ha.

El cálculo del grado de desacetilación del quitosano (GD), se ha llevado a cabo calculando como varía la intensidad relativa de la señal correspondiente protones metílicos del grupo acetamido (Ha 1,98 ppm) respecto la intensidad de las integrales de los protones de la fracción de D-glucosamina (H_b 3,08 ppm), tal y como se muestra en la Ecuación 3:

$$(\%)GD = \left(1 - \frac{\frac{1}{3}I_{Ha}}{\frac{1}{3}I_{Ha} + I_{Hb}} \right) \quad (3)$$

El grado de desacetilación determinado para el quitosano utilizado en la síntesis de los nanogeles fue del 50%.

En la Figura 15 se registra el experimento de RMN-¹H de los nanogeles sintetizados.

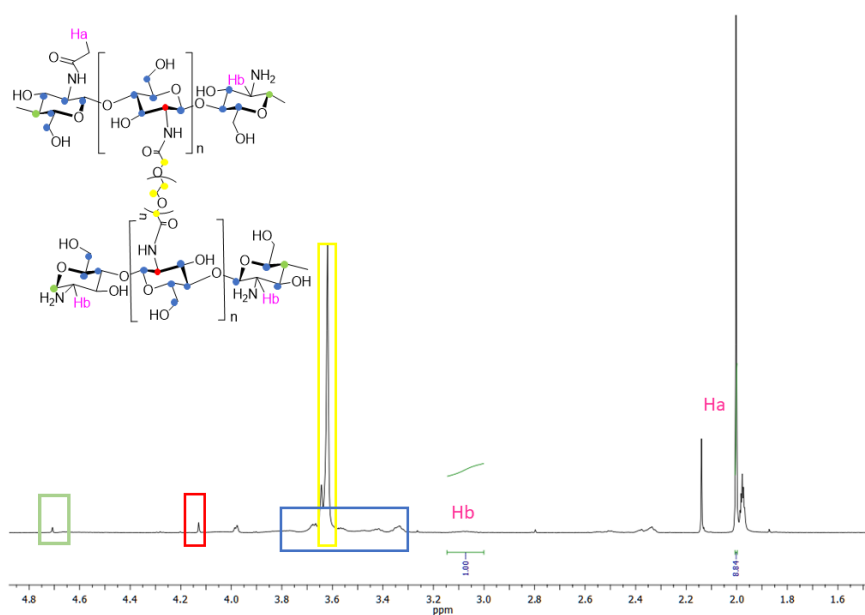


Figura 15.- Experimento de RMN-¹H de los nanogeles de quitosano entrecruzados con PEGBCOOH.

¹H-RMN(D₂O/ 1% D₃CCOOD, 500 MHz, 20 °C): δ (ppm) = 4,77 (1-H de GlcN, 3,99 (2-H de GlcN entrecruzado), 3,26– 3,77 (3-H, 4-H, 5-H, 6-H, 2-H de GlcNAc), 3,62 (-CH₂ de PEGBCOOH), 3,08 (**H_b** de GlcN), 1,99 (**H_a** de H₂NCOCH₃).

Comparando ambos espectros se observa que a 3,62 ppm se aparece una nueva señal correspondiente a los grupos (-CH₂) del PEGBCOOH. Se observa como a 3,04 ppm aparece una disminución de la señal que pertenece a los protones H_b de las unidades GlcN sin reaccionar.

La reacción de entrecruzamiento modifica el quitosano a través de sus grupos amina, es decir, varía el porcentaje de grupos amina libres a lo que denominamos grado de modificación (GM). El valor del GM se puede estimar de igual manera que para el grado de desacetilación teniendo en cuenta la nueva relación de señales del espectro de los nanogeles.

Suponiendo que cada molécula de PEGBCOOH reacciona por los dos extremos de cadena con las unidades GlcN, se calculará el grado de entrecruzamiento de acuerdo con la ecuación 4 y haciendo el cálculo respecto a los grupos desacetilados iniciales:

$$(\%)GE = \frac{GD(\%) - GM(\%)}{2} \quad (4)$$

El grado de entrecruzamiento (GE) determinado para los nanogeles entrecruzados sintetizados de acuerdo con la Ecuación 4 es del 25%.

Queda corroborado por tanto la introducción del PEG en la estructura, que además de entrecruzar al polímero, juega un papel muy importante ya que es lo que hace que los nanogeles de quitosano entrecruzados sean solubles incluso a pH fisiológico 7,4. Este hecho posibilita la aplicabilidad de estos sistemas en las condiciones fisiológicas.

3.2.2 Microscopía de transmisión electrónica.

Para finalizar, se llevó a cabo una medida de microscopía electrónica de transmisión (TEM) para analizar la morfología de las nanopartículas sintetizadas. En la Figura 16 se muestra la micrografía de los nanogeles.

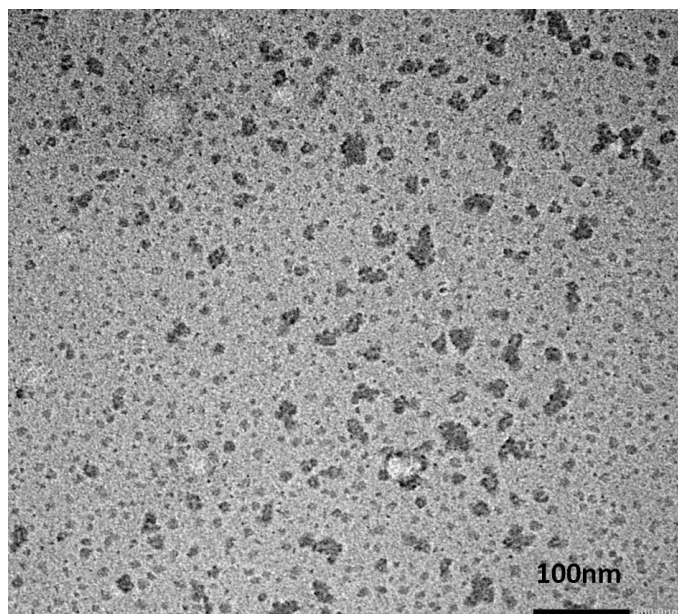


Figura 16.- Micrografía de nanopartículas de quitosano/PEG

Se observa que las nanopartículas tienen una geometría esférica. Debido a que la medida se realizó a pH neutro, se pueden observar algunos pequeños agregados a lo largo de la micrografía. Los nanogeles sintetizados mantienen una distribución coloidal lo que pone en manifiesto que el método de la microemulsión inversa es idóneo para restringir el tamaño de partícula a escala nanométrica.

3.3 CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA QUITOSANO/POM

De acuerdo con las condiciones experimentales fijadas, se procedió a la incorporación de los nanogeles en el quitosano. La carga del anión $[P_2Mo_{18}O_{62}]^{6-}$ se confirmó mediante RMN- ^{31}P , microscopía electrónica de transmisión.

3.3.1 Resonancia magnética nuclear de ^{31}P (RMN- ^{31}P).

Aprovechando la presencia de fósforo en la estructura del polianión, un experimento de RMN- ^{31}P permitirá determinar la carga del POM en el quitosano. Del mismo modo, nos permitirá dilucidar la posible existencia de otras especies derivadas de la degradación hidrolítica parcial del polianión tipo Wells-Dawson.

A continuación, se ilustran los experimentos de RMN- ^{31}P para una disolución acuosa de POM 0,741mM a pH= 5 (Figura 17) y una muestra de nanogeles cargados con POM

de la misma concentración y mismo pH (Figura 18). La posición de las señales se ha determinado empleando como referencia el ácido ortofosfórico ($\delta = 0$ ppm).

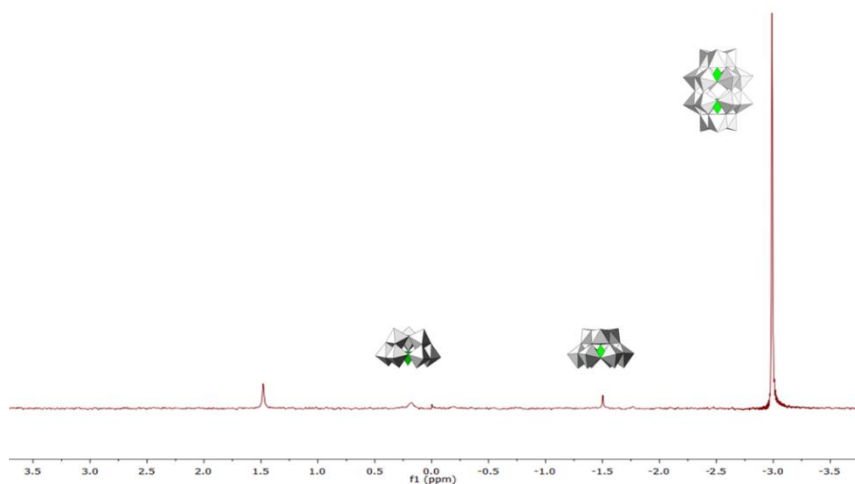


Figura 17.- Experimento RMN- ^{31}P de una disolución de 0,741mM de POM

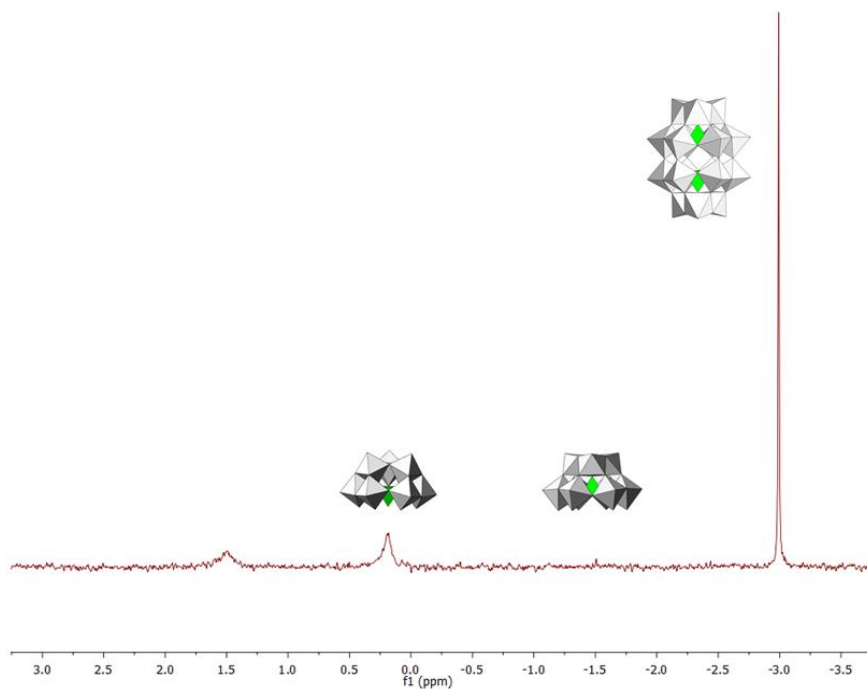


Figura 18.- Experimento RMN- ^{31}P de una muestra de nanogeles de quitosano cargados con POM.

Ambos espectros muestran una señal principal que aparece como un singlete de alta intensidad a -3.0 ppm y que corresponde al polianión $[\text{P}_2\text{Mo}_{18}\text{O}_{62}]^{6-}$ de acuerdo con la bibliografía.^{35,41} Este hecho corrobora que el proceso carga ha tenido lugar y que el anión tipo Wells-Dawson está mayoritariamente presente en los nanogeles cargados.

Sin embargo, se observa la presencia de tres señales adicionales de muy baja intensidad a -1,50, -0,18 y 1,50 ppm (la de -1.5 ppm apenas es apreciable en el espectro de los nanogeles cargados) que podrían proceder de la hidrólisis parcial del clúster en las condiciones en la que se realiza la medida. Apoyando esta teoría, estudios previos encontrados en las mismas fuentes bibliográficas asignan señales a desplazamientos químicos aproximados de -1,5 y -0,2 ppm a especies trilacunarias tipo Keggin y más específicamente a las especies $[A-PMO_9O_{33}]^{7-}$ y $[B-PMO_9O_{33}]^{7-}$, respectivamente

La única señal que no se ha podido identificar con seguridad es la correspondiente a 1,5 ppm. *Sannigrahi P.*⁴² explica que en un rango de (1-5) ppm se pueden encontrar señales de distintas sales de ortofosfato lo cual conduce a pensar que las muestras pueden contener trazas del tampón $KH_2PO_3/NaOH$ utilizado en la etapa de limpieza o incluso alguna contaminación cruzada derivada del ácido ortofosfórico usado como referencia para la medida o en el utilizado para la síntesis del POM.

A modo de resumen, la asignación de las señales presentes en los espectros de acuerdo con la bibliografía anteriormente citada es la siguiente:

³¹P-RMN (D₂O/ 1% D₃CCOOD, 500 MHz, 20 °C): δ (ppm) = -3,00 (P₂Mo₁₈), -1,50 (A-PMO₉), 0.18 (B-PMO₉).

3.3.2 Microscopía de transmisión electrónica(TEM)

A través de la técnica de TEM, se permite visualizar la carga del POM en los nanogeles de quitosano. En la siguiente figura se ilustran las micrografías de una disolución acuosa del POM (Figura 19.a) y de una muestra de quitosano cargado con POM (Figura 19.b).

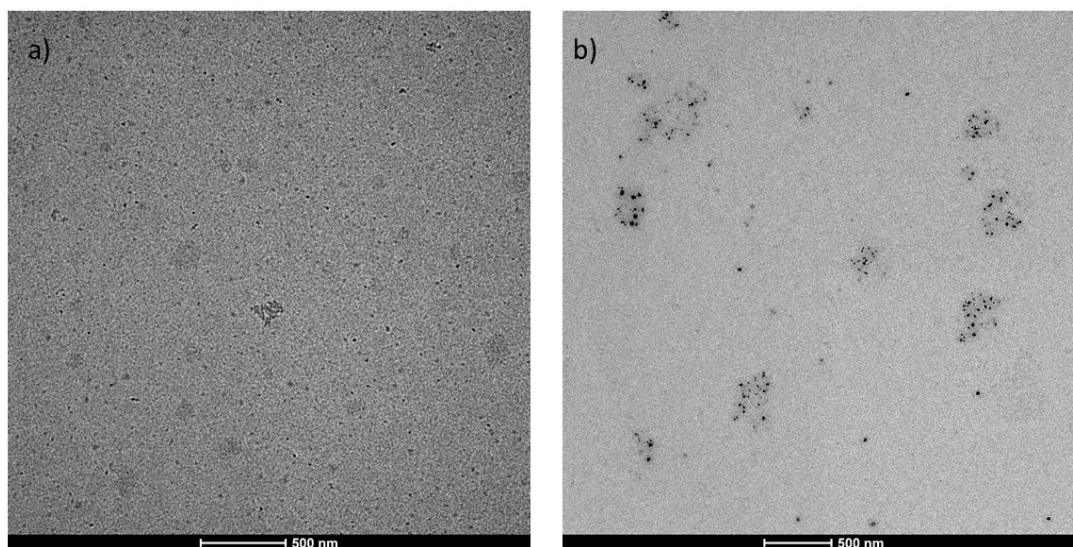


Figura 19.- Micrografías de (a) muestra en disolución acuosa de POM y (b) muestra de quitosano cargada con POM a pH=7.4.

Visualizando las micrografías, en la Figura 19.a el POM se observa en forma de pequeños puntos negros. Visualizando la Figura 19.b se confirma la presencia del POM dentro de los nanogeles de quitosano corroborándose una vez más la incorporación del POM al nanogel. Debido a que los POMs presentan una mayor densidad electrónica, se establece una gran diferencia de contraste con los nanogeles de quitosano los cuales se aprecian con un ligero sombreado grisáceo.

3.3.3 Estudio de la pH sensibilidad

Finalmente, se analizará el efecto de la variación del tamaño de partícula y la variación del potencial zeta con el pH en los nanogeles de quitosano como consecuencia de la incorporación de POM a los nanogeles.

Los parámetros mencionados están ampliamente estudiados para los sistemas de nanogeles de quitosano.¹⁵ Ahora bien, la medida de estos parámetros para muestras de quitosano/POM permitirá determinar la influencia del polianión respecto al quitosano.

En la Figura 20 se ilustra la variación del tamaño de partícula frente al pH para nanogeles de quitosano y quitosano/POM.

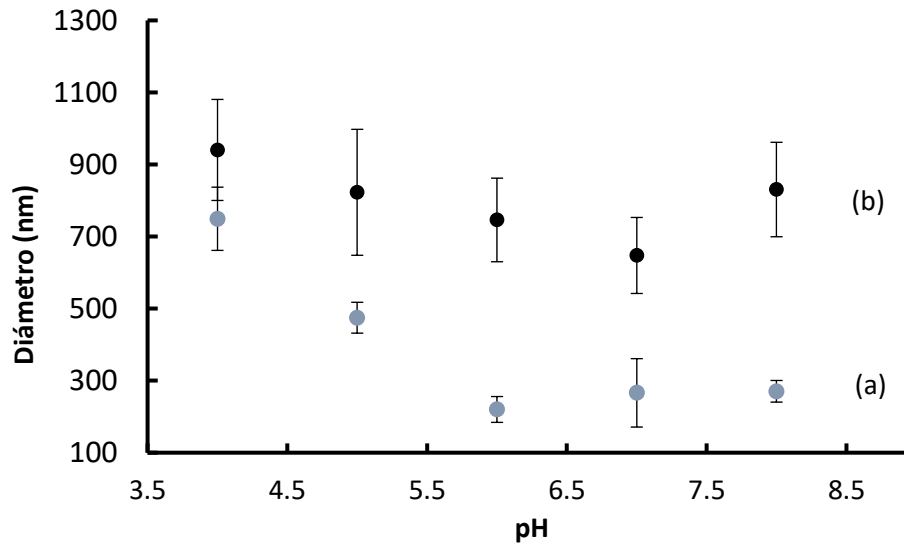


Figura 20.- Variación del tamaño de partícula para (a) nanogeles de quitosano y (b) nanogeles de quitosano/POM.

Atendiendo a los resultados obtenidos en la Figura 20.a, se comprueba el comportamiento sensible al pH de los nanogeles de quitosano. Se observa como a valores bajos de pH, aumenta secuencialmente el tamaño de partícula resultado del hinchamiento de las nanopartículas por las repulsiones electrostáticas entre las cadenas, derivadas de la ionización de los grupos amina primarios del nanogel. A valores de pH elevados se neutralizan dichos grupos produciéndose el deshinchamiento y por lo tanto la disminución del tamaño de partícula.

Como excepción a esta tendencia, se aprecia un ligero aumento en los valores 8 y 9 de pH. Para alcanzar estos valores de pH, la cantidad añadida de disolución de ajuste de pH (NaOH 0,2 M) es significativa. La adición de sales inorgánicas tiene gran efecto sobre la estabilidad de los coloides liófilos a concentraciones muy elevadas. Esto produce el efecto “salting out” o precipitación salina. El aumento de la fuerza iónica del medio produce la precipitación de los nanogeles por un aumento de las interacciones hidrofóbicas, aumentando el tamaño de partícula.⁴³

En lo que respecta a las nanopartículas de quitosano cargadas con polianión, exhiben un comportamiento ligeramente similar frente al pH aunque no tan denotado. Como se observa en la Figura 20.b se aprecia un aumento significativo del tamaño de partícula, el cual se mantiene casi constante entre (600-900) nm en todo el rango de pH.

Bajo la suposición de que el polianión neutraliza la ionización del quitosano a valores de pH ácidos, afirmaremos que este sistema no presenta una pH sensibilidad acentuada.

Para explicar el aumento de tamaño respecto a los nanogeles de quitosano nos apoyaremos en la teoría DLVO. Esta se basa en un compromiso entre las fuerzas de repulsión electrostática y de atracción de tipo Van der Waals.⁴⁴ Partiendo de la premisa de que los nanogeles están neutralizados, estos formarán agregados debido a que predominan las fuerzas de Van der Waals frente a las fuerzas repulsivas.

Para complementar estas suposiciones, se exponen los resultados de potencial zeta de ambos sistemas. En la Figura 21 se registra la variación del potencial Zeta con el pH para (a) el quitosano y el (b) quitosano/POM.

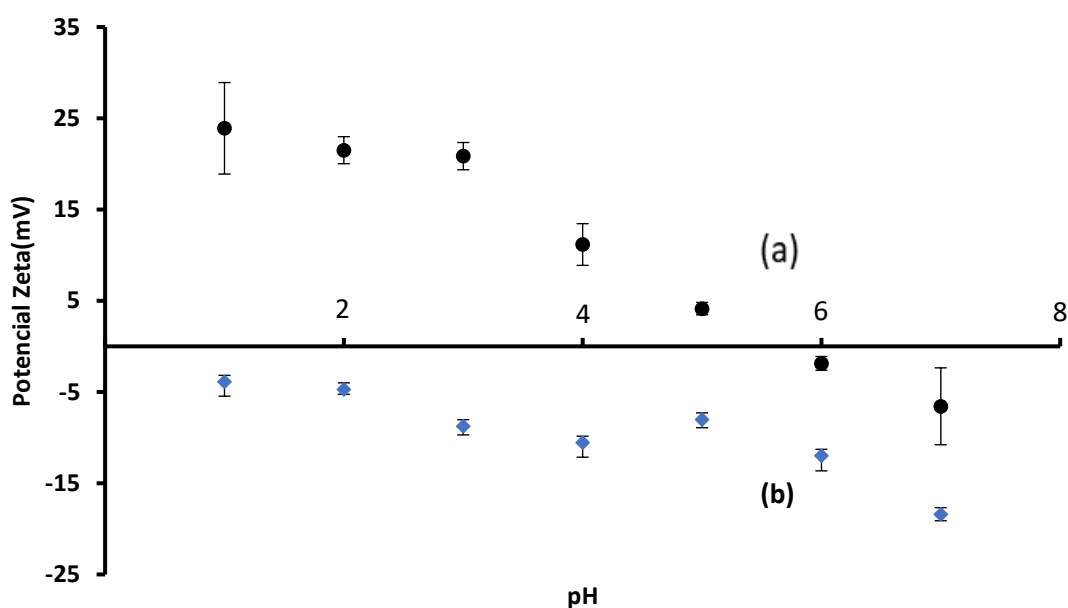


Figura 21.- Potencial Zeta para distintos valores de pH del (a) quitosano y del (b) quitosano/POM

El comportamiento del quitosano es el esperado, observándose valores de potencial muy positivos a pH ácido. Conforme disminuye el pH, la red se deshincha por la neutralización de los grupos amino llegándose a registrar valores de potencial negativos a pH = 7,0.

Visualizando la figura anterior se observa que en todo el rango del pH, el quitosano/POM registra valores negativos de potencial zeta, indicando una

neutralización de la carga superficial positiva de los nanogeles de quitosano y la incorporación de los polianiones. En vista de este cambio tan drástico del potencial Zeta se puede nuevamente afirmar que la incorporación del POM al nanogel se ha producido con éxito.

3.4 CUANTIFICACIÓN DEL PROCESO DE CARGA Y LIBERACIÓN

Tras la caracterización, se cuantificó el proceso de carga de 5 muestras de quitosano/POM. A través de la aplicación de las Ecuaciones 1 y 2, en la Tabla 1 se recogen los resultados de la carga de POM en términos de eficiencia de carga (EC) y capacidad de carga (CC). Del mismo modo, se muestra el valor de carga superficial(%) y la carga efectiva de POM respecto a la carga total de los nanogeles. Finalmente, se ilustran los resultados de un ensayo de liberación de dos días a pH=7,4 y pH=5.

Tabla 1. - *Resultados de la carga, purificación y ensayos de liberación.*

CARGA TOTAL(%)		PURIFICACIÓN(%)	CARGA EFECTIVA(%)		LIBERACIÓN (%) (2días)	
EC	CC	CARGA SUPERFICIAL	EC	CC	pH=7,4	pH=5,0
71,8±7,3	20,8±3,7	7,3±2,5	66,5±6,0	19,3±7,3	0	11,0±1,7

Dado que la carga superficial se retira con la etapa de purificación, la porción de la carga que se puede liberar se ha denominado carga efectiva. Como se observa en la Tabla 1, los valores de carga efectiva en función del EC y CC han sido bastante satisfactorios obteniéndose unos valores de 66.5 y 19,3 % respectivamente. Se aprecia que la carga superficial es relativamente alta, es decir, se elimina un 7,3% de la carga total de los nanogeles en la etapa de limpieza. En los nanogeles, la relación superficie/volumen es bastante elevada por lo que la carga superficial puede llegar a ser considerable.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las dos etapas de liberación simuladas a distintos valores de pH durante 2 días, se observa que la liberación a pH=7,4 no sucede. Esto es debido a que los nanogeles se encuentran en estado deshinchado impidiendo la salida del POM a ese valor de pH. La liberación a pH ácido ha demostrado lo

contrario. Es por ello que se llevó a cabo el estudio de la cinética de liberación a pH=5,0.

Tras la carga y la purificación, se llevó a cabo la cinética de la liberación de los nanogeles cargados como valor medio de 5 muestras durante 10 días tal y como se ilustra en la Figura 22.

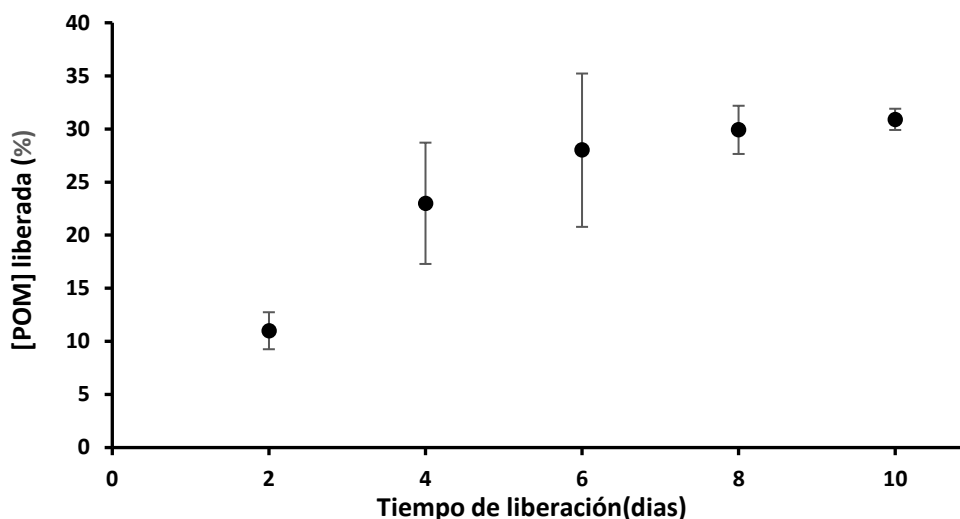


Figura 22.- Cinética de liberación para 5 muestras de nanogeles de quitosano cargados con POM a pH=5,0.

Como resultado de la liberación del POM cargado en nanogeles de quitosano, se obtiene una liberación media del $(30 \pm 8)\%$ para las 5 muestras monitorizadas.

Narayan Bhattarai y colaboradores,⁴⁵ en sus estudios de carga y liberación de nanogeles de quitosano/PEG con BSA; *bis(trimetilsilil)acetamida*, consigue liberaciones entre 80-90% en 70 horas. Teniendo en cuenta nuestros resultados, parece coherente que las interacciones electrostáticas del quitosano ionizado con el polianión sean considerables y que la liberación de porcentajes más bajos.

4. CONCLUSIONES

Se ha llevado de manera exitosa la síntesis de nanogeles de quitosano entrecruzados con PEGBCOOH a través del método de la microemulsión inversa así como la síntesis del polioxometalato Wells-Dawson.

A través de distintas técnicas se observa que la carga del compuesto es cuantitativa. El proceso de liberación no da valores tan elevados. Tal y como se ha comprobado, el hinchamiento de los nanogeles a valores de pH ácido está disminuido al estar apantalladas las repulsiones electrostáticas entre las cadenas de quitosano por el POM. El estudio del potencial Zeta confirma que la carga de los grupos amina ionizados esta neutralizada por la de los polianiones dando valores de potenciales negativos en todo el rango del pH.

A pesar de que los valores de liberación han sido menores que los de carga, ha de tenerse en cuenta que la función del quitosano es el transporte del polianión por el torrente sanguíneo (pH fisiológico de 7,4 donde no libera nada) hasta las células de interés (pH cercano a 5,0 donde se libera un 30% aproximadamente). Una vez que hayan penetrado, los nanogeles serán digeridos por los orgánulos encargados del proceso de digestión en las células cancerosas, liberando en su totalidad el polianión cargado.¹²

Finalmente, cabe mencionar que la participación en este proyecto orientado a la investigación ha permitido la puesta en práctica de los conocimientos, habilidades y destrezas adquiridas durante los estudios del grado. Así mismo, se han desarrollado competencias tales como el trabajo multidisciplinar en grupo y la toma activa de decisiones en los problemas surgidos a lo largo del proyecto.

5. TRABAJO FUTURO

Dada la versatilidad estructural del quitosano, una opción a valorar sería estudiar la funcionalización orgánica del polímero para aumentar su afinidad con el sitio receptor celular aumentando su biocompatibilidad así como su resistencia al medio.

Teniendo en cuenta que el mecanismo de incorporación de los POMs al interior de la célula no ha sido definitivamente establecido, la propuesta de POMs con propiedades luminiscentes se vuelve atractiva. Una de las estructuras más representativas en este

campo de estudio es el polianión luminiscente, $\text{Na}_9[\text{EuW}_{10}\text{O}_{36}] \cdot 32 \text{H}_2\text{O}$.⁴⁶ Así, medidas por fluorescencia supondrían una forma muy selectiva de cuantificar la carga y la liberación del POM. En este ámbito, también se proponen ensayos con microscopía confocal para apoyar con imágenes dichos estudios. Trabajos preliminares han confirmado la carga eficiente del citado polianión en los nanogeles, por lo que queda pendiente el estudio por fluorescencia.

6. AGRADECIMIENTOS

Primeramente me gustaría dar las gracias a los dos directores de este proyecto, los Dres. Beñat Artetxe y Leyre Perez por su entera disposición, su paciencia y el apoyo mostrado hacia mi persona. También me gustaría hacer mención al resto del personal del Departamento de Química Inorgánica y de Química Física de la UPV/EHU por su ayuda y por su entera compañía.

Además, agradecer también el apoyo técnico y humano de los Servicios Generales de Investigación de la UPV/EHU (SGIker) en la realización de algunas de las medidas mostradas en este trabajo.

Finalmente quiero hacer una mención especial a mi madre y a mi padre por haber dedicado su vida entera para permitirme hacer lo que ellos nunca pudieron.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Huebsch, N.; Mooney, D. *Nature*, **2009**, *462*, 426-432.
2. Ratner, B. D.; Bryant, S. J. *Biom. Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2004**, *6*, 41–75.
3. Peppas, N. A.; Bures, P.; Leobandung, W.; Ichikawa, H. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50*, 27–46.
4. Van-Vlierberghe, S.; Dubruel, P.; Schacht, E. *Biomacromolecules*, **2011**, *12*, 1387–1408.
5. Caló, E.; Khutoryanskiy, V.V. *Eur. Polym. J.* **2015**, *65*, 252–267.
6. Kuen-Young, L.; Rowley, J.A.; Eiselt, P.; Moy, E.M.; Bouhadir, K.H.; Mooney, D.J. *Macromolecules*, **2000**, *33*, 4291-4294.
7. Singla, A.K.; Chawla, M. *J. Pharm. Pharmacol.* **2001**, *53*, 1047-1067.
8. Dodane, V.; Vilivalam, V.D. *Pharm. Sci. Technol. Today*, **1998**, *1*, 246–253.
9. Hirano, S.; Seino, H.; Akiyama, Y.; Nonaka, I. *Biotechnol. Annu. Rev.* **1996**, *2*, 237-258.
10. Suh, J.K.F.; Matthew, H.W.T., *Biomaterials*, **2000**, *21*, 2589–2598.
11. Tsigos, I.; Bouriotis, V. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 26286-26291.
12. Bhattarai, N.; Gunn, J.; Zhang, M. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2010**, *62*, 83–99.
13. Berscht, P.C.; Nies, B., Liebendorfer, A.; Kreuter, J.; *Biomaterials* **1994**, *15*, 593–600.
14. Sorlier, P.; Denuzière, A., Viton, C.; Domard, A. *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 765–772.
15. Pérez-Álvarez, L.; Laza, J.M.; Álvarez-Bautista, A. *Curr. Pharm. Des.* **2016**, *22*, 3380-3398.
16. Sanson, N.; Rieger, J. S.; *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 965-977.
17. Leong, J.S.; Candau, F. *J. Phys. Chem.*, **1982**, *86*, 2269–2271
18. Mincheva, R.; Manolova, N.; Sabov, R.; Kjurkchiev, G.; Rashkov, I. *e-Polym.* **2004**, *4*, 643- 653.
19. Chen, S.H.; Tsao, C.T.; Chang, C.H. *Macromol. Mater. Eng.* **2013**, *298*, 429-438.
20. Ferlay, Y. Steliarova-Foucher, J. E.; Lortet-Tieulent, J. *Eur.J. Cancer* **2013**, *49*, 1374-1403.

21. Ali, S.; Commbers, R. *Nat. Rev. Cancer*. **2002**, *2*, 101-112.
22. Khan, A.B.; D'Souza, B.J.; Wharam, M.D.; Sinks, L.F.; Woo, S.Y. McCullough, D.C.; Leventhal, B.G. *Cancer Treat. Rep.* **1982**, *66*, 2013-2020.
23. Iqbal, J.; Shah, H. S.; Joshi, S. A.; Haider, A.; Kortz, U.; Ur-Rehman, N.; *RSC Adv.* **2015**, *5*, 93234-93242.
24. Pope, M. T.; Muller, A. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 34- 48.
25. Pope, M.T. *Heteropoly and Isopoly Oxometalates*, Springer-Verlag: Berlin, 1983.
26. Long, D.;Tsunashima, R.; Cronin, L. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 1736-1758.
27. Oms, O.; Dolbecq, A.; Mialane, P. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 7497
28. Zheng, S.T.; Yang, G. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 7623-7673
29. Coronado, E.; Galán-Mascarós, J.R.; Gimenez-Sainz, C.; Gomez-García, J. Smaíl, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4671–4681
30. Cowan, J.J.; Bailey, A.J.; Heintz, R.A.; Do, B.T.; Hardcastle, K.I.; Hill, C.L.; Weinstock, I.A. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 6666;
31. Narasimhan, K.; Pillay, S.; Rizal, N.; Ahmad, B.; Bikadi, Z.; Hazai, E.; Yan, L.; Kolatkar, P.R.; Pervushin, K.; Jauch, R. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 573–581.
32. Clares Naveros, B. *Sistemas de transporte y liberación de fármacos de aplicación tópica: liposomas multilaminares portadores de acetono de triamcinolona*, Universidad de Granada, 2003.
33. Cui-Yun, Y.; Na-Mei, L.; Yang, S.; Ning, Q.; Can, H.; Wen, H.; Zi-Ning, H. Dong-Xiu, H.; Xiang-Wen, T.; Li-Chun, S. *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, *40*, 132.
34. Agnihotri, S.A.; Mallikarjuna, N.N.; Aminabhavi, T.M. *J. Controlled Release* **2004**; *100*, 5-28.
35. Briand, L.E.; Graciela, M.; Horacio, T. *J. Mater. Chem.*, **2002**, *12*, 299-304.
36. Pujana, M. A.; Pérez-Álvarez, L.; Cesteros-Iturbe, L.C.; Katime, I. *Polymer* **2012**, *53*, 3107–3116.
37. Signini, R.; Campana-Filho, S. P. *Polym. Bull.*, **1999**, *42*, 159–166.
38. Rocchiccioli-Deltcheff, C.; Thouvenot, R. *Spectrosc. Lett.*, **1979**, *12*, 127-138.

39. Bridgeman, A.J.; *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 2935 – 2941.
40. American Standard Test Method (ASTM). Method for determining degree of deacetylation in chitosan salts by proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectroscopy, 13.01, F2260-03. <http://www.astm.org>, 2003. (visitado el 10/06/18)
41. Himeno, S.; Hashimoto, M.; Ueda, T. *Inorg. Chim. Acta*, **1999**, *284*, 237-245.
42. Sannigrahi, P.; Ingall, E. *Geochem. Trans.* **2005**, *6*(3), 52-59.
43. Shete, A.S.; Yadav, A.V.; Murthy, S.M. *J. Pharm. Sci.* **2012**, *20*, 1-9.
44. Hermansson, M. ; *Colloids Surf.* **1999**, *14*, 105–119.
45. Bhattaraia N.; Ramaya H.R.; Gunna J.; Matsenb F.A.; Zhang M. *J. Controlled Release*, **2005**, *103*, 609–624.
46. Sugeta, M.; Yamase, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1993**, *66*, 444-449.