

NANOGELES DE POLI(N-VINILCAPROLACTAMA) Y GELATINA PARA SU POTENCIAL APLICACIÓN EN SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA

Steinbach, Gisela.

Tesinista – Licenciatura en Biotecnología – FBCB - UNL

Área temática: Ciencias biológicas

Sub-área: Biotecnología

Grupo: X

Palabras claves: nanogeles, *N*-vinilcaprolactama, gelatina.

INTRODUCCIÓN

Los nanogeles (NG) son estructuras poliméricas entrecruzadas de tamaño nanométrico que poseen propiedades intrínsecas interesantes, como excelente capacidad de dispersabilidad en agua, naturaleza blanda, flexibilidad y biocompatibilidad, por lo que resultan una prometedora alternativa como sistema de transporte y liberación controlada de fármacos y proteínas terapéuticas (Chacko et al., 2012). Dependiendo de su composición son capaces de responder a diferentes estímulos, como pH, temperatura, fuerza iónica, campo eléctrico, entre otras (Molina et al., 2015).

La incorporación de un biopolímero a la estructura de los NG, como ser la gelatina que es una proteína natural obtenida por hidrólisis parcial del colágeno, aportaría grupos funcionales que permitirían generar interacciones del tipo electrostáticas o puente de hidrógeno con el fármaco o proteína terapéutica. Además, la presencia de gelatina permitiría obtener NG con sensibilidad al pH, y aportaría biodegradabilidad a los mismos.

OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es la síntesis de NG híbridos de gelatina y poli(*N*-vinilcaprolactama) (PVCL) mediante polimerización por precipitación/dispersión, con potenciales aplicaciones para el transporte y liberación controlada de fármacos o proteínas terapéuticas. De este objetivo global se desprenden los siguientes objetivos específicos: a) funcionalización de la gelatina con glicidil metacrilato (GMA), con el propósito de dotar a la proteína de dobles enlaces en su cadena que pueden polimerizar por vía radicalaria; b) síntesis de NG a partir de la gelatina funcionalizada y la VCL empleando diferentes recetas de polimerización.

METODOLOGÍA

Materiales

El monómero utilizado fue la *N*-vinilcaprolactama (VCL). La gelatina empleada fue de origen bovino. Otros reactivos utilizados fueron: glicidil metacrilato (GMA), etanol, persulfato de potasio (KPS), bicarbonato de sodio, carbonato de sodio, dodecil sulfato sódico (SDS), hidroquinona, *N*-Isopropil hidroxilamina (IPHA), y *N,N*-

Proyecto: Síntesis y Caracterización de Polímeros producidos por Procesos en Emulsión y en Miniemulsión. (C.A.I.+D.2011)

Director del proyecto: Dr. Luis M. Gugliotta

Director del becario/tesista: Dra. Ludmila Ronco, Co-Directora: Dra. Verónica Gonzalez

metilenbisacrilamida (BA) como agente entrecruzante. En las mediciones de $^1\text{H-RMN}$ se utilizó agua deuterada como solvente y piridina como patrón interno.

Funcionalización de la gelatina

La funcionalización de la gelatina con GMA se realiza con el objetivo de evitar o reducir el uso de agentes entrecruzantes, ya que la misma gelatina funcionalizada cumplirá esta función. La reacción se llevó a cabo en un reactor encamisado de vidrio de 100 ml, que se cargó inicialmente con 8 gr de gelatina y 72 ml de buffer $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ (pH = 9.6). Una vez disuelta la gelatina se adicionó 2 gr de GMA, y 1 ml de IPHA (solución al 1.5%), para evitar la polimerización del GMA durante la funcionalización. La temperatura y tiempo de reacción fueron de 60°C y 8 hs, respectivamente. Finalizada la reacción, se precipitó la gelatina en etanol (relación volumétrica 5/1 etanol/muestra, para eliminar todo el GMA que no reaccionó) y se la secó a vacío.

Síntesis de nanogeles

El reactor se cargó inicialmente con una mezcla de agua, buffer (NaHCO_3), 10% (p/p respecto a la VCL + gelatina) de emulsificante (SDS), el monómero VCL y la gelatina funcionalizada. La concentración de VCL + gelatina en el medio de reacción se varió desde 10 mg/ml a 30 mg/ml, utilizando proporciones másicas de VCL/gelatina de 60/40, 70/30 y 80/20, de acuerdo a lo detallado para cada experimento en la Tabla 1. En algunas experiencias también se utilizó 1% (p/p respecto a la VCL + gelatina) de BA. Luego, se agregó el iniciador (KPS, 1% p/p respecto a la VCL + gelatina) para dar comienzo a la polimerización. La reacción se llevó a cabo durante 4 hs a 70°C y con burbujeo de N_2 durante todo el proceso. Los NG sintetizados fueron purificados por diálisis.

Caracterizaciones

La funcionalización de la gelatina se determinó a través de espectroscopia de $^1\text{H-RMN}$ en D_2O . La cantidad de moléculas de GMA unido a la gelatina se determinó utilizando piridina como patrón interno, y cuantificando el área de los picos correspondientes a los dos protones del doble enlace metacrílico del GMA, en 5.65 y 6.05 ppm, y un pico de la piridina en 8.4 ppm. Para esto, previamente se realizó una curva de calibración con GMA y piridina.

La conversión de VCL de las distintas polimerizaciones se determinó por espectroscopia de $^1\text{H-RMN}$ en muestras extraídas a lo largo de la reacción. Se empleó la técnica watergate, y se usó piridina como patrón interno. Para cuantificar la cantidad de $\text{VCL}_{\text{libre}}$ (sin reaccionar), se calcularon las áreas del pico correspondiente a los protones doble enlace vinílico de la VCL, entre 6.93 y 7.04 ppm, y el pico de la piridina que sale a los 8.4 ppm; a partir de éstos valores, y teniendo en cuenta una curva de calibrado de la VCL, se pudo calcular la concentración de $\text{VCL}_{\text{libre}}$. Finalmente se calculó la conversión final de VCL en cada polimerización a través de la siguiente ecuación:

$$\text{Conversión VCL (\%)} = 100 * \frac{[\text{VCL}]_0 - [\text{VLC}]_{\text{libre}}}{[\text{VLC}]_{\text{libre}}}$$

siendo $[\text{VCL}]_0$ la concentración de VCL cargada en el reactor.

La PVCL es un polímero termosensible, que tiene una temperatura de transición entre $31 - 38^\circ\text{C}$. Es por esto que los NG puros de PVCL se hinchan aumentando su volumen por debajo de $31 - 38^\circ\text{C}$ y se deshinchon y reducen por encima de esa temperatura. La temperatura de transición de los NG sintetizados se determinó a partir

de una dispersión de 10 mg/ml y midiendo el cambio de transmitancia (a 600 nm) a medida que aumenta la temperatura entre 30 y 80 °C.

RESULTADOS

En la Figura 1 A se muestra el espectro de ¹H-RMN correspondientes a la gelatina funcionalizada donde se puede observar los picos característicos del GMA que salen a 5.65 y 6.05 ppm y que no aparecen en el espectro de la gelatina sin funcionalizar (Figura 1 B). Los picos característicos de la piridina, que se usó como patrón interno, salen a 7.4, 7.75 y 8.4 ppm. La cantidad de moles de GMA por mol de gelatina fue igual a 9, es decir que la reacción de funcionalización permitió introducir 9 dobles enlaces metacrílicos por molécula de gelatina.

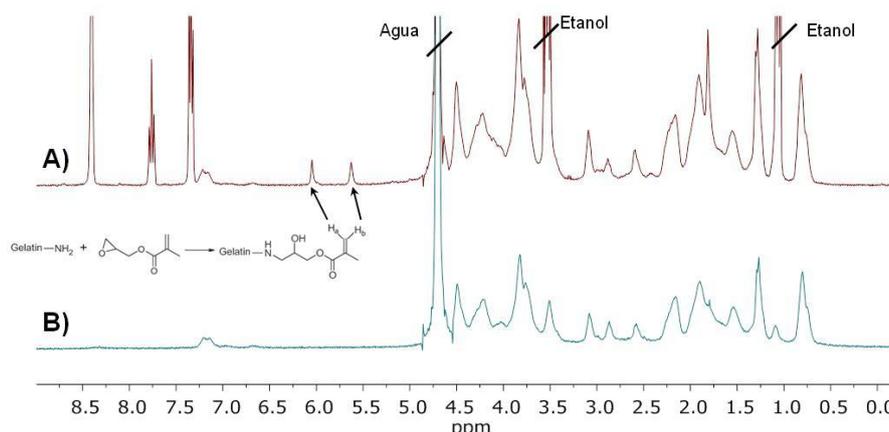


Figura 1. Espectros de ¹H-RMN de la gelatina funcionalizada (A) y sin funcionalizar (B).

Tabla 1. Recetas y resultados finales de las diferentes polimerizaciones.

Reacción	[VCL + gelatina] (mg/ml)	VCL/gelatina	BA (%)	Conv. de VCL (%)
R1	10	70/30	-	50.13
R2	10	60/40	-	31.45
R3	20	70/30	-	78.84
R4	30	70/30	-	73.83
R5	30	70/30	1	85.46
R6	30	80/20	-	78.00
R7	30	80/20	1	86.73

En la Figura 2 se muestra la conversión de VCL en función del tiempo para tres reacciones con distintas concentraciones de VCL + gelatina (R1, R3 y R4). Como se puede observar, la velocidad de polimerización y la conversión final se incrementan al utilizar concentraciones de VCL + gelatina más altas, lo que era esperable ya que la velocidad de polimerización es proporcional a la concentración de monómero (VCL) en el medio. Esto también explica las mayores conversiones finales de VCL al utilizar las relaciones 70/30 y 80/20 VCL/gelatina respecto a la experiencia

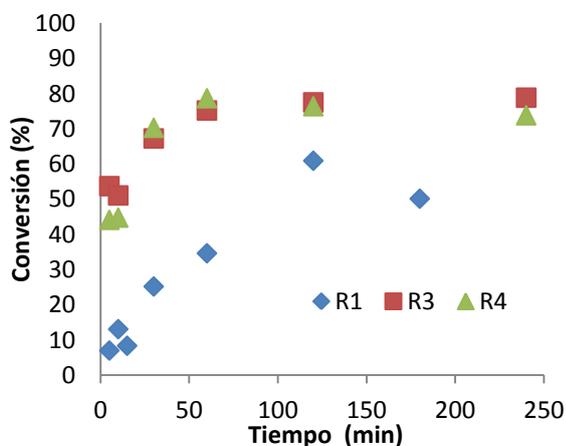


Figura 2. Evolución de la conversión de VCL para reacciones R1, R3 y R5 con diferentes concentraciones de VCL + gelatina.

R2 con una proporción 60/40 (Tabla 1).

Como la reacción de polimerización entre la gelatina y la VCL ocurre a través de los dobles enlaces metacrílicos presentes en la gelatina funcionalizada, la desaparición de los picos correspondientes a los protones de este doble enlace podrían justificar la ocurrencia de dicha reacción. Esto se corroboró mediante $^1\text{H-RMN}$ observándose la ausencia de estos picos en el espectro (no se muestra por razones de espacio).

La temperatura de transición de los NG obtenidos en las polimerizaciones R4 y R5 se determinaron a través de la medida de la transmitancia de dichas muestras. En Figura 4 A se muestra la evolución de la transmitancia en función de la temperatura para los NG de las reacciones 4 y 5. A baja temperatura (30 °C) los NG están hinchados y prácticamente no dispersan luz por lo cual la transmitancia es cercana al 100% y la dispersión acuosa de NG es transparente (Figura 4 B), pero a alta temperatura (70 °C) los NG colapsan y el medio se vuelve opaco (Figura 4 B). La temperatura donde ocurre el cambio de transmitancia corresponde a la transición térmica de los NG, que fue de 54 y 60 °C, para las reacciones 4 y 5, respectivamente. Este incremento de la temperatura de transición respecto a la PVCL es un indicio de su reacción con la gelatina, que es soluble a temperaturas mayores de 30 °C.

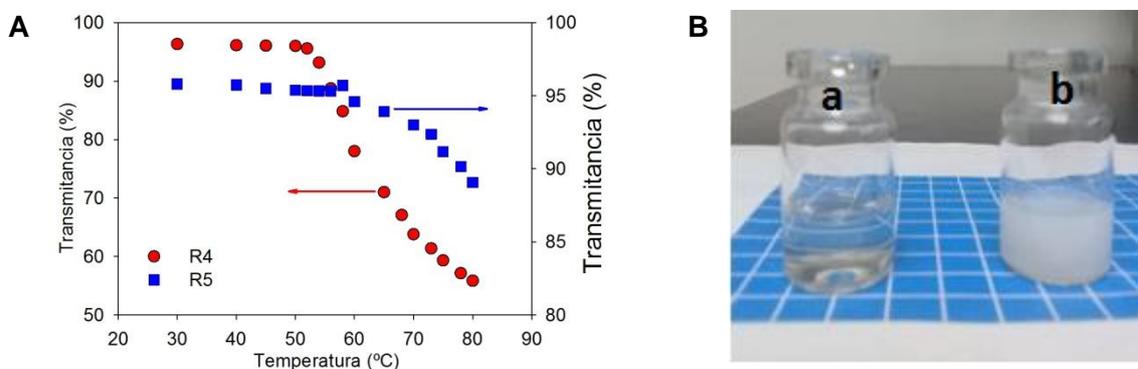


Figura 4. Evolución de la transmitancia en función de la temperatura para los NG de las reacciones R4 y R5 (A). Transición de fase volumétrica de los NG de la reacción R4 a 30°C (a) y 70°C (b).

CONCLUSIONES

Mediante la estrategia de funcionalización de la gelatina con GMA fue posible obtener un promedio de 9 doble enlaces metacrílicos por molécula de gelatina permitiendo que ésta actúe como agente entrecruzante en la síntesis de los NG.

Durante las reacciones se obtuvieron conversiones de VCL y velocidades de polimerización mayores al emplear concentraciones más altas de dicho monómero en el medio de reacción.

Finalmente, se observó un incremento importante en la temperatura de transición térmica de los NG híbridos sintetizados respecto a los NG de PVCL puros, lo que evidencia la incorporación de la gelatina a los NG por reacción con la VCL.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Chacko R.T., Ventura J., Zhuang J., Thayumanavan S., 2012. Polymer nanogels: a versatile nanoscopic drug delivery platform. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64, 836-851.
- Molina M., Asadian-Birjand M., Balach J., Bergueiro J., Miceli E., Calderon M., 2015. Stimuli-responsive nanogel composites and their application in nanomedicine. *Chem. Soc. Rev.* 44, 6161—6186.