

SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS COPOLIMÉRICAS DE NIPA-co-AcA Y SU APLICACIÓN EN LA LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

Issa Katime Amashta

Grupo de Nuevos Materiales y Espectroscopia Supramolecular (GNM). Facultad de Ciencia y Tecnología. Bilbao. España. Correo electrónico: issa.katime@ehu.es

Recibido: Julio 2018; Aceptado: Febrero 2019

ABSTRACT

Copolymer nanoparticles of poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) have been synthesized by polymerization via inverse micro-emulsion. The obtained nanoparticles have been characterized by FTIR and DSC, to know its functional groups and glass transition temperatures, respectively. Using electron microscopy transmission (TEM) and quasielastic light scattering (QLS) to determine the sizes and the size distribution of gels. There has been studied of swelling of these nanogels in order to know its response to different pH and cross linking agent concentrations. These nanoparticles have been charged with a vasodilator drug (Theophylline), and have studied the kinetics of the drug release.

Keywords: hidrogel, drug release, microemulsion, nanoparticles, Theophylline

RESUMEN

Se han sintetizado nanopartículas copoliméricas de poli(N-isopropilacrilamida-co-ácido acrílico) por polimerización vía microemulsión inversa. Las nanopartículas obtenidas han sido caracterizadas por FTIR y DSC, para conocer sus grupos funcionales y temperaturas de transición vítrea respectivamente; y mediante microscopia electrónica de transmisión (TEM) y difusión de luz cuasielástica (QLS) para determinar los tamaños y distribución de tamaños de los geles sintetizados. Se ha realizado el estudio de hinchamiento de estos nanogeles con el fin de conocer su respuesta a diferentes pH y concentraciones de agente entrecruzante. Estas nanopartículas han sido posteriormente cargadas con un fármaco vasodilatador (teofilina), y se ha estudiado la cinética de liberación de dicho fármaco en distintos medios tamponados.

Palabras clave: hidrogel, liberación de fármacos, microemulsión, nanopartículas, Theophylline

INTRODUCCIÓN

Actualmente existen diversos métodos de liberación farmacológica entre los que se encuentra la liberación dirigida a través de nanogeles [1-3]. Estos nanogeles se definen como una red polimérica entrecruzada capaz de hincharse, albergando en su interior gran cantidad de disolvente, por esta razón estos nanoingenios permiten la liberación de fármacos de forma específica en los tejidos donde es necesaria la acción de la droga sin dañar los tejidos sanos. La forma más eficiente de obtención de estos nanogeles es el método de polimerización en microemulsión inversa. Uno de los monómeros termosensibles más estudiados es la N-isopropilacrilamida, siendo sus polímeros capaces de sufrir una transición conformacional a una temperatura similar a la corporal. Haciendo uso de esta característica y gracias al pH-sensibilidad del ácido acrílico el objetivo principal de este trabajo ha sido la síntesis y caracterización de nanopartículas copoliméricas de NIPA-co-AcA por polimerización en microemulsión inversa, así como el estudio de liberación de un fármaco vasodilatador en dos medios conocidos. Una vez formada la microemulsión la polimerización se lleva a cabo en un reactor bajo condiciones de atmósfera inerte. Los nanogeles se obtienen por precipitación y purificación de las microemulsiones

en el medio adecuado y han sido cargados con el fármaco teofilina mediante inmersión en una disolución de 2.500 ppm. La caracterización ha sido llevada a cabo por FTIR y DSC para conocer los grupos funcionales presentes y las temperaturas de transición vítrea respectivamente, y mediante microscopia TEM y espectroscopia QLS para conocer el tamaño y morfología de las partículas sintetizadas. La cinética de liberación se ha seguido mediante espectroscopia UV-Vis

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales. Se emplearon los siguientes reactivos: Los monómeros utilizados han sido N-isopropilacrilamida (NIPA) (*Across Organics*) y ácido acrílico (*Sigma Aldrich*), como aceite se ha empleado ISOPAR-M (*Acideka*), Atlas G1086 (*Acideka S.A.*) como tensioactivo y Arlacel (*Acideka. S.A.*) como cotensioactivo, de HLB 10,7 y 3,7, respectivamente. La fase continua ha sido agua de grado *Milli-Q*, el iniciador empleado en este caso es el bisulfito potásico (*Merck*). Se ha empleado como agente entrecruzante N,N'-metilenbisacrilamida (NMBA) (*Aldrich Chemical*, pureza > 98%). El fármaco utilizado ha sido la teofilina (*Aldrich Chemical*).

Síntesis de los nanogeles. El monómero es disuelto en la correspondiente cantidad de agua desionizada (en todos los casos la fase acuosa ha presentado la máxima proporción de monómero que su solubilidad permite, 20%) junto con el NMBA. Separadamente se mezclan los componentes de la fase oleosa (aceite, tensioactivo y cotensioactivo). Seguidamente se añade la fase acuosa sobre la oleosa, sometiendo a ésta a fuerte agitación, durante media hora, mediante goteo. Esta forma de mezcla lenta de la fase acuosa y oleosa, mejora el aspecto final de la microemulsión disminuyendo la viscosidad, ganando transparencia y aumentando la formación de micelas que se observa por un aumento en la tonalidad azul de la microemulsión. La mezcla es introducida en un balón de reacción que es mantenido a la temperatura de 25°C, mediante un baño termostático y mantenida durante una hora previa a la reacción y durante el transcurso de ésta, en constante agitación y bajo atmósfera inerte. En el balón de reacción se introduce un termopar que indicará la variación de temperatura producida durante la reacción. El disolvente adecuado para extraer los nanohidrogeles de la microemulsión y limpiarlos del posible monómero residual y restos de aceites y surfactantes ha sido el éter dietílico. Como se trata de extraer hidrogeles entrecruzados, no importa que se trate de un disolvente del polímero, incluso es preferible esto último, ya que se eliminarían los posibles restos de cadenas poliméricas sin entrecruzar. Para ello se vierte la microemulsión polimerizada sobre el vórtice de éter dietílico apareciendo un polvo fino blanco en el fondo del recipiente. Se observa también la aparición de agregados esponjosos, esto ocurre cuando el precipitante está saturado y no es capaz de disolver la fase oleosa y el sistema tensioactivo por lo que aparece un

agregado de estas partículas. El tamaño de estos agregados disminuye al añadir más agente precipitante. A continuación el disolvente se retira por decantación y posteriormente se seca a vacío. El sólido obtenido vuelve a precipitarse en éter dietílico para purificar más el precipitado obtenido, obteniéndose un sólido blanco en forma de polvo [4].

Se han sintetizado diferentes composiciones copoliméricas, con diferentes grados de entrecruzamiento como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Composiciones copoliméricas sintetizadas

<i>Composición NIPA (%)</i>	<i>Composición AcA (%)</i>	<i>Entrecruzante (%)</i>		
60	40	1	3	5
70	30	1	3	5
80	20	1	3	5
90	10	1	3	5
100	0	1	3	5

Carga del fármaco. Los nanogeles han sido cargados mediante inmersión en una solución de agua *MilliQ* a una concentración de $2,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de teofilina. El tiempo de carga ha sido de 72 horas. Durante este tiempo los nanogeles son sometidos a fuerte agitación en la disolución que contiene el fármaco y aislados de la luz debido a la naturaleza fotosensible del mismo. Una vez transcurrido este tiempo los nanogeles son centrifugados y lavados sobre membranas nanométricas con el fin de eliminar posible fármaco libre que se encuentre adherido en la superficie externa de los mismos. Concluido el filtrado los nanogeles son secados en una cámara de aire seco.

CARACTERIZACIÓN

Caracterización mediante FTIR. Los espectros de las muestras obtenidas han sido estudiados usando la técnica de reflectancia total atenuada (ATR) empleando el accesorio *Smart Orbit* acoplado a un espectrofotómetro infrarrojo con transformada de *Fourier* (*Nicolette 6700*). Todos los espectros se obtuvieron promediando 100 barridos de 4 cm^{-1} de resolución.

Estudios de calorimetría diferencial de barrido (DSC). La temperatura de transición vítrea (T_g) ha sido medida usando un calorímetro diferencial de barrido *TA Instruments* (DSC). Para la calibración se han utilizado estándares de Indio ($T_f = 156,68^\circ\text{C}$) y cinc ($T_f = 419,58^\circ\text{C}$). El análisis calorimétrico de los polímeros en estrella se realizó en el intervalo de temperatura $0\text{--}200^\circ\text{C}$ con una velocidad de calentamiento de 10 grados/minuto con un flujo de nitrógeno ($100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$). La T_g ha sido calculada siguiendo el criterio del punto medio.

Medidas de difusión de luz quasielástica (QLS). La difusión de luz quasielástica ha sido utilizada para medir el tamaño de partícula y su distribución de tamaños. Las medidas de la intensidad de correlación se llevaron a cabo con el equipo *Brookhaven BI-9.000*, equipado con un láser de ión argón a la longitud de onda de 514,5 nm, refrigerado por agua. Las muestras fueron dispersadas en agua durante 38 horas. Todas las medidas se han realizado a 25°C. El análisis CONTIN ha proporcionado la distribución de tamaños moleculares.

Medidas de hinchamiento. Las medidas de hinchamiento se realizan utilizando una membrana de poro nanométrico a través de la cual, y por difusión, penetra el líquido que va hinchando los nanogeles permitiendo así realizar pesadas analíticas a diferentes tiempos. Las medidas se realizan para todas las muestras y a diferentes pH.

Cinética de liberación mediante el uso de la técnica UV-Vis. Las medidas de liberación se realizan en un equipo *UV-Vis Cintra 303* utilizando una cubeta de cuarzo negro de flujo continuo acoplada a una bomba peristáltica. Los nanogeles son introducidos en una disolución tampón pH 5,0 para evaluar la liberación. La disolución fluye a través de la cubeta, previo paso por un filtro nanométrico para evitar la entrada de nanogeles en la misma, y se realizan medidas a la longitud de onda de absorción del fármaco (250 nm) cada segundo.

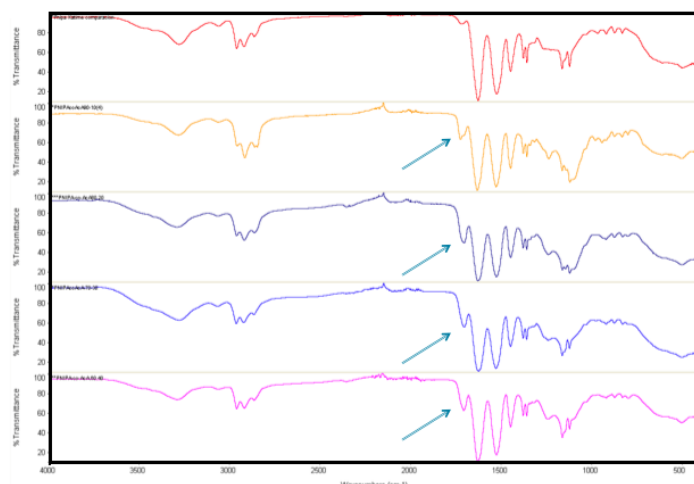


Figura 1. Espectro FTIR de las muestras estudiadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización mediante FTIR. En la Figura 1 se muestra el espectro FTIR de todas las muestras estudiadas. Todas ellas, excepto la primera (100% poli(NIPA)), muestran claramente la entrada del ácido acrílico al copolímero. La presencia o entrada del ácido acrílico al copolímero se

corroborar por la aparición una banda hacia 1.700 cm^{-1} , banda que es característica de la vibración del grupo carbonilo. El resto de bandas son claramente predominantes del monómero NIPA, que a su vez posee bandas comunes con el ácido acrílico. A medida que la composición se enriquece en el ácido esta banda se hace más predominante, siendo más acusada en la composición al 40% de acrílico.

Caracterización mediante DSC. Las curvas calorimétricas obtenidas, muestran que a medida que el copolímero se enriquece en el monómero ácido acrílico aumenta la rigidez de las nanopartículas, hecho que se pone de manifiesto en un aumento de la temperatura de transición vítrea. Este aumento de los valores de la temperatura de transición vítrea a medida que aumenta el porcentaje de ácido acrílico es debido a la presencia de los grupos $-\text{OH}$ presentes en éste ácido. Estos grupos hidroxilo forman enlaces de hidrógeno en el hidrogel restringiendo el movimiento de los segmentos del copolímero lo que conlleva a un aumento de la T_g . Asimismo, en la Figura 2, puede también observarse que para cada composición el valor de la T_g aumenta a medida que lo hace la concentración de agente entrecruzante. Así, para una composición al 90% de NIPA, se observa una T_g de 80°C para un grado de entrecruzamiento del 5% y una T_g de 65°C para un porcentaje al 1% de agente entrecruzante. Este mismo fenómeno ocurre para cualquiera de las cuatro composiciones estudiadas. Analizando el comportamiento en función de la concentración de ácido acrílico en el hidrogel, nos encontramos que para un mismo porcentaje de entrecruzante, por ejemplo al 5%, el valor de la T_g aumenta de los 80°C , con un 10% del ácido, a los 163°C cuando la concentración del ácido es del 40%. Esto ocurre en todos los casos estudiados y es debido al hecho citado anteriormente.

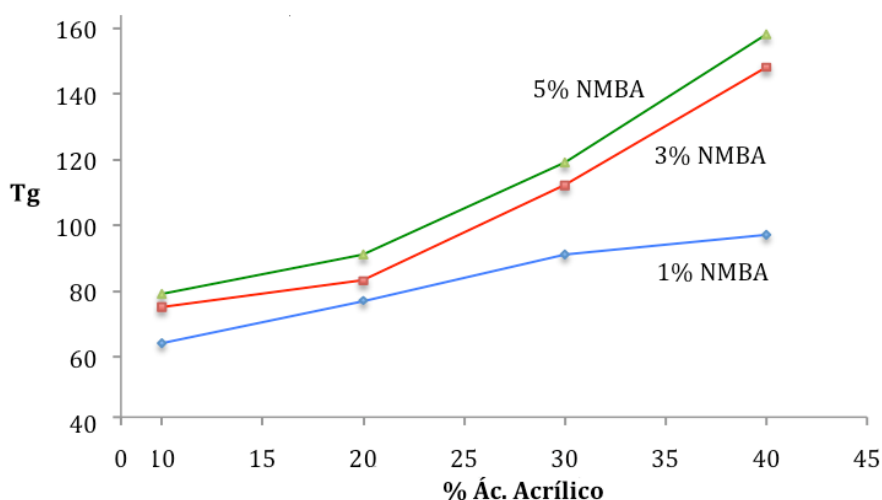


Figura 2. Variación de la T_g en función del porcentaje de ácido acrílico, para distintos grados de entrecruzamiento.

Caracterización mediante QLS y TEM. Las medidas del tamaño molecular obtenidas mediante difusión de luz cuasielástica (QLS) indican una distribución de pesos moleculares predominante para partículas con un tamaño de 63 nm. Hecho que es corroborado posteriormente mediante la espectroscopia electrónica de transmisión cuya imagen se muestra en la Figura 3.

Las micrografías obtenidas con esta técnica indican que el tamaño de partículas oscila entre los 40 y 70 nm, apreciándose una morfología esférica en todas las nanopartículas estudiadas.

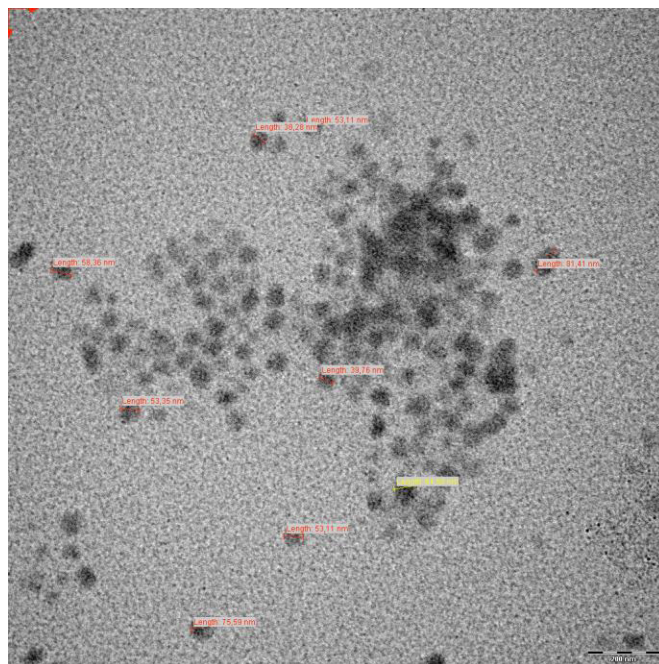


Figura 3. Micrografías obtenidas por TEM de las nanopartículas de PNIPA-co-AcA.

Cinética de hinchamiento. Se realiza el estudio de hinchamiento de la composición 90:10% a diferentes pH y diferentes grados de entrecruzamiento. La representación tridimensional del hinchamiento frente al tiempo y el pH, para un grado de entrecruzamiento determinado se muestra en la Figura 4. En esta representación se observa cómo, analizando una composición determinada de agente entrecruzante, el grado de hinchamiento aumenta con el tiempo y a medida que el pH de la disolución aumenta. Los valores de hinchamiento disminuyen a medida que aumenta el porcentaje de agente entrecruzante, como puede observarse comparando las gráficas para los distintos valores de agente entrecruzante. Este efecto de hinchamiento en función del pH es debido a que los grupos ácidos del ácido acrílico presentan un pKa que a valores de pH ácidos se encuentran en la forma ácida – COOH, mientras que a valores de pH básicos el grupo carboxilo queda cargado negativamente por la pérdida del protón, esta presencia de cargas negativas provoca la aparición de fuerzas de repulsión entre ellas conduciendo así a que las cadenas tiendan a

separarse y la red macromolecular se expanda, permitiendo así una mayor entrada de disolución en su interior [5].

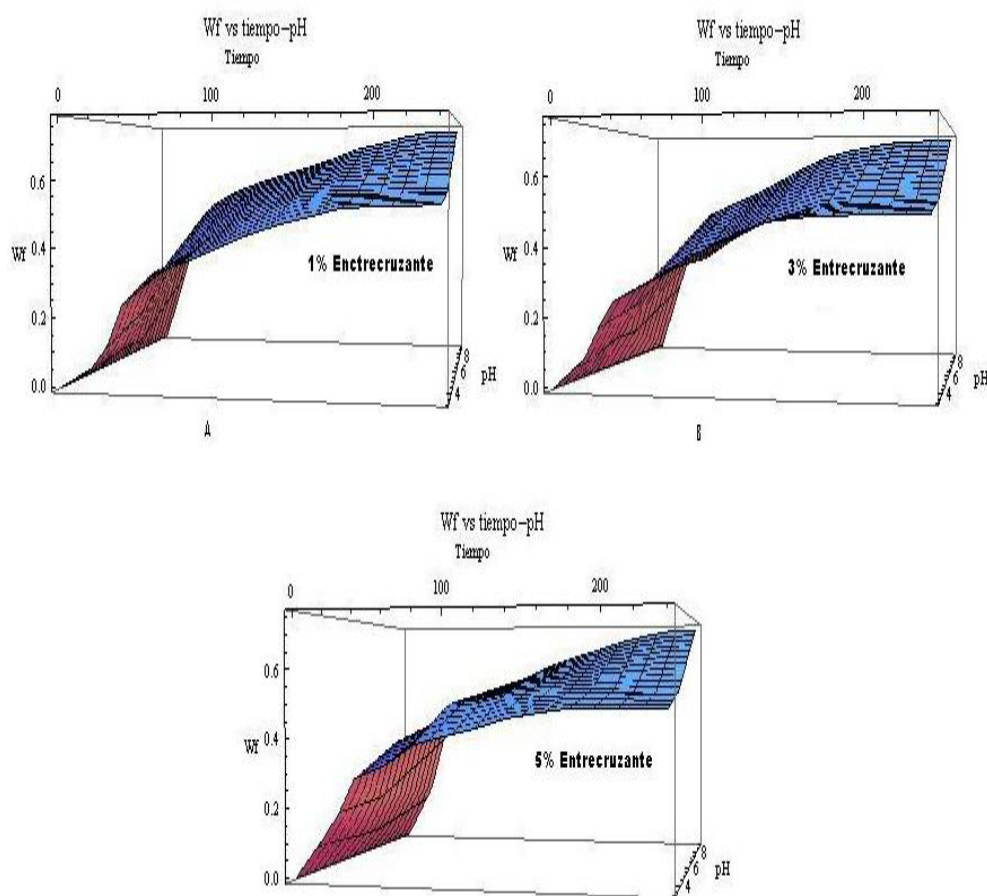


Figura 4. Representación tridimensional del hinchamiento a diferentes grados de entrecruzamiento. Nanohidrogeles de NIPA–AcA (90:10%).

Realizando un estudio del hinchamiento a tiempo infinito (W_{∞}) para la composición de 90:10 entrecruzada al 1, 3, y 5% y realizando las medidas en tres medios tamponados podemos concluir, como se observa en la Figura 5, que para una composición a un mismo pH los valores de W_{∞} aumentan ligeramente al aumentar el porcentaje de agente entrecruzante [6]. Mientras que si fijamos el valor de agente entrecruzante y estudiamos su comportamiento a diferentes pH observamos como el pH influye de manera muy notable en el comportamiento de estos nanogeles, Siendo el efecto del pH predominante frente al efecto del agente entrecruzante. Puede observarse valores de W_{∞} para una muestra, fijando el valor de agente entrecruzante (1%), de hasta un 30% superiores variando el pH desde 3 hasta 9. Mientras que fijando un pH, por ejemplo a pH 5, y variando el porcentaje de agente entrecruzante nos encontramos que las diferencias en el W_{∞} no superan el 4%. Por lo tanto, en los nanogeles estudiados y debido a las características químicas de

los grupos acrílico y su respuesta frente a los cambios de pH podemos afirmar que el factor más influyente en su hinchamiento es el pH del medio, siendo el porcentaje de agente entrecruzante un factor menos importante.

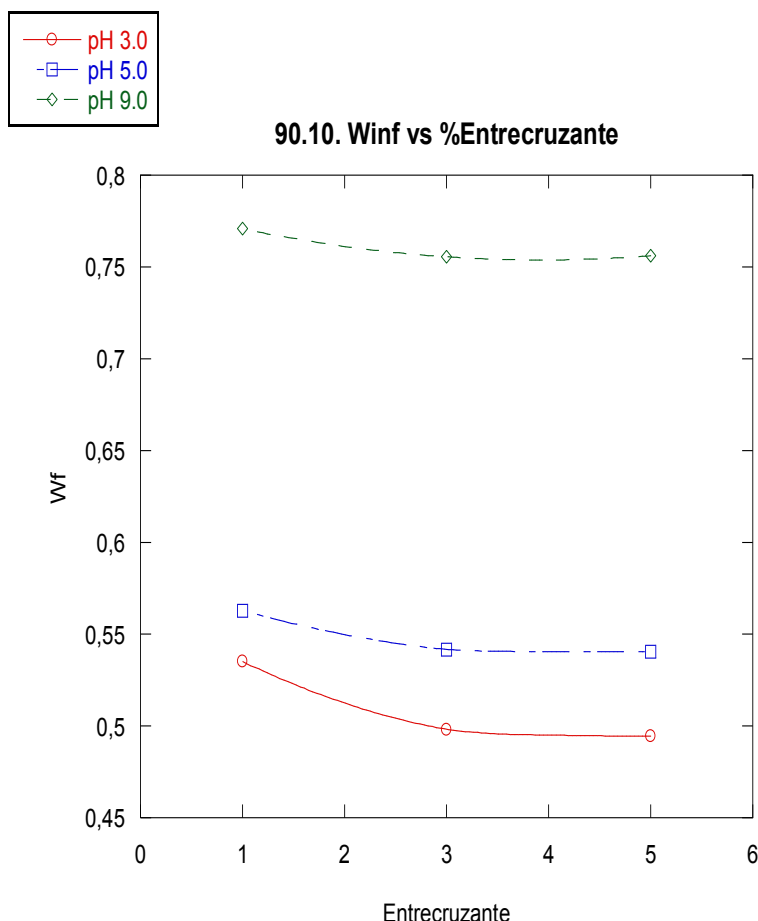


Figura 5. Representación de los valores de W_{∞} para la composición 90:10% a diferentes pH y porcentaje de entrecruzante.

Cinética de liberación del fármaco. Los nanogeles NIPA–AcA (90:10%) han sido cargados con el fármaco teofilina. La liberación se ha realizado en medios tamponados a tres valores de pH diferentes, y se ha seguido la liberación del fármaco mediante espectrofotometría UV–Vis previo calibrado del fármaco. El fármaco absorbe en la longitud de onda de 250 nm, por lo que se realiza el estudio de la cinética en base a este dato. Se observa como la cinética de liberación es diferente según el pH del medio en la que la realicemos (véase la Figura 6). Este efecto es debido a la hidrolización de los grupos ácidos del ácido acrílico. A pH básicos el hinchamiento es más elevado, por lo que el fármaco liberará de forma más rápida y alcanzará el equilibrio en intervalos de tiempo menores.

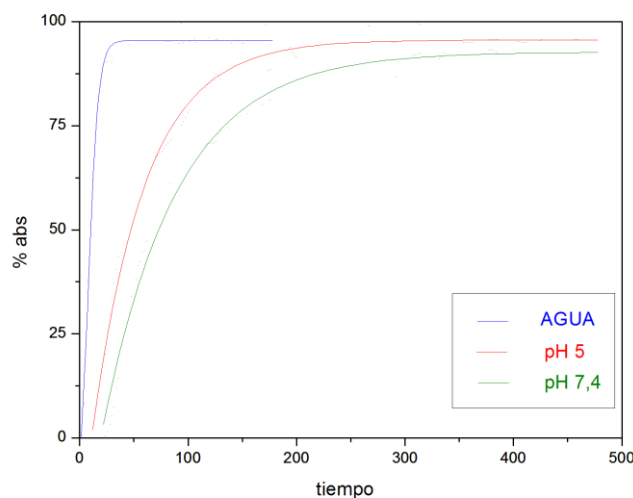


Figura 6. Cinética de liberación de teofilina a partir de los nanogeles PNIPAA-co-AA (90:10%).

CONCLUSIONES

Se han sintetizado vía microemulsión inversa nanopartículas copoliméricas de poli(NIPAA-co-AA), cuyo tamaño de partícula se ha medido por difusión de luz cuasielástica y microscopia de transmisión electrónica obteniéndose valores del orden de los 60 nm. Los diferentes copolímeros han sido caracterizados por FTIR y DSC, observándose un aumento de la T_g a medida que el copolímero se enriquece en ácido acrílico debido al mayor número de enlaces de hidrógeno formados a través de los grupos hidroxilo del ácido acrílico. A su vez se encuentra que un incremento de la cantidad de agente entrecruzante provoca también un aumento de la T_g debido a la restricción de las cadenas macromoleculares, provocando que sea necesario una temperatura mayor para permitir el libre movimiento de las cadenas. Se realiza un estudio de hinchamiento de los nanogeles encontrándose como para una misma composición se alcanzan valores de hinchamiento superiores para valores de entrecruzamiento más bajos. Del mismo modo se observa que para una misma composición y misma concentración de agente entrecruzante el hinchamiento es mucho mayor cuando este se realiza en medios básicos. Este efecto es debido a la desprotonación del grupo ácido del ácido acrílico a pH básicos, lo que provoca una repulsión entre cargas negativas que favorece la expansión de la red macromolecular permitiendo a ésta albergar más disolución en su interior. Así las cosas y en base a estos datos se puede elegir en función de las necesidades de liberación una composición u otra, ya que la liberación está íntimamente ligada a los procesos de hinchamiento. En este caso estos nanogeles han sido cargados con un fármaco vasodilatador (teofilina) y se ha estudiado la cinética de liberación de los mismos en tres medios tamponados a

diferentes pHs, encontrándose valores de liberación diferentes en tiempo y señal de absorbancia en función del pH de la disolución.

BIBLIOGRAFÍA

1. Katime I, Katime O, Katime D “*Los materiales inteligentes de este Milenio: los hidrogeles polímeros*”. Editorial de la Universidad del País Vasco, Bilbao 2004 ISBN 978-84-8373-637-1
2. Garcia D, Escobar JL, Bada N, Katime I “*Swelling behavior of polymeric networks based on N-isopropylacrylamide and N,N-dimethylacrylamide hydrogels*”, en “*Chemical Reactions in Liquid and Solid Phase: Kinetics and Thermodynamics*” Zaikov GE, Jiménez A (Editores): Nova Science Publishers Inc, New York, USA, 1-10 (2003). ISBN 1-59033-854-5
3. Zumaya Quiñones R, Antonio Cruz RC, Rivera Armenta JL, Chávez CY, Mendoza Martínez A, Ramírez Mesaz R, Katime I “Liberación de ibuprofeno empleando hidrogeles de poly(carboximetil celulosa-co-acrilamida)”, *Rev. Iberoam. Polímeros*, **10(6)**, 288 (2009)
4. Katime I, Álvarez-Bautista A, Mendizábal E, Guerrero-Ramírez LG, Ochoa-Gómez JR “Synthesis of poly(acrylamide-co-[2-acryloyloxy ethyl]trimethyl ammonium chloride) star-shaped polymers by inverse microemulsion polymerization”, *Adv. Mat. Lett.*, **4(2)**, 115 (2013)
5. Pérez L, Sáez V, Katime I “Novel pH and Temperature Responsive Methacrylamide Microgels”, *Macromolecular Chemistry & Physics*, **210(13-14)**, 1120 (2009)
6. Rodríguez E, Katime I, *J. Appl. Polymer Sci.*, **90(2)**, 530 (2003)