

Isabel Jiménez Pardo

Hidrogeles termosensibles y
fotopolimerizables derivados de
Pluronic® para aplicaciones
biomédicas

Departamento
Química Orgánica

Director/es

Ros Latienda, María Blanca
Sierra Travieso, Teresa

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

**HIDROGELES TERMOSENSIBLES Y
FOTOPOLIMERIZABLES DERIVADOS DE
PLURONIC® PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS**

Autor

Isabel Jiménez Pardo

Director/es

Ros Latienda, María Blanca
Sierra Travieso, Teresa

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Química Orgánica

2014



Departamento de
Química Orgánica
Universidad Zaragoza



icma
Instituto de Ciencia
de Materiales de Aragón



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

TESIS DOCTORAL

**HIDROGELES TERMOSENSIBLES Y FOTOPOLIMERIZABLES
DERIVADOS DE PLURONIC® PARA APLICACIONES
BIOMÉDICAS**

Autor

ISABEL JIMÉNEZ PARDO

Directores

MARÍA BLANCA ROS LATIENDA

TERESA SIERRA TRAVIESO

Dpto. de Química Orgánica

Facultad de Ciencias-ICMA

Universidad de Zaragoza-CSIC

Zaragoza, enero de 2014



Departamento de
Química Orgánica
Universidad Zaragoza



icma
Instituto de Ciencia
de Materiales de Aragón



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

TESIS DOCTORAL

**HIDROGELES TERMOSENSIBLES Y FOTOPOLIMERIZABLES
DERIVADOS DE PLURONIC® PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS**

*Memoria presentada en la Universidad de Zaragoza para optar al
grado de Doctor*

ISABEL JIMÉNEZ PARDO

Dpto. de Química Orgánica

Facultad de Ciencias-ICMA

Universidad de Zaragoza-CSIC

Zaragoza, enero de 2014

Prof. MARÍA BLANCA ROS LATIENDA, Catedrática del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza y

Dra. TERESA SIERRA TRAVIESO, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas del Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón de la Universidad de Zaragoza-CSIC.

HACEN CONSTAR:

Que la Memoria titulada: **“Hidrogeles termosensibles y fotopolimerizables derivados de Pluronic® para aplicaciones biomédicas”** ha sido realizada bajo nuestra dirección por DÑA. ISABEL JIMÉNEZ PARDO en el Departamento de Química Orgánica de esta Universidad y reúne las condiciones requeridas para su presentación como tesis doctoral.

Zaragoza, a 30 de enero de 2014

Fdo.: Prof. María Blanca Ros Latienda

Fdo.: Dra. Teresa Sierra Travieso

A mi familia, a Luis y a Clara

Agradecimientos

Ha llegado el momento. Después de posponer y posponer la escritura de los agradecimientos aquí están. Es difícil recoger en poco espacio todo lo vivido, profesional y personalmente, en estos 4 años y pico de mi vida, espero no enrollarme mucho y sobretodo no dejarme a nadie.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directoras de tesis, Teresa y Blanca. Gracias por darme la oportunidad de trabajar con vosotras, por escuchar siempre mis ideas, por enseñarme tanto y por estar siempre disponibles para resolver mis dudas e inquietudes. Gracias también por vuestra implicación con este trabajo y por buscar siempre colaboraciones con el fin de encontrar aplicaciones reales para los materiales de esta tesis. Gracias Teresa por tus fantásticas ideas químicas y Blanca, gracias por tu gran capacidad para resumir mis largas explicaciones. Creo que formáis un gran equipo.

Quisiera agradecer al profesor José Luis Serrano, por acogerme en el Grupo de Cristales Líquidos y Polímeros y por interesarse siempre por mi trabajo. También me gustaría agradecer al resto del grupo: Luis, Joaquín, Raquel, Milagros, Mercedes, Rosa, Santi, Ana, y especialmente a Pilar, por su ayuda y disponibilidad para la realización de experimentos de RMN.

También agradecer a todas las personas que formaron parte del proyecto de investigación PI031/08 de la DGA: José Manuel García Aznar, Clementina Rodellar, Francisco Vázquez, Iñaki Ochoa, María José Martínez Lorenzo..., con el que se dieron los primeros pasos de esta tesis, y del proyecto posterior PIPAMER (10/015), con el que se continuó.

Gracias a la doctora María José Martínez del Banco de Sangre y Tejidos de Aragón, por la realización de los ensayos celulares con hidrogeles de esta tesis y por acercarme al maravilloso mundo "bio". Te

agradezco enormemente tu disponibilidad para la realización de los ensayos y para responder siempre mis dudas del mundo "bio".

También me gustaría agradecer a los miembros del grupo GEMM: Iñaki, Clara, Alexis, Aitor..., por la realización de los ensayos mecánicos, y sobre todo por hacerme aprender algo sobre el que yo considero complicado mundo de las propiedades mecánicas.

En este punto me gustaría agradecer a los servicios técnicos que han hecho posible la obtención de parte de los resultados esta tesis. Gracias a los servicios técnicos del CEQMA. Gracias a María y César, del Servicio de Microscopia e imagen del IACS, por vuestra ayuda con los equipos de microscopía de fluorescencia y confocal. Gracias Carlos y Rodrigo, del LMA del INA, por la obtención de las imágenes de SEM y TEM, y por las conversaciones entre medida y medida. Gracias Pedro, Patricia y Miguel G., del Servicio de Calorimetría, por la realización de los ensayos de DSC.

GRACIAS a mis compañeros del INA, por haber sido una verdadera familia para mi, y por crear un gran ambiente de trabajo todos los días. Eva G., tu llegada al INA fue una auténtica revolución positiva; gracias por poner orden y sobre todo por tu positivismo contagioso en el laboratorio. Gracias Emma, por estar siempre ahí, dispuesta a escuchar mis historias, tanto de trabajo como de cualquier otro asunto que pasara por mi cabeza, y por supuesto gracias por tus consejos. Julieta y Betta, gracias por ser unas compañeras geniales, por vuestra ayuda dentro y fuera del laboratorio, y por escuchar con paciencia mis historias de mi querido pueblo. Y aunque ahora ya no estáis en el grupo, gracias por seguir interesadas siempre por mi y por mi tesis en estos últimos meses. Gracias Luchi, por tu entusiasmo y alegría contagiosa cada mañana, por tus historias geniales y por estar siempre dispuesta a tomar un café conmigo. Alex ha llegado tu turno, espero que los agradecimientos que llevas tanto tiempo esperando no te defrauden, que el listón está muy alto...Gracias por "aguantar" con humor las conversaciones de mujeres del INA, por los momentos que

hemos pasado tanto fuera (espero repetir este año en Pamplona) como dentro del laboratorio y por prestarme la molécula de rodamina. Mariajo, como ya eres una más del INA te incluyo aquí; gracias por tus consejos y conversaciones sobre geles y otros temas de la vida, sobre todo durante estos últimos meses. Gracias también a los estudiantes que han pasado por el INA: Eva, Diego, Chechu y Lucía H. Gracias Iñigo, por facilitarnos el trabajo en el laboratorio.

Gracias también a toda la gente de ciencias, por preparar siempre pasteles en mis visitas (os prometo que no lo hacía a posta). Gracias a Miguel C., compañero de vitrina durante mis primeros meses de tesis, y a Jordi, por hacer más llevaderas mis visitas a ciencias con vuestras historias siempre divertidas. Gracias a Neli, por tu ayuda durante mis primeras reacciones con los polímeros y por interesarte por mi tesis y por mi futuro. Gracias también a Marta, Ismael, Jose, Madalina, Bea, Albertico, Vero, Alf, Yuki, Hugos, Daniele...me ha encantado conocerlos a todos y cada uno de vosotros. Gracias también a todos los que han pasado por el grupo: Amedeo, Eva, Miguel L., Edu, Silvia, Jesús, Sandra, Ramón, Susana, Judith...

Me gustaría agradecer a Rebeca por la realización de los ensayos celulares con nanogeles, por ser siempre tan paciente con mis innumerables dudas y por responderlas siempre con una sonrisa.

Gracias a mis amigas de siempre: Elena, Sheila, Cris y Mire, porque aunque cada vez nos vemos menos por cuestiones de la vida, sé que aunque no os vea en mucho tiempo siempre puedo contar con todas vosotras.

Gracias a mis amigos de la peña, por los momentos compartidos que me han ayudado a desconectar.

Gracias también a mis amigos de la peña la femera de Ainzón: Luis, Ángel, Guillermo, Ainhoa, Juan, Marta, Javi G., Adrián, Javi A., Estela, Dani, Iván, Enrique, Nadine, Alberto y Judit, por todos los momentos compartidos, las jornadas gastronómicas, cenas de los jueves, cenas

de los sábados, bodega, casas rurales, nocheviejas, viajes de finde a la playa, excursiones, cafés, cervezas, pinchos, risas...simplemente gracias a todos!!!

Gracias a Gloria, Aurelio y Alba, por acogerme en vuestra casa siempre como una más. Gracias también por interesaos por mi trabajo y por hacernos siempre la vida más fácil. Gracias Aurelio por las fotos de los geles que has hecho para esta tesis.

Gracias a mi familia, mamá, tato, tíos y yaya, pero gracias sobre todo a ti, mamá. Gracias por comprenderme, escucharme, aconsejarme y por confiar siempre en mí y en todas mis decisiones, gracias por ser como eres y transmitirme tus valores día a día. Me gustaría acordarme también de los que no están, papá, yayos, tíos, sé que estaríais orgullosos de mí. También me gustaría recordarte a ti, Clara, porque aunque te fuiste muy pronto, en el tiempo que te conocí me enseñaste a luchar y a no rendirme ante los problemas, muchas veces sin importancia real.

Y por último, gracias a ti, Luis, por ser mi compañero de viaje, por tu paciencia, comprensión y apoyo en todos los momentos. Por hacerme ver la vida desde otro punto de vista y por ser el motivo por el que sonreír cada día. Gracias también por la realización de algunas de las figuras y fotografías de esta tesis y por tu paciencia con los cambios de última hora.

Finalizar agradeciendo al Gobierno de Aragón (DGA-FSE) a través del proyecto PI0131/08, Ingeniería de tejidos para la regeneración de cartílago articular: influencia de factores mecánicos, y del Grupo de Cristales Líquidos y Polímeros (Grupo DGA E-04) y al IACS a través del Proyecto PIPAMER (10/015), mecanobiología e ingeniería de regeneración de cartílago, por la financiación económica que he recibido durante la realización de esta tesis doctoral.

Gracias a todos!!!!

ACRÓNIMOS

^{13}C -RMN	Resonancia Magnética Nuclear de carbono
^1H -RMN	Resonancia Magnética Nuclear de protón
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Alfa-MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
BA	β -alanina
bis-MPA	Ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CC	Ensayos mecánicos confinados
CGC	Concentración Crítica de Gelificación
CMC	Concentración Micelar Crítica
CMT	Temperatura Micelar Crítica
DCC	N,N'-diciclohexilcarbodiimida
DCU	N,N'-diciclohexilurea
DLS	Dynamic Light Scattering
DMAP	Dimetilamino piridina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DPTS	p-toluensulfonato de N,N-dimetilaminopiridinio
DSC	<i>(Differential Scanning Calorimetry)</i> Calorimetría Diferencial de Barrido
DTT	Ditiotreitol
ECM	<i>(Extracellular Matrix)</i> Matriz Extracelular
EDMA	Dimetacrilato de etilenglicol
EE	Eficiencia de Encapsulación
EM	Espectrometría de Masas
EPR	<i>Enhanced Permeation Retention Effect</i>

FBS	<i>(Fetal Bovine Serum)</i> Suero fetal bovino
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FT-IR	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier
GL	Glicerol
GMA-chitosan	Quitosano metacrilado
GPC	<i>(Gel Permeation Chromatography)</i> Cromatografía de Permeación en Gel
HeLa	Células Homo Sapiens Cervix Adenocarcinoma
HEMA	Metacrilato de 2-hidroxietilo
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>
I2959	Irgacure 2959
IT	Ingeniería de Tejidos
LCF	Liberación Controlada de Fármacos
LCST	<i>Lower Critical Solution Temperature</i>
LSU	<i>Light Scattering Units</i>
MALDI-MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization- Mass Spectroscopy</i>
Mn	Peso molecular promedio en número
MSC	<i>(Mesenchymal Stem Cells)</i> Células Mesenquimales
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
Mw	Peso molecular promedio en peso
NC	Ensayos mecánicos no confinados
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCL	Policaprolactona
PDI	Índice de Polidispersidad
PEA	Poliesteramidas

PEG	Polietilenglicol
PEGDA	Diacrilato de polietilenglicol
PLA	Ácido poliláctico
PLGA	Ácido Poliláctico-co-glicólico
PNIPAAm	Poli-N-isopropilacrilamida
PPG	Polipropilenglicol
Py	Piridina
RGD	Arginina, glicina, ácido aspártico
RTG	<i>Reverse Thermal Gelation</i>
S.D.	Desviación estándar
SA	Ácido Succínico
SEM	<i>(Scanning Electron Mycroscopy)</i> Microscopía electrónica de barrido
TEA	Trietilamina
TEG	Tetraetilenglicol
TEM	<i>(Transmission Electronic Mycroscopy)</i> Microscopía electrónica de transmisión
TsOH	Ácido p-toluensulfónico monohidrato
UCST	<i>Upper Critical Solution Temperature</i>
UV	Ultravioleta
W_0	Peso inicial
W_t	Peso a tiempo t
β -TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
ΔG	Energía de Gibbs
ΔS	Entropía

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	1
1.1. HIDROGELES COMO MATERIALES PARA APLICACIONES EN BIOMEDICINA	3
1.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS HIDROGELES PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS	8
1.2.1. Hidrogeles con reticulación física	9
1.2.2. Hidrogeles con reticulación química	13
1.2.3. Hidrogeles nanoestructurados	22
1.3. PLURONIC Y SUS APLICACIONES BIOMÉDICAS	25
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO	39
2.1. OBJETIVOS	41
2.2. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO	45
CAPÍTULO 3. HIDROGELES DERIVADOS DE PLURONIC: POLIACRILATOS	49
3.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN	53
3.1.1. Derivado lineal	53
3.1.2. Derivados dendríticos	55
3.2. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES SOL-GEL	78
3.2.1. Método de inversión del vial	79
3.2.2. DSC	81
3.2.3. Discusión de los resultados	84
3.3. PREPARACIÓN DE HIDROGELES FOTOPOLIMERIZADOS	87
3.4. CARACTERIZACIÓN DE LA MORFOLOGÍA INTERNA POR SEM	89
3.5. ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE HIDROGELES FOTOPOLIMERIZADOS	92
3.6. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR	96
3.6.1. Resultados de viabilidad celular de derivados acrilados	100
3.6.2. Resultados de viabilidad celular de derivados con grupos bencilo e hidroxilo terminales	107

3.7. CARACTERIZACIÓN MECÁNICA	114
3.7.1. Ensayos de compresión uniaxial monotónica	116
3.7.2. Ensayos de compresión uniaxial de carga-relajación	119
3.7.3. Ensayos de fatiga	121
3.7.4. Comparación con propiedades mecánicas del cartílago	122
CAPÍTULO 4: HIDROGELES DERIVADOS DE PLURONIC: TIOL-ENOS	125
4.1. DERIVADOS DE PLURONIC CON GRUPOS TIOL TERMINALES	129
4.1.1. Síntesis y caracterización	129
4.1.1.1. Derivado lineal	129
4.1.1.2. Derivados tiolados dendríticos	134
4.1.2. Determinación de las propiedades sol-gel	141
4.1.2.1. Método de inversión del vial	142
4.1.2.2. DSC	144
4.1.2.3. Discusión de los resultados	147
4.1.3. Ensayos de viabilidad celular	148
4.2. FORMULACIONES DE DERIVADOS F127-SH-n Y RETICULANTES	
ACRILADOS	154
4.2.1. Materiales basados en mezclas de F127-SH-n con F127-Ac-n	154
4.2.1.1. Preparación de los hidrogeles precursores y estudio de su reticulación	155
4.2.1.2. Determinación de las propiedades sol-gel de hidrogeles polimerizables	164
4.2.1.3. Caracterización de la morfología interna por SEM	167
4.2.1.4. Degradación de hidrogeles fotopolimerizados	171
4.2.1.5. Ensayos de viabilidad celular	173
4.2.2. Materiales basados en mezclas de F127-SH-n con otros reticulantes acrilados	180
4.2.2.1. Preparación de los hidrogeles polimerizables e hidrogeles fotopolimerizados	181

4.2.2.2. Caracterización de la morfología interna por SEM de hidrogeles polimerizados basados en F127-NHAc-2	182
4.2.2.3. Degradación de hidrogeles fotopolimerizados	183
4.2.2.4. Ensayos de viabilidad celular	184
4.3. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE HIDROGELES FOTOPOLIMERIZADOS DEL CAPÍTULO 3 Y 4	186
CAPÍTULO 5: HIDROGELES NANOESTRUCTURADOS (NANOGELES)	189
5.1. PREPARACIÓN DE NANOGELES	195
5.1.1. Determinación de la CMC	195
5.1.2. Fotopolimerización de los nanogeles	198
5.1.3. Liofilización de los nanogeles fotopolimerizados	203
5.2. ENCAPSULACIÓN EN NANOGELES	205
5.3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	208
5.4. ENSAYOS CELULARES	219
5.4.1. Viabilidad celular	220
5.4.2. Ensayos de internalización	222
CAPÍTULO 6: PARTE EXPERIMENTAL	235
6.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS	239
6.2. PROTOCOLOS DE TRABAJO	259
6.3. MATERIALES Y TÉCNICAS	271
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES	275
ANEXOS	279
ANEXO I. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL	283
ANEXO II. CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES POR DSC	288
ANEXO III. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR	291

CAPÍTULO 1
ANTECEDENTES

1.1. HIDROGELES COMO MATERIALES PARA APLICACIONES EN BIOMEDICINA

Los **hidrogeles** son una clase de materiales capaces de retener una gran cantidad de agua como consecuencia de su estructura tridimensional, formada por estructuras poliméricas entrecruzadas.¹

A principios de los años 50, en la búsqueda de nuevos biomateriales, Wichterle y Lim iniciaron un programa pionero para el desarrollo de hidrogeles para aplicaciones biomédicas a partir de la copolimerización de metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) y dimetacrilato de etilenglicol (EDMA).² Estos materiales han mostrado numerosas aplicaciones en el campo de la oftalmología³ (Figura 1.1) y la cirugía plástica desarrollada a nivel clínico.⁴



Figura 1.1. Lentes de contacto de HEMA/EDMA.^{3a}

El éxito de estos materiales impulsó el desarrollo simultáneo de gran variedad de hidrogeles con otras aplicaciones biomédicas tales como la reparación de

¹ (a) Li, Y.; Rodrigues, J.; Tomas, H., *Chemical Society Reviews* **2012**, 41 (6), 2193-2221. (b) Kopeček, J., *Biomaterials* **2007**, 28 (34), 5185-5192.

² Wichterle, O., Lim, D., *Nature* **1960**, 185, 117-118.

³ (a) Kopeček, J., *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **2009**, 47 (22), 5929-5946; (b) Krejčí, L.; Harrison, R.; Wichterle, O., *Arch Ophthal* **1970**, 84 (1), 76-82.

⁴ Voldrich, Z.; Tománek, Z.; Vacík, J.; Kopeček, J., *J Biomed Mater Res* **1975**, 9 (6), 675-685.

cuerdas vocales dañadas, prevención de heridas tras cirugías y recubrimiento para tímpanos perforados.⁵

Debido al alto contenido en agua de estos materiales, que los hace similares a los tejidos naturales, su permeabilidad, porosidad, flexibilidad en la fabricación y posibilidad de variar su composición para obtener las propiedades físicas necesarias en función de la aplicación, o de diseño químico que permita su biocompatibilidad, los hidrogeles por sí mismos o combinados con células, han ampliado en la actualidad su espectro de aplicaciones biomédicas.^{1a} Así, los hidrogeles pueden servir de andamiajes o *scaffolds* que actúan como un soporte para el crecimiento celular,⁶ como materiales para la encapsulación de células,⁷ fármacos,⁸ proteínas⁹ o genes (terapia génica),¹⁰ como adhesivos entre tejidos y superficies de materiales,¹¹ como sistemas que permiten una respuesta reversible ante un estímulo externo¹² o como membranas porosas.¹³ En particular, campos tan activos como la Ingeniería de tejidos (IT)¹⁴ y su uso como

⁵ Kresa, Z.; Rems, J.; Witchterle, O., *Arch Otholaryngol* **1973**, *17*, 360.

⁶ (a) Puppi, D.; Chiellini, F.; Piras, A. M.; Chiellini, E., *Progress in Polymer Science* **2010**, *35* (4), 403-440; (b) Jagur-Grodzinski, J., *Polym. Adv. Technol.* **2010**, *21*, 27-47; (c) Khademhosseini, A.; Langer, R., *Biomaterials* **2007**, *28* (34), 5087-5092; (d) Drury, J. L.; Mooney, D. J., *Biomaterials* **2003**, *24* (24), 4337-4351.

⁷ Wang, C. M.; Varshney, R. R.; Wang, D. A., *Adv. Drug Delivery Rev.* **2010**, *62*, 699-710.

⁸ Hoare, T. R.; Kohane, D. S., *Polymer* **2008**, *49* (8), 1993-2007.

⁹ Vermonden, T.; Censi, R.; Hennink, W. E., *Chemical Reviews* **2012**, *112* (5), 2853-2888.

¹⁰ Oh, E. J.; Park, K.; Kim, K. S.; Kim, J.; Yang, J.-A.; Kong, J.-H.; Lee, M. Y.; Hoffman, A. S.; Hahn, S. K., *Journal of Controlled Release* **2010**, *141* (1), 2-12.

¹¹ (a) Sharma, B.; Fermanian, S.; Gibson, M.; Unterman, S.; Herzka, D. A.; Cascio, B.; Coburn, J.; Hui, A. Y.; Marcus, N.; Gold, G. E.; Elisseeff, J. H., *Science Translational Medicine* **2013**, *5* (167), 167ra6; (b) Strehin, I.; Nahas, Z.; Arora, K.; Nguyen, T.; Elisseeff, J., *Biomaterials* **2010**, *31* (10), 2788-2797.

¹² Alarcon, C. d. I. H.; Pennadam, S.; Alexander, C., *Chemical Society Reviews* **2005**, *34* (3), 276-285.

¹³ Yang, Q.; Adrus, N.; Tomicki, F.; Ulbricht, M., *Journal of Materials Chemistry* **2011**, *21* (9), 2783-2811.

¹⁴ (a) O'Brien, F. J., *Materials Today* **2011**, *14* (3), 88-94; (b) Spiller, K. L.; Maher, S. A.; Lowman, A. M., *Tissue engineering. Part B, Reviews* **2011**, *17* (4), 281-299 (c) Dankers, P. Y. W.; Meijer, E. W., *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **2007**, *80* (11), 2047-2073.

sistemas para transporte y Liberación controlada de fármacos (LCF),^{3a,15} han identificado a los hidrogeles como materiales con amplias posibilidades, e impulsado en gran medida su desarrollo.

Una de las primeras definiciones de la **Ingeniería de tejidos** fue establecida en 1993 por Kanger y Vacanti¹⁶ quienes la describieron como “*un campo interdisciplinar que aplica los principios de la ingeniería y de las ciencias de la vida con el objetivo de desarrollar sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren las funciones del tejido u órgano dañados*”.

Una de las líneas de trabajo de la IT es el uso de un andamiaje o *scaffold* como soporte de células en un entorno tridimensional (Figura 1.2).

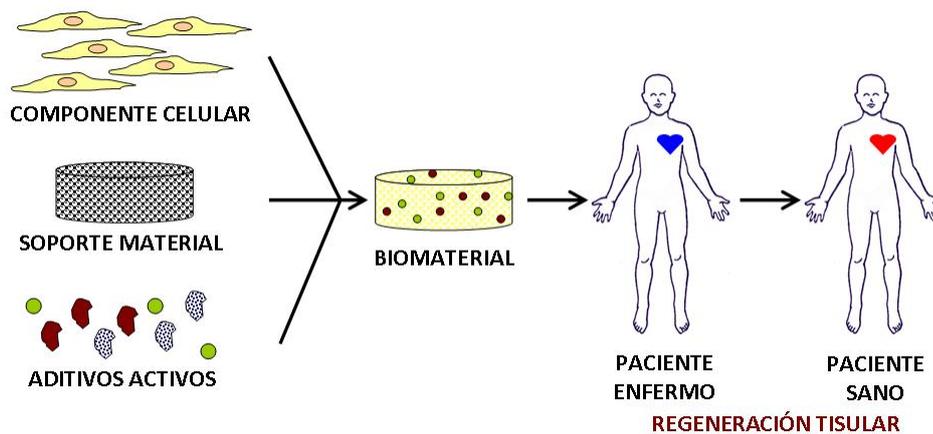


Figura 1.2. Esquema simplificado del concepto de Ingeniería de Tejidos (IT), extraído de la página web de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular.¹⁷

El andamiaje proporciona un entorno adecuado para la adhesión, proliferación, diferenciación (en el caso de utilizar células no diferenciadas) y formación de Matriz Extracelular (ECM) por parte de las células, actuando como “plantilla o template” para la regeneración de tejidos y órganos. Estos andamiajes con

¹⁵ Hamidi, M.; Azadi, A.; Rafiei, P., Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, 60 (15), 1638-1649.

¹⁶ Langer, R.; Vacanti, J. P., *Science* **1993**, 260, 920-926.

¹⁷ www.sebbm.es

células en su interior se pueden cultivar *in vitro* para sintetizar tejidos que son implantados *a posteriori* en el lugar dañado o *in vivo*, implantando el andamiaje con células directamente en el lugar dañado y utilizando el propio cuerpo humano para inducir la regeneración de tejidos y órganos. Así, la IT se ha utilizado para la sustitución de diferentes tejidos u órganos, entre los que se encuentran el hueso,¹⁸ el cartílago,¹⁹ los nervios,²⁰ los vasos sanguíneos,²¹ la piel²² y diferentes partes de los sistemas gastrointestinal o urogenital.²³

Para estos fines, el andamiaje o *scaffold* debe presentar una serie de características atendiendo a diferentes aspectos:^{14a}

- **Biocompatibilidad:** El andamiaje debe permitir la supervivencia y en el caso de ser necesario, posibilitar la diferenciación celular en su interior. Además, una vez implantado, el hidrogel debe tener una respuesta inmune negativa para impedir procesos de inflamación que conduzcan al rechazo del implante.
- **Biodegradabilidad:** Los andamiajes son implantes no permanentes, por lo que el hidrogel debe ser biodegradable. El objetivo final es que se produzca su degradación progresiva y simultánea con el crecimiento del nuevo tejido. Además los subproductos de la degradación no deben ser tóxicos y deben excretarse del cuerpo sin interferir con otros órganos.

¹⁸ Williams, J. M.; Adewunmi, A.; Schek, M. R.; Flanagan, C. L.; Krebsbach, P. H., *Biomaterials* **2005**, 26 (23), 4817-4827.

¹⁹ Mercier, N. R.; Constantino, H. R.; Tracy, M. A.; Bonassar, L. J., *Biomaterials* **2005**, 26 (14), 1945-1952.

²⁰ Lietz, M.; Dreesmann, L.; Hoss, M.; Oberhoffner, S.; Scholloschauer, B., *Biomaterials* **2006**, 27 (8), 1425-1436.

²¹ Vaz, C. M.; Van Tuijl, S.; Bouten, C. V. C.; Baaijens, F. T. P., *Acta Biomaterialia* **2005**, 1 (5), 575-582.

²² Dai, N. T.; Williamson, M. R.; Khammo, N.; Adams, e. F.; Coombes, A. G. A., *Biomaterials* **2004**, 25 (18), 4263-4271.

²³ Kim, S. S.; Kaihara, S.; Benvenuto, M. S.; Choi, R. S.; Kim, B. S.; Mooney, D. J., *Transplantation* **1999**, 67 (2), 227-233.

- Propiedades mecánicas: El andamiaje debe tener unas características mecánicas adecuadas para el lugar en el que va a ser implantado. El andamiaje es un material que debe actuar como sustituto temporal del tejido dañado, por lo que ha de imitar lo mejor posible las condiciones *in vivo*.
- Arquitectura del andamiaje: Estos sistemas deben poseer una estructura de poros interconectados entre sí y una elevada porosidad, con tamaños de poro adecuados que permitan la supervivencia celular así como, una adecuada difusión de nutrientes y productos de desecho.
- Tecnología de producción del andamiaje: La fabricación del andamiaje debe ser rentable y debe ser escalable desde un nivel de laboratorio hasta un nivel industrial.

En cuanto al uso de hidrogeles como **sistemas para el transporte y Liberación controlada de fármacos**, existen numerosos inconvenientes para lograr un transporte efectivo y una liberación regulada del fármaco, con el fin de lograr un efecto terapéutico en humanos o animales. Por ejemplo, una liberación controlada ideal supone que la dosificación del fármaco se produzca de forma constante y prolongada en el tiempo, sin exceder los límites de toxicidad y superando el nivel efectivo mínimo (Figura 1.3).²⁴

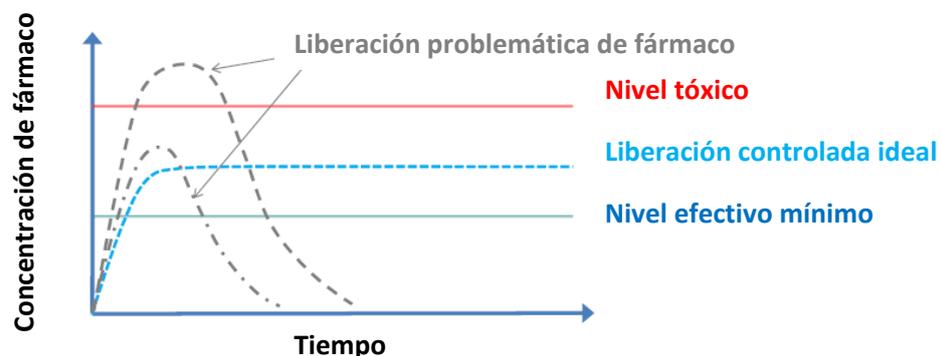


Figura 1.3. Perfil de liberación controlada ideal (línea punteada en color azul) y liberación no controlada (línea punteada en color gris).²⁴

²⁴ Ward, M. A.; Georgiou, T. K., *Polymers* **2011**, 3 (3), 1215-1242.

Para conseguir una liberación controlada de un fármaco y para mejorar bajas solubilidades, degradaciones, tiempos de circulación en el torrente sanguíneo bajos, así como reducir la toxicidad o controlar la penetración de los fármacos a través de las barreras biológicas, se ha propuesto el uso de transportadores de fármacos, la mayoría de los cuales están basados en materiales poliméricos.²⁵

Estos transportadores de fármacos pueden ser diseñados para proporcionar la liberación del medicamento en función de las necesidades terapéuticas. En esta línea, los hidrogeles^{6b} en sus diferentes variedades, por ejemplo los hidrogeles nanoestructurados^{15, 26} (identificados como Nanogeles®, marca registrada por Supratech Pharma Inc. Montreal, Canadá), poseen características que los hacen muy interesantes como sistemas para el transporte y liberación controlada de fármacos.

1.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS HIDROGELES PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS

Los hidrogeles se pueden clasificar de diferentes formas dependiendo del criterio aplicado. En función del origen del gelificante que forma la red tridimensional, se identifican como naturales, sintéticos o hidrogeles híbridos (compuestos por mezclas de moléculas de origen natural y sintético). Si se considera la naturaleza química del entrecruzamiento de la red, se puede hablar de hidrogeles químicos, reticulados a través de enlaces covalentes e hidrogeles físicos, formados por interacciones de tipo físico.²⁷

²⁵ Ravichandran, R.; Sundarajan, S.; Venugopal, J. R.; Mukherjee, S.; Ramakrishna, S., *Macromolecular Bioscience* **2012**, *12* (3), 286-311.

²⁶ (a) Ramos, J.; Imaz, A.; Callejas-Fernandez, J.; Barbosa-Barros, L.; Estelrich, J.; Quesada-Perez, M.; Forcada, J., *Soft Matter* **2011**, *7* (11), 5067-5082; (b) Kabanov, A. V.; Vinogradov, S. V., *Angewandte Chemie-International Edition* **2009**, *48* (30), 5418-5429; (c) Hamidi, M.; Azadi, A.; Rafiei, P., *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60* (15), 1638-1649.

²⁷ Yu, L.; Ding, J. D., *Chemical Society Reviews* **2008**, *37* (8), 1473-1481.

En algunos casos, los dos tipos de interacciones, físicas y químicas, pueden coexistir en un mismo hidrogel.²⁸

Por otra parte, los hidrogeles pueden utilizarse con dimensiones macroscópicas, desde varias micras a varios centímetros, o en sistemas nanoestructurados, los citados nanogeles, que son dispersiones acuosas de nanopartículas de hidrogel.

En el caso de las aplicaciones biomédicas, el desarrollo y las características de los hidrogeles han estado claramente marcados por el tipo de aplicaciones al que se ha dirigido el material.

El trabajo recogido en esta Memoria está enfocado al desarrollo de hidrogeles físicos susceptibles de ser posteriormente reticulados químicamente mediante fotopolimerización, para ser procesados de forma macroscópica y utilizados como soportes en cultivo celular, y procesados de forma nanoestructurada, como nanogeles, para su utilización en transporte y Liberación controlada de fármacos.

Por dicho motivo, a continuación se recogen los aspectos más importantes de estos tipos de hidrogeles, así como antecedentes recientes relacionados con el planteamiento del presente trabajo.

1.2.1.- Hidrogeles con reticulación física

Los hidrogeles físicos se caracterizan por estar constituidos por estructuras tridimensionales generadas mediante interacciones no covalentes, como por ejemplo, interacciones electrostáticas,²⁹ hidrófobas³⁰ o interacciones por enlaces de hidrógeno,³¹ siendo esta estructura tridimensional capaz de retener agua.

²⁸ (a) Klouda, L.; Hacker, M. C.; Kretlow, J. D.; Mikos, A. G., *Biomaterials* **2009**, *30* (27), 4558-4566; (b) Hacker, M. C.; Klouda, L.; Ma, B. B.; Kretlow, J. D.; Mikos, A. G., S., *Biomacromolecules* **2008**, *9* (6), 1558-1570.

²⁹ Wang, Q.; Mynar, J. L.; Yoshida, M.; Lee, E.; Lee, M.; Okuro, K.; Kinbara, K.; Aida, T., *Nature* **2010**, *463* (7279), 339-343.

Dentro de los hidrogeles físicos tienen gran importancia en biomedicina aquellos que, en agua, sufren una transición de fase reversible debido a un estímulo externo como por ejemplo un cambio de temperatura, pH, campo eléctrico, concentración iónica, etc.

El trabajo de esta tesis doctoral se ha centrado en hidrogeles físicos termosensibles,³² cuyo comportamiento sol-gel depende de la temperatura. Este tipo de hidrogeles se pueden clasificar en dos tipos:

- Hidrogeles termosensibles positivos, que por encima de una temperatura se encuentran en el estado sol y su gelificación se produce en el proceso de enfriamiento, cuando se alcanza la denominada UCST (*Upper Critical Solution Temperature*).
- Hidrogeles termosensibles negativos, que por debajo de una temperatura se encuentran en el estado sol y su gelificación se produce en el proceso de calentamiento, cuando se alcanza la denominada LCST (*Lower Critical Solution Temperature*). Este fenómeno también se conoce como Gelificación Térmica Inversa (RTG, *Reverse Thermal Gelation*).

Durante las últimas décadas han adquirido especial importancia los hidrogeles inyectables, que permiten la formación del hidrogel *in situ*.^{32b, 33} La inyección es una técnica mínimamente invasiva que resulta favorable por su fácil administración y la mínima incomodidad que causa en el paciente. Por otra parte, la inyección del hidrogel en el lugar de implantación permite una mejor

³⁰ Liu, C. B.; Gong, C. Y.; Pan, Y. F.; Zhang, Y. D.; Wang, J. W.; Huang, M. J.; Wang, Y. S.; Wang, K.; Gou, M. L.; Tu, M. J.; Wei, Y. Q.; Qian, Z. Y., *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **2007**, 302 (1-3), 430-438.

³¹ Pal, A.; Basit, H.; Sen, S.; Aswal, V. K.; Bhattacharya, S., *Journal of Materials Chemistry* **2009**, 19 (25), 4325-4334.

³² (a) Klouda, L.; Mikos, A. G., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2008**, 68 (1), 34-45; (b) Jeong, B.; Kim, S. W.; Bae, Y. H., *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54 (1), 37-51.

³³ (a) Ruel-Gariépy, E.; Leroux, J.-C., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, 58 (2), 409-426

adaptación del andamiaje al tejido circundante. Los hidrogeles termosensibles negativos constituyen uno de los materiales más adecuados para el desarrollo de biomateriales inyectables.³⁴ Para las aplicaciones biomédicas de estos hidrogeles termosensibles inyectables, la LCST debe ser próxima a la temperatura fisiológica, permitiendo la inyección del precursor del hidrogel en el estado sol a baja temperatura y su gelificación a temperatura corporal, tal y como se muestra en la Figura 1.4.

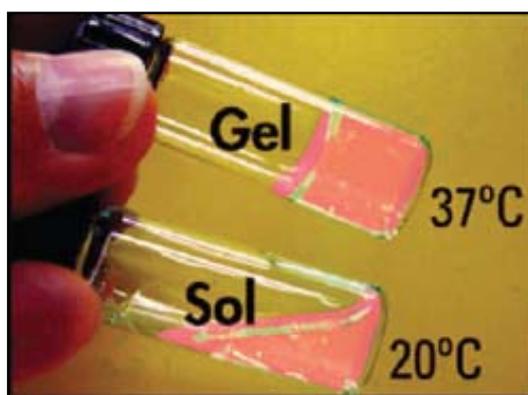


Figura 1.4. Proceso de gelificación inducido por el aumento de temperatura en un hidrogel termosensible de tipo negativo (con LCST).^{34a}

Para que un hidrogel sufra una transición sol-gel por efecto del aumento de temperatura, el gelificante constituyente del hidrogel debe poseer naturaleza anfífila, con un delicado balance hidrófobo e hidrófilo en su estructura que permita cambios de organización supramolecular en función de la temperatura.³⁵ La estructura química de algunos gelificantes, en concreto polímeros, se muestran en la Figura 1.5.

³⁴ (a) Moon, H. J.; Ko, D. Y.; Park, M. H.; Joo, M. K.; Jeong, B., *Chemical Society Reviews* **2012**, 41 (14), 4860-4883; (b) Sosnik, A., *Ars Pharm* **2007**, 48 (1), 83-102.

³⁵ Jeong, B.; Bae, Y. H.; Lee, D. S.; Kim, S. W., *Nature* **1997**, 388 (6645), 860-862.

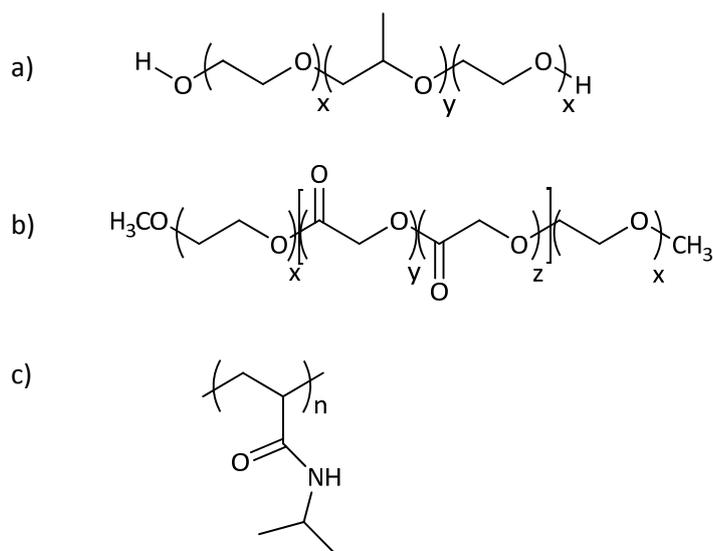


Figura 1.5. Estructura química de algunos polímeros capaces de gelificar en disolución por efecto de la temperatura, mediante transición sol-gel: a) Copolímero bloque de PEG-PPG-PEG (Pluronic® o Poloxamer®); b) Copolímero bloque de PEG-PLGA-PEG; c) poli-N-isopropil acrilamida.

Los polietilenglicoles (PEG) han sido ampliamente utilizados como segmento hidrófilo en el diseño de gelificantes anfífilos debido en parte a su biocompatibilidad y a su deshidratación dependiente de la temperatura. De esta forma se han descrito copolímeros bloque de polietilenglicol y polipropilenglicol (PEG y PPG (como Pluronic® o Poloxamer®),³⁶ copolímeros de polietilenglicol y poliésteres (como PEG con PLA (ácido poliláctico),³⁵ PEG con PCL (policaprolactona),³⁷ o PEG con PLGA (ácido poliláctico-co-glicólico).³⁸

Así mismo, otro tipo de cadenas poliméricas ampliamente utilizada en gelificantes para hidrogeles termosensibles ha sido la poli-N-isopropilacrilamida (PNIPAAm).^{28b, 39}

³⁶ Alexandridis, P.; Hatton, T. A., *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **1995**, 96 (1-2), 1-46.

³⁷ Bae, S. J.; Joo, M. K.; Jeong, Y.; Kim, S. W.; Lee, W.-K.; Sohn, Y. S.; Jeong, B., *Macromolecules* **2006**, 39 (14), 4873-4879.

³⁸ Jeong, B.; Lee, K. M.; Gutowska, A.; An, Y. H., *Biomacromolecules* **2002**, 3 (4), 865-868.

³⁹ Duarte, A. R. C.; Mano, J. F.; Reis, R. L., *Acta Biomaterialia* **2011**, 7 (2), 526-529.

1.2.2.- Hidrogeles con reticulación química

Como se ha indicado, los hidrogeles químicos se caracterizan por presentar reticulaciones de tipo covalente.

Las estrategias utilizadas para producir la reticulación química de hidrogeles han sido variadas, usando en muchos casos reacciones de polimerización clásicas, tales como reacciones entre monómeros con grupos reactivos complementarios (p.e. la adición de Michael, reacciones de cicloadición 1,3-dipolar catalizadas por Cu (I), formación de bases de Schiff, etc.)⁴⁰ o reacciones radicalarias, utilizando un iniciador térmico (polimerización térmica) o mediante un fotoiniciador (fotopolimerización).⁴¹ En el caso de hidrogeles diseñados para aplicaciones que implican la polimerización en condiciones fisiológicas, hay que tener en cuenta que el entrecruzado químico de estos materiales se debe producir sin causar daños a las células o moléculas que se encuentran combinadas con el hidrogel.

La **fotopolimerización** ha sido un procedimiento de reticulación muy aceptado en biomedicina ya que ofrece ventajas como el control espacial y temporal de la polimerización, elevadas velocidades de curado que van desde minutos a segundos, son reacciones que se pueden llevar a cabo a temperatura ambiente o fisiológica y producen muy poco calor. Así, la fotopolimerización o fotocurado de materiales se utiliza con éxito con agentes de sellado o restauraciones dentales⁴² o en el sellado de vasos sanguíneos mediante adhesivos fotopolimerizables.⁴³

La fotopolimerización precisa generalmente de la presencia de un **fotoiniciador**, que posee una alta absorción lumínica a una longitud de onda específica (luz visible o ultravioleta), generando los radicales libres iniciadores del proceso.

⁴⁰ Ko, D. Y.; Shinde, U. P.; Yeon, B.; Jeong, B., *Progress in Polymer Science* **2013**, *38* (3–4), 672-701.

⁴¹ Nguyen, K. T.; West, J. L., *Biomaterials* **2002**, *23* (22), 4307-4314.

⁴² Maffezzoli, A.; Della Pietra, A., *Biomaterials* **1994**, *15* (15), 1221-1228.

⁴³ Dumanian, G. A.; Dascombe, W.; Hong, C.; Labadie, K.; Garret, K.; Sawhney, A. S.; Pathak, C. P.; Hubbel, J. A.; Johnson, P. C., *Plast. Reconstr Surg* **1995**, *95*, 901-907.

Factores determinantes a la hora de seleccionar un fotoiniciador para la reticulación de hidrogeles incluyen su biocompatibilidad, solubilidad en agua y estabilidad.^{41, 44}

Aunque se han utilizado fotoiniciadores biocompatibles activos en el rango de la luz visible, como Eosin Y,⁴⁵ el fotoiniciador más utilizado para la fotopolimerización de hidrogeles en aplicaciones biomédicas es un fotoiniciador activo bajo luz ultravioleta, Irgacure 2959 (I2959), producto comercial, soluble en agua, cuya estructura química y proceso de generación de radicales libres se muestra en la Figura 1.6.⁴⁶ Se ha demostrado que la tolerancia de este fotoiniciador a diferentes concentraciones y para un gran número de líneas celulares, por ejemplo células mesenquimales (MSC), condrocitos (células que forman parte del cartílago natural) y osteoblastos (células de hueso), es elevada.⁴⁴

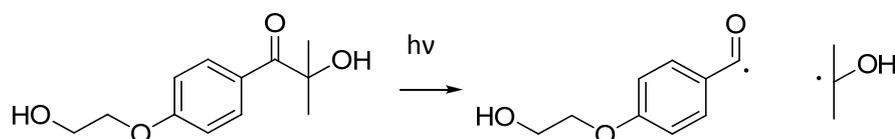


Figura 1.6. Estructura química del fotoiniciador Irgacure 2959 y formación de radicales libres por efecto de la luz.

En lo que respecta a los **gelificantes fotopolimerizables** utilizados en la producción de hidrogeles químicos, su variedad es amplia e incluyen tanto polímeros semisintéticos, es decir polímeros naturales modificados

⁴⁴ Williams, C. G.; Malik, A. N.; Kim, T. J.; Manson, P. N.; Elisseeff, J., *Biomaterials* **2005**, 26 (11), 1211-1218.

⁴⁵ Bahney, C. S.; Lujan, T. J.; Hsu, C. W.; Bottlang, M.; West, J. L.; Johnstone, B., *European Cells & Materials* **2011**, 22, 43-55.

⁴⁶ (a) You, Z.; Wang, Y., *Advanced Functional Materials* **2012**, 22 (13), 2812-2820; (b) Coutinho, D. F.; Sant, S. V.; Shin, H.; Oliveira, J. T.; Gomes, M. E.; Neves, N. M.; Khademhosseini, A.; Reis, R. L., *Biomaterials* **2010**, 31 (29), 7494-7502; (c) Vermonden, T.; Fedorovich, N. E.; van Geemen, D.; Alblas, J.; Van Nostrum, C. F.; Dhert, W. J. A.; Hennink, W. E., *Biomacromolecules* **2008**, 9 (3), 919-926.

químicamente para introducir grupos fotopolimerizables (p.e. grupos acrilato o metacrilato), como polímeros sintéticos.

Dentro de los polímeros semisintéticos se han descrito un gran número de polisacáridos naturales funcionalizados con grupos acrilato o metacrilato, como sulfato de condroitina,⁴⁷ ácido hialurónico,⁴⁸ quitosano,⁴⁹ heparina⁵⁰ o alginato.⁵¹ Todos ellos se han utilizado en la encapsulación de condrocitos o MSC con buenos resultados en cuanto a supervivencia y adhesión celular, debido a la presencia del polisacárido, y con propiedades mecánicas y de degradación controlables en función del grado de funcionalización con acrilatos o metacrilatos reactivos.

De nuevo, una de las estructuras químicas utilizadas en el diseño de gelificantes sintéticos con más éxito en aplicaciones biomédicas, y especial interés en el campo de la IT⁵² y de la encapsulación y LCF,⁵³ es el **Polietilenglicol (PEG)**, debido a su naturaleza hidrófila y biocompatibilidad. Los sistemas fotopolimerizables basados en PEG se componen principalmente de diacrilatos de PEG (PEGDA, Figura 1.7).

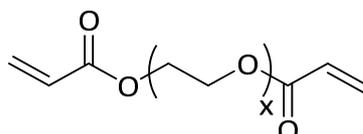


Figura 1.7. Estructura química de diacrilatos de PEG (PEGDA).

⁴⁷ Li, Q.; Williams, C. G.; Sun, D. D. N.; Wang, J.; Leong, K.; Elisseeff, J., *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2004**, *68*, 28-33.

⁴⁸ Nettles, D. L.; Vail, T. P.; Morgan, M. T.; Grinstaff, M. W.; Setton, L. A., *Annals of Biomedical Engineering* **2004**, *32*, 391-397.

⁴⁹ Amsden, B. G.; Sukarto, A.; Knight, D. K.; Shapka, S. N., *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3758-3766.

⁵⁰ Seto, S. P.; Casas, M. E.; Temenoff, J. S., *Cell and Tissue Research* **2012**, *347*, 589-601.

⁵¹ Jeon, O.; Bouhadir, K. H.; Mansour, J. M.; Alsberg, E., *Biomaterials* **2009**, *30*, 2724-2734.

⁵² Peppas, N. A.; Hilt, J. Z.; Khademhosseini, A.; Langer, R., *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1345-1360.

⁵³ Sawhney, A. S.; Pathak, C. P.; Hubbell, J. A., *Macromolecules* **1993**, *26*, 581-587.

La naturaleza no adhesiva del PEG lo ha hecho un candidato ideal para su uso con células no adherentes, como por ejemplo los condrocitos.⁵⁴ Sus hidrogeles se han utilizado para la encapsulación de estas células permitiendo, además de una elevada supervivencia celular, la secreción por parte de los condrocitos de proteoglicanos y colágeno, componentes estructurales de la ECM del cartílago.⁵⁵

Sin embargo, con células adherentes (MSC, osteoblastos, fibroblastos, etc.) se ha trabajado con moléculas de PEGDA funcionalizadas con la secuencia peptídica RGD (R: arginina, G: glicina, D: ácido aspártico). El RGD no solo promueve la adhesión celular sino que también puede ser utilizado para conseguir la respuesta selectiva de determinado tipo de células.⁵⁶ Así, un hidrogel tipo RGD-PEGDA se ha utilizado para la encapsulación de MSC, consiguiendo su diferenciación a osteoblastos, con producción de ECM compuesta por proteínas presentes en el hueso como la fosfatasa alcalina.⁵⁷

También se han descrito hidrogeles de mezclas de moléculas tipo PEGDA con productos naturales.⁵⁸ En 2013, Elisseeff *et al.* describieron uno de los materiales con más desarrollo en IT para regeneración de cartílago.¹¹ Este material es un sistema multicomponente (Figura 1.8).^{11b}

⁵⁴ Lee, J. H.; Lee, H. B.; Andrade, J. D., *Prog Polym Sci* **1995**, *20*, 1043-1079.

⁵⁵ (a) Elisseeff, J.; McIntosh, W.; Anseth, K.; Riley, S.; Ragan, P.; Langer, R., *Journal of Biomedical Materials Research* **2000**, *51* (2), 164-171; (b) Elisseeff, J.; Anseth, K.; Sims, D.; McIntosh, W.; Randolph, M. A.; Yaremchuk, M.; Langer, M., *Plast. Reconstr. Surg.* **1999**, *104* (4), 1014-1022.

⁵⁶ Hersel, U.; Dahmen, C.; Kessler, H., *Biomaterials* **2003**, *24* (24), 4385-4415.

⁵⁷ Yang, F.; Williams, C. G.; Wang, D.-a.; Lee, H.; Manson, P. N.; Elisseeff, J., *Biomaterials* **2005**, *26* (30), 5991-5998.

⁵⁸ Ouasti, S.; Donno, R.; Cellesi, F.; Sherratt, M. J.; Terenghi, G.; Tirelli, N., *Biomaterials* **2011**, *32* (27), 6456-6470.

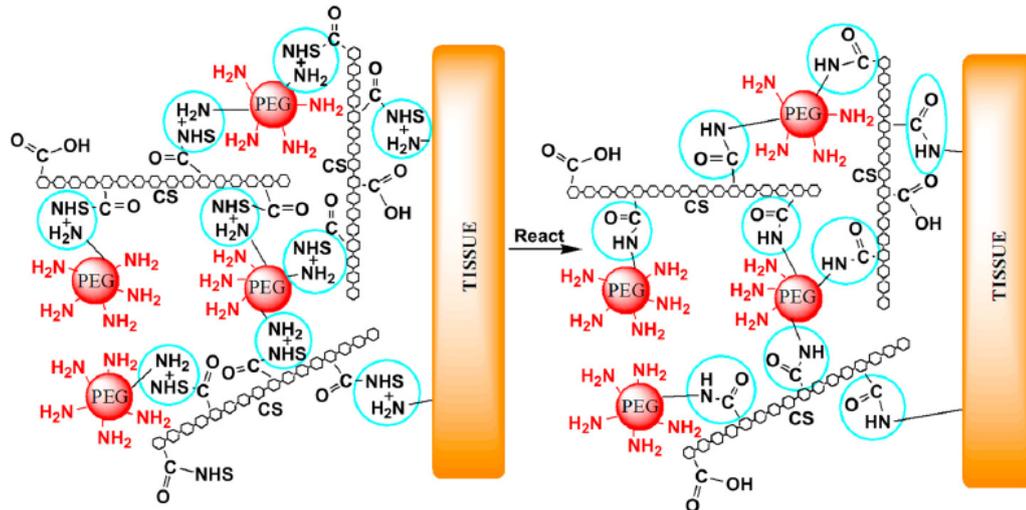


Figura 1.8. Adhesivo basado en sulfato de condroitina y PEGNH₂.^{11b}

Uno de los componentes es un adhesivo de sulfato de condroitina con grupos ácido terminales (activados en forma de N-hidroxisuccinimida), que se inyectó en el lugar del defecto del cartílago. Este adhesivo reacciona con el tejido circundante a través de los grupos amino terminales de las proteínas y también lo hace con otro componente, PEG que posee grupos terminales amino (PEGNH₂) Posteriormente, en el mismo lugar se inyectó una mezcla de ácido hialurónico+PEGDA que al fotopolimerizar *in situ* con luz ultravioleta forma el hidrogel. Este material compuesto rellenó completamente el defecto e interactuó con el tejido circundante por la presencia del adhesivo basado en sulfato de condroitina. Elisseff *et al.* han publicado ensayos clínicos piloto realizados con este material en 18 pacientes, demostrando la seguridad y posible aplicación clínica del material.^{11a}

Junto a estos diseños moleculares, la estructura de PEG también se ha incorporado en estructuras más complejas e innovadoras. Algunas de ellas, por su importancia, se comentan a continuación.

Grinstaff *et al.* propusieron la utilización de **copolímeros bloque híbridos dendrítico-lineales** basados en polímeros de PEG para la obtención de hidrogeles

fotopolimerizables.⁵⁹ Los híbridos dendrítico-lineales son estructuras poliméricas más complejas que combinan en su estructura cadenas lineales de polímero y segmentos dendríticos.⁶⁰

Centrándonos en estructuras dendríticas, de entre los diferentes tipos de estructuras dendríticas se distinguen los dendrímeros, que se caracterizan por ser macromoléculas altamente ramificadas que poseen tres partes fundamentales (Figura 1.9): el núcleo, las unidades de ramificación que dan lugar a las distintas generaciones (generación 1 (G1), generación 2 (G2), etc.); y la periferia, que permite la funcionalización con un gran variedad de grupos funcionales cuyo número está determinado por la generación del dendrímero.

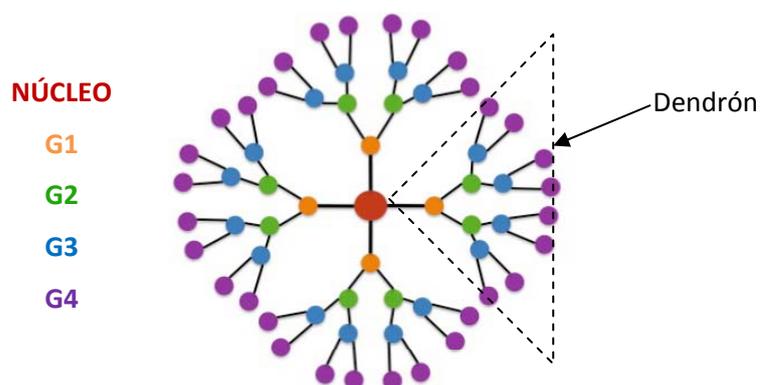


Figura 1.9. Estructura general de los dendrímeros y dendrones.⁶¹

Como estructuras dendríticas más sencillas, están los dendrones, consideradas como las unidades estructurales de un dendrímero (Figura 1.9). Se trata de moléculas ramificadas que poseen un grupo funcional reactivo como punto focal

⁵⁹ (a) Grinstaff, M. W., *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2008**, 46 (2), 383-400; (b) Degoricija, L.; Bansal, P. N.; Sontjens, S. H. M.; Joshi, N. S.; Takahashi, M.; Snyder, B.; Grinstaff, M. W., *Biomacromolecules* **2008**, 9 (10), 2863-2872; (c) Sontjens, S. H. M.; Nettles, D. L.; Carnahan, M. A.; Setton, L. A.; Grinstaff, M. W., *Biomacromolecules* **2006**, 7 (1), 310-316; (d) Carnahan, M. A.; Grinstaff, M. W., *JACS* **2001**, 123, 2905-2906.

⁶⁰ Gitsov, I., *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **2008**, 46 (16), 5295-5314.

⁶¹ Movellan, J., *Dendritic derivatives as building blocks for biomedical applications. Tesis doctoral*, **2013**.

y grupos funcionales en la periferia, cuyo número depende de la generación. La denominación utilizada para el número de generación así como los métodos utilizados para su síntesis son idénticos tanto para dendrímeros como para dendrones.

Los copolímeros bloque híbridos dendrítico-lineales se pueden sintetizar de forma divergente,⁶² cuando el crecimiento se produce desde uno o ambos extremos del polímero lineal hacia la periferia de la estructura dendrítica, o de forma convergente,⁶³ consistente en la síntesis de dendrones y su posterior acoplamiento a uno o ambos extremos del polímero lineal.

El diseño molecular propuesto por Grinstaff *et al.*, con una estructura de tipo ABA (Figura 1.10) dendrítico-lineal-dendrítico basada en PEG, permite la combinación de las propiedades del PEG, y las características de los dendrones, derivados de metabolitos naturales, como ácido succínico (SA), glicerol (GL) y β -alanina (BA). Por otra parte, la funcionalización de los extremos dendríticos con grupos terminales tipo metacrilato han permitido obtener polímeros fotopolimerizables.

La estructura dendrítica proporciona puntos de degradación en el hidrogel a través de los enlaces éster y carbamato así como numerosos grupos metacrilato fotopolimerizables en la periferia. Esta aproximación ha permitido disponer de un mayor número de grupos funcionales reactivos que puede dar lugar a un aumento de la densidad de entrecruzamiento, sin incrementar la concentración de polímero.^{59b}

⁶² Ihre, H.; Padilla De Jesús, O. L.; Fréchet, J. M. J., *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123* (25), 5908-5917.

⁶³ Ihre, H.; Hult, A.; Fréchet, J. M. J.; Gitsov, I., *Macromolecules* **1998**, *31* (13), 4061-4068.

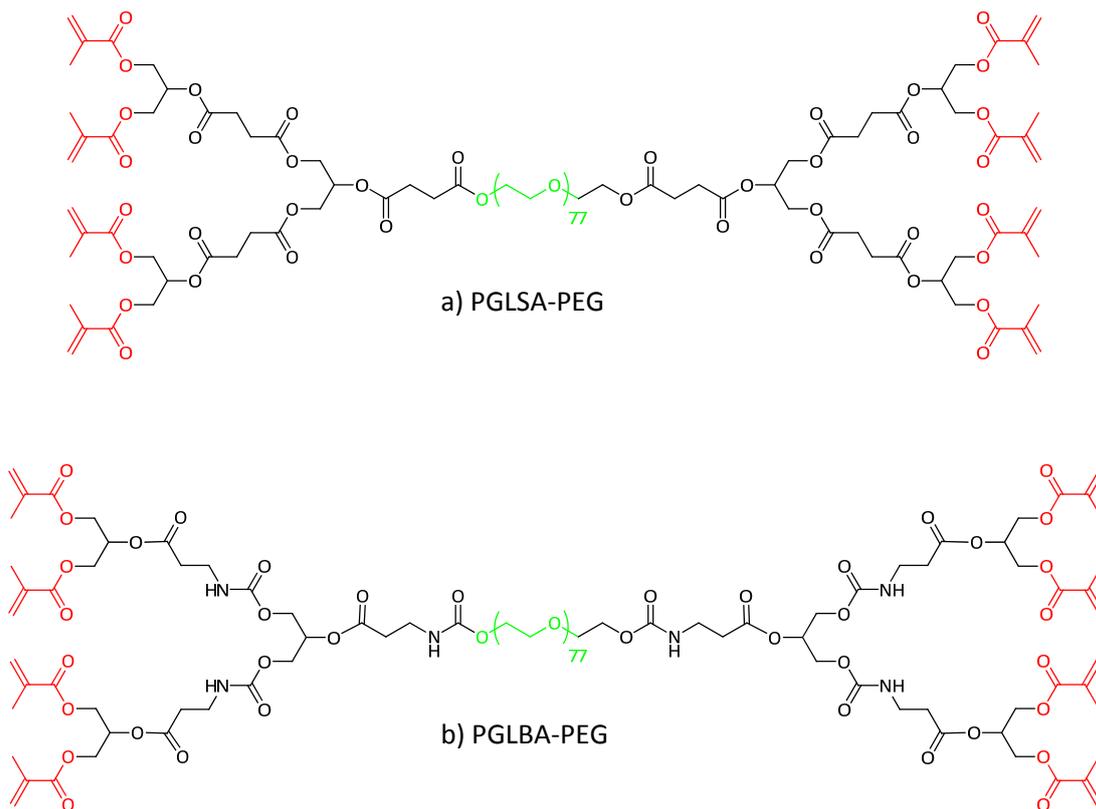


Figura 1.10. Copolímeros bloque dendrítico-lineal-dendrítico reactivos basadas en PEG y dendrones de: a) glicerol y ácido succínico; b) glicerol y β-alanina.⁵⁹

El hidrogel fotopolimerizado obtenido a partir del híbrido dendrítico-lineal PGLSA-PEG (Figura 1.10 (a)) se ha utilizado como adhesivo para el tratamiento de heridas en la córnea. Los estudios *in vivo* realizados en aves han demostrado una curación de dolencias con estos hidrogeles más rápida que con las suturas de nylon utilizadas habitualmente.^{59d, 64}

Los hidrogeles de PGLSA-PEG han sido también ensayados para la regeneración de cartílago.^{59c} Así, hidrogeles al 7.5 % y al 15 % (w/v) de PGLSA-PEG se han aplicado en la encapsulación de condrocitos *in vitro*. Con el hidrogel de menor concentración se logró generar una gran cantidad de ECM compuesta por proteoglicanos y colágeno secretados por los condrocitos. Sin embargo, este hidrogel se degradó rápidamente, lo que limita su aplicabilidad *in vivo*.

⁶⁴ Grinstaff, M. W., *Biomaterials* **2007**, 28 (35), 5205-5214.

Con el fin de mejorar las propiedades de degradación se han utilizado hidrogeles de PGLBA-PEG que combinan la presencia de enlaces tipo éster y tipo carbamato (Figura 1.10 (b)).^{59b} Estos hidrogeles presentan propiedades mecánicas que varían con la concentración de hidrogel, proporcionando en algunos casos valores de dureza y viscoelasticidad próximos a los del cartílago. Ensayos *in vivo* en conejos con hidrogeles al 10% (w/v), inyectados y fotopolimerizados en el defecto, mostraron una alta tolerancia, estabilidad estructural y producción de ECM por las células, tras 24 semanas.

Otra estrategia interesante de obtención de híbridos dendrítico-lineales multifuncionales ha sido propuesta recientemente por Malkoch *et al.*⁶⁵ El hidrogel está compuesto por una mezcla de dos componentes: uno de tipo PEG con dos grupos tiol terminales (Figura 1.11 (a)) y un híbrido dendrítico-lineal-dendrítico de PEG (Figura 1.11 (b)) con estructuras dendríticas que incorporan dobles enlaces C=C y unidades bioactivas enlazadas covalentemente (en color rosa). En este caso, la reticulación química se produce por adición del grupo tiol a un doble enlace (reacción de tiol-enos) a través de un mecanismo radicalario fotoiniciado con luz UV,⁶⁶ formándose así el hidrogel. Los autores han descrito una supervivencia de fibroblastos próxima al 100 % tras 7 días encapsulados en el interior del hidrogel.

⁶⁵ Oberg, K.; Hed, Y.; Joelsson Rahmn, I.; Kelly, J.; Lowenhielm, P.; Malkoch, M., *Chemical Communications* **2013**, 49 (62), 6938-6940.

⁶⁶ Hoyle, C. E.; Bowman, C. N., *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, 49 (9), 1540-1573.

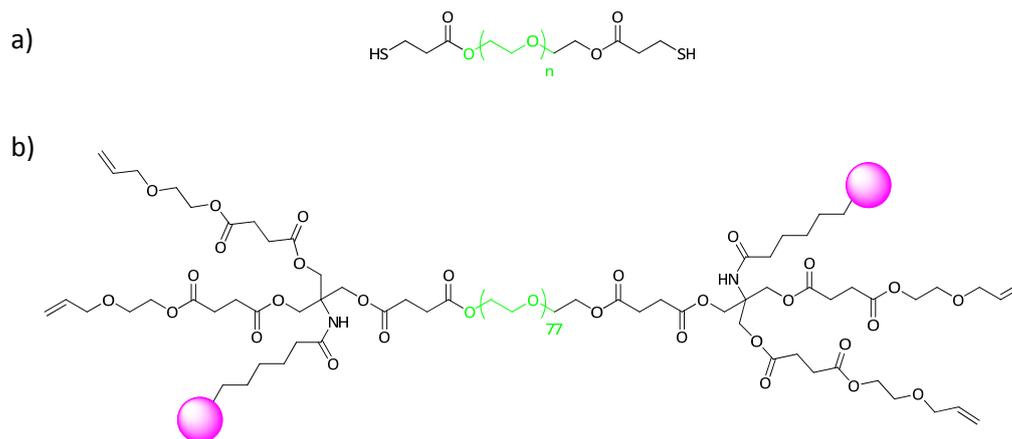


Figura 1.11. Componentes del hidrogel descrito por Malkoch *et al*,⁶⁵ a) derivado de PEG con grupos tiol terminales, b) Cadena de polietilenglicol con unidades dendríticas de glicerol, y en posiciones terminales con dobles enlaces y moléculas bioactivas (en color rosa).

1.2.3.- Hidrogeles nanoestructurados

Los hidrogeles nanoestructurados, también denominados Nanogeles[®], son dispersiones acuosas de partículas de hidrogel de tamaño nanométrico (10-1000 nm) que poseen las características de los hidrogeles macroscópicos y de las nanopartículas.^{15, 67} Los nanogeles, al igual que sus análogos macroscópicos, presentan hidrofiliidad, flexibilidad en su fabricación, versatilidad, gran capacidad de absorción de agua y biocompatibilidad.

Los métodos más habituales para la producción de nanogeles son la polimerización en microemulsión, la polimerización por microemulsión inversa o el entrecruzamiento de nanopartículas poliméricas autoensambladas.^{26b} Las polimerizaciones por microemulsión o microemulsión inversa utilizan emulsiones de aceite en agua o agua en aceite, que son sistemas relativamente complejos y requieren numerosos pasos de purificación para eliminar los monómeros y el iniciador en exceso. Por el contrario, el entrecruzamiento de estructuras de

⁶⁷ Saunders, B. R.; Vincent, B., *Adv. Colloid Interface Sci.* **1999**, *80* (1), 1-25.

tamaño nanométrico autoensambladas es una forma muy versátil de producción de nanogeles mediante el bloqueo de las estructuras preformadas.⁶⁸

Los nanogeles se han utilizado en diferentes campos biomédicos tales como el diagnóstico por imagen,⁶⁹ el diagnóstico por resonancia⁷⁰ o la Ingeniería de tejidos,⁷¹ pero el campo de aplicación más activo hoy en día es su uso como sistemas de transporte y liberación controlada de fármacos.^{15, 68a}

Para este fin, un nanogel debe poseer elevada capacidad de carga de fármaco, encapsulándolo por interacciones de tipo no covalente (interacciones iónicas, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrófobas, etc) o incorporándolos covalentemente a la matriz polimérica. La eficacia de encapsulación depende de la naturaleza del propio nanogel y de cómo la molécula a encapsular interaccione con el nanogel.^{68b}

El nanogel puede ser utilizado para mejorar la solubilidad, biodisponibilidad, toxicidad y/o estabilidad del fármaco en el interior del organismo vivo, así como para producir su liberación controlada en un lugar específico. También puede actuar como un sistema que mejora y facilita la internalización celular del fármaco con respecto al fármaco libre.⁷² Además, debe estar fabricado a partir de compuestos biodegradables que permitan una liberación controlada y prolongada en el tiempo a medida que el nanogel se va degradando.

⁶⁸ (a) Chacko, R. T.; Ventura, J.; Zhuang, S.; Thayumanavan, S., *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, *64* (9), 836-851; (b) Gonçalves, C.; Pereira, P.; Gama, M., *Materials* **2010**, *3* (2), 1420-1460.

⁶⁹ Peng, H. S.; Stolwijk, J. A.; Sun, L. N.; Wegener, J.; Wolfbeis, O. S., *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49* (25), 4246-4249.

⁷⁰ Oishi, M.; Sumitani, S.; Nagasaki, Y., *Bioconjugate Chemistry* **2007**, *18* (5), 1379-1382.

⁷¹ (a) Roux, R.; Ladavière, C.; Montembault, A.; Delair, T., *Materials Science and Engineering C* **2013**, *33* (3), 997-1007; (b) Hayashi, C.; Hasegawa, U.; Saita, Y.; Hemmi, H.; Hayata, T.; Nakashima, K.; Ezura, Y.; Amagasa, T.; Akiyoshi, K.; Noda, M., *J. Cell. Physiol.* **2009**, *220* (1), 1-7.

⁷² Chandna, P.; Saad, M.; Wang, Y.; Ber, E.; Khandare, J.; Vetcher, A. A.; A., S. V.; Minko, T., *Mol. Pharm* **2007**, *4* (5), 668-678.

Con el fin de conseguir una liberación del fármaco de forma controlada se han diseñado también nanogeles que responden a estímulos externos.⁷³ Este tipo de materiales son transportadores de fármacos activos que modifican su composición estructural o conformación, promoviendo la liberación controlada de las especies activas contenidas en el nanogel. Uno de los sistemas de este tipo más estudiado son los nanogeles termosensibles.⁷⁴

Para la preparación de nanogeles termosensibles se han utilizado materiales poliméricos que contienen en su estructura unidades termosensibles, tales como PNIPAAm⁷⁵ o Pluronic.⁷⁶ La presencia de los polímeros termosensibles confiere a los nanogeles la posibilidad de modificar su tamaño en función de la temperatura (Figura 1.12). Así, por debajo de su LCST, el polímero se encuentra hidratado y por tanto en su estado “hinchado”. En este estado los nanogeles presentan una estructura menos compacta que permite la fácil entrada y salida de la molécula encapsulada. Al aumentar la temperatura se produce la deshidratación de las cadenas de polímero, lo que supone la disminución de tamaño en la estructura del nanogel y la organización en una estructura más compacta, que retiene el fármaco, provocando su liberación de forma más lenta y controlada en el tiempo.^{68a,77}

⁷³ Fleige, E.; Quadir, M. A.; Haag, R., *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, 64 (9), 866-884.

⁷⁴ Pelton, R., *Adv. Colloid Interface Sci.* **2000**, 85 (1), 1-33.

⁷⁵ Cuggino, J. C.; Alvarez I, C. I.; Strumia, M. C.; Welker, P.; Licha, K.; Steinhilber, D.; Mutihac, R.-C.; Calderon, M., *Soft Matter* **2011**, 7 (23), 11259-11266.

⁷⁶ (a) Li, N.; Wang, J.; Yang, X.; Li, L., *Colloids and Surfaces b: Biointerfaces* **2011**, 83 (2), 237-244; (b) Kim, J. Y.; Choi, W. I.; Kim, Y. H.; Tae, G.; Lee, S. Y.; Kim, K.; Kwon, I. C., **2010**, 147 (1), 109-117; (c) Huang, S. J.; Sun, S. L.; Feng, T. H.; Sung, K. H.; Lui, W. L.; Wang, L. F., *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2009**, 38 (1), 64-73; (d) Missirlis, D.; Kawamura, R.; Tirelli, N.; Hubbell, J. A., *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2006**, 29 (2), 120-129; (e) Choi, S. H.; Lee, J. H.; Choi, S. M.; Park, T. G., *Langmuir* **2006**, 22 (4), 1758-1762; (f) Missirlis, D.; Tirelli, N.; Hubbell, J. A., *Langmuir* **2005**, 21 (6), 2605-2613.

⁷⁷ Yang, L.; Guo, C.; Jia, L.; Liang, X.; Liu, C.; Liu, H., *Journal of Colloid and Interface Science* **2010**, 350 (1), 22-29.

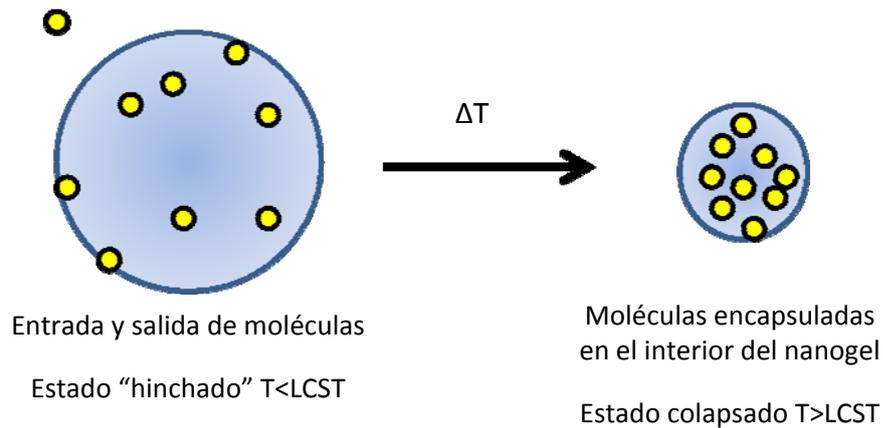


Figura 1.12. Esquema representativo del proceso de entrada y salida de fármacos en un nanogel producida por efecto de la temperatura.

1.3. PLURONIC Y SUS APLICACIONES BIOMEDICAS

En los apartados anteriores se ha podido comprobar que en la búsqueda de materiales para aplicaciones biomédicas, el Pluronic ha sido uno de los compuestos objeto de estudio en el campo de los hidrogeles termosensibles, debido a sus particulares características.

Con el término Pluronic® se identifica a un copolímero bloque genérico constituido por dos unidades de PEG, separadas por una unidad central de PPG (Figura 1.5(a)). Comercialmente están disponibles distintas variedades de Pluronic® (Pluronic® de BASF o Poloxamer de ICI) y en un amplio rango de pesos moleculares y longitudes de los bloques constituyentes.⁷⁸ Los distintos tipos de Pluronic, así como su nomenclatura, se presentan en la Figura 1.13.³⁶

⁷⁸ Pluronic and Tetronic Surfactants, Technical Brochure,. BASF Corp., Parsippany, NJ. 1989.

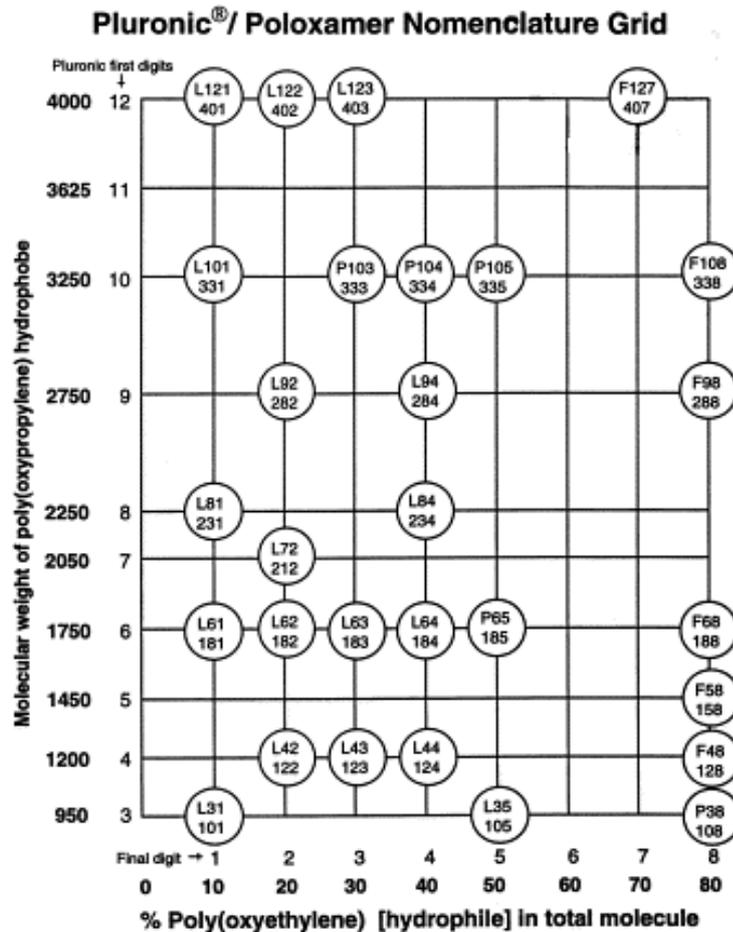


Figura 1.13. Variedades y nomenclatura de los copolímeros bloque de Pluronic®.³⁶

Los copolímeros que están situados en la misma columna de la representación de la Figura 1.13 presentan el mismo porcentaje del bloque de PEG, mientras que los copolímeros que se encuentran en la misma fila presentan un bloque de PPG del mismo peso molecular. La nomenclatura para los derivados de Pluronic comienza con las letras L (para Pluronic en estado líquido), P (para Pluronic en pasta) o F (para Pluronic en estado sólido, en forma de copos). Los dos primeros números son indicativos del peso molecular de la cadena hidrófoba de PPG, y van desde el número 3 para el copolímero con el menor peso molecular de PPG hasta el número 12 para el de mayor peso molecular de PPG (eje vertical en la Figura 1.13). El último número se refiere al porcentaje de PEG, y va desde el 1 para el menor porcentaje de PEG hasta 8 para el mayor porcentaje de PEG (eje horizontal en la Figura 1.13).

Una de las variedades de Pluronic es el Pluronic F127® (Figura 1.14). El número 12 hace referencia a que se trata de un copolímero bloque con un peso molecular del bloque de PPG de 4000 g/mol, mientras que el número 7 hace referencia a la presencia de un 70% de PEG en la molécula.

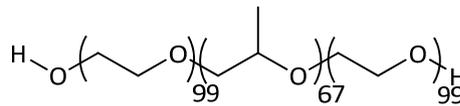


Figura 1.14. Estructura química de Pluronic F127®.

La mayoría de los copolímeros tipo Pluronic® presentan las siguientes características generales:

- En disoluciones acuosas son capaces de autoorganizarse formando micelas, las cuales consisten en un núcleo hidrófobo de PPG y una corona hidrófila de PEG (Figura 1.15). La autoorganización en micelas se produce a partir de una determinada concentración, denominada *Concentración Micelar Crítica* (CMC), que se define como la concentración mínima de material necesaria para dar lugar a micelas termodinámicamente estables. Otro parámetro fundamental es la *Temperatura Micelar Crítica* (CMT) que es la temperatura a partir de la cual se forman las micelas, siempre que el polímero se encuentre por encima de su CMC.

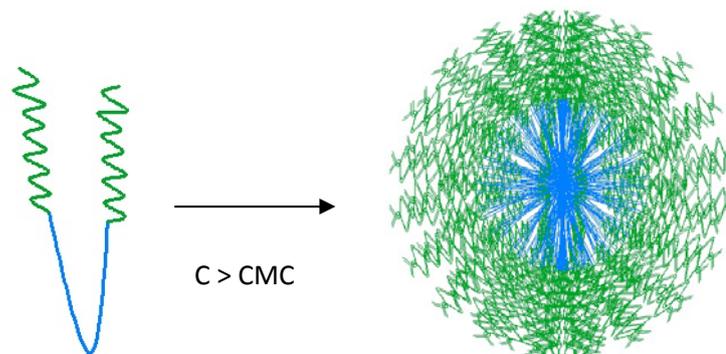


Figura 1.15. Esquema de la estructura micelar del Pluronic en agua, a concentraciones por encima de su Concentración Micelar Crítica (CMC). En color azul se representa el núcleo hidrófobo de PPG y en color verde la corona hidrófila de PEG.

- Las disoluciones acuosas a bajas concentraciones de Pluronic[®], debido a su capacidad de autoorganización en forma de micelas por encima de la CMC y debido a la presencia de su núcleo hidrófobo y su corona hidrófila, se han utilizado como sistemas de encapsulación de fármacos tanto hidrófobos, para mejorar su solubilidad en medio acuoso, como hidrófilos, para mejorar el tiempo de residencia en el torrente sanguíneo.⁷⁹
- Algunas de las variedades de Pluronic[®] disueltos en agua a altas concentraciones presentan gelificación termorreversible a partir de una *Concentración Crítica de Gelificación (CGC)*. Los factores que determinan la CGC, así como a la temperatura de transición sol-gel (LCST), son el peso molecular del polímero, su arquitectura molecular (longitud de los bloques y secuencia de bloques) y la presencia de especies iónicas en la disolución.⁸⁰

El mecanismo de la gelificación de Pluronic[®] sigue siendo un tema que despierta mucha controversia. Se han propuesto distintos mecanismos que tratan de explicar la transición sol-gel de este copolímero bloque, que se comentan a continuación.

Rassing y Attwood⁸¹ explicaron la gelificación del Pluronic por cambios intrínsecos en las propiedades micelares, como el número de agregación (número de moléculas que forman las micelas) y la simetría micelar.

⁷⁹ (a) Li, Y.-Y.; Li, L.; Dong, H. Q.; Cai, X. J.; Ren, T. B., *Materials science & engineering. C*, **2013**, 33 (5), 2698-707; (b) Yoncheva, K.; Calleja, P.; Agüeros, M.; Petrov, P.; Miladinova, I.; Tsvetanov, C.; Irache, J. M., *International Journal of Pharmaceutics* **2012**, 436 (1-2), 258-264.

⁸⁰ Lixin, F.; Degen, M.; Grupido, N.; Bendle, S.; Pennartz, P., *Materials Science and Engineering: A* **2010**, 528 (1), 127-136.

⁸¹ Rassing, D.; Attwood, D., *Ultrasound Int. J. Pharm.* **1983**, 13, 47-55.

Vadnere *et al.*⁸² atribuyeron la transición sol-gel a un cambio de entropía debido a la presencia de moléculas de agua ordenadas próximas a las cadenas hidrófobas de PPG. La presencia de moléculas de agua ordenadas alrededor de las cadenas hidrófobas minimiza el contacto agua-cadena hidrófoba. Para polímeros que presentan LCST, el aumento de temperatura permite la deshidratación de las cadenas hidrófobas, provocando un aumento del desorden en las moléculas de agua y por tanto un aumento de la entropía (ΔS), lo que hace que sea un proceso favorable (Energía de Gibbs, $\Delta G < 0$). En esta situación, las interacciones agua-polímero se hacen desfavorables mientras que se favorecen las interacciones agua-agua y polímero-polímero. Este fenómeno, que se conoce como “efecto hidrofóbico”,⁸³ es probablemente el mecanismo más aceptado para la explicación de la gelificación de disoluciones de Pluronic®.^{32a,84}

Años más tarde, Wanka *et al.*⁸⁵ propusieron la gelificación como una organización tridimensional estructurada. Las moléculas de polímero se autoorganizan en micelas por debajo de la LCST y por encima de la CMC. Al aumentar la temperatura hasta la LCST, se produce el empaquetamiento de micelas en una estructura ordenada formando mesofases líotropas cristal líquido.⁸⁶

Si bien al proceso de gelificación se le ha prestado atención, la transición gel-sol en un calentamiento posterior ha sido poco estudiada. No obstante, se ha propuesto que la transición gel-sol puede estar relacionada con el hinchamiento que experimentan las cadenas de PEG en las micelas, al aumentar la solubilidad con el incremento de temperatura.^{32b}

⁸² Vadnere, M.; Amidon, G.; Lindenbaum, S.; Haslam, J. L, *Int J Pharm* **1984**, *22*, 207-218.

⁸³ Southall, N. T.; Dill, A. D.; Haymet, D. J., *J. Phys. Chem. B*, **2002**, *106* (3), 521-533.

⁸⁴ Alexandridis, P.; Holzwarth, J. F.; Hatton, T. A., *Macromolecules* **1994**, *27* (9), 2414-2425.

⁸⁵ Wanka, G.; Hoffman, H.; Ulbricht, W., *J Colloid Interface Sci* **1990**, *268* (2), 101-117.

⁸⁶ Wanka, G.; Hoffman, H.; Ulbricht, W., *Macromolecules* **1994**, *27* (15), 4145-4159.

Estas características de las estructuras de Pluronic®, unidas a su biocompatibilidad, han hecho que en sus distintas variedades, estén presentes en productos de uso cotidiano tales como champús, enjuagues bucales, desmaquillantes-limpiadores faciales, cremas anti-acné, cremas antiinflamatorias,⁸⁷ etc.

Como se ha resaltado, en las últimas décadas, el Pluronic® ha sido uno de los copolímeros bloque más utilizados en IT y en sistemas de transporte y Liberación controlada de fármacos.⁸⁸ Sin embargo, y pese a las ventajas que presenta, estos copolímeros están lejos de ser considerados como un material ideal para hidrogeles inyectables, debido a que muestran tiempos de residencia cortos en el lugar del implante (<1 día), baja adhesión celular al material y baja biodegradabilidad de los bloques que lo componen. No obstante se considera que el Pluronic® con peso molecular inferior a 13000 g/mol es bioabsorbible por filtración a través del riñón.²⁷

Es por ello que para mejorar la biodegradabilidad, compatibilidad y adhesión celular, se han diseñado derivados de Pluronic® combinados con moléculas de origen natural⁸⁹ o con moléculas bioactivas,⁹⁰ utilizándolos en la preparación de hidrogeles termosensibles.

⁸⁷ Park, Y. J.; Yong, C. S.; Kim, H. M.; Rhee, J. D.; Oh, Y. K.; Kim, C. K.; Choi, H. G., *Int J Pharm* **2003**, 263 (1-2), 105-111.

⁸⁸ (a) Basak, R.; Bandyopadhyay, R., *Langmuir* **2013**, 29 (13), 4350-4356; (b) Lee, J. H.; Kim, J. H.; Oh, S. H.; Kim, S. J.; Hah, Y. S.; Park, B. W.; Kim, D. R.; Rho, G. J.; Maeng, G. H.; Jeon, R. H.; Lee, H. C.; Kim, J. R.; Kim, G. C.; Kim, U. K.; Byun, J. H., *Biomaterials* **2011**, 32 (22), 5033-5045; (c) Han, D. K.; Ahn, K. D.; Cha, S. H, **2007**, Patent number WO 2007/064152 A1; (d) Kumar, M.; Kumar, N.; Domb, A.; Arora, M., *Advances in Polymer Science*, **2002**, 160, 45-117 (e) Kavanov, a. V.; Alakhov, V. Y., *Critical reviews in therapeutic Drug Carrier Systems* **2002**, 19 (1), 1-73.

⁸⁹ Park, K. M.; Lee, S. Y.; Joung, Y. K.; Na, J. S.; Lee, M. C.; Park, K. D., *Acta Biomaterialia* **2009**, 5 (6), 1956-1965.

⁹⁰ (a) Park, k. M. P. K. D., *Macromolecular Research* **2008**, 16 (6), 517-523; (b) Huang, K.; Lee, B. P.; Ingram, D. R.; Messersmith, P. B., *Biomacromolecules* **2002**, 3 (2), 397-406.

Por ejemplo, Fang *et al.*⁹¹ describieron un derivado de Pluronic F127[®] modificado químicamente en sus extremos mediante la unión a un polisacárido natural como el alginato (Figura 1.16).

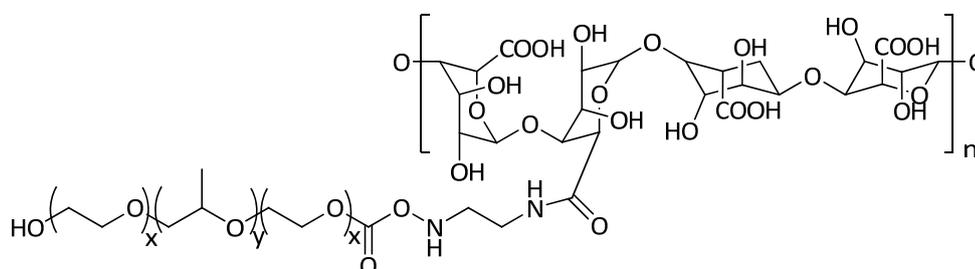


Figura 1.16. Estructura química del derivado Pluronic F127-Alginato descrito por Fang *et al.*⁹¹

Este derivado retiene las propiedades de gelificación de Pluronic F127[®] y mejora la biocompatibilidad debido a la presencia del alginato. Hidrogeles de Pluronic F127-alginato se han utilizado como soporte para la administración de forma tópica y liberación controlada de seleginina, fármaco indicado para el tratamiento de desordenes depresivos. Así mismo, se han utilizado en la dispensación, mediante inyección, de cis-platino en el tratamiento del cáncer. Estos hidrogeles mostraron una liberación controlada de cis-platino así como un aumento de la deposición de éste en zonas tumorales.⁹²

Rotonda *et al.*⁹³ combinaron Pluronic F127[®] con otro polisacárido natural, ácido hialurónico. La presencia de este ácido provoca la disminución de la temperatura de gelificación y mejora las propiedades de adhesión celular en el hidrogel. Por otra parte, la incorporación covalente adicional de una proteína bioactiva implicada en los procesos de proliferación celular y en procesos de

⁹¹ Chen, C. C.; Fang, C. L.; Al-Suwayeh, S. A.; Leu, Y. L.; Fang, J. Y., *International Journal of Pharmaceutics* **2011**, 415 (1-2), 119-128.

⁹² Fang, J. Y.; Hsu, S. H.; Leu, Y. L.; Hu, J. W., *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2009**, 20, 1031-1047.

⁹³ Mayol, L.; Quaglia, F.; Borzacchiello, A.; Ambrosio, L.; Rotonda, M. I. L., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2008**, 70 (1), 199-206.

diferenciación, la β -TGF (Transforming Growth Factor), favoreció la diferenciación celular de MSC a condrocitos y la producción en conejos de una matriz cartilaginosa en defectos de cartílago articular.⁹⁴

Con el fin de mejorar la estabilidad mecánica de hidrogeles basados en Pluronic® se han propuesto diferentes hidrogeles que combinan su termosensibilidad con la presencia en los componentes de grupos funcionales reactivos que permitan la formación de otra red tridimensional, entrecruzada químicamente. Con este fin, las reacciones más utilizadas en la preparación de hidrogeles derivados de Pluronic® mixtos (reticulación física + reticulación química), ha sido la fotopolimerización de grupos acrilatos o metacrilatos o la adición de grupos tiol (-SH) a dobles enlaces (C=C) deficientes en electrones (reacción tiol-eno), mediante un mecanismo iónico (adición de Michael) o por un mecanismo radicalario foto iniciado.^{41, 95}

La aproximación sintética más sencilla seguida para la obtención de este tipo de derivados de Pluronic® ha sido la funcionalización de los dos grupos hidroxilo terminales de la molécula de Pluronic® con grupos acrilato o metacrilato, y su entrecruzamiento por fotopolimerización consigo mismo⁹⁶ o con otros grupos reactivos de polímeros biodegradables, naturales⁹⁷ o sintéticos.⁹⁸

En esta línea, Park *et al.*⁹⁷ describieron un hidrogel termosensible y fotopolimerizable basado en una mezcla de diacrilato de Pluronic F127 y ácido hialurónico funcionalizado con grupos metacrilato. Estos autores prepararon un amplio número de hidrogeles, con diferentes densidades de entrecruzamiento y propiedades mecánicas, variando el tiempo de irradiación con luz ultravioleta.

⁹⁴ Jung, H. H.; Park, K.; Han, D. K., *Journal of Controlled Release* **2010**, 147 (1), 84-91.

⁹⁵ Tasdelen, M. A.; Yagci, Y., *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, 52 (23), 5930-5938.

⁹⁶ Lee, S. Y.; Tae, G., *Journal of Controlled Release* **2007**, 119 (3), 313-319.

⁹⁷ Chun, K. W.; Lee, J. B.; Kim, S. H.; Park, T. G., *Biomaterials* **2005**, 26, 3319-3326.

⁹⁸ (a) Park, J. H.; Moon, J. R.; Hong, K. H.; Kim, J. H., *Journal of Polymer Research* **2011**, 18 (2), 273-278; (b) Pang, X.; Chu, C. C., *Polymer* **2010**, 51 (18), 4200-4210.

Estos hidrogeles se utilizaron para encapsular ADN mediante la formación del hidrogel por efecto de la temperatura y la posterior fotopolimerización. Sus estudios demostraron que la liberación de ADN se producía durante 10 días, de forma lenta y controlada, con diferencias dependiendo del grado de entrecruzamiento del hidrogel.

Chu *et al.*^{98b} mezclaron diacrilato de Pluronic F68 con un polímero sintético biodegradable basado en poliesteramidas (PEA) con grupos acrilato, con el fin de disponer de hidrogeles termosensibles y fotopolimerizables (Figura 1.17).

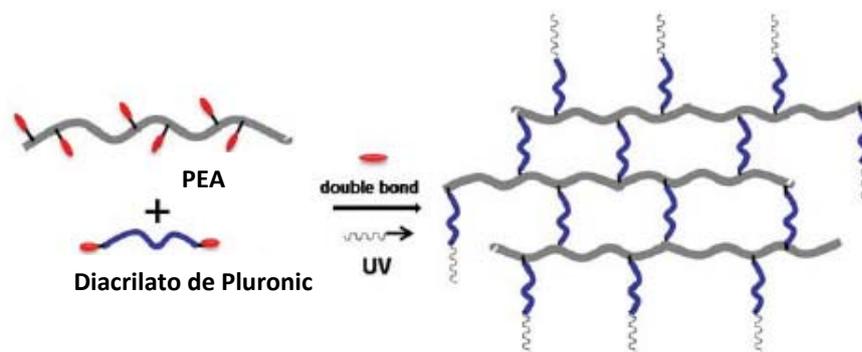


Figura 1.17. Representación esquemática del hidrogel fotopolimerizado basado en Poliesteramidas (PEA) y diacrilato de Pluronic F68, descrito por Chu *et al.*^{98b}

Han *et al.*^{88c, 99} han descrito otra aproximación diferente a la obtención de derivados fotopolimerizables de Pluronic®. Utilizando el copolímero Pluronic F68® y siguiendo el procedimiento que se muestra en la Figura 1.18, prepararon un derivado de Pluronic F68® con dos grupos metacrilato fotopolimerizables y dos estructuras peptídicas RGD, incorporadas para favorecer la adhesión celular. Estos materiales han sido objeto de dos patentes orientadas a su utilización en LCF e IT.^{88c, 99a}

⁹⁹ (a) Han, D. K.; Park, K.; Kim, J. J., **2010**, *Patent number WO 2007/064152 A1*; (b) Cha, M.-H.; Choi, J.; Choi, B. G.; Park, K.; Kim, I. H.; Jeong, B.; Han, D. K., *Journal of Colloid and Interface Science* **2011**, 360 (1), 78-85.

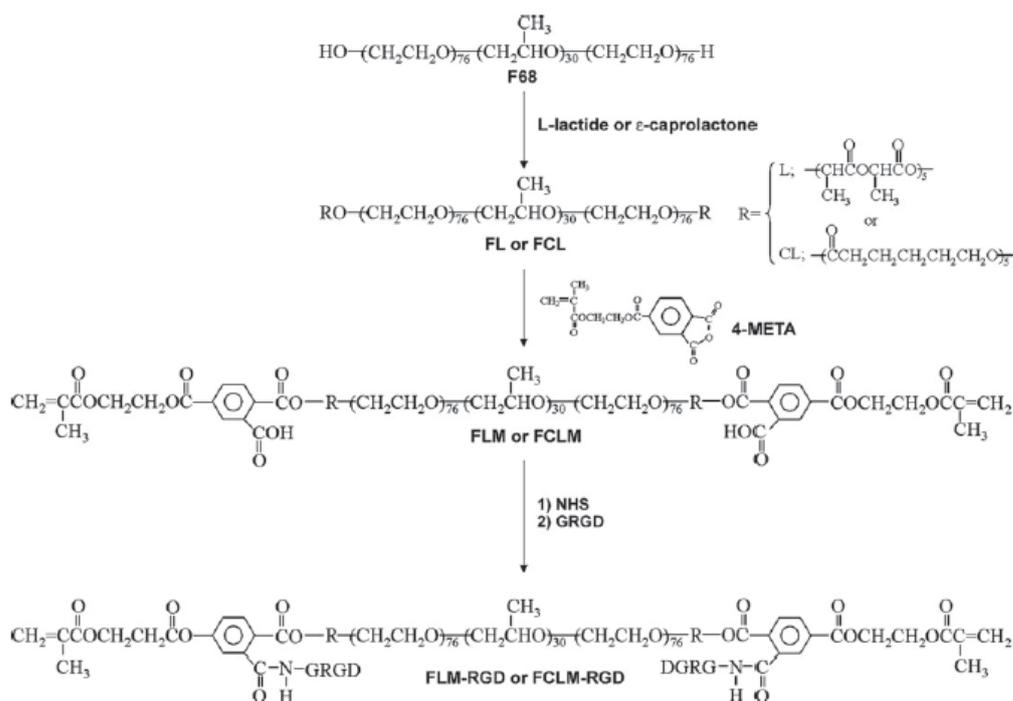


Figura 1.18. Ruta sintética de los copolímeros reactivos de Pluronic F68[®] descritos por Han *et al.*^{99a}

Como una alternativa a la fotopolimerización de acrilatos o metacrilatos, varios autores han utilizado la reacción de tiol-enos para la reticulación química de hidrogeles derivados de Pluronic[®]. Con este fin se han utilizado un significativo número de moléculas funcionalizadas con grupos tiol, para su interacción covalente con diacrilato de Pluronic, desde moléculas de origen natural, como por ejemplo dextrano tiolado,¹⁰⁰ hasta el propio Pluronic[®] con grupos tiol terminales.¹⁰¹

De forma general, en estos hidrogeles la reacción de tiol-enos se ha llevado a cabo en condiciones suaves (condiciones fisiológicas), dando lugar a materiales con buena biocompatibilidad y bajo grado de hinchamiento en entorno acuoso.

¹⁰⁰ (a) Lin, C.; Zhao, P.; Li, F.; Guo, F.; Li, Z.; Wen, X., *Materials Science and Engineering: C* **2010**, 30 (8), 1236-1244; (b) Niu, G.; Zhang, H.; Song, L.; Cui, X.; Cao, H.; Zheng, Y.; Zhu, S.; Yang, Z.; Yang, H., *Biomacromolecules* **2008**, 9 (10), 2621-2628.

¹⁰¹ (a) Cellesi, F.; Tirelli, N., *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2005**, 16 (6), 559-565; (b) Cellesi, F.; Tirelli, N.; Hubbell, J. A., *Biomaterials* **2004**, 25 (21), 5115-5124; (c) Cellesi, F.; Tirelli, N.; Hubbell, J. A., *Macromolecular Chemistry and Physics* **2002**, 203 (10-11), 1466-1472.

Si bien muchos ejemplos del uso del Pluronic® en hidrogeles han estado destinados a sus aplicaciones en IT, en la bibliografía se encuentran también ejemplos de nanogeles termosensibles, en concreto derivados de diacrilato de Pluronic, la mayoría de ellos obtenidos por fotopolimerización, algunos de los cuales se comentan a continuación.^{75b-f}

Tae *et al.*¹⁰² han descrito la preparación de nanogeles termosensibles por fotopolimerización de diacrilato de Pluronic F127. Los hidrogeles nanoestructurados fueron obtenidos en un solo paso por fotopolimerización de disoluciones diluidas del polímero por encima de la CMC, para garantizar el autoensamblaje en micelas. Los nanogeles conservan la naturaleza anfífila de las micelas, dando lugar a dominios hidrófobos e hidrófilos que permiten la encapsulación de fármacos de ambas naturalezas. Cabe destacar su gran capacidad y versatilidad de carga, ya que han permitido encapsular tanto proteínas como nanopartículas de oro. Estos nanogeles presentaron cambios de tamaño en función de la temperatura, variando de 460 ± 37 nm a 55 ± 5 nm con el aumento de 4 °C a 37 °C. Esta variación de tamaño se ha utilizado para producir una liberación de la proteína encapsulada a 37 °C de forma más sostenida en el tiempo que la que se produce a 4 °C, donde la proteína encapsulada se libera de forma rápida (Figura 1.19).

¹⁰² Choi, W. I.; Tae, G.; Kim, Y. H., *Journal of Materials Chemistry* **2008**, 18 (24), 2769-2774.

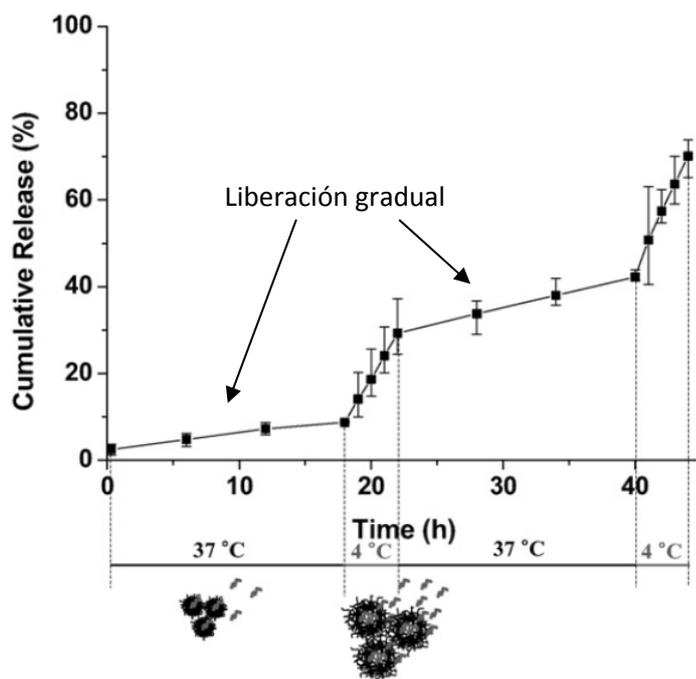


Figura 1.19. Liberación gradual a 37°C de una proteína fluorescente cargada en nanogeles de diacrilato de Pluronic F127, descrita por Tae *et al.*¹⁰²

En un estudio posterior de los mismos autores se demostró que los nanogeles facilitan la permeabilidad a través de la piel de proteínas como insulina o albúmina, manteniendo intacta la actividad de las mismas.¹⁰³

Así mismo, se han descrito nanogeles preparados a partir de la copolimerización de diacrilato de Pluronic con distintos polisacáridos naturales funcionalizados con grupos fotopolimerizables.^{76b, c, e}

Por ejemplo, Tae *et al.*^{76b} copolimerizaron diacrilato de Pluronic (F127 y F68) con el polisacárido quitosano, modificado químicamente con grupos metacrilato (Figura 1.20). Los nanogeles obtenidos mostraron baja citotoxicidad tras 24 horas, así como internalización en células tumorales.

¹⁰³ Choi , W. I.; Hyun Lee , J.; Kim , J. Y.; Kim , J.-C.; Kim , Y. H.; Tae , G., *Journal of Controlled Release* **2012**, *157*, 272-278.

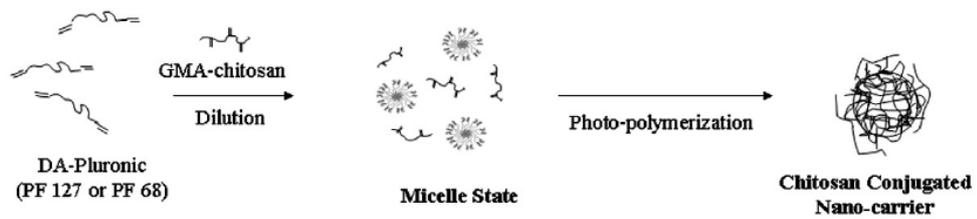


Figura 1.20. Esquema de síntesis de los nanogeles derivados de quitosano con grupos metacrilato (GMA-chitosan) y de diacrilato de Pluronic (DA-Pluronic).^{76b}

Siguiendo un procedimiento similar, Wang *et al.*^{76c} copolimerizaron diacrilato de Pluronic con sulfato de condroitina con grupos metacrilato, con resultados análogos a lo publicado por Tae *et al.*^{76b} en cuanto a citotoxicidad e internalización en células tumorales. Además estos nanogeles se utilizaron para encapsular y liberar de forma controlada Doxorubicina, un fármaco anticancerígeno hidrófobo, con un gran número de efectos secundarios cuando se administra de forma libre.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DE TRABAJO

2.1.- OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido el diseño, síntesis, preparación y caracterización de hidrogeles termosensibles y fotopolimerizables, para aplicación en Ingeniería de Tejidos y sistemas de encapsulación y Liberación controlada de fármacos.

Como se ha expuesto en el apartado de antecedentes, el diseño molecular de hidrogeles para aplicaciones biomédicas ha estado fuertemente condicionado por la aplicación última que se deseaba para estos materiales. En nuestro caso, junto al hecho de estar considerando materiales que deben gelificar en medio acuoso y combinar los requisitos propios de cualquier biomaterial, nuestro interés se ha centrado en hidrogeles termosensibles que permitan ser fotopolimerizados, con el fin de estabilizar estructuralmente tanto un soporte para Ingeniería de tejidos, como nanogeles para encapsulación y Liberación controlada de fármacos.

Basándonos en los antecedentes del tema y la propia experiencia del grupo de trabajo, el diseño químico elegido se ha centrado en copolímeros bloque dendrítico-lineal-dendrítico, cuya estructura se esquematiza en la Figura 2.1.

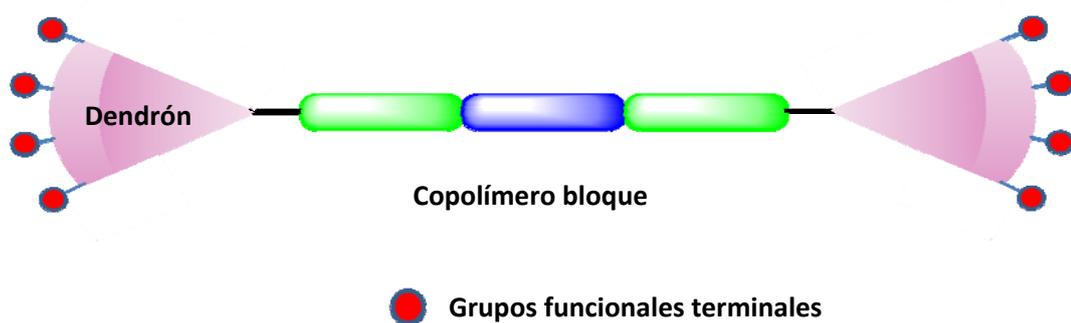


Figura 2.1. Diseño estructural de macromoléculas dendrítico-lineal-dendrítico objeto de estudio.

La estructura química de los compuestos propuestos presenta tres partes claramente diferenciadas: un núcleo lineal polimérico, que a su vez es un

polímero tribloque ABA (color verde y azul en la Figura 2.1), dos estructuras de tipo dendrítico en las posiciones terminales (color morado) y distintos grupos fotopolimerizables terminales que difieren en naturaleza química y en número (color rojo).

La estructura química propuesta de estos bloques responde a distintos aspectos.

Con el objetivo de conseguir compuestos con propiedades de autoensamblaje y termosensibilidad, se ha elegido un copolímero bloque de tipo Pluronic® como bloque lineal central, en concreto la variedad Pluronic F127®,^{79a, 88a, 104} uno de los más utilizados para aplicaciones biomédicas y aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) en diferentes aplicaciones en el campo farmacéutico para su uso *in vivo* en humanos:¹⁰⁵ disolución oftálmica,¹⁰⁶ administración oral¹⁰⁷ o uso tópico (Figura 2.2).

¹⁰⁴ (c) Manaspon, C.; Viravaidya-Pasuwat, K.; Pimpha, N., *Journal of Nanomaterials* **2012**; (d) Abdi, S. I. H.; Choi, J. Y.; Lee, J. S.; Lim, H. J.; Lee, C.; Kim, J.; Chung, H. Y.; Lim, J. O., *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **2012**, 9 (1), 1-9; (e) Antunes, F. E.; Gentile, L.; Oliviero Rossi, C.; Tavano, L.; Ranieri, G. A., *Colloids and Surfaces b: Biointerfaces* **2011**, 87 (1), 42-48; (f) Shachaf, Y.; Gonen-Wadmany, M.; Seliktar, D., *Biomaterials* **2010**, 31 (10), 2836-47.

¹⁰⁵ Approved drug products. Poloxamer 407 o Pluronic F127. USFDA, 2003, www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/igg/.

¹⁰⁶ Li, H.; Sung, K. C., *Journal of Controlled Release* **2000**, 69 (3), 379-388.

¹⁰⁷ Padilla, M.; Clark, G. T.; Merrill, R. L., *J. Am. Dent. Assoc.* **2000**, 131 (2), 184-195.

INACTIVE INGREDIENT	ROUTE; DOSAGE FORM	MAXIMUM POTENCY
POLOXAMER 407	OPHTHALMIC; SOLUTION	0.2%
POLOXAMER 407	OPHTHALMIC; SOLUTION, DROPS	0.16%
POLOXAMER 407	OPHTHALMIC; SUSPENSION, DROPS	0.101%
POLOXAMER 407	ORAL; CAPSULE, ENTERIC COATED PELLETS	5MG
POLOXAMER 407	ORAL; POWDER, FOR ORAL SUSPENSION	12.6%
POLOXAMER 407	ORAL; SOLUTION	1%
POLOXAMER 407	ORAL; SUSPENSION	0.05%
POLOXAMER 407	ORAL; TABLET	110MG
POLOXAMER 407	ORAL; TABLET, FILM COATED	106.7MG
POLOXAMER 407	PERIODONTAL; GEL	15.5%
POLOXAMER 407	TOPICAL; EMULSION, CREAM	1%
POLOXAMER 407	TOPICAL; GEL	0.2%
POLOXAMER 407	TOPICAL; SOLUTION	
POLOXAMER 407	TOPICAL; SUSPENSION, DROPS	0.101%

Figura 2.2. Concentraciones máximas permitidas de Pluronic F127® (Poloxamer 407) para distintas aplicaciones, aprobadas por la FDA.

Este copolímero posee un bloque de PPG con 67 unidades repetitivas y dos bloques de PEG de 99 unidades repetitivas cada uno (Figura 2.3). Pluronic F127® tiene un peso molecular de 12600 g/mol.

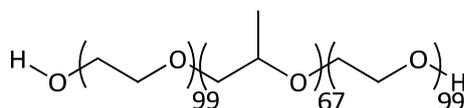


Figura 2.3. Estructura química de Pluronic F127®.

El Pluronic F127® se caracteriza por presentar una transición de fase sol-gel a temperatura fisiológica en una concentración del 16 % (w/v) en agua. Es uno de los derivados comerciales de Pluronic® que requiere una menor CGC para producir la transición sol-gel a temperatura fisiológica.

Como estructura dendrítica básica se ha optado por poliésteres basados en el ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico (bis-MPA) (Figura 2.4).

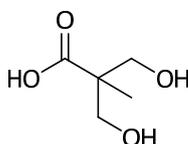


Figura 2.4. Estructura química de ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico (bis-MPA).

Los dendrímeros y dendrones de tipo poliéster basados en bis-MPA presentan una serie de características que los hacen candidatos ideales para aplicaciones biomédicas: son biocompatibles tanto *in vitro*¹⁰⁸ como *in vivo*, son solubles en entorno biológico y son capaces de degradarse por un proceso hidrolítico de los enlaces éster.^{108, 109} Por otra parte, la unidad monomérica de bis-MPA presenta en su estructura grupos hidroxilo que permiten su funcionalización con un gran número de grupos funcionales, mediante diferentes tipos de reacciones orgánicas.¹¹⁰ Así mismo, el grupo ácido en el punto focal posibilita su interacción con grupos funcionales como hidroxilo o amino de otras moléculas.

Como grupos funcionales terminales se ha optado por grupos fotoreactivos acrilato y tiol.

A pesar del creciente número de aplicaciones tanto del Pluronic®^{104a-b, 111} como de los poliésteres dendríticos¹¹⁰ de forma individual, hasta la fecha no se han descrito híbridos dendrítico-lineal-dendrítico que los combinen.

¹⁰⁸ Feliu, N.; Walter, M. V.; Montañez, M. I.; Kunzmann, A.; Hult, A.; Nyström, A.; Malkoch, M.; Fadeel, B., *Biomaterials* **2012**, *33* (7), 1970-1981.

¹⁰⁹ Zhang, H.; Patel, A.; Gaharwar, A. K.; Mihaila, S. M.; Iviglia, G.; Mukundan, S.; Bae, H.; Yang, H.; Khademhosseini, A., *Biomacromolecules* **2013**, *14* (5), 1299-1310.

¹¹⁰ Carlmark, A.; Malmstrom, E.; Malkoch, M., *Chemical Society Reviews* **2013**, *42* (13), 5858-5879.

¹¹¹ Wu, C.-J.; Gaharwar, A. K.; Chan, B. K.; Schmidt, G., *Macromolecules* **2011**, *44* (20), 8215-8224.

2.2.- PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

Para la consecución del objetivo principal de este trabajo de investigación se ha planteado la preparación de dos series diferentes de compuestos dendrítico-lineal-dendrítico que responden a la estructura antes comentada:

1.- Copolímeros bloque dendrítico-lineal-dendrítico derivados de Pluronic F127[®] y de dendrones de bis-MPA, y su análogo lineal, con grupos acrilato terminales (**Serie A**, Figura 2.5), que permitan la preparación de hidrogeles basados en poliacrilatos mediante polimerización fotoinducida.

2.- Copolímeros bloque dendrítico-lineal-dendrítico derivados de Pluronic F127[®] y de dendrones de bis-MPA, y su análogo lineal, con grupos tiol terminales (**Serie B**, Figura 2.6), que permitan la preparación de hidrogeles basados en tioles, mediante reacción fotoinducida. Para la incorporación de los grupos tiol se han seleccionado restos de tipo cisteamina unidos a los grupos hidroxilo terminales mediante enlaces carbamato.

Para la identificación de los diferentes compuestos lineales y dendrítico-lineal-dendrítico objeto de estudio de esta memoria se ha utilizado una nomenclatura **F127-GFT-n** como la indicada en las Figuras 2.5 y 2.6, que permite identificar la presencia de la estructura de Pluronic F127[®], la naturaleza química de los grupos funcionales terminales (GFT) y su número (n).

Por ejemplo, **F127-Ac-4** identifica al compuesto dendrítico lineal de Pluronic F127[®] funcionalizado con dendrones de bis-MPA de primera generación, que presenta cuatro grupos acrilato terminales.

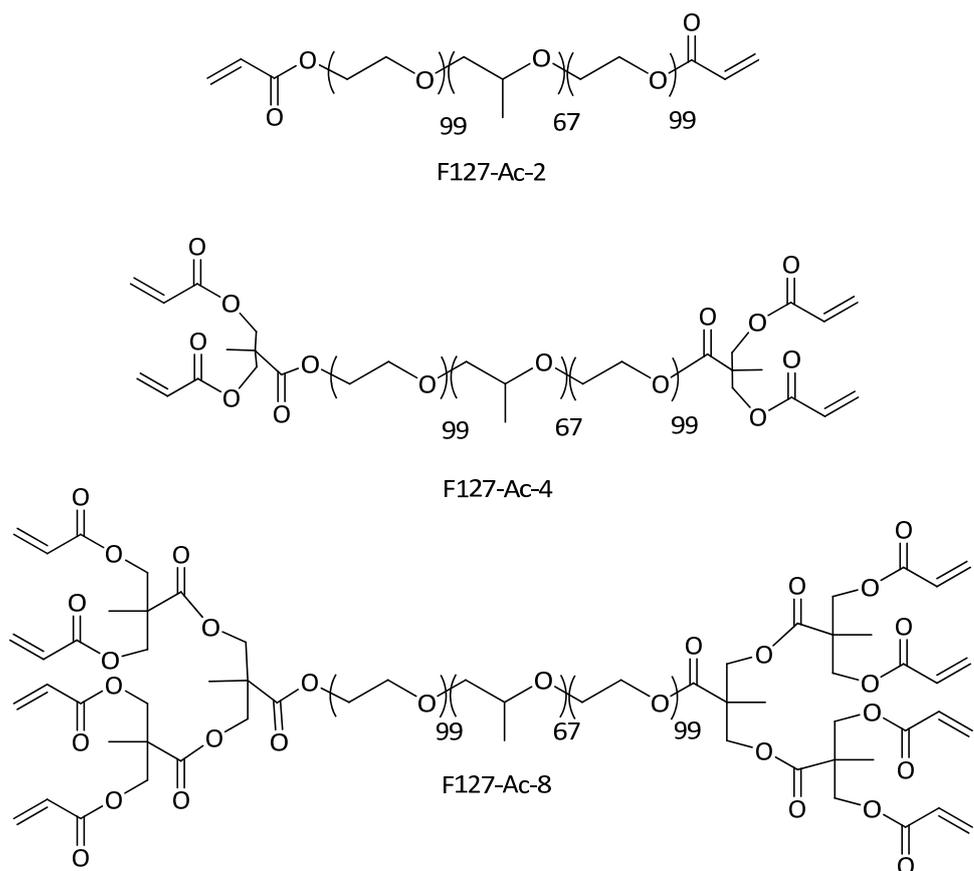


Figura 2.5. Estructura química y nomenclatura para las moléculas de la **Serie A** con grupos acrilato terminales.

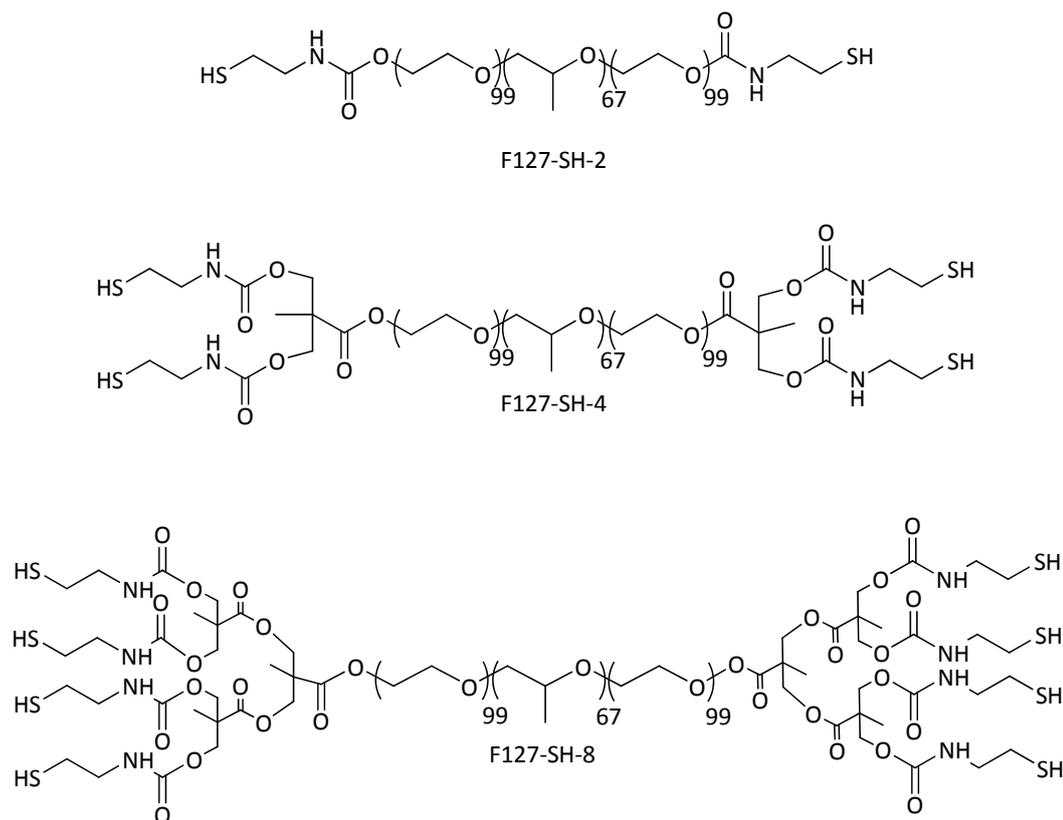


Figura 2.6. Estructura química y nomenclatura para las moléculas de la **Serie B** con grupos tiol terminales.

El plan de trabajo desarrollado ha implicado los siguientes apartados:

- Síntesis y caracterización estructural de las macromoléculas mediante diferentes técnicas experimentales (^1H -RMN, ^{13}C -RMN, FT-IR, EM y GPC).
- Determinación de las propiedades sol-gel de los materiales en función de la concentración en PBS (*Phosphate Buffer Saline*) y de la temperatura.
- Preparación de formulaciones binarias basadas en derivados acrilados y tiolados y determinación de sus propiedades sol-gel.

Con el fin de desarrollar **Materiales para aplicaciones en Ingeniería de Tejidos**, el trabajo desarrollado se ha concretado en:

- Preparación de hidrogeles macroscópicos por acción de la temperatura y por fotopolimerización.
- Caracterización de su morfología interna por SEM.
- Análisis de sus procesos de degradación.
- Estudios de viabilidad celular.
- Evaluación de sus propiedades mecánicas.

Con el fin de desarrollar **Materiales nanoestructurados para encapsulación (Nanogeles)**, el trabajo desarrollado ha sido:

- Determinación de la *Concentración Micelar Crítica* (CMC) de las moléculas.
- Preparación de nanogeles mediante fotopolimerización.
- Estudios de encapsulación de moléculas hidrófobas e hidrófilas.
- Estudio de la morfología y tamaño de los nanogeles por TEM/SEM y DLS.
- Estudios de viabilidad celular.
- Estudios de internalización de nanogeles en células.

CAPÍTULO 3

HIDROGELES DERIVADOS DE PLURONIC:

POLIACRILATOS

En este tercer capítulo de la Memoria se expone el trabajo desarrollado relativo a la preparación y caracterización de los diferentes derivados de Pluronic F127® que presentan como características estructurales: la utilización de enlaces de tipo éster en la unión entre el polímero y las estructuras dendríticas y de grupos acrilato como unidades reactivas terminales.

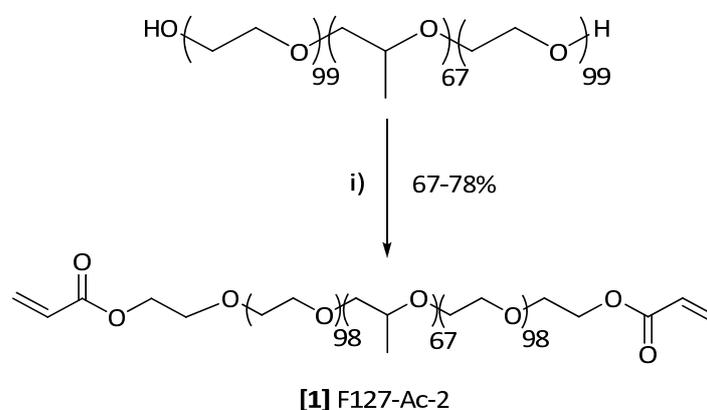
Para ello, la exposición de los resultados y su discusión se ha dividido en los siguientes apartados:

- *Síntesis y caracterización estructural* de los productos
- *Determinación de las propiedades sol-gel* de los productos
- *Preparación de los hidrogeles fotopolimerizados*
- *Caracterización morfológica de la estructura interna por SEM*
- *Estudio de la degradación de los hidrogeles fotopolimerizados*
- *Ensayos de viabilidad celular*
- *Caracterización mecánica de los hidrogeles fotopolimerizados*

3.1.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

3.1.1- Derivado lineal: F127-Ac-2

La introducción de grupos acrilato en la molécula comercial de Pluronic F127[®], para la obtención de F127-Ac-2, ha sido abordada por varios autores, utilizando diferentes procedimientos sintéticos.^{96-98, 101c} En nuestro trabajo, la acrilación se llevó a cabo utilizando cloruro de acrililoilo y trietilamina (TEA) como base (Esquema 3.1).



Esquema 3.1. Ruta sintética para la obtención de F127-Ac-2.
Condiciones de reacción: i) Cloruro de acrililoilo, TEA, diclorometano.

Ante la dificultad que presenta el seguimiento de la funcionalización de Pluronic F127[®] por los métodos cromatográficos habituales en química orgánica, se optó por utilizar ¹H-RMN como técnica de detección de las señales del nuevo grupo funcional introducido, así como por la FT-IR para la observación de las bandas de vibración de los enlaces característicos de cada compuesto. A continuación se comentan de forma detallada los espectros de ¹H-RMN así como los de FT-IR, que se complementan con otras técnicas adicionales en el caso de ser necesario.

En la parte inferior de la Figura 3.1 se muestra el espectro de ¹H-RMN de F127-Ac-2, así como el etiquetado de carbonos y sus correspondientes protones para Pluronic F127[®] y F127-Ac-2. Con respecto al del polímero comercial Pluronic F127[®] (parte superior Figura 3.1), en el espectro de F127-Ac-2 se

observó la aparición de dos señales características. Estas señales corresponden a los grupos acrilato unidos al polímero, que aparecen como 3 dobletes de dobletes entre 5.7 y 6.5 ppm (protones I, J y J') y la señal correspondiente a los protones de los grupos $-CH_2-$ de la cadena de PEG directamente unidos al enlace éster formado (protones G), triplete que aparece a 4.31 ppm.

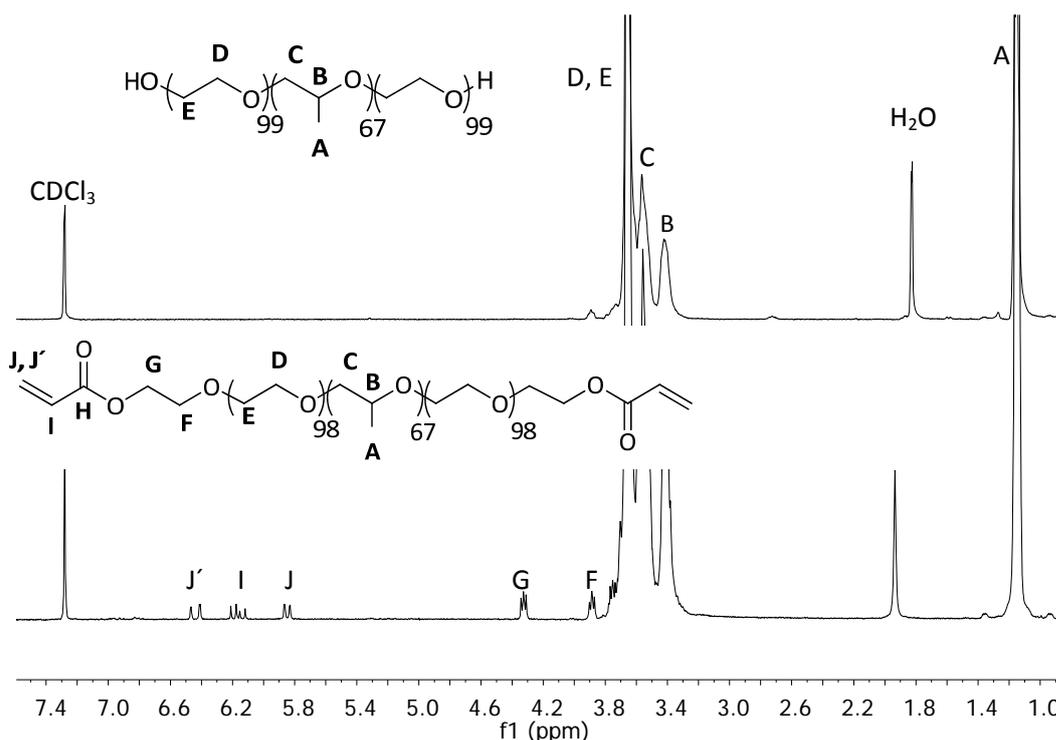


Figura 3.1. Espectros de ¹H-RMN de Pluronic F127[®] comercial (parte superior) y de F127-Ac-2 (parte inferior) en CDCl₃, 500 MHz.

Para comprobar la completa funcionalización de Pluronic F127[®], la integración de las nuevas señales, protones G (4H), I (2H), J (2H) y J' (2H), se correlacionó con la de los protones de los grupos metilo correspondientes al bloque de PPG de Pluronic F127[®], protones de tipo A, que integran por 201 protones y de los protones que corresponden a los grupos $-CH-$ del mismo bloque, protones de tipo B, que integran por 67 protones, constatando la proporción relativa esperada.

Mediante FT-IR se comprobó en el espectro de F127-Ac-2 la presencia de la vibración de tensión correspondiente al grupo carbonilo a 1724 cm⁻¹ (Figura 3.2).

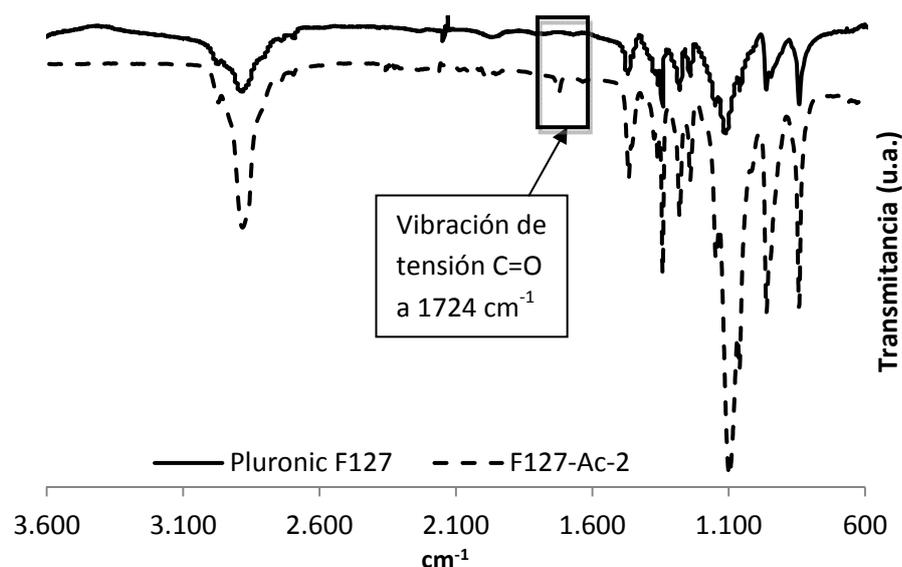


Figura 3.2. Espectros FT-IR de Pluronic F127® comercial y de F127-Ac-2, muestra preparada a partir del compuesto neto fundido sobre pastilla de NaCl.

3.1.2.- Derivados dendríticos: F127-Ac-4 y F127-Ac-8

Los aspectos más reseñables de la obtención de los diferentes compuestos dendríticos se discuten según los siguientes subapartados:

- a) *Crecimiento de la generación.*
- b) *Desprotección de los grupos hidroxilo por hidrogenolisis.*
- c) *Introducción de grupos acrilato.*
- d) *Caracterización por GPC y MALDI-MS.*

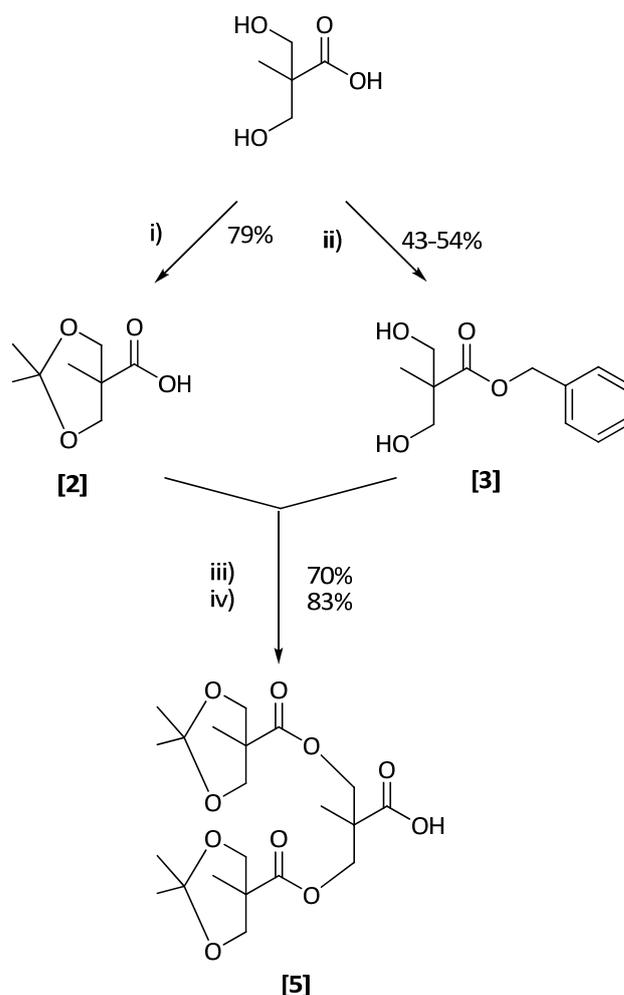
a) *Crecimiento de la generación*

Como se ha comentado en la introducción de esta memoria, existen varios métodos para la síntesis de estructuras dendríticas, el convergente y el divergente.

Para la obtención de los derivados dendrítico-lineales de Pluronic de primera y segunda generación se ensayó en primer lugar el método de síntesis convergente, ya que hasta el momento ha sido el procedimiento de síntesis de moléculas dendríticas más habitual utilizado en nuestro grupo, el grupo de

*Cristales líquidos y Polímeros.*¹¹² De forma general, este método consiste en el crecimiento de los dendrones derivados de bis-MPA y su posterior acoplamiento al núcleo central polimérico de Pluronic F127®.

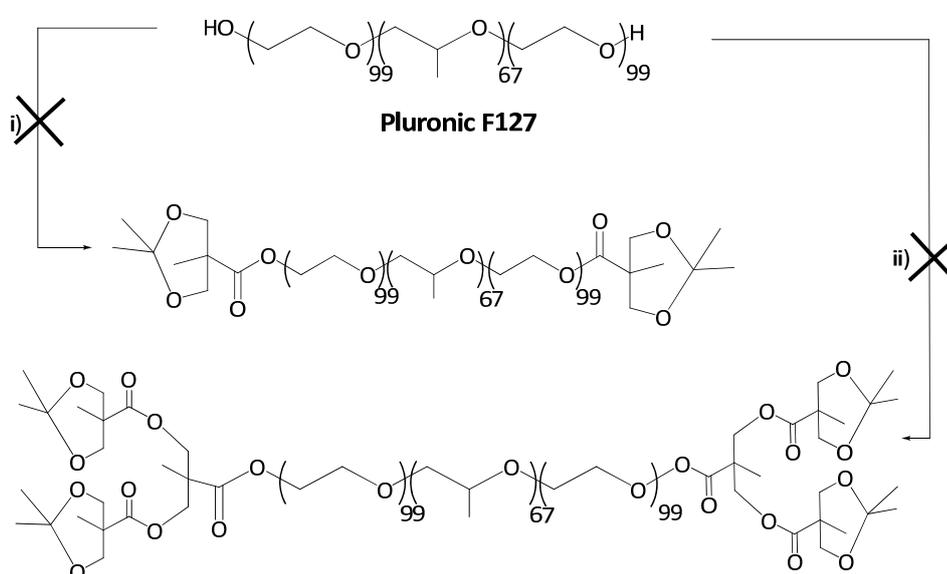
Para la síntesis de los ácidos dendríticos de bis-MPA de primera [2] y segunda generación [5] con los grupos hidroxilo protegidos en forma de acetal, se utilizó el método descrito por Hult (Esquema 3.2).⁶³



Esquema 3.2. Ruta sintética para la obtención de dendrones de primera [2] y segunda generación [5]. Condiciones de reacción: i) 2,2-dimetoxipropano, TsOH, acetona, ii) bromuro de bencilo, KOH, dimetilformamida, iii) DCC, DPTS, diclorometano, iv) Pd/C, acetato de etilo.

¹¹²(a) Blasco, E.; Barrio, J. d.; Sanchez-Somolinos, C.; Pinol, M.; Oriol, L., *Polymer Chemistry* **2013**, 4 (7), 2246-2254; (b) Blasco, E.; Barrio, J. d.; Piñol, M.; Oriol, L.; Berges, C.; Sánchez, C.; Alcalá, R., *Polymer* **2012**, 53 (21), 4604-4613; (c) del Barrio, J. s.; Oriol, L.; Alcalá, R.; Sánchez, C., *Macromolecules* **2009**, 42 (15), 5752-5760.

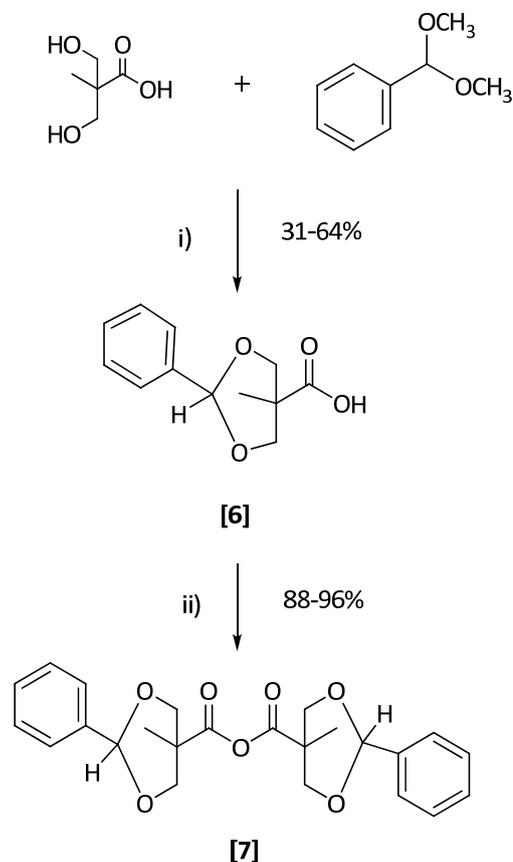
El acoplamiento de los dendrones de primera **[2]** y segunda generación **[5]** con Pluronic F127[®] se realizó por reacción de esterificación de Steglich entre los grupos ácido de los dendrones y los grupos hidroxilo de Pluronic F127[®] (Esquema 3.3). Sin embargo, esta reacción no proporcionó la funcionalización completa del copolímero bloque, siendo imposible la separación del polímero sin funcionalizar o parcialmente funcionalizado, del completamente funcionalizado, como se pudo comprobar por la incorrecta correlación del valor de las integrales correspondientes a Pluronic F127[®] y las de los fragmentos dendríticos, en sus correspondientes espectros de ¹H-RMN.



Esquema 3.3. Ruta *sintética convergente* para la obtención de los derivados dendríticos de primera y segunda generación, con los grupos hidroxilo periféricos protegidos en forma de acetal. Condiciones de reacción: i) **[2]**, DCC, DPTS, diclorometano. ii) **[5]**, DCC, DPTS, diclorometano.

Estos resultados llevaron a plantear de forma alternativa el empleo del método de síntesis divergente utilizado por Fréchet⁶² para la obtención de copolímeros bloque dendrítico-lineal-dendrítico derivados de bis-MPA y PEG. En este caso, el crecimiento de generación se realiza directamente sobre el núcleo de PEG, alternando etapas de crecimiento de generación y desprotección. Para el crecimiento de generación se utiliza un anhídrido derivado de bis-MPA **[7]**

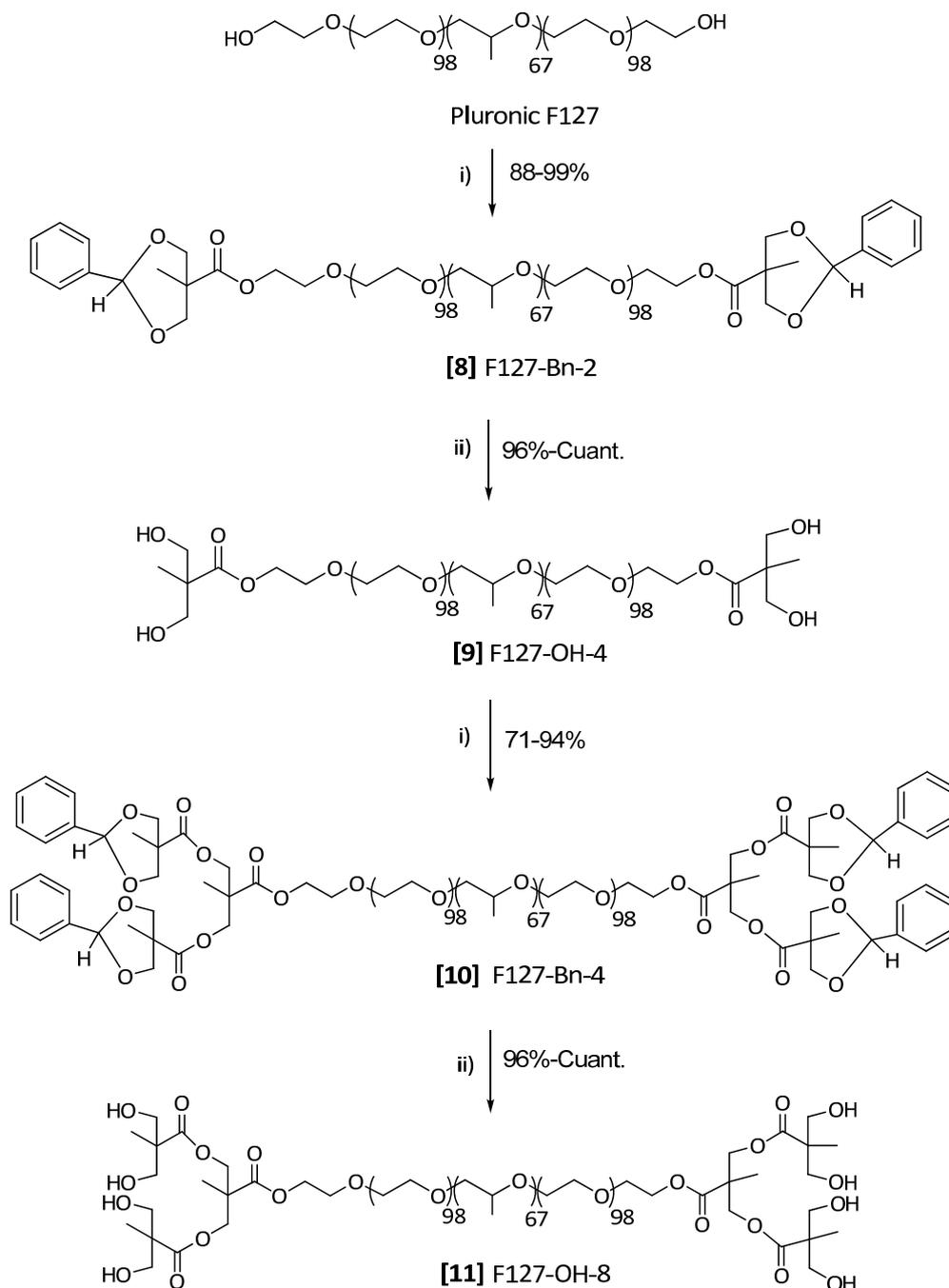
(Esquema 3.4), con el cual se consiguen funcionalizaciones completas, elevados rendimientos y purificaciones sencillas.



Esquema 3.4. Ruta sintética para la obtención del anhídrido derivado de bis-MPA [7].
Condiciones de reacción: i) TsOH, acetona ii) DCC, diclorometano.

Finalmente, la síntesis de los compuestos se desarrolló conforme a la ruta que se muestra en el Esquema 3.5. La reacción del anhídrido [7] con la molécula de Pluronic F127[®] proporcionó el derivado dendrítico-lineal-dendrítico de primera generación protegido, F127-Bn-2 [8], con rendimientos superiores al 95%. Otra ventaja de esta reacción es la facilidad de purificación, que consiste en un pretratamiento del crudo de reacción con metanol para la destrucción del anhídrido [7] en exceso, que se convierte en el correspondiente ácido benciliden-2,2-bis(oximetil)propiónico [6] y que a diferencia del anhídrido [7] es soluble en dietil éter, lo que permite la posterior precipitación de F127-Bn-2 [8] en dietil

éter frío. De esta forma se obtiene el producto buscado tras filtración y lavado con dietil éter frío.



Esquema 3.5. Ruta *sintética divergente* para la obtención de los derivados dendríticos de primera y segunda generación, en sus formas protegidas con grupos bencilo y formas desprotegidas con grupos hidroxilo terminales.

Condiciones de reacción: i) **[7]**, DMAP, diclorometano, ii) Pd/C, acetato de etilo.

La completa funcionalización de Pluronic F127® para dar F127-Bn-2 [8] se siguió por ^1H -RMN y por FT-IR.

En la Figura 3.3 se observa el espectro de ^1H -RMN, así como el etiquetado de carbonos y sus correspondientes protones, del derivado F127-Bn-2 [8].

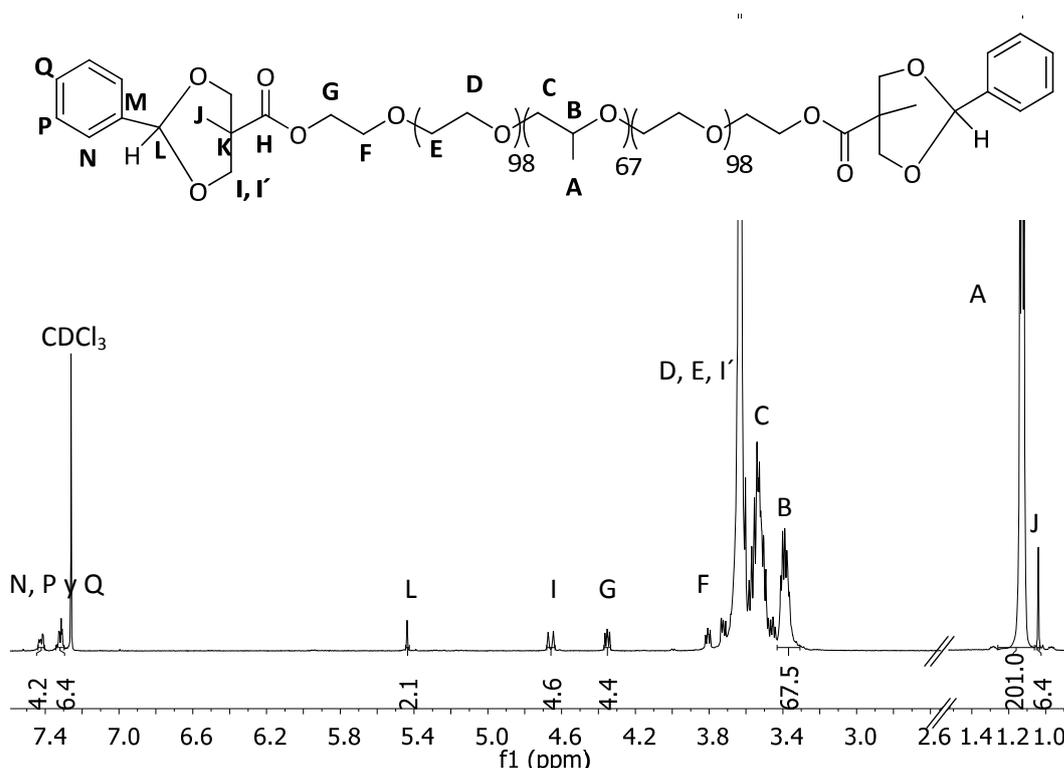


Figura 3.3. Espectro de ^1H -RMN de F127-Bn-2 en CDCl_3 , 400 MHz.

Analizando el espectro de mayor a menor desplazamiento químico, a 7.42-7.32 ppm aparecen las señales correspondientes a los protones aromáticos (N, P y Q), a 5.44 ppm aparece el protón bencílico (L), a 4.66 ppm se observa un doblete que corresponde a uno de los protones diastereotópicos del bis-MPA (I), apareciendo el otro doblete (I') enmascarado por las señales del copolímero que están entre 3.37-3.82 ppm. Estos protones diastereotópicos se describen como un sistema AX considerando la relación $\Delta\nu_{\text{II}'}/J_{\text{II}'} > 4$ [$\Delta\nu_{\text{II}'}$ (diferencia de frecuencias entre las señales) y $J_{\text{II}'}$ (constante de acoplamiento entre los núcleos)]. A 4.36 ppm se puede ver la aparición de un triplete característico que integra por 4 protones y que corresponde a los protones G del bloque de PEG del

Pluronic F127[®] adyacentes al nuevo enlace éster formado entre el polímero y la parte dendrítica. Por último, a 1.05 ppm aparece un singlete que integra por 6 protones correspondientes a los grupos metilo de la estructura de bis-MPA (J).

Los valores de las integrales de los nuevos grupos introducidos en la molécula de Pluronic F127[®] concuerdan con lo esperado considerando los valores de las integrales de los protones tipo A y tipo B de esta molécula.

En el espectro infrarrojo de este compuesto se observa la aparición de la vibración de tensión característica del enlace carbonilo del grupo –COOR a 1737 cm^{-1} (Figura 3.4).

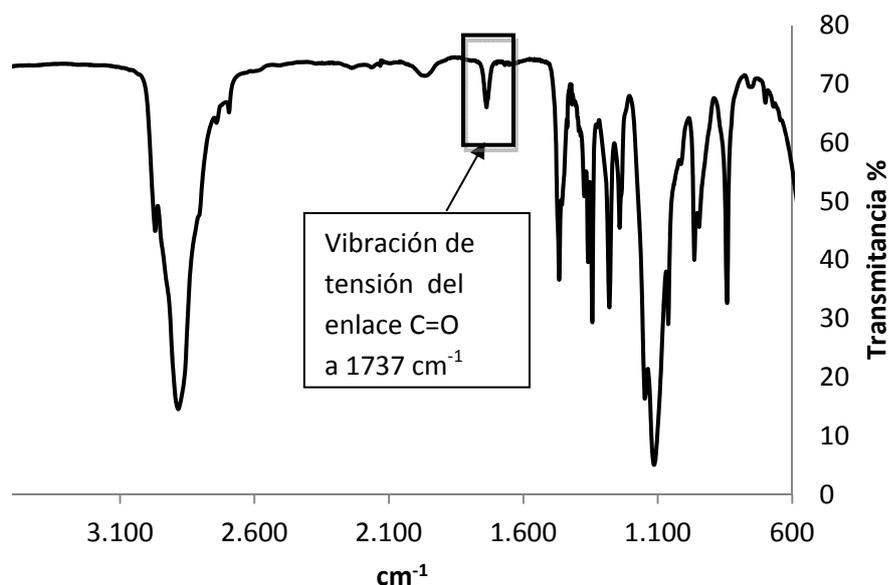


Figura 3.4. Espectro FT-IR de F127-Bn-2, muestra preparada a partir del compuesto neto fundido sobre pastilla de NaCl.

Para el crecimiento de generación se realizó la desprotección de los grupos hidroxilo por hidrogenólisis de F127-Bn-2 [8] con Pd/C, obteniendo el derivado de primera generación desprotegido F127-OH-4 [9] (reacción que se comentará en el subapartado b). Sobre este derivado se introdujeron 4 nuevas unidades derivadas de bis-MPA a partir del anhídrido derivado de bis-MPA [7], tal y como se ha mostrado en el Esquema 3.5, para la obtención de F127-Bn-4 [10].

En comparación con la funcionalización del derivado de primera generación, la completa funcionalización de F127-OH-4 **[9]** requirió trabajar con excesos de anhídrido **[7]** y DMAP, así como mayores tiempos de reacción (72 horas frente a 48 horas). En lo que respecta al compuesto F127-Bn-4 **[10]**, permitió su obtención una purificación sencilla similar a la utilizada con F127-Bn-2 **[8]**.

La correcta formación de F127-Bn-4 **[10]** se siguió por ^1H -RMN y por FT-IR. En este caso el espectro obtenido presentaba el aspecto que se observa en la Figura 3.5. Se pueden ver las señales correspondientes a los anillos aromáticos a 7.38-7.28 ppm (protones tipo R, S y T) y los protones bencílicos a 5.40 ppm (protones tipo P). Los protones de la estructura derivada de bis-MPA externa (protones tipo L y L') aparecen como dos dobletes ya que son protones diastereotópicos correspondientes a un sistema AX. Uno de los dobletes se encuentra a 4.56 ppm e integra por 8 protones (protones tipo L), mientras que el otro doblete aparece enmascarado por las señales del núcleo polimérico (protones tipo L'). Además, los protones correspondientes a las estructuras de bis-MPA internas (protones tipo I), aparecen como un singlete a 4.37 ppm. Los protones tipo G aparecen en este caso a 4.11 ppm. Los hidrógenos correspondientes a los grupos metilo de los grupos de bis-MPA internos (J) aparecen a 1.24 ppm, mientras que los de los grupos de bis-MPA externos (N) aparecen a 0.93 ppm.

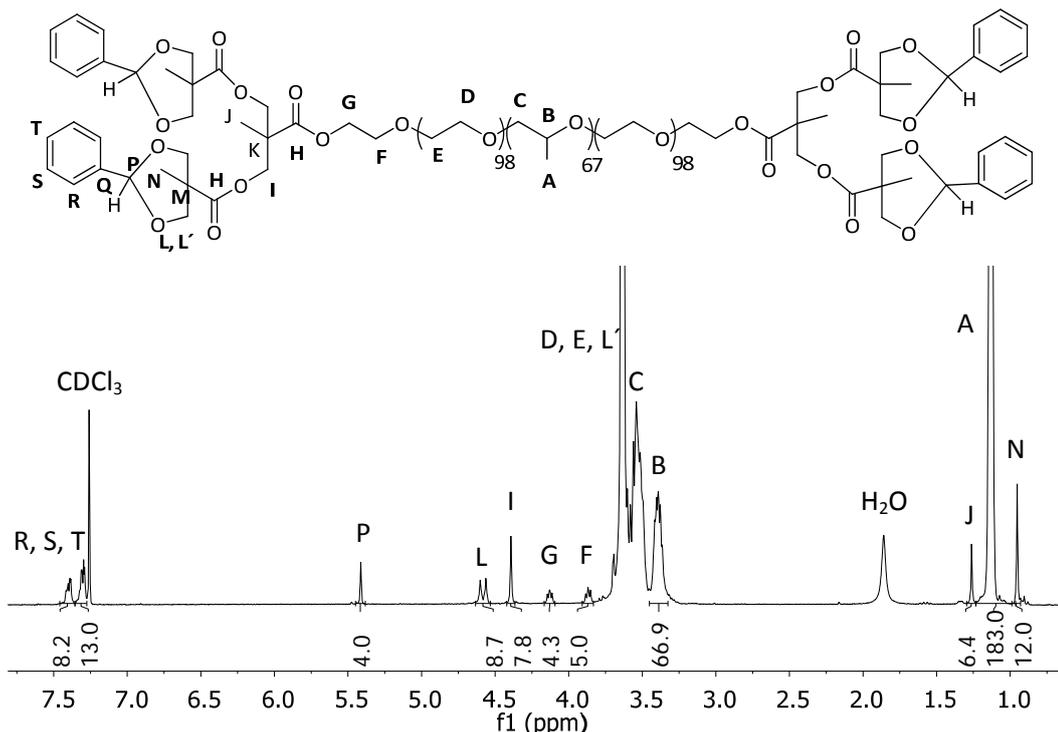


Figura 3.5. Espectro de ^1H -RMN de F127-Bn-4 en CDCl_3 , 300 MHz.

En la Figura 3.6 se muestra el espectro FT-IR de los derivados F127-OH-4 [9] y F127-Bn-4 [10]. La completa funcionalización se confirma por la desaparición de la banda de vibración a 3482 cm^{-1} correspondiente a los grupos hidroxilo.

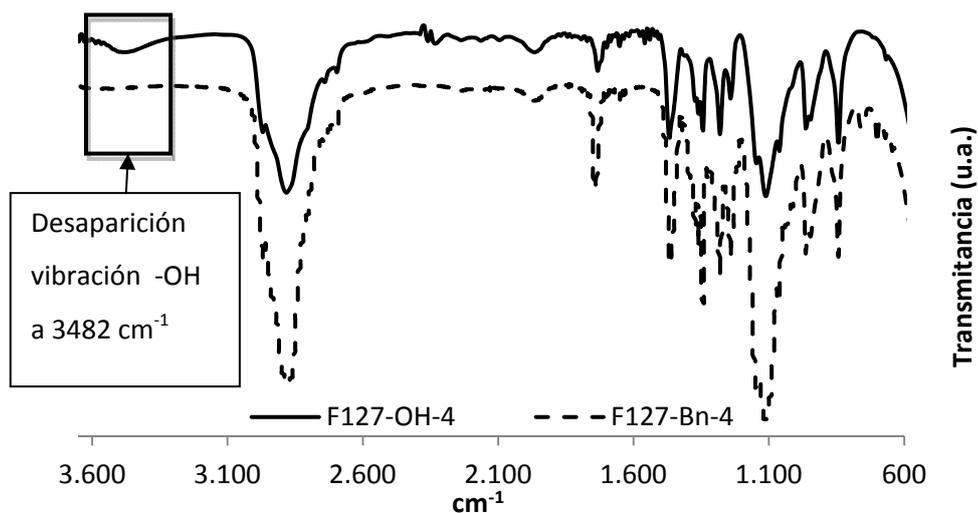


Figura 3.6. Espectros FT-IR de F127-OH-4 y F127-Bn-4, muestra preparada a partir del compuesto neto fundido sobre pastilla de NaCl.

b) Desprotección de los grupos hidroxilo por hidrogenolisis.

La eliminación de los grupos bencilo de los derivados de Pluronic de primera generación, F127-Bn-2 **[8]** y de segunda generación, F-127-Bn-4 **[10]** se realizó por hidrogenolisis, utilizando Pd/C como catalizador. Para llevar a cabo dicha reacción se probaron dos disolventes distintos. En un caso se utilizó una mezcla diclorometano/metanol en proporción 1:2, tal como se describe en el trabajo de Fréchet.⁶²

Aunque las desprotecciones tuvieron lugar de forma completa, como se observó por ¹H-RMN principalmente por la desaparición de las señales correspondientes a los grupos aromáticos, se comprobó una mala concordancia entre los valores de las integrales correspondientes a los protones tipo G, adyacentes al enlace éster entre la parte dendrítica y el polímero, y los protones tipo A y B del núcleo polimérico, lo que se atribuyó a una rotura parcial del sistema dendrítico. Ante estos resultados se descartó el uso de la mezcla diclorometano/metanol para la realización de las desprotecciones.

El segundo de los disolventes utilizados para llevar a cabo la desprotección fue acetato de etilo. En este caso se observó una correcta integración de las señales, como se detalla a continuación.

En la desprotección de F127-Bn-2 **[8]** para obtener F127-OH-4 **[9]** (Figura 3.7), se confirmó la desaparición de las señales de los protones bencílicos y aromáticos mediante ¹H-RMN, así como el desplazamiento a campos mayores de los protones tipo I e I' correspondientes a los grupos -CH₂- del sistema de bis-MPA, que en este caso aparecen enmascarados junto a los protones del polímero, entre 3.37 y 3.82 ppm. La señal de los protones G, próximos al enlace éster aparece a 4.34 ppm y los metilos del sistema de bis-MPA (J) a 1.11 ppm.

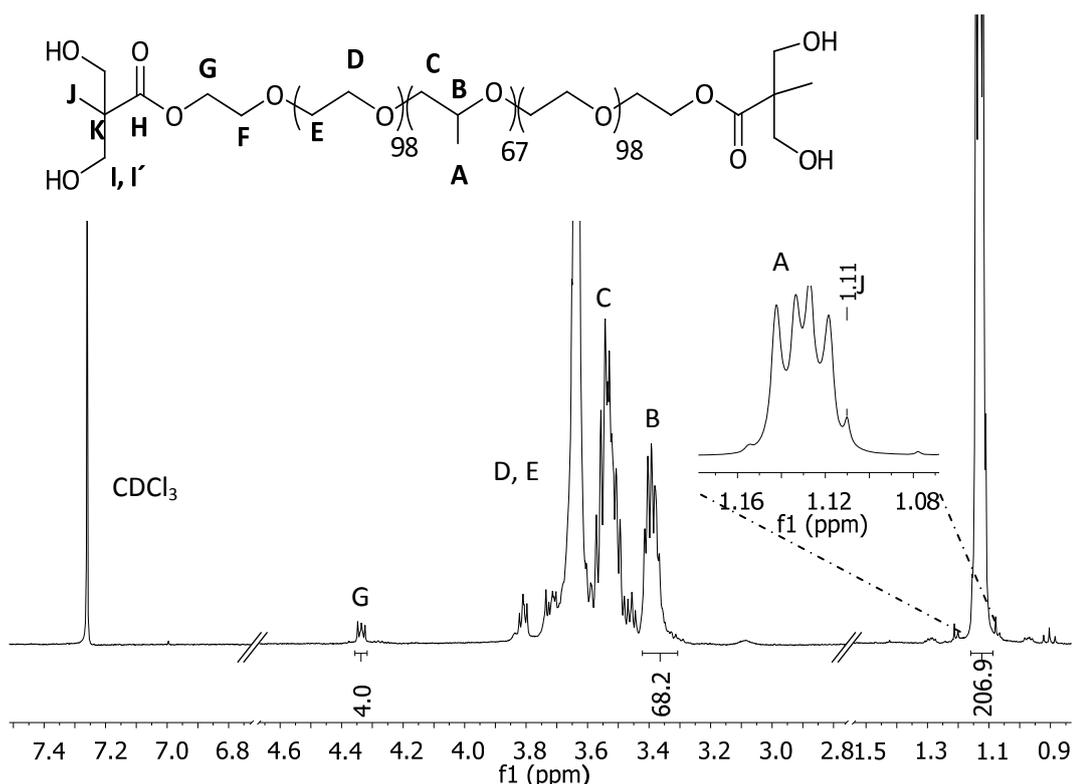


Figura 3.7. Espectro de ^1H -RMN de F127-OH-4 en CDCl_3 , 300 MHz.

En el espectro infrarrojo de F127-OH-4 (Figura 3.8), comparándolo con su análogo protegido F-127-Bn-2 [8], se observa la aparición de la vibración del enlace correspondiente a los grupos hidroxilo a 3482 cm^{-1} , así como la banda de vibración de tensión correspondiente al grupo carbonilo.

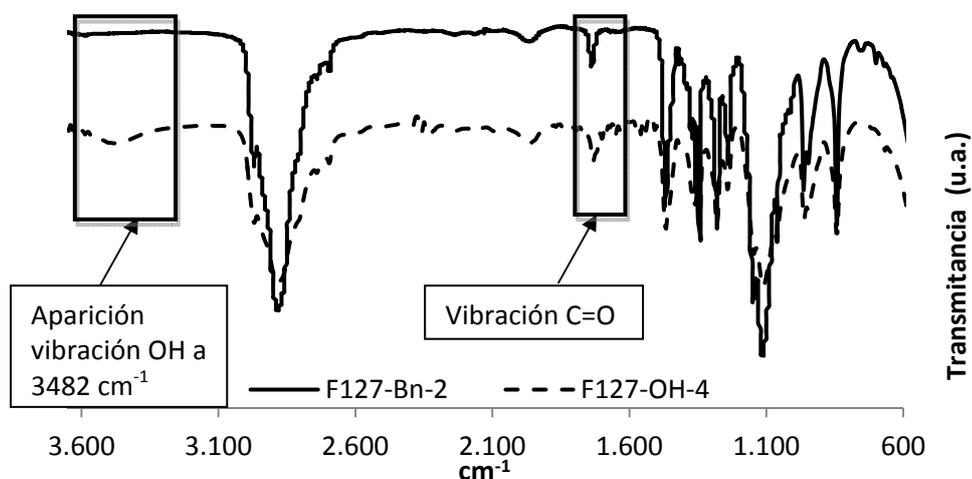


Figura 3.8. Espectros FTIR de F127-Bn-2 y F127-OH-4, muestra preparada a partir del compuesto neto fundido sobre pastilla de NaCl .

La desprotección de F127-Bn-4 **[10]** que proporcionó F127-OH-8 **[11]** se confirmó por la desaparición de los protones del sistema bencílico en el espectro de ^1H -RMN (Figura 3.9). Además los protones tipo I que en el precursor protegido aparecían como un singlete, aparecen como un cuádruplete correspondiente a un sistema AB a 4.32 ppm (I' , 8H, $\Delta\nu_{I'}=35$ Hz, $J_{I'}=11.2$ Hz), considerando la relación $\Delta\nu_{I'}/J_{I'} < 4$ [$\Delta\nu_{I'}$ (diferencia de frecuencias entre las señales) y $J_{I'}$ (constante de acoplamiento entre los núcleos)]. Parte de este cuádruplete aparece solapado junto con el triplete a 4.26 ppm de los protones G del polímero, adyacentes al enlace éster, siendo el valor total de la integral de 12 protones, 8 correspondientes a los protones I e I' y otros 4 correspondientes a los protones G. Los protones L correspondientes a los grupos $-\text{CH}_2-$ de las estructuras de bis-MPA externas, aparecen junto con las señales del polímero entre 3.37 y 3.82 ppm.

Además se observa la aparición de un singlete debido a los grupos metilo de la estructura de bis-MPA interno (J) y otro singlete de los grupos metilo de las estructuras de bis-MPA externas (N). Los valores de las integraciones de los extremos dendríticos son coherentes con las integraciones de los protones A y B de Pluronic F127®.

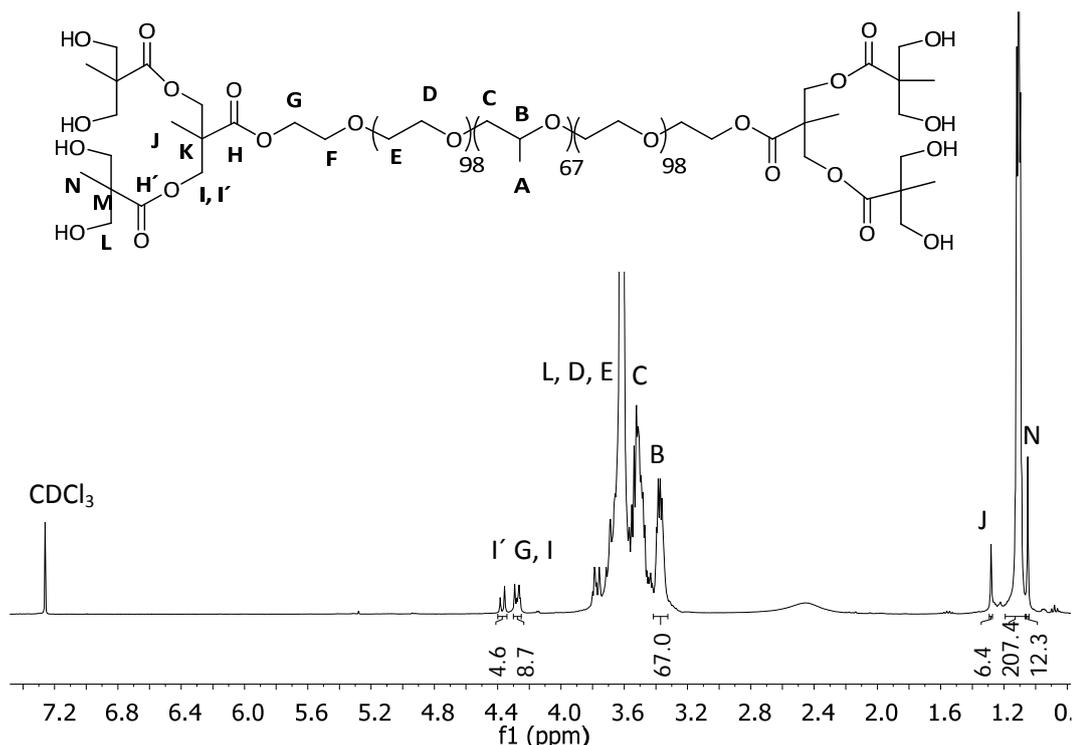


Figura 3.9. Espectro de ^1H -RMN de F127-OH-8 en CDCl_3 , 400 MHz.

Estudios adicionales de HSQC, que muestran la correlación protón-carbono a un enlace, permitieron la correcta asignación de las señales de carbono así como la observación de los protones diastereotópicos tipo I e I' descritos anteriormente (Figura 3.10).

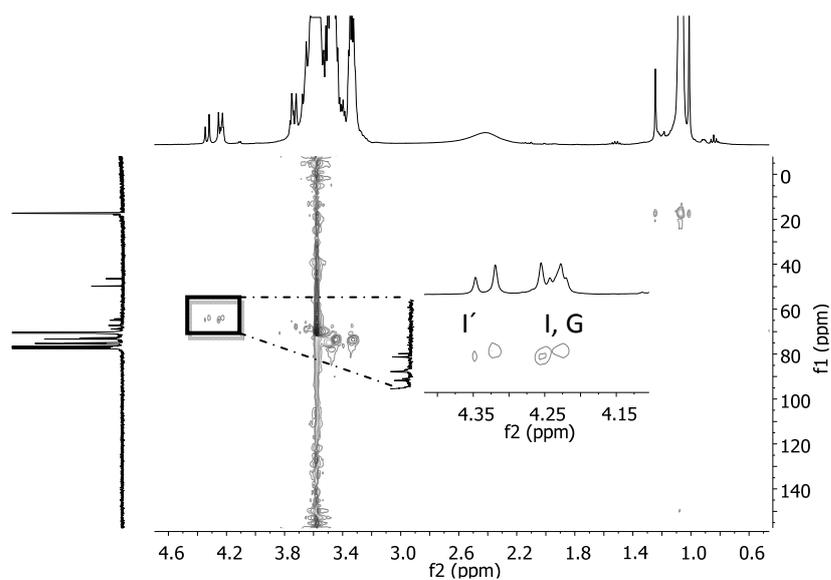


Figura 3.10. Espectro de HSQC de F127-OH-8 en CDCl_3 , 500 MHz.

En el espectro FT-IR (Figura 3.11) se observó la aparición de la banda a 3457 cm^{-1} correspondientes a la vibración de los grupos hidroxilos del compuesto F127-OH-8, así como la presencia de la banda correspondiente a la vibración de tensión del enlace carbonilo del grupo éster a 1733 cm^{-1} .

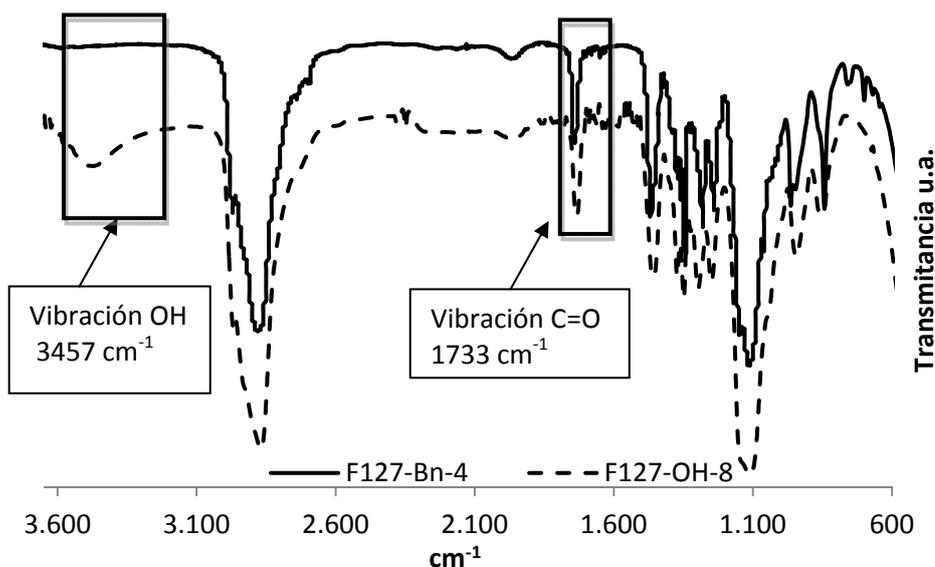
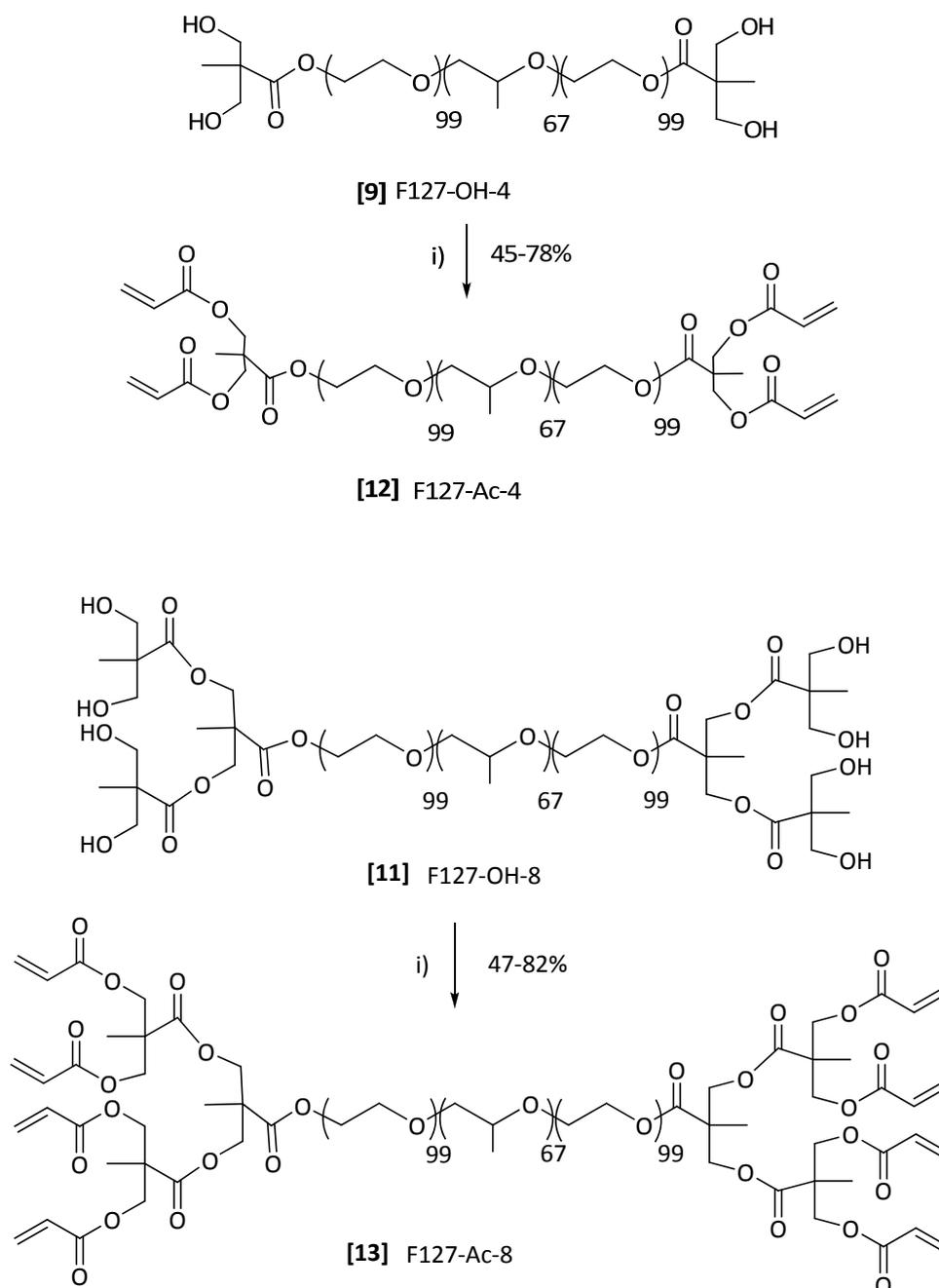


Figura 3.11. Espectro FT-IR de F127-Bn-4 y F127-OH-8, muestra preparada a partir del compuesto neto fundido sobre pastilla de NaCl.

c) Introducción de grupos acrilato

Una vez incorporados los dendrones derivados de bis-MPA de primera y segunda generación al núcleo de Pluronic F127®, los grupos hidroxilo terminales de los compuestos F127-OH-4 [9] y F127-OH-8 [11] se funcionalizaron mediante esterificación con cloruro de acrililo en presencia de TEA (Esquema 3.6), de forma similar a la descrita en el apartado 3.1.1. para la obtención del derivado acrilado lineal. Debido a la elevada densidad de grupos acrilato por molécula, se añadió a la mezcla de reacción una pequeña cantidad de 4-metoxifenol como inhibidor de radicales, para evitar la polimerización. La esterificación de los grupos hidroxilo periféricos transcurrió de forma completa, y el aislamiento del compuesto acrilado implicó procesos de purificación sencillos y rendimientos satisfactorios.



Esquema 3.6. Síntesis de los compuestos acrilados de primera y segunda generación F127-Ac-4 [12] y F127-Ac-8 [13]. Condiciones de reacción: i) cloruro de acrililo, TEA, 4-metoxifenol (inhibidor), diclorometano.

La completa transformación de los grupos terminales hidroxilo en grupos acrilato se confirmó por ^1H -RMN y por FT-IR.

En la Figura 3.12 se muestra el espectro de ^1H -RMN del compuesto F127-Ac-4 [12]. Se observó la aparición de las señales debidas a los grupos acrilato entre 6.39 y 5.85 ppm (protones M, N y N'). Los grupos $-\text{CH}_2-$ del sistema de bis-MPA (protones I e I') son un sistema AB, 4.34 ppm (II'q, 8H, $\Delta\nu_{\text{II}'}=7.6$ Hz, $J_{\text{II}'}=11.2$ Hz). Estos protones aparecen a mayor desplazamiento químico que los mismos protones de la molécula precursora F127-OH-4 [9] (Figura 3.7), dónde este tipo de protones aparecían junto con las señales del núcleo polimérico. Los protones tipo G próximos al enlace éster que produce la unión entre la parte dendrítica y el polímero, aparecen en forma de triplete a 4.27 ppm, ligeramente solapados con las señales de los protones tipo I e I'. Los protones de los grupos metilo de los extremos dendríticos (J) aparecen como un singlete a 1.30 ppm.

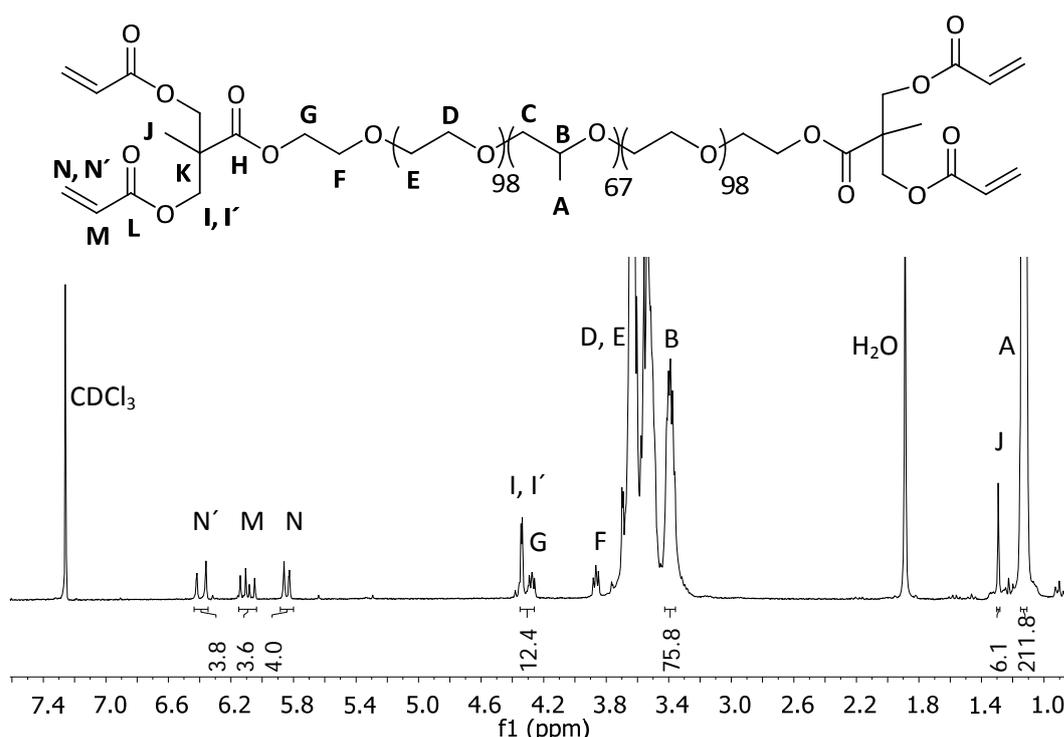
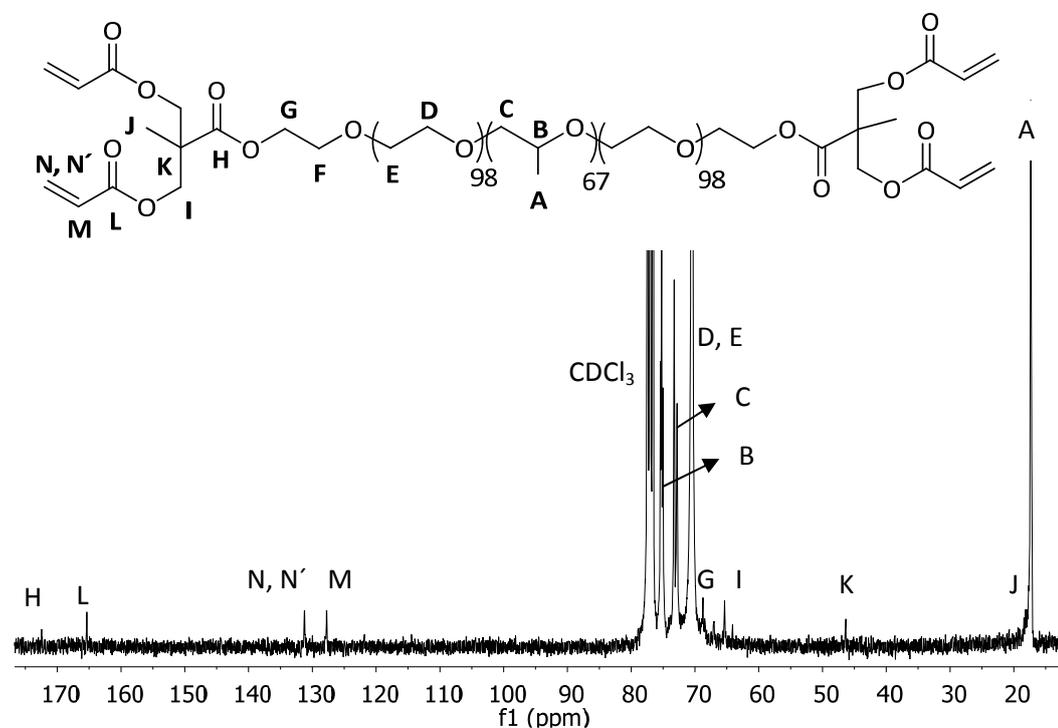


Figura 3.12. Espectro de ^1H -RMN de F127-Ac-4 en CDCl_3 , 300 MHz.

En la Figura 3.13 se muestra el espectro de ^{13}C -RMN de F127-Ac-4 donde se observan claramente los dos tipos de grupos carbonilo existentes en la molécula:

el grupo carbonilo del enlace éster más próximo al núcleo polimérico (H) a 172.5 ppm y el carbonilo del grupo acrilato (L) a 165.4 ppm.



En el espectro FT-IR de F127-Ac-4 (Figura 3.14) se comprueba su funcionalización por la completa desaparición de la vibración del grupo hidroxilo a 3482 cm^{-1} del precursor F127-OH-4.

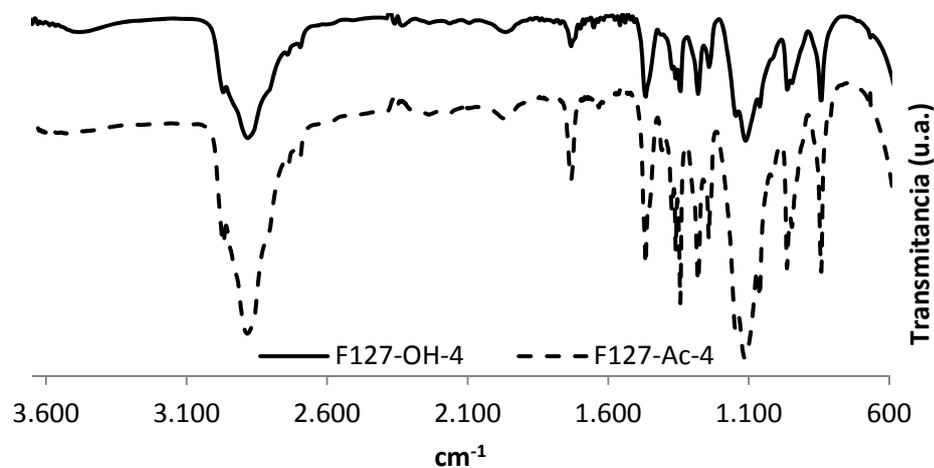


Figura 3.14. Espectros FT-IR de F127-OH-4 y F127-Ac-4, muestra preparada a partir del compuesto neto fundido sobre pastilla de NaCl.

En cuanto al análogo acrilado de segunda generación, F127-Ac-8 [13] (Figura 3.15), en el espectro de $^1\text{H-NMR}$ se observa la aparición de las señales correspondientes a los grupos acrilato (protones tipo P, Q y Q') entre 6.35 y 5.85 ppm. Entre 4.30 y 4.23 se encuentran las señales de los grupos $-\text{CH}_2-$ de los sistemas de bis-MPA externos (tipo L) como un singlete, las señales de los grupos $-\text{CH}_2-$ de los grupos de bis-MPA internos (tipo I), como otro singlete y los protones tipo G como un triplete. Los protones tipo N de los metilos de la estructura de bis-MPA externa y tipo J de los metilos internos, aparecen como singletes a 1.27 y 1.23 ppm respectivamente.

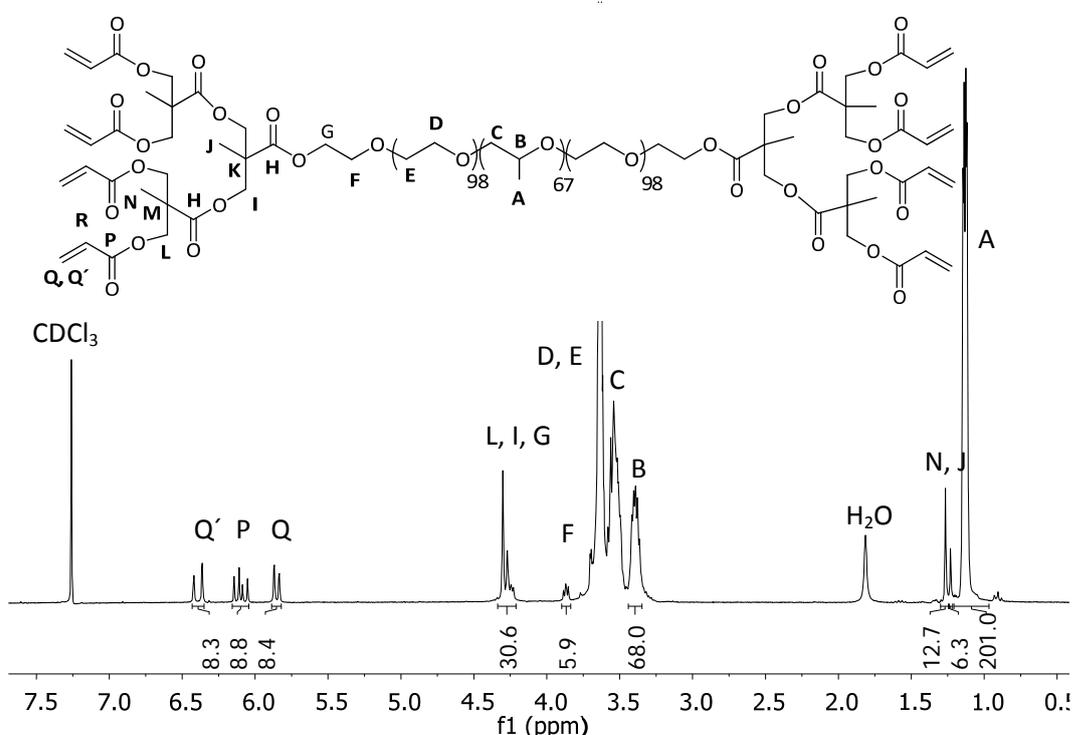


Figura 3.15. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ de F127-Ac-8 en CDCl_3 , 300 MHz.

Los espectros HSQC y HMBC (Figura 1.1 y 1.2 del Anexo 1) muestran las correlaciones protón-carbono a uno y dos ó tres enlaces respectivamente, que están de acuerdo con la estructura de la molécula estudiada.

En FT-IR, confirmando a la completa transformación de grupos hidroxilo en grupos acrilato, se observó en F127-Ac-8 la desaparición de la señal de la banda

de vibración correspondiente a los grupos hidroxilo de F127-OH-8 a 3457 cm^{-1} (Figura 3.16).

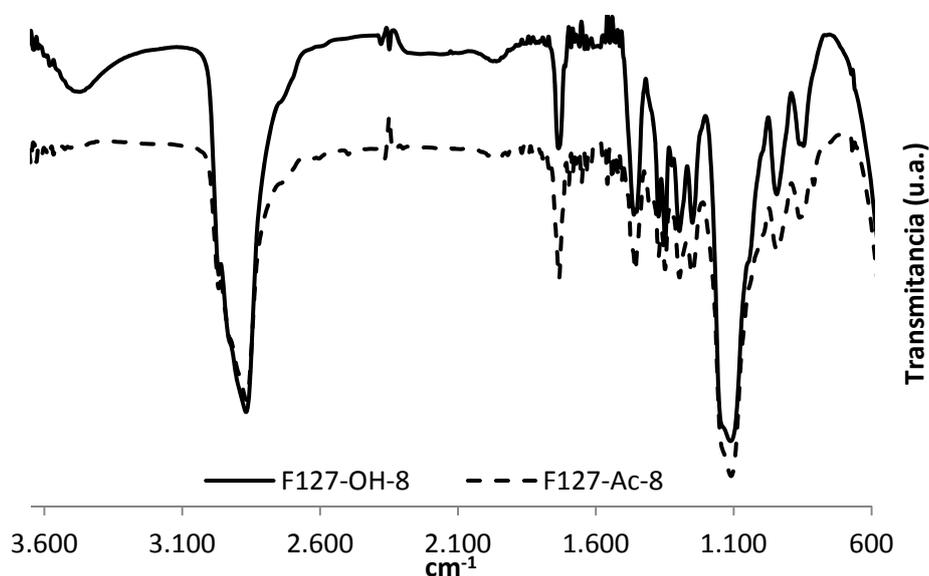


Figura 3.16. Espectro FT-IR de F127-OH-8 y F127-Ac-4, muestra preparada a partir del compuesto neto fundido sobre pastilla de NaCl.

Como norma general, los productos con grupos acrilato en su estructura química fueron almacenados a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, a vacío y en oscuridad para evitar su polimerización.

d) Caracterización por Cromatografía de Permeación en Gel (GPC) y Espectrometría de masas (MALDI-MS).

Las técnicas de GPC y MALDI-MS proporcionaron información adicional para la caracterización de los diferentes compuestos.

Mediante GPC, se determinaron los pesos moleculares promedio en número (M_n), promedio en peso (M_w) y el índice de polidispersidad (PDI), utilizando patrones de poliestireno para el calibrado.

Para la realización de los cromatogramas de Pluronic F127[®] y sus derivados se han utilizado dos tipos de columnas cromatográficas, Styrag[®] HR1 THF Waters y PLgel $5\mu\text{m}$ MIXED-C de Agilent Technologies, únicas columnas disponibles.

Los cromatogramas obtenidos (*Figura 1.3 del Anexo I*) presentaron dos distribuciones de pesos moleculares más o menos separadas en función del tipo de columna utilizada y del tipo de material ensayado.

En la Figura 3.17, a modo de ejemplo, se muestra el cromatograma de Pluronic F127[®] comercial utilizado, que presenta dos distribuciones de pesos moleculares con la columna Styrag[®] HR1 THF Waters.

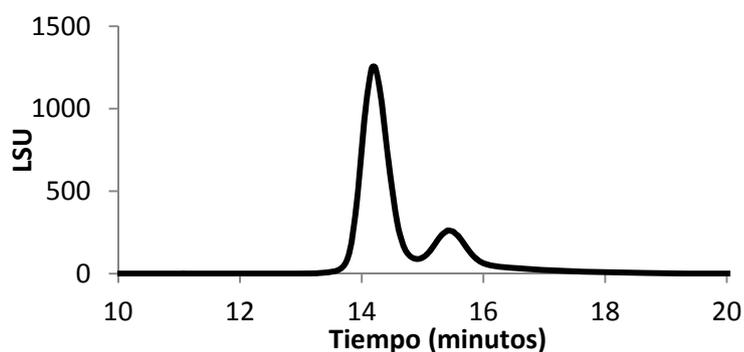


Figura 3.17. Cromatograma de GPC de Pluronic F127[®] utilizando columnas Styrag[®] HR1 THF Waters.

Sin embargo, el uso de columnas PLgel 5 μ m MIXED-C de Agilent Technologies no permite una separación adecuada de las dos distribuciones de pesos moleculares, aunque sí muestra la presencia de diferentes pesos moleculares, tal y como se observa en la Figura 3.18 para el derivado F127-Ac-8.

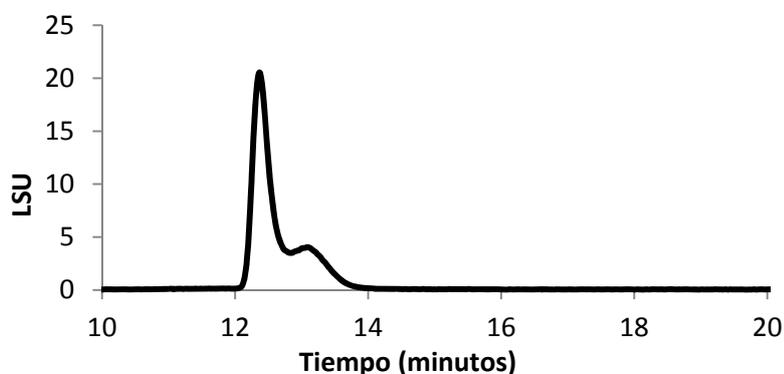


Figura 3.18. Cromatograma de GPC de F127-Ac-8 utilizando columnas PLgel 5 μ m MIXED-C de Agilent Technologies.

En la Tabla 3.1 se recogen los resultados de Mn y PDI obtenidos por GPC, proporcionándose dos valores de Mn cuando los cromatogramas mostraban distribuciones de peso molecular más separadas, y un solo valor para las distribuciones de peso molecular peor separadas. También se incluyen los valores del peso molecular teórico, calculados como la suma de los pesos moleculares de los bloques individuales que forman cada uno de los derivados analizados (Pm calculado).

Tabla 3.1. Peso molecular promedio en número, índice de polidispersidad y peso molecular calculado para los derivados de Pluronic F127®.

	Mn ^a	PDI ^b	Pm calculado ^c
PLURONIC F127^d	16748	1.03	12600
	6438	1.1	
F127-Ac-2^e	7713	1.09	12708
F127-Bn-2^e	7587	1.09	13008
F127-OH-4^d	18166	1.1	12842
F127-Ac-4^e	7798	1.09	13048
F-127-Bn-4^e	6903	1.13	13649
F127-OH-8^d	21910	1.01	13297
	9218	1.02	
F127-Ac-8^e	8731	1.09	13729

^a Mn: Peso molecular promedio en número en g/mol obtenido por GPC

^b PDI: Índice de polidispersidad (Mw/Mn) obtenido por GPC

^c Pm calculado: Peso molecular calculado en g/mol como la suma de los pesos moleculares de los bloques individuales

^d Columna Styrag[®] HR1 THF Waters

^e Columna PLgel 5µm MIXED-C de Agilent Technologies

Si comparamos los valores de Mn obtenidos por GPC, independientemente de la columna utilizada, con el Pm calculado, se obtiene una clara desviación entre ellos, tanto para Pluronic F127® como para todos sus derivados, tal y como se ha observado para otros copolímeros bloque dendrítico-lineales descritos en la

bibliografía.^{112c, 113} El peso molecular determinado por GPC es un peso molecular aparente, debido a las diferencias de volumen hidrodinámico existentes entre Pluronic F127® y sus derivados, y los de estándares de poliestireno utilizados para la calibración.

Aunque mediante GPC no se obtuvo información concluyente en cuanto a la variación de peso molecular, todos los cromatogramas de los derivados de Pluronic F127® analizados por GPC confirmaron la presencia de 2 distribuciones de peso molecular (mejor o peor separadas) que corresponden al polímero completamente funcionalizado, descartándose la presencia de moléculas o fragmentos de moléculas no unidas al núcleo central polimérico o polímero parcialmente funcionalizado.

Mediante MALDI-MS se observó, al igual que con GPC, la presencia de dos distribuciones de pesos moleculares para Pluronic F127® y sus derivados (Figura 3.19). Las dos distribuciones de pesos moleculares observadas para todos los compuestos aumentan su masa o la disminuyen en función del tipo de reacción llevada a cabo en el derivado. Con el crecimiento de generación se produce el desplazamiento de los máximos a mayor relación m/z (masa/carga).

¹¹³ Martín-Rapún, R.; Marcos, M.; Omenat, A.; Serrano, J. L.; Luckhurst, G. R.; Mainal, A., *Chemistry of Materials* **2004**, 16 (24), 4969-4979.

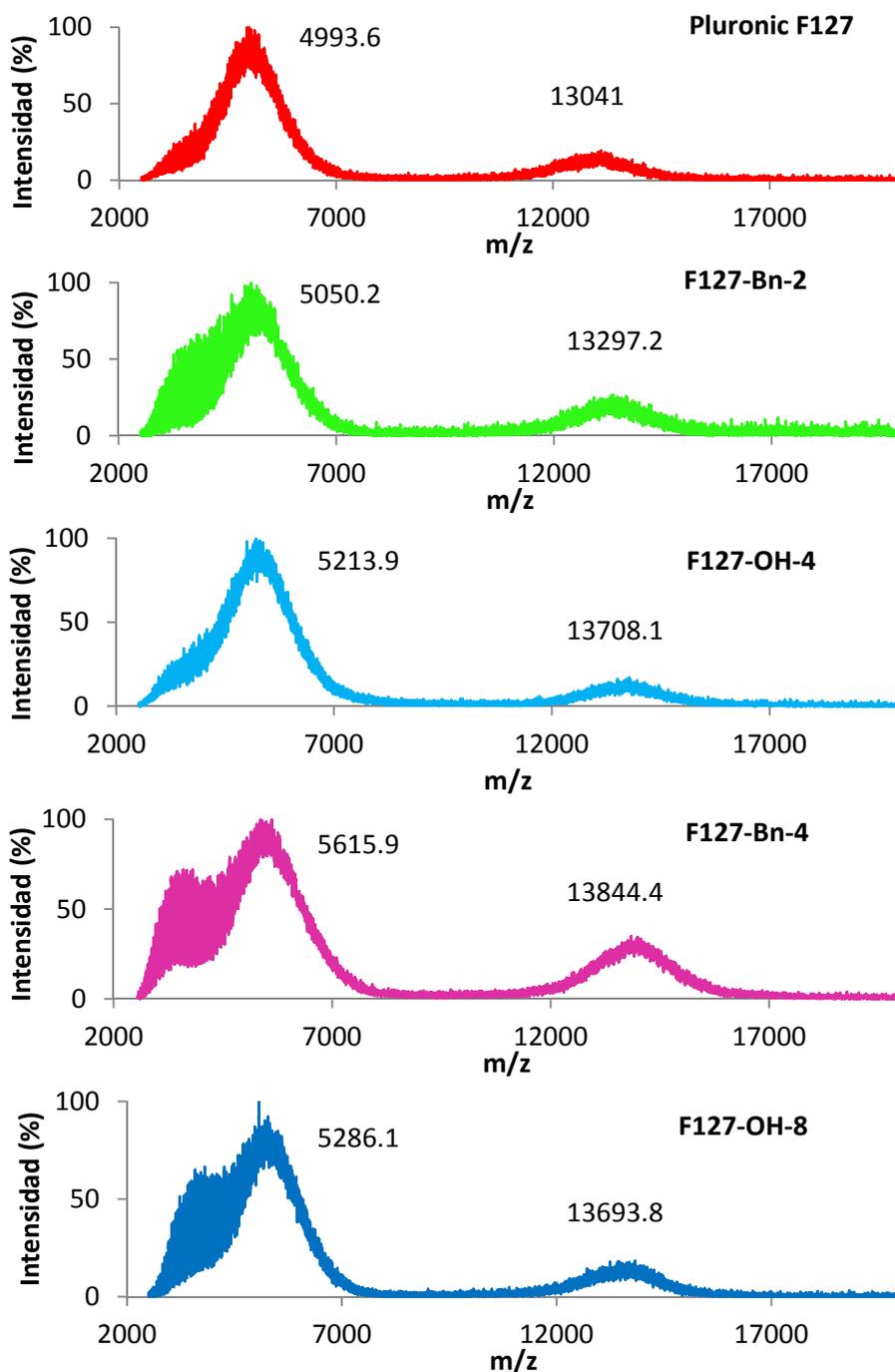


Figura 3.19. MALDI-MS del Pluronic F127[®] utilizado y sus derivados dendríticos.

En la Figura 3.20 se puede observar el desplazamiento de la distribución de pesos a mayores relaciones masa/carga tras la funcionalización de Pluronic F127[®] (en rojo) con dendrones derivados de bis-MPA de segunda generación terminados en grupos acrilato, compuesto F127-Ac-8 (en morado). La introducción de los extremos dendríticos supone un aumento de peso molecular con respecto a

Pluronic F127® de 1129 g/mol, calculado como la suma de los fragmentos acoplados al núcleo central polimérico. Mediante MALDI-MS se obtiene un aumento de peso molecular de 1135.6 g/mol, que concuerda con el valor teórico calculado.

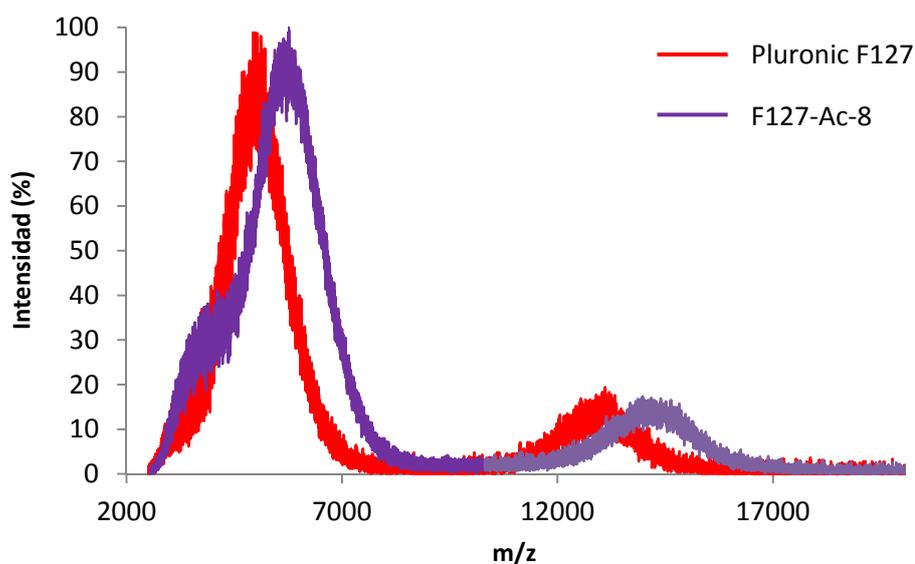


Figura 3.20. Comparación de los espectros de MALDI-MS de Pluronic F127® y F127-Ac-8.

3.2.- DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES SOL-GEL

En el campo de investigación de geles supramoleculares se han descrito básicamente dos metodologías para la LCST (*Low Critical Solution Temperatura*): el método de *inversión del vial* y la calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Con este fin, y utilizando ambos métodos, se han preparado y caracterizado disoluciones (en PBS 10 mM y pH 7.4) de cada uno de los derivados de Pluronic F127® sintetizados, a concentraciones del 16.5%, 18%, 20%, 23% y 25% (w/v).

3.2.1.- Estudio de gelificación mediante el método de *inversión del vial*

El método de *inversión del vial* consiste en determinar la temperatura de gelificación (LCST) a la cual no existe flujo del gel al realizar la inversión del vial que lo contiene (Figura 3.21).

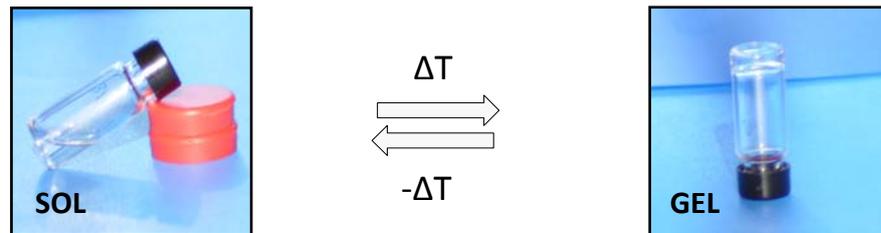


Figura 3.21. Proceso reversible de gelificación observado por el método de *inversión del vial* y producido por el aumento de la temperatura.

Una vez alcanzado el estado gel, continuando el calentamiento se consigue determinar la temperatura de la transición gel-sol.

En la Tabla 3.2 se muestran las temperaturas de transición de fase sol-gel y gel-sol obtenidas para los materiales estudiados. Con la determinación de las dos temperaturas queda reflejado el intervalo de existencia del estado gel. Experimentalmente, ambas temperaturas se establecieron siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.2.a, de la Parte Experimental.

Tabla 3.2. Temperaturas de transición de fases de los diferentes hidrogeles obtenidas por el método de *inversión del vial*.

	Concentración (% w/v)	LCST ^a método inversión vial (°C)	Temperatura transición gel-sol (°C)
Pluronic F127®	16.5%	37	78
	18 %	36	76
	20 %	26	68
	23 %	21	65
	25 %	18	59
F127-Ac-2	16.5 %	40	50
	18 %	34	57
	20 %	28	68
	23 %	25,5	89
	25 %	24	96
F127-Bn-2	16.5 %	NO GEL	NO GEL
	18 %	NO GEL	NO GEL
	20 %	NO GEL	NO GEL
	23 %	38	43
	25 %	30	52
F127-OH-4	16.5 %	NO GEL	NO GEL
	18 %	NO GEL	NO GEL
	20 %	31	52
	23 %	25	65
	25 %	22	68
F127-Ac-4	16.5 %	NO GEL	NO GEL
	18 %	37	39
	20 %	34	44
	23 %	31	48
	25 %	28	54
F127-Bn-8	16.5 %	NO GEL	NO GEL
	18 %	NO GEL	NO GEL
	20 %	NO GEL	NO GEL
	23 %	NO GEL	NO GEL
	25 %	NO GEL	NO GEL
F127-OH-8	16.5 %	NO GEL	NO GEL
	18 %	NO GEL	NO GEL
	20 %	NO GEL	NO GEL
	23 %	31	52
	25 %	25	56
F127-Ac-8	16.5 %	NO GEL	NO GEL
	18 %	NO GEL	NO GEL
	20 %	NO GEL	NO GEL
	23 %	37	42
	25 %	35	46

^aLCST (Low Critical Solution Temperature), temperatura de transición sol-gel.

Los datos experimentales tabulados han permitido establecer los diagramas de fase que se muestran en la Figura 3.22 y que facilitan el estudio comparativo entre los distintos materiales.

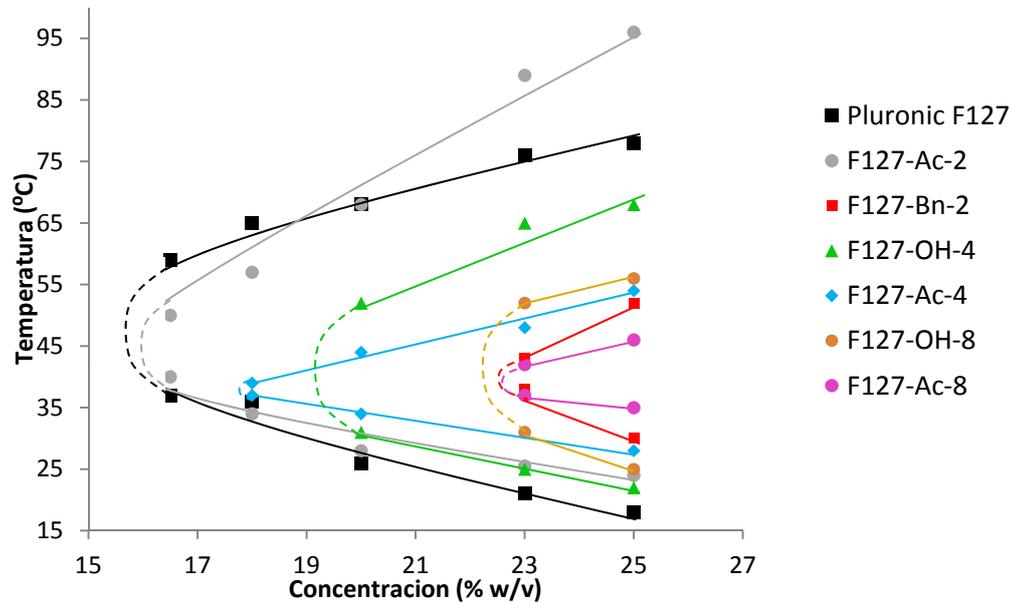


Figura 3.22. Diagrama de fases de los hidrogeles, preparados en PBS 10 mM pH 7.4, con Pluronic F127® y con sus diferentes derivados, a concentraciones del 16.5%, 18%, 20%, 23% y 25% (w/v).

3.2.2.- Estudio de gelificación mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

El procedimiento de preparación de las muestras para el estudio por DSC se describe en el apartado 6.2.b, de la Parte Experimental.

Para el estudio por DSC se aplicó el procedimiento explicado en el *Anexo II*, que proporciona termogramas con la primera derivada del flujo de calor con respecto al tiempo frente a la temperatura. El primer pico endotérmico observado en este tipo de termogramas, identifica la CMT, que es la temperatura a la cual se produce la micelización para una disolución de polímero de una determinada concentración, mientras que el segundo pico corresponde a la LCST.

A modo de ejemplo, en la Figura 3.23, se muestran los termogramas de DSC para F127-Ac-4 para tres de las concentraciones estudiadas. En cada uno de los termogramas se ha marcado la temperatura de micelización (en morado), la LCST (en azul) y la LCST obtenida por el método de *inversión del vial* (en verde).

Para el derivado F127-Ac-4 al 16.5 % (Figura 3.23 (a)) no se observa el pico de la gelificación ya que el polímero no es capaz de formar hidrogeles termosensibles, lo que es coherente con lo obtenido con el método de *inversión del vial*.

Para las concentraciones intermedias, 18 % y 20 % (Figura 3.23 (b)), los picos de gelificación se observan como un pico de baja intensidad.

Los picos de gelificación se detectan de forma más clara y definida para los hidrogeles de mayor concentración, 23 % y 25 % (Figura 3.23 (c)).

Esta variación de intensidad de los picos debidos a la gelificación en función de la concentración es extensible al resto de copolímeros bloque lineal y dendrítico-lineal-dendrítico.

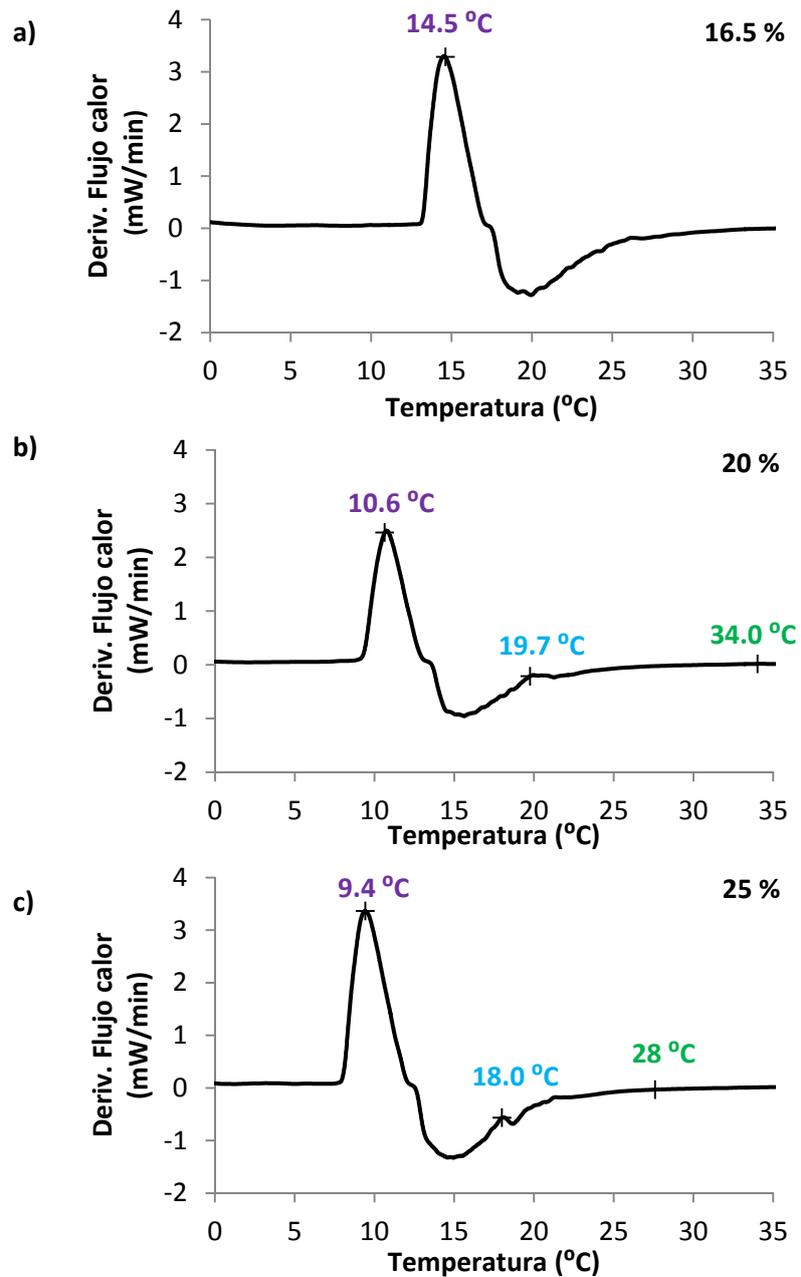


Figura 3.23. Termogramas de DSC de F127-Ac-4: a) al 16.5 % (w/v), b) al 20 % (w/v) y c) 25 % (w/v) en PBS 10 mM pH 7.4, correspondientes a la representación de la derivada del flujo de calor con respecto al tiempo (mW/min) frente a la temperatura en el ciclo de calentamiento; en morado, T^a de micelización (CMT), en azul, T^a de gelificación (LCST por DSC), en verde, LCST obtenida por el método de *inversión del vial*.

3.2.3. Discusión de los resultados

En la Tabla 3.3 se muestran los valores de LCST obtenidos por el método de *inversión de vial* (LCST inversión vial) y por DSC (LCST por DSC), así como las temperaturas de micelización de los diferentes materiales a cada concentración.

Como se puede comprobar, los resultados de LCST obtenidos por el método de inversión del vial y los determinados por DSC, no coinciden. Por DSC las temperaturas obtenidas son menores que por el método de *inversión del vial*. Sin embargo, la temperatura observada por el método de *inversión del vial* presenta concordancia con la temperatura a la que se estabiliza la línea base del termograma, tal y como se puede observar en la Figura 3.23 (b) y (c).

La significativa diferencia de temperaturas observada en función de las técnicas utilizadas podría deberse a la lenta velocidad de gelificación observada experimentalmente en estos materiales, en comparación con el comportamiento que presentan los materiales del Capítulo 4 de esta Memoria, para los que se observó mayor velocidad de gelificación y mejor concordancia de estos datos.

Tabla 3.3. LCST y temperatura de micelización de diferentes materiales obtenidas con diferentes metodologías.

	Concentración % (w/v)	LCST inversión vial (°C)	LCST por DSC (°C)	Micelización (°C)
F127-Ac-2	16.5 %	40	23	13.8
	18 %	34	21	13.2
	20 %	28	20	10.8
	23 %	25	19	10.5
	25 %	24	21	12.8
F127-Bn-2	16.5 %	NO GEL	NO GEL	14.2
	18 %	NO GEL	NO GEL	13.9
	20 %	NO GEL	NO GEL	12.8
	23 %	38	20	11.4
	25 %	30	20	10.3
F127-OH-4	16.5 %	NO GEL	NO GEL	11.7
	18 %	NO GEL	NO GEL	15
	20 %	31	20	11.5
	23 %	25	18	8.2
	25 %	22	19	9.1
F127-Ac-4	16.5 %	NO GEL	NO GEL	14.5
	18 %	37	24	13.6
	20 %	34	20	10.8
	23 %	31	20	10.6
	25 %	28	18	9.4
F127-Bn-4	16.5 %	NO GEL	NO GEL	12.8
	18 %	NO GEL	NO GEL	12.4
	20 %	NO GEL	NO GEL	10.7
	23 %	NO GEL	NO GEL	8.5
	25 %	NO GEL	NO GEL	6.3
F127-OH-8	16.5 %	NO GEL	NO GEL	13.3
	18 %	NO GEL	NO GEL	9
	20 %	NO GEL	NO GEL	14.1
	23 %	31	19	10.3
	25 %	25	18	8.8
F127-Ac-8	16.5 %	NO GEL	NO GEL	13.1
	18 %	NO GEL	NO GEL	13.4
	20 %	NO GEL	NO GEL	13.2
	23 %	37	25	15.9
	25 %	35	19	8.7

Todos los derivados analizados por DSC en disolución presentan pico de micelización a las 5 concentraciones estudiadas. En general, la temperatura de micelización es menor cuanto mayor es la concentración de polímero.

Según la naturaleza de los grupos funcionales introducidos en los derivados de Pluronic se pueden producir cambios en el balance hidrófobo-hidrófilo de la molécula que afectan a sus propiedades de gelificación, llegando incluso a no formarse el hidrogel por efecto de la temperatura.^{12, 27, 114} Por ejemplo, la presencia de los grupos funcionales bencilo hidrófobos y muy voluminosos produce un gran aumento de la concentración de polímero necesaria para producir la gelificación con respecto a los precursores terminados en grupos hidroxilo, e incluso impide el proceso de gelificación. Así, el derivado F127-Bn-4 no forma hidrogeles termosensibles a ninguna de las concentraciones estudiadas. Tan sólo se observó que al calentar las disoluciones a unos 37°C se producía cierta turbidez en la muestra. Esto puede ser indicativo de agregación, aunque no llega a gelificar debido a la presencia de grupos funcionales tan voluminosos e hidrófobos que impiden las interacciones hidrófobas entre micelas.

La funcionalización de los grupos hidroxilo con grupos acrilato hidrófobos no modifica prácticamente la concentración de polímero necesaria para producir la gelificación. Sin embargo, produce una disminución del rango de estabilidad del estado gel con respecto a los análogos terminados en grupos hidroxilo, como se puede observar en el diagrama de fases mostrado en la Figura 3.22.

¹¹⁴ Joo, M. K.; Park, M. H.; Choi, B. G.; Jeong, B., *Journal of Materials Chemistry* **2009**, *19* (33), 5891-5905.

3.3.- PREPARACIÓN DE HIDROGELES FOTOPOLIMERIZADOS

Con el fin de preparar los diferentes hidrogeles fotopolimerizados, se procedió de la forma que se esquematiza en la Figura 3.24 y que se detalla en el apartado 6.2.c., de la Parte Experimental. El proceso consiste en la obtención del hidrogel por efecto de la temperatura (transición sol, Figura 3.24 (a), a gel, Figura 3.24 (b)) y la fijación mediante luz de la estructura preformada.

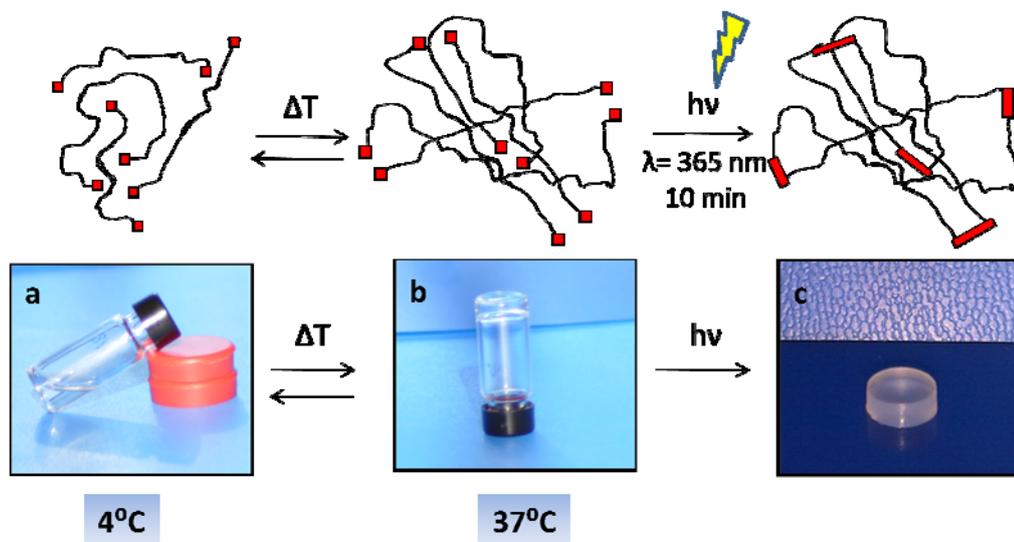


Figura 3.24. Proceso de formación de los hidrogeles fotopolimerizados a 37 °C. a) estado sol a 4 °C, b) estado gel a 37 °C, c) hidrogel desmoldado tras fotopolimerización.

El proceso se llevó a cabo irradiando con luz ultravioleta durante 10 minutos sobre hidrogeles físicos del polímero fotopolimerizable, teniendo en cuenta las concentraciones de gelificación descritas en el apartado anterior. Así, F127-Ac-2 y F127-Ac-4 se fotopolimerizaron a dos concentraciones diferentes, 18% (w/v) y 23% (w/v), y F127-Ac-8 al 23% (w/v) (hidrogeles físicos + químicos). Los estudios se completaron con la fotopolimerización de F127-Ac-8 al 18% (w/v) en su estado sol (hidrogel químico), ya que a esa concentración no es capaz de formar geles por efecto de la temperatura. Los materiales se disolvieron en PBS 10mM (pH=7.4) con un 0.1 % de fotoiniciador ultravioleta (UV). Como fotoiniciador se ha seleccionado Irgacure 2959 (I2959), debido a sus buenas propiedades de

solubilidad en agua y biocompatibilidad como se ha descrito en el Capítulo 1 de la Memoria.

Previamente a la selección del fotoiniciador I2959 activo en UV, se estudió también la fotopolimerización de los geles utilizando un fotoiniciador activo en el rango de la luz visible basado en Eosin Y. Aunque se consiguieron resultados de fotopolimerización análogos a los obtenidos con el fotoiniciador ultravioleta en cuanto a aspecto de los hidrogeles fotopolimerizados, la fluorescencia residual debida a Eosin Y interfirió en la cuantificación posterior de la viabilidad celular basada en un método que utiliza la fluorescencia. Por este motivo se decidió trabajar con radiación UV. No obstante, ante una posible aplicación *in vivo* se puede pensar en la posibilidad de trabajar con Eosin Y, muy atractivo debido a que se trata de un sistema biocompatible que además utiliza luz visible.⁴⁵

Para diferenciar los hidrogeles sin fotopolimerizar (formados por efecto de la temperatura) de los fotopolimerizados (formados por efecto de la temperatura y reticulados posteriormente de forma química) se ha utilizado la siguiente nomenclatura: Las formulaciones precursoras gelificadas sin fotopolimerizar se identifican con una H (**H**idrogel), seguida de la concentración del polímero % (w/v) y el derivado utilizado para su preparación: H18-F127-Ac-2, H23-F127-Ac-2, H18-F127-Ac-4, H23-F127-Ac-4, H18-F127-Ac-8 y H23-F127-Ac-8. Mientras que los materiales obtenidos tras la fotopolimerización se identifican con una P (**P**olimerizado): P/H18-F127-Ac-2, P/H23-F127-Ac-2, P/H18-F127-Ac-4, P/H23-F127-Ac-4, P/H18-F127-Ac-8 y P/H23-F127-Ac-8. Los ensayos con F127-Ac-8 al 18% (w/v), aunque se trata de un gel químico obtenido a partir del polímero en disolución, se denominan de la misma forma con el fin de facilitar los estudios comparativos descritos a lo largo de este capítulo.

Los hidrogeles covalentemente reticulados (geles polimerizados) han sido caracterizados morfológicamente por SEM y se han realizado también ensayos de hinchamiento y degradación.

3.4.- CARACTERIZACIÓN DE LA MORFOLOGÍA INTERNA POR SEM

Para llevar a cabo el estudio por SEM de los hidrogeles fotopolimerizados, las muestras se fracturaron tal y como se describe en el apartado 6.2.d., de la Parte Experimental.

En las Figuras 3.25, 3.26 y 3.27 se recogen las imágenes de SEM de los diferentes materiales en las que se pueden ver las estructuras internas porosas de los hidrogeles fotopolimerizados derivados de F127-Ac-2, F127-Ac-4 y F127-Ac-8, respectivamente.

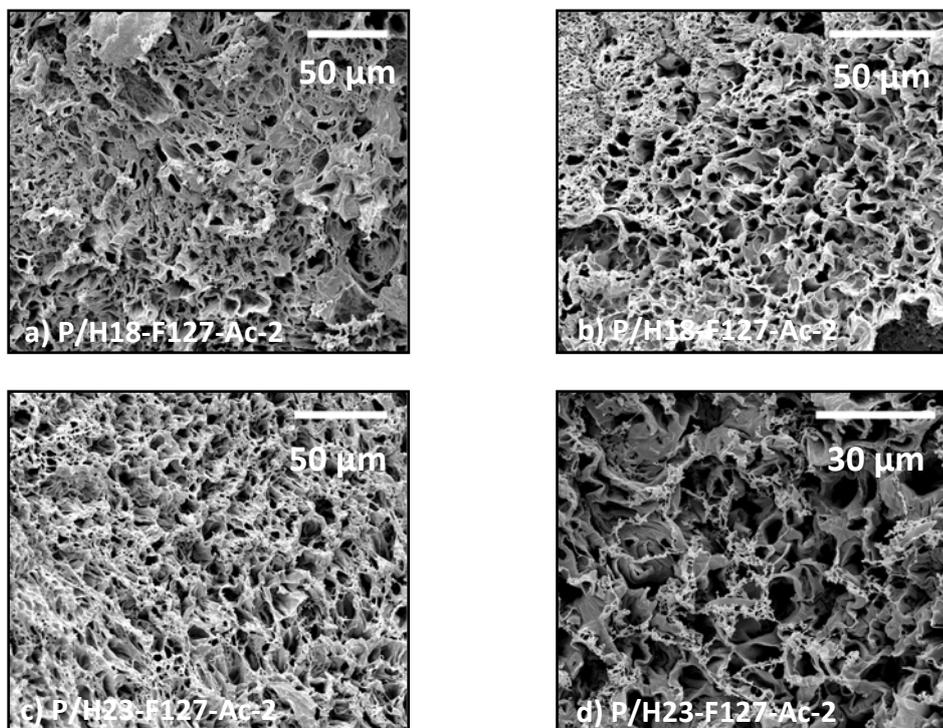


Figura 3.25. Imágenes SEM de la estructura interna de hidrogeles de F127-Ac-2 a concentraciones de 18 % (w/v) (a y b) y 23 % (w/v) (c y d).

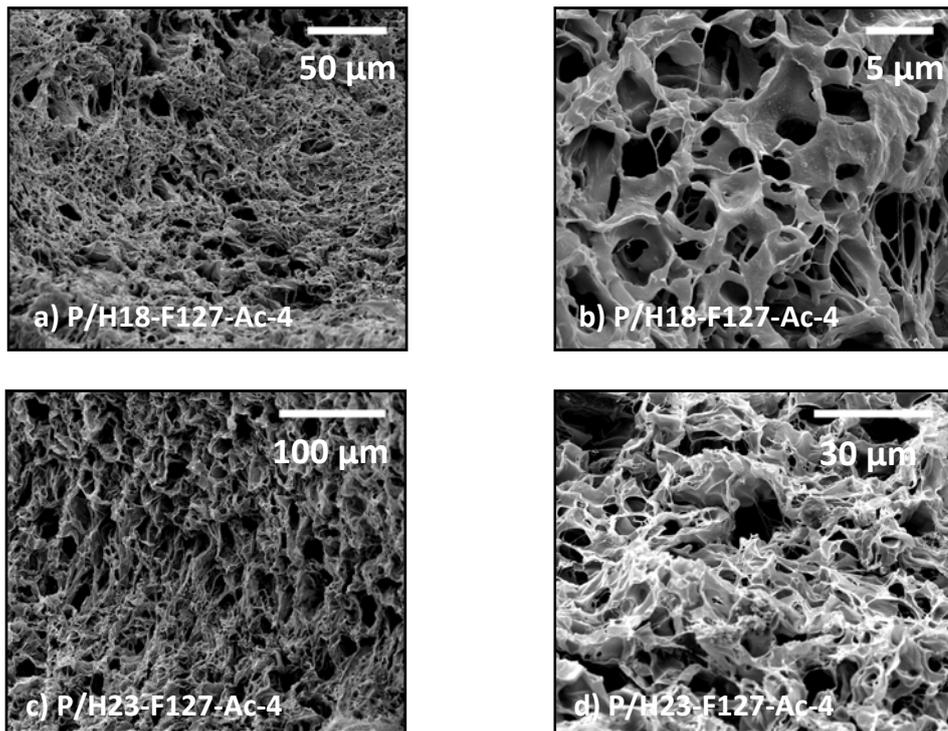


Figura 3.26. Imágenes SEM de la estructura interna de hidrogeles de F127-Ac-4 a concentraciones de 18 % (w/v) (a y b) y 23 % (w/v) (c y d).

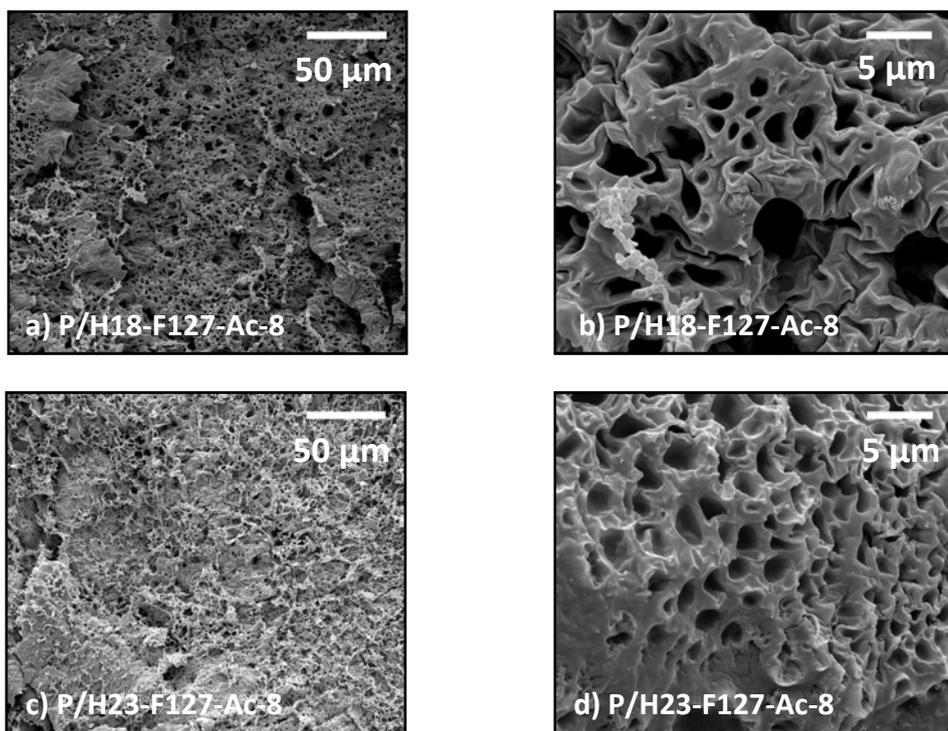


Figura 3.27. Imágenes SEM de la estructura interna de hidrogeles de F127-Ac-8 a concentraciones de 18 % (w/v) (a y b) y 23 % (w/v) (c y d).

Todos los hidrogeles estudiados presentan una morfología porosa irregular. Con el fin de realizar el estudio comparativo, en la Tabla 3.4, se recogen los intervalos correspondientes a los valores mínimo y máximo de tamaño de poro observados por SEM (estudio no estadístico).

Tabla 3.4. Tamaño de poro de los hidrogeles de derivados acrilados de Pluronic observados por SEM.

HIDROGEL	Tamaños de poro ^a (μm)
P/H18-F127-Ac-2	2-25
P/H23-F127-Ac-2	2-15
P/H18-F127-Ac-4	2-25
P/H23-F127-Ac-4	2-40
P/H18-F127-Ac-8	1-6
P/H23-F127-Ac-8	1-4

^a Intervalos correspondientes a los valores mínimo y máximo de tamaño de poro observados por SEM (estudio no estadístico).

En el caso de los hidrogeles fotopolimerizados P/H18-F127-Ac-2 (Figura 3.25, imágenes a y b) se observa una estructura con elevada densidad de poros, con un tamaño medio de poros de alrededor de 15 μm, si bien los tamaños varían entre 2 y 25 μm. Para el análogo de mayor concentración P/H23-F127-Ac-2 (Figura 3.25, imágenes c y d) la morfología porosa es similar, si bien se observa un predominio de poros de menor tamaño de alrededor de 10 μm (Figura 3.25, imagen d), lo que da lugar a una estructura ligeramente más compacta. Los poros observados corresponden a poros huecos, que sugiere la interconexión entre los mismos.

Los hidrogeles P/H18-F127-Ac-4 (Figura 3.26, imágenes a y b) y P/H23-F127-Ac-4 (Figura 3.26, imágenes c y d) poseen también una estructura interna porosa, de tamaños de poro de 2-25 μm y de 2-40 μm, respectivamente. En este caso el aumento de concentración no supone una reducción del tamaño de poro e incluso P/H23-F127-Ac-4 parece tener una mayor predominio de poros de mayor tamaño (Comparación de imágenes a y c en la Figura 3.26; se debe tener en

cuenta que la escala de las dos imágenes es diferente). En las imágenes b y d (Figura 3.26) se muestran con más detalle los poros interconectados entre sí.

El aumento de grupos acrilato por copolímero bloque reactivo, 2 para F127-Ac-2 y 4 para F127-Ac-4, no supone una disminución del tamaño de poro ni por tanto la formación de una estructura interna más compacta en los hidrogeles fotopolimerizados. Sin embargo la estructura de P/H18-F127-Ac-8 y P/H23-F127-Ac-8 es mucho más compacta, menos porosa y con un mayor predominio de poros de pequeño tamaño. Estas características se pueden observar claramente si comparamos las imágenes a y c de las Figuras 3.25 y 3.26 con las imágenes a y c de la Figura 3.27. En las imágenes b y d de la Figura 3.27 se observa en detalle la estructura de poros compactos donde no se aprecia claramente conexión entre los poros. El mayor número de grupos acrilato por molécula proporciona una mayor capacidad de entrecruzamiento en la reacción de fotopolimerización, lo que se traduce en una significativa reducción del tamaño de poro en una estructura mucho más compacta que la obtenida para P/H18-F127-Ac-2, P/H23-F127-Ac-2, P/H18-F127-Ac-4 y P/H23-F127-Ac-4.

3.5.- ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE LOS HIDROGELES FOTOPOLIMERIZADOS

Ante una posible aplicación de los hidrogeles fotopolimerizados como *scaffolds* para IT es importante conocer el proceso de degradación de éstos, ya que es necesaria una degradación progresiva del material en un tiempo suficiente que permita la diferenciación celular así como la producción de ECM por parte de las células.

El proceso de degradación de todos los hidrogeles fotopolimerizados, P/H18-F127-Ac-2, P/H23-F127-Ac-2, P/H18-F127-Ac-4, P/H23-F127-Ac-4, P/H18-F127-Ac-8 y P/H23-F127-Ac-8, se analizó siguiendo el protocolo de trabajo que se describe en el apartado 6.2.e., de la Parte Experimental. Esta metodología se ha establecido siguiendo un procedimiento descrito por Wen,^{100a} en el que la degradación se evidencia a través del hinchamiento de las muestras.

Se define como hinchamiento al cociente entre el peso del material a un determinado tiempo (W_t) y el peso inicial del hidrogel (W_0). El grado de hinchamiento a tiempo cero es 1, mientras que cuando el hidrogel está completamente degradado el valor del hinchamiento es 0.

$$\text{Grado de hinchamiento} = \frac{W_t}{W_0}$$

Los hidrogeles que poseen un bajo grado de hinchamiento inicial y que experimentan un aumento del grado de hinchamiento con el paso del tiempo, permiten un soporte inicial de las propiedades mecánicas que se van transfiriendo a la ECM en desarrollo con el paso del tiempo. Mayores grados de hinchamiento en los hidrogeles con el paso del tiempo son beneficiosos para la producción de ECM.^{14b}

En la Figura 3.28 se representa el perfil de degradación para los hidrogeles P/H18-F127-Ac-2 y P/H23-F127-Ac-2. Estos hidrogeles muestran un bajo grado de hinchamiento inicial, ligeramente superior para la concentración del 23 % en peso. Tras 35 días de ensayo se observa como los hidrogeles van aumentando el grado de hinchamiento debido a que los enlaces éster se van degradando, produciendo la pérdida de la integridad estructural que hace que el hidrogel sea capaz de absorber más agua. A los 42 días, el hinchamiento es más notable para ambos, e incluso se observa pérdida de la forma cilíndrica original del monolito (Figura 3.28 (a) para P/H18-F127-Ac-2, (c) para P/H23-F127-Ac-2), siendo esta pérdida más evidente en el caso de la concentración del 18%.

Al cabo de 49 días la forma se ha perdido completamente (Figura 3.28 (b) para P/H18-F127-Ac-2, (d) para P/H23-F127-Ac-2) y tras 57 días de ensayo ambos hidrogeles se han degradado completamente.

En la Figura 3.29 se muestran los perfiles de degradación para P/H18-F127-Ac-4 y P/H23-F127-Ac-4. Como en los anteriores materiales, inicialmente el

hinchamiento es muy bajo para ambas concentraciones. A partir de los 57 días de ensayo los hidrogeles comienzan a hincharse hasta alcanzar su peso máximo a los 77 días para P/H18-F127-Ac-4 y a los 84 días para P/H23-F127-Ac-4. El mayor grado de hinchamiento se alcanza antes para los hidrogeles de menor concentración, lo que puede deberse a una degradación de los enlaces éster de las unidades dendríticas¹⁰⁸ ligeramente más rápida, debido a la menor densidad de la red entrecruzada. A partir de ahí los hidrogeles comienzan a perder masa hasta su completa degradación, a los 93 días para P/H18-F127-Ac-4 y 98 días para P/H23-F127-Ac-4.

El mayor tiempo de estabilidad de los hidrogeles P/H18-F127-Ac-4 y P/H23-F127-Ac-4 frente a los hidrogeles P/H18-F127-Ac-2 y P/H23-F127-Ac-2 está de acuerdo con un mayor entrecruzamiento de la red polimérica, posible por el aumento de grupos acrilato en el derivado tetracrilado frente al diacrilado.

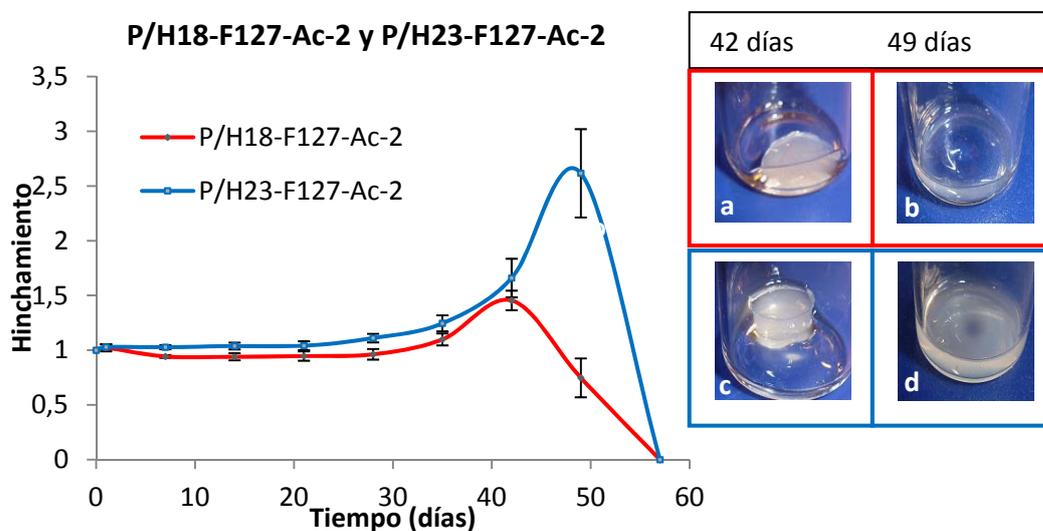


Figura 3.28. Hinchamiento de los hidrogeles P/H18-F127-Ac-2 y P/H23-F127-Ac-2 en función del tiempo.

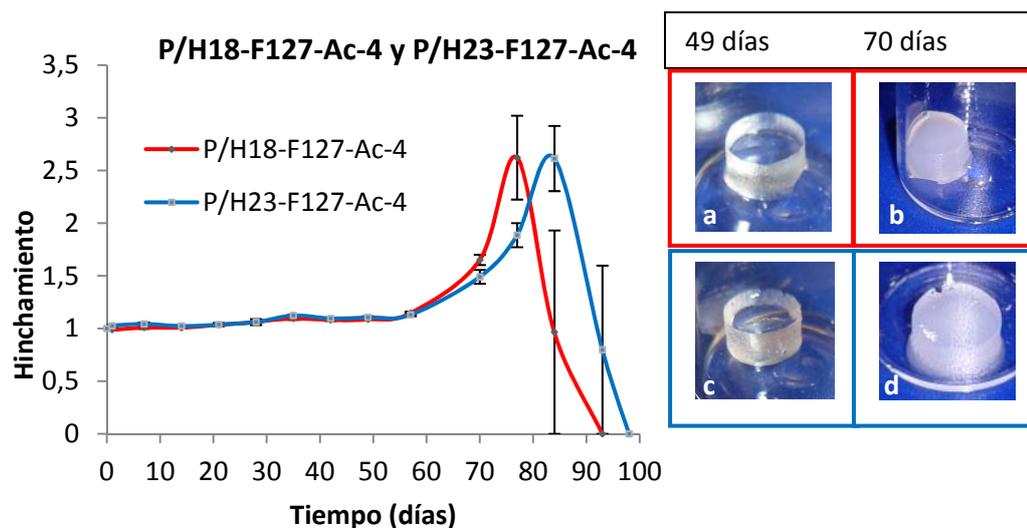


Figura 3.29. Hinchamiento de los hidrogeles P/H18-F127-Ac-4 y P/H23-F127-Ac-4 en función del tiempo.

En esta línea, los hidrogeles P/H18-F127-Ac-8 y P/H23-F127-Ac-8 (Figura 3.30) presentan un bajo grado de hinchamiento inicial sin ningún indicio de degradación tras más de 200 días de ensayo. A partir de los 240 días el hinchamiento de los hidrogeles y la progresiva pérdida de la morfología cilíndrica comienzan a ser notables, produciéndose la degradación total del hidrogel P/H18-F127-Ac-8 en 276 días y de P/H23-F127-Ac-8 en 286 días.

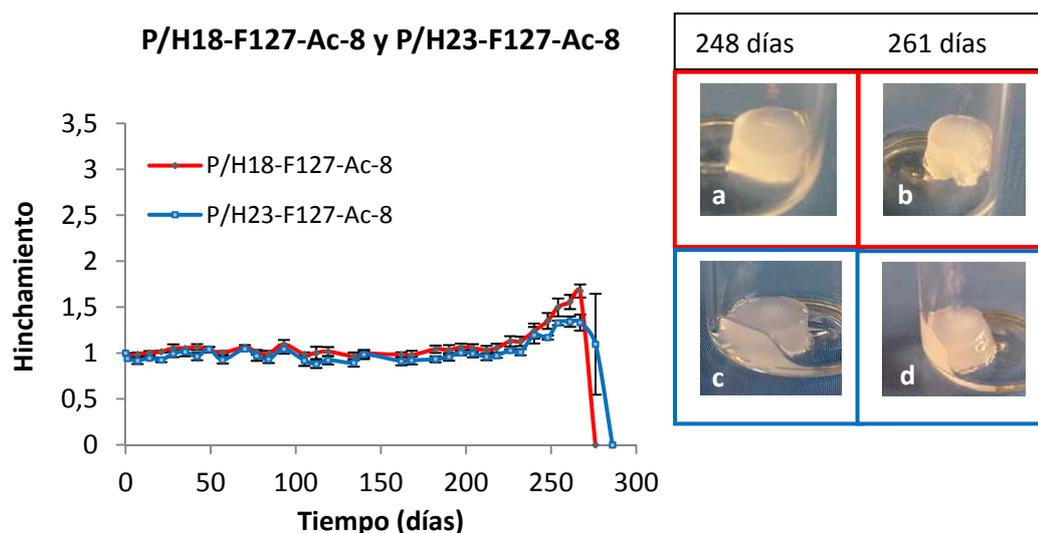


Figura 3.30. Hinchamiento de los hidrogeles P/H18-F127-Ac-8 y P/H23-F127-Ac-8 en función del tiempo.

Estos resultados también son coherentes con la morfología interna observada por SEM (*apartado 3.4*, de este capítulo), que resultaba ser muy compacta en los derivados octacrilados por el alto grado de entrecruzamiento.

Como resumen de lo observado, la Tabla 3.5 recoge los tiempos de degradación obtenidos para cada uno de los hidrogeles fotopolimerizados. El tiempo de degradación se puede modular con el número de grupos acrilato presentes en el copolímero bloque lineal o dendrítico-lineal-dendrítico y con la concentración.

Tabla 3.5. Tiempo de degradación de hidrogeles fotopolimerizados de F127-Ac-2, F127-Ac-4 y F127-Ac-8.

HIDROGEL	Tiempo de degradación (días)
P/H18-F127-Ac-2	57
P/H23-F127-Ac-2	57
P/H18-F127-Ac-4	93
P/H23-F127-Ac-4	98
P/H18-F127-Ac-8	276
P/H23-F127-Ac-8	286

3.6.- ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

Los ensayos de viabilidad biológica han sido realizados con células humanas, en un trabajo de colaboración con la Dra. María José Martínez Lorenzo del *Banco de Sangre y Tejidos de Aragón*. Para la realización de estos ensayos se eligieron células mesenquimales humanas (MSC) extraídas de cartílago.

Las MSC fueron estudiadas por primera vez por Friedenstein en los años 70.¹¹⁵ Dos de las principales características de estas células, como define la Sociedad Internacional de Terapia Celular, son su capacidad de adhesión al plástico, adquiriendo una forma característica alargada, en forma de aguja, y su capacidad de diferenciación a distintos tipos de células que dan lugar a distintas variedades

¹¹⁵ Friedenstein AJ, G. J., Kulagina NN, *Exp Hematol* **1976**, *4*, 267-274.

de tejidos, como se puede observar en la Figura 3.31.¹¹⁶ Esta capacidad de diferenciación a distintos tejidos fue determinante a la hora de elegir el tipo de células para la realización de nuestros ensayos, ante la posibilidad de aplicación de los hidrogeles como andamiajes para Ingeniería de tejidos.

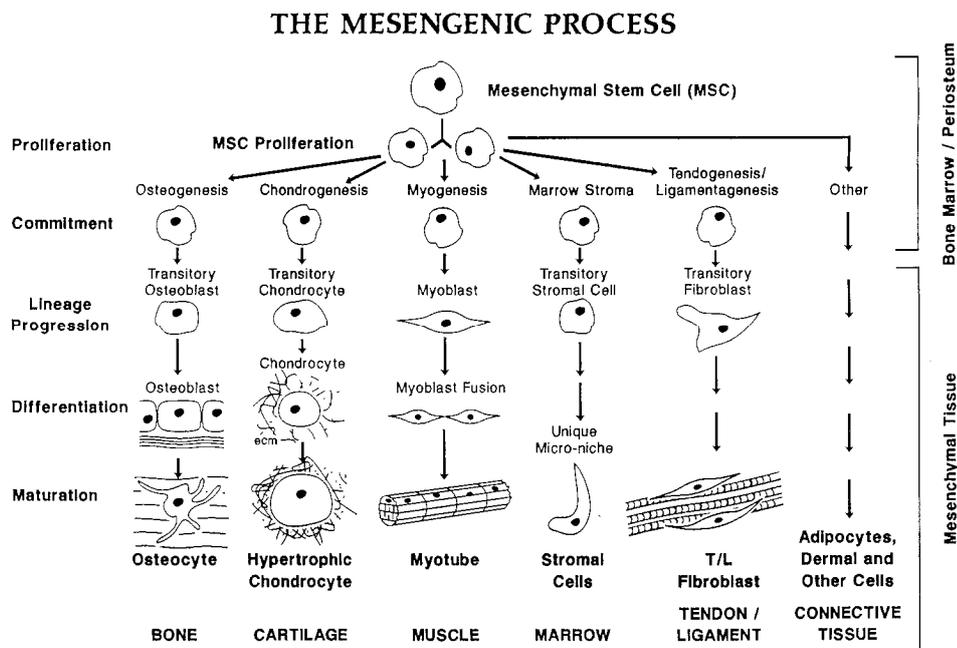


Figura 3.31. Esquema de las diferentes vías de diferenciación de las MSC a hueso, cartílago, músculo, médula, tendones o ligamentos y tejidos conectivos.¹¹⁶

En la Tabla 3.6 se resumen los tipos de experimentos realizados, incluyendo a continuación algunos comentarios relativos. La exposición y discusión de los resultados se ha realizado en función del grupo funcional terminal presente en la estructura química de los materiales: grupos acrilato (resumen de experimentos en color rosa en la Tabla 3.6) y grupos bencilo o hidroxilo (resumen de experimentos en color azul en la misma tabla). Las viabilidades celulares obtenidas se han comparado en todos los casos con la supervivencia celular en

¹¹⁶ (a) Sensebé, L.; Krampera, M.; Schrezenmeier, H.; Bourin, P.; Giordano, R., *Vox Sanguinis* **2010**, 98 (2), 93-107; (b) Caplan, A. I., *The Journal of Pathology* **2009**, 217 (2), 318-324.

presencia del polímero Pluronic F127®, determinada de la misma forma que para los copolímeros bloque lineal o dendrítico-lineal-dendrítico.

Tabla 3.6. Tabla resumen de los ensayos de viabilidad celular realizados.

COMPUESTO	TIEMPO (h)	DISOL. (% w/v)	EXPTO.	H (% w/v)	P/H (% w/v)	EXPTO.	Tª (°C)
F127-Ac-2	24/48/72	5 y 10	2D	18 y 23	18 y 23	2D y 3D	37
F127-Ac-4	24/48/72	5 y 10	2D	18 y 23	18 y 23	2D y 3D	37
F127-Ac-8	24/48/72	5 y 10	2D	18 y 23	18 y 23	2D y 3D	37
Pluronic F127	24/48/72	5 y 10	2D	18 y 23	-	2D y 3D	37
F127-Bn-2	24/48/72	5 y 10	2D	23	-	2D y 3D	37
F127-OH-4	24/48/72	5 y 10	2D	23	-	2D y 3D	37
F127-Bn-4	24/48/72	5 y 10	2D	-	-	2D y 3D	37
F127-OH-8	24/48/72	5 y 10	2D	23	-	2D y 3D	37

La viabilidad celular se ha evaluado a las 24, 48 y 72 horas de incubación, y se han llevado a cabo 2 tipos de ensayos, que se han denominado ensayos 2D y 3D, cuya representación esquemática se puede ver en la Figura 3.32.

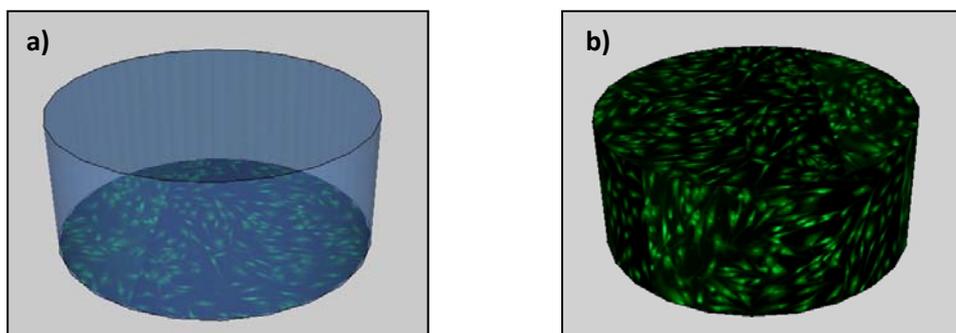


Figura 3.32. Esquema ilustrativo de: a) experimentos 2D, capa de células cubiertas por el hidrogel, y b) experimentos 3D, células distribuidas en un entorno tridimensional en el interior del hidrogel.

Los ensayos 2D consisten en cubrir una capa de células con el hidrogel (Figura 3.32 (a)), mientras que los 3D consisten en formar el hidrogel con las células en su interior (Figura 3.32 (b)).

Los ensayos se han realizado sobre los polímeros disueltos en medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) tanto en disolución a concentraciones a las cuales no se forma el hidrogel por efecto de la temperatura, concentraciones del 5 y 10 % (w/v) (ensayos en 2D), y que se pueden considerar ensayos con el monómero en disolución; como con los materiales en estado gel, a concentraciones del 18 y 23 % (w/v) (ensayos 2D y 3D). En estos casos se ha trabajado sobre hidrogeles sin fotopolimerizar y fotopolimerizados. Las concentraciones para los ensayos en el estado gel se eligieron teniendo en cuenta las concentraciones de gelificación determinadas para cada uno de los copolímeros bloque lineales o dendrítico-lineal-dendrítico, en el apartado 3.2 de este capítulo. El protocolo de preparación de las células, preparación de las disoluciones de polímero y preparación de los ensayos de viabilidad celular 2D y 3D, sobre hidrogeles sin fotopolimerizar y fotopolimerizados se describen con más detalle en el apartado 6.2.f., de la Parte Experimental.

De los métodos descritos en la literatura para evaluar la viabilidad celular, el más adecuado para estos materiales resultó ser el método *live/dead*[®] (Invitrogen) basado en las tinciones fluorescentes específicas de células vivas (verde) y muertas (rojo).^{46b, 117} Otros métodos como el MTT,¹¹⁸ fueron descartados debido a dificultades experimentales. Los métodos *live/dead*[®] y MTT se describen con detalle en el *Anexo III*.

¹¹⁷ (a) Wu, J.; Wu, D.; Mutschler, M. A.; Chu, C. C., *Advanced Functional Materials* **2012**, 22 (18), 3815-3823; (b) Howard, D.; Takae, S.; Wang, W. X.; Vermonden, T.; Hennink, W. E.; Stayton, P. S.; Hoffman, A. S.; Endruweit, A.; Alexander, C.; Howdle, S. M.; Shakesheff, K. M., *Biomacromolecules* **2009**, 10 (10), 2895-2903.

¹¹⁸ (a) Denizot, F.; Lang, R., *Journal of Immunological Methods* **1986**, 89 (2), 271-277; (b) Mosmann, T., *Journal of Immunological Methods* **1983**, 65 (1-2), 55-63.

La nomenclatura seguida para la discusión de los resultados de los ensayos celulares utiliza el tipo de ensayo celular, 2D ó 3D, al principio del identificador del material. Así, el término 2D/H18-F127-Ac-4 correspondería a un ensayo celular en un entorno 2D, de un material sin fotopolimerizar (hidrogel formado sólo por efecto de la temperatura), para disoluciones del 18 % (w/v) del derivado F127-Ac-4 disuelto en DMEM. El término 2D/P/H18-F127-Ac-4 correspondería a un ensayo celular en entorno 2D, con un material fotopolimerizado (hidrogel formado por efecto de la temperatura y reticulado químicamente por efecto de la luz), para disoluciones del 18 % (w/v) del derivado F127-Ac-4 disuelto en DMEM que contiene un 0.1 % de fotoiniciador I2959. Los ensayos celulares con el material en disolución utilizan la misma nomenclatura descrita con la sustitución de la letra H por la letra D (Disolución).

Los resultados de viabilidad celular se muestran en los siguientes apartados. En primer lugar se incluyen los resultados obtenidos con ensayos en entorno 2D y 3D para los derivados acrilados F127-Ac-2, F127-Ac-4 y F127-Ac-8, para exponer posteriormente los resultados correspondientes a F127-Bn-2, F127-OH-4, F127-Bn-4 y F127-OH-8.

3.6.1.- Resultados de viabilidad celular de derivados acrilados F127-Ac-n (n=2, 4, 8): F127-Ac-2, F127-Ac-4 y F127-Ac-8.

En las Figuras 3.33 y 3.34 se recogen los resultados de viabilidad celular de estos materiales en entornos 2D y 3D respectivamente.

El análisis de los ensayos 2D en disolución (Figura 3.33, a y b), 2D/D5-F127-Ac-n (n=2, 4, 8) y 2D/D10-F127-Ac-n (n=2, 4, 8), muestra una disminución de la viabilidad celular a las con el aumento de concentración, especialmente marcada con el aumento de grupos acrilato reactivos por molécula.

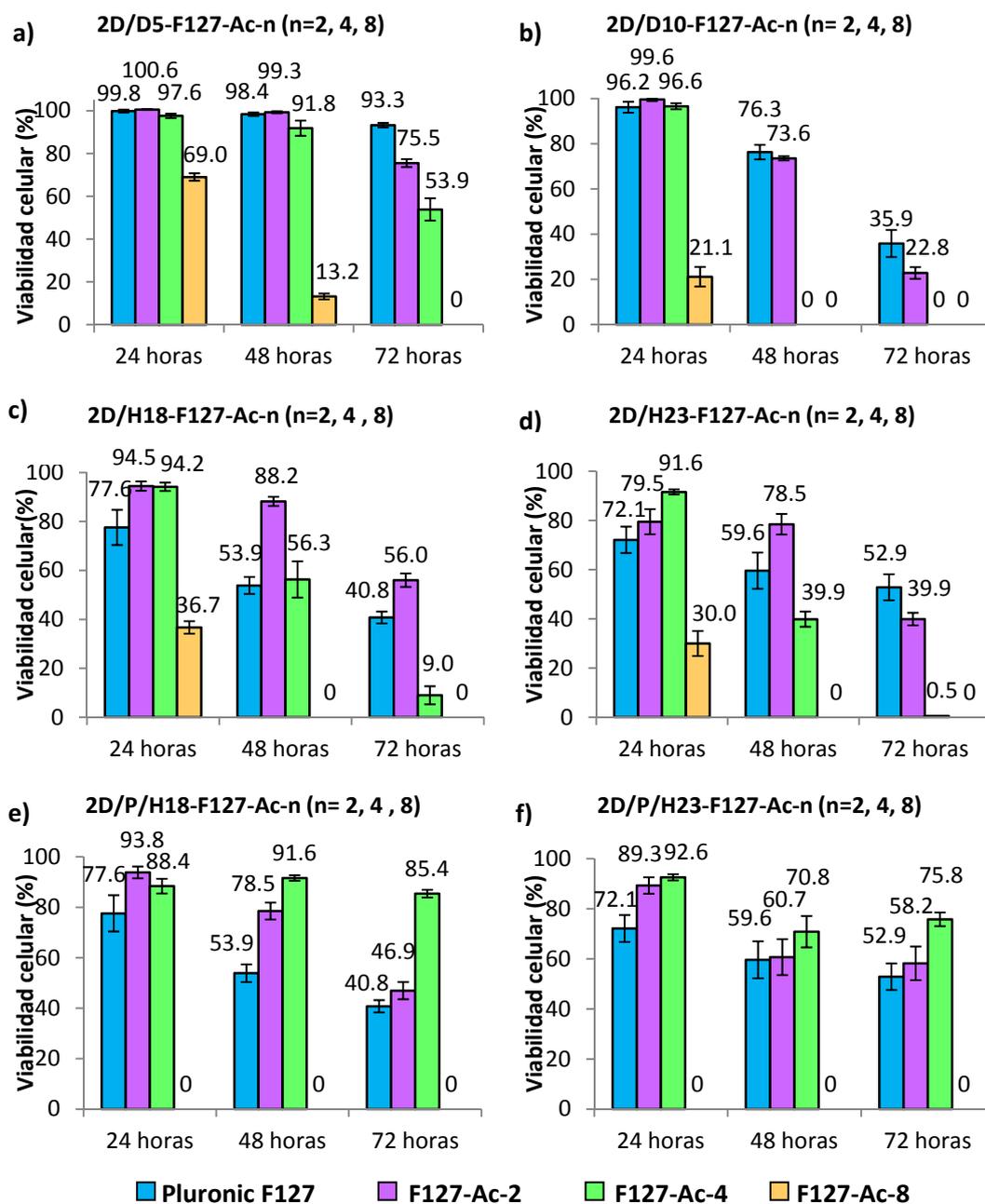


Figura 3.33. Viabilidad celular de derivados acrilados F127-Ac-2, F127-Ac-4 y F127-Ac-8 en entorno 2D: a) al 5 % (w/v) en disolución, b) al 10 % (w/v) en disolución, c) al 18 % (w/v) en estado gel sin fotopolimerizar, d) al 23 % (w/v) en estado gel sin fotopolimerizar, e) al 18 % (w/v) en estado gel fotopolimerizado y f) al 23 % (w/v) en estado gel fotopolimerizado.

Cuando los ensayos 2D se realizaron en estado gel (Figura 3.33, c y d), 2D/H18-F127-Ac-n (n=2, 4, 8) y 2D/H23-F127-Ac-n (n=2, 4, 8), que supone trabajar con concentraciones mayores de reticulante, se comprueba que disminuye ligeramente la toxicidad con respecto al monómero libre al 10 % (w/v). Esto

puede explicarse porque en el estado gel los grupos acrilato presentan menor movilidad que en disolución ya que se encuentran fijados en la estructura del hidrogel formado por efecto de la temperatura. Además se observa que cuanto mayor es la densidad de grupos acrilato por molécula, menores son las viabilidades.

Finalmente, en los ensayos 2D en estado gel fotopolimerizado (Figura 3.33, e y f), con excepción de los materiales octacrilados (hidrogeles del derivado F127-Ac-8), los hidrogeles fotopolimerizados 2D/P/H18-F127-Ac-2 y 2D/P/H23-F127-Ac-2 y los derivados de F127-Ac-4, permiten viabilidades superiores al 50% presentando una viabilidad celular similar e incluso superior a la de los análogos sin fotopolimerizar. Además, cabe destacar que en los ensayos 2D/P/H18-F127-Ac-2, 2D/P/H23-F127-Ac-2, 2D/P/H18-F127-Ac-4 y 2D/P/H23-F127-Ac-4 se obtuvieron viabilidades celulares mejoradas con respecto al polímero Pluronic F127[®], siendo los hidrogeles con mayor viabilidad celular los del material F127-Ac-4.

Analizando los ensayos 3D en estado gel sin polimerizar (Figura 3.34, a y b), se puede observar que los hidrogeles 3D/H18-F127-Ac-n (n=2, 4) y 3D/H23-F127-Ac-n (n=2, 4) permitieron viabilidades celulares en algunos casos superiores al 50%, siendo de nuevo el material menos adecuado F127-Ac-8.

A diferencia de lo observado para los ensayos 2D, la fotopolimerización en hidrogeles en entorno 3D (Figura 3.34, c y d) produce una disminución de la viabilidad celular, con biocompatibilidades inferiores a Pluronic F127[®]. 3D/P/H18-F127-Ac-4 y 3D/P/H23-F127-Ac-4 presentaron una gran mortalidad celular tras 24 horas de ensayo, si bien el valor de viabilidad se mantiene constante tras 48 y 72 horas.

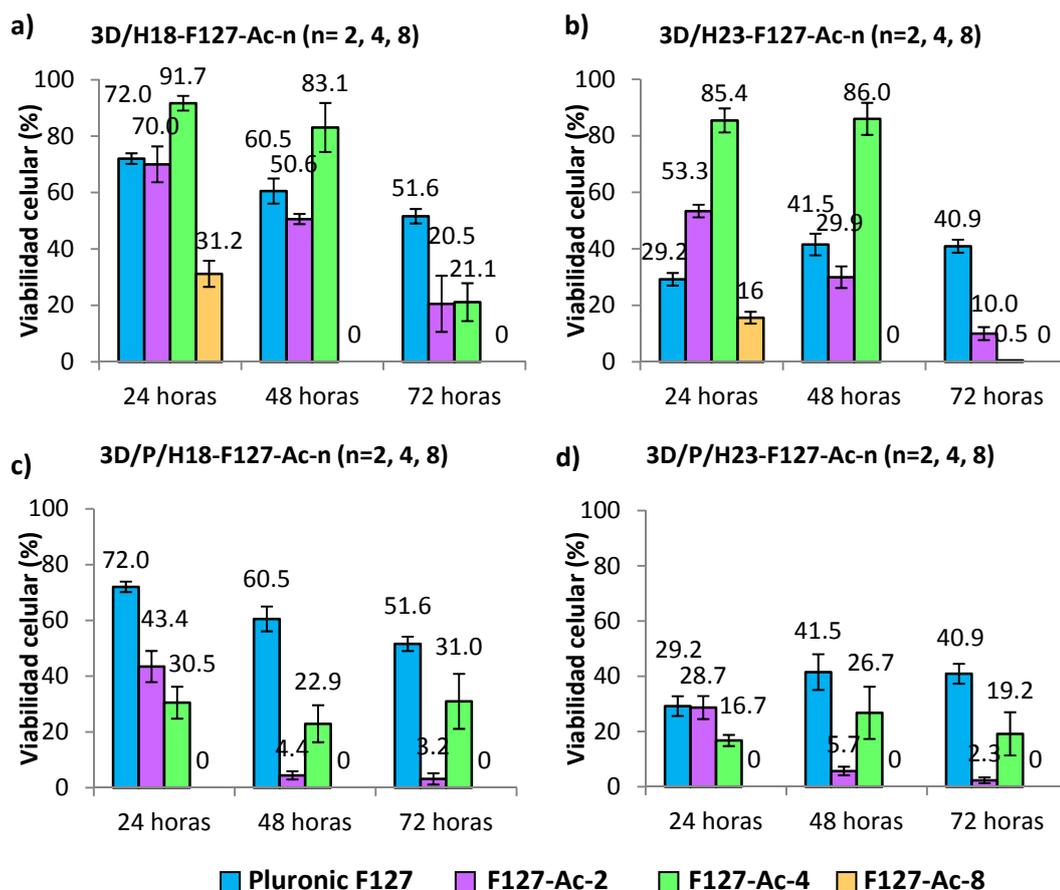


Figura 3.34. Viabilidad celular de derivados acrilados F127-Ac-2, F127-Ac-4 y F127-Ac-8 en entorno 3D: a) al 18 % (w/v) en estado gel sin fotopolimerizar, b) al 23 % (w/v) en estado gel sin fotopolimerizar, c) al 18 % (w/v) en estado gel fotopolimerizado y d) al 23 % (w/v) en estado gel fotopolimerizado.

De forma general, se han observado mayores valores de viabilidad celular en los ensayos de los hidrogeles fotopolimerizados en entorno 2D que en los ensayos 3D. Las razones que pueden conducir a estos resultados son variadas y, en particular, puede deberse a la mayor restricción de espacio y mayor superficie de contacto de las células con el hidrogel al producirse la fotopolimerización en un entorno 3D.

Por otra parte, como se ha indicado, los materiales que presentan una mejor viabilidad celular son los hidrogeles de F127-Ac-4 tanto en entorno 2D como en entorno 3D. Este hecho puede estar relacionado con la formación de una estructura interna con tamaños de poro ligeramente superiores, tal y como se ha observado por SEM (Tabla 3.4).

La menor viabilidad celular mostrada por los hidrogeles fotopolimerizados de F127-Ac-8 se puede relacionar, así mismo, con el pequeño tamaño de poro que presentan, tal y como se ha observado por SEM (entre 1 y 6 μm , Tabla 3.4). El reducido tamaño de los poros puede producir muerte celular debido a la restricción de espacio, principalmente en los ensayos 3D, además de limitar el transporte de nutrientes y sustancias de desecho, efecto que será más notable en los ensayos 2D.

Además de los resultados de viabilidad celular aquí comentados, se ha analizado mediante microscopia de fluorescencia la morfología celular en cada uno de los ensayos realizados. Para todos ellos se ha observado una morfología celular que es característica en función del tipo de ensayo, 2D o 3D.

En todos los ensayos 2D, las células se encuentran adheridas al fondo del pocillo de la placa de cultivo y presentan la morfología típica alargada de las MSC (Figura 3.35, 2D/P/F127-Ac-4).

En cambio, en los ensayos 3D, las células presentan una morfología redondeada lo que sugiere una baja adherencia al hidrogel (Figura 3.36, 3D/P/F127-Ac-4). Esta baja adhesión al material puede ser negativa a la hora de la supervivencia celular, pero la morfología redondeada que adquieren al no adherirse puede ser positiva para la diferenciación de las MSC a condrocitos, que son células de tipo no adherente que presentan dicha morfología.

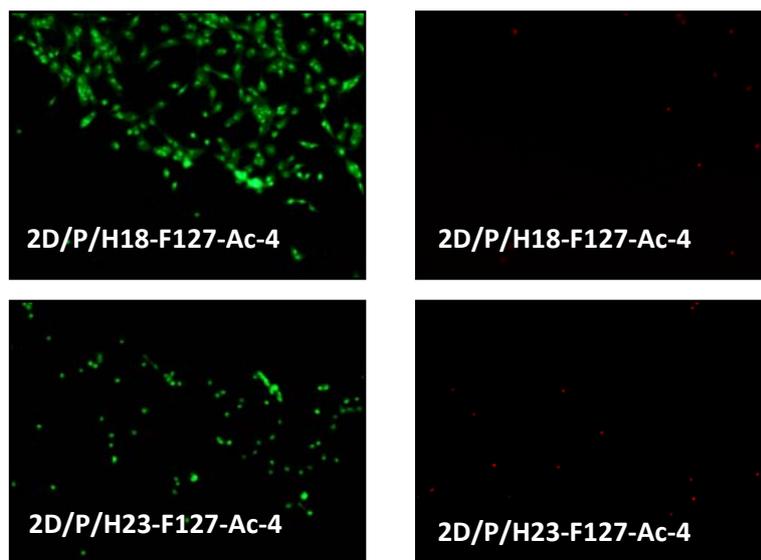


Figura 3.35. Imágenes de microscopia de fluorescencia para ensayos 2D de hidrogeles fotopolimerizados de F127-Ac-4 al 18 % y 23 % tras 24 horas de ensayo, a la izquierda en color verde se observan las células vivas y a la derecha en color rojo las células muertas.

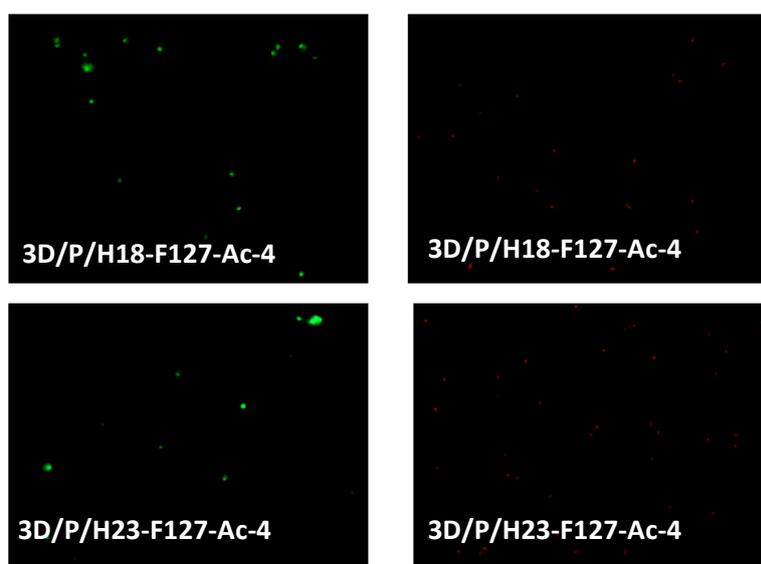


Figura 3.36. Imágenes de microscopia de fluorescencia para ensayos 3D de hidrogeles fotopolimerizados de F127-Ac-4 al 18 % y 23 % tras 24 horas de ensayo, a la izquierda en color verde se observan las células vivas y a la derecha en color rojo las células muertas.

Con el fin de disponer de una observación tridimensional de las células encapsuladas en el interior del hidrogel, la morfología celular en los ensayos 3D/P/H23-F127-Ac-4 se caracterizó también mediante microscopia confocal, tras 24 horas de ensayo. Para la tinción de las células vivas se utilizó Calcein AM y para los núcleos de las células, DAPI, que es un marcador fluorescente en el azul

que se une a las secuencias de ADN en el núcleo. El marcaje de las células en el interior de los hidrogeles se realizó de la forma descrita en el apartado 6.2.f., de la Parte Experimental.

En la Figura 3.37 (a) se muestra una imagen en 3D de una célula encapsulada en el interior del hidrogel. En la Figura 3.37 (b) y (c) se muestra uno de los planos del hidrogel con células en su interior con marcaje de Calcein AM y DAPI respectivamente. Además, en la Figura 3.37 (d) se observa la superposición de los marcajes fluorescentes con las células observadas en contraste de fases.

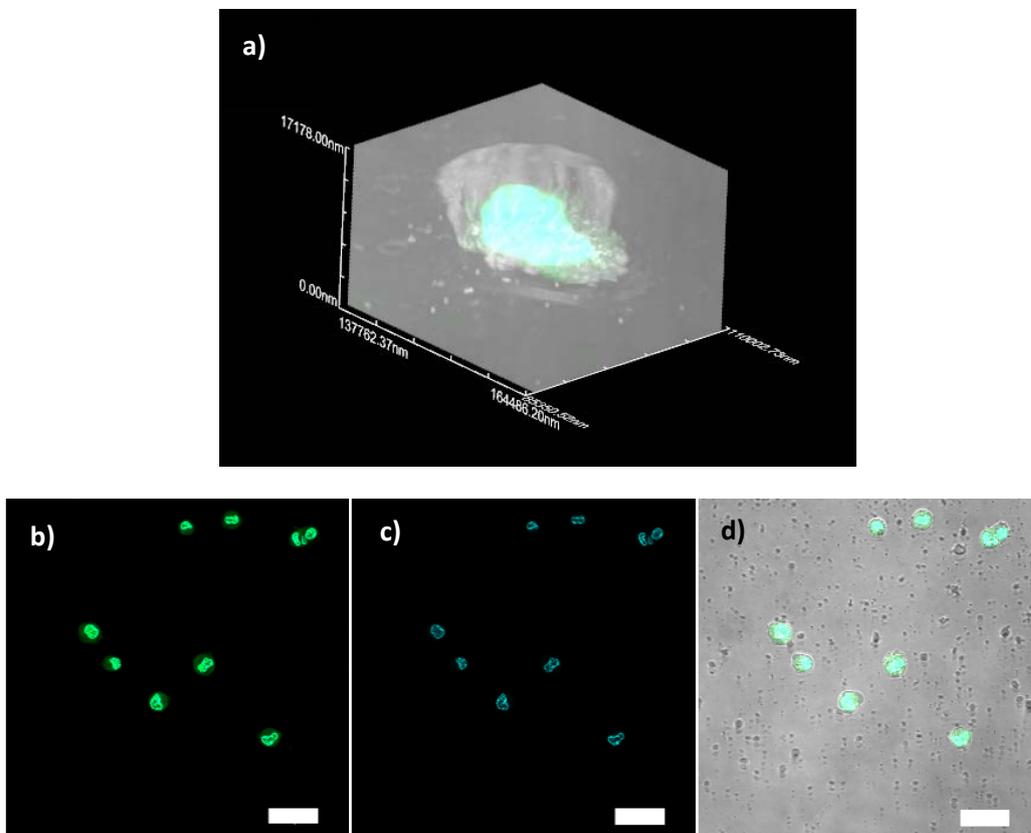


Figura 3.37. Imágenes de microscopia de fluorescencia confocal para ensayos 3D de hidrogeles fotopolimerizados de F127-Ac-4 al 23 % tras 24 horas de ensayo, a) imagen en 3D de una célula encapsulada en el interior del hidrogel, b) células vivas teñidas con Calcein AM encapsuladas en el hidrogel situadas en un mismo plano, c) núcleos celulares de células teñidos con DAPI situadas en un mismo plano, d) superposición de imágenes de fluorescencia en el verde, fluorescencia en el azul sobre imagen en contraste de fases. La escala corresponde a 30 μm .

Con este ensayo se ha demostrado que las células se encapsulan en el interior de los hidrogeles tras la formación de estos por efecto de la temperatura y la posterior fotopolimerización.

Los resultados de viabilidad celular obtenidos, en particular con hidrogeles fotopolimerizados de F127-Ac-4 en entorno 3D, han permitido seleccionarlos para preparar cortes histológicos, estudio que se está realizando en la actualidad. Este tipo de preparaciones permitirá cuantificar el grado de diferenciación celular en el interior de los hidrogeles, mediante la tinción específica de los distintos tipos de proteínas constituyentes de la ECM excretados por las células en el caso de producirse dicha diferenciación.

3.6.2.- Resultados de viabilidad celular de derivados F127-Bn-n (n=2,4): F127-Bn-2 y F127-Bn-4 y F127-OH-n (n=4, 8): F127-OH-4 y F127-OH-8.

En las Figuras 3.38 y 3.39 se recogen los resultados de viabilidad celular en entorno 2D y 3D, respectivamente, de estos materiales no reactivos también estudiados en este trabajo, tanto en disolución (D) como en forma de hidrogeles (H).

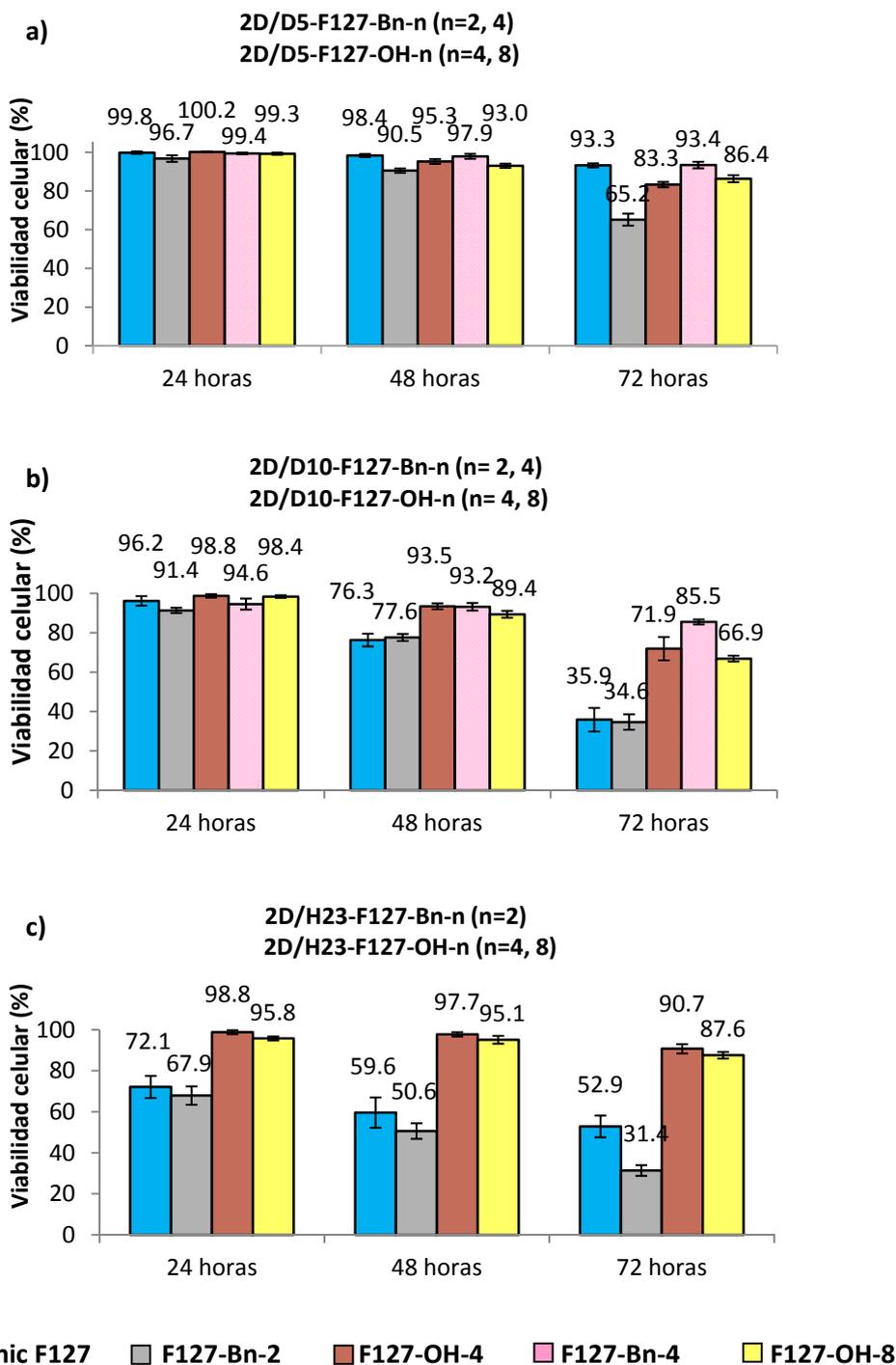


Figura 3.38. Viabilidad celular de derivados F127-Bn-2, F127-OH-4, F127-Bn-4 y F127-OH-8, en entorno 2D: a) al 5% (w/v) en disolución, b) al 10% (w/v) en disolución y c) al 23% (w/v) en estado gel.

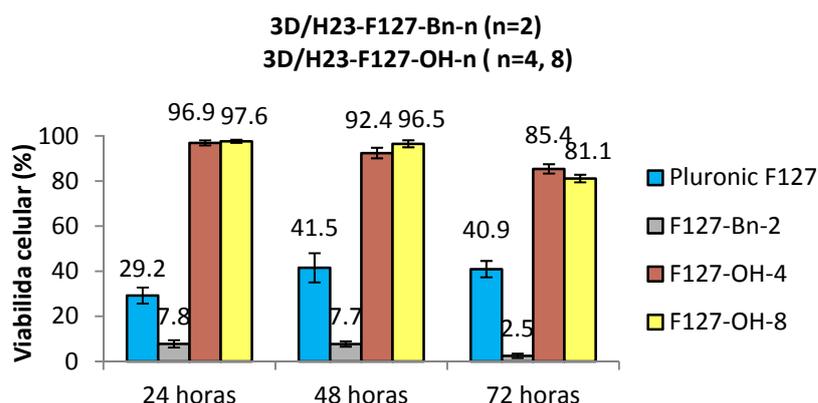


Figura 3.39. Viabilidad celular de derivados F127-Bn-2, F127-OH-4, F127-Bn-4 y F127-OH-8, en entorno 3D al 23 % (w/v) en estado gel.

Del análisis de los resultados obtenidos en ensayos celulares 2D de disoluciones al 5% (w/v) (Figura 3.38, (a)), 2D/D5-F127-Bn-n (n=2, 4) y 2D/D5-F127-OH-n (n=4, 8), se deduce una viabilidad celular de estos compuestos similar a Pluronic F127® y próximas al 90% tras 72 horas de ensayo en la mayoría de los casos.

Al aumentar la concentración al 10% (w/v) (Figura 3.38, (b)), con 2D/D10-F127-Bn-n (n=2, 4) y 2D/D10-F127-OH-n (n=4, 8) se observa una disminución de la viabilidad celular en todos los materiales. Sin embargo, esta disminución es incluso menos significativa que la observada para Pluronic F127®, manteniéndose en valores superiores al 65% tras 72 horas de ensayo.

Cuando los ensayos se realizan en entorno 2D con los materiales al 23% (w/v) en estado gel (Figura 3.38, (c)), 2D/H23-F127-Bn-n (n=2) y 2D/H23-F127-OH-n (n=4, 8), si bien se produce una disminución de la viabilidad celular para F127-Bn-2 con respecto a los materiales en disolución, los hidrogeles de los derivados F127-OH-4 y F127-OH-8 presentan una viabilidad celular entorno al 90% tras 72 horas de ensayo.

Esta buena viabilidad de los materiales polihidroxiados se mantiene incluso en los ensayos 3D con los materiales en estado gel al 23% (w/v) (Figura 3.39), 3D/H23-F127-OH-n (n=4, 8), superando significativamente al Pluronic F127®.

En las Figuras 3.40 a 3.46 se muestran las morfologías celulares observadas en los ensayos 2D y 3D de los diferentes hidrogeles, así como en disolución.

Como se puede comprobar en los ensayos de derivados F127-Bn-2 en entorno 2D las células poseen una morfología alargada y redondeada en 3D (Figuras 3.40 y 3.41, respectivamente).

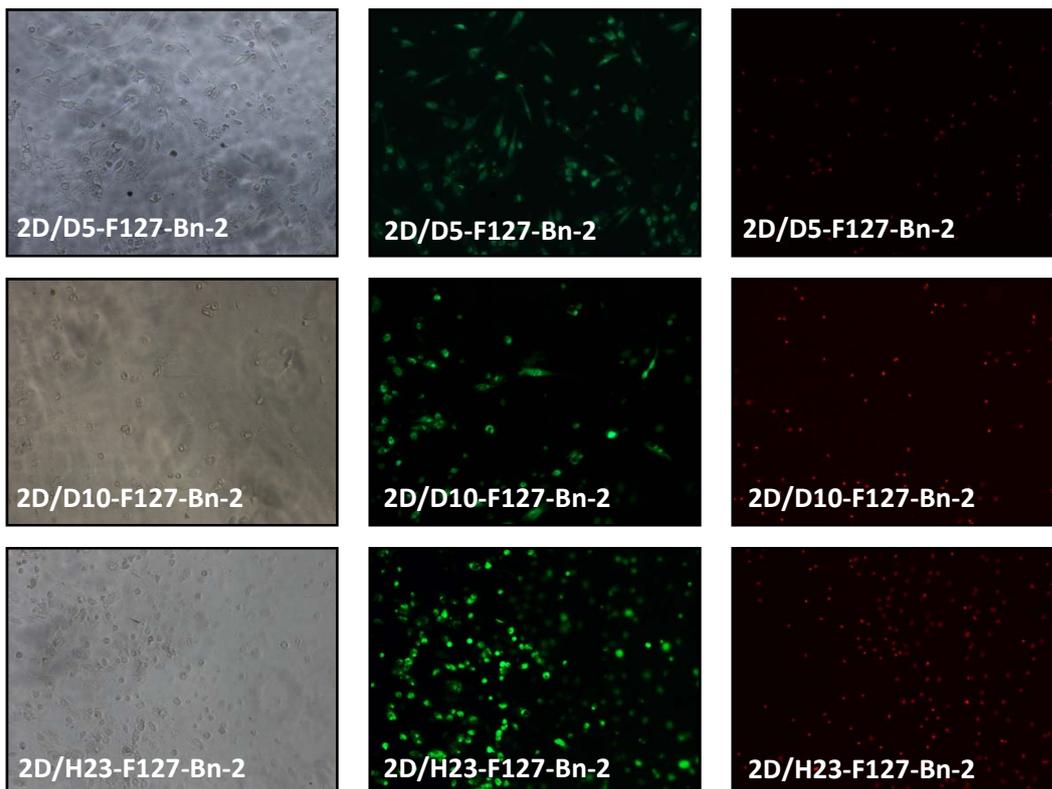


Figura 3.40. Imágenes de microscopía de fluorescencia para ensayos 2D de disoluciones e hidrogeles de F127-Bn-2 tras 72 horas de ensayo. Primera columna: Imágenes en contraste de fases; Segunda columna: Células vivas; Tercera columna: Células muertas.

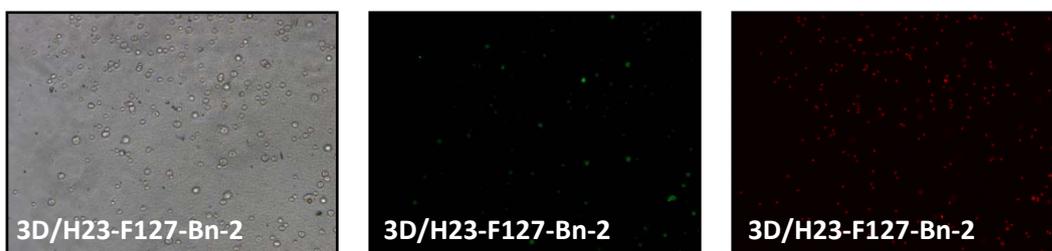


Figura 3.41. Imágenes de microscopía de fluorescencia para ensayos 3D de hidrogeles de F127-Bn-2 tras 72 horas de ensayo. Primera columna: Imágenes en contraste de fases; Segunda columna: Células vivas; Tercera columna: Células muertas.

La morfología celular alargada también se observó en ensayos celulares en entorno 2D para los derivados F127-OH-4 y F127-OH-8 (Figura 3.42 y 3.43, respectivamente) a todas las concentraciones estudiadas.

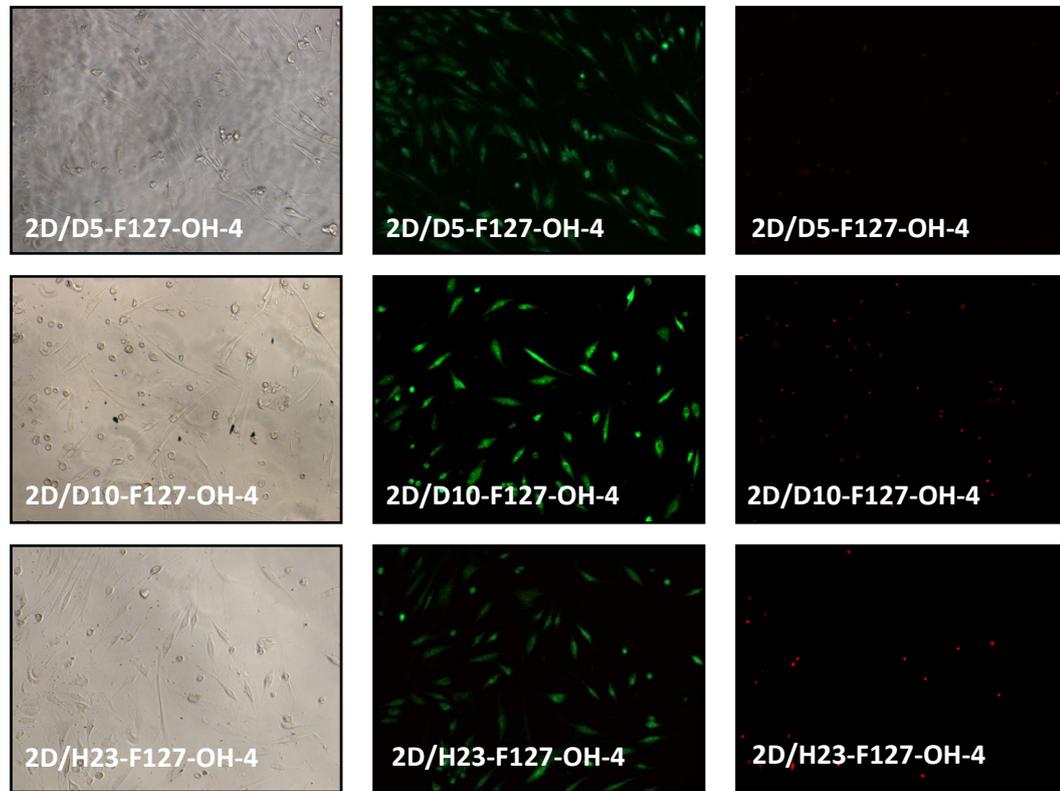


Figura 3.42. Imágenes de microscopia de fluorescencia para ensayos 2D de disoluciones e hidrogeles de F127-OH-4 tras 72 horas de ensayo. Primera columna: Imágenes en contraste de fases; Segunda columna: Células vivas; Tercera columna: Células muertas.

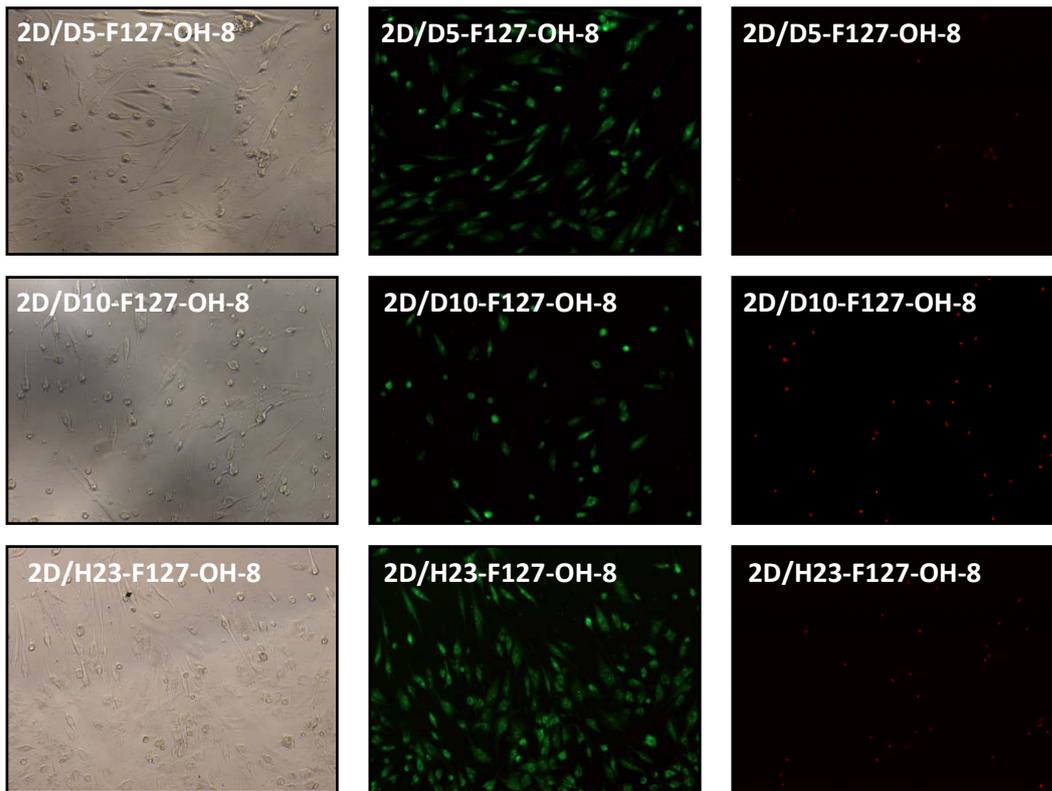


Figura 3.43. Imágenes de microscopía de fluorescencia para ensayos 2D de disoluciones e hidrogeles de F127-OH-8 tras 72 horas de ensayo. Primera columna: Imágenes en contraste de fases; Segunda columna: Células vivas; Tercera columna: Células muertas.

En los ensayos 3D/H23-F127-OH-4 (Figura 3.44) tras 24 horas de ensayo se observó un predominio de células con morfología redondeada, lo que indica baja adhesión de las células al material.

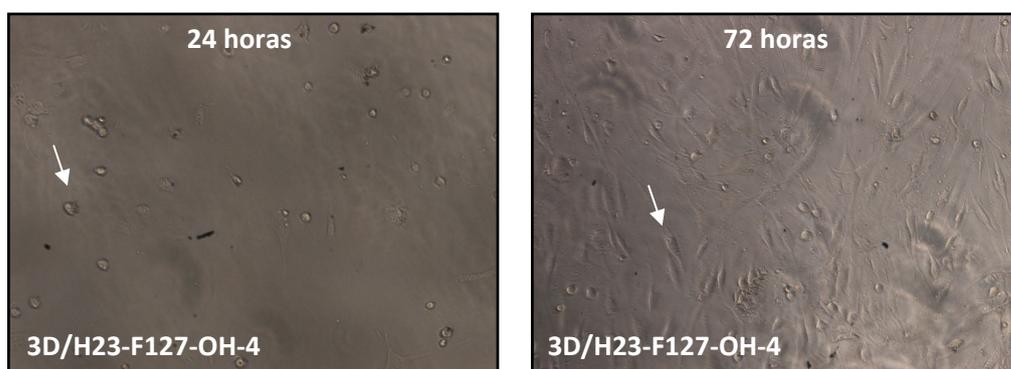


Figura 3.44. Imágenes de contraste de fases para ensayos 3D de hidrogeles de F127-OH-4 tras 24 y 72 horas de ensayo. En la imagen de la izquierda se señala con una flecha una célula con morfología redondeada. En la imagen de la derecha se señala con una flecha una célula con morfología alargada.

Tras 72 horas de ensayo se comprueba que la mayoría de las células han adquirido su característica morfología alargada debido a la adhesión a la placa de cultivo (imagen derecha, Figura 3.44). Se deduce por tanto que las células han migrado desde el hidrogel hasta el fondo del pocillo. La elevada migración celular que se produce al fondo del pocillo permite deducir que se trata de un hidrogel demasiado blando para alojar células en su interior.

En la Figura 3.45 se muestran las imágenes en contraste de fases y de fluorescencia en el verde y el rojo, para 3D/H23-F127-OH-4 tras 72 horas de ensayo.

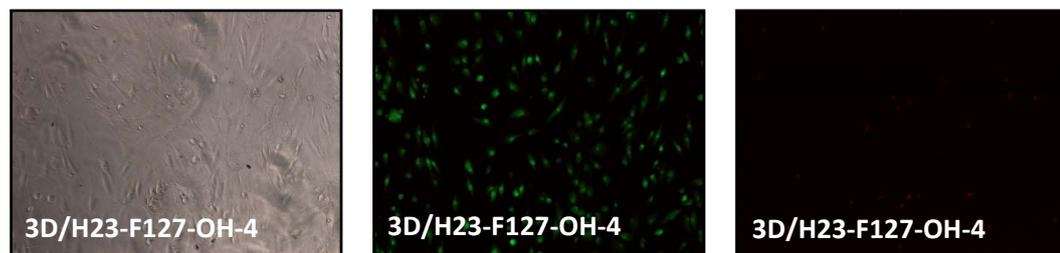


Figura 3.45. Imágenes de microscopía de fluorescencia para ensayos 3D de hidrogel de F127-OH-4 tras 72 horas de ensayo. Primera columna: Imágenes en contraste de fases; Segunda columna: Células vivas; Tercera columna: Células muertas.

El ensayo análogo con el material 3D/H23-F127-OH-8 presentó un comportamiento similar en cuanto a migración celular al fondo del pocillo. Como se puede observar en la Figura 3.46, la migración celular ya es visible a las 24 horas dada la elevada cantidad de células adheridas al fondo del pocillo, siendo más notable la presencia de células con esta morfología tras 72 horas de ensayo.

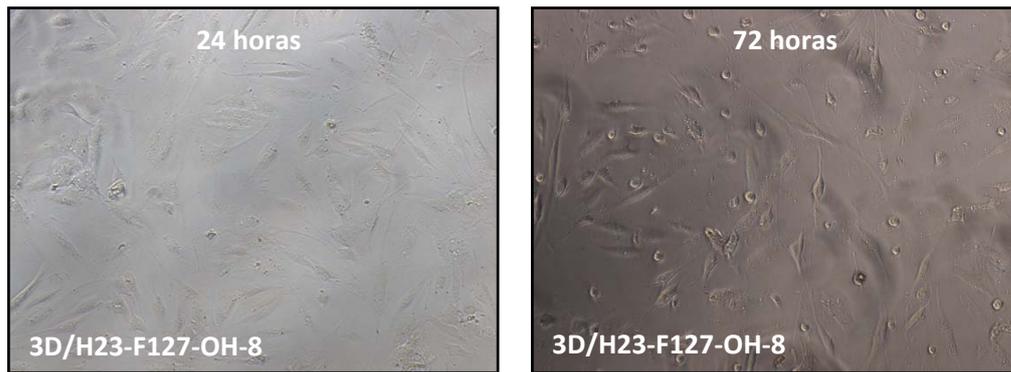


Figura 3.46. Imágenes de contraste de fases para ensayos 3D de hidrogeles de F127-OH-8 tras 24 y 72 horas de ensayo.

3.7. - CARACTERIZACIÓN MECÁNICA DE LOS HIDROGELES

Como se ha indicado al comienzo de esta Memoria, una de las posibles aplicaciones planificadas para los hidrogeles fotopolimerizados estudiados es su utilización en la preparación de *scaffolds* adecuados para Ingeniería de tejidos, en concreto para andamiajes de regeneración de cartílago articular. Por ello se decidió realizar la caracterización mecánica de los materiales mediante ensayos que se utilizan habitualmente en la caracterización de cartílago.

En la caracterización mecánica de materiales es posible utilizar distintos tipos de ensayos, los cuales se pueden clasificar en función de múltiples parámetros. Una posible clasificación viene determinada por la realización de los ensayos a alta o baja velocidad de aplicación de la carga, clasificándose como ensayos dinámicos o estáticos respectivamente.

Dentro de estos tipos de ensayos los más utilizados en la caracterización de las propiedades mecánicas del cartílago articular son ensayos de tipo estático, entre los que se incluyen los métodos de compresión uniaxial monotónica y los métodos de compresión uniaxial de carga-relajación. Ambos métodos se pueden realizar en compresión no confinada (NC), compresión confinada (CC) o de indentación dependiendo del utillaje utilizado para la aplicación de la carga (Figura 3.47) (ver Anexo IV).

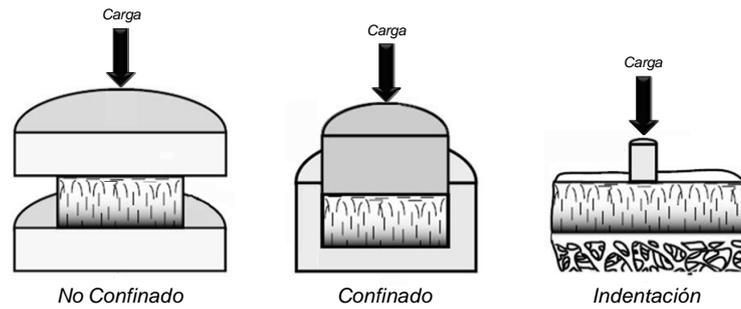


Figura 3.47. Tipos de ensayos mecánicos de tipo estático y compresión uniaxial.

Todos los ensayos realizados en este trabajo son del tipo NC y CC y se han realizado en colaboración con el Dr. Ignacio Ochoa del grupo GEMM (Group of Structural Mechanics and Materials Modeling) del I3A (Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón).

Para la caracterización mecánica se han seleccionado los hidrogeles polimerizados siguientes: P/H18-F127-Ac-2, P/H23-F127-Ac-2, P/H18-F127-Ac-4, P/H23-F127-Ac-4, P/H18-F127-Ac-8 y P/H23-F127-Ac-8, cuya manipulación y análisis de datos se describe en el apartado 6.2.g., de la Parte Experimental.

Se ha determinado el Módulo de Young (E_s) de los geles P/H18-F127-Ac-n ($n= 2, 4$ y 8) a concentraciones del 18 % y 23 % (w/v) del reticulante, para establecer comparaciones entre los hidrogeles con dos, cuatro u ocho grupos acrilato terminales.

Adicionalmente, se ha completado el estudio de las propiedades mecánicas de P/H18-F127-Ac-2 y de P/H23-F127-Ac-2 (Módulo Agregado (H_A), Coeficiente de Poisson (ν), permeabilidad (κ) y ensayos de fatiga) en el marco del Proyecto Fin de Carrera de Alexis Allueva Arjol.¹¹⁹

¹¹⁹ Allueva, A., Caracterización mecánica de hidrogeles de Pluronic para aplicaciones en ingeniería de tejidos. *Proyecto fin de carrera*, 2012.

3.7.1.- Ensayos de compresión uniaxial monotónica

En este tipo de ensayos la carga se va aplicando de forma lineal y uniforme. Con estos ensayos se obtiene el Módulo de Rigidez (E_{medido}), que se denomina de diferente forma en función del tipo de ensayo realizado en condiciones NC o CC: Módulo de Young (E_s), en ensayos NC y Módulo Agregado (H_A) en ensayos CC.

Ambos parámetros proporcionan una medida de la dureza del hidrogel bajo los efectos de una carga.¹²⁰ El cálculo de ambos parámetros a partir de las curvas de tensión-deformación se explica en el *Anexo IV*.

Compresión No Confinada- Módulo de Young (E_s)

En la Figura 3.48 se muestra la gráfica de tensión-deformación para P/H23-F127-Ac-2 así como el ajuste en la zona lineal, cuya pendiente corresponde a E_s . Todos los hidrogeles ensayados presentaron curvas tensión-deformación con la misma forma.

En el gráfico de la Figura 3.49 se muestran los valores de E_s obtenidos para los diferentes materiales estudiados: P/H18-F127-Ac-2, P/H23-F127-Ac-2, P/H18-F127-Ac-4, P/H23-F127-Ac-4, P/H18-F127-Ac-8 y P/H23-F127-Ac-8.

¹²⁰ Acosta, V. A., Ingeniería de Tejidos del Cartílago Articular: Caracterización y modelado del comportamiento mecánico. *Tesis doctoral* **2011**.

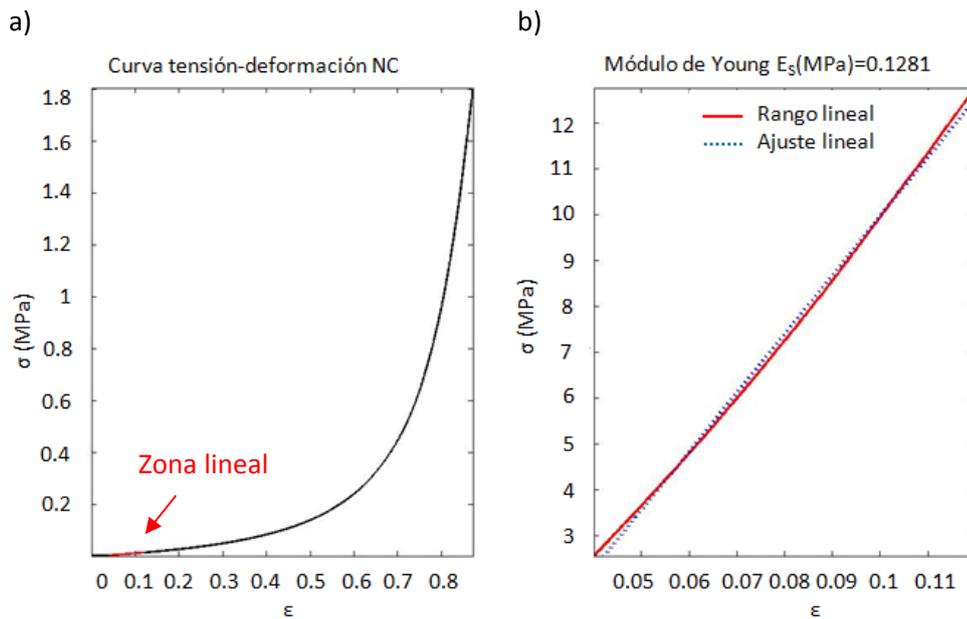


Figura 3.48. a) Curva típica de tensión (σ) vs. deformación (ϵ) obtenida para P/H23-F127-Ac-2 en un ensayo de compresión uniaxial monotónica no confinada. En color rojo, la selección del rango lineal. b) Selección y ajuste lineal por mínimos cuadrados para el cálculo del Módulo de Young (E_s).

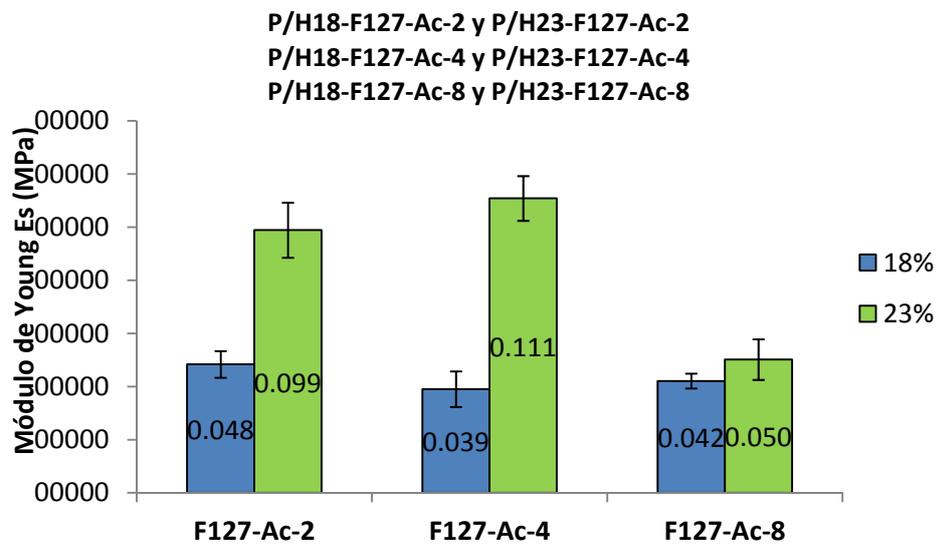


Figura 3.49. Valores medios de Módulo de Young (E_s) para los hidrogeles fotopolimerizados de F127-Ac-2, F127-Ac-4 y F127-Ac-8.

Como se puede observar, en los hidrogeles de F127-Ac-2 y F127-Ac-4 se produce un aumento del Módulo de Young con el aumento de concentración de copolímero gelificante en el hidrogel. Para P/H23-F127-Ac-2 el aumento de concentración de un 5% con respecto a P/H18-F127-Ac-2 supone un aumento del

E_s de hasta el doble. Para P/H23-F127-Ac-4 el mismo aumento de concentración supone triplicar el valor de E_s . Estos hechos están de acuerdo con la mayor rigidez esperable para los materiales de mayor concentración de reticulante. Sin embargo, no ocurre lo mismo para los hidrogeles de F127-Ac-8 que mantienen valores parecidos a ambas concentraciones.

Por otra parte, el aumento del número de grupos acrilato por molécula al pasar de F127-Ac-2 a F127-Ac-4 y a F127-Ac-8 no supone un aumento significativo en cuanto al valor del E_s , obteniéndose valores muy similares en torno a 0.04 MPa y a 0.1 MPa entre los distintos hidrogeles, con excepción de P/H23-F127-Ac-8 antes comentado que mantiene su E_s en torno a 0.045 MPa.

Compresión confinada-Módulo agregado (H_A)

Este tipo de medidas sólo se realizaron para P/H18-F127-Ac-2 y P/H23-F127-Ac-2. En la Figura 3.50 se muestra la gráfica de tensión-deformación para P/H23-F127-Ac-2 así como el ajuste en la zona lineal cuya pendiente corresponde a H_A . Los dos hidrogeles ensayados presentaron curvas tensión-deformación con la misma forma.

En la Figura 3.51 se muestran los resultados de H_A para los hidrogeles de F127-Ac-2. Como se puede observar, el aumento de concentración de gelificante supone un ligero aumento de H_A de 0.1 a 0.15 MPa, conforme a lo esperado para un aumento de rigidez de los hidrogeles debido al incremento del grado de reticulación.

Si comparamos los valores de H_A (Figura 3.51) con los de E_s (Figura 3.49) se observa que los valores de H_A son mayores que los de E_s , acorde con el tipo de ensayos realizados. Los ensayos confinados a partir de los cuales se obtiene H_A permiten mayor resistencia del hidrogel a la tensión al estar el material en un habitáculo donde sólo se le permite deformación en una dirección, a diferencia de lo que ocurre con los ensayos no confinados.

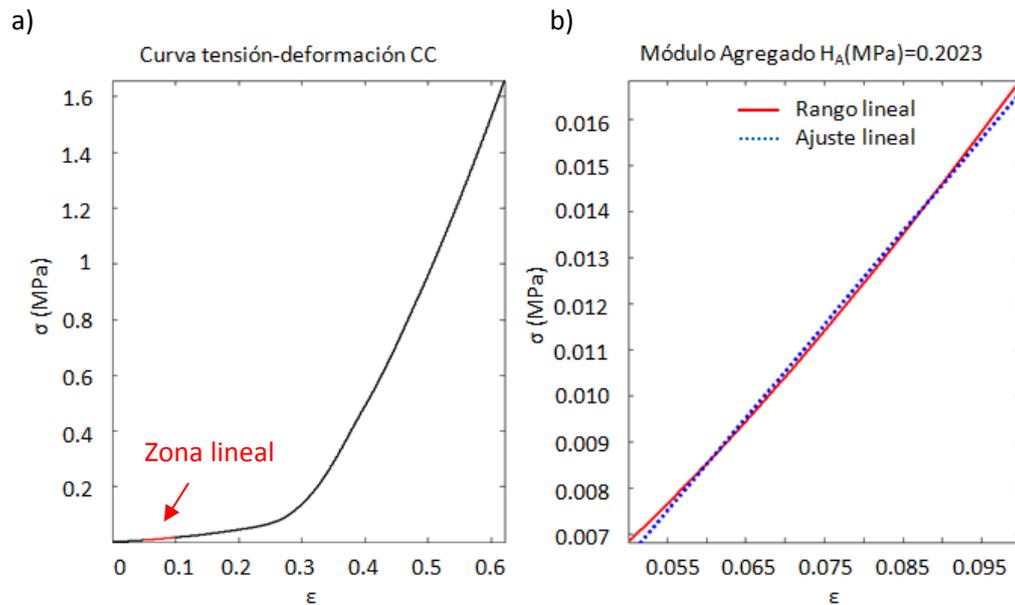


Figura 3.50. a) Curva típica de tensión (σ) vs. deformación (ϵ) obtenida para P/H23-F127-Ac-2 en un ensayo de compresión uniaxial monotónica confinada. En color rojo la selección del rango lineal. b) Selección y ajuste lineal por mínimos cuadrados para el cálculo del Módulo Agregado (H_A).

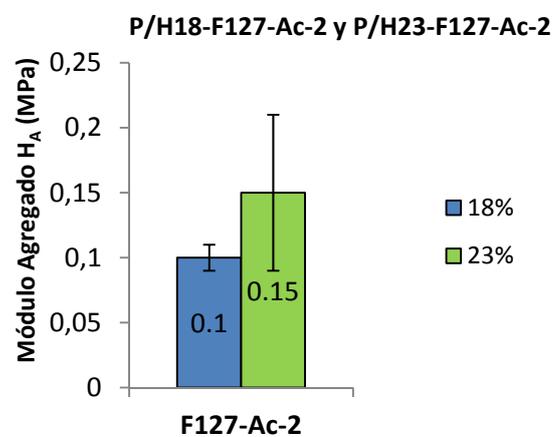


Figura 3.51. Valores medios de Módulo Agregado (H_A) para los hidrogeles fotopolimerizados de F127-Ac-2.

3.7.2.- Ensayos de compresión uniaxial de carga-relajación

El ensayo realizado consiste en aplicar una rampa de carga - relajación realizando 6 cargas separadas por una relajación de 15 minutos entre ellas.

Mediante este tipo de ensayos en condiciones NC y/o CC se puede calcular el Coeficiente de Poisson (ν) y la Permeabilidad (κ) del material.

Compresión confinada y no confinada-Coeficiente de Poisson (ν)

El coeficiente de Poisson ν es la relación entre la deformación lateral y la deformación axial en una probeta con carga axial. El cálculo de ν a partir de los parámetros E_S y H_A se realiza tal y como se describe en el *Anexo IV*.

En la Figura 3.52 se muestran los valores de ν de los dos hidrogeles caracterizados. Se observa un valor de ν ligeramente superior para el material de mayor concentración.

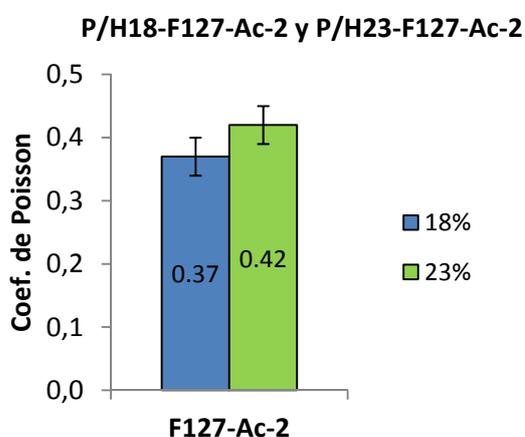


Figura 3.52. Valores medios del Coeficiente de Poisson (ν) para los hidrogeles fotopolimerizados de F127-Ac-2.

Compresión Confinada- Permeabilidad (κ)

La permeabilidad de un material hace referencia a la capacidad que tiene éste de permitir el paso del líquido a través de él, sin alterar su estructura interna. De este modo se considera que un material es permeable si deja pasar una cantidad apreciable de fluido en un tiempo dado, e impermeable si la cantidad de fluido es despreciable.¹²¹ En el caso de que el material sea permeable se puede afirmar que el material es poroso y además los poros están interconectados entre sí, ya que este hecho es necesario para producir el paso de fluido a través del material.

¹²¹ Pelegay, C., Caracterización de materiales compuestos para su uso en Ingeniería de Tejidos. *Proyecto fin de carrera* **2012**.

El cálculo de la permeabilidad, κ , realizado se detalla en el *Anexo IV*.

En la Figura 3.53 se muestran los resultados de κ obtenidos para los dos hidrogeles ensayados, P/H18-F127-Ac-2 y P/H23-F127-Ac-2. Ambos materiales son permeables, con un valor de κ ligeramente superior para el hidrogel de menor concentración, P/H18-F127-Ac-2, lo que está de acuerdo con la mayor permeabilidad que muestran los hidrogeles menos rígidos. Estos datos están en concordancia con lo observado en la medida de E_s y H_A ; P/H18-F127-Ac-2 es un hidrogel menos rígido que su análogo de concentración superior, P/H23-F127-Ac-2.

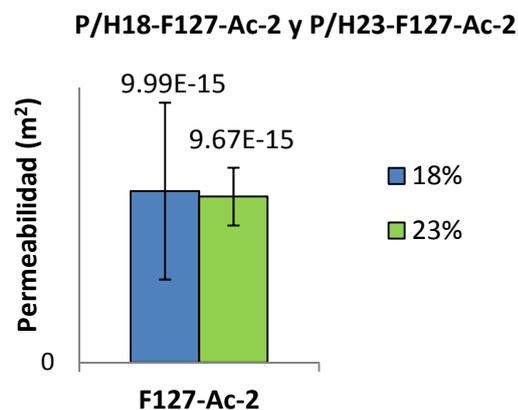


Figura 3.53. Valores medios de Permeabilidad (κ) para los hidrogeles fotopolimerizados de F127-Ac-2.

3.7.3.- Ensayos de fatiga

Un ensayo de fatiga permite determinar la vida útil de un material sometido a cargas fluctuantes. Habitualmente se registra el número de ciclos requeridos para producir el fallo del material. En el caso que nos ocupa, se ha considerado que se produce fallo o ruptura del material una vez que el hidrogel pierde sus características elásticas, no recuperando el espesor inicial tras descargar la probeta.

Los datos procedentes de los ensayos de fatiga se representan en diagramas S-N. En el eje Y se representa la tensión soportada (S) y en el eje X el número de ciclos

(N).¹¹⁹ En la Figura 3.54 se muestran los resultados obtenidos para P/H18-F127-Ac-2 y P/H23-F127-Ac-2. En la gráfica puede observarse una tendencia lineal para ambas concentraciones, las cuales poseen la misma pendiente. Este comportamiento permite estimar que los hidrogeles P/H18-F127-Ac-2 y P/H23-F127-Ac-2 se comportan del mismo modo, con la única diferencia de una mayor tensión soportada en el caso del hidrogel de mayor concentración, en concordancia con la mayor rigidez del material.

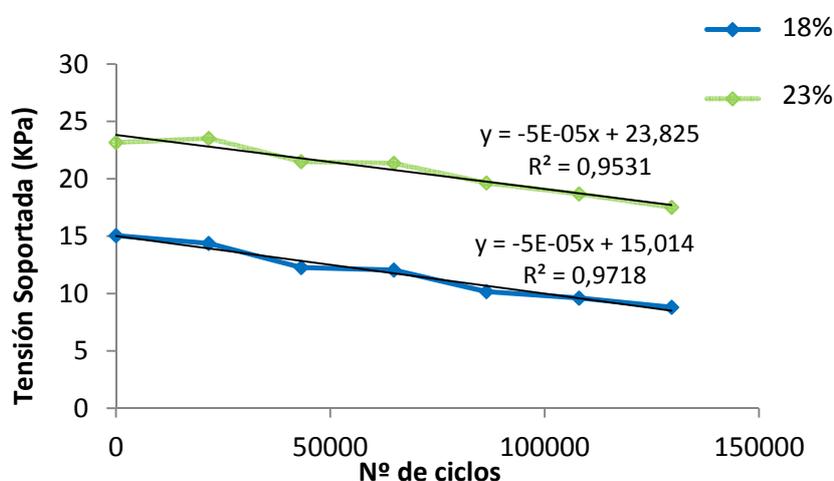


Figura 3.54. Gráfico S-N para los hidrogeles fotopolimerizados de F127-Ac-2.

A pesar de realizar todos los pasos de preparación de las muestras en condiciones estériles y adicionar antibiótico a la disolución de PBS, no se pudo extender los ensayos hasta ruptura del material debido a la aparición de hongos. No obstante, estos resultados son prometedores ya que tras 130000 ciclos el material sigue sin llegar a ruptura.

3.7.4.- Comparación con propiedades mecánicas del cartílago

Una vez determinados los parámetros mecánicos de los hidrogeles, las propiedades mecánicas de nuestros materiales se han comparado con los valores que se estiman como necesarios para su aplicabilidad. En concreto, considerando una posible aplicación de los hidrogeles como soporte para regeneración de

cartílago articular, los valores medidos para nuestros materiales se han comparado con valores promedio para cartílago humano y con los de un modelo animal (oveja).

En la Tabla 3.7 se muestran las propiedades mecánicas del cartílago articular. En la parte superior de la tabla se incluyen los valores promedio experimentales tanto para un modelo animal (oveja) como para cartílago humano, que son los que se utilizarán para establecer comparación.

Junto a estos valores, en la parte inferior de la tabla, se recogen los valores máximos y mínimos correspondientes a propiedades mecánicas de cartílago humano, determinados experimentalmente, que dan idea de su gran variabilidad. La variabilidad de los datos observada en los parámetros mecánicos de cartílago articular humano se deben a que estos parámetros se encuentran muy afectados por diversos factores como la edad, el sexo o la articulación en la que se encuentra el cartílago estudiado.

En la Tabla 3.8 se recogen los valores promedio experimentales de ν y κ evaluadas para nuestros hidrogeles. Como se puede observar, nuestros materiales muestran para estos parámetros (ν y κ) órdenes de magnitud similares a los valores del modelo humano y del animal. Sin embargo, estos hidrogeles presentan bajos valores de E_S y H_A , en comparación con los estudios en cartílago.

Tabla 3.7. Propiedades mecánicas de cartílago articular en modelo animal (oveja) y del cartílago articular humano determinadas experimentalmente.^{119, 120, 121}

Valores promedio experimentales (oveja)						
E _s (MPa)		H _A (MPa)		v	κ (m ²)	
0.21		0.31		0.32	5.8E-15	
Valores promedio experimentales (humano)						
E _s (MPa)		H _A (MPa)		v	κ (m ²)	
0.625		0.7		<0.4	5.5E-16	
Propiedades mecánicas experimentales del cartílago articular humano						
E _s (MPa)		H _A (MPa)		v	κ(m ²)	
Min.	Max.	Min.	Max.	Rango	Min.	Max.
0.45	0.8	0.5	0.8	<0.4	E-16	E-15

Tabla 3.8. Propiedades mecánicas medidas en diferentes hidrogeles fotopolimerizados.

Valores promedio experimentales				
	E _s (MPa)	H _A (MPa)	v	κ (m ²)
P/H18-F127-Ac-2	0.048	0.1	0.37	9.9E-15
P/H23-F127-Ac-2	0.099	0.15	0.42	9.67E-15
P/H18-F127-Ac-4	0.039	-	-	-
P/H23-F127-Ac-4	0.111	-	-	-
P/H18-F127-Ac-8	0.042	-	-	-
P/H23-F127-Ac-8	0.050	-	-	-

CAPÍTULO 4

HIDROGELES DERIVADOS DE PLURONIC:

TIOL-ENOS

Los resultados descritos en el capítulo anterior han permitido demostrar la viabilidad de copolímeros dendrítico-lineal-dendrítico derivados de Pluronic para obtener hidrogeles termosensibles fotopolimerizables.

No obstante, con el fin de disponer de materiales fotorreticulables con menor densidad de grupos acrilato, así como de incorporar algunas modificaciones químicas que puedan cambiar las interacciones intermoleculares y modular las propiedades sol-gel, e incluso las interacciones con las células, se planteó trabajar con formulaciones basadas en otros tipos de derivados fotorreactivos de Pluronic.

En este nuevo capítulo de la memoria se describe el trabajo desarrollado con el fin de preparar hidrogeles termosensibles fotopolimerizables que permitan una vía alternativa de fotorreticulación, en concreto mediante la reacción de tioles con alquenos, tiol-enos ($-\text{SH}/\text{CH}_2=\text{CHCOO}-$).^{66, 95} Para ello se ha optado por mezclas binarias de compuestos con grupos acrilato y de derivados con grupos tiol ($-\text{SH}$) en sus posiciones terminales.

Los grupos tiol ($-\text{SH}$) se han incorporado a diferentes materiales: Pluronic F127®, F127-OH-4 y F127-OH-8 mediante funcionalización de sus grupos hidroxilo terminales con cisteamina ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH}$), a través de enlaces carbamato. El grupo carbamato puede favorecer interacciones por enlaces de hidrógeno intermoleculares, lo que puede también contribuir a modificar propiedades de gelificación, degradación y viabilidad celular con respecto a las descritas para los análogos con enlaces éster descritos en el Capítulo 3.

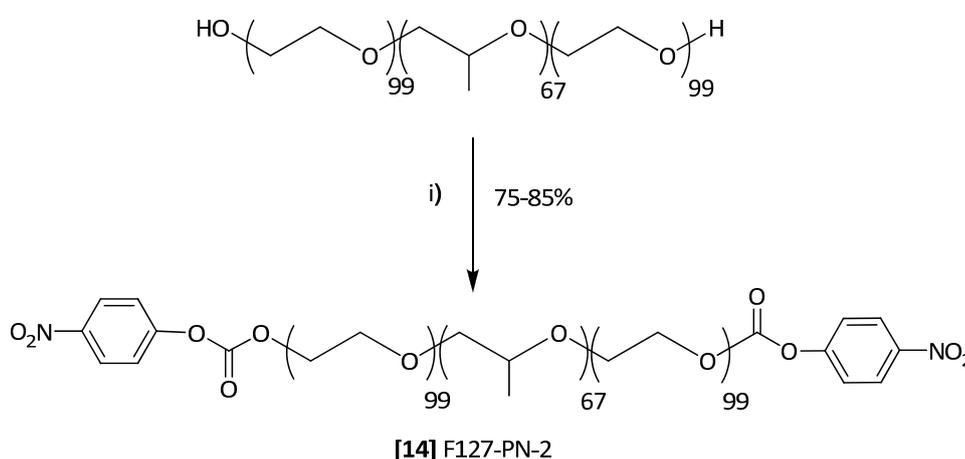
En la primera parte de este capítulo, apartado 4.1, se describe la síntesis y caracterización de los compuestos tiolados así como sus propiedades gelificantes y de viabilidad celular. En la segunda parte del capítulo, apartado 4.2, se describe la preparación y caracterización de formulaciones binarias basadas en componentes tiolados y el estudio de sus propiedades como hidrogeles.

4.1.- DERIVADOS DE PLURONIC CON GRUPOS TIOL TERMINALES

4.1.1.- Síntesis y caracterización

4.1.1.1.- Derivado lineal: F127-SH-2

La síntesis del derivado lineal F127-SH-2 ha sido descrita por varios autores.¹²²,¹²³ Para formar el enlace carbamato, que permite introducir la cisteamina, es necesario activar previamente los grupos hidroxilo terminales de Pluronic F127® con cloroformiato de p-nitrofenilo, utilizando el procedimiento de síntesis descrito en el Esquema 4.1.



Esquema 4.1. Síntesis de F127-PN-2 [14]. Condiciones de reacción: i) cloroformiato de p-nitrofenilo, base, diclorometano.

En esta Memoria se ha abordado la síntesis de F127-PN-2 utilizando distintas condiciones de reacción, que se muestran en la Tabla 4.1. En primer lugar se utilizó TEA como base (método A), siguiendo el método descrito por Park *et al.* en 2006.^{76e} Sin embargo, no se consiguió funcionalizar completamente los dos

¹²² (a) Tao, Y.; Han, J.; Ye, C.; Thomas, T.; Dou, H., *Journal of Materials Chemistry* **2012**, 22 (36), 18864-18871; (b) Bae, K. H.; Choi, S. H.; Park, S. Y.; Lee, Y.; Park, T. G., *Langmuir* **2006**, 22 (14), 6380-6384.

¹²³ (a) Ryu, J. H.; Lee, Y.-h.; Kong, W. H.; Kim, T. G.; Park, T. G., *Journal of Controlled Release* **2011**, 152 (1) 236-237; (b) Ryu, J. H.; Lee, Y.; Kong, W. H.; Kim, T. G.; Park, T. G.; Lee, H., *Biomacromolecules* **2011**, 12 (7), 2653-2659; (c) Lee, Y.; Chung, H. J.; Yeo, S.; Ahn, C.-H.; Lee, H.; Messersmith, P. B.; Park, T. G., *Soft Matter* **2010**, 6 (5), 977-983.

grupos hidroxilo terminales de Pluronic F127[®], tal y como se comprobó por ¹H-RMN (Tabla 4.1). Por ello se ensayaron otros tipos de base como piridina (Py) (método B)¹²⁴ o dimetilaminopiridina (DMAP) (métodos C y D), en lugar de TEA. Así mismo, se variaron otros parámetros de reacción como el número de equivalentes de las distintas bases y de cloroformiato de p-nitrofenilo, con respecto a la cantidad de polímero, así como el tiempo de reacción. En la Tabla 4.1 se recogen, además las condiciones de reacción ensayadas, los porcentajes de funcionalización de los grupos hidroxilo terminales de Pluronic F127[®] a que han dado lugar.

Tabla 4.1. Condiciones de reacción utilizadas en la obtención de F127-PN-2.

Método	Relación molar Pluronic F127 [®] /cloroformiato de p- nitrofenilo/Base	Tiempo de reacción (h)	% funcionalizado ^a
A	1/8/8.8 (TEA)	24	62
B	1/8/28 (Py)	24	100
C	1/14/14 (DMAP)	24	37
D	1/14/14 (DMAP)	4	100

^a Porcentaje de grupos hidroxilo terminales funcionalizados determinado por ¹H-RMN.

De las dos opciones que dieron lugar a funcionalización completa de los hidroxilos terminales de Pluronic F127[®], métodos B y D, se eligieron las condiciones de reacción B ya que, a pesar de necesitar un mayor tiempo de reacción, el tratamiento posterior resultó más sencillo en este caso (ver apartado 6.1, de la Parte Experimental).

Los compuestos sintetizados se caracterizaron principalmente por ¹H-RMN y FT-IR.

¹²⁴ Gillies, E. R.; Fréchet, J. M. J., *JACS* **2002**, *124* (47), 14137-14146.

En la Figura 4.1 se muestra el espectro de ^1H -RMN de F127-PN-2. Se observa la presencia de las señales correspondientes a los protones aromáticos J y K (7.38-7.28 ppm), además de la señal del triplete correspondiente a los protones próximos al nuevo enlace carbonato formado, protones G (4.43 ppm). La completa funcionalización se confirmó por la correcta integración de las señales de los protones de los grupos p-nitrofenilo (K y J) con respecto a los protones del núcleo de Pluronic F127[®] (A y B).

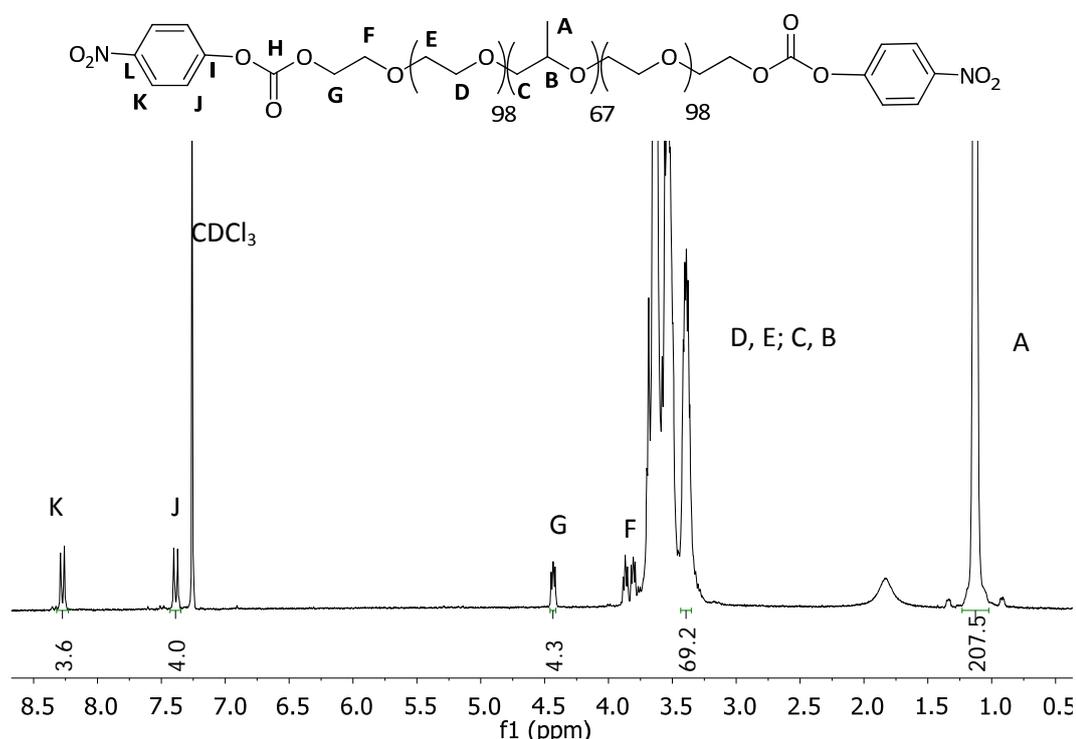
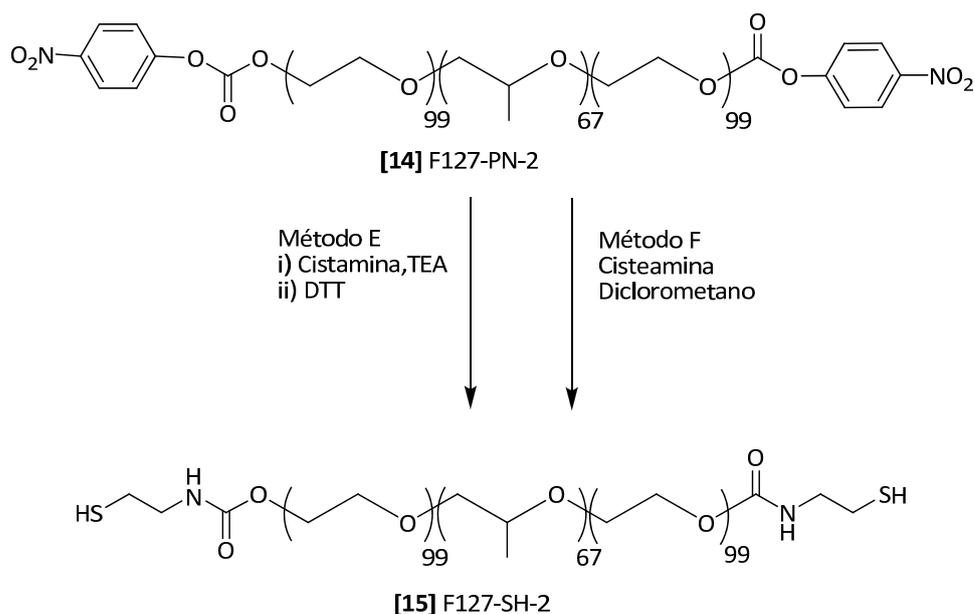


Figura 4.1. Espectro de ^1H -RMN de F127-PN-2 en CDCl_3 , 300 MHz.

Para la obtención del compuesto tiolado F127-SH-2 a partir de F127-PN-2 se han descrito en la bibliografía dos rutas sintéticas diferentes, que se representan en el Esquema 4.2. La primera de ellas, método E, consiste en el ataque nucleófilo del grupo carbonato con la cistamina y la posterior reducción del enlace disulfuro a tiol utilizando ditioneitol (DTT) que da lugar a F127-SH-2.¹²² La segunda ruta, método F, supone el ataque nucleófilo al grupo carbonato de F127-PN-2 utilizando directamente cisteamina.¹²³



Esquema 4.2. Obtención de F127-PN-2 **[14]** por los métodos de síntesis E y F.

En nuestro trabajo, mediante el método de síntesis F se consiguió obtener el derivado F127-SH-2 mientras que con el método E se producía la rotura de parte de los grupos carbamato formados, probablemente debido a los largos tiempos de diálisis, necesarios para eliminar completamente los subproductos o el agente reductor. Además, el tratamiento de la reacción resulta mucho más rápido y sencillo en el método F, tratándose de una simple precipitación y lavado con dietil éter frío.

La completa funcionalización de la molécula se determinó por ^1H -RMN (Figura 4.2) y por FT-IR (Figura 4.3).

Mediante ^1H -RMN se comprobó la total desaparición de los protones aromáticos de los grupos p-nitrofenilo de la molécula precursora F127-PN-2, así como el desplazamiento de la señal de los protones G, próximos al enlace carbamato formado, que aparece a 4.20 ppm. La señal a 2.79 ppm del espectro de F127-SH-2 corresponde a los protones tipo J adyacentes a los grupos tiol de la molécula.

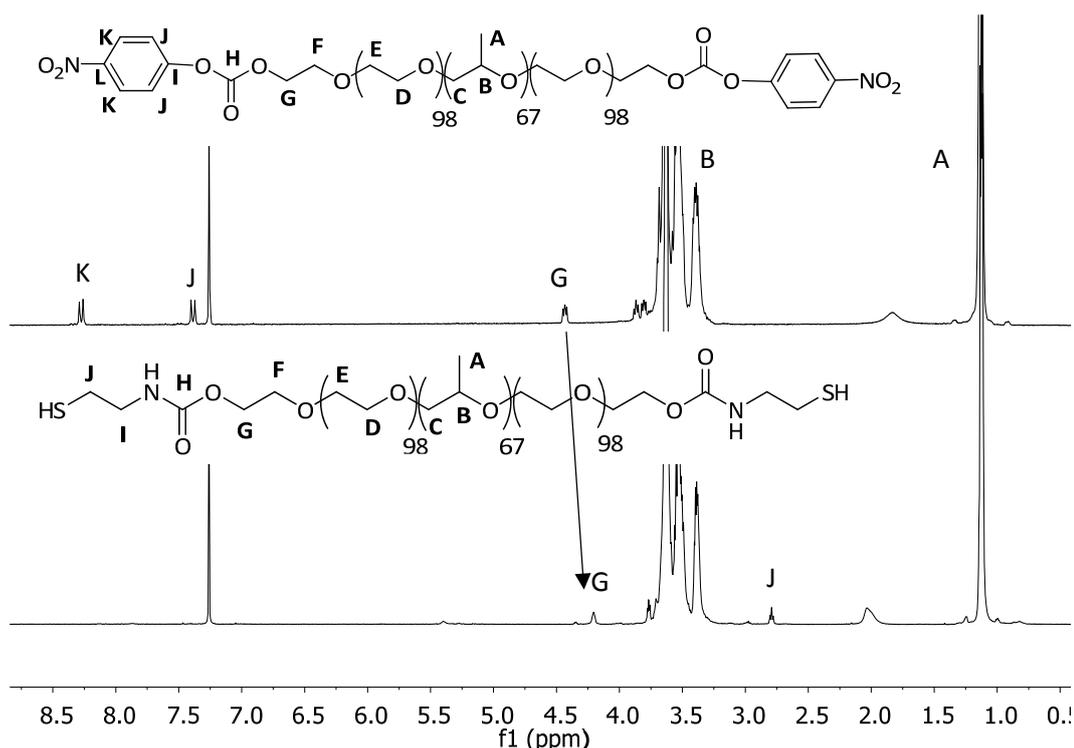


Figura 4.2. Comparativa de los espectros de ¹H-RMN de F127-PN-2 (parte superior), y F127-SH-2 (parte inferior), ambos realizados en CDCl₃.

Los protones tipo I de la molécula F127-SH-2, adyacentes al enlace carbamato se encuentran enmascarados por las señales del núcleo central polimérico presente a 3.5 ppm. La observación de estos protones, así como la correcta asignación de carbonos, se realizó mediante HSQC (ver *Figura I.4 del Anexo I*).

En la Figura 4.3 se observa en FT-IR la banda correspondiente al enlace C=O del grupo carbonato de F127-PN-2, a 1769 cm⁻¹, y la banda a 1732 cm⁻¹ correspondiente al mismo enlace del grupo carbamato y del grupo éster de F127-SH-2. Sin embargo no es posible detectar la banda debida al grupo tiol en torno a 2600 cm⁻¹.

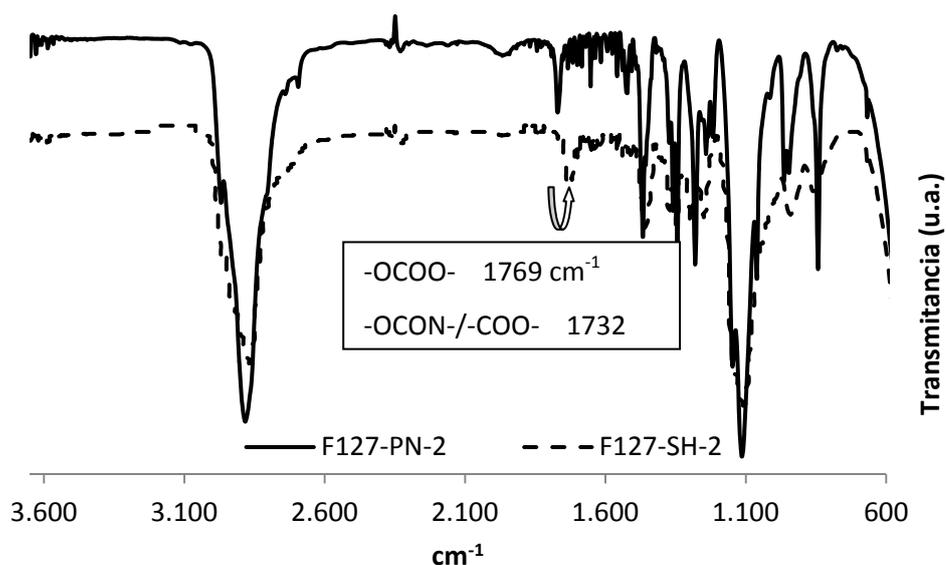
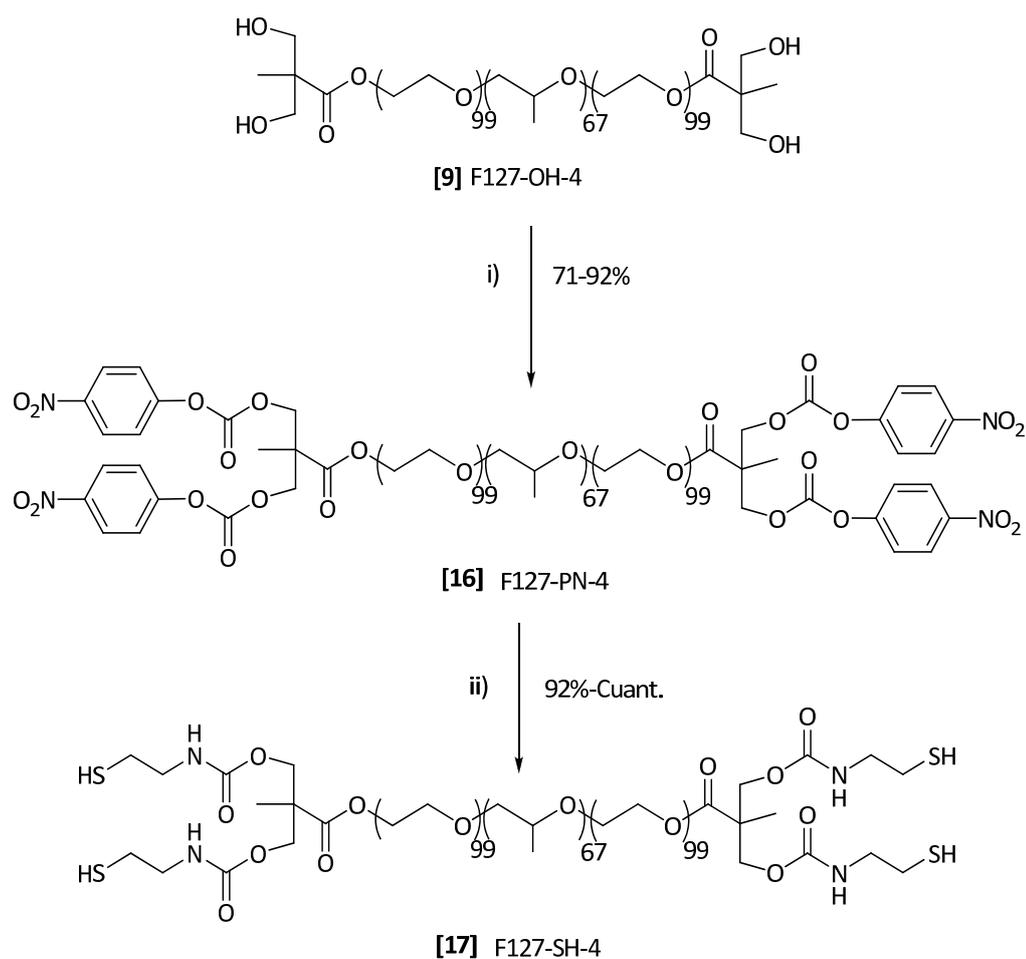


Figura 4.3. Espectro FT-IR de F127-PN-2 y F127-SH-2, compuestos netos fundidos sobre pastilla de NaCl.

4.1.1.2. Derivados tiolados dendríticos F127-SH-4 y F127-SH-8

Para la obtención del derivado dendrítico de primera generación activado con grupos *p*-nitrofenilo terminales, F127-PN-4, se partió de F127-OH-4 que se hizo reaccionar con cloroformiato de *p*-nitrofenilo y piridina como base (Condiciones del método B mostradas en la Tabla 4.1, procedimiento sintético mostrado en el Esquema 4.3 y espectro de $^1\text{H-RMN}$ de F127-PN-4 en la *Figura I.5 Anexo I*). La reacción posterior con cisteamina proporcionó el derivado dendrítico-lineal-dendrítico F127-SH-4 con cuatro grupos tiol terminales.



Esquema 4.3. Ruta sintética para la obtención del derivado dendrítico de primera generación con grupos hidroxilo activados en forma de grupos p-nitrofenilo y posterior reacción con cisteamina para dar F127-SH-4.

Condiciones de reacción: i) cloroformiato de p-nitrofenilo, piridina, diclorometano;
ii) cisteamina, diclorometano.

Al igual que para el compuesto lineal, la completa funcionalización se determinó mediante $^1\text{H-RMN}$ y FT-IR. En la Figura 4.4 se muestra el espectro de $^1\text{H-RMN}$ de F127-SH-4.

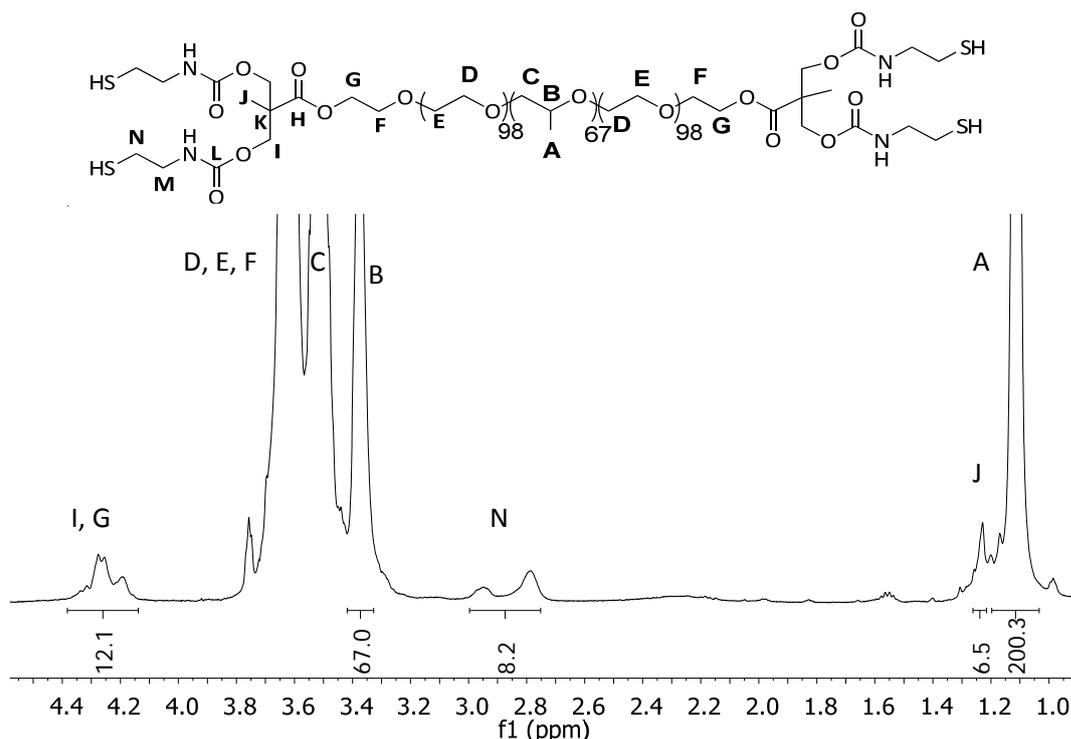


Figura 4.4. Espectro de ^1H -RMN de F127-SH-4 en CDCl_3 , 500 MHz.

Las señales que aparecen entre 4.25 y 4.28 ppm corresponden a los protones de los $-\text{CH}_2-$ de las estructuras de bis-MPA (protones tipo I) y a los protones tipo G, que en total suman 12 protones.

Las señales anchas que aparecen a 2.75 y 2.79 ppm, que suman 8 protones en total, corresponden a los protones tipo N adyacentes a los grupos tiol terminales.

Las señales de los protones M correspondientes a $-\text{CH}_2-$ anexos al enlace carbamato, aparecen enmascaradas por las señales del polímero en torno a 3.5 ppm.

Para la correcta asignación de las señales descritas se realizaron experimentos complementarios de RMN. En la Figura 4.5 se muestra el espectro HSQC de este compuesto donde se observan las correlaciones protón-carbono a un enlace.

La señal de los protones I entre 4.25 y 4.28 ppm correlaciona con la señal de carbono a 64.2 ppm. Además se observa la correlación entre los protones G, que aparecen junto con los protones I, con la señal en carbono a 67.4 ppm.

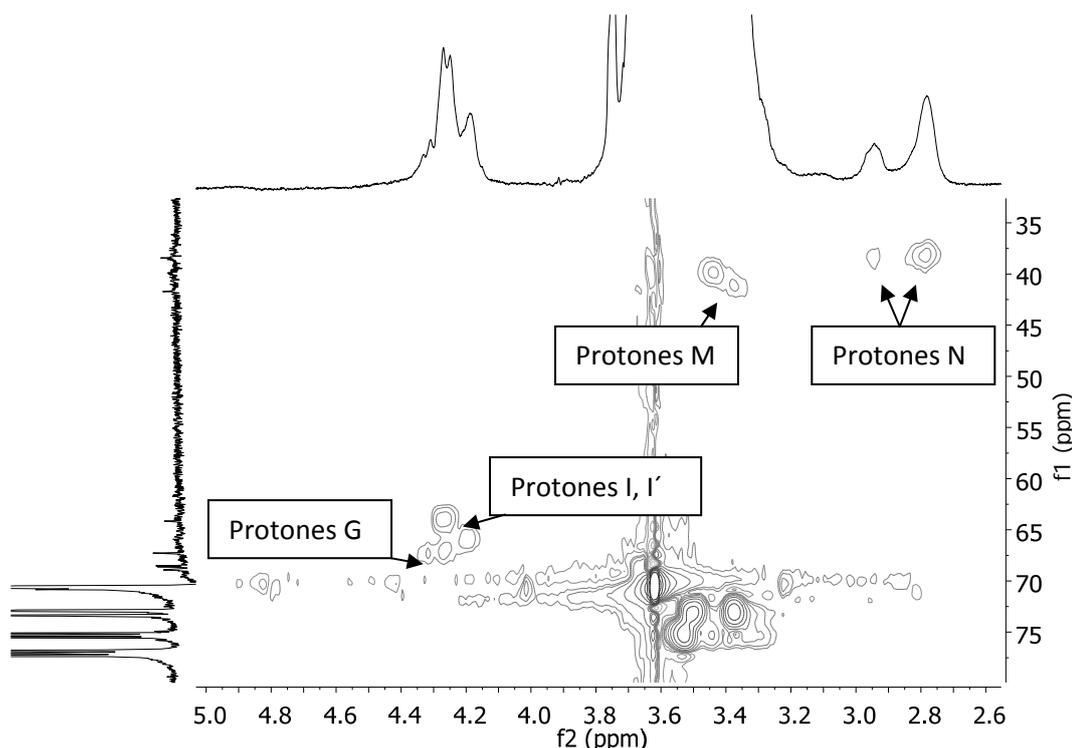


Figura 4.5. Espectro HSQC de la molécula F127-SH-4 en CDCl_3 , 500 MHz.

El grupo de señales que aparecen a 2.75 y 2.79 ppm corresponden a los protones tipo N que correlacionan con el mismo carbono a 38.4 ppm.

Además se puede observar la correlación entre los protones tipo M a 3.36 ppm, que se encuentran enmascarados por las señales del polímero, con su correspondiente carbono a 41.8 ppm.

En la Figura 4.6 se representa el espectro de FT-IR para el derivado F127-SH-4. Se observa la desaparición de las bandas correspondientes a los grupos $-\text{NO}_2$ a 1527 cm^{-1} y al grupo carbonato a 1212 cm^{-1} y a 1772 cm^{-1} , así como la presencia de la banda de la vibración del enlace $\text{C}=\text{O}$ de los grupos carbamato y éster a 1733 cm^{-1} . Al igual que para el derivado lineal F127-SH-2, la banda correspondiente a los grupos tiol no se detectó por FT-IR.

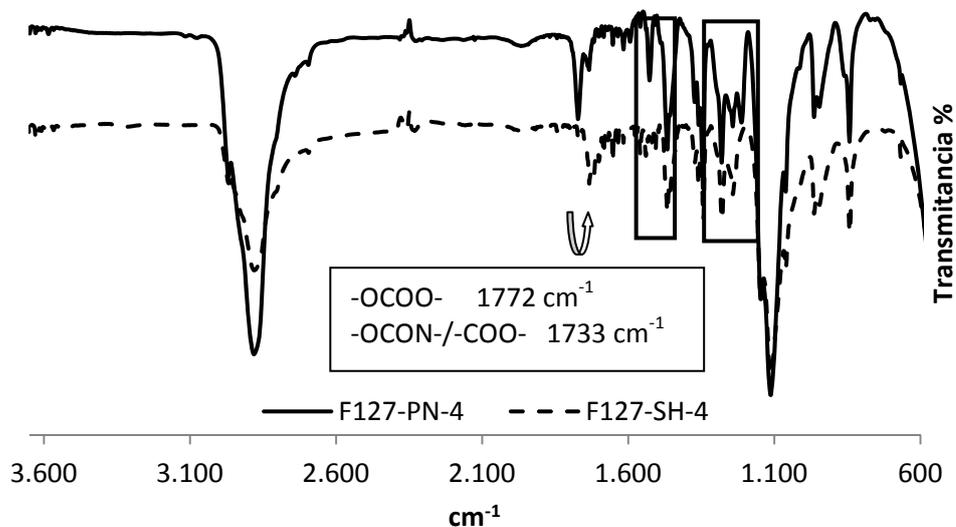
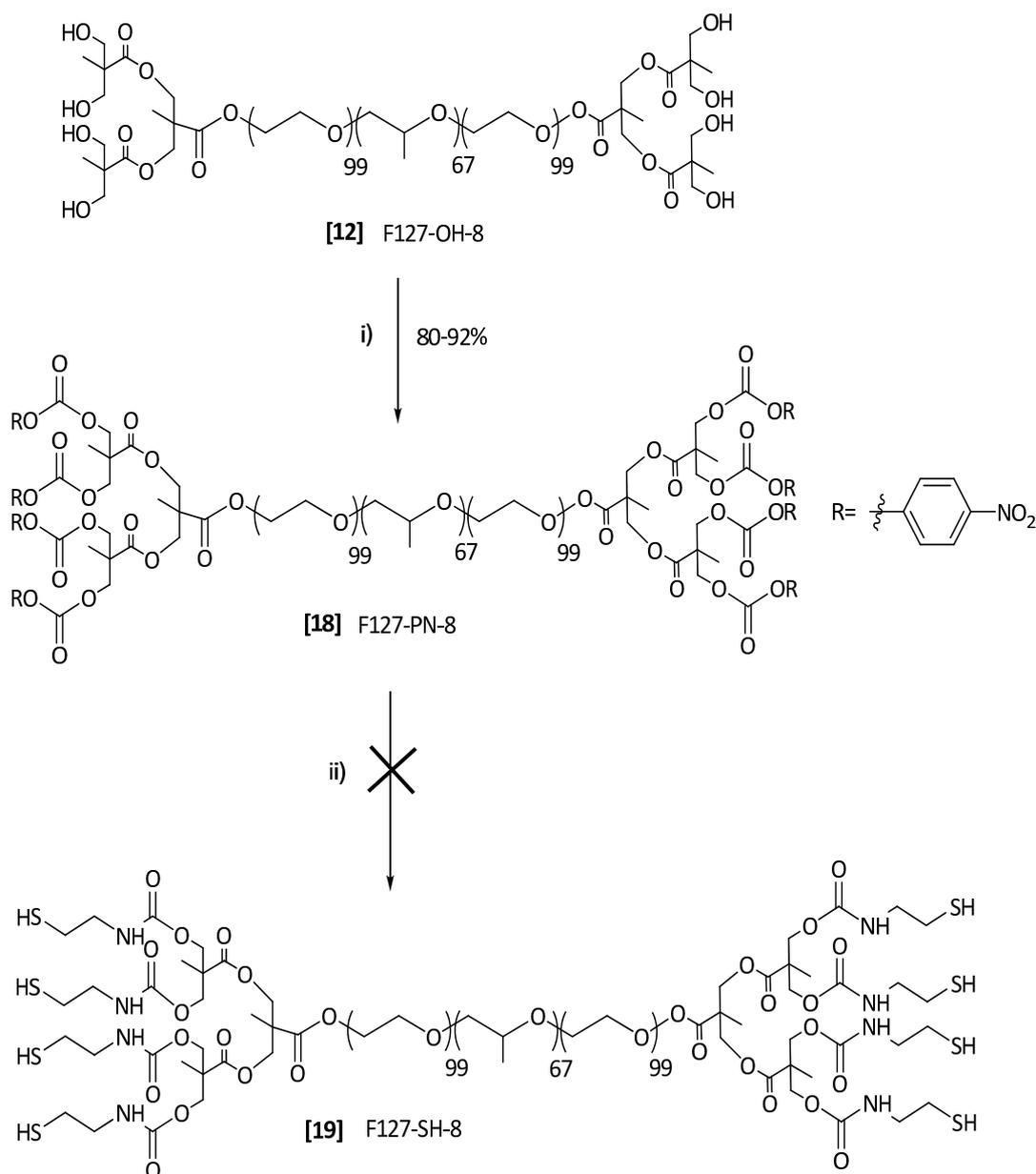


Figura 4.6. Espectro FTIR de F127-PN-4 y F127-SH-4, compuestos netos fundidos sobre pastilla de NaCl.

Para la obtención del derivado de segunda generación activado con 8 grupos p-nitrofenilo (F127-PN-8), se partió de F127-OH-8, como se muestra en el Esquema 4.4. Las condiciones de reacción fueron similares a las utilizadas para la obtención de los derivados lineal y de primera generación.



Esquema 4.4. Ruta sintética para la obtención del derivado dendrítico de segunda generación con grupos hidroxilo activados en forma de grupos p-nitrofenilo y posterior reacción con cisteamina para dar F127-SH-8.

Condiciones de reacción: i) cloroformiato de p-nitrofenilo, piridina, diclorometano;
ii) cisteamina, diclorometano.

En la Figura 4.7 se muestra el espectro de ^1H -RMN de F127-PN-8. Su completa funcionalización se puede confirmar por el valor de las integrales correspondientes a los protones del núcleo polimérico y de las unidades dendríticas introducidas. Cabe destacar la dificultad de asignación de las señales de los grupos $-\text{CH}_2-$ de los sistemas de bis-MPA, ya que tanto los protones tipo L

como los I aparecen juntos en el espectro de ^1H -RMN, entre 4.35 y 4.53 ppm, dando lugar a un multiplete.

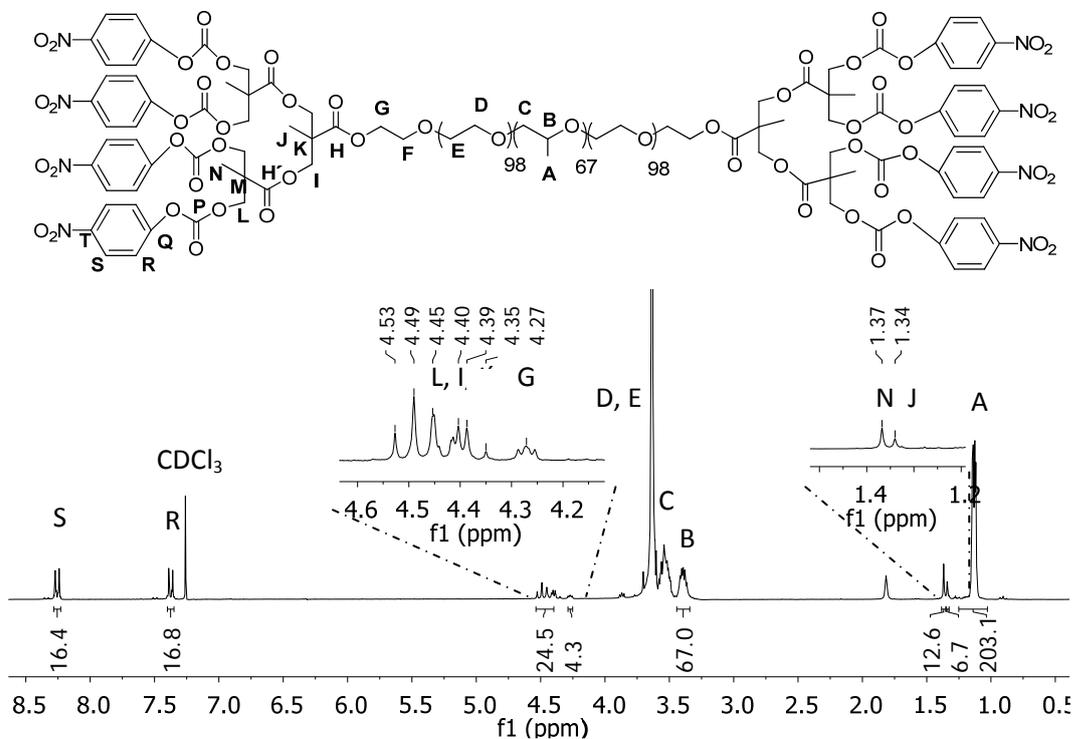


Figura 4.7. Espectro de protón de la molécula F127-PN-8 en CDCl_3 , 300 MHz.

En la síntesis de F127-SH-8 (Esquema 4.4), tras realizar el tratamiento de la reacción se obtuvo un sólido altamente insoluble en disolventes orgánicos como diclorometano, cloroformo o DMSO, por lo que no fue posible su caracterización por ^1H -RMN. Posiblemente la alta densidad de grupos tiol por molécula favorece la formación de enlaces disulfuro y el entrecruzamiento del polímero, justificando la baja solubilidad del producto final.

Todos los compuestos obtenidos en la síntesis de los derivados tiolados fueron caracterizados por GPC, técnica que confirmó la presencia de dos únicas distribuciones, conforme a lo esperado considerando el material de partida, y correspondientes al polímero totalmente funcionalizado. En la *Figura 1.6* del *Anexo I*, se muestran a modo de ejemplo, los cromatogramas obtenidos para los derivados con grupos terminales p-nitrofenilo.

Por otra parte, mediante MALDI-MS se observaron dos distribuciones de peso molecular que se desplazan a mayores o menores relaciones m/z en función de los distintos grupos funcionales terminales presentes en la molécula. En el caso del derivado F127-SH-2 sólo se observó la distribución de menor peso molecular. Los espectros de masas de los diferentes compuestos se muestran en la *Figura 1.7* del *Anexo I*.

Los valores de peso molecular obtenidos por dicha técnica y los calculados a partir de la suma de los pesos moleculares de los bloques individuales se recogen en la *Tabla 4.2*. La distribución de mayor peso molecular coincide con el peso molecular calculado a partir de la suma de los bloques individuales.

Tabla 4.2. Valores máximos de relación masa/carga obtenidos por MALDI-MS para los compuestos con grupos p-nitrofenil o tiol terminales.

DERIVADO	m/z^a	Pm calculado ^b
F127-PN-2	4999.3	12948.02
	12842.8	
F127-SH-2	4849.7	12806.3
F127-PN-4	5340.8	13492.66
	13561.3	
F127-SH-4	5184.5	13244.82
	13217.4	
F127-PN-6	5871.7	14617.54
	14635.1	

^a Máximos m/z en el espectro de masas.

^b Pm calculado: Peso molecular en g/mol calculado como la suma de los pesos moleculares de los bloques individuales.

4.1.2.- Determinación de las propiedades sol-gel

La determinación de las propiedades sol-gel de estos polímeros se llevó a cabo mediante el método de *inversión del vial* y por DSC. Para ello se prepararon muestras de distintas concentraciones de F127-SH-2 y F127-SH-4 (al 5 %, 10 %, 16 %, 18 %, 20 % y 23 % (w/v) en PBS 10 mM pH 7.4).

Los productos F127-PN-2, F127-PN-4 y F127-PN-8 se excluyeron del estudio por su elevada inestabilidad en disoluciones acuosas tales como el PBS.

A continuación se exponen los resultados obtenidos aplicando cada uno de los dos métodos.

4.1.2.1.- Estudio de Gelificación mediante el método de *inversión del vial*

El protocolo de trabajo utilizado para la obtención de las temperaturas de transición sol-gel y gel-sol es el descrito en el apartado 6.2.a., de la Parte Experimental.

En la Figura 4.8 se muestra el diagrama de fases de los dos derivados tiolados: F127-SH-2 y F127-SH-4. Para ambos materiales se obtuvieron hidrogeles termosensibles a partir de concentraciones iguales o superiores al 5% (w/v). Como se puede observar, ambos polímeros poseen un intervalo de temperaturas de existencia del hidrogel muy similar.

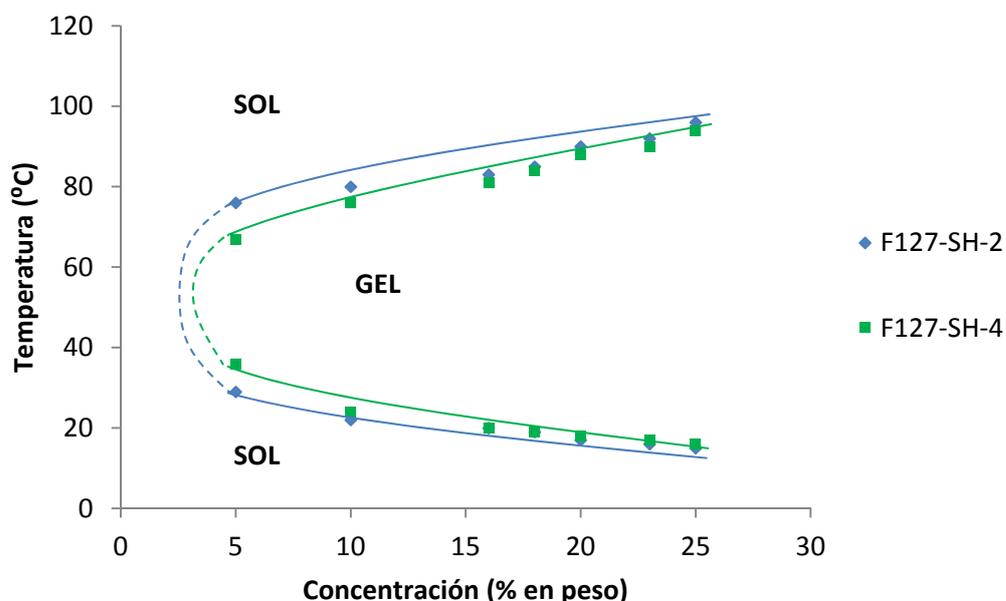


Figura 4.8. Diagrama de fases de los hidrogeles, preparados en PBS 10 mM pH 7.4, con: F127-SH-2 y F127-SH-4, a concentraciones del 5%, 10%, 16%, 18%, 20%, 23% y 25% (w/v).

En comparación con los derivados de Pluronic F127[®] descritos en capítulo anterior, estos compuestos tiolados requieren una menor concentración de copolímero para la formación de los hidrogeles por efecto de la temperatura. Este resultado debe ser atribuido a la presencia del enlace carbamato y de los grupos tiol terminales, que confieren a la molécula la posibilidad de formación de enlaces de hidrógeno, modificando notablemente sus propiedades de gelificación.

En esta línea comparativa, estos compuestos pueden relacionarse con análogos no azufrados preparados en nuestro grupo de investigación como el que se muestra en la Figura 4.9.¹²⁵ Esta molécula es estructuralmente análoga al derivado F127-SH-2 con la única diferencia de la sustitución de los grupos tiol terminales por grupos hidroxilo.

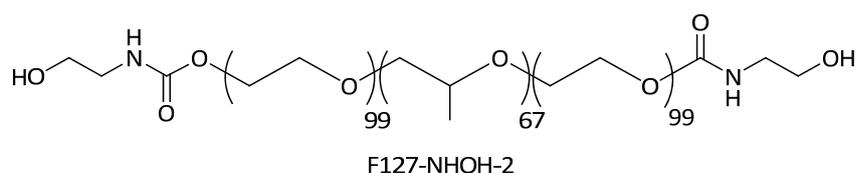


Figura 4.9. Estructura química del derivado F127-NHOH-2.

F127-NHOH-2 forma hidrogeles termosensibles a partir de concentraciones del 20% (w/v), lo que confirma la importancia de la presencia, no sólo del enlace carbamato, sino también del grupo tiol terminal para favorecer la gelificación y por tanto para disminuir la concentración de copolímero necesaria.

¹²⁵ Herrer Jiménez, I. L., Thermosensitive and photopolymerizable hydrogels based on Pluronic F127[®]. *Trabajo Fin de Master*, **2013**.

4.1.2.2.- Estudio de gelificación mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

El protocolo seguido en la obtención de los termogramas ha sido el descrito en el apartado 6.2.b., de la Parte Experimental. Los termogramas para tres de las disoluciones ensayadas, concentraciones al 5 %, 16 % y 25 % (w/v), de F127-SH-2 y F127-SH-4 se muestran en las Figuras 4.10 y 4.11, respectivamente.

En todos los termogramas realizados se observa el pico correspondiente al proceso de micelización (señalado en las gráficas en color morado). Sin embargo, el pico correspondiente al proceso de gelificación se detecta a partir de concentraciones iguales o superiores al 10 % (w/v). En estos gráficos se indica en color azul la LCST determinada en el pico de gelificación y, en verde, la LCST obtenida por el método de *inversión del vial*.

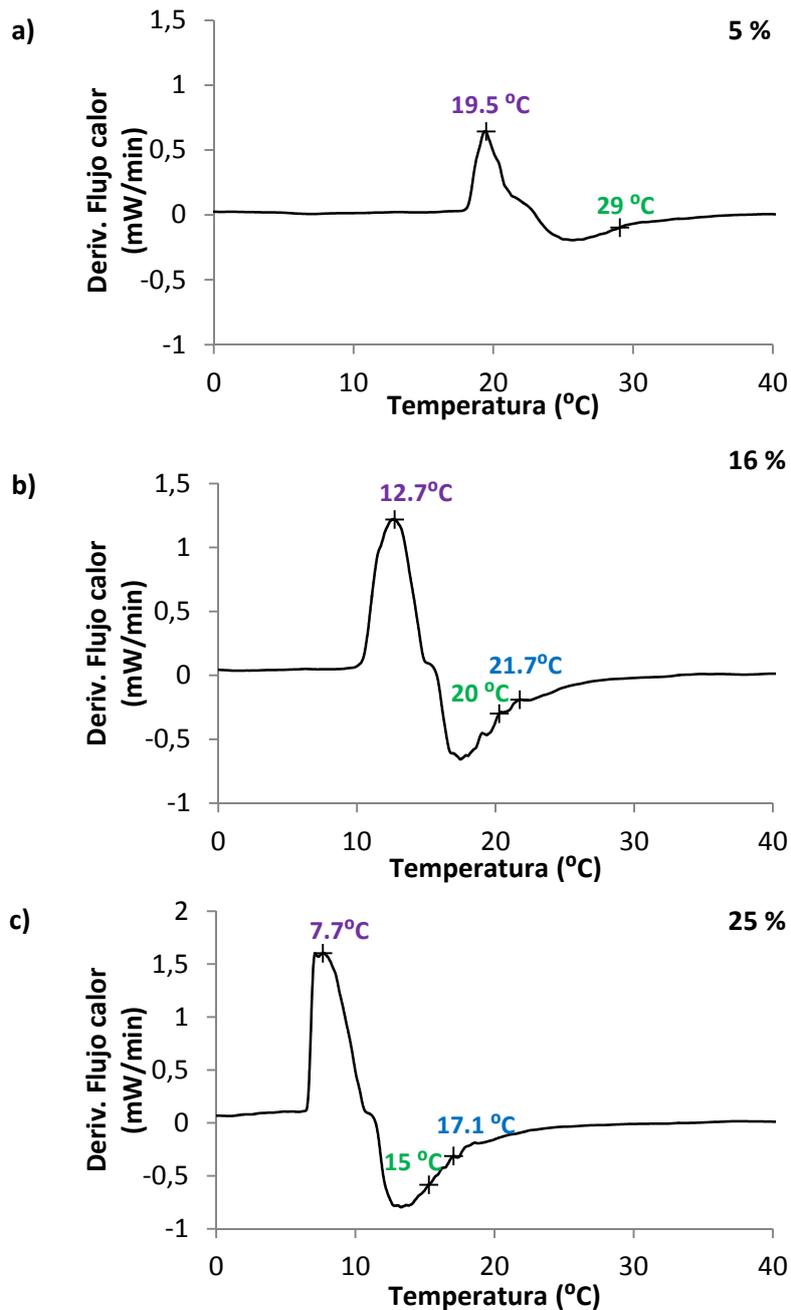


Figura 4.10. Termogramas de DSC de F127-SH-2: a) al 5 % (w/v), b) al 20 % (w/v) y c) 25 % (w/v) en PBS 10 mM pH 7.4, correspondiente a la representación de derivada del flujo de calor con respecto al tiempo (mW/min) frente a la temperatura en el ciclo de calentamiento; en morado, T^a de micelización (CMT), en azul, T^a de gelificación (LCST por DSC), en verde, LCST obtenida por el método de *inversión del vial*.

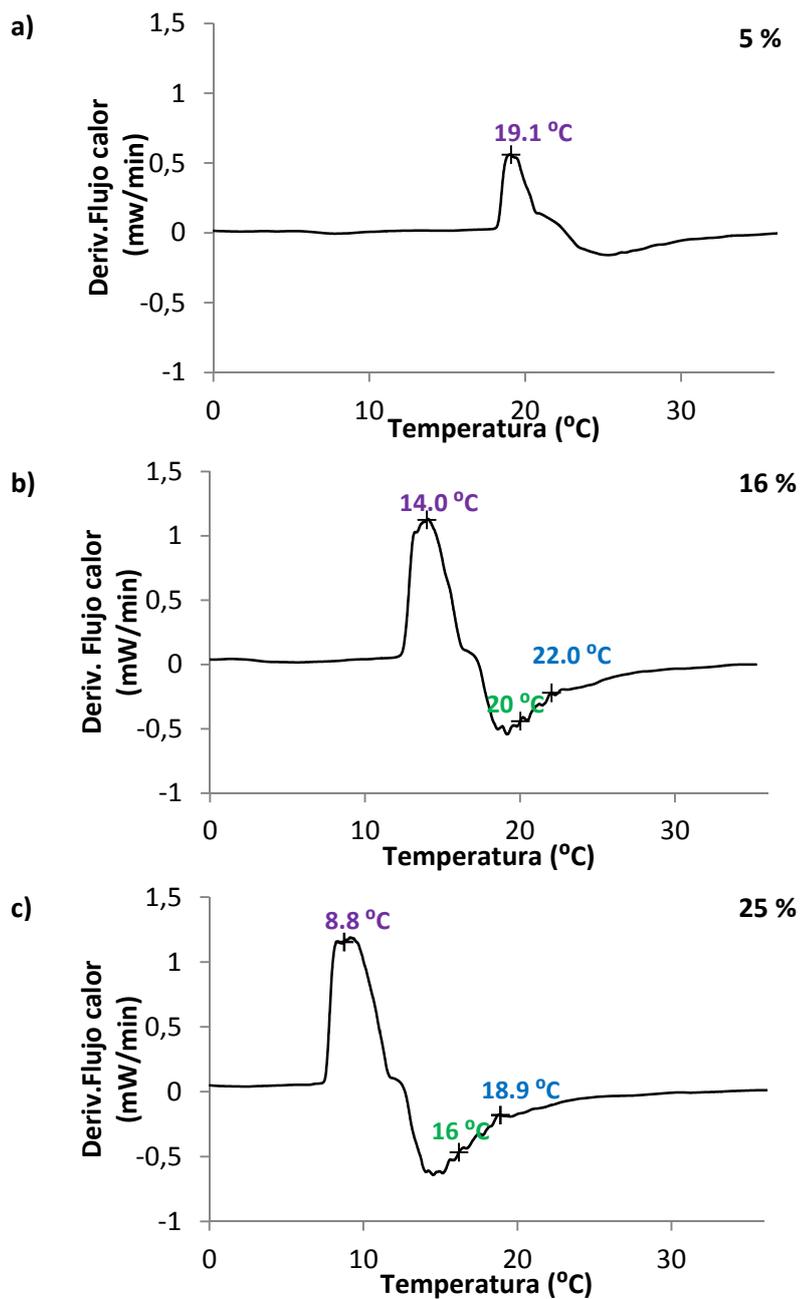


Figura 4.11. Termogramas de DSC de F127-SH-4: a) al 5 % (w/v), b) al 20 % (w/v) y c) 25 % (w/v) en PBS 10 mM pH 7.4, correspondiente a la representación de derivada del flujo de calor con respecto al tiempo (mW/min) frente a la temperatura en el ciclo de calentamiento; en morado, T^g de micelización (CMT), en azul, T^g de gelificación (LCST por DSC), en verde, LCST obtenida por el método de *inversión del vial*.

4.1.2.3.- Discusión de los resultados

En la Tabla 4.3 se resumen y comparan las LCST obtenidas por ambos métodos para los diferentes materiales estudiados.

Tabla 4.3. LCST y temperatura de micelización de diferentes materiales obtenidas con diferentes metodologías.

	Concentración (% w/v)	LCST ^a inversión vial (°C)	LCST por DSC (°C)	Micelización (°C)
F127-SH-2	5 %	29	-	19.5
	10 %	22	23.8	16.4
	16 %	20	21.7	12.7
	18 %	19	21.6	12.3
	20 %	17	21.6	11.8
	23 %	16	19.5	10.0
	25 %	15	17.1	7.7
F127-SH-4	5 %	36	-	19.1
	10 %	24	23.3	16.5
	16 %	20	22	14.0
	18 %	19	21.7	12.5
	20 %	18	20	10.2
	23 %	17	20	9.9
	25 %	16	18.9	8.8

^a LCST (Low Critical Solution Temperature)

Como se puede observar, las LCST obtenidas por el método de *inversión del vial* concuerdan bastante bien con las LCST obtenidas por DSC. Este comportamiento es diferente al descrito para los hidrogeles de los materiales estudiados en el Capítulo 3 de esta Memoria, donde las LCST obtenidas por el método de *inversión del vial* concordaban mejor con la temperatura a la cual se estabiliza la línea base. Esta diferencia de comportamiento entre los materiales acrilados y tiolados puede ser debida a que para los materiales tiolados se ha observado una mayor velocidad de gelificación con una mayor concordancia de las LCST obtenidas por ambos métodos experimentales.

4.1.3.- Ensayos de viabilidad celular

Los ensayos de viabilidad celular se han llevado a cabo con células MSC humanas utilizando el protocolo de preparación de células, preparación de las disoluciones de polímero y preparación de los ensayos de viabilidad celular en sistemas 2D y 3D descritos en el apartado 6.2.f., de la Parte Experimental. La viabilidad celular se determinó por el método live/dead (*Anexo III*).

Estos estudios se realizaron sobre concentraciones de F127-SH-2 y F127-SH-4 seleccionadas teniendo en cuenta sus diagramas de gelificación. El estudio se ha limitado a concentraciones de 5 y 10% (w/v) para los ensayos 2D, y de 5 y 10 % (w/v) para los ensayos 3D. Para determinar la toxicidad de estos compuestos en disolución también se estudiaron disoluciones de los materiales a concentración 2.5 % (w/v) en ensayos 2D.

En las Figuras 4.12 y 4.13 se muestran los resultados de viabilidad celular en ensayos 2D y 3D respectivamente, para el derivado lineal F127-SH-2 y para el derivado dendrítico F127-SH-4.

En ensayos 2D (Figura 4.12), los hidrogeles de ambos materiales presentan una elevada viabilidad celular tanto en disolución como en estado gel. Los valores de este parámetro tras 72 horas de ensayo son superiores o próximos al 90% en todos los casos. El aumento de concentración supone una ligera disminución de la viabilidad.

También se observó la elevada viabilidad celular en los ensayos 3D, como se muestra en la Figura 4.13, con valores superiores al 90% tras 72 horas de ensayo.

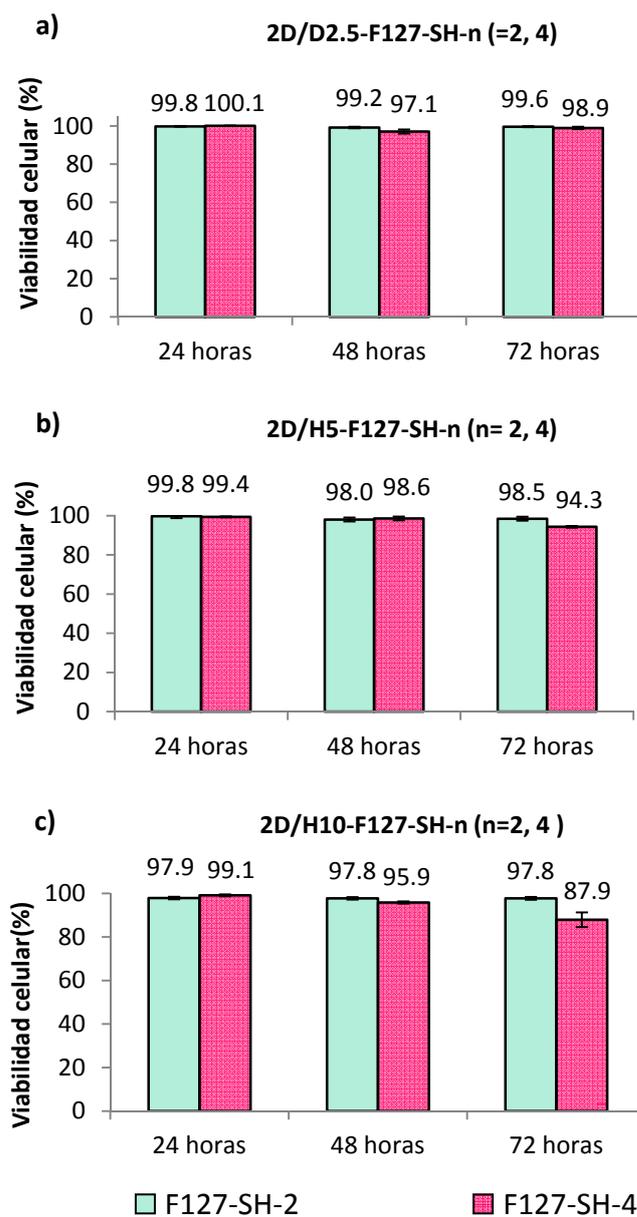


Figura 4.12. Viabilidad celular de derivados tiolados F127-SH-2 y F127-SH-4, en entorno 2D: a) al 2.5% (w/v) en disolución, b) al 5 % (w/v) en estado gel y c) al 10% (w/v) en estado gel.

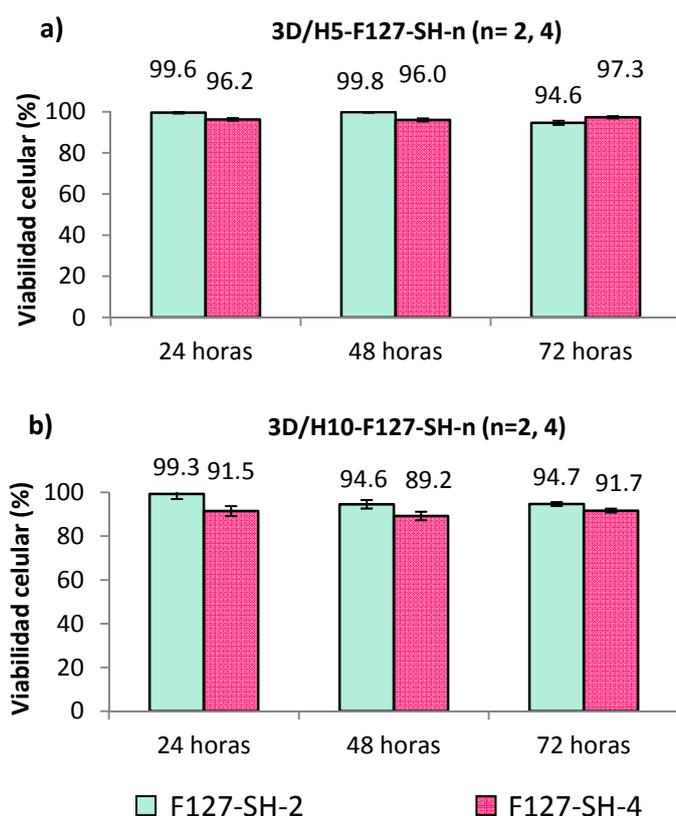


Figura 4.13. Viabilidad celular de los derivados tiolados F127-SH-2 y F127-SH-4, en entorno 3D en estado gel: a) al 5 % (w/v) y b) 10% (w/v).

A diferencia de lo descrito en los ensayos celulares para algunos de los materiales comentados en el Capítulo 3, el cambio de entorno 2D a 3D no afecta a la supervivencia celular en estos materiales con grupos tiol.

Las Figuras 4.14 y 4.15 recogen imágenes de microscopia de fluorescencia que muestran la morfología alargada de las células en los ensayos 2D, utilizando los compuestos de F127-SH-2 y F127-SH-4, tras 72 horas de ensayo. Las células vivas aparecen en color verde, teñidas con Calcein AM, y las células muertas en color rojo, teñidas con Ethidium homodimer.

En los ensayos 3D de los hidrogeles de F127-SH-2 predomina, para ambas concentraciones, la morfología celular redondeada (Figura 4.16), lo que sugiere una baja adhesión de las células al material. No obstante, también se observan algunas células con morfología alargada en 3D/H5-F127-SH-2. Esta morfología celular en los ensayos del hidrogel de menor concentración sugiere que se trata

de un material más blando que el análogo de mayor concentración, lo que permite la migración de las células al fondo del pocillo.

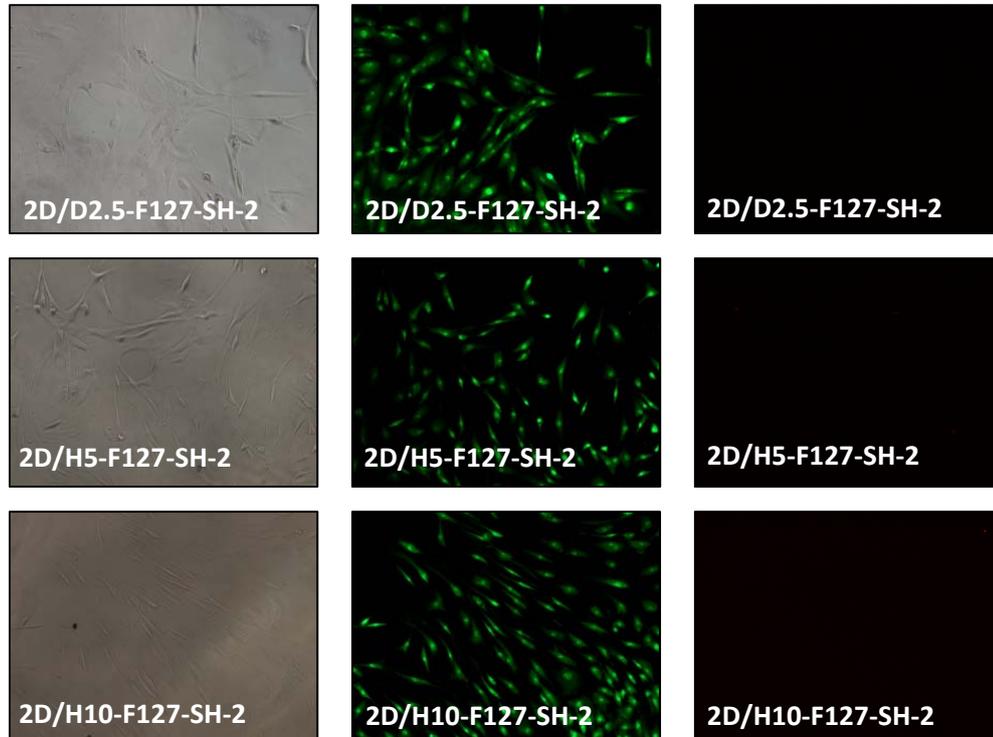


Figura 4.14. Imágenes de microscopia de fluorescencia para ensayos 2D de disoluciones e hidrogeles de F127-SH-2 tras 72 horas de ensayo. Primera columna: Imágenes en contraste de fases; Segunda columna: Células vivas; Tercera columna: Células muertas.

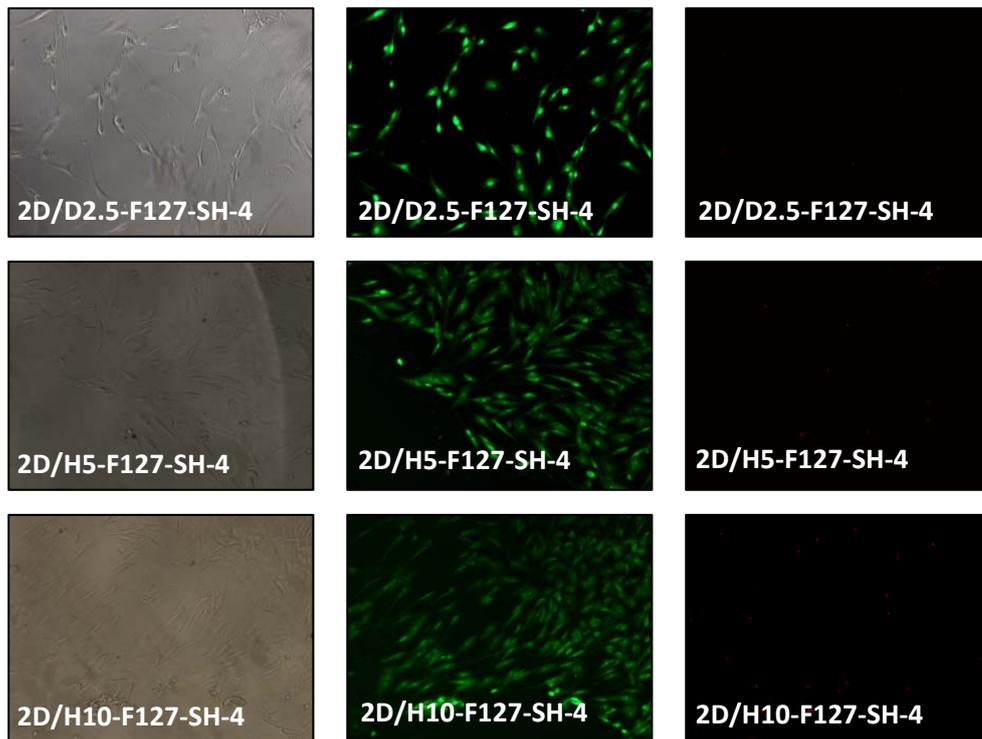


Figura 4.15. Imágenes de microscopia de fluorescencia para ensayos 2D de disoluciones e hidrogeles de F127-SH-4 tras 72 horas de ensayo. Primera columna: Imágenes en contraste de fases; Segunda columna: Células vivas; Tercera columna: Células muertas.

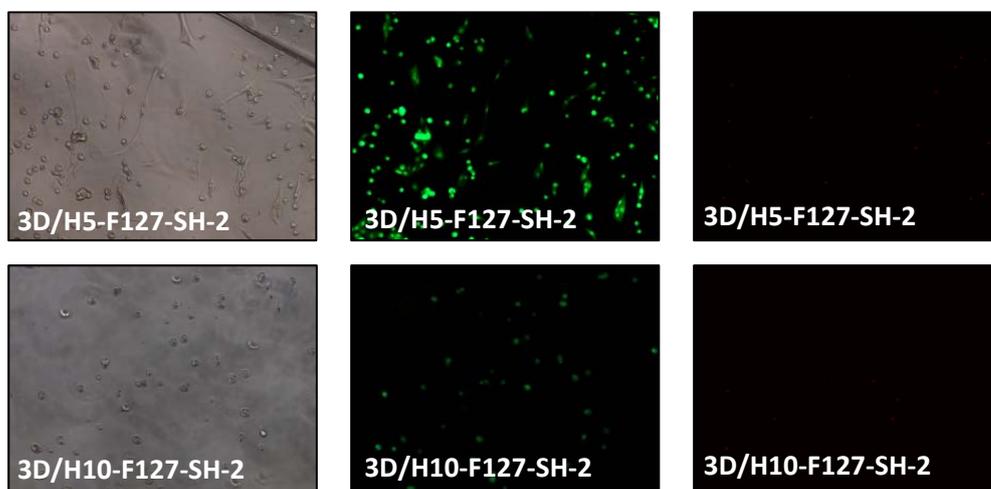


Figura 4.16. Imágenes de microscopia de fluorescencia para ensayos 3D de hidrogeles de F127-SH-2 tras 72 horas de ensayo. Primera columna: Imágenes en contraste de fases; Segunda columna: Células vivas; Tercera columna: Células muertas.

En cuanto al hidrogel 3D/H5-F127-SH-4, se observó un elevado número de células con morfología alargada, si lo comparamos con el hidrogel 3D/H10-F127-

SH-4 (imágenes en contraste de fases, Figura 4.17). En el estudio de las imágenes de contraste de fases para el ensayo 3D a concentración del 5% (w/v) a 24, 48 y 72 horas (Figura 4.18) se puede comprobar que el número de células alargadas adheridas al fondo del pocillo aumenta con el paso del tiempo, lo que se atribuye de nuevo a la migración de las células a través de un hidrogel más blando.

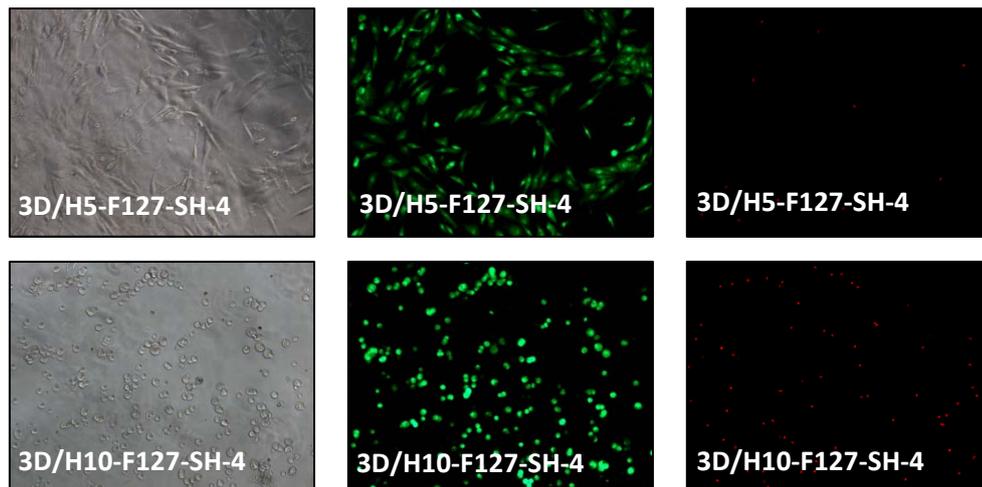


Figura 4.17. Imágenes de microscopía de fluorescencia para ensayos 3D de hidrogeles de F127-SH-4 tras 72 horas de ensayo. Primera columna: Imágenes en contraste de fases; Segunda columna: Células vivas; Tercera columna: Células muertas.



Figura 4.18. Imágenes en contraste de fases para ensayos 3D de hidrogeles al 5% (w/v) de F127-SH-4 tras 24, 48 y 72 horas de ensayo.

Los buenos resultados de viabilidad celular obtenidos para hidrogeles basados en las moléculas gelificantes F127-SH-2 y F127-SH-4, permitirán en un futuro la utilización de estos hidrogeles como soportes para el cultivo de células endoteliales en entorno 2D. Dicho estudio se realizará en colaboración con el Dr. Ángel Luis García- Otín, del Grupo de Investigación de Progenitores Adultos del

Sistema Cardiovascular (GIPASC), perteneciente al Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS).

4.2.- FORMULACIONES DE DERIVADOS F127-SH-n Y RETICULANTES CON GRUPOS ACRILATO

Como ya se ha indicado, el objetivo principal de trabajar con derivados de tipo tiol ha sido el de disponer de hidrogeles termosensibles reticulables con una menor densidad de grupos acrilato, pero capaces de polimerizar mediante una reacción de tipo tiol-eno entre grupos tiol y grupos acrilato.

Considerando los resultados descritos en el apartado anterior, estos nuevos compuestos F127-SH-n (n= 2, 4) que combinan el grupo carbamato y el grupo tiol, gelifican a una menor concentración y permiten buenas viabilidades. Así, la menor concentración de polímero necesaria para producir la gelificación y la reducción de concentración de grupos acrilato permiten pensar para sus mezclas en una mejora de la viabilidad celular, con respecto a los derivados del Capítulo 3.

Este apartado se ha dividido en dos subapartados en función de los distintos tipos de monómero acrilato utilizado. En el primero de ellos, 4.2.1., se describen los hidrogeles basados en las mezclas de los compuestos F127-SH-n (n= 2, 4) con los derivados F127-Ac-n (n= 2, 4, 8) del Capítulo 3 de esta Memoria. En el segundo subapartado, 4.2.2., se recogen los resultados obtenidos sobre formulaciones basadas en F127-SH-n (n= 2, 4) y otros agentes reticulantes de tipo acrilato, con estructuras más sencillas y no termosensibles.

4.2.1.- Materiales basados en mezclas de F127-SH-n (n= 2, 4) con F127-Ac-n (n= 2, 4, 8)

Conforme al objetivo fundamental de nuestro trabajo con estos nuevos materiales, la investigación se ha centrado esencialmente en la preparación de

las formulaciones y sus hidrogeles, el estudio de las condiciones de polimerización y en la evaluación de las propiedades de los nuevos hidrogeles reticulados.

4.2.1.1- Preparación de los hidrogeles precursores y estudio de su reticulación.

El desarrollo de esta parte del trabajo precisó analizar diferentes aspectos:

- a) La selección de la proporción de los componentes.*
- b) La metodología de preparación de las mezclas.*
- c) Establecer las condiciones más adecuadas de reticulación química.*

En la Tabla 4.4 se resumen los diferentes ensayos llevados a cabo con el fin de seleccionar las condiciones de trabajo más adecuadas respecto a los tres aspectos mencionados. Este estudio se limitó a mezclas de F127-Ac-2 con F127-SH-2. Además, con el fin de conocer el comportamiento de los polímeros de forma individual en determinadas condiciones de trabajo, en casos indicados, también se trabajó con hidrogeles monocomponente.

Para identificar los diferentes hidrogeles con los que se ha trabajado, se ha utilizado una nomenclatura que se explica con la identificación para el material H10(1:1)-F127-Ac-2/F127-SH-2. Con H10(1:1) se hace referencia a un hidrogel, su concentración y su proporción en moles entre los distintos componentes de la mezcla, en este caso concentración del 10% (w/v) en total, con una proporción molar entre los componentes 1:1. A continuación se indican los dos componentes que forman la mezcla separados por una barra F127-Ac-2/F127-SH-2. Para identificar a los hidrogeles análogos fotopolimerizados se antepone letra "P" al nombre del hidrogel precursor, P/H10(1:1)-F127-Ac-2/F127-SH-2.

En los párrafos siguientes se comentan algunos aspectos relativos al desarrollo de estos estudios.

Tabla 4.4. Resumen de los ensayos realizados para la selección de las condiciones de trabajo.

Nº	Componente C1	Componente C2	Relación molar C1 : C2	% w/v	Material	Mezclado		% (w/v) I2959		Reticulación		Resultado***	Nº
						M1*	M2*	0.1	0.5	PSL**	PL**		
1	F127-Ac-2	F127-SH-2	1 : 1	10	H10(1:1)-F127-Ac-2/F127-SH-2	+		-	-	+		negativo	1
2							+	-	-	+		negativo	2
3						+		+			+	negativo	3
4							+	+			+	negativo	4
5						+			+		+	negativo	5
6							+		+		+	positivo	6
7	F127-Ac-2	F127-SH-2	1 : 1.2	10	H10(1:1.2)-F127-Ac-2/F127-SH-2	+		-	-	+		negativo	7
8							+	-	-	+		negativo	8
9						+		+			+	negativo	9
10							+	+			+	negativo	10
11						+			+		+	negativo	11
12							+		+		+	positivo	12
13	F127-Ac-2			5	D5-F127-Ac-2	-	-	-	-	+		negativo	13
14						-	-	+			+	negativo	14
15						-	-		+		+	positivo	15
16		F127-SH-2		5	H5-F127-SH-2	-	-	-	-	+		negativo	16
17						-	-	+			+	negativo	17
18						-	-		+		+	negativo	18
Condiciones de trabajo seleccionadas			1 : 1	10		M2		0.5		PL			

*M1: Preparación de las disoluciones de los componentes por separado y posterior mezclado, M2: preparación conjunta de la disolución de los dos componentes **PSL. Polimerización sin luz, PL: polimerización con luz. ***Ensayo positivo: No reversión del hidrogel al estado sol tras mantenerlo a 4 °C durante 10 minutos.

a) Selección de la proporción de los componentes:

El trabajo desarrollado se ha centrado en diferentes composiciones, atendiendo a la relación molar de los componentes y la relación estequiométrica de los grupos reactivos ($\text{CH}_2=\text{CHCOO}^-/\text{-SH}$).

b) Metodología de preparación de las mezclas:

Una de las características de nuestros materiales y de sus propiedades es la formación de micelas. Dado que los ensayos se realizan en condiciones que superan la CMC, trabajar con mezclas de diferentes compuestos derivados del Pluronic supone que el método de mezclado claramente puede influir en la composición de estas micelas, con la particularidad de que éstas deben reaccionar en el proceso de reticulación. Por ello se plantearon y analizaron dos metodologías de mezclado diferentes.

El procedimiento de mezclado que denominaremos M1, supone la disolución de cada uno de los dos polímeros que forman la mezcla por separado y su posterior mezclado. Este procedimiento probablemente favorecería una organización en micelas “monocomponente” en la mezcla (Figura 4.19 (a)).

El segundo procedimiento de mezclado, M2, consiste en la disolución conjunta de los polímeros. Ello puede favorecer la formación de micelas “bicomponente” compuestas por los dos polímeros de la mezcla (Figura 4.19 (b)).

Independientemente del procedimiento de mezcla utilizado, en todos los casos la concentración final de las mezclas de polímeros ha sido del 10 % (w/v) en PBS 10 mM pH 7.4.

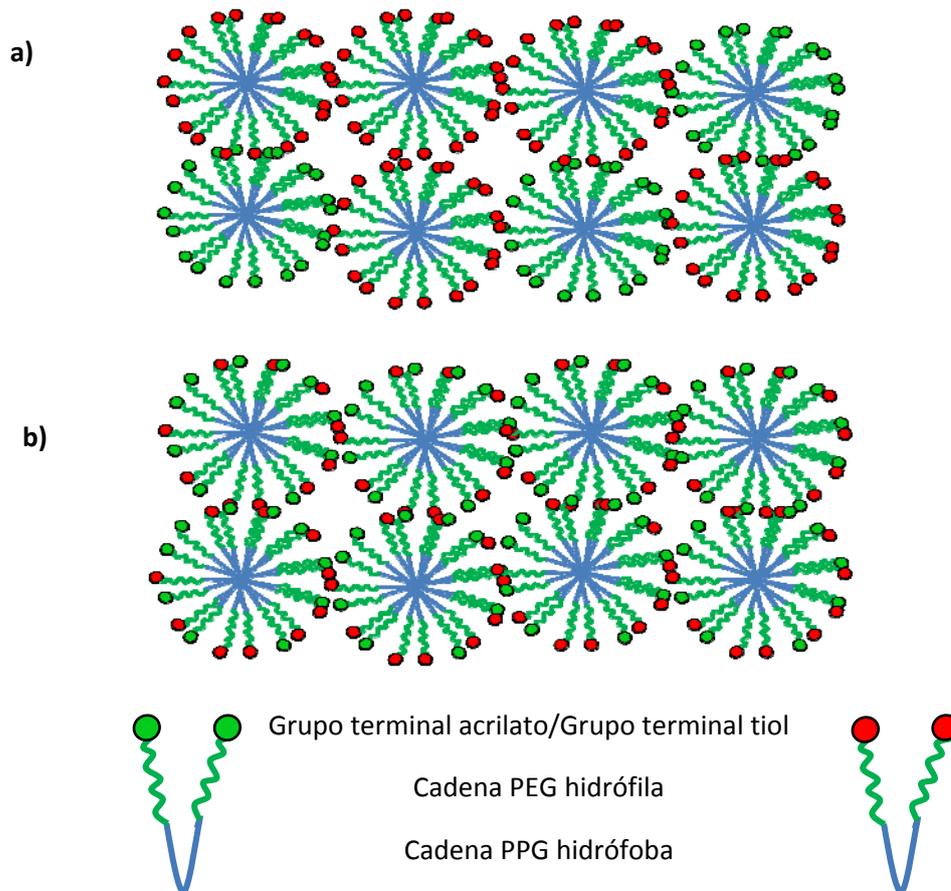


Figura 4.19. Representación esquemática de las micelas que forman los hidrogeles preparados por los distintos procedimientos de mezclado, M1 y M2. a) Organización en micelas puras favorecidas en el procedimiento de mezclado M1, b) organización en micelas mixtas favorecidas en el procedimiento de mezclado M2.

Los procedimientos de trabajo han sido:

- Método M1: Se prepararon dos disoluciones, una disolución al 10% (w/v) de F127-Ac-2 en PBS 10 mM PH 7.4 y otra de F127-SH-2 al 10% (w/v) en PBS 10 mM PH 7.4. Los polímeros se dejaron disolver a 4 °C durante toda la noche. Para la preparación de las mezclas bicomponente se mezclaron volúmenes idénticos de cada una de las disoluciones durante 30 segundos a 4 °C.
- Método M2: En un recipiente se introdujo la cantidad correspondiente al 5 % (w/v) de cada uno de los polímeros y se añadió el volumen

correspondiente de PBS 10 mM pH 7.4. Los polímeros se dejaron disolver a 4 °C durante una noche y en oscuridad.

c) Condiciones optimas de reticulación:

En el proceso de reticulación química, a través de la adición del grupo tiol a un doble enlace, existen numerosas variables experimentales que se pueden modificar, y en particular, una esencial es el uso o no de fotoiniciador para que se produzca la reacción de adición, lo que condiciona un mecanismo de fotopolimerización radicalaria o un mecanismo iónico, respectivamente.⁶⁶

Respondiendo al objetivo inicial de esta tesis, la investigación se ha centrado en el proceso de fotopolimerización con luz (reticulación identificada como PL). No obstante, dada la alternativa iónica, también se ha estudiado la polimerización sin luz (reticulación identificada como PSL).

- Reticulación química con luz (PL): Una vez preparadas las muestras de los materiales a estudio en PBS 10 mM pH 7.4, que contenía un 0.1 ó 0.5 % en peso del fotoiniciador I2959 previamente disuelto, por los distintos métodos de mezclado, se llevó a cabo la fotopolimerización del hidrogel siguiendo el protocolo de trabajo 6.2.c., descrito en la Parte Experimental. Tras la fotopolimerización, los hidrogeles obtenidos se mantuvieron a 4 °C durante 10 minutos para observar si la reticulación química había tenido lugar.

- Reticulación química sin luz (PSL): Una vez preparadas las muestras de los materiales a estudio en PBS 10 mM pH 7.4, por los distintos métodos de mezclado, se introdujeron en una estufa a 37 °C con el fin de provocar la reacción entre los grupos acrilato y grupos tiol, manteniendo el material en estas condiciones durante 7 días. A determinados intervalos de tiempo, la muestra se extrajo de la estufa, se enfrió y se mantuvo durante 10 minutos a 4 °C para comprobar si el hidrogel revertía a su estado sol, lo que sería indicativo de que el proceso sol-gel es reversible y por tanto, indicaba que no se había producido reticulación.

Los resultados obtenidos en los ensayos realizados que se muestran en la Tabla 4.4 permiten concluir que:

- En las mezclas bicomponente y a diferencia de lo descrito por otros autores,¹⁰¹ no se observó la reticulación química sin luz en ninguno de los casos (experimentos nº 1, 2, 7 y 8). No se observa reticulación térmica ni con el aumento de la proporción de grupos tiol con respecto de los acrilatos (experimentos nº 1 y 2 (proporción 1:1 en moles) frente a nº 7 y 8 (proporción 1:1.2 en moles)), ni con el cambio de método de preparación de las mezclas (experimentos nº 1 y 7 (procedimiento de mezclado M1) frente a nº 2 y 8 (procedimiento de mezclado M2)).
- La reticulación química con luz de los materiales bicomponente requiere un aumento de la concentración de fotoiniciador hasta el 0.5 % en peso (experimentos nº 6 y 12) y sólo se produce en el caso de que los polímeros se disuelven conjuntamente (M2).
- La reticulación química para los materiales monocomponente (experimentos nº 13 a 18) sólo se produjo para el material acrilado con una concentración de fotoiniciador del 0.5% en peso (experimento nº 15).
- Las condiciones de reticulación química más idóneas de los materiales “bicomponente” son:
 1. Disolución conjunta de los componentes de la mezcla en una relación molar 1:1.
 2. Utilización de PBS 10 mM pH 7.4 como medio acuoso y un 0.5 % en peso de fotoiniciador I2959.
 3. Estabilización de la disolución de los materiales a 4 °C durante una noche.
 4. Formación del hidrogel físico a 37 °C.
 5. Fotopolimerización con luz UV durante 10 min con una distancia de la lámpara a la muestra de 8 cm.

En la Figura 4.20 se muestra el aspecto del hidrogel P/H10(1:1)-F127-Ac-2/F127-SH-2 obtenido mediante la aplicación de estas condiciones de trabajo.

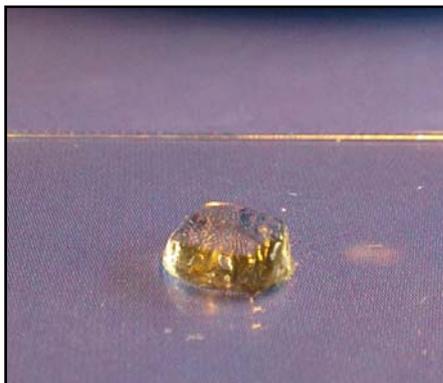


Figura 4.20. Aspecto del hidrogel P/H10(1:1)-F127-Ac-2/F127-SH-2, obtenido en las condiciones experimentales establecidas como más idóneas.

Establecidas las condiciones de preparación de los hidrogeles bicomponente polimerizados, el estudio se amplió a diferentes formulaciones con los derivados lineales y dendrítico-lineal-dendrítico de primera y segunda generación, tanto acrilados (F127-Ac-n (n= 2, 4, 8) como tiolados (F127-SH-n (n=2, 4).

En las formulaciones basadas en el derivado lineal con grupos tiol, F127-SH-2 y copolímeros dendrítico-lineal-dendrítico de primera y segunda generación con grupos acrilato (F127-Ac-4 y F127-Ac-8), se probaron dos relaciones en moles, la relación 1:1 molar (H10(1:1)-F127-Ac-4/F127-SH-2 y H10(1:1)-F127-Ac-8/F127-SH-2) que supone un exceso de grupos acrilato con respecto a los grupos tiol; y la relación 1:2 molar (H10(1:2)-F127-Ac-4/F127-SH-2) y 1:4 (H10(1:4)-F127-Ac-8/F127-SH-2), que supone una relación estequiométrica entre grupos funcionales acrilato y tiol. Las concentraciones finales de las mezclas se mantuvieron al 10 % (w/v), utilizando el método M2 como procedimiento de mezclado y disolución de los componentes en PBS 10 mM pH 7.4 y presencia de 0.5 % en peso de fotoiniciador I2959.

En la Tabla 4.5 se recogen los experimentos realizados y los resultados obtenidos.

Tabla 4.5. Resumen de los experimentos realizados para mezclas F127-Ac-n (n= 2, 4, 8) y F127-SH-n (n= 2, 4).

Nº	Componente C1	Componente C2	Relación molar C1 : C2	Proporción C=C : SH	% w/v	Material	Mezclado	% (w/v) I2959	Reticulación	Resultado***	Nº
							M2*	0.5	PL**		
6	F127-Ac-2	F127-SH-2	1 : 1	1 : 1	10	H10(1:1)-F127-Ac-2/F127-SH-2	+	+	+	positivo	6
19	F127-Ac-4	F127-SH-2	1 : 1	2 : 1	10	H10(1:1)-F127-Ac-4/F127-SH-2	+	+	+	positivo	19
20	F127-Ac-4	F127-SH-2	1 : 2	1 : 1	10	H10(1:2)-F127-Ac-4/F127-SH-2	+	+	+	negativo	20
21	F127-Ac-8	F127-SH-2	1 : 1	4 : 1	10	H10(1:1)-F127-Ac-8/F127-SH-2	+	+	+	positivo	21
22	F127-Ac-8	F127-SH-2	1 : 4	1 : 1	10	H10(1:4)-F127-Ac-4/F127-SH-2	+	+	+	negativo	22
23	F127-Ac-2	F127-SH-4	1 : 1	1 : 2	10	H10(1:1)-F127-Ac-2/F127-SH-4	+	+	+	positivo	23
24	F127-Ac-2	F127-SH-4	2 : 1	1 : 1	10	H10(1:1)-F127-Ac-2/F127-SH-4	+	+	+	negativo	24
25	F127-Ac-4	F127-SH-4	1 : 1	1 : 1	10	H10(1:1)-F127-Ac-4/F127-SH-4	+	+	+	positivo	25
26	F127-Ac-8	F127-SH-4	1 : 1	2 : 1	10	H10(1:1)-F127-Ac-8/F127-SH-4	+	+	+	positivo	26
27	F127-Ac-8	F127-SH-4	1 : 2	1 : 1	10	H10(1:1)-F127-Ac-8/F127-SH-4	+	+	+	negativo	27
Relación molar óptima			1 : 1				+	+	+		

*M2: preparación conjunta de la disolución de los dos componentes **PL: polimerización con luz. ***Ensayo positivo: No reversión del hidrogel al estado sol tras mantenerlo a 4 °C durante 10 minutos.

Independientemente de los componentes utilizados, únicamente se detectó reticulación química adecuada en el caso de las mezclas en las que los polímeros se encuentran en proporciones molares 1:1 (experimentos nº 6, 19, 21, 23, 25 y 26)

En la Figura 4.21 se muestra el aspecto de los hidrogeles obtenidos por fotopolimerización de materiales estudiados a partir del derivado lineal, F127-SH-2 (imagen superior) y del derivado dendrítico-lineal-dendrítico F127-SH-4 (imagen inferior), con F127-Ac-n (n=2, 4, 8). Las imágenes reflejan que la consistencia de los distintos materiales no es similar y que el uso de moléculas con mayor número de grupos acrilato confiere a los hidrogeles una mayor estabilidad mecánica (experimentos nº 21 y 26).

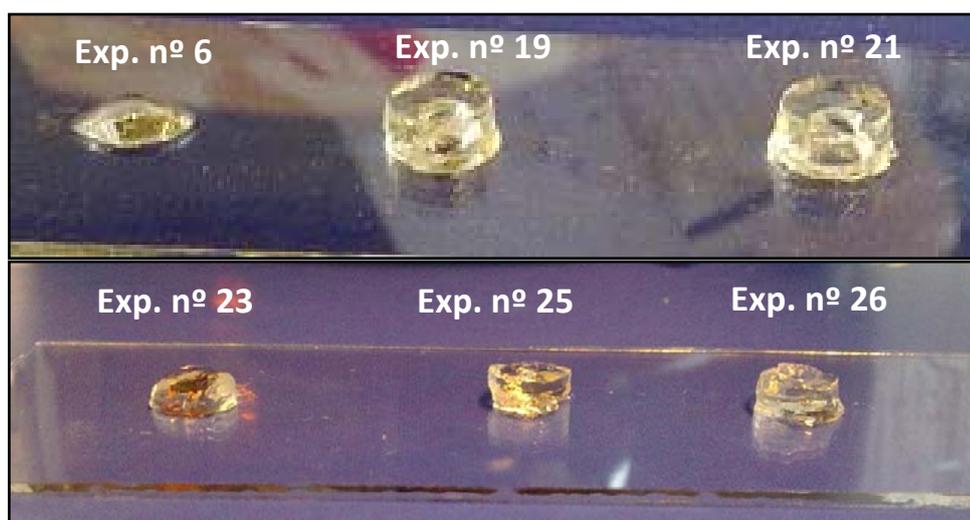


Figura 4.21. Aspecto de los hidrogeles P/H10(1:1)-F127-Ac-2/F127-SH-2 (exp. nº 6), P/H10(1:1)-F127-Ac-4/F127-SH-2 (exp. nº 19), P/H10(1:1)-F127-Ac-8/F127-SH-2 (exp. nº 21), P/H10(1:1)-F127-Ac-2/F127-SH-4 (exp. nº 23), P/H10(1:1)-F127-Ac-4/F127-SH-4 (exp. nº 25), P/H10(1:1)-F127-Ac-8/F127-SH-4 (exp. nº 26).

4.2.1.2.- Determinación de las propiedades sol-gel de hidrogeles polimerizables

Seleccionadas las formulaciones que permitían obtener hidrogeles fotopolimerizados adecuados, se llevó a cabo la caracterización sol-gel de los materiales precursores fotopolimerizables.

Para la determinación de las propiedades sol-gel se prepararon muestras de las mezclas H10(1:1)-F127-Ac-2/F127-SH-2, H10(1:1)-F127-Ac-4/F127-SH-2, H10(1:1)-F127-Ac-8/F127-SH-2 así como de H10(1:1)-F127-Ac-2/F127-SH-4, H10(1:1)-F127-Ac-4/F127-SH-4 y H10(1:1)-F127-Ac-8/F127-SH-4, disueltas en PBS 10 mM pH 7.4, preparadas mediante el procedimiento M2, y manteniendo las muestras durante una noche a 4 °C para su disolución.

Sus comportamientos sol-gel se estudiaron utilizando el método de *inversión del vial* y la calorimetría diferencial de barrido (DSC), siguiendo los protocolos de trabajo 6.2.a. y 6.2.b., descritos en la Parte Experimental.

En la Figura 4.22 y 4.23 se muestran los termogramas obtenidos para las mezclas de derivados F127-Ac-n (n=2, 4, 8) con F127-SH-2 y F127-SH-4, respectivamente.

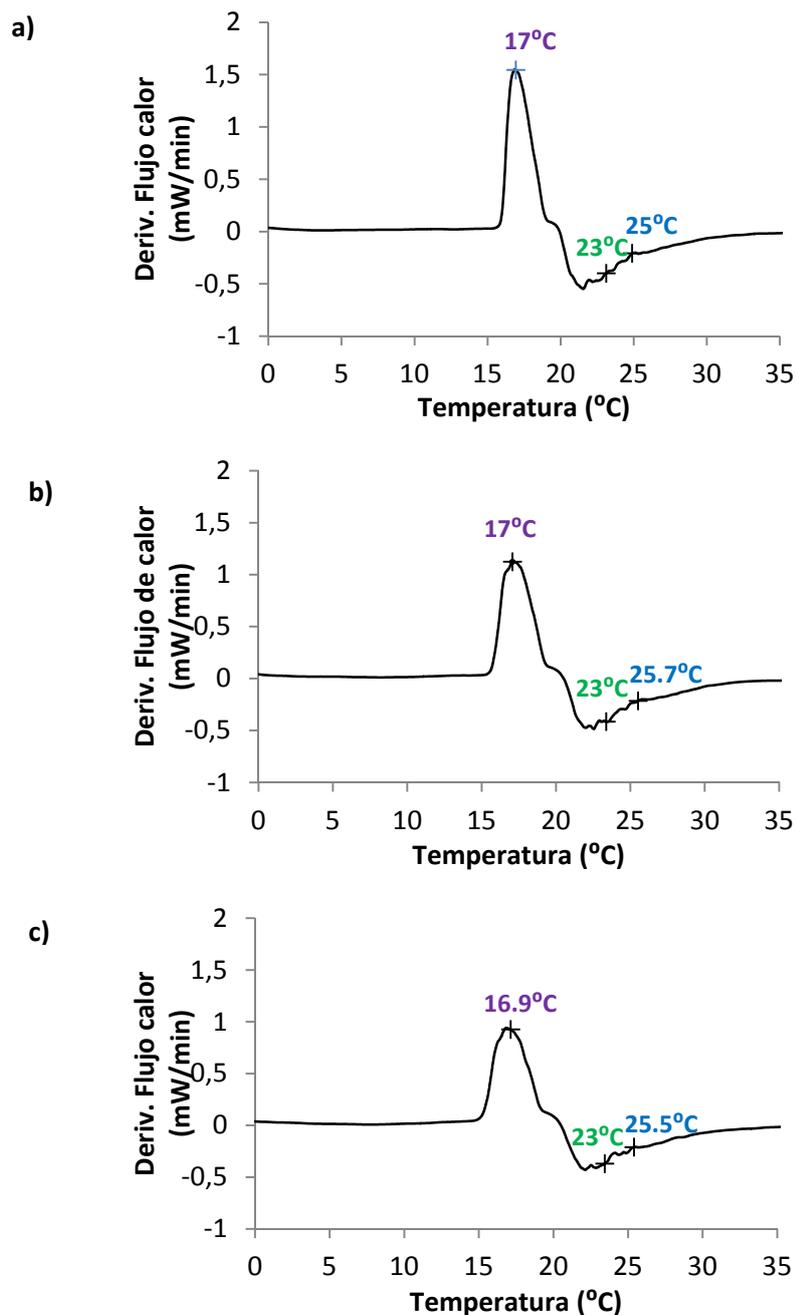


Figura 4.22. DSC de las mezclas: a) H10(1:1)-F127-Ac-2/F127-SH-2, b) H10(1:1)-F127-Ac-4/F127-SH-2 y c) H10(1:1)-F127-Ac-8/F127-SH-2 en PBS 10 mM pH 7.4 correspondientes a la representación de la derivada del flujo de calor con respecto al tiempo (mW/min) frente a la temperatura en el ciclo de calentamiento; en morado, T^a de micelización (CMT), en azul, T^a de gelificación (LCST por DSC), en verde, LCST obtenida por el método de inversión del vial.

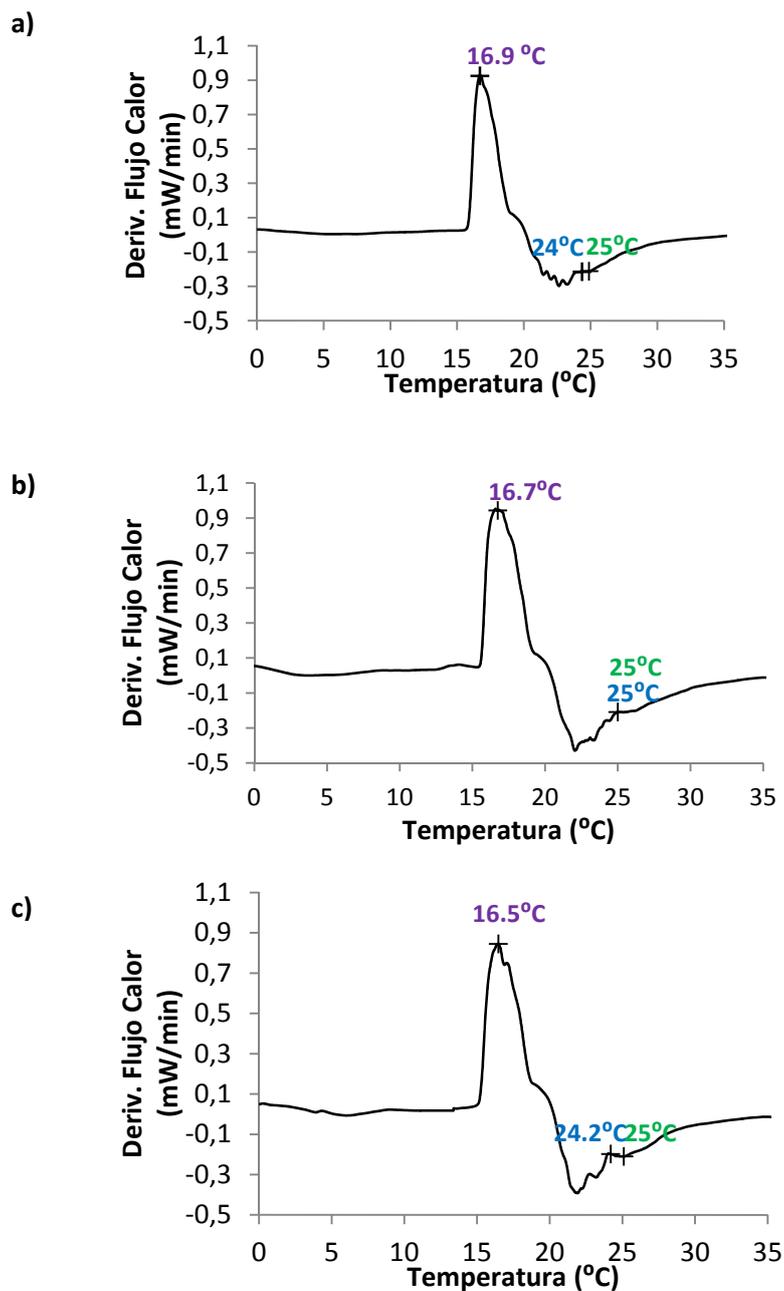


Figura 4.23. DSC de las mezclas: a) H10 (1:1)-F127-Ac-2/F127-SH-4, b) H10 (1:1)-F127-Ac-4/F127-SH-4 y c) H10 (1:1)-F127-Ac-8/F127-SH-4 en PBS 10 mM pH 7.4, correspondientes a la representación de la derivada del flujo de calor con respecto al tiempo (mW/min) frente a la temperatura en el ciclo de calentamiento; en morado, T_m de micelización (CMT), en azul, T_g de gelificación (LCST por DSC), en verde, LCST obtenida por el método de *inversión del vial*.

En la Tabla 4.6 se recogen los resultados de las temperaturas de transición sol-gel (LCST) para todas las mezclas estudiadas, obtenidas por ambos métodos. Además, se muestran las transiciones gel-sol determinadas por el método de *inversión del vial* y las CMT establecidas por DSC.

Tabla 4.6. Temperaturas de transición de fases de las mezclas obtenidas por el método de *inversión del vial* y por DSC.

	LCST inversión del vial (° C)	Temperatura gel-sol inversión del vial (° C)	LCST por DSC (°C)	Micelización (°C)
H10 (1:1)-F127-Ac-2/ F127-SH-2	23	86	25	17
H10 (1:1)-F127-Ac-4/ F127-SH-2	23	80	25.7	17
H10 (1:1)-F127-Ac-8/ F127-SH-2	23	70	25.5	16.9
H10 (1:1)-F127-Ac-2/ F127-SH-4	25	88	24	16.9
H10 (1:1)-F127-Ac-4/ F127-SH-4	25	84	25	16.7
H10 (1:1)-F127-Ac-8/ F127-SH-4	25	77	24.2	16.5

Las LCST obtenidas por el método de *inversión del vial* concuerdan bastante bien con las LCST obtenidas por DSC. Las LCST y la temperatura de micelización obtenidas por DSC son muy similares entre las mezclas, sin apreciarse diferencias en función del tipo de derivado acrilado utilizado.

4.2.1.3.- Caracterización de la morfología interna por SEM

Utilizando las condiciones de polimerización seleccionadas se prepararon 6 hidrogeles fotopolimerizados: P/H10(1:1)-F127-Ac-2/F127-SH-2, P/H10(1:1)-F127-Ac-4/F127-SH-2, P/H10(1:1)-F127-Ac8/F127-SH-2, P/H10(1:1)-F127-Ac-2/F127-SH-4, P/H10(1:1)-F127-Ac-4/F127-SH-4 y P/H10(1:1)-F127-Ac-8/F127-SH-4, cuya morfología se estudió mediante SEM, siguiendo el protocolo 6.2.d. descrito en la Parte Experimental.

En las Figuras 4.24, 4.25 y 4.26 se pueden observar las estructuras internas porosas de los tres hidrogeles fotopolimerizados basados en F127-SH-2 con F127-Ac-2, F127-Ac-4 y F127-Ac-8, respectivamente. En las Figuras 4.27 y 4.28 se muestran las estructuras internas porosas de dos de los hidrogeles fotopolimerizados basados en F127-SH-4 con F127-Ac-4 y F127-Ac-8, respectivamente. El hidrogel P/H10(1:1)-F127-Ac-2/F127-SH-4 se degradó completamente antes de transcurrir los tres días de incubación en PBS, necesarios para la preparación de las muestras para su estudio con SEM.

El análisis de las fotografías permite observar que los hidrogeles fotopolimerizados preparados a partir de mezclas F127-Ac-n (n=2, 4, 8)/F127-SH-2, muestran estructuras internas porosas, siendo muy similares en cuanto a rango de tamaños de poro (Tabla 4.7), pero muy diferentes en cuanto a cantidad y conectividad de los poros.

Los materiales basados en F127-SH-2, como el hidrogel P/H10(1:1)-F127-Ac-2/F127-SH-2 (Figura 4.24) presenta una estructura con elevada densidad de poros interconectados entre sí, como se deduce de la presencia de poros huecos en las imágenes de SEM (Figura 4.24 (b)). Sin embargo, el aumento de la densidad de grupos acrilato por molécula como es el caso de los hidrogeles P/H10(1:1)-F127-Ac-4/F127-SH-2 (Figura 4.25) y P/H10(1:1)-F127-Ac-8/F127-SH-2 (Figura 4.26) dio lugar a estructuras con menor densidad de poros y con menor interconexión entre ellos, hecho que es más notable para el material basado en el derivado con mayor número de grupos acrilato (Figura 4.26 (b), comparación con imágenes (b) en las Figuras 4.24 y 4.25).

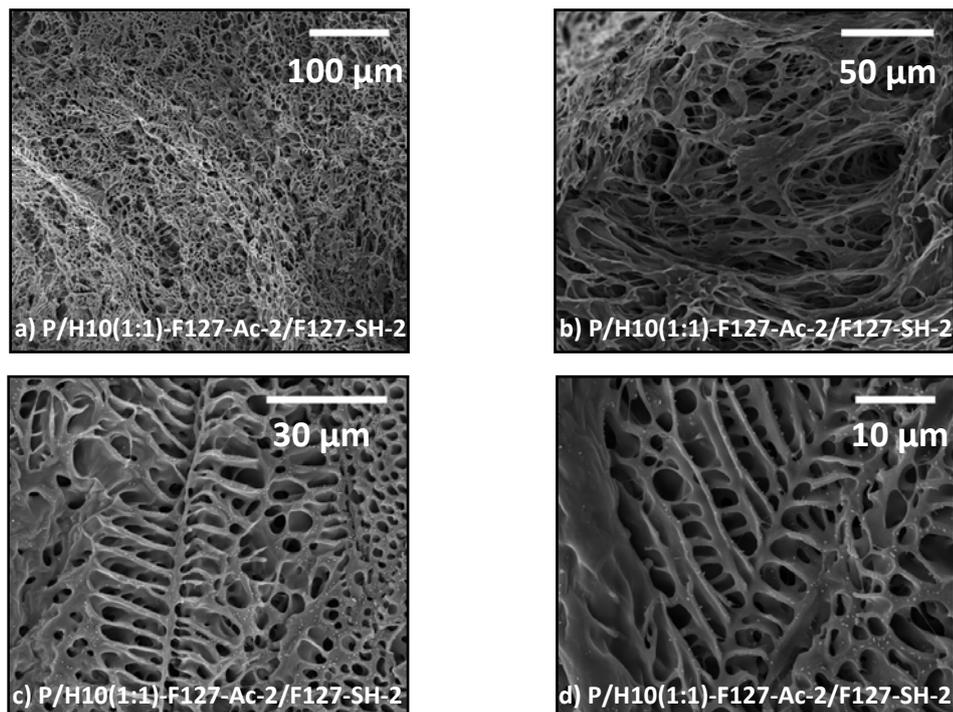


Figura 4.24. Imágenes SEM de la estructura interna de hidrogeles fotopolimerizados de mezclas de F127-Ac-2/F127-SH-2, a concentraciones del 10 % en peso (1:1 en moles).

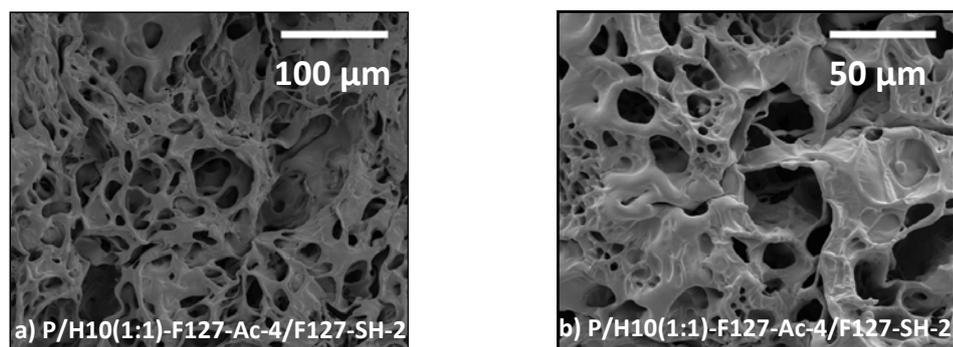


Figura 4.25. Imágenes SEM de la estructura interna de hidrogeles fotopolimerizados de mezclas de F127-Ac-4/F127-SH-2, a concentraciones del 10 % en peso (1:1 en moles).

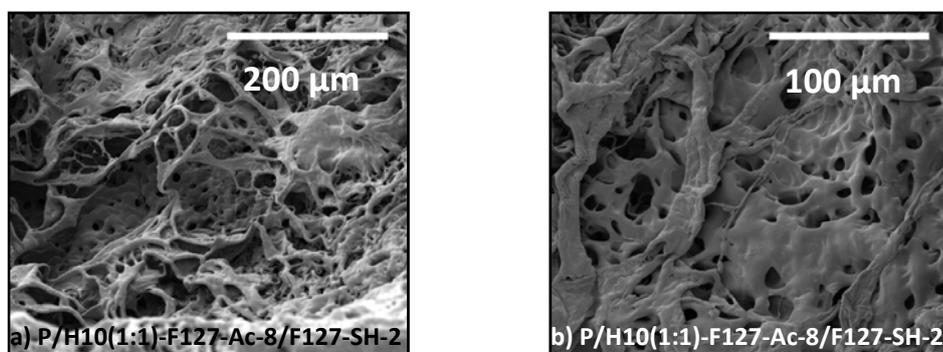


Figura 4.26. Imágenes SEM de la estructura interna de hidrogeles fotopolimerizados de mezclas de F127-Ac-8/F127-SH-2, a concentraciones del 10 % en peso (1:1 en moles).

Con el componente tiolado F127-SH-4, el hidrogel P/H10(1:1)-F127-Ac-4/F127-SH-4 (Figura 4.27) proporciona un material con elevada densidad de poros, interconectados entre sí. Por el contrario, el aumento de grupos acrilato por molécula en los hidrogeles P/H10(1:1)-F127-Ac-8/F127-SH-4 (Figura 4.28), supone la obtención de una estructura interna menos porosa, de poros mas grandes pero poco interconectados entre sí, tal y como se deduce de la presencia de poros compactos en la estructura (detalle de poros compactos en la imagen (b), Figura 4.28).

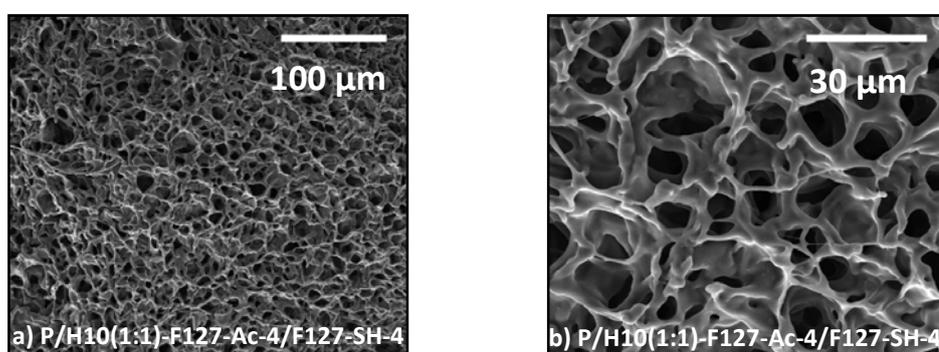


Figura 4.27. Imágenes SEM de la estructura interna de hidrogeles fotopolimerizados de mezclas de F127-Ac-4/F127-SH-4, a concentraciones del 10 % en peso (1:1 en moles).

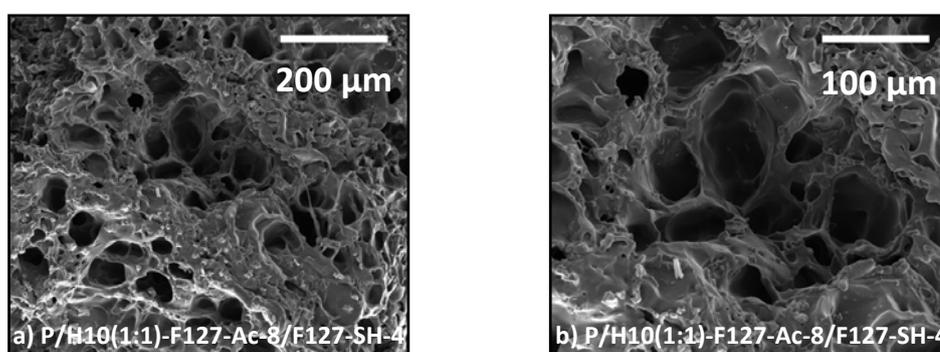


Figura 4.28. Imágenes SEM de la estructura interna de hidrogeles fotopolimerizados de mezclas de F127-Ac-8/F127-SH-4 a concentraciones del 10 % en peso (1:1 en moles).

Tabla 4.7. Tamaño de poro de los hidrogeles de mezclas de derivados tiolados y acrilados observado por SEM.

HIDROGEL	Tamaños de poro ^a (μm)
P/H10(1:1)-F127-Ac-2/F127-SH-2	5-35
P/H10(1:1)-F127-Ac-4/F127-SH-2	4-40
P/H10(1:1)-F127-Ac-8/F127-SH-2	8-30
P/H10(1:1)-F127-Ac-4/F127-SH-4	5-20
P/H10(1:1)-F127-Ac-8/F127-SH-4	25-60

^a Intervalos correspondientes a los valores mínimo y máximo de tamaño de poro observados por SEM (estudio no estadístico).

4.2.1.4.- Degradación de hidrogeles fotopolimerizados

El proceso de degradación de los seis hidrogeles fotopolimerizados preparados, se realizó siguiendo el protocolo de trabajo que se describe en el apartado 6.2.e., de la Parte Experimental. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 4.29 y 4.30, respectivamente.

Los perfiles de degradación de los materiales P/H10(1:1)-F127-Ac-n (n= 2, 4, 8)/F127-SH-2 mostraron un pequeño hinchamiento inicial (Figura 4.29), que es mayor cuanto menor es el número de grupos acrilato por molécula, probablemente debido a una menor densidad de entrecruzamiento. El tiempo de degradación aumenta con el incremento de grupos acrilato por molécula presente en las formulaciones “bicomponente”.

Los perfiles de degradación de los geles P/H10(1:1)-F127-Ac-n (n= 4, 8)/F127-SH-4 no mostraron hinchamiento inicial (Figura 4.30), produciendo una degradación de forma gradual y continua en el tiempo. El tiempo de degradación de estos hidrogeles es superior a 150 días, siendo un ensayo que en la actualidad no se ha concluido.

En la Tabla 4.8 se resumen los tiempos de degradación de los hidrogeles fotopolimerizados.

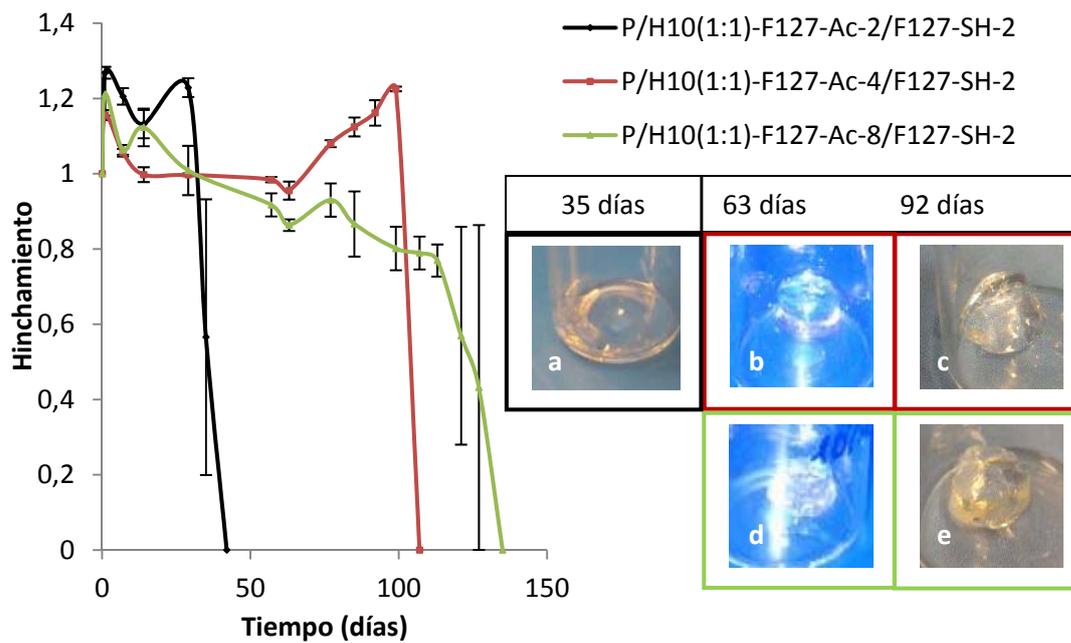


Figura 4.29. Hinchamiento de los hidrogeles P/ H10 (1:1)-F127-Ac-n (n= 2, 4, 8)/F127-SH-2 en función del tiempo.

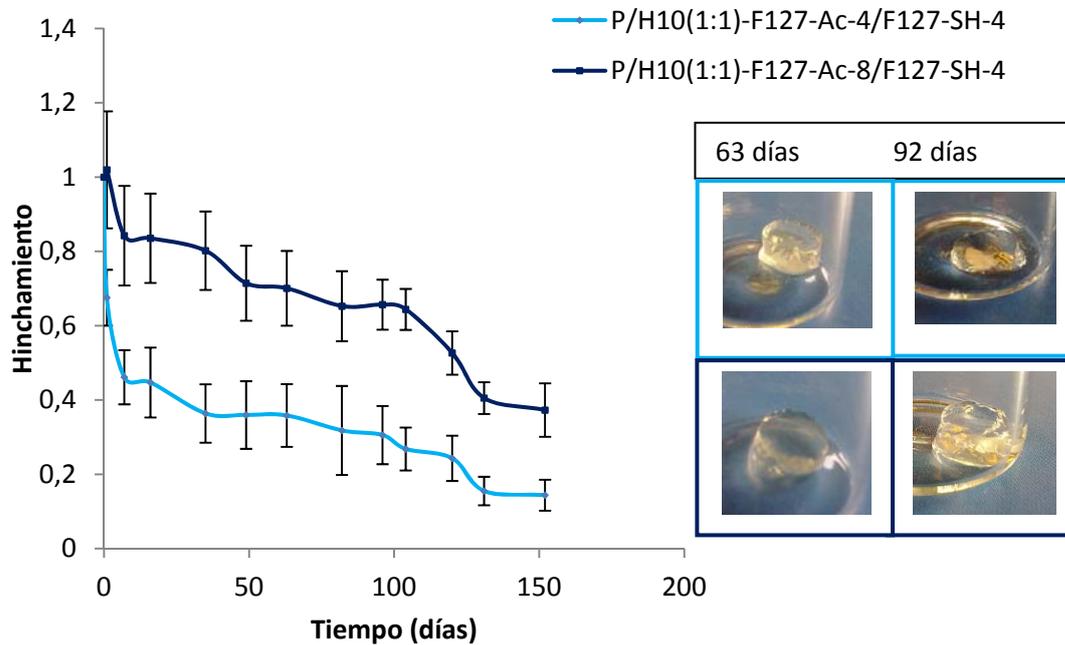


Figura 4.30. Hinchamiento de los hidrogeles P/ H10 (1:1)-F127-Ac-n (n= 4, 8)/F127-SH-4 en función del tiempo.

Tabla 4.8. Tiempo de degradación de hidrogeles fotopolimerizados de mezclas F127-Ac-n (n=2, 4, 8)/F127-SH-n (n=2, 4).

HIDROGEL	Tiempo de degradación (días)
P/H10(1:1)-F127-Ac-2/F127-SH-2	42
P/H10(1:1)-F127-Ac-4/F127-SH-2	107
P/H10(1:1)-F127-Ac-8/F127-SH-2	135
P/H10(1:1)-F127-Ac-2/F127-SH-4	3
P/H10(1:1)-F127-Ac-4/F127-SH-4	>150 ^a
P/H10(1:1)-F127-Ac-8/F127-SH-4	>150 ^a

^a Ensayos en proceso.

4.2.1.5.- Ensayos de viabilidad celular

Se han llevado a cabo estudios de viabilidad celular, tanto en ensayos 2D como 3D, sobre diferentes tipos de materiales: mezclas de componentes en disolución, hidrogeles sin polimerizar e hidrogeles polimerizados. Estos estudios *in vitro* se realizaron con células MSC humanas, utilizando el protocolo de preparación de células y preparación de las disoluciones de polímero descrito en el apartado 6.2.f., de la Parte Experimental.

Para estos ensayos se utilizó DMEM como disolvente en el caso de las mezclas en disolución y en el caso de los ensayos sin fotopolimerizar, y DMEM con 0.5% de fotoiniciador I2959 en los ensayos sujetos a fotopolimerización, utilizando en todos los casos para la preparación de las mezclas el procedimiento M2 descrito en este capítulo.

Las viabilidades celulares se han determinado sobre disoluciones e hidrogeles basados en mezclas F127-Ac-n (n=2, 4, 8) y F127-SH-n (n=2, 4), a concentraciones del 5 y 10% (w/v) para ensayos 2D, y 10% (w/v) para los ensayos 3D. Con el fin de estimar la viabilidad de las mezclas de polímeros en disolución se realizaron ensayos 2D al 5% (w/v), mientras que con las mezclas al 10% (w/v) se analizó la viabilidad celular de los materiales en el estado hidrogel sin fotopolimerizar y una vez fotopolimerizados en los ensayos 2D y 3D.

Para diferenciar los distintos estudios y materiales se ha utilizado la nomenclatura ya descrita, que antepone 2D ó 3D para indicar el tipo de ensayo. Así la nomenclatura 2D/H10(1:1)-F127-Ac-2/F127-SH-2 identifica un ensayo celular en un entorno 2D, realizado con el hidrogel formado sólo por efecto de la temperatura (sin fotopolimerizar), a partir de una disolución al 10 % (w/v) de una mezcla 1:1 molar de F127-Ac-2 y F127-SH-2, disuelta en DMEM. La nomenclatura 2D/P/H10(1:1)-F127-Ac-2/F127-SH-2 corresponde al ensayo celular realizado sobre el material anterior una vez fotopolimerizado en presencia de 0.5 % de fotoiniciador I2959. Los ensayos celulares con el material en disolución utilizan la misma nomenclatura descrita con la sustitución de la letra H por la letra D (Disolución).

En las Figuras 4.31 y 4.32 se representan los resultados de viabilidad celular realizados sobre los diferentes materiales, en ensayos en entorno 2D y en entorno 3D, respectivamente. En tonos verdes, se representan los resultados que corresponden a las mezclas de hidrogeles tipo F127-Ac-n(n=2, 4)/F127-SH-2 y en tonos rojos, los correspondientes a los de tipo F127-Ac-n(n=2, 4)/F127-SH-4. Los resultados correspondientes a los materiales basados en F127-Ac-8 no se incluyen en estas gráficas debido a la total mortalidad celular observada tras 24 horas de ensayo, tanto en disolución como en estado gel sin fotopolimerizar y una vez fotopolimerizado.

En ensayos 2D en disolución, Figura 4.31 (a), las mezclas 2D/D5(1:1)-F127-Ac-2/F127-SH-2 y 2D/D5(1:1)-F127-Ac-2/F127-SH-4 presentaron valores de viabilidad del 46 % y 76 %, respectivamente, tras 72 horas de ensayo, siendo la viabilidad de 2D/D5(1:1)-F127-Ac-4/F127-SH-2 y 2D/D5(1:1)-F127-Ac-4/F127-SH-4, que presentan mayor densidad de grupos acrilato, igual o muy próxima a cero.

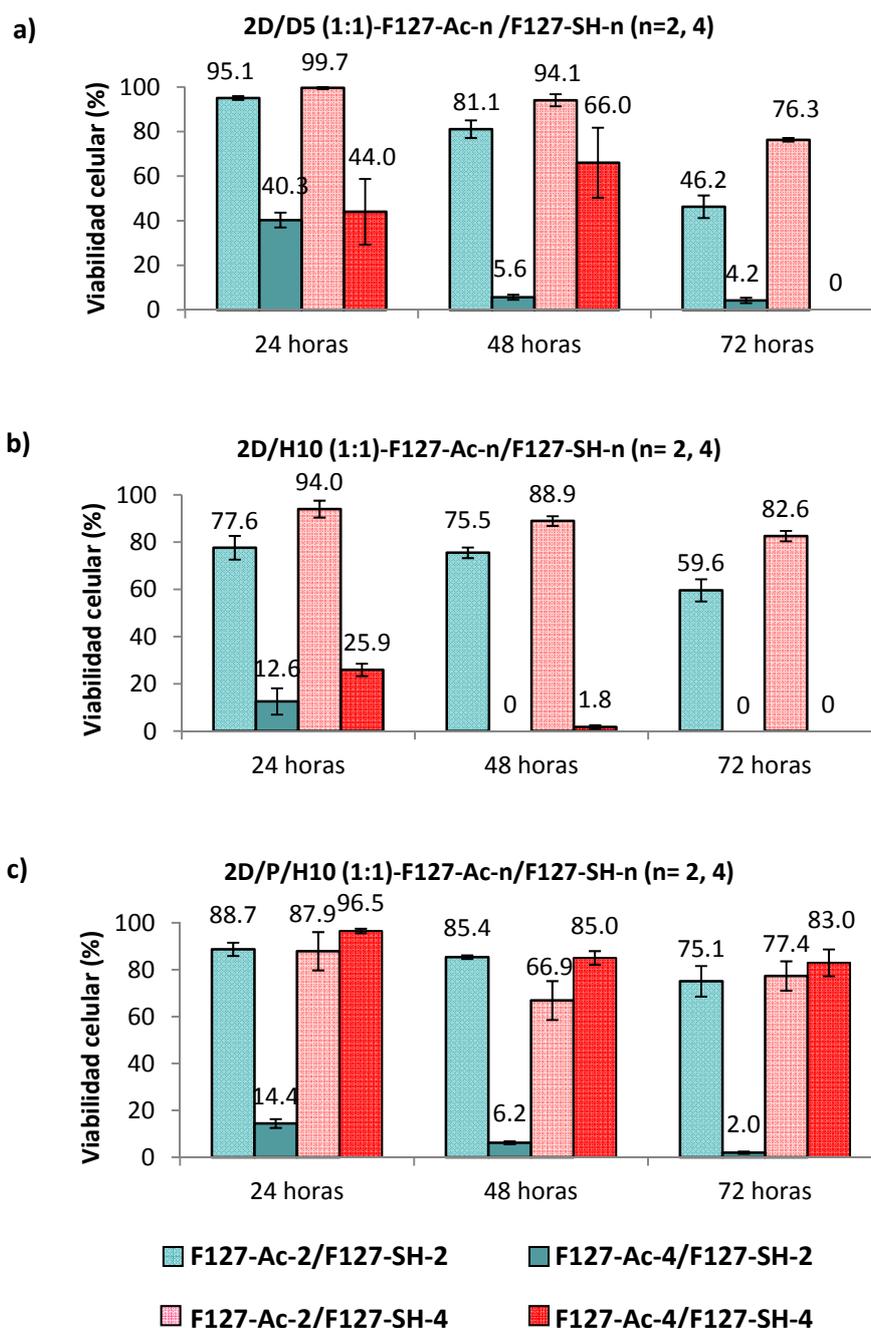


Figura 4.31. Viabilidad celular de mezclas F127-Ac-2/F127-SH-2, F127-Ac-4/F127-SH-2, F127-Ac-2/F127-SH-4 y F127-Ac-4/F127-SH-4, en entorno 2D: a) al 5 % (w/v) en disolución b) al 10 % (w/v) en estado gel sin fotopolimerizar y c) al 10% (w/v).en estado gel fotopolimerizado.

El aumento de concentración de gelificante, y por tanto el paso a estado gel por efecto de la temperatura (Figura 4.31 (b)), proporciona resultados diferentes en función de los materiales estudiados. Así, supone un ligero aumento de la

viabilidad celular para las mezclas 2D/H10(1:1)-F127-Ac-2/F127-SH-2 y 2D/H10(1:1)-F127-Ac-2/F127-SH-4 con respecto a las mezclas en disolución, mostrando viabilidades superiores al 60% tras 72 horas de ensayo. Sin embargo, en los materiales 2D/H10(1:1)-F127-Ac-4/F127-SH-2 y 2D/H10(1:1)-F127-Ac-4/F127-SH-4 se observaron viabilidades nulas tras 48 horas de ensayo.

En todos estos ensayos, el mayor número de grupos acrilato libre que confiere la presencia del derivado F127-Ac-4 puede explicar la mayor toxicidad observada en los materiales que lo incluyen en su composición.

Para los ensayos 2D sobre mezclas de hidrogeles fotopolimerizados (Figura 4.31 (c)) se obtuvieron viabilidades celulares superiores al 75%, para tres de los materiales, destacando particularmente el material 2D/P/H10(1:1)-F127-Ac-4/F127-SH-4 que hace posible la viabilidad celular únicamente en el gel fotopolimerizado. Al igual que se observa en los materiales sin fotopolimerizar, el hidrogel 2D/P/H10(1:1)-F127-Ac-4/F127-SH-2 muestra una alta toxicidad.

La gran diferencia de viabilidad celular existente entre los hidrogeles 2D/P/H10(1:1)-F127-Ac-4/F127-SH-2 y 2D/P/H10(1:1)-F127-Ac-4/F127-SH-4, cuya única diferencia radica en su composición del componente tiolado, F127-SH-2 ó F127-SH-4, podría explicarse por el exceso de grupos acrilato con respecto a los grupos tiol presentes en el material precursor que parece persistir tras el proceso de fotopolimerización

Por otra parte, la morfología interna observada por SEM para P/H10(1:1)-F127-Ac-4/F127-SH-4 (Figura 4.27) sugiere una mayor densidad de poros e interconexión entre ellos que podría ser determinante a la hora de facilitar el transporte de nutrientes y sustancias de desecho a través del hidrogel poroso hasta las células, aumentando su supervivencia con respecto a P/H10(1:1)-F127-Ac-4/F127-SH-2 que presentaba una estructura menos porosa (Figura 4.25).

Los hidrogeles sin fotopolimerizar mostraron en ensayos 3D (Figura 4.32 (a)) peores viabilidades que en ensayos 2D, siendo 3D/H10(1:1)-F127-Ac-2/F127-SH-

4 prácticamente el único material con supervivencia celular tras 72 horas superior al 50%.

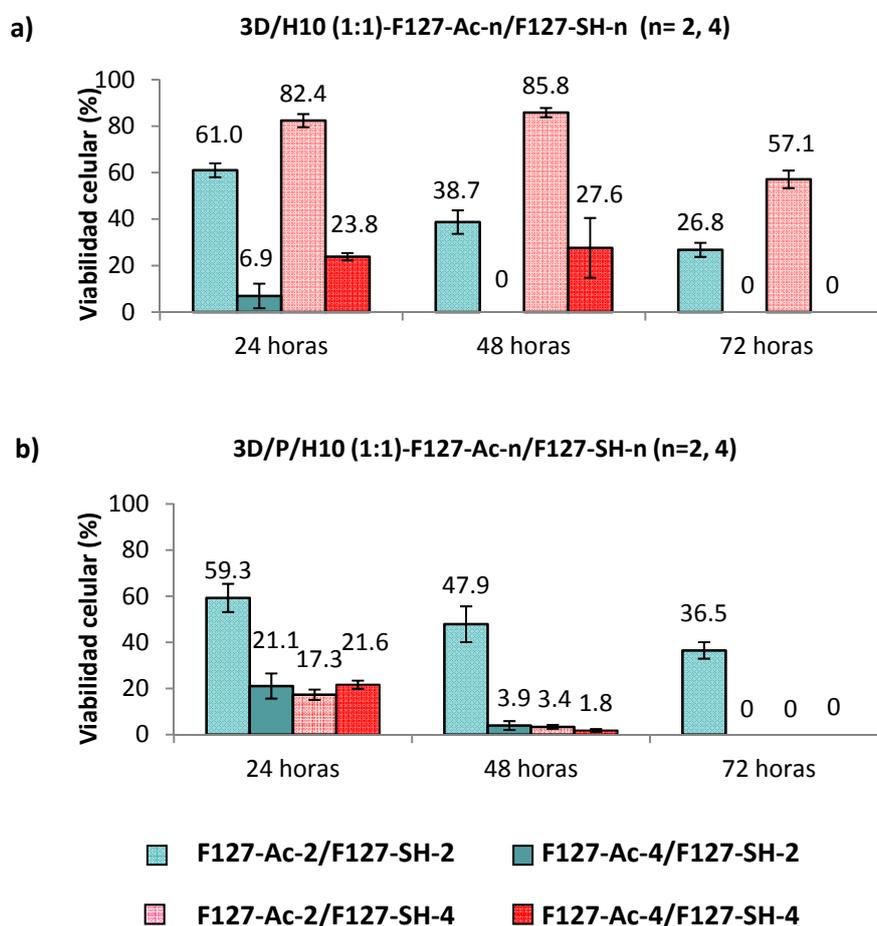


Figura 4.32. Viabilidad celular de mezclas F127-Ac-2/F127-SH-2, F127-Ac-4/F127-SH-2, F127-Ac-2/F127-SH-4 y F127-Ac-4/F127-SH-4, en entorno 3D: a) al 10% (w/v) en estado gel sin fotopolimerizar y b) al 10% (w/v) en estado gel fotopolimerizado.

En lo que respecta a los ensayos 3D con hidrogeles fotopolimerizados (Figura 4.32 (b)) se ha de concluir que la viabilidad tras 72 horas es prácticamente nula o muy baja como en el caso de 3D/P/H10(1:1)-F127-Ac-2/F127-SH-2.

La elevada mortalidad celular en disolución o en hidrogeles sin fotopolimerizar se ha atribuido a la presencia de grupos acrilato libres. Sin embargo, en hidrogeles fotopolimerizados se puede atribuir a la formación de estructuras internas más compactas para P/H10(1:1)-F127-Ac-8/F127-SH-2 y P/H10(1:1)-F127-Ac-8/F127-

SH-4, con menor interconexión entre poros, tal y como se puede deducir de las imágenes de SEM en el apartado 4.2.1.3 de este capítulo, en las Figuras 4.26 y 4.28, respectivamente.

Si se establece una comparativa con los resultados descritos en el capítulo anterior centrado en los derivados acrilados, la disminución de la concentración del gelificante y el cambio del tipo de reacción química que permiten los materiales “bicomponente” supone, para ensayos 2D de todas las mezclas estudiadas con excepción de las mezclas F127-Ac-4/F127-Ac-2, la obtención de valores de viabilidad celular similares a los máximos valores de viabilidad alcanzados en el Capítulo 3 para hidrogeles fotopolimerizados de F127-Ac-4.

Por otra parte, en el caso de los hidrogeles “bicomponente” tanto en disolución, como en estado gel no fotopolimerizado y fotopolimerizado en un entorno 2D, se ha observado que la morfología celular es la típica alargada de las células adheridas al fondo del pocillo, mientras que para el entorno 3D la morfología de las células es redondeada, lo que sugiere la baja adhesión de las células al material.

En la Figura 4.33 se muestran imágenes, en contraste de fases y fluorescencia, en las que se aprecian las células con morfología alargada, para los ensayos con diferentes hidrogeles fotopolimerizados basados en F127-Ac-n (n=2, 4)/F127-SH-n (n=2, 4), tras 72 horas de ensayo en un entorno 2D.

Las células de los ensayos 2D/P/H10(1:1)-F127-Ac-4/F127-SH-2 presentan morfología redondeada como consecuencia de la elevada mortalidad celular tras 72 horas de ensayo.

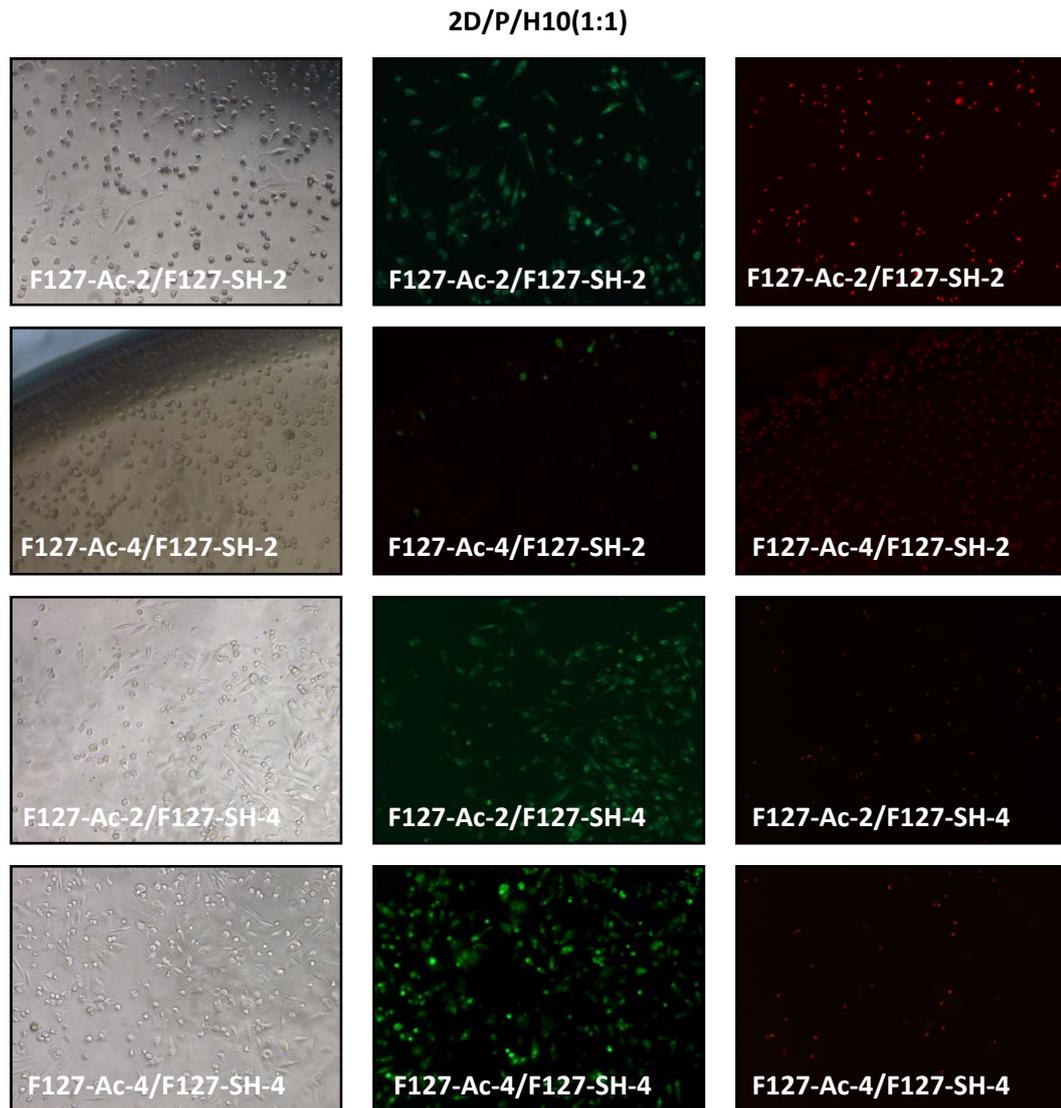


Figura 4.33. Imágenes de microscopía de fluorescencia de ensayos 2D sobre hidrogel fotopolimerizados 2D/P/H10(1:1)-F127-Ac-n/F127-SH-n ($n = 2, 4$), tras 72 horas de ensayo. Primera columna: Imágenes en contraste de fases; Segunda columna: Células vivas; Tercera columna: Células muertas.

En la Figura 4.34 se muestra la morfología redondeada de las células correspondiente al material 3D/P/H10(1:1)-F127-Ac-2/F127-SH-2, únicos ensayos en los que se observó una viabilidad celular significativa. La viabilidad celular nula obtenida para el resto de las mezclas en ensayos 3D polimerizados hace que sólo se observen células muertas, con su morfología redondeada característica.

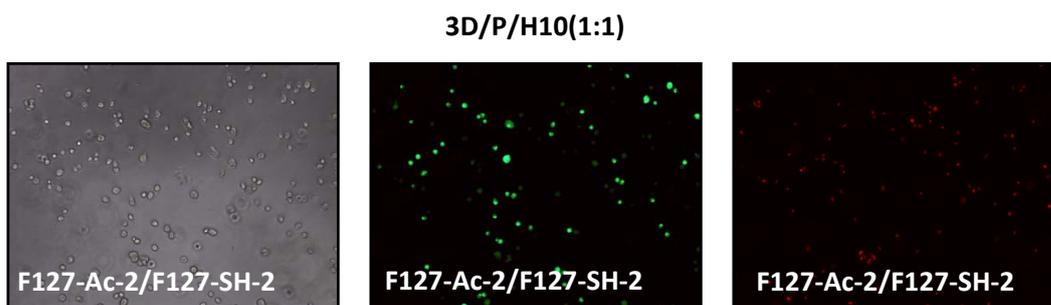


Figura 4.34. Imágenes de microscopia de fluorescencia para ensayos 3D sobre hidrogeles fotopolimerizados 3D/P/H10(1:1)F127-Ac-2/F127-SH-2, tras 72 horas de ensayo. Primera columna: Imágenes en contraste de fases; Segunda columna: Células vivas; Tercera columna: Células muertas.

4.2.2.- Materiales basados en mezclas de F127-SH-n (n=2, 4) con otros reticulantes acrilados

Con el fin de investigar la posibilidad de reticular los geles basados en polímeros tiolados con otros reticulantes tipo acrilato, se seleccionaron 4 reticulantes de características muy diferentes (Figura 4.35): a) un derivado comercial con 4 grupos acrilato reactivos, el pentaeritriol tetracrilato (PET), b) y c) dos diacrilatos lineales de PEG de diferente longitud, un compuesto comercial con 4 unidades de etilenglicol (TEG-Ac-2) y otro con 45 unidades de etilenglicol (PEG-Ac-2) sintetizado para este estudio (compuesto **[19]**), y d) un derivado lineal de Pluronic F127[®], con enlaces carbamato y dos grupos acrilato terminales también preparado para este estudio (F127-NHAc-2 **[21]**).

Ninguno de estos reticulantes por sí mismos dio lugar a la formación de hidrogeles por efecto de la temperatura, siendo por tanto el polímero con grupos tiol el único responsable *a priori* de la gelificación del material.

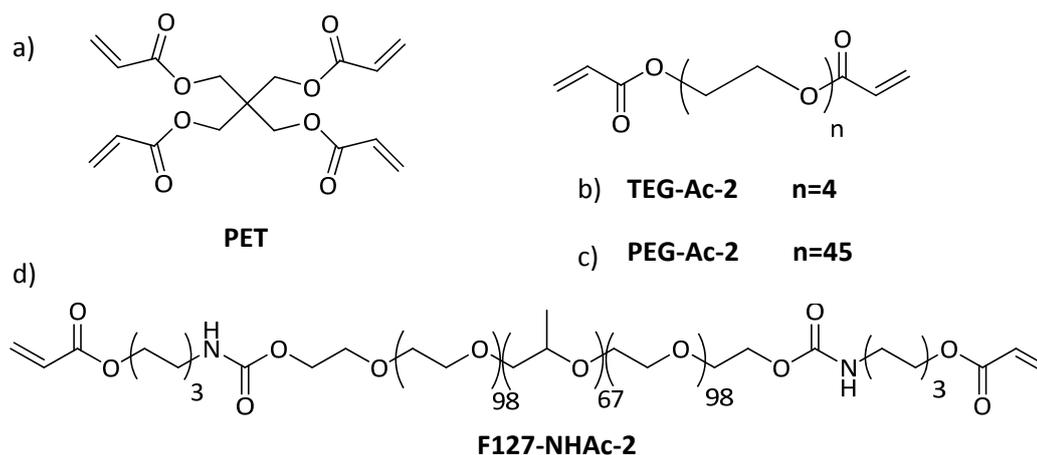


Figura 4.35. Estructura química de los reticulantes acrilados utilizados.

4.2.2.1. Preparación de los hidrogeles polimerizables e hidrogeles fotopolimerizados

Para garantizar la gelificación de la muestra se seleccionó una concentración de los polímeros F127-SH-n ($n=2, 4$) al 5 % (w/v), en proporción 1:1 en moles con los reticulantes, mezclándolos por el método M2 en PBS 10 mM pH 7.4 que contenía un 0.5 % de fotoiniciador I2959.

La fotopolimerización de los diferentes hidrogeles se realizó siguiendo el protocolo de trabajo descrito en el apartado 6.2.c., de la Parte Experimental.

Tras la fotopolimerización los hidrogeles se mantuvieron a 4 °C para comprobar la reticulación química.

El único reticulante que produjo la reticulación química de F127-SH-2 y F127-SH-4 fue F127-NHAc-2, formando hidrogeles fotopolimerizados con el aspecto que se muestra en la Figura 4.36.

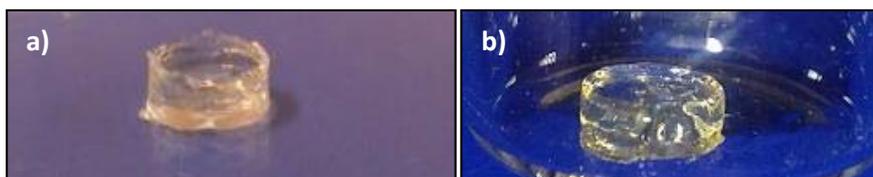


Figura 4.36. Aspecto de los hidrogeles a) P/H10 (1:1)-F127-NHAc-2/F127-SH-2 y b) P/H10 (1:1)-F127-NHAc-2/F127-SH-4.

4.2.2.2. Caracterización de la morfología interna por SEM de hidrogeles polimerizados basados en F127-NHAc-2

Las estructuras internas porosas de los hidrogeles P/H10(1:1)-F127-NHAc-2/F127-SH-2 y P/H10(1:1)-F127-NHAc-2/F127-SH-4 se muestran en la Figura 4.37.

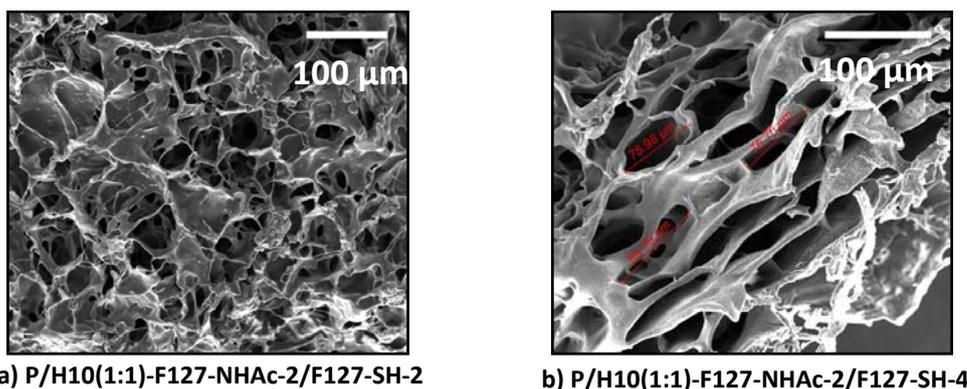


Figura 4.37. Imágenes SEM de la estructura interna de hidrogeles fotopolimerizados: a) F127-NHAc-2/F127-SH-2; b) F127-NHAc-2/F127-SH-4 a concentraciones del 10 % en peso (1:1 en moles).

Ambos materiales presentan una estructura porosa con tamaños de poro de 17-45 µm para P/H10(1:1)-F127-NHAc-2/F127-SH-2 y de 35-75 µm para P/H10(1:1)-F127-NHAc-2/F127-SH-4, aunque en estos últimos se observa un predominio de poros con estructura alargada.

4.2.2.3. Degradación de hidrogeles fotopolimerizados

Las curvas de degradación de estos hidrogeles P/H10(1:1)-F127-NHAc-2/F127-SH-2 y P/H10(1:1)-F127-NHAc-2/F127-SH-4 se muestran en la Figura 4.38.

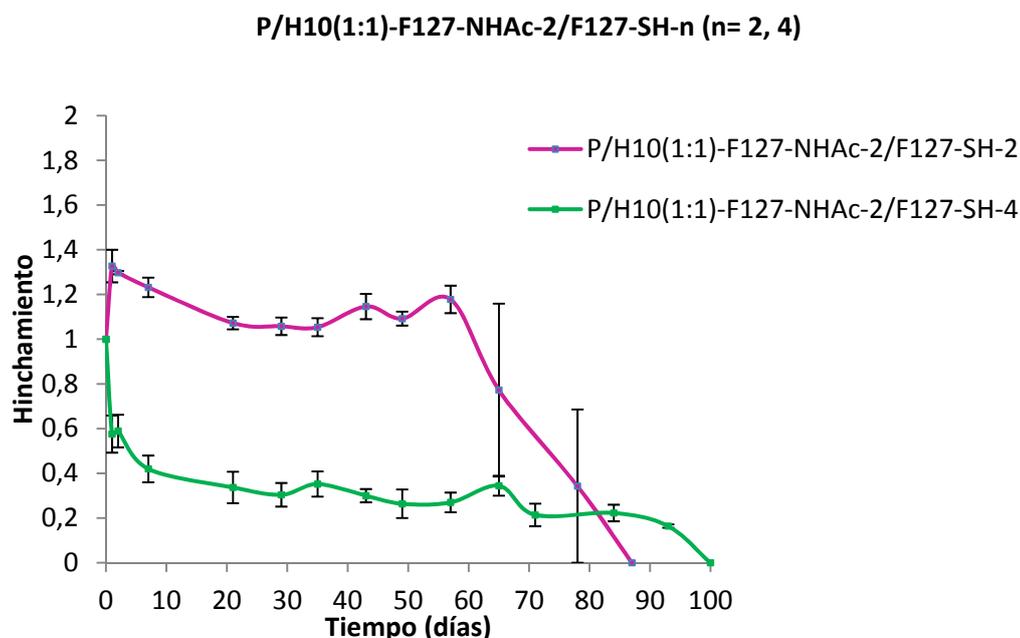


Figura 4.38. Hinchamiento de los hidrogeles P/H10(1:1)-F127-NHAc-2/F127-SH-n (n=2, 4) en función del tiempo.

El comportamiento de los dos materiales fue completamente diferente. El hidrogel P/H10(1:1)-F127-NHAc-2/F127-SH-2 mostró un pequeño hinchamiento inicial, mientras que el hidrogel P/H10(1:1)-F127-NHAc-2/F127-SH-4 no mostró hinchamiento antes de empezar a degradarse. Esta diferencia puede deberse al exceso de grupos tiol con respecto al de grupos acrilato, lo que puede dar lugar a la rápida liberación al medio de degradación de las moléculas con grupos tiol no reticuladas químicamente. Posteriormente, ambos hidrogeles pierden masa de manera gradual, completándose la degradación en 87 días para P/H10(1:1)-F127-NHAc-2/F127-SH-2 y en 100 días para P/H10(1:1)-F127-NHAc-2/F127-SH-4.

4.2.2.4. Ensayos de viabilidad celular

Los estudios de viabilidad celular en estos hidrogeles fotopolimerizados se llevaron a cabo con células MSC humanas, utilizando condiciones de preparación y de trabajo similares a las descritas para el resto de los hidrogeles “bicomponente” descritos en el apartado 4.2.1., tanto en ensayos 2D como 3D. Los resultados se muestran en la Figura 4.39.

Al igual que lo observado en los estudios anteriores, estos materiales muestran una buena viabilidad celular en un entorno 2D, con un 44% de supervivencia en P/H10(1:1)-F127-NHAc-2/F127-SH-2 y 70% de viabilidad celular para P/H10(1:1)-F127-NHAc-2/F127-SH-4, tras 72 horas de ensayo. El mayor valor de viabilidad celular observado para P/H10(1:1)-F127-NHAc-2/F127-SH-4 podría estar relacionado con el mayor tamaño de poro observado por SEM, que permite una mejor difusión de nutrientes y sustancias de desecho de las células. Sin embargo los resultados en sistemas 3D de nuevo indican la práctica mortalidad celular.

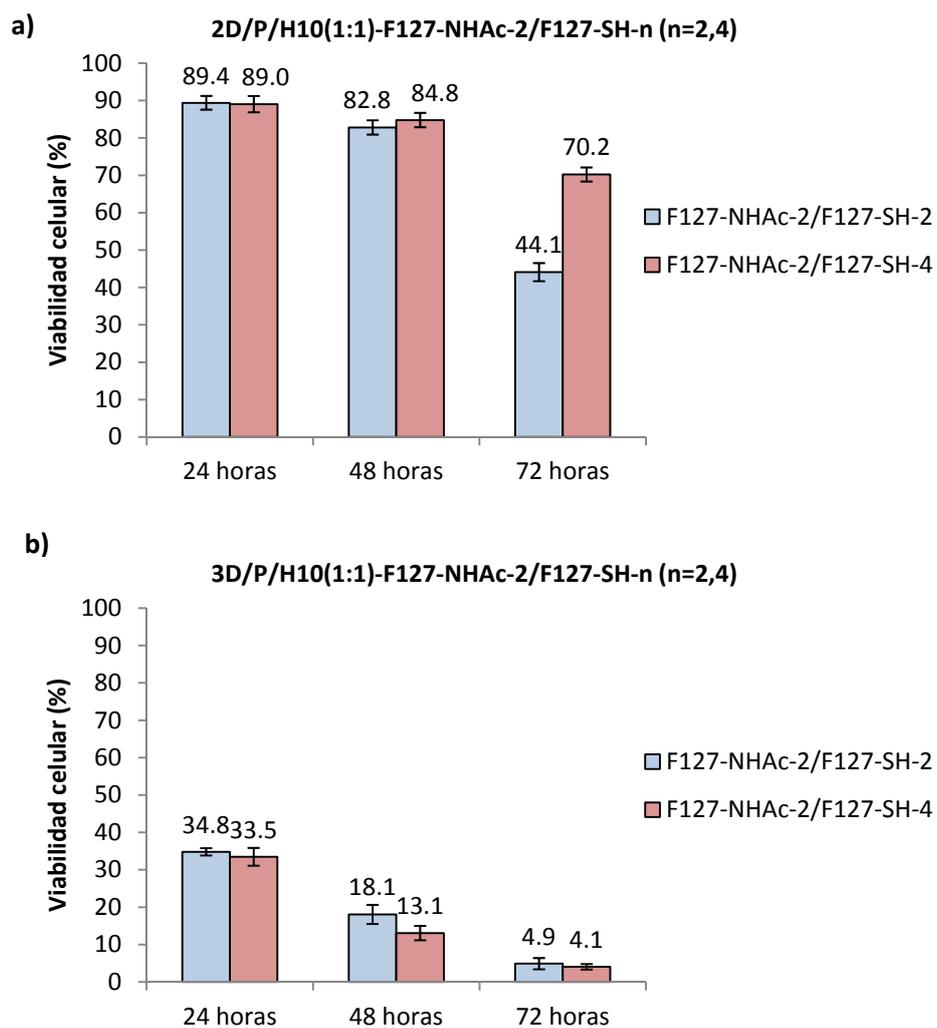


Figura 4.39. Viabilidad celular de mezclas F127-NHAc-2/F127-SH-2, F127-NHAc-2/F127-SH-4, hidrogeles al 10 % (w/v) en relación molar (1:1) fotopolimerizados: a) en entorno 2D b) en entorno 3D.

4.3. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE HIDROGELES FOTOPOLIMERIZADOS DEL CAPÍTULO 3 Y DEL CAPÍTULO 4

En la Tabla 4.9 se recogen con fines comparativos los datos obtenidos de rango de tamaño de poros observados por SEM, tiempo de degradación y porcentajes de viabilidad celular de ensayos 2D y 3D tras 72 horas, de los distintos hidrogeles fotopolimerizados descritos tanto en el Capítulo 3 como en este capítulo.

Tabla 4.9. Resumen de propiedades de los hidrogeles fotopolimerizados descritos en el Capítulo 3 y en el Capítulo 4.

MATERIAL HIDROGEL POLIMERIZADO (P/H)*		% (w/v)	Porosidad (μm) (SEM)	Tiempo degradación (días)	Viabilidad celular (%) a 72 h.	
					2D	3D
CAPÍTULO 3	F127-Ac-2	18	2-25	57	47	3
		23	2-15	57	58	2
	F127-Ac-4	18	2-25	93	85	31
		23	2-40	98	76	19
	F127-Ac-8	18	1-6	276	0	0
		23	1-4	286	0	0
CAPÍTULO 4	F127-Ac-2/F127-SH-2	10	5-35	42	75	37
	F127-Ac-4/F127-SH-2	10	4-40	107	2	0
	F127-Ac-8/F127-SH-2	10	8-30	135	0	0
	F127-Ac-2/F127-SH-4	10	-	3	77	0
	F127-Ac-4/F127-SH-4	10	5-20	>150**	83	0
	F127-Ac-8/F127-SH-4	10	25-60	>150**	0	0
	F127-NHAc-2/F127-SH-2	10	15-45	87	44	5
	F127-NHAc-2/F127-SH-4	10	35-75	100	70	4

*Mezclas “bicomponente” en relación 1 : 1 molar; ** Ensayos en proceso.

Se han preparado con éxito hidrogeles fotopolimerizados basados en mezclas “bicomponente” con una menor concentración requerida para la formación del hidrogel (10% (w/v)) frente a la concentración requerida para los materiales descritos en el Capítulo 3 (18% (w/v)).

Los materiales estudiados han presentado tamaños de poro que oscilan entre las 2 μm y las 75 μm , y tiempos de degradación que oscilan entre los 2 y los 10 meses.

Las viabilidades celulares obtenidas en entorno 2D han sido superiores a las obtenidas en entorno 3D. La mayoría de materiales en entorno 2D con los hidrogeles fotopolimerizados han presentado buenas viabilidades celulares, que oscilan entre el 44% y el 85%.

CAPÍTULO 5:

HIDROGELES NANOESTRUCTURADOS (NANOGELES)

Con el término “nanogeles” se identifica a hidrogeles estructurados en forma de nanopartículas dispersas en disolución acuosa. Desde el punto de vista de su aplicación, los nanogeles deben cumplir algunas de las especificaciones en cuanto a estabilización y tamaño que se comentan a continuación.

Ante una posible aplicación de los nanogeles como transportadores de fármacos, y con la finalidad de inyectarlos en organismos vivos donde los nanogeles alcanzan un alto grado de dilución, resulta importante asegurar la estabilidad de los nanogeles. La fijación de estructuras micelares con la luz permite evitar la conversión de las micelas en copolímeros bloque en disolución, cuando éstos se encuentran en condiciones de alta dilución, por debajo de su CMC.

Con este mismo fin, otro aspecto a tener en cuenta es el tamaño del nanogel, que debe ser optimizado para su utilización como sistemas de transporte y liberación controlada de fármacos. El diferente tamaño de los nanogeles afecta a su tiempo de permanencia en el torrente sanguíneo, así como a su internalización en la célula y a la biodisponibilidad de las nanopartículas que contienen el fármaco.¹²⁶ El tamaño ideal de los nanogeles para garantizar su internalización por endocitosis en las posibles células diana debe ser inferior a 100 nm. Nanogeles con tamaños entre los 5 y los 10 nm son eliminados por excreción renal. Las partículas entre 10 y 70 nm permiten un mayor tiempo de permanencia en el torrente sanguíneo, y su pequeño tamaño permite llegar a los capilares de pequeño tamaño que presentan algunos tejidos. Las partículas entre 70 y 200 nm presentan los tiempos de permanencia en el torrente sanguíneo más prolongados.^{126, 127} Las partículas con tamaños mayores de 200 nm son eliminadas directamente por el bazo o por fagocitosis en las células, lo que se traduce en un menor tiempo de permanencia en el torrente sanguíneo. Por

¹²⁶Stolnik, S.; Illum, L.; Davis, S. S., *Advanced Drug Delivery Reviews* **1995**, *16* (2–3), 195-214.

¹²⁷ Ishida, O.; Maruyama, K.; Sasaki, K.; Iwatsuru, M., *International Journal of Pharmaceutics* **1999**, *190* (1), 49-56.

tanto, el tamaño óptimo para la aplicación de nanogeles en el transporte y liberación controlada de fármacos se sitúa entre 10-100 nm.¹²⁸

Este tamaño permite, además, aprovechar el fenómeno de vectorización pasiva conocido como efecto “EPR” (*Enhanced Permeation Retention Effect*),¹²⁹ que se produce en tejidos tumorales debido a la hiperpermeabilidad de los vasos sanguíneos que los rodean. Este fenómeno, junto con la escasa eliminación de los nanogeles por parte del sistema linfático, permite la acumulación selectiva de los nanogeles en el tumor.

Otro de los aspectos importantes de cara a la aplicación de nanogeles como sistemas versátiles de encapsulación de fármacos es la posibilidad de eliminación del agua contenida en los nanogeles, por ejemplo, por liofilización, y la obtención de éstos como un sólido que se pueda redissolver. De esta forma se facilita el almacenaje y manipulación de los nanogeles, así como realizar la encapsulación del fármaco o producto de interés en las proporciones necesarias y en el momento de la administración. En esta línea de trabajo, un aspecto importante a tener en cuenta es la estabilidad de los nanogeles tras la liofilización, ya que los nanogeles pueden resultar inestables ante la exposición a las condiciones de baja presión y temperatura requeridas en este proceso.¹³⁰

En este nuevo capítulo se describe la preparación de nanogeles fotopolimerizados, obtenidos a partir de disoluciones acuosas a bajas concentraciones de los copolímeros bloque con grupos acrilato. Como se ha expuesto en el Capítulo 3, los copolímeros bloque estudiados mantienen la posibilidad de organización en micelas y la termosensibilidad que confiere el núcleo de Pluronic F127®. Esta organización en micelas, junto con la presencia de

¹²⁸ Vinogradov, S. V.; Bronich, T. K.; Kabanov, A. V., *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54* (1), 135-147.

¹²⁹ Khandare, J.; Calderon, M.; Dagia, N. M.; Haag, R., *Chemical Society Reviews* **2012**, *41* (7), 2824-2848.

¹³⁰ Han, J.; Zhou, C.; Wu, Y.; Liu, F.; Wu, Q., *Biomacromolecules* **2013**, *14* (5), 1529-1540.

grupos funcionales reactivos, permite el entrecruzamiento intra e intermicelar fotoinducido y la formación de nanogeles fotopolimerizados.

Por lo que se refiere al caso concreto de los hidrogeles nanoestructurados basados en Pluronic F127[®], merece la pena destacar la presencia de entornos hidrofóbos formados por los bloques de PPG, en los núcleos de las micelas, rodeados de su correspondiente corona hidrófila formada por los bloques de PEG. Esta doble naturaleza permite la utilización de los nanogeles como sistemas de encapsulación de moléculas hidrófobas e hidrófilas.

En este trabajo de tesis se han preparado nanogeles a partir tanto del copolímero bloque lineal como de los nuevos derivados dendrítico-lineal-dendrítico estudiados en el Capítulo 3, lo que ha permitido establecer un estudio comparativo entre distintos nanogeles, en base a su estructura química.

En los siguientes apartados se incluyen los aspectos más relevantes relativos tanto a la preparación y caracterización estructural de estos nanogeles, como a su comportamiento en entornos celulares.

5.1.- PREPARACIÓN DE NANOGELES

Para la preparación de los hidrogeles nanoestructurados se ha seguido el método descrito por Tae *et al.* utilizado para la preparación de nanogeles de F127-Ac-2,^{76b, 102, 103, 131}, el cual se ha adaptado con pequeñas modificaciones. Este método consiste en la preparación de una disolución del correspondiente copolímero bloque a concentración superior a su CMC, con la consiguiente formación de micelas, y la posterior fijación de las estructuras micelares por fotopolimerización en la disolución precursora. La utilización de este método supone la preparación de los nanogeles en un solo paso y de forma sencilla.

La aplicación y validación de este método para la preparación de nanogeles a partir de los derivados F127-Ac-2, F127-Ac-4 y F127-Ac-8 descritos en el Capítulo 3 se discute en los siguientes apartados.

5.1.1. - Determinación de la CMC

Con el cálculo de la CMC se establece la concentración a partir de la cual, el polímero en disolución acuosa, es capaz de agregarse formando organizaciones micelares termodinámicamente estables. Estas organizaciones micelares, a su vez, poseen los grupos acrilato terminales que confieren a las micelas la posibilidad de formar agregados de mayor tamaño, estabilizados por fotopolimerización, que constituirán los nanogeles.

Para la determinación de la CMC en copolímeros bloque de Pluronic® se han descrito varios métodos experimentales.¹³² Los métodos que utilizan una sonda fluorescente son los más frecuentes, por lo que se decidió utilizar el *método del pireno*.^{132a} Estudios previos han demostrado la disminución de la CMC con el

¹³¹ Choi, W. I.; Kim, Y. H.; Tae, G., *Macromolecular Research* **2011**, *19* (6), 639-642

¹³² (a) Ashjari, M.; Khoei, S.; Mahdavian, A. R.; Rahmatolahzadeh, R., *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **2012**, *23* (4), 943-953; (b) Kulthe, S. S.; Inamdar, N. N.; Choudhari, Y. M.; Shirolkar, S. M.; Borde, L. C.; Mourya, V. K., *Colloids and Surfaces b: Biointerfaces* **2011**, *88* (2), 691-696; (c) Sharma, P. K.; Bhatia, S. R., *International Journal of Pharmaceutics* **2004**, *278* (2), 361-377; (d) Kabanov, A. V.; Nazarova, I. R.; Astafieva, I. V.; Batrakova, E. V.; Alakhov, V. Y.; Yaroslavov, A. A.; Kabanov, V. A., *Macromolecules* **1995**, *28* (7), 2303-2314.

aumento de temperatura,⁸⁴ por lo que todas las medidas fueron realizadas a 25 °C.

El *método del pireno* se fundamenta en la diferencia del espectro de excitación del pireno según se encuentre en un entorno hidrófilo ($\lambda_{\text{exc max}} = 332 \text{ nm}$) o hidrófobo ($\lambda_{\text{exc max}} = 335 \text{ nm}$). En disoluciones diluidas de copolímero bloque lineal o dendrítico-lineal-dendrítico (por debajo de la CMC), el pireno se encuentra en un entorno hidrófilo, mientras que en disoluciones por encima de la CMC, el pireno se localizará preferentemente en la parte hidrófoba de las micelas, dada la naturaleza hidrófoba de éste, lo que produce el desplazamiento de su máximo de excitación de 332 nm a 335 nm. El gráfico para la determinación de la CMC se obtiene con la representación de la relación de las intensidades I_{335}/I_{332} , frente al logaritmo de la concentración (Log C). Cuando la concentración del polímero anfífilo supera la CMC, la relación I_{335}/I_{332} aumenta considerablemente y alcanza un máximo que indica que se ha encapsulado la mayor concentración posible de pireno. La CMC del polímero se determina calculando la intersección de las dos zonas rectas en dicha gráfica.

Para la obtención de las gráficas se prepararon disoluciones de nuestros materiales a concentraciones 0.0001, 0.001, 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1 % (w/v) de cada uno de los compuestos acrilados, F127-Ac-2, F127-Ac-4 y F127-Ac-8, a las que se adicionó pireno, en una concentración de $6 \times 10^{-8} \text{ M}$. A continuación se midió la intensidad de los máximos de excitación a 332 y 335 nm.

La preparación de las muestras así como las condiciones de medida se describen con detalle en el apartado 6.2.h., de la Parte Experimental.

En la Figura 5.1 se muestran las gráficas obtenidas tras la representación de I_{335}/I_{332} frente a log C, así como la representación de las rectas cuya intersección permite calcular el valor de CMC.

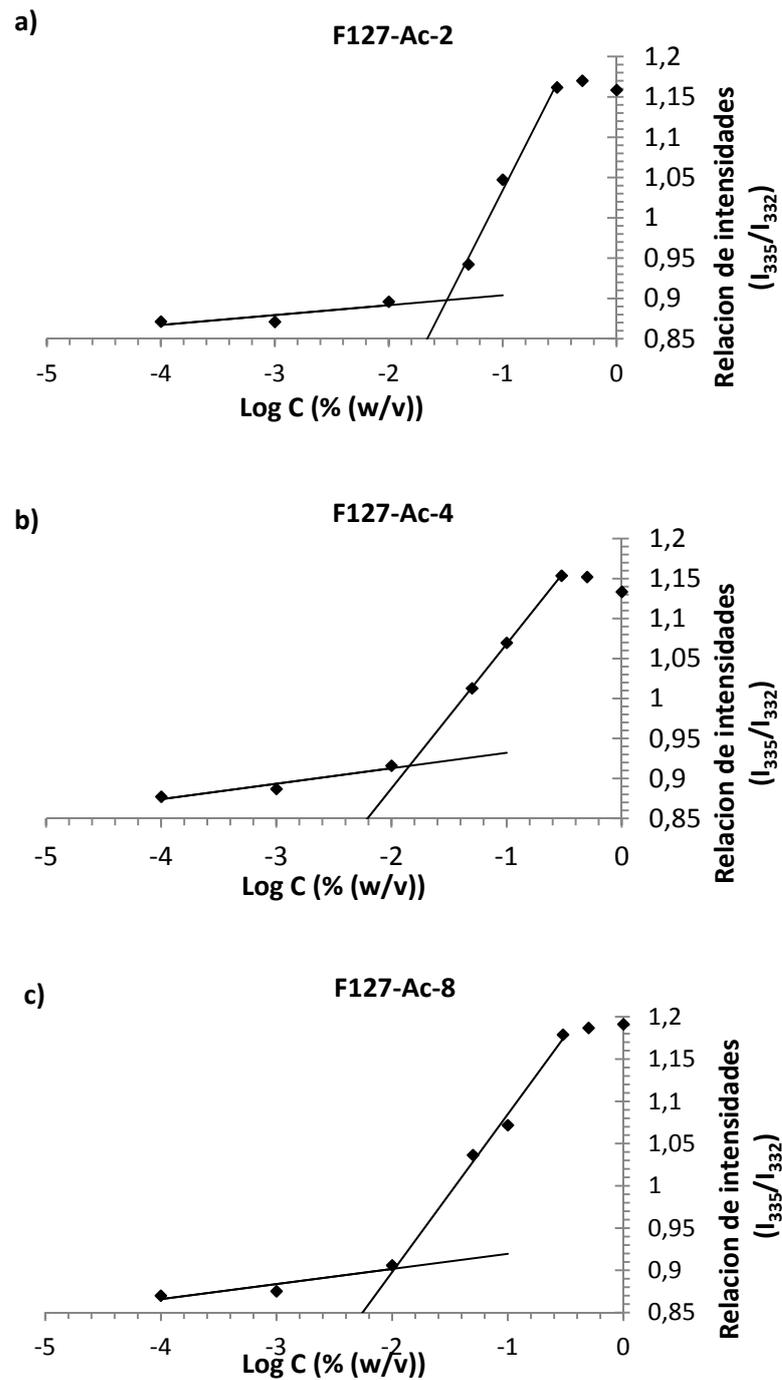


Figura 5.1. Representación gráfica de la relación de intensidades I_{335}/I_{332} frente al logaritmo de la concentración (log C), a) F127-Ac-2, b) F127-Ac-4 y c) F127-Ac-8.

En la Tabla 5.1 se recogen los valores de CMC obtenidos por el *método del pireno* para los tres copolímeros estudiados.

Tabla 5.1. CMCs obtenidas por el *método del pireno* para los compuestos acrilados, F127-Ac-2, F127-Ac-4 y F127-Ac-8.

DERIVADO	CMC (% (w/v)) a 25°C
F127-Ac-2	0.032
F127-Ac-4	0.014
F127-Ac-8	0.011

La CMC de los derivados acrilados sintetizados es considerablemente inferior a la descrita para Pluronic F127® (0.25 % (w/v)).¹³³ La introducción de grupos acrilato en Pluronic F127® supone una importante disminución de la CMC. Además, la funcionalización de la estructura de Pluronic F127® con dendrones es efectiva para la reducción de la CMC, tal y como se observa al pasar del copolímero bloque lineal, F127-Ac-2, a los copolímeros bloque dendrítico-lineal, F127-Ac-4 y F127-Ac-8.

5.1.2.- Fotopolimerización de los nanogeles

Para la obtención de los nanogeles fotopolimerizados se prepararon disoluciones precursoras de F127-Ac-2, F127-Ac-4 y F127-Ac-8 en concentración del 0.77 % (w/v), utilizando para su disolución agua destilada con un 0.1% de fotoiniciador I2959. Esta concentración se eligió de acuerdo a los estudios previos realizados por Tae *et al*,¹⁰³ en los que se obtuvieron nanogeles de F127-Ac-2 con diámetros de alrededor de 60 nm. A su vez, esta concentración es superior a la CMC de los tres compuestos estudiados, lo que garantiza la autoorganización en micelas necesaria para la posterior formación de los nanoagregados.

Los agregados formados fueron estabilizados por fotopolimerización mediante irradiación de estas disoluciones con luz UV. Posteriormente, las disoluciones se dializaron. La diálisis se realizó a 4 °C con el propósito de revertir las posibles

¹³³ (a) Perry, C. C.; Sabir, T. S.; Livingston, W. J.; Milligan, J. R.; Chen, Q.; Maskiewicz, V.; Boskovic, D. S., *Journal of Colloid and Interface Science* **2011**, 354 (2), 662-669; (b) Gao, Q.; Liang, Q.; Yu, F.; Xu, J.; Zhao, Q.; Sun, B., *Colloids and Surfaces b: Biointerfaces* **2011**, 88 (2), 741-748.

micelas no fotopolimerizadas presentes en el sistema y eliminarlas en forma de monómero libre en disolución. Además, tras este proceso, se eliminan agregados de tamaño menor a 30 nm, debido a las características de la membrana de diálisis. Finalmente, las disoluciones sometidas a diálisis se filtraron con filtros de 0.2 μm para la eliminación de agregados de tamaño superior a los 200 nm. La preparación detallada de los nanogeles se describe en el apartado 6.2.i., de la Parte Experimental.

En la Figura 5.2 se muestra de forma esquemática el proceso de formación de los nanogeles. Las micelas en disolución (Figura 5.2 (a)), una vez fotopolimerizadas (Figura 5.2 (b)), proporcionan nanogeles con dominios hidrófobos formados por los bloques de PPG y dominios hidrófilos formados por los bloques de PEG en contacto con el agua.

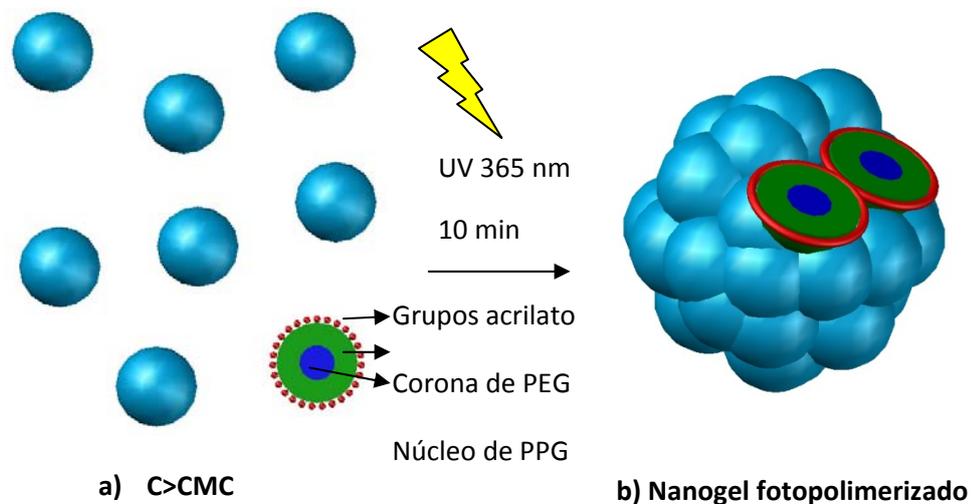


Figura 5.2. Representación esquemática del proceso de formación mediante fotopolimerización de los nanogeles, a) micelas formadas a concentración superior a la CMC (Concentración Micelar Crítica); b) Nanogel fotopolimerizado.

Con el fin de identificar los diferentes nanogeles se ha utilizado la nomenclatura que se explica con el siguiente ejemplo. PDF/N-F127-Ac-2 identifica un nanogel en el que las letras "PDF/N" indican que se trata de un nanogel (N) obtenido mediante fotopolimerización (P), dializado (D) y filtrado con filtro de 0.2 μm (F), preparado a partir del copolímero F127-Ac-2.

Teniendo en cuenta que la temperatura a la que se lleva a cabo la fotopolimerización tiene influencia en el tamaño de los agregados,⁸⁴ se realizaron experimentos de reticulación a dos temperaturas distintas, 25 °C y 37 °C.

Mientras que los nanogeles formados a 25 °C permitieron un tratamiento posterior de dialización y filtración, este no fue posible con los nanogeles obtenidos a 37 °C. Tras someter al proceso de fotopolimerización a las micelas de nuestros materiales a 37 °C, las disoluciones correspondientes a los nanogeles formados P/N-F127-Ac-2, P/N-F127-Ac-4 y P/N-F127-Ac-8, se mostraron turbias, y una vez dializadas, no fue posible su filtración a través de filtros de 0.2 µm debido a la saturación del filtro. La turbidez y la imposibilidad de la filtración de las muestras sugerían la presencia de agregados de gran tamaño. Para confirmar este hecho, se estudiaron por TEM los nanogeles PD/N-F127-Ac-2 fotopolimerizados a 37 °C y dializados (sin filtrar), y los nanogeles PDF/N-F127-Ac-2 fotopolimerizados a 25 °C, dializados y filtrados.

Tras la fotopolimerización a 37 °C, los nanogeles presentaron morfología esférica con tamaños del orden de las micras, como se puede observar en la Figura 5.3 (a). Sin embargo los agregados obtenidos tras la fotopolimerización a 25 °C presentaron tamaños nanométricos manteniendo la forma esférica (Figura 5.3 (b)). El mayor tamaño obtenido al realizar la fotopolimerización a 37 °C se puede explicar por la mayor movilidad que adquieren las micelas a esta temperatura, lo que favorece el contacto micelar y con ello la formación de agregados de mayor tamaño. Por otra parte, también se ha descrito que en los copolímeros bloque que poseen LCST, el aumento de temperatura favorece el aumento del número de moléculas que forman las micelas, formando micelas de mayor tamaño.⁸⁴

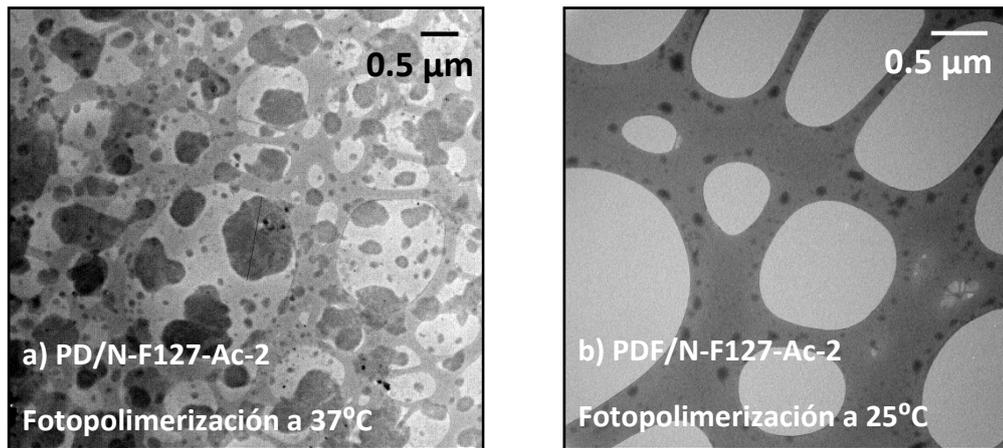


Figura 5.3. Imágenes TEM de nanogeles de F127-Ac-2, a) nanogeles obtenidos mediante polimerización a 37 °C y dializados, b) nanogeles obtenidos mediante polimerización a 25 °C, dializados y filtrados.

Basándonos en estos resultados, y con el fin de asegurar la obtención de nanogeles de tamaño nanométrico, se seleccionó temperatura de 25 °C como temperatura para llevar a cabo los experimentos de fotopolimerización.

No obstante, para la validación del método de obtención por fotopolimerización establecido para los nanogeles y aplicado a los materiales F127-Ac-4 y F127-Ac-8, tras la fotopolimerización de las muestras a 25 °C, y como paso previo al tratamiento de diálisis y filtración, se comprobó la correcta formación de nanogeles mediante TEM y SEM.

En la Figura 5.4 y 5.5 se muestran las imágenes de TEM y SEM respectivamente de todos los materiales estudiados, antes de ser sometidos a procesos de diálisis y filtración. En todas las muestras, tanto por TEM como por SEM, se observó la presencia de nanogeles de forma esférica y tamaño nanométrico tras la fotopolimerización a 25 °C, lo que confirma también la viabilidad del método descrito por Tae *et al.* y adaptado para la preparación de nanogeles a partir de los derivados F127-Ac-4 y F127-Ac-8.

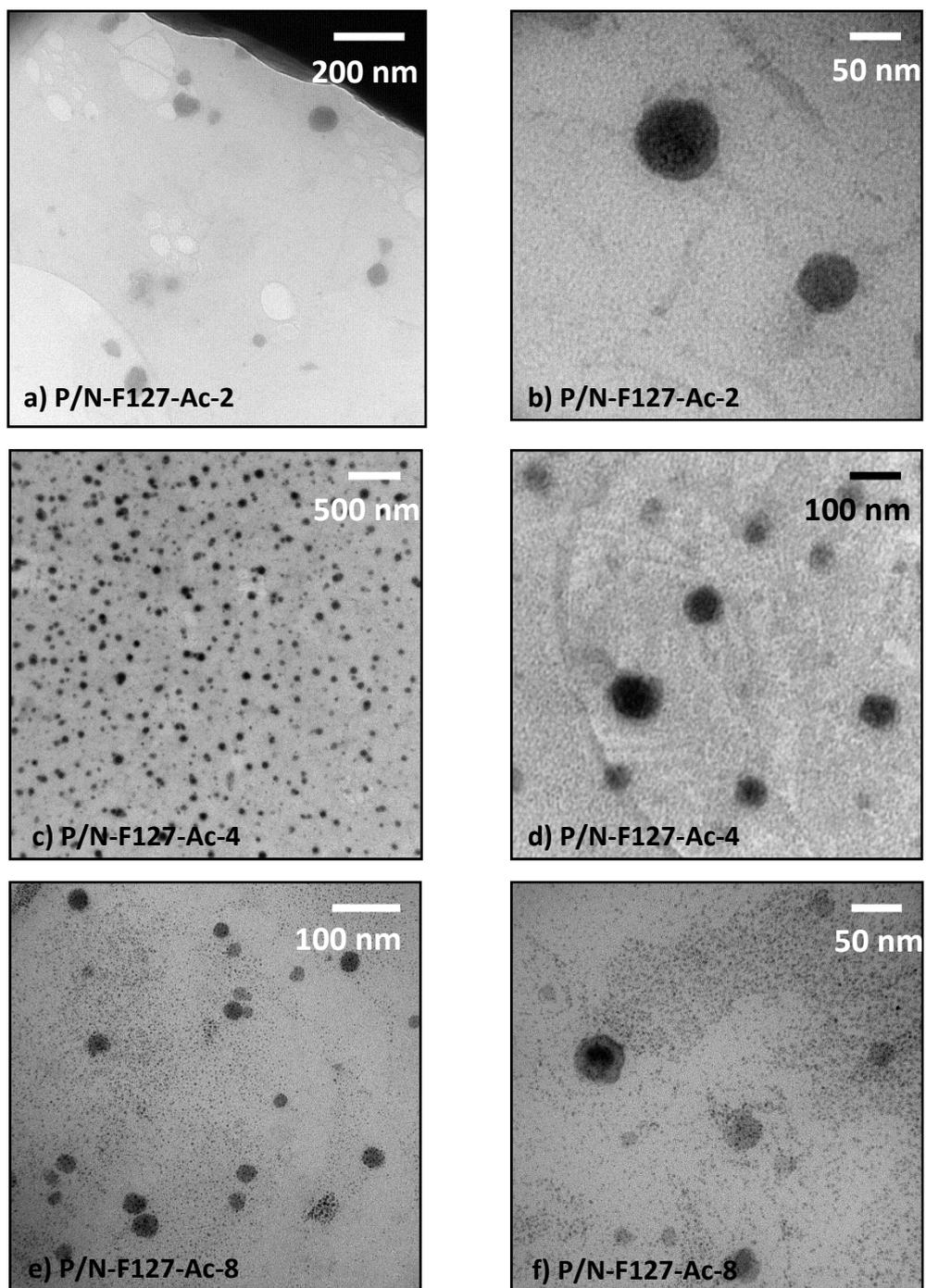


Figura 5.4. Imágenes TEM de nanogeles preparados por polimerización a 25°C, a) y b) P/N-F127-Ac-2, c) y d) P/N-F127-Ac-4, d) y f) P/N-F127-Ac-8.

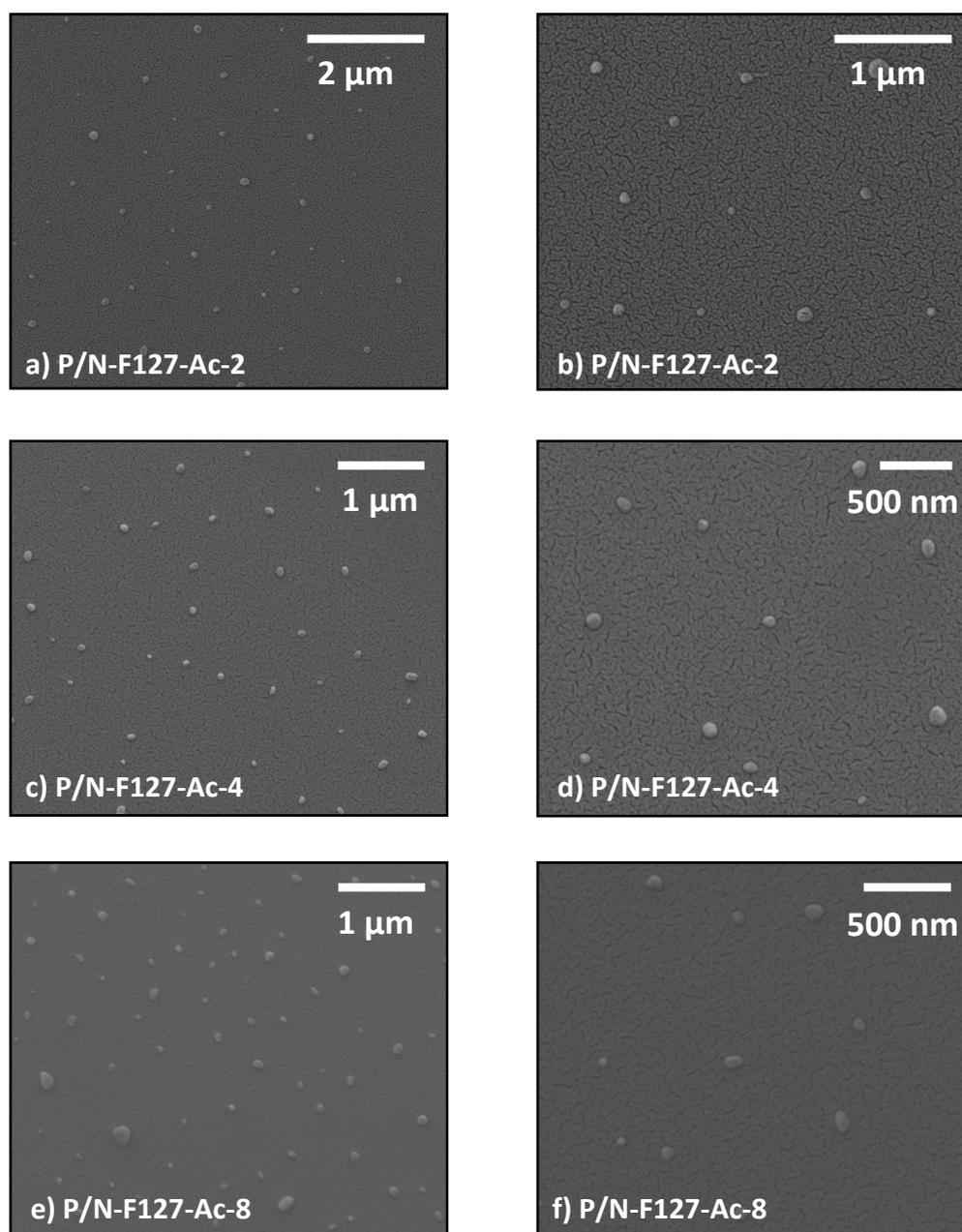


Figura 5.5. Imágenes SEM de nanogeles preparados por polimerización a 25 °C, a) y b) P/N-F127-Ac-2, c) y d) P/N-F127-Ac-4, d) y f) P/N-F127-Ac-8.

5.1.3.- Liofilización de los nanogeles fotopolimerizados

Una vez demostrada la formación de nanogeles tras la fotopolimerización, y tras su purificación por diálisis y filtración, se procedió a la eliminación del agua mediante liofilización. De esta forma se pudo estimar el rendimiento del proceso de preparación de los nanogeles llevado a cabo.

Para ello se tomaron 3 alícuotas de 5 mL cada una, de las disoluciones correspondientes a PDF/N-F127-Ac-2, PDF/N-F127-Ac-4 y PDF/N-F127-Ac-8. La eliminación del agua por liofilización y posterior pesada del residuo sólido permitió estimar la concentración media de nanogel en las disoluciones (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Miligramos de nanogel obtenidos tras el tratamiento de diálisis y filtración de los nanogel fotopolimerizados.

NANOGELE	mg de nanogel^a ±S.D.	Concentración (mg/mL)
PDF/N-F127-Ac-2	2.5±0.5	0.50
PDF/N-F127-Ac-4	3.3±0.6	0.54
PDF/N-F127-Ac-8	11.5±0.1	1.90

^a Obtenidos tras la liofilización de alícuotas de 5 mL.
S.D. Desviación Estandar

Como se ha comentado en la introducción de este capítulo, de cara a sus aplicaciones y manipulación, es importante comprobar la posibilidad de redisolución de los nanogel tras su liofilización. Sólo en el caso de PDF/N-F127-Ac-2 se consiguió la redisolución de los nanogel en agua, mientras que no se consiguió la redisolución en agua o en disolventes orgánicos de los nanogel PDF-N-F127-Ac-4 y PDF-N-F127-Ac-8.

Estos resultados tienen implicaciones en estudios posteriores, como por ejemplo los estudios de encapsulación de moléculas en el interior de los nanogel y la determinación de la viabilidad celular, ya que es fundamental conocer la concentración de las disoluciones con las que se trabaja. Para el caso de los dos materiales que no permiten su redisolución, PDF-N-F127-Ac-4 y PDF-N-F127-Ac-8, las concentraciones de trabajo utilizadas son las que se recogen en la Tabla 5.2.

5.2.- ENCAPSULACIÓN EN NANOGELES PDF/N-F127-Ac-n (n=2, 4 y 8)

La naturaleza anfífila de los nanogeles preparados permite la encapsulación en su interior de moléculas tanto hidrófilas como hidrófobas.

Para demostrar la posibilidad de encapsulación ambos tipos de moléculas se han realizado estudios eligiendo como molécula hidrófila la rodamina B y como molécula hidrófoba el pireno, cuyas estructuras se muestran en la Figura 5.6.

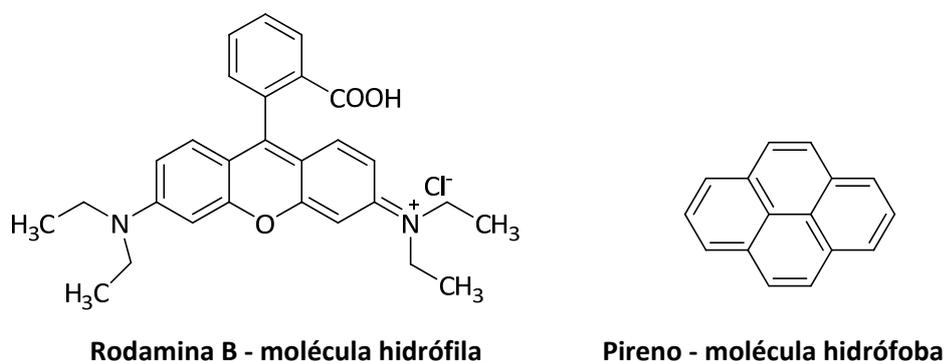


Figura 5.6. Estructura química de Rodamina B y Pireno utilizados para la encapsulación en los nanogeles.

La encapsulación de ambas moléculas se realizó utilizando el *método de evaporación de disolvente*.^{79b} Este método consiste en la disolución de las moléculas hidrófilas o hidrófobas en un disolvente orgánico de bajo punto de ebullición y miscible con el agua, y la adición de esta disolución sobre la disolución acuosa de los nanogeles fotopolimerizados. Tras la evaporación del disolvente orgánico, las moléculas hidrófilas quedan retenidas en los dominios hidrófilos del nanogel y las moléculas hidrófobas se localizan en los núcleos hidrófobos del mismo. La posterior eliminación de las moléculas no encapsuladas, por distintas técnicas en función de la naturaleza de la molécula a encapsular, proporciona disoluciones acuosas de nanogeles cargados. El método de preparación de los nanogeles cargados con rodamina B y pireno se detalla en el apartado 6.2.k., de la Parte Experimental.

En la Tabla 5.3 se muestran los resultados obtenidos para la encapsulación de rodamina B y pireno, en los nanogel preparados con los tres derivados acrilados, y que identificaremos con la nomenclatura PDF-N-F127-Ac-n-ROD y PDF-N-F127-Ac-n-PIR, respectivamente. Los valores de encapsulación están expresados mediante tres parámetros distintos: como μg de molécula encapsulada por miligramo de nanogel, Eficiencia de Encapsulación, EE (%), y porcentaje en peso de molécula encapsulada con respecto a la cantidad de fluoróforo (rodamina B o pireno) inicial añadida, siempre en exceso.

Tabla 5.3. Resultados de encapsulación de rodamina B y pireno en los nanogel.

NANOGE	μg encaps./mg nanogel	EE (%)	% encaps. ^a
PDF/N-F127-Ac-2-ROD	56.9	40.6	37.2
PDF/N-F127-Ac-4-ROD	68.9	48.8	45.3
PDF/N-F127-Ac-8-ROD	71.1	50.6	47.1
PDF/N-F127-Ac-2-PIR	67.8	46.3	42.6
PDF/N-F127-Ac-4-PIR	54.7	37.8	34.4
PDF/N-F127-Ac-8-PIR	59.4	40.9	37.4

^a % en peso de molécula encapsulada con respecto al peso de fluoróforo (rodamina B o pireno) añadido (0.15 mg de fluoróforo/mg de nanogel).

La cantidad de rodamina B y pireno encapsulado expresada como la Eficiencia de Encapsulación (EE%), se calcula a partir de las siguientes ecuaciones:^{79b}

$$\text{Carga teórica (\%)} = \frac{\text{Peso de fluoróforo inicial añadido}}{\text{Peso de fluoróforo inicial} + \text{Peso de nanogel}} \times 100$$

$$\text{Carga real (\%)} = \frac{\text{Peso de fluoróforo encapsulado}}{\text{Peso fluoróforo encapsulado} + \text{Peso de nanogel}} \times 100$$

$$\text{Eficiencia de encapsulación (EE) (\%)} = \frac{\text{Carga real}}{\text{Carga teórica}} \times 100$$

En general, los tres nanogeles preparados presentan EE alrededor de 40-50 % tanto para la molécula hidrófila, rodamina B, como la hidrófoba, pireno. En el caso de la rodamina B se observa un aumento de la EE con el aumento del número de grupos reactivos del copolímero utilizado en la preparación de los nanogeles. Así, los nanogeles PDF/N-F127-Ac-8-ROD presentan un aumento de EE de un 10% con respecto a los nanogeles del derivado lineal, PDF/N-F127-Ac-2-ROD. Sin embargo, para el pireno no se observa una tendencia clara en la variación de la EE, siendo los nanogeles PDF/N-F127-Ac-2-PIR los que ofrecen una EE más alta.

Junto a estos valores experimentales, también se ha podido comprobar la encapsulación de ambas moléculas en estos nanogeles utilizando otros métodos. Así, mientras que la carga de rodamina B se ha podido visualizar mediante difracción de electrones-TEM (ver apartado 5.3), la correcta encapsulación de pireno se demostró mediante estudios de excitación con luz.

Como se ha comentado anteriormente, el pireno experimenta un desplazamiento de su máximo de excitación cuando pasa de un entorno hidrófilo, 332 nm, a uno hidrófobo, 335 nm. El pireno en el interior de los nanogeles se situará previsiblemente en los dominios hidrófobos, observándose por tanto el máximo de excitación de los nanogeles cargados a 335 nm. En efecto, en la Figura 5.7 se muestran los espectros de excitación para PDF/N-F127-Ac-2, PDF/N-F127-Ac-4 y PDF/N-F127-Ac-8 donde se observa el máximo en el espectro de excitación a 335 nm, debido al pireno en un entorno hidrófobo, demostrando la correcta encapsulación de éste en el interior de los nanogeles.

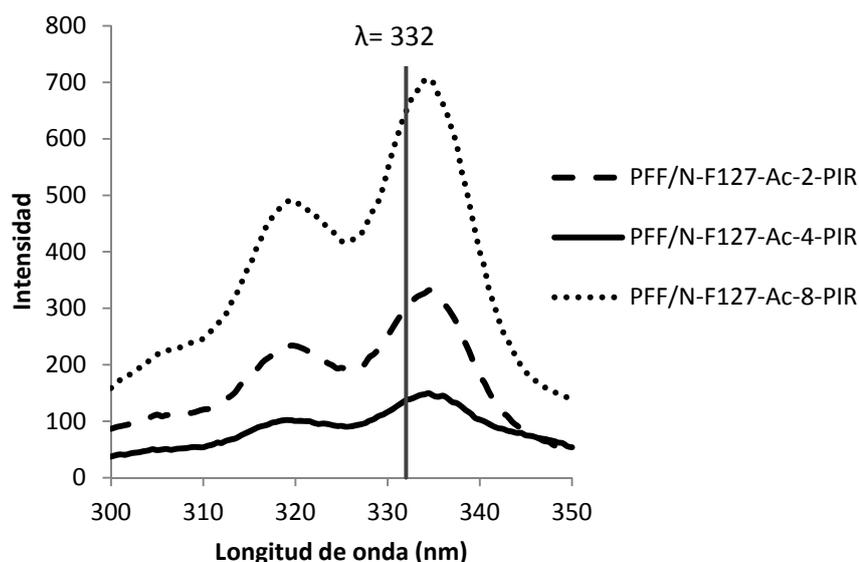


Figura 5.7. Espectros de excitación de los nanogeles cargados con pireno. Desplazamiento del máximo de excitación a 335 nm debido al pireno situado en un entorno hidrófobo.

5.3.- CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE NANOGELES PDF/N-F127-Ac-n (n=2, 4 y 8)

La morfología y tamaño de los distintos nanogeles preparados fue estudiada por TEM, SEM y DLS.

Morfología

En la Figura 5.8 y Figura 5.9 se muestran las imágenes de TEM y SEM respectivamente para los nanogeles PDF/N-F127-Ac-n (n=2, 4 y 8). En el apartado 5.1.2. se recogen las imágenes de TEM correspondientes a los nanogeles tras su fotopolimerización. Tras la diálisis y filtración todos los nanogeles preparados a partir de los 3 derivados acilados mantuvieron su forma esférica sin producirse agregación entre ellos.

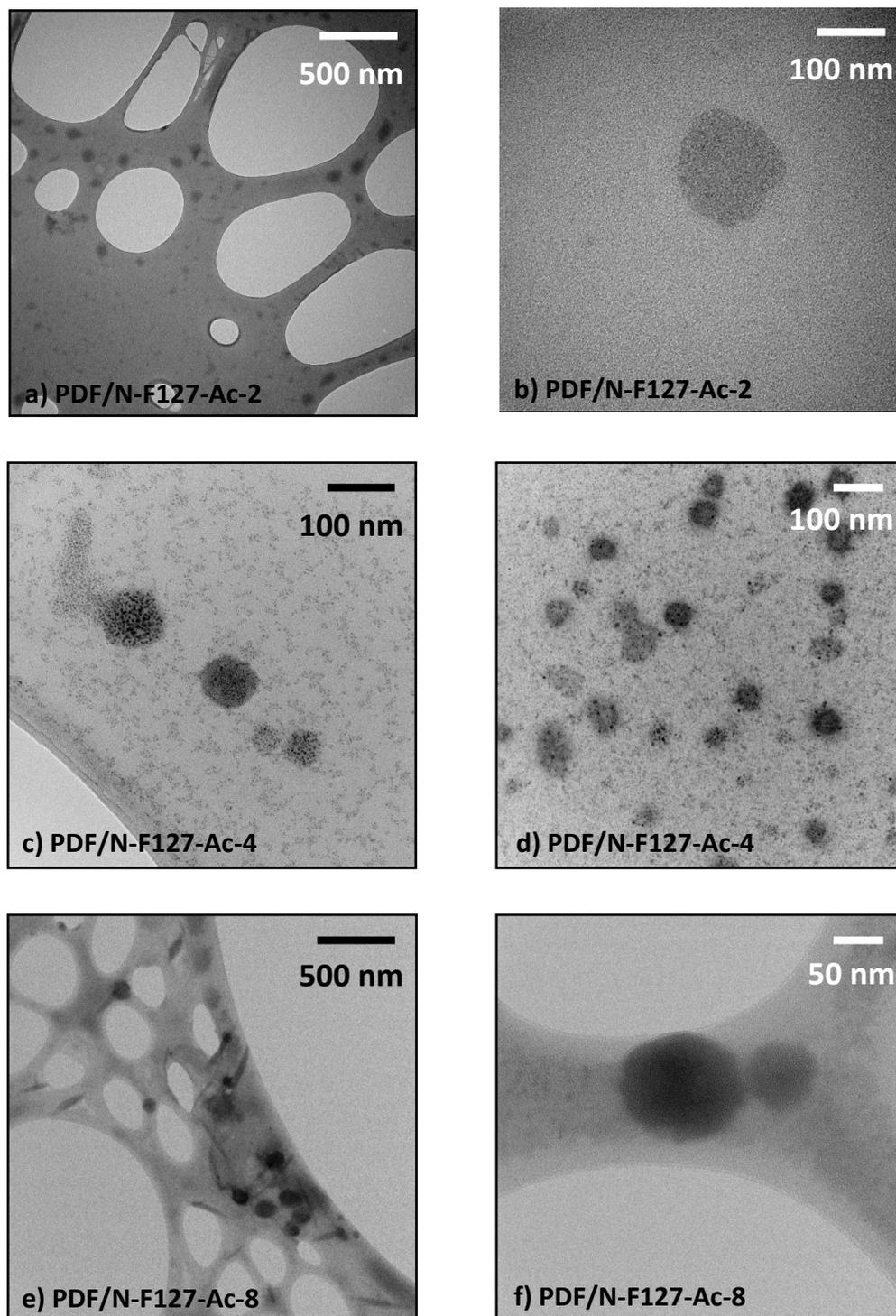


Figura 5.8. Imágenes TEM de nanogeles fotopolimerizados a 25 °C, dializados y filtrados a) y b) PDF/N-F127-Ac-2, c) y d) PDF/N-F127-Ac-4, d) y f) PDF/N-F127-Ac-8.

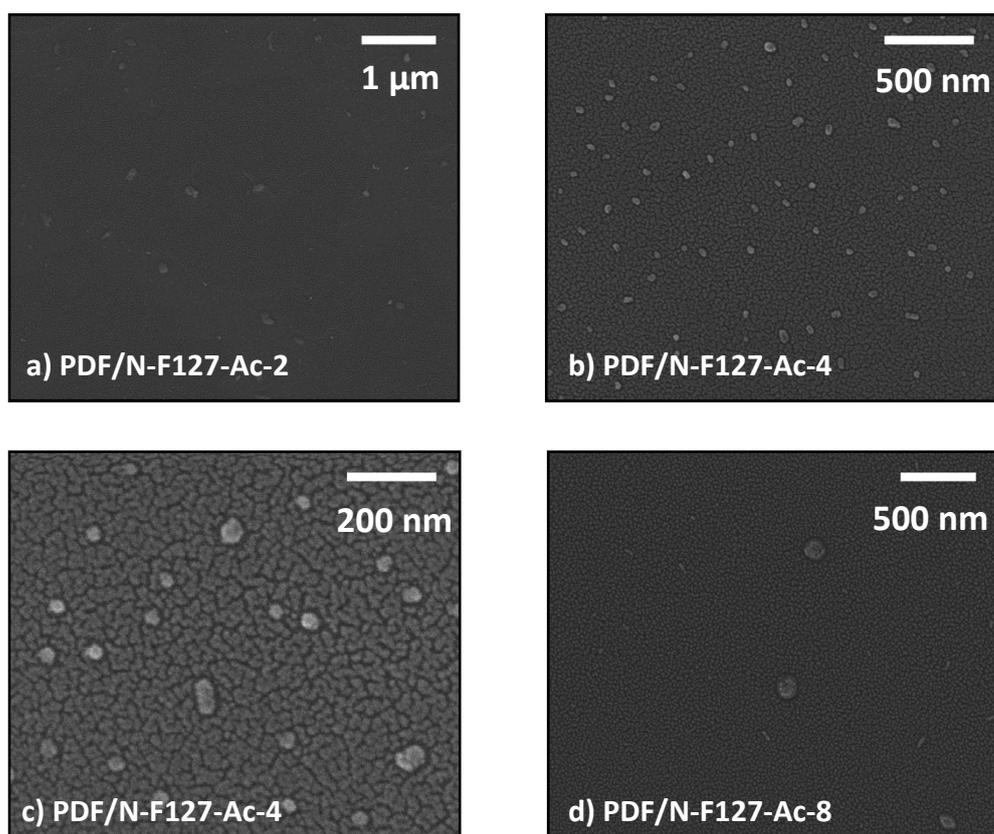


Figura 5.9. Imágenes SEM de nanogeles fotopolimerizados a 25 °C, dializados y filtrados a) PDF/N-F127-Ac-2, b) y c) PDF/N-F127-Ac-4 y d) PDF/N-F127-Ac-8.

En cuanto a los nanogeles PDF/N-F127-Ac-2-red (nanogeles tras su liofilización redisueltos en agua), se comprueba la recuperación de la morfología inicial, como demuestran las imágenes de TEM y SEM, Figuras 5.10 y 5.11, respectivamente.

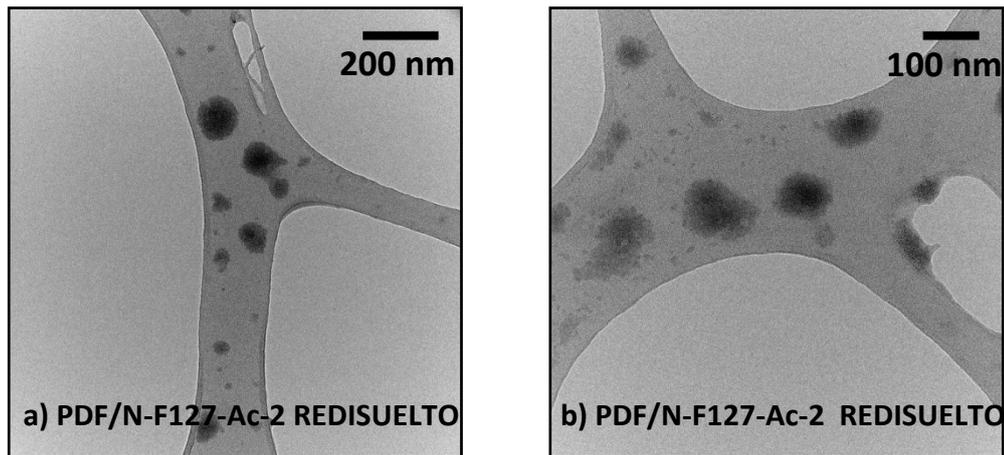


Figura 5.10. Imágenes TEM de nanogeles PDF/N-F127-Ac-2 redisueltos en agua destilada tras ser sometidos a liofilización.

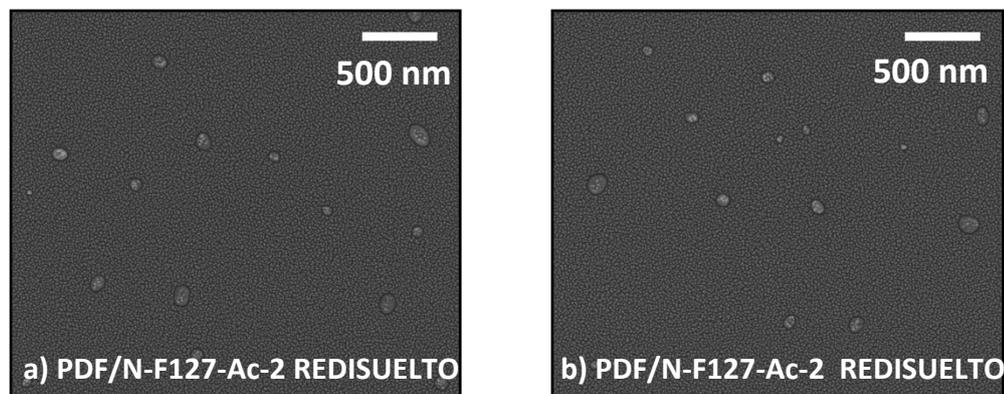


Figura 5.11. Imágenes SEM de nanogeles PDF/N-F127-Ac-2 redisueltos en agua destilada tras ser sometidos a liofilización.

Por lo que respecta a los nanogeles cargados, mediante TEM (Figura 5.12) se observó la morfología redondeada de los nanogeles tras la carga de rodamina B.

Así mismo, mediante TEM en campo oscuro, que permite la detección de los electrones difractados debido a estructuras cristalinas, se detectó la difracción debida a la rodamina B (Figura 5.12 (b), (d) y (f), en color blanco) coincidente con los nanogeles observados por TEM (Figura 5.12 (b), (c) y e), en color negro), lo que indica su encapsulación.

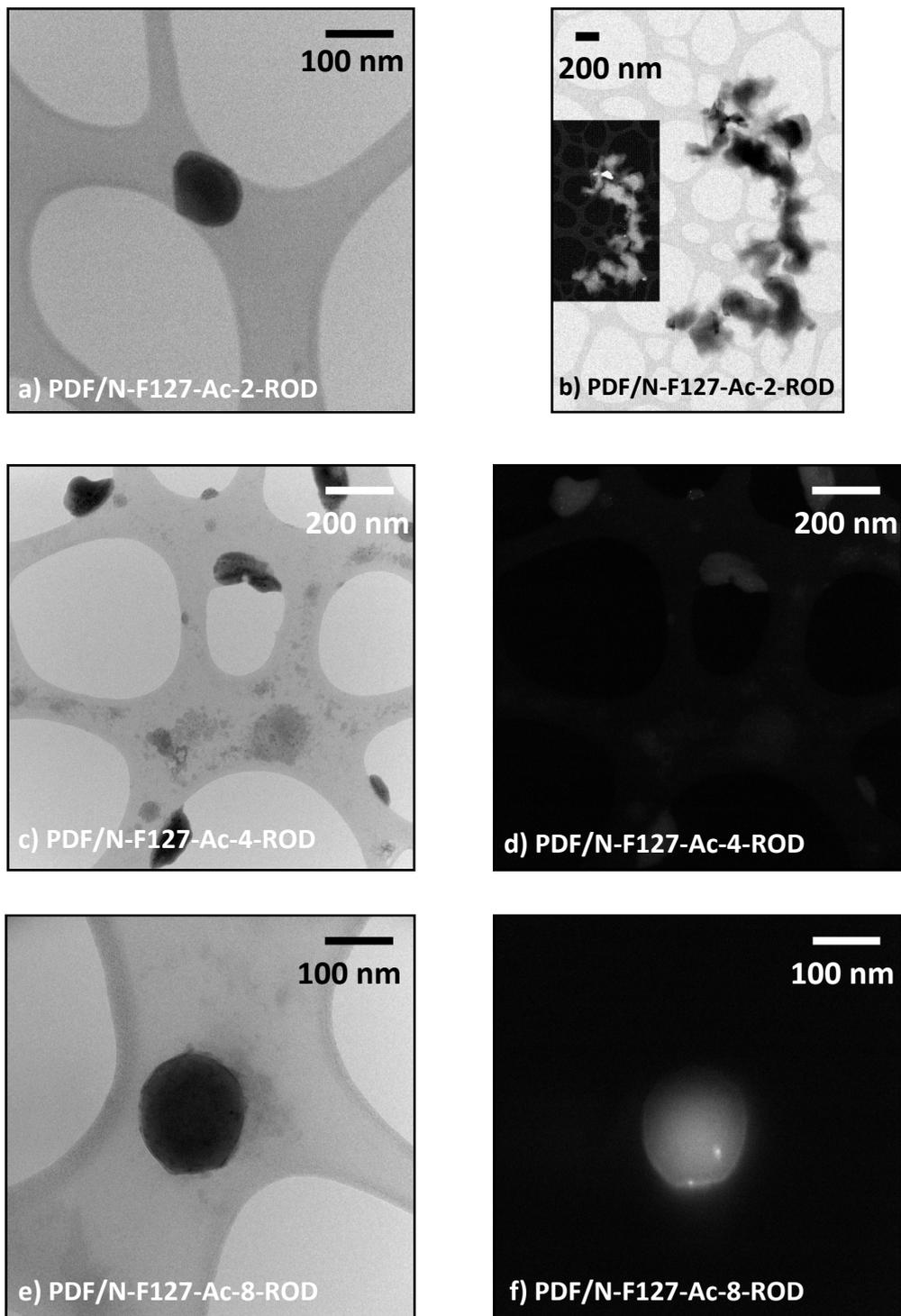


Figura 5.12. Imágenes TEM de nanogeles fotopolimerizados a 25 °C, dializados, filtrados y cargados con rodamina B: a) PDF/N-F127-Ac-2-ROD en campo claro, b) PDF/N-F127-Ac-2-ROD en campo oscuro c) PDF/N-F127-Ac-4-ROD en campo claro, d) PDF/N-F127-Ac-4-ROD en campo oscuro d) PDF/N-F127-Ac-8-ROD en campo claro, f) PDF/N-F127-Ac-8-ROD en campo oscuro.

Cabe destacar, que ninguno de los nanogeles sin cargar presentó difracción de electrones, confirmando que la difracción es debida a la rodamina B cargada en el interior de los nanogeles. En la Figura 5.13 (a) se muestran los puntos de difracción obtenidos para los nanogeles PDF/N-F127-Ac-2-ROD, donde se observa la difracción atribuida a la rodamina B en el interior de los nanogeles y para los nanogeles PDF/N-F127-Ac-2 sin cargar (Figura 5.13 (b)), donde no se observa ninguna señal de difracción.

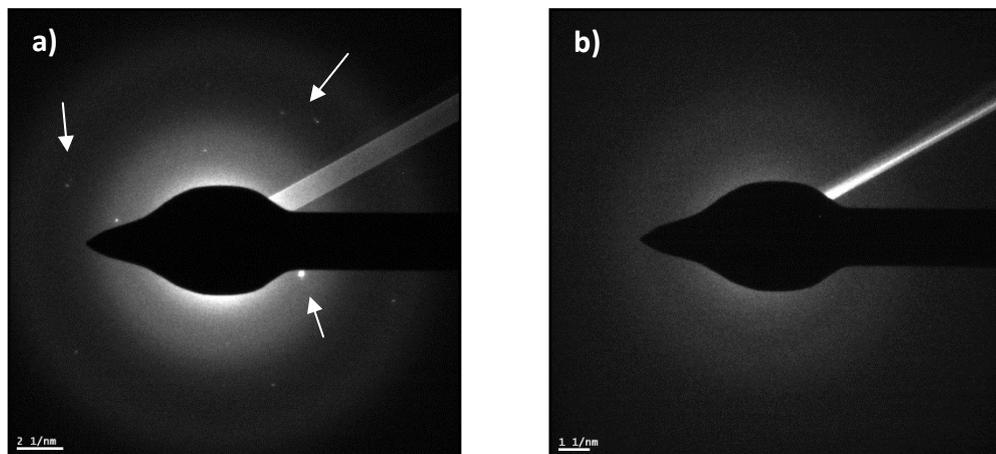


Figura 5.13. Patrones de difracción de los nanogeles PDF/N-F127-Ac-2 a) nanogeles cargados con rodamina B y b) nanogeles sin cargar. Los puntos blancos corresponden a distintos puntos de difracción, algunos de los cuales se señalan con flechas.

Por SEM se observó también la morfología redondeada de los nanogeles cargados con rodamina B (Figura 5.14).

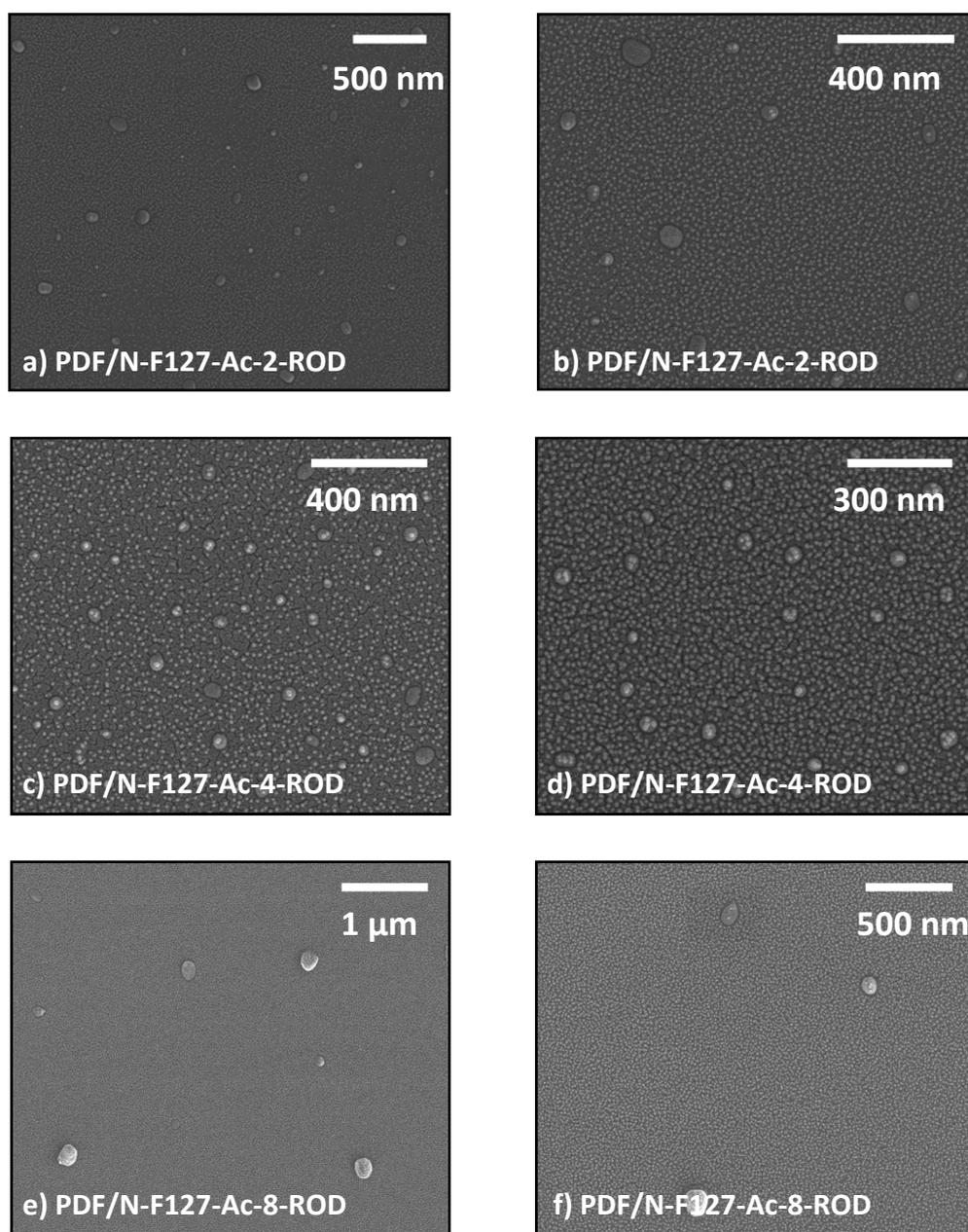


Figura 5.14. Imágenes SEM de nanogeles fotopolimerizados a 25 °C, dializados, filtrados y cargados con rodamina B a) y b) nanogeles de F127-Ac-2, c) y d) nanogeles de F127-Ac-4, d) y f) nanogeles de F127-Ac-8.

Por TEM (Figura 5.15) y por SEM (Figura 5.16) se observaron morfologías redondeadas para los nanogeles PDF/N-F127-Ac-2-PIR y PDF/N-F127-Ac-4-PIR.

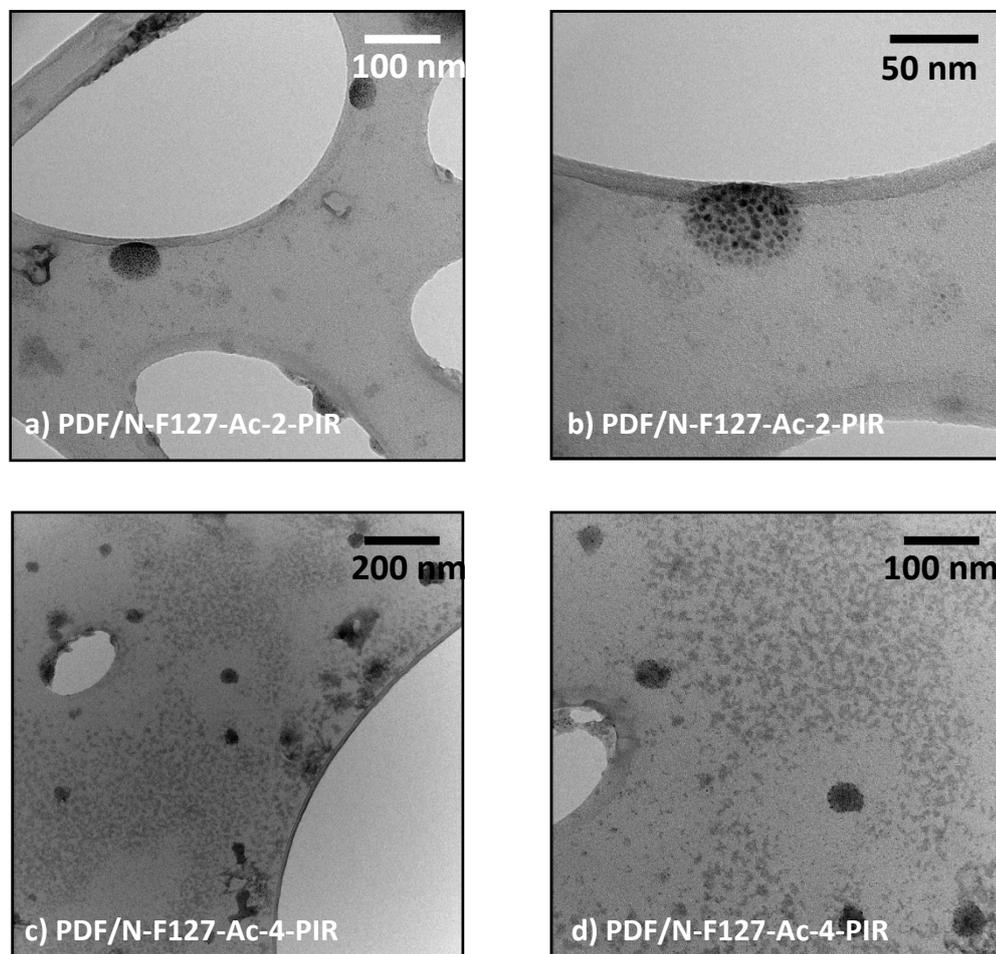


Figura 5.15. Imágenes TEM de nanogeles fotopolimerizados a 25 °C, dializados, filtrados y cargados con Pireno a) y b) PDF/N-F127-Ac-2-PIR, c) y d) PDF/N-F127-Ac-4-PIR.

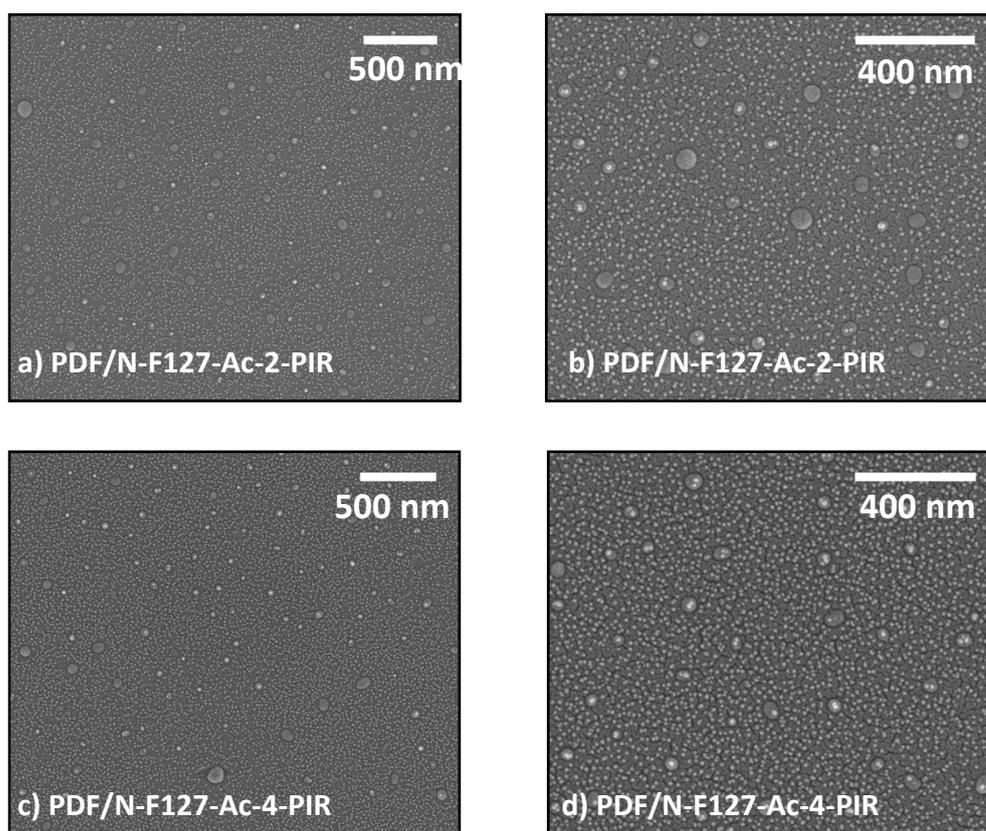


Figura 5.16. Imágenes SEM de nanogeles fotopolimerizados a 25 °C, dializados, filtrados y cargados con Pireno a) y b) PDF/N-F127-Ac-2-PIR, c) y d) PDF/N-F127-Ac-4-PIR.

Tamaño

El tamaño de los nanogeles obtenidos en disolución se midió mediante DLS. No obstante, se midieron también los diámetros medios de los nanoobjetos observados en las imágenes de TEM y SEM. En la Tabla 5.4 se recogen los diámetros estimados mediante TEM, SEM y DLS para diferentes nanogeles, PDF/N-F127-Ac-n (n= 2, 4, 8) sin cargar, PDF/N-F127-Ac-2-red, nanogel rediseñado después de ser liofilizado y los nanogeles cargados con rodamina B y pireno, PDF/N-F127-Ac-n-ROD (n= 2, 4, 8) y PDF/N-F127-Ac-n-PIR (n= 2, 4, 8).

Tabla 5.4. Diámetros de diferentes nanogel estudiados, estimados por TEM y SEM y por DLS a 25 °C y 37 °C.

NANOGELEL	TEM ^a	SEM ^a	DLS 25°C	DLS 37°C
	(nm) ±S.D.	(nm) ±S.D.	(nm) ±S.D. Polidispersidad±S.D.	(nm) ±S.D. Polidispersidad±S.D.
PDF/N-F127-Ac-2	95±42	138±22 ^b	61.9±1 0.195±0.006	52±0.3 0.179±0.009
PDF/N-F127-Ac-4	52±16	41±10	74.9±0.7 0.439±0.009	56.5±0.9 0.391±0.011
PDF/N-F127-Ac-8	63±31	119.8±38	126.5±9.2 0.559±0.071	102±0.9 0.358±0.021
PDF/N-F127-Ac-2-redis	81.3±36.8	69.2±28	62.4±11.4 0.543±0.069	31.5±3.4 0.197±0.051
PDF/N-F127-Ac-2-ROD	82.5±44	68.2±27	130.2±1.5 0.473±0.012	123.3±1.8 0.379±0.050
PDF/N-F127-Ac-4-ROD	89.8±40	59.1±30	89±1 0.423±0.012	72.1±8.1 0.439±0.117
PDF/N-F127-Ac-8-ROD	145.5±31 ^b	135.7±31 ^b	146.9±1.6 0.294±0.009	124.4±4.1 0.303±0.008
PDF/N-F127-Ac-2-PIR	61.2±25	64.4±13	55.8±0.5 0.182±0.005	49.9±0.4 0.188±0.02
PDF/N-F127-Ac-4-PIR	46.6±14.4	58.8±13.5	76.1±3 0.518±0.078	63.2±1.1 0.570±0.03
PDF/N-F127-Ac-8-PIR	-----	-----	95.7±2.6 0.377±0.002	85.0±1.2 0.282±0.008

^a Tamaños calculados como la media de la medida de, al menos, 20 nanogel.

^b Tamaños calculados como la media de la medida de menos de 10 nanogel.
S.D. Desviación Estándar.

Antes de pasar a comentar los resultados encontrados es preciso tener en cuenta que la técnica de DLS mide el diámetro hidrodinámico, mientras que por SEM y TEM las medidas se realizan sobre muestras deshidratadas, lo que puede dar lugar a una discordancia en los tamaños estimados del diámetro con respecto a

los nanogeles en disolución, tal y como se ha observado. Además, en algunos de los casos se obtienen diferencias significativas de tamaño entre lo medio por TEM y lo medido por SEM, que pueden ser debidas a la presencia de un recubrimiento de oro como parte de la preparación de la muestra para SEM. Este recubrimiento puede alcanzar un espesor suficiente que enmascara los nanoobjetos de menor tamaño, dando lugar a medidas que pueden ser erróneas. Finalmente, en algunas muestras de TEM y/o SEM el muestreo fue inferior a 20 nanogeles o incluso en PDF/N-F127-Ac-8-PIR no se visualizaron los nanogeles, lo que se atribuyó al deterioro de la muestra.

Por lo anterior expuesto, y dado que el medio de aplicación de los nanogeles es en disolución, la discusión se va a centrar en los resultados obtenidos por DLS. Con el fin de observar la posible termosensibilidad de los nanogeles, las medidas se realizaron a dos temperaturas, 25 °C y 37 °C.

Tal y como se observa en los datos obtenidos por DLS a 37 °C, los nanogeles estudiados tienen diámetros entre 50-100 nm, por lo que se puede decir que, en general, su tamaño es el adecuado para su aplicación en transporte y liberación controlada de fármacos.

Del análisis de estos datos experimentales se puede comentar que mediante DLS a 25 °C los nanogeles fotopolimerizados PDF/N-F127-Ac-n (n=2, 4, 8) muestran un incremento del tamaño con el aumento de generación del derivado utilizado, lo que resulta coherente con el mayor tamaño de las moléculas al incrementar la generación de la estructura dendrítica.

Esta técnica, además, corrobora que estos nanogeles PDF/N-F127-Ac-n (n=2, 4, 8) son termosensibles, observándose una disminución de tamaño, de 10 nm para PDF/N-F127-Ac-2, 18.4 nm para PDF/N-F127-Ac-4 y 24.5 nm para PDF/N-F127-Ac-8, con el aumento de la temperatura, de 25 °C a 37 °C.

En cuanto a los nanogeles PDF/F127-Ac-2-redisuelto (nanogeles redisueltos en agua tras su liofilización), se comprueba la recuperación del tamaño inicial, como

demuestran los valores de DLS a 25 °C. Así mismo, se comprobó que la termosensibilidad se mantiene tras el proceso de liofilización y redisolución, si bien varía en mayor medida tras la redisolución, mostrando menor tamaño las partículas a 37 °C

Del análisis de los resultados obtenidos con los nanogeles cargados, se puede comentar que en el caso de los nanogeles cargados con rodamina B se produjo un aumento del tamaño con respecto a los nanogeles no cargados, siendo la variación de tamaño de 68.3 nm para PDF/N-F127-Ac-2-ROD, de 14 nm para PDF/N-F127-Ac-4-ROD y de 20.4 nm para PDF/N-F127-Ac-8 (medidas a 25 °C). El incremento más significativo de tamaño, que se produce para los nanogeles PDF/N-F127-Ac-2-ROD, puede atribuirse a una estructura externa del nanogel menos rígida debido a la menor cantidad de grupos acrilato presentes, lo que permite una mayor deformación del nanogel para alojar la rodamina B.

A diferencia de lo observado en la encapsulación de la molécula hidrófila, la encapsulación de pireno no produjo aumento de tamaño con respecto a los nanogeles sin cargar.

Al igual que en los otros casos estudiados, los nanogeles cargados mantienen su comportamiento termosensible como se deduce de los tamaños determinados por DLS, a las dos temperaturas (Tabla 5.4). Las variaciones de tamaño coinciden con las observadas en los nanogeles sin cargar.

5.4.- ENSAYOS CELULARES

Los ensayos celulares con estos materiales han consistido en el estudio de su toxicidad, evaluando la viabilidad celular, así como ensayos preliminares de internalización celular. Ambos tipos de estudios han sido realizados en colaboración con la Dra. Pilar Martín Duque, investigadora ARAID, y Rebeca González, en el CIBA (Centro de Investigaciones Biomédicas de Aragón, IACS).

5.4.1.- Viabilidad celular

La citotoxicidad de los nanogeles se determinó mediante ensayos de viabilidad celular, utilizando dos líneas celulares: MSC (células mesenquimales de ratón) y HeLa (células cancerígenas, Homo Sapiens Cervix Adenocarcinoma).

Con el material PDF/N-F127-Ac-2 se ensayaron tres concentraciones, 0.25, 0.5 y 1 mg/mL, preparando estas muestras por disolución directa del material liofilizado en medio de cultivo DMEM F12 para células MSC y DMEM high glucose para células HeLa, a la concentración deseada.

Debido a la imposibilidad de redisolución tras la liofilización, los ensayos celulares con PDF/N-F127-Ac-4 y PDF/N-F127-Ac-8 se realizaron con las disoluciones que se obtienen tras el proceso de fotopolimerización, diálisis y filtración tal y como se ha explicado en el apartado 5.1.3. (ver Tabla 5.2). Esto implica que las muestras se obtienen disueltas en agua destilada. Para los ensayos de toxicidad, se ajustó la concentración por adición de medio de cultivo DMEM F12 para células MSC y DMEM high glucose para células HeLa.

En el caso de PDF/N-F127-Ac-4 (con una concentración en agua destilada de 0.54 mg/ml) los ensayos de viabilidad celular sólo se realizaron a una concentración de 0.25 mg/ml. Por el contrario, con PDF/N-F127-Ac-8 (con una concentración en agua destilada de 1.9 mg/ml) se ensayaron a las tres concentraciones, 0.25, 0.5 y 1 mg/ml.

Los protocolos de trabajo seguidos para la preparación de las células, preparación de las disoluciones de nanogeles y preparación de los ensayos de viabilidad celular se describen con detalle en el apartado 6.2.1., de la Parte Experimental. Los estudios de viabilidad celular se realizaron utilizando el método Alamar Blue, que se describe en el *Anexo III*.

En la Figura 5.17 se muestran los resultados de viabilidad celular obtenidos para los tres tipos de nanogeles estudiados con las dos líneas celulares.

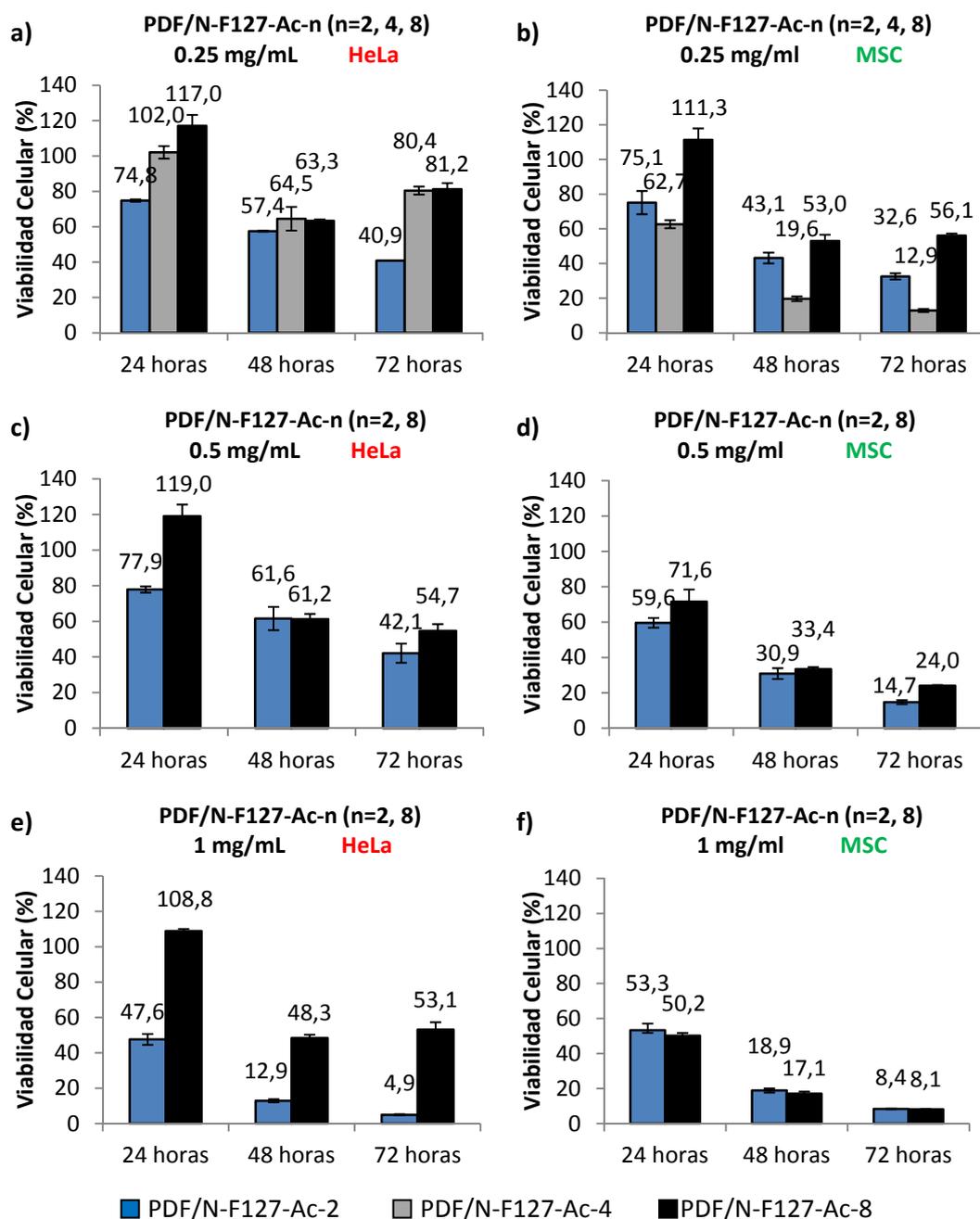


Figura 5.17. Viabilidad celular de los nanogeles PDF/N-F127-Ac-2, PDF/N-F127-Ac-4 y PDF/N-F127-Ac-8, a concentraciones 0.25 mg/mL (a y b), 0.5 mg/mL (c y d) y 1 mg/mL (e y f), en cultivos con células HeLa (columna de la izquierda) y con células MSC (columna de la derecha).

Para células HeLa, los nanogeles PDF/N-F127-Ac-4 y PDF/N-F127-Ac-8 son menos citotóxicos a concentración 0.25 mg/ml tras 72 horas de ensayo que los nanogeles PDF/N-F127-Ac-2. Cabe destacar, que los nanogeles PDF/N-F127-Ac-8

presentan tras 72 horas a concentración 1 mg/ml, los mejores niveles de viabilidad celular (superior al 50%) para este tipo de células.

De forma general, los nanogeles resultaron significativamente más tóxicos con MSC. Los porcentajes de supervivencia celular disminuyen a niveles inferiores al 30% con el paso del tiempo y el incremento de la concentración. Si bien, se repite el hecho de que PDF/N-F127-Ac-8 es, en general, menos tóxico que PDF/N-F127-Ac-2, especialmente a concentraciones inferiores a 1 mg/mL.

Por otra parte, con el fin de poder comparar nuestros resultados con análogos descritos en la literatura, decir que los únicos valores de viabilidad celular comparables, han sido descritos para PDF/N-F127-Ac-2. Estos nanogeles a una concentración de 1 mg/mL, tras 24 horas de ensayo, con cultivos con células tumorales SCC7, mostraron viabilidades próximas al 100%.^{76b} Estos resultados reflejan la clara influencia del tipo de célula utilizada para la realización de los ensayos en el valor de la viabilidad celular.

5.4.2.- Ensayos de internalización

Con el fin de analizar la capacidad de estos nanogeles de acceder al interior de las células, se han realizado también ensayos de internalización celular, utilizando para el marcaje de los nanogeles rodamina B y una molécula derivada de la misma, tal y como se discute en los siguientes subapartados.

Estudios de internalización de nanogeles cargados con rodamina B

Este tipo de ensayo consiste en el estudio del proceso de entrada de los nanogeles en el interior de células. Para la realización de estos estudios se utilizaron células tumorales HeLa, que se incubaron durante 4 horas junto con disoluciones en agua destilada de los nanogeles cargados con rodamina B, a las que previamente se ajustó la concentración por adición de medio de cultivo high glucose. Se han utilizado nanogeles cargados con rodamina B con el fin de

visualizar la localización de los nanogel con respecto de las células mediante microscopia confocal de fluorescencia.

Para estos estudios, los filamentos de actina del citoesqueleto de las células se marcaron utilizando el fluoróforo verde Alexa fluor 488, y el núcleo se tiñó utilizando el fluoróforo azul DAPI. Esta tinción permite distinguirlos de los nanogel cargados que se observaron de color rosa, característico de la rodamina B. El procedimiento de preparación, incubación de las células con la disolución de nanogel cargado con rodamina B y marcaje de las células se describe en el apartado 6.2.1., de la Parte Experimental.

En la Tabla 5.5 se recogen las características generales relativas a los ensayos de internalización realizados. En la primera y la segunda columna se incluyen la concentración de nanogel y la cantidad de rodamina B encapsulada por miligramo de nanogel en la disolución inicial de nanogel, respectivamente. La tercera columna recoge la concentración final de nanogel utilizada en los ensayos de internalización tras ajustar la concentración por adición de DMEM high glucose, hasta un volumen total de 500 μ L. La cuarta columna corresponde a la cantidad total de rodamina B encapsulada presente en el ensayo.

Tabla 5.5. Concentración de nanogel y cantidad de rodamina B utilizada en los ensayos de internalización.

NANOGELEL	C. dis ^a (mg/mL)	μ g ROD encap./mg nanogel	C. Int ^b (mg/mL)	μ g ROD ^c encap.
PDF/N-F127-Ac-2-ROD	1.0*	56.9	0.8	23
PDF/N-F127-Ac-4-ROD	0.54	68.9	0.5	17
PDF/N-F127-Ac-8-ROD	1.90	71.1	0.675 1.35	23 48

^a Concentración de nanogel en la disolución inicial, en agua destilada

^b Concentración de nanogel en el ensayo de internalización.

^c μ g de rodamina B encapsulados presentes en un volumen de 500 μ L utilizados en el ensayo de internalización.

*Concentración obtenida por redisolución de nanogel liofilizados en agua destilada.

La concentración final de rodamina B del nanogel PDF/N-F127-Ac-4-ROD estuvo limitada por la baja concentración de nanogel obtenida tras la preparación y tratamiento de los nanogeles, proporcionando disoluciones con menor contenido de nanogeles y rodamina B encapsulada.

En la Figura 5.18 se recogen las imágenes de microscopia confocal de fluorescencia de los diferentes nanogeles estudiados: PDF/N-F127-Ac-2-ROD (23 μg), PDF/N-F127-Ac-4-ROD (17 μg) y PDF/N-F127-Ac-8-ROD (23 μg). En la parte superior de dicha figura se muestran los controles realizados incubando células HeLa con rodamina B en forma libre, en la misma cantidad de rodamina B que la encapsulada en los nanogeles (17 y 23 μg). Como control, las imágenes (a) y (b) muestran la internalización de rodamina B, la cual entra en las células localizándose en el citoesqueleto de estas. Es sabido que la internalización de moléculas de pequeño tamaño se produce por mecanismos de difusión no energéticos, producidos por la simple presencia de un gradiente de concentración.¹³⁴

En el caso de la rodamina B encapsulada en los nanogeles PDF/N-F127-Ac-2-ROD y PDF/N-F127-Ac-8-ROD (Figura 5.18 (c) y (e) respectivamente) también se observó internalización de rodamina B en las células. En este caso, y debido al tamaño que presentan los nanogeles cargados con rodamina B, cabe esperar un proceso de internalización por endocitosis.¹³⁴ Un caso particular es el observado con PDF/N-F127-Ac-4-ROD (Figura 5.18 (d)), detectándose la ruptura del citoesqueleto, probablemente debido a la baja concentración de medio de cultivo presente en el ensayo, que da lugar a una disolución hipotónica y la consiguiente explosión de las paredes celulares. Con estos ensayos cualitativos realizados es difícil percibir el grado de internalización de los nanogeles con rodamina B con respecto a los controles así como diferenciar si la rodamina B se libera antes de entrar en la célula, a la que entra por difusión.

¹³⁴ Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., *Molecular Biology of the Cell, 4th edition*, Garland Science, New York. **2002**.

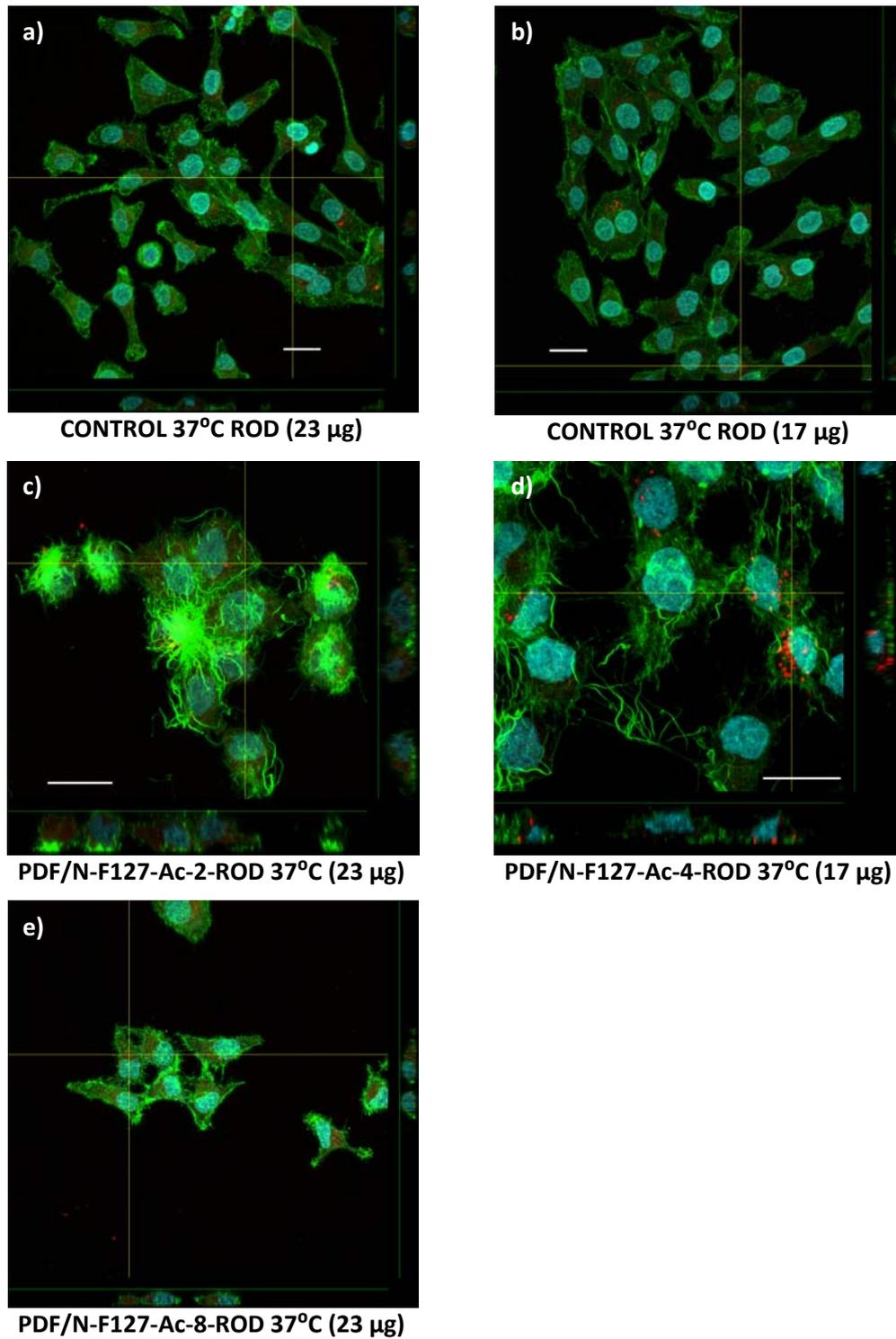


Figura 5.18. Imágenes de microscopía confocal de los ensayos de internalización celular, tras 4 horas de incubación. Ensayos de control con rodamina B libre a 37 °C: a) 23 µg y b) 17 µg. Ensayos con rodamina B encapsulada: c) PDF/N-F127-Ac-2-ROD, d) PDF/N-F127-Ac-4-ROD y e) PDF/N-F127-Ac-8-ROD. En azul: núcleo celular, en verde: actina del citoesqueleto, en rojo: rodamina B. La escala corresponde a 20 µm.

Para intentar dilucidar el grado de internalización de los nanogeles, se plantearon ensayos a dos temperaturas, 4 °C y 37 °C, con nanogeles PDF/N-F127-Ac-8-ROD. Para estos ensayos se utilizó una mayor concentración de nanogel y por tanto una mayor cantidad de rodamina B cargada, 48 µg, con el objetivo de conseguir una mayor intensidad de fluorescencia que la observada para ensayos realizados a menor concentración. La selección de la temperatura de 4 °C responde a que los procesos de internalización que requieren gasto energético, como es la endocitosis, se encuentran inhibidos a esta temperatura, lo que debería impedir por tanto la internalización de nanogeles cargados con rodamina B, que se internaliza por este mecanismo. Sin embargo, la difusión de rodamina B libre no se vería inhibida al tratarse de un proceso sin coste energético para la célula.

En la Figura 5.19 se muestran los ensayos de controles y los de internalización realizados a las dos temperaturas de trabajo.

En ambos controles se detecta la internalización de rodamina B en su forma libre debida a procesos de difusión (imagenes (a) y (b)). Como se ha observado y comentado anteriormente, a 37 °C de nuevo se produce la internalización de los nanogeles (imagen (c)), siendo difícil percibir el grado de internalización con respecto al control. A 4 °C se observa un aumento de la fluorescencia en el interior de las células (imagen (d)) con respecto al ensayo análogo realizado a 37 °C (imagen (c)). Considerando que la rodamina B encapsulada en los nanogeles no puede internalizarse porque a 4 °C se produce la inhibición de la endocitosis, el aumento de fluorescencia debe corresponder a rodamina B libre internalizada por un proceso de difusión. Por ello, estos resultados parecen indicar que debido a la termosensibilidad que presentan los nanogeles, éstos experimentan un aumento de tamaño con la disminución de la temperatura, lo que produce la liberación al medio de la rodamina B encapsulada, creando así un gradiente de concentración responsable de la internalización de la rodamina B en su forma libre por un proceso de difusión. Esta circunstancia hace que este experimento

no sea el más adecuado para estudiar el grado de internalización de los nanogeles.

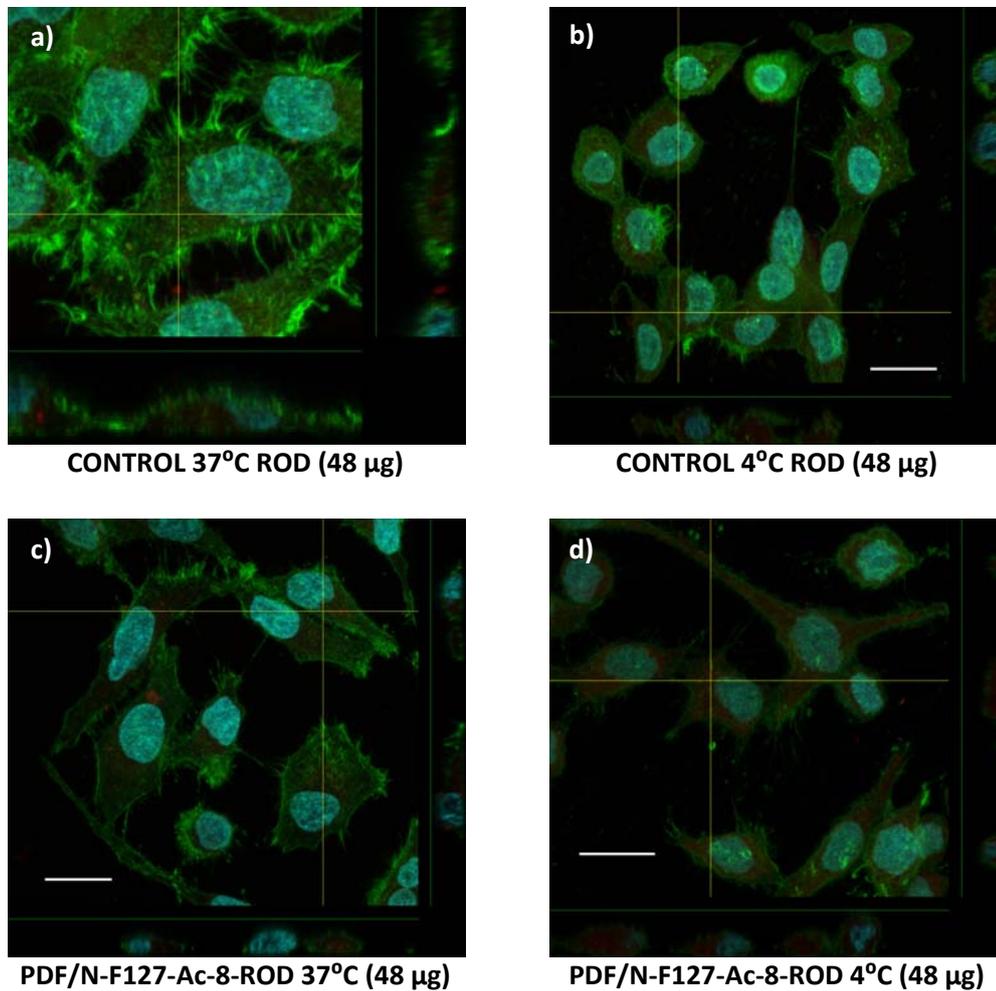


Figura 5.19. Imágenes de microscopía confocal de los ensayos de internalización celular, tras 4 horas de incubación. Ensayos de control con rodamina B libre: a) 48 µg, 37 °C y b) 48 µg, 4 °C. Ensayos con rodamina B encapsulada: c) PDF/N-F127-Ac-8-ROD a 37 °C, d) PDF/N-F127-Ac-8-ROD a 4 °C. En azul: núcleo celular, en verde: actina del citoesqueleto, en rojo: rodamina B. La escala corresponde a 20 µm.

Con el fin de modificar la rápida liberación de la rodamina B a 4 °C al medio de ensayo, debido fundamentalmente a su elevada solubilidad en agua, se pensó en un modelo más adecuado que permitiera comprobar la encapsulación y los procesos de internalización por endocitosis de los nanogeles cargados, modelo que se explica a continuación.

Estudios de internalización de nanogeles cargados con Rodamina-EST (rodamina- ácido esteárico)

Para asegurar una mayor retención de la rodamina en el interior del nanogel y disminuir su rápida liberación se planteó la síntesis de una molécula fluorescente derivada de rodamina B de carácter anfífilo, que permita inducir interacciones no covalentes hidrófobas con el nanogel así como modificar su solubilidad en agua.

Con este fin se diseñó una molécula funcionalizada con un dendrón de bis-MPA de primera generación con cadenas terminales de ácido esteárico (Rodamina-EST), cuya estructura se muestra en la Figura 5.20. Esta molécula, que ha sido sintetizada y utilizada en el grupo de investigación, ha demostrado una mayor capacidad de internalización en las células por difusión en su forma libre que la rodamina B, lo que puede facilitar estudios comparativos cualitativos.

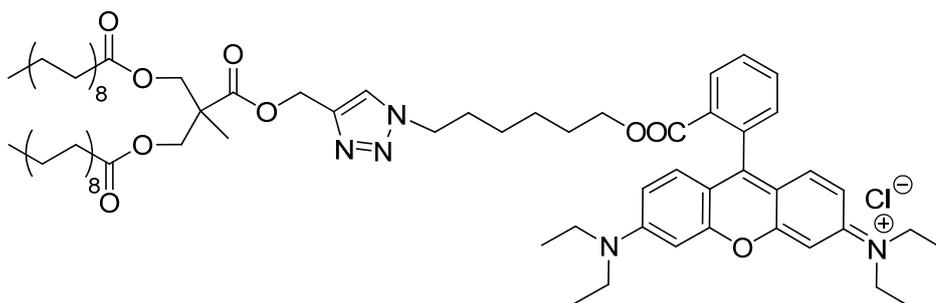


Figura 5.20. Estructura química de la rodamina-EST que se caracteriza por su carácter anfífilo.

El procedimiento de encapsulación de la rodamina-EST en el interior de los nanogeles fue similar al utilizado para la encapsulación de rodamina B, descrito en el apartado 6.2.k., de la Parte Experimental, aunque eliminando la etapa de purificación por diálisis, dado que la molécula es poco soluble en agua. De esta forma se consideró que toda la molécula adicionada queda encapsulada en el interior de los nanogeles.

Para la incubación de las células HeLa con los nanogel cargados con rodamina-EST y la tinción de las células con Alexa fluor 488 y DAPI se procedió conforme al procedimiento descrito en el apartado 6.2./., de la Parte Experimental.

En la Tabla 5.6 se muestra la concentración de nanogel y rodamina-EST encapsulada en la disolución inicial, así como la concentración final de nanogel utilizada en los ensayos de internalización, obtenida tras el ajuste de la concentración por adición de DMEM high glucose, así como la cantidad de rodamina-EST presente. De nuevo, los ensayos con los nanogel de F127-Ac-4 estuvieron limitados por la baja concentración de estos en disolución, ensayándose a una concentración más baja que el resto de nanogel.

Tabla 5.6. Concentración de nanogel y cantidad de rodamina-EST utilizada en los ensayos de internalización.

NANOGELE	C. dis. ^a (mg/mL)	µg ROD-EST encap./mg nanogel	C. int ^b (mg/mL)	µg ROD-EST encap.
PDF/N-F127-Ac-2- ROD-EST	1.0*	150	0.64	50
PDF/N-F127-Ac-4- ROD-EST	0.54	150	0.32	25
PDF/N-F127-Ac-8- ROD-EST	1.90	150	0.64	50

^a Concentración de nanogel en la disolución inicial, en agua destilada.

^b Concentración de nanogel en el ensayo de internalización.

^c µg de rodamina-EST encapsulados presentes en un volumen de 500 µL utilizados en el ensayo de internalización.

*Concentración obtenida por redisolución de nanogel liofilizados en agua destilada.

Los resultados de estos estudios se muestran en dos secuencias de imágenes (Figuras 5.21 y 5.22), correspondientes a dos cantidades diferentes de rodamina-EST encapsulada, 50 µg en el caso de los ensayos con PDF/N-F127-Ac-2-ROD-EST y PDF/N-F127-Ac-8-ROD-EST, y 25 µg para PDF/N-F127-Ac-4-ROD-EST. Para facilitar la comparación de los resultados se incluyen también los correspondientes ensayos de control. Con el fin de analizar el efecto de la

temperatura en el proceso de internalización, de nuevo se ha trabajado a 37 °C y 4 °C.

En la Figura 5.21 (a) y (b) se muestran las imágenes de control obtenidas con una cantidad de rodamina-EST de 50 µg, a las dos temperaturas, 4 °C y 37 °C respectivamente. Como se puede observar, la internalización de rodamina-EST libre es independiente de la temperatura.

Sin embargo, no ocurre lo mismo cuando esta molécula está encapsulada en nanogeles. La internalización de los nanogeles PDF/N-F127-Ac-2-ROD-EST se produce a 37 °C (Figura 5.21 (c)) de forma más lenta que la internalización de la molécula libre (Figura 5.21 (a)), como se deduce de la menor intensidad de la fluorescencia debida a la internalización de nanogeles cargados con rodamina-EST. En cambio, a 4 °C (Figura 5.21 (d)), con los procesos de endocitosis inhibidos, no se observa fluorescencia en el interior de las células, confirmando que los nanogeles entran a la célula por endocitosis y que la rodamina-EST no se libera al medio de ensayo, encontrándose efectivamente encapsulada en el interior de los nanogeles.

La internalización de los nanogeles PDF/N-F127-Ac-8-ROD-EST a 37 °C (Figura 5.21 (e)) y a 4 °C (Figura 5.21 (f)) presentó el mismo comportamiento que los nanogeles PDF/N-F127-Ac-2-ROD-EST, siendo la diferencia de fluorescencia a las dos temperaturas de trabajo menos significativas que en este caso. La menor intensidad de fluorescencia observada en la imagen (e) con respecto a la imagen (c) se puede atribuir a que la internalización de PDF/N-F127-Ac-8-ROD-EST a 37 °C se produce de forma más lenta que los PDF/N-F127-Ac-2-ROD-EST a la misma temperatura.

Además el uso de rodamina-EST hace que el cambio de tamaño que experimentan los nanogeles al disminuir la temperatura a 4 °C no produzca la liberación de esta al medio (Figura 5.21, imágenes (d) y (f)), a diferencia de lo ocurrido con la rodamina B (Figura 5.19, imagen (d)).

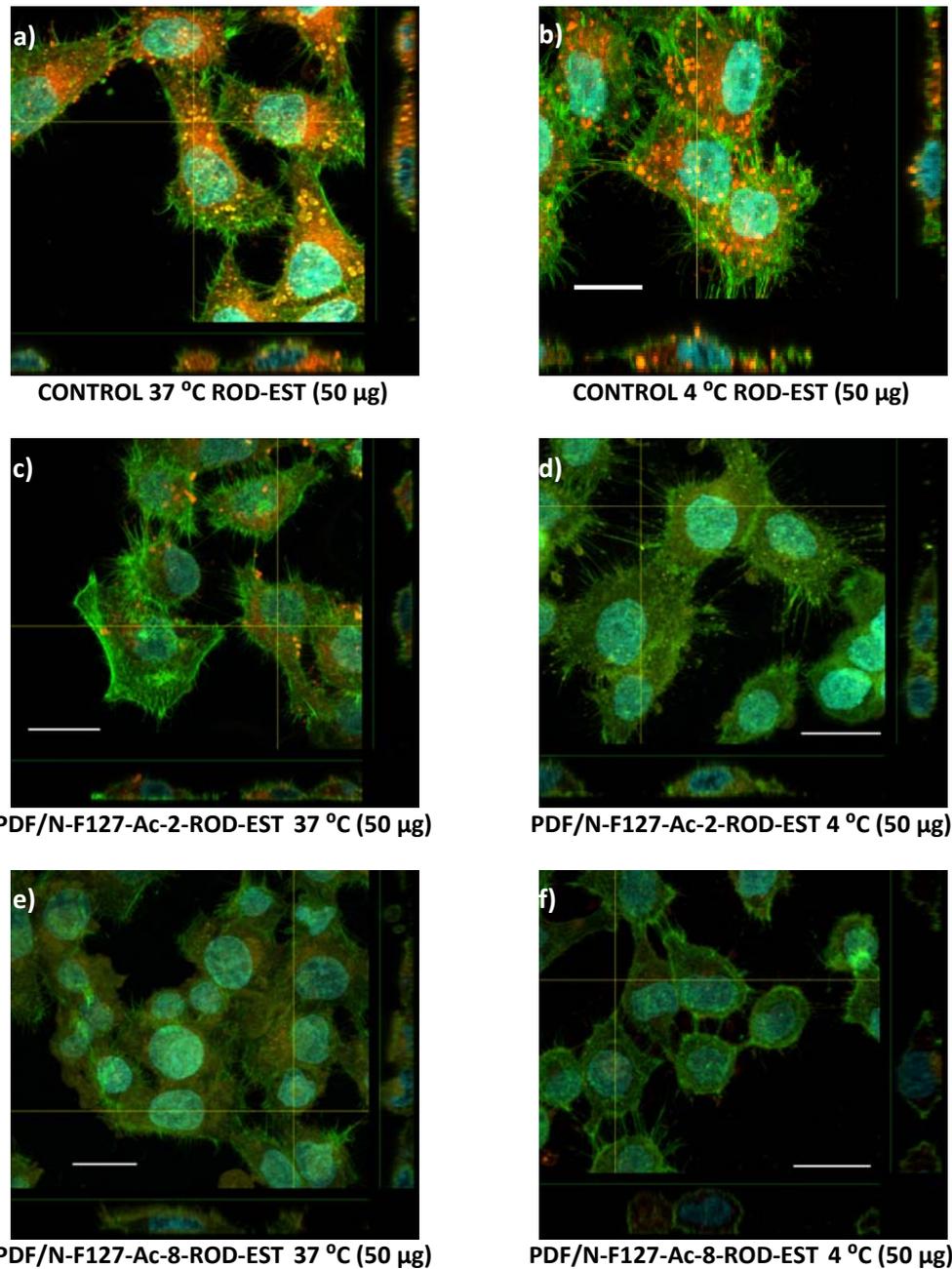


Figura 5.21. Imágenes de microscopia confocal de los ensayos de internalización celular, tras 4 horas de incubación. Ensayos de control con rodamina-EST libre: a) 50 μg, 37 °C, b) 50 μg, 4 °C; Ensayos con rodamina-EST encapsulada: c) PDF/N-F127-Ac-2-ROD-EST a 37 °C, d) PDF/N-F127-Ac-2-ROD-EST a 4 °C. e) PDF/N-F127-Ac-8-ROD-EST a 37 °C, f) PDF/N-F127-Ac-8-ROD-EST a 4 °C. En azul: núcleo celular, en verde: actina del citoesqueleto, en rojo: rodamina-EST. La escala corresponde a 20 μm.

En la Figura 5.22 se muestran los resultados de internalización observados para los ensayos con nanogeles PDF/N-F127-Ac-4-ROD-EST, con sus correspondientes controles. A diferencia de lo observado con los otros dos tipos de nanogeles ensayados se visualiza un aumento de la intensidad de fluorescencia a baja temperatura, con respecto a los mismos ensayos realizados a 37 °C. Estos nanogeles, a 4 °C, producen la liberación de la rodamina-EST encapsulada lo que permite la internalización de la molécula por procesos de difusión. Todavía queda por resolver la diferencia de comportamiento de estos nanogeles con respecto a los otros dos.

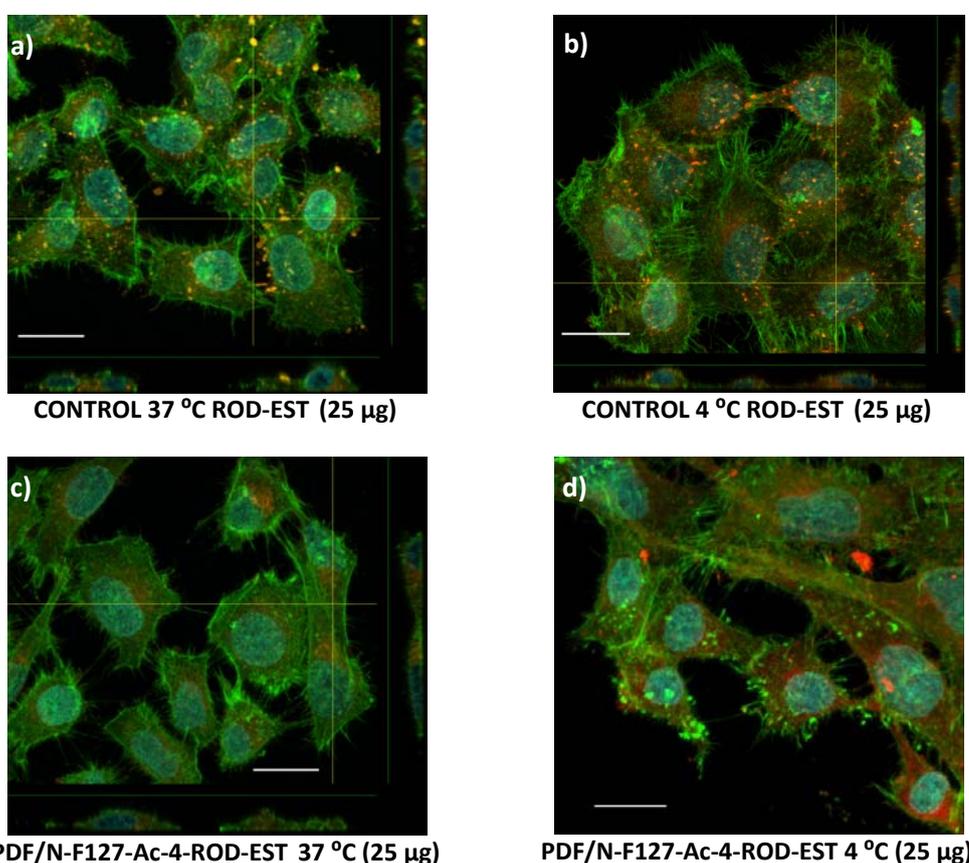


Figura 5.22. Imágenes de microscopía confocal de los ensayos de internalización celular, tras 4 horas de incubación. Ensayos de control con rodamina-EST libre: a) 25 µg, 37 °C, b) 25 µg, 4 °C. Ensayos con rodamina-EST encapsulada: c) PDF/N-F127-Ac-4-ROD-EST a 37 °C, d) PDF/N-F127-Ac-4-ROD-EST a 4 °C. En azul: núcleo celular, en verde: actina del citoesqueleto, en rojo: rodamina-EST. La escala corresponde a 20 µm.

A modo de resumen, en la Tabla 5.7 se recogen los ensayos de internalización celular realizados y sus resultados.

Tabla 5.7. Resumen de ensayos de internalización realizados en células HeLa.

Nanogel	Carga	37 °C	4 °C	Internalización
-	ROD (17 y 23 µg)	+		+ (por difusión)
-	ROD (48 µg)	+		+ (por difusión)
-	ROD (48 µg)		+	+ (por difusión)
PDF/N-F127-Ac-2- ROD	ROD (23 µg)	+		+
PDF/N-F127-Ac-4- ROD	ROD (17 µg)	+		Rotura de células
PDF/N-F127-Ac-8- ROD	ROD (23 µg)	+		+
PDF/N-F127-Ac-8- ROD	ROD (48 µg)	+		+
PDF/N-F127-Ac-8- ROD	ROD (48 µg)		+	+ (por difusión)
-	ROD-EST (50 µg)	+		+ (por difusión)
-	ROD-EST (50 µg)		+	+ (por difusión)
-	ROD-EST (25 µg)	+		+ (por difusión)
-	ROD-EST (25 µg)		+	+ (por difusión)
PDF/N-F127-Ac-2- ROD-EST	ROD-EST (50 µg)	+		+ (más lenta que libre)
PDF/N-F127-Ac-2- ROD-EST	ROD-EST (50 µg)		+	- (endocitosis inhibida)
PDF/N-F127-Ac-8- ROD-EST	ROD-EST (50 µg)	+		+ (más lenta que libre)
PDF/N-F127-Ac-8- ROD-EST	ROD-EST (50 µg)		+	- (endocitosis inhibida)
PDF/N-F127-Ac-4- ROD-EST	ROD-EST (25 µg)	+		+
PDF/N-F127-Ac-4- ROD-EST	ROD-EST (25 µg)		+	+ (por difusión)

Ensayo de internalización positivo: ensayo que presenta fluorescencia en el interior de la célula debida a la presencia de fluoróforo (rodamina B o rodamina-EST), en su forma libre o encapsulada en el nanogel.

Ensayos cualitativos preliminares han demostrado que estos nanogeles se internalizan de forma efectiva en el interior de la célula. Sin embargo, son necesarios más ensayos de internalización, incluyendo ensayos de tipo cuantitativo y ensayos en función del tiempo de incubación de las células con los nanogeles. Estos estudios permitirán confirmar la viabilidad de estos materiales

como transportadores de fármacos y explicar el distinto comportamiento observado para cada uno de los nanogeles estudiados, investigación que se plantea como un objetivo futuro.

Los resultados de internalización y de encapsulación de moléculas permitirán el uso de los nanogeles como sistemas de encapsulación de fármacos hidrófobos, como la Camptotecina, fármaco con baja solubilidad en agua y elevada citotoxicidad en su forma libre, activo contra la hepatitis. Así mismo, se comprobará la efectividad y toxicidad de los nanogeles cargados con Camptotecina al producirse la internalización celular, en comparación con el fármaco libre. Dichos experimentos se realizarán en colaboración con Olga Abián del Instituto Universitario de Investigación de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI), perteneciente al IACS.

CAPÍTULO 6

PARTE EXPERIMENTAL

En este capítulo se incluyen todos aquellos aspectos relacionados con el trabajo experimental desarrollado para esta tesis doctoral.

Para ello se han considerado los siguientes apartados:

- Síntesis y caracterización de los compuestos:

Apartado en el que se describen los procedimientos experimentales que han permitido obtener los diferentes compuestos, así como los datos relativos a su caracterización química.

La nomenclatura y numeración que identifica cada compuesto es la utilizada en los esquemas sintéticos y texto incluidos en los Capítulos 3 y 4.

- Protocolos de trabajo:

Apartado en el que se recogen los diferentes procedimientos experimentales puestos a punto, estandarizados y desarrollados para la preparación o caracterización de los diferentes materiales.

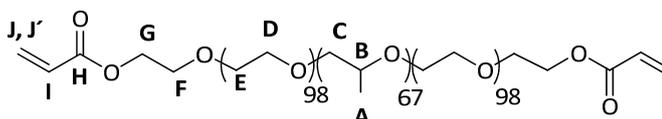
- Materiales y técnicas experimentales.

Apartado en el que se incluyen los materiales, técnicas y equipos utilizados en la preparación y caracterización de los distintos materiales.

6.1.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS

Compuesto F127-Ac-2 [1]

Descrito por Tirelli *et al.*, *Macromolecular Chemistry and Physics* **2002**, 203 (10-11), 1466-1472. (Referencia 101c).



En un matraz se pesa Pluronic F127® (10 g, 0.79 mmol) secado previamente a vacío y se disuelve en 20 mL de diclorometano seco. Una vez disuelto el polímero se añade trietilamina (0.97 mL, 6.99 mmol) gota a gota bajo atmósfera de argón. El matraz de reacción se introduce en un baño de hielo y se añade muy lentamente, gota a gota cloruro de aciloilo (0.54 mL, 6.35 mmol). La mezcla de reacción se mantiene a temperatura ambiente, bajo atmósfera de argón y en oscuridad durante toda la noche. Transcurrido este tiempo se filtra el crudo de reacción sobre alúmina neutra para la eliminación del subproducto hidrocioruro de trietilamonio. Al filtrado se le añade Na₂CO₃ anhidro y se mantiene con agitación en oscuridad durante 2 horas. El sólido se filtra por gravedad y el filtrado se concentra en el rotavapor. A continuación la mezcla se vierte sobre un litro de dietil éter frío. El sólido que precipita se deja decantar durante una noche en el frigorífico, y el precipitado se filtra y se lava con dietil éter frío, obteniéndose un sólido blanco. Rto: 67-78 %.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 1.13 (m, 201H, A), 3.37-3.82 (m, ~1100H, B, C, D, E, F), 4.31 (m, 4H, G), 5.83 (dd, $J_{cis}=10.4$ Hz, $J_{gem}=1.6$ Hz, 2H, J), 6.15 (dd, $J_{trans}=17.2$ Hz, $J_{cis}=10.4$ Hz, 2H, I), 6.42 (dd, $J_{trans}=17.2$ Hz, $J_{gem}=1.6$ Hz, 2H, J).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 17.3-17.4 (A), 63.6 (G), 68.4-69.1 (F), 70.5 (D, E), 72.9- 73.3 (C), 75.1- 75.3- 75.5 (B), 128.2 (I), 130.9 (J), 166.1 (H).

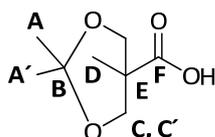
FT-IR (cm⁻¹, neto, película delgada sobre NaCl): 2882 (C-H st), 1724 (C=O), 1114 (C-O-C).

MS (MALDI+): máximos a m/z 5201.1 y 13449.6.

ANÁLISIS ELEMENTAL para $C_{603} H_{1200} O_{268}$, **calculado:** C, 56.94; H, 9.44., **experimental:** C, 56.44; H, 9.47.

Compuesto [2]

Descrito por Hult *et al.*, *Macromolecules* **1998**, 31 (13), 4061-4068. (Referencia 63).



En un matraz se disuelve ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico (10 g, 74.5 mmol), 2,2-dimetoxipropano (13.8 mL, 112 mmol) y ácido p-toluensulfónico monohidrato (0.7 g, 3.7 mmol) en 50 mL de acetona seca. La mezcla de reacción se agita durante 2 horas en atmósfera de argón a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se adiciona a la mezcla de reacción 1 mL de una mezcla amoniaco/etanol 1.1 (v/v). A continuación se elimina el disolvente en rotavapor y el residuo blanco se redisuelve en 250 mL de diclorometano. La fase orgánica se extrae con 20 mL de agua (x2), se seca con $MgSO_4$, se filtra y evapora a sequedad. El producto se obtiene como un sólido blanco. 10.3 g. Rto.: 79 %.

1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm): 1.21 (s, 3H, D), 1.42 (s, 3H, A), 1.45 (s, 3H, A'), 3.68 (d, $J=12$ Hz, 2H, C), 4.18 (d, $J=12$ Hz, 2H, C').

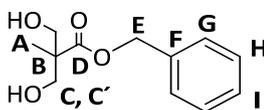
^{13}C -RMN (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm): 18.4 (D), 21.8 (A), 25.3 (A'), 41.7 (E), 65.9 (C, C'), 98.3 (B), 180.0 (F).

FT-IR (cm^{-1} , KBr): 3142 (COO-H st), 2995-2891 (C-H st), 1723 (C=O).

MS (ESI+) para $C_8H_{14}O_4$, **calculado:** 174.09, **experimental:** ($M+Na^+$) 196.9.

Compuesto [3]

Descrito por Hult *et al.*, *Macromolecules* **1998**, 31 (13), 4061-4068. (Referencia 63).



En un matraz se disuelve ácido 2,2-bis(hidroximetil)propionico (18 g, 134 mmol) y KOH (8.6 g, 154 mmol) en 100 mL de dimetilformamida seca. La reacción se mantiene a 100 °C durante una hora. Transcurrido este tiempo se adiciona bromuro de bencilo (19 mL, 162 mmol). La mezcla de reacción se mantiene durante 15 horas a 100 °C. El crudo de reacción se evapora en el rotavapor y se redisuelve en 300 mL de diclorometano. A continuación se extrae con 50 mL de agua (x2), se seca la fase orgánica con MgSO₄, se filtra y el disolvente se evapora en el rotavapor. El aceite amarillo obtenido se cristaliza en una mezcla diclorometano/hexano 1:1 (v/v). El producto se obtiene como un sólido blanco. Rto.: 43-54 %.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 1.08 (s, 3H, A), 3.74 (d, *J*=12 Hz, 2H, C), 3.94 (d, *J*=12 Hz, 2H, C'), 5.21 (s, 2H, E), 7.36 (m, 5H, G, H, I).

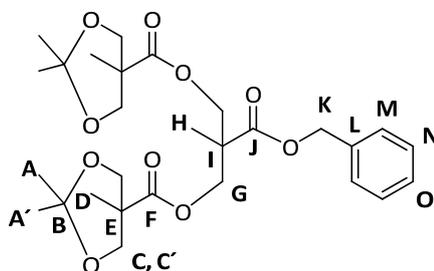
¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 17.2 (A), 49.3 (B), 66.7 (C, C'), 68.4 (E), 127.9 (G), 128.4 (I), 128.7 (H), 175.8 (D).

IR (cm⁻¹, nujol): 3351.6 (OH), 2923.2-2853.2 (C-H st), 1701.3 (C=O st).

MS (MALDI+) para C₁₂H₁₆O₄, calculado: 224.2, experimental: (M+Na⁺) 246.8.

Compuesto [4]

Descrito por Hult *et al.*, *Macromolecules* **1998**, 31 (13), 4061-4068. (Referencia 63).



En un matraz se disuelven **[2]** (10 g, 57.4 mmol), **[3]** (6.1 g, 27.4 mmol) y DPTS (3.2 g, 10.9 mmol) en 90 mL de diclorometano seco. La mezcla de reacción se enfría a 0 °C y se purga con argón. A continuación se añade N,N'-diciclohexilcarbodimida (DCC) (14.3 g, 69.1 mmol) previamente disuelta en diclorometano. La mezcla de reacción se mantiene a temperatura ambiente y en atmósfera de argón durante una noche. El precipitado de N,N'-diciclohexilurea (DCU) formado se filtra y el filtrado se evapora en el rotavapor para obtener un aceite amarillo. El crudo se purifica por cromatografía en columna eluyendo inicialmente con hexano e incrementando gradualmente la polaridad del disolvente de elución hasta hexano/acetato de etilo 60:40. El producto se obtiene en forma de aceite amarillento viscoso. 10.2 g. Rto.: 70 %.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 1.09 (s, 3H, D), 1.30 (s, 3H, H), 1.34 (s, 3H, A), 1.41 (s, 3H, A'), 3.58 (d, *J*=12 Hz, 4H, C), 4.11 (d, *J*=12 Hz, 4H, C'), 4.34 (s, 4H, G), 5.16 (s, 2H, K), 7.34 (m, 5H, M, N, O).

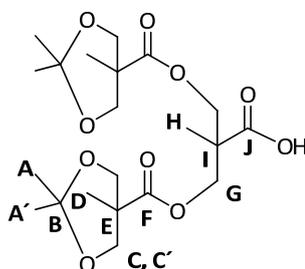
¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 17.6 (H), 18.4 (D), 22.2 (A), 24.9 (A'), 42.0 (E), 46.8 (I), 65.3 (C, C'), 65.9 (G), 66.9 (K), 98.0 (B), 128.1 (M), 128.3 (O), 128.5 (N), 135.4 (L), 172.3 (J), 173.4 (F).

FT-IR (cm⁻¹, puro): 2991.4-2876.7 (C-H st), 1737 (C=O st).

MS (MALDI+) para C₂₉H₄₃O₁₀, **calculado:** 536.6, **experimental:** (M+Na⁺) 559.2.

Compuesto [5]

Descrito por Hult *et al.*, *Macromolecules* **1998**, 31 (13), 4061-4068. (Referencia 63).



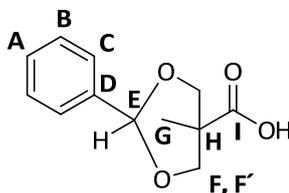
En un matraz se disuelve **[4]** (4 g, 7.5 mmol) en 40 mL de acetato de etilo y se añade un 10 % en peso de Pd/C. Se realizan 3 ciclos vacío-argón y la mezcla de reacción se deja en atmósfera de hidrógeno durante 4 horas a temperatura ambiente. El crudo se filtra sobre Celite® para eliminar el Pd/C. El producto se obtiene como un sólido blanco tras la evaporación del disolvente. 2.8 g. Rto.: 83 %.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 1.15 (s, 3H, D), 1.31 (s, 3H, H), 1.35 (s, 3H, A), 1.41 (s, 3H, A'), 3.62 (d, J=12 Hz, 4H, C), 4.16 (d, J=12 Hz, 4H, C'), 4.33 (s, 4H, G).

FT-IR (cm⁻¹, neto, película delgada sobre NaCl): 3180 (COO-H st), 2988-2884 (C-H st), 1731 (C=O).

Compuesto [6]

Descrito por Fréchet *et al.*, *JACS* **2001**, 123 (25), 5908-5917. (Referencia 62).



En un matraz se adiciona ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico (15 g, 111.8 mmol), α,α- dimetoxitolueno (25.5 mL, 166.6 mmol) y ácido p-toluensulfónico (1.05 g, 5.5 mmol) en 120 mL de acetona seca. La mezcla de reacción se agita durante 4 horas. Transcurrido este tiempo, se mantiene el matraz de reacción en

el frigorífico durante toda la noche. El sólido blanco formado se filtra y se lava con acetona fría. Rto: 31-64 %.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 1.11 (s, 3H, G), 3.70 (d, $J=11.7$ Hz, 2H, F), 4.64 (d, $J=11.4$ Hz, 2H, F'), 5.49 (s, 1H, E), 7.37 (m, 3H, A, B), 7.47 (m, 2H, C).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 17.7 (G), 42.1 (H), 73.4 (F), 101.9 (E), 126.2 (C), 128.3 (B), 129.0 (A), 137.5 (D), 178.8 (I).

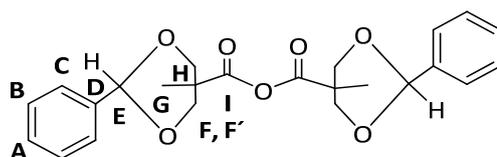
FT-IR (cm^{-1} , KBr): 3005 (OH), 2865 (C-H st), 1702 (C=O).

MS (ESI+) para $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4$, calculado: 222.24, experimental: ($\text{M}+\text{Na}^+$) 245.

ANÁLISIS ELEMENTAL para $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4$, calculado: C, 64.85; H, 6.35., experimental: C, 64.39; H, 6.37.

Compuesto [7]

Descrito por Fréchet *et al.*, *JACS* **2001**, *123* (25), 5908-5917. (Referencia 62).



En un matraz se disuelve [6] (15.5 g., 69.7 mmol) en 100 mL de diclorometano seco. En otro matraz se disuelve DCC (8.05 g, 39 mmol) en 40 mL de diclorometano seco. La disolución de DCC se añade sobre la disolución del compuesto [6] y la mezcla de ambos se deja con agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. El subproducto DCU formado se filtra y se lava con un pequeño volumen de diclorometano. El filtrado se concentra en rotavapor y se precipita en 1 L de hexano. Tras la filtración se obtiene [7] como un sólido blanco. Rto.: 88-96 %.

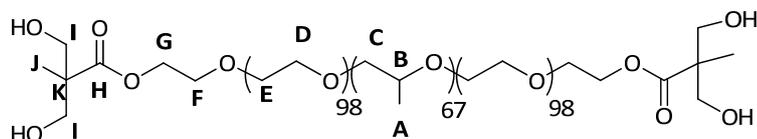
$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 1.12 (s, 6H, G), 3.69 (d, $J=11.6$ Hz, 4H, F), 4.66 (d, $J=11.7$ Hz, 4H, F'), 5.47 (s, 2H, E), 7.34 (m, 6H, A, B), 7.45 (m, 4H, C).⁶²

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 16.9 (G), 44.2 (H), 73.2 (F, F'), 102.1 (E), 126.3 (C), 128.2 (B), 129.1 (A), 137.6 (D), 169.1 (I).

FT-IR (cm^{-1} , KBr): 2865 (C-H st), 1816 (C=O st sim), 1746 (C=O st as).

MS (MALDI+) para $\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{O}_7$, calculado: 426.46, experimental: 465.1 ($\text{M}+\text{K}^+$)

Compuesto F127-OH-4 [9]



En un matraz se disuelven 9.5 g (0.73 mmol) de **[8]** en 200 mL de acetato de etilo. Una vez disuelto se añade un 10 % en peso de Pd/C. A continuación se realizan 3 ciclos vacío-argón y se deja la mezcla de reacción bajo atmósfera de hidrógeno durante toda la noche. El Pd se filtra sobre Celite® y el filtrado se evapora a sequedad para obtener un sólido blanco. Rto.: 96%.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 1.11 (s, 6H, J), 1.13 (m, 201H, A), 3.37-3.82 (m, ~1100H, B, C, D, E, F, I), 4.34 (m, 4H, G).

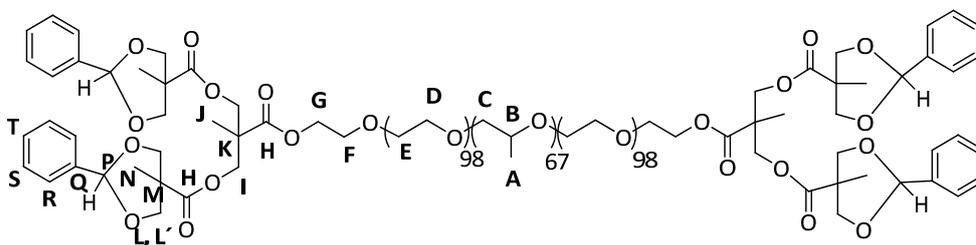
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 17.1 (J), 17.3- 17.4 (A), 49.5 (K), 63.2 (G), 67.3 (I), 68.7 (F), 70.5 (D, E), 72.9- 73.3 (C), 75.1- 75.3- 75.5 (B), 175.6 (H).

FT-IR (cm⁻¹, neto, película delgada sobre NaCl): 3482 (OH), 2884 (C-H st), 1728 (C=O), 1112 (C-O-C).

MS (MALDI+): máximos a m/z 5213.9 y 13780.1.

ANÁLISIS ELEMENTAL para C₆₀₇H₁₂₁₂O₂₇₂, calculado: C, 56.42; H, 9.44., experimental: C, 56.04; H, 9.98.

Compuesto F127-Bn-4 [10]



En un matraz se disuelven 4 g (0.31 mmol) de **[9]** en 15 mL de diclorometano seco. Una vez disuelto se añade **[7]** (2.13 g, 4.99 mmol) y DMAP (122 mg, 1 mmol). La mezcla de reacción se deja bajo atmósfera de argón, a temperatura ambiente durante 3 días. Transcurrido este tiempo se añaden 6 mL de metanol,

para la destrucción del anhídrido en exceso, y la mezcla se agita durante 7 horas. El crudo de reacción se vierte sobre 500 mL de dietil éter frío. El precipitado formado se filtra y lava con dietil éter frío para obtener **[10]**. Sólido blanco. Rto.: 71-94 %

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 0.93 (s, 12H, N), 1.13 (m, 201H, A), 1.24 (s, 6H, J), 3.37-3.82 (m, ~1100H, B, C, D, E, F, L), 4.11 (m, 4H, G), 4.37 (s, 8H, I), 4.56 (d, *J*=11.5 Hz, 8H, L'), 5.40 (s, 4H, P), 7.28 (m, 12H, S, T), 7.38 (m, 8H, R).

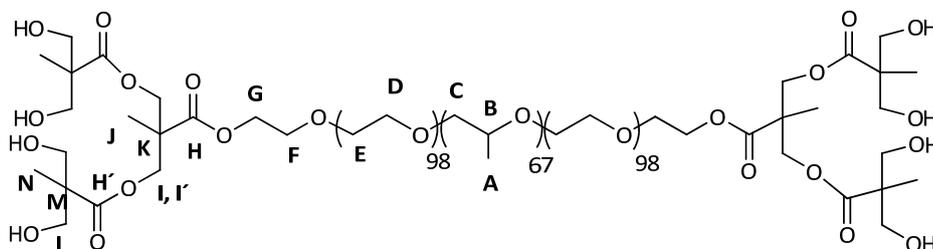
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 17.3- 17.4 (A), 17.6 (N), 17.7 (J), 42.5 (K), 46.7 (M), 64.1 (G), 65.4 (I), 68.4-68.6 (F), 70.5 (D, E), 72.9- 73.3 (C, L, L'), 75.1- 75.3- 75.5 (B), 101.6 (P), 126.1 (R), 128.0 (T), 128.8 (S), 137.7 (Q), 173.1 (H).

FT-IR (cm⁻¹, neto, película delgada sobre NaCl): 2883 (C-H st), 1741 (C=O), 1113 (C-O-C).

MS (MALDI+): máximos a *m/z* 5615.9 y 13844.4.

ANÁLISIS ELEMENTAL para C₆₅₅H₁₂₆₀O₂₈₄, **calculado**: C, 57.59; H, 9.23., **experimental**: C, 56.89; H, 9.74.

Compuesto F127-OH-8 [11]



En un matraz se disuelve **[10]** (2.8 g, 0.21 mmol) en 100 mL de acetato de etilo. Una vez disuelto se añade un 10 % en peso de Pd/C. A continuación se realizan 3 ciclos vacío-argón y se deja la reacción bajo atmósfera de hidrógeno durante toda la noche. El Pd se filtra sobre Celite® y el filtrado se evapora a sequedad para obtener un sólido blanco. Rto.: 96% - Cuantitativo.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 1.05 (s, 12H, N), 1.13 (m, 201H, A), 1.28 (s, 6H, J), 3.37-3.79 (m, ~1100H, B, C, D, E, F, L), 4.26-4.38 (ll'q, 8H, Δv_{ll'}=35 Hz, J_{ll'}=11.2 Hz, I, I'), 4.26 (m, 4H, G).

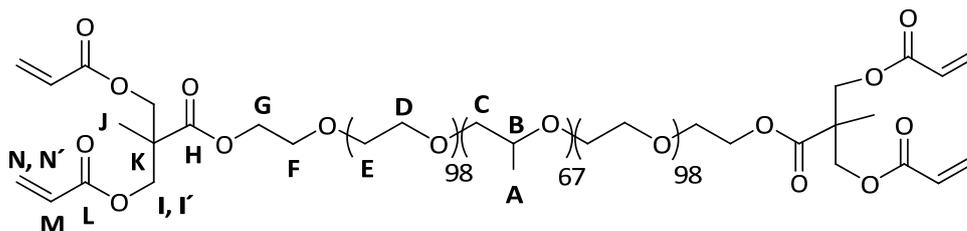
¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 17.1 (N), 17.3- 17.4 (A), 17.9 (J), 46.4 (K), 49.7 (M), 64.3 (I), 64.9 (G), 67.3-67.4 (L), 68.5-68.8 (F), 70.5 (D, E), 72.9- 73.3 (C), 75.1- 75.3- 75.5 (B), 172.9 (H), 174.9 (H').

FT-IR (cm⁻¹, neto, película delgada sobre NaCl): 3457 (OH), 2884 (C-H st), 1733 (C=O), 1113 (C-O-C).

MS (MALDI+): máximos a m/z 5286.1 y 13693.8.

ANÁLISIS ELEMENTAL para C₆₂₇H₁₂₄₄O₂₈₄, calculado: C, 56.59; H, 9.36., experimental: C, 56.17; H, 9.98.

Compuesto F127-Ac-4 [12]



En un matraz se disuelve [9] (2.0 g, 0.16 mmol) en 20 mL de diclorometano seco. Se añade trietilamina (0.39 mL, 2.76 mmol) y 4-metoxifenol (200 mg) como inhibidor de la polimerización. Se realizan en la mezcla de reacción tres ciclos vacío-argón y a continuación la mezcla se enfría con hielo. Transcurridos 10 minutos se añade cloruro de acrililoilo (0.22 mL, 2.66 mmol), gota a gota, con agitación y la mezcla de reacción se deja bajo atmósfera de argón y en oscuridad durante 48 horas. El crudo de reacción se filtra a través de una columna de alúmina neutra para eliminar el subproducto formado, y el filtrado se seca con Na₂CO₃ anhidro durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se filtra y el filtrado se concentra en rotavapor. A continuación, el concentrado se precipita en 300 mL de dietil éter frío. El producto se obtiene como un sólido blanco tras la filtración. Rto.: 45-78%

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 1.13 (m, 201H, A), 1.30 (s, 6H, J), 3.37-3.82 (m, \sim 1100H, B, C, D, E, F), 4.34 (ll'q, 8H, $\nu_{\text{ll}}=7.6$ Hz, $J_{\text{ll}}=11.2$ Hz, l, l'), 4.27 (m, 4H, G), 5.85 (dd, $J_{\text{cis}}=10.4$ Hz, $J_{\text{gem}}=1.3$ Hz, 4H, N), 6.10 (dd, $J_{\text{trans}}=17.2$ Hz, $J_{\text{cis}}=10.4$ Hz, 4H, M), 6.39 (dd, $J_{\text{trans}}=17.2$ Hz, $J_{\text{gem}}=1.3$ Hz, 4H, N').

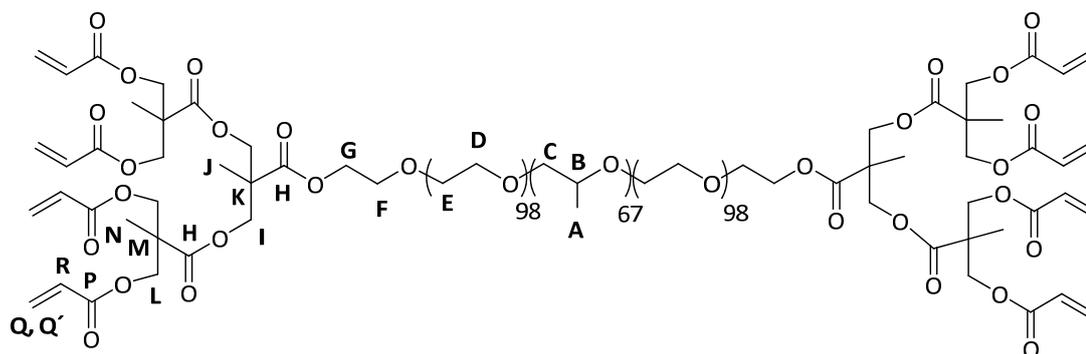
$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 17.3- 17.4 (A), 17.7 (J), 46.3 (K), 65.4 (I), 68.7 (G), 70.5 (D, E, F), 72.9- 73.3 (C), 75.1- 75.3- 75.5 (B), 127.8 (M), 131.2 (N, N'), 165.4 (L), 172.5 (H).

FT-IR (cm^{-1} , neto, película delgada sobre NaCl): 2869 (C-H st), 1733 (C=O), 1110 (C-O-C).

MS (MALDI+): máximos a m/z 5920.3 y 13255.4.

ANÁLISIS ELEMENTAL para $\text{C}_{619}\text{H}_{1220}\text{O}_{276}$, calculado: C, 56.93; H, 9.35., experimental: C, 56.52; H, 9.73.

Compuesto F127-Ac-8 [13]



En un matraz se disuelve **[11]** (1.5 g, 0.11 mmol) en 20 mL de diclorometano seco. Se añade trietilamina (0.55 mL, 3.98 mmol) y 4-metoxifenol (200 mg) como inhibidor de polimerización. Se realizan en el medio de reacción tres ciclos vacío-argón y a continuación se enfría la mezcla con hielo. Tras 10 minutos se añade cloruro de acrililo (0.29 mL, 3.61 mmol), gota a gota, y con agitación y la mezcla de reacción se deja bajo atmósfera de argón y en oscuridad durante 72 horas. El crudo de reacción se filtra a través de una columna de alúmina neutra y el filtrado se seca con Na_2CO_3 anhidro durante 2 horas. El filtrado se concentra en

rotavapor y se purifica por precipitación en 250 mL de dietil éter frío. El producto se obtiene tras filtración como un sólido blanco. Rto.: 47-82 %.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 1.13 (m, 201H, A), 1.23 (s, 6H, J), 1.27 (s, 12H, N), 3.37-3.87 (m, ~1100H, B, C, D, E, F), 4.23-4.30 (m, 28H, G, I, L), 5.85 (dd, $J_{cis}=10.4$ Hz, $J_{gem}=1.3$ Hz, 4H, Q), 6.10 (dd, $J_{trans}=17.3$ Hz, $J_{cis}=10.4$ Hz, 4H, R), 6.39 (dd, $J_{trans}=17.3$ Hz, $J_{gem}=1.3$ Hz, 4H, Q').

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 17.3- 17.4 (A), 17.7 (J, N), 45.8 (K), 46.5 (M), 64.9 (G), 65.3-65.6 (I, L), 68.5-68.7 (F), 70.5 (D, E), 72.9- 73.3 (C), 75.1- 75.3- 75.5 (B), 127.7 (Q), 131.5 (R), 165.4 (P), 171.9-172.0 (H).

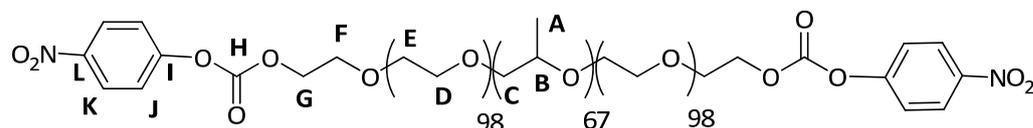
FT-IR (cm⁻¹, neto, película delgada sobre NaCl): 2867 (C-H st), 1733 (C=O), 1109 (C-O-C).

MS (MALDI+): máximos a m/z 5761.4 y 14176.6.

ANÁLISIS ELEMENTAL para C₆₅₁H₁₂₆₀O₂₉₂, calculado: C, 56.90; H, 9.18., **experimental:** C, 56.48; H, 9.66.

Compuesto F127-PN-2 [14]

Descrito por Park *et al.* *Langmuir* **2006**, 22 (4), 1758-1762.



Procedimiento experimental con condiciones de reacción B

En un matraz se pesa Pluronic F127® (5 g, 0.40 mmol), previamente seco y se disuelve en 15 mL de diclorometano seco. A continuación se añade piridina seca (0.9 mL) y cloroformiato de p-nitrofenilo (0.65 g, 3.2 mmol) bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se mantiene a temperatura ambiente, con agitación durante toda la noche. El crudo de reacción se diluye con 50 mL de diclorometano y se extrae con NaHSO₄ 1 M (2 x 30 mL) y disolución de NaCl saturada (1 x 30 mL). La fase orgánica se seca con MgSO₄ y se concentra en rotavapor. La fase orgánica concentrada se precipita en 200 mL de dietil éter frío.

El producto se obtiene tras filtración y lavado con dietil éter frío como un sólido blanco. Rto.: 75-85 %.

Procedimiento experimental con condiciones de reacción D

En un matraz se pesa Pluronic F127[®] (5 g, 0.40 mmol), previamente seco, y se disuelve en 15 mL de diclorometano seco.

Por otro lado, se disuelve cloroformiato de p-nitrofenilo (1.13 g, 5.60 mmol) en 5 mL de diclorometano, y se añade bajo atmósfera de argón sobre la disolución anterior.

A la disolución resultante se le adiciona DMAP (0.68 g, 5.60 mmol), previamente disuelta en 5 mL de diclorometano. La mezcla de reacción se mantiene bajo agitación y en atmósfera de argón durante 4 horas. Transcurrido este tiempo, el crudo de reacción se vierte sobre 350 mL de dietil éter frío. El sólido blanco que precipita se filtra y lava con dietil éter frío y a continuación, se redisuelve en 100 mL de diclorometano. La fase orgánica se extrae con HCl 1N (2x75 mL) y con disolución saturada de NaCl (1x75 mL) para eliminar el cloruro de dimetilaminopiridinio formado en la reacción, se seca con MgSO₄ anhidro y se evapora hasta sequedad. El producto se obtiene como un sólido blanco. Rto: 65-74 %.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.13 (m, 201H, A), 3.37-3.85 (m, ~1000H, B, C, D, E, F), 4.41-4.44 (m, 4H, G), 7.38 (m, 4H, J), 8.26 (m, 4H, K).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 17.4- 17.5 (A), 68.4 (G), 68.7 (F), 70.7 (D, E), 72.9- 73.5 (C), 75.2- 75.4- 75.6 (B), 121.8 (J), 125.4 (K), 145.5 (L), 152.5 (H), 155.6 (I).

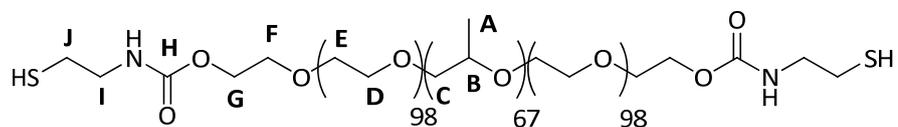
FT-IR (cm⁻¹, neto, película delgada sobre NaCl): 2867 (C-H st), 1769 (C=O st carbonato), 1520 (NO₂ st as), 1200 (C-O st as carbonato), 1110 (C-O-C).

MS (MALDI+): máximos a m/z 4999.3 y 12842.8.

ANÁLISIS ELEMENTAL para C₆₁₁H₁₂₀₂N₂O₂₇₄, calculado: C, 56.63; N, 0.22; H, 9.28., **experimental:** C, 56.12; N, 0.11; H, 8.64.

Compuesto F127-SH-2 [15]

Descrito por Park *et al.*, *Langmuir* **2006**, 22 (14), 6380-6384.

**Método de síntesis E**

En un matraz se disuelve **[14]** (0.5 g, 0.041 mmol) en 25 mL de agua destilada. A continuación se añade dihidrocloruro de 2, 2'-diaminoetil disulfuro (cistamina) y 0.5 mL de TEA. La mezcla de reacción se mantiene a temperatura ambiente y atmósfera de argón durante toda la noche. A continuación el crudo de reacción se dializa con membrana (Spectra/Por® Dialysis membrane MWCO 3500, Spectrum) hasta la desaparición de la tonalidad amarillenta del subproducto de reacción p-nitrofenol (7 días). Una vez eliminado el subproducto se añade al dializado 148 mg de D,L- ditioneitol (DTT) como agente reductor y se deja reaccionar durante 6 horas en atmósfera de argón. El crudo se dializa durante 3 días utilizando buffer de citrato a pH=4 para la eliminación del agente reductor. El producto se obtiene tras liofilización del dializado.

Método de síntesis F

En un matraz se disuelve **[14]** (2 g, 0.16 mmol) en 30 mL de diclorometano seco. A continuación se añade cisteamina (24 mg, 0.32 mmol) bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se mantiene a temperatura ambiente con agitación durante toda la noche. El crudo de reacción se precipita en 200 mL de dietil éter frío, se filtra y se lava con dietil éter frío para eliminar el subproducto p-nitrofenol. El producto se obtiene como un sólido amarillo. Rto.: 91-96%.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 1.13 (m, 201H, A), 2.79 (t, 4H, J), 3.37-3.77 (m, ~1000H, B, C, D, E, F, I), 4.20 (m, 4H, G).

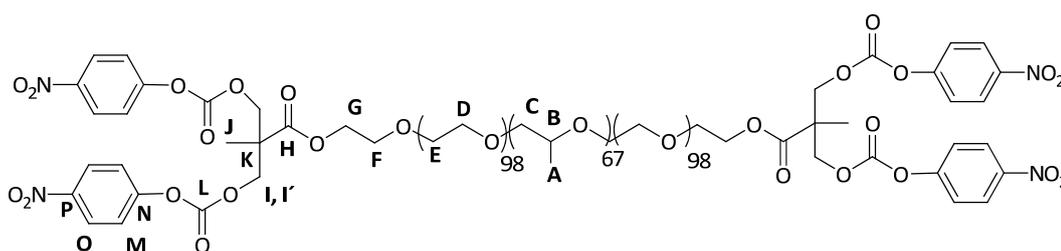
¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 17.4- 17.5 (A), 38.2 (J), 39.9 (I), 64.2 (G), 68.6-68.7-69.7 (F), 70.7 (D, E), 72.9- 73.5 (C), 75.2- 75.4- 75.6 (B).

FT-IR (cm^{-1} , neto, película delgada sobre NaCl): 2867 (C-H st), 1732 (C=O carbamato), 1525 (NO_2 st as), 1108 (C-O-C).

MS (MALDI+): máximo a m/z 4849.7.

ANÁLISIS ELEMENTAL para $\text{C}_{603}\text{H}_{1206}\text{N}_2\text{O}_{268}\text{S}_2$, **calculado**: C, 56.50; N, 0.22; H, 9.42, S, 0.50., **experimental**: C, 55.83; N, 0.11; H, 8.64, S, 0.76.

Compuesto F127-PN-4 [16]



En un matraz se pesa **[9]** (2.3 g, 0.18 mmol) y se disuelve en 17 mL de diclorometano seco. A continuación se añade piridina seca (0.8 mL) y cloroformiato de p-nitrofenilo (0.6 g, 2.9 mmol) bajo atmósfera de argón. La reacción se mantiene a temperatura ambiente, con agitación durante toda la noche. El crudo de reacción se diluye con 50 mL de diclorometano y se extrae con NaHSO_4 1 M (2 x 30 mL) y disolución de NaCl saturada (1 x 30 mL). La fase orgánica se seca con MgSO_4 y se concentra en rotavapor. El concentrado se vierte sobre 200 mL de dietil éter frío. El producto que precipita se obtiene tras filtración y lavado con dietil éter frío como un sólido blanco. Rto.: 71-92%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 1.13 (m, 201H, A), 1.38 (s, 6H, J), 3.37-3.85 (m, ~1000H, B, C, D, E, F), 4.34 (m, 4H, G), 4.52 (ABq, 8H, $\Delta\nu_{AB}=31.8$ Hz, $J_{AB}=9$ Hz, I, I'), 7.37 (m, 8H, M), 8.26 (m, 8H, O).

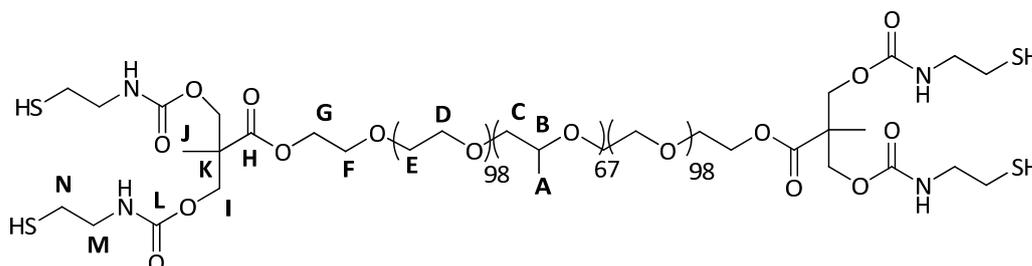
$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 17.4- 17.5 (A), 17.7 (J), 46.5 (K), 64.5 (G), 68.6-68.7-69.2 (F), 70.7 (D, E, I, I'), 72.9- 73.5 (C), 75.2- 75.4- 75.6 (B), 121.7 (M), 125.3 (O), 145.5 (P), 152.1 (L), 155.2 (N), 171.5 (H).

FT-IR (cm^{-1} , neto, película delgada sobre NaCl): 2867 (C-H st), 1772 (C=O st carbonato), 1732 (C=O ester), 1527 (NO_2 st as), 1212 (C-O st as carbonato), 1113 (C-O-C).

MS (MALDI+): máximos a m/z 5340.8 y 13561.3.

ANÁLISIS ELEMENTAL para $\text{C}_{635}\text{H}_{1224}\text{N}_4\text{O}_{288}$, calculado: C, 54.65; N, 0.40; H, 8.78., **experimental:** C, 56.10; N, 0.35; H, 9.02.

Compuesto F127-SH-4 [17]



En un matraz se disuelve **[16]** (1.7 g, 0.13 mmol) en 30 mL de diclorometano seco. A continuación se añade cisteamina (50 mg, 0.65 mmol) bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se deja a temperatura ambiente, con agitación durante toda la noche. El crudo de reacción se precipita en 200 mL de dietil éter frío, se filtra y se lava con dietil éter frío para eliminar el p-nitrofenol. El producto se obtiene como un sólido amarillo. Rto.: 92%-Cuantitativo.

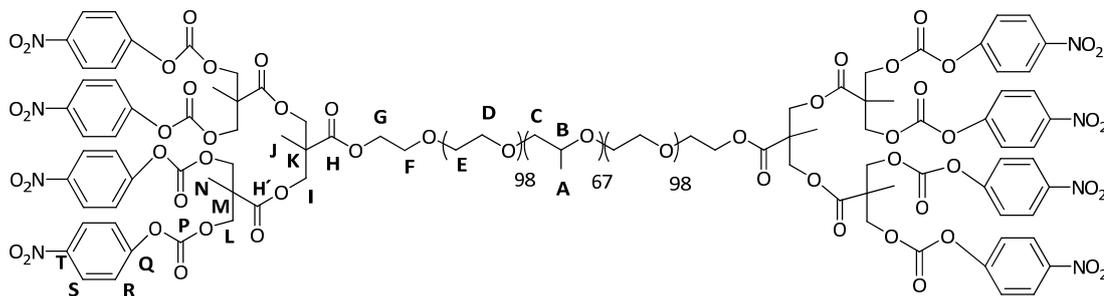
$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 1.13 (m, 201H, A), 1.23 (s, 6H, J), 2.79-2.95 (m, 8H, N), 3.37-3.76 (m, $\sim 1000\text{H}$, B, C, D, E, F, M), 4.27 (m, 12H, I, G).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 17.4- 17.5 (A), 18.3 (J), 38.5 (N), 41.8 (M), 64.2 (I), 67.4 (G), 68.6-68.7-69.0 (F), 70.7 (D, E), 72.9- 73.5 (C), 75.2- 75.4- 75.6 (B), 156.2 (L).

FT-IR (cm^{-1} , neto, película delgada sobre NaCl): 2880 (C-H st), 1733 (C=O st carbamato, C=O ester), 1112 (C-O-C).

MS (MALDI+): máximos a m/z 5184.5 y 13217.4.

ANÁLISIS ELEMENTAL para $\text{C}_{619}\text{H}_{1232}\text{N}_4\text{O}_{276}\text{S}_4$, calculado: C, 56.08; N, 0.42; H, 9.30, S, 0.97., **experimental:** C, 55.59; N, 0.14; H, 8.97, S, 1.29.

Compuesto F127-PN-8 [18]

En un matraz se pesa **[11]** (1.6 g, 0.12 mmol) y se disuelve en 50 mL de diclorometano seco. A continuación se añade piridina seca (1.3 mL) y cloroformiato de p-nitrofenilo (0.8 g, 3.9 mmol) bajo atmósfera de argón. La reacción se deja a temperatura ambiente, con agitación durante toda la noche. El crudo de reacción se diluye con 50 mL de diclorometano y se extrae con NaHSO_4 1 M (2 x 30 mL) y disolución de NaCl saturada (1 x 30 mL). La fase orgánica se seca con MgSO_4 y se concentra en rotavapor. El concentrado se precipita en 200 mL de dietil éter frío. El sólido blanco obtenido se filtra y se lava con dietil éter frío. Rto.: 80-92 %.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 1.13 (m, 201H, A), 1.34 (s, 6H, J), 1.37 (s, 12H, N), 3.37-3.85 (m, ~1000H, B, C, D, E, F), 4.27 (m, 4H, G), 4.45 (m, 24H, I, L), 7.37 (m, 16H, R), 8.26 (m, 16H, S).

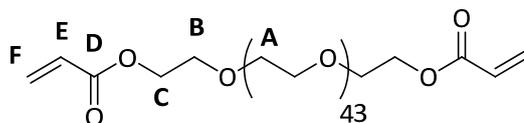
$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 17.4- 17.5 (A), 17.7 (J, M), 46.6 (K, M), 65.8 (G), 69.1 (F), 70.7 (D, E, I), 72.9- 73.5 (C), 75.2- 75.4- 75.6 (B), 121.7 (R), 125.3 (S), 145.6 (T), 152.0 (P), 155.2 (Q), 171.05 (H, H').

FT-IR (cm^{-1} , neto, película delgada sobre NaCl): 2867 (C-H st), 1771 (C=O st carbonato), 1736 (C=O st ester), 1526 (NO_2 st as), 1212 (C-O st as carbonato), 1008 (C-O-C).

MS (MALDI+): máximos a m/z 5871.7 y 14635.1.

ANÁLISIS ELEMENTAL para $\text{C}_{683}\text{H}_{1268}\text{N}_8\text{O}_{316}$, calculado: C, 56.07; N, 0.77; H, 8.67.,
experimental: C, 55.62; N, 0.67; H, 7.66.

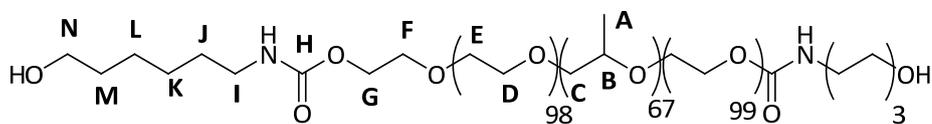
Compuesto PEG-Ac-2 [19]



En un matraz se disuelve PEG (Pm=2000 g/mol) (1 g, 0.51 mmol) en 15 mL de diclorometano seco. A continuación se añade TEA (0.65 mL, 4.7 mmol) y 4-metoxifenol (50 mg) como inhibidor. Se realizan al medio de reacción tres ciclos vacío-argón y a continuación se enfría la mezcla de reacción con hielo. Transcurridos 10 minutos se añade cloruro de acrililoilo (0.34 mL, 4.2 mmol), gota a gota, con agitación y la mezcla de reacción se deja bajo atmósfera de argón y en oscuridad durante 24 horas. El crudo de reacción se filtra a través de una columna de alúmina neutra para eliminar cloruro de tretimonio formado como subproducto y el filtrado se seca con Na₂CO₃ anhidro durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se filtra y el filtrado se concentra en rotavapor. A continuación el concentrado se vierte en 200 mL de dietil éter frío. El producto se obtiene como un sólido blanco tras la filtración. 0.9 g. Rto.: 82%

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 3.64 (s, 180H, A), 3.74 (t, 4H, B), 4.31 (t, 4H, C), 5.83 (dd, *J*_{cis}=10.2 Hz, *J*_{gem}=1.5 Hz, 2H, F), 6.15 (dd, *J*_{trans}=17.1 Hz, *J*_{cis}=10.2 Hz, 2H, E), 6.42 (dd, *J*_{trans}=17.1 Hz, *J*_{gem}=1.5 Hz, 4H, F').

Compuesto F127-NH(CH₂)₆OH-2 [20]



En un matraz de disuelve [14] (2.5 g, 0.2 mmol) en 15 mL de diclorometano seco. A continuación se añade 6-amino-1-hexanol (50 mg, 0.43 mmol) bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se mantiene a temperatura ambiente con agitación durante toda la noche. El crudo de reacción se precipita en 200 mL de dietil éter frío, se filtra y se lava con dietil éter frío para eliminar p-nitrofenol

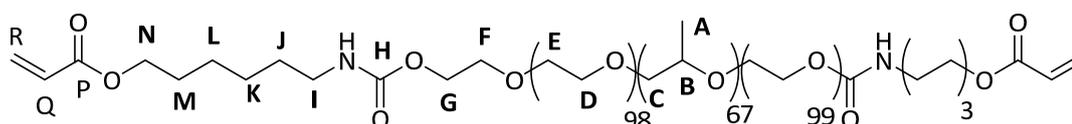
formado como subproducto. El producto se obtiene como un sólido blanco. 1.8 g. Rto.: 70%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 1.13 (m, 201H, A), 1.34 (m, 8H, K, L), 1.53 (m, 8H, J, M), 3.16 (q, 4H, I), 3.37-3.77 (m, $\sim 1000\text{H}$, B, C, D, E, N), 3.87 (m, 4H, F), 4.20 (m, 4H, G).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 17.4- 17.5 (A), 25.3 (L), 26.3 (J), 29.9 (K), 32.5 (M), 40.9 (I), 62.6 (G), 63.8 (N), 68.6 (F), 70.7 (D, E), 72.9- 73.5 (C), 75.2- 75.4- 75.6 (B), 156.4 (H).

FT-IR (cm^{-1} , neto, ATR): 2867 (C-H st), 1726 (C=O carbamato), 1108 (C-O-C).

Compuesto F127-NHAc-2 [21]



En un matraz se disuelve [20] (1.5 g, 0.12 mmol) en 15 mL de diclorometano seco. A continuación se añade TEA (0.14 mL, 1.04 mmol) y 4-metoxifenol (50 mg) como inhibidor. Se realizan a la mezcla tres ciclos vacío-argón y a continuación se enfría con hielo. Transcurridos 10 minutos se añade cloruro de acrililoilo (0.08 mL, 0.94 mmol), gota a gota con agitación y la reacción se deja bajo atmósfera de argón y en oscuridad durante 24 horas. El crudo de reacción se filtra a través de una columna de alúmina neutra para eliminar el subproducto cloruro de tretilamonio y el filtrado se seca con Na_2CO_3 anhidro durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se filtra y el filtrado se concentra en rotavapor. A continuación se precipita en 200 mL de dietil éter frío. El producto se obtiene como un sólido blanco tras la filtración. 1.2 g. Rto.: 78%

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 1.13 (m, 201H, A), 1.37 (m, 8H, K, L), 1.52 (m, 4H, J), 1.67 (m, 4H, M), 3.16 (q, 4H, I), 3.37-3.77 (m, $\sim 1000\text{H}$, B, C, D, E), 3.81 (m, 4H, F), 4.20 (m, 4H, G), 5.81 (dd, $J_{cis}=10.4$ Hz, $J_{gem}=1.6$ Hz, 2H, F), 6.10 (dd, $J_{trans}=17.2$ Hz, $J_{cis}=10.4$ Hz, 2H, E), 6.39 (dd, $J_{trans}=17.2$ Hz, $J_{gem}=1.6$ Hz, 4H, F').

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 17.4- 17.5 (A), 25.6 (L), 26.3 (K), 28.5 (K), 29.8 (M), 40.9 (I), 64.4 (N), 66.9 (G), 68.6 (F), 70.7 (D, E), 72.9- 73.5 (C), 75.2- 75.4- 75.6 (B), 128.6 (Q), 130.5 (R), 156.4 (H), 166.2 (P).

FT-IR (cm^{-1} , ATR): 2867 (C-H st), 1728 (C=O), (1108 (C-O-C)).

6.2.- PROTOCOLOS DE TRABAJO

a. Protocolo de estudio de gelificación mediante el método “de inversión del vial”

- Las disoluciones preparadas a las distintas concentraciones 16.5 %, 18 %, 20 %, 23 % y 25 % (w/v) en PBS 10 mM pH 7.4, se mantuvieron durante una noche a 4 °C y en oscuridad para asegurar la completa disolución del polímero.
- 100 µL de disolución a estudio se dispusieron en un vial de 2 mL.
- la muestra se calentó con un bloque calefactor a una velocidad de 1 °C/min con el fin de producir la transición sol-gel. Se consideró como temperatura de transición de fase (LCST) la temperatura a la cual, tras inversión del vial, no se observa flujo de la muestra durante 10 segundos.
- una vez alcanzado el estado gel se continuó calentando a la misma velocidad el gel físico hasta conseguir la transición de gel a disolución (transición gel-sol).

b. Protocolo de estudio de gelificación mediante DSC

- En cápsulas herméticas de DSC se colocaron entre 15 y 20 miligramos de muestra (disoluciones preparadas de la misma forma que en el método de *inversión del vial*).
- En el horno de DSC, a una velocidad de 5 °C/min, el material se sometió a un calentamiento de -10°C a 60°C y posterior enfriamiento de 60°C a -10°C, permitiendo un periodo de estabilización entre ambos de 5 minutos.

c. Protocolo de preparación de los hidrogeles fotopolimerizados

- El polímero fotopolimerizable (F127-Ac-2, F127-Ac-4 o F127-Ac-8) se disolvió en PBS 10 mM (pH 7.4) con 0.1% en peso de fotoiniciador Irgacure 2959 (I2959), a dos concentraciones diferentes del polímero: 18 % (w/v) y 23 % (w/v).
- La disolución se mantuvo una noche a 4 °C y en oscuridad para su completa disolución.

- 100 μ l de la disolución precursora fría se introdujeron en un molde cilíndrico abierto, de 6 mm de diámetro por 3 mm de altura, colocado sobre un porta de vidrio que sirvió como base y dispuesto todo el sistema sobre una placa calefactora.
- El sistema se calentó a 37°C comprobando la formación del gel.
- El gel se expuso a radiación ultravioleta (365 nm) durante 10 minutos, con una distancia de la lámpara a la muestra de 8 cm.
- Los hidrogeles fotopolimerizados formados se desmoldaron para su posterior estudio.

d. Protocolo de caracterización de los materiales por SEM

- Para llevar a cabo el estudio por SEM de los hidrogeles fotopolimerizados, éstos fueron incubados en 2 mL de PBS 10 mM pH 7.4 a 37 °C durante 3 días para conseguir el estado de equilibrio.
- Los hidrogeles equilibrados se introdujeron en nitrógeno líquido, se fracturaron y se liofilizaron durante una noche. La congelación con nitrógeno líquido y la posterior fractura en frío, permite que la morfología interna del hidrogel no se vea alterada en el proceso de fractura.
- Las muestras se fijaron en cinta de carbono y se recubrieron con oro para su observación por SEM.

e. Protocolo de estudio de degradación de los hidrogeles

- Los hidrogeles fotopolimerizados se pesaron (W_0 , peso inicial del hidrogel) e incubaron en 2 mL de PBS 10 mM pH 7.4 a 37 °C.
- El peso de la muestra se controló a intervalos regulares de tiempo (W_t) y después de cada pesada se añadió 2 mL de PBS nuevo para mantener las condiciones iniciales de incubación.
- El grado de hinchamiento se determinó mediante el cociente W_t/W_0 .
- Los ensayos se realizaron por triplicado.

f. Protocolo de ensayos de viabilidad celular en hidrogeles

- *Preparación de las células:* Las células MSC humanas utilizadas en los ensayos fueron cultivadas en medio de cultivo alfa-MEM (Minimum Essential Medium) con FGF (Fibroblast Growth Factor) y un 10 % de FBS (Fetal Bovine Serum). El medio se cambió cada 3 ó 4 días y las células fueron tripsinizadas, con el fin de separar las células de su soporte, cuando se alcanzó un 80 % de confluencia.

- *Preparación de las disoluciones de polímero:*

- el polímero en estado sólido se esterilizó previamente exponiéndolo a luz UV durante 1 hora.

- A continuación los polímeros esterilizados se disolvieron en la concentración correspondiente, en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), que contenía 0.1 % (w/v) de fotoiniciador I2959 o sin fotoiniciador en el caso de ensayos sin fotopolimerizar, manteniendo la muestra durante una noche a 4 °C. El medio de cultivo con o sin fotoiniciador se esterilizó previamente por filtración a través de un filtro de 0.22 µm.

- *Ensayos de viabilidad:*

Todos los ensayos tanto en entorno 2D como en 3D se han realizado por triplicado.

- preparación de muestras 2D: en una placa de 96 pocillos se sembraron 10000 células en cada pocillo, se cubrieron con 100 µL de la disolución de polímero y se incubaron durante 5 minutos a 37 °C hasta la formación del hidrogel físico.

Una vez formado el hidrogel físico, en el caso de los ensayos sin fotopolimerizar, o tras la fotopolimerización, en el caso de los ensayos con geles fotopolimerizados, se añadieron 100 µL de medio de cultivo fresco (DMEM con 20 % de FBS) para mantener las condiciones usuales de cultivo celular.

Para la realización de los ensayos celulares con el polímero en disolución se preparó una muestra del polímero del doble de la concentración

necesaria para el ensayo disuelta en DMEM. A continuación la disolución del polímero se diluyó a la mitad (concentración del ensayo) utilizando DMEM con 20 % de FBS, y se dejó disolver a 4 °C durante 1 hora.

200 µL de la disolución resultante se adicionaron a los pocillos sobre una capa de células para la determinación de la viabilidad celular en disolución.

- preparación de muestras 3D: las células se dispersaron en las disoluciones de polímero a una densidad final de 1×10^5 células/mL. 100 µL de las disoluciones de polímero con células se transfirieron a una placa de 96 pocillos (10000 células por pocillo), y se incubaron durante 5 minutos a 37 °C hasta la formación del hidrogel físico.

Una vez formado el hidrogel físico, en el caso de los ensayos sin fotopolimerizar, o tras la fotopolimerización en el caso de los ensayos fotopolimerizados se añadió 100 µL de medio de cultivo fresco (DMEM con 20 % de FBS) a cada pocillo, tras la formación del hidrogel, para mantener las condiciones habituales para el cultivo celular.

- *Proceso de fotopolimerización:*

- los hidrogeles con células en entorno 2D o 3D se incuban durante 5 min a 37 °C hasta la producción del gel físico.

- el gel se expone a radiación ultravioleta (365 nm) durante 10 minutos, con una distancia de la lámpara a la muestra de 8 cm.

- *Cálculo de viabilidad celular:*

- Los hidrogeles con células se cultivaron a 37 °C y 5% de CO₂ durante 24, 48 ó 72 horas.

Transcurridos estos tiempos, las células se tiñeron con Calcein AM y con Ethidium homodimer. Para realizar la tinción se adicionó en cada pocillo 50 µL de una disolución de la siguiente composición: 1µL de Calcein AM + 1µL de Ethidium homodimer + 660 µL de DMEM.

Las placas con agentes de tinción se incubaron durante 30 minutos a 37 °C y 5 % de CO₂. Transcurrido este tiempo, las células vivas y muertas se visualizaron utilizando microscopia de fluorescencia.

- Los porcentajes de viabilidad celular, frente a un control, se calcularon utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de viabilidad celular} = \frac{\% \text{ viabilidad celular}}{\% \text{ viabilidad celular control}} \times 100$$

El porcentaje de células vivas y muertas se determinó por conteo del número de células de cada tipo, conforme al método utilizado (ver *Anexo III*), y del número total de células. En cada uno de los 3 pocillos de cada ensayo realizado se tomaron 2 fotografías de dos zonas diferentes del pocillo. Los resultados mostrados son por tanto una media de 6 valores expresados con su correspondiente desviación estándar.

Como ensayo de control se prepararon 3 pocillos con el mismo número de células utilizadas en los ensayos 2D y 3D, 10000 células por pocillo, únicamente con medio de cultivo.

Al cabo de 24, 48 y 72 horas se determinó la viabilidad celular del control por fluorescencia, utilizando el método live/dead. Tras 72 horas de ensayo se obtuvo una viabilidad celular próxima al 99 % como se puede observar en la Figura 6.1.

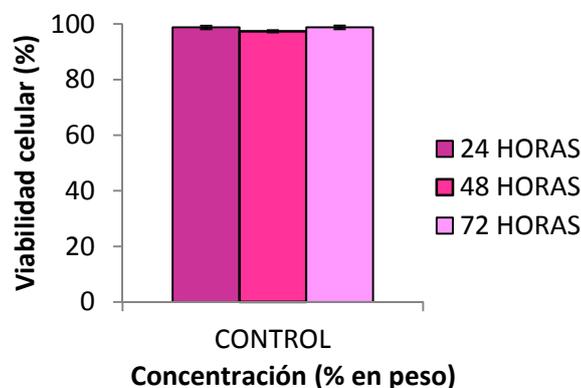


Figura 6.1. Viabilidad celular del ensayo de control.

- Marcaje de las células en hidrogeles para observación por microscopia confocal:

- Los hidrogeles con células se cultivaron a 37 °C y 5% de CO₂ durante 24 horas. A continuación, las células se tiñeron con 50 µL de una disolución de Calcein AM (1µL Calcein AM en 660 µL de DMEM). Las placas con tinción se incubaron durante 30 minutos a 37 °C y 5 % de CO₂. Una vez transcurrido ese tiempo se adicionaron 5 µL de DAPI directamente en el pocillo y las muestras se volvieron a incubar durante 30 minutos a 37 °C y 5 % de CO₂. Las células se visualizaron con microscopia confocal.

g. Protocolo de caracterización mecánica de los hidrogeles

- Los hidrogeles se fotopolimerizaron de la forma descrita en el apartado 6.2.c.
- Una vez obtenidos los geles fotopolimerizados fueron almacenados a 37 °C en PBS 10 mM pH=7.4 hasta su ensayo (nunca más de 4 horas).
- Los datos experimentales obtenidos en cada ensayo se analizaron mediante el uso de un ejecutable en el programa MatLab®, a partir del cual se generó la curva de tensión-deformación (σ - ϵ), de la que se obtuvieron diferentes parámetros mecánicos en función del método utilizado (monotónico o carga-relajación) y del tipo de ensayo en condiciones NC o CC.
- Los valores de los distintos parámetros mecánicos se muestran como la media de los valores obtenidos con 6 probetas ensayadas, con su correspondiente error.
- Para la realización de los ensayos de fatiga se han utilizado cámaras de ensayo (Figura 6.2) que permiten mantener los hidrogeles fotopolimerizados entre los dos émbolos metálicos, sumergidos en PBS 10 mM pH 7.4 a 37 °C, utilizando un baño termostatzado externo (Figura 6.3). Para evitar la aparición de hongos se adicionó al PBS un 1% v/v de una mezcla de antibióticos (Penicilina/Estreptomicina) y un 0.5% v/v de Fungizona.

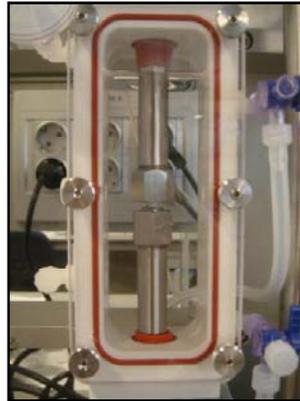


Figura 6.2. Detalle de las cámaras de ensayo utilizadas para los ensayos de fatiga.

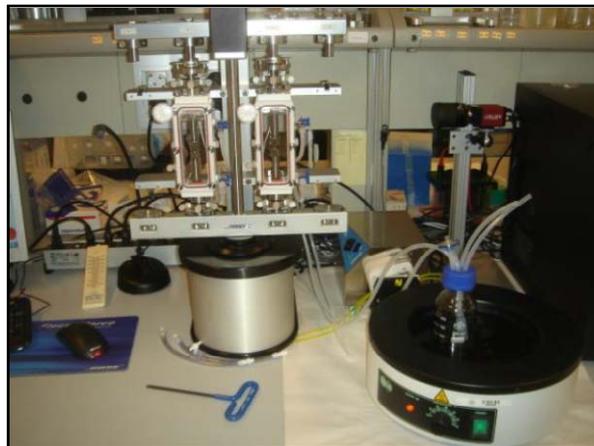


Figura 6.3. Detalle de las cámaras de ensayo utilizadas para los ensayos de fatiga con el baño termostatzado externo.

h. Protocolo de determinación de la CMC

- Las disoluciones de los copolímeros bloque lineal y dendrítico-lineal-dendrítico de mayor concentración (1, 0.5, 0.3 y 0.1 % (w/v)) se prepararon por disolución directa de los materiales en agua destilada. Las disoluciones de menor concentración (0.05, 0.01, 0.001, 0.0001 % (w/v)) se prepararon por dilución a partir de una disolución de mayor concentración. Todas las disoluciones se mantuvieron durante 4 horas a 4 °C.

- Para la preparación de la disolución de pireno se disolvieron 0.485 mg de pireno en 200 mL de agua (1.2×10^{-5} M). Para garantizar una completa disolución de éste y dada su baja solubilidad en agua, el pireno se disolvió previamente en acetona,

y esta disolución se adicionó sobre 200 mL de agua destilada. A continuación la acetona se evaporó durante 4 horas a vacío.

- Sobre las disoluciones acuosas de los diferentes copolímeros se adicionaron 10 μL de la disolución de pireno (1.2×10^{-5} M) para conseguir una concentración final de pireno de 6×10^{-8} M. Las disoluciones se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad.

- El espectro de excitación de las diferentes muestras con pireno se midió en el intervalo de 300 a 350 nm con $\lambda_{\text{emisión}}=390$ nm. De estos espectros se trabajó con el valor de la intensidad, a 332 nm (I_{332}) y a 335 nm (I_{335}), para cada una de las concentraciones de material preparadas.

i. Protocolo de preparación de nanogeles fotopolimerizados

- Se preparó una disolución al 10% (w/v) del copolímero en agua destilada, que contenía un 0.1% (w/v) de fotoiniciador Irgacure 2959 previamente disuelto. Esta disolución se mantuvo durante una noche a 4 °C para su completa disolución.

- Esta disolución al 10% (w/v) se filtró utilizando un filtro de 0.2 μm de acetato de celulosa para eliminar posibles partículas en suspensión.

- A partir de esta disolución del 10% (w/v) se prepararon disoluciones de concentración 0.77% (w/v), utilizando para su dilución una disolución acuosa con un 0.1% (w/v) de fotoiniciador I2959 previamente filtrada con filtro de 0.2 μm .

- Las disoluciones precursoras al 0.77% (w/v) se equilibraron durante 1 hora a temperatura ambiente, para conseguir el estado de equilibrio.

- 5 mL de las disoluciones precursoras con el copolímero reactivo se fotopolimerizaron en un recipiente de vidrio cilíndrico de 6 cm de diámetro, irradiando con luz ultravioleta (365 nm) durante 10 minutos a una distancia de 8 cm de la lámpara a la muestra.

- La fotopolimerización se llevó a cabo a 25 °C. Para mantener la temperatura de fotopolimerización constante se utilizó una placa calefactora, sobre la cual se colocó el molde cilíndrico de vidrio.

- Las disoluciones fotopolimerizadas se dializaron a 4 °C durante 24 horas (nanogeles de F127-Ac-2) y durante 72 horas (nanogeles de F127-Ac-4 y F127-Ac-8), utilizando una membrana de acetato de celulosa Spectra/Por® Biotech MWCO 300,000 (Spectrum) con un tamaño de poro de 30 nm. El mayor tiempo de diálisis aplicado para los nanogeles de los derivados F127-Ac-4 y F127-Ac-8 se debe al mayor peso molecular que presentan lo que disminuye la velocidad de diálisis, tal y como se observa en las especificaciones de la membrana de diálisis utilizada.
- A continuación, las muestras dializadas (más 1 mL de agua destilada utilizado para lavar la membrana de diálisis) se filtraron de nuevo con filtros de acetato de celulosa de 0.2 µm, para la eliminación de agregados de tamaño superior a los 200 nm.

j. Protocolo de caracterización por TEM y SEM de nanogeles fotopolimerizados

- Para la preparación de muestras de TEM, se adiciona una gota de la disolución acuosa de los nanogeles sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono. El exceso de muestra se seca con papel de filtro y la rejilla se deja secar a temperatura ambiente.
- Para la preparación de muestras de SEM, se adiciona una gota de disolución acuosa de nanogeles sobre un cubre redondo de vidrio de 12 mm de diámetro. La muestra se deja secar a temperatura ambiente y una vez seca se recubre con oro.

k.- Protocolo de encapsulación en nanogeles

Encapsulación de rodamina B

- Se preparó una disolución de rodamina B de concentración 0.15 mg/ml en etanol.

- Esta disolución se adicionó sobre la disolución de cada uno de los nanogeles, PDF/N-F127-Ac-n (n= 2, 4 y 8). La cantidad de rodamina adicionada con respecto a la cantidad de nanogeles fue 0.15 mg de rodamina/mg de nanogel.
- A continuación la mezcla de ambas disoluciones se incubó a temperatura ambiente durante 24 horas.
- El etanol se evaporó con agitación orbital y la disolución acuosa de nanogeles cargados con rodamina y rodamina no encapsulada resultante se dializó (Slide-A-Lyzes® Dyalisis Cassette G2 2,000 MWCO, Thermo Scientific) con agua destilada durante 24 horas para eliminar la rodamina no encapsulada.
- La cuantificación de la rodamina no encapsulada en las aguas de diálisis se realizó por fluorescencia ($\lambda_{\text{max en agua}}=576 \text{ nm}$). Para la realización de la curva de calibrado de la rodamina se utilizaron disoluciones acuosas en el rango de concentraciones 2.5-38 $\mu\text{g/ml}$. La cantidad de rodamina encapsulada se calculó de forma indirecta como la diferencia entre la cantidad de rodamina adicionada inicialmente y la cantidad de rodamina presente en las aguas de diálisis.

Encapsulación de pireno

- Se preparó una disolución de pireno de concentración 0.15 mg/ml en acetona.
- Esta disolución se adicionó sobre la disolución de cada uno de los nanogeles, PDF/N-F127-Ac-n (n= 2, 4 y 8). La cantidad de pireno adicionada con respecto a la cantidad de nanogeles fue 0.15 mg de pireno/mg de nanogel.
- A continuación la mezcla de ambas disoluciones se incubó a temperatura ambiente durante 24 horas.
- La acetona se evaporó con agitación orbital, produciendo la precipitación del pireno no encapsulado en la disolución acuosa de nanogeles.
- La disolución acuosa de nanogeles cargados con pireno y pireno no encapsulado en forma de precipitado se filtró a través de filtros de teflón de 0.45 μm . El filtro se lavó con acetona para la recuperación del pireno no encapsulado y su cuantificación.

- El pireno no encapsulado precipitado se cuantificó por fluorescencia, utilizando el espectro de excitación (λ_{max} en acetona=332.5 nm). Para la realización de la curva de calibrado del pireno se utilizaron disoluciones de pireno en acetona en el rango de concentraciones 13.4-268 $\mu\text{g/ml}$. La cantidad de pireno encapsulado se calculó de forma indirecta como la diferencia entre la cantidad de pireno adicionada inicialmente y la cantidad de pireno no encapsulado en forma de precipitado.

6.3.I.- Protocolo de ensayos celulares con nanogeles

- *Preparación de las células:* Las células HeLa se cultivaron en DMEM high glucose (4.5 g/l), 4 mM de L-glutamina, 10 % de FBS, 1% de Penicilina/Estreptomina y 1% de Anfotericina B y las células MSC de ratón se cultivaron en DMEM F12 (3 g/l de glucosa) 2mM de L-glutamina, 10 % de FBS, 1% de Penicilina/Estreptomina y 1% de Anfotericina B. Las células se mantuvieron a 37 °C, con 21% O₂ y 5% CO₂ para HeLa y 3% O₂ y 5% CO₂ para MSC. Cuando las células alcanzaron un 80-90% de confluencia se lavaron con DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), se añadió solución de tripsina al 1 % y se incubaron durante 5 minutos a 37 °C, para permitir la rotura de las proteínas que producen la adhesión de las células al recipiente de cultivo. La acción de la tripsina se detuvo añadiendo medio de cultivo fresco.

- *Preparación de las disoluciones de nanogeles:* En el caso de los nanogeles PDF/F127-Ac-2, tras su liofilización, se redisolviéron a la concentración deseada directamente en DMEM high glucose para ensayos con HeLa y en DMEM F12 para ensayos con MSC. Para los nanogeles PDF/N-F127-Ac-4 y PDF/N-F127-Ac-8, disueltos en agua destilada, la concentración se ajustó por adición de medio de cultivo DMEM high glucose para ensayos con HeLa y con DMEM F12 para ensayos con MSC. Previo al ajuste de la concentración, las disoluciones de nanogeles de PDF/N-F127-Ac-4 y PDF/N-F127-Ac-8 en agua destilada una vez fotopolimerizadas y dializadas se filtraron con filtros de 0.22 μm para esterilizar. Todas las manipulaciones de redisolución, filtrado o ajuste de la concentración

por adición de medio de cultivo se realizaron en campana de flujo laminar para garantizar las condiciones de esterilidad.

- *Ensayos de viabilidad:* Las células HeLa o MSC se sembraron a una densidad de 10000 células por pocillo, utilizando placas de 96 pocillos. Tras 24 horas de incubación se retiró el medio de cultivo y se añadieron 100 μ L de disolución de nanogeles de la concentración deseada. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

El medio de cultivo con nanogeles se retiró tras 24, 48 o 72 horas de incubación y se añadió medio de cultivo fresco. A continuación se añadió una disolución de Alamar Blue, en una cantidad del 10% del volumen de medio presente en cada pocillo. Tras 2 horas de incubación a 37 °C, la fluorescencia se leyó a 530/590 (excitación/emisión) en un lector de placas. La viabilidad celular se expresó como la viabilidad de células relativa al control (% comparado con las células control incubadas sólo con medio de cultivo).

- *Ensayos de internalización:*

- Las células HeLa se sembraron a una densidad 40000 células por pocillo, sobre portas de 12 mm dispuestos en el fondo de los pocillos de placas de cultivo de 24 pocillos.

- Para la incubación con los nanogeles cargados con rodamina B o rodamina-EST se adicionó disolución de nanogel con rodamina B o rodamina-EST disuelto en agua destilada, cuya concentración se ajustó previamente por adición de medio de cultivo DMEM high glucose, siendo el volumen final del ensayo de 500 μ L. Las células se incubaron durante 4 horas a 37 °C o a 4 °C.

- Transcurrido ese tiempo, se retiró el medio de cultivo con nanogel cargado con rodamina y las células se lavaron 3 veces con PBS.

- La fijación de las células se realizó por adición de 300 μ L de formaldehído al 4% e incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente.

- A continuación las células se lavaron durante 5 minutos con PBS (x2).

- Para realizar el marcaje de la actina de las células se utilizó el fluoróforo verde Alexa fluor 488. El porta con las células se dispuso sobre una gota de 40 μ L de Alexa fluor y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se lavaron durante 5 minutos con PBS-BS (PBS+1% BSA (Bovine Serum Albumin)+0.1% Saponina), PBS-B (PBS+1% BSA) y agua destilada.
- Los cubres se secaron con papel de filtro. Para realizar el marcaje del núcleo de las células se añadió sobre el cubre 5 μ L de DAPI-Mowiol. El cubre se tapó con un porta, se selló con laca de uñas transparente y tras su secado se almacenó a 4 °C en oscuridad hasta observación por microscopia confocal.

6.3. MATERIALES Y TÉCNICAS

- Los reactivos y disolventes utilizados en la síntesis de los compuestos fueron suministrados por Sigma-Aldrich o Acròs.

La membrana de acetato de celulosa Spectra/Por® Biotech de MWCO 300,000 y la membrana Spectra/Por® de MWCO 3500 fueron suministradas por Spectrum. La membrana Slide-A-Lyzes Dialysis Cassette G2 de MWCO 2,000 fue suministrada por Thermo Scientific.

El DMEM, DMEM F12, DMEM high glucose, DPBS y L-glutamina fueron suministrados por Gibco, Invitrogen para Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, España.

El kit Live/dead® (Calcein AM/Ethidium homodimer), Phalloidin Alexa fluor 488 y DAPI (dilactate) fueron suministrados por Invitrogen.

El mowiol fue suministrado por Merck.

La Penicilina, Estreptomocina, Anfotericina B y tripsina (Trypsin-Versene 10X) fueron suministradas por Lonza.

La BSA fue suministrada por Sigma-Aldrich.

Las células HeLa fueron suministradas por *Cancer Research-UK cell bank*.

Las células MSC de ratón (bone marrow of C57BL/6 mouse at ≤ 8 weeks after gestation) fueron suministradas por Gibco.

- Los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN se han registrado en los siguientes equipos: Bruker AV-400 (operando a 400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C) o AV-500 (operando a 500 MHz para ^1H y 125 MHz para ^{13}C), Bruker AMX300 (operando a 300 MHz para ^1H y 75 MHz para ^{13}C), equipos del Servicio de Resonancia Magnética del CEQMA (Centro de Química y Materiales de Aragón). El CDCl_3 se ha utilizado como disolvente; los desplazamientos químicos se muestran en ppm relativos a TMS, utilizando el pico de disolvente como estándar interno.

- Los espectros de FT-IR se han realizado en un espectrofotómetro Thermo NICOLET Avatar 360 FT-IR utilizando una pastilla de NaCl como soporte o un equipo Bruker Vertex 70 en modo ATR modelo MKII Golden Gate Single Reflection ATR System de Specac. Equipos del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Zaragoza.

- El análisis elemental de los compuestos se ha realizado en un microanalizador Perkin Elmer CHN 2400, equipo perteneciente al Servicio de Análisis Elemental del CEQMA.

- Los termogramas de DSC se han realizado en el equipo Q20 V24.10 Build 122 de TA Instruments, utilizando cápsulas de aluminio para la preparación de las muestras. Equipo del Servicio de Calorimetría del CEQMA.

- La espectrometría de masas se ha realizado en un ESI Brüker Esquire 300+, MALDI+/TOF Brüker Microflex system, utilizando NAFTA/ditranol como matriz. Equipo del Servicio de Espectrometría de Masas del CEQMA.

- Las muestras de SEM se han observado en un equipo Inspect F50 perteneciente al Laboratorio de Microscopías Avanzadas (LMA) del Instituto de Nanociencia de Aragón (INA).

- Las medidas de TEM han sido realizadas en un microscopio TECNAI G20 (FEI COMPANY), 200 kV, perteneciente al LMA del INA. Las muestras fueron preparadas en rejillas holley carbon film 300 Mesh Cu (50) de Agar Scientific.
- Las medidas de DLS se realizaron en un equipo Malvern Instrument Nano ZS que utiliza un laser de He-Ne con una longitud de onda de 633 nm y un ángulo de detección de 173°, a 25 °C y 37 °C.
- Las medidas de GPC se han realizado sobre muestras de concentración 1 mg/ml utilizando un equipo Waters e2695 Alliance equipado con un detector de dispersión de luz, columnas Styragel® HR1 de Waters o PLgel 5µm MIXED-C de Agilent Technologies. Las medidas se han realizado con THF (grado HPLC) como disolvente, con un flujo de 1 ml/min. Para el calibrado se han utilizado patrones de poliestireno.
- Las medidas de fluorescencia se han realizado en un espectrómetro de fluorescencia Perkin Elmer LS 55, perteneciente al INA.
- La liofilización se realizó en un liofilizador Cryodos 50 de Telstar perteneciente al INA.
- Las propiedades mecánicas se midieron en una máquina de ensayos uniaxial Instrom 5848 y una máquina Instrom Micro Tester 5548. Los ensayos de fatiga se realizaron en una máquina BOSE ElectroForce 5210 BioDynamic con capacidad para 4 cámaras de ensayo y una fuerza máxima aplicable de 200 N. Equipos pertenecientes al grupo GEMM del I3A.
- Las células HeLa se incubaron en un incubador de CO₂ Excella ECO-170 (New Brunswick Scientific, UK). Las MSC se incubaron en un incubador de CO₂ Forma series II water jacketed, HEPA class 100 (Thermo Fisher Scientific, Spain).
- Las imágenes en contraste de fases y de fluorescencia de las células se han realizado en un microscopio invertido modelo Olympus IX81 en el CIBA (Centro de Investigaciones Biomédicas de Aragón).

- La fluorescencia en el método Alamar Blue se determinó con un lector de placas Synergy HT de Biotek perteneciente a la Unidad de Investigación Translacional (UIT) del Hospital Miguel Servet, IACS.
- Las imágenes de microscopia confocal se realizaron en un equipo Fluoview FV10i con inmersión en aceite, perteneciente al CIBA (Centro de Investigaciones Biomédicas de Aragón). Las imágenes se visualizaron y trataron con el software FV10-ASW 4.0 Viewer.

CAPÍTULO 7
CONCLUSIONES

- Se han sintetizado copolímeros bloque basados en Pluronic F127®, con estructura lineal o dendrítica-lineal-dendrítica (derivados de bis-MPA), y con diferentes grupos terminales (-COCH=CH₂, -SH, -Bn y -OH), que proporcionan hidrogeles termosensibles inyectables y moldeables.
- La presencia de grupos reactivos en estos copolímeros permite obtener, vía procesos de fotopolimerización, hidrogeles de mayor consistencia mecánica que sus precursores, utilizando tanto materiales monocomponente (-COCH=CH₂) como formulaciones bicomponente (-COCH=CH₂ + -SH).
- Estos hidrogeles presentan distintos tiempos de degradación, así como morfologías internas porosas, con tamaño de poro microscópico. Algunos de estos hidrogeles muestran viabilidades celulares *in vitro* (células MSC humanas) superiores al 85% a las 72 horas, en ensayos 2D, lo que permite pensar en su posible aplicación en Ingeniería de Tejidos.
- Los copolímeros con grupos terminales -COCH=CH₂ son compuestos adecuados para la preparación de nanogeles, vía procesos de fotopolimerización, obteniendo nanopartículas con tamaños entre 50 y 100 nm a 37 °C, y viabilidades celulares *in vitro* (células HeLa) superiores al 50% a las 72 horas.
- Estos nanogeles son termosensibles y pueden cargarse con moléculas hidrófilas e hidrófobas, así como producir su transporte e internalización en medios celulares *in vitro* (células HeLa), lo que permite pensar en su posible aplicación como sistemas de Transporte y Liberación controlada de fármacos.

ANEXOS

En estos apartados se recogen descripciones detalladas y datos de técnicas, procedimientos y estudios realizados y obtenidos como parte del trabajo desarrollado en esta tesis doctoral.

ANEXO I. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

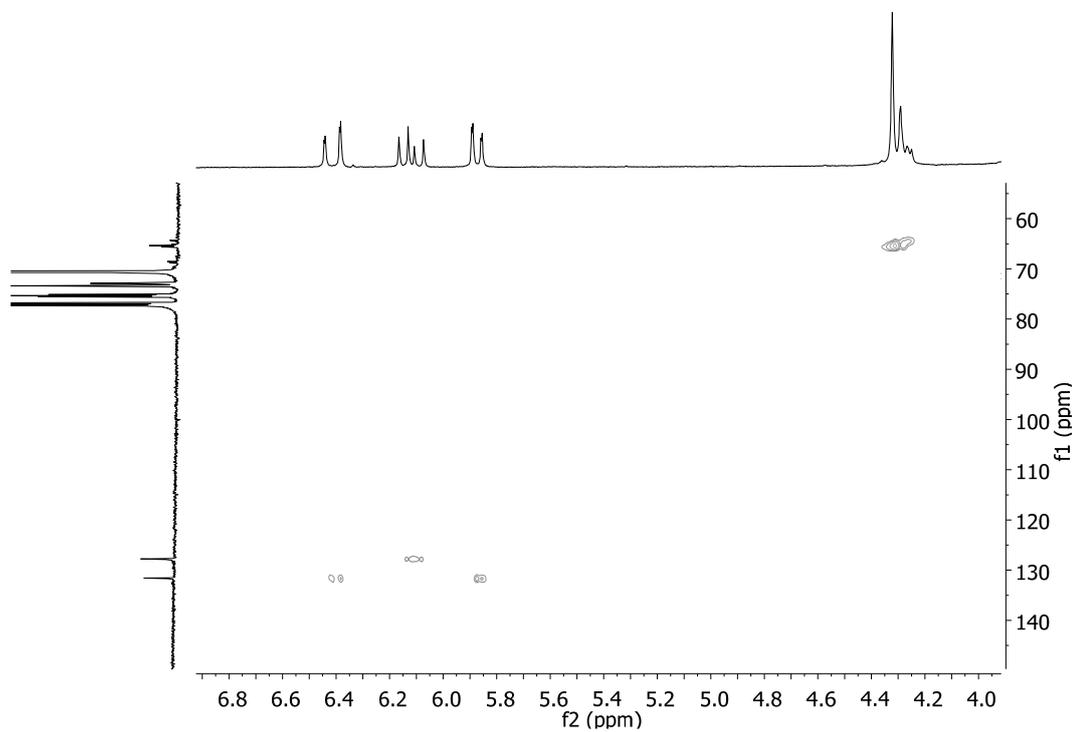


Figura I.1. Espectro de HSQC para la molécula F127-Ac-8 EN CDCl_3 , 500 MHz.

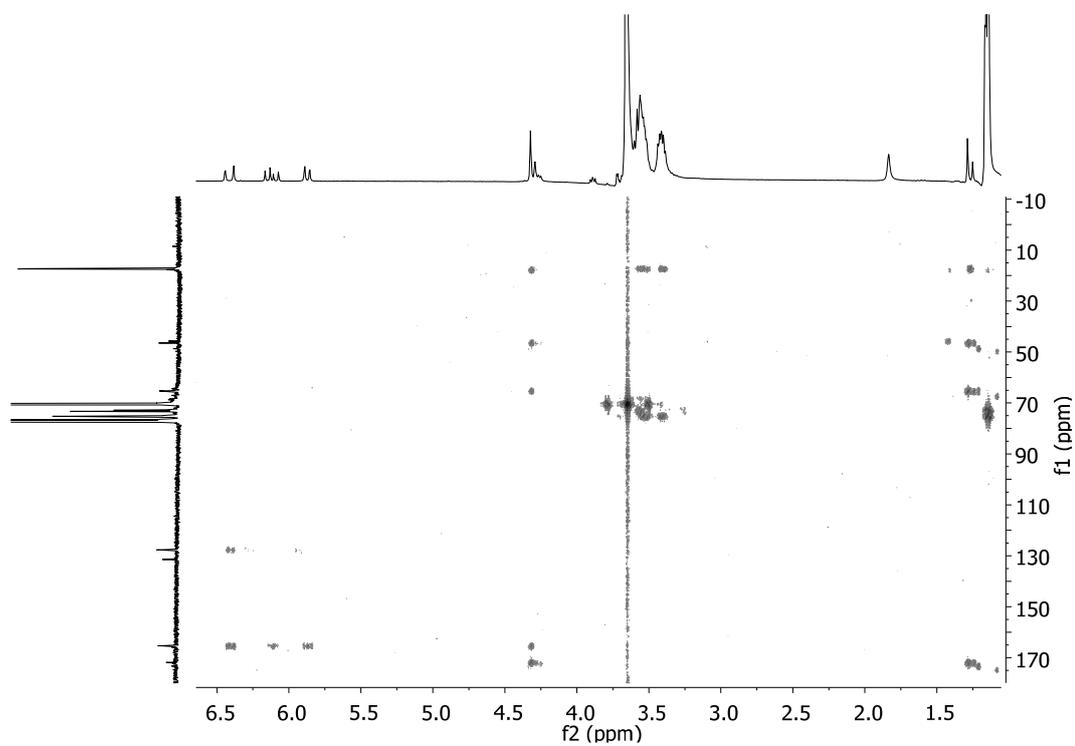


Figura I.2. Espectro de HMBC para la molécula F127-Ac-8 en CDCl_3 , 500 MHz.

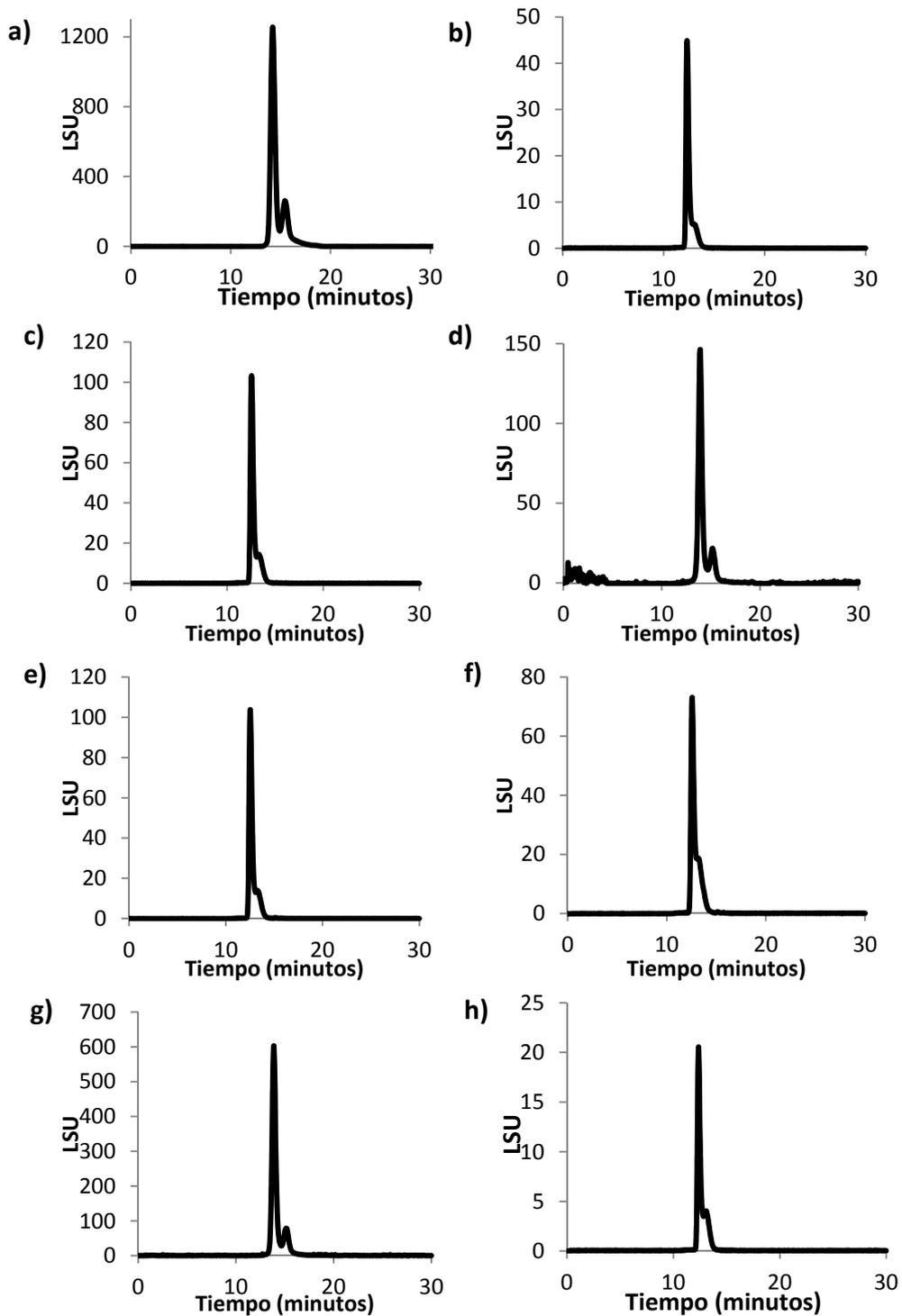


Figura I.3. Cromatogramas de GPC de los derivados de Pluronic F127[®] descritos: a) Pluronic F127[®], b) F127-Ac-2, c) F127-Bn-2, d) F127-OH-4, e) F127-Ac-4, f) F127-Bn-4, g) F127-OH-8 y h) F127-Ac-8. Cromatogramas a), d) y g) realizados con columna Styrag[®] HR1 THF Waters, resto de cromatogramas realizados con columna PLgel 5 μ m MIXED-C de Agilent Technologies.

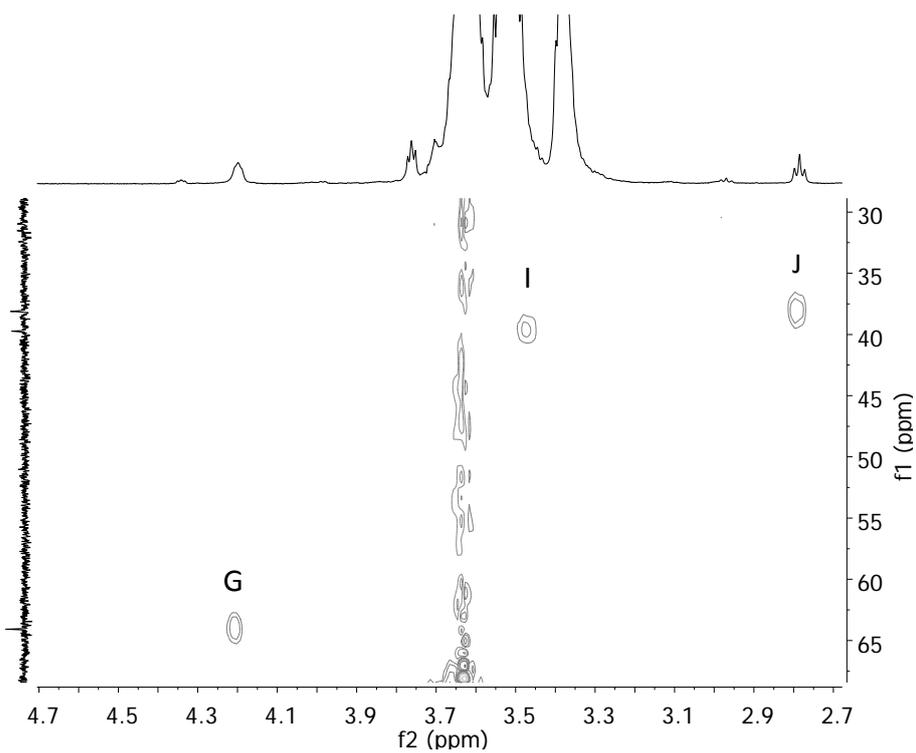


Figura I.4. Espectro de HSQC para la molécula F127-SH-2 en CDCl_3 , 500 MHz.

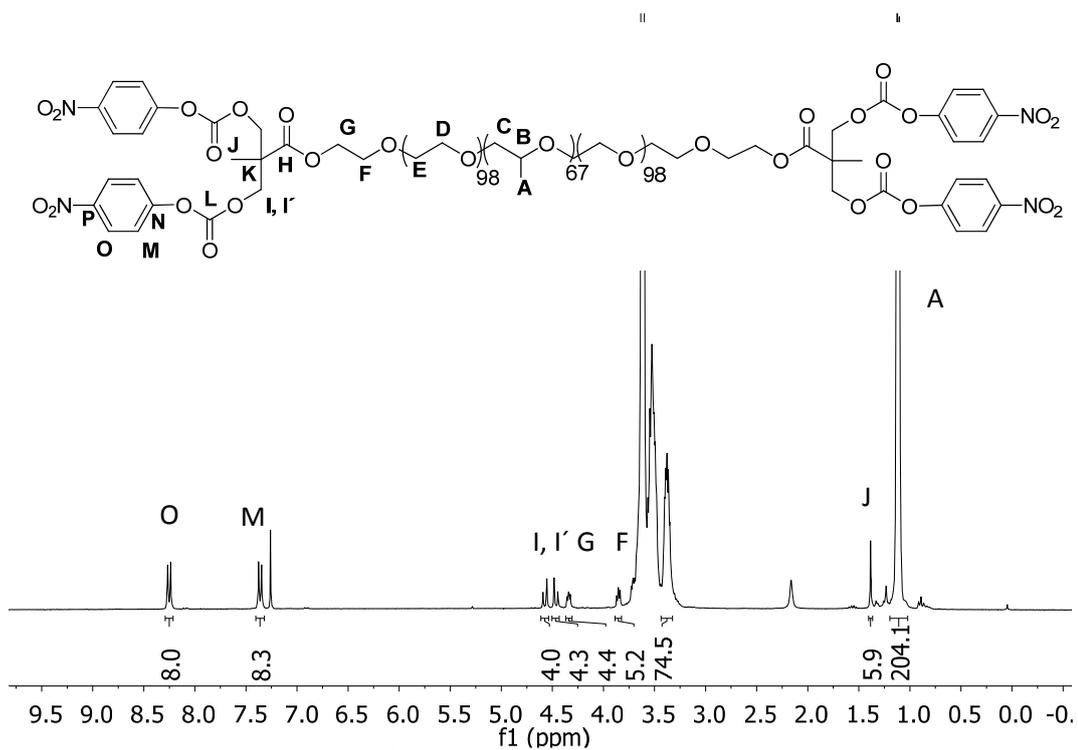


Figura I.5. Espectro de ^1H -RMN para la molécula F127-PN-4 en CDCl_3 , 300 MHz.

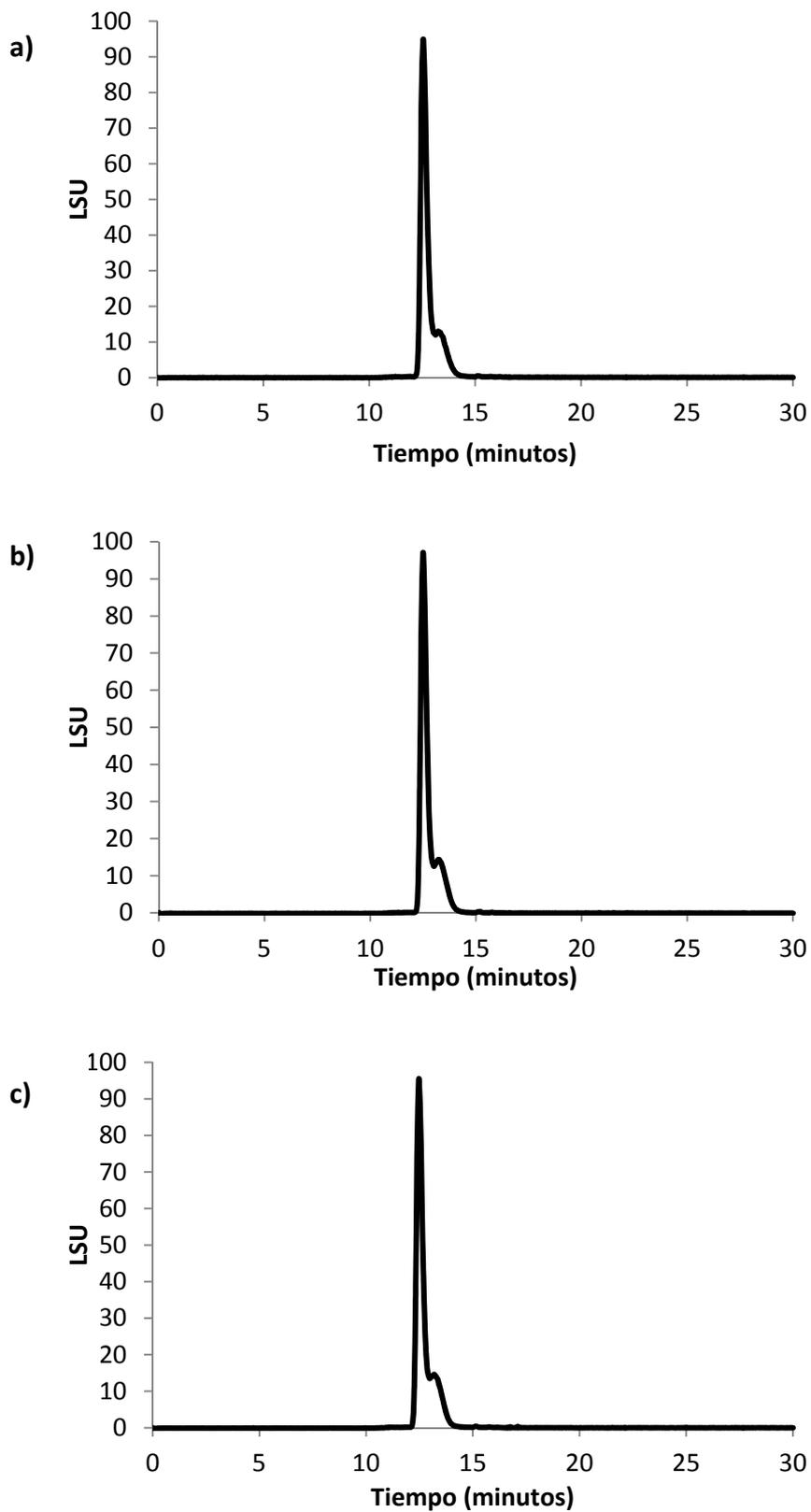


Figura I.6. Cromatogramas obtenidos por GPC con columnas PLgel 5 μ m MIXED-C de Agilent Technologies para a) F127-PN-2, b) F127-PN-4 y c) F127-PN-8.

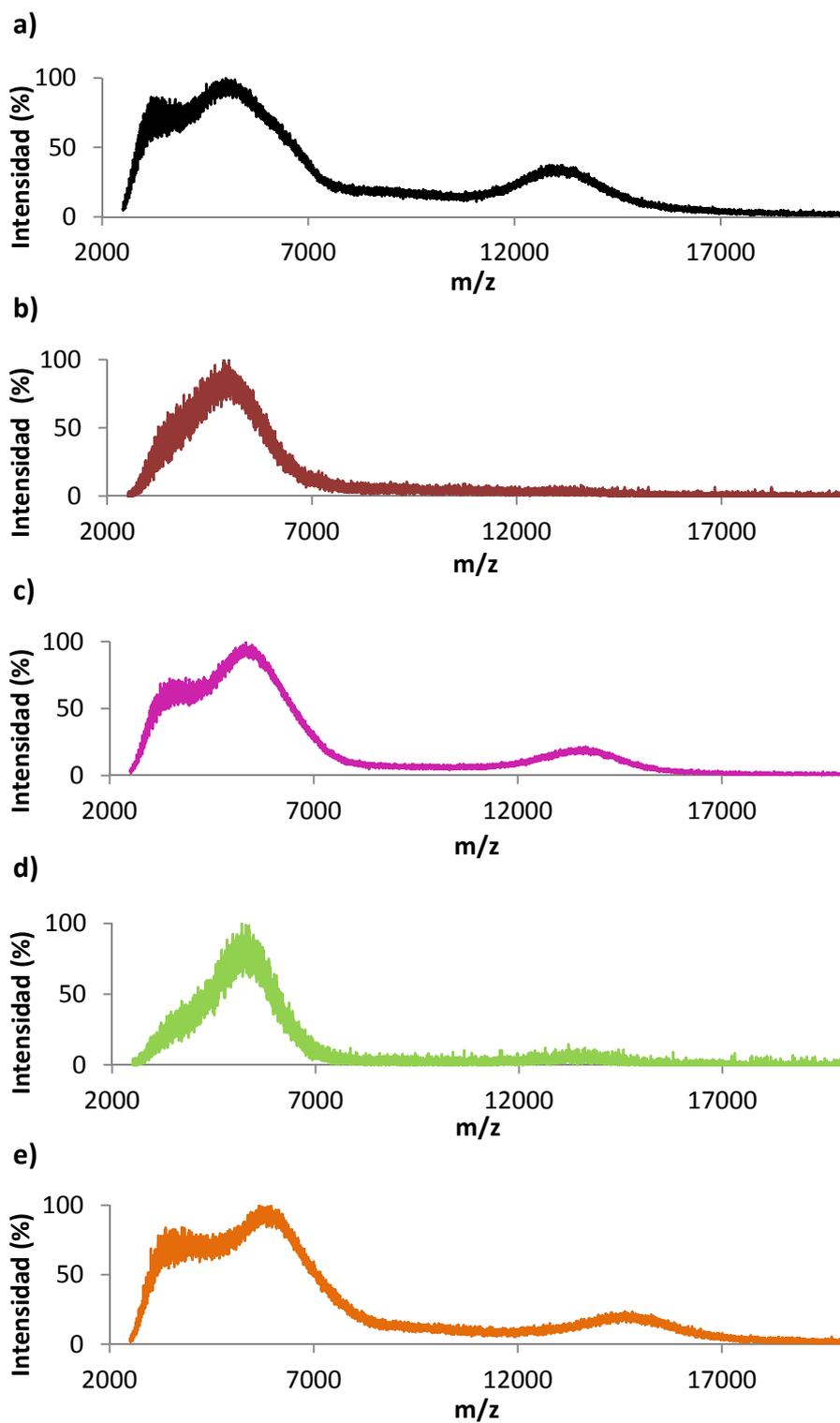


Figura I.7. Espectros MALDI-MS: a) F127-PN-2, b) F127-SH-2, c) F127-PN-4, d) F127-SH-4 y e) F127-PN-8.

ANEXO II. CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES POR DSC

La utilización de la técnica de DSC para la determinación de la LCST (Low Critical Solution Temperature) de Pluronic F127® ha sido descrita por varios autores.¹³⁵ En los termogramas se muestra el flujo de calor frente a la temperatura, observándose dos cambios de la línea base, adjudicados al proceso de micelización y de gelificación (Figura II.1).

El primer pico endotérmico Figura II.1 (a) corresponde al proceso de micelización, que supone la agregación de las cadenas de polímero en micelas. Este pico permite obtener la CMT, que es la temperatura a la cual se produce la micelización para una disolución de polímero de una determinada concentración.

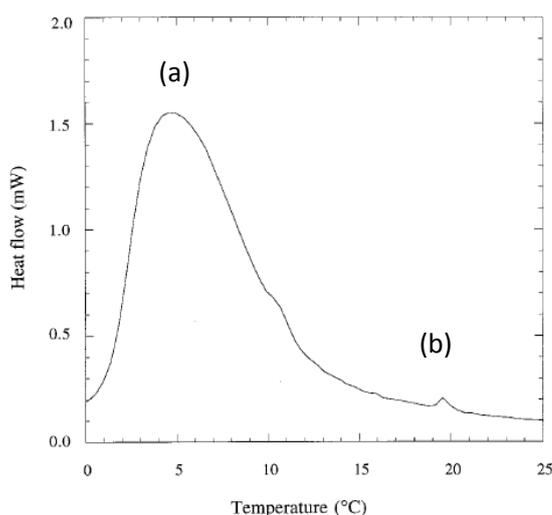


Figura II.1. Termograma de DSC de una disolución acuosa al 30% w/v de Pluronic F127®.^{135d}

El segundo pico de la Figura II.1 (b), también endotérmico, y correspondiente al proceso de gelificación, aparece como un pequeño pico a la derecha del pico de micelización y permite la determinación de la LCST. En la gelificación por efecto

¹³⁵(a) Nie, S. F.; Hsiao, W. L. W.; Pan, W. S.; Yang, Z. J., *Int. J. Nanomed.* **2011**, *6*, 151-166; (b) Barba, A. A.; d'Amore, M.; Grassi, M.; Chirico, S.; Lamberti, G.; Titomanlio, G., *Journal of Applied Polymer Science* **2009**, *114* (2), 688-695; (c) Li, L.; Lim, L. H.; Wang, Q.; Jiang, S. P., *Polymer* **2008**, *49* (7), 1952-1960; (d) Cabana, A.; Ait-Kadi, A.; Juhász, J., *Journal of Colloid and Interface Science* **1997**, *190* (2), 307-312.

de la temperatura se produce una reorganización de las micelas ya formadas. Esta transición supone un pequeño cambio de entalpía por lo que utilizando la representación del flujo de calor frente a la temperatura este pico sólo es visible para disoluciones de Pluronic F127® de elevada concentración.^{135d}

En la Figura II.2 (a) se muestra el termograma correspondiente a una disolución de F127-Ac-4 al 25 % (w/v) dónde solo se aprecia el proceso reversible de micelización en el calentamiento y en el enfriamiento. Por ello, para una mejor determinación de la temperatura de gelificación, se ha trabajado con la representación de la derivada del flujo de calor respecto al tiempo frente a la temperatura (Figura II.2 (b)).^{135a} El primer pico más grande, debido a un mayor valor de entalpía, corresponde al proceso de micelización (CMT), mientras que el segundo pico más pequeño, debido a un menor valor de entalpía, corresponde a la transición sol-gel (LCST).

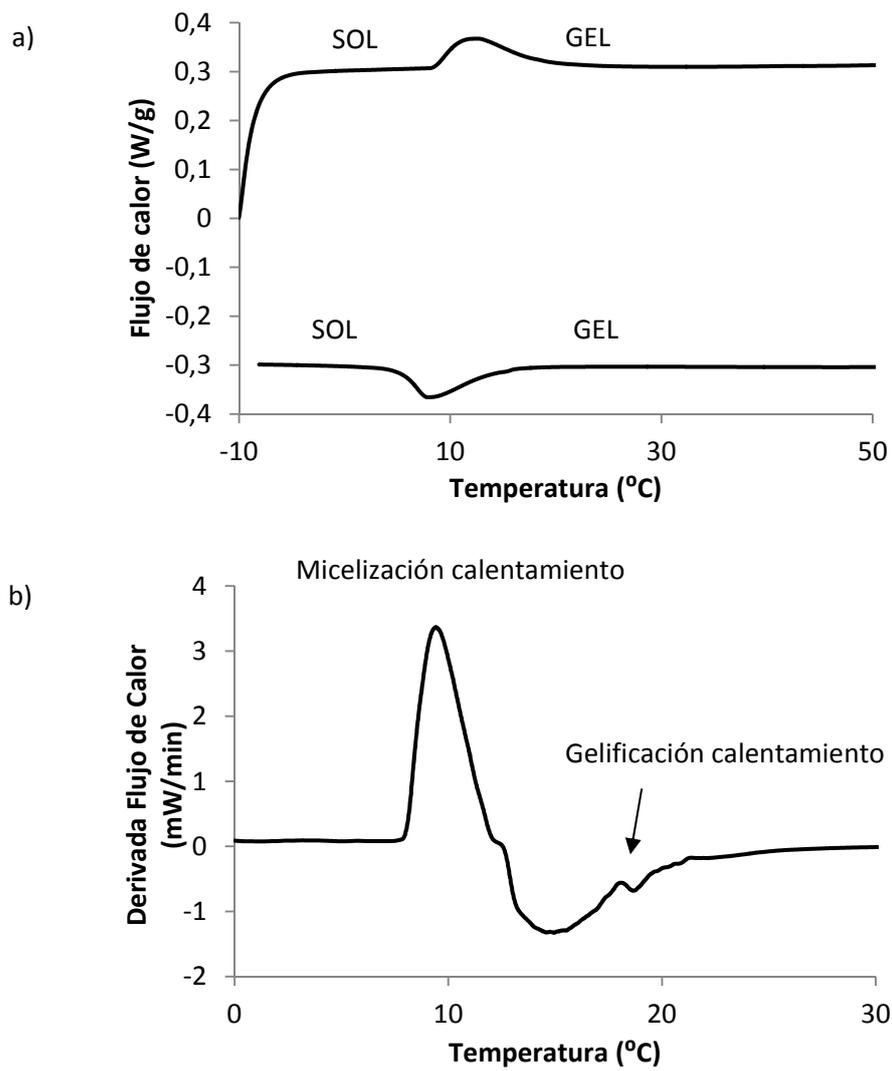


Figura II.2. Termograma de DSC de F127-Ac-4 al 25 % w/v en PBS 10 mM pH 7.4, a) Flujo de calor (W/g) frente a la temperatura en el proceso de calentamiento y enfriamiento, b) Derivada del flujo de calor con respecto al tiempo (mW/min) frente a la temperatura en el proceso de calentamiento.

ANEXO III. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

- Método de MTT para la determinación de la viabilidad celular

El método MTT fue desarrollado por Mosmann^{118b} en 1983 y modificado en 1986 por François Denizot y Rita Lang.^{118a}

El ensayo con MTT se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) que realiza la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa transformándolo en un compuesto coloreado de color azul, Formazán (Figura III.1). La medida de la absorbancia de este compuesto a 570 nm permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas y por tanto la viabilidad celular. A mayor cantidad de Formazán producido la viabilidad celular es mayor.

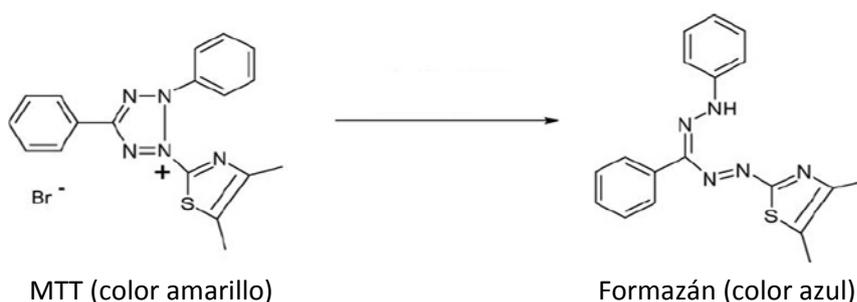


Figura III.1. Reducción metabólica del MTT a Formazán producida por la enzima succinato deshidrogenasa.

En nuestro caso se añadió el MTT a cada uno de los pocillos. Tras incubación durante 4 horas a 37 °C y 5% de CO₂ se procedió a redissolver el Formazán para su cuantificación. En este punto se observó que parte de los hidrogeles retenían el Formazán en su estructura, siendo imposible su total disolución y por tanto su cuantificación. Este hecho era más notable en los hidrogeles fotopolimerizados. Por tanto este método se descartó para la medida de viabilidad de nuestros hidrogeles.

- Método *live/dead* para la determinación de la viabilidad celular

La viabilidad celular de nuestros materiales se evaluó por el método *live/dead* (Invitrogen). Este método consiste en la tinción específica de las células vivas utilizando Calcein AM (Calcein acetoxymethyl ester) y la tinción específica de las células muertas con Ethidium homodimer-1.

La Calcein AM es un compuesto no fluorescente permeable a la membrana celular que se transforma en un compuesto que presenta una gran fluorescencia verde cuando es hidrolizado por las enzimas esterasas intracelulares. (Figura III.2) La actividad intracelular de las esterasas y la integridad de la membrana plasmática son características de las células vivas.

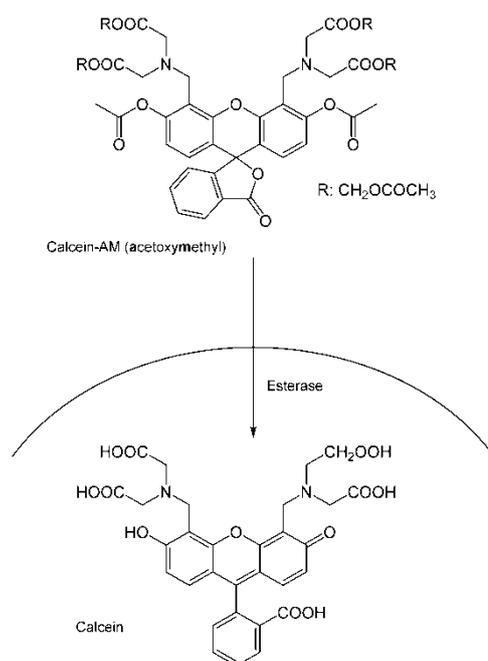


Figura III.2. Hidrólisis de Calcein AM para dar lugar a Calcein producida por la enzima estearasa en el interior de la células.

El Ethidium homodimer-1 (Figura III.3) es un compuesto impermeable a la membrana celular que produce fluorescencia en el rojo cuando se une a los ácidos nucleicos del ADN. Cuando la célula está viva, con su membrana celular intacta, este compuesto no puede penetrar en el interior de la célula y no se

produce unión al ADN, sin proporcionar fluorescencia. En cambio, cuando la célula está muerta, este compuesto es capaz de interactuar con el ADN debido a la pérdida de integridad estructural por la muerte celular, produciendo la fluorescencia en el rojo.

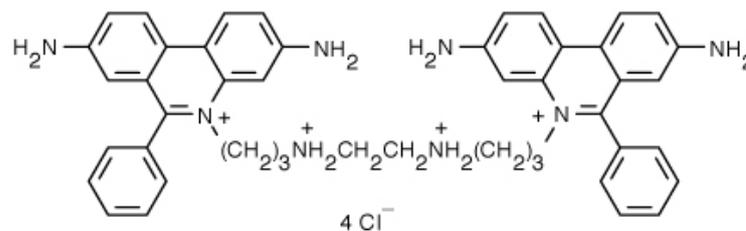


Figura III.3. Estructura química de la molécula Ethidium homodimer-1.

- Método *Alamar Blue* para la determinación de la viabilidad celular

La Resazurina es un fluoróforo redox comercialmente disponible como Alamar Blue. Este fluoróforo experimenta cambios colorimétricos y fluorimétricos relacionados con la actividad metabólica. El ensayo está basado en la habilidad de las células viables o metabólicamente activas de reducir Resazurina a Resorufina o dihidroresorufina (Figura III.4). La conversión ocurre de forma intracelular, cuando la forma oxidada de la Resazurina penetra en el citosol y es convertido a su forma reducida por acción de la enzima mitocondrial, aceptando electrones del NADPH, FADH, FMNH, NADH así como de numerosos citocromos. Esta reducción es responsable de un cambio en la fluorescencia desde la forma oxidada o no fluorescente, a la forma reducida que sí lo es.

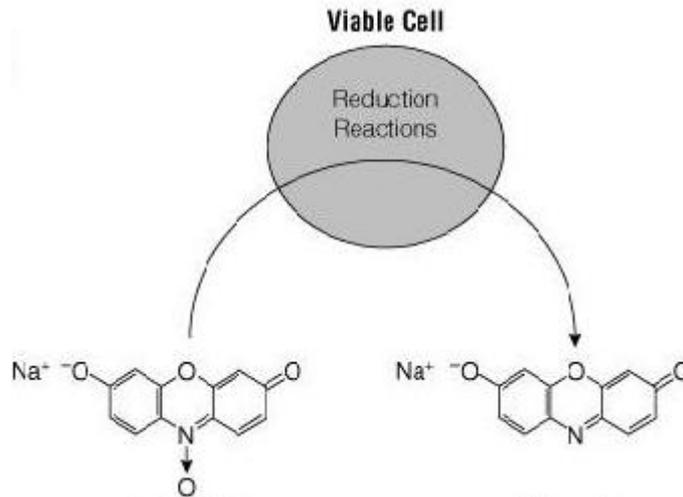


Figura III.4. Transformación de Resaruzina a Resorufina por reacciones de reducción en las células viables o metabólicamente activas.

La Resarzurina es un compuesto no tóxico para las células y es estable en el medio de cultivo, lo que permite una medida continua de la proliferación celular *in vitro*. Los compuestos tóxicos que afectan a la viabilidad celular y a la proliferación también afectan a la capacidad de reducción de la Resarzurina, y la velocidad de la reducción es directamente proporcional al número de células viables presentes.

ANEXO IV. CARACTERIZACIÓN MECÁNICA DE HIDROGELES.

Dentro de los ensayos dinámicos y estáticos los más utilizados en la caracterización de las propiedades mecánicas del cartílago articular son ensayos de tipo estático, entre los que se incluyen los métodos de compresión uniaxial monotónica y los métodos de compresión uniaxial de carga-relajación. Ambos métodos se pueden realizar en compresión no confinada (NC), compresión confinada (CC) o de indentación dependiendo del utillaje utilizado para la aplicación de la carga.

Las principales diferencias entre los ensayos de compresión no confinados y confinados, se centran en la diferencia del comportamiento del material bajo diferentes restricciones de movimiento. Para el caso de ensayos de compresión no confinados, al hidrogel se le permite generar una deformación lateral a medida que actúa la carga o el desplazamiento, por lo que las fibras que forman el hidrogel se reubican progresivamente al deformarse paulatinamente, actuando a tracción transversal. Al final del ensayo se obtendrá una matriz con mayores dimensiones con respecto al diámetro inicial y de menor espesor. Por el contrario en un ensayo de compresión confinada se impide la deformación lateral al ubicar al hidrogel en un habitáculo que le impide dicha deformación, provocando que las fibras no puedan acomodarse libremente, por lo que las dimensiones del material solo cambian con respecto al espesor. Otra diferencia importante está en el comportamiento y limitaciones que presenta el flujo interno dentro del hidrogel. En este sentido, para ensayos de compresión no confinados el flujo puede producirse libremente por las paredes laterales del hidrogel, mientras que para un ensayo de compresión confinada dicho flujo se ve forzado a salir por la parte inferior del mismo.¹¹⁹⁻¹²⁰

i) Ensayos de compresión uniaxial monotónica

En este tipo de ensayos la carga se va aplicando de forma lineal y uniforme. Con estos ensayos se obtienen el Módulo de Rigidez (E_{medido}): Módulo de Young (E_s) y Módulo Agregado (H_A).

E_{medido} se calcula como la pendiente en la zona de comportamiento lineal del material en la gráfica tensión-deformación (σ - ϵ). Es importante destacar que de cada tipo de ensayo realizado, NC y CC, y debido a las restricciones de movimiento ejercidas por los utillajes utilizados, tal y como se ha descrito anteriormente, éste Módulo tiene connotaciones diferentes, denominándose Módulo de Young ($E_{\text{medido}}=E_S$) para NC y Módulo Agregado ($E_{\text{medido}}=H_A$) para CC. Ambos parámetros proporcionan una medida de la dureza del hidrogel bajo los efectos de una carga.¹²⁰

ii) Ensayos de compresión uniaxial de carga-relajación

• Coeficiente de Poisson (ν)

ν es la relación entre la deformación lateral y la deformación axial en una probeta con carga axial.

Para el cálculo de ν se representan los valores obtenidos de tensión-deformación por los métodos de NC y CC y se obtienen E_S y H_A , de la forma descrita en el apartado anterior. Cabe destacar que estos valores obtenidos son diferentes a los hallados a través del método de compresión uniaxial de carga monotónica ya que en los ensayos de carga-relajación se extrae el agua del interior de los hidrogeles por lo que se evalúa únicamente las propiedades de la matriz polimérica. ν se obtiene de forma empírica mediante la combinación de E_S y H_A por medio de la Ecuación (1). Esta fórmula sólo es aplicable dentro del límite elástico del material.

$$H_A = \frac{E_S(1 - \nu)}{[(1 + \nu)(1 - 2\nu)]} \quad (1)$$

• Permeabilidad (κ)

El cálculo de la permeabilidad, κ , se realiza aplicando la Ecuación (2), donde τ' es el tiempo de relajación, h es el espesor de la muestra y H_A es el Módulo Agregado. El cálculo de τ' y H_A se realizan con ensayos de compresión uniaxial de carga-relajación de tipo CC.

$$\tau' = \frac{h^2}{\pi^2 H_A \kappa} \quad (2)$$

La Figura IV.1 (a) muestra la curva típica de tensión-deformación obtenida para los ensayos de carga-relajación. En ella se observa el ajuste lineal por mínimos cuadrados (en rojo) de los puntos de máxima relajación que permite obtener al valor de H_A .

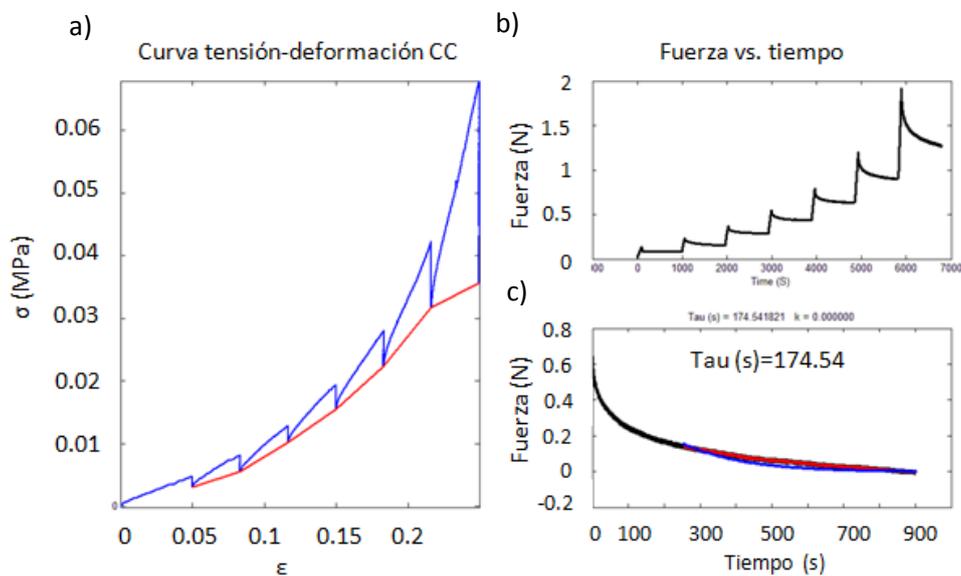


Figura IV.1. a) Curva típica de tensión vs. deformación obtenida para P/H23-F127-Ac-2 en un ensayo de compresión uniaxial de carga-relajación confinada. En color rojo, el ajuste lineal por mínimos cuadrados en los puntos de máxima relajación, b) Curva típica de fuerza vs. tiempo para una rampa de carga-relajación, c) Selección (en rojo) y ajuste exponencial (en azul) para el cálculo de la permeabilidad a partir de una curva de relajación.

Para el cálculo de τ' , en un ensayo de CC de carga-relajación se puede medir la fuerza de reacción en función del tiempo requerido para alcanzar el equilibrio en cada ciclo de relajación. La Ecuación (3) es una función exponencial del tiempo donde F es la fuerza aplicada, F_{∞} es la fuerza a máxima relajación ($t=\infty$) y se supone que es igual a cero, F_0 es la fuerza a máxima tensión ($t=0$) y τ' (tiempo de relajación) es el parámetro a calcular. En la Figura IV.1 (b) se muestra la gráfica correspondiente a la fuerza aplicada frente al tiempo.

$$F(t) = F_{\infty} + F_0 e^{\frac{-t}{\tau'}} \quad (3)$$

El ajuste exponencial por mínimos cuadrados en los puntos de máxima relajación en cada curva de relajación permite obtener τ' .

La Figura IV.1 (c) muestra la zona seleccionada para llevar a cabo el ajuste (en color rojo) así como el ajuste exponencial por mínimos cuadrados (en color azul) a partir del cual se calcula τ' .¹¹⁹

