



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

I N T E C

INSTITUTO DE DESARROLLO TECNOLÓGICO



PARA LA INDUSTRIA QUÍMICA (UNL-CONICET)

“NANOGELES BIFUNCIONALES Y SU APLICACIÓN EN VACUNACIÓN TRANSDERMAL”

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral, para la obtención del Grado Académico de Doctor en Química.

Lic. Ana Sonzogni

Director de Tesis: Dr. Roque J. Minari

Codirector de Tesis: Dra. Verónica D. Gonzalez

Jurados: Dr. Gustavo Abraham

Dra. Marisa Martinelli

Dra. Paulina Mocchiutti

Agradecimientos

Esta Tesis es el resultado del esfuerzo, voluntad y apoyo de muchísimas personas, así que tengan paciencia porque los agradecimientos vienen largos.

Primero lo primero...GRACIAS a mis directores Roque Minari y Verónica Gonzalez, por su apoyo, predisposición y paciencia a lo largo de estos 5 años y por todo el esfuerzo que dedicaron a este trabajo. En particular quiero agradecerle Roque por tener la idea que le dio origen a esta Tesis y por confiar en mí para llevarla a cabo. Gracias por el ejemplo que nos das, por tu perseverancia y constancia, pero sobre todo por tu pasión que nos contagia a muchos. Gracias por todos los fines de semana y feriados que te quedaste corrigiendo planes, resúmenes, capítulos, etc. para no demorarme. Gracias por atender mis inquietudes a toda hora y día de la semana, ya sea por mail, WhatsApp o paloma mensajera. A vos Vero, quiero agradecerle por tu apoyo emocional que fue muy importante al inicio de esta etapa y por transmitirme tu metodología de trabajo, tanto en el laboratorio como en la organización de los resultados. Aunque sigo siendo super desordenada al lado tuyo, se que gracias a tu insistencia he mejorado mucho.

Gracias Ludmila Ronco, por tu amistad y por el enorme apoyo y tiempo que me dedicaste en estos años. Por discutir los resultados conmigo una y mil veces hasta que parecían algo coherentes. Tu presencia en el grupo fue muy importante para mí en estos 6 años.

Gracias Marcelo Calderón por abrirme las puertas de tu hermoso grupo. Gracias por enseñarme la importancia de trabajar en grupo, pero sobre todo mil gracias por incentivarme siempre, tus palabras de aliento fueron cruciales en todo este tiempo para mí. Gracias por confiar en mí y por regalarme tu amistad.

Gracias Luis Gugliotta por tu aporte en esta Tesis, por estar siempre dispuesto para atender mis inquietudes y por tu incentivo constante.

Agradecimientos

Gracias a mis cumpas del Grupo de Polímeros (de ambos lados del charco) por el aporte que todos hicieron para que pueda llevar adelante este trabajo. A todos les ha tocado en algún momento darme una mano para que pueda salir adelante y siempre lo hicieron.

Gracias a mis compañeros del Palacio, con quienes recorrí estos últimos años de Tesis. Gracias por su amistad y por sostenerme en los malos momentos y por festejar conmigo los triunfos.

A mis compañeros del Laboratorio de Tecnología Inmunológica (LIT, FCB-UNL). Sobre todo, a Gabi y Giuli por la buena predisposición para enseñarle a una Lic. en Química como trabajar con animales (con todos los riesgos que eso implica). Por ayudarme a llevar adelante los ensayos e interpretar los resultados. Y por aguantar mis gritos y piñas cuando un ratón se movía de manera inesperada (Perdón por eso). Especialmente gracias Ivan Marcipar por tu entusiasmo constante, por tu paciencia y por todo lo que me enseñaste. Realmente lograste transmitirme tu pasión por la Inmunología.

A las Dras Stefanie Wedepohl y Sarah Hedtrich, y los Dres. Mario Passeggi y Santiago Vaillard por su colaboración y buena predisposición.

A la Universidad Nacional del Litoral, al CONICET y a la DAAD por el apoyo económico brindado.

Fuera del ambiente de la universidad también hubo muchas personas que ayudaron a llevar adelante mis estudios, por eso quiero agradecer

A Guille, por tu amor y paciencia a lo largo de todo este tiempo. Por aguantar mis caras largas y por compartir mis alegrías. Sobre todo, gracias por levantarme cuando la voluntad no me daba y por aprender como acompañarme en esta nueva vida.

A mis directores de la vida, mis viejos Marta y Victorio. Gracias por haberme incentivado y acompañado desde chiquita. Gracias por creer en mí siempre y por enseñarme cuales son las cosas importantes en la vida. Pero sobre todo gracias por el ejemplo que me dan día a día como profesionales y más que nada como personas. Ustedes fueron los mejores docentes que tuve,

Agradecimientos

porque me enseñaron siempre con el ejemplo. Gracias por enseñarme a pelear por lo que quiero, y por ser mi gran sosten.

A Martin y Luci. Obviamente que lo primero que les voy a agradecer es el regalo más grande que me han hecho: convertirme en tía. Mas allá de esa inmensa alegría, su apoyo fue realmente muy importante en estos años. Gracias por abrazarme cuando la cosa se puso fea y por festejar cuando se pudo. Son muy importantes para mí.

A toda mi familia, por creer siempre en mí, por apoyarme en todo momento desde cerca y desde lejos.

A la Sole por su ayuda con el diseño tanto para artículos como para esta Tesis.

Prólogo

La vacunación es una de las más exitosas intervenciones médicas en la reducción de enfermedades infecciosas. Sin embargo, ¿quién no tiene un pariente que sale corriendo con sólo ver la aguja? Y digo “pariente” para que no se sientan atacados. Lo cierto es que el dolor, las lesiones y un gran historial de contagios que vienen de la mano de la inyección hicieron de la vacunación uno de los cucos más grandes de la medicina. ¡Y tan buenita que parecía! Por suerte, hubo gente que estudió la posibilidad de vacunar por otras vías, un poquito más amigables. Tal es el caso de las vacunas orales, que no generan más que las muecas por su gusto feo. Lamentablemente no es tan fácil vacunar por medio de esta vía, ya que las condiciones extremas en el estómago desactivan bruscamente a la mayoría de las vacunas. Por este motivo a lo largo de la historia se han desarrollado diferentes sistemas de vacunación libres de aguja. La vía más popular fue la vía transdermal, pues se descubrió que en la piel se encuentran células especializadas del sistema inmunológico que ayudan a despertar una respuesta inmune bien específica. Esto, sumado a que la piel está muy accesible impulsó el desarrollo de una gran variedad de sistemas de vacunación transdermal. Lamentablemente, a pesar de numerosos esfuerzos, la mayoría de las tecnologías desarrolladas tienen limitaciones que todavía deben resolverse.

Esta Tesis tiene como objetivo principal desarrollar un sistema de vacunación libre de agujas, fácil de usar y no invasivo. Para ello se propone una plataforma que consiste en nanogeles que presentan dos funciones (por eso los llamamos bifuncionales): son sensibles a la temperatura y tienen capacidad de formar un film o película. Los nanogeles son redes poliméricas de tamaños nanométricos que tienen propiedades ideales para aplicaciones biomédicas, como un alto contenido acuoso, flexibilidad, compatibilidad celular, etc. Específicamente, los nanogeles termosensibles presentan cambios estructurales respondiendo a cambios de temperatura. Los nanogeles desarrollados en esta Tesis son capaces de contraerse a la temperatura de la piel, de manera que si se carga una proteína inmunogénica (responsable de la generación de respuesta

inmunológica) en su interior, estos pueden liberarla de forma controlada una vez que son expuestos a la piel. Además, la capacidad de formación de film de los nanogeles bifuncionales brinda la posibilidad de formar un parche de vacunación transdermal previamente o de aplicar la dispersión de los nanogeles bifuncionales directamente sobre la piel para formar la película *in-situ*. La presencia de este film en las dos formas de aplicación genera una oclusión que aumenta la permeabilidad de la piel, mejorando la capacidad del sistema de liberar la vacuna específicamente en el sitio de acción de las células inmunocompetentes, para desatar una respuesta inmunológica. Esta doble funcionalidad de los nanogeles combina la capacidad de retener, proteger y liberar la vacuna en el sitio adecuado con la actividad de un film volviéndolos una prometedora plataforma de vacunación transdermal.

La Tesis abarca desde el diseño y la síntesis de los nanogeles bifuncionales, seguida por el estudio exhaustivo de estos nanogeles y de los films formados a partir de ellos, hasta su aplicación *in vitro* e *in vivo* con una proteína inmunogénica modelo. Además, el sistema desarrollado se compara con otros dos sistemas termosensibles con propiedades similares, a fin de evaluar su desempeño como plataformas de liberación dermal.

Índice General

Agradecimientos.....	3
Prólogo.....	7
Índice General.....	9
Índice de Tablas.....	15
Índice de Figuras.....	17
Resumen.....	25
Abreviaturas.....	29
Capítulo 1: Consideraciones Generales.....	31
1.1. Introducción.....	33
1.2. Polímeros termosensibles.....	34
1.3. Sistemas de liberación controlada.....	38
1.3.1. Hidrogeles.....	40
1.3.2. Nanogeles.....	42
1.4. Síntesis de NGs de PVCL.....	43
1.4.1. Principios de la polimerización en emulsión.....	44
1.4.2. Antecedentes previos de síntesis de NGs de PVCL mediante polimerización en emulsión.....	46
1.5. Nociones de vacunación.....	50
1.5.1. Sistema inmunológico.....	50
1.5.2. Mecanismo de la vacunación.....	53
1.5.3. Vías de inoculación convencional.....	54
1.5.4. Vacunación transdermal.....	55
1.6. Motivación y Objetivos.....	58
1.6.1. Objetivo General.....	60
1.6.2. Objetivos específicos.....	61
Capítulo 2: Síntesis de Nanogeles de poli(N-vinilcaprolactama).....	63
2.1. Introducción.....	65

2.2. Trabajo experimental	67
2.2.1. Materiales.....	67
2.2.2. Síntesis discontinua de los NGs de PVCL.....	68
2.2.3. Caracterización de los NGs	70
2.2.3.1. Conversión de los monómeros.....	70
2.2.3.2. Diámetro medio y número de partícula.....	71
2.2.3.3. Respuesta térmica de los NGs.....	72
2.2.3.4. Morfología de los NGs	73
2.2.3.5. Citotoxicidad	73
2.2.3.6. Capacidad de carga de los NGs.....	74
2.2.3.7. Liberación in vitro de OVA cargada en los NGs	75
2.3. Resultados y Discusiones	76
2.3.1. Síntesis de los NGs de PVCL.....	76
2.3.2. Respuesta térmica	85
2.3.3. Capacidad de carga y liberación de distintos analitos de los NGs de PVCL.....	91
2.3.3.1. Carga de fármaco	91
2.3.3.2. Carga y liberación de proteínas.....	93
2.3.4. Citotoxicidad.....	95
2.4. Conclusión	98
Capítulo 3: Síntesis semicontinua de nanogeles bifuncionales	101
3.1. Introducción	103
3.2. Trabajo experimental	105
3.2.1. Materiales.....	105
3.2.2. Polimerizaciones	106
3.2.3. Caracterización	108
3.2.2.3. Caracterización de los látex	108
3.2.3.2. Caracterización de las películas.....	114
3.3. Síntesis semicontinua de NGs de PVCL	118
3.4. Síntesis semicontinua de NGs bifuncionales con diferentes contenidos de BA ..	123

3.4.1. Estudio del mecanismo de formación de la morfología lobular.....	130
3.4.2. Estudio por CHDF de los NGs bifuncionales.....	134
3.4.2. Propiedades de las películas obtenidas a partir de los NGs bifuncionales con diferente contenido de BA	137
3.5. Síntesis semicontinua de NGs bifuncionales obtenidos con diferentes velocidades de dosificación	144
3.5.1. Propiedades de las películas obtenidas a partir de los NGs bifuncionales S4, S5 y S6.....	149
3.6. Síntesis semicontinua de NGs bifuncionales con diferentes composiciones de dosificación	154
3.6.1. Propiedades de las películas obtenidas con los NGs S4, S7 y S8.	160
3.7. Síntesis semicontinua de NGs bifuncionales con incorporación de AA.....	163
3.7.1 Propiedades de las películas obtenidas con los NGs con incorporación de AA	168
3.8. Conclusiones.....	173
Capítulo 4: Aplicación <i>in vitro</i> de los nanogeles bifuncionales como sistema de liberación dermal controlada de proteínas	177
4.1. Introducción.....	179
4.2. Trabajo experimental	180
4.2.1. Materiales	180
4.2.2. Capacidad de carga de los NGs	181
4.2.3. Respuesta térmica de los NGs cargados con OVA.....	181
4.2.4. Formación del parche a partir de los NGs S9	181
4.2.5. Ensayos de liberación <i>in vitro</i>	183
4.2.6. Marcado fluorescente de proteínas.....	184
4.2.7. Distribución de la OVA en el parche	184
4.2.8. Ensayos de penetración de OVA en piel humana	185
4.3. Propiedades del sistema cargado con OVA	189
4.3.1. Respuesta térmica de los NGs	190
4.3.2. Distribución de la OVA dentro del parche	191
4.4. Liberación controlada de proteínas	193

4.4.1 Liberación de OVA desde NGs y Parche.....	193
4.4.2. Liberación de proteínas desde parches formados con distintas relaciones proteína/NGs bifuncionales	194
4.5. Desempeño del parche en liberación tópica de OVA.....	197
4.6. Conclusiones	200
Capítulo 5: Nanogeles bifuncionales como sistema de liberación dermal de proteínas, y su comparación con hidro y nanogeles de PVCL	203
5.1. Introducción	205
5.2. Trabajo experimental	207
5.2.1. Materiales.....	207
5.2.2. Polimerizaciones	208
5.2.2. Caracterización de las plataformas.....	209
5.2.2.1. Morfología	209
5.2.2.2. Respuesta térmica	209
5.2.2.3. Citotoxicidad	210
5.2.2.4. Carga y liberación de OVA.....	210
5.2.2.5. Penetración en piel humana.....	212
5.3. Resultados y Discusiones.....	213
5.3.1. Estructura de las plataformas	214
5.3.2. Respuesta térmica de las plataformas.....	215
5.3.3. Citotoxicidad de las plataformas.....	219
5.3.4. Carga y liberación controlada de OVA.....	220
5.3.5. Penetración en piel de la OVA aplicada con las tres plataformas	223
5.4. Conclusiones	226
Capítulo 6 :Aplicación <i>in vivo</i> de los NGs bifuncionales como sistema de vacunación transdermal.....	229
6.1. Introducción	231
6.2. Trabajo experimental	232
6.2.1. Materiales.....	232
6.2.2. Modelo <i>in vivo</i>	232

6.2.3. Inoculaciones.....	233
6.2.4. Extracción de plasma	236
6.2.5. Evaluación de anticuerpos específicos	236
6.2.6. Respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH).....	238
6.2.7. Análisis estadísticos	238
6.3. Resultados y Discusiones	239
6.3.1. Influencia sobre la respuesta inmunológica del método de aplicación tópica de los NGs bifuncionales	239
6.3.1.1. Respuesta humoral	239
6.3.1.2. Respuesta celular.....	241
6.3.2. Influencia sobre la respuesta inmunológica de la incorporación de saponina como adyuvante.....	242
6.3.2.1. Respuesta humoral	242
6.3.2.2. Respuesta celular.....	243
6.4. Conclusiones.....	245
Capítulo 7: Conclusiones generales y sugerencias para trabajos futuros.....	247
7.1. Conclusiones generales	250
7.2. Sugerencias para trabajos futuros.....	252
Referencias	257
Anexo 1.....	265
Polimerizaciones discontinuas	267
Polimerizaciones semicontinuas	268
Anexo 2.....	273
Polimerizaciones discontinuas	273
Polimerizaciones semicontinuas	275

Índice de Tablas

Tabla 1.1. Factores que modifican la LCST de la PVCL.....	37
Tabla 2.1. Descripción de los reactivos empleados durante el trabajo experimental	68
Tabla 2.2. Receta de las polimerizaciones de VCL con diferentes contenidos de sólidos (B1-B3).....	70
Tabla 2.3. Principales resultados de la síntesis discontinua de NGs de PVCL (x , D y N_p) y valor de fuerza iónica (I) de la mezcla reaccionante.....	77
Tabla 2.4. Parámetros de respuesta térmica de los NGs obtenidos en B1-B3.....	87
Tabla 2.5. Valor medio y desviación estándar (SD) del potencial Z de los NGs B3 a diferentes temperaturas.	89
Tabla 2.6. Propiedades de los fármacos empleados.	91
Tabla 2.7. Eficiencia de encapsulamiento de OVA (EE) de los NGs B2 y B3 empleando los diferentes métodos de carga.....	94
Tabla 3.1. Parámetros de síntesis y propiedades de los NGs investigados.	105
Tabla 3.2. Descripción de los reactivos empleados durante el trabajo experimental.	106
Tabla 3.3. Receta general de las polimerizaciones.....	108
Tabla 3.4. Formulación de la polimerización semicontinua S0.....	119
Tabla 3.5. Polimerizaciones semicontinuas con diferentes contenidos de BA.	124
Tabla 3.6. Propiedades de los látex obtenidos en S0-S4.....	125
Tabla 3.7. Capacidad de hinchamiento y VPTT de los NGs S0-S4.....	128
Tabla 3.8. Propiedades mecánicas de las películas de PBA y S3.	138
Tabla 3.9. Rugosidad de los films S1-S4.....	141
Tabla 3.10. VPTT y capacidad de hinchamiento de los NGs y de las películas S3 y S4.....	144
Tabla 3.11. Condiciones de polimerización de las reacciones S4, S5 y S6.	145
Tabla 3.12. Rugosidad superficial de las películas obtenidas a partir de los NGs bifuncionales S4, S5 y S6.....	151
Tabla 3.13. VPTT y capacidad de hinchamiento de los NGs y películas S4, S5 y S6.	154
Tabla 3.14. Condiciones de polimerización de las reacciones S4, S7 y S8.	156

Tabla 3.15. Tg de las fases poliméricas presentes en los NGs S4, S7 y S8.....	158
Tabla 3.16. Rugosidad superficial de las películas formadas con los látex S4, S7 y S8.....	161
Tabla 3.17. VPTT y capacidad de hinchamiento de los NGs y películas S4, S7 y S8.....	163
Tabla 3.18. Condiciones de polimerización de las reacciones S3, S7, S9 y S10.....	165
Tabla 3.19. Valores de Tg de las fases de los NGs S3, S7, S9 y S10 determinados experimentalmente y calculados mediante Flory-Fox.	167
Tabla 3.20. Rugosidad superficial de los films S3, S7, S9 y S10.....	168
Tabla 3.21. VPTT y capacidad de hinchamiento de los NGs y películas S3, S7, S9 y S10. ...	173
Tabla 4.1. Descripción de los reactivos empleados durante el trabajo experimental.	180
Tabla 5.1. Descripción de los reactivos empleados durante el trabajo experimental	207
Tabla 5.2. Cantidad de OVA y relación OVA/polímero empleadas en los ensayos de penetración en piel humana.	213
Tabla 5.3. VPTT y capacidad de hinchamiento.	216
Tabla 6.1. Descripción de los reactivos empleados durante el trabajo experimental	232
Tabla 6.2. Experimentos de inoculación para evaluar la respuesta inmunológica <i>in vivo</i>	235

Índice de Figuras

Figura 1.1. Ilustración esquemática de diagramas de fase para soluciones de polímeros con LCST (a) y con UCST (b).....	35
Figura 1.2. Transición de bobina hidrofílica a glóbulo hidrofóbico de un polímero con LCST en agua.	36
Figura 1.3. Estructura química de los polímeros termosensibles PNIPAAm (a) y PVCL (b).	37
Figura 1.4. Evolución en el tiempo de la concentración de un analito administrado convencionalmente (a) y mediante un sistema de liberación controlada (b).....	38
Figura 1.5. Fotos de los primeros sistemas de liberación controlada. Imagen extraída de Journal of Controlled Release 132 (2008) 153–163. ¹⁸	39
Figura 1.6. Representación esquemática de la respuesta de un hidrogel de PVCL frente a un cambio de temperatura.	41
Figura 1.7. Representación esquemática de los diferentes tipos de hidrogeles según su tamaño.....	42
Figura 1.8. Cambio volumétrico y control de la liberación de analitos en NGs de PVCL.	43
Figura 1.9. Etapas de la polimerización en emulsión discontinua según el mecanismo de Harkins.	45
Figura 1.10. Mecanismos de nucleación en la polimerización en emulsión.	46
Figura 1.11. Mecanismo de hidrólisis de la VCL en medio ácido propuesto por Imaz y col. ³⁶ ...47	47
Figura 1.12. Conversión de VCL y BIS en la síntesis de NGs de PVCL realizadas con 1 % de sólidos, 4 %BIS/VCL, 1 % SDS/VCL, 1 % KPS/VCL, 1 % NaHCO ₃ /VCL a 60 °C (a) y 70 °C (b).	48
Figura 1.13. Diámetro de partícula (Dp) en función de la temperatura de los NGs obtenidos con diferentes condiciones de polimerización: distintas concentraciones de KPS a 60 °C (a) y a 70 °C (b), de BIS (c) y de SDS (d). Resultados extraídos de Imaz y col. ^{31,37}	49
Figura 1.14. Células de los sistemas inmune innato y adaptativo. Imagen extraída de libro “Understanding Modern Vaccines: Perspectives in Vaccinology”, Oberdan y col., 2011. ⁴⁰	51
Figura 1.15. Mecanismo efector del sistema inmune innato. Imágen extraída del libro “Understanding Modern Vaccines: Perspectives in Vaccinology”, Oberdan y col., 2011. ⁴⁰	52

Figura 1.16. Cinética de respuesta del sistema inmunológico frente a una primera y segunda exposición ante un antígeno. Imagen extraída del libro “Understanding Modern Vaccines: Perspectives in Vaccinology”, Oberdan y col., 2011. ⁴⁰	54
Figura 1.17. Vías de administración por inyección.	55
Figura 1.18. Estrategias empleadas para vacunación transdermal. Imagen extraída del artículo “Immunization without needles”. ⁴²	57
Figura 1.19. Etapas del proceso de formación de film.	59
Figura 1.20. Esquema propuesto de los NGs bifuncionales y sus propiedades.	61
Figura 2.1. Esquema de la formación de puntos de entrecruzamiento en NGs de PVCL.....	66
Figura 2.2. Esquema (a) y foto (b) del sistema de polimerización discontinua empleado.....	69
Figura 2.3. Espectros de H1-RMN de VCL (a) y BIS (b) con AcNa como estándar interno.	71
Figura 2.4. Esquema del protocolo empleado para la determinación de la capacidad de carga de los NGs.	75
Figura 2.5. Foto (a) y esquema (b) del sistema empleado para liberación controlada de OVA a partir de los NGs.	76
Figura 2.6. Evolución a lo largo de las reacciones B1-B3 de la conversión de VCL (a), la conversión de BIS (b) y del D (c).	77
Figura 2.7. Espectros de H1-RMN de muestras extraídas a lo largo de las polimerizaciones B1 (a), B2 (b) y B3 (c).	79
Figura 2.8. Esquema de fases presentes al inicio de las reacciones B1 y B3.	81
Figura 2.9. Reparto de la VCL entre el agua y la partícula de polímero durante la polimerización en emulsión en ausencia de gotas.	81
Figura 2.10. Perfil de la concentración de VCL en las partículas ($[VCL]_P$) en los experimentos B1-B3.	82
Figura 2.11. Curvas de DSC de los NGs obtenidos en B1-B3.	85
Figura 2.12. Respuesta térmica de los NGs de PVCL obtenidos en B1-B3 (a-c) y su comparación (d).	87
Figura 2.13. Estudio de la respuesta térmica de los NGs B2 y B3 a diferentes concentraciones por DLS. Las Tablas muestran los valores de VPTT obtenidos por los métodos de la derivada y del punto medio.	88

Figura 2.14. Estudio por transmitancia a 500 nm de la respuesta térmica de los NGs B2 y B3 a diferentes concentraciones. Las Tablas muestran los valores de VPTT obtenidos por los métodos de la derivada y del punto medio.....	90
Figura 2.15. Resultados de capacidad de carga (a) y eficiencia de encapsulamiento (b) obtenidos en los ensayos de carga de los NGs B2 con concentraciones de fármacos de 1 a 5 mg/mL.	92
Figura 2.16. Estructura química del polímero componente de los NGs y de los fármacos empleados.	92
Figura 2.17. Esquema de las estrategias de carga de los NGs con OVA investigadas: a partir de NGs colapsados a 40 °C (a) y de NGs liofilizados (b).	94
Figura 2.18. Ensayos de liberación de OVA en función de la temperatura con los NGs B2 cargados por liofilización o colapso (a) y con los NGs B2 y B3 cargados por liofilización (b). ...	95
Figura 2.19. Resultados de citotoxicidad de los NGs de PVCL investigados mediante los ensayos MTT (a) y Celltiter Glo (b)	97
Figura 2.20. Imágenes de las dispersiones celulares luego de 48 hs de incubación con los NGs de PVCL investigados.....	97
Figura 3.1. Esquema de los NGs bifuncionales.....	104
Figura 3.2. Esquema (a) y foto (b) del sistema de polimerización con dosificación.	107
Figura 3.3. Esquema de la estrategia de polimerización semicontinua. Configuración del sistema de polimerización (a) y esquema de alimentación de los monómeros a lo largo de la reacción (b).....	108
Figura 3.4. Espectros de H1-RMN de BA (a) y AA (b) con AcNa como estándar interno.	110
Figura 3.5. Esquema del principio de fraccionamiento por tamaños de un equipo CHDF.	111
Figura 3.6. Determinación de la MFFT. Observación de la MFFT sobre la placa (a) y equipo empleado (b).	114
Figura 3.7. Ensayo de tracción. Imagen de una probeta antes y después del ensayo (a), y durante la realización del ensayo (b).	117
Figura 3.8. Equipo empleado en la determinación de Ángulo de Contacto.....	118
Figura 3.9. Polimerización semicontinua de VCL (S0) y su comparación con el proceso batch (B3). Evolución a lo largo de las reacciones de la conversión (a), diámetro a 55 °C (b) y número de partículas (c).	121
Figura 3.10. Respuesta térmica de los NGs obtenidos en S0 y su comparación con los NGs obtenidos en B3.....	122

Figura 3.11. Micrografías de TEM de los NGs S0 (a) y B3 (b); y esquemas de la morfología de los NGs obtenidos en S0 (c) y B3 (d).	123
Figura 3.12. Esquema de alimentación de los monómeros empleados en las reacciones S3 y S4.....	125
Figura 3.13. Conversión instantánea de VCL a lo largo del tiempo en las polimerizaciones S0-S4.....	126
Figura 3.14. Estudio de DSC de los NGs con incorporación de BA (S1-S4).	127
Figura 3.15. Diámetro de los NGs S0-S4 en función de la temperatura.	128
Figura 3.16. Morfología observada por TEM de los NGs obtenidos en S3 (a) y S4 (b).	129
Figura 3.17. Imagen de fase de AFM de los NGs obtenidos en S3.....	129
Figura 3.18. Micrografía de TEM de muestras extraídas a lo largo de la polimerización S4... ..	131
Figura 3.19. Esquema de la evolución de la morfología de las partículas a lo largo de la polimerización S4.	133
Figura 3.20. Distribución de la concentración de oligoradicales dentro de la partícula en crecimiento.....	133
Figura 3.21. Diagrama de morfologías (extraído del artículo de Blenner y col ⁹⁷).....	134
Figura 3.22. Distribución en volumen obtenida mediante CHDF para los látex S4F1 (a) y S4F2 (b).....	135
Figura 3.23. Distribución en volumen obtenidas mediante CHDF para los látex S3 (a) y S4 (b).	136
Figura 3.24. Foto de las películas de PBA, S3 y B3.....	138
Figura 3.25. Fotos de los films obtenidos con los látex S1 (a), S2 (b) y S4 (c).....	139
Figura 3.26. Imágenes de topografía y fase obtenidas por AFM de las películas formadas a partir de los látex obtenidos en S1-S4.	140
Figura 3.27. Micrografía de TEM de un corte transversal de la película S3.	141
Figura 3.28. Absorción de agua de los films obtenidos en S3 y S4.....	142
Figura 3.29. Imágenes de la película y de una dispersión de los NGs S3 a 20 °C (a) y a 55 °C (b).....	143
Figura 3.30. Respuesta térmica de los NGs y de las películas S3 (a) y S4 (b).....	144
Figura 3.31. Esquema de dosificaciones de los monómeros para las reacciones S4-S6.....	145

Figura 3.32. Evolución de la conversión de VCL en las polimerizaciones S4 (a), S5 (b) y S6 (c).	146
Figura 3.33. dDSC de las muestras S4, S5 y S6.....	147
Figura 3.34. Micrografías de TEM de los NGs bifuncionales obtenidos en S4 (a), S5 (b) y S6 (c).	149
Figura 3.35. Imagen de AFM de topografía y fase de las superficies de las películas obtenidas con los NGs S4, S5 y S6. Como referencia se incluye las imágenes de TEM de los respectivos NGs.	150
Figura 3.36. Ángulo de contacto medido para las películas S4F1, S4F2, S4, S5 y S6.	152
Figura 3.37. Absorción de agua a temperatura ambiente (a) y pérdida de masa al final del ensayo (b) de las películas obtenidas a partir de los NGs bifuncionales S4, S5 y S6.....	153
Figura 3.38. Respuesta térmica de los NGs y películas S4 (a), S5 (b) y S6 (c).	153
Figura 3.39. Esquema de alimentación de los monómeros en las reacciones S4, S7 y S8; y composición teórica de las fases de los NGs expresadas en % w/vcl.	155
Figura 3.40. Conversión global e instantánea de VCL obtenidas en las polimerizaciones S4 (a), S7 (b) y S8 (c).	156
Figura 3.41. dDSC de los NGs bifuncionales S4, S7 y S8.	158
Figura 3.42. Imágenes de TEM de los NGs obtenidos en S4 (a), S7 (b) y S8 (c).	159
Figura 3.43. Imagen de AFM de topografía y fase de las películas obtenidas con los NGs bifuncionales S4, S7 y S8. Como referencia se agregan las respectivas imágenes de TEM de los NGs.	160
Figura 3.44. Absorción de agua de las muestras (a) y peso perdido al final del ensayo (b) para las películas S4, S7 y S8.	161
Figura 3.45. Respuesta térmica de los NGs y películas S4 (a), S7 (b) y S8 (c).	162
Figura 3.46. Ángulo de contacto medido para las películas S4, S7 y S8.	163
Figura 3.47. Esquema de alimentación de los monómeros en las polimerizaciones S3, S7, S9 y S10.	164
Figura 3.48. Evolución de la conversión instantánea de VCL de las polimerizaciones S3 y S9 (a) y, S7 y S10 (b).	165
Figura 3.49. dDSC de los NGs S3 y S9.	166
Figura 3.50. dDSC de los NGs S7 y S10.	166
Figura 3.51. Imágenes de TEM de los NGs S3 (a) y S9 (b).	168

Figura 3.52. Imagen de AFM de topografía y fase de los films S3, S7, S9 y S10.....	169
Figura 3.53. Imágenes de TEM del corte transversal de las películas S3 (a) y S9 (b).....	170
Figura 3.54. Foto de las películas formadas con los NGs S7 y S10.....	170
Figura 3.55. Absorción de agua de las muestras S3 y S9 (a), S7 y S10 (b).....	171
Figura 3.56. Ángulo de contacto medido para las películas S3, S7, S9 y S10.	171
Figura 3.57. Respuesta térmica de los NGs y las películas S3 (a), S9 (b), S7 (c) y S10 (d)...	172
Figura 4.1. Parche formado en molde de silicona (a) y en el molde de jeringa (b).	182
Figura 4.2. Molde de jeringa para la formación de parches.....	183
Figura 4.3. Procedimiento de formación del parche a partir del látex S9 con la incorporación de una proteína inmunogénica.	183
Figura 4.4. Superficies del parche (a) y ubicación de los campos (A, B, y C) observados con el microscopio confocal (b).....	185
Figura 4.5. Protocolo de construcción de los modelos de piel.....	186
Figura 4.6. Imágenes de cortes transversales de la piel.	187
Figura 4.7. Imágenes de microscopía de fluorescencia de una sección de piel donde se observan los tres marcadores: DAPI (a); mapa de temperatura (b) y Anti-OVA en rojo (c).....	188
Figura 4.8. Liberación de proteínas controlada por la temperatura en un parche formado con los NGs bifuncionales.....	189
Figura 4.9. Respuesta térmica de los NGs S9 cargados con 3 mg de OVA y sin cargar.....	191
Figura 4.10. Imágenes ópticas y de fluorescencia del parche cargado con OVA.	192
Figura 4.11. Ensayos in vitro de liberación de OVA en PBS, desde los NGs S9 (a) y desde el parche S9 (b).....	194
Figura 4.12. Ensayos in vitro de liberación de OVA, en PBS, desde parches formados con relaciones proteína/NGs bifunciones de 3/22.5 (a) y 3/45 (b).	195
Figura 4.13. Ensayos in vitro de liberación de BSA en PBS, desde parches formados con relaciones proteína/NGs bifuncionales iguales 1/22.5 (a), 2/22.5 (b) y 3/22.5 (c).	197
Figura 4.14. Resultados de los ensayos de penetración de OVA en modelos de piel humana intacta y deficiente de barrera (tratada con TNF α).....	199
Figura 4.15. Resultados de los ensayos de penetración de OVA en piel humana ex vivo intacta y deficiente de barrera (tratadas con 60 tape stripped).....	200

Figura 5.1. Representación esquemática de las plataformas estudiadas: hidrogel de PVCL, NGs de PVCL y parche (a); y efecto de la temperatura sobre los sistemas (b).....	207
Figura 5.2. Obtención de los especímenes de hidrogel de PVCL; hidrogel producto de la polimerización en jeringa (a); corte y lavado de los discos; disco de hidrogel comparado con parche obtenido a partir de los NGs bifuncionales (c).....	208
Figura 5.3. Protocolos de carga de OVA en los NGs de PVCL (a), el hidrogel de PVCL (b) y el parche (c).	211
Figura 5.4. Ensayo de liberación a partir del hidrogel y el parche (a) y de los NGs (b).....	212
Figura 5.5. Imágenes de microscopía de las plataformas estudiadas: hidrogel de PVCL (a), NGs de PVCL (b) y parche (c).	214
Figura 5.6. Respuesta térmica del hidrogel de PVCL, los NGs de PVCL y del parche (a); e imágenes de los sistemas en estado hinchado y colapsado (b).....	216
Figura 5.7. Distribución de DLS en intensidad (Int) y volumen (Vol) a 25 y 37 °C de los NGs de PVCL (a) y los NGs bifuncionales (b).....	217
Figura 5.8. Curvas de DSC obtenidas para una muestra de hidrogel de PVCL hidratada, a distintas velocidades de calentamiento.....	218
Figura 5.9. Valores de VPTT en función de la velocidad de calentamiento empleada en la medición por DSC para los tres sistemas.	219
Figure 5.10. Viabilidad relativa de fibroblastos dermales humanos después de 48 hs de exposición a extracto de hidrogel (a) y diferentes concentraciones de NGs de PVCL y NGs bifuncionales (b).	220
Figura 5.11. Capacidad de carga (LC) y eficiencia de encapsulación (EE) de OVA de los diferentes sistemas estudiados.....	221
Figura 5.12. Liberación de OVA en PBS desde el hidrogel (a), los NGs de PVCL (b), y el parche (c). Estructura secundaria de la OVA liberada por los tres sistemas (d).....	223
Figura 5.13. Resultados del ensayo de penetración en piel humana realizado empleando una solución de OVA con 4 mg/mL (a), igual cantidad de OVA cargada en los tres sistemas (b) e igual relación OVA/polímero en los tres sistemas (c).	225
Figura 6.1. Metodología empleada para la inoculación de los ratones.	234
Figura 6.2. Parche empleado para la inmunización antes y después del proceso de hidratación.	235
Figura 6.3. Esquema de inmunización empleado.....	236
Figura 6.4. Esquema de las etapas del ELISA para detección de anticuerpos específicos. ...	237

Figura 6.5. Ensayo de evaluación de DTH.....	238
Figura 6.6. Evolución de la densidad óptica (DO) de IgG1 (a) y área bajo la curva (AUC) (b) de los grupos control (PBS), 1 y 5. *Diferencia significativa respecto del grupo PBS ($p<0.05$). ...	240
Figura 6.7. Evolución del índice de IgG2a de los grupos control (PBS),1 y 5.....	240
Figura 6.8. Análisis preliminar de la respuesta celular mediante DTH de los grupos control (PBS), 1 y 5.....	241
Figura 6.9. Evolución de la DO de IgG1-anti OVA (a) y área bajo la curva (AUC) (b) de los grupos 1-4 y control (PBS). *Diferencia significativa respecto del grupo PBS ($p<0.05$).....	242
Figura 6.10. Evolución de la DO de IgG2a-anti OVA (a) y área bajo la curva (AUC) (b) de los grupos 1-4 y control (PBS). *Diferencia significativa respecto del grupo PBS ($p<0.05$).....	243
Figura 6.11. Análisis preliminar de la respuesta celular mediante DTH de los grupos 1-4 y control (PBS).....	243
Figura 6.12. Fotos de los ratones luego de la primera inoculación (24 hs después de aplicar el parche), correspondientes a los grupos 1 (a) y 4 (b).....	244
Figura 7.1. Esquema de la estructura de los NGs propuestos para vacunación vía transdermal y mucosa.....	255

Resumen

En los últimos años, la nanociencia y la nanotecnología han sido un importante foco de atención en la investigación, tanto académica como industrial. El desarrollo de nanomateriales poliméricos tiene una fuerte influencia en el campo biomédico debido que constituye una poderosa herramienta para mejorar las técnicas de terapia y diagnóstico actuales. Como ejemplo se puede citar el desarrollo de productos farmacéuticos más efectivos como sistemas de liberación controlada, técnicas de imagen, implantes y reemplazo de tejidos, test de diagnósticos y hasta tratamientos para combatir enfermedades particulares. Dentro de la amplia gama de nanomateriales poliméricos existentes se encuentran los nanogeles (NGs), partículas formadas por redes de polímeros entrecruzados. Los NGs tienen propiedades muy atractivas para su empleo en bioaplicaciones como alta capacidad de retención de agua y fluidos biológicos, tamaño y funcionalidades controlables, fácil preparación, alta capacidad de carga de fármacos y moléculas biológicas, estabilidad en presencia de suero, etc. Además, dependiendo de su composición, son capaces de responder a diferentes estímulos como pH, temperatura, fuerza iónica y campo eléctrico. Debido a su gran potencialidad y flexibilidad de diseño de los NGs se ha avanzado en numerables aplicaciones. En este sentido, el desarrollo de estrategias sintéticas que permitan manipular de forma controlada la morfología y composición de los NGs para ampliar y regular las propiedades favorables de estos materiales.

En esta Tesis se desarrolló un método de síntesis que permite obtener NGs termosensibles y con capacidad de formación de película, dos propiedades que no fueron combinadas previamente. Para ello, se trabajó con *N*-vinilcaprolactama (VCL) como monómero base para la construcción de la matriz de los NGs, debido a sus propiedades de termorespuesta y biocompatibilidad, y con acrilato de butilo (BA) para generar una fase de baja temperatura de transición vítrea (T_g) que permita la coalescencia de los NGs entre sí y de esa forma otorgar la capacidad de formación de película. Es por ello, que a estos NGs se los denominará en esta Tesis como NGs bifuncionales, porque combinan estas dos capacidades (termorespuesta y

capacidad de formar película). Se pretende que este sistema pueda ser empleado como parche para vacunación transdermal, debido a que combina las propiedades de los NGs como alta capacidad de carga y liberación controlada de moléculas biológicas, con el efecto oclusivo del film, que facilita la penetración de moléculas a través de la piel. Cabe destacar que el alcance de esta Tesis recorre desde el desarrollo del método de síntesis de los NGs bifuncionales, hasta su prueba como sistema de vacunación transdermal, incluyendo tanto ensayos *in vitro* como *in vivo* relacionados a esta aplicación en particular. A continuación, se detalla el contenido de los capítulos que componen la presente Tesis.

En el Capítulo 1 se introducen los principales antecedentes y conceptos relacionados con los polímeros termosensibles, incluyendo la síntesis y propiedades de los distintos tipos de hidrogeles y de los sistemas de liberación controlada de analitos. Además, se exponen los principales antecedentes en síntesis y caracterización de los NGs de PVCL. Seguidamente, se exponen nociones de inmunización y los sistemas existentes para vacunación transdermal. Finalmente, se presenta la motivación y los objetivos planteados para el desarrollo de la presente Tesis.

En el Capítulo 2 se estudia la síntesis de NGs de PVCL y la influencia de la concentración de los reactivos sobre algunas propiedades de estos nanomateriales. Este estudio permitió determinar el aumento en el contenido de sólidos que sin afectar negativamente las propiedades de dichos NGs, hace posible su empleo en una aplicación con formación de película.

A partir de la información obtenida en el capítulo anterior, en el Capítulo 3 se investigó la síntesis semicontinua de NGs bifuncionales con morfología controlada, empleando como monómeros principales VCL y BA. Se analizó la influencia de diferentes parámetros de síntesis en la morfología y propiedades de los NGs bifuncionales, como así también sobre las características de las películas formada a partir de los mismos.

En el Capítulo 4 se estudió la potencialidad de los NGs bifuncionales como sistema de liberación tópica de analitos. Se realizaron ensayos *in vitro* de liberación de proteínas inmunogénicas modelo en PBS (BSA y OVA) a diferentes temperaturas y la distribución de OVA

dentro del parche formado. Además, se estudió la penetración de OVA en piel humana *ex vivo* y en modelos de piel para determinar la distribución de la proteína en las capas de la piel.

En el Capítulo 5 se comparó el desempeño del parche obtenido a partir de los NGs bifuncionales como sistema de liberación tópica controlada, con NGs e hidrogeles puros de PVCL. Para ello, se evaluaron las propiedades de los tres sistemas en diferentes niveles. En primer lugar, se estudió la respuesta térmica y la citotoxicidad de los tres materiales sobre fibroblastos humanos. Luego, se evaluó la capacidad de carga de OVA y el control de su liberación por temperatura. Finalmente, se evaluó la capacidad de estos sistemas para favorecer la penetración de OVA en piel humana.

En el Capítulo 6 se muestran los resultados de estudios *in vivo* que permiten evaluar la respuesta inmunológica generada por la aplicación del sistema de liberación tópica controlada basado en los NGs bifuncionales, empleando OVA como proteína inmunogénica. En este estudio se evaluó la aplicación del parche de dos maneras: formado previamente a su aplicación y formado directamente sobre la piel a la hora de la inoculación. Además, se estudió la influencia de la incorporación de un adyuvante en la formulación sobre la respuesta inmunológica generada.

Finalmente, en el Capítulo 7 se extrajeron las principales conclusiones de la Tesis y se formularon algunas sugerencias para trabajos futuros.

Abreviaturas

AA	Ácido acrílico
AC	Ángulo de contacto
AFM	Microscopía de fuerza atómica
AIBN	2,2'-Azobis(2-metilpropionitrilo)
APC	Célula presentadora de antígeno
ATP	Adenosín trifosfato
BA	Acrilato de butilo
BIS	<i>N,N</i> -metilenbisacrilamida
BSA	Albúmina de suero bovino
CD	Dicroísmo circular
CHDF	Cromatografía por fraccionamiento hidrodinámico capilar
CMC	Concentración micelar crítica
D	Diámetro de partícula
DC	Célula dendrítica
DLS	Dispersión de luz dinámica
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DTH	Respuesta de hipersensibilidad retardada
EE	Eficiencia de encapsulamiento
FITC	Isocianato de fluoresceína
GLI	Glibenclamida
H1-RMN	Resonancia nuclear de protones
KPS	Persulfato de potasio
LC	Capacidad de carga
LCST	Mínima temperatura crítica de solución
MFFT	Temperatura mínima de formación de film

Abreviaturas

NG	Nanogel
Np	Número de partícula
OVA	Ovoalbúmina
PBA	Poliacrilato de butilo
PBS	Buffer fosfato salino
PCM	Paracetamol
PVCL	Poli(<i>N</i> -vinilcaprolactama)
RAN	Ranitidina
SAP	Saponina (Quil A)
SC	Estrato córneo
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SDS	Dodecil sulfato sódico
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
Tg	Temperatura de transición vítrea
UCST	Máxima temperatura crítica de solución
VCL	<i>N</i> -vinilcaprolactama
VPTT	Temperatura de transición de fase volumétrica

Capítulo 1

Consideraciones generales



1.1. Introducción

Los hidrogeles son materiales con un excelente potencial para su aplicación en liberación controlada, puesto que sus características físicas (grado de hidratación, porosidad, densidad de entrecruzamiento, resistencia mecánica, etc.) pueden alterarse y controlarse fácilmente, con el fin de modificar tanto la capacidad de carga como la velocidad de liberación de un fármaco determinado. Existe un conjunto de hidrogeles que son capaces de responder frente a un cambio en su entorno, como por ejemplo cambios en el pH, la temperatura, la presencia de campos eléctricos y/o magnéticos, la luz o algún agente bioactivo. A esta clase de hidrogeles se los llama hidrogeles sensibles a estímulos, siendo la temperatura el estímulo más estudiado por ser fácil de controlar. En este contexto, los hidrogeles termosensibles tienen la ventaja de transportar el analito dentro de su matriz y liberarlo selectivamente una vez superada la temperatura de transición, de manera de controlar el proceso de liberación.

En los últimos años se observó un notable incremento en el interés por el diseño de hidrogeles termosensibles de tamaño micrométrico y nanométrico, motivado por sus potenciales aplicaciones como biomateriales. Particularmente, los nanogeles (NGs) poseen todas las propiedades beneficiosas de los hidrogeles, con las ventajas de presentar mayor área expuesta que favorece la carga y liberación de analitos, conjuntamente con el tamaño reducido que permite una mayor velocidad de respuesta.

La versatilidad de los NGs ofrece una amplia oportunidad para su uso como vehículos de liberación de drogas específicamente dirigidas. Los NGs, exhiben numerables ventajas para el suministro de medicamentos en comparación con otros sistemas: reducen los efectos secundarios, prolongan el tiempo de circulación del fármaco debido a la alta estabilidad en comparación a las micelas, controlan la liberación de fármacos, pueden dirigirse a tejidos específicos a través de la conjugación de la superficie del nanogel con ligandos de afinidad, protegen a la molécula cargada de la rápida degradación, y facilitan el cruce de barreras tisulares.

Dentro de la gran variedad de aplicaciones de los NGs en sistemas de liberación controlada, se destaca la liberación transdermal, la cual se encuentra en actual crecimiento. Esta

última surge como una alternativa de la inyección para la administración de vacunas y proteínas ya que, a pesar de ser el método más ampliamente utilizado, cuenta con algunas limitaciones como dolor, contagios derivados de accidentes con agujas, etc. En este campo, predomina la liberación de drogas ya que el estrato córneo, la capa más externa de la piel es una barrera muy eficiente a través de la cual solo pueden cruzar moléculas pequeñas. Sin embargo, en los dos últimos años se estudió la penetración de proteínas a través de la piel mediante la utilización de NGs termosensibles.¹ En dichos estudios se demostró que las interacciones entre la matriz polimérica de los NGs y la piel permiten una mejor difusión de las proteínas. Debido a que en la piel se encuentra una gran población de células inmunocompetentes como los queratinocitos, células de Langerhans y linfocitos T, la liberación eficiente de un antígeno a dichas células podría generar una respuesta inmunológica específica.² En este contexto, los NGs termosensibles se presentan como potenciales sistemas de vacunación transdermal.

Un caso no abordado en la bibliografía es la síntesis de NGs termosensibles y biocompatibles con propiedades extendidas como capacidad de formación de películas. En esta Tesis se persigue la síntesis de NGs capaces de formar película, que brinden las ventajas propias de los NGs y amplíen sus potenciales formas de aplicación. En particular, se propone la síntesis de NGs bifuncionales (es decir, que incluyan respuesta termosensible y capacidad de formar película) para su utilización como sistema de vacunación transdermal. A continuación, se introducen los principales conceptos y antecedentes que tiene relación directa con la temática abordada en esta Tesis.

1.2. Polímeros termosensibles

Los polímeros termosensibles son una clase de materiales inteligentes que tienen la capacidad de responder a un cambio de temperatura.³ Este tipo de polímeros exhibe una transición de fase a una cierta temperatura, que causa un cambio repentino en el estado de solvatación. Existen dos tipos de polímeros termosensibles: los que presentan una mínima temperatura crítica de solución (LCST, de sus siglas en inglés) y los que presentan una máxima temperatura crítica de solución (UCST). LCST y UCST representan los puntos mínimo y superior,

respectivamente, del diagrama de fases del polímero en función de la temperatura y la fracción volumétrica del polímero (ϕ), de acuerdo a lo representado en la Figura 1.1. Estos puntos representan las condiciones mínimas y máximas donde el polímero y solvente son completamente miscibles.⁴ Por lo tanto, una solución acuosa de un polímero con LCST es transparente y homogénea por debajo de la temperatura de transición, porque el polímero es perfectamente soluble en agua. Pero por encima de la temperatura de transición, el polímero se vuelve hidrofóbico e insoluble, por lo que la solución se ve turbia. Este fenómeno es completamente reversible y en consecuencia, el enfriamiento por debajo de la LCST genera que el polímero vuelva a ser soluble. Por otro lado, los polímeros con UCST son solubles en agua por encima de la temperatura de transición e hidrofóbicos por debajo de esta temperatura.

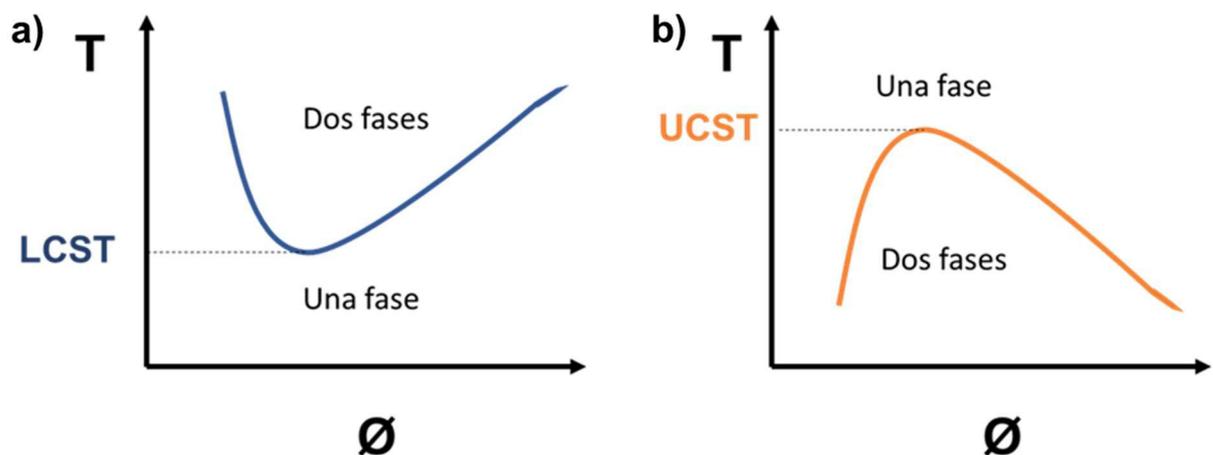


Figura 1.1. Ilustración esquemática de diagramas de fase para soluciones de polímeros con LCST (a) y con UCST (b).

En los polímeros con LCST, el cambio repentino de su comportamiento de hidrofílico a hidrofóbico se establece a partir del balance de los enlaces puente de hidrógeno entre los grupos funcionales de su cadena y las moléculas de agua circundantes, y las interacciones hidrofóbicas del propio polímero (Figura 1.2). Es así que, a temperaturas bajas, las interacciones del polímero con las moléculas de agua son importantes y las cadenas de polímero se hidratan y se solubilizan con una conformación del tipo bobina, dando como resultado una fase única. Al aumentar la temperatura, los puentes de hidrógeno se debilitan, las cadenas de polímero son parcialmente deshidratadas y precipitan en forma globular.

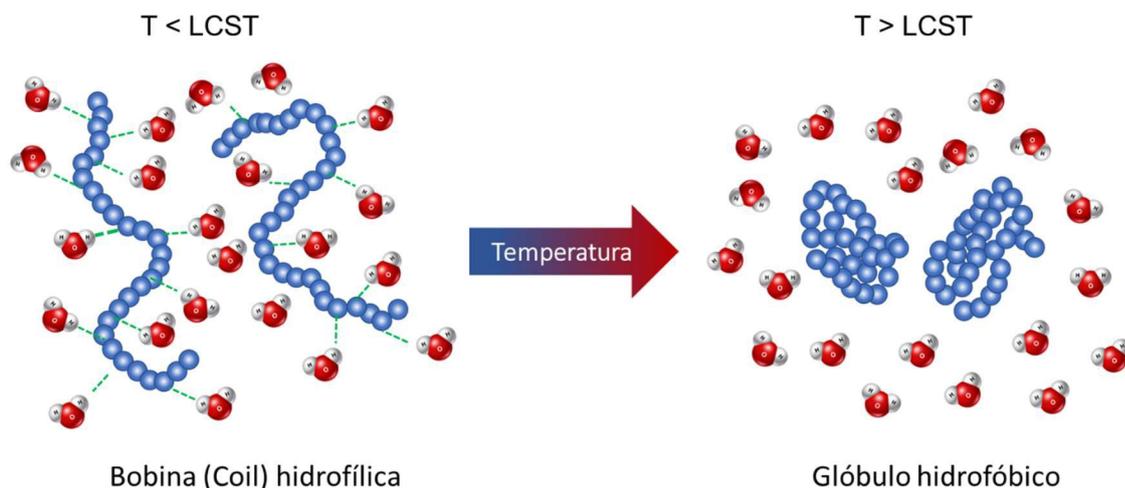


Figura 1.2. Transición de bobina hidrofílica a glóbulo hidrofóbico de un polímero con LCST en agua.

Los polímeros con LCST tuvieron un mayor impacto en la investigación respecto de los que poseen UCST, especialmente aquellos cuya temperatura de transición es cercana a la temperatura corporal, abriendo la posibilidad de su empleo en aplicaciones biomédicas.^{5,6} El polímero termosensible más ampliamente estudiado es el poli(*N*-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) (Figura 1.3a). El PNIPAAm presenta una LCST entre 32 y 33 °C independiente del peso molecular (Comportamiento del Tipo II).⁷ Pero la LCST del PNIPAAm puede modificarse cambiando el balance hidrofílico/hidrofóbico mediante la copolimerización con otros comonómeros. Para desplazar la LCST a menores temperaturas se emplean comonómeros más hidrofóbicos, mientras que para alcanzar temperaturas mayores se utilizan comonómeros más hidrofílicos.⁸ La poli(*N*-vinilcaprolactama) (PVCL) (Figura 1.3b) es el segundo polímero termosensible más estudiado. La PVCL posee propiedades muy interesantes para aplicaciones biotecnológicas, como solubilidad en agua y disolventes orgánicos, biocompatibilidad, alta capacidad de absorción y una temperatura de transición cercana a la corporal.⁹ A pesar de que la PVCL tiene una LCST cercana a la del PNIPAAm, hay diferencias significativas en la termodinámica de la transición de fase. En contraste con el PNIPAAm, la PVCL posee un clásico diagrama de fase termosensible de Flory-Huggins (Tipo I), donde la LCST depende del peso molecular de la cadena de PVCL y de su concentración en solución.¹⁰ Esta característica permite

controlar la respuesta térmica del polímero variando su peso molecular, sin la necesidad de emplear un comonómero. La gran variedad de factores que posibilitan la modificación de la LCST de la PVCL de manera externa (es decir, sin modificar el polímero) hacen de la PVCL un material de gran interés para la construcción de plataformas poliméricas avanzadas. La Tabla 1.1 resume los principales factores que modifican la LCST de la PVCL.

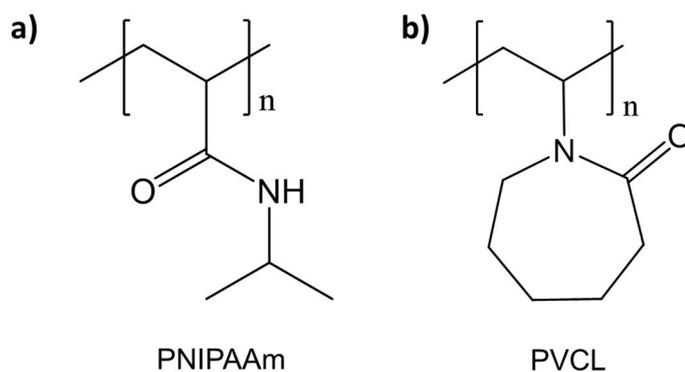


Figura 1.3. Estructura química de los polímeros termosensibles PNIPAAm (a) y PVCL (b).

Tabla 1.1. Factores que modifican la LCST de la PVCL.

Factores	PVCL LCST
Aumento de concentración del polímero¹⁰	Disminuye
Aumento de peso molecular¹¹	Disminuye
Incorporación de comonómeros hidrofílicos	Aumenta
Incorporación de comonómeros hidrofóbicos	Disminuye
Presencia de sales¹²	Disminuye
Presencia de alcohol¹³	Disminuye
Presencia de surfactantes aniónicos⁹	Aumenta

La polimerización de la VCL ha sido relativamente menos estudiada en comparación con la del NIPAAm, la cual ha sido objeto de numerosos estudios realizados por años. Probablemente esta diferencia se deba a la mayor dificultad para polimerizar la VCL de forma controlada, debido

a la inestabilidad de su radical. La cinética de polimerización de estos monómeros es muy diferente; y la copolimerización controlada de la VCL con otros monómeros es más difícil de controlar que en el caso de NIPAAm. Sin embargo, un factor importante que hace a la PVCL muy atractiva para aplicaciones biomédicas y ambientales es su biocompatibilidad, un hecho que no ha sido completamente demostrado para el PNIPAAm.¹⁴ Recientemente, se ha logrado un mejor control de la polimerización y copolimerización de VCL mediante técnicas de polimerización por radicales libres, lo cual resulta en un creciente interés por el estudio de la obtención de PVCL para aplicaciones biomédicas y ambientales.

1.3. Sistemas de liberación controlada

Dentro de la amplia gama de aplicaciones de la PVCL se destaca su empleo en sistemas de liberación controlada de analitos. Este tipo de sistemas tiene la capacidad de cargar principios activos y controlar la velocidad y el lugar de liberación de dichas moléculas, aumentando la eficiencia y disminuyendo los efectos adversos. Estos sistemas surgen de la necesidad de mejorar la acción terapéutica de los analitos, ya sea liberándolos directamente en el sitio de acción o manteniendo constante su concentración en sangre dentro de la ventana terapéutica. En la Figura 1.4 se muestra la variación en la concentración de un analito cuando es dosificado de manera convencional y cuando es dosificado mediante un sistema de liberación controlada.

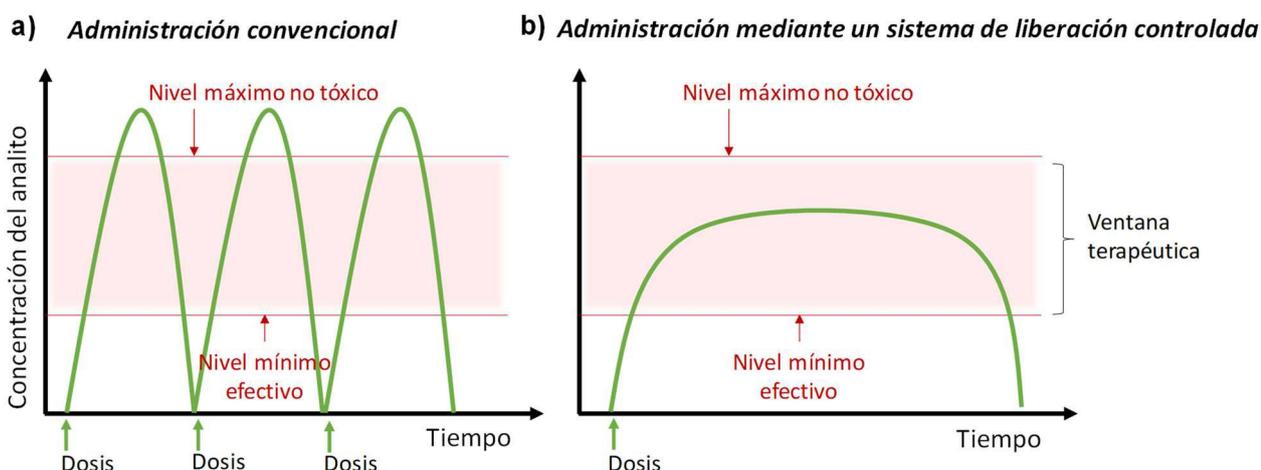


Figura 1.4. Evolución en el tiempo de la concentración de un analito administrado convencionalmente (a) y mediante un sistema de liberación controlada (b).

El principio de liberación controlada ha sido utilizado en la industria farmacéutica desde 1950, pero no fue hasta 1960 en que los polímeros fueron usados con estos fines.¹⁵ Folkman y Long fueron los primeros en reportar, en 1964, la liberación sostenida de un fármaco empleando materiales poliméricos.¹⁶ Desde entonces, las investigaciones en el campo de la liberación controlada tienen como protagonistas a los polímeros.¹⁷ Los primeros sistemas de liberación controlada fueron de escala macroscópica (Figura 1.5). Tales son los casos del Ocusert® para liberación controlada de una droga contra el glaucoma a una velocidad constante en el ojo; Progesterone® y Vaginal Ring®, dispositivos intrauterino (DIU) para liberación de un esteroide anticonceptivo en la cavidad uterina; y Norplant®, un implante anticonceptivo subcutáneo que consiste en 6 tubos de silicona.¹⁸

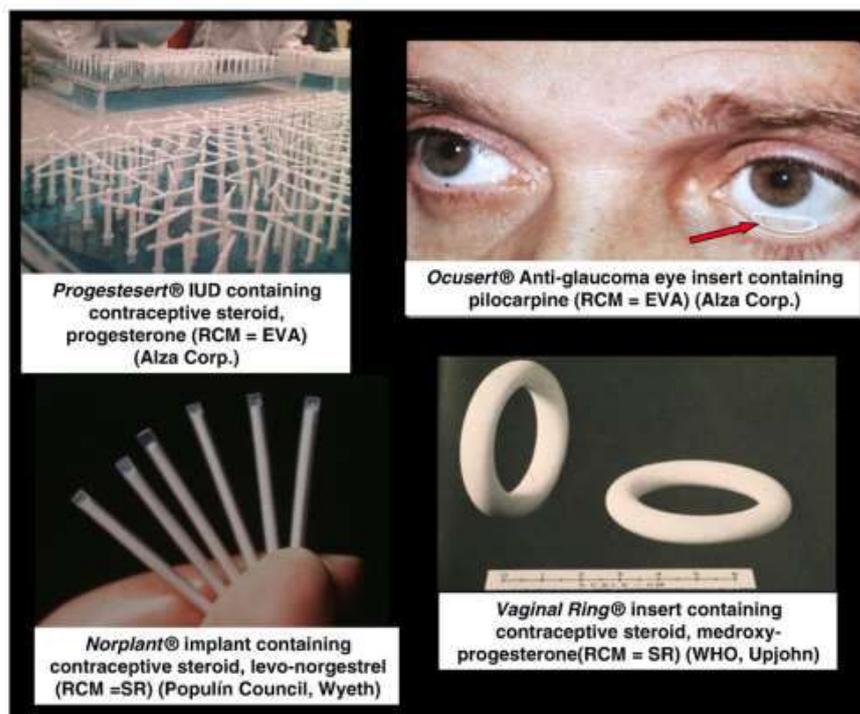


Figura 1.5. Fotos de los primeros sistemas de liberación controlada. Imagen extraída de *Journal of Controlled Release* 132 (2008) 153–163.¹⁸

Entre los años 1970 y 1980 el campo de la liberación controlada evolucionó desde la escala macro a microsistemas, siendo las micropartículas de poli(ácido glicólico) y de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) los primeros sistemas en esta escala. Estos biopolímeros están disponibles comercialmente para uso médico y han sido aprobados por la FDA (Food and Drug

Administration) para elaborar sistemas para la administración de sustancias activas por vía parenteral.¹⁹ Por esta razón el PLGA es el polímero más ampliamente empleado en sistemas de liberación controlada.

El empleo de la PVCL en sistemas de liberación controlada se enfocó mayoritariamente en sistemas reticulados, empleando algún entrecruzante para generar una estructura tridimensional como es el caso de hidrogeles, microgeles y nanogeles, y en menor medida en materiales con diferentes arquitecturas formados por copolímeros, como micelas, polímeros en bloque, copolímeros de injerto, etc.¹⁴ A continuación se describirán los principales conceptos y antecedentes de hidrogeles y NGs, haciendo especial énfasis en los obtenidos a partir de PVCL.

1.3.1. Hidrogeles

Los hidrogeles son estructuras poliméricas tridimensionales que contienen grupos altamente hidrofílicos, los cuales le confieren al material la capacidad de absorber agua u otros fluidos biológicos, manteniendo su forma y sin disolverse.^{20,21} Esta gran capacidad de retención de agua le otorga a los hidrogeles una alta biocompatibilidad y una gran capacidad para el transporte de proteínas y fármacos. Además, al modificar su estructura química se pueden obtener diversas propiedades mecánicas y físicas, que se adapten a diferentes aplicaciones.

El empleo de un polímero termosensible para la fabricación del hidrogel genera una matriz capaz de responder a cambios de temperatura. En este sentido, los hidrogeles de PVCL se encuentran hinchados y conteniendo una gran cantidad de agua a baja temperatura, donde la PVCL es soluble. Cuando la temperatura supera a la LCST de la PVCL, el hidrogel colapsa expulsando todo lo que tiene en su interior. La Figura 1.6 esquematiza este comportamiento. La temperatura a la cual ocurre el cambio volumétrico que sufre el hidrogel se denomina temperatura de transición de fase volumétrica (VPTT) y puede modificarse con las estrategias descritas en la Tabla 1.1.

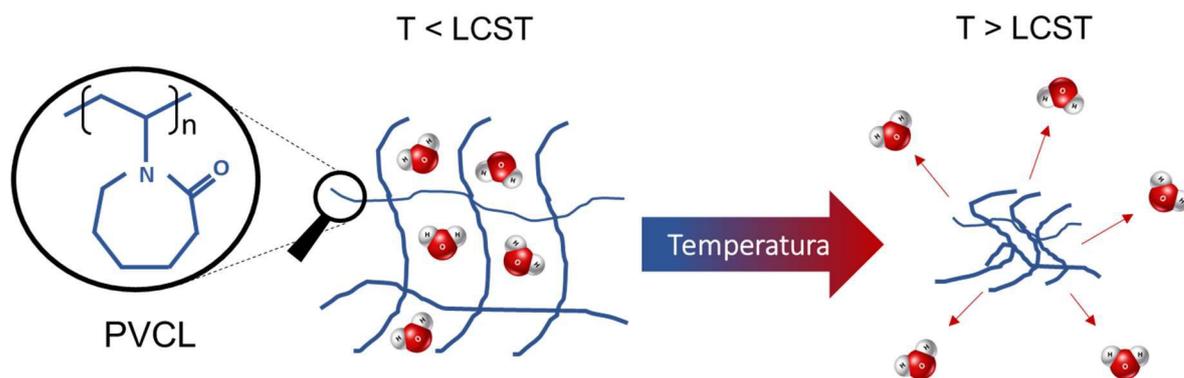


Figura 1.6. Representación esquemática de la respuesta de un hidrogel de PVCL frente a un cambio de temperatura.

El primer hidrogel de PVCL covalentemente entrecruzado, fue reportado en 1996 por Makhaeva y col.⁹ Desde entonces se ha publicado la síntesis de una gran cantidad de hidrogeles basados en PVCL, tanto puros como conteniendo otros componentes, con el propósito de ampliar su rango de aplicación. Por ejemplo, Sanna y col. sintetizaron hidrogeles de PVCL con nanocristales de celulosa con el propósito de reforzar sus propiedades mecánicas.²² Wu y col. sintetizaron hidrogeles catiónicos empleando cloruro de [2- (acriloxi) etil] trimetilamonio como comonomero para liberación controlada de proteínas.²³

Los hidrogeles pueden clasificarse según su tamaño en macrogeles o hidrogeles macroscópicos, microgeles o nanogeles (NGs) (Figura 1.7). El interés en la síntesis de los sistemas de escala micro y nanométrica para su empleo en liberación controlada de diversas moléculas ha crecido en los últimos años. La disminución de tamaño de la matriz polimérica tiene dos efectos en la migración del analito cargado. Por un lado, se cuenta con un área expuesta mayor para el intercambio de materia, y por el otro, se obtiene una mayor velocidad de respuesta frente a los cambios de temperatura. De manera que la velocidad de respuesta térmica debería ser mucho mayor en los NGs que para hidrogeles macroscópicos. Así, Chu y col. propusieron, para los hidrogeles de PNIPAAm, una regla que establece que el tiempo de respuesta es proporcional al cuadrado de la dimensión de la matriz.²⁴

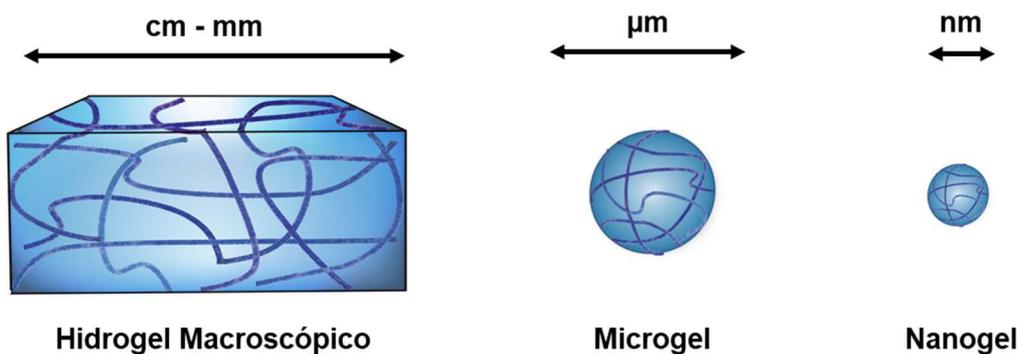


Figura 1.7. Representación esquemática de los diferentes tipos de hidrogeles según su tamaño.

1.3.2. Nanogeles

Los NGs tienen un creciente protagonismo en aplicaciones biomédicas debido a sus propiedades únicas. Estos tienen todas las ventajas de los hidrogeles macroscópicos, pero dentro de un tamaño privilegiado como para producir partículas estables en dispersión y con posibilidades de ingreso a nivel celular. La flexibilidad y versatilidad en el diseño de los NGs permite amplias oportunidades para su empleo como sistemas de liberación controlada y dirigida. En este particular campo de aplicación, los NGs cumplen muchos, si no todos, los requisitos básicos de un sistema de liberación controlada versátil, como la capacidad de reducir los efectos secundarios de fármacos, extender el tiempo de circulación del componente activo y protegerlo de la posible degradación *in vivo*, alcanzar células o tejidos específicos a través de conjugación de la superficie del nanogel con ligandos de afinidad, y facilitar el cruce de las barreras de tejidos.²⁵

En particular, los NGs de PVCL resultan de gran interés porque, además de todas las ventajas comunes a los NGs, poseen respuesta térmica en un rango de temperatura cercana a la corporal humana. Esta propiedad puede ser empleada para realizar la liberación de un principio activo en condiciones controladas. Es decir, a temperaturas menores de la VPTT, la carga se mantendrá dentro de la matriz del NG (protegida por ella) y la liberación tendrá lugar cuando el sistema se exponga a una temperatura mayor a la VPTT. En la Figura 1.8. se muestra una curva típica del volumen en función de la temperatura para NGs de PVCL; donde a bajas temperaturas

los NGs se encuentran hinchados y conteniendo la carga, y a una temperatura determinada sufre un cambio volumétrico, como consecuencia del colapso de los mismos, expulsando el fluido y la carga de su interior. Este cambio volumétrico puede ocurrir paulatinamente, donde se produce la liberación lenta del analito, o puede suceder repentinamente provocando la liberación rápida de su carga. El control de este cambio volumétrico permite regular la cinética de liberación del analito.

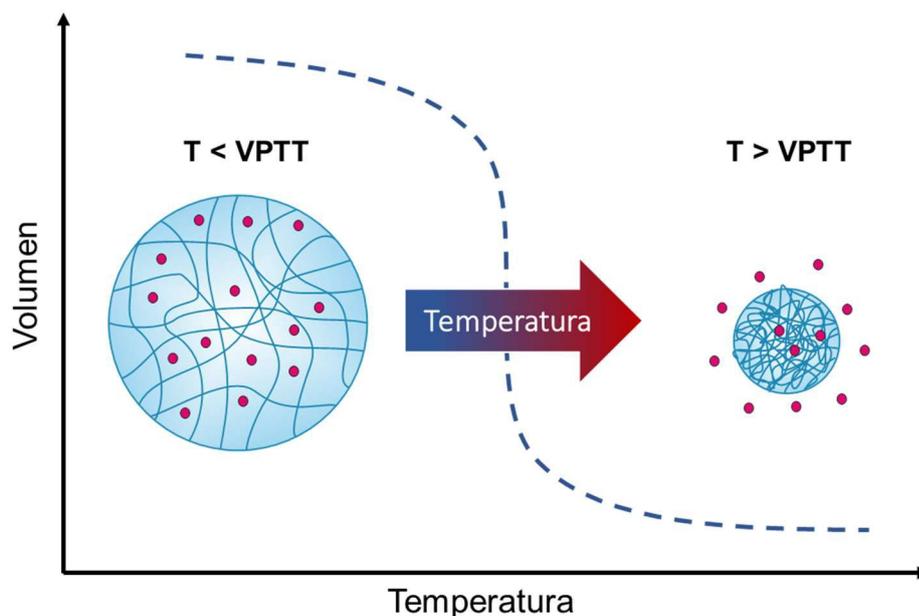


Figura 1.8. Cambio volumétrico y control de la liberación de analitos en NGs de PVCL.

1.4. Síntesis de NGs de PVCL

La preparación de micro y nanogeles termosensibles en agua requiere que la polimerización se lleve a cabo a temperaturas superiores a su LCST final.²⁴ Bajo estas condiciones el monómero soluble en agua reacciona para dar un polímero insoluble a la temperatura de reacción utilizada. Se han empleado diferentes técnicas para sintetizar micro y nanogeles de PVCL: polimerización por dispersión,^{26,27} polimerización por precipitación²⁸⁻³⁰ y polimerización por emulsión.^{31,32}

Debido a que en esta Tesis los NGs se sintetizaron por polimerización en emulsión, se desarrollarán algunos conceptos de esta técnica.

1.4.1. Principios de la polimerización en emulsión

La polimerización en emulsión convencional es un proceso en el cual un monómero (o mezcla de monómeros) disperso en un medio (generalmente acuoso) se convierte a través de una polimerización por radicales libres en una dispersión “cinéticamente estable” de partículas de polímero con un diámetro menor que un micrón. Al inicio, el monómero se encuentra disperso en la fase acuosa formando gotas, las cuales están estabilizadas con un emulsificante. Este emulsificante puede añadirse a una concentración mayor que la concentración micelar crítica (CMC), dando lugar además a la formación de una gran cantidad de micelas. Dichas micelas son capaces de hincharse con el monómero en su interior hidrofóbico, el cual migra desde las gotas hasta alcanzar un equilibrio. Parte del monómero también se encuentra disuelto en el agua, a una concentración que depende de su solubilidad (generalmente baja).

De acuerdo con la teoría de Harkins, el proceso discontinuo de la polimerización en emulsión puede dividirse en tres intervalos o etapas. En la Figura 1.9 se presentan las especies presentes en cada una de las etapas.

Etapa I: Es la etapa de nucleación. En este sistema coexisten cuatro fases: gotas de monómero (1000-10000 nm de diámetro), micelas (5-10 nm de diámetro), partículas de polímero (50–200 nm de diámetro) y la fase acuosa. La Figura 1.10 ilustra los mecanismos de formación de partículas que pueden estar involucrados en la polimerización en emulsión. En la nucleación micelar, el iniciador soluble en agua se descompone y genera radicales que reaccionan con el monómero disuelto en la fase acuosa formando oligorradicales, los cuales migran hacia el interior de las micelas, donde hay una elevada concentración de monómero que permite continuar la reacción de polimerización. Por otro lado, en la nucleación homogénea las partículas se forman en la fase acuosa por precipitación de radicales oligoméricos, ya sea por agregación entre ellos o porque han alcanzado una longitud crítica que los hace insoluble en agua. Los oligorradicales precipitados por nucleación homogénea se estabilizan absorbiendo emulsificante y se hinchan con monómero alcanzando el equilibrio termodinámico entre las fases.

Etapa II: Es la etapa de crecimiento de las partículas, que coexisten con las gotas de monómero y no hay formación de nuevas partículas. Estas aumentan su tamaño (a número constante) y permanecen saturadas con monómero, por lo que la concentración de monómero en las partículas se mantiene aproximadamente constante. Esta etapa finaliza cuando desaparece la fase gotas de monómero.

Etapa III: En esta etapa coexisten sólo dos fases: las partículas de polímero y la fase acuosa. La concentración de monómero en las partículas disminuye con el avance de la reacción, mientras que el número de partículas permanece idéntico al intervalo II. La velocidad de polimerización disminuye en esta fase como consecuencia de la reducción de la concentración de monómero.

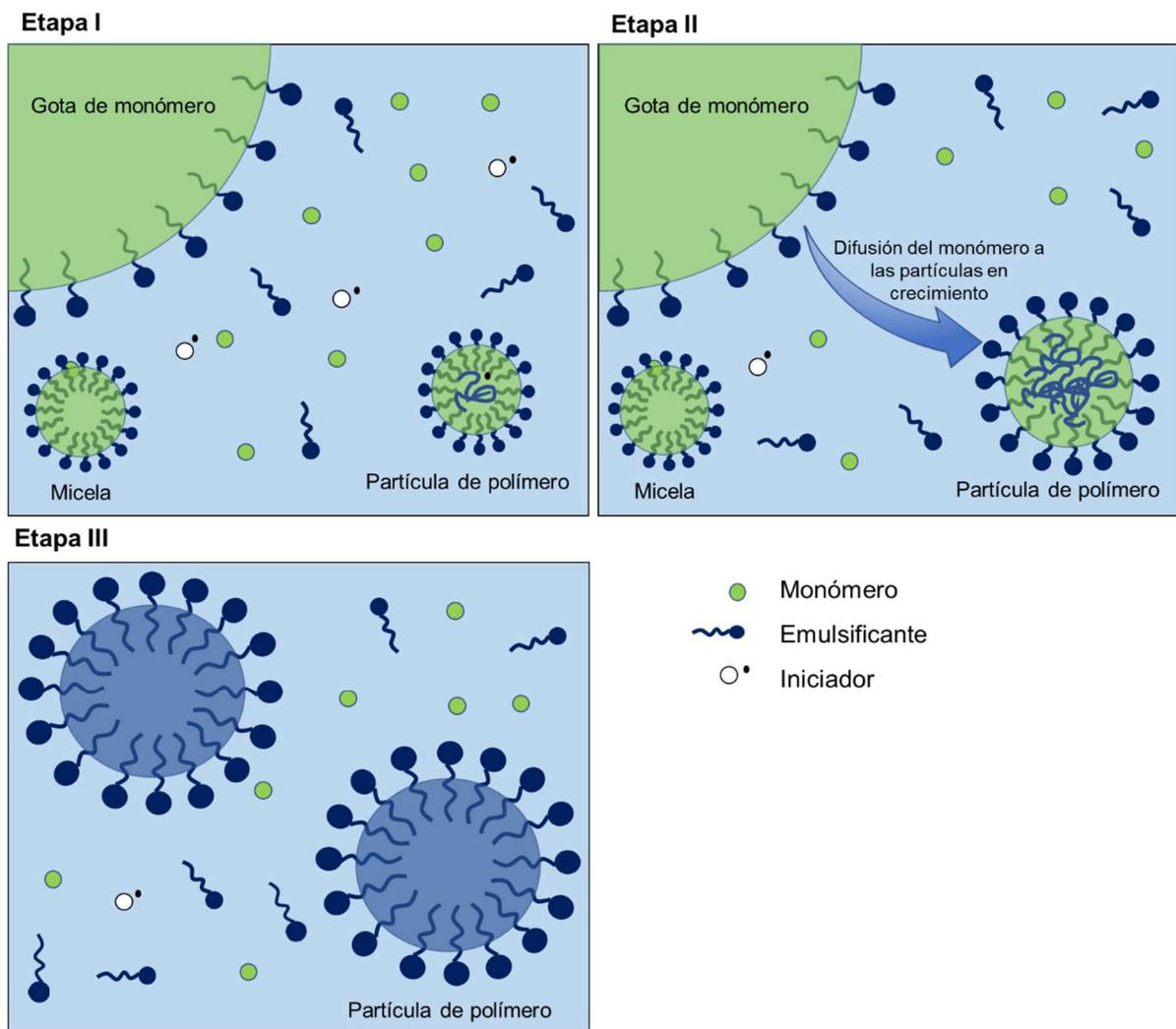


Figura 1.9. Etapas de la polimerización en emulsión discontinua según el mecanismo de Harkins.

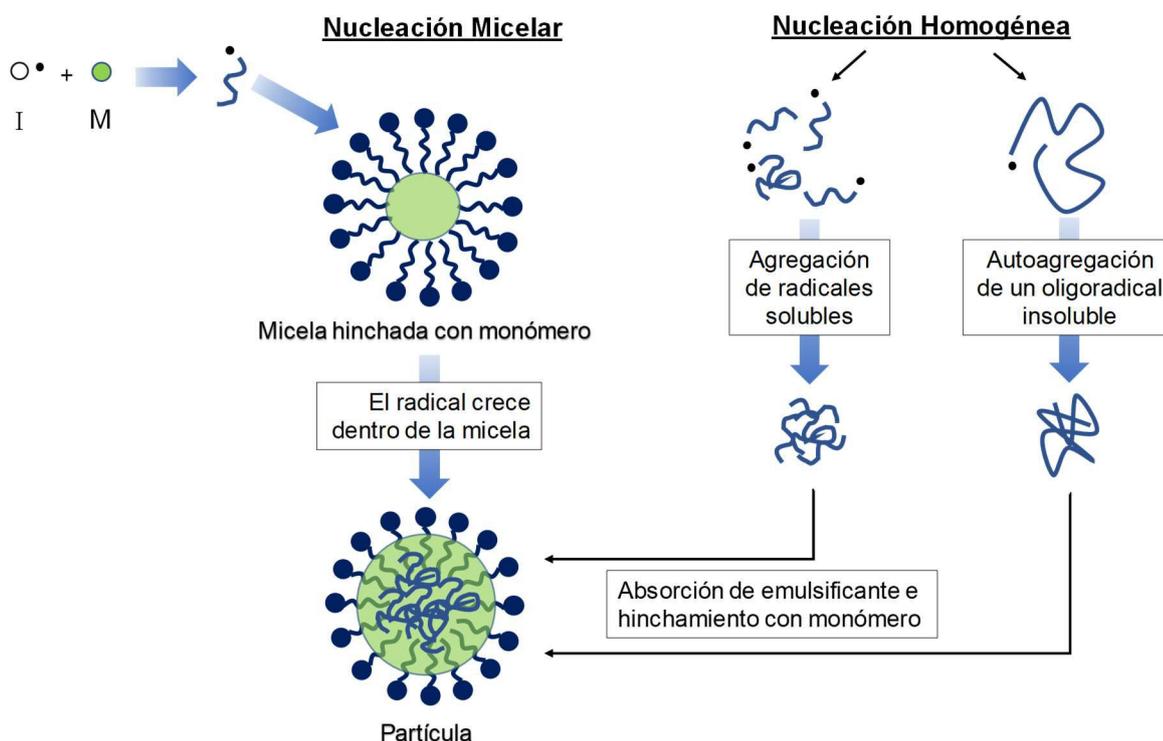


Figura 1.10. Mecanismos de nucleación en la polimerización en emulsión.

1.4.2. Antecedentes previos de síntesis de NGs de PVCL mediante polimerización en emulsión

La síntesis de NGs de PVCL mediante polimerización por emulsión fue extensamente estudiada por el grupo de Jaqueline Forcada del Polymat (San Sebastián, España). En su primera publicación relacionada con este sistema, proponen sintetizar los NGs empleando *N,N*-metilenbisacrilamida (BIS) como entrecruzante, dodecil sulfato sódico (SLS) como emulsificante y persulfato de potasio (KPS) como iniciador. Con dichos reactivos estudiaron diferentes parámetros de síntesis tales como temperatura, cantidad de iniciador, cantidad de entrecruzante, cantidad de emulsificante y concentración de monómero.³¹ En trabajos posteriores los mismos autores reportaron el efecto del empleo de diferentes entrecruzantes³³ y de la incorporación de ácido acrílico en la formulación monomérica³⁴ y la aplicación de NGs de PVCL en liberación controlada de drogas.³⁵ En su publicación “Evidences of a hydrolysis process in the synthesis of *N*-vinylcaprolactam -based microgels”³⁶ reportaron la necesidad de realizar la síntesis del microgel en presencia de un buffer para prevenir la hidrólisis de la VCL cuando se emplea un

iniciador persulfato. Se conoce que el KPS descompone térmicamente generando dos radicales sulfato de acuerdo a la reacción 1.1; luego los radicales generados pueden reaccionar con el monómero (reacción 1.2) o con el agua (reacción 1.3) produciendo HSO_4^- y reduciendo el pH del medio.



Bajo condiciones ácidas la VCL sufre una hidrólisis de acuerdo con el mecanismo presentado en la Figura 1.11, generando acetaldehído y caprolactama.

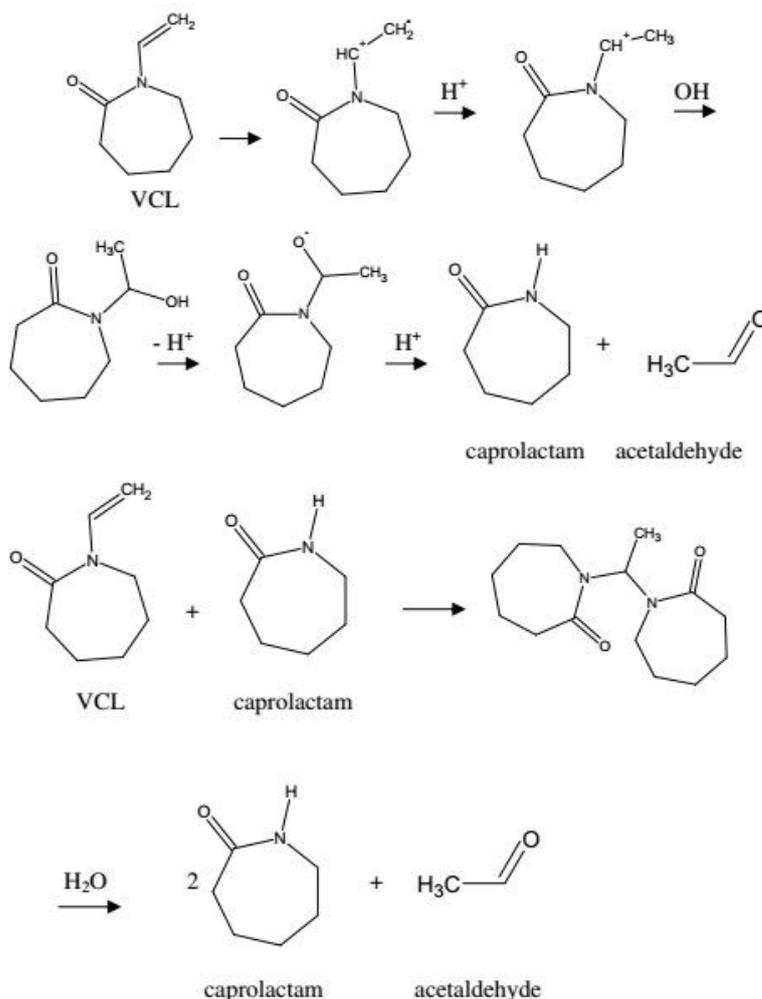


Figura 1.11. Mecanismo de hidrólisis de la VCL en medio ácido propuesto por Imaz y col.³⁶

Por lo tanto, cuando la polimerización ocurre en medio ácido, la hidrólisis de la VCL compite con la reacción de propagación, ya que descompone el monómero e impide su polimerización. Para evitar este inconveniente, los autores proponen emplear NaHCO_3 como buffer para mantener el pH del medio de reacción cercano a 7. Bajo estas nuevas condiciones, estudiaron algunos parámetros de síntesis, y a continuación se presentan algunos resultados reportados en esta publicación.³⁷ En la Figura 1.12 se muestra la conversión de la VCL y la BIS para la síntesis de NGs de PVCL, a dos temperaturas de reacción: 60 y 70 °C. Se puede ver en ambos casos que la BIS se consume completamente a los 30 y 10 min de la reacción para las temperaturas de 60 °C y 70 °C, respectivamente, mientras que la VCL reacciona más lentamente y en ninguno de los dos casos llega a consumirse completamente. En base a estos resultados los autores proponen que las partículas de nanogel formadas presentan una fase interna más densamente entrecruzada y una fase externa con menor grado de entrecruzamiento.

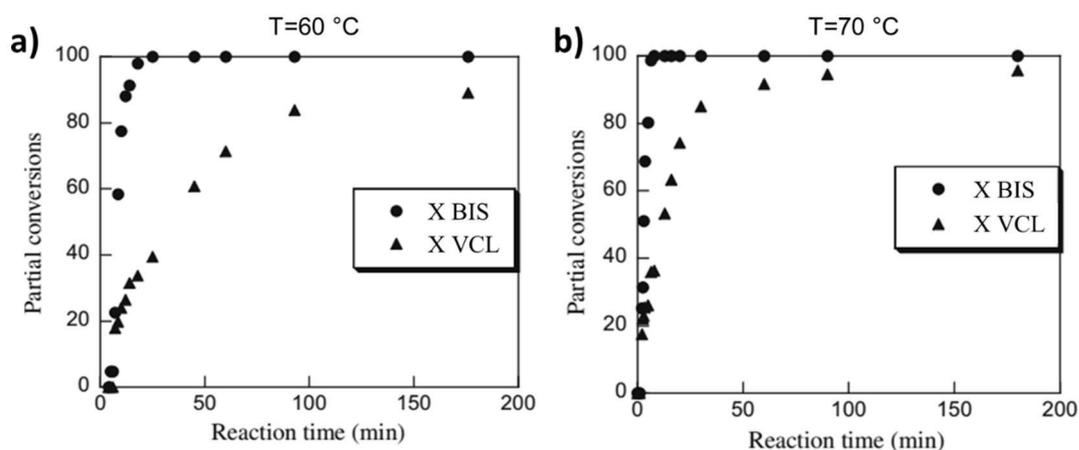


Figura 1.12. Conversión de VCL y BIS en la síntesis de NGs de PVCL realizadas con 1 % de sólidos, 4 %BIS/VCL, 1 % SDS/VCL, 1 % KPS/VCL, 1 % NaHCO_3 /VCL a 60 °C (a) y 70 °C (b).

En la Figura 1.13 se muestra la respuesta térmica de los microgeles obtenidos en diferentes condiciones de reacción, expresadas como % en peso con respecto a la VCL (wt % M). Las Figuras 1.13a y b presentan la respuesta térmica de los NGs obtenidos con diferentes relaciones de KPS/VCL (0.5 a 1.5 %) a 60 y 70 °C, respectivamente. Los autores observaron que la respuesta térmica cambia al modificar la temperatura de polimerización, de manera que a mayor temperatura de reacción, se obtienen NGs con mayor capacidad de hinchamiento. Por

otro lado, cuando se aumenta la relación KPS/VCL, para una misma temperatura de reacción, los NGs presentan una mayor capacidad de hinchamiento, y un diámetro colapsado mayor. En la Figura 1.13c se muestra la respuesta térmica de los NGs obtenidos con diferentes relaciones de BIS/VCL (4 a 10 %) a 70 °C. Los autores reportaron que el aumento de la concentración de BIS genera NGs con menor capacidad de hinchamiento y mayor VPTT, debido a que la BIS es más soluble en agua que la PVCL y por lo tanto aumenta la solubilidad del material. Finalmente, en la Figura 1.13d se muestra la respuesta térmica de NGs de PVCL obtenidos con diferentes relaciones SDS/VCL (4 y 8 %), y para lo cual se reportó que el aumento de la concentración de SDS, permite obtener NGs con menores diámetros y capacidad de hinchamiento. Este resultado se debe a que una mayor cantidad de emulsificante presente en la dispersión durante la polimerización permite estabilizar una mayor área interfacial partícula-agua y por lo tanto se genera un número mayor de partículas de menor tamaño.

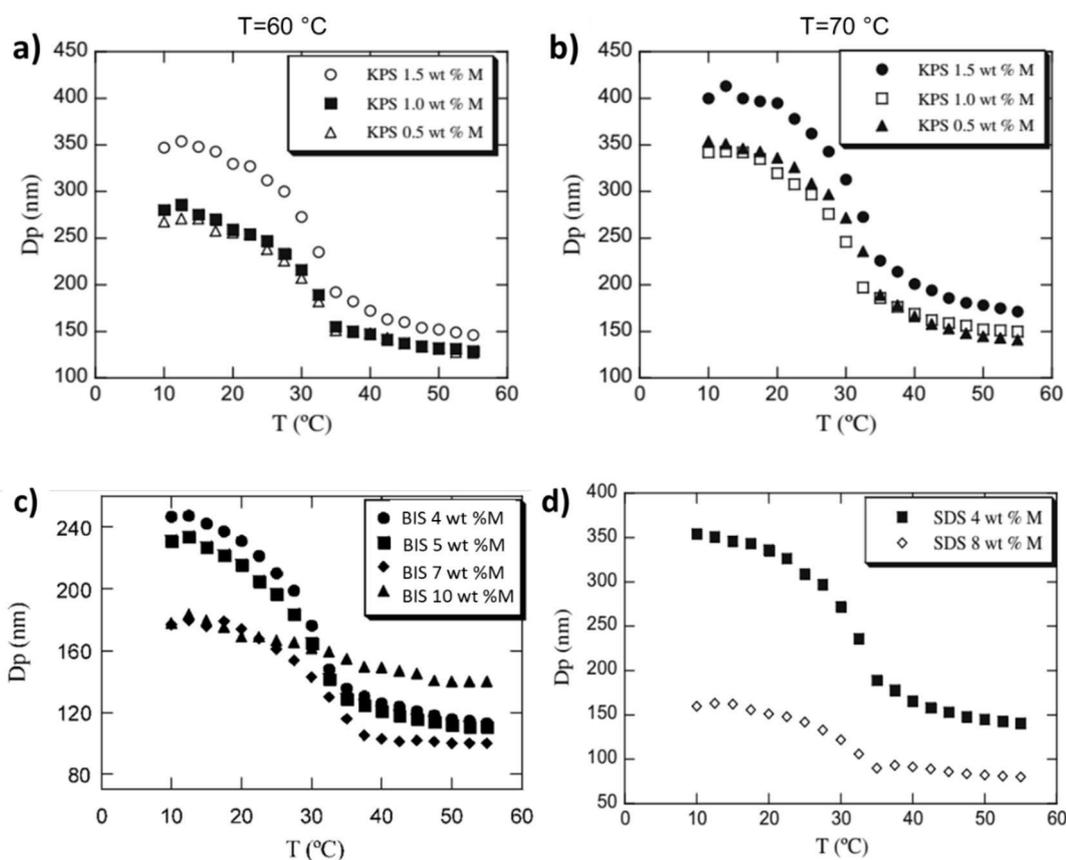


Figura 1.13. Diámetro de partícula (D_p) en función de la temperatura de los NGs obtenidos con diferentes condiciones de polimerización: distintas concentraciones de KPS a 60 °C (a) y a 70 °C (b), de BIS (c) y de SDS (d). Resultados extraídos de Imaz y col. ^{31,37}

1.5. Nociones de vacunación

Una vacuna, según la Organización Mundial de la Salud, es “cualquier preparación destinada a generar inmunidad contra una enfermedad, estimulando la producción de anticuerpos”. Las vacunas están compuestas por dos componentes: el inmunógeno y el adyuvante.

Inmunógeno: es la sustancia capaz de producir una respuesta inmune específica frente a un determinado patógeno.

Adyuvante: es la sustancia agregada a la vacuna para potenciar la inmunogenicidad del antígeno o redirigir su acción a un determinado perfil de respuesta, incrementando la efectividad de la misma.

La vacunación es una de las más exitosas intervenciones médicas en la reducción de enfermedades infecciosas. Numerosas enfermedades como el sarampión, la rubeola, el tétanos y la fiebre amarilla están ahora bajo control gracias a campañas de vacunación realizadas a lo largo de la historia.³⁸

1.5.1. Sistema inmunológico

El sistema inmunológico puede ser considerado como un sistema multicapa, que comprende tres mecanismos de defensa principales: (i) barreras externas que incluyen barreras físicas (como la piel y membranas mucosas) y químicas (como enzimas destructivas en las secreciones y ácidos del estómago); y las respuestas inmunes (ii) innatas y (iii) adaptativas.

La inmunidad innata representa la primera línea de defensa contra patógenos que han ingresado al cuerpo. Este mecanismo carece de memoria y se enfoca principalmente en un conjunto limitado de determinantes microbianos compartidos por un gran número de patógenos. Las respuestas innatas se caracterizan por una falta de proceso de aprendizaje y una cinética rápida, lo que proporciona una protección casi inmediata contra los patógenos invasores.³⁹ La inmunidad innata está compuesta por células de tejidos (fijas) como los macrófagos y células dendríticas (DCs), y células móviles como los neutrófilos, eosinófilos y monocitos (Figura 1.14).

El mecanismo de acción del sistema inmune innato se muestra en la Figura 1.15. Las células residentes cerca del sitio de infección secretan mediadores solubles para reclutar a las demás células del sistema innato al sitio de infección, y para aumentar la actividad fagocítica. Mediante la secreción de factores antimicrobianos y la fagocitosis, el sistema inmune innato es capaz de contener y expulsar a la mayoría de los patógenos. Cuando esto no es suficiente, el patógeno es tomado por las DCs inmaduras las cuales maduran y se convierten en células presentadoras de antígeno (APC). En el proceso de maduración, las DCs migran hacia los nódulos linfáticos mientras procesan al patógeno en su interior y toman una parte de él para presentarla a las células del sistema inmune adaptativo, el cual se encarga de la respuesta inmunológica desde ese momento.

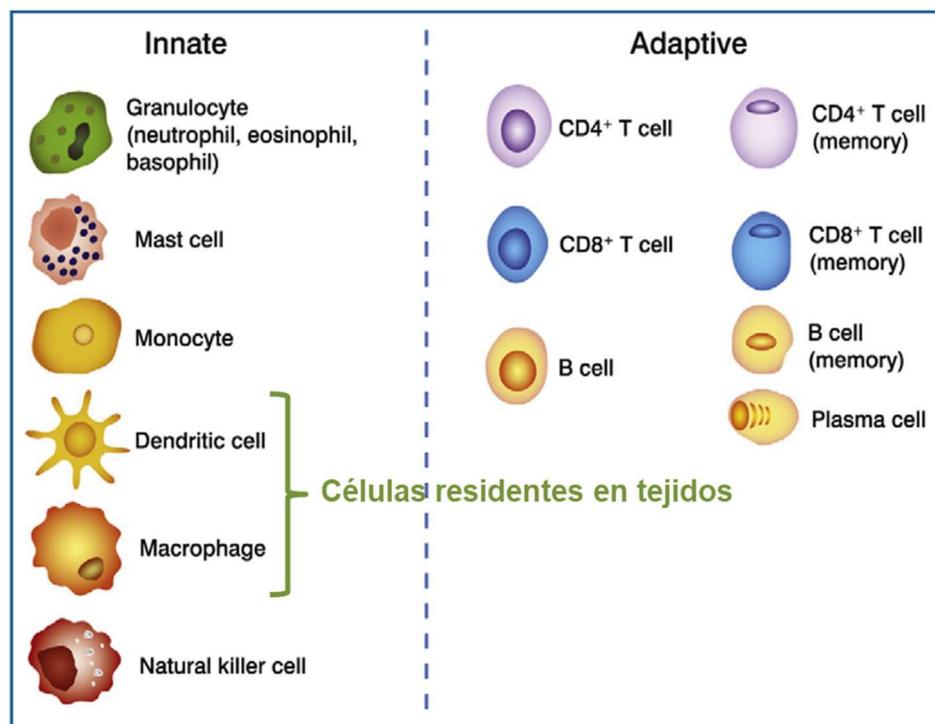


Figura 1.14. Células de los sistemas inmune innato y adaptativo. Imagen extraída de libro "Understanding Modern Vaccines: Perspectives in Vaccinology", Oberdan y col., 2011.⁴⁰

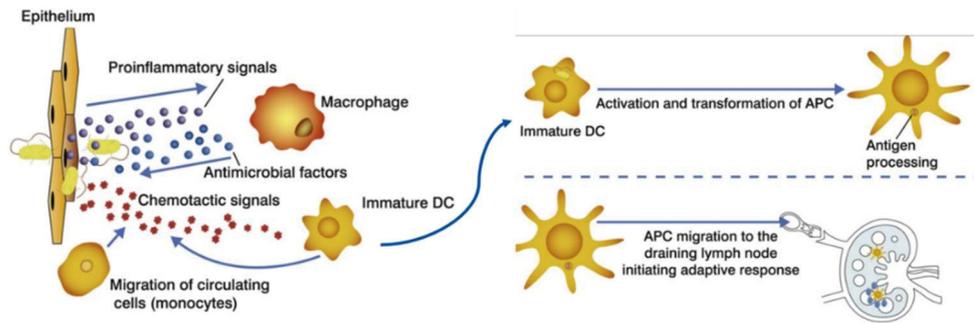


Figura 1.15. Mecanismo efector del sistema inmune innato. Imágen extraída del libro “Understanding Modern Vaccines: Perspectives in Vaccinology”, Oberdan y col., 2011.⁴⁰

La inmunidad adaptativa proporciona una segunda línea de defensa. Esta respuesta es relativamente lenta y se caracteriza por la intervención de un gran conjunto de moléculas y células efectoras capaces de reconocer y eliminar de manera eficiente prácticamente cualquier patógeno conocido. El sistema inmune adaptativo cuenta con dos tipos de células llamadas linfocitos: los producidos en la médula ósea (bone marrow, en inglés) se los llama linfocitos B, y los producidos en el Timo se los llama linfocitos T. Una vez que estos son activados por las DCs, expresan un único receptor antígeno-específico, de manera que solo son capaces de reconocer a un patógeno determinado. En la Figura 1.14 puede verse que existen distintas clases de linfocitos T. Esto se debe, a que una vez que son activados por las DCs, las células T expresan en su superficie un conjunto de proteínas, llamado cluster de diferenciación (CD), el cual depende del antígeno. Si el antígeno es intracelular (como los virus) expresan un complejo llamado CD8+, el cual es citotóxico y actúa directamente sobre la célula infectada. En cambio, si el antígeno es externo (como las bacterias y parásitos) expresan un complejo llamado CD4+, que interviene activando otras células que actuarán sobre la infección. Además, estas subclases de linfocitos T pueden almacenarse como células de memoria una vez que el patógeno fue combatido. Por otro lado, los linfocitos B pueden producir y liberar anticuerpos, los cuales permiten reclutar las células efectoras locales óptimas y ayudan a que la respuesta sea más eficiente. Existen diferentes clases de anticuerpos, las cuales tienen distintas funciones. El isotipo de los anticuerpos determina la capacidad de una clase de anticuerpos para localizarse en determinados sitios corporales y dirigirse a tipos específicos de infección. Los isotipos de anticuerpos se conocen como IgG, IgM, IgA, IgE e IgD.

Una característica muy importante del sistema inmune adaptativo es que después de la eliminación del patógeno, se establece un estado de "memoria" mediante la acumulación de células T y B de memoria específicas para cada antígeno, caracterizada por la capacidad de proteger eficazmente el cuerpo de una nueva infección con el mismo agente.

1.5.2. Mecanismo de la vacunación

En la Figura 1.16 se muestra la cinética de respuesta de los sistemas inmune innato (rojo) y adaptativo (azul) frente a una primera y una segunda exposición a un antígeno. En la primera exposición el sistema innato debe detectar el antígeno, procesarlo y trasladar la información al sistema adaptativo de manera que éste pueda interpretarlo. Esto ocurre mediante la acción de las células APC con la intervención de anticuerpos, mayoritariamente de los isotipos IgG e IgM, y demora días o semanas. Una vez combatido el patógeno o antígeno, el cuerpo conserva células de memoria especializadas. Estas células se guardan durante un largo tiempo (meses o años) e incluso pueden permanecer en el huésped toda su vida. En caso de una segunda exposición al mismo antígeno, la respuesta inmune innata actúa de la misma manera que en la primera infección, pero ahora las células de memoria son capaces de establecer una respuesta más pronunciada y más rápida ya que no necesitan atravesar el mismo proceso de activación que las células nativas. En esta segunda exposición los anticuerpos que intervienen son mayoritariamente del isotipo IgG.

Teniendo en cuenta que la respuesta inmunológica es más rápida y más eficiente en la segunda exposición a un antígeno, la vacunación persigue la introducción de un antígeno de manera que no genere una infección masiva que enferme al paciente, pero que provoque una activación del sistema inmune de forma que guarde células de memoria y pueda protegerse eficientemente en el caso de una posterior infección.

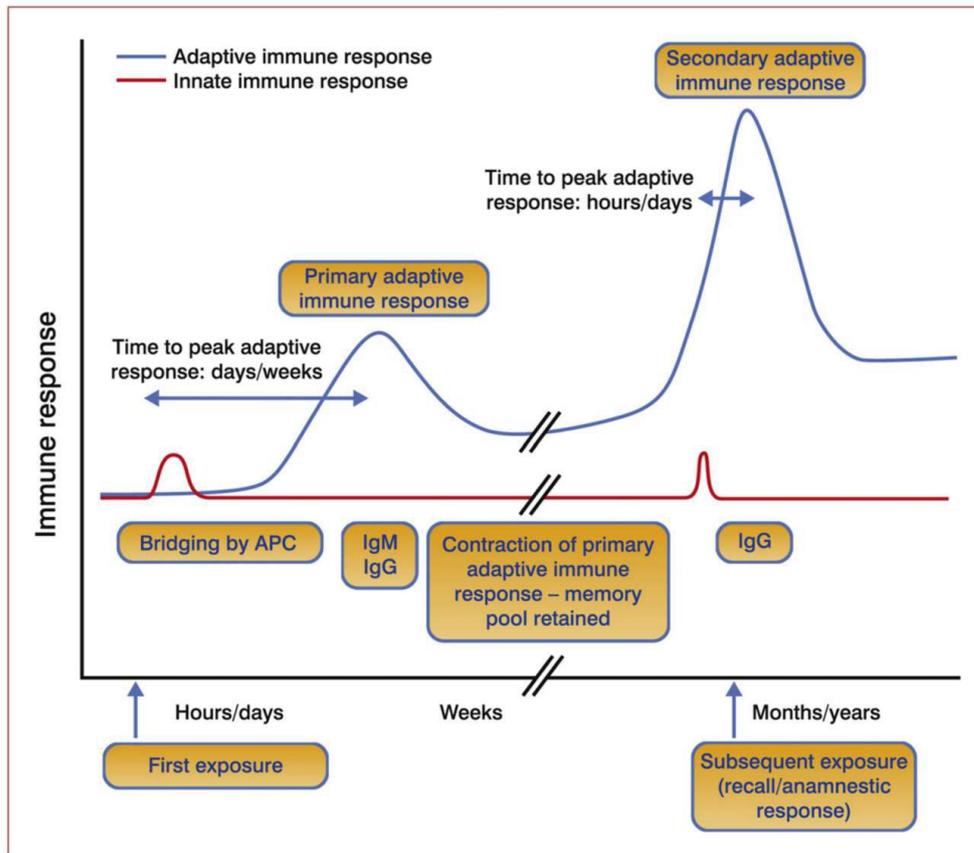


Figura 1.16. Cinética de respuesta del sistema inmunológico frente a una primera y segunda exposición ante un antígeno. Imagen extraída del libro “Understanding Modern Vaccines: Perspectives in Vaccinology”, Oberdan y col., 2011.⁴⁰

1.5.3. Vías de inoculación convencional

La inyección es la principal vía de administración de vacunas. Esta vía de vacunación es eficiente, pero produce un rechazo por parte de los pacientes debido al dolor y las lesiones relacionadas al uso de agujas. Existe también un gran historial de contagios de enfermedades debido a una mala manipulación de las agujas. Se estima que la reutilización de agujas causa la muerte de al menos 1.3 millones de personas por año por hepatitis B y SIDA.⁴¹ Estos números son considerablemente mayores en el área de veterinaria, donde el contagio entre animales es muy común debido al empleo de un único dispositivo de inyección en las campañas de vacunación. Además, la utilización de jeringas demanda la intervención de personal capacitado para su uso, y el transporte y almacenamiento requieren de muchos cuidados. Por otro lado, la vía oral (una vía alternativa a la inyección) requiere de dosis mayores, puede existir desactivación gastrointestinal de la vacuna debido a las condiciones extremas de pH del fluido gástrico y existe

una alta variabilidad de respuesta entre pacientes.⁴² En este contexto el deseo de eliminar la inyección como vía de inoculación, motiva fuertemente al desarrollo de un sistema de vacunación no invasivo.² Recientemente, la piel ha sido investigada como el sitio alternativo para la administración de vacunas debido a las abundantes APC contenidas en la epidermis, las cuales no pueden estimularse mediante las técnicas de inyección (Figura 1.17).

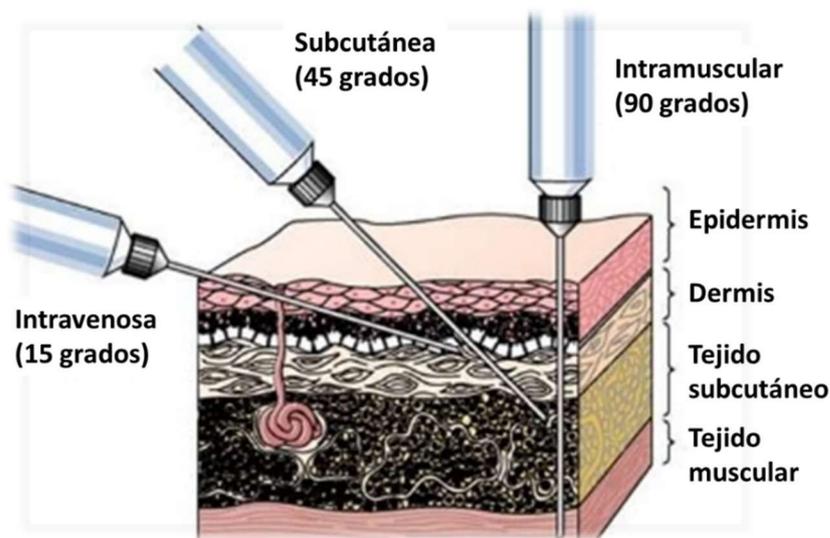


Figura 1.17. Vías de administración por inyección.

1.5.4. Vacunación transdermal

La ruta transdermal presenta la ventaja de producir un efecto sistémico, evitando el efecto del metabolismo hepático⁴³ y el paso por el tracto gastrointestinal, de permitir un mayor tiempo de acción terapéutica, y de disminuir y controlar las dosis requeridas.⁴⁴ La piel es la principal barrera del cuerpo contra los patógenos invasores.⁴⁵ Por esta razón, una gran población de células inmunocompetentes, como los queratinocitos, las células de Langerhans y los subconjuntos de linfocitos T se encuentran dentro de la epidermis y la dermis. En particular, las células de Langerhans tienen un rol crítico como células APC potentes contra antígenos externos. Además, están presentes en la epidermis y son capaces de migrar hacia los nódulos linfáticos para activar las células del sistema inmune adaptativo. Debido a que la actividad de estas células desencadena respuestas con alta especificidad y eficiencia, surgen como un objetivo muy tentador al momento de aplicar una vacuna. En este sentido, la inmunización

transcutánea persigue la entrega eficiente de un antígeno a las células de Langerhans, residentes en la capa epidérmica, para inducir la respuesta inmune antígeno-específica. Esta propiedad representa una enorme ventaja para la vacunación transdermal frente a los otros métodos de aplicación, ya que evita la circulación del antígeno por el cuerpo, entregándolo directamente a las células objetivo. Además, la vacunación transdermal significa un importante aporte para las campañas de vacunación en sitios alejados de centros de salud, ya que no requiere de personal capacitado para su aplicación, evita los riesgos de contagio y facilita el almacenamiento y transporte.

A pesar de las grandes ventajas que proporciona la vacunación transdermal respecto de la vacunación convencional, su potencial no ha sido explotado todavía debido a que el suministro tópico de vacunas en la piel está limitado por la baja permeabilidad del estrato córneo (SC). Esta capa externa de la piel tiene un espesor de 15-20 micras y se compone de queratinocitos embebidos en una matriz rica en lípidos. Los lípidos del SC se organizan en una estructura bicapa ordenada y, por consiguiente, forman una fuerte barrera para el transporte molecular.⁴⁶ Por esta razón, la simple aplicación tópica de vacunas generalmente no conduce a una respuesta inmune adecuada.

El aumento de la permeabilidad del SC, sin irritar los queratinocitos subyacentes, ha sido un gran desafío en el campo de la investigación biomédica. Numerosos sistemas de vacunación transdermal se han desarrollado en los últimos 50 años (Figura 1.18). El primer método de vacunación libre de agujas fue el inyector líquido. Este dispositivo utiliza la energía cinética de una corriente de líquido con alta velocidad, el cual es capaz de penetrar y transportar la vacuna hacia el tejido subcutáneo o muscular.⁴⁷ Este dispositivo permite “inyectar” numerosas dosis con el mismo reservorio. Fue utilizado exitosamente en inmunización humana con vacunas vivas contra el sarampión y la viruela, y también no-vivas contra el cólera, la hepatitis B, la gripe y la poliomielitis.⁴⁸ Sin embargo presenta algunas desventajas: en algunos estudios se lo relacionó con altos niveles de dolor, incluso mayores a la inyección con agujas;⁴⁹ también se lo asocia con reacciones locales más frecuentes que con agujas, como enrojecimiento e hinchazón de la piel en el sitio de inyección;^{50,51} y lo más importante es que se lo asocia con mayor contaminación de

paciente a paciente, ya que puede transmitir un importante volumen de sangre de un paciente a otro.⁵²

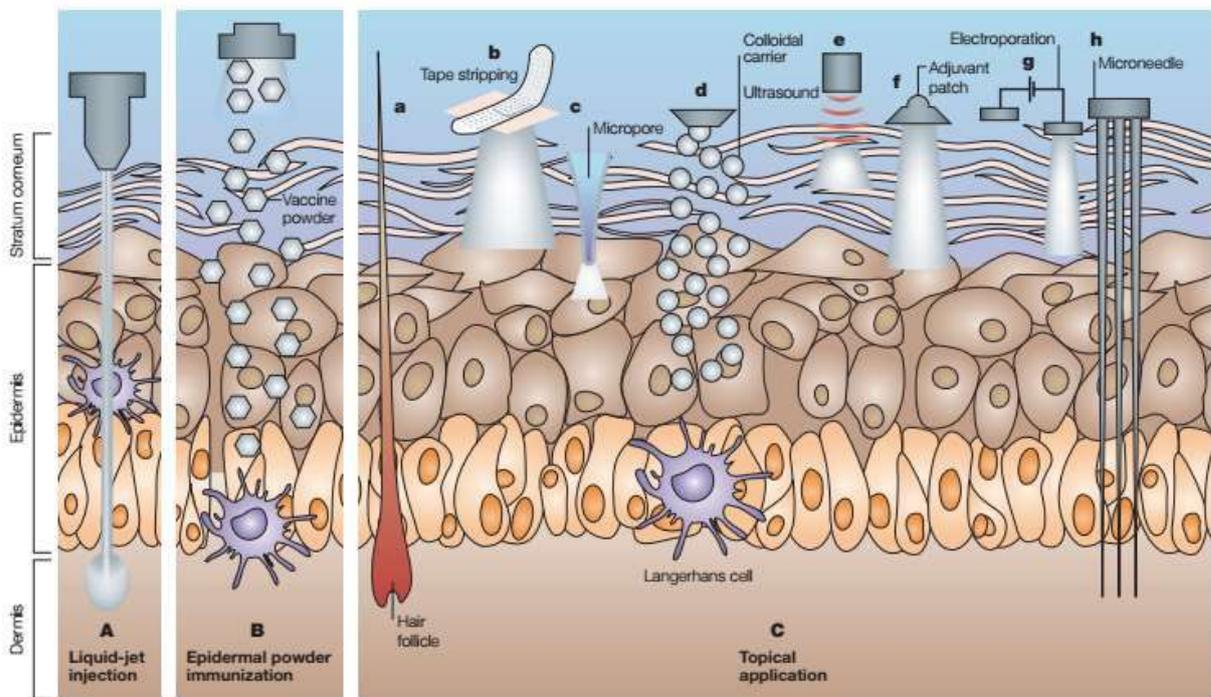


Figura 1.18. Estrategias empleadas para vacunación transdermal. Imagen extraída del artículo "Immunization without needles".⁴²

En 1990 se desarrolló la técnica de inmunización epidérmica en polvo (EPI), en la cual se aplican vacunas en polvo con alta velocidad, de tal manera que penetran en la capa externa de la piel y se depositan en la epidermis. El uso de polvos simplificó la manipulación y el almacenamiento en comparación con las formulaciones líquidas. Se utilizó en humanos⁵³ y animales con buenos resultados,⁵⁴ pero también se lo asocia con dolor y sangrados ocasionales.⁵⁵

Por otra parte, se han desarrollado vehículos (carriers) coloidales, como vesículas lipídicas, para encapsular proteínas antigénicas. Estos sistemas fueron aplicados por vía transdermal y permitieron obtener una respuesta inmune comparable a la inyección intramuscular.⁵⁶ En general, se han informado pocos estudios sobre el uso de vehículos coloidales para la administración tópica de vacunas, y todos fueron realizados en animales.

También se han utilizado numerosas técnicas físicas para administrar las vacunas a través de la piel, como la utilización de microagujas,⁵⁷ el tratamiento con cintas adhesivas (tape

stripping),⁵⁸ la aplicación de ultrasonido,⁵⁹ la formación de microporos⁶⁰ o la electroporación.⁶¹ Aunque estos sistemas han demostrado generar la respuesta inmune necesaria, tienen el inconveniente de que requieren de dispositivos caros, lo que podría suponer limitaciones en su adopción por los países en desarrollo.

En relación al empleo de hidrogeles en vacunación transdermal, se estudió la inmunización contra infecciones virales y bacterianas utilizando parches obtenidos a partir de formulaciones comerciales y distintas proteínas antigénicas, donde se obtuvieron resultados más que alentadores.^{62,63} Estudios *in vivo* revelaron que la administración con los hidrogeles provocó una respuesta inmune comparable con la producida por administración intramuscular. La microscopía de fluorescencia reveló la penetración del inmunógeno a través de la piel, siendo posible entregar el antígeno a las células inmunocompetentes de Langerhans.

Además, en los dos últimos años se estudió la penetración de proteínas a través de la piel mediante la utilización de NGs termosensibles,⁶⁴ y la interacción de las proteínas liberadas con las células inmunes presentes en la piel. En dichos estudios se demostró que las interacciones entre la matriz polimérica de los NGs y la piel permiten una mejor difusión de las proteínas, y la efectiva activación de células de Langerhans.⁶⁵ Estos estudios demuestran la potencialidad de los NGs termosensibles para su uso como sistemas de vacunación transdermal.

1.6. Motivación y Objetivos

Los NGs termosensibles se han empleado previamente en la construcción de un parche para liberación transdermal mediante su incorporación a una matriz polimérica de soporte, que permitió formar un material cohesivo y adhesivo. Sin embargo, se reportó que la complejidad de dicha matriz polimérica, donde una importante fracción de los materiales no contribuyen al proceso de carga y liberación, puede distorsionar la respuesta de los NGs y generar barreras adicionales para la difusión del analito.⁶⁶ Por otro lado, el uso de NGs termosensibles aplicados directamente como suspensiones en la piel tiene la desventaja de que la gran área expuesta de los NGs conduce a una rápida pérdida de humedad que no permite una liberación completa del

analito. Esta particularidad limita el empleo de los NGs en aplicaciones que requieren la liberación en un tiempo prolongado.

En este contexto, el desarrollo de un material compuesto por NGs termosensibles y capaces de formar una película, sin la necesidad de emplear una matriz de soporte, podría resultar de interés para una aplicación de liberación transdermal. Para ello, se requiere de la síntesis de NGs “bifuncionales” que combinen simultáneamente las propiedades de termosensibilidad y capacidad de coalescencia, es decir, capacidad de formar película.

El proceso de formación de película a partir de una dispersión de partículas de polímero (látex) implica tres etapas claramente identificadas: evaporación de agua, deformación de partículas y coalescencia. La Figura 1.19 esquematiza las etapas de este proceso. Durante la evaporación del agua, las partículas de polímero se concentran y se acercan entre sí (Etapa I). Cuando las fuerzas que acompañan al secado exceden el módulo de rigidez del polímero, se produce la deformación de las partículas para formar una película sin espacios vacíos entre ellas, que todavía es mecánicamente débil (Etapa II). En la etapa final, la difusión del polímero más allá del límite entre las partículas (difusión interpartícula) genera el entrecruzamiento físico de las cadenas (Etapa III).⁶⁷ Esta etapa da lugar a una película cohesiva con propiedades mecánicas aceptables. La temperatura mínima de formación de film (MFFT), identificada como la temperatura mínima a la cual el látex forma una película transparente, depende en gran medida de la temperatura de transición vítrea (T_g) del polímero y de los demás componentes de la dispersión (por ejemplo de la presencia de moléculas pequeñas que plastifiquen el polímero).⁶⁸

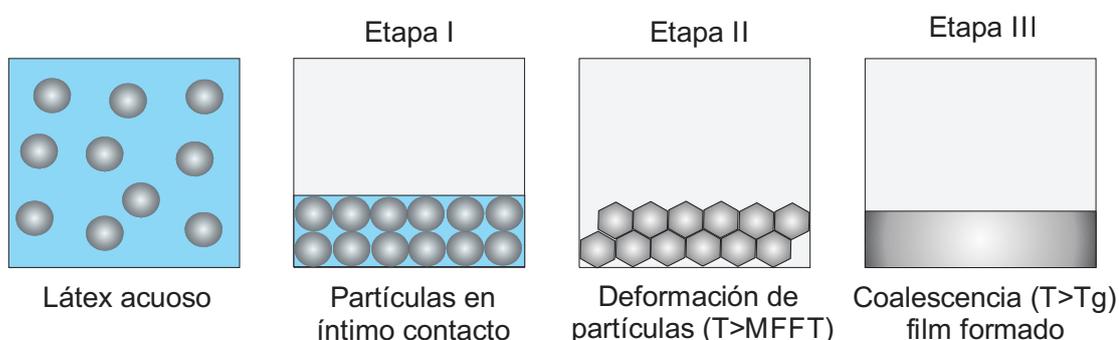


Figura 1.19. Etapas del proceso de formación de film.

Las propiedades de termo-respuesta y biocompatibilidad que caracterizan a la PVCL motivó su empleo en la síntesis de los NGs termosensibles. Si bien la PVCL es capaz de formar film gracias al efecto plastificante del agua, que disminuye su T_g , en el caso de los NGs de PVCL la presencia de entrecruzamiento no permite que se lleve a cabo la Etapa III del proceso de formación de film, y no es posible obtener una película cohesiva con buenas propiedades mecánicas. Por ese motivo, se requiere que estos NGs de PVCL contengan una fase polimérica de baja T_g para lograr la deformación y la coalescencia de las partículas durante la formación de la película, sin la necesidad de agregar aditivos que distorsionen o interfieran en el proceso posterior de liberación.

1.6.1. Objetivo General

El objetivo general de esta Tesis es el desarrollo de una plataforma polimérica basada en NGs, que permita alojar una proteína inmunogénica para luego liberarla de manera tópica hasta la epidermis, donde se encuentran las células de Langerhans, capaces de generar una respuesta inmunológica. Por ello, esta Tesis persigue la síntesis de NGs bifuncionales, que permitan combinar simultáneamente las propiedades de termosensibilidad y capacidad de coalescencia, es decir que puedan formar película sin requerir de la incorporación de una matriz polimérica. Para otorgar termosensibilidad a los NGs, se propone emplear PVCL por sus propiedades favorables mencionadas anteriormente. Para incorporar la propiedad de coalescencia y formación de película se plantea utilizar poliacrilato de butilo (PBA), un polímero de baja T_g . Con el fin de evitar que la incorporación de PBA interfiera en la respuesta térmica de los NGs de PVCL y a la vez permita la difusión interpartícula, se perseguirá la síntesis de NGs con morfología núcleo-coraza donde el núcleo esté formado por una fase de PVCL entrecruzada, y una coraza rica en acrilato de butilo (BA) que permita la formación de la película (Figura 1.20).

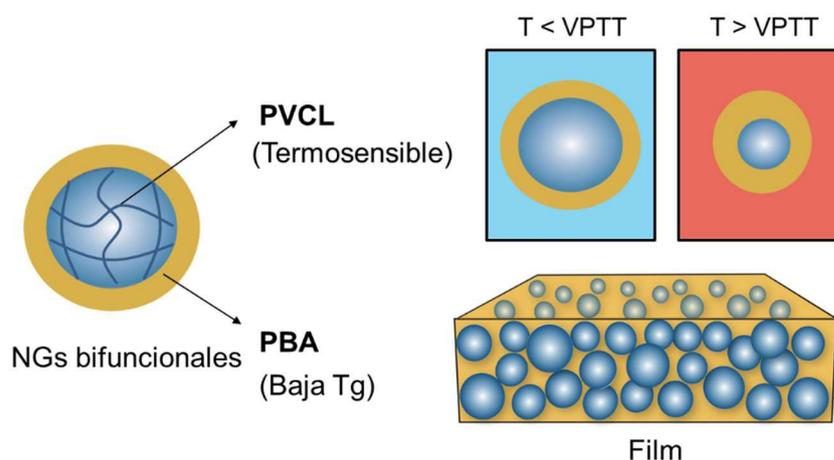


Figura 1.20. Esquema propuesto de los NGs bifuncionales y sus propiedades.

Se propone emplear los NGs bifuncionales para la formación de una película cargada con una proteína antigénica para su utilización tópica (parche de liberación transdermal), o alternativamente, para su aplicación como una dispersión sobre la piel para la formación in-situ de la película de liberación. Se espera que la liberación tópica de una proteína inmunogénica a través de esta plataforma permita su penetración en la piel y la generación de una respuesta inmune eficiente.

1.6.2. Objetivos específicos

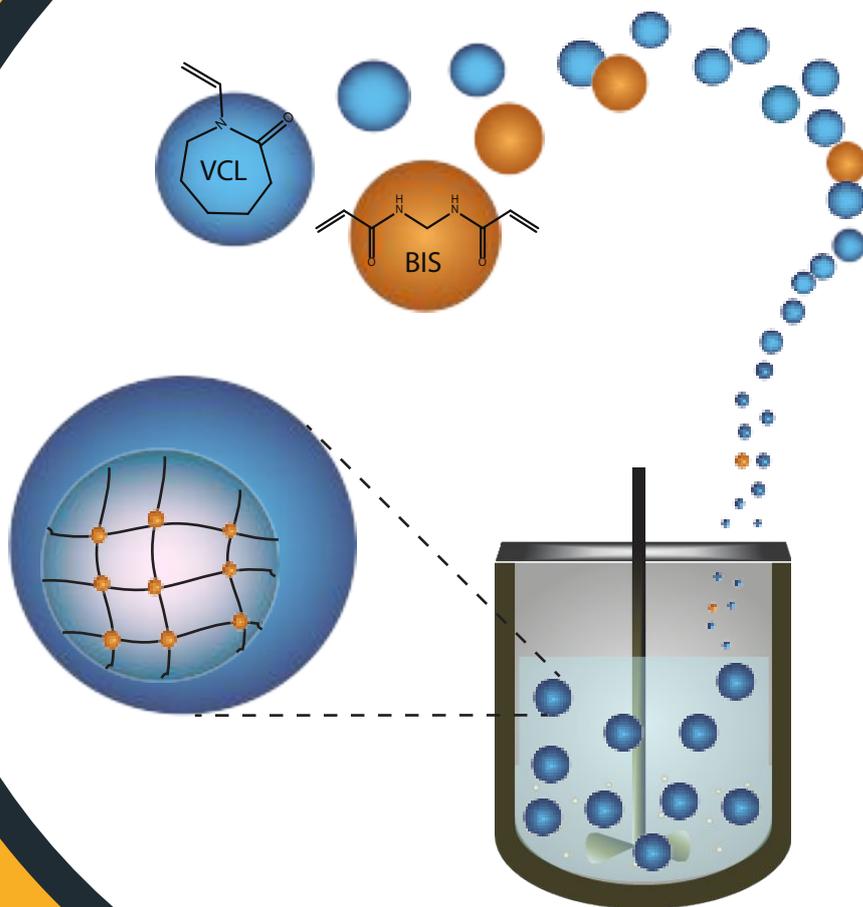
Para alcanzar el objetivo general planteado se proponen los siguientes objetivos específicos:

- ❖ Desarrollar estrategias de polimerización que permitan la síntesis de NGs bifuncionales con morfología núcleo-coraza, con una buena compatibilidad de las fases involucradas.
- ❖ Estudiar la influencia de los parámetros de síntesis en las propiedades de los NGs obtenidos y en las películas formadas a partir de ellos.
- ❖ Evaluar la capacidad de la plataforma diseñada para la carga y liberación *in vitro* de diferentes analitos, como fármacos y proteínas.
- ❖ Favorecer la penetración de una proteína inmunogénica modelo en piel humana, utilizando los NGs bifuncionales sintetizados como plataforma de liberación transdermal.

- ❖ Generar respuesta inmunológica *in vivo*, en modelo murino, mediante la inoculación tópica con la plataforma obtenida a partir de los NGs bifuncionales desarrollados.

Capítulo 2

Síntesis de nanogeles de poli(*N*-vinilcaprolactama)



2.1. Introducción

Las propiedades de biocompatibilidad y respuesta térmica, con transiciones a temperaturas cercanas a la corporal, hacen de la PVCL un polímero muy atractivo para aplicaciones biomédicas, donde se destaca la liberación de fármacos controlada por temperatura.¹⁴ Para el diseño de sistemas de liberación controlada de analitos basados en PVCL se emplean principalmente estructuras tridimensionales, como hidro, micro y nanogeles.^{31,36,37,69–72} La complejidad y especificidad que demanda esta aplicación, requieren de un control exhaustivo de las propiedades del sistema de liberación, como son su tamaño, su temperatura de transición, su capacidad de hinchamiento, y carga y liberación diferenciada con la temperatura. De esta manera se persigue que la liberación se produzca selectivamente en el lugar requerido y estimulada por las condiciones ambientales. Todas estas propiedades están determinadas principalmente por la composición química y la morfología de los geles, las cuales dependen fuertemente de las principales variables de reacción (temperatura, concentración y tipo de iniciador, surfactante y monómeros).

La PVCL ha sido sintetizada exclusivamente por polimerización radicalaria de la *N*-vinilcaprolactama (VCL). La VCL es un monómero no conjugado que carece de estabilización por resonancia, por lo tanto, su velocidad de propagación es muy alta. Sin embargo, su radical de propagación es inestable,¹⁴ de manera que si se lo copolimeriza con un comonómero que forma una especie de propagación más estable, entonces la VCL reaccionará más lentamente, favoreciendo la incorporación de dicho comonómero. Esta característica podría dificultar el control de la composición de un copolímero a base de VCL, si la copolimerización se realizara de manera discontinua, es decir, cargando ambos monómeros al inicio de la polimerización.

Se ha comprobado que la VCL polimeriza en cadenas lineales, de manera que no es capaz de generar una red entrecruzada.⁷³ Para obtener una estructura tridimensional es necesario su copolimerización con un agente entrecruzante. La *N,N*-metilenbisacrilamida (BIS) es la más empleada en la síntesis de micro y nanogeles de PVCL.¹⁴ Posee dos dobles enlaces en su estructura, de manera que es capaz de reaccionar con dos radicales en crecimiento,

generando así un punto de entrecruzamiento (Figura 2.1). En la síntesis de NGs de PVCL, la BIS demostró aumentar la afinidad de los NGs por el agua, de manera que una mayor cantidad de este entrecruzante aumenta la VPTT del sistema y disminuye su capacidad de hinchamiento.³¹ Imaz y col. reportaron una VPTT para NGs de PVCL igual a 37.6 °C, la cual aumenta 3 °C cuando se utiliza concentraciones mayores a 5 % de BIS respecto a la VCL.³¹ Es por ello que, tomando como base estos resultados, en esta Tesis se trabajó con 4 % de BIS respecto de la VCL (cantidad mínima empleada por estos autores), con el propósito de obtener la máxima capacidad de hinchamiento y una VPTT más cercana a la temperatura corporal.

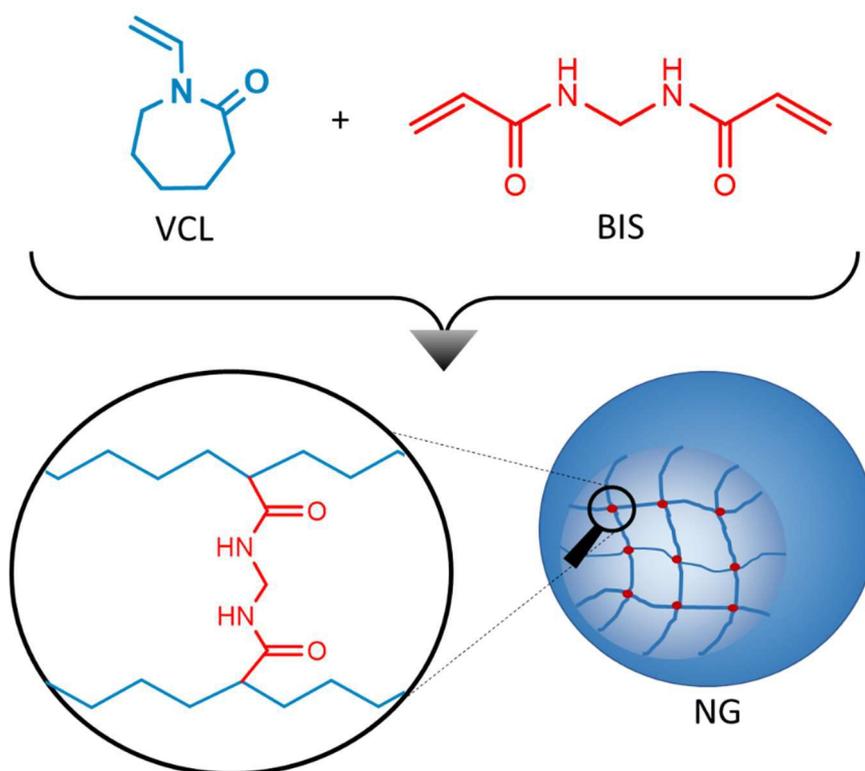


Figura 2.1. Esquema de la formación de puntos de entrecruzamiento en NGs de PVCL.

La síntesis de NGs de PVCL mediante polimerización por emulsión fue extensamente investigada por el grupo de la Prof. Jaqueline Forcada, quienes estudiaron la influencia de diferentes parámetros de síntesis, como temperatura y concentraciones de iniciador, entrecruzante, emulsificante y monómero. Una de las conclusiones obtenidas por dicho grupo es que al emplear concentraciones del monómero cercanas a la solubilidad (40 mg/mL) no fue posible obtener partículas dispersas y el resultado es un macrogel.³¹ Por lo cual se reportó que 10 mg/mL de VCL es la concentración ideal para obtener una dispersión de NGs de PVCL con

un diámetro medio colapsado de 120 nm, al 1 % de sólidos. Un año más tarde, los mismos autores, reportaron la necesidad de emplear un buffer debido a la hidrólisis ácida de la VCL por la presencia de KPS.³⁶ Con este panorama, repitieron el estudio de algunos parámetros de síntesis incluyendo el buffer en la formulación. Sin embargo, no se estudió la variación de la concentración de VCL en estas nuevas condiciones.

Debido a que esta Tesis tiene como objetivo la síntesis mediante polimerización en emulsión de NGs con capacidad de formar film, se pretende trabajar a contenidos de sólido superiores al 1 % para favorecer el proceso de formación de película. Esto se debe a que la etapa de evaporación de agua durante dicho proceso puede resultar limitante; así, trabajar con contenidos de sólidos mayores involucraría una menor masa de agua a evaporar, y por lo tanto una disminución del tiempo de formación de la película a partir de la dispersión. Por este motivo, el primer objetivo propuesto para esta Tesis es la obtención de partículas entrecruzadas de PVCL con tamaños nanométricos y con un contenido de sólidos mayor a 1 % para una aplicación final en formación de películas. En este Capítulo se analiza la síntesis de NGs de PVCL con diferentes contenidos de sólidos y la influencia del aumento de la concentración de los reactivos sobre algunas de sus propiedades, teniendo como objetivo una aplicación final en liberación controlada.

2.2. Trabajo experimental

2.2.1. Materiales

La Tabla 2.1 contiene la descripción de los reactivos que se utilizaron a lo largo del trabajo experimental del presente Capítulo. Todos los reactivos se utilizaron como fueron recibidos sin ninguna purificación adicional. El agua empleada a lo largo de todo el trabajo fue destilada y desmineralizada (DDI).

Tabla 2.1. Descripción de los reactivos empleados durante el trabajo experimental

Reactivo	Abreviatura	Función	Proveedor	Pureza
<i>N</i> -vinilcaprolactama	VCL	Monómero	Aldrich	98 %
Acrilato de butilo	BA	Monómero	Aldrich	99 %
Ácido acrílico	AA	Monómero	Aldrich	98 %
<i>N,N</i> -metilenbisacrilamida	BIS	Entrecruzante	Genbiotech	99.9 %
Persulfato de potasio	KPS	Iniciador	Mallinckrodt	99 %
Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	Buffer	Cicarelli	99.7 %
Dodecil sulfato sódico	SDS	Emulsificante	Cicarelli	95 %
Hidroquinona	HQ	Inhibidor	Fulka	>99 %
Albúmina de huevo	OVA	Proteína inmunogénica	Aldrich	98 %
Paracetamol	PCM	Fármaco	LIF	-
Ranitidina	RAN	Fármaco	LIF	-
Glibenclamida	GLI	Fármaco	LIF	-
Agua deuterada	D ₂ O	Solvente	Aldrich	>99 %

2.2.2. Síntesis discontinua de los NGs de PVCL

El diseño del proceso de síntesis de NGs de PVCL de esta Tesis se basó en los resultados obtenidos por Imaz y col (2008).³¹ Los NGs de PVCL fueron sintetizados de manera discontinua, empleando *N,N*-metilenbisacrilamida (BIS, Genbiotech 99.9 %) como entrecruzante, dodecilsulfato sódico (SDS, Cicarelli 95 %) como emulsificante, persulfato de potasio (KPS, Mallinckrodt 99 %) como iniciador, bicarbonato de sodio (NaHCO₃, Cicarelli 99.7 %) como buffer y agua ultrapura como medio de dispersión. Se empleó hidroquinona (HQ, Fulka >99 %) para inhibir la polimerización en las muestras extraídas a lo largo de la reacción.

El esquema y la foto del sistema de polimerización discontinuo utilizado en la síntesis de los látex se observan en la Figura 2.2. Este consta de un reactor de vidrio de 200 mL encamisado y con agitación mecánica, un condensador de vapores, una salida para toma de muestra, una entrada para burbujeo de nitrógeno, un termómetro digital y un baño termostático (Lauda RC 3) de temperatura regulable, que recircula agua a través de la camisa del reactor. El caudal de N₂ de 50 cm³ en todas las reacciones se reguló con un flotámetro (Bruno Schillig). La temperatura de reacción se controló indirectamente mediante la regulación de la temperatura del agua del

baño termostático. El tiempo de reacción y los tiempos de toma de muestra fueron controlados con un cronómetro manual.

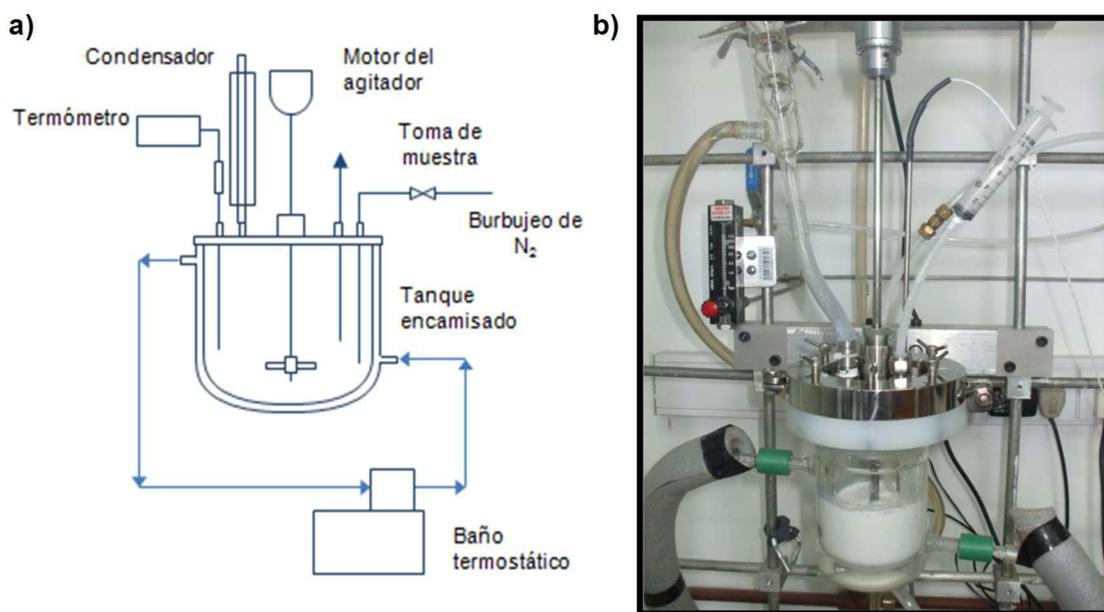


Figura 2.2. Esquema (a) y foto (b) del sistema de polimerización discontinua empleado.

Las polimerizaciones se llevaron a cabo de la siguiente manera. Primero se disolvió directamente en el reactor el emulsificante y el buffer en agua, y posteriormente, se cargaron la VCL y el entrecruzante. La mezcla reaccionante se mantuvo una hora bajo agitación constante y con burbujeo N₂ para desplazar el oxígeno disuelto y evitar inhibiciones indeseadas. Una vez alcanzada la temperatura de reacción (70 °C) se agregó el iniciador, previamente disuelto en agua, para dar comienzo a la reacción. A lo largo de la polimerización se tomaron muestras con el propósito de determinar la conversión de los monómeros, la evolución del tamaño de partícula y su morfología. A cada muestra extraída se le adicionó HQ (disuelta al 1 %) para detener la reacción.

En estas condiciones se realizaron tres polimerizaciones con concentraciones de VCL (10, 50 y 100 mg/mL), que equivalen a 1, 5, y 10 % de sólidos, respectivamente. Los demás componentes de la receta se mantuvieron constantes con respecto a la VCL, según se indica en la Tabla 2.2. Todas las cantidades están expresadas en % tomando como base la VCL (% w/vcl). Además, en la Tabla 2.2 se incluye la concentración de SDS en agua en el medio de reacción.

Tabla 2.2. Receta de las polimerizaciones de VCL con diferentes contenidos de sólidos (B1-B3).

Reacción	[VCL] (mg/mL)	BIS (%wbvcl)	NaHCO₃ (%wbvcl)	KPS (%wbvcl)	SDS (%wbvcl)	[SDS] (mg/mL)
B1	10	4	1	1	4	0.4
B2	50	4	1	1	4	2
B3	100	4	1	1	4	4

2.2.3. Caracterización de los NGs

2.2.3.1. Conversión de los monómeros

La conversión de los monómeros (VCL y BIS) en cada muestra extraída durante la reacción se determinó mediante H1-RMN utilizando un espectrómetro Bruker 300MHz. Los espectros se registraron empleando la técnica WATERGATE³¹ (83919GP, Tiempo de relajación (D1): 1.00 seg) para suprimir la señal de agua y analizar directamente la muestra retirada del medio de reacción sin ningún tratamiento previo. Como estándar interno se utilizó acetato de sodio (AcNa), cuyo espectro presenta un único pico a 1.7 ppm. En la Figura 2.3 se muestran los espectros obtenidos de ambos monómeros con la técnica de supresión WATERGATE, y la asignación correspondiente a cada pico. Para determinar la concentración de VCL y BIS sin reaccionar se integró el pico correspondiente al doble enlace vinílico a 7 y 5.7 ppm, respectivamente, y se lo relacionó con el área del pico de AcNa. Las muestras se prepararon a partir de 720 µL de látex, a la que se le adicionó 80 µL de D₂O y 200 µL de una solución acuosa al 6 mg/mL de AcNa. La conversión se calculó empleando la ecuación 2.1:

$$conversión = \frac{[monómero]_i - [monómero]_{LIBRE}^t}{[monómero]_i} \quad \text{Ec. 2.1}$$

donde $[monómero]_i$ es la concentración de VCL o BIS cargada inicialmente y $[monómero]_{LIBRE}^t$ es la concentración de VCL o BIS sin reaccionar en el tiempo t.

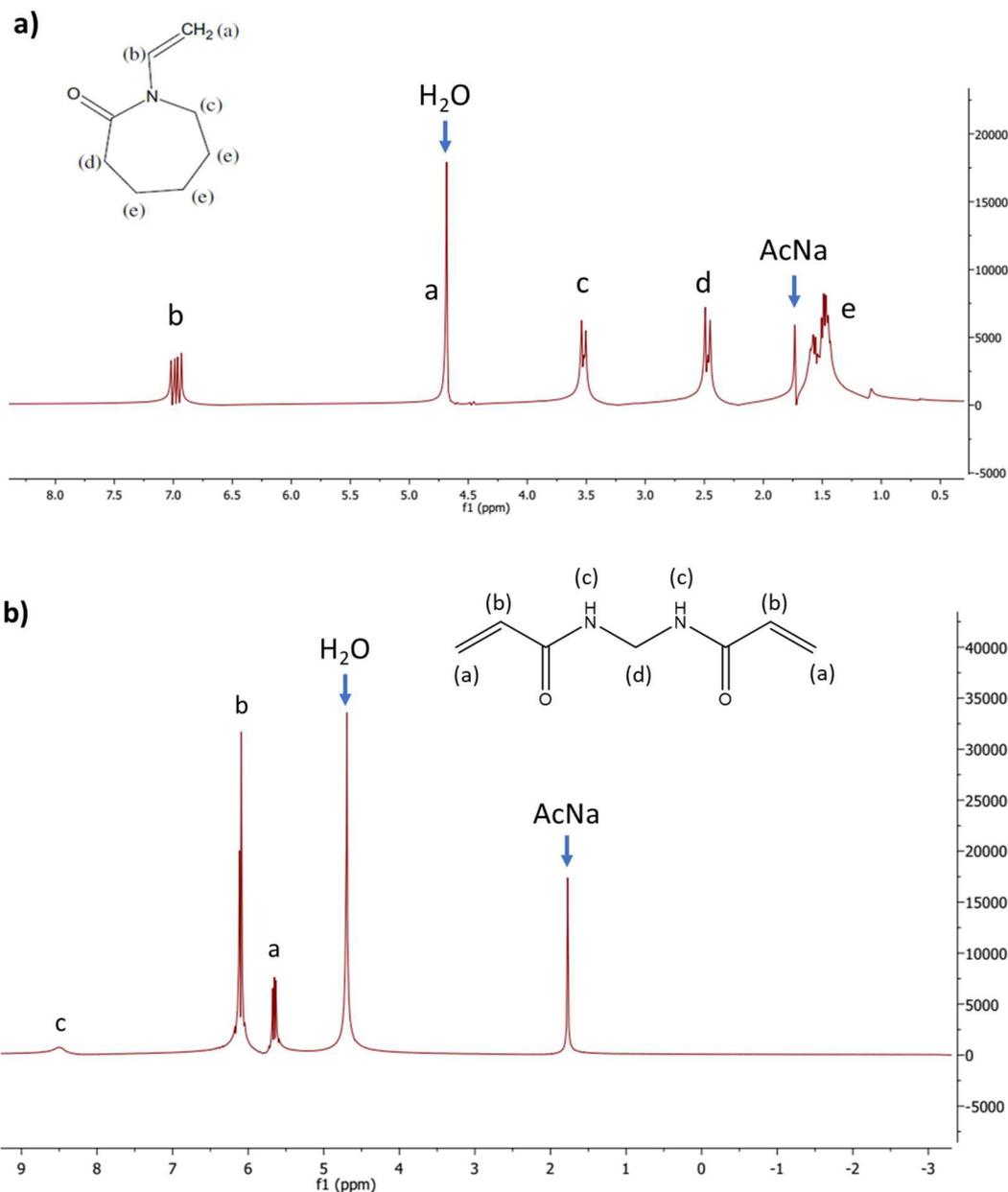


Figura 2.3. Espectros de ^1H -RMN de VCL (a) y BIS (b) con AcNa como estándar interno.

2.2.3.2. Diámetro medio y número de partícula

Para determinar el diámetro promedio de los NGs (D) se utilizó la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS). Las mediciones se efectuaron en un fotómetro de dispersión de luz marca Brookhaven modelo BI-2030, con un láser de He-Ne (632.8 nm) polarizado verticalmente, y un correlador digital modelo BI-200 AT, utilizando un ángulo de 90°. Todas las muestras se midieron a una concentración de 1 mg/mL y a una temperatura de 55 °C, de manera que los NGs se

encuentren colapsados. De esta manera se determinó el diámetro medio de partícula de las muestras extraídas a lo largo de las reacciones.

A partir del valor del diámetro medio de los NGs en estado colapsado, es posible estimar el número de partículas (N_p), asumiendo que los NGs son homogéneos en tamaño y se encuentran completamente colapsados, es decir, sin agua en su interior. De esa manera, el N_p resulta de la división del volumen total de polímero (V_p) y del volumen de una partícula calculado a partir de D , según la Ecuación 2.2,

$$N_p = \frac{V_p}{\pi/6D^3} \quad \text{Ec. 2.2}$$

donde:

$$V_p = \frac{\text{masa}_{VCL}}{\rho_{PVCL}} \times \text{conversion} \quad \text{Ec. 2.3}$$

y ρ_{PVCL} es la densidad de la PVCL.

2.2.3.3. Respuesta térmica de los NGs

La respuesta térmica de los NGs se determinó utilizando dos técnicas: turbidimetría y DLS. Las muestras se midieron con una concentración de 1 mg/mL, debido a que en trabajos previos se determinó el rango de concentraciones (0.1-1 mg/mL) en que la temperatura de transición de los NGs de VCL no depende de la concentración de la medición.³⁶ Adicionalmente, para algunos NGs se estudió el cambio de la temperatura de transición con la concentración, midiendo también a concentraciones de 5 y 10 mg/mL. Las mediciones se realizaron en agua destilada y en PBS.

- *Turbidimetría*: Se utilizó un espectrómetro Perkin Elmer Lambda 950 UV/Vis/NIR con una velocidad de calentamiento de 0.5 °C/min y se midió la transmitancia cada un minuto.

- *DLS*: Se empleó el equipo Malvern Zetasizer Nano ZS ZEN3600 con un láser de He-Ne utilizando un ángulo de detección de 173°. Se midió el diámetro de los NGs en el rango de

temperatura de 20-55 °C a intervalos de 0.5 °C y manteniendo las muestras por 5 min a cada temperatura antes de realizar la medición.

2.2.3.4. Morfología de los NGs

La morfología de los NGs se estudió por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), empleando un equipo JEOL 100 CX (100 kV) del Laboratorio de Microscopía del CCT-Bahía Blanca. Las muestras se prepararon colocando 10 µL de dispersión de NGs con una concentración de 1 mg/mL sobre una rejilla de cobre cubierta con polivinil formal (Formvar®) y dejándola secar a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se tiñeron con una solución de acetato de uranilo al 1 %, depositando 10 µL de dicha solución sobre la muestra seca y dejándola secar a temperatura ambiente.

2.2.3.5. Citotoxicidad

La citotoxicidad de los NGs se estudió sobre fibroblastos primarios humanos, preparados de prepucio neonatal. Estos ensayos se realizaron en la Freie Universität de Berlín, durante una estancia doctoral. Se llevaron a cabo los ensayos de contacto directo de MTT y Celltiter Glo, que se describen a continuación.

El ensayo MTT permite determinar la actividad mitocondrial y se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, de color amarillo) por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color púrpura (formazan). La capacidad de las células para reducir el MTT es un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional puede interpretarse como una medida de la viabilidad celular.

Por otro lado, el ensayo Celltiter Glo permite cuantificar la cantidad de adenosin trifosfato (ATP) presente, el cual es un indicativo de la actividad metabólica celular.⁷⁴ Este ensayo tiene la ventaja de que mide luminiscencia en lugar de absorbancia, de manera que si la muestra es opaca no interfiere en la medición.

Para llevar a cabo los ensayos se sembraron las células en un plato de 96 wells, 100 μL en cada well con una concentración de 10^5 cel/mL (10^4 cel/well) y se incubaron durante la noche a 37°C y 5 % CO_2 . Luego, se reemplazó el medio de las células de cada well con 100 μL de medio con diferentes concentraciones de NGs. Se incubó 48 hs a 37°C y 5% CO_2 , y nuevamente se renovó el medio con una solución conteniendo el reactivo (MTT o Celltiter Glo). En el caso del MTT, se incubó por 4 hs, el sobrenadante se descartó nuevamente y se añadieron, en cada well, 100 μL de isopropanol con HCl 0.04 M para solubilizar los cristales de formazan. La absorbancia se leyó a 570 nm en un lector de microplacas Tecan Infinite M200Pro. En el caso del Celltiter Glo, luego del agregado del reactivo se agitó por 2 minutos y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Luego se leyó la luminiscencia en el lector de microplacas.

Los resultados se reportan en porcentaje de viabilidad celular, el cual se calcula empleando como referencia un grupo de células que no reciben ningún tratamiento.

2.2.3.6. Capacidad de carga de los NGs

Se estudió la capacidad de carga tanto de fármacos como de proteínas de los NGs. Para ello se emplearon tres fármacos con diferentes solubilidades, como el paracetamol (PCM), la ranitidina (RAN) y la glibenclamida (GLI), y como proteína modelo la ovoalbúmina (OVA).

Para llevar a cabo la carga de los NGs se prepararon dispersiones de 5 mg/mL y se calentó a 40°C durante una hora, de manera que los NGs se encuentren en estado colapsado. La carga de proteínas, también se realizó partiendo de los NGs liofilizados, sin necesidad de realizar el calentamiento. Luego se agregó el analito correspondiente, el cual se diluyó inmediatamente mediante agitación (Figura 2.4, paso a). La suspensión se llevó rápidamente a 4°C , de manera que los NGs se hinchen con la solución del analito y alcancen su mayor volumen, y se mantuvo a dicha temperatura durante 48 hs (Paso b). Para separar el analito libre de los NGs cargados se centrifugó en un tubo VIVASPIN con membrana de 30 KDa para los fármacos y 300 KDa para la proteína, a 8000 rpm durante 15 min a 15°C (Paso c).

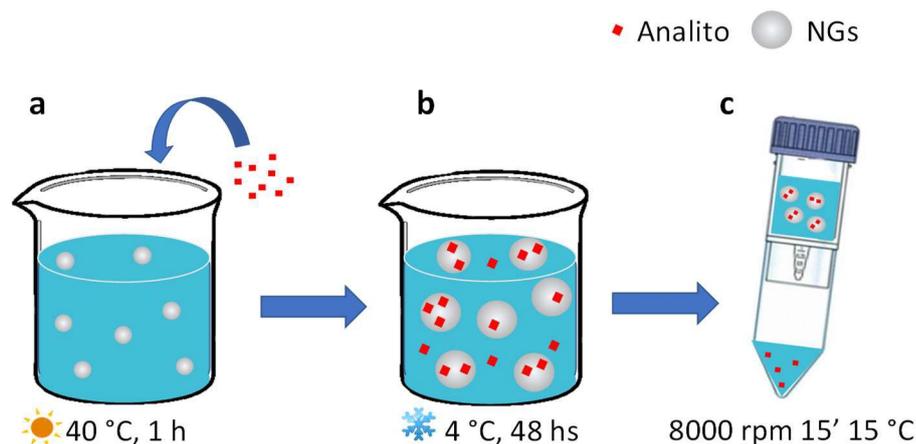


Figura 2.4. Esquema del protocolo empleado para la determinación de la capacidad de carga de los NGs.

La concentración de los analitos en la solución antes de la incubación con los NGs y luego de su separación se determinó por espectrofotometría UV-VIS a partir del área del pico de máxima absorción correspondiente a cada uno de ellos. La masa de analito cargada en el sistema se calculó por balance de masa. La capacidad de carga (LC por sus siglas en inglés) y la eficiencia de encapsulamiento (EE) se calcularon de la siguiente manera:

$$LC = \frac{\text{masa de analito cargada}}{\text{masa del sistema polimérico}} \quad \text{Ec. 2.4}$$

$$EE = \frac{\text{masa de analito cargada}}{\text{masa de analito adicionada}} \times 100 \quad \text{Ec. 2.5}$$

2.2.3.7. Liberación in vitro de OVA cargada en los NGs

Se estudió la liberación de OVA en buffer PBS (pH = 7.4), a partir de los NGs cargados, a dos temperaturas: ambiente (25 °C) y corporal (37 °C). Debido a que la transición volumétrica de los NGs ocurre a una temperatura intermedia entre las de estudio, los NGs se encuentran hinchados a 25 °C y en estado colapsado a 37 °C. Para llevar a cabo los ensayos de liberación se emplearon tubos Float-A-Lizer G2, dotados de un tubo de membrana de 300 KDa (Figura 2.5). Se adicionó 1 mL de la dispersión de los NGs (5 mg/mL de NGs) cargados con OVA en el tubo de membrana y la liberación se realizó en 6 mL de PBS. A intervalos de tiempo regulares se extrajeron muestras del medio de liberación y se renovó con medio fresco. La concentración de

OVA en el medio de liberación extraído se determinó por espectrofotometría UV, midiendo la absorbancia a 280 nm.

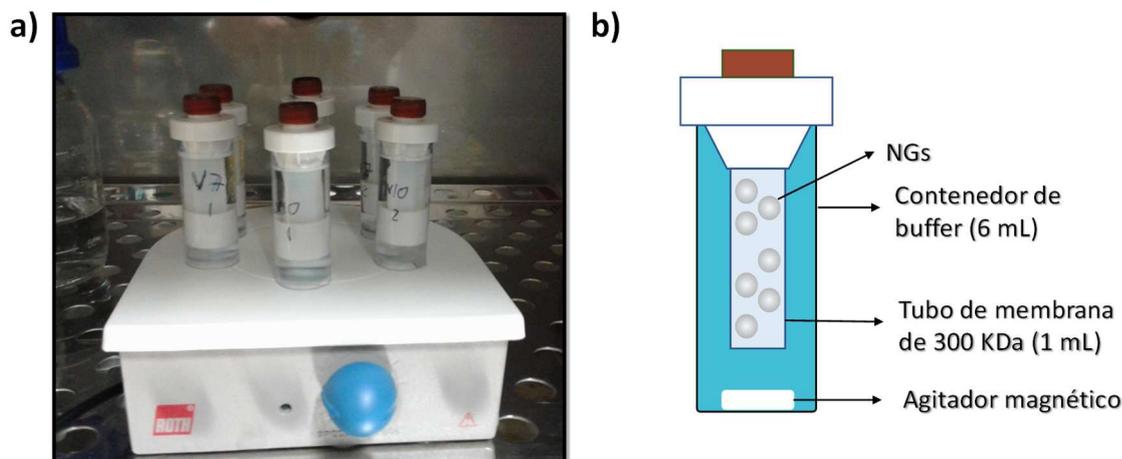


Figura 2.5. Foto (a) y esquema (b) del sistema empleado para liberación controlada de OVA a partir de los NGs.

2.3. Resultados y Discusiones

2.3.1. Síntesis de los NGs de PVCL

En la Figura 2.6 se muestran las evoluciones de las conversiones de VCL y BIS, y la correspondiente al D de los NGs sintetizados a partir de las polimerizaciones discontinuas (B1-B3). Además, en la Tabla 2.3 se presentan los valores finales de conversión de la VCL, D y N_p de los látex obtenidos en las tres polimerizaciones y la fuerza iónica de las mezclas reaccionantes.

En primer lugar, se destaca que en las tres polimerizaciones la conversión de VCL fue casi completa, observándose una notable disminución de la velocidad de polimerización (pendiente de la curva de conversión con el tiempo) a medida que se reduce la concentración de VCL, es decir, de B3 a B1. En cambio, se observa que en todos los casos la conversión de la BIS fue prácticamente 100 %, con valores muy altos desde el inicio de la polimerización.

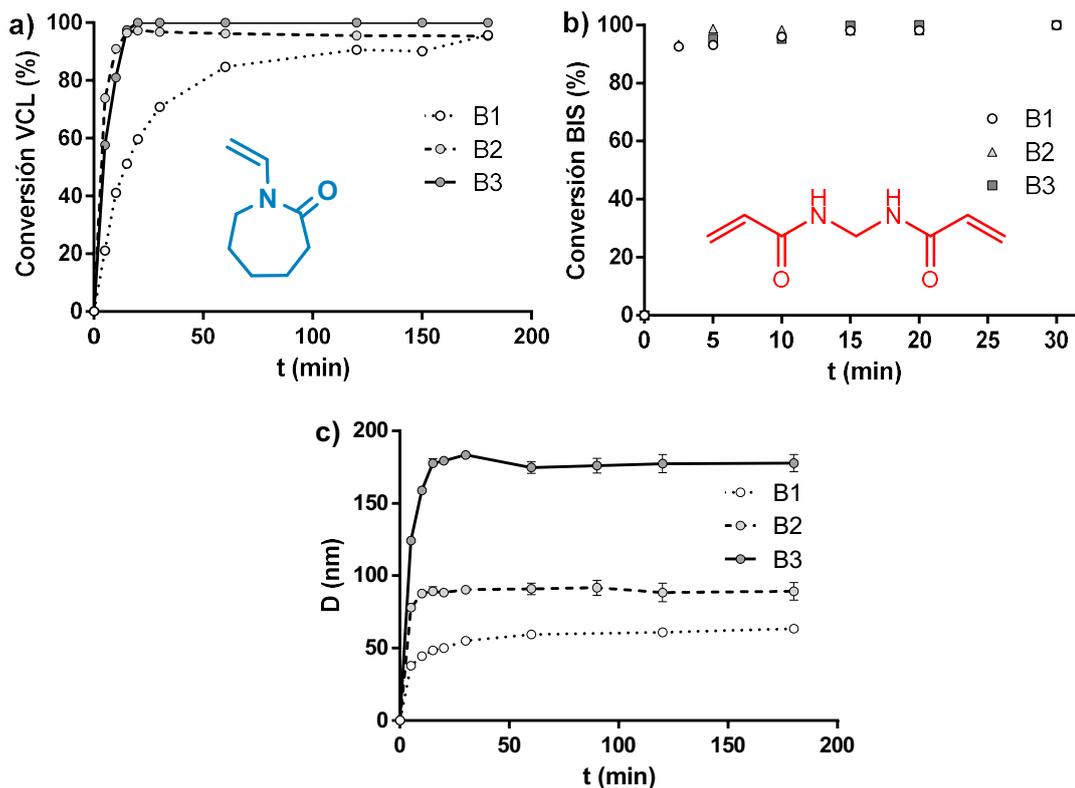


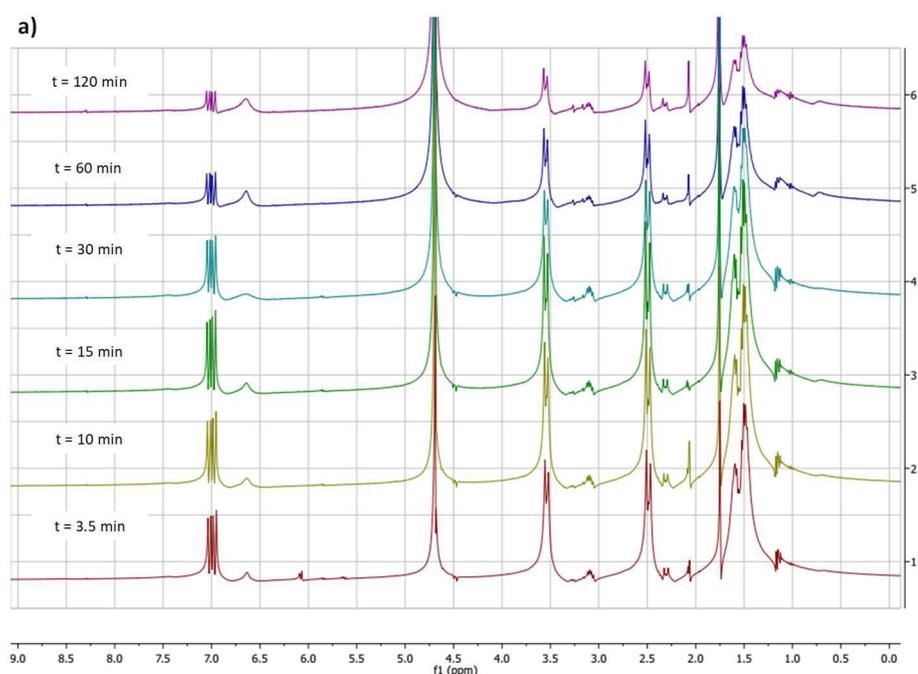
Figura 2.6. Evolución a lo largo de las reacciones B1-B3 de la conversión de VCL (a), la conversión de BIS (b) y del D (c).

Tabla 2.3. Principales resultados de la síntesis discontinua de NGs de PVCL (x , D y N_p) y valor de fuerza iónica (I) de la mezcla reaccionante.

	[VCL] (mg/mL)	x (%)	D (nm)	N_p (#/L)	I (mol/L)
B1	10	95.7	63	6.5×10^{13}	0.013
B2	50	97	90	1.3×10^{14}	0.033
B3	100	100	177	3.1×10^{13}	0.061

Estas observaciones también se pueden advertir en la Figura 2.7, donde se muestran los espectros de RMN de las muestras extraídas a lo largo de las polimerizaciones B1 - B3. En la misma se puede observar cómo en la polimerización B1 hay presencia de enlaces vinílicos de la VCL remanente (pico a 7 ppm) prácticamente hasta la última muestra, y cómo la altura de esta señal desciende a medida que avanza la reacción. Por otro lado, en las reacciones B2 y B3 la presencia de VCL sin polimerizar es significativamente menor, indicando mayor velocidad de polimerización. Además, no se observa prácticamente la presencia de enlaces vinílicos correspondiente a la BIS (5.7 y 6.2 ppm) desde la primera muestra extraída, lo que demuestra

una conversión completa de este monómero. Este resultado puede deberse a que la estabilización por resonancia del radical BIS promueve su consumo preferentemente ante la VCL, cuyo radical es más inestable. Pueden encontrarse en bibliografía numerosas evidencias del consumo temprano de la BIS respecto de la VCL en la producción de micro y nanogeles.^{14,37,73} En estos artículos, se propone una morfología donde las partículas están conformadas por un núcleo densamente entrecruzado y una coraza mayormente compuesta por cadenas lineales de PVCL. Además, en la Figura 2.6b se puede ver que el aumento de la concentración de los reactivos no afectó a la conversión de BIS, la cual llega al máximo a los 15 min de polimerización en los tres casos.



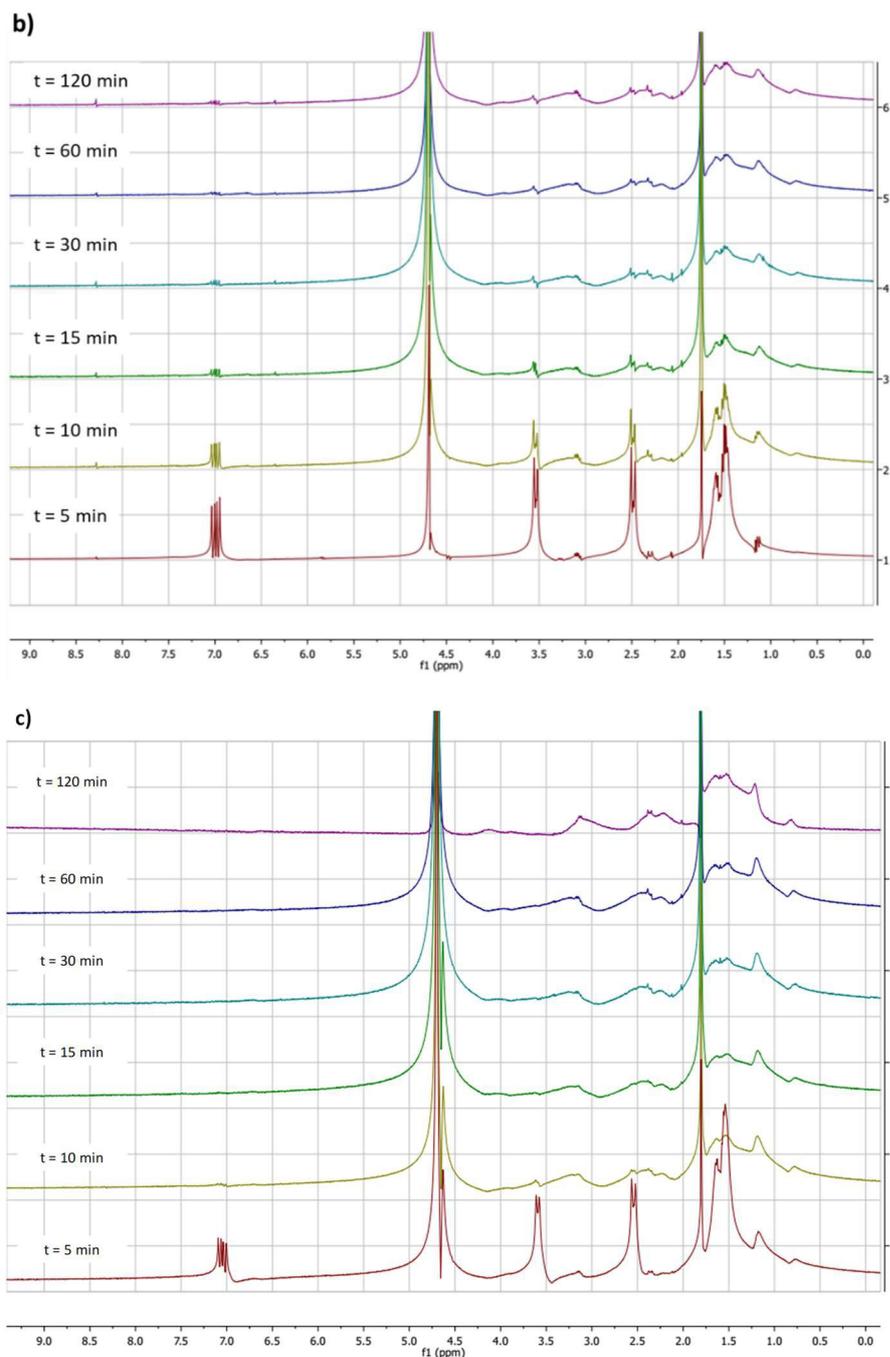


Figura 2.7. Espectros de ^1H -RMN de muestras extraídas a lo largo de las polimerizaciones B1 (a), B2 (b) y B3 (c).

En relación al D de los NGs, se puede observar que este aumenta a medida que se incrementa la concentración de VCL en el sistema de polimerización y se nota que su evolución con el tiempo de reacción es paralela a la conversión de VCL (Figura 2.6c). Este resultado indica que el proceso de nucleación ocurre principalmente en el inicio de la polimerización, y que los NGs aumentan su tamaño a medida que avanza la reacción. Esto concuerda con lo reportado

por Janseen y col. en la síntesis de NGs de PVCL y BIS, empleando 1 mg/mL de VCL con un iniciador soluble en agua y en presencia de emulsificante, donde observaron que casi la totalidad de la VCL y de la BIS se consume en las partículas en crecimiento y no en el agua.⁷³

Tal como se mencionó, en la Figura 2.6a se observa que a medida que se incrementa la concentración de VCL en el medio de reacción (de B1 a B3), aumenta la velocidad de polimerización (R_p). Para evaluar estas diferencias se debe tener en cuenta que, en el caso de una polimerización en emulsión, donde el consumo del monómero (en este caso la VCL) ocurre principalmente en las partículas en crecimiento, R_p depende de la concentración de VCL en las partículas ($[VCL]_p$), del número medio de radicales libres por partícula (\bar{n}) y del N_p , según la siguiente ecuación:

$$R_p = k_p \frac{\bar{n}[VCL]_p N_p}{N_A} \quad \text{Ec. 2.6}$$

siendo, k_p la constante de propagación y N_A el número de Avogadro.

A continuación evaluaremos cómo el cambio en la formulación de la Tabla 2.2 puede afectar los parámetros de la Ecuación 2.6. La Figura 2.8 muestra un esquema de las fases presentes en la etapa inicial de las reacciones B1 y B3. Al comienzo, el medio de la reacción B1 presenta una sola fase compuesta por una solución de VCL que se encuentra en una concentración por debajo de su solubilidad (40 mg/mL) y del emulsificante en una concentración menor a su concentración micelar crítica (CMC, 2 mg/mL). Por el contrario, al comienzo de la reacción B3, una concentración de VCL mayor a su solubilidad en agua y en presencia de una concentración de SDS superior a su CMC, da lugar a la formación de gotas de monómero y micelas hinchadas con VCL. En la reacción B2 se presenta una situación intermedia entre B1 y B3, donde la concentración del monómero se encuentra levemente por encima de la solubilidad y el SDS está en la CMC, con la posibilidad de presencia de algunas pocas gotas y micelas.

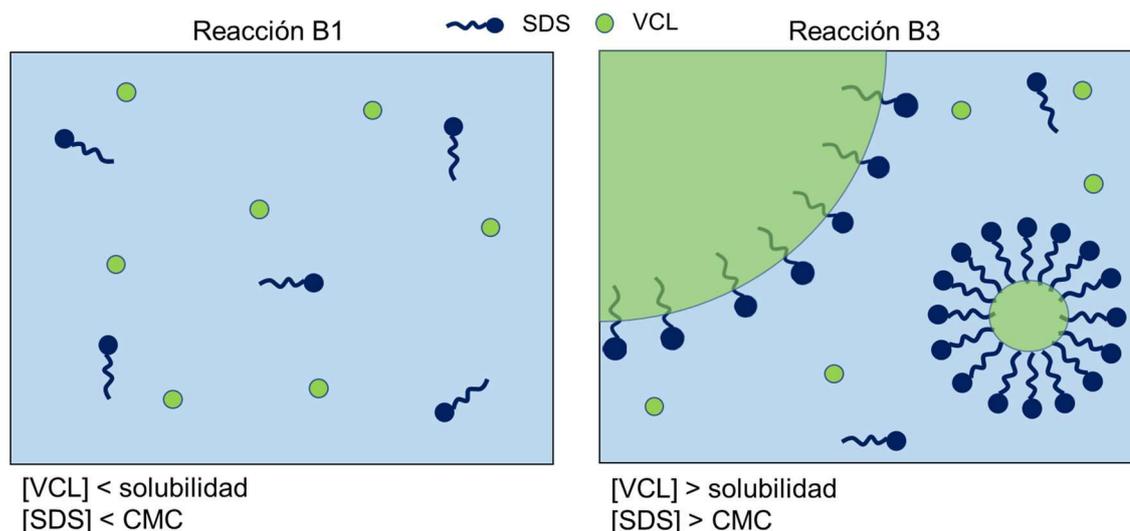


Figura 2.8. Esquema de fases presentes al inicio de las reacciones B1 y B3.

De acuerdo a este análisis, la concentración inicial de VCL en las reacciones B1 y B2 determina que el monómero se encuentre durante toda la polimerización principalmente repartido entre la fase acuosa y las partículas en crecimiento, tal cual lo esquematiza la Figura 2.9. Este equilibrio posee un coeficiente de partición (K_{VCL}), que relaciona las concentraciones de VCL en la fase acuosa y en la fase partículas. En estas condiciones, es decir en ausencia de gotas de monómeros, el aumento de la concentración de VCL de B1 a B2 produce un incremento directo en su concentración en la fase partículas. Así, la mayor disponibilidad de monómero en las partículas podría conducir a un aumento de R_p de acuerdo a la Ec. 2.6 y de la conversión de VCL.

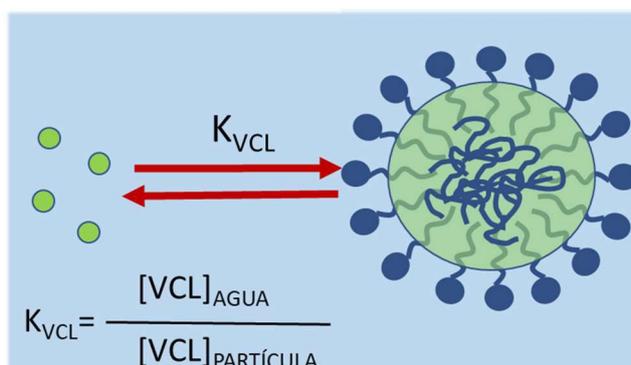


Figura 2.9. Reparto de la VCL entre el agua y la partícula de polímero durante la polimerización en emulsión en ausencia de gotas.

En la reacción B3, la situación es bien diferente y contiene todas las etapas de la polimerización en emulsión de la Figura 1.9. Las gotas de monómero presentes en el sistema actúan como reservorio, manteniendo las partículas de polímero en crecimiento y la fase acuosa saturadas con VCL. Una vez que las gotas se consumen, la concentración de VCL en solución y en las partículas desciende siguiendo el esquema de la Figura 2.9. La evolución esperable de la concentración de VCL en la fase partículas para las 3 polimerizaciones (B1-B3) se muestra en la Figura 2.10, donde x_g representa la conversión a la cual se consumieron las gotas en B3. Tal como se puede ver, B3 presenta la típica situación de una polimerización en emulsión con contenidos de sólidos moderados a altos, donde la concentración de VCL en las partículas es máxima en la primera parte de la polimerización, dando lugar a elevadas R_p , y luego desciende a medida que avanza la polimerización en ausencia de gotas de monómeros.

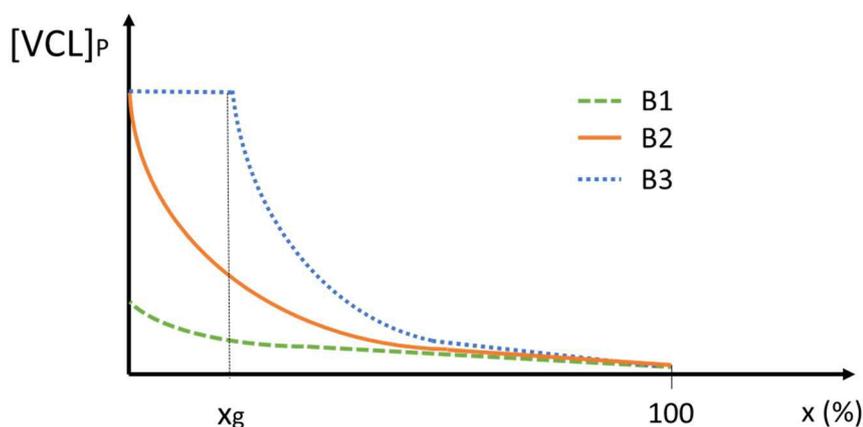


Figura 2.10. Perfil de la concentración de VCL en las partículas ($[VCL]_p$) en los experimentos B1-B3.

A partir de los datos de D y conversión, se calculó el N_p (Tabla 2.3), otra de las variables que influye en R_p . Se observa que N_p aumenta de B1 a B2, mientras que desciende para B3. N_p está principalmente influenciado por el mecanismo de nucleación, es decir por el mecanismo de formación de los NGs. En este caso, el iniciador soluble en agua (KPS) se descompone térmicamente y genera radicales que reaccionan con el monómero disuelto en la fase acuosa formando oligorradicales. Estos oligorradicales, a la temperatura de polimerización ($70\text{ }^\circ\text{C}$), superior a la temperatura de transición térmica (LCST), se tornan insolubles en el agua y tienen la capacidad de ser absorbidos en el interior de las micelas (nucleación micelar) o precipitar

(nucleación homogénea) para dar lugar a la formación de partículas poliméricas. El proceso de formación de partículas depende, no solo de la concentración de iniciador, sino que también depende en gran medida de la solubilidad y concentración tanto del monómero como del emulsificante en el sistema. La nucleación micelar es considerada el principal mecanismo de formación de partículas para monómeros con solubilidad en agua relativamente baja (< 0.015 mmol/mL) y en presencia de micelas, mientras que la nucleación homogénea es considerada como el mecanismo predominante cuando la solubilidad del monómero en agua es relativamente alta (> 0.17 mmol/mL)^{75,76} y también cuando se trabaja con concentraciones de emulsificante menores a la CMC o en ausencia de emulsificante.⁷⁷⁻⁷⁹ En consecuencia, y teniendo en cuenta que la VCL es un monómero con solubilidad relativamente alta, se espera que el mecanismo de nucleación en las tres polimerizaciones sea principalmente la nucleación homogénea, más aún en la polimerización B1 donde el emulsificante se encuentra por debajo de su CMC. Sin embargo, es posible que ambos mecanismos de nucleación estén presentes.

En cuanto al tercer parámetro que controla la velocidad de polimerización en emulsión, \bar{n} , este depende directamente de la concentración de radicales en la fase acuosa (es decir de la concentración de KPS), de las velocidades de absorción y desorción de los radicales en las partículas (es decir, de la entrada y salida de los radicales), y de la terminación bimolecular de los radicales en las fases acuosa y partícula. Si bien se desconocen los parámetros que gobiernan estos fenómenos para el caso particular en estudio, se espera que \bar{n} aumente de B1 a B3 debido, principalmente, al incremento de la concentración de KPS en las formulaciones.

Por consiguiente, con el aumento en la concentración de VCL y KPS al pasar de la polimerización B1 a B2 (donde la VCL está prácticamente soluble en agua) es esperable un incremento de los puntos de nucleación, que a su vez conduce a un mayor valor de N_p y una disminución en el D de los NGs. Además, el aumento del N_p , de $[VCL]_P$ y el posible aumento de \bar{n} , producen un incremento en la conversión final y en R_p , tal como se observa en la Tabla 2.3 y en la Figura 2.6.

En el caso de la reacción B3, el análisis es algo más complejo porque de acuerdo a la determinación de D y conversión, se estima una reducción de N_p (Tabla 2.3) y un aumento de R_p cuando esta se compara con B2. De B2 a B3 la formulación (Tabla 2.1) involucra un incremento de KPS, SDS y NaHCO_3 , es decir se produce un aumento en la fuerza iónica (I , Tabla 2.3). Además, las gotas presentes en B3 absorben emulsificante al estabilizarse, reduciendo la disponibilidad de SDS para estabilizar las partículas. Estos dos fenómenos tienden a generar una dispersión con menos capacidad de estabilización de la fase dispersa, lo cual podría conducir a una disminución del N_p con respecto a B2. Aun así, el aumento en R_p observado en B3 (Figura 2.6) puede deberse al aumento de $[\text{VCL}]_p$ (Figura 2.10) y al posible incremento de \bar{n} .

La Figura 2.11 muestra las curvas de DSC de los NGs obtenidos en B1-B3 (las cuales pueden encontrarse ampliadas y con sus respectivas T_g en las Figuras A2.1 – A2.3 del Anexo 2). La muestra B1 posee dos T_g , a 155 y 182 °C, mientras que las muestras B2 y B3 poseen una T_g a 195 °C. Teniendo en cuenta que la T_g de la PVCL lineal es 145 °C⁸⁰ y que la PVCL entrecruzada con un 4 % de BIS tiene una T_g cercana a 200 °C,³⁷ se puede inferir que los NGs obtenidos en B1 poseen dos fases, una formada de PVCL lineal y otra de PVCL entrecruzada, mientras que en los NGs B2 y B3, la fase entrecruzada es mayoritaria a la fase lineal. Esta diferencia puede deberse a que la menor velocidad de polimerización de VCL con respecto a la de BIS observada en B1 (Figura 2.6) favorece la formación de una segunda fase de PVCL sin entrecruzar (es decir, en ausencia de BIS). Por otro lado, la mayor velocidad de polimerización de VCL en B2 y B3 resulta más cercana a la velocidad de consumo de BIS, lo que favorece el entrecruzamiento de una mayor cantidad de VCL, y por lo tanto la fase de PVCL lineal no llega a apreciarse por DSC.

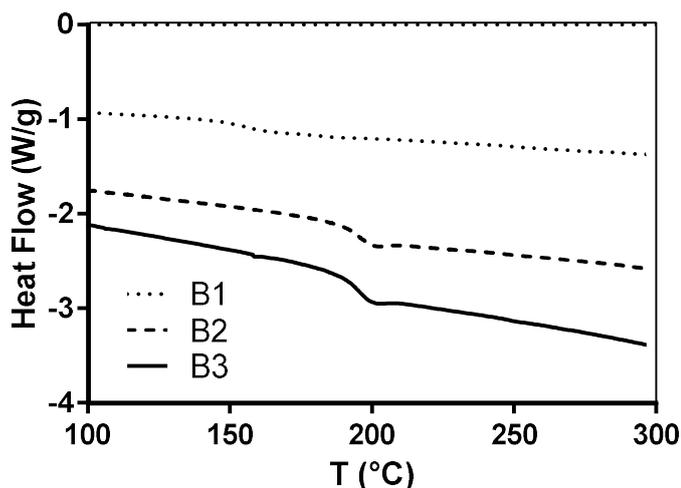


Figura 2.11. Curvas de DSC de los NGs obtenidos en B1-B3.

2.3.2. Respuesta térmica

La respuesta térmica de los NGs es una propiedad sumamente importante cuando se pretende emplearlos como sistemas de liberación controlada térmicamente, ya que la VPTT define el rango de las posibles aplicaciones de estos materiales. En particular, cuando se trata de partículas de PVCL es necesario controlar tanto el peso molecular como la polidispersidad de la PVCL en el sistema, ya que la termosensibilidad de este polímero es dependiente del peso molecular.^{81,10} De esta manera, todos los parámetros de síntesis que generen un cambio en el peso molecular de la PVCL pueden modificar la respuesta térmica. Debido a que en trabajos previos se observó una dependencia de la respuesta térmica con el contenido de BIS, SDS y KPS,^{31,37} las síntesis de NGs de PVCL con tres contenidos de sólidos diferentes, se realizaron con relaciones de BIS/VCL, SDS/VCL y KPS/VCL constantes (Tabla 2.2).

En la Figura 2.12 se muestra la evolución con la temperatura del D determinado por DLS de los NGs dispersos en agua ultrapura a una concentración de 1 mg/mL. Los NGs obtenidos en B1, B2 y B3 presentan una tendencia a disminuir su tamaño a medida que se aumenta la temperatura como consecuencia del cambio de solubilidad de la PVCL en el medio disperso. En la Figura 2.12d puede verse que los NGs obtenidos en las tres reacciones poseen una fuerte disminución del diámetro en el rango de temperaturas de 30 - 35 °C, obteniéndose un valor de VPTT de 32.5 °C para los tres sistemas (Tabla 2.4). El colapso progresivo que presentan las

muestras podría deberse a la distribución de pesos moleculares de las cadenas de PVCL presentes en la estructura de los NGs, las cuales presentan diferentes LCST. Se puede observar que el aumento en el contenido de sólidos durante la polimerización no produce un cambio apreciable en la VPTT de los NGs obtenidos. Los tres NGs en estudio presentan transiciones y VPTT cercanas a la temperatura corporal, haciéndolos adecuados para su empleo en liberación controlada de analitos en aplicaciones biomédicas.

El efecto más marcado del aumento de la concentración de VCL en la receta de polimerización, sobre la respuesta térmica de los NGs obtenidos, es el incremento de la capacidad de hinchamiento, también incluida en la Tabla 2.4. La capacidad de hinchamiento de los NGs se define como el cociente entre los volúmenes hinchado (20 °C) y colapsado (55 °C). Los factores que afectan a dicha propiedad son el grado de entrecruzamiento y la estructura molecular del polímero. En este sentido, cuanto mayor es el grado de entrecruzamiento, menor es la capacidad de hinchamiento de los NGs. Esto sucede porque durante el hinchamiento, las cadenas que conforman la red polimérica de los NGs asumen una configuración extendida y esta dilatación va acompañada de la aparición de una fuerza retráctil en oposición al proceso de hinchamiento, que actúa como una presión que las cadenas de la red polimérica ejercen sobre el disolvente contenido en ella. A medida que la red se hincha con el solvente, aumenta dicha presión elástica y el hinchamiento alcanza su valor máximo o de equilibrio cuando se obtiene un balance entre ambas fuerzas.⁸² Al aumentar el grado de entrecruzamiento, la fuerza retráctil aumenta y por lo tanto la capacidad de hinchamiento disminuye. La estructura molecular del polímero también puede afectar al hinchamiento. Aquellos hidrogeles que contienen grupos hidrófilos en su estructura se hinchan en mayor grado que aquellos que contienen grupos hidrófobos, los cuales tienden a minimizar su interacción con las moléculas de agua.⁸²

En el caso particular de los NGs de PVCL en estudio, el entrecruzante empleado posee grupos hidrofílicos que otorgan mayor afinidad con el agua a la red polimérica. Si bien la concentración de BIS, en relación al contenido de VCL es constante, el método de polimerización puede generar cambios estructurales en el NG que modifiquen su capacidad de hinchamiento.

En este sentido, el aumento del *D* y la posible distribución más uniforme de la BIS dentro de la estructura de los NGs, generaría cadenas de PVCL más largas entre puntos de entrecruzamiento, minimizando así la fuerza retráctil. Esta podría ser la razón por la cual la capacidad de hinchamiento de los NGs aumenta cuando se incrementa el porcentaje de sólidos en la receta de la polimerización.

Tabla 2.4. Parámetros de respuesta térmica de los NGs obtenidos en B1-B3.

	VPTT (°C)	Capacidad de hinchamiento
B1	32.5	2.9
B2	32.5	19.0
B3	32.5	26.3

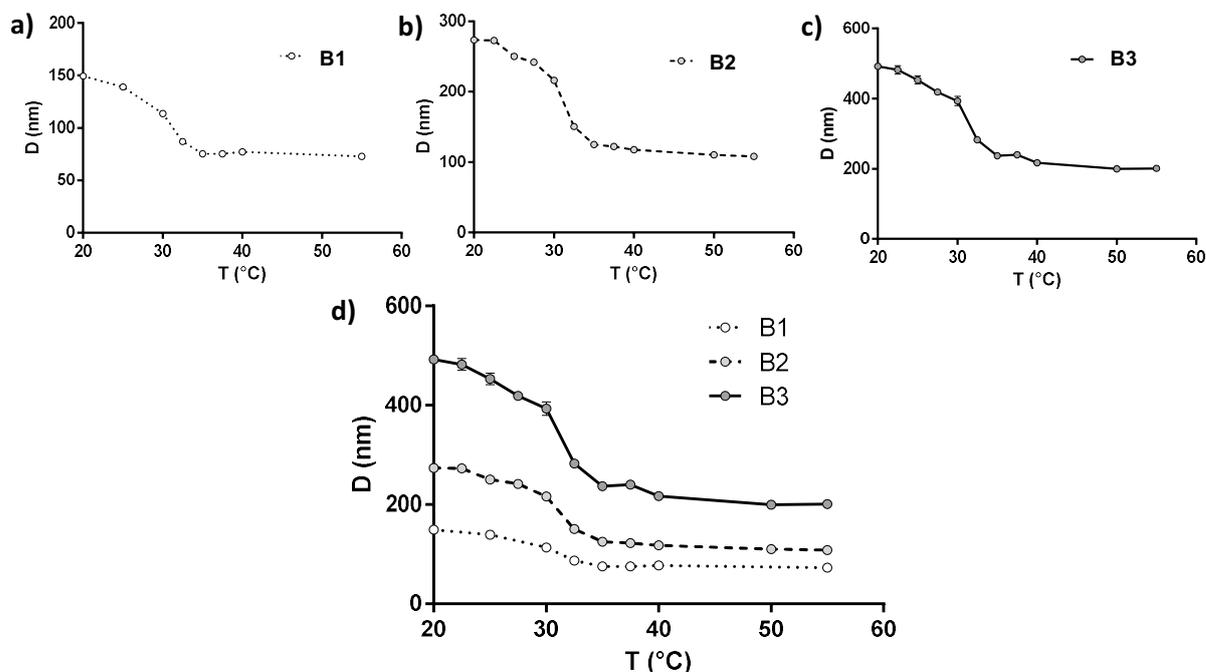


Figura 2.12. Respuesta térmica de los NGs de PVCL obtenidos en B1-B3 (a-c) y su comparación (d).

Imaz y col.³¹ determinaron que la respuesta térmica de los NGs se ve influenciada por su concentración al momento de la medición. Estos autores observaron que para un látex sintetizado con una concentración de VCL de 10 mg/mL (1 % de contenido de sólidos), el valor de VPTT aumenta cuando la concentración de NGs aumenta por encima de 0.1 % (1 mg/mL). Por ese motivo, se adoptó una concentración de 1 mg/mL para determinar la respuesta térmica

de los NGs. Aun así, para los NGs sintetizados en esta Tesis se estudió el efecto de la variación de la concentración de los NGs sobre su respuesta térmica. Para ello, se emplearon dos técnicas: DLS y transmitancia a 500 nm. Por DLS se pueden percibir cambios de tamaño de NGs termosensibles en función de la temperatura a partir de la medición del D. Por otro lado, la transmitancia de la luz visible de dispersiones acuosas de los NGs termosensibles disminuye cuando los NGs cambian a un estado colapsado, debido a que la solución se torna más turbia. De esta manera, midiendo la transmitancia en función de la temperatura se puede hallar la temperatura crítica de colapso. Para determinar la VPTT se empleó el método de la derivada (VPTT = temperatura donde el valor absoluto de la derivada es máximo) y del punto medio (VPTT = temperatura correspondiente al valor medio del D o porcentaje de transmitancia igual a 0.5). Ambos métodos son ampliamente empleados en sistemas de nanopartículas sensibles a un estímulo. En las Figuras 2.13a y 2.13b se muestran los resultados obtenidos por DLS para los NGs B2 y B3, respectivamente. Además, se incluyó para cada gráfico una tabla con los valores de VPTT calculados mediante los dos métodos antes descritos.

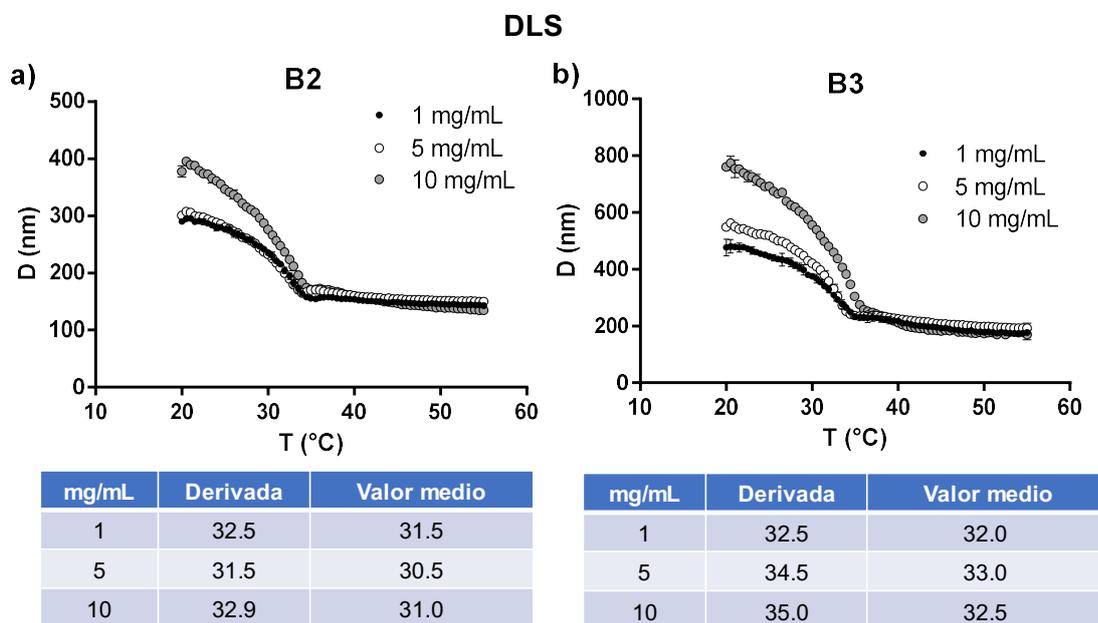
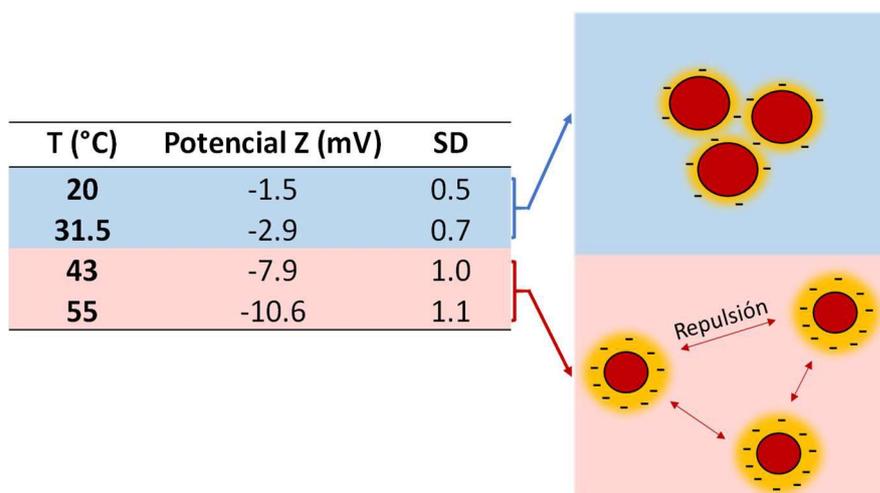


Figura 2.13. Estudio de la respuesta térmica de los NGs B2 y B3 a diferentes concentraciones por DLS. Las Tablas muestran los valores de VPTT obtenidos por los métodos de la derivada y del punto medio.

Como característica general puede observarse que en todas las curvas de respuesta térmica, los D coinciden a temperaturas por encima de la VPTT. En el caso particular de los NGs B2, si bien no hay una diferencia significativa en los valores de VPTT determinados para las tres concentraciones estudiadas, se puede observar que a temperaturas por debajo de la VPTT los valores de D correspondientes a la curva de 10 mg/mL son superiores a los determinados a menores concentraciones. Esta tendencia se repite para los NGs B3, con diferencias más marcadas de VPTT. Este fenómeno puede deberse a que el potencial Z de los NGs varía ampliamente con la temperatura (Tabla 2.5). Estos resultados tienen la misma tendencia a las observaciones previas realizados con NGs de PVCL por Peng y Wu.^{83,84} Se puede observar que a temperaturas menores a la VPTT el potencial Z es bajo y se encuentra dentro del rango de aglomeración y precipitación de los sistemas coloidales (-5 a 5 mV),⁸⁵ donde el tamaño de los aglomerados depende de la concentración de la dispersión. Por otro lado, a temperaturas mayores de la VPTT el mayor valor de potencial Z indica un aumento de la carga superficial negativa que incrementa la fuerza de repulsión entre partículas y permite obtener una dispersión estable donde las partículas se mantienen individuales cualquiera sea su concentración.

Tabla 2.5. Valor medio y desviación estándar (SD) del potencial Z de los NGs B3 a diferentes temperaturas.



En la Figura 2.14 se muestran los resultados obtenidos a partir de la medición de transmitancia. Puede verse que para ambos NGs se observa la tendencia opuesta a la obtenida por DLS: a mayor concentración, menor VPTT. También puede observarse que los valores de

VPTT obtenidos por esta técnica son mayores que los obtenidos por DLS. Esta discrepancia en los resultados resultados puede deberse a que el cambio de opacidad de la muestra es un fenómeno macroscópico, el cual depende de la concentración de la muestra. Ante esto, la transición podría ser detectada a temperaturas menores cuando la concentración de NGs es mayor. Por otro lado, la técnica de DLS permite detectar un cambio en el diámetro de las partículas, el cual no depende de una variación en la opacidad de la muestra. Por este motivo las temperaturas de transición observadas por DLS resultan menores que las observadas por transmitancia.

Estos resultados muestran que, al analizar la respuesta térmica de NGs termosensibles, es de suma importancia considerar la técnica empleada, la concentración de la muestra y la forma de calcular la temperatura de transición. Teniendo en cuenta esta consideración, a lo largo de esta Tesis se estudiará la respuesta térmica de los NGs termosensibles mediante DLS, empleando una concentración de los NGs de 1 mg/mL en agua ultrapura.

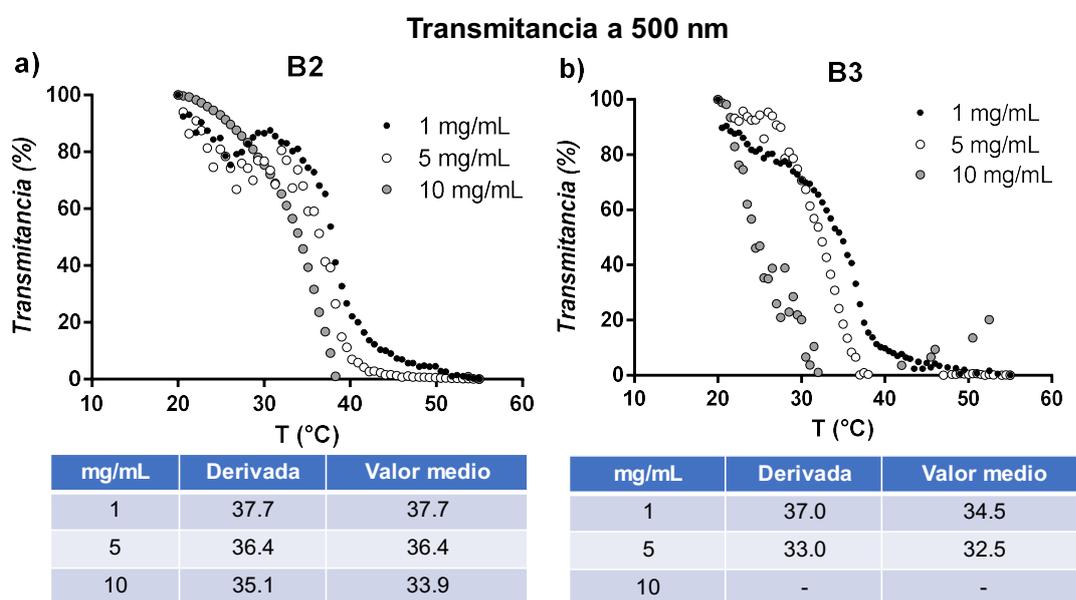


Figura 2.14. Estudio por transmitancia a 500 nm de la respuesta térmica de los NGs B2 y B3 a diferentes concentraciones. Las Tablas muestran los valores de VPTT obtenidos por los métodos de la derivada y del punto medio.

2.3.3. Capacidad de carga y liberación de distintos analitos de los NGs de PVCL

2.3.3.1. Carga de fármaco

Como estudio preliminar, se evaluó la capacidad de carga de los NGs ante moléculas pequeñas. Se trabajó solo con los NGs B2 y se emplearon tres drogas con diferentes solubilidades: Ranitidina (RAN), Paracetamol (PCM) y Glibenclamida (GLI). En la Tabla 2.6 se muestra el peso molecular, la solubilidad en agua y la longitud de onda de máxima absorbancia (λ) para cada fármaco. Se realizaron curvas de calibración de concentraciones utilizando la absorbancia a la λ correspondiente, para determinar cada fármaco en solución.

Tabla 2.6. Propiedades de los fármacos empleados.

	PM (g/mol)	Solubilidad en agua (mg/mL)	λ (nm)
RAN	350.9	100	314
PCM	151.2	12	244
GLI	494.0	4	280

Los ensayos se realizaron partiendo de distintas concentraciones del fármaco para determinar la máxima capacidad de carga de los NGs. Debido a la baja solubilidad de la GLI solo pudo estudiarse el intervalo de concentraciones de 1 a 5 mg/mL. En la Figura 2.15 se muestran los resultados obtenidos en términos de capacidad de carga (LC) y eficiencia de encapsulamiento (EE). En el intervalo de concentraciones estudiado, se observó en todos los casos un comportamiento prácticamente lineal de LC; así, a medida que aumentó la concentración de los fármacos en la solución, los NGs fueron capaces de incorporar una mayor masa en su interior. Como consecuencia de ello, la EE prácticamente no se modificó al variar la concentración del fármaco, obteniéndose un valor de 80.2 ± 2 , 30.1 ± 7 y 99.6 ± 0.4 para RAN, PCM y GLI, respectivamente. De estos resultados se puede inferir que la capacidad de carga de los NGs B2 no se vio afectada por la solubilidad de los fármacos.

En la Figura 2.16 se presentan las estructuras químicas de los fármacos y del polímero que compone los NGs. Se puede ver en ellas la presencia de grupos funcionales donores y aceptores de puentes de hidrógeno, que podrían favorecer la carga de los fármacos mediante la

interacción con las cadenas poliméricas. Como puede verse, estos grupos se encuentran en un mayor número en la GLI y RAN en comparación con el PCM. La mayor presencia de estos grupos en las moléculas de los fármacos estudiados, podría ser la principal razón de la mayor capacidad de carga de los NGs. Es por ello, que tanto la LC como la EE aumentan a medida que se incrementa el número de grupos funcionales capaces de formar puentes de hidrógeno en los fármacos.

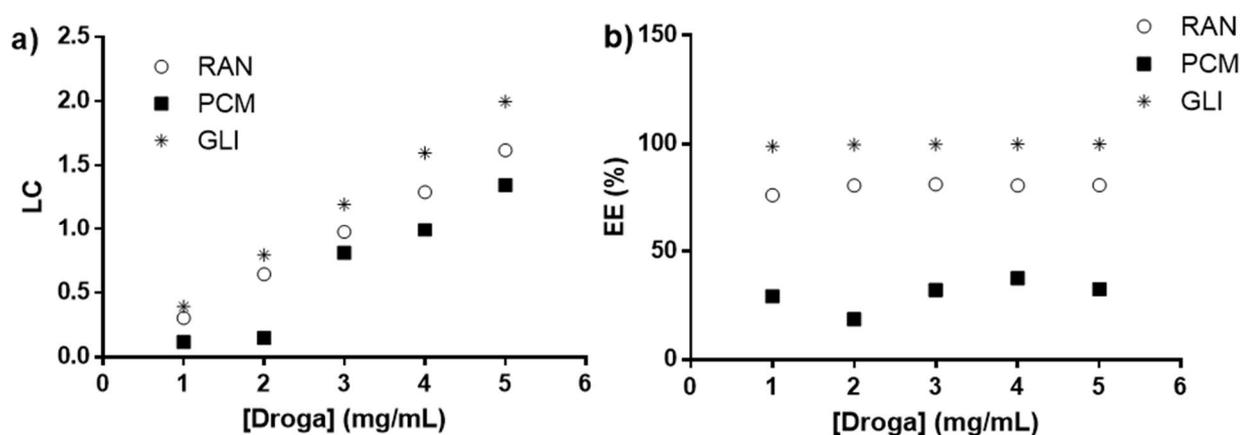


Figura 2.15. Resultados de capacidad de carga (a) y eficiencia de encapsulamiento (b) obtenidos en los ensayos de carga de los NGs B2 con concentraciones de fármacos de 1 a 5 mg/mL.

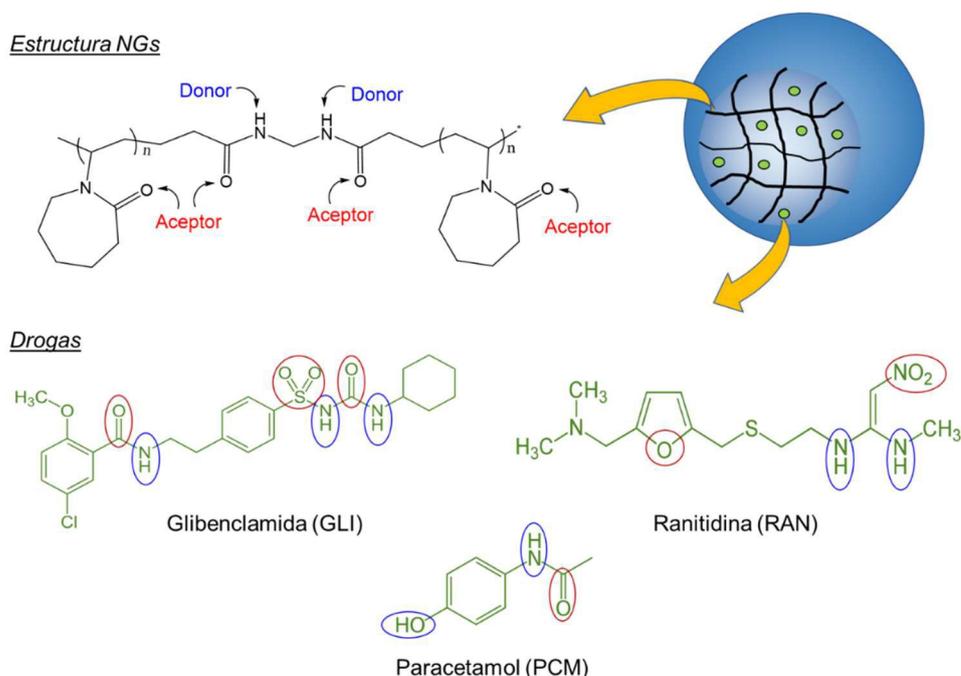


Figura 2.16. Estructura química del polímero componente de los NGs y de los fármacos empleados.

2.3.3.2. Carga y liberación de proteínas

El objetivo principal de esta Tesis es el desarrollo de una plataforma de vacunación transdermal, que implica la interacción de la matriz polimérica con una proteína inmunogénica. Es por ello que en esta sección se estudiará el proceso de carga y liberación de una proteína modelo con el propósito de evaluar la capacidad de los NGs sintetizados con VCL para la construcción de un sistema de vacunación transdermal.

La carga de proteínas en sistemas nanométricos es mucho más compleja que la carga de moléculas pequeñas como el caso de los fármacos antes evaluados, ya que las nanopartículas en presencia de una solución de proteínas tienden a formar un complejo llamado “corona de proteínas”. En este complejo las proteínas se unen de manera inespecífica a la superficie de las partículas formando una corona de proteínas. La formación de este complejo es un fenómeno inevitable cuando se adiciona cualquier tipo de nanopartículas en sangre, suero y otros fluidos biológicos.⁸⁶ La presencia del complejo corona de proteínas puede presentar ventajas o desventajas según la función que desempeñan las nanopartículas, ya que afecta la manera en que las nanopartículas son percibidas por los sistemas biológicos, y su estabilidad y tiempo de residencia en los fluidos, pero a la vez puede modificar sus propiedades alterando su funcionamiento.⁸⁷

El empleo del protocolo de carga utilizado previamente con los fármacos, donde se parte de los NGs colapsados a 40 °C, podría favorecer la formación del complejo de corona de proteína. Si esto se produce, las proteínas podrían quedar principalmente adsorbidas en la superficie de los NGs y no incorporadas en su interior, resultando más difícil el control de su posterior liberación. Por este motivo la carga de OVA se realizó empleando dos estrategias diferentes. La primera consiste en realizar la carga de OVA partiendo de NGs colapsados (40 °C) y disminuir posteriormente la temperatura, para que los NGs se hinchen e incorporen el analito (Figura 2.17a). Como segunda estrategia, se realizó la carga de OVA partiendo de los NGs liofilizados, e hinchándolos en una solución de proteína directamente a baja temperatura (4 °C) por 48 hs (Figura 2.17b).

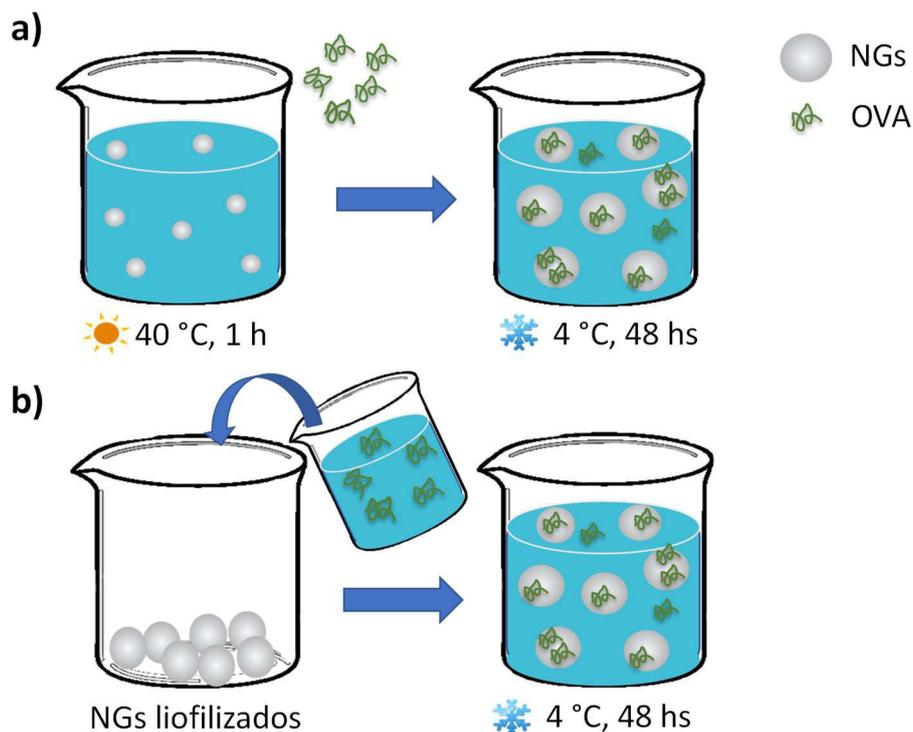


Figura 2.17. Esquema de las estrategias de carga de los NGs con OVA investigadas: a partir de NGs colapsados a 40 °C (a) y de NGs liofilizados (b).

En la Tabla 2.7 se muestran los resultados de EE obtenidos en la carga de los NGs B2 y B3 con OVA empleando concentraciones de NGs y OVA de 5 mg/mL. Se puede observar que los NGs B3 presentan una EE levemente superior a los NGs B2, a pesar de su mayor tamaño y por lo tanto menor área superficial. Esto puede deberse a que los NGs B3 poseen una mayor capacidad de hinchamiento (ver Tabla 2.4). Por otra parte, se observa que la estrategia de carga a partir de los NGs liofilizados permite una mayor incorporación de OVA.

Tabla 2.7. Eficiencia de encapsulamiento de OVA (EE) de los NGs B2 y B3 empleando los diferentes métodos de carga.

Método	EE (%)	
	B2	B3
NGs Colapsados (Col)	84	90
NGs Liofilizados (Lio)	94	97

En la Figura 2.18a se muestran los resultados del ensayo de liberación en términos de porcentaje acumulado de OVA liberada en PBS a los distintos tiempos para los NGs B2. Puede verse que para los NGs cargados con los dos métodos, la liberación de OVA a 25 °C es mucho

menor que a 37 °C. Esto se debe a que a 25 °C los NGs no sufren ningún cambio volumétrico y las interacciones de la PVCL con la OVA son suficientes para impedir su difusión hacia el medio. En cambio, a 37 °C se favorecen las interacciones polímero-polímero y los NGs colapsan expulsando todo su contenido. Este efecto on-off es muy importante en los sistemas de liberación controlada, ya que permite que los NGs retengan su carga, protegiéndola hasta el momento indicado de su liberación (cuando son expuestos a la temperatura corporal). Por otro lado, no se aprecia una diferencia significativa en la liberación de los NGs cargados con ambos métodos, por lo cual el método de carga solo tendría influencia en la capacidad de carga de OVA de los NGs, y no en su liberación.

En la Figura 2.18b se muestra la liberación de OVA en PBS con los NGs B2 y B3 cargados por liofilización. No se observan diferencias significativas en el desempeño en la liberación entre ambos NGs. En consecuencia, la diferencia de morfología interna y de tamaño de partícula entre los NGs B2 y B3 no altera significativamente su capacidad de cargar y liberar esta proteína.

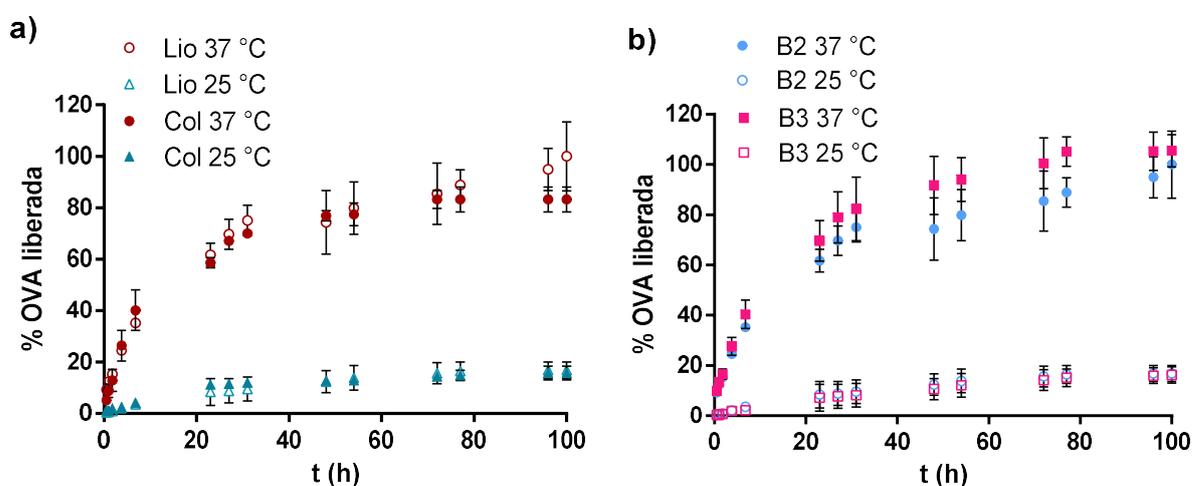


Figura 2.18. Ensayos de liberación de OVA en función de la temperatura con los NGs B2 cargados por liofilización o colapso (a) y con los NGs B2 y B3 cargados por liofilización (b).

2.3.4. Citotoxicidad

A fin de evaluar la factibilidad del empleo de estos NGs en aplicaciones biomédicas, se estudió su citotoxicidad sobre fibroblastos humanos.

Cabe destacar que la presencia de cargas superficiales en las nanopartículas demostró tener una fuerte influencia en la citotoxicidad.⁸⁸ Los NGs sintetizados en este Capítulo poseen cargas negativas en su superficie provenientes del iniciador empleado (KPS). Para determinar si la presencia de estas cargas tiene influencia sobre la citotoxicidad de los NGs, se sintetizaron NGs con carga superficial neutra (Pot Z = 0.7 mV) a partir de la formulación B2, pero empleando dihidrocloruro de 2,2'-Azobis [2- (2-imidazolin-2-il) propano] (VA-044) como iniciador. Estos NGs se identificaron como NGs B4.

La compatibilidad celular de estos materiales se evaluó en primer lugar sobre la actividad metabólica de las células, mediante el ensayo MTT directo. En este ensayo se pusieron en contacto las células con los NGs B2 y B3 en diferentes concentraciones, y se midió la absorbancia a 570 nm luego de incubar al sistema en presencia del reactivo MTT.

En la Figura 2.19a se muestran los resultados obtenidos en este ensayo. Puede verse que en todos los casos se obtuvieron valores de viabilidad relativa superiores a 100 %, los cuales aumentaron a concentraciones mayores de NGs. Si bien es común la obtención de valores por encima de 100 %, los porcentajes de viabilidad relativa obtenidos en este ensayo resultaron muy elevados. Luego de descartar una posible contaminación de las muestras, estos resultados pueden explicarse considerando que los NGs son difíciles de lavar (son adherentes) y dispersan luz, lo que podría provocar un error por exceso. Esta hipótesis concuerda también con el aumento de viabilidad al emplear mayores concentraciones de NGs.

Debido a estos resultados, la viabilidad celular también se determinó mediante el ensayo Celltiter Glo, en el cual se mide la concentración de ATP que puede correlacionarse también con el número de células y puede tomarse como una medida de la viabilidad celular al comparar células tratadas y no tratadas. La concentración de ATP se obtiene por luminiscencia, y por lo tanto la presencia de los NGs no debería afectar la medición. La Figura 2.19b muestra los resultados obtenidos en este ensayo. Los NGs en estudio no resultaron citotóxicos a las concentraciones analizadas, obteniendo valores de viabilidad relativas superiores al 100 % hasta 0.5 mg/mL de NGs. Al emplear la mayor concentración de NGs (5 mg/mL) la viabilidad relativa

disminuyó, pero en todos los casos se mantuvo por encima del umbral de toxicidad (75 %). En la Figura 2.20 se observa cómo lucen las dispersiones celulares luego de 48 hs en contacto con los distintos NGs y en las concentraciones extremas empleadas. En ella puede verse que los NGs sin carga superficial (B4) no produjeron ninguna alteración en el crecimiento celular respecto de la placa sin tratamiento, mientras que sí puede verse una diferencia con las placas tratadas con los NGs B2 y B3.

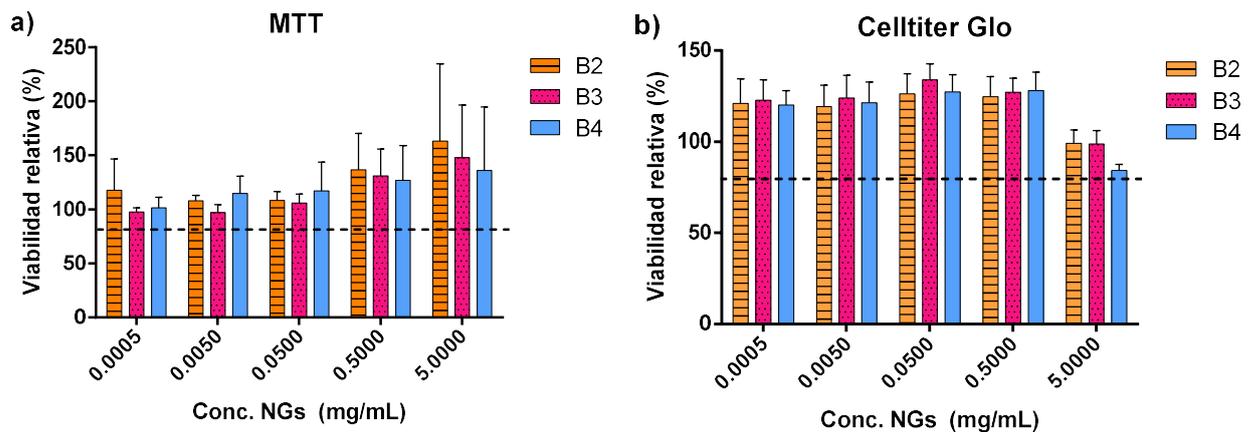


Figura 2.19. Resultados de citotoxicidad de los NGs de PVCL investigados mediante los ensayos MTT (a) y Celltiter Glo (b)

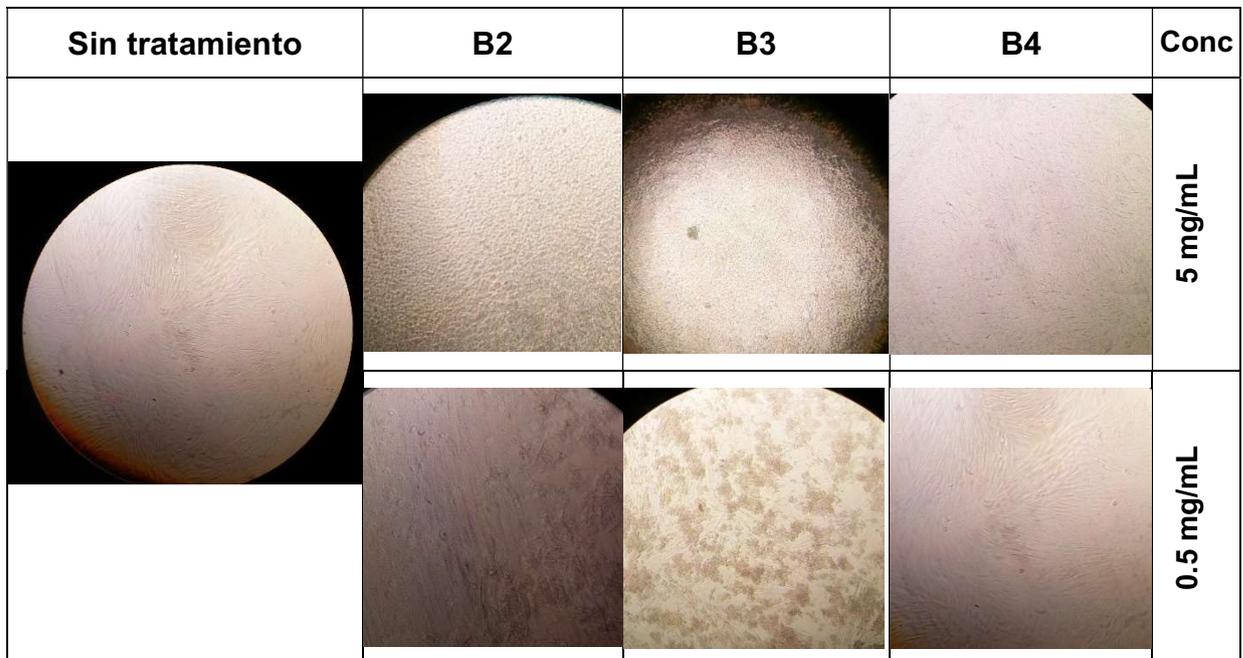


Figura 2.20. Imágenes de las dispersiones celulares luego de 48 hs de incubación con los NGs de PVCL investigados.

Si bien la detección visual de una diferencia en el crecimiento celular podría indicar una intervención negativa de los NGs frente a los fibroblastos, los valores de viabilidad celular relativa del estudio de citotoxicidad de los NGs de PVCL superiores al umbral de citotoxicidad indican que la carga superficial aportada por el iniciador no representa un factor determinante en la citotoxicidad de los mismos.

2.4. Conclusión

En este Capítulo se estudió la síntesis de NGs de PVCL con diferentes contenidos de sólido y la influencia del aumento de la concentración de los reactivos sobre sus propiedades. Este aumento demostró influir en el diámetro y en la morfología interna de los NGs, debido a una modificación en la cinética de polimerización de la VCL. En consecuencia, la capacidad de hinchamiento aumentó con el incremento de la concentración de VCL empleada en la síntesis, pero sin modificar la VPTT de los NGs. Los NGs sintetizados mostraron una respuesta térmica que implica un cambio volumétrico al variar la temperatura, como consecuencia del cambio de solubilidad de la PVCL en agua.

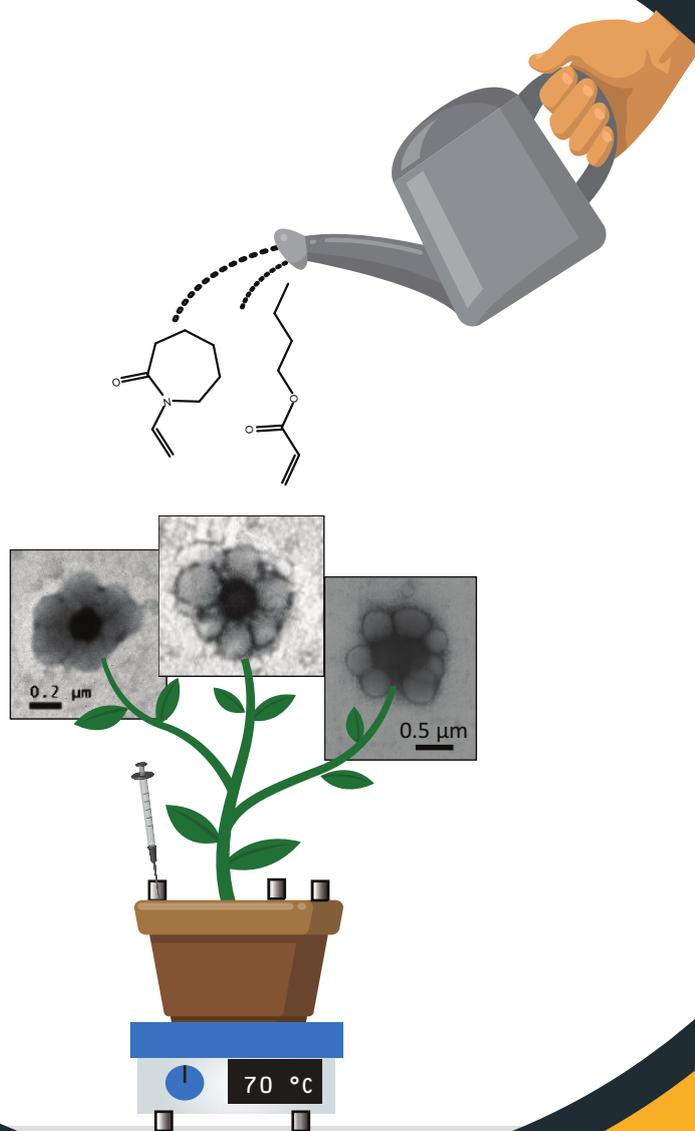
La capacidad de carga y liberación de OVA de los NGs de PVCL no se vio considerablemente influenciada al variar la concentración de los reactivos para la síntesis de los NGs. La liberación de la proteína está fuertemente controlada por la temperatura, observándose un efecto on-off al pasar de temperatura ambiente a la temperatura corporal.

Los NGs no mostraron signos de citotoxicidad sobre fibroblastos humanos. El ensayo MTT, ampliamente empleado para determinar la citotoxicidad de nanomateriales, no permitió obtener resultados confiables con estos NGs, ya que ellos interfieren en la cuantificación de formazan, el compuesto generado por la actividad metabólica de las células vivas. El ensayo de Celltiter Glo permitió evitar esta complicación. Si bien las imágenes de las dispersiones celulares se observa la presencia de interacciones que indicarían modificación en el crecimiento celular, los valores de viabilidad celular mostraron que los NGs no presentan toxicidad en fibroblastos humanos.

Los resultados obtenidos en este Capítulo permiten concluir que los NGs de PVCL pueden sintetizarse con contenidos de sólidos de hasta 10 % sin afectar negativamente sus principales propiedades, y que los mismos constituyen un buen sistema de liberación controlada con un control eficiente de la liberación mediante la regulación de la temperatura. Por consiguiente, estos materiales podrían emplearse en el desarrollo de sistemas para aplicaciones biomédicas, como la propuesta de esta Tesis.

Capítulo 3

Síntesis semicontinua de nanogeles bifuncionales



3.1. Introducción

En el proceso de formación de películas a partir de un látex acuoso, las partículas de polímero discretas deben unirse y deformarse para que las cadenas de polímero puedan difundir a través de los límites de la partícula y formar una película continua.⁸⁹ Si bien la PVCL es capaz de formar film gracias al efecto plastificante del agua, en el caso de partículas de gel la presencia de entrecruzamiento no permite la difusión entre partículas de las cadenas poliméricas, es decir que no es posible formar una película cohesiva con buenas propiedades mecánicas. Además, una vez evaporada el agua, la película recupera la elevada Tg de la PVCL (147 °C),¹⁴ resultando un material muy rígido y frágil. En este escenario, la síntesis de NGs que combinen simultáneamente las propiedades de termosensibilidad y capacidad de coalescencia (es decir capacidad de formar film) resulta de gran interés para la producción de películas con capacidad de carga y liberación de analitos, termo-respuesta y buenas propiedades mecánicas, como flexibilidad y adaptabilidad a superficies, acordes a una aplicación dermal. Para ello, en esta Tesis se persigue el diseño de una estrategia de síntesis que permita el control de la estructura de los NGs, de manera de conseguir que dos materiales combinen positiva y sinérgicamente las propiedades deseadas.

Tal como se describió en el Capítulo 2, se empleó PVCL como polímero base de los NGs, un polímero con propiedades termosensibles y biocompatible.⁹⁰ Con el fin de dotar de capacidad de formación de film a los NGs de PVCL, se persiguió la incorporación de PBA a su estructura. El PBA es un polímero de baja Tg (-56 °C) que posee excelentes propiedades de formación de película, con una MFFT menor a 2 °C, sin la incorporación de agentes plastificantes, y que se ha utilizado como adhesivo en aplicaciones biomédicas.⁹¹ A pesar de las propiedades positivas del PBA por las cuales se escogió su empleo, es un polímero hidrofóbico y sin sensibilidad térmica. Por lo tanto, la incorporación de una fase de PBA a los NGs de PVCL podría modificar algunas de sus propiedades ya estudiadas. Es por ello que se espera que la formación de NGs con dos fases separadas: una fase de PVCL entrecruzada con BIS (núcleo de la partícula), que conserve las propiedades de los NGs de PVCL (expuestas en el Capítulo 2), y otra fase rica en PBA, que

se encuentre formando la coraza de los NGs y que permita su coalescencia durante el proceso de formación de película. La Figura 3.1 esquematiza las propiedades de los NGs bifuncionales que se persigue sintetizar en este Capítulo.

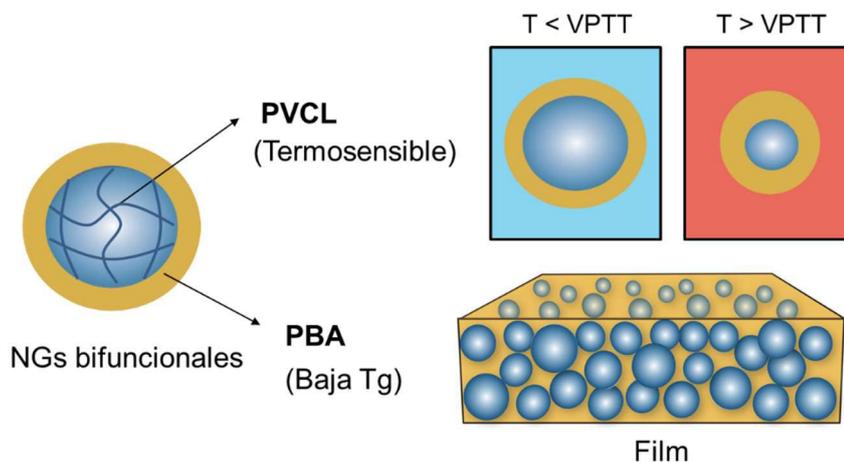


Figura 3.1. Esquema de los NGs bifuncionales.

Cabe destacar que los monómeros VCL y BA poseen reactividades muy diferentes. Verbrugghe et al.⁹² reportaron reactividades relativas (mediante el método de Kelen-Tüdös) de estos comonómeros de $r_{VCL}=0.1$ y $r_{BA}=1.2$ a 90 °C en 2-propanol y con 1% de AIBN como iniciador. Es sabido que, si los comonómeros presentan reactividades tan diferentes, en una polimerización discontinua la composición del copolímero presentará una variación a lo largo de la polimerización, debido a que el monómero más reactivo se consume primero y su concentración desciende marcadamente a lo largo de la reacción. En consecuencia, en el caso de la copolimerización discontinua de VCL y BA, el consumo preferencial del BA y la mayor hidrofobicidad del PBA frente al PVCL daría como resultado una morfología opuesta a la deseada, NGs con la fase rica en BA en su interior y con una coraza rica en VCL. El control de la composición del copolímero, como la separación y distribución de las fases en las partículas (es decir su morfología), se puede lograr manipulando la disponibilidad de los comonómeros en el sistema de polimerización. Para ello se requiere de estrategias de polimerización, que involucren la dosificación de los comonómeros especialmente diseñada (es decir, una estrategia de síntesis semicontinua). Un caso particular es cuando los caudales de alimentación de los

comonómeros son muy bajos y puede lograrse un copolímero con una composición igual a la de la alimentación. Esta estrategia de síntesis se denominada de inanición o, en inglés, *starved*.

En el presente Capítulo se investigó la síntesis semicontinua de NGs bifuncionales con morfología núcleo-coraza de acuerdo al esquema de la Figura 3.1. Para la obtención de estos NGs bifuncionales se empleó como monómeros principales VCL y BA. Tanto la estrategia de incorporación de los comonómeros como la composición de la alimentación (BA/VCL) pueden influir fuertemente en las propiedades de los NGs obtenidos. Es por ello que sobre la base de la adopción de una estrategia semicontinua de síntesis de los NGs, en este Capítulo se analiza la influencia de cinco parámetros de síntesis sobre las propiedades de los NGs resultantes. La Tabla 3.1 resume el conjunto de experimentos realizados, con los parámetros de síntesis investigados y las principales propiedades de los NGs analizadas.

Tabla 3.1. Parámetros de síntesis y propiedades de los NGs investigados.

Sección	Propiedad de los NGs	Parámetro de síntesis investigado
3.3	Microestructura interna de los NGs	Estrategia semicontinua
3.4	Formación de película	Contenido de BA
3.5	Control en la composición de la coraza	Velocidad de dosificación
3.6	Tg de la coraza	Composición de alimentación
3.7	Funcionalidad de la fase acrílica	Incorporación de AA

3.2. Trabajo experimental

3.2.1. Materiales

La Tabla 3.2, contiene la descripción de los reactivos que se utilizaron a lo largo del trabajo experimental del presente Capítulo. Todos los reactivos se utilizaron como fueron recibidos sin ninguna purificación adicional. El agua empleada a lo largo de todo el trabajo fue destilada y desmineralizada (DDI).

Tabla 3.2. Descripción de los reactivos empleados durante el trabajo experimental.

Reactivo	Abreviatura	Función	Proveedor	Pureza
<i>N</i> -vinilcaprolactama	VCL	Monómero	Aldrich	98%
Acrilato de butilo	BA	Monómero	Aldrich	99%
Ácido acrílico	AA	Monómero	Aldrich	98%
<i>N,N</i> -metilenbisacrilamida	BIS	Entrecruzante	Genbiotech	99.9%
Persulfato de potasio	KPS	Iniciador	Mallinckrodt	99%
Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	Buffer	Cicarelli	99.7%
Dodecil sulfato sódico	SDS	Emulsificante	Cicarelli	95%
Hidroquinona	HQ	Inhibidor	Fulka	>99%
Acetato de sodio	AcNa	Estándar interno RMN	Cicarelli	99%
Agua deuterada	D ₂ O	Solvente RMN	Aldrich	>99%

3.2.2. Polimerizaciones

Con el fin de obtener el control sobre la composición y morfología de los NGs se emplearon estrategias semicontinuas de síntesis. Estas polimerizaciones se llevaron a cabo en el mismo reactor de vidrio de 200 mL empleado en las síntesis discontinuas del Capítulo 2, con la incorporación de un sistema de dosificación automática. El sistema de dosificación cuenta con bombas dosificadoras (Prominent Gamma/L) y balanzas digitales (PIONER - OHAUS), conectadas en lazo cerrado mediante una PC para controlar el caudal de alimentación. Las imágenes de la Figura 3.2a y b muestran el esquema y la foto del sistema de polimerización con dosificación controlada empleado.

En la Tabla 3.3 se muestra la receta general empleada en las síntesis semicontinuas de los NGs bifuncionales. Todas las cantidades están expresadas en % tomando como base la VCL (% w/vcl).

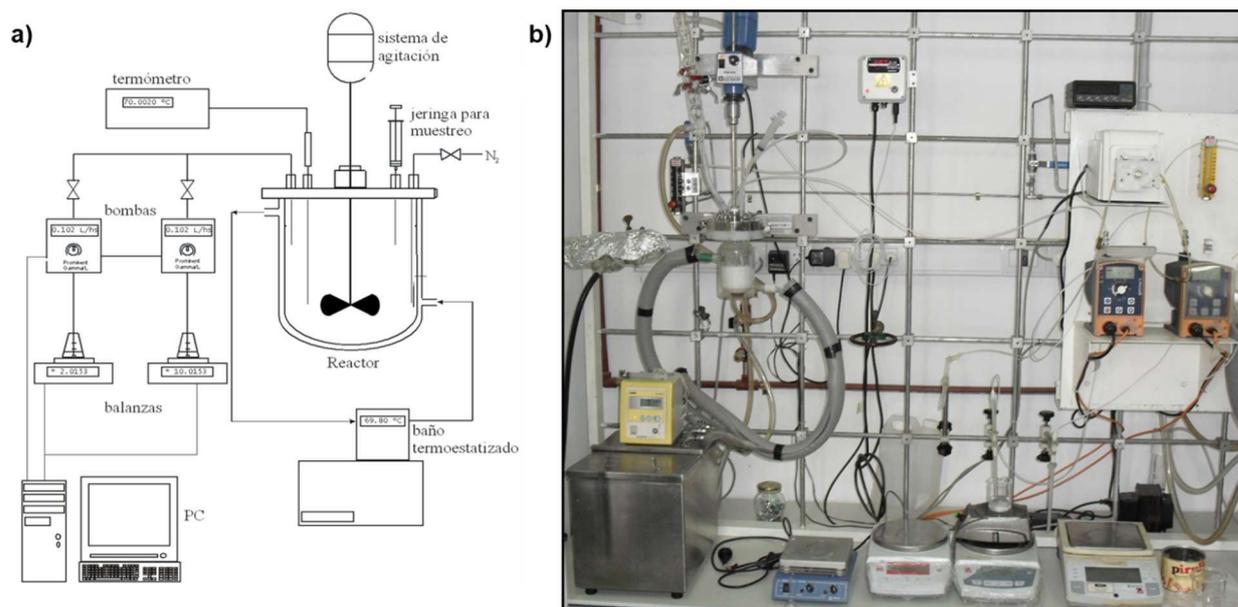


Figura 3.2. Esquema (a) y foto (b) del sistema de polimerización con dosificación.

En la Figura 3.3 se muestra un esquema con una línea de tiempo que resume la estrategia de polimerización con las dosificaciones de los comonómeros a lo largo de la reacción. La estrategia involucró una carga inicial de una dispersión acuosa compuesta por el 50% en peso de VCL, SDS y NaHCO_3 , y la cantidad total de BIS (Esquema A de la Figura 3.3). El sistema se mantuvo una hora a $70\text{ }^\circ\text{C}$ bajo agitación a 250 rpm y con burbujeo de N_2 . Luego, la polimerización se comenzó con la carga del iniciador al mismo tiempo que se inicia la dosificación del 50% restante de VCL, SDS y NaHCO_3 a una velocidad de alimentación constante hasta el tiempo t_{VCLf} (Esquema B de la Figura 3.3). El tiempo t_{VCLf} , que indica el final de la dosificación de la VCL, fue modificado según la polimerización. Para la síntesis de los NGs que contienen una fase rica en BA, denominada en el esquema como acrílica (Ac), se dosificó en una corriente separada una dispersión acuosa que contiene la mezcla de monómeros acrílicos y SDS (Esquema C de la Figura 3.3). Tanto la cantidad como la composición de los monómeros acrílicos y los tiempos de dosificación (inicio de la dosificación, t_{ACi} , y final de alimentación, t_{ACf}) se modificaron según la polimerización. En las reacciones donde se emplearon cantidades pequeñas de BA, este monómero se alimentó en un pulso. Finalmente, en todas las polimerizaciones, las condiciones de reacción se mantuvieron durante 30 minutos adicionales una vez que terminó el período de alimentación (Esquema D de la Figura 3.3).

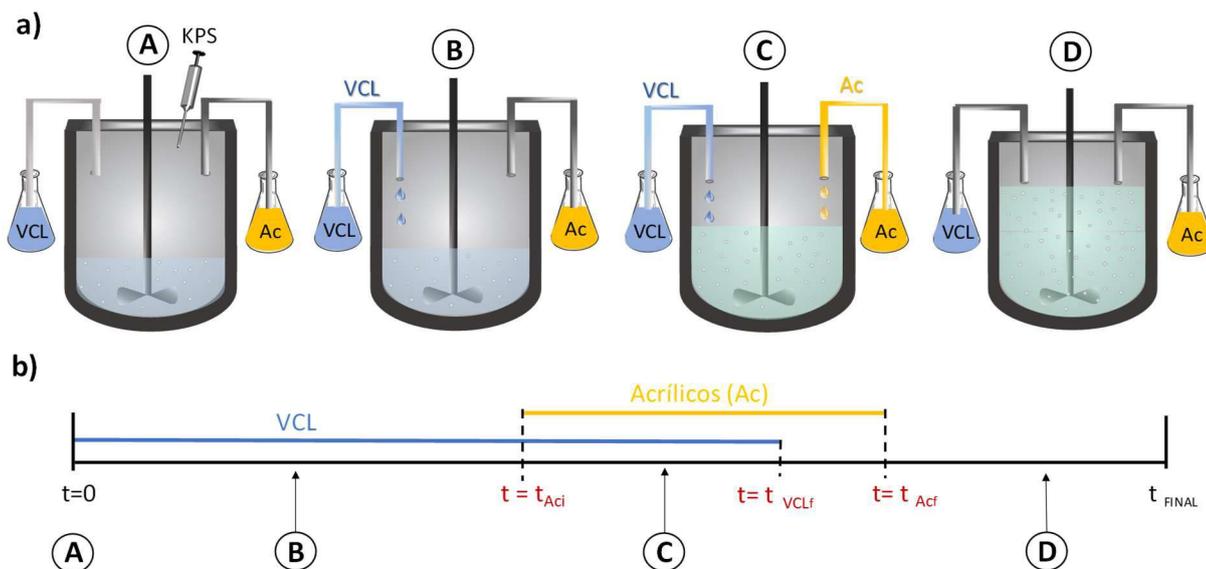


Figura 3.3. Esquema de la estrategia de polimerización semicontinua. Configuración del sistema de polimerización (a) y esquema de alimentación de los monómeros a lo largo de la reacción (b).

Tabla 3.3. Receta general de las polimerizaciones

Reactivo	% wbvcl
VCL	100
BIS	4
KPS	1
SDS	4
NaHCO ₃	1
BA	Variable
AA	Variable

3.2.3. Caracterización

3.2.2.3. Caracterización de los látex

Conversión de los monómeros

La conversión de los monómeros se llevó a cabo mediante H1-RMN. Para VCL y BIS se procedió tal como se explicó en el Capítulo 2, pero con la diferencia de que al tratarse de reacciones semicontinuas la conversión puede calcularse de dos maneras: en base a la masa del monómero presente en el reactor a cada tiempo (conversión instantánea) y en base a la masa

total de monómero dosificada en toda la reacción (conversión global). De esta forma se definen dos conversiones:

$$\text{conversión instantánea} = \frac{[VCL]^t - [VCL]_{LIBRE}^t}{[VCL]_t} \quad \text{Ec. 3.1}$$

$$\text{conversión global} = \frac{([VCL]^t - [VCL]_{LIBRE}^t) V_t}{[VCL]_{TOTAL} V_{FINAL}} \quad \text{Ec. 3.2}$$

donde:

$[VCL]^t$ es la concentración de VCL que resulta de la carga inicial y la dosificada hasta el tiempo t.

$[VCL]_{LIBRE}^t$ es la concentración de VCL sin reaccionar en el tiempo t.

$[VCL]_{TOTAL}$ es la concentración de VCL que resulta de la carga inicial y la dosificada hasta el final de la reacción.

V_t y V_{FINAL} son los volúmenes correspondientes al tiempo t y al final de la reacción respectivamente.

En la Figura 3.4 se muestran los espectros obtenidos de BA y AA con la técnica de supresión WATERGATE, y la asignación correspondiente a cada pico. Para determinar la concentración de BA y AA sin reaccionar se analizó el pico correspondiente al doble enlace vinílico a 6 y 6.3 ppm, respectivamente. La conversión final se define como:

$$\text{conversión} = \frac{[\text{monómero}]_{cargado} - [\text{monómero}]_{LIBRE}}{[\text{monómero}]_{cargado}} \quad \text{Ec. 3.3.}$$

donde $[\text{monómero}]_{cargado}$ es la concentración de BA o AA cargada en el reactor al final de la reacción y $[\text{monómero}]_{LIBRE}$ es la concentración de BA o AA sin reaccionar al final de la polimerización.

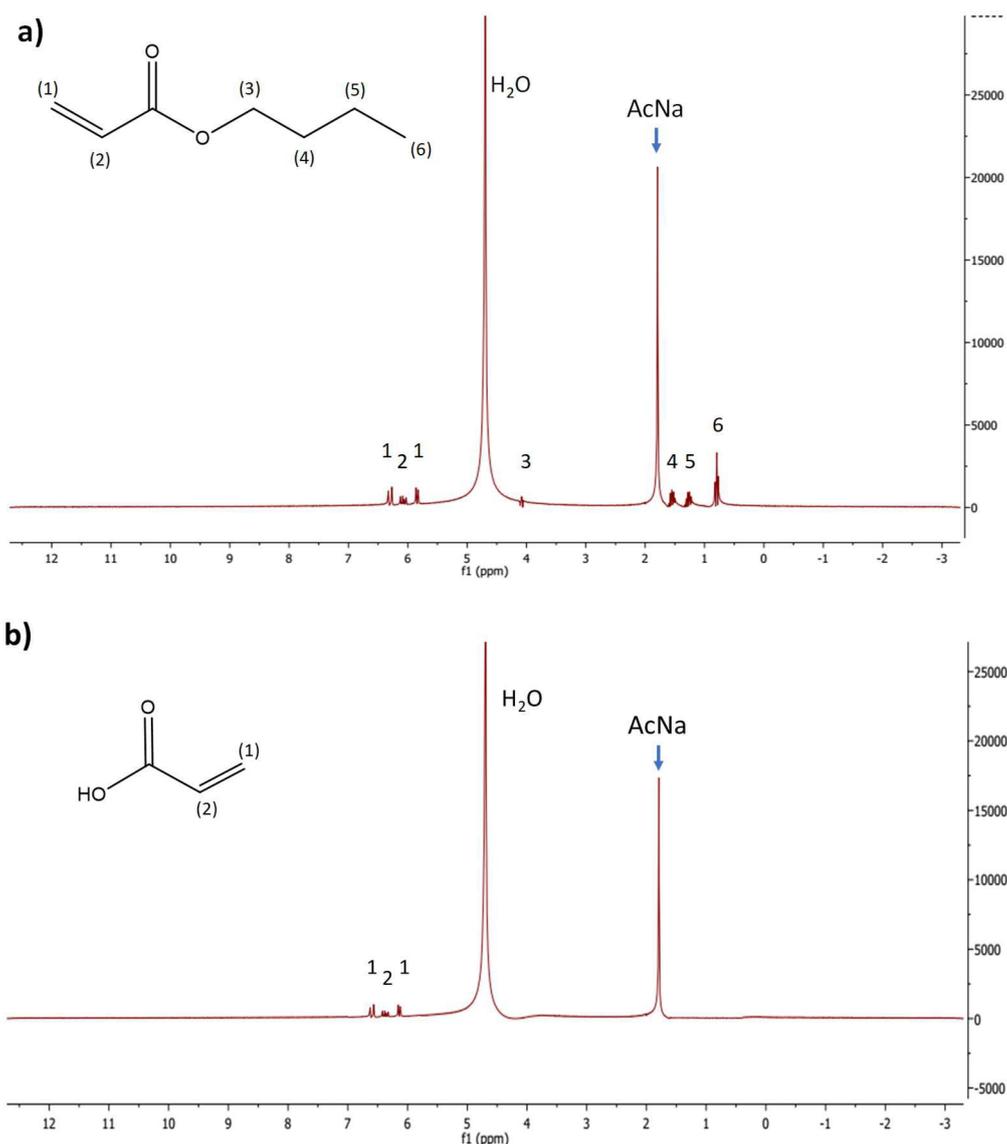


Figura 3.4. Espectros de ^1H -RMN de BA (a) y AA (b) con AcNa como estándar interno.

Diámetro de NGs

Para determinar el diámetro promedio de los NGs (D) se utilizó la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS). Las mediciones se efectuaron en un fotómetro de dispersión de luz marca Brookhaven modelo BI-2030, con un láser de He-Ne (632.8 nm) polarizado verticalmente, y un correlador digital modelo BI-200 AT, utilizando un ángulo de 90° . Todas las muestras se midieron con una concentración de 1 mg/mL y a 55°C , de manera que los NGs se encuentren colapsados. De esta manera se determinó el diámetro medio de las muestras extraídas a lo largo de las reacciones. El número de partículas (N_p) se calculó a partir de los valores de D medidos, tal como se describió en el Capítulo 2.

Distribución de tamaños de NGs por CHDF

La distribución de tamaños de los NGs se determinó mediante Fraccionamiento Hidrodinámico Capilar (CHDF), empleando un equipo marca Matec Applied Sciences, modelo CHDF-2000. Las mediciones de CHDF se realizaron a dos temperaturas, 20 y 35 °C. Debido a que el equipo no tiene la capacidad de enfriamiento, la temperatura del eluyente se controló mediante un vaso encamisado conectado a un baño termostático.

La técnica de CHDF implica la separación por tamaños de una muestra de látex en un tubo capilar sin relleno. La Figura 3.5 esquematiza el principio de fraccionamiento en un equipo CHDF. El eluyente adopta un flujo laminar (o Poiseuille) con perfil parabólico, el cual presenta menor velocidad cerca de la pared del tubo con respecto de su centro. Las partículas introducidas en este sistema de flujo laminar se difunden aleatoriamente debido a su movimiento browniano. La difusión radial lleva las partículas a diferentes zonas de velocidad axial. Las partículas más grandes, son menos capaces de acercarse a la pared del capilar, y se mueven en las líneas de corriente más rápidas, eluyendo más temprano que las pequeñas; mientras que las partículas pequeñas pueden difundir más cerca de las paredes del capilar, a una distancia mínima definida por su radio. Por lo tanto, se consigue una separación física de acuerdo con el tamaño de partícula, eluyendo en orden decreciente de tamaños. Para suprimir la influencia de las fluctuaciones de presión o temperatura, después de la inyección de la muestra, se introduce un marcador cuyo tiempo de elución se toma como referencia.

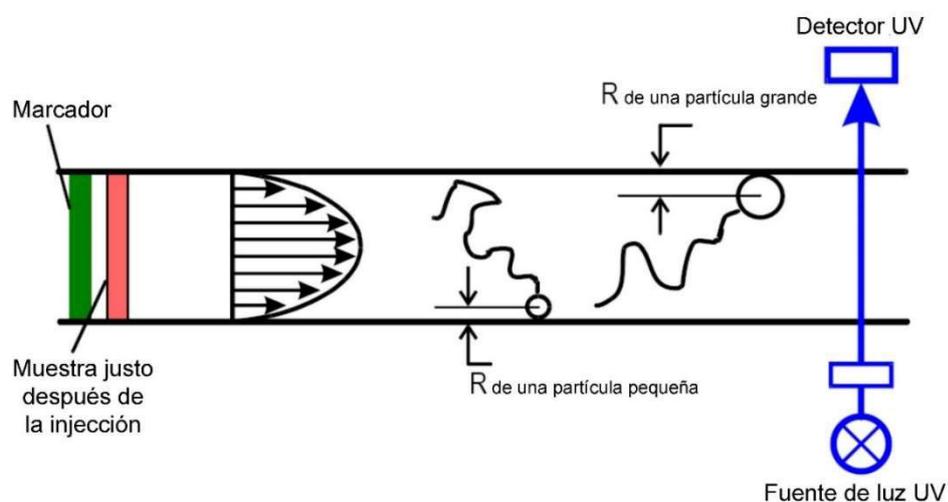


Figura 3.5. Esquema del principio de fraccionamiento por tamaños de un equipo CHDF.

En CHDF, cada fracción eluida se detecta mediante un sensor de turbidez (a 254 nm). CHDF es una técnica relativa, que requiere del empleo de una curva de calibración obtenida sobre la base de estándares estrechos de diámetros medios conocidos. De esta manera, la calibración permite la transformación del eje del tiempo de elución de una muestra desconocida en el eje de diámetros de la distribución de tamaños de partícula. Debido a que en esta Tesis se realizaron mediciones de CHDF a 2 temperaturas, se realizaron dos calibraciones correspondientes a las temperaturas de trabajo. Luego, la señal de turbidimetría se transforma en fracción en número (o masa) de partículas, siguiendo un procedimiento que requiere del empleo de la teoría de dispersión de luz de Mie.⁹³

Morfología de los NGs

La morfología de los NGs se observó mediante dos técnicas: Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

Las observaciones de TEM se realizaron con dos microscopios a lo largo de este Capítulo:

- Microscopio electrónico de barrido Hitachi SU 8030 operando a 30 kV provisto por un detector de TEM, perteneciente a la Universidad Libre de Berlin.
- JEOL 100 CX (100 kV) del Laboratorio de Microscopía del CCT-Bahía Blanca.

Las muestras para TEM se prepararon colocando una gota de dispersión de NGs con una concentración de 1 mg/mL a una rejilla de cobre recubierta con Formvar® y con posterior secado a temperatura ambiente. Las muestras se tiñeron depositando una gota de una solución de acetato de uranilo al 1% sobre la muestra seca y dejándola secar a temperatura ambiente.

Algunos NGs también fueron observados por AFM, mediante imágenes de topografía y de fase. Para ello se utilizó un sistema comercial Nanotec Electronic equipado con cantilevers V-Shaped Olympus RC800 PSA de nitruro de silicón recubiertos con Au/Cr (radio de curvatura de 20 nm y frecuencia de resonancia 80-135 kHz). Las muestras fueron preparadas por dilución de los látex 1/6000 con agua destilada y deposición en vidrios porta muestra de aproximadamente 0.5 cm de lado. Posteriormente las muestras se secaron con una corriente de N₂. La adquisición y el procesamiento de las imágenes se realizaron utilizando el Software libre WS × M.⁹⁴

Respuesta térmica

La respuesta térmica de los NGs se determinó mediante DLS. Las muestras se midieron con una concentración de 1 mg/mL, ya que previamente fue determinado el rango de concentraciones (0.1-1 mg/mL) en que la temperatura de transición de los NGs de VCL y BIS no depende de la concentración de la medición.³⁶ Las mediciones se realizaron a partir de una dispersión de los NGs en agua destilada. Se utilizó el equipo descrito anteriormente para la determinación de D y también un Malvern Zetasizer Nano ZS ZEN3600 con un láser de He-Ne utilizando un ángulo de dispersión de 173°. Se midió el D en el rango de temperatura de 20-55°C a intervalos de 2.5 o 0.5 °C según el equipo utilizado. Cuando el cambio de temperatura entre mediciones fue de 2.5 °C las muestras se mantuvieron por 20 min a cada temperatura antes de realizar la medición. En cambio, cuando el intervalo fue de 0.5 °C, se esperó 5 min de estabilización antes de realizar la medición, ya que el salto de temperatura es menor y por lo tanto se espera que el cambio en el tamaño de los NGs se alcance más rápido.

Temperatura mínima de formación de film (MFFT)

La temperatura mínima de formación de film (MFFT) representa la temperatura mínima a la que la dispersión es capaz de formar película. La determinación de la MFFT se basa en un método óptico, el cual involucra la evaluación del cambio en la transparencia de la película luego de ser aplicado sobre una placa que posee un gradiente de temperatura.⁹⁵ La temperatura a la cual se observa una transición en la transparencia de la película, indicando la ausencia de coalescencia de las partículas, se considera como la MFFT (Figura 3.6.a). Para este propósito, se empleó un equipo construido en el laboratorio (Figura 3.6.b) que consiste en una placa de acero inoxidable sobre la que se aplica en sus extremos dos temperaturas para generar un gradiente controlado de temperatura. El gradiente de temperatura se mide por medio de 16 termorresistencias instaladas a intervalos regulares debajo de la superficie de la placa. Para formar la película se empleó un aplicador cuadrangular (Neurtek Instruments) con un espesor de película húmeda de 120 µm (Figura 3.6.b)

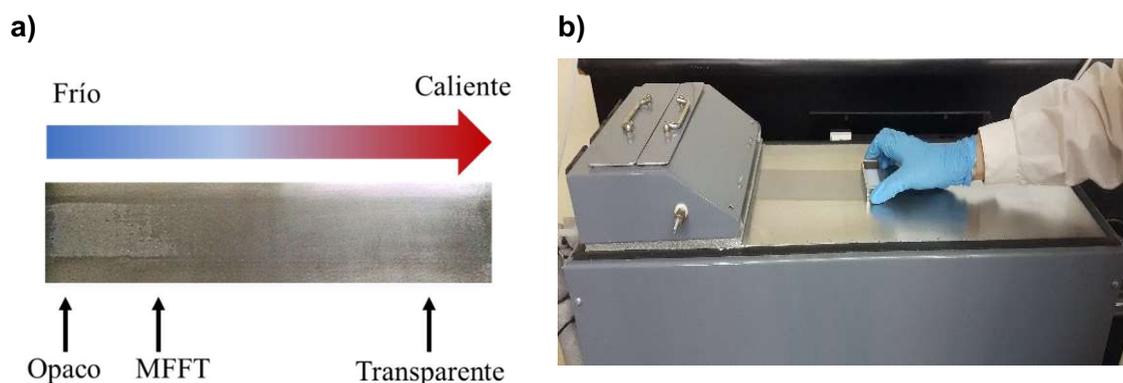


Figura 3.6. Determinación de la MFFT. Observación de la MFFT sobre la placa (a) y equipo empleado (b).

3.2.3.2. Caracterización de las películas

Para realizar las caracterizaciones que se describen a continuación, las películas fueron obtenidas secando en moldes de silicona, a una temperatura de 22 °C y una humedad de 55 % durante 7 días. El espesor de las películas fue en todos los casos alrededor de 1 mm.

Resistencia al agua

Para determinar la resistencia al agua de los films obtenidos, se cortaron muestras de 1 cm de diámetro y se sumergieron en agua a temperatura ambiente. Las muestras fueron removidas del medio a tiempos regulares, secadas con papel absorbente e inmediatamente pesadas antes de regresarlas al medio de inmersión. Este procedimiento se repitió hasta peso constante. En cada caso se calculó la masa relativa absorbida (Ec. 3.4) y la pérdida de peso, expresada como el porcentaje de masa disuelta de la película seca (Ec. 3.5).

$$\text{Masa absorbida (\%)} = \frac{M_h - M_0}{M_0} \times 100 \quad \text{Ec. 3.4}$$

$$\text{Pérdida de peso (\%)} = \frac{M_0 - M_{fs}}{M_0} \times 100 \quad \text{Ec. 3.5}$$

donde M_0 , M_h y M_{fs} representan la masa inicial de la película, la masa de la película luego del período de hinchamiento y la masa final de la película luego de ser secada hasta peso constante, respectivamente.

Respuesta térmica

La respuesta térmica de los films se evaluó gravimétricamente. Para ello se sumergió una muestra de film de 1 cm de diámetro en agua y se la dejó hidratándose durante toda la noche. Se evaluó el hinchamiento en las siguientes temperaturas: 20, 25, 27.5, 30, 32.5, 35, 37.5, 40, 45, 50, 55 °C. Para llevar a cabo este estudio, luego de su estabilización 15 min a la temperatura deseada, las muestras fueron removidas del medio, se secaron con papel absorbente e inmediatamente se pesaron antes de regresarlas al medio de inmersión. La masa de agua absorbida se calculó mediante la Ecuación 3.4.

Para permitir la comparación de la respuesta térmica de los films con la de los NGs en dispersión, se definió el factor de hinchamiento (\emptyset), en peso (Ec. 3.6) para los films, y volumétrico (Ec. 3.7) para los NGs.

$$\emptyset_w(T) = 1 - \frac{W_S - W(T)}{W_S - W_C} \quad 3.6$$

$$\emptyset_v(T) = 1 - \frac{V_S - V(T)}{V_S - V_C} \quad 3.7$$

donde, W_S y V_S son el peso y volumen en el estado hinchado (a 20 °C), W_C y V_C son el peso y el volumen en el estado colapsado (a 55 °C), y $W(T)$ y $V(T)$ son el peso y el volumen a la temperatura de la medición (T). La VPTT se definió como la temperatura a la cual $\emptyset(T) = 0.5$.

Morfología

La morfología de las películas se caracterizó por AFM y TEM.

Para AFM se empleó el equipo previamente descrito para la caracterización de los NGs. Se utilizó una constante fuerza de 2.7 N m⁻¹ y una frecuencia de resonancia de 80 ± 30 kHz. Las muestras de película fueron preparadas por casting de la dispersión NGs con un aplicador cuadrangular de 120 μm de espesor en una hoja de papel plastificado y luego se secaron a 22 °C durante 1 día. Todas las mediciones de AFM se realizaron en aire y a temperatura ambiente. A partir de seis imágenes topográficas de AFM (5000 nm × 5000 nm) para cada muestra, se obtuvo la rugosidad como la raíz media cuadrada de la diferencia de las alturas con el valor

medio (RMS). Esta se define como la desviación estándar de las medidas de altura, adquiridas en las imágenes topográficas, de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\text{RMS} = \sqrt{\frac{\sum_{i,j}(a_{i,j}-\langle a \rangle)^2}{N}} \quad \text{Ec. 3.8}$$

donde $\langle a \rangle$ es el valor medio de la altura, $a_{i,j}$ es el valor real de altura para cada punto del mapeo de la muestra y N es el número de puntos dentro del intervalo ($N = i \times j$). Esta medición permite tener una idea del grado de rugosidad de la superficie de la película, lo cual indica una mayor o menor coalescencia entre las partículas a la hora de formar la película.

También se estudió la morfología interna de algunas películas empleando TEM. Para ello las películas se cortaron transversalmente mediante un ultramicrotomo criogénico Leica EM UC6 (POLYMAT, San Sebastián, España). Las muestras de los cortes se depositaron sobre una grilla de TEM y se tiñeron mediante la hidratación con una gota de una solución de acetato de uracilo al 1 %.

Estudio de la Tg por DSC

La temperatura de transición vítrea (Tg) de las películas poliméricas fue determinada por calorimetría diferencial de barrido (DSC), utilizando un equipo Q2000 de TA Instruments perteneciente al Laboratorio de Análisis Térmicos (LAT) de INTEC. Las muestras de 5-10 mg se analizaron utilizando una cápsula de aluminio sellada herméticamente (TZero de TA Instruments). Las mediciones se llevaron a cabo en el rango de temperaturas de -90 a 300 ° C, con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min y bajo atmósfera de N₂. La Tg fue determinada como la temperatura correspondiente al punto medio del cambio de la capacidad calorífica observado durante la segunda etapa de calentamiento. A lo largo del Capítulo se analizarán los resultados de las derivadas del flujo de calor (dDSC) y los termogramas de flujo de calor con la temperatura (DSC) se muestran en el Anexo N° 2.

Ensayos mecánicos

Para los ensayos de tracción se cortaron probetas de las películas con forma de hueso (Figura 3.7.a), de acuerdo a la norma ASTM D882, siendo las dimensiones de la zona de

elongación de 9.53 mm de longitud con una sección transversal de 3.18 mm x 1 mm. Las pruebas se realizaron en un equipo de ensayos universal INSTRON 3344, siguiendo la norma ASTM D882, en condiciones controladas de temperatura (23 °C) y humedad (50 %), y a una velocidad de elongación de 3 mm/min. Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados de las propiedades en tracción de estas mediciones se reportaron como la media aritmética, junto a la desviación estándar. La Figura 3.7 muestra una probeta cortada de una película obtenida a partir de los NGs bifuncionales antes y después de ser ensayada (a), y la misma durante la realización del ensayo (b).

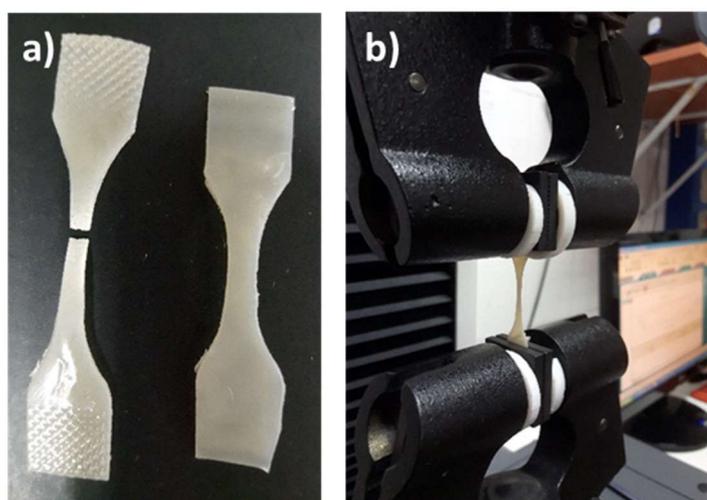


Figura 3.7. Ensayo de tracción. Imagen de una probeta antes y después del ensayo (a), y durante la realización del ensayo (b).

Ángulo de contacto

El ángulo de contacto (CA) de la superficie de las películas fue determinado utilizando un goniómetro construido en nuestro laboratorio (Figura 3.8). El equipo consta de una cámara Point Grey modelo BFLY-PGE-05S2M-CS, con una lente macro Edmund Optics #68-678 con una magnificación de 6X. Las muestras se prepararon sobre una placa de vidrio aplicando una película de 120 μm de espesor húmedo y secando a temperatura ambiente por 24 hs. A lo largo de la película así obtenida se depositaron gotas de agua de 20 μL . Las gotas fueron analizadas utilizando el método LB-ADSA⁹⁶ y el software gratuito “ImageJ”. Se realizaron al menos 10 mediciones para cada muestra, reportándose un valor promedio y su desviación estándar.

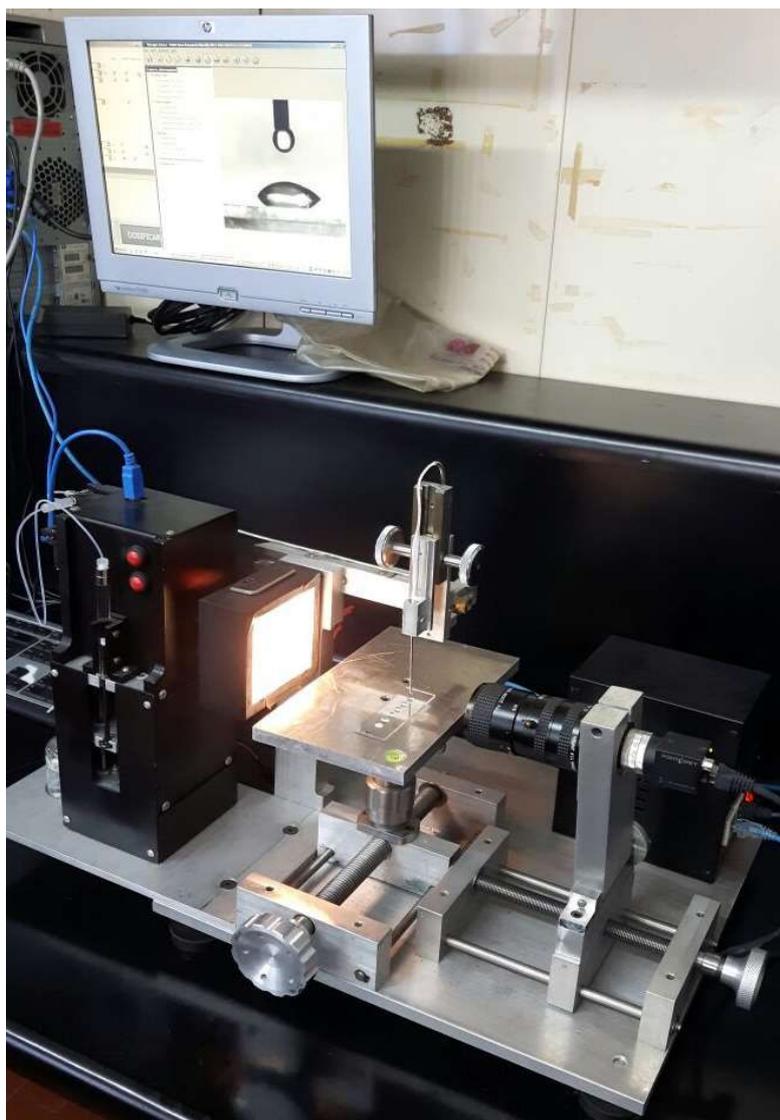


Figura 3.8. Equipo empleado en la determinación de Ángulo de Contacto.

3.3. Síntesis semicontinua de NGs de PVCL

Con esta estrategia se persigue la síntesis de NGs que posean un núcleo de PVCL entrecruzada, el cual hace las veces de reservorio para alojar proteínas y/o fármacos para su posterior liberación controlada. La estructura de dicho núcleo, así como su respuesta térmica y capacidad de carga, pueden afectar la factibilidad de aplicación de estos NGs en liberación controlada. Por esta razón, resulta de gran interés estudiar cómo influye el empleo de una estrategia semicontinua, donde la VCL se dosifica a lo largo de la polimerización, sobre la estructura y las propiedades de los NGs obtenidos. Para ello se realizó una reacción semicontinua, utilizando la misma formulación global que en B3 (polimerización discontinua,

Capítulo 2: 100 mg/mL de VCL, BIS 4 % wvcl, SDS 4 % wvcl, NaHCO₃ 1 % wvcl y KPS 1 % wvcl).

En la polimerización semicontinua S0 el 50 % de la VCL de la formulación global se cargó en el reactor antes de comenzar la polimerización y el 50 % restante se alimentó durante 90 min (t_{VCLf}), una vez cargado el iniciador. Una vez finalizada la dosificación, la reacción se mantuvo durante 30 min adicionales, es decir hasta alcanzar un tiempo total de polimerización de 120 min (t_{FINAL}). En la Tabla 3.4 se resume la formulación detallada para esta estrategia semicontinua de polimerización.

Tabla 3.4. Formulación de la polimerización semicontinua S0.

Reactivo	% wbvcl	
	Carga Inicial	Dosificación
VCL	50	50
BIS	4	0
KPS	1	0
SDS	2	2
NaHCO₃	0.5	0.5

En la Figura 3.9a-c se muestran las evoluciones de la conversión global e instantánea de la VCL, del diámetro de los NGs (D) y del número de partícula (N_p) obtenidos a lo largo la polimerización S0 y su comparación con B3. Se observa que en el proceso semicontinuo la conversión instantánea (es decir, referida a la VCL alimentada hasta ese tiempo) alcanzó rápidamente el 100 %. La velocidad de polimerización inicial observada en S0 es mayor que en la polimerización batch, donde esta última requiere de un mayor tiempo para alcanzar la máxima conversión. Esto se debe a que en ambas reacciones todo el iniciador se cargó a tiempo cero, pero en S0 la alimentación inicial de VCL fue la mitad que la cargada en B3. Sin embargo, a medida que se dosificó la VCL en S0, su conversión instantánea fue disminuyendo levemente, llegando a un valor final de 81 %. Aun así, la conversión instantánea se mantuvo elevada durante toda la polimerización, estando en una condición de semi-inanición.

En la Figura 3.9.b se observa la evolución del D de los NGs con el tiempo de reacción. En B3, D crece al inicio de la polimerización y se mantiene constante, indicando que todas las

partículas se forman al inicio de la polimerización y aumentan su tamaño a medida que el monómero reacciona. Mientras que en S0 el D aumenta rápidamente al inicio de la polimerización y luego continúan creciendo lentamente a medida que la conversión global incrementa con la dosificación continua de VCL. Esto se debe a que en la primera etapa de la reacción los NGs crecen con la disponibilidad de VCL de la carga inicial, mientras que el crecimiento continuo a lo largo de la polimerización es consecuencia de la dosificación de la VCL. La evolución del N_p (Figura 3.9.c) demuestra que la nucleación de las partículas ocurre principalmente al inicio de la polimerización, donde el N_p aumenta y luego se mantiene constante a lo largo de toda la reacción. Debido a que la BIS es consumida predominantemente al comienzo de la polimerización (según lo observado en el Capítulo 2 para la polimerización batch y en los espectros de RMN de la Figura A.2 y Figura A.3 del Anexo 1), este resultado indicaría que la mayoría de las partículas se forman al inicio de la polimerización y en presencia de BIS. Por lo tanto, este resultado indicaría que con la estrategia semicontinua S0, la mayoría de los NGs son formados al inicio de la polimerización y deberían contener un núcleo entrecruzado.

Puede observarse que el D final de los NGs sintetizados con la estrategia semicontinua S0 es mayor que el obtenido con la polimerización batch homóloga B3. Esta diferencia se debe a que los NGs son formados principalmente al inicio en ambas polimerizaciones y mayoritariamente por nucleación homogénea. Tal como se describió en el Capítulo 2, la nucleación de los NGs de PVCL depende de la concentración de radicales (es decir, de la concentración de KPS), la concentración de VCL y de la concentración de SDS, que permite estabilizar las partículas en formación. Mientras que en B3 la totalidad del KPS, la VCL y el SDS son cargados al comienzo de la reacción, en S0 solo la mitad de la VCL y el SDS están disponibles desde el inicio. De esta manera, en S0 se obtiene un menor N_p (Figura 3.9c), y por lo tanto NGs con tamaños mayores, con respecto a B3.

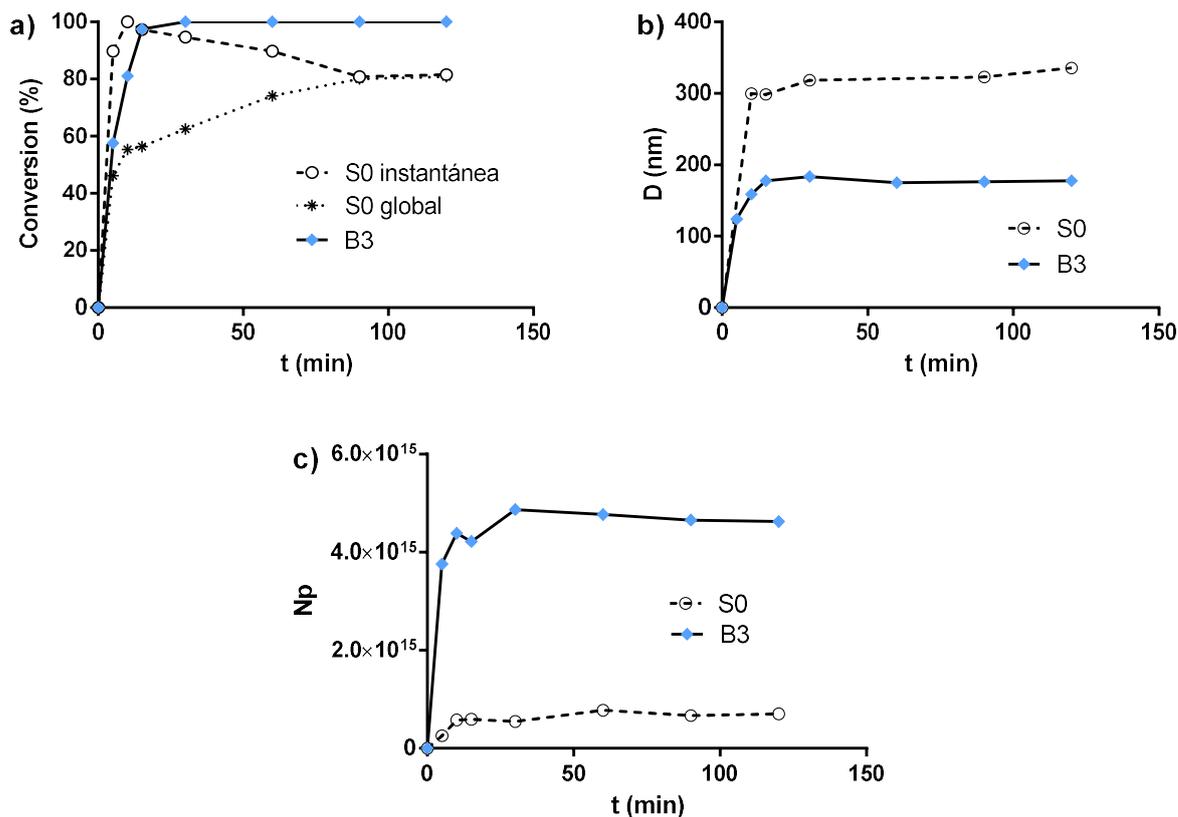


Figura 3.9. Polimerización semicontinua de VCL (S0) y su comparación con el proceso batch (B3). Evolución a lo largo de las reacciones de la conversión (a), diámetro a 55 °C (b) y número de partículas (c).

En cuanto a la respuesta térmica de los NGs (Figura 3.10), se observa que los NGs obtenidos en la polimerización semicontinua (S0) presentan un colapso progresivo a temperaturas menores a la VPTT de los NGs obtenidos en B3, exhibiendo un cambio significativo de volumen entre 30 y 40 °C. Este resultado puede asociarse con la estructura interna de los NGs. En B3, toda la VCL se cargó al mismo tiempo con el entrecruzante (BIS), mientras que en S0, solo la mitad de la VCL se cargó con toda la BIS y la otra mitad se dosificó continuamente a lo largo de la polimerización. Además, puede verse en ambas polimerizaciones el consumo completo de la BIS a los 10 min de reacción (espectros de RMN de la Figura A.2 y Figura A.3 del Anexo 1). En este escenario, se espera en B3 un entrecruzamiento más homogéneamente distribuido dentro del NG, donde las cadenas de VCL tienen una distribución angosta de pesos moleculares. Por otro lado, en la reacción S0 se esperan NGs que contienen un núcleo altamente entrecruzado de cadenas cortas de VCL, con una coraza de cadenas largas de VCL sin reticular.

Debido a que la respuesta térmica de la PVCL depende del peso molecular, una amplia distribución de pesos moleculares en los NGs puede producir una contracción progresiva al aumentar la temperatura.

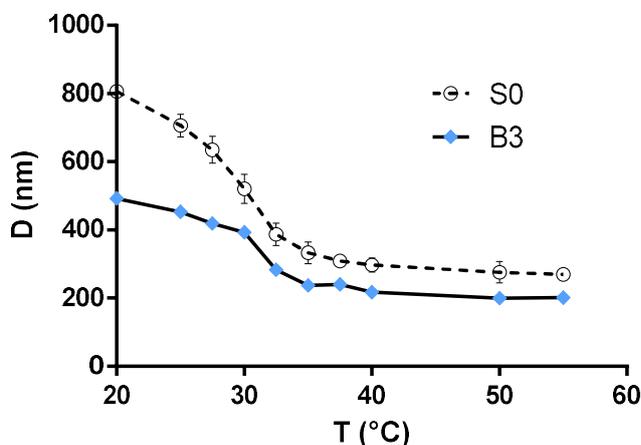


Figura 3.10. Respuesta térmica de los NGs obtenidos en S0 y su comparación con los NGs obtenidos en B3.

En Figura 3.11a-b se muestran las imágenes TEM de los NGs obtenidos en S0 y su comparación con los correspondientes a B3. En la Figura 3.11a se observa un sombreado alrededor de los NGs, que podría indicar la presencia de las cadenas poliméricas de VCL con bajo grado de entrecruzamiento que forman una coraza; mientras que en la Figura 3.11b se observa un NG con una estructura más compacta, donde el sombreado no es evidente. Sin embargo, cuando se hace una ampliación de las micrografías, también se puede observar la presencia de la coraza menos densa en los NGs de B3, aunque de manera menos clara que en los NGs de S0. La presencia de esta fase de cadenas poliméricas estaría aumentando el tamaño de los NGs en aproximadamente 175 y 120 nm en los NGs obtenidos en S0 y B3 respectivamente. Por esta razón se propone que ambos NGs poseen una estructura núcleo-coraza, siendo mayor la coraza de los NGs obtenidos en un proceso semicontinuo. En las Figuras 3.11c-d se muestran los esquemas de las morfologías propuestas para los NGs obtenidos en ambas polimerizaciones.

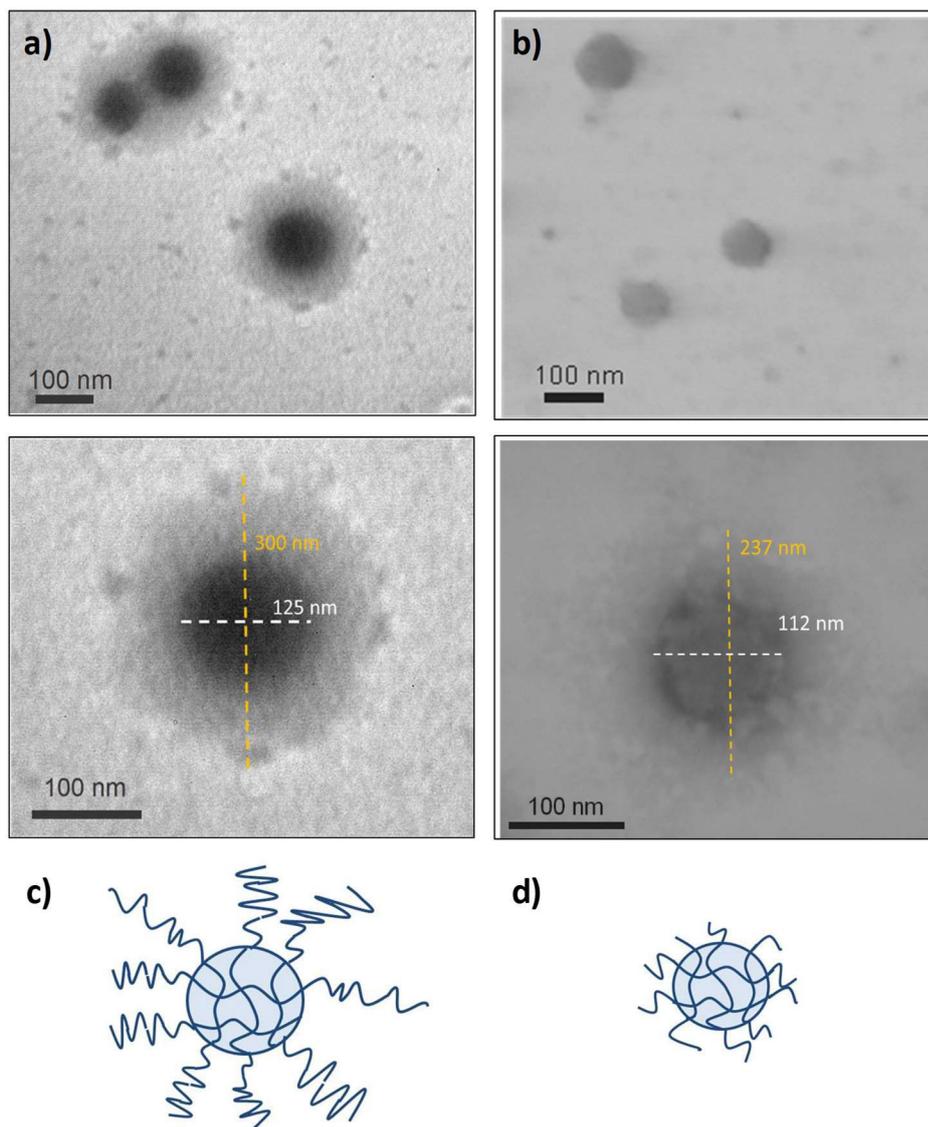


Figura 3.11. Micrografías de TEM de los NGs S0 (a) y B3 (b); y esquemas de la morfología de los NGs obtenidos en S0 (c) y B3 (d).

3.4. Síntesis semicontinua de NGs bifuncionales con diferentes contenidos de BA

Como se mencionó anteriormente, la capacidad de formar películas de una dispersión polimérica está directamente relacionada con la Tg de las partículas que lo componen. Por lo tanto, la presencia de una fase de baja Tg favorece la deformación y coalescencia de las partículas, otorgando cohesividad a la película formada.⁶⁷ En este sentido, la incorporación de BA en la síntesis, el cual genera un homopolímero de baja Tg (-56 °C), para la formación de NGs nucleo-coraza (Figura 3.1) permitiría otorgar capacidad de formación de película a la PVCL

($T_g = 147\text{ }^\circ\text{C}$). La cantidad de BA incorporado juega un papel muy importante, ya que la T_g de la fase que contiene el copolímero rico en BA depende del contenido del mismo. Por otro lado, la incorporación de BA a los NGs de PVCL podría modificar sus propiedades. En este contexto, es necesario encontrar la composición monomérica adecuada, que permita combinar las propiedades positivas de ambos polímeros en los NGs finales. Para ello se llevaron a cabo cinco reacciones en las que se incorporaron diferentes cantidades de BA. En todas las polimerizaciones se dosificó la dispersión conteniendo la VCL con un caudal constante y desde el inicio de la polimerización siguiendo el procedimiento y formulación de S0 (Tabla 3.3). De esta forma se persiguió un crecimiento controlado de los NGs, tal que permita incorporar el BA a las partículas en crecimiento.

En la Tabla 3.5 se presentan las concentraciones de los monómeros y las condiciones de dosificación empleadas en las polimerizaciones semicontinuas con diferentes contenidos de BA. La reacción S0, sin la incorporación de BA, se utilizó como referencia. En las reacciones S1 y S2, la dispersión de BA se cargó en una sola dosis (como un pulso) a los 80 min de iniciada la polimerización. En las polimerizaciones S3 y S4, la mayor cantidad de BA permitió establecer una dosificación continua para promover la copolimerización del BA y la VCL en condición de inanición. En estas reacciones la dispersión acuosa conteniendo BA 50 % y SDS (0.5 % wba) se dosificó durante 40 min con un caudal constante, a partir de los 50 min de polimerización (Figura 3.12). La dosificación de una dispersión monomérica favorece la difusión del monómero dosificado entre las fases, reduciendo el control por difusión de la polimerización.

Tabla 3.5. Polimerizaciones semicontinuas con diferentes contenidos de BA.

Código	VCL (mg/mL)	t_{VCLf} (min)	BA (% w/vcl)	$t_{Aci}-t_{Acf}$ (min)
S0	100	90	-	-
S1	50	90	5	80*
S2	100	90	20	80*
S3	100	90	50	50-90
S4	50	90	66	50-90

* dosificación en un pulso a los 80 minutos.

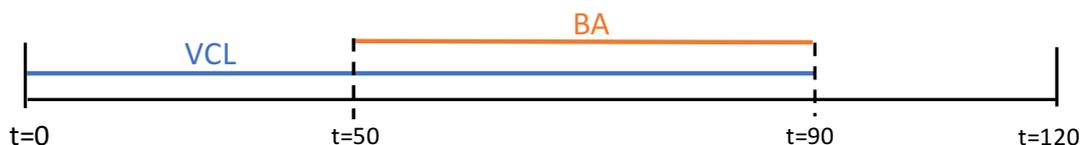


Figura 3.12. Esquema de alimentación de los monómeros empleados en las reacciones S3 y S4.

En la Tabla 3.6 se muestran algunas características de los látex obtenidos. Se puede observar que la conversión final de VCL en todos los casos fue mayor a 80 % y aumenta con la presencia de BA, debido a su mayor reactividad. En la Figura 3.13 se puede corroborar que todas las polimerizaciones semicontinuas de esta sección ocurren en una condición muy cercana a la inanición (o *starved*), donde el consumo de VCL está prácticamente gobernado por su dosificación. Además, se observa que la velocidad inicial de polimerización es prácticamente igual en todos los casos. En todas las polimerizaciones, la conversión final de BA y de BIS, de acuerdo al análisis de los espectros de H1-RMN (Figuras A1.6 – A1.9 del Anexo 1), fue de 100 %.

Se observa también, que la incorporación de BA tiene un leve efecto sobre el D de los NGs. Para las dispersiones sintetizadas con la misma concentración de VCL (S0, S2 y S3, con 100 mg/mL; y S1 y S4, con 50 mg/mL), el incremento de la cantidad de BA incorporado produce una disminución en el D de los NGs obtenidos. Este fenómeno podría deberse a la formación de partículas pequeñas independientes de los NGs, lo cual disminuye el diámetro medio medido por DLS.

Tabla 3.6. Propiedades de los látex obtenidos en S0-S4.

Reacción	Conversión VCL (%)	D (nm)	PDI
S0	81.0	335 ± 2	0.07
S1	95.4	246 ± 2	0.06
S2	93.1	317 ± 1	0.10
S3	99.9	313 ± 9	0.07
S4	98.2	206 ± 15	0.06

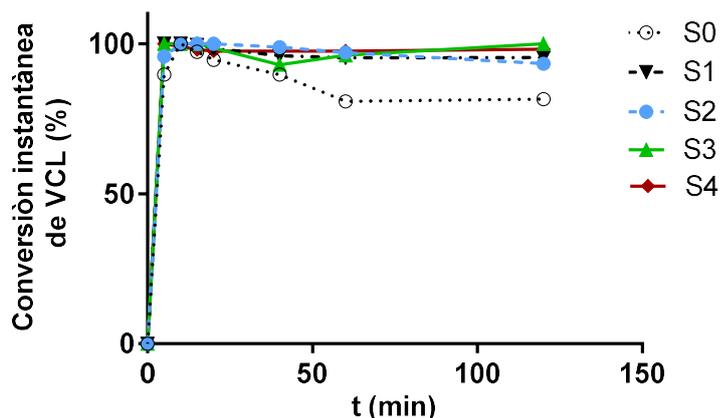


Figura 3.13. Conversión instantánea de VCL a lo largo del tiempo en las polimerizaciones S0-S4.

La Figura 3.14 muestra los resultados de DSC (la derivada de flujo de calor, dDSC) para las muestras con incorporación de BA (S1-S4). Se observan dos picos principales en sus derivadas, indicando la presencia de 2 fases poliméricas con transiciones vítreas diferentes. La transición a 200 °C corresponde a la fase de PVCL entrecruzada con BIS, mientras que la transición observada cerca de 0 °C corresponde al copolímero VCL-co-BA. Este segundo pico no se aprecia en los termogramas de los NGs producidos en S1 y S2, posiblemente porque la Tg del copolímero formado en estos látex es mucho más alta por la menor cantidad de BA, y porque su masa también es menor. En las Figuras A2.8 y A2.9 del Anexo 2 se muestran los termogramas con los valores de Tg resultantes de cada fase de dichos NGs. Se puede ver que para la muestra S3 la Tg obtenida es de -8 °C, mientras que para la muestra S4 el valor de Tg obtenido es de -1 °C. En la Figura 3.14 puede verse que, si bien el valor de Tg del copolímero en S3 es menor que el de S4, su transición es más ancha y se observa la presencia de polímeros con Tg superiores. Mientras que, el copolímero formado en S4 tiene una composición más homogénea y una mayor masa en temperaturas menores. Estos valores de Tg para el polímero rico en BA indican la formación de una segunda fase con capacidad de formación de película en ambos NGs bifuncionales.

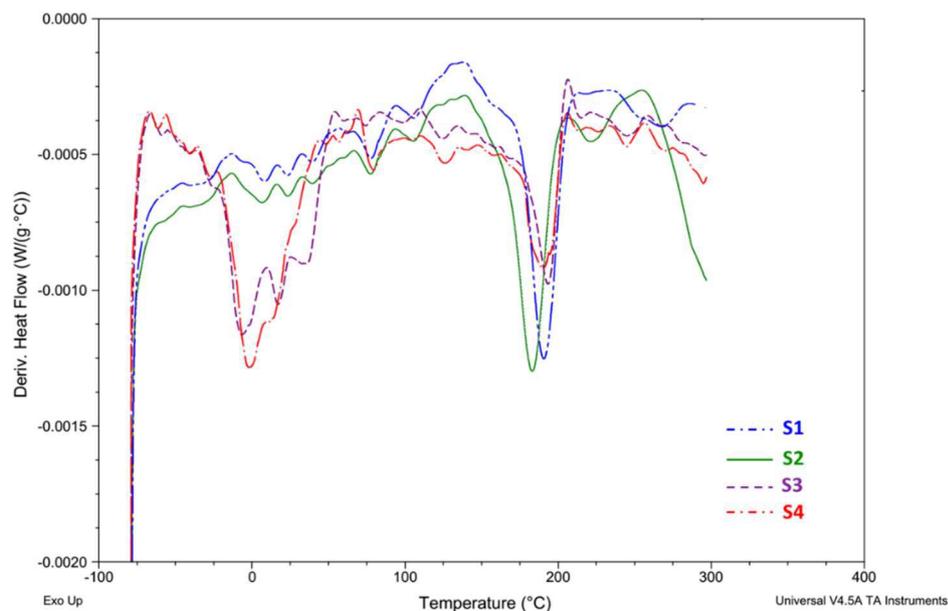


Figura 3.14. Estudio de DSC de los NGs con incorporación de BA (S1-S4).

Todos los NGs con incorporación de BA presentan sensibilidad térmica, con temperaturas de transición que se encuentran en el rango correspondiente a la LCST de la PVCL (Figura 3.15). Coincidentemente con lo observado para S0, estos NGs muestran también un colapso progresivo en el rango de las temperaturas estudiadas. En la capacidad de hinchamiento y la temperatura de transición de las dispersiones de NGs no se observa una tendencia definida con la incorporación de BA, de manera que no se puede concluir como afecta este parámetro de síntesis en dichas propiedades (Tabla 3.7). Es sabido que la incorporación de un monómero hidrofóbico en la estructura de un NG termosensible, disminuye su VPTT.¹⁴ Sin embargo, no se observa este comportamiento en la VPTT de los látex S0-S4. Esto puede deberse a que la incorporación de BA se realiza después de la formación del núcleo de VCL entrecruzada con BIS, y este monómero forma una fase separada de la matriz polimérica con respuesta térmica, como se demostró por DSC. De todas maneras, como se discutirá a continuación, la morfología no esférica de las partículas introduce incertidumbre en la determinación del D de partícula medido por DLS, de manera que los valores de VPTT obtenidos a partir de las curvas de DLS de los NGs bifuncionales pueden estar sujetos a este error.

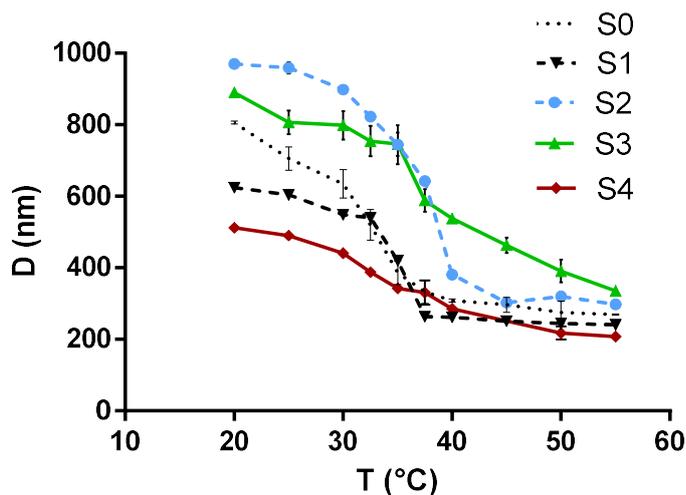


Figura 3.15. Diámetro de los NGs S0-S4 en función de la temperatura.

Tabla 3.7. Capacidad de hinchamiento y VPTT de los NGs S0-S4.

Reacción	Capacidad de hinchamiento	VPTT (°C)
S0	2582	28.5
S1	1743	33.4
S2	3457	34.0
S3	1869	32.5
S4	1497	31.0

En la Figura 3.16 se muestran imágenes de TEM de los NGs S3 y S4. Las muestras se tiñeron con una solución acuosa de acetato de uranilo, para lograr una tinción negativa. En las micrografías de TEM se observan partículas con morfología lobular compuesta por dos fases, una clara y otra más oscura, resultantes del proceso de tinción. La fase formada por PVCL entrecruzada es capaz de hincharse con la solución de acetato de uranilo y por lo tanto el agente de tinción retenido en esta estructura le otorga un color más oscuro, mientras que la fase del copolímero rico en BA no se hincha en la solución y el uranilo simplemente es adsorbido en su superficie. Tanto las partículas S3 como S4 presentan dos fases: un núcleo que corresponde a la fase formada al inicio de la polimerización, compuesta de PVCL entrecruzada con BIS con capacidad de alojar soluciones acuosas; y otra fase formada por el copolímero poli(VCL-co-BA) con baja Tg, que origina los lóbulos (coraza) sin capacidad de hinchamiento.

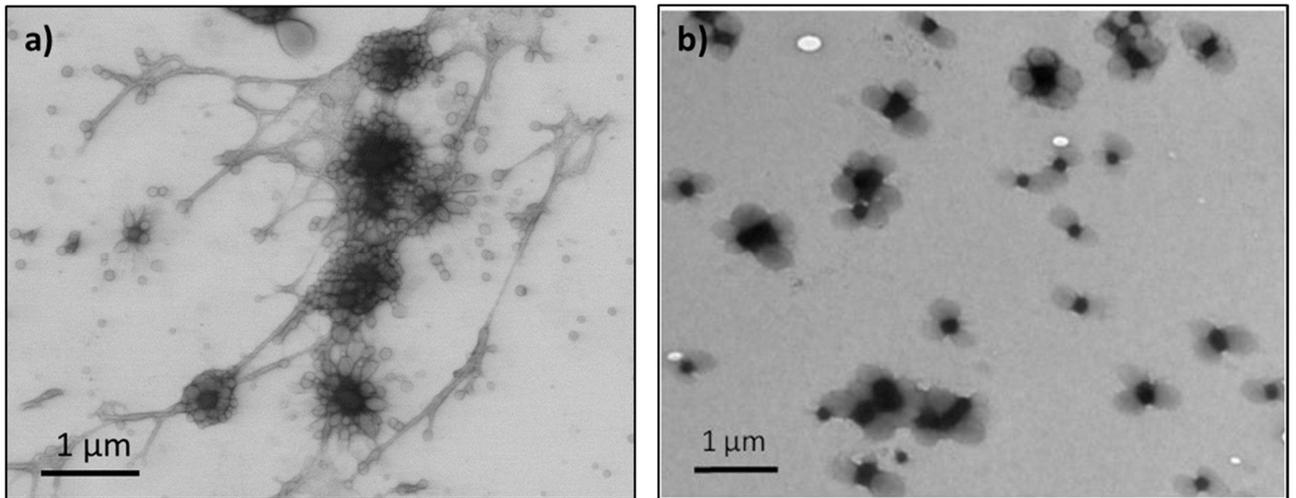


Figura 3.16. Morfología observada por TEM de los NGs obtenidos en S3 (a) y S4 (b).

La Figura 3.17 muestra una imagen de fase de AFM de los NGs deshidratados obtenidos en S3. En ella se puede apreciar la diferencia del comportamiento viscoelástico de las dos fases presentes en los NGs. Se observan partículas irregulares, con un núcleo de color más claro, indicativo de un material más duro (PVCL entrecruzada de T_g 195 °C), y una coraza compuesta por lóbulos (en color más oscuro) de un material blando y más viscoso (copolímero poli(VCL-co-BA) de T_g -8 °C). También se observan partículas blandas aisladas de tamaño más pequeño que los NGs. Esta imagen permitió aportar una evidencia adicional del ordenamiento de las fases en los NGs bifuncionales en función de su comportamiento viscoelástico, que coincide con los resultados observados por DSC y TEM.

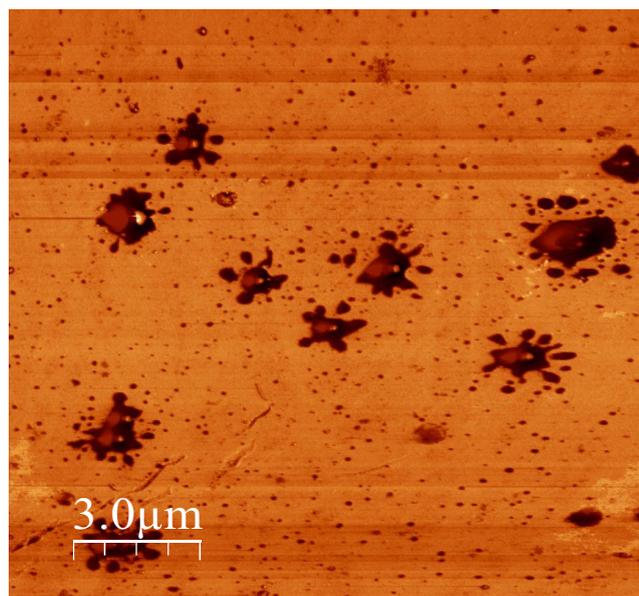


Figura 3.17. Imagen de fase de AFM de los NGs obtenidos en S3.

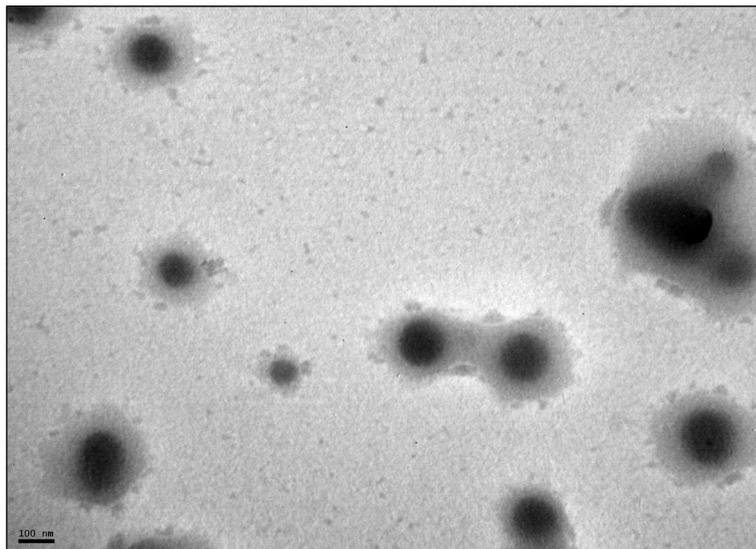
3.4.1. Estudio del mecanismo de formación de la morfología lobular

Generalmente, las partículas de látex homogéneas y heterogéneas producidas mediante polimerización en emulsión convencional son de naturaleza esférica. Esto incluye a partículas obtenidas por polimerizaciones discontinuas y semicontinuas, por emulsión y miniemulsión. Sin embargo, las partículas de los látex producidos en este Capítulo son de naturaleza no esféricas y presentan una morfología multi-lobular. La presencia de esta morfología impulsó una serie de experimentos que permitan la comprensión del mecanismo de producción de partículas multilobulares mediante un proceso de polimerización en emulsión estándar.

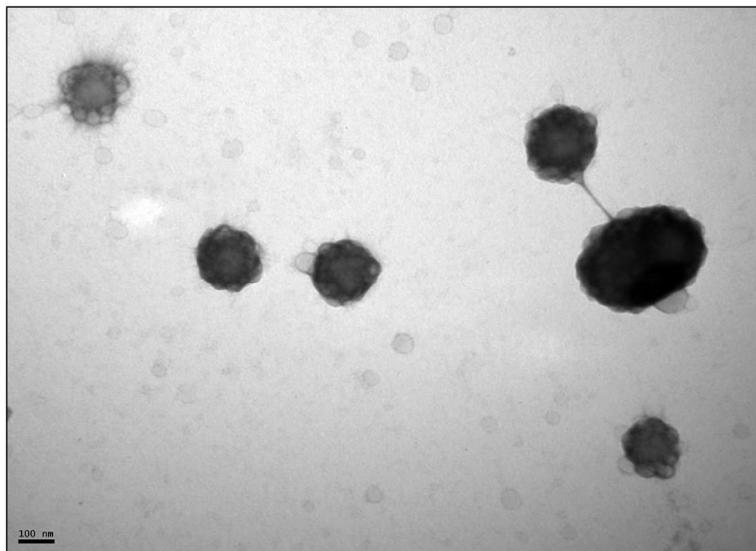
En primer lugar, se analizaron por TEM muestras extraídas de la polimerización S4 en diferentes etapas de la reacción (Figura 3.18). La primera muestra, tomada a los 50 min, corresponde al momento antes de iniciar la dosificación de BA. Hasta ese tiempo la reacción ocurre como una polimerización semicontinua de VCL. Se puede notar que se han formado NGs de PVCL entrecruzada con BIS, con una morfología que concuerda con la observada en la imagen de TEM de la reacción S0 (Figura 3.11a). En la muestra correspondiente a los 70 min de reacción, luego de 20 min iniciada la dosificación de BA (y manteniendo la dosificación de VCL), se puede observar la formación de pequeñas partículas compactas en la superficie de los NGs que no son teñidos por el acetato de uranilo debido a que poseen baja o nula capacidad de hinchamiento. Al final de la polimerización (120 min) se observa que los NGs presentan una coraza formada de lóbulos compactos (sin tinción) de mayor tamaño y en menor número que los detectados a los 70 min.

Del análisis de la evolución de la morfología se propone el siguiente mecanismo de formación de los NGs lobulares. En la Figura 3.19 se presenta un diagrama de alimentación de los monómeros junto con un esquema de las morfologías observadas por TEM para cada tiempo de reacción. En primer lugar, vale destacar que la morfología de equilibrio del sistema ubica a la fase rica en PBA en el interior de la partícula, rodeada por la fase de PVCL la cual tiene más afinidad con el agua y por lo tanto disminuye la energía interfacial partícula-agua. La diferencia

t=50 min



t=70 min



t=120 min

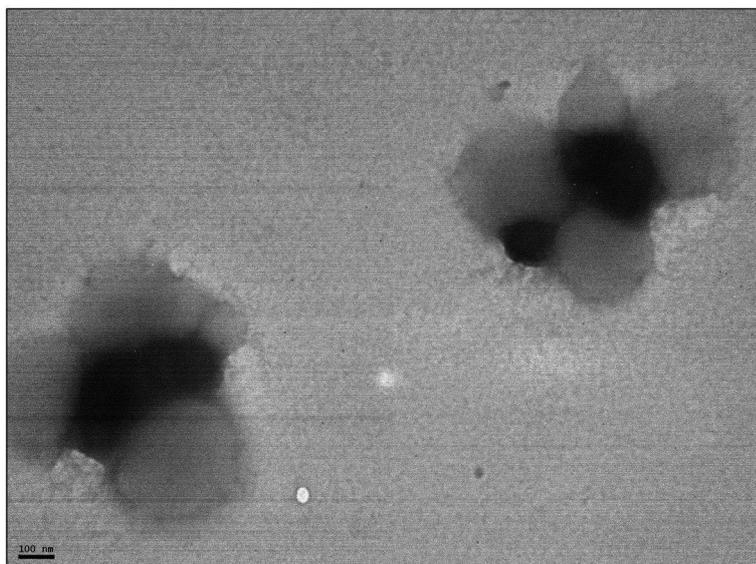


Figura 3.18. Micrografía de TEM de muestras extraídas a lo largo de la polimerización S4.

entre esta morfología y la observada por TEM se debe a las condiciones de reacción y las propiedades de los polímeros que las componen. La formación de las distintas fases de los NGs ocurre en dos etapas. En la primera etapa, que abarca desde el inicio de la reacción hasta los 50 min, en el sistema solo están disponibles la VCL y la BIS, dando lugar a la formación del núcleo compuesto por PVCL entrecruzada. La sombra de menor densidad presente alrededor de los NGs se interpretó como polímero lineal o con menor grado de entrecruzamiento que el centro (Figura 3.19a), y responde a la misma estructura observada en los NGs obtenidos en la polimerización S0. Esta fase posee una Tg cercana a 200 °C (mucho mayor que la temperatura de reacción, 70 °C) y además como la PVCL se encuentra insoluble durante la polimerización (VPTT = 31 °C), forma una partícula compacta. A su vez la elevada conversión de VCL a lo largo de la polimerización (Figura 3.13) indica prácticamente ausencia de monómero sin reaccionar que pueda plastificar esta fase y disminuir así su Tg.

En la segunda etapa de la polimerización, luego de los 50 min, se comienza a dosificar la dispersión de BA simultáneamente con la de VCL. El copolímero formado por estos monómeros es insoluble, debido a la insolubilidad de la PVCL a 70 °C y a la hidrofobicidad del PBA. Por lo tanto, a medida que los oligoradicales se forman tienden a migrar hacia las partículas de PVCL entrecruzada ya formadas, las cuales son hidrofóbicas a 70 °C (temperatura de polimerización). Debido a la alta densidad de las partículas formadas en la primera etapa, los oligoradicales no son capaces de penetrar en la partícula, quedándose principalmente en su superficie. De esta forma se genera un perfil de concentración de radicales dentro de la partícula como se muestra en la Figura 3.20. Estos radicales crecen en la superficie de la fase de PVCL entrecruzada formando pequeños lóbulos (Figura 3.19b), los cuales coalescen a medida que crecen de tamaño, de manera que al final de la polimerización se aprecia una reducción del número de lóbulos y un aumento de su tamaño (Figura 3.19c). En lugar de formar una coraza continua, la creación de estos lóbulos ocurre porque la temperatura de reacción es superior a la Tg del polímero en formación (copolímero poli(VCL-co-BA)) y por lo tanto, este tiene la movilidad

molecular para desplazarse de manera de exponer parcialmente la fase de PVCL al medio (agua); la cual es más hidrofílica y contribuye a estabilizar a la partícula entera.

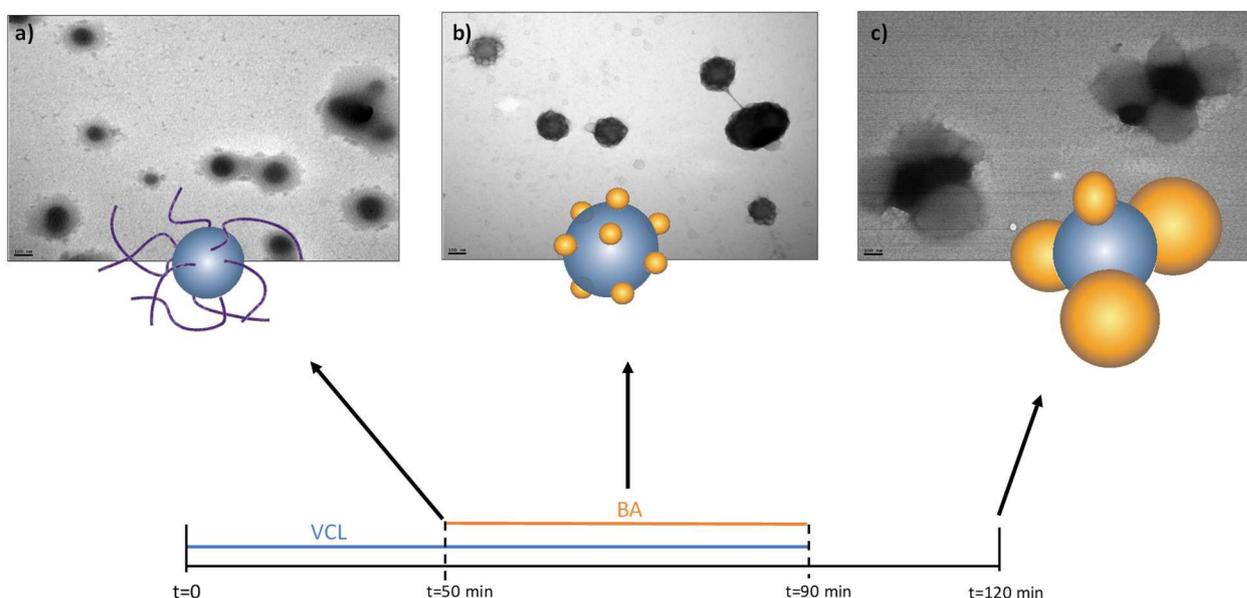


Figura 3.19. Esquema de la evolución de la morfología de las partículas a lo largo de la polimerización S4.

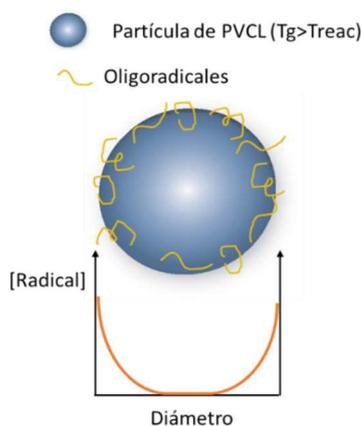


Figura 3.20. Distribución de la concentración de oligoradicales dentro de la partícula en crecimiento.

Este mecanismo de formación de partículas concuerda con las evidencias encontradas por Blenner y col.⁹⁷ en polimerizaciones sembradas utilizando partículas de metacrilato de metilo y acrilato de metilo como siembra, y estireno y metacrilato de hexilo para la segunda fase. En este artículo los autores estudian la morfología obtenida al emplear polímeros con diferentes valores de Tg tanto para la siembra como para la segunda fase, y proponen el diagrama de fases expuesto en la Figura 3.21. Este diagrama muestra las morfologías resultantes en función de la

diferencia entre la T_g del polímero de la siembra ($T_{g, \text{seeded}}$) y la temperatura de reacción ($T_{\text{reacción}}$) en el eje de las ordenadas y de la diferencia entre la T_g del polímero de la segunda fase ($T_{g, \text{second stage}}$) y la temperatura de reacción en el eje de las abscisas. Dentro de este diagrama, el sistema empleado en las reacciones de este Capítulo se encuentra ubicado en el cuadrante superior izquierdo ($T_{g, \text{seed}} - T_{\text{reacción}} = 130 \text{ }^\circ\text{C}$, $T_{g, \text{second stage}} - T_{\text{reacción}} = -78 \text{ }^\circ\text{C}$), donde la T_g del núcleo es mayor que la temperatura de reacción y la del polímero de la segunda fase es menor. Se puede ver que en este cuadrante la morfología de las partículas es lobular y coincide con lo observado por TEM.

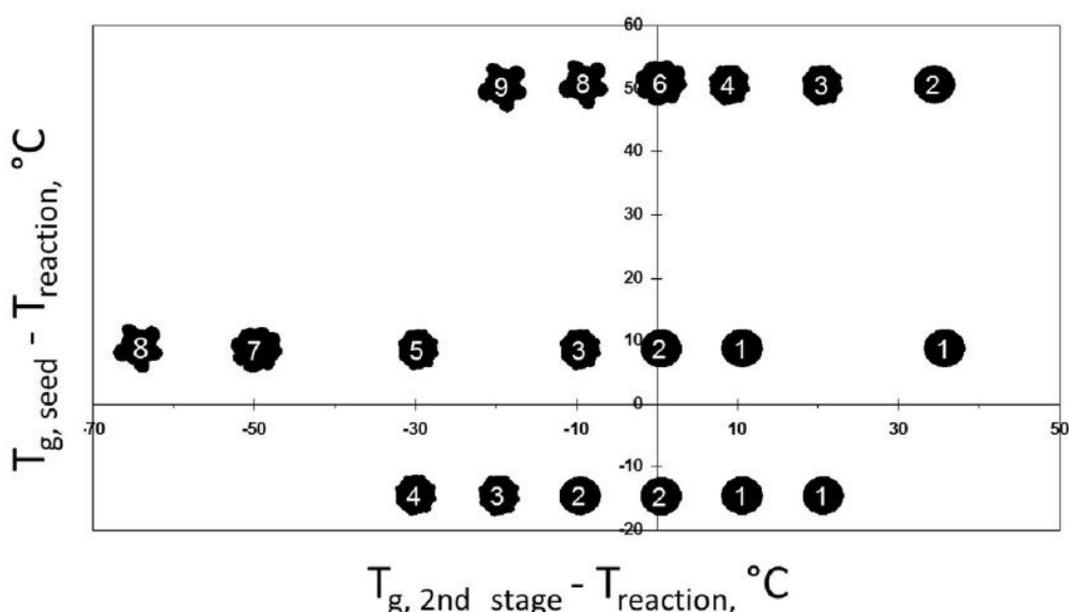


Figura 3.21. Diagrama de morfologías (extraído del artículo de Blenner y col⁹⁷).

3.4.2. Estudio por CHDF de los NGs bifuncionales

Para una mejor comprensión del sistema, se realizaron dos polimerizaciones que permitan obtener las dos fases presentes en las partículas del látex S4 de forma separada. Primero se sintetizaron las partículas del núcleo (hasta los 50 minutos); esta reacción se denominó S4F1. En una segunda polimerización se sintetizaron las partículas de copolímero que constituyen la segunda fase (siguiendo el perfil de alimentación de S4 desde 50 min hasta 120 min), reacción que se denominó S4F2. En la Figura 3.22 se muestran las distribuciones de tamaños de partículas en volumen obtenidas por CHDF para ambas reacciones a 20 y a 35 °C

(temperatura mayor que permitió emplear el equipo, de manera que la PVCL esté insoluble). A 20 °C la PVCL se encuentra soluble en agua y por lo tanto la fase de PVCL entrecruzada se encuentra hinchada, mientras que a 35 °C el sistema está por encima de su LCST y por lo tanto las partículas de PVCL entrecruzadas se encuentran colapsadas. Se puede observar que las partículas obtenidas en S4F1 corresponden a NGs de PVCL que tienen un tamaño medio de 210 nm a 20 °C y de 50 nm a 35 °C. En cambio, las partículas obtenidas en S4F2 poseen un tamaño medio de aproximadamente 50 nm en ambas temperaturas. Estos resultados demuestran que la única fase que tiene respuesta térmica en los NGs formados en S4 es el núcleo (que se ve más oscuro en la Figura 3.16b) que está compuesto por PVCL entrecruzada con BIS, mientras que los lóbulos del copolímero que se encuentran formando la coraza no poseen sensibilidad térmica.

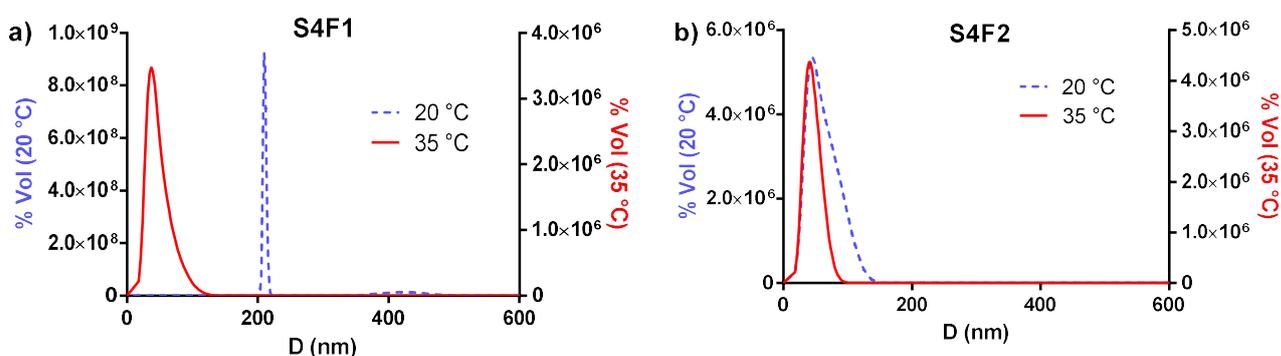


Figura 3.22. Distribución en volumen obtenida mediante CHDF para los látex S4F1 (a) y S4F2 (b).

Finalmente, teniendo en cuenta lo observado en el análisis de CHDF de las partículas formadas en las distintas etapas de la polimerización S4, se estudiaron las distribuciones de tamaños en volumen obtenidas por CHDF de los NGs S3 y S4. La Figura 3.23 muestra las distribuciones de tamaños de partícula en volumen a 20 y a 35 °C para estos NGs. La distribución para S3 a 20 °C muestra la presencia de cuatro poblaciones de partículas, dos de tamaños pequeños de 50 y 210 nm y dos de tamaños mayores de 700 y 900 nm. Cuando se cambia la temperatura a 35 °C, la única población que aparece invariable es la del pico a 50 nm, mientras que las otras tres se desplazan hacia diámetros menores. Esto indica que las partículas pertenecientes a la población de 50 nm son partículas que carecen de sensibilidad térmica, y corresponderían a partículas de poli(VCL-co-BA). Las demás poblaciones de partículas

presentan distintos diámetros a temperaturas por encima y por debajo de la LCST de la PVCL. Por lo tanto, se trata de partículas que poseen una fase de PVCL entrecruzada. Estos resultados concuerdan con lo observado en la imagen de TEM de la muestra S3 (Figura 3.16a), donde se observa una gran población de partículas de copolímero, partículas pequeñas con las dos fases presentes y partículas grandes, del rango de 700 y 900 nm con un núcleo de PVCL y una coraza de partículas de copolímero formando lóbulos.

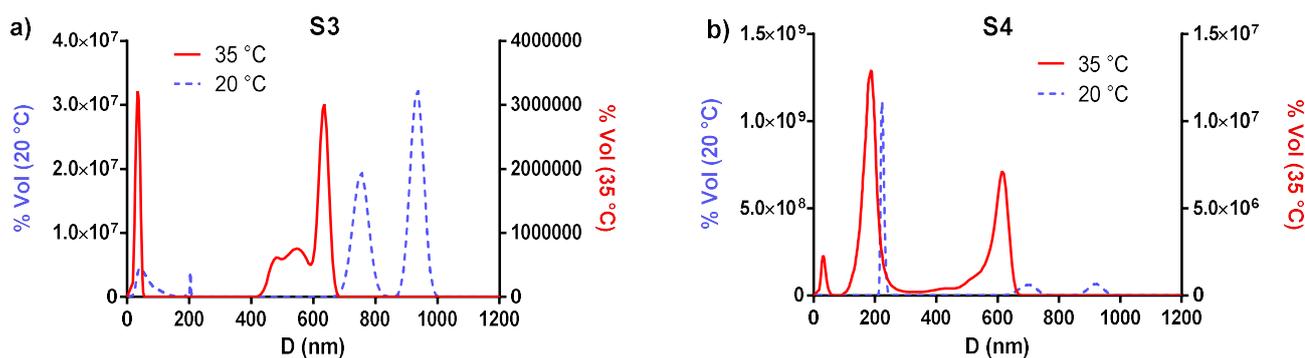


Figura 3.23. Distribución en volumen obtenidas mediante CHDF para los látex S3 (a) y S4 (b).

Por otro lado, la distribución de diámetros del látex S4 presenta a 20 °C tres poblaciones de partículas, a 210, 700 y 900 nm, que a 35 °C se desplazan hacia diámetros menores, indicando que tienen sensibilidad térmica. Esto demuestra que la mayoría de las partículas formadas presentan una fase de PVCL entrecruzada, resultado que coincide con lo observado por TEM (Figura 3.16b) donde no se observan partículas de copolímero de poli(VCL-co-BA) individuales.

De estos resultados se puede inferir que los látex S3 y S4 contienen dos poblaciones de partículas con sensibilidad térmica con diámetros medios de 700 y 900 nm a temperatura ambiente, las cuales corresponden a los NGs bifuncionales observados por TEM. Ambos látex poseen también partículas de menor tamaño. El látex S3 presenta una población con partículas de copolímero de VCL y BA (con tamaño y comportamiento similar al de las partículas del látex S4F2) y otra con NGs bifuncionales de mayor tamaño que presentan respuesta térmica correspondiente a la presencia de una fase de PVCL. Por otro lado, el látex S4 presenta 3

poblaciones de NGs con respuesta térmica, relacionadas a la formación de partículas que contienen una fase de PVCL.

3.4.2. Propiedades de las películas obtenidas a partir de los NGs bifuncionales con diferente contenido de BA

A partir de los látex obtenidos se formaron películas secando el látex en moldes de silicona a temperatura ambiente durante 7 días. El espesor de las películas fue en todos los casos alrededor de 1 mm. La MFFT de los látex conteniendo los NGs bifuncionales fue menor a 7 °C (la temperatura mínima medida) en todos los casos. Este resultado indica que la dispersión de los NGs tiene capacidad de formar película por encima de 7 °C, pudiéndose aplicar sobre la superficie que tenga una temperatura superior a este valor.

En la Figura 3.24 se muestran fotos de los films obtenidos a partir de un látex de PBA puro, los NGs bifuncionales S3 y los NGs de PVCL B3. Cabe destacar que el color de las películas de PBA y S3 se debe a que se agregó hidroquinona al látex una vez finalizada la polimerización. Esta práctica fue realizada en los látex S1, S2 y S3, pero no se realizó con los látex obtenidos posteriormente. Por este motivo se notaron diferencias de color en los látex, los cuales son de color blanco si no se incorpora hidroquinona. La película de los NGs de PVCL (B3) es muy frágil, debido a la alta T_g de la PVCL entrecruzada con BIS, y en consecuencia no pudieron cortarse probetas para su ensayo. En la Tabla 3.8 se muestran los valores de algunas propiedades mecánicas de los films PBA y S3. La T_g del PBA de -54 °C permite la obtención de una película muy flexible, con muy baja dureza y alta capacidad de elongación. La película S3 muestra un comportamiento intermedio entre las películas de NGs de PVCL y del látex de PBA, con una dureza, módulo de Young y resistencia tensil considerablemente mayor al film de PBA, y una menor capacidad de elongación. Aun así, la película S3 tiene la capacidad de deformarse hasta superar el 100 % su longitud inicial, frente a la alta fragilidad de la película pura de PVCL, lo que indica una excelente sinergia en la incorporación compatibilizada de BA a los NGs bifuncionales.

Tabla 3.8. Propiedades mecánicas de las películas de PBA y S3.

	PBA	S3
Módulo de Young (MPa)	0.13	115.5
Resistencia Tensil (MPa)	0.14	8.9
Elongación a la rotura (%)	800.00	122.8
Dureza (N)	2.40	59.6



Figura 3.24. Foto de las películas de PBA, S3 y B3.

Los látex S1 y S2, con relaciones BA/VCL menores a 50 % formaron películas quebradizas, muy frágiles y que se disuelven al poco tiempo de su inmersión en agua (Figura 3.25a y 3.25b). Este resultado es producto de la falta de una fase con una masa considerable y una Tg lo suficientemente baja que permita la interdifusión entre las partículas. En cambio, los NGs S4 forman un film con propiedades aparentes similares al S3 y resiste la inmersión en agua, gracias a que la fase de baja Tg observada en la Figura 3.14 permitió la formación de películas resistentes al agua y no quebradizas.

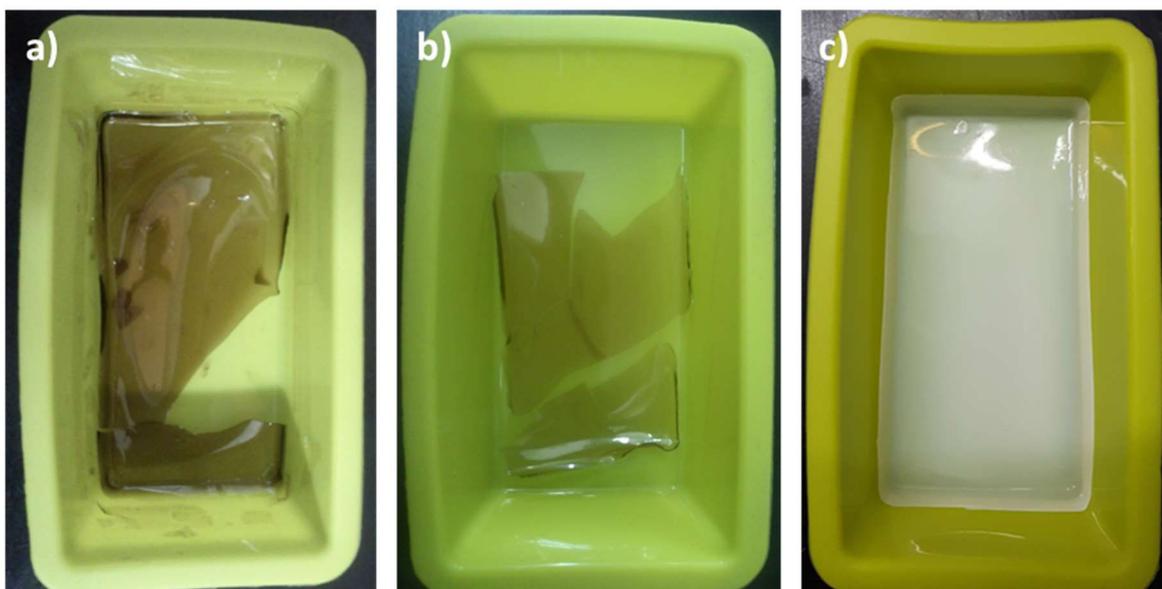


Figura 3.25. Fotos de los films obtenidos con los látex S1 (a), S2 (b) y S4 (c).

En la Figura 3.26 se muestran las imágenes de topografía y fase de AFM de las superficies de las películas obtenidos a partir de los látex S1-S4. De las imágenes de topografía se observa que a medida que se aumenta el contenido de BA en los NGs, los films obtenidos presentan una superficie más lisa y homogénea, indicando una mejor coalescencia entre las partículas. Este resultado concuerda con los valores de rugosidad medidos sobre la superficie (RMS), presentados en la Tabla 3.9. En las imágenes de fase, se observa la diferencia en el comportamiento viscoelástico de las fases del material. Mientras que en S1 y S2 se pueden observar claramente partículas coalescidas que tienen mayor dureza en el centro, en S3 y S4 se observa una superficie mas lisa y compuesta por un material blando con la aparición de dominios tanto duros como blandos. Se resalta que los dominios oscuros del film S3 son de menor tamaño que los del film S4, lo que indica la presencia de zonas blandas de menor tamaño. Esto concuerda con los tamaños observados por TEM para los lóbulos de poli(VCL-co-BA) en los NGs S3 y S4 (Figura 3.16).

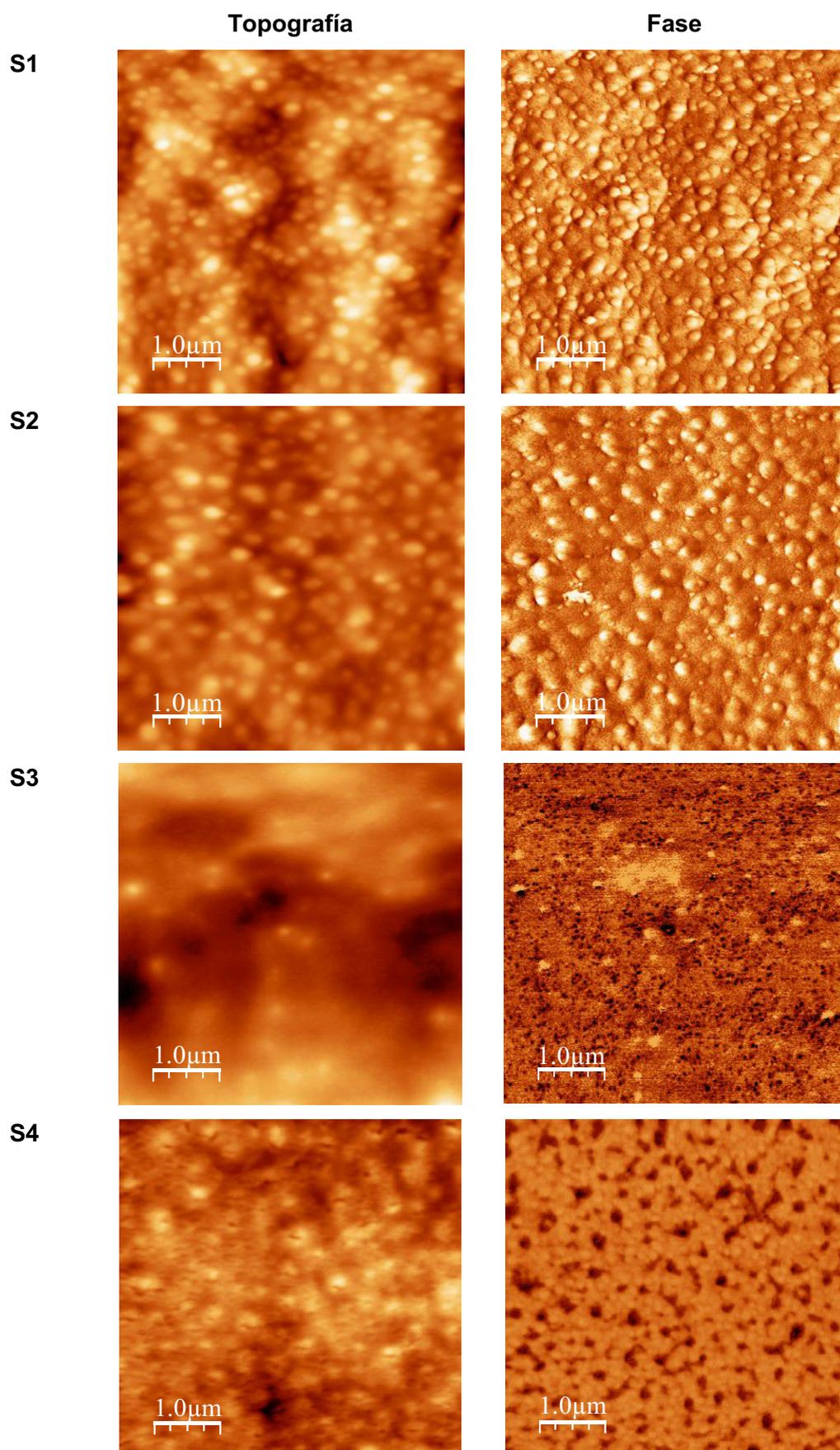


Figura 3.26. Imágenes de topografía y fase obtenidas por AFM de las películas formadas a partir de los látex obtenidos en S1-S4.

Tabla 3.9. Rugosidad de los films S1-S4.

	RMS (nm)
S1	17.8 ± 1.5
S2	11.5 ± 0.8
S3	8.5 ± 0.9
S4	4.4 ± 0.7

En la Figura 3.27 se muestra una micrografía de TEM correspondiente a un corte transversal de la película S3 teñida con acetato de uranilo. Si bien la superficie de la película S3 presenta una fase homogénea rica en el copolímero de baja Tg, su interior presenta una distribución de fases, donde la morfología de los NGs bifuncionales permanece prácticamente intacta. En ella se puede ver la presencia de las fases de los NGs con la misma distribución: núcleos de PVCL entrecruzados que se tiñen con el acetato de uranilo rodeados por partículas lobulares de poli(VCL-co-BA) de color más claro. Esta imagen demuestra que la coalescencia de los NGs bifuncionales en el interior de la película es a partir de los lóbulos de poli(VCL-co-BA) de baja Tg.

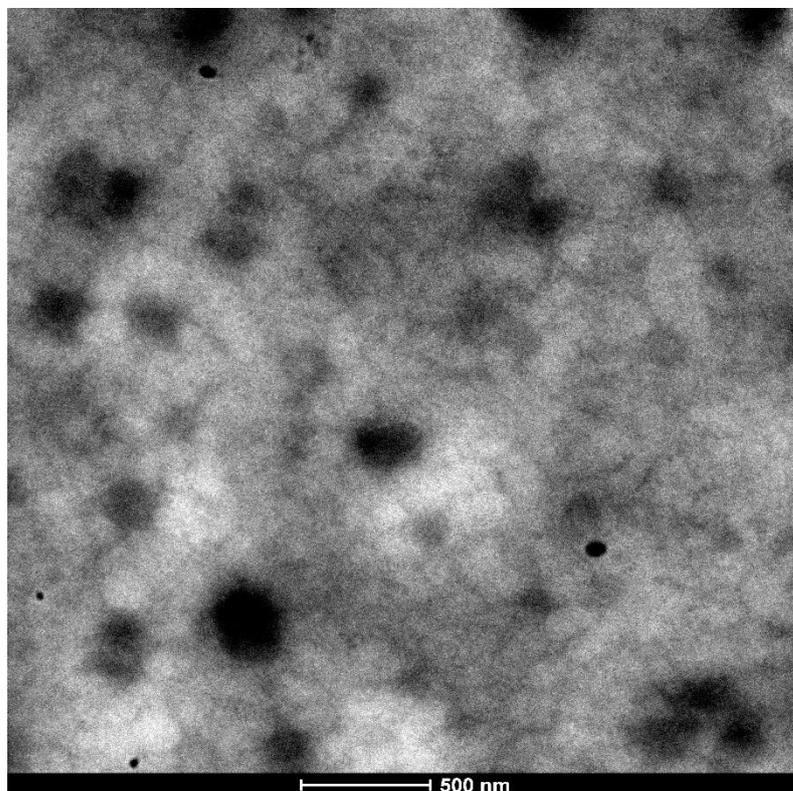


Figura 3.27. Micrografía de TEM de un corte transversal de la película S3.

La Figura 3.28 muestra los resultados del estudio de resistencia al agua para las películas S3 y S4. En ella puede verse que tanto la cinética de hinchamiento como la cantidad de agua absorbida es la misma para ambas películas. El ensayo se realizó por 24 hs y la masa perdida en ese tiempo fue 13.5 % (± 0.0 %) y 13.5 (± 0.2 %) para S3 y S4, respectivamente. Estos resultados muestran que no hay diferencia en la capacidad de absorción y resistencia al agua cuando se emplean relaciones de BA/VCL de 50 y 66 %, posiblemente porque la capacidad de absorber agua está gobernada por la presencia de la fase de PVCL, la cual tiene la misma estructura en ambas películas.

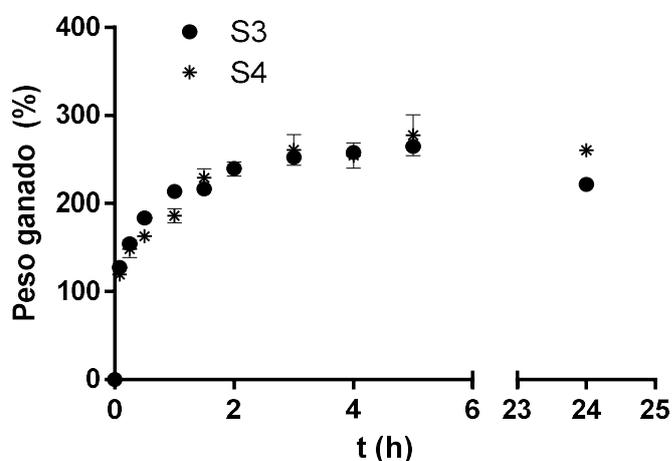


Figura 3.28. Absorción de agua de los films obtenidos en S3 y S4.

En la Figura 3.29 se puede apreciar visualmente el cambio volumétrico que se genera en los NGs y en la película formada a partir de ellos cuando son sometidos a una temperatura por debajo de la VPTT (20 °C), donde la PVCL se encuentra soluble y por lo tanto los NGs se encuentran hinchados, y a una temperatura por encima de la VPTT (55 °C), donde la PVCL se encuentra insoluble y los NGs sufren un colapso. Esta transición en la dispersión de NGs se puede observar como un cambio en la turbidez de la muestra: los NGs colapsados presentan una diferencia mayor en el índice de refracción con respecto al agua en comparación con los NGs hinchados, y como resultado la dispersión es más turbia a alta temperatura. En el caso de la película se observa una contracción de aproximadamente un tercio en el diámetro de la muestra.

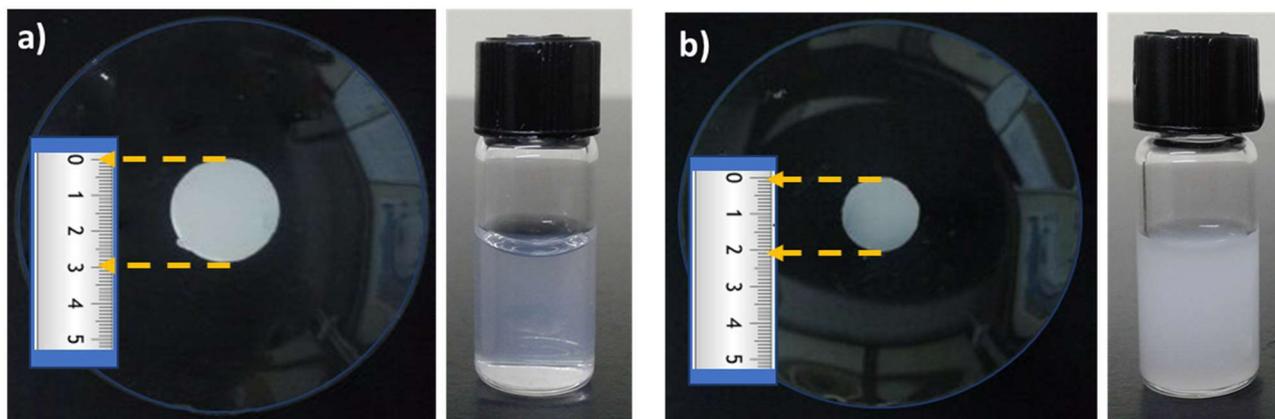


Figura 3.29. Imágenes de la película y de una dispersión de los NGs S3 a 20 °C (a) y a 55 °C (b).

Para poder comparar la respuesta térmica de los films con la de los respectivos NGs en dispersión, se empleó el factor de hinchamiento (\emptyset), en peso para los films, y volumétrico para los NGs. La VPTT se definió como la temperatura a la cual $\emptyset_i(T) = 0.5$.

En la Figura 3.30 se comparan la respuesta térmica de los NGs bifuncionales y sus respectivas películas en términos de $\emptyset_i(T)$, de los dos sistemas que resistieron la inmersión en agua, S3 y S4. Se puede observar que los NGs bifuncionales permiten obtener películas que conservan la respuesta térmica, aunque con una considerable reducción de la capacidad de hinchamiento (Tabla 3.10). Su capacidad de hinchamiento se redujo de valores superiores a 1000 % para los NGs bifuncionales a valores de alrededor a 200 % para las películas. Obviamente la coalescencia de los NGs a través de sus lóbulos de la coraza (Figura 3.27) restringe la capacidad de hinchamiento de la fase de PVCL entrecruzada. Además, la VPTT de los NGs S3 no sufren modificación al coalescer para formar la película, mientras que en los NGs S4 el film tiene una VPTT levemente mayor que los NGs en dispersión. Este resultado puede deberse a una inercia de colapso mayor en los NGs coalescidos en el film.

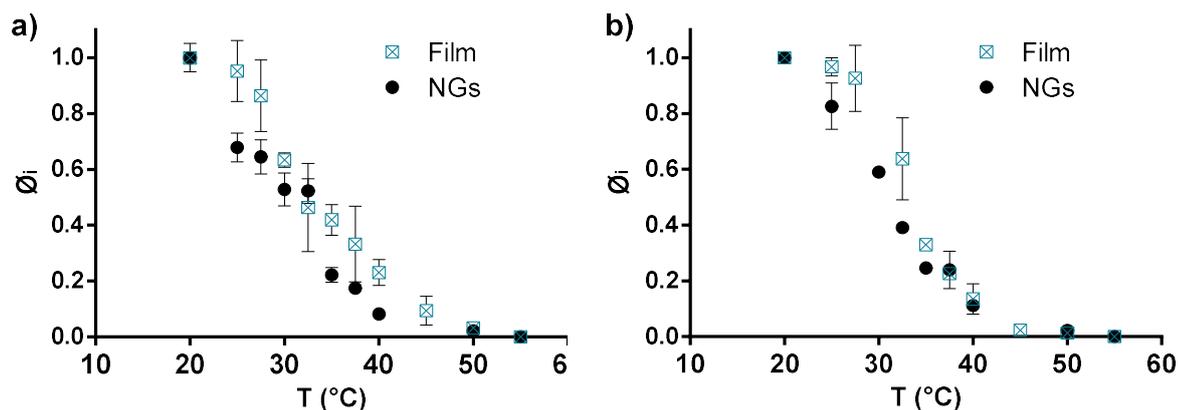


Figura 3.30. Respuesta térmica de los NGs y de las películas S3 (a) y S4 (b).

Tabla 3.10. VPTT y capacidad de hinchamiento de los NGs y de las películas S3 y S4.

	S3		S4	
	NGs	Film	NGs	Film
VPTT (°C)	32.5	32.0	31.0	33.5
Capacidad de hinchamiento (%)	1869	214	1497	189

3.5. Síntesis semicontinua de NGs bifuncionales obtenidos con diferentes velocidades de dosificación

En esta sección del Capítulo se estudia la influencia de la velocidad de dosificación de los comonómeros en la estructura y propiedades de los NGs bifuncionales. Debido a la diferencia de reactividades entre la VCL y el BA, se espera que a medida que se disminuyen los caudales de dosificación de ambos monómeros, se pueda ejercer un mayor control sobre la velocidad de propagación, logrando el control estricto de la composición del copolímero. El cambio en las velocidades de dosificación puede influir en la estructura y el tamaño tanto de las partículas de PVCL entrecruzada con BIS, como en las partículas lobulares de la coraza compuesta por poli(VCL-co-BA). Estos cambios pueden alterar las propiedades de los NGs bifuncionales y de las películas obtenidas a partir de ellos. Con la motivación de estudiar el efecto de la velocidad de dosificación de los monómeros en dichas propiedades se realizaron tres polimerizaciones semicontinuas empleando la misma formulación (VCL = 100 mg/mL y BA= 66 % w/vcl) con

diferentes caudales de dosificación. En la Tabla 3.11 se muestran las condiciones utilizadas en cada polimerización, y para una mejor comprensión en la Figura 3.31 se muestran los esquemas de alimentación de los monómeros.

Tabla 3.11. Condiciones de polimerización de las reacciones S4, S5 y S6.

Código	VCL (mg/mL)	t_{VCLf} (min)	t_{Aci} (min)	t_{Acf} (min)	Tiempo polim. (min)
S4	50	90	50	90	120
S5	50	180	100	180	210
S6	50	360	200	360	390

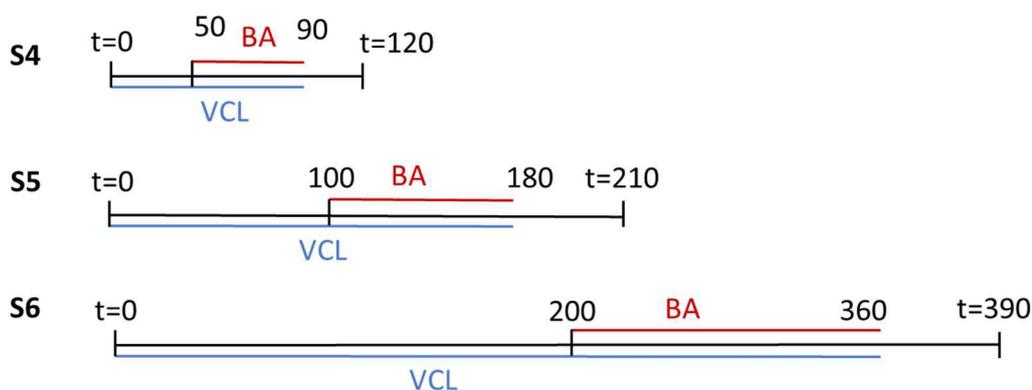


Figura 3.31. Esquema de dosificaciones de los monómeros para las reacciones S4-S6.

En la Figura 3.32 se muestran los resultados de la evolución de la conversión de la VCL a lo largo de las tres polimerizaciones estudiadas en esta sección del Capítulo. En las tres reacciones se puede observar la condición muy cercana a la inanición, ya que la conversión instantánea de VCL se mantiene cercana al 100% a lo largo de toda la polimerización. La conversión global de VCL comienza con un valor de 50 % debido a que la carga inicial de VCL corresponde al 50 % del total de la receta de polimerización. El valor de la conversión global aumenta progresivamente con la dosificación continua de VCL, que se consume instantáneamente. Este efecto puede comprobarse comparando las gráficas de conversión global en las diferentes reacciones. Por ejemplo, si vemos la conversión a 60 min en la polimerización S4, el valor de conversión global es 81 %, mientras que en S5 es 66 % y en S6 55 %. Esta diferencia se debe a que se emplean velocidades de dosificación de VCL distintas en

cada reacción. A partir de los datos de caudales de alimentación, se puede ver que a los 60 min en S4 se dosificó 70 g de la dispersión conteniendo VCL (83 % de la VCL total), en S5 35 g (66 %) y en S6 18 g (57 %). En los espectros de H1-RMN de las muestras finales tomadas en las reacciones S4, S5 y S6 (Figuras A1.9 – A1.11 del Anexo 1) se observa la ausencia de los picos correspondientes a los enlaces vinílicos de BA, que demuestra su consumo total en las tres polimerizaciones. Este resultado es una indicación de que la polimerización también ocurrió en condiciones de inanición para la dosificación del BA.

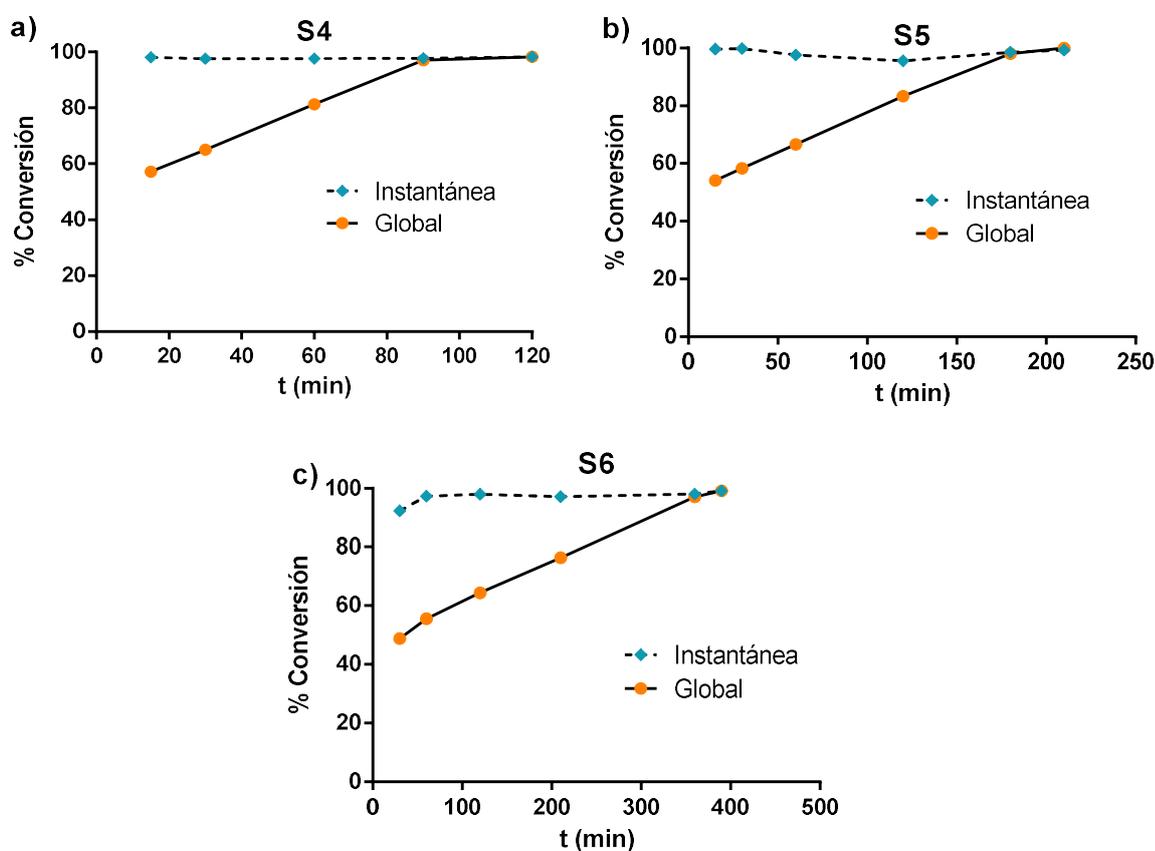


Figura 3.32. Evolución de la conversión de VCL en las polimerizaciones S4 (a), S5 (b) y S6 (c).

En la Figura 3.33 se muestran los termogramas de dDSC obtenidos para los tres NGs bifuncionales. Se observa que los NGs bifuncionales presentan dos fases con valores de Tg muy diferentes. Se puede ver un pico en la derivada del flujo de calor a altas temperaturas correspondiente a la transición vítrea de la fase de PVCL cuyo máximo se encuentra entre 192 y 195 °C en los tres casos. Estos valores son cercanos al reportado por Imaz y col.³⁷ para los

NGs de VCL entrecruzados con BIS (200 °C), donde se adjudica el incremento de Tg de la PVCL a la rigidez que aporta el entrecruzamiento. Por lo tanto, una mayor Tg indica mayor grado de entrecruzamiento. En cuanto a la transición del copolímero poli(VCL-co-BA), se comparó con el valor de Tg calculado mediante la ecuación de Flory-Fox correspondiente a un copolímero aleatorio ideal formado con una relación de VCL/BA igual a 25/75 (relación resultante de la dosificación continua de los dos monómeros en las tres polymerizaciones). El valor de la Tg teórica del copolímero aleatorio ideal es -22.3 °C. En los NGs S4 se puede observar un pico muy pequeño cerca de la Tg correspondiente al PBA puro (-56 °C) y un pico que representa una transición vítrea muy ancha en el rango de temperaturas de -20 a 40 °C, correspondiente a un copolímero de poli(VCL-co-BA) con una gran variación en su composición monomérica. La reducción de las velocidades de dosificación para obtener los NGs S5, aun producen una pequeña fracción de PBA puro con un pequeño pico en el dDSC a -56 °C y dos picos más significativos, uno cercano a la Tg calculada con Flory-Fox (-22.3 °C) y otro a temperatura mayor con un máximo en 20 °C.

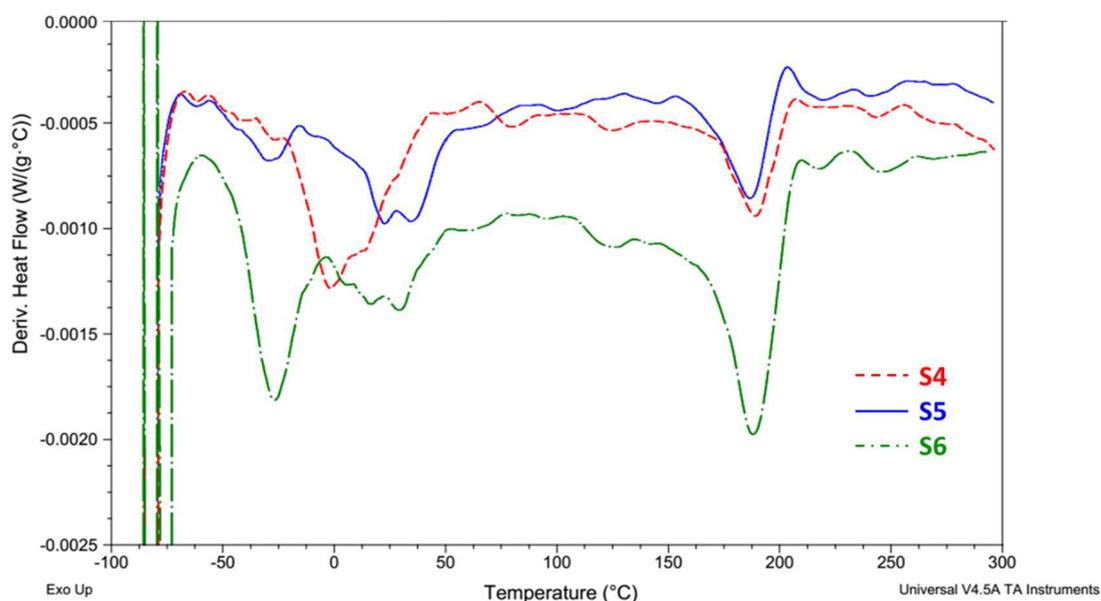
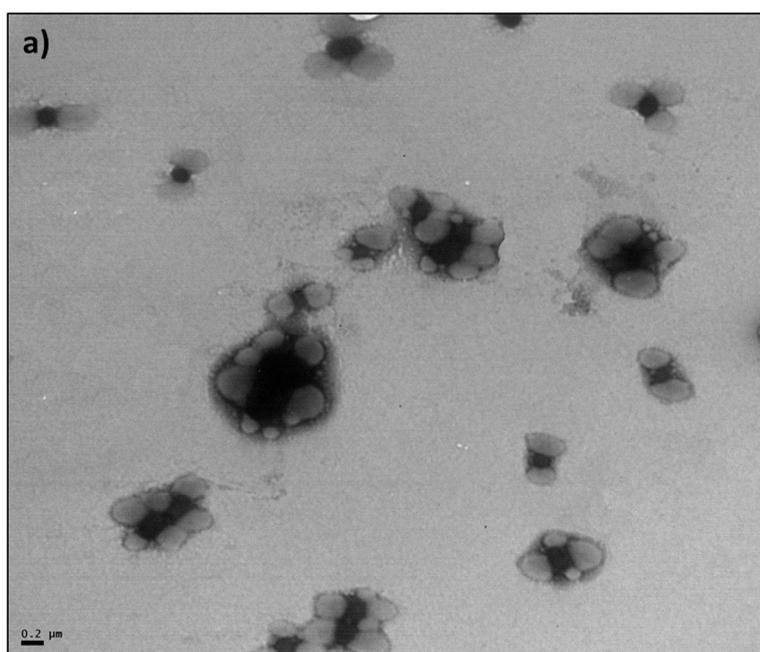


Figura 3.33. dDSC de las muestras S4, S5 y S6.

El empleo de la mínima velocidad de dosificación en S6 produjo NGs con una fase de baja Tg, donde predomina una composición equivalente al copolímero random ideal con composición igual a la alimentada. Estos resultados indican que cuando la dosificación de los

comonómeros fue más lenta, se tuvo un mejor control en la composición del copolímero formado. La presencia de copolímeros con distintas composiciones, y por lo tanto distintas Tg, se produce como consecuencia de una dosificación rápida que permite la polimerización de los monómeros a velocidades diferentes a su dosificación. En esta situación resulta un consumo más rápido del BA (el monómero más reactivo) sobre la VCL.

La Figura 3.34 muestra la morfología de las partículas obtenidas en S4, S5 y S6. Se puede observar que a medida que la dosificación de los comonómeros fue más lenta se obtuvieron partículas más homogéneas en tamaño y forma. En los tres casos se trata de partículas lobulares con dos fases, una compuesta por un núcleo de PVCL entrecruzados (que se ven más oscuros por la tinción con uranilo) y una coraza con lóbulos de copolímero de poli(VCL-co-BA) que se forman en la etapa de dosificación conjunta de los comonómeros (que se ven sin tinción). En todos los casos se puede ver que cuando los NGs de PVCL tienen un mayor tamaño y por lo tanto más superficie, mayor cantidad de lóbulos del copolímero se alojan en la misma. También se aprecia que el tamaño de partículas observado en las imágenes de TEM no son comparables a los determinados por DLS, debido a la morfología no esférica de las partículas. El diámetro final colapsado (a 55 °C) medido por DLS para los NGs bifuncionales S4 fue de 206 nm, en S5 de 376 nm y en S6 225 nm.



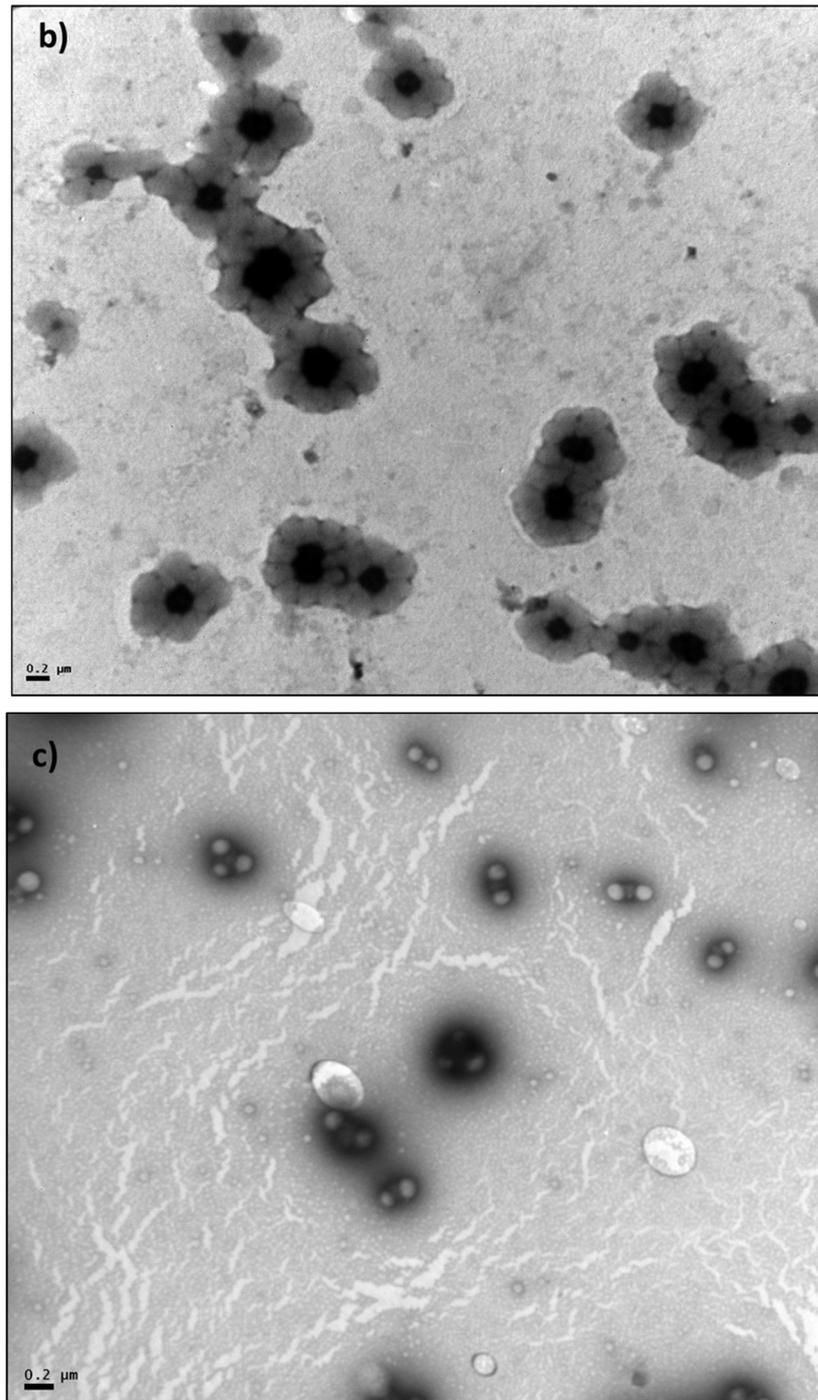


Figura 3.34. Micrografías de TEM de los NGs bifuncionales obtenidos en S4 (a), S5 (b) y S6 (c).

3.5.1. Propiedades de las películas obtenidas a partir de los NGs bifuncionales S4, S5 y S6

La diferencia en la T_g de los copolímeros que forman los lóbulos de los NGs bifuncionales obtenidos con velocidades de alimentación diferentes podría afectar tanto la capacidad de formar película como sus propiedades. Si bien la diferencia en la temperatura mínima de formación de

film no se pudo determinar, ya que los tres látex forman películas a temperaturas menores a la menor temperatura medida por el equipo (7 °C), se pueden detectar diferencias en la morfología de la superficie de los films mediante AFM y en su ángulo de contacto con agua.

La Figura 3.35 muestra las imágenes de topografía y fase obtenidas por AFM de las superficies de las películas S4, S5 y S6. Además, se incluye como referencia las morfologías de las partículas lobulares correspondientes a cada película

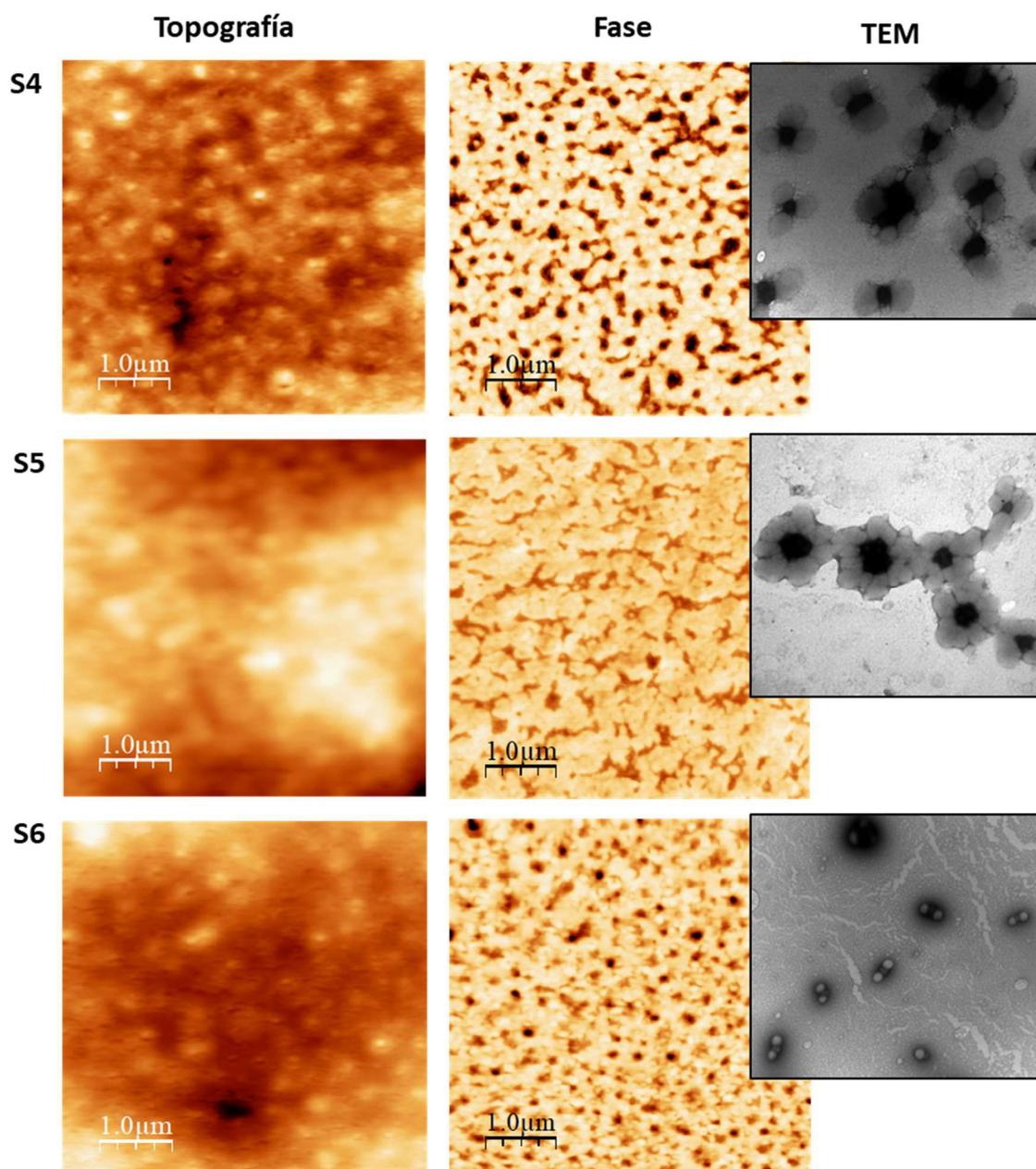


Figura 3.35. Imagen de AFM de topografía y fase de las superficies de las películas obtenidas con los NGs S4, S5 y S6. Como referencia se incluye las imágenes de TEM de los respectivos NGs.

En las imágenes de fase de AFM de las superficies de las películas pueden verse dos fases con gran diferencia de dureza, una fase continua más dura, que corresponde a la PVCL entrecruzada, con dominios blandos (de color más oscuro) que presentan tamaños que concuerda con el observado para los lóbulos en los NGs. Los valores de rugosidad obtenidos de las imágenes de topografía se resumen en la Tabla 3.12. Se observa que los valores de RMS para S4 y S6 son similares y menores que S5, indicando una menor capacidad de coalescencia de los NGs S5. El mayor valor de rugosidad medido en S5 podría deberse a que la Tg predominante de la fase con capacidad de coalescer es de 21 °C, mientras que en los otros NGs (S4 y S6) esa fase posee Tg predominante de -1 y -3 °C (Figura 3.31 y Figuras A2.9-11 del Anexo 2).

Tabla 3.12. Rugosidad superficial de las películas obtenidas a partir de los NGs bifuncionales S4, S5 y S6.

Reacción	RMS (nm)
S4	4.1 ± 0.3
S5	12.2 ± 0.5
S6	4.96 ± 1.0

En la Figura 3.36 se muestran los ángulos de contacto obtenidos para los films de cada una de las reacciones. En principio este resultado nos da una idea de cuán hidrofóbica o hidrofílica es la superficie del film formado. Debido a que las mediciones se realizaron a temperatura ambiente, se espera que la PVCL tenga un comportamiento hidrofílico, mientras que el copolímero conteniendo mayor proporción de BA sea responsable de la hidrofobicidad del material. Este comportamiento puede verse reflejado en los valores de ángulo de contacto de los films obtenidos a partir de los látex S4F1 (de PVCL) y S4F2 (de poli(VCL-co-BA)). En este contexto, la medición del ángulo de contacto nos permite conocer la distribución de estas dos fases en la superficie de la película. En la síntesis de los tres materiales se utilizó la misma formulación, de manera que la relación BA/VCL es la misma en todos los casos. La diferencia entre ellos, como se comprobó anteriormente, es la distribución de estos dos monómeros en cada una de las fases y la morfología de las partículas. Se puede observar que el film S6 tiene

el mayor ángulo de contacto, seguido por el film S4 y finalmente el S5 posee el menor. El valor bajo de ángulo de contacto de la muestra S5 puede deberse a que el copolímero predominante de la fase formadora de film, que tiene una alta T_g , posee un mayor porcentaje de VCL que en S4 y S6, cuyas T_g son mas bajas. Como resultado este copolímero es menos hidrofóbico y la superficie del film generado con este material presenta un menor ángulo de contacto. Si bien la diferencia de ángulo de contacto entre S4 y S6 no es muy grande, puede deberse a la distribución de las fases en la superficie del film, la cual es más homogénea en la muestra S6 que en S4.

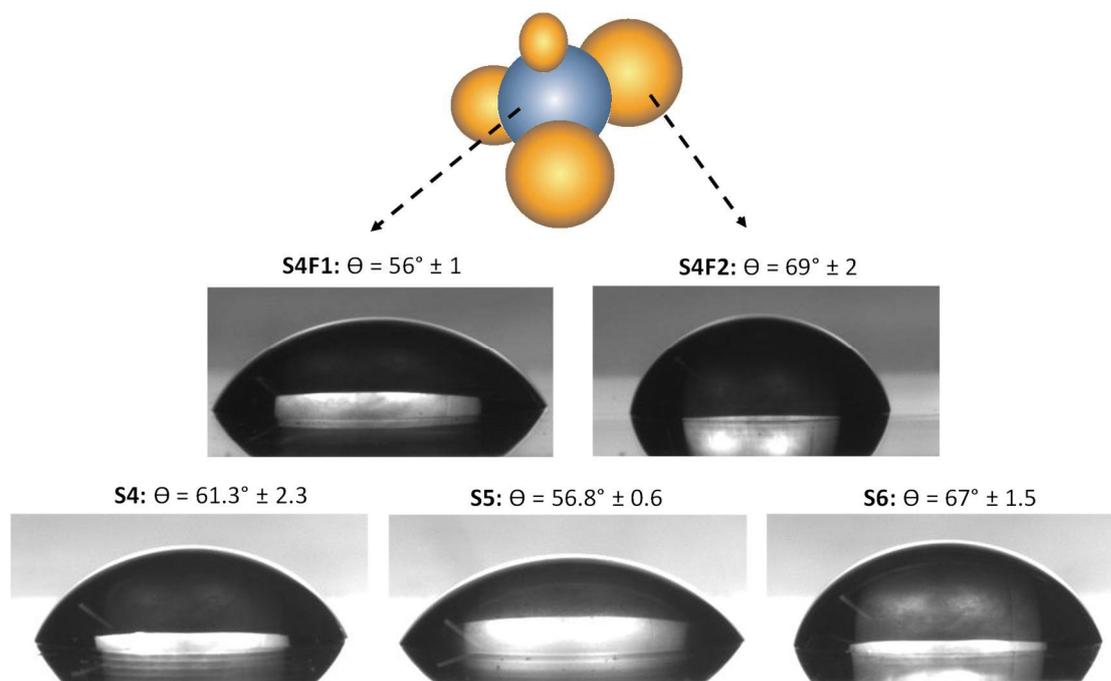


Figura 3.36. Ángulo de contacto medido para las películas S4F1, S4F2, S4, S5 y S6.

En la Figura 3.37 se muestran los resultados de un estudio de absorción y resistencia al agua de los films obtenidos a partir de los NGs S4, S5 y S6. Si bien las diferencias entre las curvas observadas no son muy significativas, puede verse que el film S6 presentó una mayor velocidad de absorción de agua y menor pérdida de masa después de 24 hs, mientras que la película S5 presentó la mayor pérdida de masa. Este resultado junto con el valor elevado de rugosidad del film S5, sugiere que la coalescencia de las partículas podría ser menos eficiente en este material en comparación con los films obtenidos en S4 y S6, posiblemente debido a la T_g más elevada del copolímero predominante.

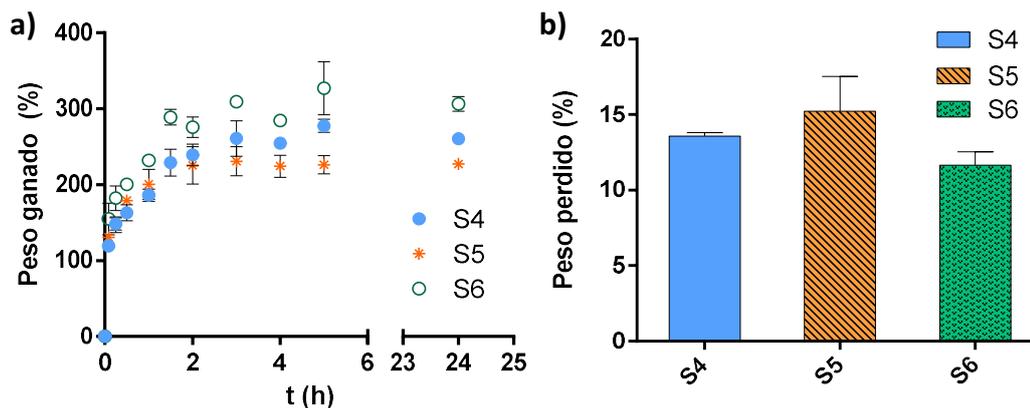


Figura 3.37. Absorción de agua a temperatura ambiente (a) y pérdida de masa al final del ensayo (b) de las películas obtenidas a partir de los NGs bifuncionales S4, S5 y S6.

La respuesta térmica de los NGs es comparada con la de sus respectivos films en la Figura 3.38 empleando el factor de hinchamiento (Φ_i) definido anteriormente. Se puede observar que los tres sistemas presentan prácticamente la misma sensibilidad térmica tanto los NGs como las películas correspondientes.

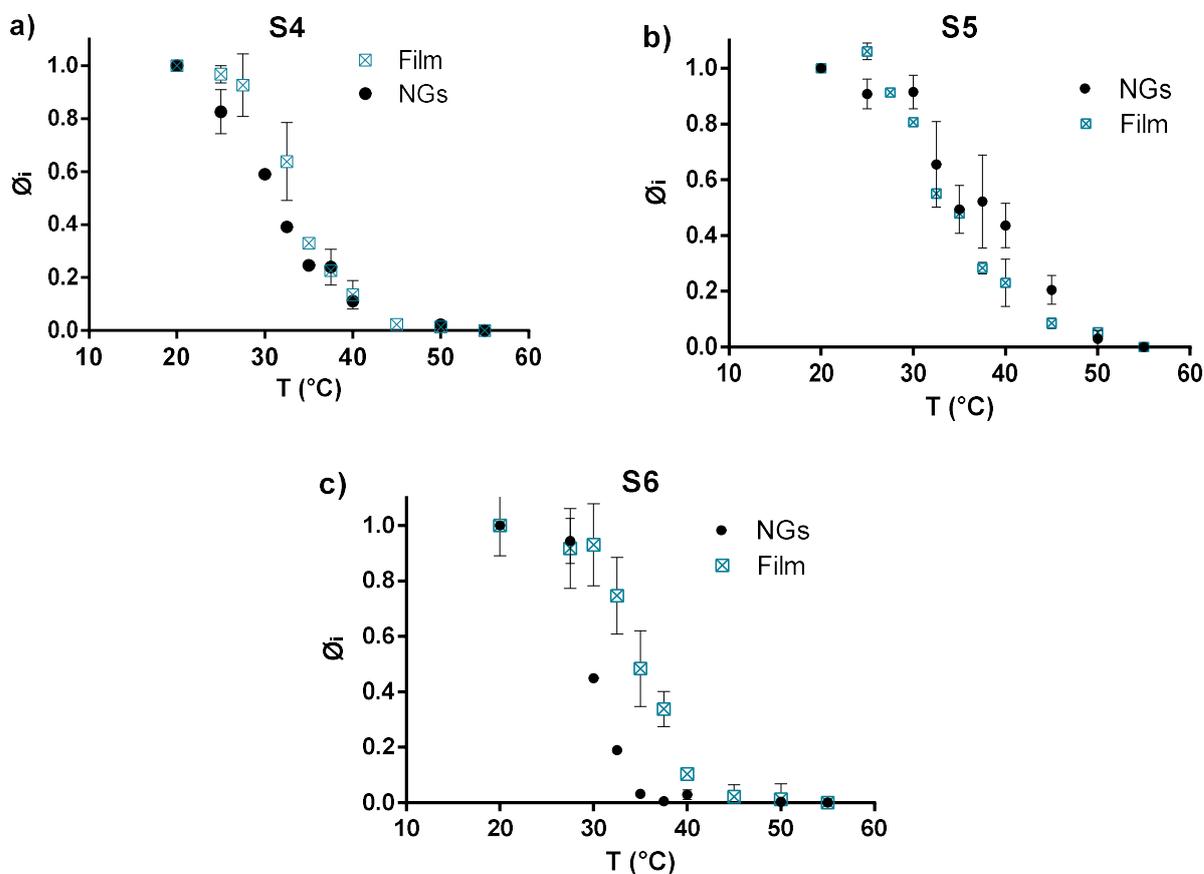


Figura 3.38. Respuesta térmica de los NGs y películas S4 (a), S5 (b) y S6 (c).

Los sistemas S4 y S6 presentan un valor de VPTT mayor para las películas que para los NGs en dispersión, mientras que se observa la situación inversa para el sistema S5 (Tabla 3.13 y Figura 3.38). Si bien esta diferencia es considerable, puede deberse a la gran dispersión de los valores obtenidos en la medición de DLS de esa muestra. En la Tabla 3.13 se observa que la capacidad de hinchamiento disminuye notablemente en las películas, respecto de sus NGs, siendo este efecto más notorio en la muestra S4, en la cual los NGs presentan la mayor capacidad de hinchamiento. En esta instancia, resulta importante destacar que esta propiedad de los NGs presenta incertidumbres y son valores de carácter semicuantitativos debido a que su determinación está basada en los diámetros medidos en estado hinchado y colapsado, teniendo estas partículas morfologías no esféricas.

Tabla 3.13. VPTT y capacidad de hinchamiento de los NGs y películas S4, S5 y S6.

	S4		S5		S6	
	NGs	Film	NGs	Film	NGs	Film
VPTT (°C)	31.0	33.5	35.0	32.0	30.0	34.0
Capacidad de hinchamiento (%)	1497	189	451.7	172	711	175.5

3.6. Síntesis semicontinua de NGs bifuncionales con diferentes composiciones de dosificación

En la sección anterior se analizó el efecto de la velocidad de dosificación de los comonomeros, manteniendo constante la composición global de la fase poli(VCL-co-BA), sobre los NGs bifuncionales. Se observó que la presencia de una fracción polimérica significativa con baja Tg en la fase con capacidad de formación de película, que podría favorecer la coalescencia de los NGs y algunas de las propiedades del film obtenido. Es por ello que en la presente sección se investiga el efecto de la composición de la fase rica en PBA, generando fracciones poliméricas que tengan valores de Tg diferentes, manteniendo constante la composición global de BA de los NGs (66 % w/vcl). En este sentido, se propone implementar las estrategias esquematizadas en la Figura 3.39 donde la fase de baja Tg contenga fracciones poliméricas con contenidos de BA

diferentes, con el propósito de investigar su efecto sobre la capacidad de formación de película y sus propiedades. Para ello se modificó la composición de la fase de baja Tg tomando como referencia la estrategia S4, cuya relación BA/VCL es 66/22. Así, se proponen las estrategias S7 y S8 que presentan teóricamente dos fracciones poliméricas, compuesta por poli(VCL-co-BA) y homopolímero puro de BA en diferentes proporciones. Nótese que como el tiempo inicial y final de la alimentación del BA ($t_{ACi} = 50$ min y $t_{ACf} = 90$ min) y el tiempo total de polimerización ($t_{FINAL} = 120$ min) son constantes, para la implementación de estas estrategias se modificaron el tiempo en el cual se alimentó la VCL (t_{VCLf}).

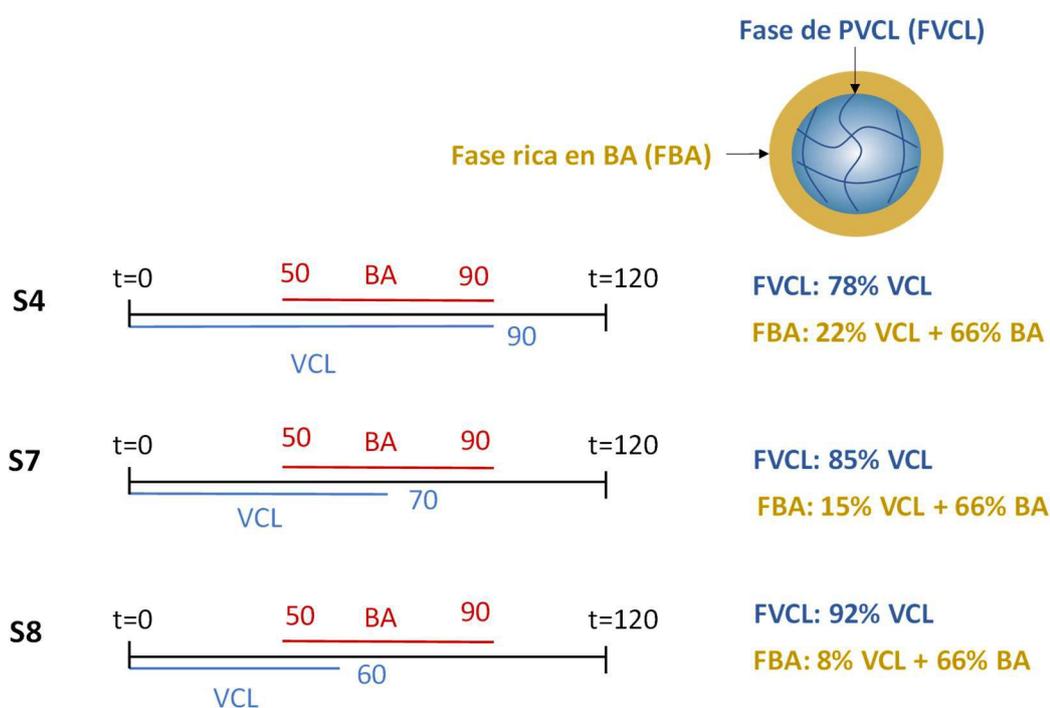


Figura 3.39. Esquema de alimentación de los monómeros en las reacciones S4, S7 y S8; y composición teórica de las fases de los NGs expresadas en % w/vcl.

De acuerdo a lo esquematizado en las Figura 3.39 y los parámetros de alimentación de la Tabla 3.14, se destaca que: a) en la reacción S4 se dosificaron ambos comonómeros conjuntamente desde los 50 min hasta los 90 min; b) en S7 y S8, ambos comonómeros se dosificaron conjuntamente durante 20 y 10 min, respectivamente, y luego se continuó únicamente con la dosificación de BA hasta los 90 min. En todas las polimerizaciones se mantuvieron las condiciones de polimerización hasta 120 min. Se resalta que el cambio en el caudal de alimentación de la VCL para lograr dosificar el total de este monómero en diferentes tiempos,

puede tener no solo influencia en el copolímero formado hacia el final de la polimerización, sino también en la estructura de la fase de PVCL entrecruzada de los NGs formados, incidiendo sobre las propiedades que gobierna dicha fase como la respuesta térmica.

Tabla 3.14. Condiciones de polimerización de las reacciones S4, S7 y S8.

Código	VCL (mg/mL)	t_{VCLf} (min)	BA/VCL (%)	t_{Aci} (min)	t_{Acf} (min)
S4	50	90	66	50	90
S7	50	70	66	50	90
S8	50	60	66	50	90

En la Figura 3.40 se puede ver que la conversión instantánea de VCL fue alta en todas las muestras tomadas a lo largo de cada reacción, confirmando nuevamente la condición de inanición. La conversión global de la VCL presenta una evolución en línea recta con la alimentación de este monómero.

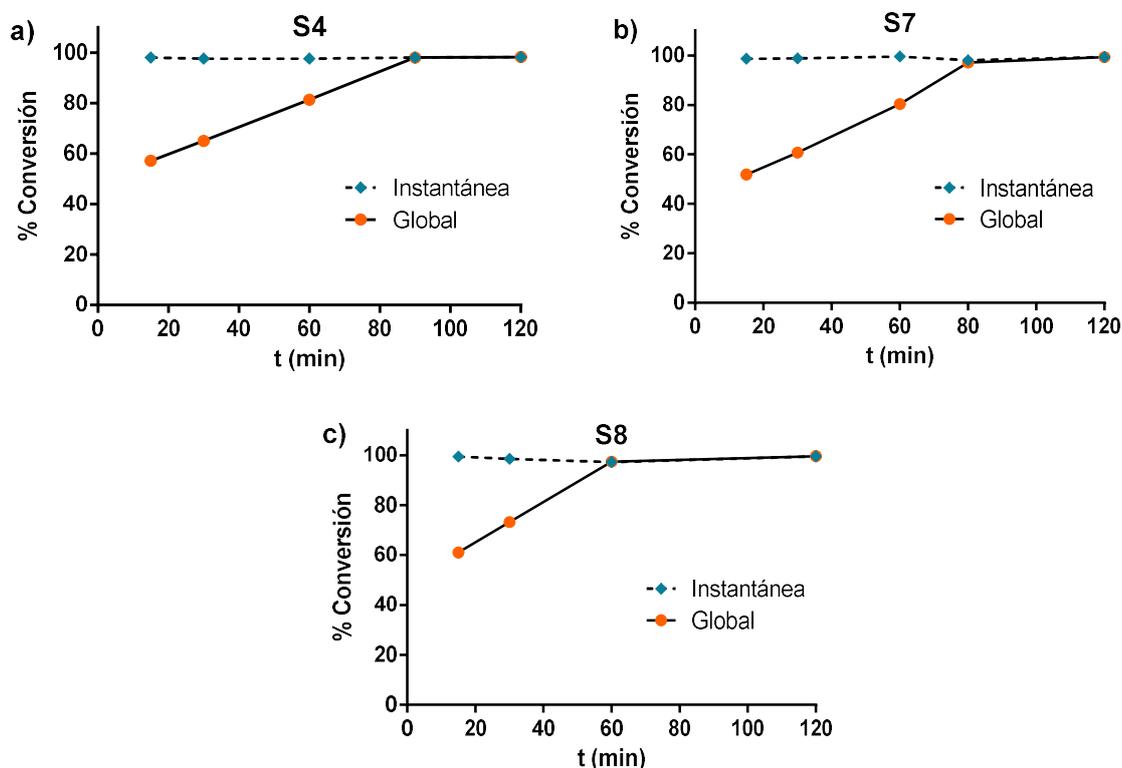


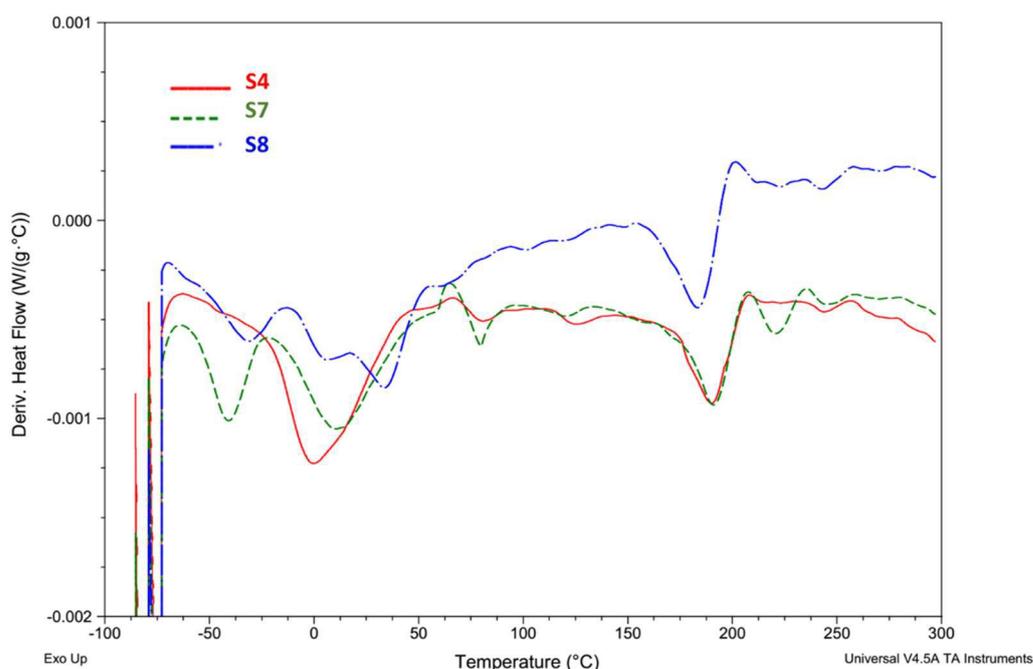
Figura 3.40. Conversión global e instantánea de VCL obtenidas en las polimerizaciones S4 (a), S7 (b) y S8 (c).

Como puede verse en las Figuras A1.10 y A1.11 del Anexo 1, en los espectros de RMN de las muestras finales tomadas en las reacciones S7 y S8 no aparecen los picos de los enlaces vinílicos del BA, indicando su consumo total en las tres polimerizaciones, tal como ya se había comprobado para la reacción S4 en la sección anterior.

En la Figura 3.41 se muestran los termogramas de dDSC de los NGs bifuncionales sintetizados en esta sección (en las Figuras A2.9, A2.12-13 en el Anexo 2 se muestran los correspondientes termogramas de DSC). La Tabla 3.15 representa los valores de Tg determinados para las fases que componen los NGs bifuncionales. Tal como se observa en la Figura 3.39 el tiempo de dosificación de la VCL se acorta cuando se pasa de S4 a S8, implicando un aumento de la velocidad de alimentación de este monómero. Se observa que este aumento en el caudal de la VCL produce una disminución en la Tg de la fase de PVCL entrecruzada. Esto puede deberse a que, a medida que se dosifica más rápido la VCL el grado de entrecruzamiento de la fase PVCL se reduce porque la relación VCL/BIS es mayor. Por otro lado, se observa que los NGs S7 y S8 presentan 2 fracciones poliméricas de baja Tg, mientras que S4 presenta una única fracción de una Tg igual a $-1.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Tabla 3.15). La aparición de las 2 fracciones de baja Tg en los NGs de S7 y S8 es consecuencia de la política de dosificación, donde una fracción del BA es alimentada en la etapa final de la polimerización sin la alimentación simultánea de VCL. Si bien en ninguna de las muestras se observa una fracción significativa con una Tg lo suficientemente baja como para asociarlo a PBA puro, los NGs S7 y S8 presentan una fracción polimérica de baja Tg que ronda $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Además, en estos NGs se muestra una segunda fracción polimérica con una Tg algo más elevada que indica la copolimerización de BA con VCL y que correspondería a la primera etapa de alimentación simultánea de ambos monómeros. Como de S4 a S8 se produce un aumento de la velocidad de alimentación de la VCL, durante el periodo de alimentación simultánea de ambos monómeros la concentración instantánea de VCL dosificada es mayor. Por ello es esperable que el copolímero poli(VCL-co-BA) presente un contenido de VCL mayor y por lo tanto una Tg mayor (Tabla 3.15).

Tabla 3.15. Tg de las fases poliméricas presentes en los NGs S4, S7 y S8.

NGs	Tg _{VCL} (°C)	Tg _{copolímero} (°C)
S4	195.6	-1.2
S7	195.0	-39/15
S8	184.0	-30/33


Figura 3.41. dDSC de los NGs bifuncionales S4, S7 y S8.

En la Figura 3.42 se muestran las imágenes de TEM de los NGs sintetizados en esta sección. Se puede ver que en todas las polimerizaciones se obtuvieron partículas lobulares, con lóbulos más pequeños a medida que se aumentó el caudal de dosificación de VCL. Este resultado se debe a que de S4 a S8 (esquemas de la Figura 3.39) cada vez menos cantidad de VCL pasa a formar parte de la fase de baja Tg, mientras se mantiene constante la cantidad de BA. Por lo tanto, la fase lobular de los NGs representa una fracción másica menor de S4 a S8.

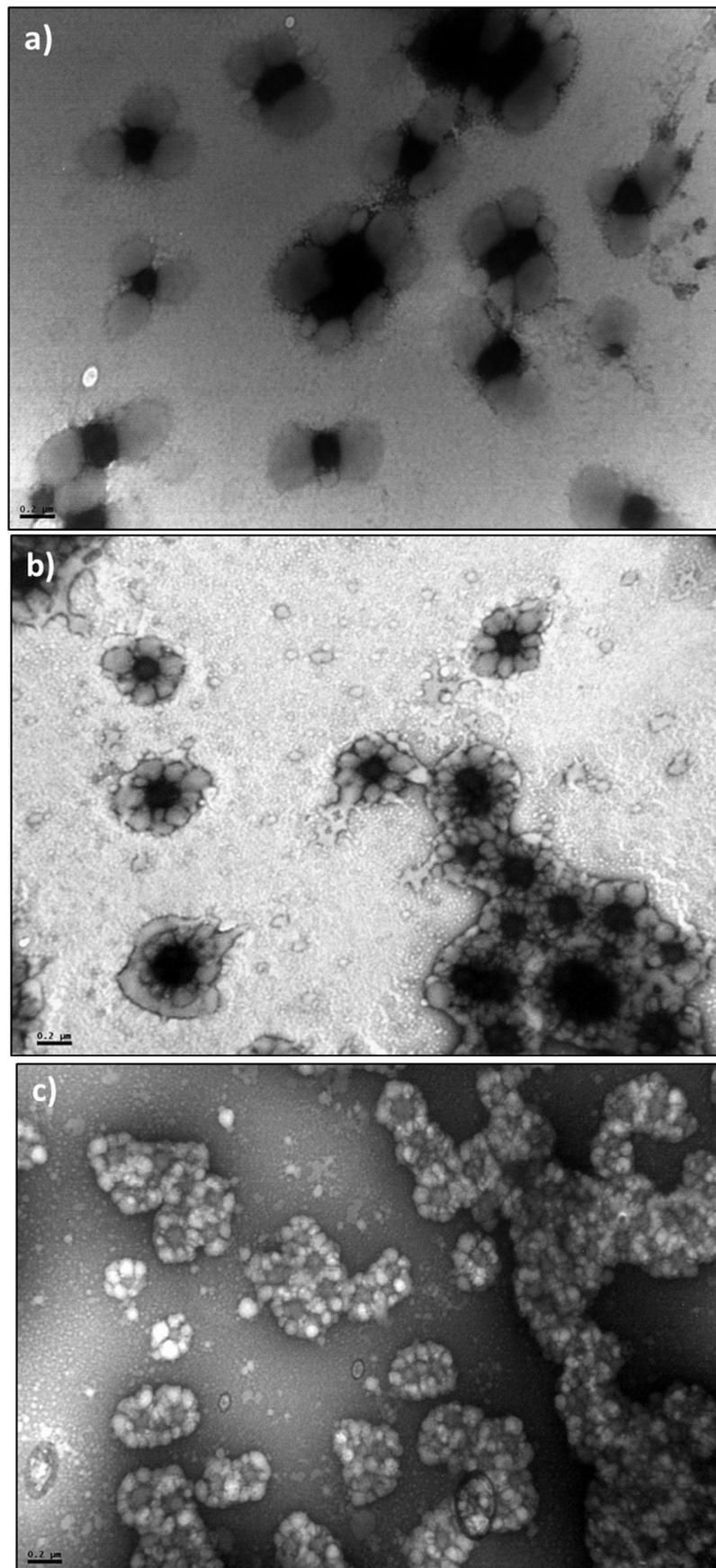


Figura 3.42. Imágenes de TEM de los NGs obtenidos en S4 (a), S7 (b) y S8 (c).

3.6.1. Propiedades de las películas obtenidas con los NGs S4, S7 y S8.

Todas las dispersiones de los NGs son capaces de formar película con una TMFF menor a la temperatura mínima medida por el equipo (7 °C). Las películas obtenidas con los tres látex tienen aspectos muy similares de transparencia, flexibilidad y dureza a simple vista.

En la Figura 3.43 se muestran las morfologías de las superficies obtenidas por AFM (topografía y fase) de las películas obtenidas con los NGs S4, S7, S8 y S9.

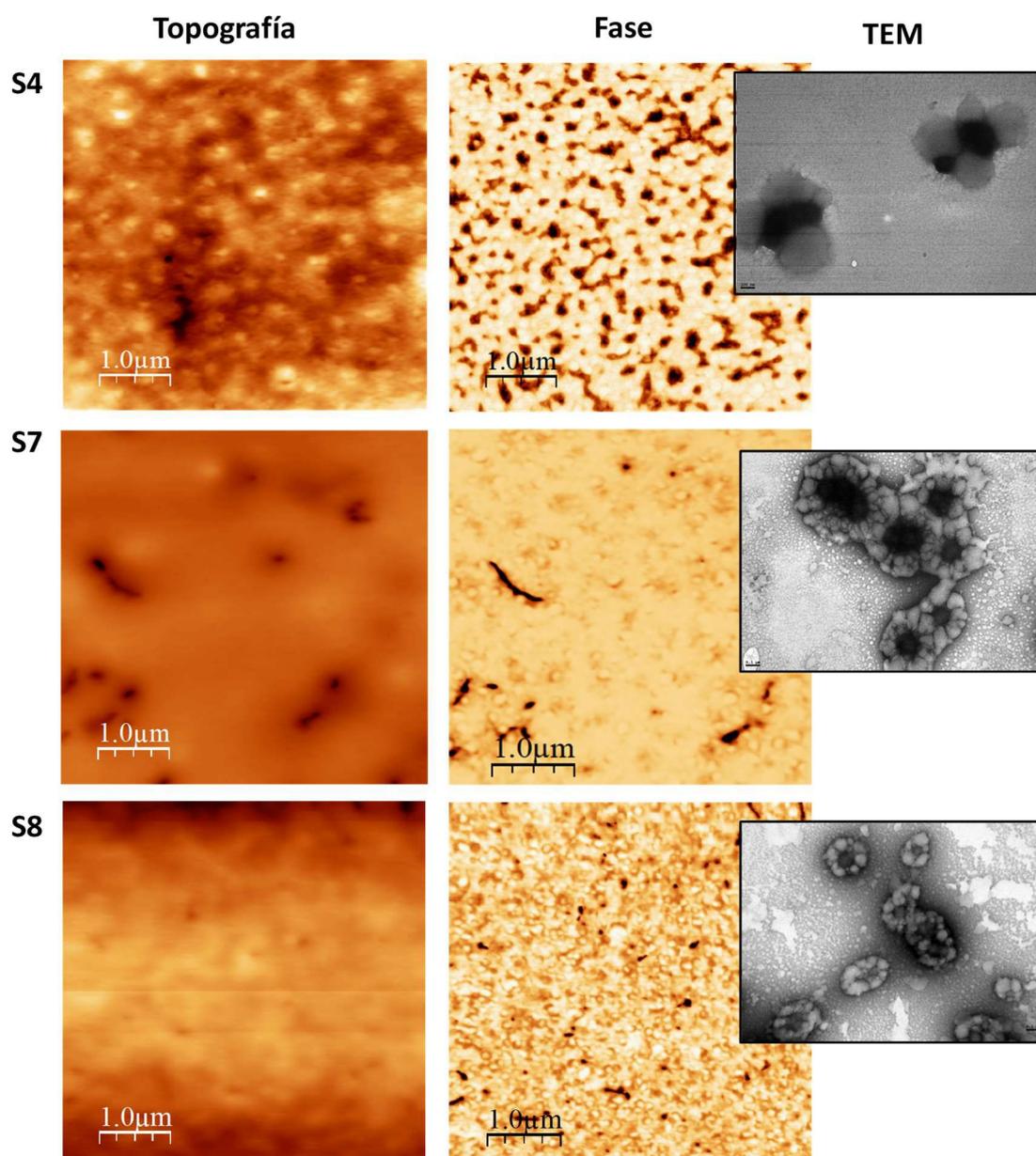


Figura 3.43. Imagen de AFM de topografía y fase de las películas obtenidas con los NGs bifuncionales S4, S7 y S8. Como referencia se agregan las respectivas imágenes de TEM de los NGs.

Se observa que los films formados con estos NGs muestran en su superficie una fase continua de PVCL (de color mas claro) con dominios discretos más oscuros correspondientes a la fase acrílica de los lóbulos de la coraza. Estos dominios acrílicos presentan tamaños que están relacionados con los lóbulos de los NGs, los cuales son de mayor tamaño en la muestra S4.

Puede verse también en la Tabla 3.16 que la rugosidad de la superficie del film formado aumentó conforme se aumentó el caudal de dosificación de la VCL y se favoreció la homopolimerización de BA (es decir, de S7 a S9). Este resultado puede deberse a que las fases presenten menor grado de compatibilidad.

Tabla 3.16. Rugosidad superficial de las películas formadas con los látex S4, S7 y S8.

Reacción	RMS
S4	4.1 ± 0.3
S7	5.3 ± 0.5
S8	11.5 ± 1.7

En la Figura 3.44 se observan los resultados del ensayo de absorción de agua de las películas de esta sección.

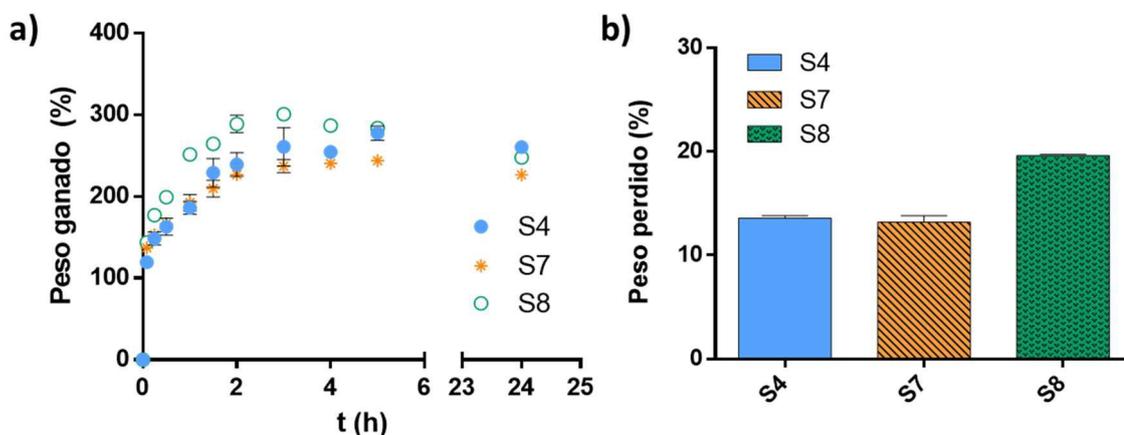


Figura 3.44. Absorción de agua de las muestras (a) y peso perdido al final del ensayo (b) para las películas S4, S7 y S8.

Los valores de porcentajes de agua absorbida como de peso perdido al final del ensayo no parecen tener una diferencia significativa entre las películas S4 y S7, pero puede verse un aumento en ambos valores en la película S8. Este fenómeno puede deberse a que en estos NGs las fases están menos compatibilizadas, de manera que la fase de PVCL entrecruzada (hidrofílica

a temperatura ambiente) se encuentra en mayor proporción y por lo tanto el film es capaz de absorber más cantidad de agua y a la vez tiene menos resistencia al agua.

En la Figura 3.45 se muestra la respuesta térmica de las películas junto con la de los NGs en dispersión acuosa, ambos en términos de $\bar{\phi}_i$, y en la Tabla 3.17 se presentan los valores de VPTT y de capacidad de hinchamiento correspondientes a cada uno de los sistemas. Se observa que todas las películas muestran respuesta térmica similar a los NGs con transiciones que ocurren en un amplio rango de temperatura. En la Tabla 3.17 se observa nuevamente que la capacidad de hinchamiento de los films es menor a la de los NGs. Además, la capacidad de hinchamiento tanto de los NGs como de los films disminuyó a medida que se dosificó la VCL más rápidamente.

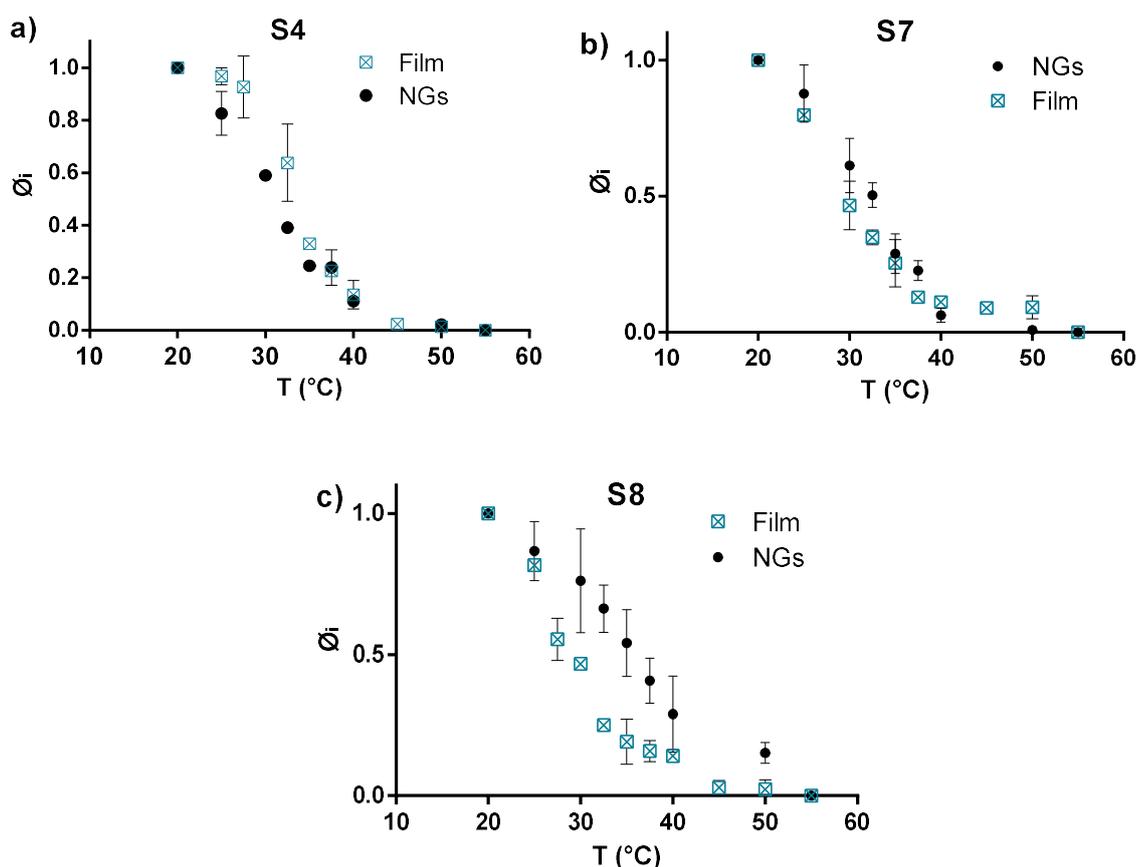


Figura 3.45. Respuesta térmica de los NGs y películas S4 (a), S7 (b) y S8 (c).

Tabla 3.17. VPTT y capacidad de hinchamiento de los NGs y películas S4, S7 y S8.

	S4		S7		S8	
	NGs	Film	NGs	Film	NGs	Film
VPTT (°C)	31.0	33.5	32.5	35.0	35.0	29.0
Capacidad de hinchamiento (%)	1497	189	1237	171	322.6	103.6

En la Figura 3.46 se muestran los resultados del estudio de ángulo de contacto de los films. Se puede ver que los valores de ángulo de contacto obtenidos se encuentran entre los valores medidos para la fase de PVCL entrecruzada y la correspondiente al poli(VCL-co-BA). Las variaciones en los ángulos de contactos medidos podrían deberse a la presencia de pequeñas partículas ricas en PBA. Las partículas con mayor contenido de homopolímero de BA, debido a su menor compatibilidad y su baja Tg, pueden difundir hacia la superficie durante el secado de la película y de esa manera aumentar el ángulo de contacto.

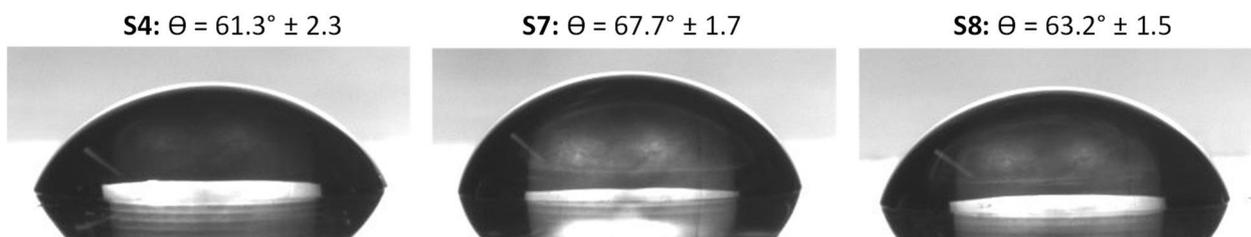


Figura 3.46. Ángulo de contacto medido para las películas S4, S7 y S8.

3.7. Síntesis semicontinua de NGs bifuncionales con incorporación de AA

Los polímeros utilizados para la formulación de adhesivos se sintetizan con dos o más monómeros. Generalmente, se copolimeriza un monómero hidrofóbico (en mayor proporción) con uno o más monómeros polares hidrófilos. El monómero hidrofóbico proporciona al copolímero una baja Tg y sensibilidad a la presión, mientras que pequeñas cantidades de comonómeros polares o hidrofílicos aumentan la fuerza cohesiva y proporcionan polaridad

superficial al adhesivo. El contacto y adhesión con la piel se ve reforzada con la presencia de grupos funcionales como carboxilo, hidroxilo y amida, mediante interacciones interfaciales.⁹¹ En este escenario, en esta sección del presente Capítulo se estudió el agregado de AA a la fase acrílica de baja Tg de los NGs bifuncionales. La estrategia empleada involucró la incorporación de AA en la preemulsión de alimentación junto con el BA, de manera que el sistema de polimerización presentó la configuración que se muestra en la Figura 3.3.

Para realizar este estudio se tomaron como base las polimerizaciones S3 y S7, reacciones realizadas con distintas estrategias sintéticas y se realizó la incorporación de AA en la fase correspondiente. En la Figura 3.47 se presentan los esquemas de alimentación de los comonómeros de las polimerizaciones analizadas en esta sección y en la Tabla 3.18, las condiciones de reacción empleadas.

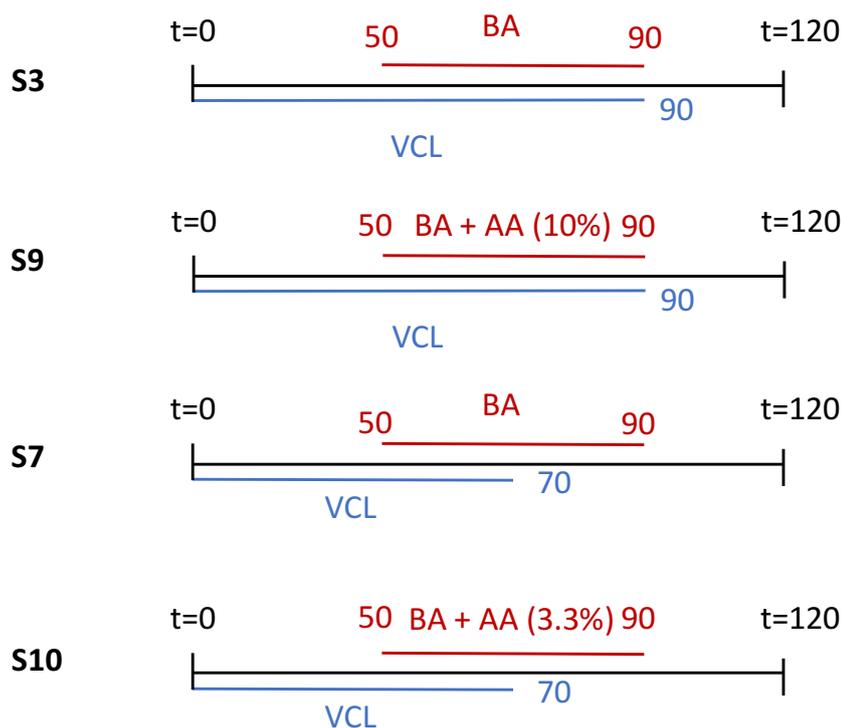
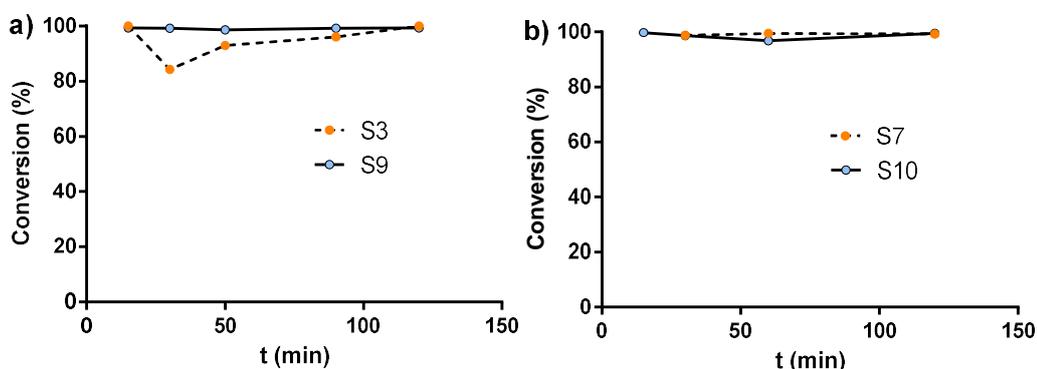


Figura 3.47. Esquema de alimentación de los monómeros en las polimerizaciones S3, S7, S9 y S10.

Tabla 3.18. Condiciones de polimerización de las reacciones S3, S7, S9 y S10.

Código	VCL (mg/mL)	t_{VCLf} (min)	BA (% w/vcl)	AA (% w/vcl)	t_{Aci} (min)	t_{Acf} (min)
S3	100	90	50	-	50	90
S9	100	90	50	10	50	90
S7	50	70	66	-	50	90
S10	50	70	66	3.3	50	90

En la Figura 3.48 se compara la evolución de la conversión de VCL en las polimerizaciones con incorporación de AA en la fase acrílica (S9 y S10) y sus homólogas sin AA (S3 y S7). Puede verse que la conversión final, como la evolución de la conversión instantánea, no se vieron afectadas significativamente por la incorporación de AA, obteniéndose valores cercanos al 100% a lo largo de las polimerizaciones. El D obtenido con el agregado de AA en los dos casos fue levemente mayor, siendo los valores de D: 313 ± 27 nm en S3, 358 ± 18 nm en S9, 283 ± 11 nm en S7 y 350 ± 42 nm en S10.


Figura 3.48. Evolución de la conversión instantánea de VCL de las polimerizaciones S3 y S9 (a) y, S7 y S10 (b).

En las Figuras 3.49 y 3.50 se muestran los termogramas de dDSC de los NGs bifuncionales obtenidos con la incorporación de AA. 47). En la Tabla 3.19 se presentan los valores de T_g obtenidos experimentalmente conjuntamente con los calculados por Flory-Fox, correspondientes a poli(BA-co-AA), poli(VCL-co-BA) y poli(VCL-co-BA-co-AA) con la composición equivalente a las dosificación de los monómeros. Como ya se analizó en las secciones anteriores, los NGs bifuncionales obtenidos con esta estrategia presentan 2 fases con

valores de Tg distintos correspondientes a la fase PVCL entrecruzada y a la fase acrílica de baja Tg. Los NGs S3 presentan dos transiciones correspondientes a cada una de sus fases, una a -8 °C y otra a 195 °C, mientras que en el termograma de S9 se observan, además de la Tg de la PVCL, tres transiciones a baja temperatura correspondiente a la fase acrílica (Figura 3. Puede observarse que estas transiciones a baja temperatura de S9 coinciden con la producción de poli(BA-co-AA), poli(VCL-co-BA) y poli(VCL-co-BA-co-AA). En el termograma de dDCS correspondiente a los NGs S10 de la Figura 3.50 se observa una transición ancha, que se presenta a lo largo de todo el rango de temperaturas comprendido entre los valores de Tg calculados por Flory-Fox.

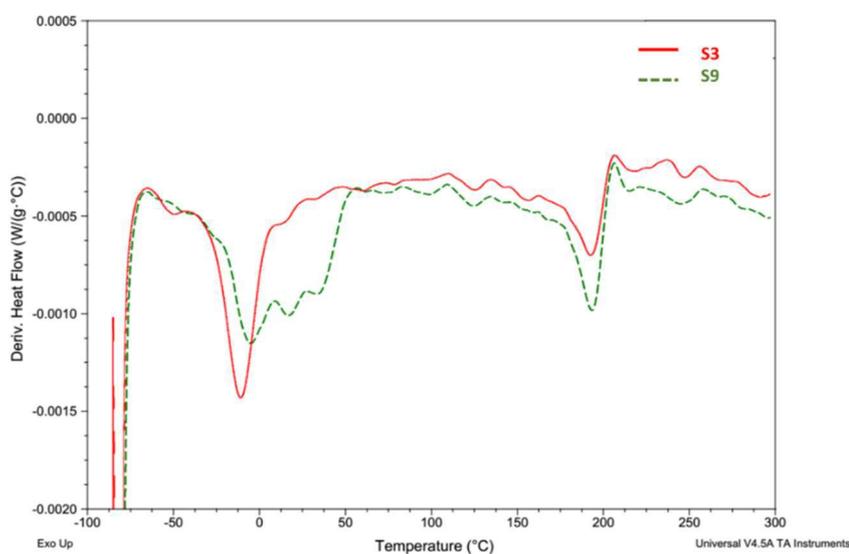


Figura 3.49. dDSC de los NGs S3 y S9.

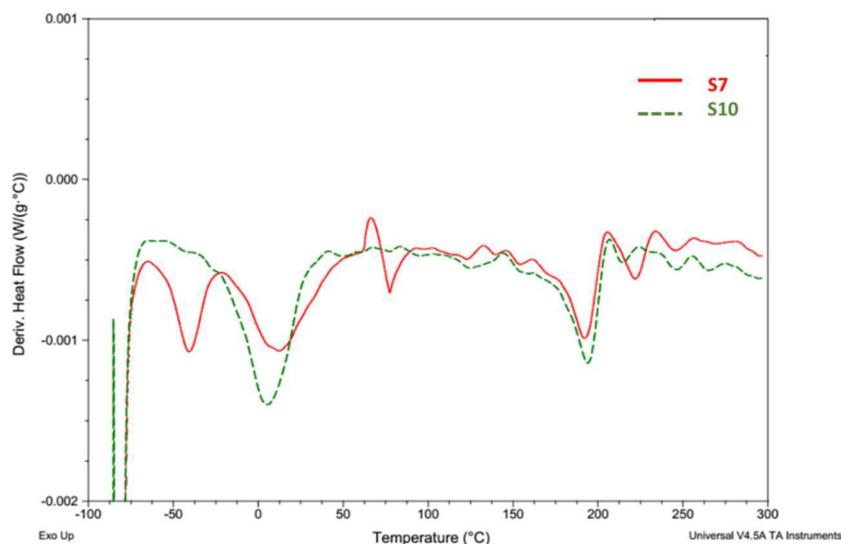
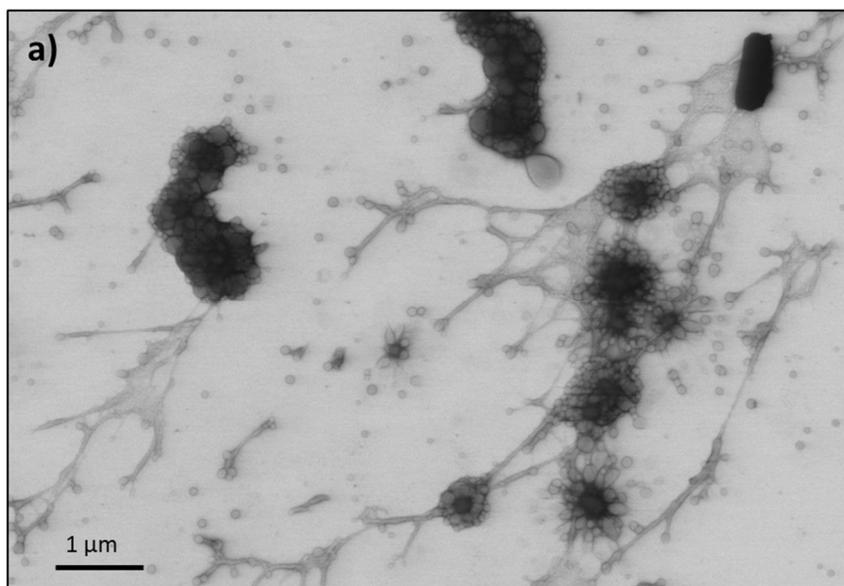


Figura 3.50. dDSC de los NGs S7 y S10.

Tabla 3.19. Valores de Tg de las fases de los NGs S3, S7, S9 y S10 determinados experimentalmente y calculados mediante Flory-Fox.

	<i>Experimental (°C)</i>		<i>Flory-Fox (°C)</i>		
	Tg _{VCL}	Tg _{copolímeros}	Tg _{BA-AA}	Tg _{VCL-BA}	Tg _{VCL-BA-AA}
S3	195	-8.3	-	-12	-
S9	195	-29/-10/2.7	-28.8	-12	2.5
S7	195	-39/15	-	-15	-
S10	195	-24/5	-47.5	-15	21.8

En la Figura 3.51 se muestran imágenes de TEM de los NGs S3 y S9. Se puede observar que en ambas polimerizaciones se obtuvieron partículas lobulares, con un núcleo de PVCL entrecruzado (teñido con el uranilo) y lóbulos de partículas ricas en acrílicos, las cuales no se hinchan en la solución de acetato de uranilo y por eso no se encuentran teñidas. Puede verse claramente que en la muestra S3 se ven rastros de polímero de baja Tg, que no aparecen en las imágenes de S9, donde los lóbulos de copolímero acrílico poseen una forma bien esférica y límites bien definidos. Esto concuerda con los resultados de DSC donde la fase acrílica de los NGs S9 presentan un valor de Tg mayor. Ambas muestras presentan una amplia distribución de tamaño y morfología de partículas.



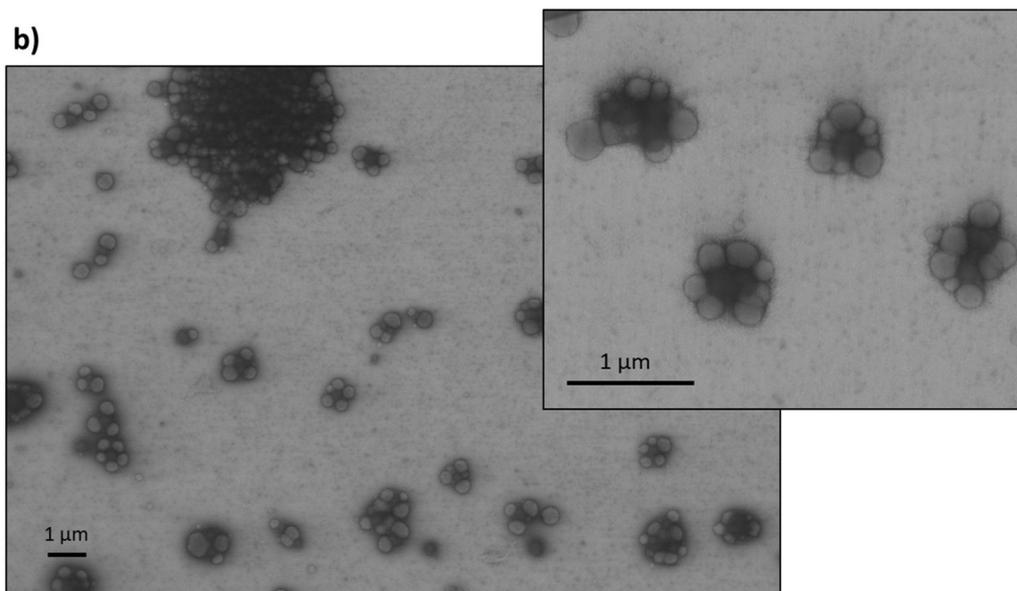


Figura 3.51. Imágenes de TEM de los NGs S3 (a) y S9 (b).

3.7.1 Propiedades de las películas obtenidas con los NGs con incorporación de AA

En la Figura 3.52 se muestran las imágenes de AFM de topografía y fase de las películas formadas con los látex analizados en esta sección. Podemos ver en las imágenes de fase superficies más homogéneas en las películas que no contienen AA (S3 y S7), mientras que en los films que contienen este monómero puede observarse la presencia de partículas parcialmente coalescidas en la superficie. La menor capacidad de coalescencia de los NGs que contienen AA puede deberse al aumento de Tg de la fase rica en acrílicos. Este resultado también se refleja en los valores de RMS expresados en la Tabla 3.20, que indican un aumento de rugosidad en los films con AA y mayor aun cuando la cantidad empleada es superior (S9).

Tabla 3.20. Rugosidad superficial de los films S3, S7, S9 y S10.

Muestra	Contenido de AA (%)	RMS (nm)
S3	-	8.5 ± 0.9
S9	10.0	33.2 ± 7.0
S7	-	5.3 ± 0.5
S10	3.3	13.4 ± 0.2

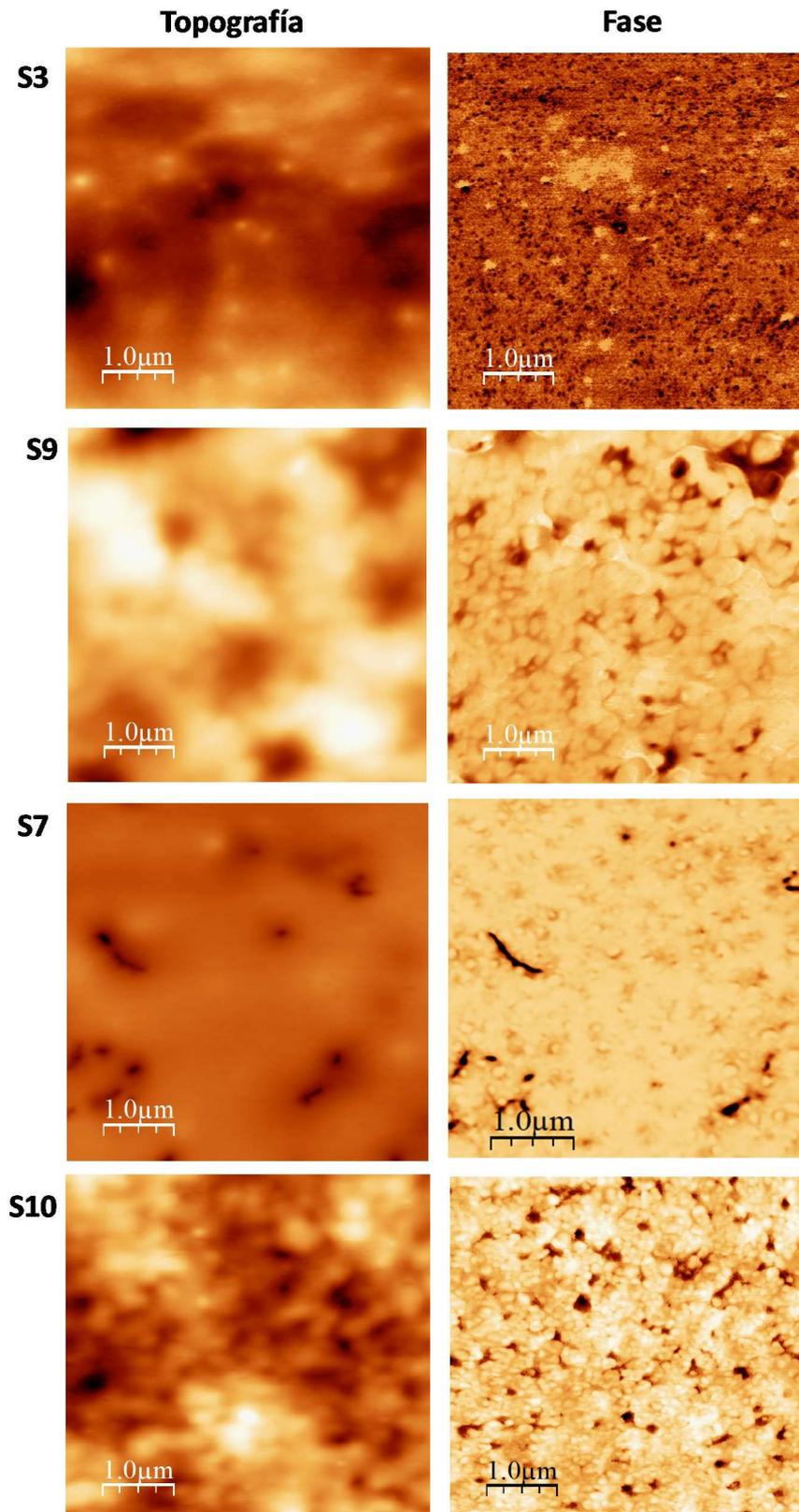


Figura 3.52. Imagen de AFM de topografía y fase de los films S3, S7, S9 y S10.

En la Figura 3.53 se muestran las imágenes de TEM de un corte transversal de las películas S3 y S9, teñidas con acetato de uranilo. En ellas se puede ver que los NGs conservan

su morfología en las películas luego de la coalescencia, donde se observa la presencia de sus dos fases observadas en las imágenes de TEM de los NGs. En la muestra correspondiente a la película S9 se observa una mayor definición de los lóbulos acrílicos de los NGs, debido a la menor coalescencia (menor deformación e interpenetración entre partículas) a causa de su mayor Tg.

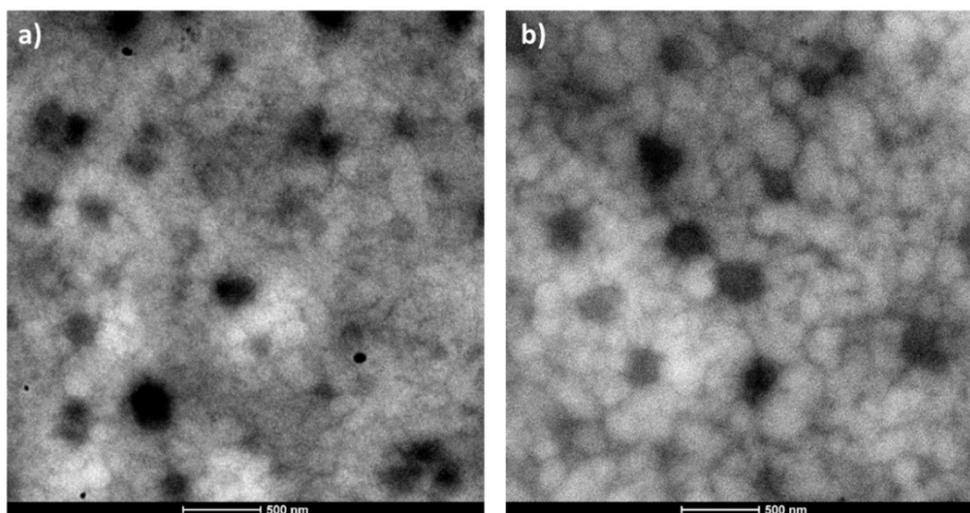


Figura 3.53. Imágenes de TEM del corte transversal de las películas S3 (a) y S9 (b).

El aumento de la rugosidad superficial y el menor grado de coalescencia de los NGs con incorporación de AA, a causa de una mayor Tg de la fase acrílica se traduce también en un aumento de la opacidad en la película formada. En la Figura 3.54 se muestra la película formada por los NGs bifuncionales S7 y S10, donde se observa un leve aumento de la opacidad de la película que contiene AA.



Figura 3.54. Foto de las películas formadas con los NGs S7 y S10.

Los resultados de absorción de agua se presentan en la Figura 3.55. Las películas con AA presentan mayor velocidad y capacidad de absorción de agua. Además, el peso perdido al final del ensayo fue de 10 y 13.5 % para las películas S3 y S9 respectivamente, y de 13.1 y 21 % para las películas S7 y S10 respectivamente. Estos resultados muestran que los materiales que contienen AA son levemente menos resistentes a la inmersión en agua. Esta mayor afinidad al agua de las películas formadas con los NGs que tienen AA se ve reflejada también en el menor ángulo de contacto medido para S9 y S10 frente a los medidos en S3 y S7 (Figura 3.56).

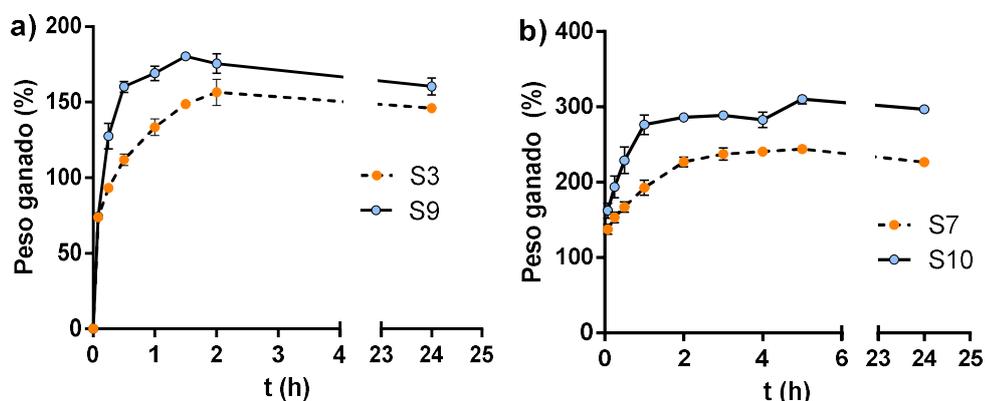


Figura 3.55. Absorción de agua de las muestras S3 y S9 (a), S7 y S10 (b).

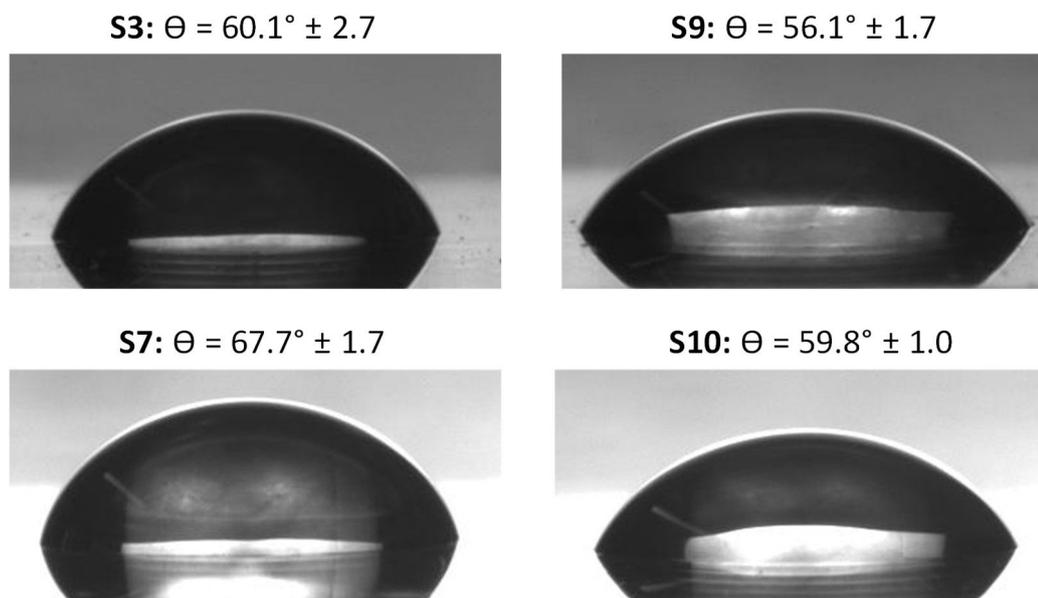


Figura 3.56. Ángulo de contacto medido para las películas S3, S7, S9 y S10.

Debido a que la política de adición de VCL no cambio en la síntesis de los NGs y se obtiene una fase de PVCL con grado de entrecruzamiento similar sin modificación de su Tg

(Tabla 3.19), es esperable que tanto los NGs como las películas tengan respuesta térmica equivalente. En la Figura 3.57 se muestra la respuesta térmica de los cuatro materiales en función de $\bar{\alpha}$, mientras que en la Tabla 3.21 se resumen los valores de VPTT y de la capacidad de hinchamiento. Con la excepción de la muestra S10, la respuesta térmica tanto de los NGs como de las películas formadas no se ven significativamente alteradas por la incorporación de AA. En la muestra S10 la diferencia entre la respuesta térmica del film y los NGs es más pronunciada que en los otros sistemas, donde los NGs presentan una VPTT de 40 °C, muy superior a la observada para la película (30 °C). Esta diferencia puede deberse en parte a que la película S10 es la que mostró una menor resistencia al agua, lo que podría influir en el peso determinado a lo largo del ensayo de respuesta térmica. El aumento en la capacidad de hinchamiento tanto de los de los films como de los NGs S9 y S10 respecto de sus homólogos sin AA, concuerda con la mayor afinidad por el agua otorgada por la incorporación de AA.

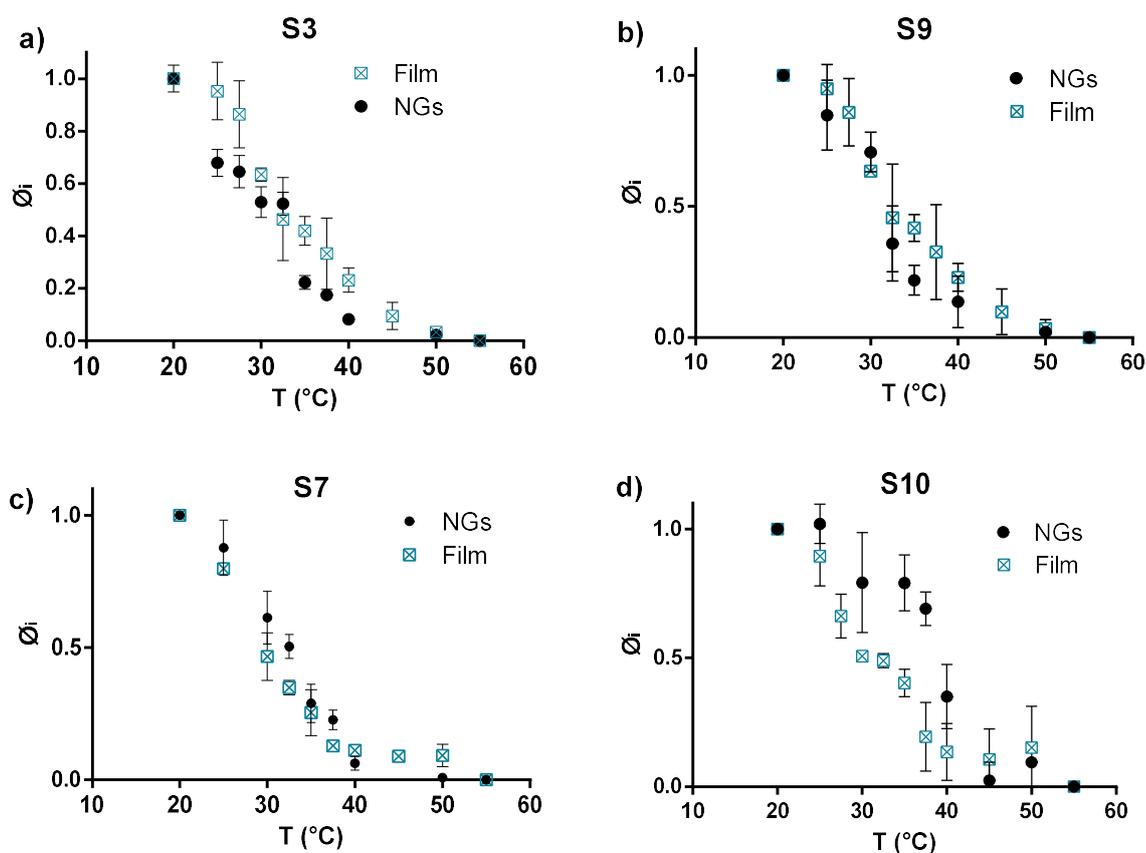


Figura 3.57. Respuesta térmica de los NGs y las películas S3 (a), S9 (b), S7 (c) y S10 (d).

Tabla 3.21. VPTT y capacidad de hinchamiento de los NGs y películas S3, S7, S9 y S10.

	S3		S7		S9		S10	
	NGs	Film	NGs	Film	NGs	Film	NGs	Film
VPTT (°C)	32.5	32.0	32.5	35.0	32.0	32.0	40.0	30.0
Capacidad de hinchamiento (%)	1869	214	1237	171	2079	220	1326	262

3.8. Conclusiones

El control de la composición y la morfología de las partículas obtenidas mediante polimerización en emulsión de dos comonómeros con diferentes reactividades y solubilidades en agua, como VCL y BA, resulta difícil si la reacción se realiza de manera discontinua. Es por ello, que en este Capítulo se diseñó una estrategia semicontinua, basada en la dosificación continua de VCL y de monómeros acrílicos, para la obtención de NGs bifuncionales con morfología y composición controlada. Estos NGs presentan una morfología lobular, donde el núcleo está formado por PVCL entrecruzada con BIS y la coraza, en forma de lóbulos, está compuesta por una fase rica en BA de baja Tg.

La Figura 3.58 compara a modo de ejemplo algunas propiedades de los NGs S3 obtenidos con la estrategia semicontinua desarrollada y su homólogo producido de manera discontinua (B5), donde la VCL y el BA se alimentan al inicio de la polimerización. Tal como se esperaba, los NGs obtenidos mediante la polimerización discontinua muestran una única fase, con una débil respuesta térmica, debido a la ausencia de una fase de PVCL. Además, los NGs obtenidos mediante polimerización discontinua tienen una pobre capacidad de formación film, dando lugar a películas con baja flexibilidad y quebradizas.

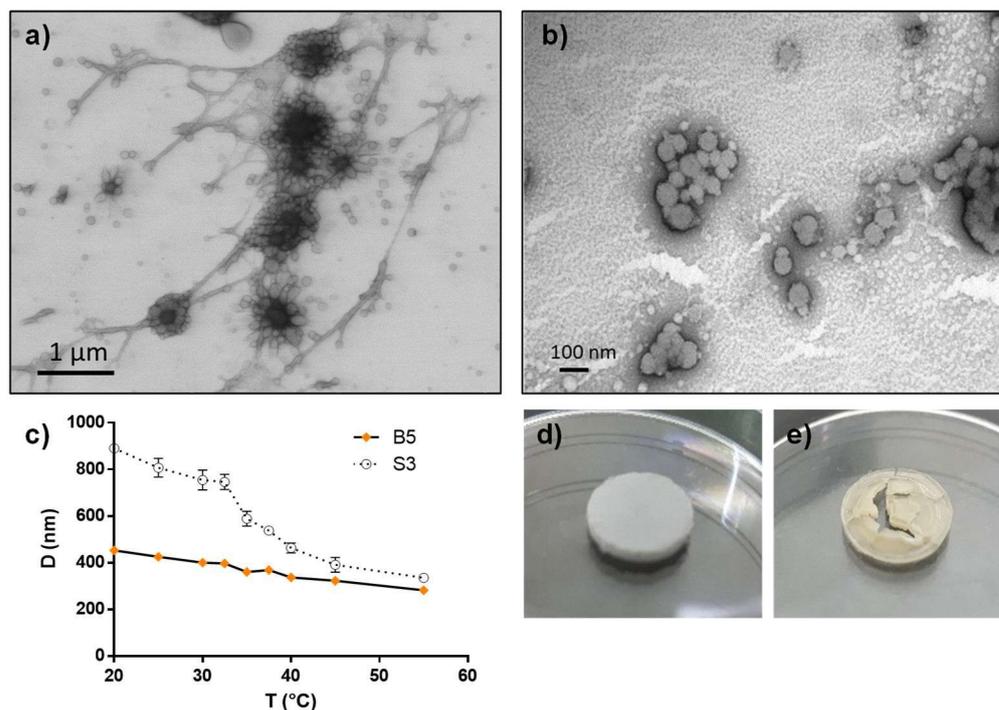


Figura 3.58. Comparación de los NGs bifuncionales S3 y de su homólogo obtenido por polimerización discontinua (B5). Morfología de los NGs bifuncionales S3 (a) y de los NGs B5 (b), Respuesta térmica de NGs S3 y B5. Películas obtenidas a partir de los NGs S3 (d) y B5 (e).

Se demostró que la cantidad de BA empleada en la síntesis tiene una fuerte influencia en la capacidad de coalescencia de las partículas, de manera que empleando un mínimo de 50% de BA con respecto a VCL se logra obtener películas resistentes a la inmersión en agua y con buenas propiedades mecánicas, que permiten su manipulación para una aplicación como parche de liberación transdermal.

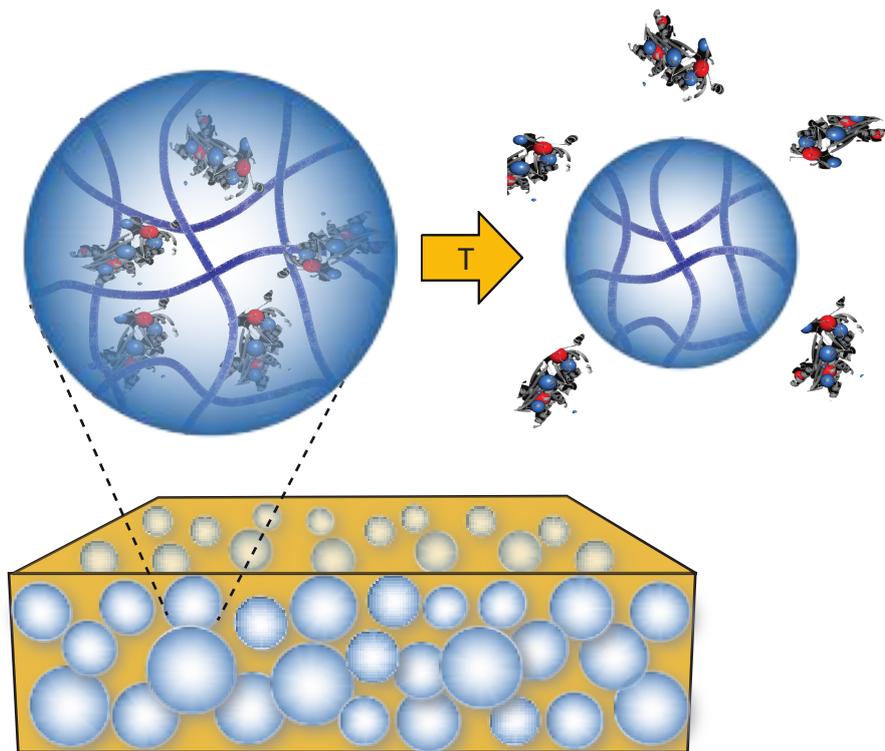
La variación de la velocidad de dosificación de ambos monómeros permitió establecer que mediante la alimentación más lenta de los comonómeros se pudo controlar la composición de la fase lobular de los NGs. A su vez, la disminución en dicho parámetro produjo un decrecimiento de la capacidad de hinchamiento de los NGs y diferentes morfologías de partícula, la cual influye en las propiedades de las películas. Por otro lado, la modificación en la composición monomérica dosificada permitió modificar la composición de los NGs. Se demostró que es necesario generar en la fase lobular un copolímero que contenga en su composición VCL para lograr una buena compatibilización entre las fases y conservar las propiedades deseadas

de ambas fases en los NGs biofuncionales (termosensibilidad por parte de la PVCL y baja Tg con capacidad de coalescencia por parte de la fase acrílica).

El agregado de AA en la fase acrílica de los NGs bifuncionales produjo un aumento de la Tg de esta fase, generando películas con menor grado de coalescencia y menor resistencia al agua (mayor pérdida de masa al final del ensayo), pero con mayor capacidad de hinchamiento.

Capítulo 4

Aplicación *in vitro* de los NGs bifuncionales como sistema de liberación dermal de proteínas



4.1. Introducción

Los sistemas de vacunación transdermal persiguen la activación de las células inmunocompetentes presentes en la piel, que permiten desencadenar una respuesta inmuno-específica contra un determinado patógeno. Las células de Langerhans son eficientes células presentadoras de antígeno, capaces de inducir respuestas inmunológicas específicas y su activación es clave para alcanzar una vacunación efectiva.² Dichas células se encuentran en la epidermis, y en consecuencia para lograr una vacunación transdermal efectiva es necesario transportar el inmunógeno hasta dicha capa de la piel.

Una plataforma de vacunación transdermal debe ser capaz de alojar una proteína o péptido inmunogénico en su interior, para almacenarlo y transportarlo preservando su actividad biológica hasta el momento de la aplicación. La liberación de la proteína o péptido debe ocurrir durante el intervalo de tiempo requerido según la aplicación, e idealmente liberar la totalidad de la carga para obtener una mayor eficiencia. Además, el sistema debe interactuar con la estructura compacta del estrato córneo (SC) para permitir el paso de la proteína a través de dicha capa. El SC está compuesto por células muertas y lípidos ordenados, y constituye la barrera externa de la piel con un espesor de 5 a 20 μm . Existe una amplia bibliografía que demuestra que los lípidos, situados en el espacio extracelular del SC, desarrollan la función de controlar la barrera cutánea.⁹⁸ Por ello, una exposición continuada o repetida del estrato córneo al agua puede provocar una importante alteración de la ordenación de estos lípidos extracelulares, volviendo más permeable esta barrera.⁹⁹

Debido a que el objetivo final de esta Tesis es emplear los NGs bifuncionales para producir un sistema de vacunación transdermal, mediante la formación de una película de aplicación tópica, es importante estudiar la capacidad del sistema para facilitar la penetración de una proteína inmunogénica en las capas inmunocompetentes de la piel. En principio, la alta hidratación local generada por los NGs, junto con la oclusión provocada por la película continua del parche formado, constituyen una ventaja para esta propuesta. En este Capítulo se pretende evaluar la capacidad de la película formada a partir de los NGs bifuncionales de liberar una

proteína antigénica en la epidermis. Para ello, se estudió la carga y liberación de una proteína antigénica, bajo diferentes condiciones. Además, se analizó el perfil de penetración en piel de esta proteína liberada a partir de la película de NGs. Estos estudios se realizaron con el objetivo de conocer los parámetros que permitan regular la liberación dermal de una proteína inmunogénica a partir de una película formada con los NGs bifuncionales sintetizados en esta Tesis.

4.2. Trabajo experimental

Para llevar a cabo los ensayos se seleccionó los NGs S9 y con las proteínas inmunogénicas modelos ovoalbúmina (OVA) y albúmina de suero bovino (BSA). A continuación, se describen los detalles de los procedimientos y métodos utilizados en este Capítulo.

4.2.1. Materiales

La Tabla 4.1 contiene la descripción de los reactivos que se utilizaron a lo largo del trabajo experimental del presente Capítulo. Todos los reactivos se utilizaron como fueron recibidos sin ninguna purificación adicional. El agua empleada a lo largo de todo el trabajo fue destilada y desmineralizada (DDI).

Tabla 4.1. Descripción de los reactivos empleados durante el trabajo experimental.

Reactivo	Abreviatura	Función	Proveedor	Pureza
Albúmina de suero bovino	BSA	Proteína inmunogénica	Aldrich	99%
Albúmina de huevo	OVA	Proteína inmunogénica	Aldrich	98%
Isocianato de fluoresceína	FITC	Marcador fluorescente	Aldrich	90%
Dimetil sulfóxido	DMSO	Solvente	Aldrich	99.9%
4',6-diamidin-2-fenilindol	DAPI	Marcador fluorescente	Diovana	
anti-OVA ab181688	-	Anticuerpo de conejo anti-OVA	Abcam	
Alexa-594 anti-IgG ab150080	-	Anti-anticuerpo de conejo marcado	Abcam	

4.2.2. Capacidad de carga de los NGs

Para determinar la capacidad de carga de OVA de los NGs bifuncionales se empleó el mismo procedimiento descrito en la sección 2.2.3.6 del Capítulo 2. Los NGs se expusieron a una temperatura de 40 °C, se disolvieron 4 mg de OVA en la dispersión de NGs y se incubó a 4 °C durante 48 hs. Luego, se separó la proteína libre de los NGs cargados mediante ultrafiltración con tubos VIVASPIN con membranas de 300 KDa. La concentración de OVA que no fue cargada en los NGs se determinó por espectroscopía UV a 280 nm.

4.2.3. Respuesta térmica de los NGs cargados con OVA

Se estudió la respuesta térmica de los NGs S9 cargados con OVA. Para ello se realizaron mediciones del D de los NGs en función de la temperatura en PBS, empleando una concentración de NGs de 1 mg/mL. El equipo utilizado fue un Malvern Zetasizer Nano ZS ZEN3600 con láser de He-Ne empleando un ángulo de dispersión de 173°. Se midió el diámetro de los NGs en el rango de temperatura de 20-55 °C, con un intervalo entre mediciones de 0.5 °C y dejando 2.5 minutos de estabilización una vez alcanzada cada temperatura para realizar la medición.

4.2.4. Formación del parche a partir de los NGs S9

Para formar los parches cargados con proteínas se evitó el empleo de los moldes de silicona utilizados en la formación de las películas que se estudiaron previamente. Debido al moderado contenido de sólidos de los látex, las películas formadas en estos moldes contienen bordes, por lo que se desperdicia esta parte de las películas (Figura 4.1a). Además, esta forma de obtención de los parches requiere un paso posterior a la formación del film en donde se corta el parche con la forma y el tamaño deseado. Cuando se realiza este paso se pierde una gran cantidad de proteína, la cual queda en los fragmentos excedentes del film cortado, que no se emplean en ningún ensayo. Además, si la distribución de la proteína no fuera homogénea a lo largo de todo el film, no podría conocerse de manera precisa la cantidad de proteína presente en cada espécimen. Teniendo en cuenta estos factores, la formación de los parches cargados se realizó empleando el siguiente protocolo.

Se prepararon “moldes” que consisten en jeringas de 3 mL, de 1 cm de diámetro, las cuales se cortaron transversalmente en el extremo superior. En el émbolo se colocó una pieza de teflón con una superficie lisa, para favorecer la fácil extracción del parche una vez formado. En la Figura 4.2 se muestran las piezas empleadas para armar los moldes (a) y un molde armado (b). El látex se carga en el molde y se deja evaporar. A medida que el agua se va evaporando se mantiene el borde del cilindro de la jeringa coincidiendo con la altura del látex (Figura 4.3). De esta forma, se obtiene un parche circular con 1 cm de diámetro, 1 mm de espesor y sin bordes levantados (Figura 4.1b).

Para la formación de los parches conteniendo la proteína inmunogénica de interés, se disuelve previamente la misma en el látex, se coloca el sistema en la heladera para evitar la descomposición de la proteína y se lleva a cabo la formación de la película de acuerdo al procedimiento de la Figura 4.3. Con este procedimiento parte de la proteína se encuentra contenida dentro de los NGs, mientras que una fracción se ubicará en los intersticios entre los NGs del parche. De esa manera, se evita el proceso de separación de la proteína no incorporada en los NGs y la totalidad de la proteína adicionada queda formando parte del parche.

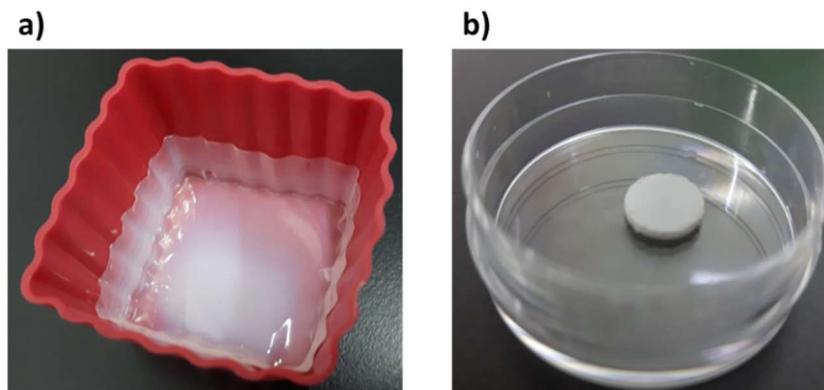


Figura 4.1. Parche formado en molde de silicona (a) y en el molde de jeringa (b).

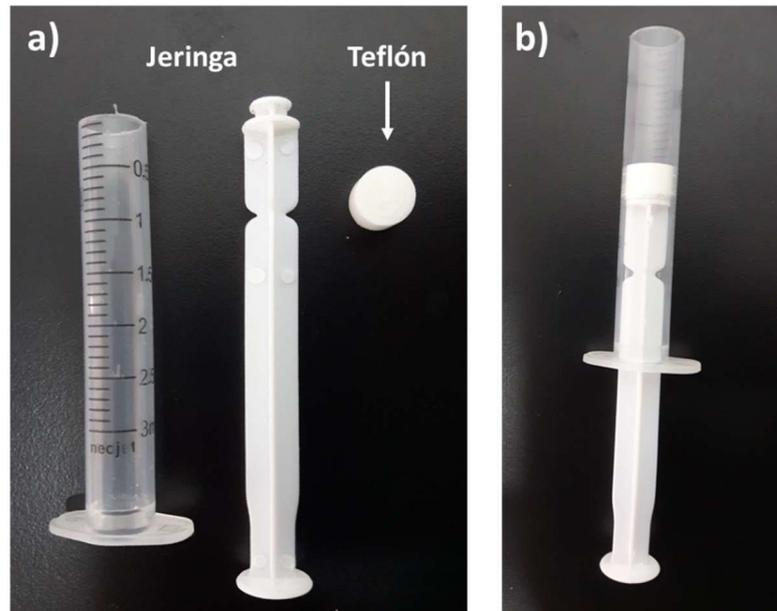


Figura 4.2. Molde de jeringa para la formación de parches.

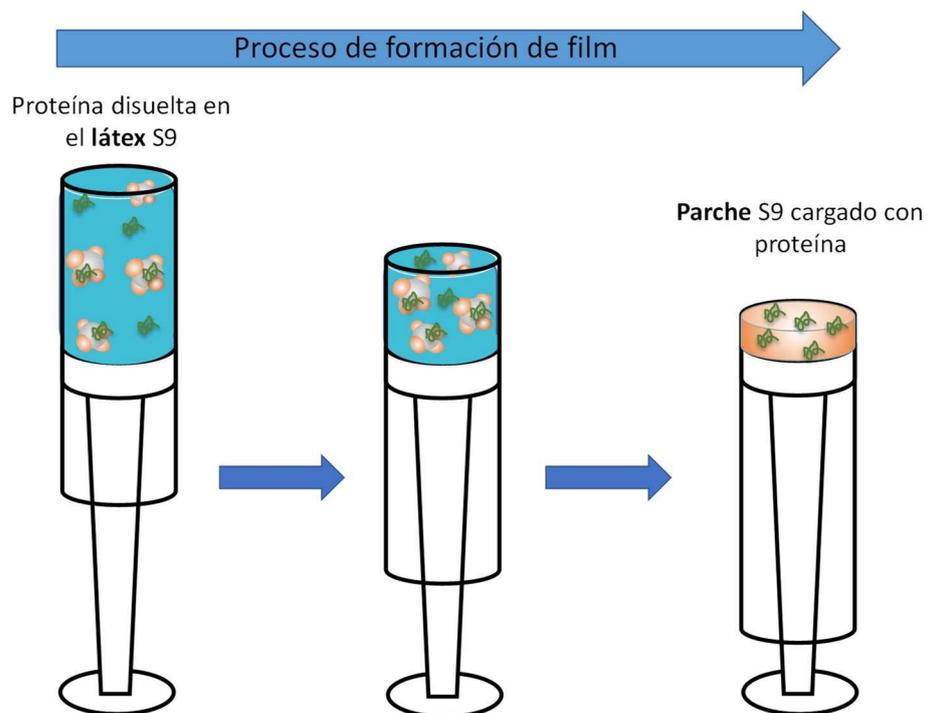


Figura 4.3. Procedimiento de formación del parche a partir del látex S9 con la incorporación de una proteína inmunogénica.

4.2.5. Ensayos de liberación *in vitro*

Los ensayos de liberación *in vitro* se realizaron por inmersión del parche cargado con la proteína, en 2 mL de PBS. La liberación se realizó a 25 y 37 °C y se tomaron muestras con reposición del medio de liberación a intervalos de tiempo regulares. La concentración de la

proteína liberada en el tiempo se determinó por espectroscopía UV. Los resultados se reportan como el % acumulado de proteína liberada, respecto de la cantidad cargada en el parche.

En el caso del estudio de liberación *in vitro* de los NGs cargados con la proteína se empleó el procedimiento descrito en la sección 2.2.3.7 del Capítulo 2. Empleando tubos Float-A-Lizer G2, dotados de un tubo de membrana de 300 KDa de 1 mL de capacidad donde se cargó la dispersión de los NGs (5 mg/mL de NGs) cargados con OVA y un reservorio de 6 mL para el medio de liberación (PBS). A diferencia del parche, en este caso los NGs cargados fueron separados de la proteína libre antes de realizar el ensayo, por lo tanto, la proteína sólo se encuentra dentro de los NGs (sección 2.2.2.6 del Capítulo 2).

4.2.6. Marcado fluorescente de proteínas

Para marcar fluorescentemente la OVA se empleó isocianato de fluoresceína (FITC) siguiendo el protocolo reportado por McDonagh y col.¹⁰⁰ En primer lugar se disolvió 0.05 g de FITC en 0.5 mL de DMSO y luego se adicionaron 5 mL de un buffer de carbonato-bicarbonato (pH = 9). El FITC es una molécula grande, con muchos anillos en su estructura, y que forma un cristal difícil de romper; por ese motivo requiere el primer paso de solubilización en DMSO. Por otro lado, se disolvió 1 g de OVA en 24 mL del mismo buffer. Esta solución de proteína se colocó en un baño de hielo con buena agitación y se agregó gota a gota la solución de FITC. Finalmente, la reacción se mantuvo durante una noche con agitación. La proteína marcada fue separada del FITC sin reaccionar por diálisis.

4.2.7. Distribución de la OVA en el parche

Para analizar la distribución de la proteína inmunogénica modelo, OVA, en el parche cargado, se empleó microscopía confocal. Un láser aplicado en la muestra hace que moléculas de OVA marcadas con FITC se exciten y emitan fluorescencia, eliminando además la luz reflejada o fluorescente procedente de los planos fuera de foco. El láser se aplica sobre una pequeña sección en forma de barrido, que penetra la muestra, obteniendo así imágenes de diferentes planos focales que permiten el análisis tridimensional de las estructuras analizadas.

Las muestras se prepararon formando parches de 1 mm de altura y 1 cm de diámetro, con 1 mg de OVA marcada fluorescentemente con FITC. Las imágenes se tomaron con un microscopio confocal invertido marca Leica, Modelo TCS SP8, a diferentes planos del parche. La distribución de la OVA se evaluó cualitativamente obteniendo imágenes en distintas zonas del parche. En la Figura 4.4a se muestra un esquema del parche donde se señalan las superficies definidas respecto a su posición en el momento de la formación del parche. Esta misma conformación se empleó en la observación con el microscopio confocal, ubicando la superficie en contacto con el molde (CM) sobre el portaobjetos. En la Figura 4.4b se muestra un esquema del parche y la ubicación de los campos (A, B, y C) observados con el microscopio, es decir, en el centro y en dos zonas periféricas del parche.

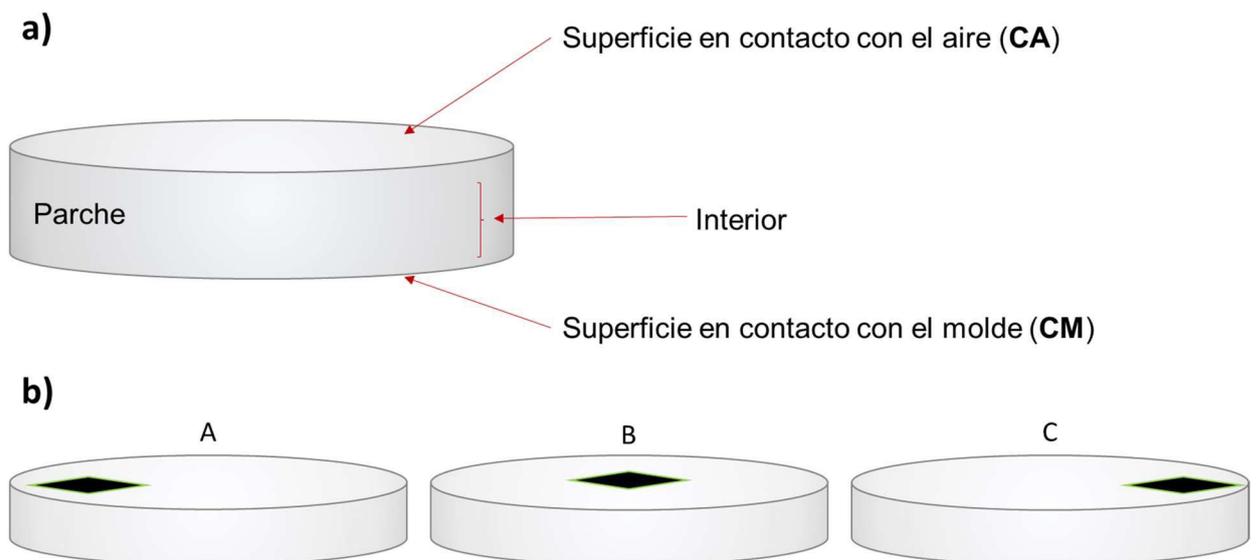


Figura 4.4. Superficies del parche (a) y ubicación de los campos (A, B, y C) observados con el microscopio confocal (b).

4.2.8. Ensayos de penetración de OVA en piel humana

La capacidad del parche para facilitar la penetración de OVA en la piel se evaluó utilizando modelos de piel humana contruidos *in vitro* y piel humana *ex vivo*. En ambos medios de penetración se trabajó con piel intacta y piel deficiente de barrera, de manera de evaluar la penetración de OVA en ambas condiciones. Estos ensayos se realizaron en colaboración con el grupo de Sarah Hedtrich del Instituto de Farmacia de la Universidad Libre de Berlín (Alemania),

durante mi estadía en el grupo de Marcelo Calderón del Instituto de Química y Bioquímica de dicha Universidad.

Modelos de piel

Los modelos de piel fueron construidos por el grupo de Sarah Hedtrich según el protocolo reportado por Alnasif y col.¹⁰¹, el cual está representado esquemáticamente en la Figura 4.5. En primer lugar, se incuban fibroblastos soportados en colágeno que forman la dermis, luego keratinocitos para formar la epidermis y, finalmente el medio de cultivo se deja evaporar de manera que se forme una capa delgada de keratinocitos en contacto con el aire que forman el estrato córneo.

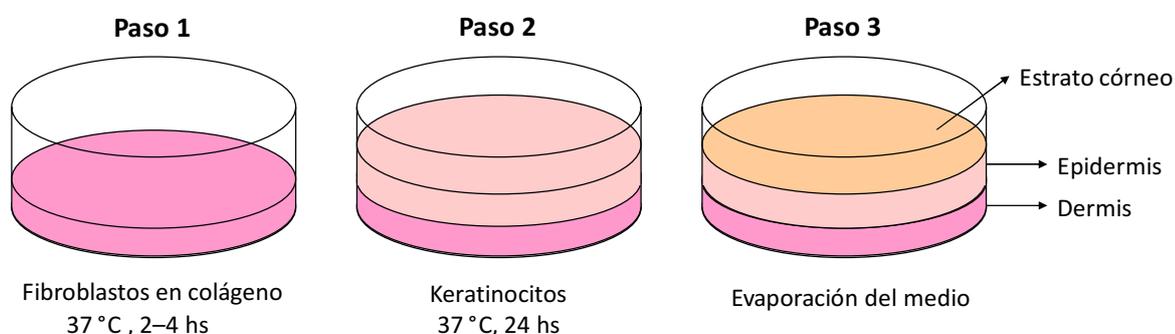


Figura 4.5. Protocolo de construcción de los modelos de piel.

Para generar las condiciones de piel deficiente de barrera se construyeron los modelos en presencia de Factor de necrosis tumoral α (TNF α por sus siglas en Ingles), una citoquina pro-inflamatoria que está presente cuando se generan lesiones en la piel.

Piel humana ex vivo

Las biopsias de piel se obtuvieron de cirugías plásticas de rutina con consentimiento escrito y ético (EA1 / 081/13) en el Hospital Universitario Charité, de la Universidad Libre de Berlín. Se tomaron muestras de tres donantes: piel de busto de mujer de 33 años (biopsia fresca), piel de abdomen de hombre de 32 años (congelada por 37 días antes del experimento) y piel lumbar de mujer de 45 años (congelada por 64 días antes del experimento). Las biopsias *ex vivo* se seccionaron en áreas circulares de 20 mm de diámetro. Las secciones se tomaron de regiones inalteradas de la piel o áreas previamente sometidas a tape stripping (50 veces). Esta última

técnica se realiza para debilitar o extraer parte del SC mediante la aplicación y remoción reiterada de una cinta adhesiva. En la Figura 4.6 se muestran imágenes de cortes transversales de la piel tomadas con un microscopio óptico. A la izquierda se señalan las diferentes capas de la piel y a la derecha se muestra como se observan las biopsias intactas y luego de 50 tape stripping. Puede verse que el SC casi no se percibe en la imagen de la piel tratada con tape stripping, indicando la deficiencia de barrera de la piel.

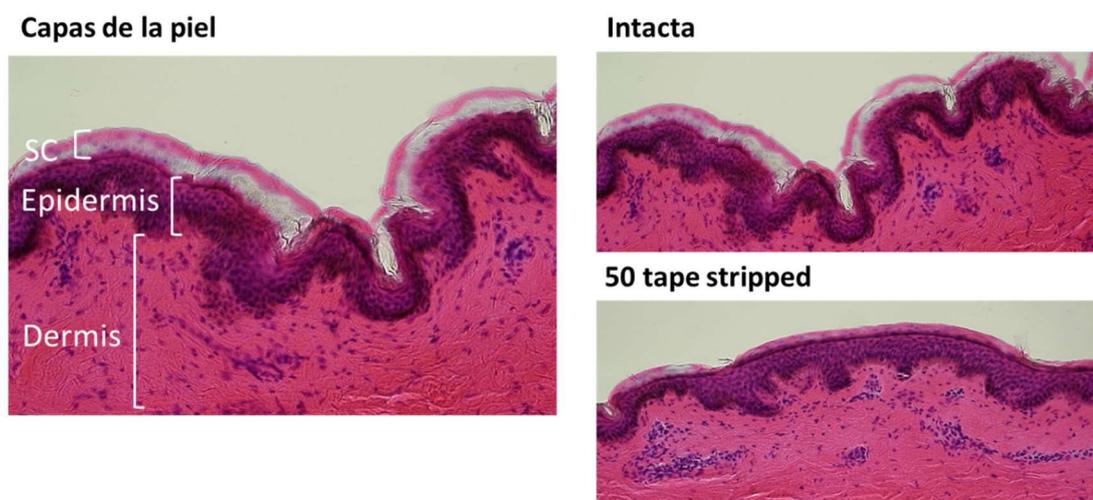


Figura 4.6. Imágenes de cortes transversales de la piel.

Ensayos de penetración de OVA en piel

El látex S9 dializado se esterilizó mediante radiación UV por 30 min. En moldes estériles y bajo campana de esterilidad se secaron 0.4 mL de látex (100 mg/mL de NGs) y una cantidad exacta de OVA. Una hora y media antes del ensayo se hidrató el parche con 0.15 mL de PBS estéril y luego se los aplicó sobre la piel.

Para evaluar si la OVA es capaz de penetrar la piel sin la intervención del sistema de liberación, se realizó un ensayo donde se aplicaron 50 μ L de una solución de OVA (2.5 mg/mL) en PBS directamente sobre la piel.

Una vez que los parches y la solución de OVA fueron aplicados sobre la piel, se incubaron por 6 hs aplicando un gradiente de temperatura de 30 a 37 °C, y posteriormente se retiraron los parches. La piel se cortó en secciones transversales de 8 μ m de espesor con un micrótomo (Leica CM1510, Leica Biosystems), se fijó con paraformaldehído al 4 % y se tiñó la OVA

inmunológicamente (anti-OVA ab181688; Alexa-594 anti-IgG de conejo marcada ab150080, Abcam). Las secciones se contratiñeron con 4',6-diamidin-2-fenilindol (DAPI) (Dianova) y se obtuvieron imágenes mediante microscopía de fluorescencia (BZ-8000Keyence, Neu-Iseburg, Alemania; objetivos 20x / 0.75, zoom 20x, Plan-Apo, DIC N2). Las imágenes se analizaron utilizando el software de análisis de imágenes FIJI.

En la Figura 4.7 se muestran imágenes de una misma sección de piel con diferente información, derivadas del empleo de diferentes longitudes de onda en el láser del microscopio confocal. En la Figura 4.7a se observa la señal del DAPI, el cual se une fuertemente al ADN, pero no puede penetrar la membrana celular, de manera que solo es capaz de teñir células muertas. En esta aplicación el empleo de DAPI permite distinguir las capas de la piel, ya que en el SC y la epidermis hay una cantidad de células muertas mucho mayor que en la dermis. En las Figuras 4.7 b y c se observa la señal del anti-OVA marcado fluorescentemente. En la primera se puede distinguir diferentes cantidades de OVA mediante el empleo de una escala de colores, donde el negro indica ausencia de OVA y el blanco la máxima concentración, el cual se denomina mapa de temperaturas. En la Figura 4.7c se observa solo el anti-OVA en rojo, para ver su distribución. En algunos casos se superponen la imagen a y c para visualizar más fácilmente la distribución de la OVA en las distintas capas de la piel.

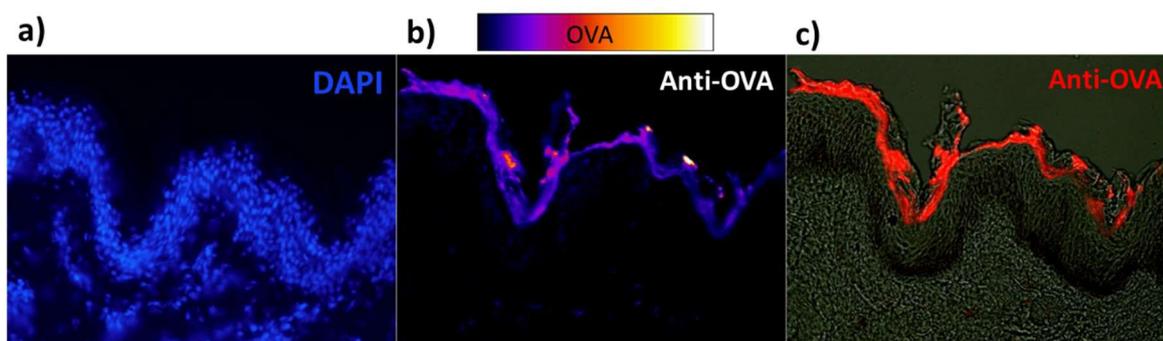


Figura 4.7. Imágenes de microscopía de fluorescencia de una sección de piel donde se observan los tres marcadores: DAPI (a); mapa de temperatura (b) y Anti-OVA en rojo (c).

4.3. Propiedades del sistema cargado con OVA

La forma de carga de los parches permite que toda la proteína que se agrega a la dispersión quede formando parte de la película obtenida al final del proceso. Esto resulta una ventaja ya que puede conocerse con precisión la cantidad de proteína cargada y no requiere la separación del analito no incorporado a los NGs. De este modo, la ubicación de la proteína dentro de la película formada puede influir fuertemente en el control de su liberación.

Como se vio en el Capítulo anterior, los NGs bifuncionales presentan propiedades termosensibles debido a la fase de PVCL entrecruzada, permitiendo el control de la liberación de la proteína con la temperatura, mientras que el copolímero de baja Tg no puede ejercer dicho control, pero favorece la formación de la película cohesiva (Figura 4.8).

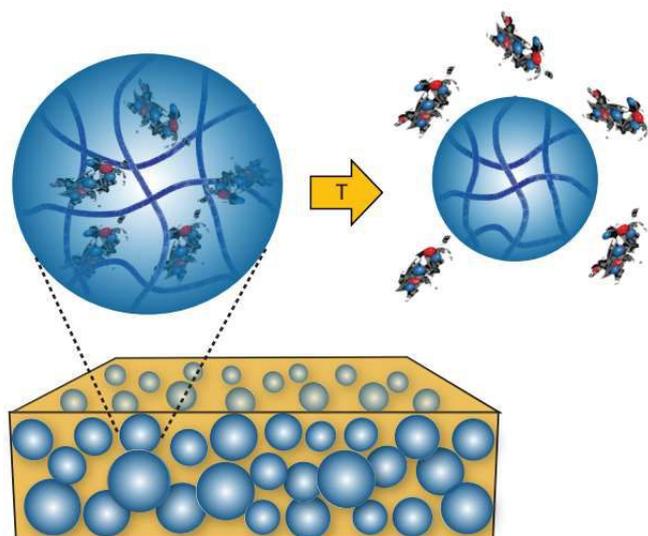


Figura 4.8. Liberación de proteínas controlada por la temperatura en un parche formado con los NGs bifuncionales.

Debido al procedimiento de formación de los parches cargados con la proteína, esta se encontrará distribuida entre el interior de los NGs de PVCL y los espacios intersticiales entre NGs. Si bien los NGs S9 presentan una EE de 60 % para la OVA, es posible que durante el proceso de formación del parche este valor se incremente. El proceso de formación de la película implica la evaporación del agua, la cual se encuentra principalmente como medio disperso y una fracción menor se encuentra dentro de las estructuras hinchadas de los NGs. De esta forma, se

espera que el agua libre se evapore más fácilmente que la atrapada en el interior de los NGs. Esta diferencia en la velocidad de evaporación del agua podría promover la migración de OVA libre, presente en el medio de dispersión, hacia el interior de los NGs donde se evaporaría posteriormente.

4.3.1. Respuesta térmica de los NGs

Las interacciones entre el polímero y las proteínas surgen de mecanismos complejos, que pueden ser predominantemente electrostáticos, efectos hidrófobos (de naturaleza entrópica) y fuerzas de van der Waals.¹⁰² La presencia de dichas interacciones en los NGs bifuncionales cargados con OVA podría afectar su respuesta térmica, la cual se basa en las interacciones de la PVCL con el agua.

Por este motivo, se estudió la respuesta térmica de los NGs S9 cargados con 3 mg de OVA. En la Figura 4.9 se puede ver como la curva correspondiente a los NGs cargados con OVA se encuentra por encima (es decir desplazada a D mayores) de la curva correspondiente a los NGs sin cargar, siendo más notoria la diferencia a temperaturas mayores. Los valores de D mayores de los NGs cargados a bajas temperaturas podría deberse a la presencia del complejo “corona de proteínas”. Por otro lado, los mayores D obtenidos a alta temperatura para los NGs cargados puede deberse a que la OVA no liberada y que se encuentra en el interior de los NGs impide el total colapso de estos. El estudio completo de respuesta térmica demandó aproximadamente 3 hs, y aunque los NGs se hayan expuesto a temperaturas mayores a la VPTT, que favorece la liberación de la OVA, esta no logró liberarse del interior de los NGs en este tiempo. La VPTT determinada para los NGs S9 en ambas condiciones no difiere significativamente, siendo de 32 ± 0.5 °C. Por lo tanto, no puede afirmarse que este parámetro se vea afectado por la presencia de la OVA en el interior de los NGs.

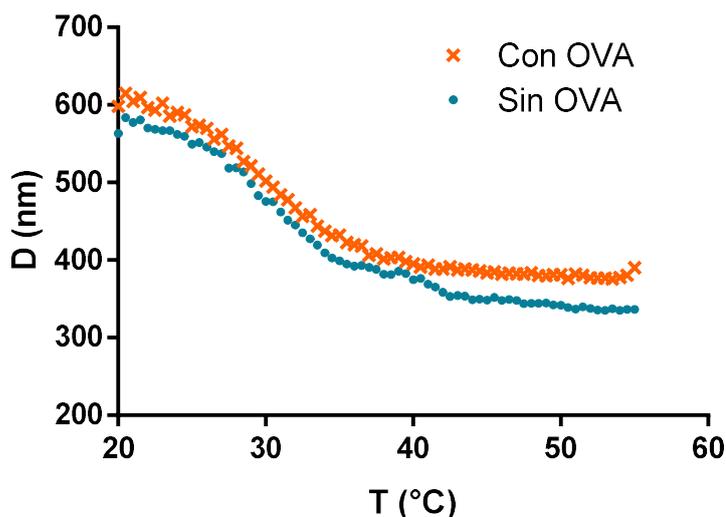


Figura 4.9. Respuesta térmica de los NGs S9 cargados con 3 mg de OVA y sin cargar.

4.3.2. Distribución de la OVA dentro del parche

Si bien no se puede conocer con exactitud la distribución de la OVA en las distintas fases de los NGs bifuncionales, se persiguió el conocimiento cualitativo de su ubicación espacial dentro del parche formado a partir de los mismos. Esta información es relevante, ya que si la proteína se encuentra en la superficie del parche se liberará más rápidamente que si se encuentra en el interior, donde deberá difundir a través de la matriz polimérica, permitiendo un mayor control de la liberación.

En la Figura 4.10 se muestran las imágenes del parche S9 cargado con 1 mg de OVA marcada fluorescentemente. En la primera fila de la imagen se muestran las micrografías de la superficie en contacto con el aire (CA) de los diferentes campos observados (A, B y C) y en las filas inferiores se encuentran las imágenes de fluorescencia obtenidas en planos tomados a distintas profundidades: CA, interior del parche y CM. Puede verse que en las tres zonas del parche en las imágenes tomadas en su interior se observa el color amarillo de la proteína marcada fluorescentemente con mayor intensidad. Este resultado comprueba que la proteína se ubica mayoritariamente en el interior del parche y no en la superficie.

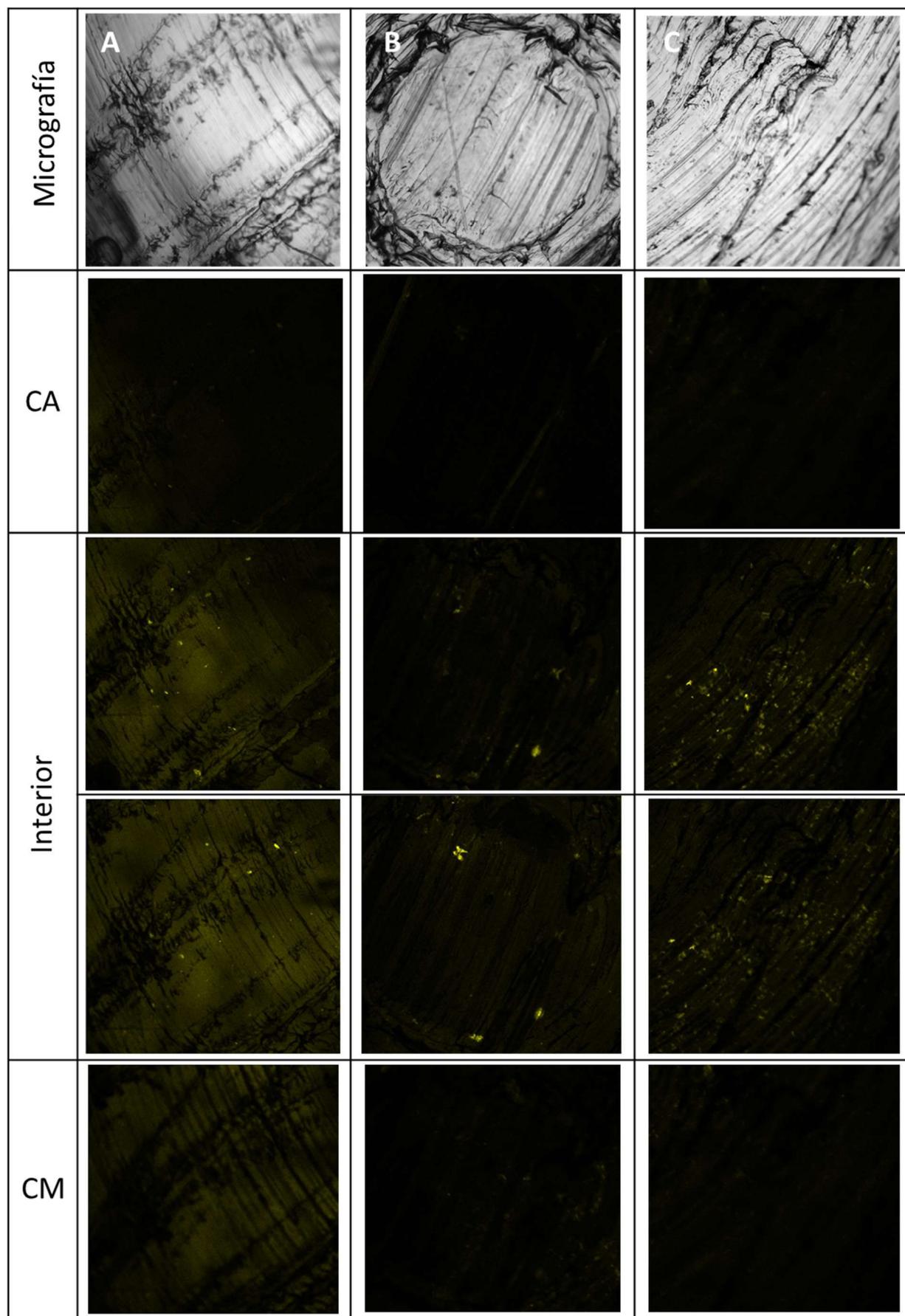


Figura 4.10. Imágenes ópticas y de fluorescencia del parche cargado con OVA.

4.4. Liberación controlada de proteínas

En esta sección se estudió la liberación *in vitro* de proteínas a las temperaturas ambiente (25 °C) y corporal (37 °C), empleando como medio de liberación el buffer PBS. El estado de los NGs a estas temperaturas es diferente, ya que a 37 °C se encuentran por encima de la VPTT, y a 25 °C se encuentran por debajo de la misma. De esta manera, se pretende estudiar la influencia de esta variable sobre los perfiles de liberación. Los ensayos se realizaron empleando diferentes condiciones del sistema a fin de conocer cómo puede modificarse el sistema de manera de regular la liberación para obtener los perfiles deseados.

4.4.1 Liberación de OVA desde NGs y Parche

En la Figura 4.11 se muestran los perfiles de liberación de OVA desde los NGs S9 y desde el parche, conteniendo 2.4 (60 % de 4 mg) y 3 mg de OVA cargada, respectivamente. En primer lugar, se destaca que los sistemas incubados a 37 °C presentaron mayor velocidad de liberación y cantidad de OVA liberada al final del ensayo que a 25 °C. Este resultado es consecuencia de la fuerza impulsora adicional para la difusión de proteínas que genera el colapso de los NGs a 37 °C.

En el caso de los NGs (Figura 4.11a), se puede observar que durante las primeras 20 hs del ensayo, prácticamente no se ven diferencias en la liberación a ambas temperaturas. Esto podría indicar que parte de la proteína cargada en los NGs S9 se encuentra adsorbida en su superficie y no en el interior de los NGs de PVCL. Así, la proteína liberada en este primer período correspondería a esa fracción de proteína que no se encuentra en el interior de los NGs. En cambio, la proteína cargada en la matriz de PVCL entrecruzada (es decir, en el interior de los NGs) es liberada principalmente cuando los NGs se encuentran colapsados (a 37 °C) y queda retenida a 25 °C.

Por otro lado, el perfil de liberación de OVA a partir del parche muestra una liberación dependiente de la temperatura, donde a las 2 hs de comenzado el proceso ya se diferencian las curvas obtenidas a las dos temperaturas (Figura 4.11b). Esto podría deberse a que el proceso

de formación del parche aumente la capacidad de carga de los NGs en la fase termosensible, permitiendo tener control de una mayor cantidad de OVA que en el caso de los NGs. Tanto para los NGs bifuncionales como para el parche producido a partir de estos, no se ve un efecto on-off como en el caso de los NGs de PVCL del Capítulo 2. Esto puede deberse a que la proteína no se encuentra en su totalidad dentro de la estructura de los NGs y, de esta manera, la parte que se encuentra adsorbida en la superficie de los NGs o en los espacios intersticiales entre NGs del parche es liberada a baja temperatura.

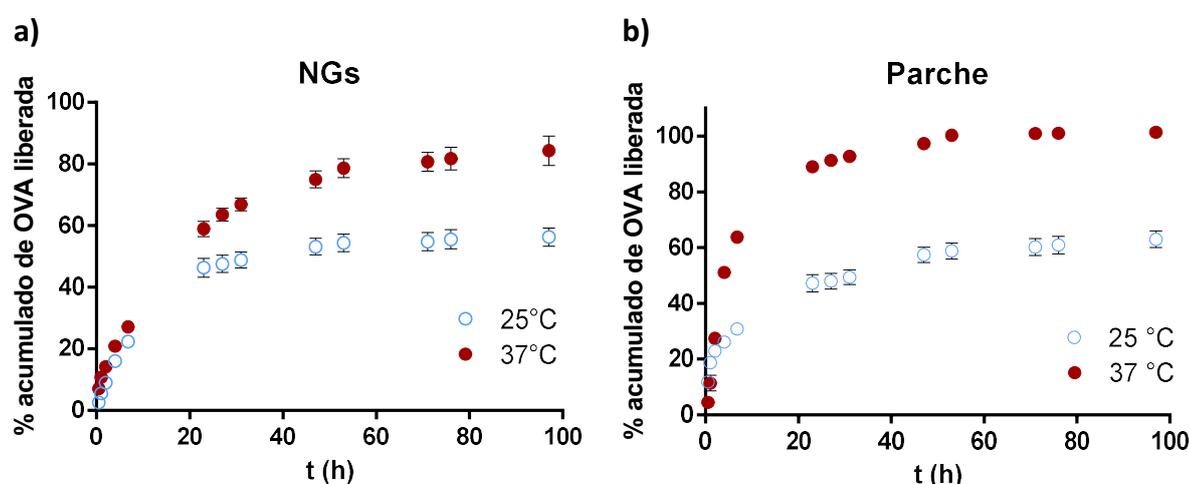


Figura 4.11. Ensayos *in vitro* de liberación de OVA en PBS, desde los NGs S9 (a) y desde el parche S9 (b).

4.4.2. Liberación de proteínas desde parches formados con distintas relaciones proteína/NGs bifuncionales

En el apartado anterior se analizó la liberación de una proteína inmunogénica modelo (OVA) desde el parche formado a partir de los NGs bifuncionales S9. Para ello se disolvió la cantidad deseada de OVA en la dispersión de los NGs, con los que se formó el parche a analizar. Este procedimiento permitió formar un parche con una única relación proteína/NGs bifuncionales igual a 3/22.5. Para investigar el efecto de esta relación sobre la liberación de una proteína inmunogénica se decidió modificar en primer lugar la cantidad de NGs que componen el parche, manteniendo la cantidad de proteína constante, y en segundo lugar variar la cantidad de la proteína cargada, conservando la masa de NGs que constituyen la película. En el primer caso, la modificación del contenido de NGs genera parches con el mismo diámetro (igual superficie de

liberación) pero con diferentes espesores, mientras que en el segundo el espesor y el área de liberación de las películas son constantes.

El contenido de NGs bifuncionales que componen el parche puede controlarse simplemente adicionando diferentes volúmenes de látex en el molde, lo que genera parches con distintos espesores. La Figura 4.12 muestra los perfiles de liberación de OVA cargada en parches que se formaron con 0.4 y 0.8 mL de látex, conteniendo ambos 3 mg de proteína. Los parches así formados presentan relaciones proteína/NGs iguales a 3/22.5 y 3/45, respectivamente.

Se puede ver que en el parche de mayor espesor (proteína/NGs = 3/45, Figura 4.12b) la liberación se produjo más lentamente a ambas temperaturas, con respecto al parche con menor espesor (proteína/NGs = 3/22.5, Figura 4.12a). En los ensayos realizados a 37 °C se observa que el 93 % de la proteína es liberada a las 100 hs a partir del parche con mayor espesor (con 45 mg de NGs), mientras que en el parche más delgado (con 22.5 mg de NGs), dicho porcentaje se libera a las 31 hs. A 25 °C el máximo de liberación en los dos parches es 60 % y se alcanza antes cuando el espesor de la película es menor (a las 60 hs cuando el contenido de NGs es 22.5 mg y a las 97 hs para el parche con 45 mg).

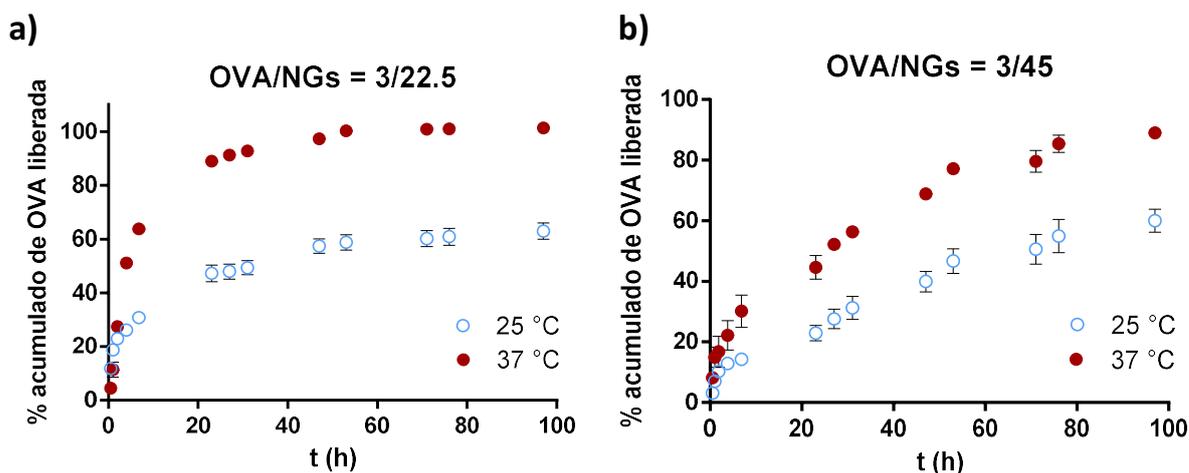


Figura 4.12. Ensayos *in vitro* de liberación de OVA, en PBS, desde parches formados con relaciones proteína/NGs bifunciones de 3/22.5 (a) y 3/45 (b).

El perfil de liberación en sistemas de liberación controlada compuesto por NGs termosensibles, se controla normalmente modificando las propiedades de los NGs como el grado

de entrecruzamiento y el tamaño, propiedades que pueden modificarse únicamente en la síntesis. Los resultados obtenidos en esta sección muestran que, empleando el parche propuesto en esta Tesis, el perfil de liberación puede modificarse sin necesidad de volver a la etapa de síntesis, simplemente cambiando la cantidad de NGs bifuncionales al momento de formar el parche.

A continuación, se analizará el efecto de modificar la relación de proteína/NGs pero manteniendo el contenido de NGs del parche, y por lo tanto su espesor. Para ello, se trabajó con parches obtenidos con 0.4 mL de látex (equivalente a 22.5 mg de NGs) conteniendo tres cantidades diferentes de BSA disuelta, resultando con relaciones de proteína/NG bifuncionales iguales a 1/22.5, 2/22.5, y 3/22.5. La Figura 4.13 muestra el perfil de liberación BSA desde las tres películas cargadas a 25 y 37 °C. Para todas las concentraciones de BSA analizadas, la máxima cantidad de proteína liberada se alcanzó después del segundo día de estudio. Una vez más las películas incubadas a 37 °C presentaron una liberación mayor y más rápida que las de 25 °C, como consecuencia de que el colapso de los NGs a 37 °C constituye una fuerza impulsora adicional para la difusión de la proteína. La liberación final de BSA a 37 °C fue 92, 79 y 81% cuando se usaron 1, 2 y 3 mg de proteína, respectivamente. La proteína también fue liberada desde los parches incluso cuando los NGs estaban hinchados (a 25 °C). Además, el perfil de liberación a 25 °C se acercó al de 37 °C a medida que se aumentó la proteína cargada en la película. Esta tendencia sugiere que cuando se emplea una mayor cantidad de proteína, la fracción que se encuentra en los intersticios entre los NGs del parche aumenta, la cual puede ser fácilmente liberada debido a que no requiere la difusión a lo largo de toda la red polimérica y no depende la fuerza impulsora adicional que otorga el colapso de los NGs de PVCL.

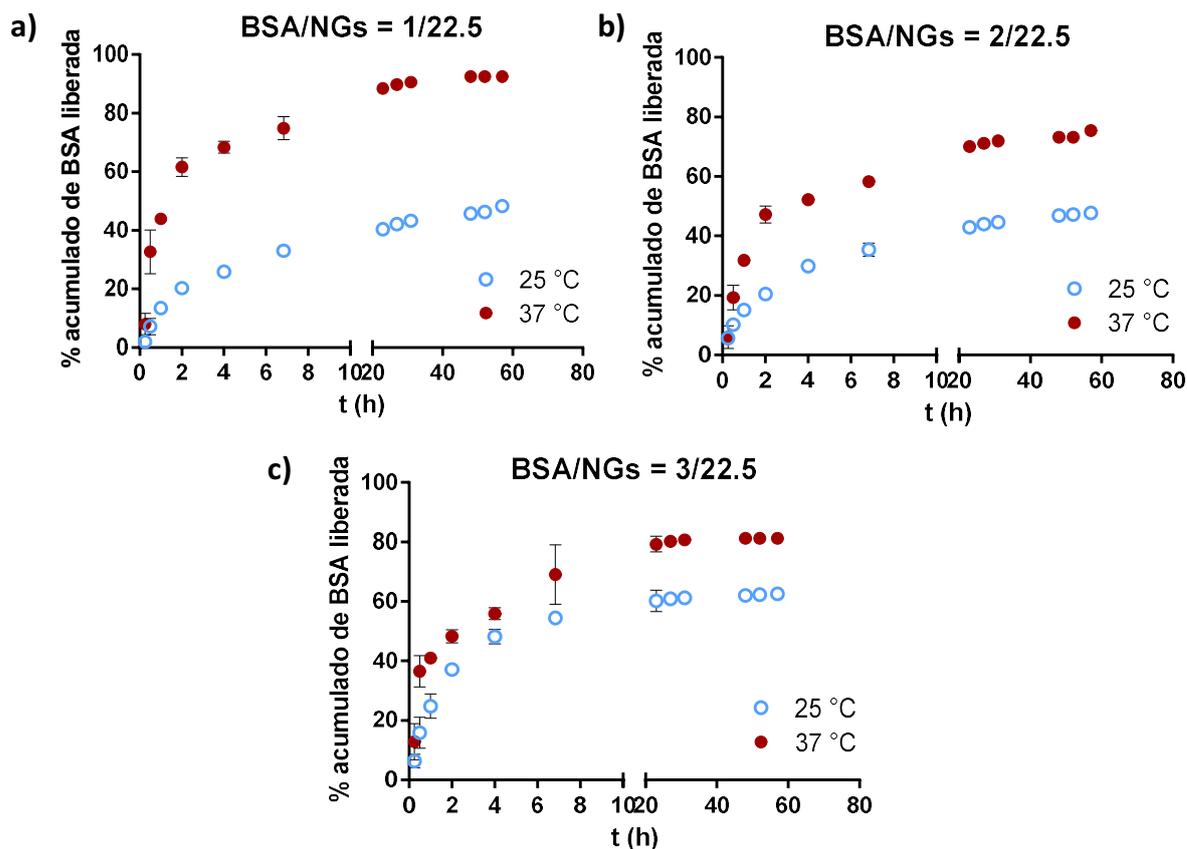


Figura 4.13. Ensayos *in vitro* de liberación de BSA en PBS, desde parches formados con relaciones proteína/NGs bifuncionales iguales 1/22.5 (a), 2/22.5 (b) y 3/22.5 (c).

4.5. Desempeño del parche en liberación tópica de OVA

Para ser empleadas en inmunización transdermal, las plataformas de liberación deben ser capaces de entregar antígenos más allá del SC en la epidermis viable de la piel. Los métodos más utilizados para atravesar dicha barrera son los parches con microagujas^{103,57} y iontoforesis,¹⁰⁴ las dos técnicas más empleadas para vacunación transdermal. Ambos métodos están asociados con diversos riesgos, como la inflamación y la infección, que se deben a una ruptura irreversible del SC.⁶³ En los parches obtenidos a partir de los NGs bifuncionales, los mecanismos no invasivos que pueden favorecer la penetración de una proteína a través del SC son la hidratación local y la oclusión. Si bien constituyen una gran ventaja del sistema, la naturaleza no invasiva de este sistema podría conducir a la obtención de una penetración más pobre de proteínas. En este contexto, en esta sección del Capítulo se estudia los perfiles de

penetración de OVA en piel humana que resultan de la aplicación dermal del parche de NGs bifuncionales cargados con la proteína.

Los ensayos se realizaron por triplicado, aplicando el parche cargado en tres secciones de piel diferentes, tanto cuando se emplearon modelos de piel como cuando se emplearon biopsias de piel humana. En ambos casos se evaluó la penetración en piel intacta y en piel deficiente de barrera.

Penetración de OVA en modelos de piel

En primer lugar, se estudió la penetración en modelos de piel. En la Figura 4.14 se muestran las imágenes de fluorescencia de los cortes transversales de los modelos luego de realizar el ensayo de penetración y la tinción histoquímica de la OVA. En la columna de la izquierda se muestran los resultados obtenidos empleando los modelos de piel intacta, y en la columna de la derecha los obtenidos empleando los modelos tratados con TNF α (modelo para piel deficiente de barrera). En ambas columnas se muestran dos imágenes de cada corte: a la izquierda se ven las imágenes obtenidas de la tinción con DAPI (azul) y de OVA (rojo) superpuestas, y a la derecha se muestra las imágenes de la tinción con anti-OVA con escala de colores según la cantidad de proteína.

Se puede ver que en ambos casos la proteína penetra hasta la epidermis, siendo mayor la cantidad de proteína presente en dicha capa de la piel en los modelos de piel deficiente de barrera. Los resultados muestran reproducibilidad, con perfiles de penetración que se repiten en los tres modelos. Los resultados obtenidos alentaron a continuar el estudio de penetración de OVA en biopsias de piel humana.

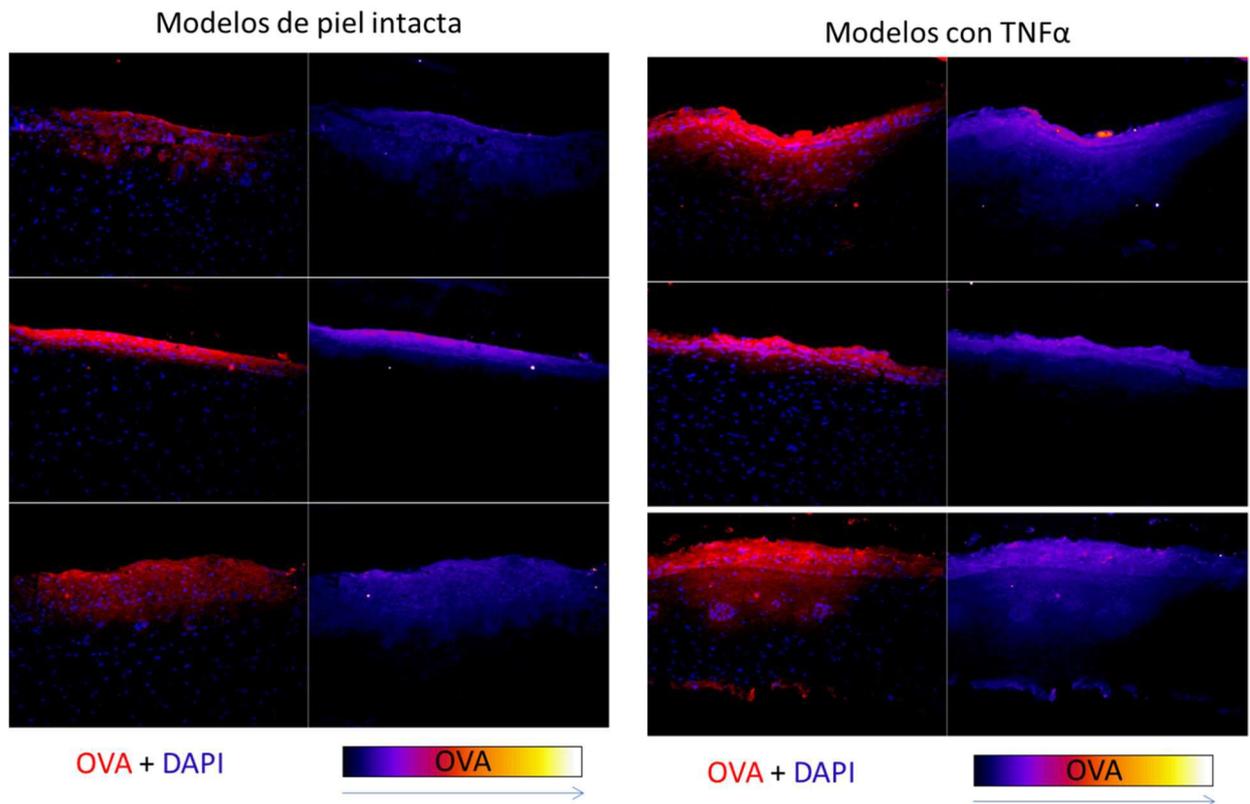


Figura 4.14. Resultados de los ensayos de penetración de OVA en modelos de piel humana intacta y deficiente de barrera (tratada con TNF α).

Penetración de OVA en piel humana *ex vivo*

En la Figura 4.15 se muestran las imágenes de fluorescencia de los cortes transversales de las biopsias luego de los ensayos y posterior tinción. En la columna de la izquierda se muestran los resultados obtenidos en piel intacta y en la columna derecha aquellos obtenidos empleando piel deficiente de barrera, en las tres biopsias obtenidas (piel de busto, abdomen y espalda). La intensidad en los colores muestra que la mayor cantidad de proteína queda en el SC y en la epidermis temprana, incluso en la piel deficiente de barrera. Pero puede verse que en ambas situaciones la proteína es transportada hacia la epidermis, siendo mucho mayor en el caso de la piel deficiente de barrera. En estos ensayos se observa una diferencia más notoria entre la penetración de la proteína en piel intacta y piel deficiente de barrera que aquella observada en los modelos de piel. Este resultado se repite para las biopsias de los tres donantes, indicando reproducibilidad en los resultados.

Si bien estos resultados son cualitativos, es clara la presencia de una gran cantidad de proteína en la epidermis, lo cual indica que el parche de NGs bifuncionales tiene un gran potencial como sistema de vacunación transdermal, ya que es capaz de favorecer la penetración de proteínas inmunogénicas en la zona inmunocompetente de la piel, donde se encuentran las células de Langerhans.

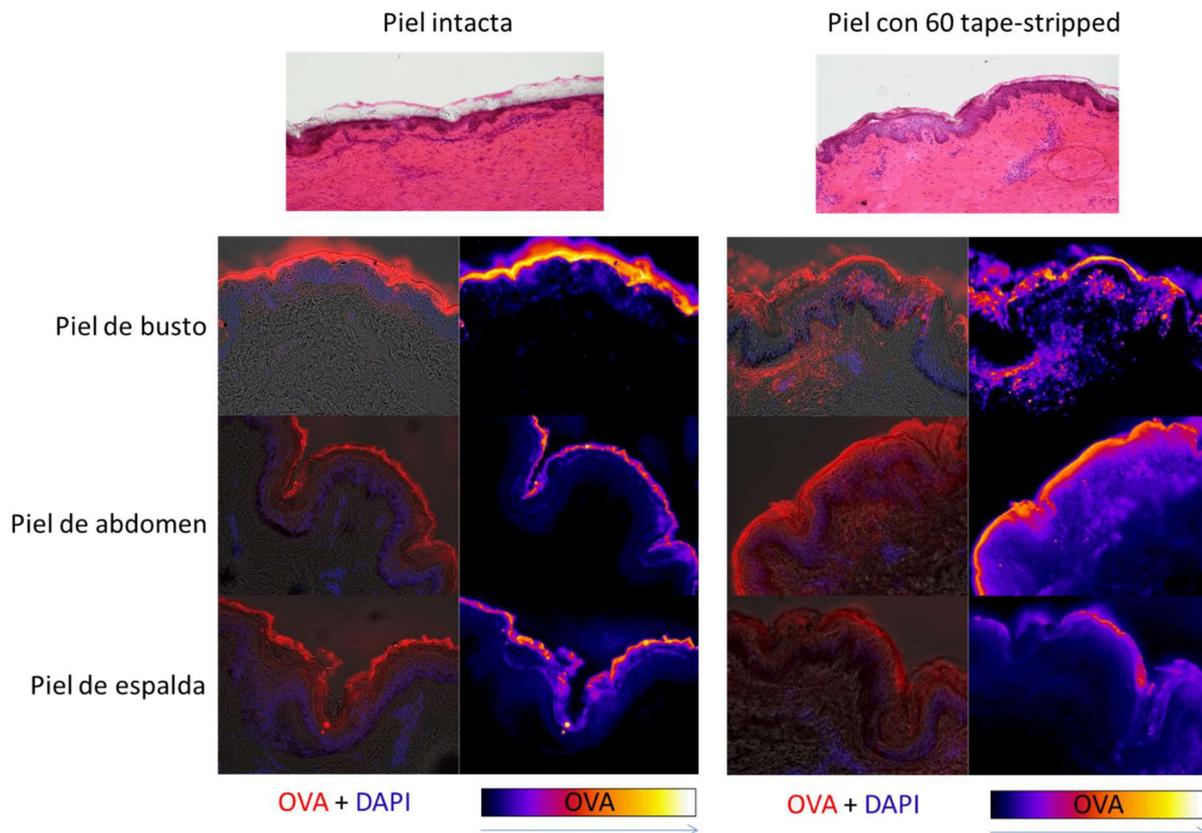


Figura 4.15. Resultados de los ensayos de penetración de OVA en piel humana *ex vivo* intacta y deficiente de barrera (tratadas con 60 tape stripped).

4.6. Conclusiones

En este Capítulo se estudió el desempeño del parche formado a partir de NGs bifuncionales como sistema de liberación dermal de proteínas. Los NGs bifuncionales son capaces de cargar las proteínas inmunogénicas estudiadas (OVA y BSA) sin verse afectada su temperatura de transición (VPTT). Al formar los parches, cilíndricos y de 1 cm de diámetro y espesor variable, la proteína queda en su interior, y no expuesta en su superficie. Por lo tanto,

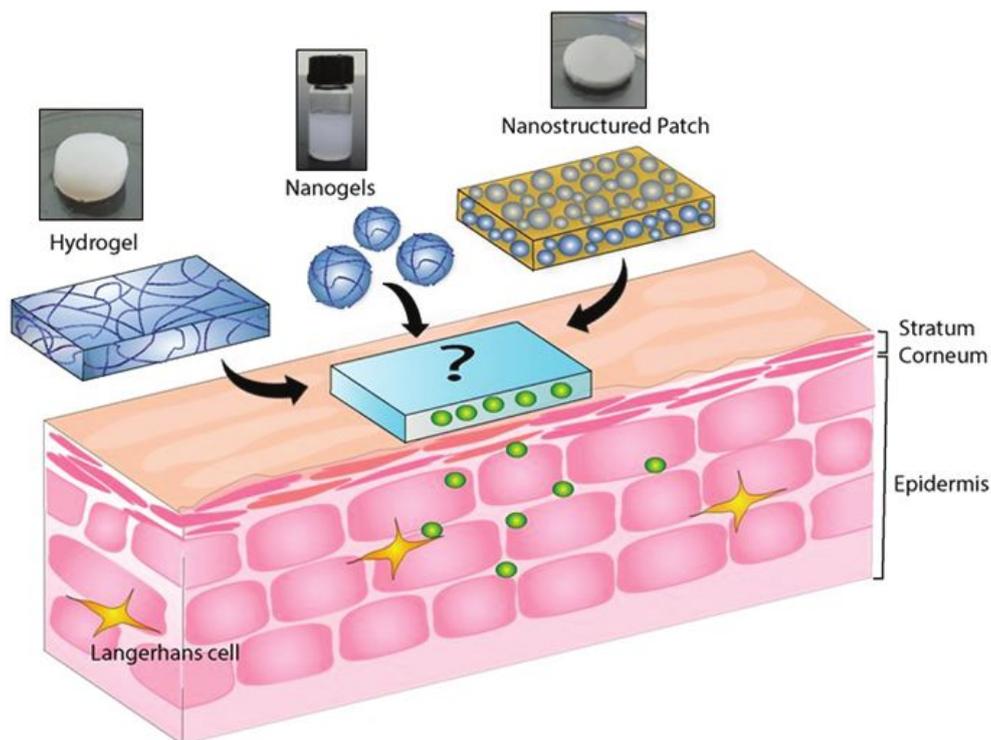
su liberación puede controlarse, ya que debe difundir a lo largo de la matriz polimérica antes de ser liberada.

Una fracción de la proteína cargada se encuentra en el interior de la fase de PVCL entrecruzada, la cual puede liberarse con control de temperatura, y otra fracción se encuentra en los espacios intersticiales entre NGs del parche. Esta última fracción no puede liberarse controladamente con la temperatura, pero sí puede ser controlada por la cantidad de NGs que se emplea en la formación del parche. Al aumentar la masa de NGs en el parche, la liberación se produce más lentamente. Además, se observó que a medida que se aumenta la cantidad de proteína cargada en el parche, aumenta la fracción de proteínas que se almacena fuera de los NGs, restando controlabilidad térmica al parche.

Finalmente, los ensayos de penetración de proteína en piel humana demostraron que el parche formado a partir de los NGs bifuncionales es capaz de facilitar la penetración de OVA hacia la epidermis, donde se encuentran las células de Langerhans. Este resultado indica una gran potencialidad del parche como sistema de vacunación transdermal, ya que es un sistema no invasivo, que no provoca una destrucción irreversible del SC, y que no requiere de ningún dispositivo complejo para su aplicación.

Capítulo 5

NGs bifuncionales como sistema de liberación dermal de proteínas, y su comparación con hidro y nanogeles de PVCL



5.1. Introducción

La piel es la principal barrera del cuerpo contra los patógenos invasores.⁴⁵ Por esta razón, una gran población de células inmunocompetentes, como los queratinocitos, las células de Langerhans, los subconjuntos de linfocitos T y el tejido linfoide asociado a la piel se encuentran dentro de la epidermis y la dermis.² Las células de Langerhans son células profesionales presentadoras de antígenos que inducen la respuesta inmunitaria adaptativa de las células T.¹⁰⁵ En este sentido, el transporte efectivo de un antígeno hacia la epidermis, donde se encuentran dichas células, podría generar una respuesta inmune específica.¹⁰⁶ Sin embargo, el estrato córneo (SC), la capa más externa de la piel, es una barrera altamente eficiente que solo moléculas pequeñas y lipofílicas^{107,108} son capaces de atravesar pasivamente. Aunque la vacunación transdermal está ganando interés,^{42,44,109–111} para su implementación eficientemente se requiere de una penetración efectiva y reproducible de moléculas grandes en la piel, más allá del SC.

Se han propuesto diversos métodos para facilitar la penetración en la piel de macromoléculas grandes, como el uso de compuestos químicos y biológicos, y la aplicación de técnicas semi-invasivas que interrumpen físicamente el ordenamiento del SC.^{103,112–117} Entre estas estrategias se encuentra el empleo de hidrogeles, los cuales han demostrado mejorar la administración tópica de BSA en piel intacta, así como en la piel con deficiencia de barrera, es decir con el SC debilitado, ya sea por una enfermedad de la piel o por el uso de alguna técnica que lo permita.¹¹⁸ Las evidencias obtenidas de este estudio indican que la mejora en la administración tópica de la proteína resulta del efecto de hidratación de la piel debido a la aplicación del hidrogel. Asimismo, se cree que las interacciones de la matriz polimérica con los componentes de SC perturban su estructura, favoreciendo el pasaje de la proteína.

La capacidad de cargar y liberar un analito está fuertemente influenciada por la estructura de la matriz polimérica. En el caso de hidrogeles termosensibles, una de las variables principales es el tamaño del sistema. El empleo de sistemas de menor tamaño (como micro y nanogeles)

implica una mayor área expuesta para el intercambio de materia, lo cual influye tanto en la carga del analito como en su liberación. Además, un sistema de menor tamaño requiere de menos tiempo para responder ante los cambios de temperatura, de manera que la velocidad de respuesta térmica es mayor en los NGs que en hidrogeles macroscópicos.²⁴ Estas ventajas de los NGs por sobre los hidrogeles macroscópicos impulsaron su empleo en sistemas de liberación incluyendo su aplicación tópica. Se ha demostrado que varios NGs termosensibles son capaces de cargar proteínas con un peso molecular tan alto como ~ 150 kDa y mediar su penetración más allá del SC de la piel humana deficiente en barrera. Se cree que la penetración a través del SC se ve facilitada por la liberación desencadenada de la proteína después de la aplicación tópica, y las interacciones entre los NGs y el SC.^{1,58,64,119} Si bien los resultados del empleo de NGs termosensibles para aplicación tópica de proteínas dio buenos resultados, cabe destacar que la aplicación de dichos NGs directamente como suspensiones sobre la piel tiene la desventaja de que la gran área expuesta de los NGs conduce a una pérdida de humedad muy rápida. Este fenómeno podría conducir a una liberación incompleta del analito y sobre todo dificulta el empleo de estos NGs en aplicaciones que requieren la liberación en un tiempo prolongado.

En este escenario, se espera que los NGs bifuncionales desarrollados en esta Tesis combinen las ventajas del tamaño pequeño de los NGs con el fenómeno de hidratación cuando estos se aplican como una película. En este Capítulo se compara en diferentes niveles el desempeño de tres plataformas basadas en PVCL: hidrogeles macroscópicos de PVCL, NGs de PVCL (NGs B2 del Capítulo 2) y parche obtenido con los NGs bifuncionales (NGs S9 del Capítulo 3). En la Figura 5.1 se presenta un esquema de los diferentes sistemas estudiados (Figura 5.1a) y se resalta que la presencia de la PVCL en los tres sistemas otorga sensibilidad térmica para actuar como plataformas de liberación controlada mediante la temperatura (Figura 5.1b). Los resultados de este Capítulo fueron obtenidos en el marco de una estancia de seis meses en la Universidad Libre de Berlín, en el grupo de Marcelo Calderón.

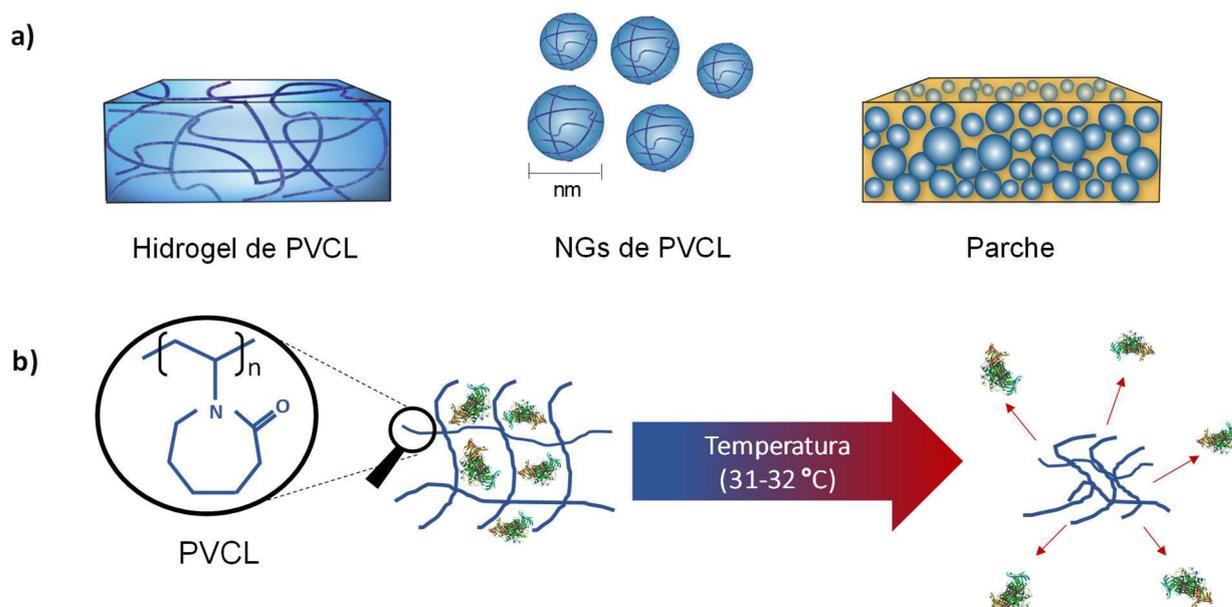


Figura 5.1. Representación esquemática de las plataformas estudiadas: hidrogel de PVCL, NGs de PVCL y parche (a); y efecto de la temperatura sobre los sistemas (b).

5.2. Trabajo experimental

5.2.1. Materiales

La Tabla 5.1 contiene la descripción de los reactivos que se utilizaron a lo largo del trabajo experimental del presente Capítulo. Todos los reactivos se utilizaron como fueron recibidos sin ninguna purificación adicional. El agua empleada a lo largo de todo el trabajo fue destilada y desmineralizada (DDI).

Tabla 5.1. Descripción de los reactivos empleados durante el trabajo experimental

Reactivo	Abreviatura	Función	Proveedor	Pureza
N-vinilcaprolactama	VCL	Monómero	Aldrich	98.0 %
N,N-metilenbisacrilamida	BIS	Entrecruzante	Genbiotech	99.9 %
2,2'-Azobis(2-metilpropionitrilo)	AIBN	Iniciador	Aldrich	98.0 %
Etanol anhidro	EtOH	Solvente	Cicarelli	99.9 %
Albúmina de huevo	OVA	Proteína inmunogénica	Aldrich	98.0 %

5.2.2. Polimerizaciones

Los NGs de PVCL (B2) y los NGs bifuncionales (S9) se sintetizaron mediante polimerización en emulsión discontinua y semicontinua, respectivamente, siguiendo los detalles descritos en los Capítulos 2 y 3. Las dispersiones de los NGs fueron dializados para eliminar los residuos de la reacción antes de su utilización. A partir de los NGs bifuncionales S9 dializados se obtuvieron los parches siguiendo el procedimiento detallado en la sección 4.2.3 del Capítulo 4.

El hidrogel de PVCL se sintetizó mediante un proceso discontinuo empleando jeringas de 3 mL (1 cm de diámetro), de manera de obtener una barra de gel con un diámetro de 1 cm, como se muestra en la Figura 5.2a. Los reactivos VCL, BIS y AIBN se disolvieron en una mezcla de etanol-agua (70-30) y la mezcla de reacción se cargó en la jeringa. A la solución se le burbujeó nitrógeno durante 15 min y se sumergió en un baño ultrasónico, durante 5 min, para eliminar las burbujas presentes. El sistema se mantuvo durante 4 horas a 70°C en una estufa. La barra de hidrogel obtenida fue cortada con un bisturí en pequeños cilindros de aproximadamente 2.5 mm

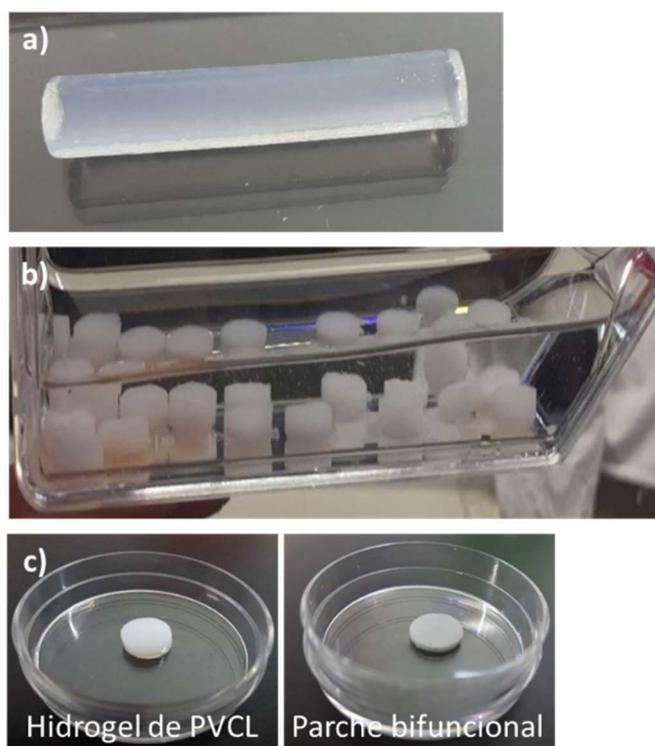


Figura 5.2. Obtención de los especímenes de hidrogel de PVCL; hidrogel producto de la polimerización en jeringa (a); corte y lavado de los discos; disco de hidrogel comparado con parche obtenido a partir de los NGs bifuncionales (c).

de altura, los cuales se lavaron repetidamente en agua desionizada hasta que se eliminaron los residuos de la polimerización (Figura 5.2b). El espécimen final obtenido tiene el mismo diámetro que el parche bifuncional, ya que la jeringa que se emplea tanto para la síntesis del hidrogel y como molde para formar el parche es de la misma capacidad (Figura 5.2c).

5.2.2. Caracterización de las plataformas

5.2.2.1. Morfología

El parche y el hidrogel se analizaron mediante SEM. Para ello las muestras se liofilizaron, y el parche se recubrió con oro utilizando un sputtering Emitech modelo K500X, con un voltaje de 2 kV y durante 3 min. Las observaciones se realizaron utilizando un microscopio electrónico de barrido Phenom World ProX.

Los NGs de PVCL (B2) se analizaron mediante TEM. Las imágenes obtuvieron en un Microscopio electrónico de barrido Hitachi SU 8030 operando a 30 kV provisto por un detector de TEM, en la Universidad Libre de Berlin.

5.2.2.2. Respuesta térmica

En los sistemas macroscópicos (hidrogel y parche), la respuesta térmica se estudió por gravimetría, determinando la variación de peso con la temperatura de un espécimen en agua ultrapura. Para los NGs, este estudio se realizó por DLS, observando la variación del D con la temperatura de una dispersión de NGs de 1 mg/mL. Para permitir la comparación de la respuesta térmica de los films y los hidrogeles con la de los NGs en dispersión, se definió el factor de hinchamiento (\emptyset) en peso para los films e hidrogeles, y volumétrico para los NGs, según las ecuaciones 3.6 y 3.7 definidas en el Capítulo 3. Por otro lado, la capacidad de hinchamiento se definió como el cociente volumétrico para NGs y gravimétrico para parche e hidrogel, entre el sistema hinchados (20 °C) y el sistema colapsado (55 °C).

Además, se estudió la velocidad de respuesta térmica de los tres materiales por DSC, utilizando un equipo Q2000 de TA Instruments en el Laboratorio de Análisis Térmicos (LAT) de

INTEC. Las muestras húmedas de 9-10 mg se analizaron utilizando una cápsula de aluminio (Tecnología TZero). Las mediciones se llevaron a cabo en un rango de temperaturas de 10 a 80 °C, con una velocidad de calentamiento variable entre 0.5 y 5 °C/min bajo atmósfera de N₂.

5.2.2.3. Citotoxicidad

La citotoxicidad de los materiales se evaluó midiendo el contenido de adenosin trifosfato (ATP) en fibroblastos dermales humanos luego de 48 hs de exposición a una dispersión de NGs B2 y NGs S9 y a extractos de hidrogel de PVCL, empleando el ensayo de viabilidad celular por luminiscencia CellTiter-Glo® (Promega). El ensayo directo con los NGs se realizó empleando el mismo protocolo descrito en el Capítulo 2. Por su parte, para realizar el ensayo de contacto indirecto con los hidrogeles se incubaron las muestras con 1 mL de medio de cultivo a 37 °C por 48 hs. Por otro lado, se sembraron las células en un plato de 96 wells, 100 µL en cada well con una concentración de 10⁵ cel/mL (10⁴ cel/well) y se incubaron durante la noche a 37 °C y 5 % CO₂. Luego se reemplazó el medio de las células de cada well por 100 µL de medio con diferentes porcentajes del medio incubado con la muestra. Se incubó 48 hs a 37°C y 5 % CO₂, y nuevamente se renovó el medio con una solución del reactivo. El protocolo continuó igual que para los ensayos de contacto directo.

5.2.2.4. Carga y liberación de OVA

La carga de las plataformas se realizó tal como se muestra en la Figura 5.3. En el caso de los NGs de PVCL, se empleó el procedimiento descrito en la sección 2.2.3.6 del Capítulo 2. Para ello, se partió de los NGs liofilizados, los cuales fueron redispersados en una solución de 4 mg/mL de OVA a una concentración final de NGs de 5 mg/mL. Luego de la incubación por 48 hs a 4 °C, los NGs cargados se separaron de la OVA libre por ultracentrifugación en un tubo VIVASPIN con membrana de 300 KDa (Figura 5.3a).

Para cargar el hidrogel se partió de los discos secos y se los incubó en una solución de OVA de 17 mg/mL durante 48 hs a 4 °C. Los hidrogeles cargados se separaron de la OVA libre extrayendo el hidrogel de la solución (Figura 5.3b).

Para realizar la carga del parche formado a partir de los NGs bifuncionales se utilizó el procedimiento descrito en la sección 4.2.3 del Capítulo 4. Para ello, se procedió al secado de la dispersión de NGs S9 conteniendo la OVA disuelta en los moldes de jeringa de 1 cm de diámetro, tal como se muestra en la Figura 5.3c.

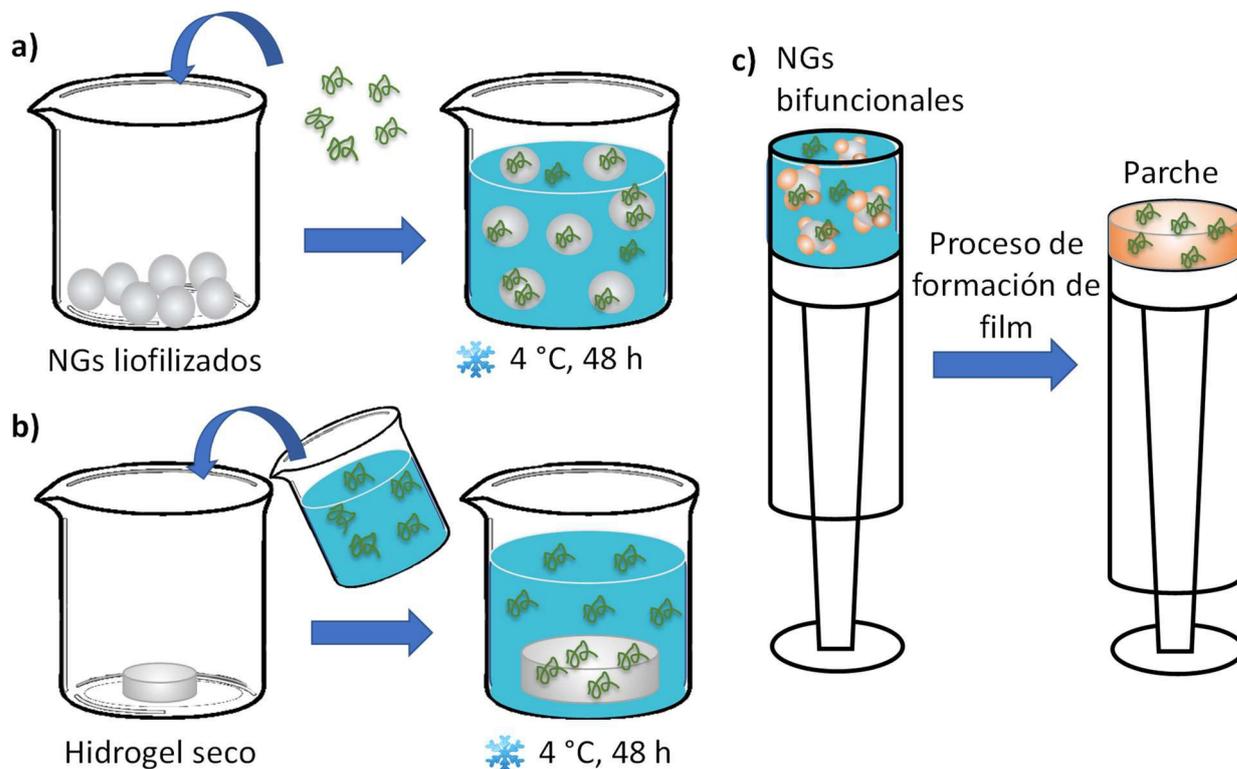


Figura 5.3. Protocolos de carga de OVA en los NGs de PVCL (a), el hidrogel de PVCL (b) y el parche (c).

En el caso de los NGs de PVCL y el hidrogel de PVCL se calcularon la EE y la LC mediante las ecuaciones 2.4 y 2.5 del Capítulo 2. Para ello la concentración de OVA libre en la solución después de la carga de estas plataformas se determinó por espectroscopía UV-VIS empleando el área del pico correspondiente.

La liberación in vitro de la OVA desde los diferentes sistemas se realizó por exposición en buffer PBS. Debido a que los sistemas estudiados son termosensibles, la liberación se estudió a dos temperaturas: a 25 °C, temperatura ambiente y por debajo de la VPTT de los sistemas; y a 37 °C, temperatura corporal y por encima de la VPTT.

En los sistemas macroscópicos, como el hidrogel y el parche bifuncional, la liberación se realizó por inmersión del sistema cargado en 2 mL de PBS, tal como se muestra en la Figura 5.4a. Mientras que para los NGs fue necesario el empleo de un sistema más complejo que mantenga separado los NGs del buffer, de manera que la presencia de NGs no interfieran en la determinación de la concentración de la OVA liberada. Para ello se emplearon tubos Float-A-Lizer G2, dotados de una membrana de 300 KDa con capacidad de 1 mL y un contenedor de buffer con 6 mL de capacidad (Figura 5.4b). La liberación se realizó a lo largo de una semana en todos los casos y se tomaron muestras con reposición del medio de liberación a intervalos de tiempo regulares.

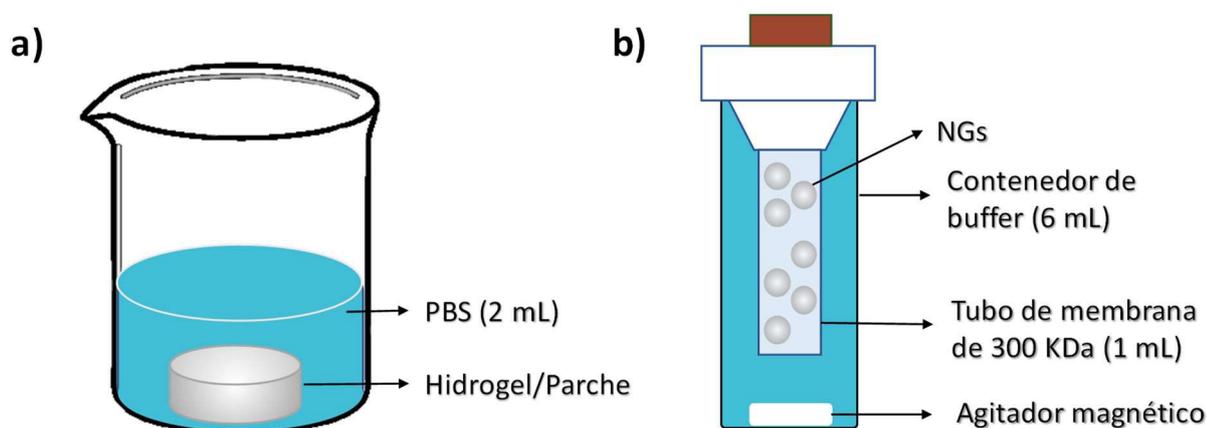


Figura 5.4. Ensayo de liberación a partir del hidrogel y el parche (a) y de los NGs (b).

La estructura secundaria de la OVA se determinó mediante Dicroísmo Circular (CD), empleando un espectropolarímetro Jasco J-810 (Jasco, Gross-Umstadt, Alemania) utilizando cubetas Suprasil de cuarzo de 0.2 mm de longitud (Hellma, Müllheim, Alemania). El CD es una técnica espectroscópica de absorción que provee información acerca de la estructura de macromoléculas biológicas. Este estudio se realizó para determinar si la estructura secundaria de la OVA es modificada al ser cargada y liberada por los distintos sistemas estudiados en este capítulo.

5.2.2.5. Penetración en piel humana

Para determinar la capacidad de las diferentes plataformas en estudio de facilitar la liberación tópica y posterior penetración en piel de una proteína inmunogénica, se realizaron

ensayos de penetración en piel humana de estos sistemas cargadas con OVA y esterilizados. Para ello, se empleó piel *ex vivo* siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.2.7 del Capítulo 4. Las biopsias, intactas o tratada con tape stripping (un modelo validado de piel deficiente en barrera¹²⁰) se trataron tópicamente con OVA en PBS, como grupo control, y con cada una de las plataformas de PVCL cargadas con OVA según el ensayo. Luego, se expusieron a una rampa de temperatura durante un período de incubación de 6 hs (30-37 °C). Posteriormente, las biopsias de piel se congelaron rápidamente, se seccionaron transversalmente y se tiñeron inmunohistoquímicamente para detectar la presencia de OVA. Cada experimento se repitió tres veces, empleando las biopsias detalladas en el Capítulo 4.

Se realizaron dos estudios: uno en el cual se empleó la misma cantidad de OVA en los tres sistemas (0.125 mg), y otro donde se empleó la misma relación OVA/polímero en los tres sistemas (10 %). En la Tabla 5.2 se muestran las condiciones empleadas en cada grupo de ensayos.

Tabla 5.2. Cantidad de OVA y relación OVA/polímero empleadas en los ensayos de penetración en piel humana.

Experiencia	Hidrogel		NGs B2		Parche	
	OVA (mg)	OVA/polímero	OVA (mg)	OVA/polímero	OVA (mg)	OVA/polímero
Ensayos con igual cantidad de OVA	0.125	0.004	0.125	30	0.125	0.003
Ensayos con igual relación OVA/polímero	3.3	10	0.05	10	4	10

5.3. Resultados y Discusiones

La fase capaz de alojar la proteína, protegerla y liberarla está compuesta por el mismo polímero en los tres sistemas (PVCL) y la relación monómero/entrecruzante es la misma. En este contexto, la variable más destacada entre los sistemas es la estructura y la morfología. A partir de este estudio se podrá inferir la influencia de estos factores en el desempeño de una plataforma termosensible como sistema de liberación dermal de proteínas.

5.3.1. Estructura de las plataformas

La dimensión de un sistema de liberación, así como también su arquitectura y porosidad constituyen factores determinantes en la respuesta térmica y en la cinética de liberación de un analito. Por este motivo se estudió la composición estructural de los tres sistemas. La Figura 5.5 muestra imágenes de microscopía SEM para el hidrogel y el parche bifuncional, y de TEM para los NGs de PVCL. Se puede ver que el hidrogel tiene una estructura reticulada con un tamaño de poro en el rango de 15-30 μm (Figura 5.5a). Por otro lado, tal como se esperaba, los poros de NG no son visibles por TEM, pero a pesar de eso puede observarse su morfología esférica y su estrecha distribución de tamaños (Figura 6.5b). La imagen SEM del parche muestra una película completamente fusionada con pequeños poros en la superficie que no superan un tamaño de 2 μm de diámetro. Esta imagen evidencia la buena capacidad de formación de película de los NGs bifuncionales (Figura 5.5c).

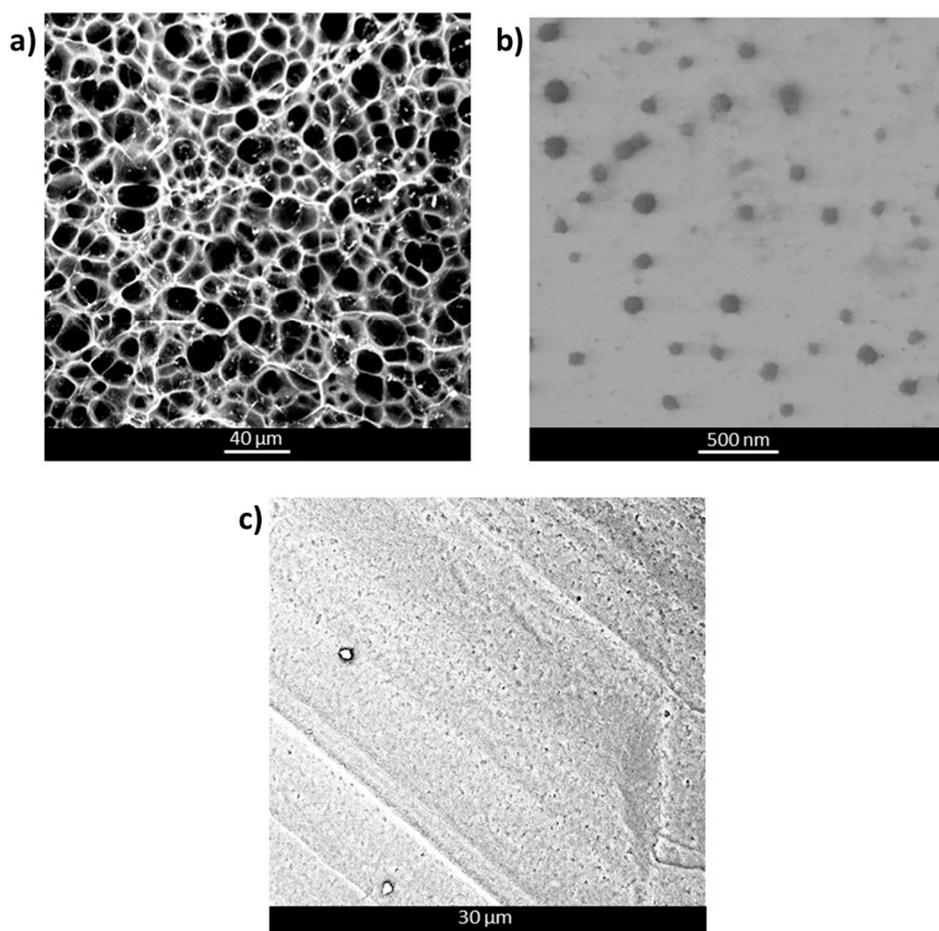


Figura 5.5. Imágenes de microscopía de las plataformas estudiadas: hidrogel de PVCL (a), NGs de PVCL (b) y parche (c).

Los tres sistemas estudiados difieren notablemente en sus superficies expuestas. El tamaño pequeño de los NGs de PVCL y bifuncionales, de 157 y 393 nm respectivamente a 37 °C, constituye una ventaja de estos sistemas para la transferencia de masa en el proceso de carga y liberación de la proteína. Sin embargo, la rápida evaporación promovida por la gran área expuesta puede limitar el empleo de estos materiales en una aplicación dermal donde se necesita un tiempo de liberación prolongado, lo que pone en ventaja al hidrogel macroscópico. Por otro lado, la hidratación del SC generada por la aplicación de un material con alto contenido acuoso constituye el método más seguro y más ampliamente utilizado para aumentar la penetración en piel de moléculas tanto hidrofílicas¹²¹ como lipofílicas.¹²² Además, el efecto oclusivo de un sistema macroscópico como el hidrogel y el parche mejora la penetración debido a un aumento de hidratación.¹²³ Asimismo, el tamaño de poro más pequeño en el parche podría conducir a una oclusión más eficiente que el hidrogel, cuyo tamaño de poros es considerablemente mayor. En este contexto, se espera que el parche combine las ventajas de los hidrogeles y NGs, obteniendo en un mismo sistema una respuesta térmica rápida y un buen control de la liberación característicos de los NGs y el efecto oclusivo de un film.

5.3.2. Respuesta térmica de las plataformas

Debido a que la respuesta térmica de un gel está muy relacionada con la cinética de difusión de las moléculas de agua dentro de la matriz polimérica, es importante estudiar cómo influye la estructura en esta propiedad. Mas aun cuando se trata de sistemas de liberación controlada por temperatura, donde la respuesta térmica del sistema es la responsable de que el sistema sea capaz de alojar y proteger su carga para liberarla a la temperatura oportuna. La PVCL se encuentra entrecruzada en los tres sistemas y la estructura tridimensional resultante sufre un cambio de volumen reversible entre los estados hinchado y colapsado. La presencia de ambos estados en las tres plataformas se puede corroborar en la Figura 5.6, donde se muestra la variación del factor ϕ en función de la temperatura, y los valores de VPTT de los sistemas investigados se muestra en la Tabla 5.3.

Las tres plataformas presentan una transición térmica amplia, que corresponde a la separación de fases de PVCL a su LCST.¹⁴ Las transiciones prácticamente coinciden entre los sistemas y cubren casi todo el rango de temperatura analizado (de 25 a 45 °C); y la temperatura de transición (temperatura a $\Phi_i(T) = 0.5$), está en todos los casos entre 31 y 32 °C. La razón del amplio rango de transición puede estar relacionada con la amplia distribución de pesos moleculares de las cadenas de PVCL dentro de las estructuras de los geles. Teniendo en cuenta que la LCST de la PVCL varía con el peso molecular, diferentes longitudes de cadena presentes en las plataformas producen una contracción progresiva con el aumento de la temperatura. Este comportamiento también se puede observar en estudios previos de NGs basados en PVCL, donde al aumentar el contenido del entrecruzante y emulsificante, se obtuvieron rangos más amplios de transiciones³¹.

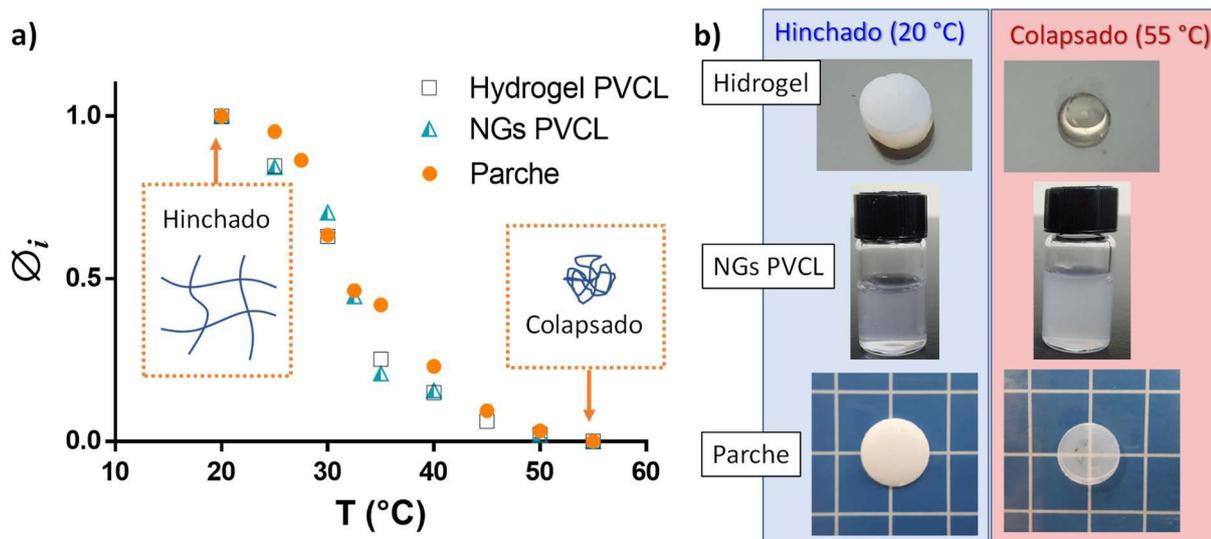


Figura 5.6. Respuesta térmica del hidrogel de PVCL, los NGs de PVCL y del parche (a); e imágenes de los sistemas en estado hinchado y colapsado (b).

Tabla 5.3. VPTT y capacidad de hinchamiento.

	VPTT	capacidad de hinchamiento
Hidrogel	31.7	520 ± 10
NGs PVCL	31.4	1887 ± 20
NGs bifuncionales	32.0	2079 ± 30
Parche	32.0	446 ± 13

Se puede observar que la capacidad de hinchamiento de los NGs bifuncionales es similar a la de los NGs de PVCL. Esto concuerda con la similitud en la contracción de ambos sistemas manifestada mediante DLS (Figura 5.7), con variaciones en el D de 100 nm para NGs de PVCL y 169 nm para los NGs bifuncionales entre la temperatura ambiente y 37 °C. Por otro lado, la capacidad de hinchamiento en el parche es similar y comparable a la del hidrogel (alrededor de 4 veces menor que las dispersiones de NGs). Es importante destacar que las temperaturas de transición de las tres plataformas son apropiadas para una aplicación de liberación transdermal, ya que la temperatura de la piel es de 32 °C en la superficie y aumenta constantemente con una profundidad creciente.¹²⁴

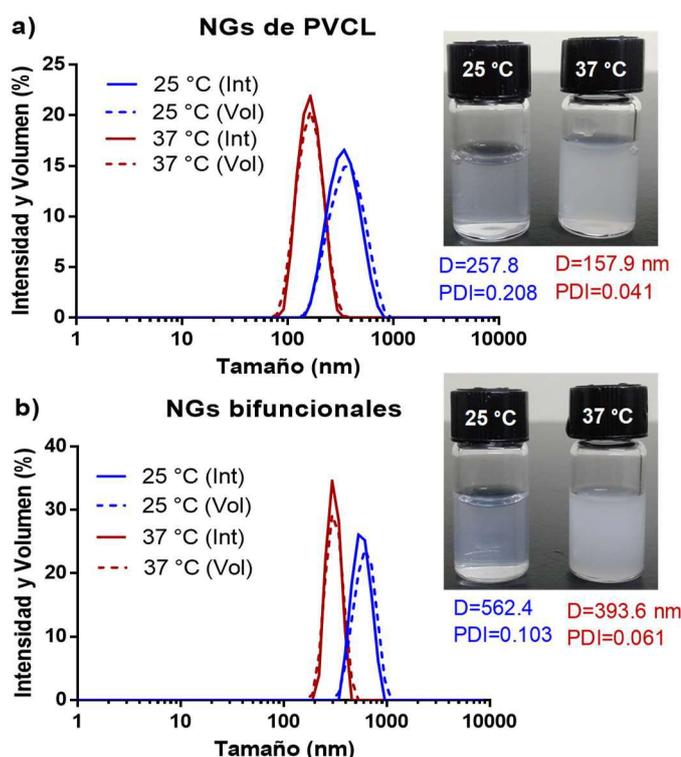


Figura 5.7. Distribución de DLS en intensidad (Int) y volumen (Vol) a 25 y 37 °C de los NGs de PVCL (a) y los NGs bifuncionales (b).

Durante la transición de fase volumétrica de las redes de PVCL, los puentes de hidrógeno formados entre la PVCL y el agua se rompen generando un pico endotérmico detectable por DSC.^{125,126} La presencia de este pico permite determinar la VPTT de los sistemas tanto macroscópicos como nanométricos empleando el mismo método de caracterización. En este contexto, mediante el análisis por DSC de los tres sistemas hidratados en agua, se estudió

cuantitativamente la velocidad de respuesta térmica de los sistemas. Para ello se realizaron rampas de calentamiento de 10 a 80 °C, empleando diferentes velocidades (0.5, 1, 3 y 5 °C/min). El valor de la VPTT se consideró como el valor mínimo del pico endotérmico. A modo de ejemplo, en la Figura 5.8 se muestran las curvas de DSC obtenidas para el hidrogel. Se puede ver como a medida que se aumenta la velocidad de calentamiento, el valor de VPTT aumenta. Esto se debe a que la estructura polimérica tiene menos tiempo para realizar el cambio volumétrico. Justamente, esta variación entre los valores de VPTT con la velocidad de calentamiento dan información de la velocidad de respuesta térmica del material.

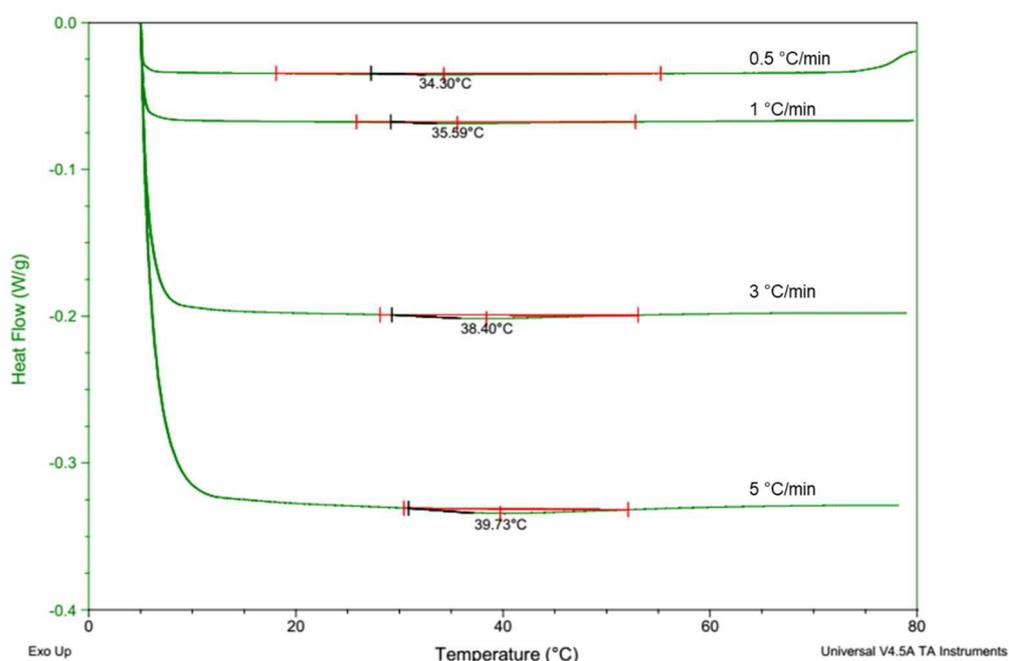


Figura 5.8. Curvas de DSC obtenidas para una muestra de hidrogel de PVCL hidratada, a distintas velocidades de calentamiento.

En la Figura 5.9 se muestra la VPTT en función de la velocidad de calentamiento para los tres sistemas. El sistema que presentó mayor variación de la VPTT (pendiente de la recta) fue el hidrogel, seguido por los NGs de PVCL y el parche. Estos resultados sugieren que el parche responde frente a los cambios de temperatura con una velocidad similar a los NGs de PVCL, pero más rápidamente que el hidrogel de PVCL. Cabe aclarar que al tratarse de un ensayo dinámico los valores de VPTT no son comparables con lo observado por otras técnicas, donde

se dejó a los sistemas un tiempo prudente a cada temperatura para que alcancen el estado de hinchamiento de equilibrio.

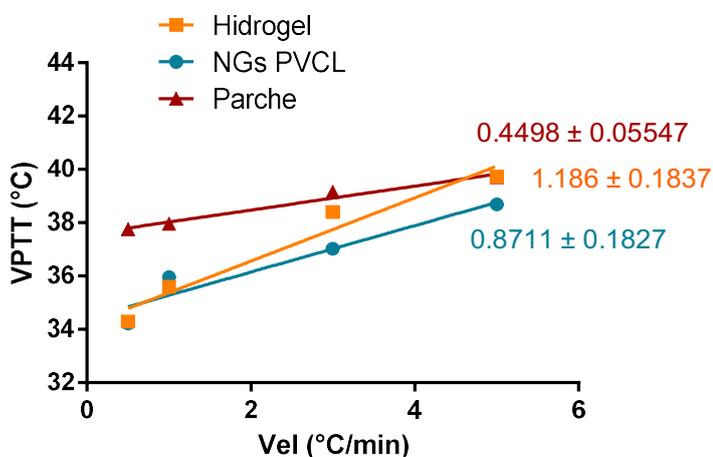


Figura 5.9. Valores de VPTT en función de la velocidad de calentamiento empleada en la medición por DSC para los tres sistemas.

5.3.3. Citotoxicidad de las plataformas

Un factor importante que hace a la PVCL muy atractiva para aplicaciones biomédicas es que presenta mejor tolerancia celular en comparación con otros polímeros termosensibles.¹²⁷ Aunque los tres sistemas están basados en PVCL, la presencia de cargas superficiales, de los comonomeros acrílicos en los NGs bifuncionales y de los posibles restos del proceso sintético (por ej., monómeros y emulsificante) pueden afectar esta propiedad. En este contexto, se evaluó la citotoxicidad de los tres sistemas en fibroblastos dermales humanos. Para ello, se realizaron estudios de contacto directo para los NGs (NGs de PVCL y NGs bifuncionales) y de contacto indirecto en el hidrogel.

La Figura 5.10 muestra los resultados de viabilidad relativa de los fibroblastos luego de 48 hs de incubación con el extracto de hidrogel (Figura 5.10a) y con los NGs (Figura 5.10b). Los resultados del ensayo indirecto muestran que cuando se reemplazó el 100 % del medio celular con el extracto del hidrogel se obtuvo un valor de viabilidad celular de 97 %. Por otro lado, los porcentajes de viabilidad celular fueron del 99 % y 84 % luego de la incubación con los NGs de PVCL (B2) y NGs bifuncionales (S9) respectivamente, cuando se emplearon las concentraciones

más altas de NGs (5 mg/mL) (Figura 5.10b). La leve disminución de la viabilidad celular cuando se incubó con los NGs bifuncionales es posiblemente debido a la presencia de una mayor cantidad de carga negativa por la presencia de ácido acrílico. Estos resultados confirmaron que los tres materiales son bien tolerados por los fibroblastos dermales humanos, mostrando todos ellos una viabilidad celular superior al 75 % en la concentración más alta ensayada.

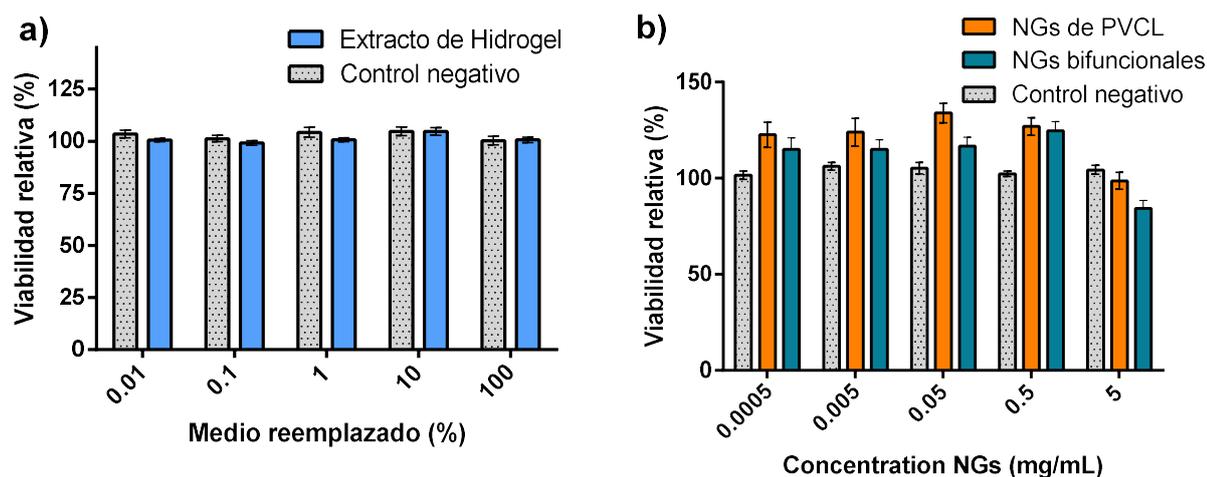


Figure 5.10. Viabilidad relativa de fibroblastos dermales humanos después de 48 hs de exposición a extracto de hidrogel (a) y diferentes concentraciones de NGs de PVCL y NGs bifuncionales (b).

5.3.4. Carga y liberación controlada de OVA

En la Figura 5.11 se muestra la capacidad de carga de OVA (LC) y las eficiencias de encapsulación (EE) de los tres sistemas. Cabe recordar que la LC se refiere a la masa de OVA cargada por unidad de masa de polímero. Mientras que la EE cuantifica el porcentaje de masa de OVA incorporado en el sistema polimérico con respecto a la masa total de OVA añadida al momento de la carga. También deben tenerse en cuenta las diferencias entre los procesos de carga de cada sistema al interpretar estos resultados. En los NGs e hidrogeles de PVCL, la OVA no encapsulada se separó de los sistemas cargados y, por lo tanto, contienen solamente la proteína incorporada dentro de la matriz termosensible de PVCL. En el caso del parche, la masa total de proteína añadida a la dispersión de NGs queda disponible en el parche final, ya que no hay una etapa de separación previa al secado (Figura 5.3).

Como era de esperar, los NGs de PVCL poseen el mayor valor de LC, incorporando casi toda la OVA añadida (EE = 94 %). Esto se debe a que es el sistema con mayor área superficial y en el que se emplea la menor cantidad de polímero en la aplicación. Por otro lado, el parche demostró un EE de 100 %, debido al método específico utilizado para cargar OVA en este sistema. Aquí, la proteína se incubó con la dispersión de los NGs bifuncionales, que luego se usaron para formar el parche sin separación de la OVA no encapsulada. Por lo tanto, toda la proteína cargada permanece en el parche después de la evaporación del agua, donde una fracción de OVA se incorpora dentro de la estructura de los NGs y el resto puede permanecer en los espacios intersticiales entre los NGs en la película.

Por último, el hidrogel presentó la EE más baja, probablemente debido a la menor relación superficie/volumen del sistema. La concentración final de OVA por polímero (LC) fue, sin embargo, similar a la observada en el parche bifuncional. Este resultado se debe a que en los sistemas macroscópicos se emplean cantidades de polímero muy superiores a las empleadas en las dispersiones de NGs, y como la cantidad de proteína cargada es similar en los tres sistemas, el cociente de LC resulta menor para los sistemas macroscópicos y mayor para los NGs.

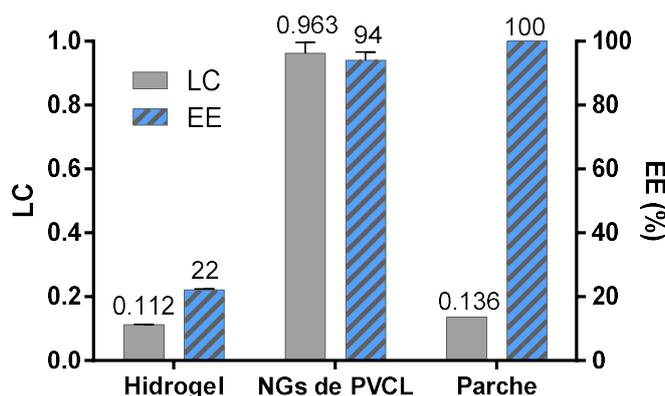


Figura 5.11. Capacidad de carga (LC) y eficiencia de encapsulación (EE) de OVA de los diferentes sistemas estudiados.

En la Figura 5.12 se muestra el perfil de liberación de OVA en PBS de los tres sistemas a 25 y 37 °C. Se observó una mayor magnitud y velocidad de liberación de OVA a 37 °C, probablemente como consecuencia de la fuerza impulsora creada por el colapso de la red

polimérica de PVCL. Los NGs de PVCL presentaron la mejor retención de proteínas a 25 °C y la mayor liberación a 37 °C (Efecto On-Off). Por el contrario, la diferencia en la liberación de proteína a partir de los hidrogeles a las dos temperaturas fue menos evidente. El parche bifuncional presentó un comportamiento intermedio, donde la liberación de OVA es considerablemente mayor tras el colapso de los NGs provocado térmicamente a 37 °C. Este comportamiento variable podría ser una consecuencia de la ubicación de la proteína cargada dentro de los sistemas investigados.

Como los NGs de PVCL se separaron de la proteína no cargada, la OVA solo estuvo presente dentro de la matriz de los NGs al momento de la liberación. En este escenario, la retención o expulsión de OVA está influenciada principalmente por los cambios de volumen que experimentan los NGs con el cambio de temperatura. Como se describió previamente, en el parche, la OVA se reparte entre la estructura de los NGs y los espacios intersticiales de la película. Aquí, la fracción de OVA cargada dentro de las estructuras de NGs debería ser más susceptible a la liberación inducida por la temperatura, desencadenada por el colapso de los NGs. Por su parte, la fracción de OVA presente en los espacios intersticiales del parche podría liberarse a 25 °C, ya que no tiene que difundirse a través de las redes PVCL reticuladas. En los hidrogeles, aunque la OVA no cargada fue separada de los hidrogeles cargados, la liberación de proteína fue importante a 25 °C. Esto podría ser un indicio de que una gran fracción de la OVA se adsorbe a la superficie del hidrogel, y de esta forma la difusión es independiente de la temperatura. Este resultado concuerda con el trabajo publicado por Zhang y sus colaboradores, en el que se investigó la liberación de BSA a partir de hidrogeles de poli(*N*-isopropilacrilamida).¹²⁸

Los espectros de CD de la OVA liberada por los tres sistemas se compararon con el obtenido a partir de la solución de OVA original (Figura 5.12.d). La estructura secundaria de la OVA se mantuvo intacta después de la carga y liberación en todos los sistemas investigados. Por lo tanto, se espera que la competencia terapéutica de la proteína cargada se pueda mantener en una aplicación dérmica.

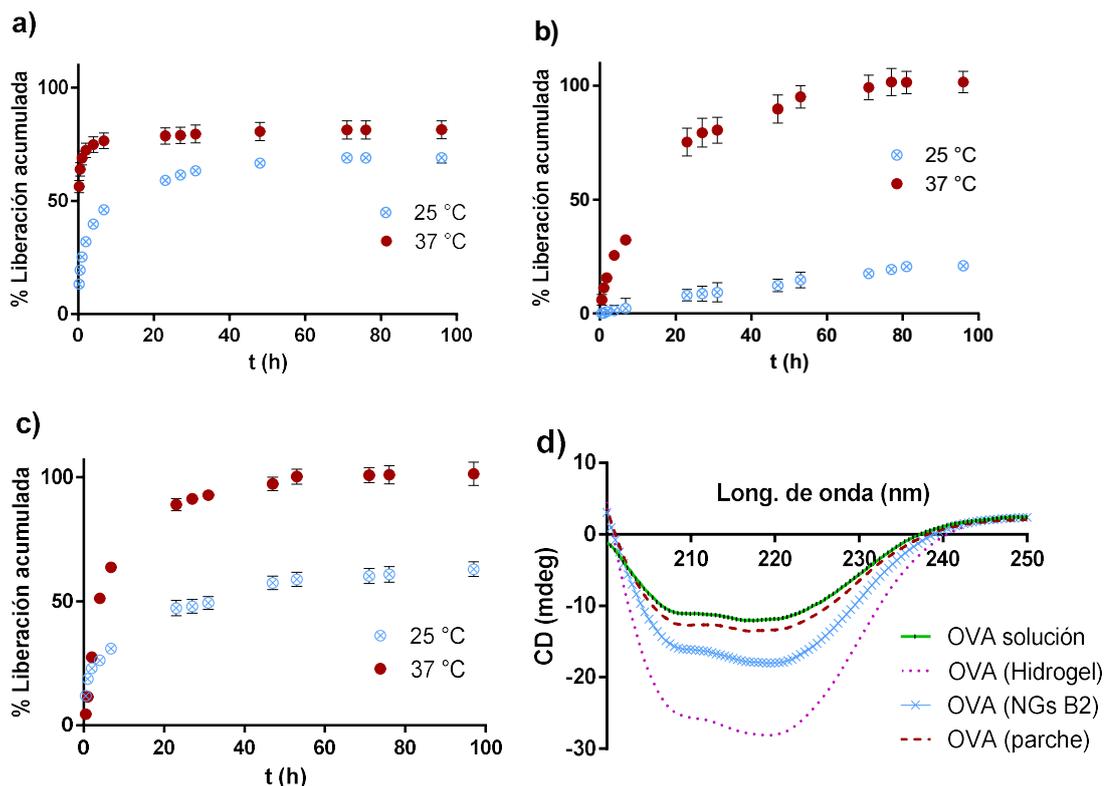


Figura 5.12. Liberación de OVA en PBS desde el hidrogel (a), los NGs de PVCL (b), y el parche (c). Estructura secundaria de la OVA liberada por los tres sistemas (d).

5.3.5. Penetración en piel de la OVA aplicada con las tres plataformas

Para una aplicación eficiente en inmunización transdermal, los sistemas deben ser capaces de suministrar agentes terapéuticos a las regiones inmunocompetentes de la piel. Esto requiere la penetración más allá del SC. Por ese motivo, es de interés estudiar la capacidad de estos tres sistemas para facilitar la penetración de OVA en la piel humana.

Los resultados de los ensayos se muestran en la Figura 5.13, donde se observan los cortes transversales de las biopsias luego de la incubación con los diferentes sistemas y la posterior tinción. Se presentan dos imágenes para cada ensayo. En la imagen de la izquierda se muestra el mapa de temperatura donde se ve la distribución de intensidades de color en función de la concentración de OVA y en la imagen de la derecha la superposición de las imágenes de tinción con DAPI (azul) y anti-OVA (rojo).

Se puede observar en la Figura 5.13a que la aplicación de la solución de OVA sobre la piel intacta no generó penetración del SC de la proteína; mientras que en la piel tratada con tape

stripping la OVA quedó retenida en el SC. Al comparar las Figuras 5.13b y 5.13c puede verse en todos los casos que al aumentar la OVA cargada en los sistemas se produjo un aumento en la cantidad de proteína liberada en la piel.

En las imágenes de la Figura 5.13b se muestran los ensayos donde se cargó la misma cantidad de OVA en todos los sistemas. La aplicación del hidrogel mostró liberar una pequeña cantidad de OVA en el SC de la piel intacta, mientras que en la piel deficiente de barrera se observó la penetración de una pequeña cantidad de OVA en la epidermis tardía (Figura 5.13bi). Por otro lado, los NGs B2 liberaron grandes cantidades de OVA en todo el SC de la piel tratada con cinta adhesiva, con una tinción decreciente y más profunda dentro de la epidermis (Figura 5.13bii). La penetración de OVA para la piel intacta se limitó en gran parte al SC. En particular, el SC de estas biopsias parecía alterado (hinchado) en comparación con otras crio-secciones tratadas tópicamente. Esto puede deberse a la alta hidratación local producida por los NGs y su posible penetración. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos mediante la administración tópica de proteínas mediada por otros NGs termosensibles. Por ejemplo, NGs de poli(*N*-isopropilacrilamida) o poliglicerol han demostrado ser capaces de suministrar proteínas de 150 kDa más allá del SC en piel deficiente de barrera, gracias a la liberación controlada por la temperatura y la hidratación local de los NGs que interrumpe la estructura ordenada del SC haciéndolo más permeable.^{58,119} En el futuro, sería de interés analizar si los NGs de PVCL inducen interrupciones similares en el SC y si ellos mismos pueden penetrar en la epidermis.

En contraste con los hidrogeles, los parches bifuncionales produjeron una penetración significativa de OVA en la epidermis con una tinción muy extensa dentro del SC tanto para las biopsias de piel intacta como de piel deficiente de barrera (Figura 6.13biii). Esta mejora en la penetración en piel de la proteína a partir del parche con respecto a los otros sistemas, podría corresponder a una liberación controlada de la proteína con la temperatura sumada a la naturaleza oclusiva de la aplicación tópica del parche, que ha demostrado mejorar la hidratación de la piel y la posterior penetración de macromoléculas.¹²³

El estudio realizado con la misma relación OVA/polímero dio como resultado una mayor profundidad de penetración y cantidad de proteína liberada en los sistemas donde el contenido de proteínas es mayor: el parche y el hidrogel. Este resultado es evidente en piel deficiente de barrera, mientras que en la piel intacta puede verse una penetración más eficiente empleando el parche. Finalmente se resalta que estos ensayos demostraron que el sistema que permitió una mejor penetración en piel intacta como deficiente de barrera fue el parche formado a partir de los NGs bifuncionales.

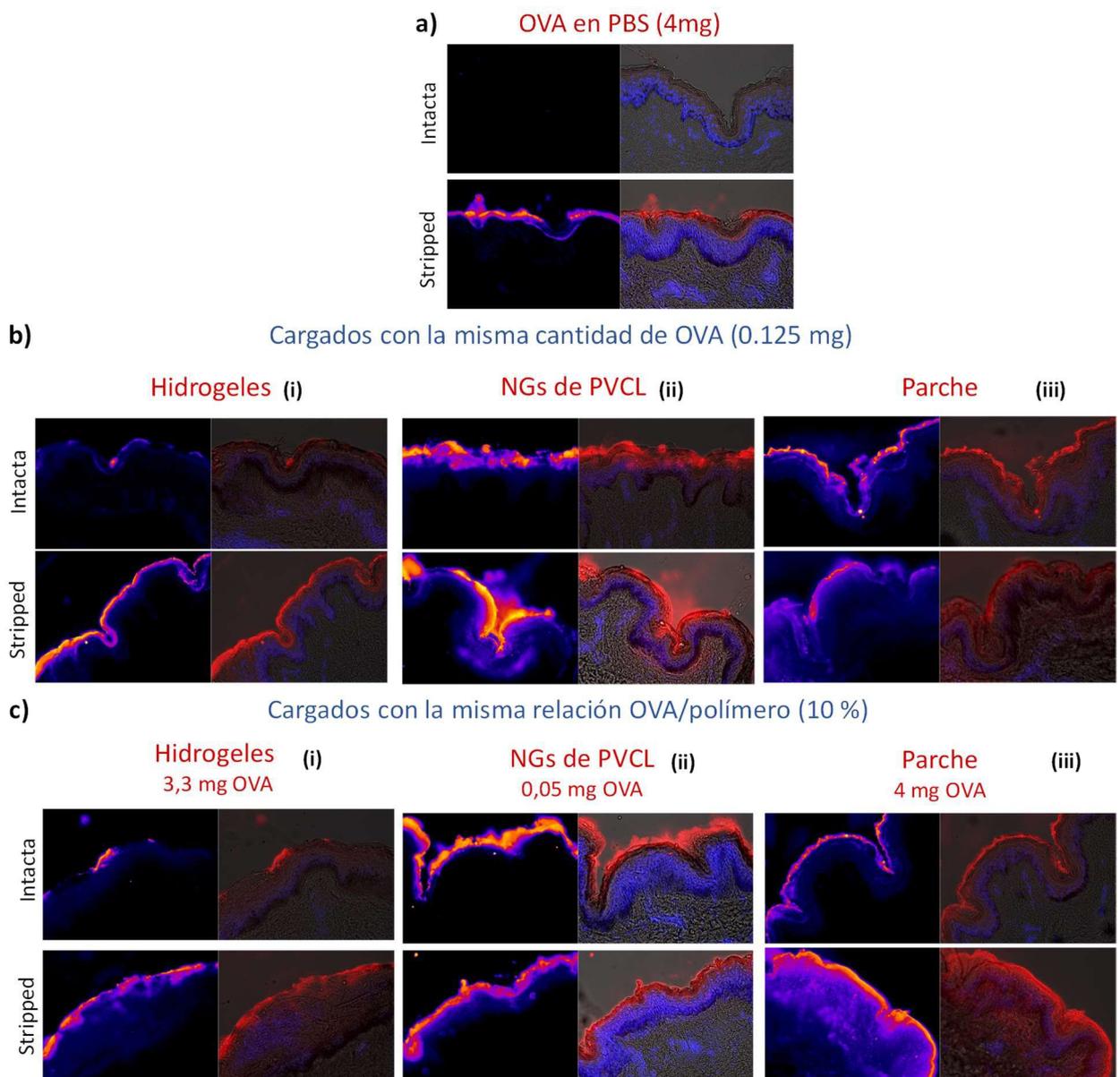


Figura 5.13. Resultados del ensayo de penetración en piel humana realizado empleando una solución de OVA con 4 mg/mL (a), igual cantidad de OVA cargada en los tres sistemas (b) e igual relación OVA/polímero en los tres sistemas (c).

5.4. Conclusiones

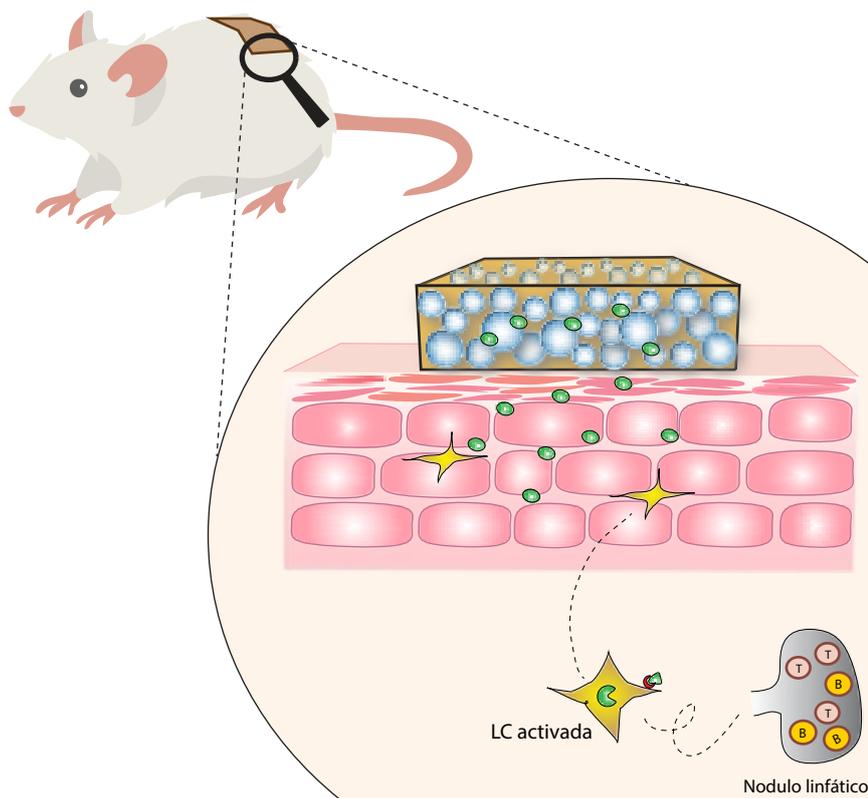
En este Capítulo, se comparó el desempeño de los NGs bifuncionales como sistema de liberación dermal con el hidrogel y los NGs de PVCL puros. Las tres variaciones estructurales consistieron en un hidrogel de PVCL con un tamaño de poro en el rango de 15-30 μm , NGs de PVCL con un diámetro colapsado promedio de 157 nm y un parche obtenido a partir de NGs bifuncionales de PVCL/acrílico con diámetro promedio colapsado de 393 nm y con capacidad de formación de película. Aunque los tres sistemas fueron sintetizados por diferentes estrategias, sus parámetros de síntesis se ajustaron para otorgarles características similares de respuesta térmica. Los tres sistemas fueron capaces de cargar OVA, siendo los NGs de PVCL los que mostraron la mayor capacidad de carga debido a su mayor área superficial. También se observó una liberación de OVA desencadenada por temperatura, donde se lograron velocidades de liberación *in vitro* más elevadas cuando la temperatura del medio estuvo por encima de la temperatura de transición del sistema estudiado. La integridad estructural de la OVA no se vio afectada por la carga y la liberación en los sistemas investigados.

En los estudios realizados sobre la capacidad de entrega de proteínas más allá del SC en biopsias de piel humana, se observó que los tres sistemas fueron eficientes en comparación con la aplicación de OVA en solución en PBS. Los NGs de PVCL solo mostraron una penetración de proteínas en la piel deficiente de barrera, siguiendo el comportamiento de otros NGs termosensibles reportados. La aplicación de los hidrogeles dio como resultado una pequeña penetración de OVA en la epidermis tardía de la piel intacta y deficiente de barrera. Los parches bifuncionales parecieron lograr una mayor cantidad de administración de OVA a la epidermis tanto en la piel intacta como en la piel tratada con cinta adhesiva. Las diferencias en la capacidad del sistema para administrar OVA a las capas más profundas de la piel podrían estar relacionadas con sus áreas superficiales y su capacidad para contraer y expulsar la proteína cargada en respuesta a un cambio de temperatura, generando un estímulo de penetración adicional. Estas propiedades favorecen a los NGs y al parche bifuncional, donde las plataformas de proteínas se basan en un sistema de nanopartículas, respecto del hidrogel.

Teniendo en cuenta la alteración del SC causada por la aplicación tópica de NGs de PVCL cargados de OVA y la mayor penetración de OVA en piel intacta que presentó el parche, se puede inferir que la plataforma basada en NGs bifuncionales resulta un buen candidato como sistema de inmunización transdérmica.

Capítulo 6

Aplicación in vivo de los NGs bifuncionales como sistema de vacunación transdermal



6.1. Introducción

Una vacuna normalmente está constituida por un inmunógeno (en este caso una proteína inmunogénica) y un adyuvante. La proteína inmunogénica es la encargada de inducir una respuesta inmunológica específica y los adyuvantes son sustancias que al administrarlos de forma simultánea con el inmunógeno generan una respuesta inmunológica más efectiva. Además de potenciar la respuesta inmunológica, los adyuvantes pueden usarse para redirigirla con el propósito de obtener el perfil de respuesta deseado. El análisis de los componentes inmunológicos generados por una vacuna es muy importante para determinar si se indujo una respuesta solamente humoral, o bien humoral y celular, ya que para cada patógeno los requerimientos pueden ser diferentes. Es por ello que contar con herramientas que permitan determinar la participación de componentes humorales y celulares es esencial para optimizar la respuesta.

La cuantificación de los isotipos de anticuerpos IgG1 e IgG2a en ratón permite realizar una primera aproximación sobre la respuesta humoral involucrada. El isotipo IgG1 está más asociado con una respuesta neutralizante no inflamatoria, mientras que el isotipo IgG2a se relaciona más con una respuesta inflamatoria con activación del complemento y de los fagocitos.¹²⁹ De esta manera, conociendo la relación IgG2a/IgG1 se puede evaluar si la respuesta está más orientada a la generación de anticuerpos inflamatorios (IgG2a/IgG1 mayor a 1) o neutralizantes (IgG2a/IgG1 menor a 1).

Para determinar la potencialidad de los NGs bifuncionales desarrollados en esta Tesis como sistema de vacunación transdermal es necesario evaluar su capacidad de inducir respuesta inmunológica en un modelo *in vivo*. Es por ello, que en este Capítulo se investigó la aplicación de los NGs bifuncionales en ratones de la cepa BALB/c, como dispersión con formación de una película directamente sobre la piel (*in situ*) y como un parche preformado. Con estos ensayos se pretende realizar una primera aproximación del perfil de respuesta generado y evaluar la posibilidad de redirección de la respuesta inmunológica mediante el empleo de un adyuvante. Se empleó OVA como inmunógeno y saponina (SAP) "Quil A" como adyuvante. La

SAP es un extracto acuoso de la corteza de *Quillaja saponaria* Molina ampliamente empleado como adyuvante en vacunas veterinarias,^{130,131} e incluso se ha demostrado que su utilización potencia la respuesta de vacunas administradas por las vías mucosales.¹³²

6.2. Trabajo experimental

6.2.1. Materiales

La Tabla 6.1, contiene la descripción de los reactivos que se utilizaron a lo largo del trabajo experimental del presente Capítulo. Todos los reactivos se utilizaron como fueron recibidos sin ninguna purificación adicional. El agua empleada a lo largo de todo el trabajo fue destilada y desmineralizada (DDI).

Tabla 6.1. Descripción de los reactivos empleados durante el trabajo experimental

Reactivo	Abreviatura	Función	Proveedor	Pureza
Albúmina de huevo	OVA	Proteína inmunogénica	Aldrich	98 %
Saponina (Quil A)	SAP	Adyuvante	Brenntag	-
Ketamina	KT	Anestésico	Holliday-Scott	-
Xilamina	Xi	Sedante	Farmavet	-

6.2.2. Modelo *in vivo*

Se trabajó con modelo murino empleando a los NGs S9 como plataforma de vacunación. Se estudió la influencia de dos parámetros sobre la respuesta inmunológica: el método de aplicación de los NGs bifuncionales y la inclusión de SAP como adyuvante.

Los estudios incluidos en este Capítulo se realizaron en colaboración con el Laboratorio de Tecnología Inmunológica (Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, FBCB-UNL). Se emplearon ratones hembra de la cepa BALB/c de 6 semanas de edad, adquiridos en la Facultad de Ciencias Veterinarias-UNL (Esperanza, Santa Fe). Los animales se mantuvieron en el bioterio de Inmunología Básica y Laboratorio de Tecnología Inmunológica (FBCB-UNL), en condiciones controladas de luz y temperatura, y con agua y alimento *ad libitum*. Todos los protocolos experimentales se llevaron a cabo en conformidad con las normas éticas internacionales para

animales de experimentación (“Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” del National Research Council de los Estados Unidos de Norteamérica, año 2011) y fueron aprobados por el Comité Asesor de Ética y Seguridad de la Investigación (CAESI) de la FBCB-UNL.

6.2.3. Inoculaciones

El desempeño de la plataforma basada en los NGs bifuncionales de PVCL/acrílicos, como sistema de vacunación transdermal, se estudió mediante su aplicación *in vivo* de dos maneras:

- a) como un parche preformado, donde se formó una película empleando 0.4 mL de la dispersión S9 en molde de jeringa de 1 cm de diámetro (Figura 4.2); y
- b) como película formada *in situ*, donde se aplicó directamente sobre la piel del ratón 10 μ L de la dispersión S9.

En los dos casos la dispersión S9 se cargó con 1 mg de OVA. Además, en el caso de la inoculación mediante el parche preformado se evaluó la incorporación de SAP como adyuvante, el cual se incorporó a la dispersión previo a la formación de la película en el molde.

La inoculación de los ratones se realizó siguiendo el protocolo expuesto en la Figura 6.1. En primer lugar, se anestesiaron los ratones con 100 μ L por ratón de suero fisiológico conteniendo Ketamina (53 %) y Xilazina (13 %) (Figura 6.1a). Una vez dormidos, se utilizaron tijeras quirúrgicas para cortar el pelo de la parte trasera baja (Figura 6.1b). Luego se aplicó la crema depilatoria Depimiel® para remover completamente el pelo, dejando la zona perfectamente depilada (Figura 6.1c-d). Antes de la aplicación de los NGs se pasó un algodón con alcohol para remover la crema depilatoria sobrante y se realizaron 6 tape stripping para remover parte del SC y favorecer la penetración del inmunógeno (Figura 6.1f). Después de 12 hs de realizada la depilación, se procedió a inocular los ratones con los parches preformados, los cuales se aplicaron y se sujetaron con una cinta impermeable Adhesur®, para asegurar la permanencia en el sitio de liberación e impedir la evaporación del agua (Figura 6.1g-h). Fue necesario realizar una segunda aplicación de cinta para asegurar la permanencia del parche en

contacto con la piel (Figura 6.1i). Los parches se mantuvieron aplicados durante 24 hs. Por otra parte, la aplicación *in situ* se realizó al momento de finalizar la depilación aprovechando la anestesia, para que la inmovilidad de los ratones permita una eficaz formación del film (Figura 6.1j).

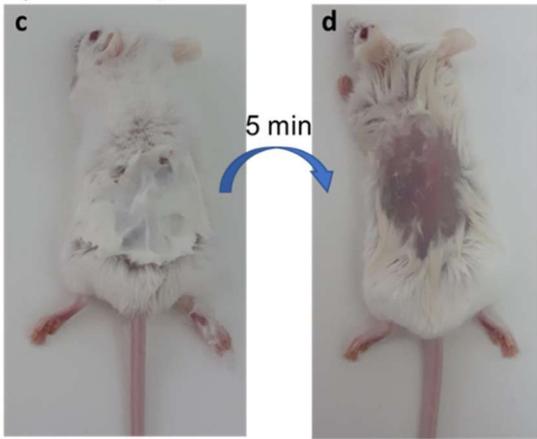
1) Inyección sedante



2) Corte de pelo con tijera



3) Crema depilatoria



4) Tape-stripping (x6)



5) Aplicación del Parche

Parche preformado (12 hs después)



In situ (en el momento)

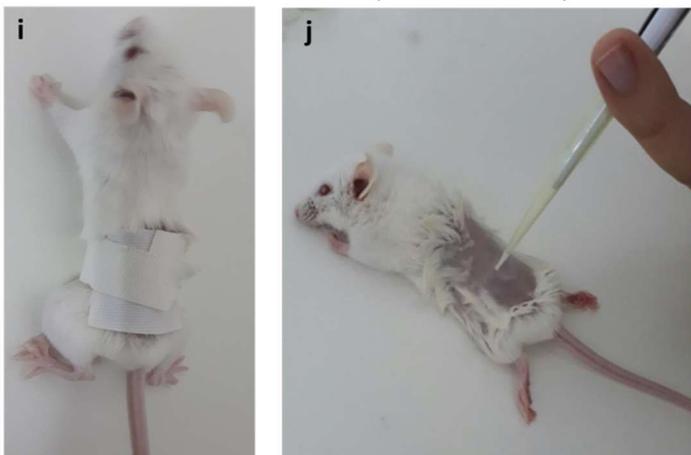


Figura 6.1. Metodología empleada para la inoculación de los ratones.

En la Tabla 6.2 se presentan los experimentos de inoculación, especificando la cantidad de OVA y SAP empleada para cada grupo, el método de aplicación del parche (preformado o formado *in situ*) y la cantidad de ratones en cada grupo (n).

Tabla 6.2. Experimentos de inoculación para evaluar la respuesta inmunológica *in vivo*.

Grupo	OVA (mg)	SAP (mg)	Aplicación	n
1	1	-	Preformado	5
2	1	0.2	Preformado	4
3	1	0.5	Preformado	5
4	1	1	Preformado	4
5	1	-	<i>In situ</i>	4
PBS	-	-	<i>In situ</i>	4

En el caso del parche preformado, el film obtenido se encuentra seco luego de atravesar todas las etapas del proceso de formación de film y, por lo tanto, es necesario hidratarlo antes de su empleo. Para ello, 2 horas antes de la aplicación los parches se hidrataron con 100 μ L de PBS y se incubaron a 4 °C. La Figura 6.2 muestra una foto de un parche preformado antes y después de su hidratación. Particularmente en el grupo 4, en lugar de PBS, los parches se hidrataron con 100 μ L de una solución de SAP en PBS de 5 mg/mL (0.5 mg de SAP). De esta forma, los parches de este grupo se cargaron con 1 mg de SAP, 0.5 mg al momento de formar el parche (como en el grupo 3) y 0.5 mg durante el proceso de hidratación (Tabla 6.2). Se espera que la SAP agregada en el segundo paso esté más disponible para generar un proceso de irritación que facilite la entrada de la OVA.

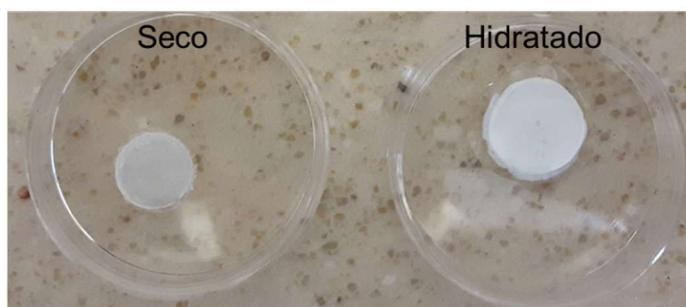


Figura 6.2. Parche empleado para la inmunización antes y después del proceso de hidratación.

En todos los grupos se aplicó el esquema de inmunización presentado en la Figura 6.3, administrando tres dosis separadas por 15 días. Cada inoculación consistió en la aplicación del parche durante 24 hs.

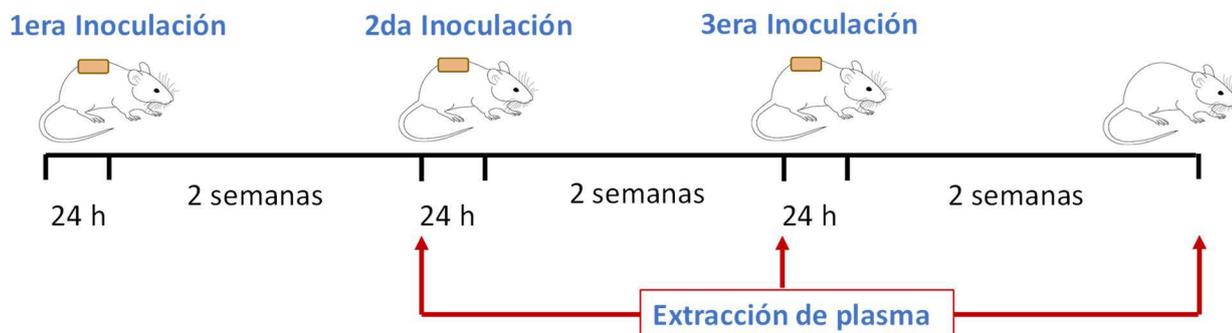


Figura 6.3. Esquema de inmunización empleado.

6.2.4. Extracción de plasma

Dos semanas después de cada inoculación, y antes de la siguiente, se extrajeron muestras de sangre de cada ratón (Figura 6.3) para evaluar la presencia de anticuerpos específicos mediante ELISA. Para llevar a cabo la extracción de plasma se anestesiaron los ratones con isofluorano y se tomaron muestras de sangre mediante punción retro-orbital con capilares heparinizados. Estas muestras fueron centrifugadas a 2000 rpm durante 5 minutos, se separaron los plasmas y se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

6.2.5. Evaluación de anticuerpos específicos

La existencia de anticuerpos específicos contra la OVA se determinó mediante ELISA indirecto, utilizando plasma de los ratones vacunados. Se evaluó la presencia de los isotipos IgG1 e IgG2a. A continuación, se describe el protocolo empleado, el cual se esquematiza en la Figura 6.4:

Etapa 1 - Sensibilización de la placa: En esta etapa se busca que la proteína quede adherida al fondo de la placa. Para ello, una solución de OVA de concentración conocida se agregó a la placa de ELISA de 96 wells, luego se incubó en estufa 1 h a 37°C , y se dejó en la heladera una noche. Al día siguiente, se descartó el contenido de la placa, y se realizaron tres lavados de la misma. Luego se agregó leche 5 % que será la encargada de adherirse a todos

aquellos sitios que no haya ocupado el antígeno (bloqueo), evitando así reacciones inespecíficas. La placa se incubó en estufa durante 1 h a 37 °C.

Etapa 2 – Agregado del suero: se descartó el contenido de la placa y se realizaron tres lavados de la misma. Luego se añadió el plasma obtenido de los ratones diluidos 1/100 y se llevó a estufa 1 h a 37°C. En este paso se espera que si el suero contiene anticuerpos que reconocen específicamente la OVA (Ac-OVA), éstos queden retenidos en la placa interaccionando con la OVA que a su vez está adherida a la placa.

Etapa 3 - Agregado del conjugado/anticuerpo marcado: se descartó el contenido de la placa, se realizaron tres lavados de la misma. Luego se adicionó una solución conteniendo un anticuerpo que reconoce a los Ac-OVA. Cuando se quiere cuantificar IgG1 se adicionan los anticuerpos que reconocen los IgG1 específicos de la OVA y de la misma forma para el otro isotipo. Se trabajó con diluciones de 1/20.000, en leche 1 %. Luego se llevó a estufa 1 h a 37°C.

Etapa 4 - Revelado: se descartó el contenido de la placa y se realizaron tres lavados de la misma. Posteriormente, se colocó una gota de la solución de revelado, y se dejó desarrollar la reacción colorimétrica por 10 min. Esta reacción se interrumpió mediante el agregado de una gota de ácido sulfúrico (0.16 M). Finalmente, se mide con un lector de placas a 450 nm la densidad óptica (DO) en cada uno de los Wells.

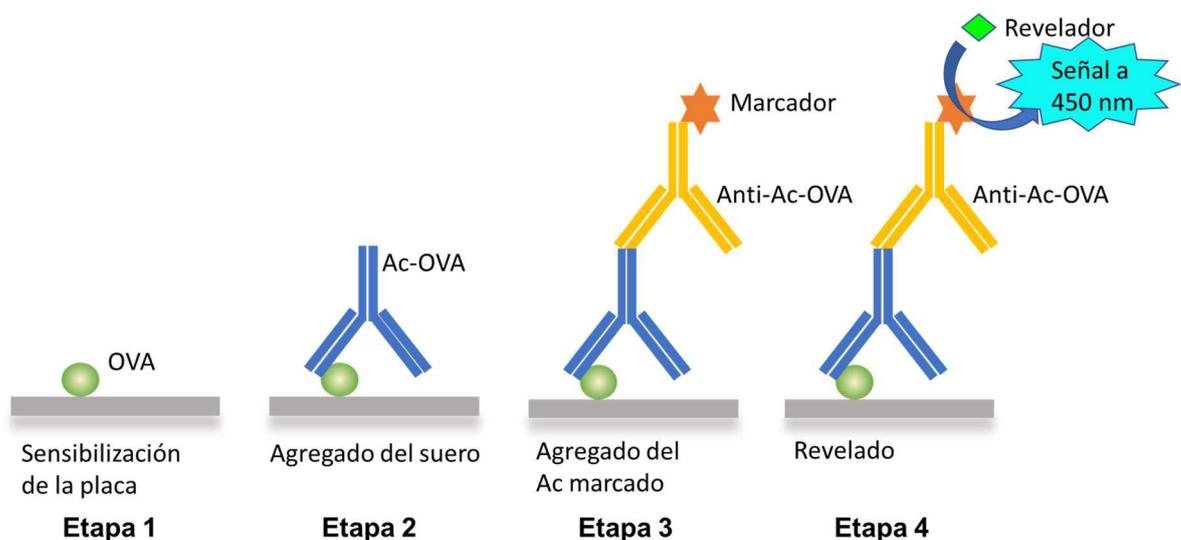


Figura 6.4. Esquema de las etapas del ELISA para detección de anticuerpos específicos.

6.2.6. Respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH)

Para detectar de forma preliminar la presencia de respuesta celular se realizó un estudio de respuesta de hipersensibilidad retardada, DTH por sus siglas en inglés. Esta respuesta normalmente está correlacionada con una respuesta celular, ya que se trata de un proceso inflamatorio. Una vez vacunados los ratones, y pasadas las dos semanas después de la última inmunización, se inoculó la pata derecha de los ratones con 20 μ L de una solución de PBS y 50 μ g de OVA. A las 48 hs se midió con un calibre el espesor de la pata inoculada y de la pata sin inocular (Figura 6.5). Una diferencia significativa entre los valores obtenidos en ambas mediciones es indicativo de la presencia de respuesta celular.



Figura 6.5. Ensayo de evaluación de DTH.

6.2.7. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo utilizando el programa Prisma 3.0 Software (GraphPad, San Diego, CA). Para el análisis de los datos se utilizaron los test de Mann-Whitney (para la comparación entre dos grupos) y Kruskal-Wallis (para la comparación entre 3 o más grupos). Se consideró una diferencia significativa entre grupos cuando $p < 0.05$.

6.3. Resultados y Discusiones

6.3.1. Influencia sobre la respuesta inmunológica del método de aplicación tópica de los NGs bifuncionales

Una característica que destaca a los NGs bifuncionales desarrollados en esta Tesis es que las películas o parches termosensibles se pueden formar antes de su aplicación (es decir, preformados) o directamente en la superficie de la piel (*in situ*) donde se persigue la liberación del inmunógeno. Con el objetivo de determinar si el método de aplicación influye en la respuesta inmunológica generada, se analizaron los ensayos donde los ratones se inocularon con la misma cantidad de OVA, empleando el parche preformado o formando la película *in situ*.

6.3.1.1. Respuesta humoral

Para evaluar la respuesta humoral generada por la administración de OVA a partir de los NGs bifuncionales en sus dos formas de aplicación (parche e *in situ*), se estudió la presencia de anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos de la OVA en cada uno de los grupos. Se analizó la cinética de producción de anticuerpos para evaluar el aporte de cada dosis administrada. Luego, para poder comparar la respuesta global generada en los distintos grupos se determinó, para cada animal inoculado, el área bajo la curva (AUC) entre los días 0 y 42 correspondientes al protocolo de inmunización (Figura 6.3) y se compararon dichas áreas con el test One-way ANOVA-Kruskall-Wallis.

En la Figura 6.6a se muestra la cinética de producción de anticuerpos IgG1 anti-OVA en los grupos inmunizados mediante la aplicación del parche preformado y del parche formado *in situ*, ambos cargados con 1 mg de OVA. Se observa que ambas metodologías de aplicación generan a partir de la segunda dosis una producción de IgG1 anti-OVA con niveles significativos respecto del grupo control (Mann-Whitney $p < 0.05$), los cuales permanecen constantes luego de aplicar la tercera. Estos resultados indican que la aplicación de dos dosis es suficiente para generar una buena producción de este tipo de anticuerpos. Además, ambos métodos de aplicación del sistema de vacunación basado en los NGs bifuncionales son capaces de inducir

la producción de anticuerpos IgG1, sin diferencia significativa en la respuesta global generada (Figura 6.6b) de acuerdo al análisis estadístico del AUC (Mann-Whitney $p > 0.05$). Por otro lado, se confirma que las dos formas de aplicación del parche generan una respuesta global, en cuanto a la producción de IgG1, que difiere significativamente del grupo control (Kruskall-Wallis $p=0.0005$).

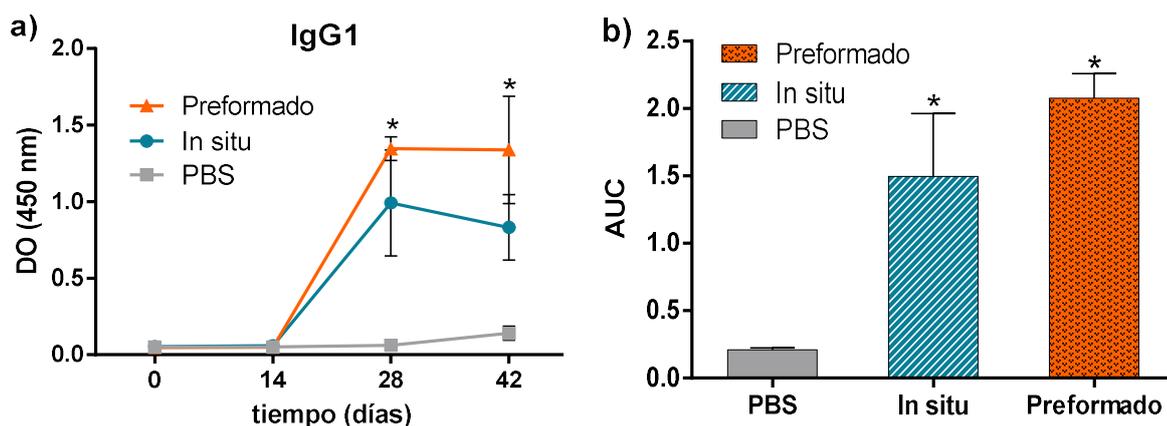


Figura 6.6. Evolución de la densidad óptica (DO) de IgG1 (a) y área bajo la curva (AUC) (b) de los grupos control (PBS), 1 y 5. *Diferencia significativa respecto del grupo PBS ($p < 0.05$).

En la Figura 6.7. se muestran los resultados de la cuantificación de los anticuerpos IgG2a anti-OVA. En ninguno de los dos grupos se observó una producción de este isotipo de anticuerpos específicos de la OVA, ya que no hay diferencia significativa con el grupo control luego de completar el esquema de inmunización. Estos resultados indican que la administración transdermal de OVA generó una respuesta fundamentalmente basada en anticuerpos IgG1.

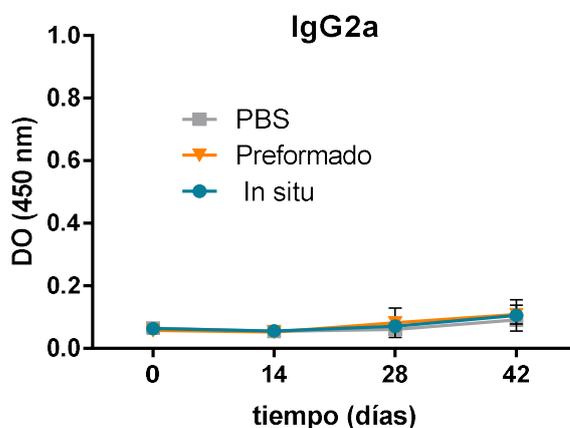


Figura 6.7. Evolución del índice de IgG2a de los grupos control (PBS), 1 y 5.

6.3.1.2. Respuesta celular

En la Figura 6.8 se muestran los resultados de DTH obtenidos para los tres grupos (control, parche preformado con 1 mg de OVA y película formada *in situ* con 1 mg de OVA). Los resultados se reportan en términos de la diferencia de mm entre el grosor de la pata inoculada y la pata sin inocular (Δ). Si bien, estadísticamente no se detectó una diferencia significativa entre los grupos, los resultados sugieren que el tratamiento con el parche preformado podría inducir respuesta celular, lo cual debería ser evaluado utilizando un número mayor de animales de experimentación.

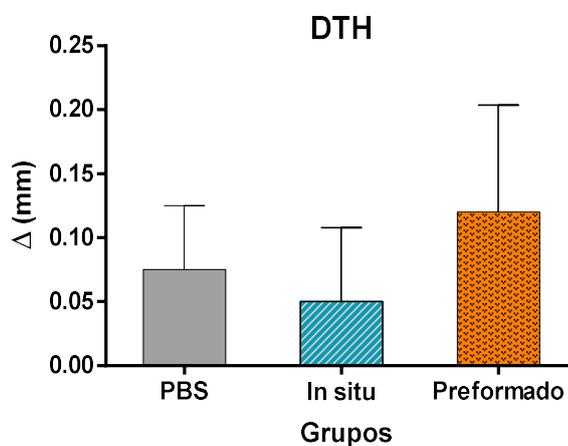


Figura 6.8. Análisis preliminar de la respuesta celular mediante DTH de los grupos control (PBS), 1 y 5.

En su conjunto, los resultados obtenidos indican que la aplicación de OVA con los NGs bifuncionales genera importantes niveles de anticuerpos específicos del isotipo IgG1, tanto formando el parche previamente, como formando la película directamente en la piel del individuo. Por lo tanto, la plataforma de inmunización transdermal aplicada de las dos maneras investigadas, tiene potencialidad para su aplicación como sistema de vacunación transdermal, para proteger contra patógenos donde se requiere una respuesta de anticuerpos neutralizantes gobernada por la respuesta humoral. Estos resultados coinciden con lo reportado por Ishii y col.,⁶³ quienes emplearon un parche de hidrogel comercial para la administración transdermal de OVA, llegando a la conclusión que la OVA aplicada de manera transdermal solo induce respuestas que involucran anticuerpos IgG1, sin provocar la producción de IgG2a.

6.3.2. Influencia sobre la respuesta inmunológica de la incorporación de saponina como adyuvante

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos a partir de la administración transdermal de OVA mediante los NGs bifuncionales y lo reportado anteriormente, se estudió la incorporación de SAP en la formulación como adyuvante, y su influencia en el perfil de respuesta inmunológica generado. Para ello, se administró de manera conjunta OVA y SAP en diferentes concentraciones empleando solamente el parche preformado como sistema de administración.

6.3.2.1. Respuesta humoral

En la Figura 6.9a se muestra la cinética de producción de anticuerpos IgG1 anti-OVA en los grupos inmunizados con 1 mg de OVA y diferentes concentraciones de SAP. Luego de la primera inoculación, el grupo 4 (que contiene 1 mg de SAP) fue el único grupo que presentó un nivel de anticuerpos con diferencia significativa respecto del control (Mann-Whitney $p < 0.05$). Sin embargo, luego de la segunda inoculación todos los grupos presentaron niveles de anti-OVA IgG1 con una diferencia significativa respecto al grupo PBS (control). Los datos de AUC (Figura 6.9b), permiten observar que la respuesta global generada por todos los grupos fue significativamente diferente a la del grupo control, y que la respuesta inmunológica global del grupo 4 fue significativamente mayor que las demás (Kruskal-Wallis sin el grupo PBS, $p = 0.02$).

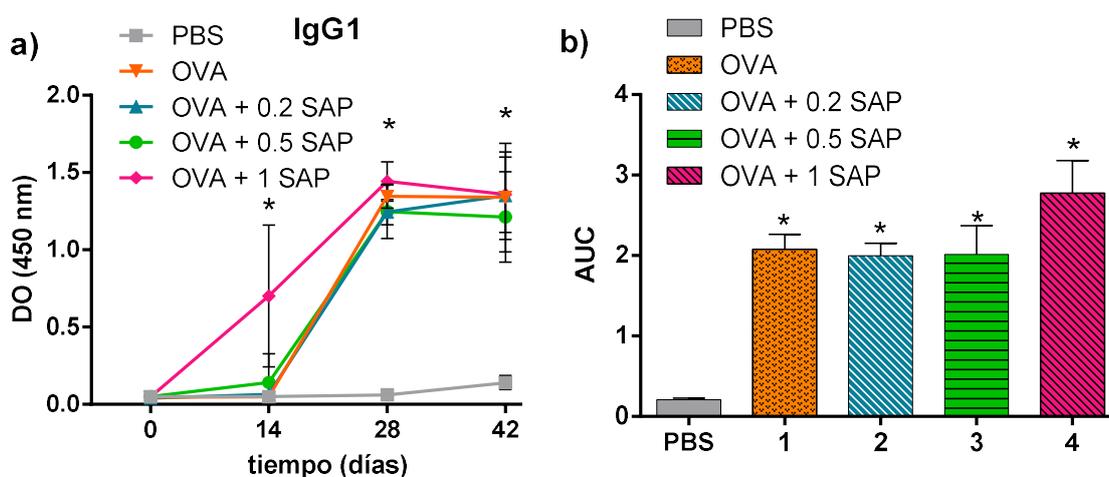


Figura 6.9. Evolución de la DO de IgG1-anti OVA (a) y área bajo la curva (AUC) (b) de los grupos 1-4 y control (PBS). *Diferencia significativa respecto del grupo PBS ($p < 0.05$).

Por otro lado, el análisis de la evolución de la producción de anticuerpos anti-OVA del isotipo IgG2a y el AUC muestra que el grupo 4 fue el único que generó esta clase de anticuerpos (Figura 6.10). La curva de cinética muestra que el nivel máximo de IgG2a se alcanzó en la segunda inoculación, y que la tercera dosis no indujo respuesta inmunológica adicional.

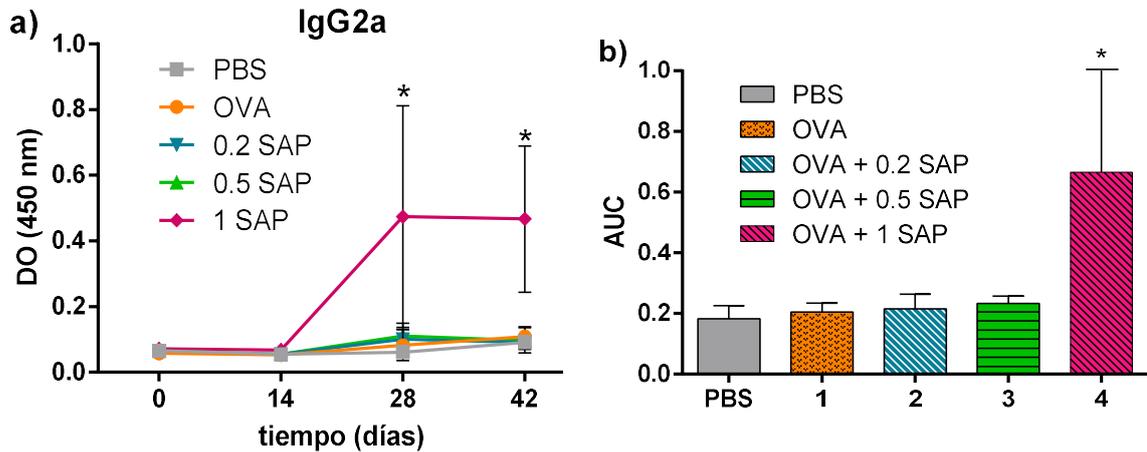


Figura 6.10. Evolución de la DO de IgG2a-anti OVA (a) y área bajo la curva (AUC) (b) de los grupos 1-4 y control (PBS). *Diferencia significativa respecto del grupo PBS ($p < 0.05$).

6.3.2.2. Respuesta celular

Si bien los resultados de DTH no alcanzaron significación estadística, resulta importante destacar que los grupos de mayor concentración de SAP (3 y 4) mostraron niveles de DTH notoriamente mayores al resto de los grupos. En este sentido, sería valioso reevaluar y analizar en detalle este tipo de respuesta empleando un número mayor de animales.

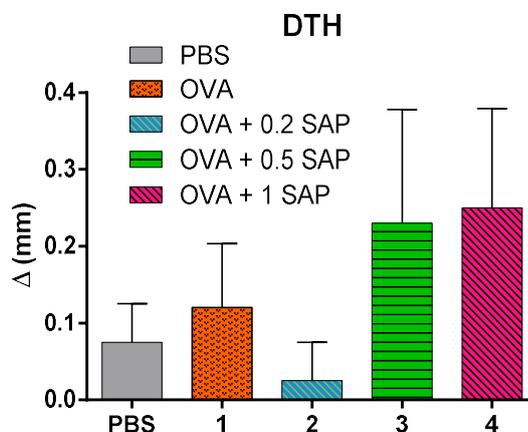


Figura 6.11. Análisis preliminar de la respuesta celular mediante DTH de los grupos 1-4 y control (PBS).

En la Figura 6.12 se muestran fotos de dos ratones pertenecientes a los grupos 1 y 4, respectivamente, luego de la primera inoculación y un instante después de retirar el parche. En la Figura 6.12a se puede observar que la zona donde estaba ubicado el parche sin SAP no presenta ninguna alteración; mientras que en la Figura 6.9b se puede advertir perfectamente que la zona de aplicación del parche con SAP se encuentra irritada. Esta irritación es un indicio de una respuesta inflamatoria, la cual se suele asociar a respuestas del tipo celular, como consecuencia de la presencia de SAP a una concentración suficientemente elevada para inducirla. Cabe destacar, que si bien en los grupos 2 y 3 no se generó respuesta del tipo celular significativa mediante la determinación del isotipo IgG2a, también se observó irritación en la zona donde estuvo aplicado el parche. Este resultado podría indicar que si bien no fue posible detectar una producción significativa de este isotipo, la incorporación de SAP favorece la respuesta celular en concordancia con los resultados preliminares de DTH.

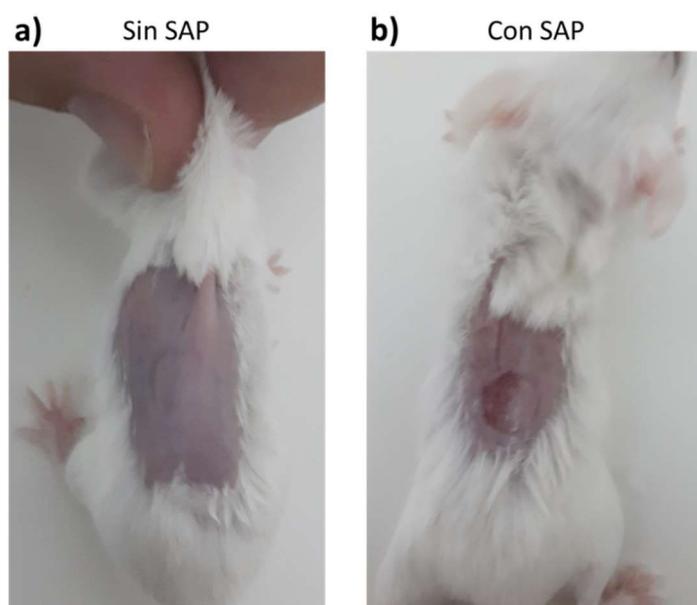


Figura 6.12. Fotos de los ratones luego de la primera inoculación (24 hs después de aplicar el parche), correspondientes a los grupos 1 (a) y 4 (b).

Los resultados obtenidos en esta sección sugieren que la SAP es capaz de influir en la respuesta inmune de acuerdo a la dosis empleada. A bajas dosis (0.2 y 0.5 mg), no se observaron diferencias significativas con el grupo control; en cambio, cuando se empleó 1 mg de SAP, el grupo 4 mostró producción temprana de anticuerpos IgG1 e inducción de IgG2a, respecto de los

demás grupos. Debido a que la SAP en el grupo 4 fue cargada de manera diferente, resta analizar en el futuro si este resultado se debe a que se requiere un mínimo de 1 mg de SAP para generar dicha respuesta, o a que la SAP está más disponible debido a que una parte de este adyuvante fue cargada luego de que el parche fue formado. Por último, cabe resaltar que se logró inducir la producción de anticuerpo IgG2a, influyendo en la relación IgG2a/IgG1, lo cual sugiere la generación de una respuesta inmune más balanceada, con anticuerpos IgG2a que complementan a los IgG1.

6.4. Conclusiones

En este Capítulo se evaluó *in vivo* la posible aplicación de los NGs bifuncionales como sistema de vacunación transdermal. En una primera instancia se estudió si la forma de aplicación de los NGs bifuncionales influye en la respuesta inmunológica generada. Los resultados sugieren que no hay diferencia significativa entre la aplicación tópica de la OVA empleando un parche preformado o formando la película *in situ* sobre la piel. La respuesta generada en ambos casos involucró la producción de anticuerpos IgG1 anti-OVA, sin inducción de anticuerpos del isotipo IgG2a y con una respuesta celular que no varió de forma significativa entre ambos grupos.

Por otro lado, se evaluó como afecta la inclusión en la formulación del parche de SAP como adyuvante. La inclusión de SAP en concentraciones menores a 1 mg no mostró influencia en la respuesta generada, mientras que el empleo de 1 mg de SAP indujo una producción temprana de IgG1, y producción de IgG2a. Debido a que estos resultados obtenidos pueden deberse tanto a la mayor cantidad de SAP empleada como a la forma de carga, en trabajos futuros se deberá estudiar como estos parámetros son responsables de la mejora en la respuesta inmunológica.

En todos los casos la tercera inoculación no aumentó la cantidad de anticuerpos generados, respecto de la alcanzada con la segunda dosis. Este resultado sugiere que en este sistema la aplicación de dos dosis es suficiente para generar el máximo nivel de anticuerpos posible con 1 mg de OVA.

Finalmente, a partir de los resultados obtenidos en este Capítulo se puede concluir que los NGs bifuncionales tienen potencial para ser empleados como sistema de vacunación transdermal, tanto aplicando el parche previamente formando o mediante la inoculación con la dispersión y formando la película *in situ*. Se destaca que esta plataforma permite no solo la penetración de una proteína inmunogénica como la OVA a la zona inmunocompetente de la piel, sino también la penetración de un adyuvante que genera una respuesta inmunológica más balanceada.

Capítulo 7

Conclusiones generales y propuestas para trabajos futuros



Los NGs termosensibles tienen un futuro muy prometedor en aplicaciones biomédicas debido a su capacidad para controlar la liberación de moléculas activas en un sitio específico de acción, frente a un cambio de temperatura. La facilidad con la que se pueden modificar estas estructuras poliméricas ha hecho posible el desarrollo de nanomateriales con variadas aplicaciones. El diseño de estrategias sintéticas que permitan ampliar las propiedades beneficiosas de estos materiales constituye la clave para optimizar su funcionamiento en la aplicación. Dentro de la amplia gama de aplicaciones de los NGs termosensibles, la liberación controlada de proteínas a través de la piel constituye un área de estudio naciente y con alto potencial tanto para tratamiento de enfermedades de la piel como para vacunación transdermal. La ruta transdermal presenta la ventaja de producir un efecto sistémico, evitando el metabolismo hepático y el paso por el tracto gastrointestinal, mayor tiempo de acción terapéutica y la disminución y control de las dosis. En el caso de la inmunización, la utilización de la vía transdermal es una propuesta simple, no invasiva, que evita contagios y es capaz de generar una respuesta a nivel piel, que proteja al individuo desde el instante en que el patógeno entra en contacto con la piel. Todas estas ventajas hacen de este método de vacunación un atractivo reemplazo para la vacunación convencional por inyección.

Con la presente Tesis se pretende contribuir al desarrollo de un sistema de vacunación transdermal, en el cual se proyecta que la vacuna se encuentre incluida en NGs y se libere de manera controlada. Con este objetivo se investigó la síntesis de NGs con doble funcionalidad: respuesta térmica y capacidad de formación de película, dos propiedades que no fueron combinadas anteriormente. Para ello se desarrolló un método de síntesis que permite combinar positivamente las propiedades de dos polímeros en forma sinérgica. Como resultado se obtuvieron NGs bifuncionales, los cuales fueron intensamente caracterizados y demostraron tener un gran potencial para actuar como sistema de vacunación transdermal.

A continuación, se resaltan los resultados más importantes del presente trabajo de Tesis, y se sugieren futuras tareas de investigación.

7.1. Conclusiones generales

Los resultados obtenidos en esta Tesis muestran que es posible sintetizar hidrogeles de PVCL con tamaños nanométricos (NGs) empleando una concentración de VCL mayor a la de su solubilidad, para obtener dispersiones con contenidos de sólidos superiores a 5 %. Los NGs sintetizados poseen una respuesta térmica que implica un cambio volumétrico al variar la temperatura, como consecuencia del cambio de solubilidad de la PVCL en agua. El empleo de una estrategia de síntesis semicontinua permitió la incorporación de BA a los NGs de PVCL, obteniendo como resultado partículas con dos fases compatibilizadas. Los NGs obtenidos presentaron una morfología lobular, donde el núcleo está formado por PVCL entrecruzada con BIS y la coraza, en forma de lóbulos, está compuesta por una fase rica en BA. La composición de las fases presentes en los NGs, así como la cantidad de lóbulos y sus tamaños se pudo modificar mediante la variación de la composición de dosificación y de las velocidades de dosificación. Además, se demostró que la cantidad de BA empleada en la síntesis tiene una fuerte influencia en la capacidad de coalescencia de las partículas, de manera que empleando un mínimo de 50 % de BA, respecto a la VCL, se logra obtener films resistentes a la inmersión en agua y con buenas propiedades mecánicas. Las películas formadas a partir de los NGs bifuncionales mostraron un comportamiento intermedio entre las películas de NGs de PVCL (muy frágil) y del látex de PBA (muy flexible, y alta capacidad de elongación), lo que indica una excelente sinergia entre las fases que las componen.

En cuanto a la capacidad del sistema para actuar como plataforma de vacunación transdermal, en primer lugar, se evaluó la citotoxicidad de los NGs bifuncionales en fibroblastos humanos. Los ensayos realizados mostraron que los materiales no presentan toxicidad celular, obteniendo valores de viabilidad relativa siempre por encima del umbral de toxicidad (75%). Además, se demostró que los NGs bifuncionales son capaces de cargar proteínas con una eficiencia de encapsulamiento de 100 %, durante la formación del parche. Los ensayos de liberación *in vitro* mostraron que el parche permite una liberación diferenciada con la temperatura, con una velocidad de liberación mucho mayor a la temperatura corporal que a temperatura

ambiente (25 °C). La aplicación tópica del parche (formado con los NGs bifuncionales) en piel humana demostró favorecer la penetración de una proteína inmunogénica modelo (OVA) hacia la epidermis, donde se encuentran las células de Langerhans, capaces de iniciar una respuesta inmune. La debilitación del estrato corneo (SC) mediante tape stripping permite la penetración en la piel de una cantidad de proteína superior y hasta una mayor profundidad.

Adicionalmente, se comparó en distintos niveles el desempeño del parche frente al de NGs e hidrogeles de PVCL, como sistemas de liberación tópica de proteínas. Los tres sistemas fueron capaces de cargar OVA, siendo los NGs de PVCL el sistema con la mayor capacidad de carga en relación a la cantidad de polímero empleado, y el parche el sistema con mayor eficiencia de encapsulamiento debido a que toda la proteína queda incorporada en el parche formado. El perfil de liberación de OVA en PBS de los tres sistemas mostró una mayor magnitud y velocidad de liberación de OVA a 37 °C en todos los casos, como consecuencia de la fuerza impulsora creada por el colapso de la PVCL a 37 °C. Los NGs de PVCL presentaron la mejor retención de proteínas a 25 °C y la importante liberación a 37 °C. Por el contrario, la diferencia en la liberación de proteína desde los hidrogeles fue menos evidente a las dos temperaturas respectivas. El parche presentó un comportamiento intermedio, donde la liberación de OVA es considerablemente mayor tras el colapso del parche provocado térmicamente a 37 °C. Un resultado a destacar es que la integridad estructural de la OVA no se vio afectada por la carga y la liberación en los tres sistemas investigados. Por lo tanto, se espera que la competencia terapéutica de la proteína cargada se conserve después aplicación dérmica. Por su parte, los ensayos de penetración en piel humana mostraron que los NGs de PVCL y el parche formado por los NGs bifuncionales permiten la penetración de OVA hasta la epidermis, mientras que la OVA aplicada con el hidrogel fue capaz de atravesar el SC solo en cantidades muy pequeñas y quedando en la epidermis tardía. Los NGs de PVCL produjeron una alteración celular del SC, debido posiblemente a la alta hidratación local del SC en contacto con esta plataforma. Teniendo en cuenta esta alteración y la baja penetración de proteína provocada por la aplicación del

hidrogel, el parche formado a partir de NGs bifuncionales surge como un candidato preferencial para su aplicación como sistema de inmunización transdermal.

Los ensayos *in vivo* realizados sobre modelo murino sugieren que no hay diferencia entre aplicar la OVA con el parche preformado o formándolo *in situ* mediante la aplicación del látex sobre la piel. La respuesta que se obtiene involucra la producción de anticuerpos IgG1 anti-OVA, sin inducción del isotipo IgG2a y con una respuesta celular que no varía de forma significativa. Por otro lado, se evaluó como afecta la inclusión de un adyuvante, saponina (SAP), en la formulación. La inclusión de SAP en cantidades de 0.2 y 0.5 mg no influyó en la respuesta generada, mientras que la presencia de 1 mg SAP indujo una producción temprana de IgG1, y producción de IgG2a, mostrando una superioridad en la respuesta del grupo tratado con esta formulación frente a los demás. En todos los casos una tercera inoculación no aumentó la cantidad de anticuerpos generados, respecto de la alcanzada con la segunda dosis, de manera que los resultados sugieren que en este sistema la aplicación de dos dosis es suficiente para generar la máxima respuesta inmunológica.

En su conjunto, los resultados obtenidos en esta Tesis sugieren fuertemente que los NGs bifuncionales tienen potencial para ser empleados como sistema de vacunación transdermal.

7.2. Sugerencias para trabajos futuros

A partir de los resultados alentadores obtenidos en la Tesis, se propone avanzar en la adaptación de los materiales desarrollados a aplicaciones puntuales. Para ello se empleará el método de síntesis semicontinua para otorgar a los NGs de PVCL diferentes funcionalidades superficiales que favorezcan una determinada aplicación. Específicamente se sugieren las siguientes actividades:

NGs para vacunación transdermal

- **NGs con capacidad de formación de film para vacunación transdermal contra el Mal de Chagas:** La enfermedad de Chagas, principal endemia en Latinoamérica, es causada

por el parásito *Trypanosoma cruzi*, cuya infección natural se produce a través de la piel, por lo tanto la administración transdermal constituye la vía óptima para vacunación contra esta enfermedad. Además, se espera que este medio de inoculación facilite la ejecución de campañas de vacunación en zonas alejadas de centros de salud, sin la necesidad de trasladar personal capacitado y minimizando los problemas de traslado y almacenamiento. Para el desarrollo de esta plataforma se pretende ajustar los parámetros de síntesis de los NGs bifuncionales desarrollados en la Tesis, con capacidad de formación de película, de manera que permitan la liberación tópica controlada y simultánea de una proteína inmunogénica del Chagas y de SAP como adyuvante. Para ello, se trabajará con diferentes herramientas que permitan optimizar la capacidad de carga de la proteína inmunogénica y la SAP y la liberación simultánea de ambas moléculas, de manera de despertar la respuesta inmunológica deseada. Se ajustará el grado de entrecruzamiento de los NGs empleando como entrecruzantes, *N,N*-metilénbisacrilamida (BIS) y etilenglicoldimetacrilato (EGDM), y el contenido de cargas de la red reticulada, mediante la incorporación de monómeros con funcionalidades especiales (ácido acrílico, 3-(Dimethylamino)propyl methacrylate, DMAPMA) (Figura 7.1a).

NGs para vacunación por mucosas

Debido a que la mucosa constituye una superficie enorme, aproximadamente 200 veces mayor que la superficie de la piel, y se estima que el 70 % de los agentes infecciosos entran al huésped por esta vía, se pretende extender la aplicación de los NGs para vacunación a través de mucosas, una vía de vacunación muy prometedora. Para lograr una eficiente administración en la mucosa, se desarrollaron dos estrategias que involucran micro y nanovehículos: mucoadhesión y mucopenetración. Los sistemas mucoadhesivos son capaces de adherirse a las membranas mucosas mediante diferentes interacciones, y de esa manera aumentan el tiempo de residencia en contacto con la mucosa, permitiendo durante este tiempo la liberación controlada de la molécula deseada. Otra estrategia para superar la barrera mucosa y lograr un mayor tiempo de retención en la superficie celular es desarrollar un nanoportador que puede

penetrar con eficacia la capa de mucosidad y acumularse en la superficie epitelial. Una forma de favorecer la mucopenetración consiste en agregar cargas negativas a la partícula, de manera que sufran repulsión con las cargas negativas presentes en la mucina, y evitar así la adhesión.

En este contexto se pretende trabajar en la síntesis de NGs que permitan la vacunación por ambas estrategias, mucoadhesión y mucopenetración.

- **NGs para mucoadhesión:** Se pretende funcionalizar superficialmente NGs de PVCL con poli(ácido acrílico), un polímero extensamente utilizado para obtener propiedades de mucoadhesión. Sobre estos NGs se investigará el efecto de la carga superficial de grupos carboxílicos y del tamaño de los NGs sobre la mucoadhesión (Figura 7.1b).
- **NGs para mucopenetración y targeting:** Para lograr la mucopenetración se empleará KPS como iniciador, de manera que los NGs presenten cargas negativas a pH neutro en su superficie. De esta forma, se pretende evitar la adhesión en la mucina. Por otro lado, se buscará dirigir la liberación de la vacuna a las células presentadoras de antígeno (APC). Para ello, se funcionalizará la superficie de los NGs con manosa, teniendo en cuenta que las APC de la mucosa tienen receptores de este compuesto (Figura 7.1c). Para lograr su incorporación se plantean 2 estrategias: 1) la modificación previa de la manosa con glicidilmetacrilato (GMA), para darle funcionalidad vinílica que permitan su incorporación durante la polimerización radicalaria; o 2) la incorporación de funcionalidad glicidilo en los NGs y su posterior decoración con manosa.

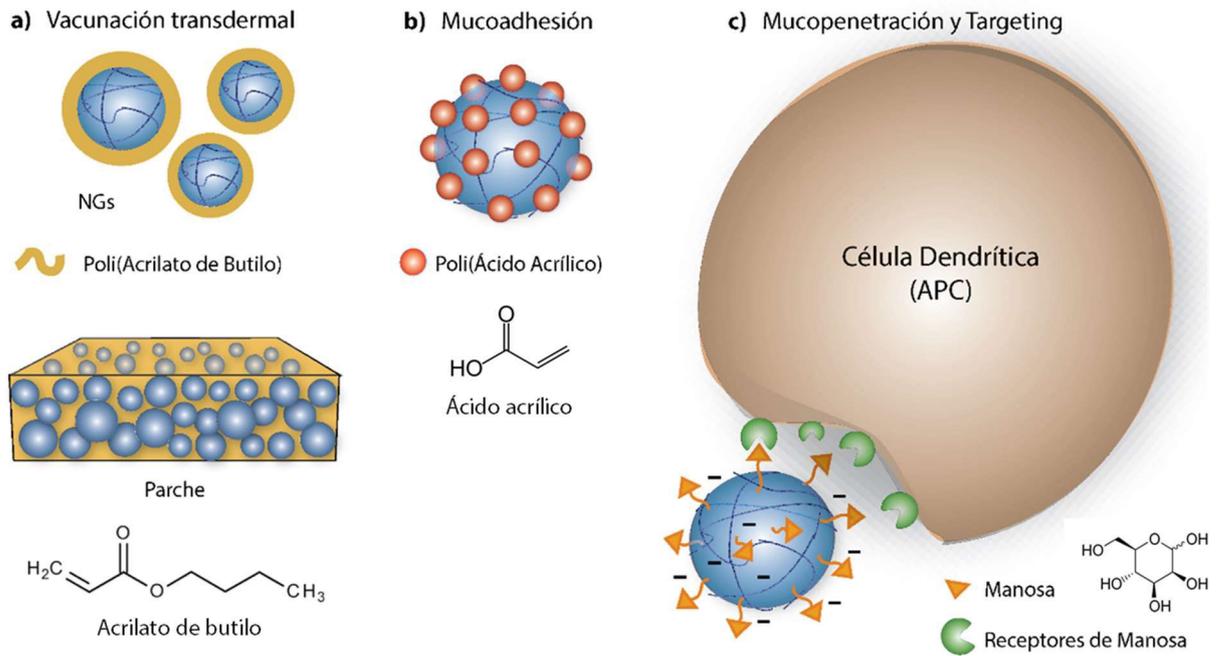


Figura 7.1. Esquema de la estructura de los NGs propuestos para vacunación vía transdermal y mucosa.

Referencias

- (1) Giubudagian, M.; Rancan, F.; Klossek, A.; Yamamoto, K.; Jurisch, J.; Neto, V. C.; Schrade, P.; Bachmann, S.; Rühl, E.; Blume-Peytavi, U.; et al. Correlation between the Chemical Composition of Thermoresponsive Nanogels and Their Interaction with the Skin Barrier. *J. Control. Release* **2016**, *243*, 323–332.
- (2) Babiuk, S.; Baca-Estrada, M.; Babiuk, L. A.; Ewen, C.; Foldvari, M. Cutaneous Vaccination: The Skin as an Immunologically Active Tissue and the Challenge of Antigen Delivery. *J. Control. Release* **2000**, *66* (2–3), 199–214.
- (3) Priya James, H.; John, R.; Alex, A.; Anoop, K. R. Smart Polymers for the Controlled Delivery of Drugs – a Concise Overview. *Acta Pharm. Sin. B* **2014**, *4* (2), 120–127.
- (4) Bergueiro, J.; Calderón, M. Thermoresponsive Nanodevices in Biomedical Applications. *Macromol. Biosci.* **2015**, *15* (2), 183–199.
- (5) Klouda, L.; Mikos, A. G. Thermoresponsive Hydrogels in Biomedical Applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *68* (1), 34–45.
- (6) Lutz, J.-F. Polymerization of Oligo(ethylene Glycol) (Meth)acrylates: Toward New Generations of Smart Biocompatible Materials. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2008**, *46* (11), 3459–3470.
- (7) Yasushi Maeda, *; Hiroki Yamamoto, and; Ikeda, I. Phase Separation of Aqueous Solutions of Poly(N-Isopropylacrylamide) Investigated by Confocal Raman Microscopy. **2003**.
- (8) Gandhi, A.; Paul, A.; Sen, S. O.; Sen, K. K. Studies on Thermoresponsive Polymers: Phase Behaviour, Drug Delivery and Biomedical Applications. *Asian J. Pharm. Sci.* **2015**, *10* (2), 99–107.
- (9) Makhaeva, E. E.; Thanh, L. T. M.; Starodoubtsev, S. C.; Khokhlov, A. R. Thermoshrinking Behavior of Poly(vinylcaprolactam) Gels in Aqueous Solution. **1996**, *197* (6), 1973–1982.
- (10) Tager AA, Safronov AP, Sharina SV, G. I. Thermodynamics of Aqueous Solutions of poly(N-Vinylcaprolactam). *Polym Sci USSR* **1990**, *32*, 469–474.
- (11) Solomon, O. F.; Corciovei, M.; Ciută, I.; Boghină, C. Properties of Solutions of Poly-N-Vinylcaprolactam. *J. Appl. Polym. Sci.* **1968**, *12* (8), 1835–1842.
- (12) Schild, H. G.; Tirrell, D. A. Microcalorimetric Detection of Lower Critical Solution Temperatures in Aqueous Polymer Solutions. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94* (10), 4352–4356.
- (13) Kirsh, I. E. (Іўїї E. *Water-Soluble Poly-N-Vinylamides: Synthesis and Physicochemical Properties*; Wiley, 1998.
- (14) Cortez-Lemus, N. A.; Licea-Claverie, A. Poly(N-Vinylcaprolactam), a Comprehensive Review on a Thermoresponsive Polymer Becoming Popular. *Prog. Polym. Sci.* **2016**, *53*, 1–51.
- (15) Pierre, T. St.; Chiellini, E. Review : Biodegradability of Synthetic Polymers Used for Medical and Pharmaceutical Applications: Part 1— Principles of Hydrolysis Mechanisms. *J. Bioact. Compat. Polym.* **1986**, *1* (4), 467–497.
- (16) Folkman, J.; Long, D. M. The Use of Silicone Rubber as a Carrier for Prolonged Drug Therapy. *J. Surg. Res.* **1964**, *4* (3), 139–142.
- (17) Laurencin, C. T.; Langer, R. Polymeric Controlled Release Systems: New Methods for Drug Delivery. *Clin. Lab. Med.* **1987**, *7* (2), 301–323.

- (18) Hoffman, A. S. The Origins and Evolution of “controlled” Drug Delivery Systems. *J. Control. Release* **2008**, *132* (3), 153–163.
- (19) Niu, C.-H.; Chiu, Y.-Y. FDA Perspective on Peptide Formulation and Stability Issues. *J. Pharm. Sci.* **1998**, *87* (11), 1331–1334.
- (20) Peppas, N. A.; Bures, P.; Leobandung, W.; Ichikawa, H. Hydrogels in Pharmaceutical Formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50* (1), 27–46.
- (21) Hoffman, A. S. Hydrogels for Biomedical Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54* (1), 3–12.
- (22) Sanna, R.; Fortunati, E.; Alzari, V.; Nuvoli, D.; Terenzi, A.; Casula, M. F.; Kenny, J. M.; Mariani, A. Poly(N-Vinylcaprolactam) Nanocomposites Containing Nanocrystalline Cellulose: A Green Approach to Thermoresponsive Hydrogels. *Cellulose* **2013**, *20* (5), 2393–2402.
- (23) Wu, D.-Q.; Chu, C.-C.; Chen, F. A. Cationic poly(VCL–AETA) Hydrogels and Ovalbumin (OVA) Release in Vitro. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, *19* (12), 3593–3601.
- (24) Chu, L.-Y.; Kim, J.-W.; Shah, R.; Weitz, D. Monodisperse Thermoresponsive Microgels with Tunable Volume-Phase Transition Kinetics. *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17* (17), 3499–3504.
- (25) Eckmann, D. M.; Composto, R. J.; Tsourkas, A.; Muzykantov, V. R. Nanogel Carrier Design for Targeted Drug Delivery. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2* (46), 8085–8097.
- (26) Boyko, V.; Richter, S.; Pich, A.; Arndt, K.-F. Poly(N -Vinylcaprolactam) Microgels. Polymeric Stabilization with Poly(vinyl Alcohol). *Colloid Polym. Sci.* **2003**, *282* (2), 127–132.
- (27) Mallikarjuna, B.; Madhu, K.; Rao, S.; Subha, M. C. S.; Prasad, C. V; Rao, K. C.; Rao, K. S. V. K. Synthesis, Characterization and Use of Poly (N-Isopropylacrylamide-Co-N-Vinylcaprolactam) Crosslinked Thermoresponsive Microspheres for Control Release of Ciproflaxin Hydrochloride Drug. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2011** (6), 171–177.
- (28) Häntzschel, N.; Hund, R.-D.; Hund, H.; Schrunner, M.; Lück, C.; Pich, A. Hybrid Microgels with Antibacterial Properties. *Macromol. Biosci.* **2009**, *9* (5), 444–449.
- (29) Lin, W.; Ma, X.; Qian, J.; Abdelrahman, A. I.; Halupa, A.; Baranov, V.; Pich, A.; Winnik, M. A. Synthesis and Mass Cytometric Analysis of Lanthanide-Encoded Polyelectrolyte Microgels. *Langmuir* **2011**, *27* (11), 7265–7275.
- (30) Shen, L.; Pich, A.; Fava, D.; Wang, M.; Kumar, S.; Wu, C.; Scholes, G. D.; Winnik, M. A. Loading Quantum Dots into Thermo-Responsive Microgels by Reversible Transfer from Organic Solvents to Water. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18* (7), 763.
- (31) Imaz, A.; Forcada, J. N -Vinylcaprolactam-Based Microgels: Synthesis and Characterization. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2008**, *46* (7), 2510–2524.
- (32) Imaz, A.; Forcada, J. Synthesis Strategies to Incorporate Acrylic Acid into N-Vinylcaprolactam- Based Microgels. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2011**, *49* (14), 3218–3227.
- (33) J., I. A. F. N-Vinylcaprolactam-Based Microgels: Effect of the Concentration and Type of Cross-Linker. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2008**, *46*, 2766–2775.
- (34) Imaz, A.; Forcada, J. Synthesis Strategies to Incorporate Acrylic Acid into N-Vinylcaprolactam-Based Microgels. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2011**, *49* (14), 3218–3227.
- (35) Imaz A. Forcada J. N-Vinylcaprolactam-Based Microgels for Biomedical Applications. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2010**, *48*, 1173–118.

- (36) Imaz, A.; Miranda, J. I.; Ramos, J.; Forcada, J. Evidences of a Hydrolysis Process in the Synthesis of N-Vinylcaprolactam-Based Microgels. *Eur. Polym. J.* **2008**, *44* (12), 4002–4011.
- (37) Imaz, A.; Forcada, J. Optimized Buffered Polymerizations to Produce N-Vinylcaprolactam-Based Microgels. *Eur. Polym. J.* **2009**, *45* (11), 3164–3175.
- (38) Li, N.; Peng, L. H.; Chen, X.; Nakagawa, S.; Gao, J. Q. Transcutaneous Vaccines: Novel Advances in Technology and Delivery for Overcoming the Barriers. *Vaccine* **2011**, *29* (37), 6179–6190.
- (39) Moser, M.; Leo, O. Key Concepts in Immunology. *Vaccine* **2010**, *28* (SUPPL. 3), 2–13.
- (40) Oberdan Leo, Anthony Cunningham, P. L. S. *Understanding Modern Vaccines: Perspectives in Vaccinology*; 2011.
- (41) Miller, M. A.; Pisani, E. The Cost of Unsafe Injections. *Bull. World Health Organ.* **1999**, *77* (10), 808–811.
- (42) Mitragotri, S. Immunization without Needles. *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, *5* (12), 905–916.
- (43) V. Sáez, E. Hernández, L. L. Revista Iberoamericana de Polímeros. *Rev. Iberoam. Polímeros* **2003**, *4*, 111–122.
- (44) Glenn, G. M.; Taylor, D. N.; Li, X.; Frankel, S.; Montemarano, A.; Alving, C. R. Transcutaneous Immunization: A Human Vaccine Delivery Strategy Using a Patch. *Nat. Med.* **2000**, *6* (12), 1403–1406.
- (45) Richmond, J. M.; Harris, J. E. Immunology and Skin in Health and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2014**, *4* (12), a015339–a015339.
- (46) Bouwstra, J.; Pilgram, G.; Gooris, G.; Koerten, H.; Ponec, M. New Aspects of the Skin Barrier Organization. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2001**, *14* (1), 52–62.
- (47) HINGSON, R. A.; FIGGE, F. H. J. A Survey of the Development of Jet Injection in Parenteral Therapy. *Curr. Res. Anesth. Analg.* **31** (6), 361–366.
- (48) Weniger, B. G. Jet injection of vaccines: overview and challenges for mass vaccination with jet injections.
- (49) Jackson, L. A.; Austin, G.; Chen, R. T.; Stout, R.; DeStefano, F.; Gorse, G. J.; Newman, F. K.; Yu, O.; Weniger, B. G.; Vaccine Safety Datalink Study Group. Safety and Immunogenicity of Varying Dosages of Trivalent Inactivated Influenza Vaccine Administered by Needle-Free Jet Injectors. *Vaccine* **2001**, *19* (32), 4703–4709.
- (50) Williams, J.; Fox-Leyva, L.; Christensen, C.; Fisher, D.; Schlicting, E.; Snowball, M.; Negus, S.; Mayers, J.; Koller, R.; Stout, R. Hepatitis A Vaccine Administration: Comparison between Jet-Injector and Needle Injection. *Vaccine* **2000**, *18* (18), 1939–1943.
- (51) Matheï, C.; Van Damme, P.; Meheus, A. Hepatitis B Vaccine Administration: Comparison between Jet-Gun and Syringe and Needle. *Vaccine* **1997**, *15* (4), 402–404.
- (52) Hoffman, P. N.; Abuknesha, R. A.; Andrews, N. J.; Samuel, D.; Lloyd, J. S. A Model to Assess the Infection Potential of Jet Injectors Used in Mass Immunisation. *Vaccine* **2001**, *19* (28–29), 4020–4027.
- (53) Chen, D.; Maa, Y.-F.; Haynes, J. R. Needle-Free Epidermal Powder Immunization. *Expert Rev. Vaccines* **2002**, *1* (3), 265–276.
- (54) Chen, D.; Endres, R.; Maa, Y.-F.; Kensil, C. R.; Whitaker-Dowling, P.; Trichel, A.; Youngner, J. S.; Payne, L. G. Epidermal Powder Immunization of Mice and Monkeys with an Influenza Vaccine. *Vaccine* **2003**, *21* (21–22), 2830–2836.
- (55) Dean, H. J.; Chen, D. Epidermal Powder Immunization against Influenza. *Vaccine* **2004**,

- 23 (5), 681–686.
- (56) Gupta, P. N.; Mishra, V.; Singh, P.; Rawat, A.; Dubey, P.; Mahor, S.; Vyas, S. P. Tetanus Toxoid-Loaded Transfersomes for Topical Immunization. *J. Pharm. Pharmacol.* **2005**, *57* (3), 295–301.
- (57) Arya, J.; Prausnitz, M. R. Microneedle Patches for Vaccination in Developing Countries. *J. Control. Release* **2016**, *240*, 135–141.
- (58) Witting, M.; Molina, M.; Obst, K.; Plank, R.; Eckl, K. M.; Hennies, H. C.; Calderón, M.; Frieß, W.; Hedtrich, S. Thermosensitive Dendritic Polyglycerol-Based Nanogels for Cutaneous Delivery of Biomacromolecules. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2015**, *11* (5), 1179–1187.
- (59) Zhang, I.; Shung, K. K.; Edwards, D. A. Hydrogels with Enhanced Mass Transfer for Transdermal Drug Delivery. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85* (12), 1312–1316.
- (60) Bramson, J.; Dayball, K.; Eveleigh, C.; Wan, Y. H.; Page, D.; Smith, A. Enabling Topical Immunization via Microporation: A Novel Method for Pain-Free and Needle-Free Delivery of Adenovirus-Based Vaccines. *Gene Ther.* **2003**, *10* (3), 251–260.
- (61) Priya, B.; Rashmi, T.; Bozena, M.; Rashmi, T.; Michniak, B.; Bozena, M. Transdermal Iontophoresis. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2006**, *3* (1), 127–138.
- (62) Matsuo, K.; Ishii, Y.; Quan, Y. S.; Kamiyama, F.; Mukai, Y.; Yoshioka, Y.; Okada, N.; Nakagawa, S. Transcutaneous Vaccination Using a Hydrogel Patch Induces Effective Immune Responses to Tetanus and Diphtheria Toxoid in Hairless Rat. *J. Control. Release* **2011**, *149* (1), 15–20.
- (63) Ishii, Y.; Nakae, T.; Sakamoto, F.; Matsuo, K.; Matsuo, K.; Quan, Y. S.; Kamiyama, F.; Fujita, T.; Yamamoto, A.; Nakagawa, S.; et al. A Transcutaneous Vaccination System Using a Hydrogel Patch for Viral and Bacterial Infection. *J. Control. Release* **2008**, *131* (2), 113–120.
- (64) Edlich, A.; Gerecke, C.; Giulbudagian, M.; Neumann, F.; Hedtrich, S.; Schäfer-Korting, M.; Ma, N.; Calderon, M.; Kleuser, B. Specific Uptake Mechanisms of Well-Tolerated Thermoresponsive Polyglycerol-Based Nanogels in Antigen-Presenting Cells of the Skin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2016**, *116*, 155–163.
- (65) Rancan, F.; Giulbudagian, M.; Jurisch, J.; Blume-Peytavi, U.; Calderón, M.; Vogt, A. Drug Delivery across Intact and Disrupted Skin Barrier: Identification of Cell Populations Interacting with Penetrated Thermoresponsive Nanogels. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, *116*, 4–11.
- (66) Don, T.-M.; Huang, M.-L.; Chiu, A.-C.; Kuo, K.-H.; Chiu, W.-Y.; Chiu, L.-H. Preparation of Thermo-Responsive Acrylic Hydrogels Useful for the Application in Transdermal Drug Delivery Systems. *Mater. Chem. Phys.* **2008**, *107* (2), 266–273.
- (67) Winnik, M. A. Latex Film Formation. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1997**, *2* (2), 192–199.
- (68) Sewell, G. Importance and Measurement of Minimum Film-forming Temperature. *Pigment Resin Technol.* **1998**, *27* (3), 173–174.
- (69) Ramos, J.; Imaz, A.; Forcada, J. Temperature-Sensitive Nanogels: poly(N-Vinylcaprolactam) versus poly(N-Isopropylacrylamide). *Polym. Chem.* **2012**, *3*, 852–856.
- (70) Ramos, J.; Forcada, J.; Hidalgo-Alvarez, R. Cationic Polymer Nanoparticles and Nanogels: From Synthesis to Biotechnological Applications. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (1), 367–428.
- (71) Rejinold, N. S.; Chennazhi, K. P.; Nair, S. V.; Tamura, H.; Jayakumar, R. Biodegradable and Thermo-Sensitive Chitosan-G-poly(N-Vinylcaprolactam) Nanoparticles as a 5-

- Fluorouracil Carrier. **2011**, 83 (2), 776–786.
- (72) Mundargi, R. C.; Rangaswamy, V.; Aminabhavi, T. M. Poly(*N*-Vinylcaprolactam- Co - Methacrylic Acid) Hydrogel Microparticles for Oral Insulin Delivery. *J. Microencapsul.* **2011**, 28 (5), 384–394.
- (73) Janssen, F. A. L.; Kather, M.; Kröger, L. C.; Mhamdi, A.; Leonhard, K.; Pich, A.; Mitsos, A. Synthesis of Poly(*N*-Vinylcaprolactam)-Based Microgels by Precipitation Polymerization: Process Modeling and Experimental Validation. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2017**, acs.iecr.7b03263.
- (74) Kangas L, Grönroos M, N. A. Bioluminescence of Cellular ATP: A New Method for Evaluating Cytotoxic Agents in Vitro. *Med. Biol.* **1984**, 62 (6), 338–343.
- (75) Lovell, P. A., El-Aasser, M. S. *Features of Emulsion Polymerization. In Emulsion Polymerization and Emulsion Polymers*; J. Wiley & Sons, Ed.; New York, 1997.
- (76) F. A. Bovey, I. M. Kolthoff, A. I. Medalla, E. J. Meehan. Emulsion Polymerization (High Polymers, IX). *J. Polym. Sci.* **1955**, 18 (87), 105–106.
- (77) Feeney, P. J.; Napper, D. H.; Gilbert, R. G. Coagulative Nucleation and Particle Size Distributions in Emulsion Polymerization. *Macromolecules* **1984**, 17 (12), 2520–2529.
- (78) Feeney, P. J.; Napper, D. H.; Gilbert, R. G. Surfactant-Free Emulsion Polymerizations: Predictions of the Coagulative Nucleation Theory. *Macromolecules* **1987**, 20 (11), 2922–2930.
- (79) Lichti, G.; Gilbert, R. G.; Napper, D. H. The Mechanisms of Latex Particle Formation and Growth in the Emulsion Polymerization of Styrene Using the Surfactant Sodium Dodecyl Sulfate. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **1983**, 21 (1), 269–291.
- (80) Kirsh, Y. .; Yanul, N. .; Kalninch, K. . Structural Transformations and Water Associate Interactions in Poly-*N*-Vinylcaprolactam–water System. *Eur. Polym. J.* **1999**, 35 (2), 305–316.
- (81) Solomon, O. F.; Corciovei, M.; Ciută, I.; Boghină, C. Properties of Solutions of poly-*N*-vinylcaprolactam. **1968**, 12 (8), 1835–1842.
- (82) and, J. O. K.; Gatenholm*, P. Surface Mobility of Grafted Hydrogels. **1999**.
- (83) and, S. P.; Wu*, C. Ca²⁺-Induced Thermoreversible and Controllable Complexation of Poly(*N*-Vinylcaprolactam-Co-Sodium Acrylate) Microgels in Water. **2001**.
- (84) Peng, S.; Wu, C. Controllable Interaction between Cations and Thermally Sensitive poly(*N*-Vinylcaprolactam-Co-Sodium Acrylate) Microgels in Water. *Polymer (Guildf).* **2001**, 42 (16), 6871–6876.
- (85) Salopek, B.; Krasić, D.; Filipović, S. Measurement and Application of Zeta-Potential. *Rud. Zb.* **1992**, 4 (1), 147–151.
- (86) Yang, S.-T.; Liu, Y.; Wang, Y.-W.; Cao, A. Biosafety and Bioapplication of Nanomaterials by Designing Protein-Nanoparticle Interactions. *Small* **2013**, 9 (9–10), 1635–1653.
- (87) Bertrand, N.; Grenier, P.; Mahmoudi, M.; Lima, E. M.; Appel, E. A.; Dormont, F.; Lim, J.-M.; Karnik, R.; Langer, R.; Farokhzad, O. C. Mechanistic Understanding of in Vivo Protein Corona Formation on Polymeric Nanoparticles and Impact on Pharmacokinetics. *Nat. Commun.* **2017**, 8 (1), 777.
- (88) Fröhlich, E. The Role of Surface Charge in Cellular Uptake and Cytotoxicity of Medical Nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, 7, 5577–5591.
- (89) Felton, L. A. Mechanisms of Polymeric Film Formation. *Int. J. Pharm.* **2013**, 457 (2), 423–427.
- (90) Cheng, S. .; Feng, W.; Pashikin, I. .; Yuan, L. .; Deng, H. .; Zhou, Y. Radiation

- Polymerization of Thermo-Sensitive Poly (N-Vinylcaprolactam). *Radiat. Phys. Chem.* **2002**, 63 (3), 517–519.
- (91) Kenney, J. F.; Haddock, T. H.; Sun, R. L.; Parreira, H. C. Medical-Grade Acrylic Adhesives for Skin Contact. *J. Appl. Polym. Sci.* **1992**, 45 (2), 355–361.
- (92) Verbrugge, S.; Bernaerts, K.; Prez, F. E. Du. Thermo-Responsive and Emulsifying Properties of Poly (N-Vinylcaprolactam) Based Graft Copolymers. *Macromol. Chem. Phys.* **2003**, 204, 1217–1225.
- (93) Mie, G. Beiträge Zur Optik Trüber Medien, Speziell Kolloidaler Metallösungen. *Ann. Phys.* **1908**, 330 (3), 377–445.
- (94) Horcas, I.; Fernández, R.; Gómez-Rodríguez, J. M.; Colchero, J.; Gómez-Herrero, J.; Baro, A. M. WSXM : A Software for Scanning Probe Microscopy and a Tool for Nanotechnology. *Rev. Sci. Instrum.* **2007**, 78 (1), 13705.
- (95) Keddie, J. L. Film Formation of Latex. *Mater. Sci. Eng. R Reports* **1997**, 21 (3), 101–170.
- (96) Stalder, A. F.; Melchior, T.; Müller, M.; Sage, D.; Blu, T.; Unser, M. Low-Bond Axisymmetric Drop Shape Analysis for Surface Tension and Contact Angle Measurements of Sessile Drops. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2010**, 364 (1–3), 72–81.
- (97) Blenner, D.; Stubbs, J.; Sundberg, D. Multi-Lobed Composite Polymer Nanoparticles Prepared by Conventional Emulsion Polymerization. *Polym. (United Kingdom)* **2017**, 114, 54–63.
- (98) Pons, L. Estrato Córneo. Aspectos Relacionados Con Su Hidratación Y Permeabilidad. *Actual. científica. Cosmética al día* **2004**, 23, 166–168.
- (99) Scheuplein R. Site Variations in Diffusion and Permeability. The Physiology and Pathophysiology of the Skin. *Acad. Press* **1978**, 1731–1752.
- (100) McDonagh, P. F.; Williams, S. K. The Preparation and Use of Fluorescent-Protein Conjugates for Microvascular Research. *Microvasc. Res.* **1984**, 27 (1), 14–27.
- (101) Alnasif, N.; Zoschke, C.; Fleige, E.; Brodewolf, R.; Boreham, A.; Rühl, E.; Eckl, K.-M.; Merk, H.-F.; Hennies, H. C.; Alexiev, U.; et al. Penetration of Normal, Damaged and Diseased Skin — An in Vitro Study on Dendritic Core–multishell Nanotransporters. *J. Control. Release* **2014**, 185, 45–50.
- (102) Salmaso, S.; Caliceti, P. Self Assembling Nanocomposites for Protein Delivery: Supramolecular Interactions of Soluble Polymers with Protein Drugs. *Int. J. Pharm.* **2013**, 440 (1), 111–123.
- (103) Chen, W.; Li, H.; Shi, D.; Liu, Z.; Yuan, W. Microneedles As a Delivery System for Gene Therapy. *Front. Pharmacol.* **2016**, 7, 137.
- (104) Wang, Y.; Thakur, R.; Fan, Q.; Michniak, B. Transdermal Iontophoresis: Combination Strategies to Improve Transdermal Iontophoretic Drug Delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2005**, 60 (2), 179–191.
- (105) Mitsui, H.; Watanabe, T.; Saeki, H.; Mori, K.; Fujita, H.; Tada, Y.; Asahina, A.; Nakamura, K.; Tamaki, K. Differential Expression and Function of Toll-like Receptors in Langerhans Cells: Comparison with Splenic Dendritic Cells. *J. Invest. Dermatol.* **2004**, 122 (1), 95–102.
- (106) Tay, S. S.; Roediger, B.; Tong, P. L.; Tikoo, S.; Weninger, W. The Skin-Resident Immune Network. *Curr. Dermatol. Rep.* **2014**, 3 (1), 13–22.
- (107) Choy, Y. Bin; Prausnitz, M. R. The Rule of Five for Non-Oral Routes of Drug Delivery: Ophthalmic, Inhalation and Transdermal. *Pharm. Res.* **2011**, 28 (5), 943–948.

- (108) Bouwstra, J. A.; Ponec, M. The Skin Barrier in Healthy and Diseased State. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2006**, *1758* (12), 2080–2095.
- (109) Shi, Z.; Curiel, D. T.; Tang, D. C. DNA-Based Non-Invasive Vaccination onto the Skin. *Vaccine* **1999**, *17* (17), 2136–2141.
- (110) Partidos, C. D.; Beignon, A.-S.; Mawas, F.; Belliard, G.; Briand, J.-P.; Muller, S. Immunity under the Skin: Potential Application for Topical Delivery of Vaccines. *Vaccine* **2003**, *21* (7–8), 776–780.
- (111) Hammond, S. A.; Guebre-Xabier, M.; Yu, J.; Glenn, G. M. Transcutaneous Immunization: An Emerging Route of Immunization and Potent Immunostimulation Strategy. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **2001**, *18* (5), 503–526.
- (112) Chen, Y.; Wu, Y.; Gao, J.; Zhang, Z.; Wang, L.; Chen, X.; Mi, J.; Yao, Y.; Guan, D.; Chen, B.; et al. Transdermal Vascular Endothelial Growth Factor Delivery with Surface Engineered Gold Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (6), 5173–5180.
- (113) Karande, P.; Jain, A.; Mitragotri, S. Insights into Synergistic Interactions in Binary Mixtures of Chemical Permeation Enhancers for Transdermal Drug Delivery. *J. Control. Release* **2006**, *115* (1), 85–93.
- (114) Chen, Y.; Shen, Y.; Guo, X.; Zhang, C.; Yang, W.; Ma, M.; Liu, S.; Zhang, M.; Wen, L.-P. Transdermal Protein Delivery by a Coadministered Peptide Identified via Phage Display. *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24* (4), 455–460.
- (115) Vij, M.; Natarajan, P.; Pattnaik, B. R.; Alam, S.; Gupta, N.; Santhiya, D.; Sharma, R.; Singh, A.; Ansari, K. M.; Gokhale, R. S.; et al. Non-Invasive Topical Delivery of Plasmid DNA to the Skin Using a Peptide Carrier. *J. Control. Release* **2016**, *222*, 159–168.
- (116) Gennari, C. G. M.; Franzè, S.; Pellegrino, S.; Corsini, E.; Vistoli, G.; Montanari, L.; Minghetti, P.; Cilurzo, F. Skin Penetrating Peptide as a Tool to Enhance the Permeation of Heparin through Human Epidermis. *Biomacromolecules* **2016**, *17* (1), 46–55.
- (117) Yang, Y.; Sunoqrot, S.; Stowell, C.; Ji, J.; Lee, C.-W.; Kim, J. W.; Khan, S. A.; Hong, S. Effect of Size, Surface Charge, and Hydrophobicity of Poly(amidoamine) Dendrimers on Their Skin Penetration. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (7), 2154–2162.
- (118) Witting, M.; Boreham, A.; Brodewolf, R.; Vávrová, K.; Alexiev, U.; Friess, W.; Hedtrich, S. Interactions of Hyaluronic Acid with the Skin and Implications for the Dermal Delivery of Biomacromolecules. *Mol. Pharm.* **2015**, *12* (5), 1391–1401.
- (119) Giubudagian, M.; Yealland, G.; Hönzke, S.; Edlich, A.; Geisendörfer, B.; Kleuser, B.; Hedtrich, S.; Calderón, M. Breaking the Barrier – Potent Anti-Inflammatory Activity Following Efficient Topical Delivery of Etanercept Using Thermoresponsive Nanogels. *Theranostics* **2018**, *8* (2), 450–463.
- (120) Bashir, S. J.; Chew, A. L.; Anigbogu, A.; Dreher, F.; Maibach, H. I. Physical and Physiological Effects of Stratum Corneum Tape Stripping. *Skin Res. Technol.* **2001**, *7* (1), 40–48.
- (121) Behl, C. R.; Flynn, G. L.; Kurihara, T.; Harper, N.; Smith, W.; Higuchi, W. I.; Ho, N. F.; Pierson, C. L. Hydration and Percutaneous Absorption: I. Influence of Hydration on Alkanol Permeation through Hairless Mouse Skin. *J. Invest. Dermatol.* **1980**, *75* (4), 346–352.
- (122) McKENZIE, A.; STOUGHTON, R. Method for Comparing Percutaneous Absorption of Steroids. *Arch. Dermatol* **1962**, *86*, 608–610.
- (123) Benson, H. A. E. Transdermal Drug Delivery: Penetration Enhancement Techniques. *Curr. Drug Deliv.* **2005**, *2* (1), 23–33.
- (124) Benedict, F. G.; Miles, W. R.; Johnson, A. The Temperature of the Human Skin. *Proc.*

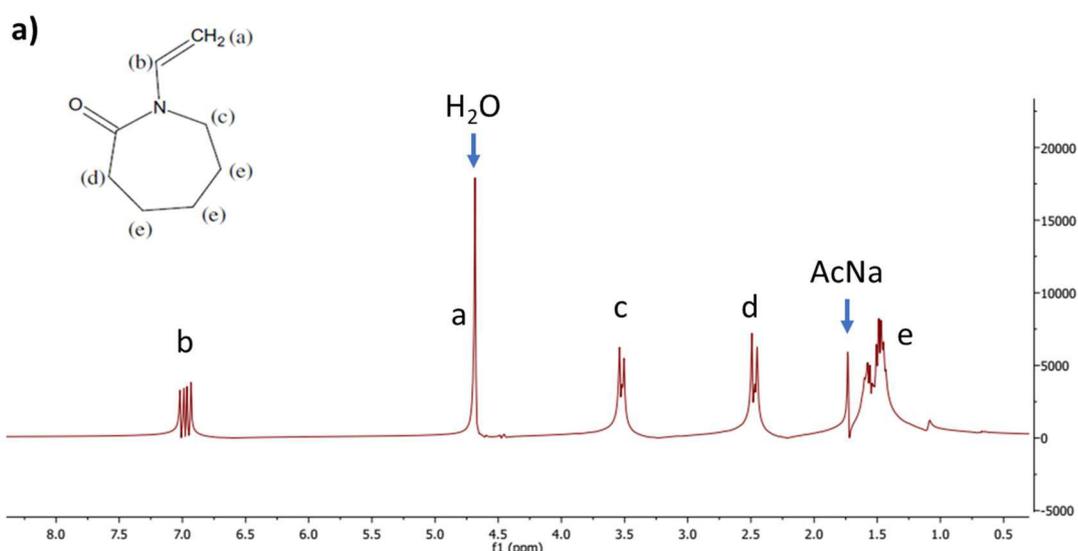
- Natl. Acad. Sci. USA* **1919**, 5 (6), 218–222.
- (125) Shibayama, M.; Mizutani, S.; Nomura, S. Thermal Properties of Copolymer Gels Containing *N*-Isopropylacrylamide. *Macromolecules* **1996**, 29 (6), 2019–2024.
- (126) Hou, Y.; Fei, R.; Burkes, J. C.; Lee, S. D.; Munoz-Pinto, D.; Hahn, M. S.; Grunlan, M. A. Thermoresponsive Nanocomposite Hydrogels: Transparency, Rapid Deswelling and Cell Release. *J. Biomater. Tissue Eng.* **2011**, 1 (1).
- (127) Vihola, H.; Laukkanen, A.; Valtola, L.; Tenhu, H.; Hirvonen, J. Cytotoxicity of Thermosensitive Polymers poly(N-Isopropylacrylamide), poly(N-Vinylcaprolactam) and Amphiphilically Modified poly(N-Vinylcaprolactam). *Biomaterials* **2005**, 26 (16), 3055–3064.
- (128) Zhang, X.-Z.; Wu, D.-Q.; Chu, C.-C. Synthesis, Characterization and Controlled Drug Release of Thermosensitive IPN–PNIPAAm Hydrogels. *Biomaterials* **2004**, 25, 3793–3805.
- (129) Fernández-Tejada, A.; Chea, E. K.; George, C.; Gardner, J. R.; Livingston, P. O.; Ragupathi, G.; Tan, D. S.; Gin, D. Y. Design, Synthesis, and Immunologic Evaluation of Vaccine Adjuvant Conjugates Based on QS-21 and Tucaresol. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22 (21), 5917–5923.
- (130) Edelman, R. An Update on Vaccine Adjuvants in Clinical Trial. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **1992**, 8 (8), 1409–1411.
- (131) Petrovsky, N.; Aguilar, J. C. Vaccine Adjuvants: Current State and Future Trends. *Immunol. Cell Biol.* **2004**, 82 (5), 488–496.
- (132) Kensil, C. R. Saponins as Vaccine Adjuvants. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1996**, 13 (1–2), 1–55.

Anexo 1

Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

En este anexo se muestran los espectros de H1-RMN obtenidos a distintos tiempos de la mayoría de las reacciones realizadas en esta tesis, los cuales se emplearon para calcular la conversión de la VCL. Los espectros fueron obtenidos de las muestras tal cual extraídas de las polimerizaciones incorporando D₂O en la siguiente relación: 720 μL de muestra de reacción + 80 μL de D₂O. Debido a una gran presencia de agua en las muestras fue necesario el empleo de una técnica de supresión del pico del agua. Para ello se utilizó la técnica WATERGATE. El pico a 4.7 ppm corresponde al agua y fue empleado para referenciar todos los espectros. A demás se utilizó acetato de sodio como estándar interno, cuyo pico aparece a 1.7 ppm.

En la Figura A1.1 se muestra los espectros de H1-RMN de los monómeros utilizados en la tesis, obtenidos en las condiciones antes mencionadas. Para la VCL se puede ver que el pico “a” sale muy junto al pico del agua y se pierde cuando se realiza la supresión del pico del agua. Por este motivo se utilizó el pico “b” para determinar la conversión que corre a 7 ppm. Por otro lado, los picos de los enlaces vinílicos de la BIS y el BA salen alrededor de 6 ppm indicando que pueden observarse sin superposición cada uno de ellos con la VCL.



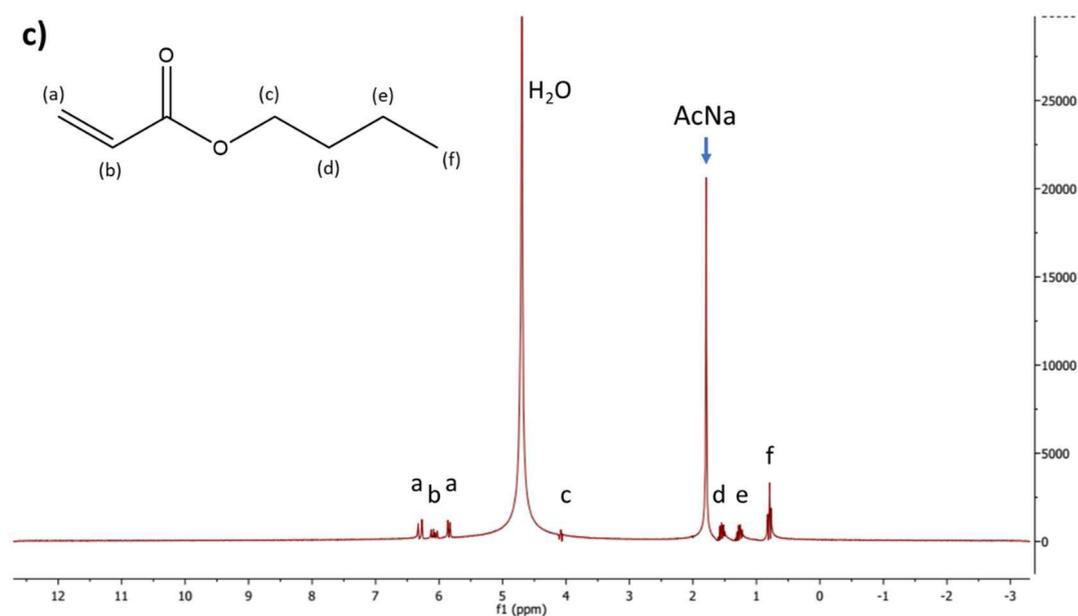
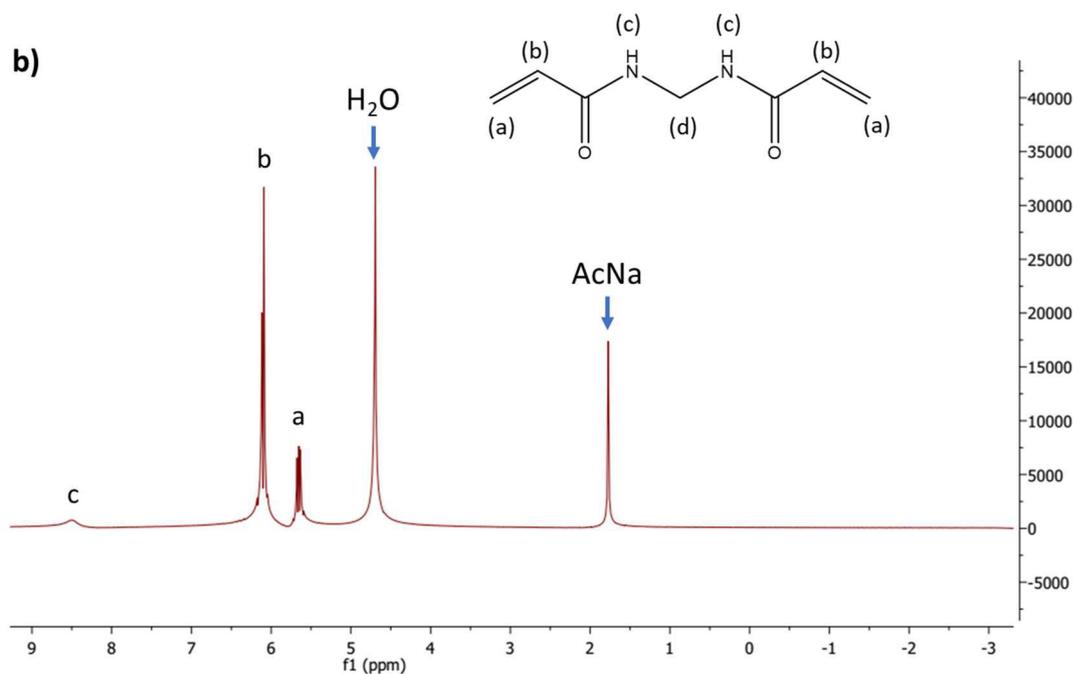


Figura A1.1. Espectro de H1-RMN de VCL (a), BIS (b) y BA (c).

Polimerizaciones discontinuas

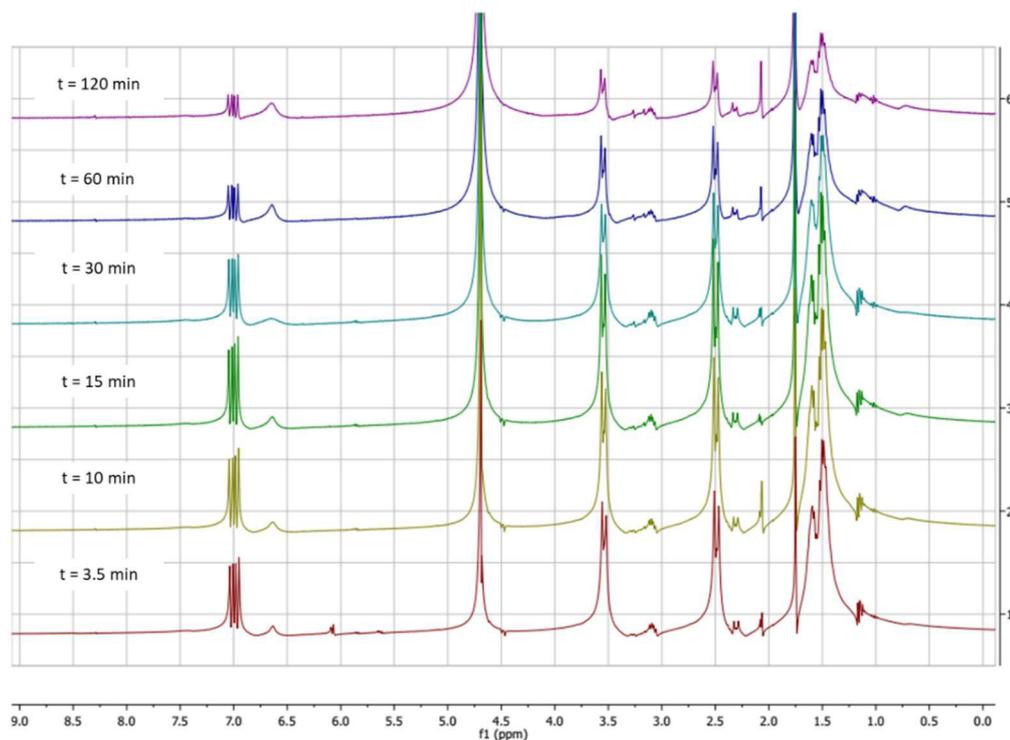


Figura A1.2. Espectros de H1-RMN de muestras extraídas a lo largo de la polimerización B1.

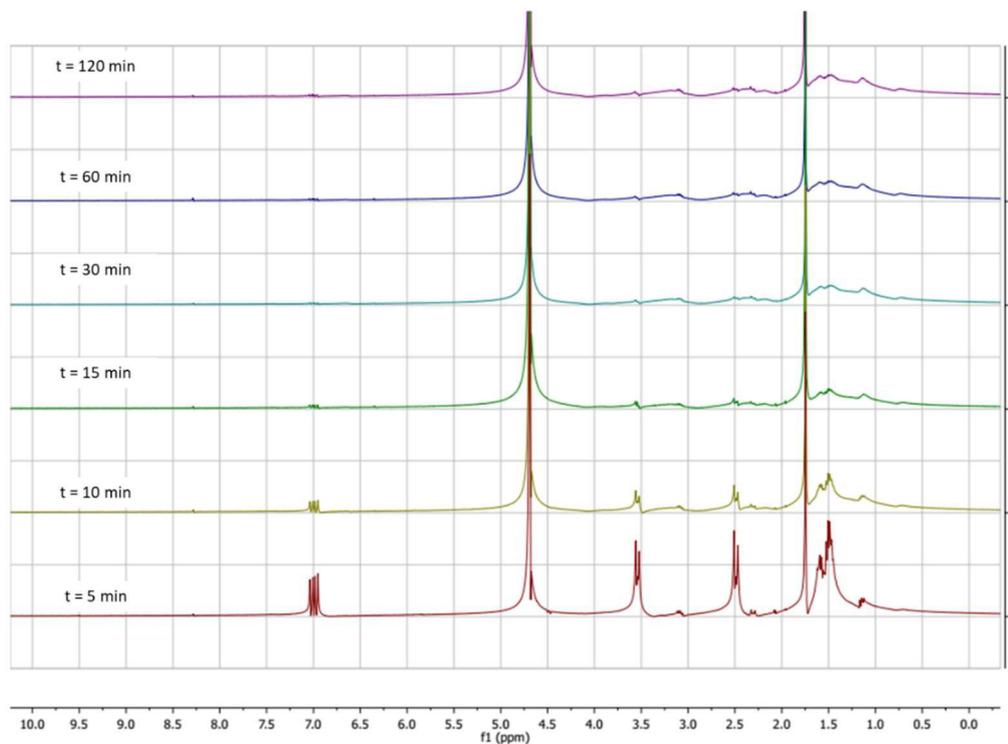


Figura A1.3. Espectros de H1-RMN de muestras extraídas a lo largo de la polimerización B2.

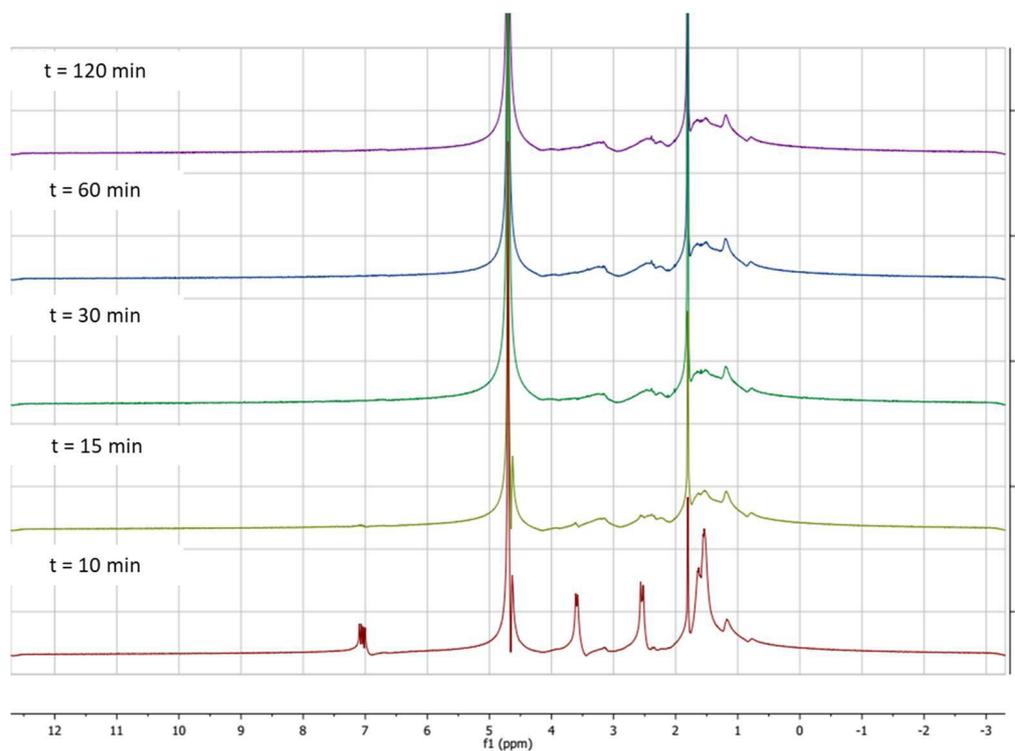


Figura A1.4. Espectros de ^1H -RMN de **muestras** extraídas a lo largo de la polimerización B3.

Polimerizaciones semicontinuas

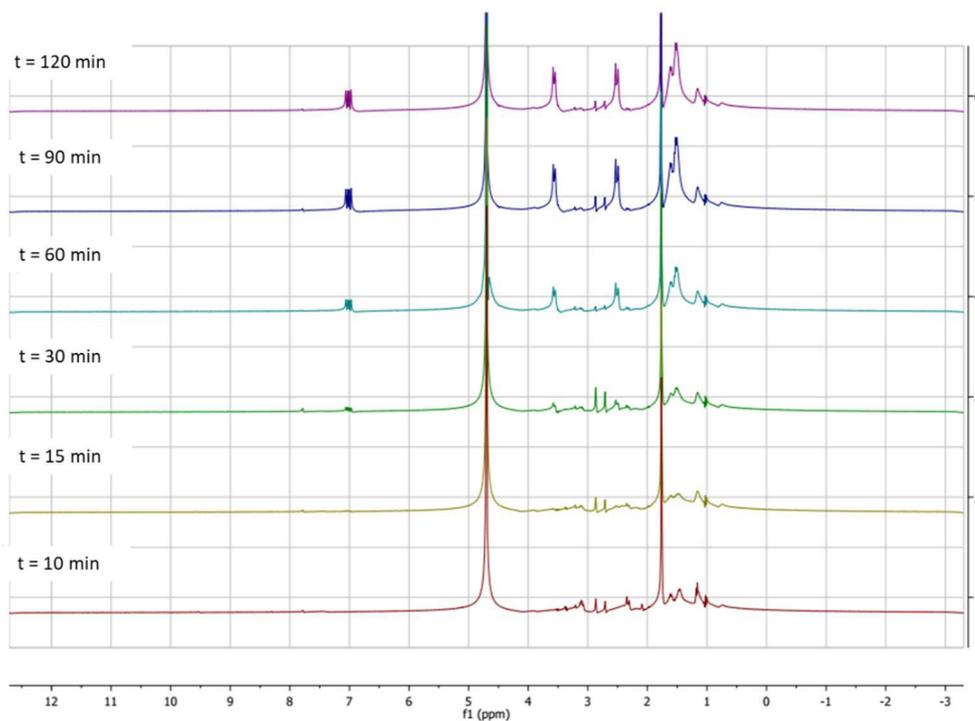


Figura A1.5. Espectros de ^1H -RMN de **muestras** extraídas a lo largo de la polimerización S0.

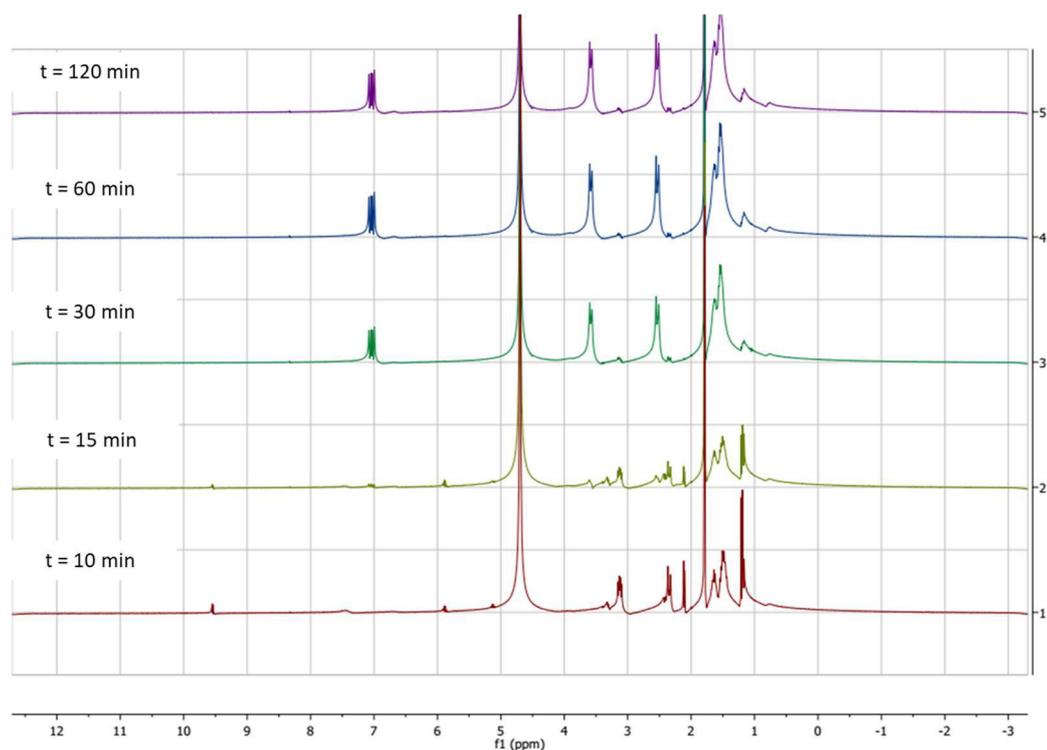


Figura A1.6. Espectros de H1-RMN de muestras extraídas a lo largo de la polimerización S1.

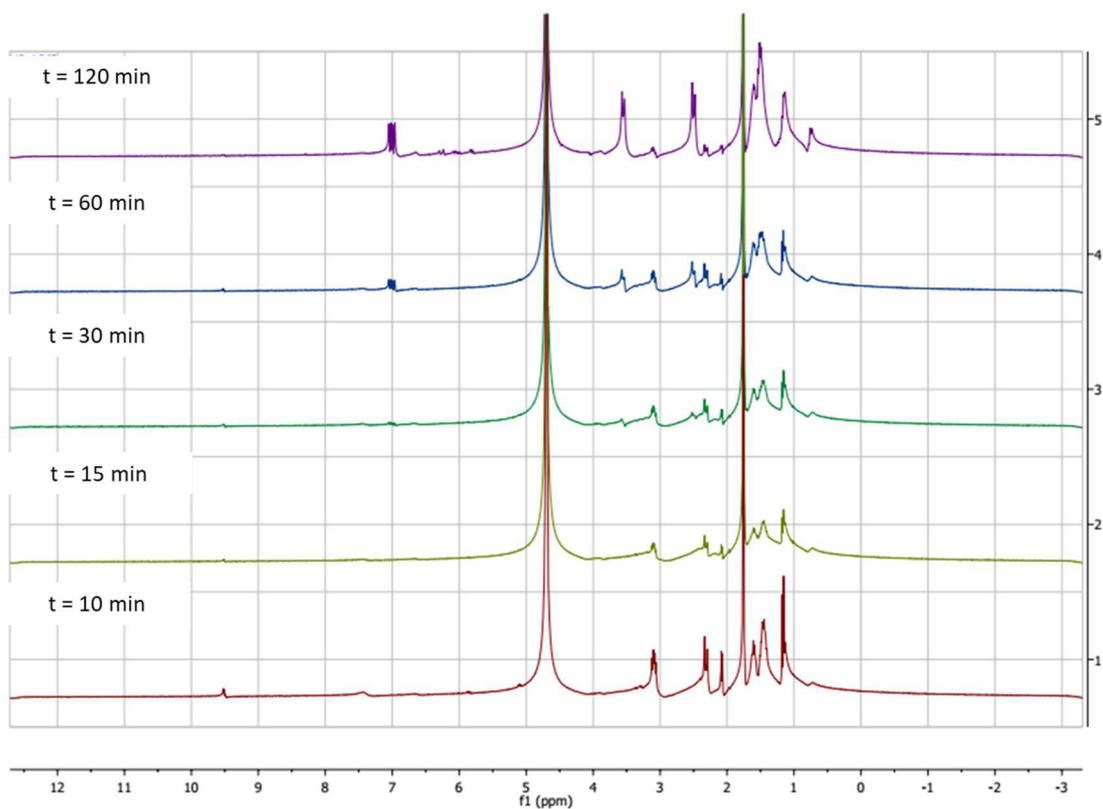


Figura A1.7. Espectros de H1-RMN de muestras extraídas a lo largo de la polimerización S2.

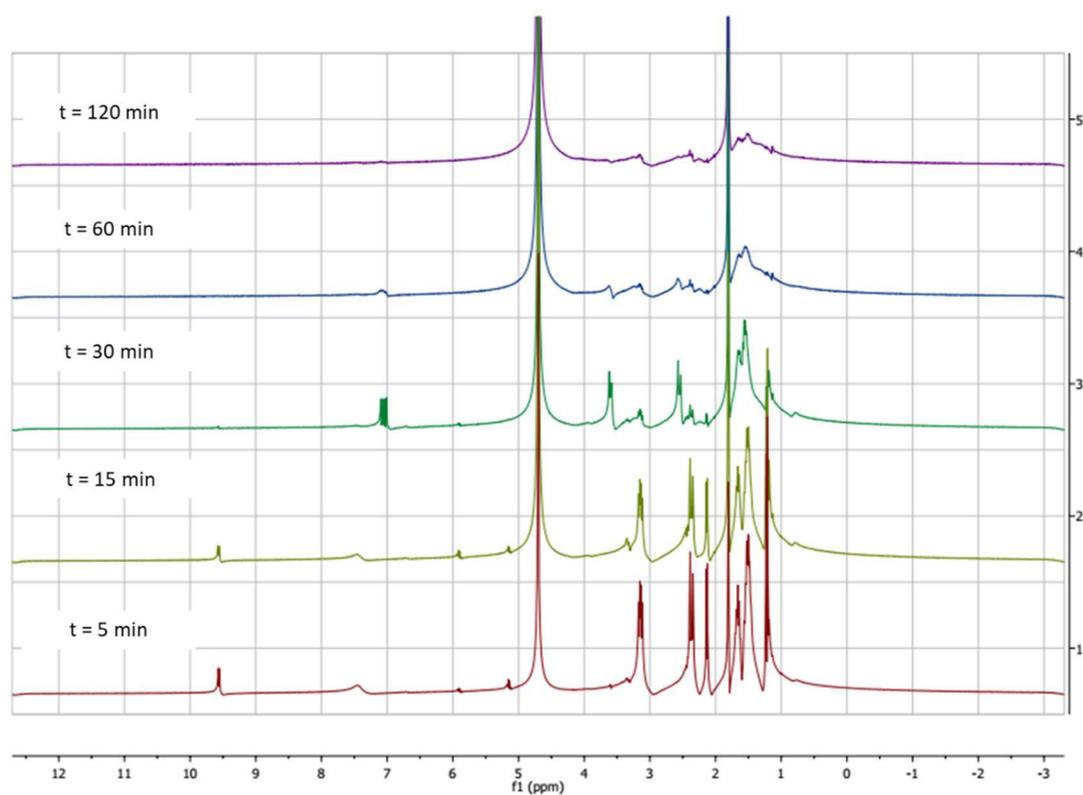


Figura A1.8. Espectros de ^1H -RMN de muestras extraídas a lo largo de la polimerización S3.

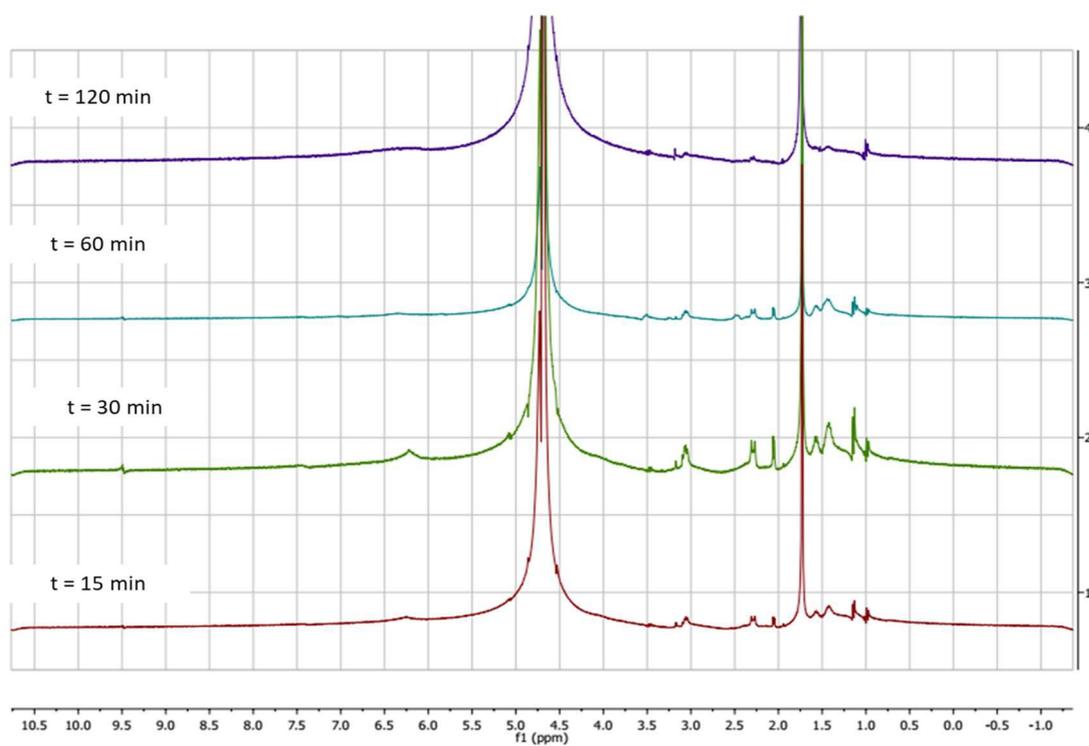


Figura A1.9. Espectros de ^1H -RMN de muestras extraídas a lo largo de la polimerización S4.

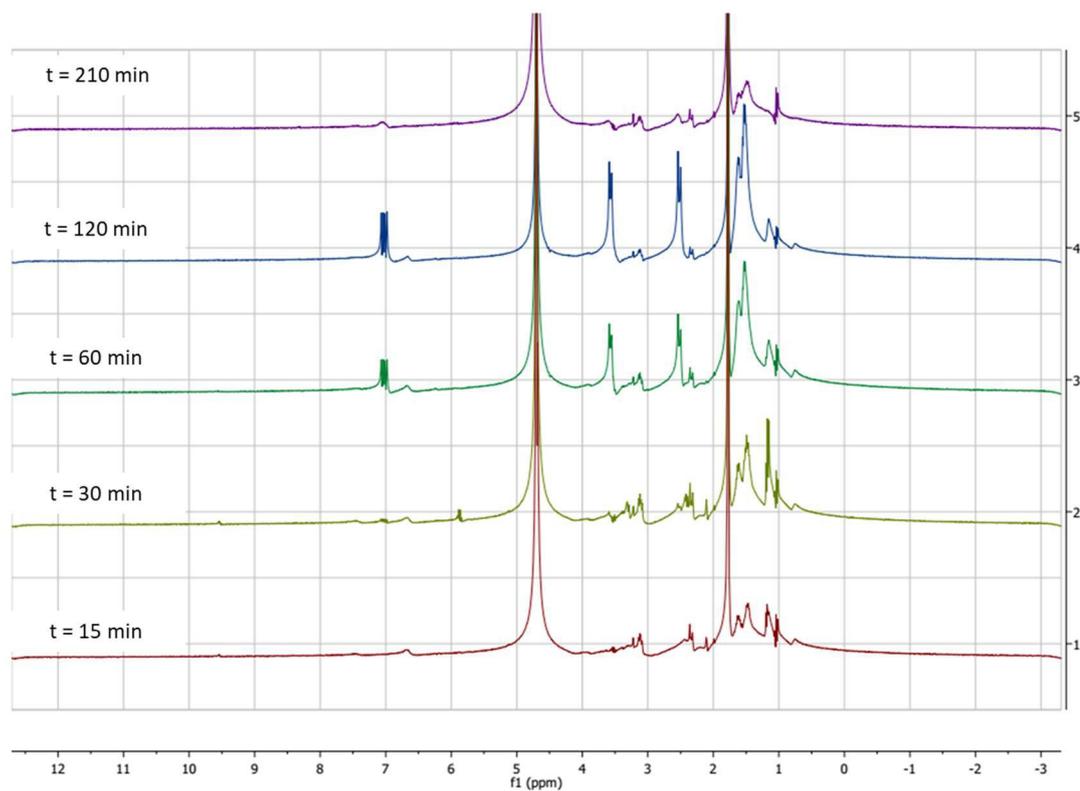


Figura A1.10. Espectros de H1-RMN de muestras extraídas a lo largo de la polimerización S5.

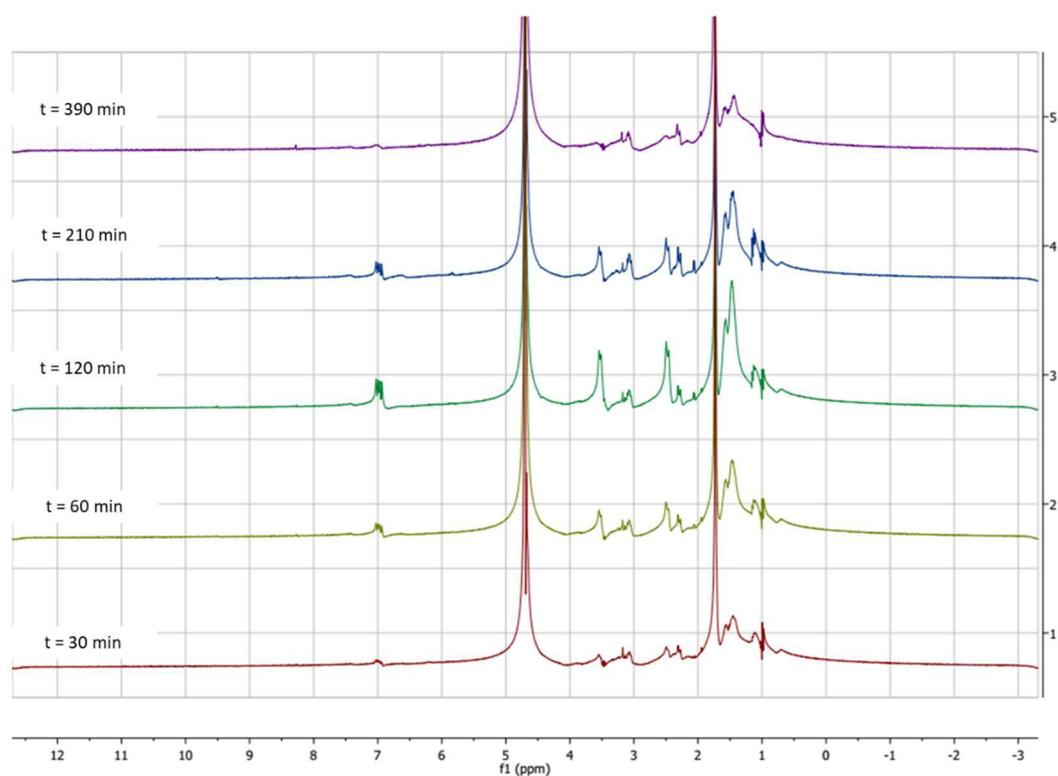


Figura A1.11. Espectros de H1-RMN de muestras extraídas a lo largo de la polimerización S6.

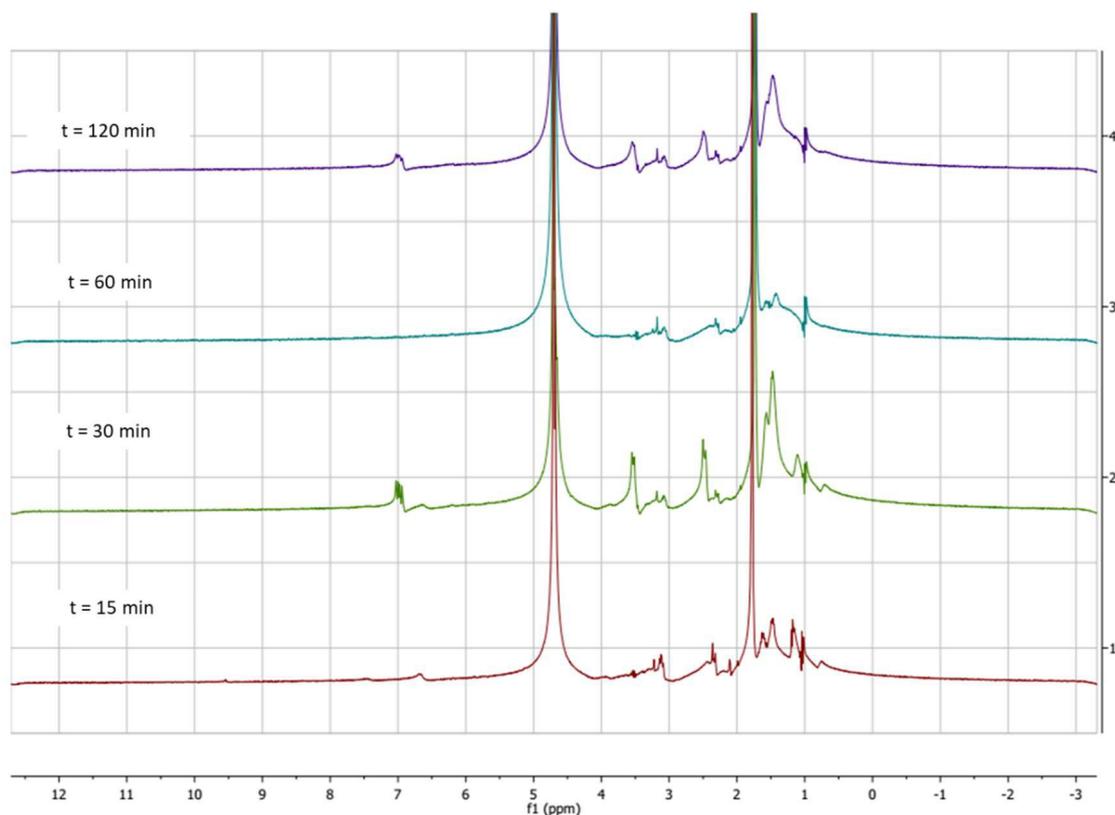


Figura A1.12. Espectros de ^1H -RMN de muestras extraídas a lo largo de la polimerización S7.

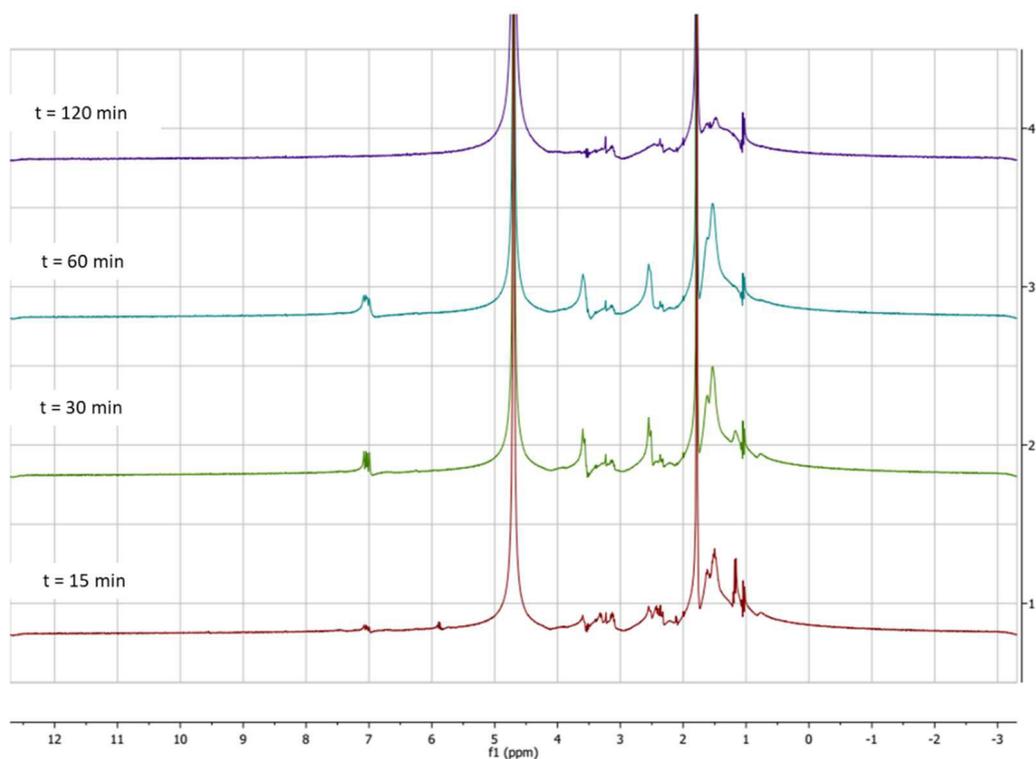


Figura A1.13. Espectros de ^1H -RMN de muestras extraídas a lo largo de la polimerización S8.

Anexo 2

Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

En este anexo se muestran las curvas de DSC obtenidas en la mayoría de las polimerizaciones realizadas en esta tesis, con sus respectivas Tg.

Las muestras fueron sometidas a tres rampas de temperatura:

Ciclo 1: 10 a 300 °C

Ciclo 2: 300 a -90 °C

Ciclo 3: -90 a 300 °C

Las curvas graficadas en este anexo corresponden al tercer ciclo.

Los valores de Tg están expresados en rojo.

Polimerizaciones discontinuas

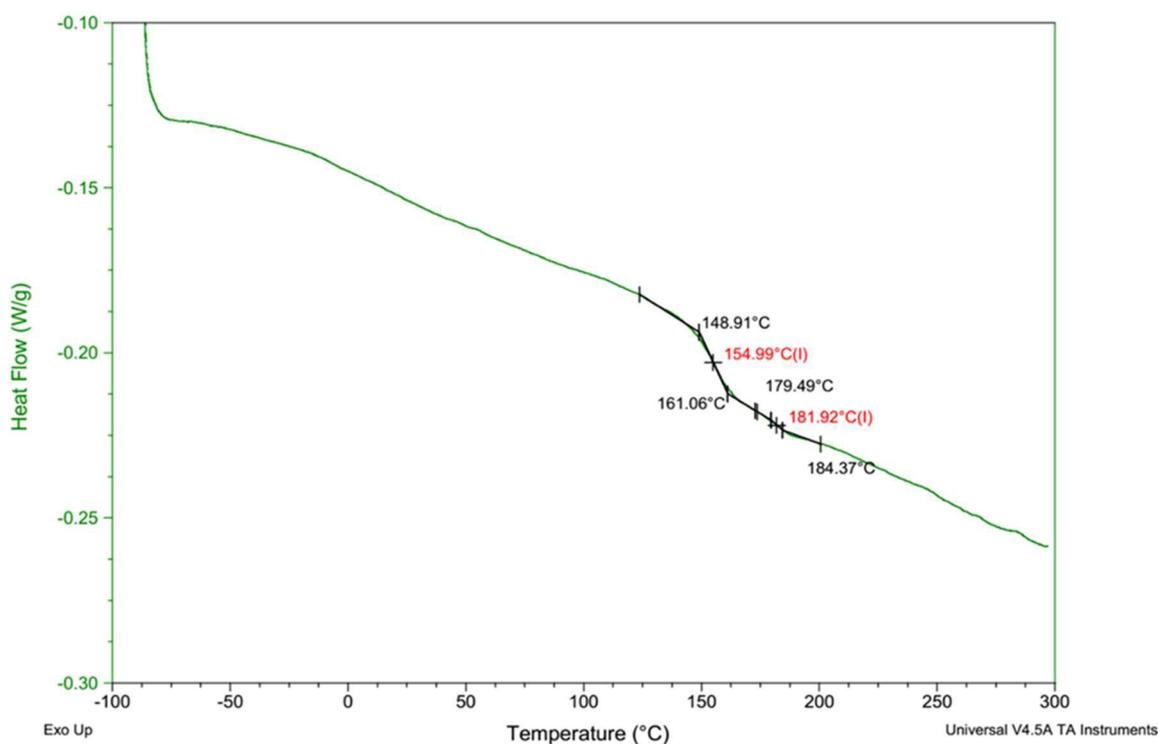


Figura A2.1. DSC del material obtenido en B1

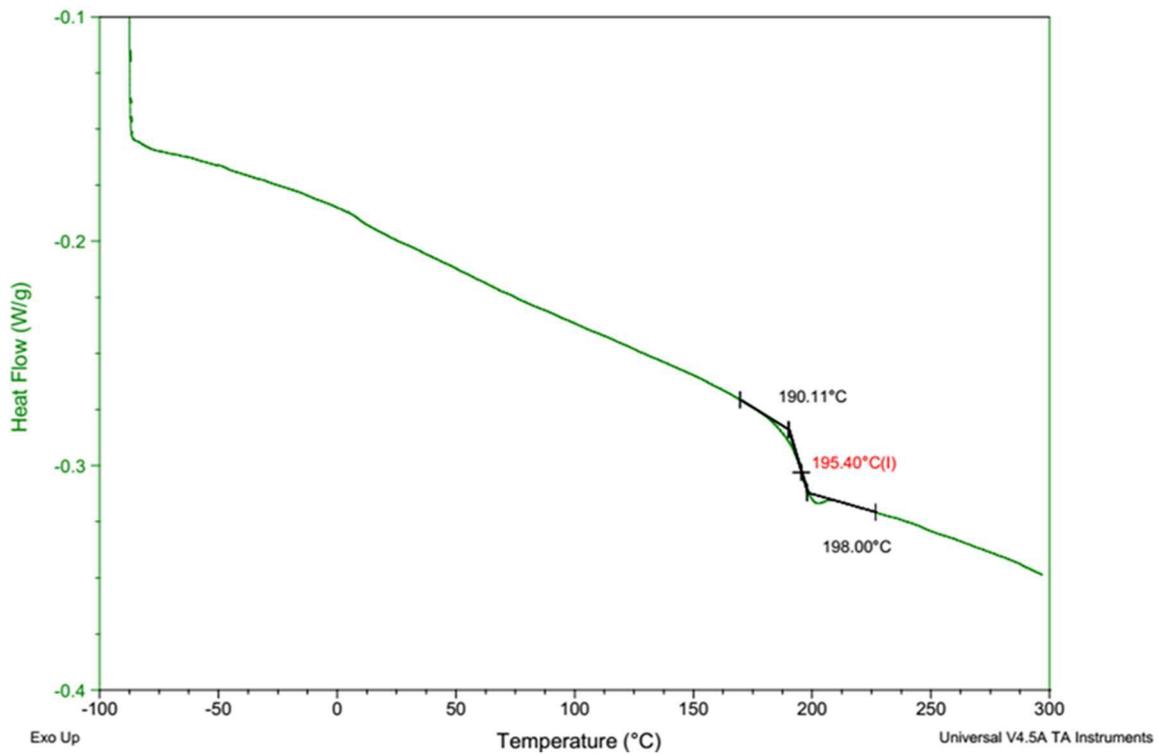


Figura A2.2. DSC del material obtenido en B2.

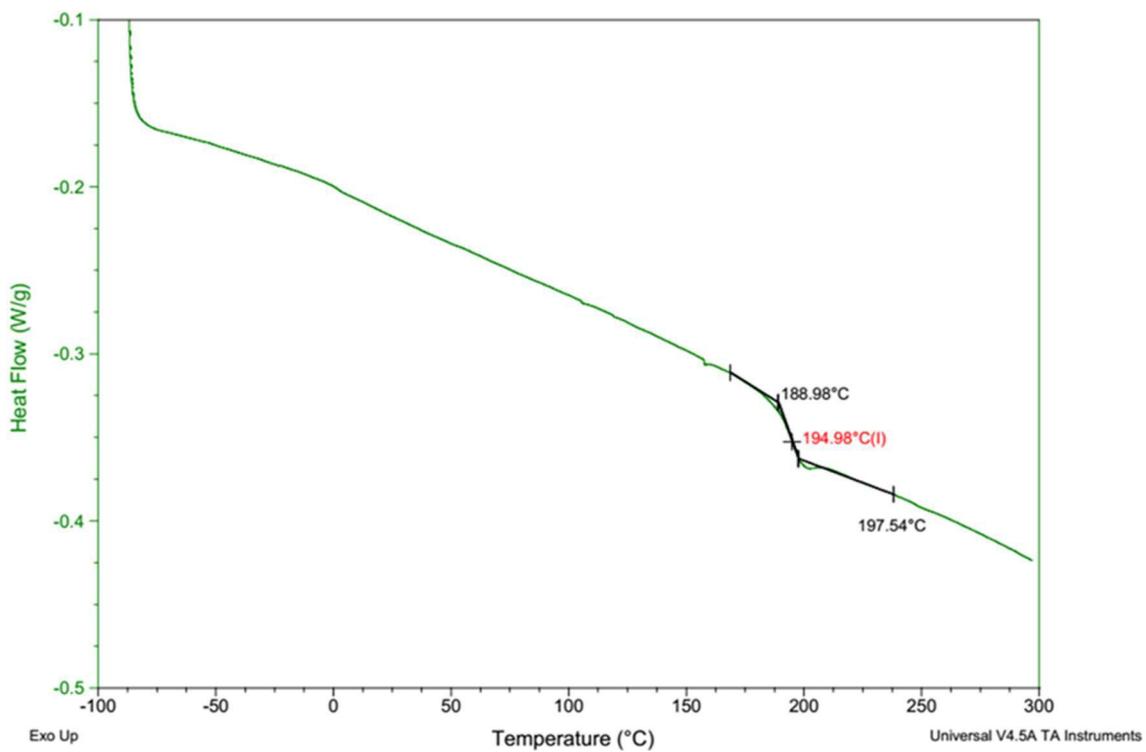


Figura A2.3. DSC del material obtenido en B3.

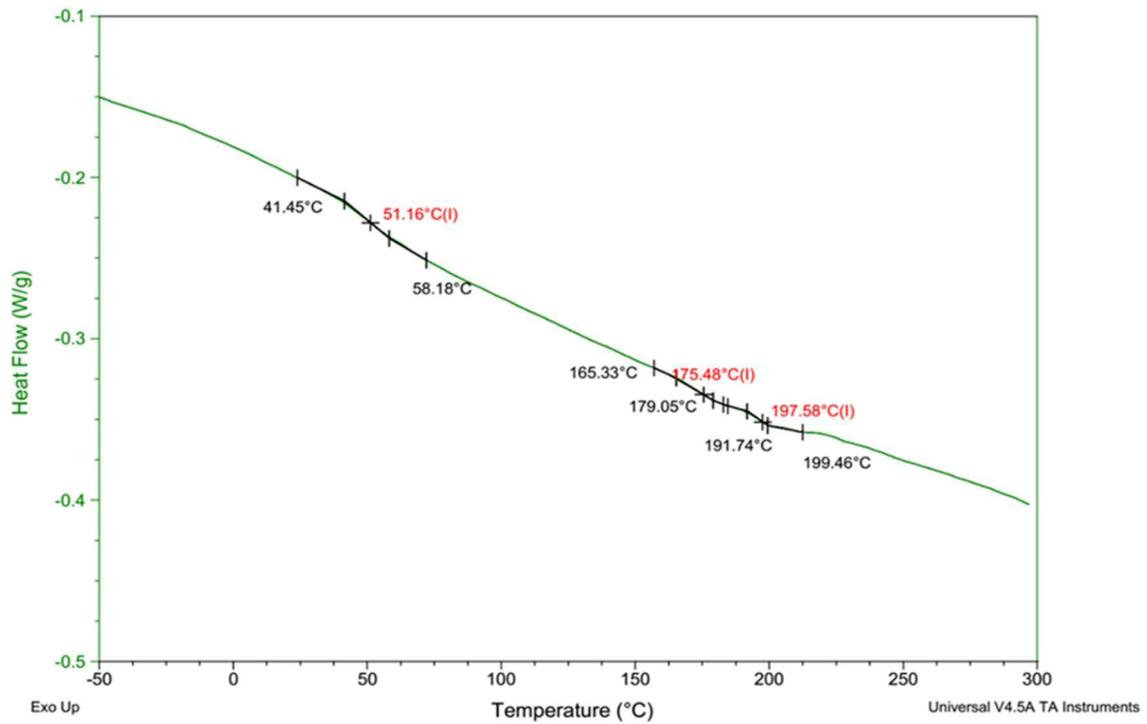


Figura A2.4. DSC del material obtenido en B4.

Polimerizaciones semicontinuas

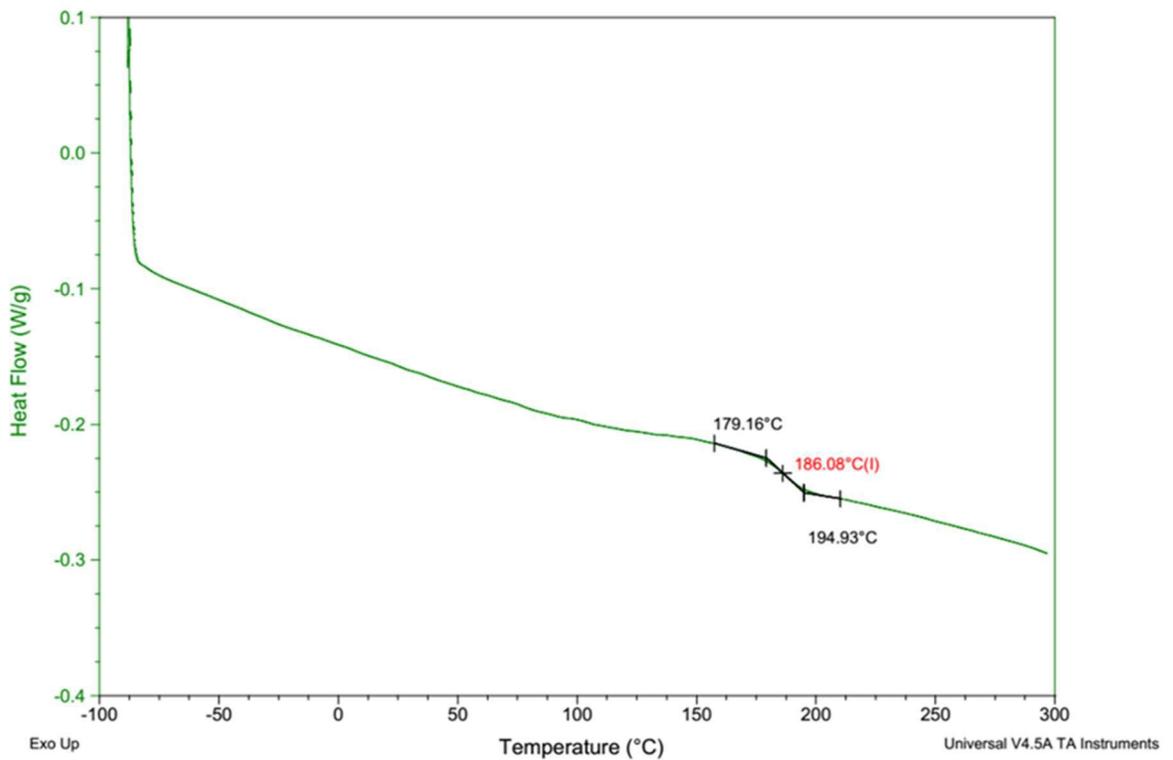


Figura A2.5. DSC del material obtenido en S0.

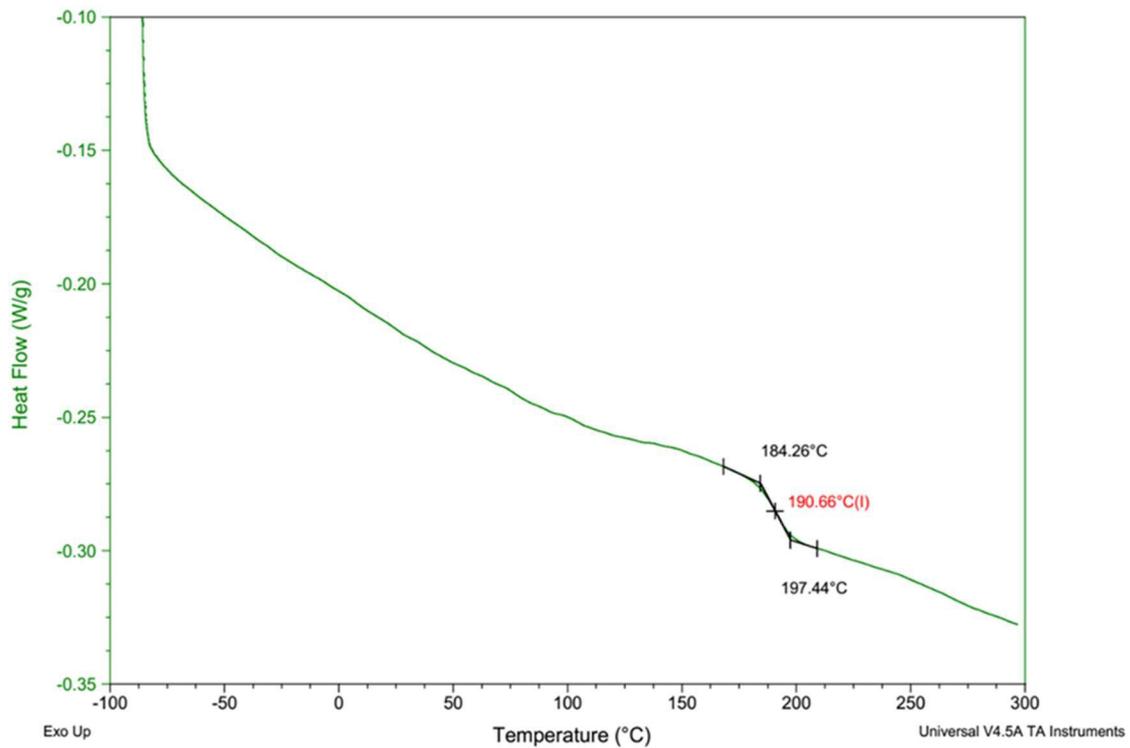


Figura A2.6. DSC del material obtenido en S1.

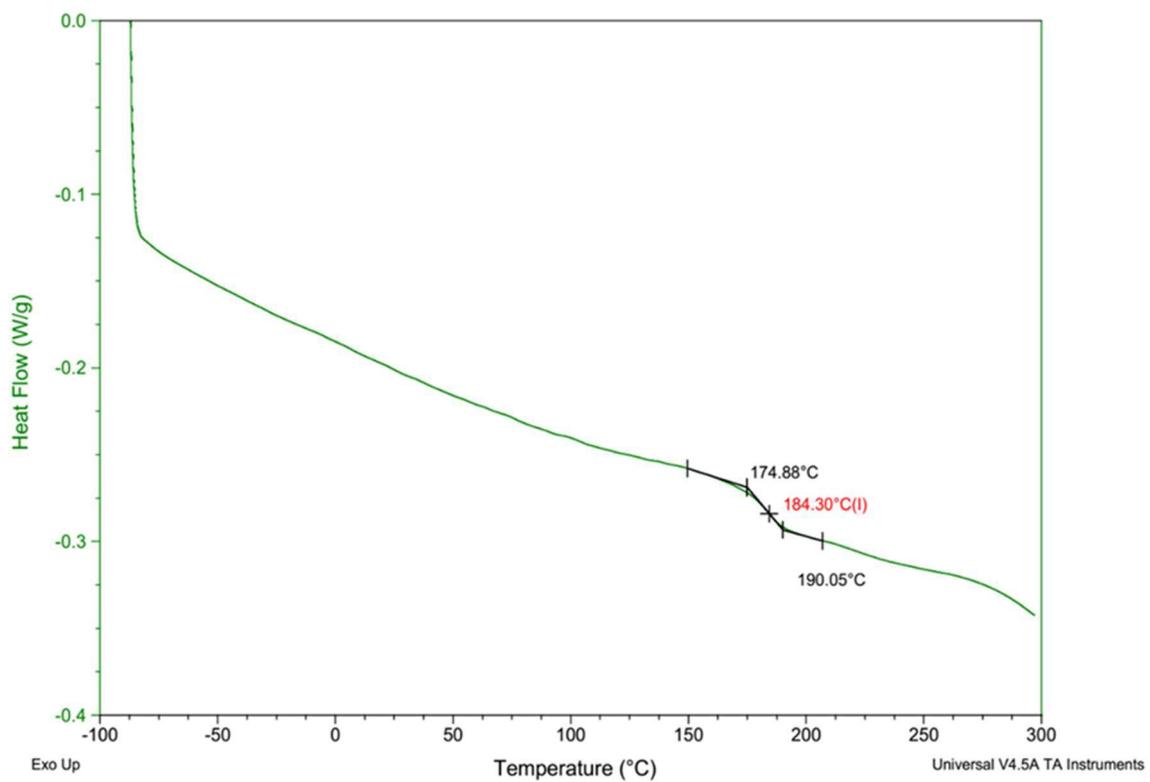


Figura A2.7. DSC del material obtenido en S2.

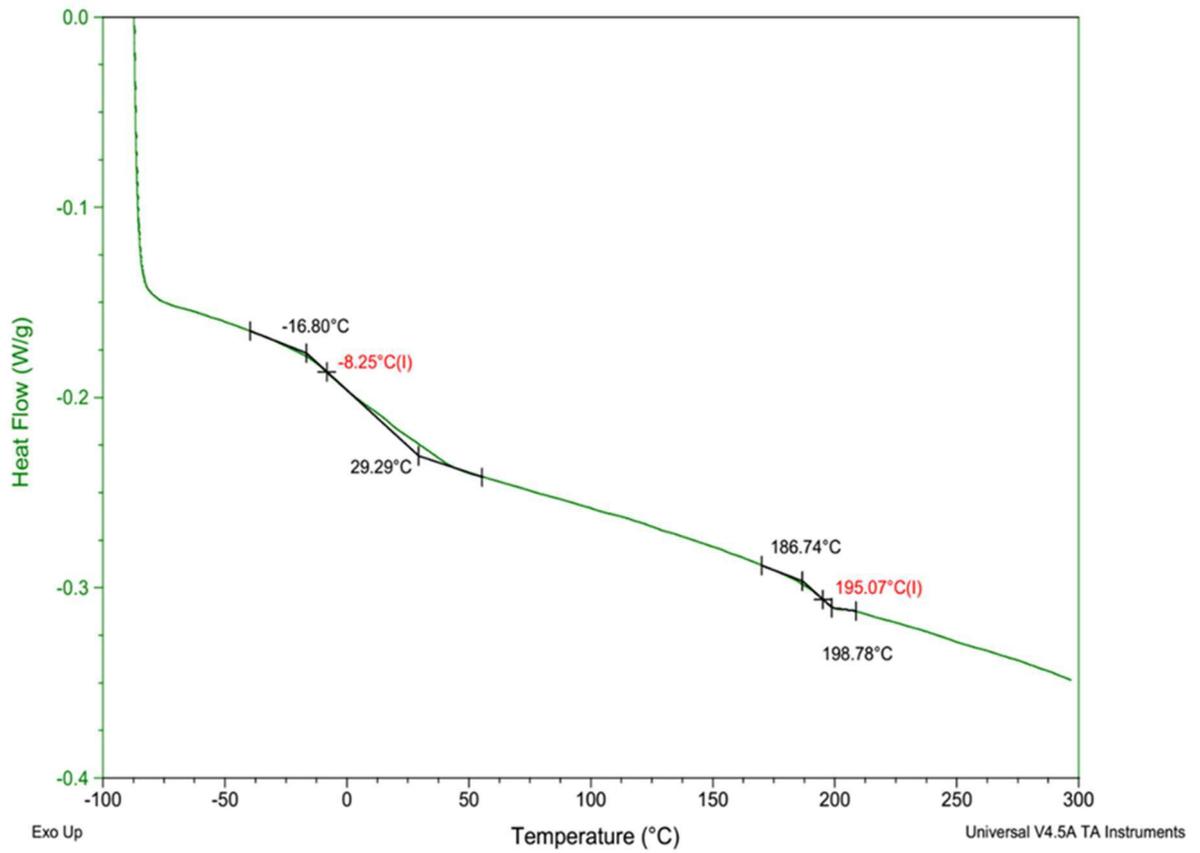


Figura A2.8. DSC del material obtenido en S3.

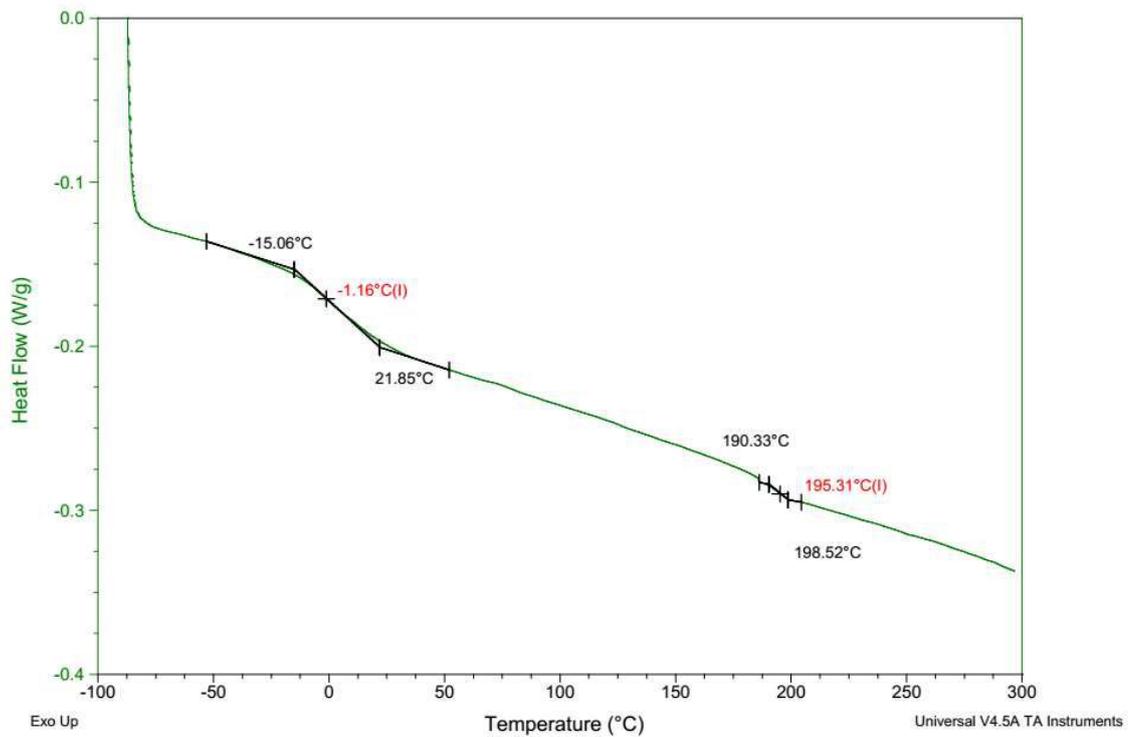


Figura A2.9. DSC del material obtenido en S4.

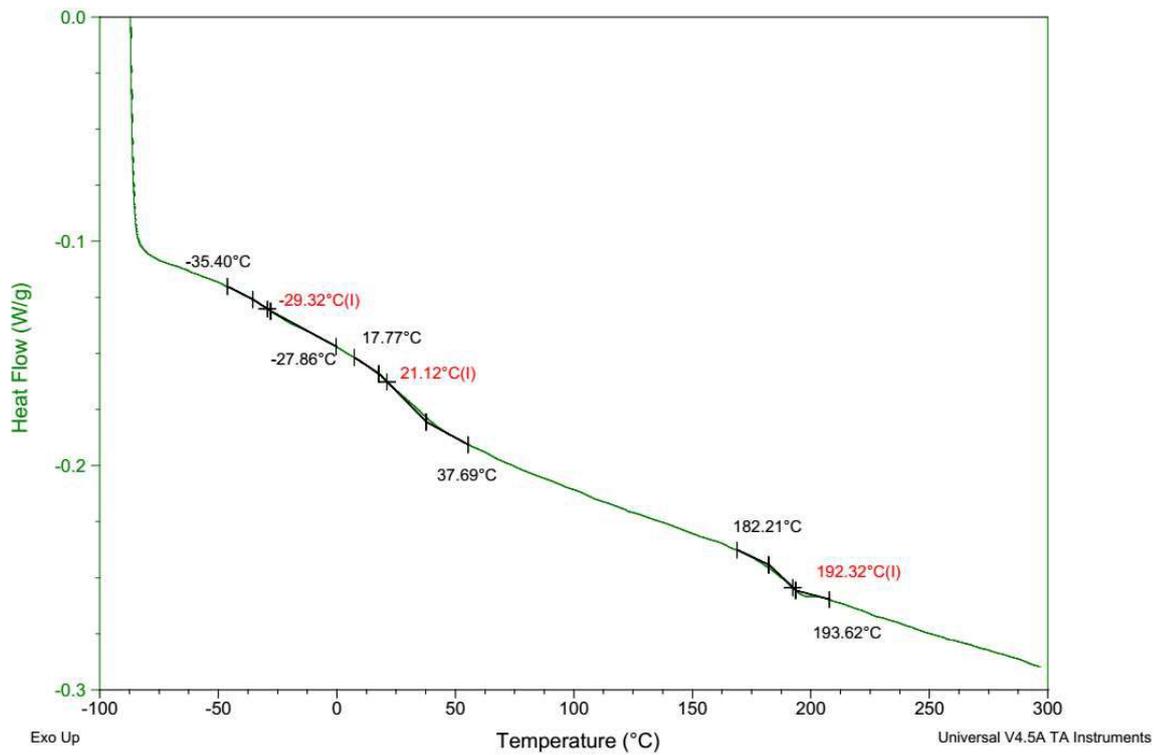


Figura A2.10. DSC del material obtenido en S5.

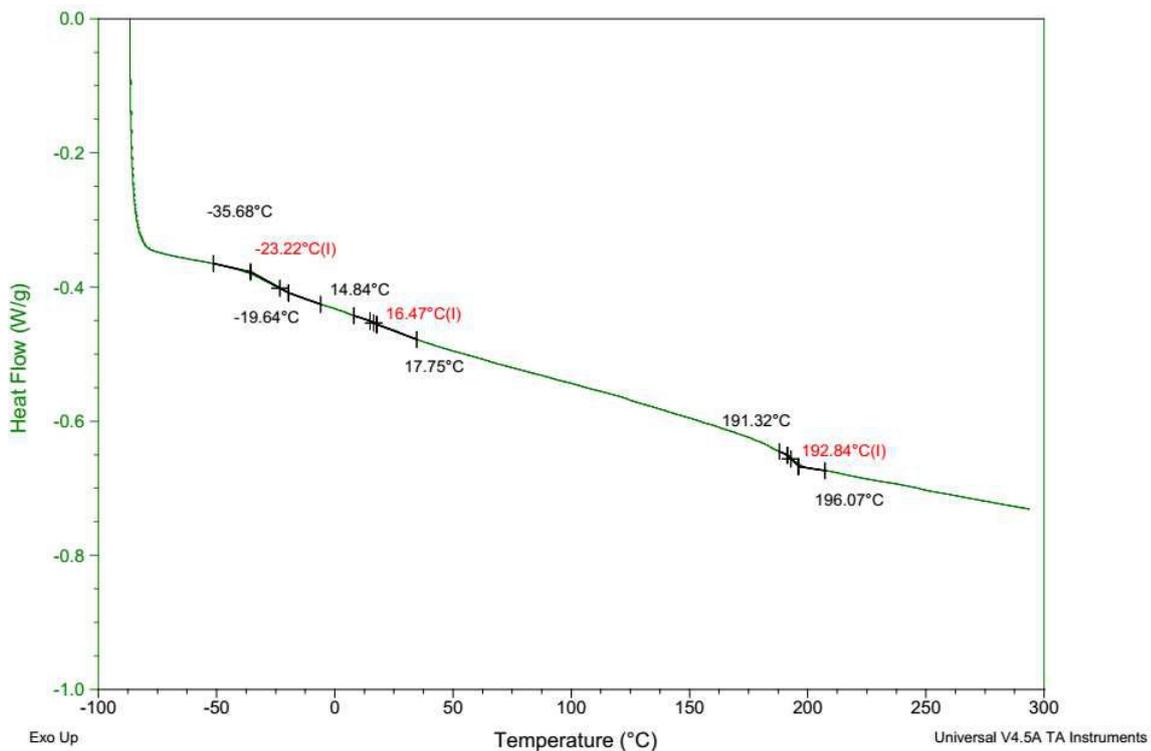


Figura A2.11. DSC del material obtenido en S6.

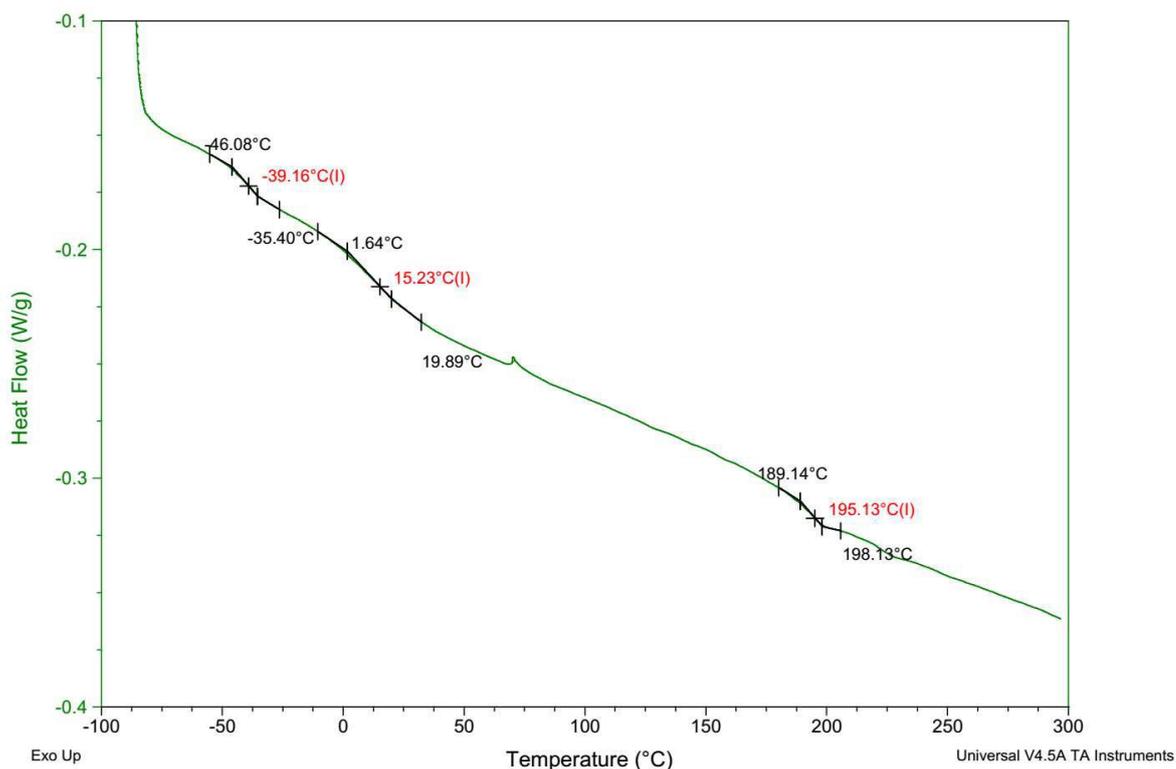


Figura A2.12. DSC del material obtenido en S7.

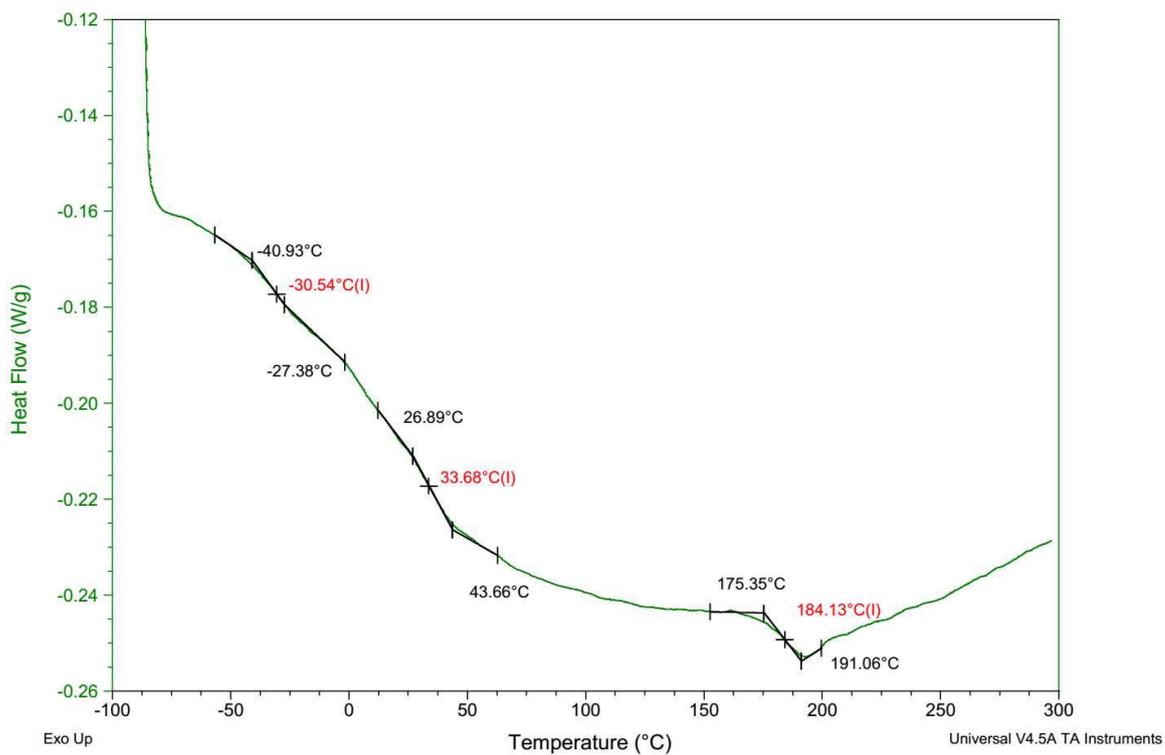


Figura A2.13. DSC del material obtenido en S8.

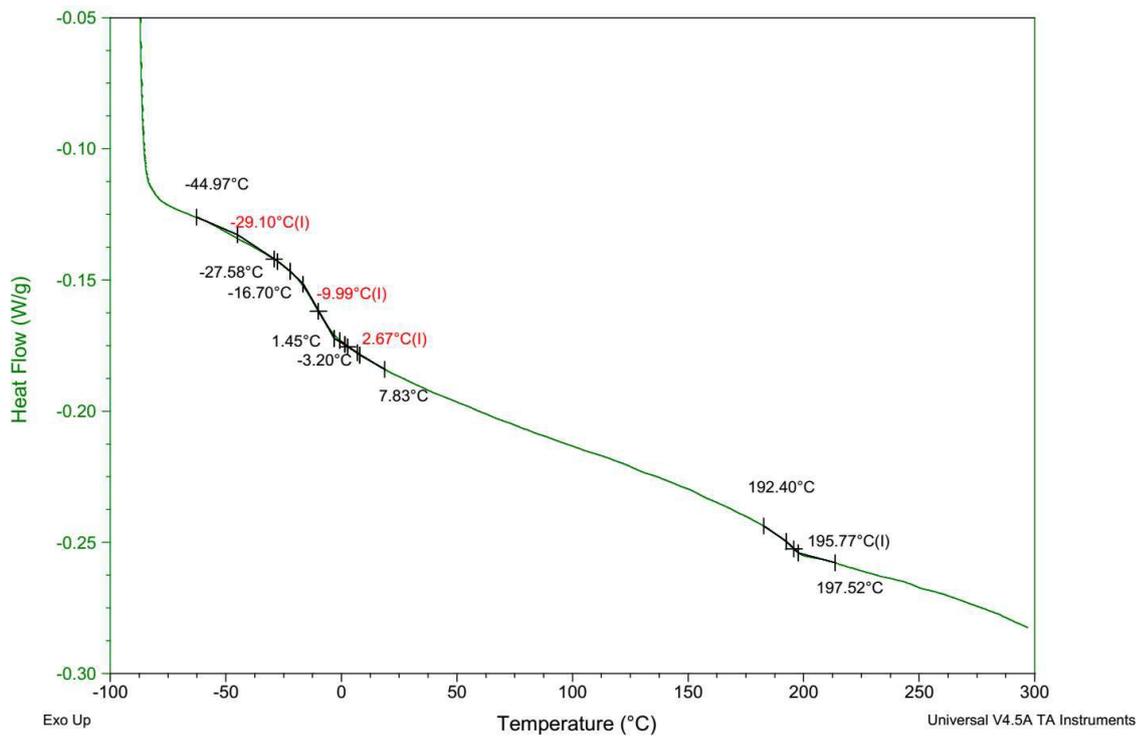


Figura A2.14. DSC del material obtenido en S9.

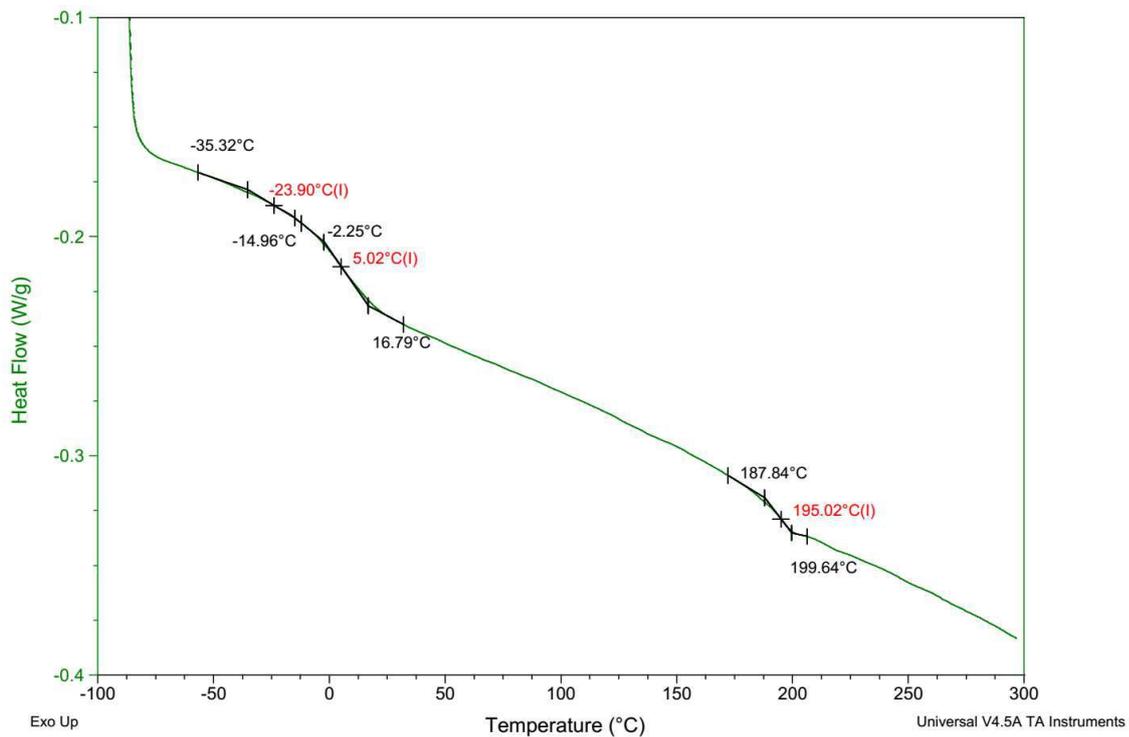


Figura A2.15. DSC del material obtenido en S10.