

## **Sistema de micelas poliméricas en un hidrogel termosensible para uso biomédico**

Teresa D. Carrillo-Castillo<sup>a\*</sup>, Javier S. Castro-Carmona<sup>b</sup>, Ma. Antonia Luna-Velasco<sup>a</sup>, Teresita Ruíz-Anchondo<sup>c</sup>, E. Armando Zaragoza-Contreras<sup>a</sup>.

a) Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S.C, Miguel de Cervantes No. 120, Complejo Industrial Chihuahua. C.P. 31136; b) Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Manuel Díaz H. No. 518-B, Zona Pronaf Condominio La Plata. C.P. 32315; c) Universidad Autónoma de Chihuahua, Escorza No 900 Zona Centro. C.P. 31100. Correo electrónico: teresa.carrillo@cimav.edu.mx

**Resumen:** Los sistemas de liberación de fármacos, tienen la capacidad de transportar medicamentos para ser liberados en las células diana. Las micelas, por un lado, muestran afinidad por el sistema reticuloendotelial alterado, produciendo aglomeración con la posterior entrega del fármaco y los hidrogeles termosensibles son capaces de depositar compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos *in situ*, con una mínima invasión y sin necesidad de extracción posterior debido a su biodegradabilidad. Al unir estos dos materiales, se busca potenciar sus cualidades de localización, transporte, liberación y degradación para lograr más eficiencia en la acción del fármaco. En este proyecto se obtuvieron micelas con la síntesis de un copolímero dibloque de poli(etilenglicol)-*b*-poli( $\epsilon$ -caprolactona) con el potencial de transportar moléculas hidrofóbicas, las cuales fueron incluidas en un hidrogel de copolímero tribloque poli( $\epsilon$ -caprolactona)-*b*-poli(etilenglicol)-*b*-poli( $\epsilon$ -caprolactona). Este hidrogel tiene la característica de mantenerse en solución a temperatura ambiente y cambiar a fase gel a la temperatura de 37 °C. La síntesis de los dos copolímeros, la concentración micelar crítica, el tamaño de partícula, el análisis de cambio de fase, la identificación de grupos funcionales, la morfología y su comportamiento térmico fueron analizados. Los resultados indican factibilidad y estabilidad en su estructura, lo que le proporciona un potencial uso como material biomédico.

### **Introducción.**

Los polímeros de tamaño nanométrico han ofrecido un conjunto único de propiedades para la administración de fármacos, incluyendo alta capacidad de carga de fármacos, suministro combinado, liberación controlada y sostenida de fármacos, estabilidad prolongada y vida útil, y administración dirigida. Para mejorar el índice terapéutico, especialmente para aplicaciones localizadas, las nanopartículas se han incluido en hidrogeles para formar un sistema de biomateriales combinados para la administración controlada de fármacos<sup>1</sup>. Por un lado, las micelas poliméricas se pueden crear a partir de polímeros anfífilicos que forman espontáneamente agregados nanométricos cuando las cadenas poliméricas individuales ("unimers") se disuelven directamente en solución acuosa<sup>2</sup> por encima de una concentración umbral (concentración micelar crítica o CMC)<sup>3</sup>. Debido a esta característica anfífilica, las micelas poliméricas han sido utilizadas como vehículos para la solubilización de moléculas poco solubles en agua, suministrar la carga al sitio de acción, mejorar la farmacocinética del fármaco cargado y reducir la citotoxicidad fuera del objetivo<sup>4</sup>. El diseño de este tipo de micelas, deben cumplir con ciertos criterios para obtener éxito como vehículos de carga<sup>5</sup>. La micela debe: ser lo

suficientemente pequeña (~10-200 nm) para penetrar efectivamente en el tejido; ser irreconocible por el sistema mononuclear de fagocitos; ser eliminado del organismo; localizar e interactuar con las células objetivo; tener estabilidad; poseer alta capacidad de carga y ser sintetizado en un método reproducible, fácil y razonablemente barato<sup>6</sup>. Las micelas poliméricas son únicas porque pueden permanecer intactas o disociarse lentamente en copolímeros de bloque a niveles por debajo de sus concentraciones críticas de micelas (CMC)<sup>7</sup>. En casi todos los sistemas, el segmento hidrofílico se compone de polietilenglicol (PEG)<sup>6</sup>. Además de la aprobación de la FDA, PEG es extremadamente soluble. La parte hidrofóbica se complementa con la policaprolactona (PEG-PCL), para obtener un copolímero anfífilico ampliamente utilizado para la encapsulación de fármacos<sup>8</sup>, ya que presenta buena biocompatibilidad, biodegradabilidad y perfil de baja toxicidad<sup>9</sup>.

Por el otro lado, los hidrogeles son redes poliméricas hinchadas por agua, capaces de absorber grandes cantidades de agua y fluidos biológicos, a la vez que mantienen una estructura tridimensional distintiva<sup>10</sup>. Cuando esos hidrogeles son capaces de responder a estímulos externos que incluyen temperatura, pH, concentración iónica, luz, campos magnéticos, campos eléctricos y productos químicos, son llamados

“Hidrogeles inteligentes”. El hidrogel físico-termosensible basado en copolímeros de bloques sintéticos, ha atraído una atención creciente en las últimas décadas debido a sus aplicaciones potenciales en campos biomédicos, tales como administración de fármacos, encapsulación de células, reparación de tejidos, etc.<sup>11</sup>. La integración de nanopartículas terapéuticas con tecnologías de hidrogel crea un único y robusto sistema de biomateriales que permite la entrega localizada y efectiva de fármacos. En éste trabajo, se sintetizaron dos tipos de copolímeros, utilizando al PEG y a la PCL. Se obtuvieron partículas nanométricas de forma micelar con el potencial de carga y transporte de fármacos. Al mismo tiempo se sintetizó un copolímero con la capacidad de formar un hidrogel termosensible y de transportar las micelas. Los resultados muestran que el sistema integrado tiene potencial para el transporte y la entrega *in situ* de fármacos.

### Parte experimental.

**Materiales.** Metoxipoli(etilenglicol) ( $M_n \approx 2000$ ) (Aldrich Co.), dietil éter (Alfa Aesar), polietilenglicol, ( $M_n \approx 1000$ ) (Merck), monómero de  $\epsilon$ -caprolactona 99% (Alfa Aesar), trietilamina 99% (Sigma-Aldrich Co.), diclorometano anhídrido  $\geq 99.8\%$ , octoato estanoso (Sigma-Aldrich) y hexano (Fermont Co.). Todos los productos químicos y solventes son de grado reactivo o superior y se utilizaron tal como se recibieron.

### Síntesis del dibloque metoxipoli(etilenglicol)-*b*-poli( $\epsilon$ -caprolactona) (mPEG-PCL)

El proceso de polimerización para obtener el dibloque mPEG-PCL por apertura de anillo catiónica fue el reportado por Mikhail y Allen<sup>12</sup>, con algunas modificaciones: 2 g de mPEG (1 mmol) se disolvieron en 12 mL de diclorometano y posteriormente, se adicionó 1 g de  $\epsilon$ -caprolactona (8.76 mmol). La polimerización se inició mediante la adición de la solución 1.0 M de HCl en éter dietílico (3 mL, 0.003 mmol) a 30°C y se mantuvo en agitación. Después de 24 h se agregaron 0.5 mL de trietilamina para neutralizar el HCl presente. La purificación del copolímero se realizó mediante precipitación con una mezcla de dietiléter:hexano, en proporción 1:1 (20 mL:20 mL). Posteriormente se separó el precipitado por filtración con papel filtro y se evaporó.

### Síntesis del tribloque poli( $\epsilon$ -caprolactona)-*b*-poli(etilenglicol)-*b*-poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL-PEG-PCL)

El copolímero de PCL-PEG-PCL se preparó por polimerización de apertura de anillo de  $\epsilon$ -caprolactona iniciada por PEG ( $M_n = 1000 \text{ g mol}^{-1}$ ) y con  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$  como catalizador<sup>13</sup>. Brevemente: 10.0 g (0.175 mol) de  $\epsilon$ -caprolactona y 5.0 g (0.01 mol) de PEG 1000 se depositaron en un reactor de tres bocas bajo atmósfera de nitrógeno, la mezcla de reacción se agitó suavemente y se calentó a 130 °C. Una vez alcanzada la temperatura, se adicionó 0.15 g de  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$  y el sistema de reacción se mantuvo en agitación moderada a 130 °C durante 6 h. Después de desgasificar al vacío durante 30 min, el copolímero resultante se enfrió a temperatura ambiente. La caracterización de grupos funcionales para ambos copolímeros se realizó por espectroscopia infrarroja (FT-IR). La caracterización morfológica se realizó por microscopía electrónica de barrido (SEM).

### Determinación de la CMC por el método del Yodo-Lugol

Se preparó una solución acuosa estándar de  $\text{I}_2$  y KI a un volumen final de 25 mL. A la vez, se prepararon diluciones del copolímero (1 a 30  $\mu\text{g}$ ) con un volumen final de 10 mL, a cada dilución se le adicionaron 25  $\mu\text{L}$  de la solución de yodo. Se mantuvieron en incubación toda la noche en oscuridad. Se analizaron por UV-Vis, el valor de CMC se determinó por un incremento en la absorbancia<sup>14</sup>

### Transición sol-gel-sol

Se determinó mediante el método de inversión del tubo de ensayo<sup>15</sup>. En viales de 4 mL, se depositaron cantidades del copolímero que se llevaron a concentraciones finales de 10 a 50% en dispersión acuosa a un volumen de 1 mL con agua tridestilada a temperatura ambiente. Todos los viales se sumergieron en un baño de agua a 60 °C durante 5 min. Posteriormente, se pasaron a un baño de hielo con una temperatura de 0 °C durante 3 min; enseguida, se sumergieron en un tercer baño a temperatura ambiente (27 °C) durante 10 min y la temperatura se fue incrementando en 2 °C. En cada temperatura los tubos se invertían para observar la formación o no del gel. Al estado de formación del gel se clasificó como “no fluye” y cuando permanecían en estado de sol se clasificaban como “fluye”. El cambio de fase fue caracterizado por Reología.

## Resultados y discusión.

### Caracterización de los grupos funcionales

El espectro IR del copolímero dibloque mPEG-PCL muestra un pico principal característico a  $1727\text{ cm}^{-1}$ , el cual identifica a la banda del éster carbonilo C=O. La banda de absorción a  $3450\text{ cm}^{-1}$  se asigna a grupos hidroxilo terminales. Todas las bandas de estiramiento C-H se centraron en  $2952$  y  $2882\text{ cm}^{-1}$ . La banda a  $1100\text{ cm}^{-1}$  se atribuye al estiramiento C-O (Figura 1).

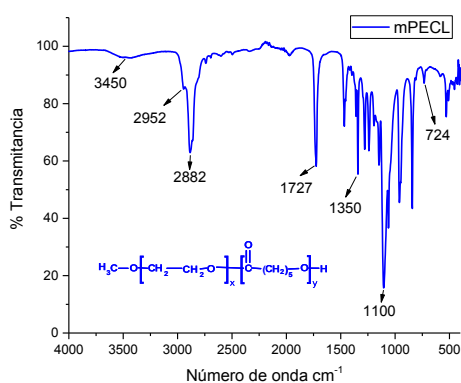


Figura 1. IR del copolímero mPEG-PCL

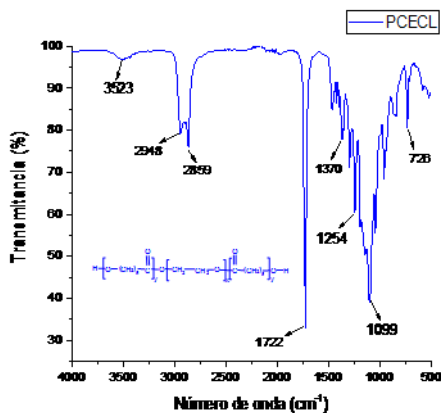


Figura 2. IR del copolímero PCL-PEG-PCL

El espectro del tribloque PCL-PEG-PCL (Figura 2), presentó vibraciones de estiramiento C=O en  $1722\text{ cm}^{-1}$ , atribuidas al éster carbonilo. Así como las bandas de absorción a  $1099$  de las vibraciones de estiramiento C-O-C y las de estiramiento -COO- a  $1254\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a las unidades repetitivas de OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> del PEG. También presentó banda de

absorción en  $3523\text{ cm}^{-1}$ , atribuida a los grupos -OH terminales.

### Concentración Micelar Crítica

Según los resultados obtenidos mediante el método del yodo-lugol, se pudo determinar que la CMC se encuentra a partir de los  $10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 3). Por encima de ese valor, se obtenía el autoensamblaje de las cadenas poliméricas. Para los siguientes ensayos se utilizó un valor de  $40\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ .

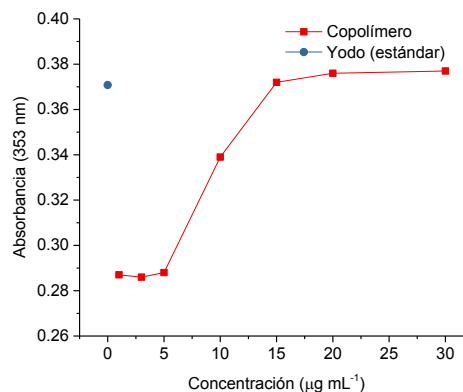


Figura 3. Curva de la CMC con estándar de yodo-lugol.

### Tamaño de partícula

El conteo de las micelas obtenidas mostró un tamaño promedio de  $56\text{ nm}$  (Figura 4). Este tamaño es el adecuado para crear un sistema de liberación de fármacos, como lo han reportado algunos autores<sup>5</sup>.

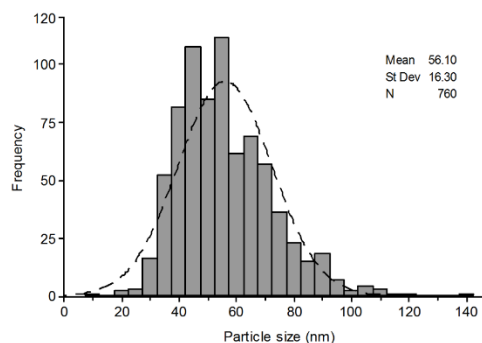


Figura 4. Distribución de tamaño de partícula.

### Transición sol-gel-sol

La solución acuosa del copolímero a una concentración de  $20\%$  presentó transición de fase a estado gel a una temperatura de  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . Cuando se le incluyeron las micelas, fue necesario ajustar la concentración del tribloque a  $25\%$  para que pasara al estado gel (Figura 5). Se ensayaron con

concentraciones micelares de 20, 40 y 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y no alteraron la temperatura de cambio de fase.

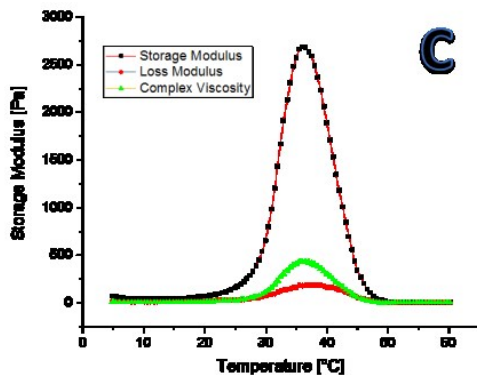
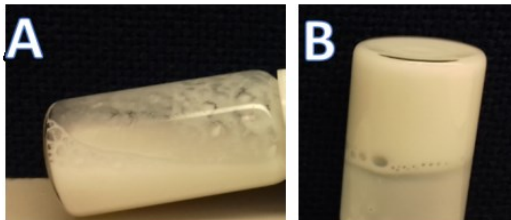


Figura 4. Hidrogel a temperatura ambiente (A) y a 37 °C (B). Módulo de almacenamiento y módulo de pérdida (C).

### Morfología por SEM

Las imágenes obtenidas confirman que el agregado del copolímero mPEG-PCL en solución acuosa es esférico, con un diámetro menor de 100 nm (Figura 5)

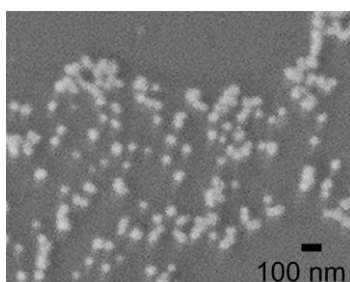


Figura 5. Imagen SEM de micelas del copolímero PEG-PCL.

La micrografía del hidrogel, muestra canales interconectados con un tamaño de poro de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  (Figura 6). Estos poros tiene el potencial de albergar partículas y moléculas orgánicas las cuales podrán ser depositadas y liberadas de manera prolongada.

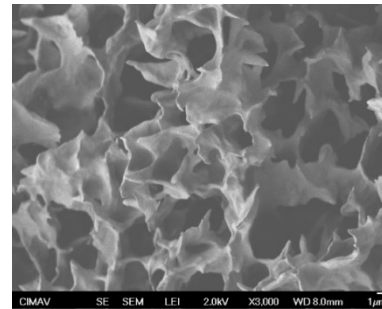


Figura 6. Imagen SEM del hidrogel PCECL aumento 3,000X

### Conclusiones.

El método del yodo-lugol fue adecuado para determinar la CMC, lo cual se demostró con la micrografía. Las partículas obtenidas, son estables y presentan una distribución de tamaño cerca de los 60 nm. Se obtuvo un hidrogel termosensible que tiene su transición sol-gel a la temperatura corporal y con capacidad de ser inyectable. Dada la estructura y tamaño de los poros del hidrogel, se concluye que es el adecuado para albergar las micelas dentro de sus poros, los cuales tendrán agua en su interior, lo que permitirá mantener la estructura micelar estable en solución acuosa y dado que las micelas tienen un diámetro menor a 100 nm, el sistema promete ser el adecuado y permitirá controlar la carga del fármaco. El sistema será capaz de transportar diferentes concentraciones de carga micelar acorde con el tratamiento que sea necesario, las cuales podrán ser inyectadas utilizando una solución polimérica que será capaz de cambiar a estado gel cuando la temperatura en el entorno se aproxime a los 37 °C. Por la naturaleza de los materiales utilizados, el sistema será degradado sin necesidad de intervención quirúrgica posterior.

### Agradecimientos.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo a esta investigación a través del proyecto (CB 2014-241001) y por la beca otorgada a Teresa D. Carrillo-Castillo (No. Becaria 447478). Además se agradece a Luis de la Torre, Wilber Antúnez y Claudia Hernández, por su valioso apoyo durante el desarrollo de esta investigación.

### Referencias.

- (1) Gao, W.; Zhang, Y.; Zhang, Q.; Zhang, L. Nanoparticle-Hydrogel: A Hybrid Biomaterial System for Localized Drug Delivery. *Ann. Biomed. Eng.* **2016**, *44* (6), 2049–2061.
- (2) Kubowicz, S.; Baussard, J.; Lutz, J.; Thünemann, A. F.; Berlepsch, H. Von; Laschewsky, A. Multicompartment Micelles Formed by Self- Assembly of Linear ABC Triblock Copolymers in Aqueous Medium\*\*. **2005**, 5262–5265.
- (3) Lu, J.; Owen, S. C.; Shoichet, M. S. Stability of Self-Assembled Polymeric Micelles in Serum. *Macromolecules* **2011**, *44*, 6002–6008.
- (4) Biswas, S.; Kumari, P.; Lakhani, P. M.; Ghosh, B. Recent Advances in Polymeric Micelles for Anti-Cancer Drug Delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2016**, *83*, 184–202.
- (5) Owen, S. C.; Chan, D. P. Y.; Shoichet, M. S. Polymeric Micelle Stability. *Nano Today* **2012**, *7* (1), 53–65.
- (6) Torchilin, V. P. Multifunctional, Stimuli-Sensitive Nanoparticulate Systems for Drug Delivery. *Nat. Publ. Gr.* **2014**, No. October, 1–15.
- (7) Kwon, G. S.; Okano, T. Polymeric Micelles as New Drug Carriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1996**, No. 96, 107–116.
- (8) Gou, M.; Wei, X.; Men, K.; Wang, B.; Luo, F.; Zhao, X.; Wei, Y.; Quia, Z. PCL / PEG Copolymeric Nanoparticles : Potential Nanoplatforms for Anticancer Agent Delivery. *Curr. Drug Targets* **2011**, *12*, 1131–1150.
- (9) Kim, S. Y.; Shin, I. L. G.; Lee, Y. M.; Cho, C. S.; Sung, Y. K. Methoxy Poly ( Ethylene Glycol ) and e -Caprolactone Amphiphilic Block Copolymeric Micelle Containing Indomethacin . II . Micelle Formation and Drug Release Behaviours. **1998**, *51*, 13–22.
- (10) Vlierberghe, S. Van; Dubruel, P.; Schacht, E. Biopolymer-Based Hydrogels As Scaffolds for Tissue Engineering Applications : A Review. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (5), 1387–1408.
- (11) Liu, C. B.; Gong, C. Y.; Huang, M. J.; Wang, J. W.; Pan, Y. F.; Zhang, Y. De; Li, G. Z.; Gou, M. L.; Wang, K.; Tu, M. J.; et al. Thermoreversible Gel–Sol Behavior of Biodegradable PCL-PEG-PCL Triblock Copolymer in Aqueous Solutions. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **2007**, *83* (2), 165–175.
- (12) Mikhail, A. S.; Allen, C. Poly(Ethylene Glycol)-b -Poly(e-Caprolactone) Micelles Containing Chemically Conjugated and Physically Entrapped Docetaxel: Synthesis, Characterization, and the Influence of the Drug on Micelle Morphology. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (5), 1273–1280.
- (13) Feng, R.; Song, Z.; Zhai, G. Preparation and in Vivo Pharmacokinetics of Curcumin-Loaded PCL-PEG-PCL Triblock Copolymeric Nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 4089–4098.
- (14) Thotakura, N.; Dadarwal, M.; Kumar, P.; Sharma, G.; Guru, S. K.; Bhushan, S.; Raza, K.; Katare, O. P. Chitosan-Stearic Acid Based Polymeric Micelles for the Effective Delivery of Tamoxifen: Cytotoxic and Pharmacokinetic Evaluation. *AAPS PharmSciTech* **2017**, *18* (3), 759–768.
- (15) Feng, Z.; Zhao, J.; Li, Y.; Xu, S.; Zhou, J.; Zhang, J.; Deng, L.; Dong, A. Temperature-Responsive in Situ Nanoparticle Hydrogels Based on Hydrophilic Pendant Cyclic Ether Modified PEG-PCL-PEG. *Biomater. Sci.* **2016**, *4* (10), 1493–1502.