

Nanopartículas de copolímeros acrílicos cargadas con curcumina mediante polimerización *in situ*. Preparación, caracterización y evaluación como sistemas de liberación.

Elizabeth Reyes*; L. Osvaldo García; B. Elvira Reyes; F. Javier Enríquez, M. Esther Treviño*

Departamento de Química Macromolecular y Nanomateriales, Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), Blvd. Enrique Reyna Hermosillo 140, Col. San José de los Cerritos, Saltillo, 25294, México. *Autor por correspondencia: elizabeth.reyes.d21@ciqa.edu.mx y esther.trevino@ciqa.edu.mx

Resumen: Se prepararon, empleando la técnica de Polimerización en Heterofase en Semicontinuo (SHP), nanopartículas del copolímero poli(metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico) en dos diferentes relaciones molares 1:1 y 2:1 (C1 y C2). La composición de estos copolímeros corresponde a la de los copolímeros comerciales Eudragit L100 y Eudragit S100, respectivamente. Las polimerizaciones se llevaron a cabo en presencia de curcumina (CUR), para lograr su encapsulamiento, utilizando persulfato de amonio (APS) como iniciador y una mezcla de dodecilsulfato de sodio con bis-(2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio (SDS: AOT = 3:1 peso) como tensoactivo. Se utilizó también n-dodecanotiol como un agente de transferencia de cadena (CTA), con el propósito de estudiar el efecto de su concentración (0.5, 1 y 3% peso con respecto al monómero) sobre la cinética de polimerización, el peso molecular de las cadenas de copolímero y la cinética de la liberación de la CUR. Independientemente de la composición de la mezcla de monómeros y de la concentración de CTA ([CTA]), en todos los casos se lograron conversiones finales superiores al 98 %. Sin embargo, la tasa de polimerización mostró una dependencia inversa de la [CTA], lo cual fue más notorio para C1. La disminución en el peso molecular promedio número con el incremento en la [CTA] se vio reflejada en una mayor tasa de liberación de la CUR a pH de 7.4.

Introducción

En los últimos años, la curcumina (CUR) ha ganado un interés particular debido a sus múltiples propiedades terapéuticas; entre las cuales se puede mencionar su posible aplicación para el tratamiento de enfermedades del colon. Sin embargo, se ha reportado que sus efectos terapéuticos se ven limitados debido a su baja biodisponibilidad oral y su rápida metabolización, lo que se atribuye a su extremadamente baja solubilidad en agua [1]. Con la finalidad de incrementar su biodisponibilidad oral, se trabaja en el diseño de nanoestructuras como acarreadoras de CUR entre las cuales destacan las nanopartículas poliméricas (NPPs) [2]. La línea de copolímeros acrílicos de la marca Eudragit®, cuenta con opciones para liberar fármacos a diferentes valores de pH en el tracto gastrointestinal.[3] Sin embargo, el encapsulamiento de CUR con este tipo de copolímeros, involucra el uso de disolventes orgánicos; que al ser eliminados afectan las características y propiedades de las NPPs [4].

El objetivo principal del presente trabajo fue utilizar la técnica de Polimerización en Heterofase en Semicontinuo (SHP) para el encapsulamiento de la CUR en NPPs de composición similar a la de los copolímeros Eudragit L100 (C1) y Eudragit S100 (C2). También se llevó a cabo la síntesis de las NPPs utilizando n-dodecanotiol como un agente de transferencia de cadena (CTA), con el propósito de estudiar su efecto sobre la cinética de la polimerización, peso molecular del copolímero y cinética de liberación de la CUR.

Parte experimental.

Materiales.

Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Durante la síntesis se utilizaron los monómeros metacrilato de metilo (MMA, 98%) y ácido metacrílico (MAA, 99%); los surfactantes aniónicos dodecilsulfato de sodio (SDS, 98.5%) y bis-(2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio (AOT, 96%); el iniciador persulfato de amonio (APS, 99.9%)

como iniciador y la curcumina (CUR, $\geq 80\%$). Como agente de transferencia se empleó el n-dodecanotiol (CTA, $\geq 98\%$). Para las pruebas de liberación de CUR se utilizó una solución buffer fosfato (PBS) pH 7.4 (1.0 M) y monooleato de sorbitán polioxietileno 20 (Tween® 80). Como agente metilante de los copolímeros se utilizó trimetilsilildiazometano (TMS). Otros disolventes utilizados fueron: etanol anhidro (99.5%), tetrahidrofurano grado HPLC (THF, 99.9%), metanol grado reactivo (99.9%). Los monómeros se pasaron por una columna empacada con resina removedora de hidroquinona. El resto de los reactivos se utilizaron tal y como fueron recibidos. Todas las reacciones se llevaron a cabo en atmósfera inerte utilizando argón (Ar) de ultra alta pureza de INFRA y agua desionizada.

Síntesis de las NPPs.

En un reactor de vidrio enchaquetado de 100 mL, se cargaron 93.2 g de agua desionizada, 0.1 g de APS y 1.0 g de la mezcla de surfactantes SDS/AOT (3/1; p/p). Para desplazar el O₂ del reactor se hizo pasar un flujo de Ar por un periodo de 1 h, a temperatura ambiente y una agitación de 650 rpm. Pasado este tiempo, la temperatura de la mezcla de reacción se elevó a 70 °C y se dio inicio a la dosificación de la mezcla de monómeros ^[5] (que podía contener CUR). Para la adición de CUR, este reactivo se dispersó previamente en la mezcla de monómeros con ayuda de energía de ultrasonido por 5 min. En una formulación típica se agregaron 12.5 g de la mezcla de monómeros, los cuales se dosificaron con una bomba de infusión. Durante la polimerización se tomaron alícuotas a diferentes tiempos para determinar la conversión de los monómeros y el tamaño de las NPPs (D_p). Al finalizar la adición de la mezcla de monómeros, se permitió que la reacción continuara por un periodo de 1 h.

Pruebas de liberación de la CUR.

Para las pruebas de liberación de la CUR, los látex se dializaron para eliminar el tensoactivo y posteriormente se liofilizaron. Se agregó a un vial 1 mg de CUR, la cual podía estar en forma libre o cargada en las NPPs, seguidamente se adicionaron 6 mL de una solución preparada con PBS 0.1 M. La solución resultante se colocó dentro de una

bolsa de diálisis que fue sumergida en un frasco de vidrio color ámbar (para proteger a la CUR de la fotodegradación), el cual contenía 50 mL del medio de liberación previamente calentado a 37 °C. Como medio de liberación se utilizó una solución de PBS 0.1 M/Tween® 80 (3 % p/v). Los frascos se colocaron en un baño de agua a una temperatura controlada de 37 °C y se dejaron bajo agitación magnética a 120 rpm. A determinados intervalos de tiempo, se tomaron muestras de 5 mL del medio de liberación y el volumen fue recuperado añadiendo la misma cantidad de la solución. La cuantificación de la CUR liberada se hizo por espectrofotometría de UV-Vis.

Resultados y Discusión.

Se llevaron a cabo una serie de polimerizaciones para obtener las NPPs de C1 y C2 (MMA/MAA, 1:1 y 2:1 mol/mol respectivamente). Durante la experimentación se varió la [CTA] (0, 1, 3 y 5 % p) y la [CUR] (0 y 1 % p) con respecto a la mezcla de monómeros. En las Figuras 1 y 2 se presenta las curvas de conversión vs. tiempo para las polimerizaciones efectuadas con distinta [CTA] en presencia de CUR. Para efecto de comparación se incluyen las gráficas de C1 y C2, para las reacciones donde no se utilizó CTA ni CUR y aquella donde solo se empleó la CUR sin CTA. La línea continua representa la conversión instantánea (X_i), que se calcula tomando como referencia el peso del monómero agregado al tiempo de tomar la muestra, mientras que la línea punteada representa la conversión global (X), que se calcula tomando en cuenta la cantidad total del monómero adicionado. Como puede apreciarse en las reacciones sin CTA, X_i y X disminuyeron ligeramente cuando se empleó la CUR. El efecto de retardación de la CUR podría deberse a una posible transferencia de átomos de hidrógeno de la molécula hacia una fracción de los radicales poliméricos en crecimiento; para dar lugar a la generación de radicales con una menor constante de reactivación ^[6]. En cuanto a las reacciones a diferente [CTA], el efecto de retardación fue mayor, lo que puede atribuirse a un efecto combinado de la presencia de moléculas de CUR y CTA, ya que en estudios previos no se observó un efecto de la [CTA] sobre la R_p cuando no se utilizó CUR.

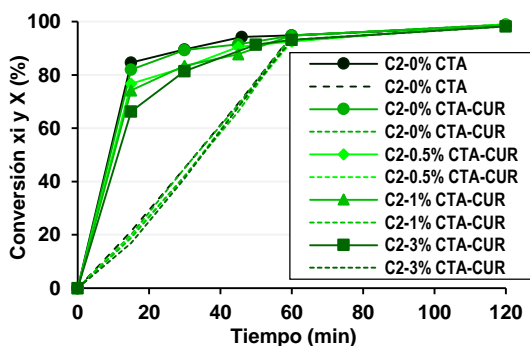
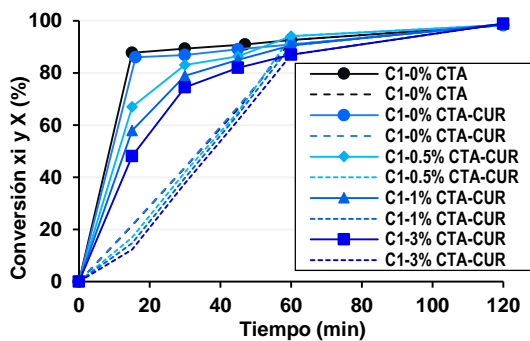


Figura 1 y 2.- Efecto de la [CTA] y presencia de CUR (1%p) sobre la cinética de la polimerización de C1 y C2. Conversión instantánea, X_i (—) y conversión global, X (---).

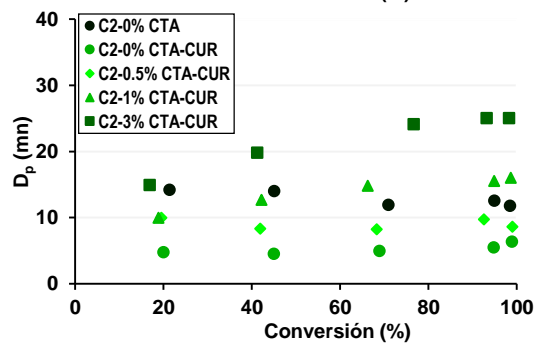
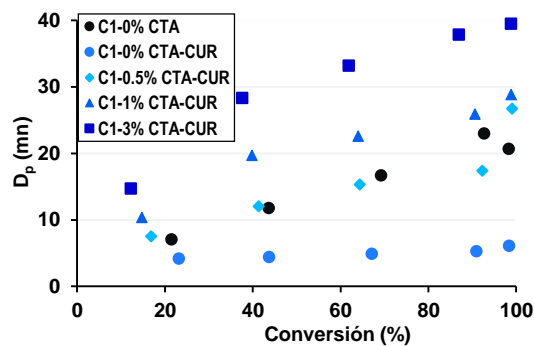


Figura 3 y 4.- Evolución de D_p con el avance de la reacción con diferente [CTA], en presencia de CUR (1%p).

En cuanto a la variación del D_p con el avance de reacción (Figuras 3 y 4), el ligero incremento de C1 sobre C2 se atribuye al predominio del mecanismo de coagulación sobre la nucleación o formación de partículas. El incremento de D_p también puede ser atribuido a la presencia de la CUR en el interior o en la superficie de las NPPs y la coalescencia de partículas durante el periodo de polimerización [7-9].

Por último, en las Figuras 5 y 6 se observa que el número de las partículas (N_p) disminuyó drásticamente con la [CTA], al considerar el aumento del valor de D_p con el avance de reacción se puede interferir que, durante la nucleación de partículas, estas se unieron para ser coloidalmente estables. La caracterización que se hizo para determinar la estabilidad coloidal de los látex, indicó que se trata de látex altamente estables (potencial $Z \pm 30$ mV) [10].

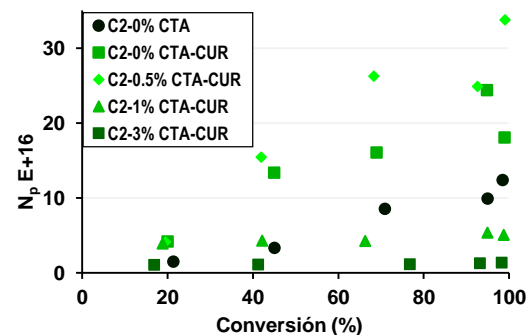
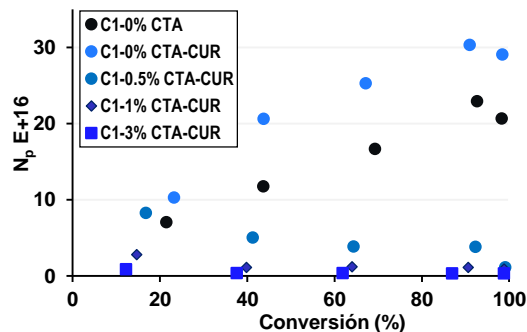


Figura 5 y 6.- Evolución de N_p con el avance de la reacción con diferentes [CTA] y en presencia de 1% de CUR.

De acuerdo con los resultados que se presentan en la Tabla 1, es posible mantener una [CUR] constante en el látex a pesar de incrementar la [CTA]. Sin embargo, la eficiencia de encapsulamiento (EE) no sigue la misma tendencia, ya que se puede apreciar que disminuyó ligeramente con el aumento de la [CTA]. Es importante mencionar que la CUR no encapsulada sale de fase durante la polimerización y queda en forma de hojuelas flotando en la superficie del látex, o bien, adherida en las paredes del reactor. Al finalizar la polimerización los látex se filtran para eliminar la CUR no encapsulada, lo cual es relativamente sencillo de hacer porque las hojuelas de CUR son de tamaño milimétrico. En la Figura 7 se presentan fotografías de los látex obtenidos con diferente [CTA] y cargados con el 1% p de CUR.

Tabla 1.- Tabla 8.- Eficiencia de encapsulación (% EE) de las NPPs sintetizadas.

[CTA] agregada en la formulación (% p)	0%	0.5%	1%	3%
C1				
CUR en el látex (g/L)	1.09	1.11	1.08	1.07
EE (%)	94.7	92.51	89.47	88.15
C2				
CUR en el látex (g/L)	1.03	1.07	1.08	1.08
EE (%)	92.0	90.24	89.16	88.4

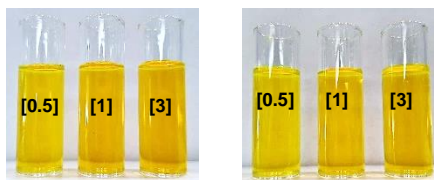


Figura 7.- Látex obtenidos al 1% p de CUR y con diferente [CTA].

Los termogramas de DSC de los copolímeros obtenidos (Figura 8) muestran la que presencia de las moléculas de CUR ocasiona un ligero incremento en el valor de la T_g . Este incremento podría atribuirse a una modificación en el empaquetamiento de las cadenas del copolímero, ocasionada por posibles interacciones electrostáticas con las moléculas de CUR. Este efecto ya había sido reportado para el caso del copolímero C2, cuando fue sintetizado en presencia de

ibuprofeno, ya que la T_g aumentó alrededor de 10 °C [9]. Por otro lado, se observó que los valores de T_g disminuyeron con el aumento de la [CTA] a pesar de la presencia de CUR. La ausencia de endotermas adicionales indica que no se formaron homopolímeros. Además, el hecho de que no se observe el punto de fusión de la CUR (T_m , 183 °C) sugiere que ésta se encuentra en estado amorfo y dispersa en la matriz polimérica [11]. En la Tabla 2 se presenta una comparación de los valores de T_g para los dos tipos de copolímeros obtenidos

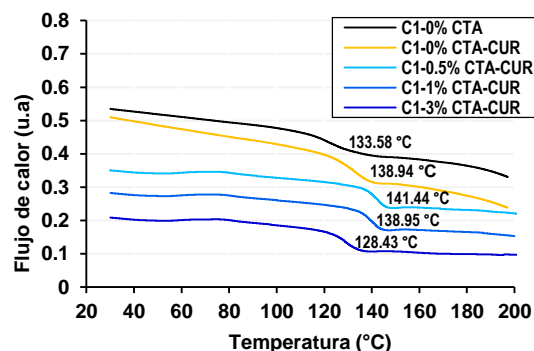


Figura 8.- Termogramas de DSC para las muestras del copolímero C1 obtenido a 1h de reacción.

Tabla 2.- Temperatura de transición vítrea (T_g) de los copolímeros al 1% de CUR

variables		C1	C2
CTA (%)	CUR (%)	T_g (°C)	T_g (°C)
0	0	133.58	132.77
0	1	138.94	134.87
0.5	1	141.24	131.35
1	1	138.95	120.46
3	1	128.43	110.83

En la Figura 9 se presentan los cromatogramas de GPC para las muestras de C1. Como puede observarse, existe una dependencia inversa del peso molecular sobre la [CTA]. La disminución del peso molecular en estas reacciones se atribuye a una combinación entre la presencia del CTA y la CUR (esto se puede inferir al observar a C1 sin CTA y C1 con CUR); lo que sugiere que las reacciones de transferencia de cadena se dan principalmente hacia el CTA y que la presencia de la CUR tiene un efecto menor en este tipo de reacciones. Los datos de la Tabla 3 indican que el efecto de la [CTA] y la

presencia de CUR producen una disminución en $M_n < 200,000$ g/mol y en $M_w > 250,000$ g/mol, en ambos copolímeros.

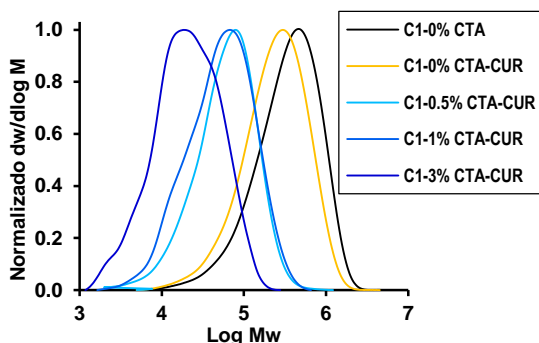


Figura 9.- Distribuciones de peso molecular del copolímero C1 a diferente [CTA] y 1% de CUR.

Tabla 3.- Datos de conversión, M_n , M_w , y PDI para la serie de polimerizaciones efectuadas con CUR al 1 % p y diferente [CTA].

Exp.	[CTA]	Conv. (%)	M_n (g/mol)	M_w (g/mol)	PDI
C1 CUR	0	98.40	168,845	393,216	2.33
	0.5	98.43	46,989	105,141	2.24
	1	98.8	32,301	75,030	2.32
	3	98.83	12,665	29,372	2.31
C2 CUR	0	98.90	163,018	364,136	2.23
	0.5	99.02	35,563	74,436	2.09
	1	98.67	24,244	47,807	1.98
	3	98.35	11,455	22,778	1.99

Las curvas de liberación de CUR se presentan en la Figura 10. En primera instancia el uso de las NPPs (sin CTA) como acarreadores de CUR no parece muy alentador ya que solo se incrementó una pequeña cantidad de CUR liberada desde los copolímeros C1 (12.7%) y C2 (8.5%), con respecto a la CUR libre (CL \approx 3.9%). Sin embargo, se puede observar que la disminución del peso molecular de ambos copolímeros tuvo un efecto considerable sobre la liberación acumulada de la CUR (aprox. 5 veces mayor). Esto se atribuye a que la disminución del peso molecular permite un mayor hinchamiento de las NPPs y una mayor difusión de las moléculas de CUR a través de la matriz polimérica. También se observó que el incremento de la [MAA], monómero más soluble en agua permitió una mayor liberación de la CUR. Esto se debe al incremento en la capacidad de ionización y, en consecuencia, incremento en la solubilidad en agua de C1.

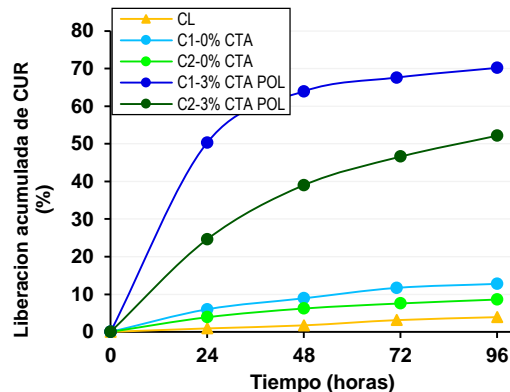


Figura 10.- Efecto del tipo de copolímero y la [CTA] sobre los perfiles de liberación de la CUR a 37°C en una solución de PBS 0.1 M/Tween 80 (3 % p/v).

Conclusiones

- Se demostró que es posible la llevar a cabo la síntesis de NPPs de C1 y C2 en presencia de la CUR (1% p) a diferente [CTA]. En ambos sistemas se obtuvieron conversiones > 95 % y $D_p < 40$ nm.
- La evolución del D_p y el N_p con el avance de la reacción de C1 sugiere que la alta solubilidad del MAA en el agua, aunada a su alta reactividad, tuvo un efecto importante sobre el proceso de formación y crecimiento de las NPPs.
- El encapsulamiento de la CUR muestra que C1 tuvo siempre la mayor eficiencia de encapsulación (EE de 92.51 y 1.11 g/L de CUR obtenido con el 0.5 % p de CTA).
- El aumento de la [CTA] combinado con la presencia de CUR mostró un ligero efecto de disminución sobre la T_g de los copolímeros.
- El peso molecular de C1 y C2 muestra una dependencia directa con la [CTA] y se explica por las reacciones de transferencia de cadena.
- La CUR actuó como un agente retardante de la R_p y afectó negativamente a X_i y X a medida que se incrementaba la [CTA]. Este efecto se atribuye a posibles reacciones de transferencia de cadena de los radicales hacia las moléculas de CUR.
- Las pruebas de liberación indican que se puede incrementar la cantidad de CUR liberada desde las NPPs al disminuir el peso molecular de los copolímeros. También muestran que C1 libera el mayor porcentaje de CUR al pH evaluado.

Agradecimientos.

Se agradece a CONACYT por el financiamiento otorgado a través de la beca de Doctorado #792422. Se agradece a la M.C. Teresa Rodríguez y L.C.Q. María Guadalupe Méndez por su apoyo en los análisis de GPC y DSC, respectivamente.

Referencias.

1. Jieying, L.; Siyuan, C.; Li, L.; Lei, S.; Shengrong, G.; Shentang, H. Recent Progress in Studying Curcumin and its Nano-preparations for Cancer Therapy. *Curr Pharm Des.* 2013, 19(11), 974–93.
2. Panwar, J.; Dwivedi, N.; Shukla, V.K. Polymeric nanoparticles: New approaches towards targeted cancer therapy with biomedical applications. *Int J Pharm Res Sch.* 2014, 3(2), 540–50.
3. Thakral, S.; Thakral, N. K.; Majumdar, D.K. Eudragit®: a technology evaluation, Expert Opin. *Drug Deliv.* 2013, 10 (1), 131-149.
4. Miladi, K.; Ibraheem, D.; Iqbal, M.; Sfar, S.; Fessi, H.; Elaissari, A.; Particles from preformed polymers as carriers for drug delivery. *Excli j.* 2014, 13, 28-57.
5. Fernández, S.; Guillén, M.; López, R. G.; Enríquez, F.J.; Cepeda, J.; Romero, J.C.; Saade, H.; Ilyna, A. Biocompatible and biodegradable ultrafine nanoparticles of poly(methyl methacrylate-co-methacrylic acid) prepared via semicontinuous heterophase polymerization: kinetics and product characterization. *Int. J. Polym. Sci.* 2016, 1–8.
6. Odian, G. *Emulsion polymerization. in principles of polymerization*; Hoboken, Ed; John Wiley & Sons, Ltd: New Jersey, 2004, cap. 3 y 6.
7. Liu, B.J.; Deng, Y.J.; Sun, S.L.; Zhang, M.Y.; Lin R.Q.; Zhang H.X. A novel approach to prepare large-scale and narrow-dispersed latex particles by emulsion polymerization based on particle coagulation mechanism. *Des. Mono. Polym.* 2016, 19 (2), 119-127.
8. Oliveira, M.; Melo, P.; Nele, M.; Pinto, J. In-Situ incorporation of amoxicillin in pva/pvac-co-pmma particles during suspension polymerizations. *Macromol. Symp.* 2011, 299/300, 34-40.
9. Saade, H.; Diaz de León, R.; Enríquez, F.J.; López, R.G. Preparation of ultrafine poly(methyl methacrylate-co-methacrylic acid) biodegradable nanoparticles loaded with ibuprofen. *J. Biomater. Sci. Polym.* 2016, 27 (11), 1126–1138.
10. Guo, W.; Hu, N. “Interaction of myoglobin with poly(methacrylic acid) at different pH in their layer-by-layer assembly films: An electrochemical study”. *Biophys. Chem.* 2007, 29 (2–3), 163–171.
11. Esatbeyoglu, T.; Huebbe, P.; Ernst, I.M.A.; Chin, D.; Wagner, A.E; Rimbach, G. Curcumin—From Molecule to Biological Function. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 5308-5332.