

Nanogeles de PEGMA/ DEAEMA con TBMA Intrinsecamente fluorescentes y sensibles a pH.

Gabriela Ramos-Durán^{a)}, Alejandra González-Urías^{b)}, Karla Juárez-Moreno^{c)}, Adrián Ochoa-Terán^{b)}, Hened Saade-Caballero^{a)}, Christian Castro-Riquelme^{b)}, Ricardo López-González^{a)}, Iván Zapata-González^{a)*}

^{a)} Centro de Investigación en Química Aplicada, Blvd. Enrique Reyna Herмосillo 140, San José de los Cerritos, Saltillo Coahuila México, 25294; ^{b)} Instituto Tecnológico de Tijuana, Calz del Tecnológico 12950, Tomas Aquino, 22414 Tijuana, B.C.; ^{c)} Universidad Nacional Autónoma de México, CFATA, Juriquilla, Querétaro, México; ricardo.lopez@ciqa.edu.mx, ivan.zapata@ciqa.edu.mx

Resumen: En el área de la ciencia biomédica recientemente se han desarrollado diversos dispositivos para liberación de fármacos, pero añadiendo características como la capacidad de diagnóstico. Los sistemas biopoliméricos multifuncionales para terapias guiadas por imágenes eficientes exhiben grandes ventajas comparado con otros sistemas, confiriéndoles características como la protección de los fármacos a la degradación, la eficiencia de encapsulación al eliminar las interacciones con el entorno biológico para aumentar el tiempo de propagación de la circulación del fármaco en el torrente sanguíneo y una acumulación mejorada del fármaco en las zonas afectadas. Además, los nanogeles teranósticos presentan la capacidad de fluorescencia para el posible diagnóstico de diversas enfermedades, así como el seguimiento de las mismas. En este trabajo se reportan dos plataformas teranósticas, denominados nanogeles tipo núcleo – coraza con dos diversos fluoróforos como entrecruzantes sensibles al pH. Los materiales se obtuvieron a través de polimerización en emulsión libre de surfactante, con una relación molar de 70% en la coraza de metacrilato de poli(etilenglicol) metil éter de 1100 g mol⁻¹ (PEGMA) y 30% en el núcleo del red copolimérica de metacrilato de (*N,N*-dietilamino) etilo (DEAEMA) y metacrilato de *ter*-butilo (TBMA). Los nanogeles fueron caracterizados por resonancia magnética nuclear (RMN-H¹) para conocer su composición, dispersión de luz dinámica (DLS) para estimar el tamaño de los nanogeles, potencial Z y fluorescencia, comprobando el efecto que tiene el cambio de pH en estas dos plataformas, confirmando que se obtienen materiales inteligentes sensibles al estímulo.

Introducción

Los nanogeles (NG) poliméricos son partículas de hidrogeles a escalas nanométricas de 10-1000 nm formadas mediante la reticulación física o química de cadenas polimérica las cuales presentan características novedosas como hinchamiento en presencia de un buen disolvente. [1] Los NG son estructuras tridimensionales en forma de nano red y pueden formarse a partir de polímeros tanto sintéticos como naturales al igual que una mezcla entre ellos. Estos poseen una excelente capacidad para poder retener agua sin degradarse en un medio acuoso, y mediante las diversas composiciones poliméricas pueden aportar modificaciones en

las características, como el diámetro hidrodinámico y la carga superficial, sintetizando así un material ad hoc. Actualmente se han reportado diversos trabajos donde se registra que dichos materiales pueden responder a estímulos ambientales como la temperatura [2], pH [3], luz [4] y campo eléctrico [5], la manera en que responden es cambiando su grado de hinchamiento o deshinchamiento. En función de la morfología y las características de los nanogeles se pueden clasificar principalmente en tipo núcleo-coraza, hueca, peluda, capa por capa, funcionalizado e híbrido **Figura 1.** [6]

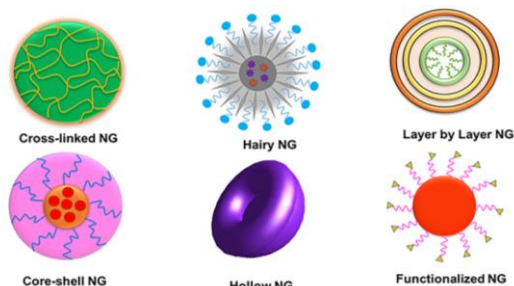


Figura 1. Tipo de clasificación de nanogeles.

Los nanogeles con morfología tipo núcleo-coraza, como se muestra en la **Figura 2**, están compuestos por una red reticulada químicamente. Por lo cual en esta zona el repliegue de las cadenas reticuladas está restringida, dicha retícula polimérica es llamada “inteligente” debido a que está formada por cadenas entrecruzadas conteniendo grupos funcionales ionizables (o con grupo sensible a un gradiente externo) capaz de causar repulsiones electrostáticas con el medio y sufrir una expansión o contracción, dependiendo del valor de pH del ambiente [7], es esta categoría la base del nanogel es la síntesis ya que de ella dependen los diversos parámetros, como el tamaño, carga superficial y modificaciones de los grupos funcionales [8]. En este tipo de nanogel las interacciones que existen entre polímero-polímero dentro del núcleo se vuelven favorables en comparación con las interacciones polímero-agua, expulsando así el agua y disminuyendo el diámetro hidrodinámico de las partículas. Este fenómeno también puede influir en otras propiedades de las nanopartículas, como la densidad de carga, la dispersión de la luz y la hidrofobicidad [9].

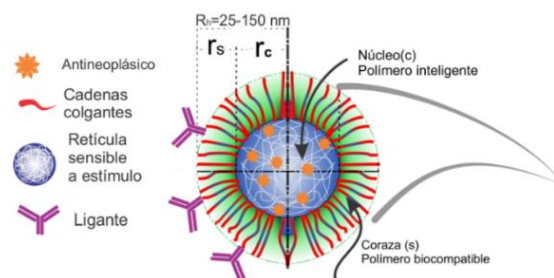


Figura 2. Esquema de nanogel etiquetado, tipo núcleo-coraza.

A fin de brindarle las características de fluorescencia es necesario otro componente el cual le confiera esta capacidad, en el 2020 Manzanares *et al.* [10] reportaron la síntesis de un material inteligente cargado con curcumina lo cual daba como resultado un nanogel núcleo-coraza fluorescente, el cual tenía la finalidad de poder rastrearse una vez dentro de las células mediante microscopia de fluorescencia. Los nanogel liberaban el fármaco contenido a pH ácidos. De igual manera Gonzalez- Urías *et al.* reportaron este mismo proceso para obtener un NG tipo núcleo-coraza, sin embargo, realizaron una grande aportación al adicionar entrecruzantes fluorescentes, dándole la capacidad de cargar diversos fármacos y así obtener un NG que pudiera ser denominado como un material terapéutico, en este trabajo sintetizaron NG aniónicos y catiónicos reportando por primera vez el uso del diacrilato de fluoresceína (DAF) como entrecruzante, cargando cisplatino. El estudio concluye que es posible sintetizar este tipo de materiales con modificaciones en el núcleo, para realizar el seguimiento del material en las células y liberar el fármaco [11].

Parte experimental

Materiales. Metacrilato de poli(etilenglicol) metil éter de 1100 g mol⁻¹ (447951-100 mL, Sigma-Aldrich), Metacrilato de (N,N-dietilamino) etilo (408980-250 mL, Sigma-Aldrich), metacrilato de ter-butilo (463353-100 mL, Sigma-Aldrich), diacrilato de fluoresceína (DAF) (570257-500 mg, Sigma-Aldrich), el entrecruzante derivado de Naftalendimida (NDI) fue sintetizado por un colaborador del equipo de trabajo. Solución reguladora (bifalato, pH4) 1L J.T. Baker, Solución reguladora (borato pH 10) 1L J.T. Baker Se utilizo agua destilada para todos los procesos.

Instrumentación. Los nanogel purificados se caracterizaron por medio de dispersión de luz dinámica (DLS), para obtener el diámetro hidrodinámico (D_h), en el equipo de Zetasizer Nano ZS, ZEN3690; Malvern Instruments, equipado con un láser rojo de 630 nm y con

medición de retrodispersión con detector a 90° del láser. En el equipo Microtrac Zeta- Check, se midió el potencial zeta (ζ), en donde, las partículas positivas son atraídas al ánodo y las negativas al cátodo, lo que determina la movilidad de las partículas cargadas en un campo eléctrico alterno. El potencial zeta se calcula a partir de la movilidad a través de la ecuación de Henry o Smoluchowski. También se utilizó espectroscopía de $^1\text{H-NMR}$ en un equipo Bruker de 400 MHz y los datos se procesaron utilizando el software Mestrenova, para comprobar la incorporación de los monómeros principales y cuantificar la composición de los nanogeles. Y se llevaron a cabo las lecturas de fluorescencia en un espectrómetro de fluorescencia/UV-Vis, de marca Horiba, Duetta, para determinar los valores de emisión y excitación de cada material.

Tabla 1. Masas molares iniciales de las reacciones NG-DAF/ Y NG-NDI/T.

Exp.	DEAEMA mMol	PEGMA mMol	C.L. mMol	TBMA mMol
NG-DAF/T	0.81	0.37	0.008	0.32
NG-NDI/T	0.81	0.37	0.007	0.32

C.L. = entrecruzante

Resultados y discusión

Se realizó la síntesis de los nanogeles tipo núcleo-coraza, donde la coraza está compuesta de PEGMA y el núcleo de una redícula inteligente de DEAEMA – TBMA, utilizando como entrecruzantes fluorescentes DAF y NDI.

En la **Tabla 1**, se concentraron las relaciones que se utilizaron para cada una de las reacciones, variando el tipo de entrecruzante (NDI / DAF). La síntesis se llevó a cabo en un reactor de vidrio de 1000 mL a 80° C por 30 min, obteniendo en nanogeles con diámetros hidrodinámicos de partícula entre 50-200 nm [12], necesario para las diversas aplicaciones biomédicas.[13]

Una vez que transcurrieron los 30 minutos de la reacción, se coloca en un recipiente con

agua fría para detener la reacción, posterior a esto sometieron a el proceso de purificación y liofilización, finalmente se caracterizar el material.

La composición de los nanogeles se determinó a través de espectroscopia de RNM- ^1H , en la **Figura 3** se muestra el espectro del nanogel con diacrilato de fluoresceína (NG-DAF/T), se integraron las señales de los desplazamientos en 3.4 ppm correspondientes a los hidrógenos de CH_3 del PEGMA y de CH_2 del DEAEMA a 2.4 y 3.2 ppm, respectivamente, y en el desplazamiento de 1.4 ppm son señales correspondientes a los CH_3 del TBMA.

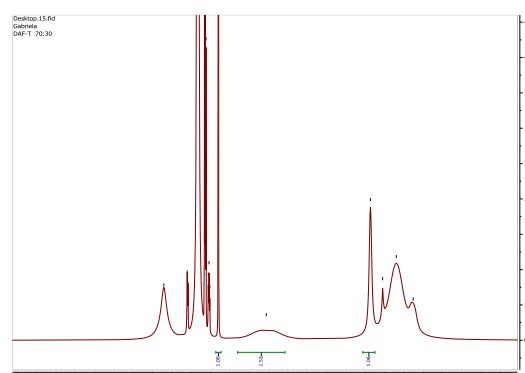


Figura 3. Espectro de RMN de H^+ de NG-DAF/T en CDCl_3 .

Al sustituir los valores correspondientes en la Ec. 1. Se logra obtener la composición de PEGMA en el copolímero (F_{PEGMA}) para la reacción. Teniendo como resultado un 47 %mol de coraza en total del nanogel.

$$F_{\text{PEGMA}}(\% \text{ mol}) = \left(\frac{\frac{\int H_B}{3}}{\frac{\int H_B}{3} + \frac{\int H_{E+F}}{6}} \right) \text{ Ec.1}$$

Tabla 2. Composición y tamaño de partícula de los nanogeles.

Exp.	D_h	COMPOSICION (F_i) (% mol)		
		TBMA	DEAEMA	PEGMA
NG-DAF/T	56	16.7	36.0	47.3
NG-NDI/T	36.24	35	25.5	39.5

2. Sensibilidad de pH

Para comprobar que los materiales responden a un estímulo ambiental como lo es el pH, los nanogeles fueron sometidos a diversos pH para posteriormente ser caracterizados y conocer así es potencial ζ , y el tamaño de partícula de cada material a los diversos valores, así como la fluorescencia.

Tabla 3. Tamaño de diámetro hidrodinámico y potencial ζ para nanogeles con ambos fluoróforos a distintos pH.

pH	NG-DAF/T		NG-NDI/T	
	D_h	ζ	D_h	ζ
4	487	+27.9	506	+26.7
6	97	+10.9	243	-31.8
8	25	+8.7	108	-45.9

En la **Tabla 3** se resumen los resultados y se comprueba que los materiales sintetizados presentan sensibilidad a pH, en NG-DAF/T se presenta un hinchamiento mayor al incrementar su tamaño de un pH 6 a pH 5 de 300 % aproximadamente, mientras que en el NG-NDI/T tiene un comportamiento similar al hincharse en presencia de pH ácidos. Siendo congruente con lo reportado por Urías et al., [14] quienes reportan que el nanogel al encontrarse en un medio ácido, es decir, al disminuir el pH aumenta el hinchamiento debido a que nitrógenos de los grupos amino del DEAEMA se protonan, teniendo este efecto

Por otro lado, el potencial ζ observado en la es congruente con lo esperado, al aumentar el pH las cargas negativas aumentan. De acuerdo con lo reportado en la literatura existe una absorción de grupos OH, ya que estas especies se encuentran favorecidas por ser un medio básico, y esto pudiera explicar la carga superficial negativa.[15] Por otro lado, a pH bajos las cargas positivas incrementaron debido a que el poli(DEAEMA) se protona.[16]

3. Fluorescencia de los nanogeles

Se midieron los nanogeles a diversos valores de pH para conocer el comportamiento de estos.

El NG-DAF/T presenta señales de emisión de 517 nm y una longitud de onda para excitación de 480 nm, disminuyendo su intensidad al ir

aumentando el pH en las muestras. De igual manera van apareciendo señales lo cual indicaría la presencia de diversas especies del fluoróforo presente en este material, acorde a lo descrito por R. Sjoback et al. [17].

Conclusiones

Se sintetizaron nanogeles a base de DEAEMA y PEGMA con entrecruzantes intrínsecamente fluorescentes (DAF y NDI). Con la proporción molar adecuada de monómeros y de entrecruzantes, se obtuvieron nanogeles con diámetro hidrodinámico de 50-200 nm, sensibles al gradiente de pH. Se estudió la fluorescencia de los nanosistemas NG-DAF/T y NG-NDI/T, dando una emisión y excitación máximas de 517 nm y 480 nm, 564 nm y 490 nm, respectivamente. La fluorescencia se abatió conforme el pH aumenta en la solución. El diámetro hidrodinámico para la plataforma NG-DAF/T disminuyó desde 480 nm en pH 4 a 22 nm en pH 9 (22 veces). Para el caso de NG-NDI/T presentó el mismo comportamiento con un tamaño de 500 nm, el cual se redujo en pH básicos a 60 nm (8 veces).

Agradecimientos

Agradecemos a el COECYT y al CONACYT por el financiamiento del proyecto FONCYT-COAH-2022-C19-C006, y al CIQA a través del proyecto interno 6754. También, Gabriela Ramos-Durán agradece al CONAHCYT por la beca de doctorado y al CIQA por las facilidades para llevar a cabo el proyecto doctoral.

Referencias

1. B. R. Saunders and B. Vincent, Adv. Colloid Interface Sci., 1999, 80, 1–25
2. C. D. Jones, L. A. Lyon, Macromolecules 2000,33, 8301
3. Y. Li, T. Tanaka, J. Chem. Phys.1989,90, 5161.
4. S. R. Sershen, S. L. Westcott, N. J. Halas, J. L. West, Appl. Phys.Lett.2002,80, 4609
5. T. Tanaka, I. Nishio, S. T. Sun, S. Ueno-Nishio, Science1982,218, 467
6. N. K. Preman; S. Jain; R. P. Johnson, ACS Omega 2021, 6, 5075–5090
7. J. Ramos.; J. Forcada; R. Hidalgo-

- Alvarez, *Chem. Rev.* 2014, 114, 367–428.
8. N. Sanson; J. Rieger, *Polym. Chem.* 2010, 1, 965–977.
 9. D. M. Gray; A. R. Town; E. Niezabitowska; S. P. Rannard and T. O. McDonald, *RSC Adv.*, 2022, 12, 2196–2206
 10. L. A. Manzanares-Guevara, A. C. Licea; I. O. Parra; J. B. Sarabia; F. D. Castillo, and A. F. L. Navarro; *ACS Omega* 2020, 5, 9171–9184.
 11. A. G. Urías; L. A. Manzanares-Guevara; Licea-Claverie; Ochoa-Terán, A., A. L. Navarro, A. F., B. Sarabia, J., & I. Zapata-González, (2021). *European Polymer Journal*, 144, 110200.
 12. Avgoustakis, K.; Beletsi, A.; Panagi, Z.; Klepetanis, P.; Karydas, A. G.; Ithakissios, D. S.; *J. Control. Release* 2002, 79, 123-135.
 13. A. A. Kulkarni; & P. S. Rao; 2013. *Nanomaterials in Tissue Engineering*, 27–63.
 14. P. A. Arredondo; L. M. Londono; *Rev. Ing. Biomed.* 2009, 3, 83-94.
 15. S.R. Marek; Thesis for the degree of Doctor of Philosophy, University of Texas at Austin, Doctor of Philosophy, USA, 2009.
 16. L. Manzanares-Guevara, Tesis de Maestría en Ciencias en Química, Instituto Tecnológico de Tijuana, Centro de Graduados e Investigación, Tijuana, B. C., 2015, p 50.
 17. R. Sjöback; J. Nygren; & M. Kubista, 1995. *Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 51(6), L7–L21