



# **Diseño de copolímeros basados en PEG-PCL para encapsulación de fármacos apolares**

**Julián David Porras Argüello**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Departamento de Química

Bogotá D.C, Colombia

2022



# **Diseño de copolímeros basados en PEG-PCL para encapsulación de fármacos apolares**

**Julián David Porras Argüello**

Tesis o trabajo de investigación presentado(a) como requisito parcial para la obtención del título de:

**Maestría en Ciencias Químicas.**

Director:

Ph.D. León Darío Pérez Pérez

Línea de investigación:

Síntesis de polímeros

Grupo de investigación

Macromoléculas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá D.C, Colombia

2022

## Agradecimientos

Expreso mi agradecimiento al Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia y al Ministerio de Ciencia y Tecnología por el financiamiento del proyecto “Evaluación de formulaciones nanoestructuradas de extractos de Cannabis encapsulados en micelas poliméricas para el tratamiento del dolor crónico” enmarcado en la convocatoria 807 - 2018 para proyectos de ciencia, tecnología e invocación en salud 2018.

Además, quiero agradecer al profesor León Darío Pérez, por el apoyo y acompañamiento a lo largo de todo este proceso que han permitido darle una mayor calidad académica a mi trabajo. También, agradezco a mis compañeros del grupo de macromoléculas, liderado por el profesor Cesar Sierra, por sus consejos en el ámbito científico y amistad. Quisiera reconocer a Dora Benjumea, Yoreny Roman y Lucas Blandón, pertenecientes a la Universidad de Antioquia, por su buena disposición y apoyo para aquellas partes de nuestro proyecto de investigación que involucraban su participación.

Quiero agradecer a mi familia, por el apoyo y sostén durante todo este tiempo, debido a que mucho de lo vivido durante el tiempo de pandemia me ha permitido mejorar mis percepciones con respecto del ámbito profesional y personal. Me gustaría reconocer el acompañamiento de mis amigos de la Universidad Nacional, quienes me han acompañado desde el pregrado. Por último, quiero agradecer a los programas de Bienestar de la universidad por el acompañamiento psicológico.

## Resumen.

### *Diseño de copolímeros basados en PEG-PCL para encapsulación de fármacos apolares*

En la actualidad existen múltiples moléculas con interés farmacológico de carácter lipofílico que presentan baja solubilidad en agua y baja biodisponibilidad, por ejemplo, la curcumina con propiedades antioxidantes y los cannabinoides como el cannabidiol (CBD) y  $\Delta$ -9-tetrahidrocannabinol (THC) que interactúan con el sistema endocannabinoide. Se han desarrollado diferentes vehículos de transporte para abordar los anteriores problemas, que han mostrado la capacidad de aumentar la biodisponibilidad de los fármacos, sin embargo, presentan desventajas asociadas principalmente a su baja capacidad de carga de fármaco y toxicidad. Por esta razón se plantea el desarrollo de un vehículo polimérico funcionalizado con ácidos grasos en esta investigación.

Para la obtención de este polímero, en primer lugar, se llevó a cabo la síntesis de copolímeros de polietilenglicol (PEG), con  $\epsilon$ -caprolactona ( $\epsilon$ -CL) y 5-metil-5-propargiloxycarbonil-1,3-dioxan-2-ona (MCP), mediante polimerización por apertura de anillo (ROP, por sus siglas en inglés). Seguido de ello, se probaron diferentes metodologías de reacción por química clic que incluyen el uso de una azida de acilo o una 3-azidopropilamida basada en ácido linoleico como sustratos, solventes como DMF o anisol y varias temperaturas. La tendencia general de estas reacciones fue evaluada usando resonancia magnética nuclear de protón (RMN- $^1$ H), en donde las condiciones que aumentan la solubilidad del polímero se correlacionaron con un aumento de la conversión de los grupos funcionales. Los polímeros obtenidos fueron caracterizados mediante el uso de cromatografía por permeación en gel (GPC), RMN- $^1$ H y espectroscopia infrarroja (FT-IR).

La encapsulación de los fármacos se llevó a cabo usando nanoprecipitación. Se evaluó el efecto de los polímeros modificados, solventes usados, velocidad de agitación y evaporación por vacío sobre la encapsulación de curcumina (CUR), la cual fue cuantificada por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Estos experimentos permitieron concluir que hay un efecto cinético asociado a la velocidad

en la cual se forman los núcleos de las micelas y el fármaco, en donde el uso de evaporación por vacío fue el método que permitió obtener mayores valores de encapsulación (aproximadamente 40% en peso curcumina/ peso micela cargada).

Por otra parte, los valores de encapsulación de CBD fueron mucho más altos que los de curcumina (aproximadamente 60% en peso CBD/peso micela cargada), lo que se asoció a la partición del principio activo desde el medio continuo hacia el núcleo micelar, aun cuando los coloides ya están formados. Debido a las altas cargas de fármaco, se estudió la estabilidad coloidal de las micelas cargadas con CBD y la degradación del fármaco encapsulado. Se observó que los polímeros con 5 ácidos grasos en su estructura alcanzaron micelas más estables que los que tenían 2 ácidos y se observaron sistemas estables con PEG-PCL. La degradación del CBD en el interior del núcleo micelar fue significativa luego de varios meses de almacenamiento en las micelas con mayor carga de fármaco.

Por último, se llevó a cabo la encapsulación y la liberación de extractos enriquecidos en CBD y THC. Las encapsulaciones de los extractos fueron menos eficientes que las encontradas con el CBD puro, lo cual fue asociado a efectos antagónicos de los componentes del extracto. Los valores obtenidos para las cinéticas de liberación ajustaron principalmente al modelo de Higuchi, lo que sugiere una liberación mediada por difusión. Además, se realizaron ensayos *in-vivo* usando las formulaciones obtenidas que mostraron un efecto analgésico sostenido en el tiempo.

Palabras clave: Química clic, curcumina, cannabidiol, micelas, ácidos grasos

## ABSTRACT.

### *Design of copolymers based on PEG-PCL for encapsulation of apolar drugs.*

Currently, there are multiple lipophilic drugs with pharmacological interest which present low water solubility and poor bioavailability, for instance, curcumin with antioxidant properties and cannabinoids such as cannabidiol (CBD) and  $\Delta$ -9-tetrahydrocannabinol (THC) that interact with the endocannabinoid system. Different vehicles have been developed to tackle those problems which increase the bioavailability of drugs; however, they have drawbacks associated with their low drug loading capacity and toxicity. For this reason, a modified polymeric vehicle with fatty acids is proposed in this research.

To obtain this polymer, firstly, the synthesis of polyethylene glycol (PEG) copolymers with  $\epsilon$ -caprolactone ( $\epsilon$ -CL), and 5-methyl-5-propargyloxycarbonyl-1,3-dioxan-2-one (MCP) was conducted by ring-opening polymerization (ROP). Then, different click chemistry reaction methodologies were tested including an acyl-azide or a 3-azidopropylamide based on linoleic acid as substrates, DMF or anisole as solvents, and various temperatures. General tendency of these reactions was evaluated using proton nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H-NMR}$ ), where conditions that increase solubility of the polymer were correlated with an increment in the conversion of the functional groups. Obtained polymers were characterized by gel permeation chromatography (GPC),  $^1\text{H-NMR}$  and infrared spectroscopy (FT-IR).

Drug encapsulation was conducted by nanoprecipitation. Effect of modified polymers, solvents, speed of stirring and rotaevaporation were evaluated on curcumin encapsulation, which was quantified by high performance liquid chromatography (HPLC). These experiments allowed to conclude that there is a possible kinetic effect associated to the speed at which the nuclei of the micelles and the drug are formed, where the highest drug loading capacity was obtained with rotaevaporation (approximately 40 % weight curcumin/ weight of charged micelle).

On the other hand, encapsulation values of CBD were higher than those of curcumin (approximately 60 % weight CBD/ weight of charged micelle), which was associated

with partition of the compound from the continuous phase into the micellar nucleus, even when colloids were already formed. Considering their high drug loading capacity, colloidal stability of micelles loaded with CBD and degradation of the encapsulated drug were studied. It was observed that polymers with 5 fatty acids in their structure were more stable micelles than those with 2 acids, although stable systems with PEG-PCL were obtained. Degradation of CBD was significant after several months of storing for micelles with highest drug loading capacity.

Finally, the encapsulation and release profiles of extracts CBD and THC rich were conducted. Encapsulation of the extracts was lower than those found with pure CBD, which was associated with antagonistic effects of the components of the extract. Release's profiles adjusted mainly to the Higuchi model, which suggests a release mediated by diffusion. Also, *In-vivo* essays were done with extracts encapsulated using modified polymers that presented an analgesic sustained effect during days.

Key words: click chemistry, curcumin, cannabidiol, micelles, fatty acids

## Contenido

Lista de abreviaturas .....	16
INTRODUCCIÓN.....	19
1. OBJETIVOS .....	20
1.1 Objetivo General.....	20
1.2 Objetivos específicos.....	20
2. MARCO TEÓRICO.....	21
2.1 Síntesis de copolímeros anfífilicos por polimerización por apertura de anillo .....	21
2.2 Química clic.....	22
2.3 Autoensamblaje de copolímeros anfífilicos y algunas propiedades de estos sistemas.....	24
2.4 Métodos para encapsular fármacos .....	25
2.5 Modelos de liberación de fármacos .....	26
2.6. Teoría de Flory-Huggings.....	26
2.7. Propiedades medicinales de la curcumina y los cannabinoides.....	27
2.8 Estado del arte .....	29
2.8.1 Sistemas basados en lípidos.....	29
2.8.2 Sistemas basados en bio MOF .....	31
2.8.3 Sistemas de nanomateriales basados en carbono .....	31
2.8.4 Polímeros para encapsulación de fármacos.....	32
2.9 Propiedades del polímero de PEG-PCL .....	32
3. METODOLOGÍA Y MATERIALES.....	34
3.1 Materiales.....	34
3.2 Síntesis de los polímeros .....	34
3.2.1 Síntesis de polímeros PEG-PCL de varios pesos moleculares .....	34
3.2.2. Síntesis de PEG-P(CL-MCP) .....	35
3.2.3 Síntesis de 3-azidopropilamina .....	35
3.2.4 Reacción de Steglich de los ácidos grasos con 3-azidopropilamina .....	36
3.2.5 Síntesis de azida de acilo basado en ácido linoleico .....	36
3.2.6 Reacción clic CuAAC .....	37
3.3. Evaluación de las características coloidales de los polímeros funcionalizados con ácidos grasos	38
3.3.1 Determinación de CMC para los polímeros con ácidos grasos en su estructura.....	38

3.3.2 Preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	38
3.3.3 Pruebas de comportamiento micelar usando RMN-1H .....	39
3.4 Encapsulación de fármacos apolares .....	39
3.4.1 Procedimiento general para encapsulación de fármacos .....	39
3.4.2 Evaluación del efecto de los solventes usados en la encapsulación de CUR.....	40
3.4.3 Estudio de la partición de CBD al interior del núcleo micelar. ....	40
3.4.4 Estudio de la estructura de las micelas poliméricas .....	40
3.4.5 Efecto de la evaporación por vacío en la encapsulación de CUR. ....	40
3.5 Cinéticas de liberación de fármacos apolares .....	41
3.6 Técnicas de caracterización.....	41
3.6.1 Caracterización estructural.....	41
3.6.2 Caracterización de sistemas micelares.....	42
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS. ....	43
4.1 Síntesis de los polímeros .....	43
4.1.1 Síntesis de polímeros de PEG-PCL.....	43
4.1.2 Síntesis de polímeros modificados por química clic .....	46
4.3 Comportamiento micelar de los polímeros con ácidos grasos .....	56
4.3.1 Evaluación de la CMC de las micelas poliméricas .....	56
4.4 Encapsulación de CBD y CUR.....	58
4.4.1 Encapsulación de CBD y CUR con copolímeros de PEG-PCL .....	59
4.4.2 Estudio de la capacidad de los polímeros modificados en la encapsulación CUR .....	62
4.4.3 Efecto de la velocidad de agitación en la encapsulación de CUR.....	64
4.4.4 Estudio de la influencia de los solventes en la encapsulación de CUR .....	65
4.4.5 Estudio por difracción de rayos X (DRX) sobre las micelas cargadas con CUR.....	67
4.4.6 Método de evaporación por vacío para encapsulación de CUR.....	68
4.4.7 Encapsulación de CBD con los copolímeros modificados con ácidos grasos.....	69
4.4.8 Estudio de la partición del CBD al interior del núcleo micelar .....	71
4.4.9 Estudio de DRX de las micelas de PEG-PCL cargadas con CBD.....	72
4.4.10 Estudio de la estabilidad coloidal y degradación de CBD.....	73
4.4.11 Estudio morfológico por Microscopía de transmisión de electrones.....	75
4.5 Diseño de una formulación analgésica empleando los polímeros desarrollados .....	76
4.5.1 Evaluación de los perfiles de liberación .....	78

4.5.2 Resultados para medidas de analgesia in-vivo.....	79
5. Conclusiones.....	81
Bibliografía.....	82
Anexos.....	89

## Lista de tablas

Tabla 1. Características de los modelos para la liberación del fármaco[15]. .....	26
Tabla 2. Muestra los valores de encapsulación de vehículos previamente estudiados. ....	30
Tabla 3. Caracterización de las distintas condiciones para la reacción ROP cuantificados por GPC y RMN- <sup>1</sup> H. ....	45
Tabla 4. Caracterización de los polímeros precursores con grupos alquino por RMN- <sup>1</sup> H y GPC....	49
Tabla 5 . Caracterización de RMN- <sup>1</sup> H y GPC sobre los polímeros modificados con ácidos grasos	55
Tabla 6. Lista de los polímeros usados en la presente investigación. ....	59
Tabla 7. Muestra los valores de % de encapsulación y <i>D<sub>h</sub></i> para la curcumina y el CBD usando los polímeros de PEG-PCL. ....	61
Tabla 8. Influencia de la cantidad de polímero P2-P4 en el % de encapsulación de CUR y CBD...	62
Tabla 9. Compara los diferentes porcentajes de encapsulación de CUR usando diferentes proporciones de mezclas de solventes para P2-P4 y OLE-2 . ....	66
Tabla 10. Valores de porcentaje de encapsulación de CUR usando LAU 5 por 4 metodologías distintas .....	69
Tabla 11. Tamaños de nanopartículas y valores de % de encapsulación recién preparadas y varios meses después. ....	75
Tabla 12. Muestra la influencia de las proporciones agua:acetona (A:A) en el tamaño de las micelas dejando las proporción 5:2 en peso de polímero y extracto de CBD constantes. S.F: separación de fases. ....	77
Tabla 13. Valores de % de encapsulación de los extractos de CBD y THC. ....	78
Tabla 14. Ajuste matemático de las cinéticas de liberación de los extractos de CBD y THC. ....	79
Tabla 15. Resultados para ensayos de analgesia <i>in-vivo</i> .....	80

## Lista de figuras.

Figura 1. Espectros RMN- <sup>1</sup> H y ATR-IR y la distribución de pesos moleculares de los polímeros de PEG-PCL.....	44
Figura 2. Reacciones para llevar a cabo la inclusión de los ácidos grasos a la cadena del polímero PEG-PCL.....	47
Figura 3. Espectros de RMN- <sup>1</sup> H, FT-IR y cromatogramas de GPC de los polímeros con grupos alquino en su estructura. ....	48
Figura 4. Reacciones usadas para la obtención de los ácidos grasos modificados con grupos azida. ....	50
Figura 5. Espectros FT-IR de los polímeros modificados con ácido linoleico y sus precursores .....	51
Figura 6. Espectro RMN- <sup>1</sup> H del copolímero LIN 5. ....	52
Figura 7. Cromatogramas por GPC de los polímeros modificados con ácidos grasos y sus precursores.....	52
Figura 8. Rendimientos por química clic empleando diferentes condiciones de síntesis.....	54
Figura 9. Comportamiento de la sonda de pireno en las micelas de LIN 5 seguida por espectroscopia de fluorescencia. ....	57
Figura 10. Imagen TEM, distribución de tamaños micelares y espectros RMN- <sup>1</sup> H en agua y cloroformo deuterados para la muestra LIN 5.....	58
Figura 11. Muestra los cromatogramas para el extracto de curcumina inicial y un encapsulado con los polímeros de PEG-PCL. ....	60
Figura 12. Valores de % de encapsulación obtenidos para CUR con los copolímeros modificados con ácidos grasos y P2-P4 usando dos proporciones en peso distintas .....	63
Figura 13. Espectros FT-IR de las micelas de LIN 5 libres y cargadas con CUR, además de la CUR libre.....	63
Figura 14. Muestra los valores de % de encapsulación obtenidos para CUR obtenidos cuando se usó una velocidad de agitación de 300 y 1000 rpm.....	64
Figura 15. Efecto de diferentes mezclas de solventes sobre el porcentaje de encapsulación de CUR.....	66
Figura 16. Difractogramas de las micelas vacías y cargadas con CUR comparadas con el fármaco libre.....	68
Figura 17. Valores de porcentaje de encapsulación obtenidos para el CBD con los copolímeros con ácidos grasos y P2-P4 usando dos proporciones en peso distintas.....	70
Figura 18. Espectros FT-IR de las micelas de LIN 5 libres y cargadas con CBD, además del CBD libre.....	71
Figura 19. Valores de porcentaje de encapsulación de CBD mediante coprecipitación y partición y sus valores de diámetro hidrodinámico.....	72
Figura 20. Difractogramas de las micelas vacías y cargadas con CBD comparadas con el fármaco libre.....	72

Figura 21. Fotografías de las dispersiones coloidales varios meses después de su preparación. ..	74
Figura 22. Imágenes de TEM de las micelas con 58% de DLC aproximadamente de los polímeros P2-P4 y LIN 5. ....	76
Figura 23. imágenes TEM de las micelas de P2-P4 con los extractos de CBD y THC. ....	77
Figura 24. Perfiles de liberación de los extractos de CBD y THC. ....	79

## **Lista de esquemas**

Esquema 1. Muestra el mecanismo de reacción de la ROP[6]. .....	22
Esquema 2. Evidencia el mecanismo de reacción de la química clic[8]......	23
Esquema 3. Estructura de los principales fármacos que son evaluados en esta investigación. ....	29

## **Lista de abreviaturas**

### Lista de Símbolos y Abreviaturas

#### Símbolos

Símbolo Término Unidad SI Definición

$\bar{M}_w$ : Dispersión de peso molecular =  $M_w/M_n$

$M_n$ : Peso molecular promedio en número

$M_w$ : Peso molecular promedio en peso

## **Abreviaturas**

### **Abreviatura Término**

CBD: cannabidiol

CMC: Concentración micelar crítica

Cu: Cobre

CUR: curcumina

DCC: N,N'-diciclohexilcarbodiimida

DLC: Capacidad de carga de fármaco

DLS: Dispersión dinámica de luz

DMAP: 4-(Dimetilamino)-piridina

EE: Eficiencia de encapsulación

FT-IR: Espectroscopía infrarroja

GPC: Cromatografía de permeación en gel

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

MCP: 5-metil-5-propargiloxycarbonil-1,3-dioxan-2-ona

PEG: Polietilenglicol

PCL: Policaprolactona

PMDETA: N,N,N',N'',N''-pentametildietilentriamina

RMN: Resonancia magnética nuclear

TEM: Microscopia electrónica de transmisión

THC:  $\Delta$ -9-tetrahidrocannabinol



## INTRODUCCIÓN

Los fármacos apolares (llamados así por su alto carácter lipofílico) exhiben una serie de dificultades para ser aplicados con alta eficiencia, algunos de ellos son la curcumina con propiedades antioxidantes[1] o los cannabinoides que pueden interactuar con los receptores endocannabinoides[2]. La principal desventaja de estos fármacos se asocia a su baja biodisponibilidad, que ha procurado ser superada mediante el uso de diferentes tipos de vehículos que han conseguido mostrar una serie de ventajas muy prometedoras. Dentro de esta variedad de vehículos, el polietilenglicol-policaprolactona (PEG-PCL) destaca por tener una alta potencialidad de ser usado en formulaciones orales, debido a que están aprobados por la FDA y presentan baja toxicidad cuando son administrados por vía oral [3].

En este proyecto se propone la síntesis de un vehículo alternativo para la encapsulación de fármacos lipofílicos, cuya principal característica estructural se basa en la inclusión de ácidos grasos mediante el uso de química clic. Este tipo de materiales con biomoléculas incluidas en su estructura han sido estudiados previamente y se han visto interacciones entre los fragmentos introducidos al polímero y los fármacos [4], [5]. El producto final presenta varias potenciales ventajas, como mejor encapsulación, o un perfil de liberación controlado.

En este estudio se pretende establecer las condiciones de síntesis para estos nuevos materiales, y determinar la influencia del grado de modificación de los polímeros con ácidos grasos sobre la estabilidad de las micelas, la liberación de los fármacos, el tamaño de las partículas, capacidad de carga de fármaco, entre otros.

## **1. OBJETIVOS**

### ***1.1 Objetivo General***

Determinar las características del mejor sistema de encapsulación micelar basado en el uso de PEG-PCL modificado con ramificaciones de ácidos grasos insaturados.

### ***1.2 Objetivos específicos***

- Determinar las condiciones experimentales que permitan la modificación de la cadena de PCL con ácidos grasos.
- Establecer la relación entre el grado de modificación del polímero y la capacidad de encapsulación.
- Establecer relaciones entre la estructura de los copolímeros y la cinética de liberación de los fármacos apolares.

## **2. MARCO TEÓRICO**

Esta investigación se fundamenta principalmente en la obtención de un polímero que presenta ácidos grasos en su estructura. Esto puede proveer al material de una serie de mejoras asociadas a su interacción con los fármacos, que puede repercutir en la generación de coloides que presenten diferente encapsulación y/o perfil de liberación. Para la síntesis de este novedoso material, es necesario usar como base un polímero anfifílico.

Los polímeros anfifílicos son aquellos que contienen un segmento hidrófobo y otro hidrófilo. Las propiedades de estos materiales son muy importantes para la industria farmacéutica debido a que pueden formar micelas. Este proceso ocurre mediante la agregación de los segmentos hidrófobos que conduce a la formación del núcleo, mientras la cadena hidrófila se extiende en el agua. Uno de los polímeros más importantes que existen con esta característica es el PEG-PCL.

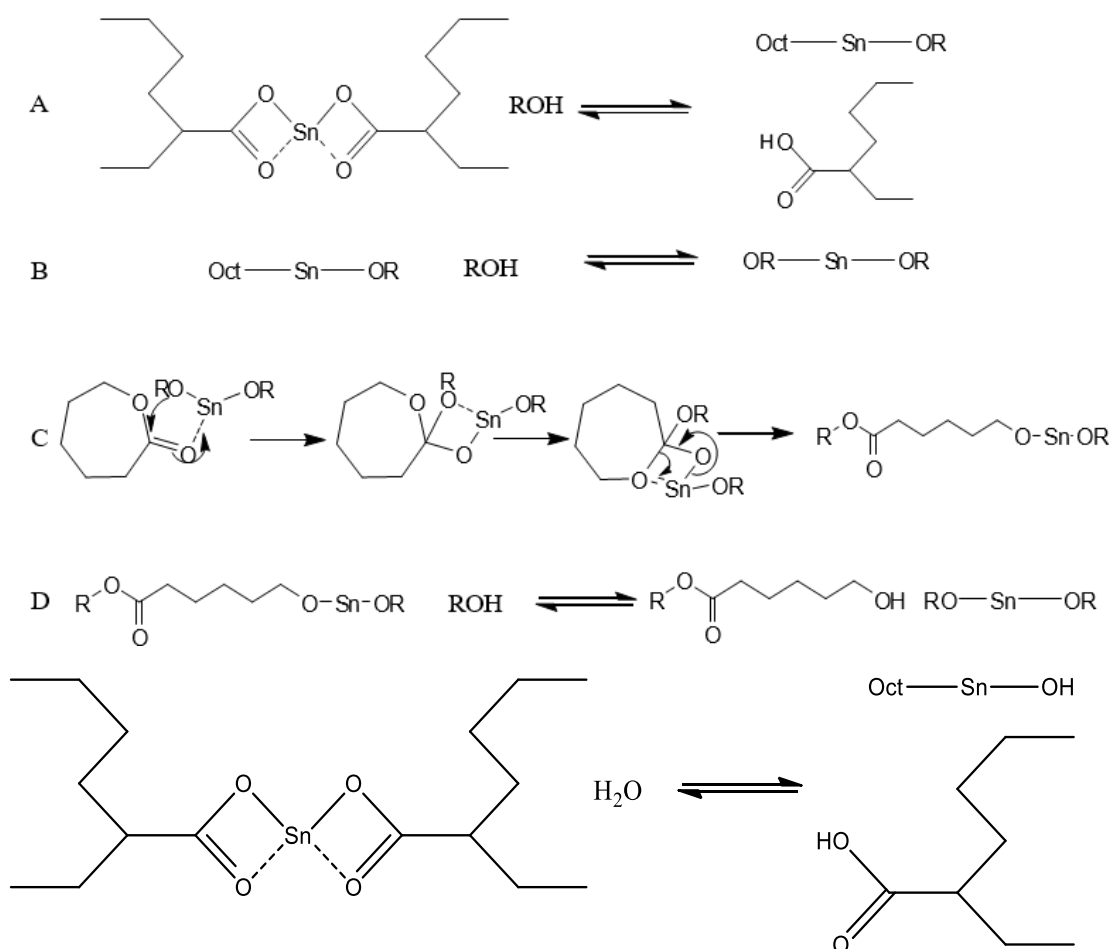
El PEG-PCL es un polímero aprobado por la FDA (administración de alimentos y drogas, por sus siglas en inglés) que presenta propiedades como biodegradabilidad, biocompatibilidad, entre otras. Este tipo de material puede ser obtenido mediante polimerización por apertura de anillo, metodología que ha sido utilizada por múltiples autores.

### **2.1 Síntesis de copolímeros anfifílicos por polimerización por apertura de anillo**

Para la síntesis de PCL usando PEG como iniciador, se ha reportado el uso de enzimas o de catalizador con centros metálicos como aluminio, o calcio, allí el más usado es el 2-etilhexanoato de estaño (II) ( $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ ), ya que ha mostrado altos rendimientos en bajos tiempos, usando condiciones simples [3].

Para llevar a cabo la síntesis de los polímeros modificados con PEG-PCL se hace uso de ROP, el esquema 1 presenta el mecanismo de la reacción [6]. En el esquema 1, el paso A muestra la iniciación de la polimerización, allí un alcohol puede interactuar con el catalizador; al mismo tiempo, en el paso B se muestra que el estaño puede coordinar dos grupos alcohol simultáneamente. En C, se muestra cómo se produce el ataque del alcohol a la  $\epsilon$ -caprolactona, seguido del paso D, que

evidencia como el catalizador puede acomplejarse con otro alcohol nuevo, lo que se podría considerar como reconstitución del sitio catalítico. Por último, se observa que el agua puede convertir al catalizador en óxido de estaño, convirtiéndose en un interferente de la reacción.



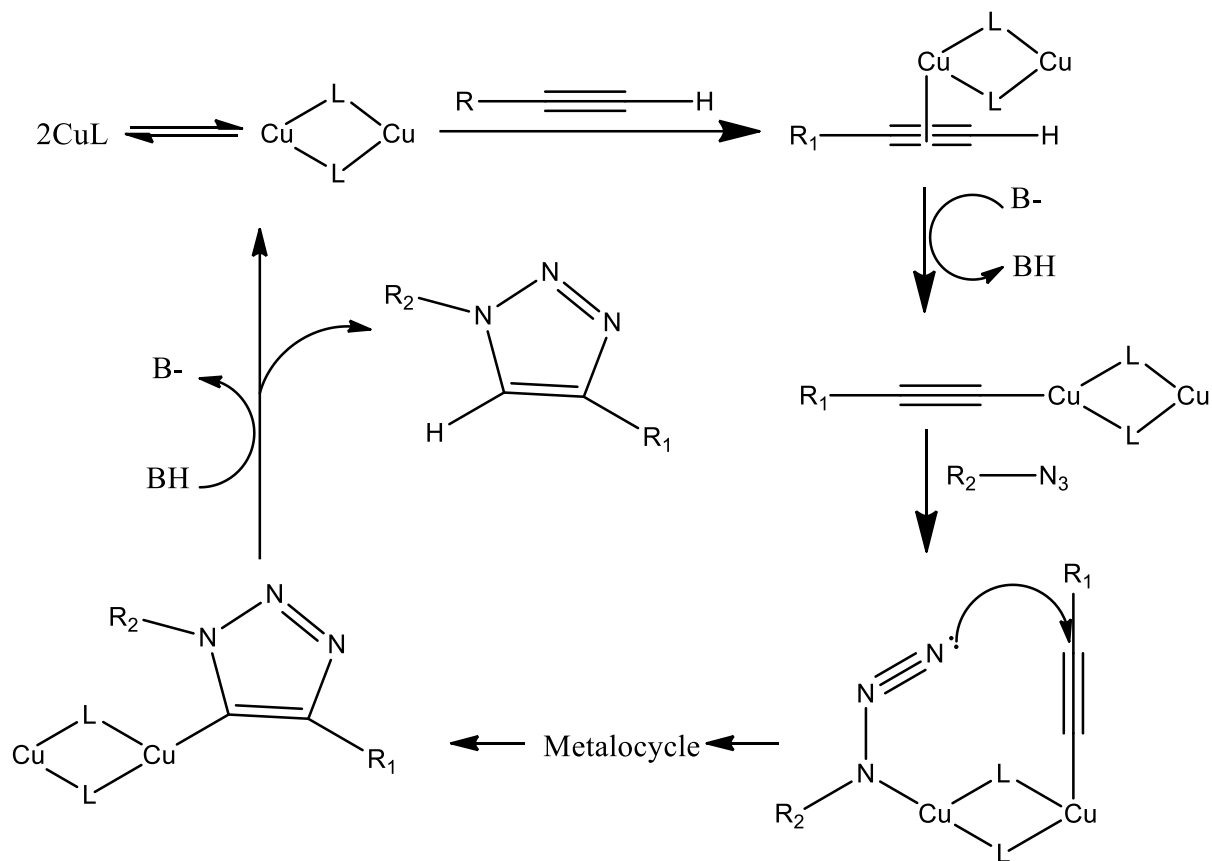
Esquema 1. Muestra el mecanismo de reacción de la ROP[6].

El uso de ROP es fundamental en esta investigación para la obtención de polímeros de PEG-PCL de diferentes pesos moleculares, además de ser necesaria para la polimerización de monómeros con grupos alquino laterales que permiten la inclusión en este material de ácidos grasos mediante química clic.

## 2.2 Química clic

Las reacciones de química clic se caracterizan por la formación de un enlace entre un átomo de carbono y un heteroátomo. Además de ello, este tipo de reacciones

presentan altos rendimientos, fácil purificación, subproductos de baja toxicidad y son estereoespecíficas [7]. Esta reacción suele ser rápida y selectiva. El ejemplo más claro de esta reacción es la formación de un anillo de triazol que se produce entre un alquino y un grupo azida, como se muestra en el esquema 2.



Esquema 2. Evidencia el mecanismo de reacción de la química clic [8].

El esquema 2 muestra el mecanismo de reacción para la formación de un anillo de triazol[8]. En primer lugar, el catalizador de cobre se acompleja con el grupo alquino, luego la formación del complejo de cobre con el alquino terminal disminuye el pKa del H de manera dramática, haciendo posible la extracción de este por una base (en medio acuoso la base es agua, mientras que, en un solvente orgánico, se debe usar una base). En el siguiente paso el N del grupo azida desplaza uno de los cobres del complejo acetiluro-Cu, en donde, debido a la proximidad se favorece el ataque del N al C del alquino para formar un metalociclo. Luego de esto el catalizador se desprende y se repite el ciclo con otra molécula.

La química clic constituye el paso final para la síntesis de los polímeros funcionalizados con ácidos grasos. Una vez se completa este paso se pueden usar estos polímeros para potenciales aplicaciones. Debido a que son polímeros anfílicos su aplicación más clara está relacionada con su uso en sistemas coloidales.

### **2.3 Autoensamblaje de copolímeros anfílicos y algunas propiedades de estos sistemas.**

Los polímeros anfílicos pueden autoensamblarse generando agregados coloidales con tamaños de 1 a 1000 nm cuando se dispersan en medios acuosos [9]. Los sistemas coloidales basados en polímeros pueden ser obtenidos mediante múltiples metodologías que pueden conducir a emulsiones, nanoesferas, nanocapsulas o micelas. Las micelas son un tipo de arreglo fácil de obtener, razón por la cual se escoge un procedimiento que permita la obtención de estos sistemas.

Cuando los polímeros superan la concentración micelar crítica (CMC), es cuando se pueden llegar a formar micelas. Debajo de esta concentración las moléculas anfílicas se distribuyen en el interfaz líquido/aire y el seno de la solución, disminuyendo la tensión superficial. A medida que se aumenta la concentración, se alcanza la CMC, punto en el cual las micelas empiezan a formarse y la tensión superficial se mantiene prácticamente estable[10]. Por otra parte, existen ecuaciones asociadas a la termodinámica, relacionando la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ), la temperatura (T), la constante de los gases (R) y la CMC, como muestra la ecuación 1[11]. Teniendo en cuenta que las CMC rondan alrededor de 10 ppm, cuando se está muy por encima de la CMC la formación de las micelas es espontánea ya que el  $\Delta G$  es mucho menor a cero.

$$\Delta G \approx RT \ln(CMC) \text{ Ecuación 1}$$

Con respecto a los sistemas micelares, es importante mencionar que hay dos tipos de parámetros que son considerados de alta importancia: la estabilidad termodinámica y cinética. La estabilidad termodinámica hace referencia a la estabilidad de las partículas una vez han llegado al equilibrio, mientras que la

estabilidad cinética se refiere al tiempo que tardan las partículas en disociarse, su estabilidad en el tiempo y el tiempo de intercambio de las cadenas[12].

Tras la formación de micelas, la encapsulación de fármacos lipofílicos se da en su núcleo, para lograrlo, la sustancia a encapsular, en la mayoría de los casos, debe entrar en contacto con los precursores poliméricos antes de su autoensamble, proceso que es determinante para poder obtener los tamaños y rendimientos altos en la encapsulación.

#### **2.4 Métodos para encapsular fármacos**

La encapsulación de los fármacos se lleva a cabo mediante la mezcla mecánica de los polímeros y los principios activos, en donde la metodología usada para llevar a cabo este proceso puede llevar a la formación de diferentes tipos de coloides. A continuación, se muestran los tipos de procedimientos y su producto final[13]:

- Método de diálisis: Consiste en la disolución del fármaco y el polímero en un solvente orgánico miscible con el agua como el acetonitrilo (ACN), tetrahidrofurano (THF), o N,N-dimetilformamida (DMF). Esta solución se dializa contra agua, lo que permite que se formen las micelas y que se elimine el solvente orgánico. Este método suele tomar varios días.
- Método de evaporación de cosolvente: Se prepara una disolución del polímero y el fármaco en un solvente miscible con el agua. A esta solución se adiciona agua y posterior a ello se evapora el solvente orgánico.
- Método de emulsión agua-aceite: Se prepara una disolución del fármaco y el polímero en un solvente inmiscible en agua. Se inyectan juntos y se evapora el solvente.
- Método de nanoprecipitación: Se gotea una solución del polímero y el fármaco en agua usando una fuerte agitación constante. Se permite que se evapore el solvente y se obtienen las micelas dispersas en agua.

Una vez se obtienen los sistemas micelares, estos liberan los principios activos que se almacenan en su interior. Una de las características más importantes de los sistemas micelares es su capacidad de liberar de manera controlada los fármacos,

lo que junto con su habilidad de protegerlos de la acción enzimática suponen la principal razón para su uso en aplicaciones farmacéuticas.

## 2.5 Modelos de liberación de fármacos

De forma general la liberación se puede dar debido a la erosión de los sistemas poliméricos, es decir la degradación de los polímeros, por difusión del fármaco al exterior de la micela, o por la respuesta ante algún estímulo externo como la luz, pH, temperatura, entre otros [14]. En esta investigación se usarán modelos para describir el comportamiento de la liberación *in vitro*, que son mostrados en la tabla 1.

Tabla 1. Características de los modelos para la liberación del fármaco[15].

Modelo	Ecuación	Características
Orden cero	$Q_t = Q_0 + k_0 t$	La liberación se da a velocidad constante en función del tiempo, independientemente de la concentración del fármaco.
Orden uno	$\ln(Q_t) = \ln(Q_0) + k_1 t$	La cantidad de fármaco que se libera es proporcional a la que aún hay en la matriz. Decrece en función del tiempo
Higuchi	$Q_t = K_H + t^{1/2}$	La liberación es proporcional a la raíz cuadrada del tiempo.
Korsmeyer-Peppas	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_{kp} + t^n$	Dependiendo de n se puede establecer el mecanismo de liberación (para una esfera). n= 0,43 difusión de Fick 0,43<n<0,85: transporte anómalo n=1: orden cero n>0,85: transporte tipo II

Como se ha comentado, los polímeros con ácidos grasos podrían cambiar la encapsulación y liberación de los fármacos. Este principio se puede explicar fundamentalmente con la teoría de Flory-Huggings y los parámetros de solubilidad.

## 2.6. Teoría de Flory-Huggings

La teoría de Flory-Huggins se relaciona con termodinámica de soluciones, en ella se relacionan diferentes interacciones inter-moleculares matemáticamente [16]. En la ecuación 2 se muestra como calcular los parámetros de interacción ( $\delta$ ), allí  $v$  es el volumen libre de la unidad repetitiva,  $\delta_{farmaco}$  y  $\delta_{polimero}$  son los parámetros de

solubilidad del fármaco y el polímero respectivamente, R es la constante de los gases y T es la temperatura. En la ecuación 3,  $\delta_H$ ,  $\delta_d$ ,  $\delta_p$  son los parámetros de solubilidad relacionados con los enlaces de hidrogeno, fuerzas de dispersión de London e interacciones dipolo-dipolo, respectivamente. Por último, en la ecuación 4 se muestra el cálculo de los 3 parámetros de solubilidad, en donde,  $F_{di}$ ,  $F_{pi}$ , se refieren a las constantes de atracción molar debido a fuerzas de dispersión y dipolo-dipolo, mientras que  $E_{hi}$  es la energía de enlace de hidrogeno.

$$\chi = \frac{v(\delta_{fármaco} - \delta_{polímero})^2}{RT} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$\delta = \sqrt{\delta_H^2 + \delta_d^2 + \delta_p^2} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$\delta_d = \frac{\sum F_{di}}{v_i}, \delta_p = \frac{\sqrt{\sum F_{pi}}}{v_i}, \delta_H = \frac{\sqrt{\sum E_{hi}}}{v_i} \quad \text{Ecuación 4}$$

La teoría de Flory-Huggings ha sido usada para describir la interacción de fármacos y polímeros. Estos conceptos se relacionan con el grado de solubilidad del principio activo en el polímero, lo cual puede repercutir en la encapsulación o liberación de los fármacos. Los fármacos escogidos para evaluar las interacciones fármaco-polímero se presentan en la siguiente sección.

## 2.7. Propiedades medicinales de la curcumina y los cannabinoides.

Existe una gran gama de fármacos que presentan actividades para el tratamiento de enfermedades como el cáncer, la artritis, Alzheimer, entre otras, en este trabajo se ha escogido trabajar con algunos de ellos: cannabidiol (CBD),  $\Delta$ -9-tetrahidrocannabinol (THC), y curcumina (CUR) ilustrados en el esquema 3.

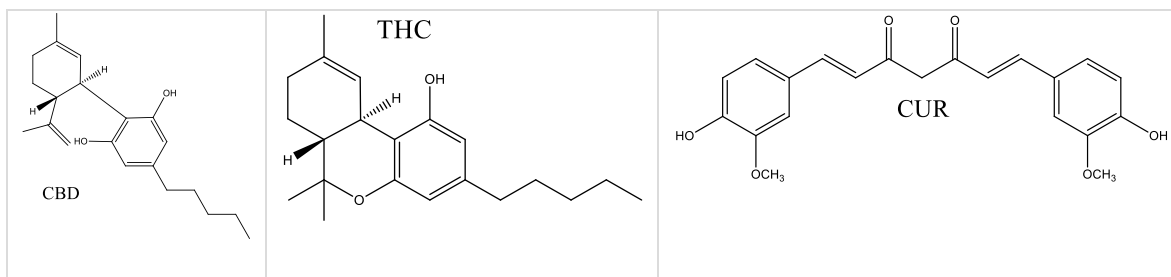
Se seleccionaron estos principios activos debido a que presentan diferencias en su estructura y permiten estudiar la posibilidad de interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre las insaturaciones de los ácidos grasos y la curcumina, mientras que en el CBD priman las interacciones van der Waals y dipolo-dipolo.

Para entender la importancia de los fármacos seleccionados y el porqué de su selección, se realiza una breve descripción de los fármacos a estudiar a continuación:

- CUR [1]: sus propiedades antioxidantes se han asociado fundamentalmente a la donación del H del grupo fenólico, sobre todo para procesos de peroxidación asociados a daños en la membrana celular. También, en otros contextos como en el estrés crónico, puede llegar a mantener el efecto de las enzimas con actividad antiradicalaria como la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y revertir la inhibición de la actividad de la catalasa. Sumado a lo anterior también se ha estudiado el efecto que puede tener en otros procesos oxidativos, en donde la curcumina permite una protección sobre los astrocitos e incluso la recuperación de la mitocondria en células con daños por procesos oxidativos.

Las propiedades medicinales de la curcumina han sido estudiadas para el tratamiento de múltiples enfermedades como artritis, ansiedad, problemas inflamatorios, entre otros[17]. Lo anterior, sumado a su bajo costo, y facilidad de ser observado mediante espectroscopia ultravioleta-visible, o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector en el visible son algunas de las razones principales por la que se escoge a la curcumina como uno de los fármacos a estudiar en esta investigación.

- Cannabinoides[2]: Los cannabinoides tienen la posibilidad de interactuar con los receptores del sistema endocannabinoide, que ha sido estudiado desde 1988, del cual se conocen dos tipos principales de receptores el CB1 (presente principalmente en el cerebro) y el CB2 (mayoritariamente en las células del sistema inmune). Las interacciones de los cannabinoides son distintas: el THC actúa como agonista de ambos receptores, mientras que el CBD interactúa de manera más débil con ellos y presenta una interacción como parcial antagonista con el receptor CB1 y como un débil agonista inverso del receptor CB2.



**Esquema 3. Estructura de los principales fármacos que son evaluados en esta investigación.**

Es importante resaltar que los cannabinoides se han estudiado para el tratamiento de diferentes patologías como depresión, náusea, evitar vómitos en quimioterapia, trastornos del sueño, ansiedad, pero sobre todo dolor crónico y espasticidad[18]. La potencial aplicación de estos fármacos en tratamientos futuros es la principal razón para centrarse en ellos, sumado a los pocos reportes previos sobre su encapsulación.

A pesar de las propiedades medicinales que presentan los fármacos expuestos anteriormente, sus aplicaciones en la industria farmacéutica se ven limitadas por su baja biodisponibilidad, por ejemplo el THC y el CBD poseen una biodisponibilidad entre el 6 y 20% cuando se administran por vía oral [19], al mismo tiempo que la curcumina presenta solo 1% [20]. Esto supone que los efectos medicinales anteriormente mencionados se ven muy disminuidos, razón por la cual se ha buscado diseñar vehículos que aumenten su biodisponibilidad.

## 2.8 Estado del arte

Se han reportado muchos tipos de vehículos para la encapsulación de fármacos, basados principalmente en lípidos, estructuras metal orgánicas (MOF, por sus siglas en inglés), polímeros y nanomateriales basados en carbono. Debido a que en este estudio se busca hacer énfasis especialmente en la encapsulación de curcumina, CBD y THC, solo se comentarán los vehículos con las propiedades más interesantes encontrados en la literatura usados para la encapsulación de los fármacos estudiados en esta investigación.

### 2.8.1 Sistemas basados en lípidos

Los sistemas basados en lípidos presentan diferentes formas como vesículas, liposomas o partículas tipo núcleo-corona, que presentan como principal ventaja estar conformados por moléculas que presentan alta biocompatibilidad. En la tabla 2 se exponen algunos de los sistemas para encapsulación de CBD y CUR reportados previamente en la literatura.

Una desventaja que se puede ver en los avances expuestos en la encapsulación de fármacos con sistemas lipídicos se asocia a su baja capacidad de carga de fármaco, que se traduce en una dosis más alta para alcanzar un efecto terapéutico, que conlleva a efectos secundarios. Otra de las desventajas de estos vehículos se asocia a que una formulación oral de nanopartículas lipídicas pasa por un proceso de digestión en el cual las lipasas actúan sobre ellos, luego estos productos forman micelas con los ácidos biliares, fosfolípidos y productos de digestión, que generan que los bioactivos protegidos por los sistemas sean absorbidos por la linfa a través de enterocitos [21]. En resumen, los sistemas basados en lípidos presentan propiedades interesantes, pero aún tienen bastantes limitaciones.

**Tabla 2. Muestra los valores de encapsulación de vehículos previamente estudiados.**

<b><i>Vehículo</i></b>	<b><i>% DL</i></b>	<b><i>Fármaco</i></b>	<b><i>Tamaño (nm)</i></b>	<b><i>Ref</i></b>
Nanocapsulas decoradas con CBD	Menor a 10	CBD	20-50	[22]
Cargador lipídico nanoestructurado	18,87	CBD	200	[23]
Liposomas	0,074	CUR	36	[24]
M-MOF-74	50 o 30	CUR	3 a 5 $\mu\text{m}$	[25]
MIL-101-Fe	56,3	CUR	-----	[26]
Oxido de grafeno con PEG	4,5	CUR	11	[27]
Oxido de grafeno reducido en heparina	40-50	CUR	85	[28]
Nanoesponjas con ciclodextrina	48	CUR	450	[29]
Polioxazina-polioaxalizina	54	CUR	50	[30]
PEG-PLGA, PEG-PLA, Shellac	40 a 58	CUR*	70 a 160	[31]
PEG-PCL	25-50	CBD	185 a 210	[32]

\* En esta investigación se encapsula CUR, además de otros fármacos, en donde se obtienen distintas encapsulaciones para otros fármacos y diferentes tamaños. % DL es una proporción en peso del contenido de fármaco con respecto del peso de la nanocápsula.

### **2.8.2 Sistemas basados en bio MOF**

Los MOF están conformados por ligandos orgánicos y centros metálicos, que se combinan mediante enlaces de coordinación covalentes que pueden presentar redes bi o tridimensionales altamente porosas y cristalinas, estas características pueden ser aprovechadas para la liberación controlada de fármacos en el cuerpo humano si se usan metales y ligandos biocompatibles, quienes facilitan la degradación del MOF, y que en ocasiones pueden proveer al material de propiedades intrínsecas como capacidad antibacterial [33]. En la tabla 2, se listan algunos MOF usados para encapsular CUR.

Estos sistemas exhiben mayor capacidad de carga de fármaco que los sistemas lipídicos, lo que constituye su principal ventaja. Por otra parte, una de las desventajas de estos sistemas es su dosis letal media ( $LD_{50}$ ) vía oral, por ejemplo, en el caso de los MOF con potasio, zinc, circonio y hierro los valores de  $LD_{50}$  son: 0,215; 0,35; 4,1; 0,45 g/kg respectivamente[34], la cual es una toxicidad muy alta, ya que estos valores son comparables a ingerir bromato de potasio (0,464 g/kg en ratas ICR) [35]. A pesar de que la dosis usando estos sistemas disminuye por su alta capacidad de carga de fármaco, su toxicidad persiste, sumado a que se obtienen con tamaño micrométrico (frente a partículas de tamaño menor a 200 nm deseables en estas aplicaciones) [36] siguen siendo factores críticos que reducen las expectativas de su uso clínico. En conclusión, al igual que sucede con los sistemas lipídicos, los bioMOF son muy interesantes, pero no proveen una solución integral al problema de la biodisponibilidad de los fármacos lipofílicos.

### **2.8.3 Sistemas de nanomateriales basados en carbono**

Los nanomateriales basados en carbono presentan grandes áreas superficiales que facilitan la adsorción de los fármacos, razón por la cual presentan altas capacidad de carga que llegan a alcanzar valores del 50% en peso[37]. En la tabla 2 se

muestran algunas características de los más interesantes vehículos de óxido de grafeno para encapsular CUR.

Por otro lado, para algunos óxidos de grafeno se ha encontrado que con dosis de 10mg/kg se pueden generar edemas pulmonares[38]. Esto último indica que la toxicidad asociada a estos materiales es muy alta, por lo que deben plantearse otras alternativas.

#### **2.8.4 Polímeros para encapsulación de fármacos.**

Los polímeros poseen propiedades muy interesantes basadas en la multiplicidad de monómeros que pueden ser usados para diseñar un vehículo, los cuales permiten generar una base muy amplia de posibilidades de funcionalización de los materiales que pueden mejorar sus propiedades, como por ejemplo ser sensibles a un estímulo externo como la temperatura, pH, o luz [39]. Algunos de los sistemas poliméricos más interesantes encontrados en la literatura se muestran en la tabla 2.

Previamente se han reportado sistemas polímeros con ultra alta capacidad de carga de fármaco (con valores superiores al 50 %), pero en ocasiones no son estables[32], requieren de purificaciones extensivas debido al uso de solventes no volátiles[31], tienen tamaños mayores a 200 nm, o como el caso de las polioxazinas, hasta donde se puede conocer en esta revisión bibliográfica, no se ha reportado que puedan ser degradadas por acción enzimática, aunque sí por estrés oxidativo[40].

En resumen, se han reportado múltiples vehículos con excelentes propiedades y ventajas, a pesar de ello, sus desventajas representan una gran dificultad a la hora de ser aplicadas en la liberación controlada de fármacos mediante administración por vía oral. Es por esta razón, que la creación de alternativas a estos sistemas se hace necesaria y es el objetivo principal de este proyecto.

#### **2.9 Propiedades del polímero de PEG-PCL**

Para conseguir un sistema alternativo con respecto de los sistemas previamente reportados en la literatura se escoge hacer uso de los polímeros debido a que son biodegradables [14] y como se ha mostrado pueden llegar a tener altas capacidades de carga de fármaco. Además, algunos de los polímeros más fáciles de sintetizar

son aquellos que pueden obtenerse mediante polimerización por apertura de anillo (ROP) como el PCL, o PLA (ácido poliláctico), en donde se puede usar PEG como iniciador de esta polimerización, lo que hace fácil su preparación. En contraste a los sistemas previamente descritos, el PEG-PCL ha mostrado que cuando se administra por vía intravenosa presentan LD<sub>50</sub> superiores a 10 g/kg [41] y toxicidad oral mayor a 5000 mg/kg [42]; al mismo tiempo se ha reportado que dosis de 100 mg/kg de PEG-PCL no induce daños en órganos vitales como el riñón, pulmón o cerebro [43].

Los datos anteriores permiten ver que el PEG-PCL tiene menor toxicidad que los vehículos de nanomateriales basados en carbono o los bioMOFs, además de ser susceptibles de ser usados en formulaciones orales con baja toxicidad asociada, lo que los hace una alternativa frente a los sistemas basados en lípidos. Estas fueron las razones fundamentales para la elección de PEG-PCL como materia prima para el desarrollo de un vehículo que permita la encapsulación y liberación de fármacos lipofílicos.

### 3. METODOLOGÍA Y MATERIALES.

#### 3.1 Materiales.

El cannabidiol (CBD,99%) fue suplementado por Cannal-Oil (Canadá). Metoxipolietilenglicol (PEG) (2kDa peso molecular),  $\epsilon$ -caprolactona ( $\epsilon$ -CL,98%) octoato de estaño ( $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ , 99%), 3-cloropropilamina (98%), ácido oleico ( $\geq 99\%$ ), nitrato de cobre trihidratado (99%), N,N,N',N'',N''-pentametildietilentriamina (PMDETA), hidróxido de sodio (99%), 5-metil-5-propargiloxycarbonil-1,3-dioxan-2-ona (MCP), y los demás reactivos y solventes son de la marca Sigma-Aldrich. Los solventes fueron secados haciendo uso de protocolos previamente establecidos. El tolueno es secado mediante una destilación con sodio usando benzofenona como indicador, el cual es almacenado posteriormente en un balón con tamices moleculares en atmosfera inerte de  $\text{N}_2$ . Por otra parte, la  $\epsilon$ -CL es secada haciendo uso de hidruro de calcio y el PEG es secado mediante destilación azeotrópica con tolueno por triplicado previo a llevar a cabo la reacción.

#### 3.2 Síntesis de los polímeros

##### 3.2.1 Síntesis de polímeros PEG-PCL de varios pesos moleculares

Para la síntesis de PEG-PCL de forma general se siguió el siguiente procedimiento: a PEG 2 kDa (1,5 g, 0,75 mmol) secado por destilación azeotrópica, se adicionan 20 mL de tolueno y 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$  (0,62 mmol), los cuales son agitados en atmosfera inerte de  $\text{N}_2$  por 15 minutos. Después de esto, se adicionan 3,5 mL de  $\epsilon$ -CL (32 mmol) y la reacción se deja por 24 horas a  $110^\circ\text{C}$  en atmosfera de nitrógeno. El producto final de la reacción se purifica mediante la precipitación del polímero haciendo uso de un exceso de éter etílico frío. Este sistema se deja en la nevera durante al menos 12 horas para garantizar la mayor precipitación posible del polímero. Una vez recuperado el polímero se filtra sobre un papel filtro y se seca en un horno de vacío. Las señales encontradas en el polímero por RMN- $^1\text{H}$  (413 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm) para cada uno de los segmentos se describen a continuación. PCL: 1,4 (q,  $\text{CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—O}$ ), 1,6 (m,  $\text{C}[\text{O}]\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—O}$ ), 2,3 (t,  $\text{C}[\text{O}]\text{—CH}_2$ ), 4,0 (t,  $\text{C}[\text{O}]\text{—O—CH}_2$ ) y PEG: 3,4 (s,  $\text{CH}_3\text{—O}$ ), 3,6 (s,  $\text{O—CH}_2\text{—CH}_2\text{—O}$ ), por FT-IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu = 2874$  (C-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1738 (C[O]), 1186 (C-O).

### 3.2.2. Síntesis de PEG-P(CL-MCP)

Para la síntesis de un polímero de PEG-PCL con 5 unidades de carbonato, a una muestra de PEG 2 kDa (1,8 g, 0,9 mmol) secado por destilación azeotrópica, se adicionan 24 mL de tolueno y 240  $\mu$ L de Sn(Oct)<sub>2</sub> (0,74 mmol) los cuales se agitan en atmosfera inerte de N<sub>2</sub> por 15 minutos, después de esto, se adicionan 3,3 mL de  $\epsilon$ -CL (29,9 mmol) y 900 mg de 5-metil-5-propargiloxicarbonil-1,3-dioxan-2-ona (MCP) (4,5 mmol), la reacción se dejó en atmosfera inerte por 24 horas a 110°C. El producto final de la reacción se purifica mediante la precipitación del polímero con un exceso de éter etílico frío que se deja en la nevera durante más de 12 horas para garantizar la mayor precipitación posible del polímero. Una vez recuperado el polímero se filtra sobre un papel filtro y se seca en un horno de vacío. Las distintas señales en RMN-<sup>1</sup>H (413 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ , ppm) para cada una de los segmentos en el copolímero se describen a continuación: PCL: 1,4 (q, **CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O**), 1,6 (m, C[O]-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O**), 2,3 (t, C[O]-**CH<sub>2</sub>**), 4,0 (t, C[O]-O-**CH<sub>2</sub>**), PEG: 3,4 (s, **CH<sub>3</sub>-O**), 3,6 (s, O-**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O**) y MCP: 1,3 (s, C[O]C[CH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>-**CH<sub>3</sub>**), 2,5 (t, **C $\equiv$ CH**), 4,7 (d, **CH<sub>2</sub>-C $\equiv$ CH**) y por FT-IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):  $\nu$  = 3256( $\equiv$ C-H), 1969 (C $\equiv$ C), 1738 (C[O]).

### 3.2.3 Síntesis de 3-azidopropilamina

Para la obtención de la 3-azidopropilamina se partió de un procedimiento previamente publicado [44]. 13,60 g de 3-cloropropilamina (0,10 mol) y 21 g de azida de sodio (0,32 mol) se disuelven en 120 mL de agua y se mantienen bajo agitación a 80°C durante 24 horas. Posteriormente, la reacción se detiene adicionando pellets de hidróxido de sodio, sobre la mezcla de reacción previamente enfriada. El producto se recupera mediante 4 extracciones sucesivas con 50 mL de éter etílico. Esta solución se concentra y se almacena con sulfato de magnesio. Las distintas señales encontradas en el compuesto fueron RMN-<sup>1</sup>H (413 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ , ppm): 1,5 (s, **NH<sub>2</sub>**), 1,8 (q, **CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>**), 2,8 (t, **N<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>**), 3,3 (t, **NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>**) y por FT-IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):  $\nu$  = 3367 (NH<sub>2</sub>), 2098 (N<sub>3</sub>).

### 3.2.4 Reacción de Steglich de los ácidos grasos con 3-azidopropilamina

Para la modificación de los ácidos grasos, se adaptó una metodología previamente reportada en literatura[45]. Como ejemplo: se pesan 0,9401 g de ácido linoleico (3,32 mmol) junto con 693 mg de DCC (3,32 mmol) y se disuelven en 10 mL de diclorometano (DMC) sobre un baño de hielo. Por separado se disuelven 118 mg de DMAP (1 mmol) y 332 mg de 3-azidopropilamina (3,32 mmol) en 5 mL de diclorometano. Luego a la solución en el baño de hielo, que contiene al ácido oleico, se añade la solución de la 3-azidopropilamina. Se deja reaccionar a temperatura ambiente por 24 horas. Seguido de ello, se elimina el sólido por filtración y se rotaevapora para eliminar el DMC. El producto es un líquido amarillo. Las señales encontradas para el compuesto fueron por RMN-<sup>1</sup>H (413 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm): 0,9 (t, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,3 (m, [CH<sub>2</sub>]<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>), 1,6 (m, [CH<sub>2</sub>]<sub>3</sub>-C(O)), 1,8 (q, N<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2,0 (dd, CH<sub>2</sub>-CH=CH) 2,3 (t, C[O]CH<sub>2</sub>), 2,7 (t, CH=CH-CH<sub>2</sub>CH=CH) 3,3 (q, NHCH<sub>2</sub>), 5,3 (m, CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>), 7,5 (t, C[O]-NH-CH<sub>2</sub>) y por FT-IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): ν = 3423 (N-H), 1668 (C[O]), 1537 (C-N).

### 3.2.5 Síntesis de azida de acilo basado en ácido linoleico

Se prepara el cloruro de linoleilo haciendo uso de una metodología reportada en la literatura[46]. Para su obtención, 2 g de ácido linoleico (7,18 mmol) se disuelven en 14 mL de cloroformo y se someten a reflujo mientras se adicionan lentamente 0,8 mL de cloruro de tionilo (17,23 mmol). El sistema se mantiene bajo estas condiciones durante 6 horas. El producto se recupera mediante evaporación por vacío.

En un segundo paso a 2 g de cloruro de linoleilo (6,7 mmol) se agregan 587 mg (9,03 mmol) de azida de sodio y 10 mL DMF. La reacción se deja durante toda la noche a temperatura ambiente. El producto se purifica adicionando agua hasta disolver toda la sal, luego de ello se decanta el sistema y se recupera la fase oleosa. El producto es un líquido amarillo. Las distintas señales encontradas en el compuesto fueron por RMN-<sup>1</sup>H (413 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm): 0,9 (t, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,3 (m, [CH<sub>2</sub>]<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>), 1,6 (m, [CH<sub>2</sub>]<sub>3</sub>-C(O)), 2,0 (dd, CH<sub>2</sub>-CH=CH), 2,3 (t, C[O]CH<sub>2</sub>), 2,7 (t,

CH=CH-CH<sub>2</sub>CH=CH), 3,7 (t, N<sub>3</sub>C[O]CH<sub>2</sub>), 5,3 (m, (CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>) y por FT-IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):  $\nu = 1668 \text{ cm}^{-1}$ (C[O]).

### 3.2.6 Reacción clic CuAAC

En primer lugar, se prepara una solución con 86 mg (0,36 mmol) de nitrato de cobre trihidratado, 638 mg (3,68 mmol) de PMDETA y se afora a 25 mL con (DMF).

Se mezclan 50 mg de PEG-P(CL-MCP) con 5 unidades de grupos alquino (0,05 mmol de grupos alquino), 160  $\mu\text{L}$  de la solución de catalizador de cobre (0,0023 mmol de cobre, 900  $\mu\text{L}$  de DMF o anisol, 36 mg de la amida del ácido graso (0,054 mmol) o 31 mg de la azida de acilo (0,06 mmol), a los cuales en último lugar se adicionan 37 mg de ácido ascórbico (0,23 mmol). Las reacciones se dejaron durante diferentes periodos de tiempo usando 3 diferentes temperaturas: temperatura ambiente, 60°C y 110°C. Para la obtención de los polímeros finales, se escaló el proceso usando 15 veces las cantidades aquí descritas.

Los copolímeros obtenidos en los ensayos previos se purifican mediante cromatografía, usando como fase estacionaria alúmina básica y como eluyente acetona. La solución resultante se concentra mediante evaporación por vacío y posteriormente el copolímero se recupera mediante precipitación con un exceso de éter etílico, igual a como se hizo en la polimerización ROP. Para el polímero final se escoge hacer la purificación con carbón activado, mezclando la solución con el adsorbente durante al menos 1 hora. Posteriormente se elimina el carbón activado por filtración, y se precipita el polímero usando éter etílico y dejando el sistema al menos 12 horas en la nevera. Allí se elimina el sobrenadante y se disuelve el sólido remanente en diclorometano. Posteriormente, se permite que el solvente se evapore hasta obtener un sólido amarillo oscuro. Las señales encontradas por RMN-<sup>1</sup>H (413 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ , ppm) para cada uno de los componentes presentes en el copolímero conjugado con ácido linoleico se describen a continuación. PCL: 1,4 (q, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 1,6 (m, C[O]-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 2,3 (t, C[O]-CH<sub>2</sub>), 4,0 (t, C[O]-O-CH<sub>2</sub>), PEG: 3,4 (s, CH<sub>3</sub>-O), 3,6 (s, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O) y MCP: 1,3 (s, C[O]C[CH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) y derivado del ácido linoleico: 0,9 (t, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,3

(m,  $[\text{CH}_2]_5\text{CH}_3$ ), 1,6 (m,  $[\text{CH}_2]_3\text{-C}[\text{O}]$ ), 2,0 (dd,  $\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH}$ ), 2,7 (t,  $\text{CH}=\text{CH-CH}_2\text{CH}=\text{CH}$ ) 3,3 (q,  $\text{NHCH}_2$ ), 5,2 (d,  $\text{CH}_2\text{-C-N}$ ) 5,3 (m,  $(\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH-CH}_2)$ , 7,5 (t,  $\text{C}[\text{O}]\text{-NH-CH}_2$ ), 7,8 (s,  $\text{N-CH}=\text{C}$ ) y por FT-IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu = 1732$  ( $\text{C}[\text{O}]$ ), 1652 ( $\text{NHC}[\text{O}]$ ), 1539 ( $\text{N-C}$ ).

### **3.3. Evaluación de las características coloidales de los polímeros funcionalizados con ácidos grasos**

#### **3.3.1 Determinación de CMC para los polímeros con ácidos grasos en su estructura.**

La CMC fue determinada haciendo uso de espectroscopia de fluorescencia empleando pireno como sonda hidrófoba. Para este experimento se disuelven de 1,5 a 1,2 mg de polímero en acetona, los cuales se adicionan posteriormente a una solución acuosa de 20 ppm de pireno, a la cual se le elimina la acetona por evaporación por vacío. Una vez eliminada la acetona del sistema, se procedió a llevar el producto a 10 mL con la misma disolución de pireno. El sistema final fue diluido de manera sucesiva en una proporción de 1:2 hasta alcanzar concentraciones de alrededor de 0,1 ppm, allí cada concentración fue medida. Se determinaron los espectros de emisión desde 300 hasta 360 nm con una longitud de onda de emisión de 390 nm.

#### **3.3.2 Preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

En primer lugar, se preparan micelas del polímero. Se pesan 6 mg del copolímero a analizar y se disuelven en 800 mg de acetona, esta solución se inyecta en 10 mL de agua destilada, se deja en agitación constante por 22 horas y se centrifuga. Una alícuota de 20  $\mu\text{L}$  de la solución micelar resultante se diluye hasta 10 mL con agua destilada. De esta dilución se toman 0,5  $\mu\text{L}$  que se depositan sobre una rejilla de cobre recubierta de Formvar. La rejilla se deja secar en un desecador por un día, para posterior a ello tomar las imágenes.

Este mismo proceso fue usado para la preparación de todas las demás muestras que fueron caracterizadas por TEM.

### **3.3.3 Pruebas de comportamiento micelar usando RMN-<sup>1</sup>H**

Se prepararon las micelas de estos polímeros usando 10 mg de LIN 5 que fueron disueltos en 40 a 60 mg de acetona y mezclados con 0,5 mL de agua deuterada, posterior a ello se rotaevapora el producto para eliminar la acetona y se toma un espectro RMN-<sup>1</sup>H.

## **3.4 Encapsulación de fármacos apolares**

### **3.4.1 Procedimiento general para encapsulación de fármacos**

De manera general, 8 mg de curcumina o CBD y 20 mg de cada uno de los materiales poliméricos se disuelven en 800 mg de acetona y se adicionan a 10 mL de agua destilada bajo agitación constante. La adición de la solución del polímero y el fármaco se lleva a cabo con el uso de una jeringa, en donde la aguja es sumergida en el agua y se inyecta presionando el embolo de forma que la adición se produce en menos de 2 segundos con una agitación de 300 rpm. Se deja agitando por 22 horas y se centrifuga el producto a 4000 rpm para eliminar cualquier presencia de sólido referente a fármaco no encapsulado y agregados del polímero. El proceso se realizó por triplicado y una de las muestras se almacenó para observar la estabilidad de las formulaciones en períodos prolongados de almacenamiento.

Las dos réplicas restantes se liofilizan y posteriormente una muestra de cada una de ellas con masa entre 1,5 y 3 mg se dispersa de en metanol con el fin de determinar el contenido de fármaco empleando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En el caso de las formulaciones obtenidas a partir de los extractos ricos en THC y CBD se empleó una metodología similar a la descrita, pero en este caso la determinación del contenido del fármaco se realizó en la Universidad de Antioquía por el grupo de Ofidismo.

Para la determinación de los valores de CBD y CUR encapsulados, se usan las ecuaciones 5 a 8. Aquí la ecuación 7 fue usada para CUR sumando el área de los picos asociados a los 3 curcuminoides observados, mientras que % DLC(CUR) se calcula teniendo en cuenta solo el área de la curcumina. Finalmente, el CBD se cuantificó con la ecuación 5.

$$\% DLC = \frac{\text{peso de fármaco en micela}}{\text{peso total del sistema}} * 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

$$\% DLC(CUR) = \frac{\text{peso de curcumina en micela}}{\text{peso total del sistema}} \quad \text{Ecuación 6}$$

$$\% DLC(Total) = \frac{\text{peso de los 3 curcuminoides en micela}}{\text{peso total del sistema}} * 100 \quad \text{Ecuación 7}$$

$$\% EE = \frac{\text{peso de fármaco en micela}}{\text{peso fármaco inicial}} * 100 \quad \text{Ecuación 8}$$

### **3.4.2 Evaluación del efecto de los solventes usados en la encapsulación de CUR**

Este procedimiento para encapsulación fue adaptado de la literatura [31]. En este caso se usaron mezclas de solventes en diferentes proporciones. A una disolución del polímero y CUR con una proporción 1:1 en peso, se adicionó diferentes volúmenes de agua en diferentes porciones.

### **3.4.3 Estudio de la partición de CBD al interior del núcleo micelar.**

Se preparó una disolución de 800 mg de acetona y 12 mg de polímero, posterior a ello se inyectó esta solución en 10 mL de agua destilada y se dejó en constante agitación durante 22 horas. Luego de esto, se adicionó una solución de 8 mg de CBD en 800 mg de acetona y se dejó evaporar el solvente por 22 horas en agitación constante. El sistema fue centrifugado para eliminar sólidos, el producto fue liofilizado y el contenido de CBD fue determinado usando HPLC.

### **3.4.4 Estudio de la estructura de las micelas poliméricas**

Los productos de las micelas poliméricas de PEG-PCL vacías, aquellas que contienen CBD encapsulado mediante el método de partición, el de coprecipitación, y los coloides cargados con CUR fueron liofilizados y caracterizados por DRX. Además, se tomó el difractograma de los fármacos.

### **3.4.5 Efecto de la evaporación por vacío en la encapsulación de CUR.**

Se siguió el mismo procedimiento de la sección 2.4.1 *Procedimiento general para encapsulación de fármacos apolares*, usando 12 mg del polímero. Se dejó en agitación por 20 segundos a 300 rpm y se evaporó por vacío a 60°C y 200 mm Hg

de presión durante 10 minutos, para eliminar la acetona. El producto final se pasó a través de filtros de 0,45  $\mu\text{m}$ , este proceso se llevó a cabo por duplicado.

### **3.5 Cinéticas de liberación de fármacos apolares**

Se toma una alícuota de 4 mL de extractos encapsulados de CBD o de THC se ponen en un cassette de diálisis Thermo-Fischer (Slyde-A-Lizer, membrana semipermeable con un valor de corte de proteínas de 7000 dalton). Las dispersiones se dializan contra 200 mL de una solución de PBS (pH=7,4) con 1 % de tween 80 a 37°C. Se recogen alícuotas de 50  $\mu\text{L}$  del interior del cassette a diferentes tiempos: 1, 3, 5, 8, 24, 48, 72, 96 y 120 h y se llevan a 1mL usando metanol. Estas muestras se inyectan en el HPLC y se usan para cuantificar la cantidad de cannabinoides que permanecen en el interior del cassette. La desviación estándar de las medidas usadas fue obtenida preparando 4 veces una misma muestra, es decir, que se asume que todas las medidas presentan un error asociado solo a la preparación de las muestras.

### **3.6 Técnicas de caracterización.**

#### **3.6.1 Caracterización estructural**

Los espectros de RMN-<sup>1</sup>H fueron tomados disolviendo las muestras en CDCl<sub>3</sub>, mientras que el equipo usado fue un 400 Ultrashield spectrometer de 413 MHz (Bruker, Mannheim, Germany). La determinación de los pesos moleculares de los polímeros fue llevada a cabo usando un HPLC, en este caso un ThermoScientific, Ultimate 3000 con un detector de índice de refracción. En los análisis llevados a cabo se usó un flujo de THF a 0,8 mL/min y la columna usada fue (LC) 300 x 7,8 mm Phenogel TM 5  $\mu\text{m}$  1x10<sup>3</sup> Å. La curva de calibración fue tomada un rango de 2,5–50 kDa, usando estándares de poliestireno. Para la toma de los espectros de FT-IR se empleó el modo de transmitancia y reflectancia total atenuada (ATR), en un equipo Nicolet Is10 de Thermo Scientific usando 32 ciclos. Para la obtención de los espectros por transmitancia, previo al análisis, la muestra disuelta en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se deposita en una ventana de NaCl y se permite la evaporación del solvente antes del análisis.

### **3.6.2 Caracterización de sistemas micelares.**

El diámetro hidrodinámico de los sistemas coloidales se determinó empleando un equipo de dispersión dinámica de luz (DLS) Nano ZS Zetasizer Marvel a una temperatura de 25 °C. Las características morfológicas de las partículas coloidales se estudió usando un microscopio electrónico de transmitancia Jeol 1400 plus. Los difractogramas de rayos X se tomaron usando un equipo X'pert Panalytical equipado con un tubo anódico de cobre de  $\lambda = 0,154$  nm con un tiempo de recolección de 1s por paso, usando un barrido desde 2° hasta 50° 2 $\theta$ , un incremento de 0,1° y una abertura del detector de 0,5°. Los espectros de fluorescencia fueron tomados usando un espectrofluorómetro Horiba-Duetta.

Para la cuantificación de fármacos se utilizó un equipo de HPLC Thermoscientific, Ultimate 3000, usando una columna analítica Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 de fase reversa de 4  $\mu\text{m}$  (4.6 x 150 mm). Las condiciones de corrida para la curcumina fueron adaptadas de reportes previos en la literatura[47], se usó como fase móvil A =60% de 0,1% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y una B=40 % de acetonitrilo con un flujo de 1,5 mL/min y una temperatura en la columna de 30°C, con un volumen de inyección de muestra de 10  $\mu\text{L}$ , mientras que la detección se hizo con detector visible a 420 nm. Para la determinación de CBD y THC se adaptaron las condiciones previamente reportadas en literatura[48], se usó un flujo de 1,0 mL/min de A=85% acetonitrilo y B=15 % de agua, a una temperatura de columna de 25°C, inyectando 10  $\mu\text{L}$  de muestra, usando un detector de ultravioleta a 205 nm.

#### **4. RESULTADOS Y ANÁLISIS.**

El análisis de resultados se divide en 3 partes. En primer lugar, se muestran los resultados de la polimerización por ROP para copolímeros de PEG-PCL y PEG-P(CL-MCP) y su correspondiente modificación pos-síntesis vía química clic. Posteriormente, la capacidad de los copolímeros sintetizados de encapsular CBD y CUR es determinada empleando diferentes condiciones experimentales, además, se estudió la estabilidad coloidal de los sistemas obtenidos. Finalmente, se llevó a cabo la encapsulación y liberación de extractos ricos en THC o CBD con los mejores polímeros determinados en caracterizaciones previas.

##### **4.1 Síntesis de los polímeros**

La síntesis de los polímeros se llevó a cabo en dos etapas en las cuales se buscó obtener los mayores rendimientos en los menores tiempos. La primera comprende la polimerización ROP, en la cual se estudió el efecto del tiempo y la cantidad de solvente usado en la reacción. La segunda abarca las reacciones por química clic, en donde se evaluaron dos sustratos de reacción, dos solventes, distintas temperaturas y diferentes tiempos.

##### **4.1.1 Síntesis de polímeros de PEG-PCL**

La síntesis de los copolímeros PEG-PCL se efectuó por ROP, empleando PEG de dos pesos moleculares diferentes como iniciador, mientras que el Sn(Oct)<sub>2</sub> y tolueno fueron usados como catalizador y solvente, respectivamente. Se estudió el efecto de la cantidad de solvente y el tiempo de reacción sobre el rendimiento, peso molecular e índice de dispersión de los materiales resultantes.

Se usaron diferentes técnicas de caracterización para garantizar la obtención de los polímeros. Para determinar el rendimiento de las reacciones se usó RMN-<sup>1</sup>H, la caracterización de los grupos funcionales presentes en la muestra se hizo con FT-IR, RMN-<sup>1</sup>H y GPC se empleó para corroborar la evolución del peso molecular tras la reacción. Los resultados de estas técnicas se muestran en la figura 1, en donde se nombran los polímeros de PEG-PCL como P2-P2 (PEG2kDa-PCL2kDa), P2-P4 (PEG2kDa-PCL4kDa) y P5-P4 (PEG5kDa-PCL4kDa).

De acuerdo con los espectros de absorción infrarroja dados en la figura 1 A, los copolímeros PEG-PCL muestran señales características de la PCL, tales como la extensión simétrica del enlace C=O a  $1738\text{ cm}^{-1}$  y las señales a  $1186\text{ cm}^{-1}$  y  $2874\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a vibraciones que involucran los grupos C-O y C-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, respectivamente. Por otro lado, las distribuciones de peso molecular obtenidas por GPC (figura 1 B), muestran que el copolímero presenta un mayor peso molecular que el correspondiente iniciador de PEG, lo cual corrobora la obtención de estructuras dibloque. En la figura 1 C, los espectros de resonancia RMN-<sup>1</sup>H muestran la presencia de señales debidas al PEG a 3,6 ppm de los grupos O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, además del PCL a 4,0 ppm, pertenecientes a CH<sub>2</sub>-OC[O] y 2,3 ppm del CH<sub>2</sub> C[O], lo que corrobora la presencia de los grupos funcionales en la estructura de los polímeros.

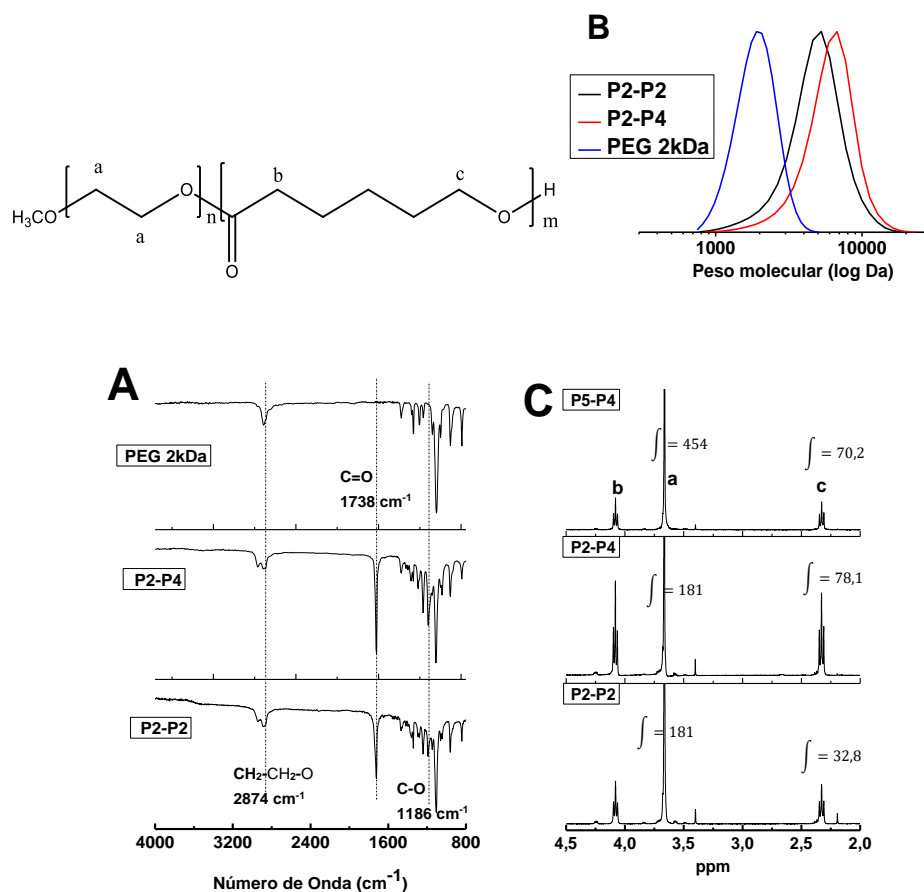


Figura 1. Espectros RMN-<sup>1</sup>H y ATR-IR y la distribución de pesos moleculares de los polímeros de PEG-PCL.

En la tabla 3 se resumen las condiciones de síntesis evaluadas, en donde se muestran los datos de  $M_n$  y  $\bar{D}$  calculados por GPC. Los valores de  $M_n$  medidos por GPC se obtuvieron empleando una curva de calibración construida a partir de estándares de poliestireno y por tanto son valores relativos, ellos indican que existe un aumento en el  $Dh$  de las cadenas del copolímero conforme se incrementa el tiempo de reacción. Los índices de dispersión ( $\bar{D}$ ) caracterizan la distribución de peso molecular del polímero, los cuales al presentar valores menores a 1,3 indican que las distribuciones obtenidas son estrechas y corroboran las características “vivientes” de la ROP empleada para la obtención de los copolímeros.

Tabla 3. Caracterización de las distintas condiciones para la reacción ROP cuantificados por GPC y RMN-<sup>1</sup>H.

Ensayo	$M_n$ PEG (kDa)	Proporción peso PEG (mg):mL tolueno	Tiempo (h)	$\epsilon$ -CL (RMN- <sup>1</sup> H) $\bar{X}_n$	$M_n$ (RMN- <sup>1</sup> H)	$M_n$ (GPC)	$\bar{D}$	% Rendimiento
	2				2000	1810	1,10	
1	2	15:1	2	1,40	2160	2733	1,09	3,43
2			8	2,55	2291	2933	1,11	6,24
3			24	9,25	3055	3086	1,17	22,6
4			48	17,3	3976	3592	1,21	42,3
5		75:1	2	7,82	2892	3602	1,15	19,1
6			8	26,4	5007	4344	1,27	64,4
7*			24	39,0	6451	6098	1,14	95,4
8**			24	16,4	3870	4398	1,20	93,5
9***	5		24	35,1	9000	11809	1,21	80,0

\*P2-P4, \*\*P2-P2, \*\*\*P5-P4.

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{M_n \text{ de PCL por RMN}^{-1} \text{ H}}{M_n \text{ esperado de PCL}} * 100 \quad \text{Ecuación 9}$$

$$M_n (\text{RMN}^{-1} \text{ H}) = M_n \text{ de PCL por RMN}^{-1} \text{ H} + M_n \text{ PEG} \quad \text{Ecuación 10}$$

La RMN-<sup>1</sup>H fue empleada para determinar  $\bar{X}_n$  y  $M_n$  mostrados en la tabla 3. El valor de  $\bar{X}_n$  de la PCL fue calculado a partir del área de la señal c de la PCL que aparece a 2,3 ppm (correspondiente a grupos metileno en este poliéster), donde la señal a 3,6 ppm debida a protones en el PEG es empleada como referencia. El  $M_n$  calculado por RMN-<sup>1</sup>H se obtiene con la ecuación 10, en donde el peso de PEG (2kDa dado por el proveedor) se suma al de la PCL, que se calcula usando el valor de  $\bar{X}_n$ . Los

rendimientos de la reacción se calculan con la ecuación 9 y se refieren al seguimiento del  $M_n$  de la PCL en el tiempo.

Las entradas 1 a la 4 de la tabla 3 muestran que cuando se usan las cantidades más altas de solvente, aún a tiempos de reacción prolongados, se obtienen bajos rendimientos en la polimerización, observándose valores inferiores al 50 % luego de 48 horas. Por su parte, las entradas de la 5 a la 9 evidencian que la conversión aumenta drásticamente con el uso de menor cantidad de solvente, requiriéndose un menor tiempo de polimerización. Estas condiciones se emplearon en la obtención de los materiales que se emplearán en etapas posteriores de la investigación.

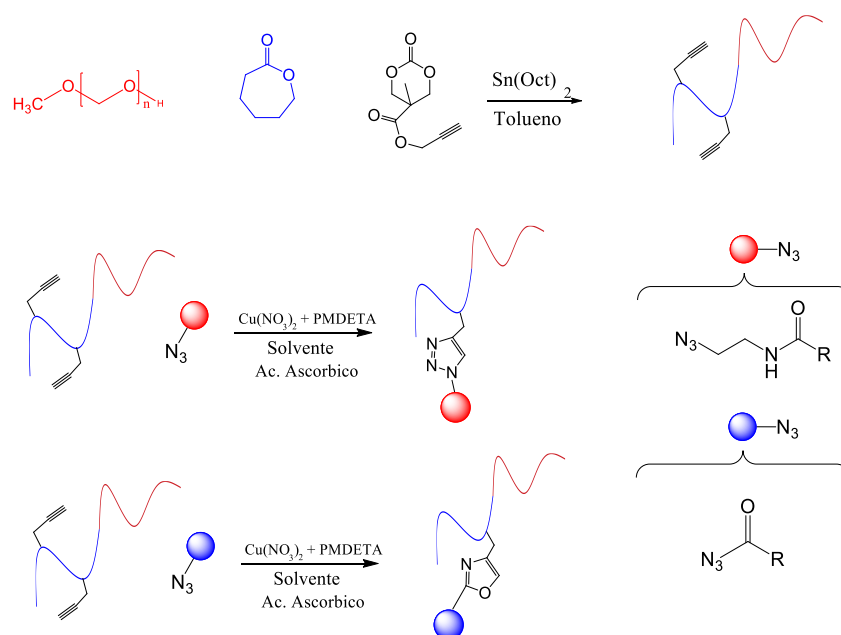
La razón por la cual los rendimientos de la reacción son mejores usando baja cantidad de solvente, se puede deber a un aumento en la concentración del monómero. Por otro lado, es importante mencionar que la presencia de agua puede afectar los rendimientos de la reacción[49], a pesar de ello se consiguieron altos rendimientos sin la necesidad de usar cabinas con guantes, lo que implica que los métodos de secado son lo suficientemente efectivos en las condiciones de síntesis evaluadas.

#### **4.1.2 Síntesis de polímeros modificados por química clic**

Teniendo en cuenta que el PEG-PCL es un copolímero que no presenta grupos funcionales que favorezcan la interacción con los fármacos, en la presente investigación se desarrollaron copolímeros compuestos por un segmento de PEG y un segmento hidrófobo que contiene unidades de  $\epsilon$ -CL copolimerizada con un carbonato y funcionalizados con ácidos grasos. Los materiales con este tipo de moléculas en su estructura se han reportado que se puede obtener vectorización activa al cerebro [50], mejor interacción con fármacos [5] y disrupción de la cristalización del PCL [51]. Por todas sus potencialidades, se decide hacer uso de esta estrategia de síntesis.

La síntesis se llevó a cabo en dos etapas que se describen en la figura 2. En la primera etapa se produce una polimerización ROP usando PEG como iniciador y  $\epsilon$ -CL y MCP como monómeros. En la segunda etapa los copolímeros se modifican mediante química clic, usando 2 tipos de compuestos: una azida de acilo, que

permite formar un anillo de oxazol y una 3-azidopropilamida del ácido graso, que es usada para obtener un anillo de triazol.



**Figura 2. Reacciones para llevar a cabo la inclusión de los ácidos grasos a la cadena del polímero PEG-PCL**

### Síntesis de PEG-P(CL-MCP)

Con el fin de obtener un copolímero que contenga grupos alquinos susceptibles de reaccionar por química clic en una etapa posterior, se optó por emplear el MCP ya que es un carbonato funcional empleado previamente en el grupo de investigación y que puede copolimerizarse aleatoriamente con  $\epsilon$ -CL vía ROP [52]. Para la síntesis se empleó PEG de 2kDa como iniciador y las demás condiciones empleadas para la obtención de PEG-PCL mostradas en la sección 4.1.1 en la tabla 3 entrada 7, es decir 75 mg PEG:mL tolueno y 24 h de reacción.

Los copolímeros fueron caracterizados haciendo uso de FT-IR para determinar la presencia de los grupos funcionales en su estructura, GPC para corroborar la formación de estructuras dibloque asociadas al incremento del peso molecular y RMN- $^1\text{H}$  que permite identificar los grupos funcionales y cuantificar los rendimientos de reacción. Se sintetizaron dos copolímeros con diferente cantidad de grupos alquino, el PEG-P(CL-MCP<sub>5</sub>) llamado PP5 y PEG-P(CL-MCP<sub>2</sub>) identificado como PP2.

La presencia de los grupos funcionales del copolímero se verificó en primera instancia empleando FT-IR, obteniéndose espectros como los mostrados en la figura 3 A, en donde se tiene la presencia de señales a  $3256\text{ cm}^{-1}$  y  $1969\text{ cm}^{-1}$  que se asocian a la extensión de los enlaces  $\equiv\text{C-H}$ , y  $\text{C}\equiv\text{C}$ , respectivamente y a  $1738\text{ cm}^{-1}$  de la vibración del  $\text{C=O}$ . En tanto el perfil de GPC en la figura 3 B, ratifica que la inclusión de los dos monómeros usados fue efectiva, ya que el tiempo de retención disminuyó luego de la polimerización. Con respecto a la figura 3 C, que muestra el espectro RMN- $^1\text{H}$  de la muestra PEG-P(CL-MCP<sub>5</sub>), se observan señales a 2,5 ppm y 4,7 ppm que corresponden a los protones  $\equiv\text{C-H}$  y  $\text{CH}_2\text{C}\equiv$  derivados del MCP, respectivamente. Estos resultados confirman que la reacción efectivamente se llevó a cabo y se logró obtener el polímero deseado.

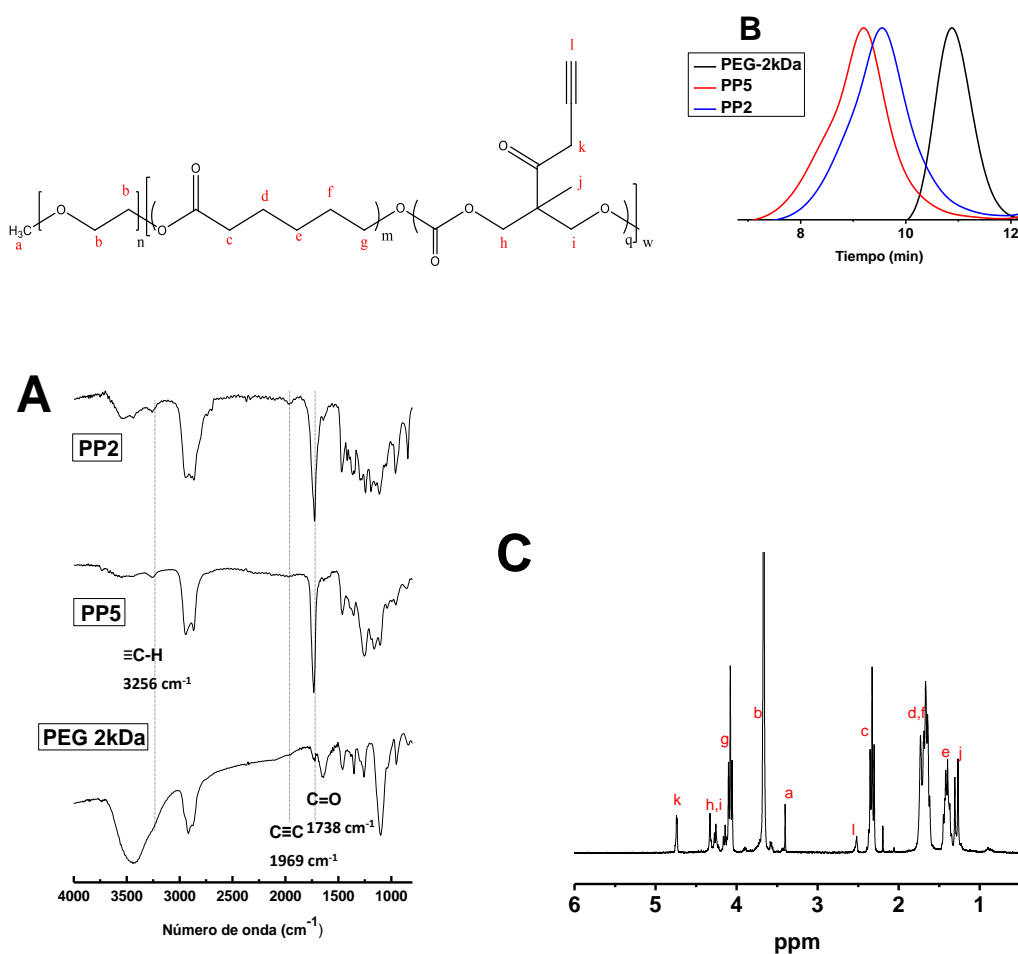


Figura 3. Espectros de RMN- $^1\text{H}$ , FT-IR y cromatogramas de GPC de los polímeros con grupos alquino en su estructura.

La tabla 4 muestra los rendimientos de reacción y las características de los polímeros PP2 y PP5. Los rendimientos fueron calculados de forma análoga a como se hizo en la sección 4.1.1, haciendo uso de RMN-<sup>1</sup>H, en donde la señal b del PEG se usó como referencia, la señal c permitió calcular el peso molecular de la PCL y la señal l se usó para cuantificar el número de unidades de MCP en la estructura del polímero.

Tabla 4. Caracterización de los polímeros precursores con grupos alquino por RMN-<sup>1</sup>H y GPC.

Muestra	RMN- <sup>1</sup> H			GPC		%Conversión ε-CL /MCP
	ε-CL $\bar{X}_n$	MCP $\bar{X}_n$	M <sub>n</sub>	M <sub>n</sub>	Đ	
mPEG			2000	1810	1,10	
PEG-P(CL-MCP <sub>5</sub> ) (PP5)	23,7	5,17	5725	7450	1,31	87,9/100
PEG-P(CL-MCP <sub>2</sub> ) (PP2)	25,0	1,60	5163	5449	1,32	61,6/80,0

$$\% \text{ rendimiento de MCP} = \frac{M_n \text{ de MCP por RMN } ^{-1} H}{M_n \text{ esperado de MCP}} \quad \text{Ecuación 10}$$

$$M_n (\text{RMN } ^{-1} H) = M_n \text{ PEG} + M_n \text{ PCL por RMN } ^{-1} H + M_n \text{ MCP RMN } ^{-1} H \quad \text{Ecuación 11}$$

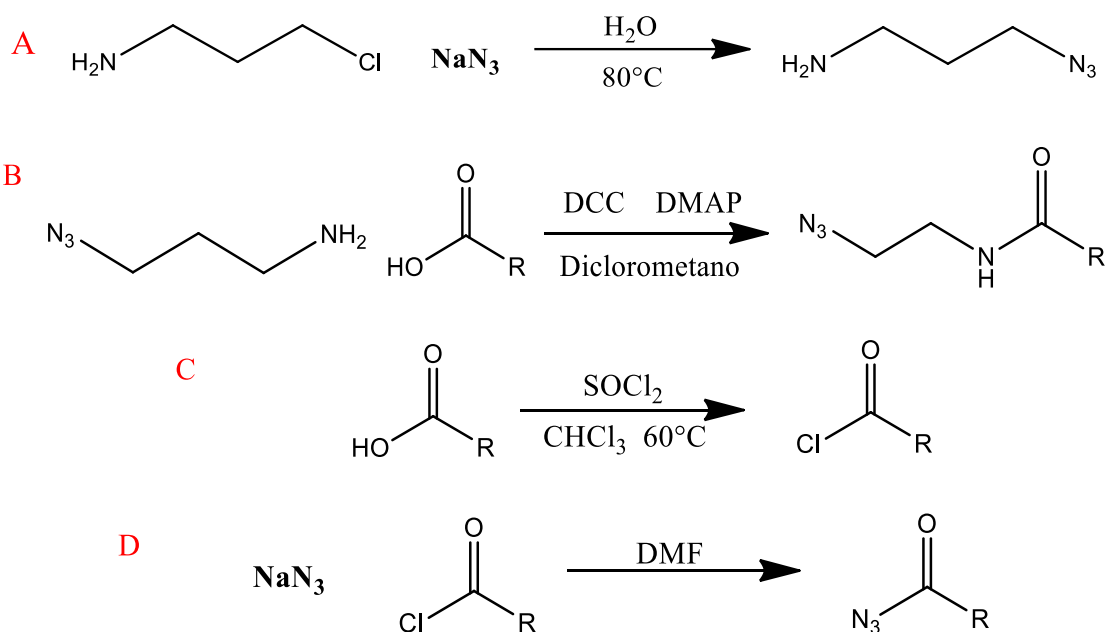
Los resultados permitieron corroborar que las condiciones de reacción empleadas en la polimerización de PEG-PCL son igualmente útiles en la copolimerización de ε-CL y MCP. Esto se corrobora por el alto grado de conversión de ambos monómeros como se observa en la tabla 4. Una vez preparados los polímeros con grupos alquino en su estructura, se procedió a llevar a cabo la síntesis de los precursores que permiten incluir en la estructura del copolímero ácidos grasos mediante química clic.

#### Química clic sobre los polímeros

A partir de los copolímeros PP5 y PP2 descritos anteriormente, se prepararon copolímeros conjugados con tres ácidos grasos diferentes: láurico, oleico y linoleico. Los ácidos se modificaron en una etapa previa con el fin de funcionalizarlos con grupos azida obteniendo dos sustratos diferentes. Para la obtención del sustrato terminado en grupos azida, primero se preparó el precursor 3-azidopropilamina, como se muestra en la figura 4 A. Esta reacción corresponde a una sustitución

nucleofílica sobre la 3-cloropropilamina usando azida de sodio. El reactivo resultante, se hace reaccionar con cada uno de los ácidos grasos a través de una amidación usando DCC como agente de acople como se ilustra en la figura 4 B. El segundo sustrato, terminado en grupos azida de acilo se prepara usando cloruro de tionilo y azida de sodio, como se muestra en la figura 4 C y D.

Finalmente, cada uno de los sustratos se hizo reaccionar vía CuAAC para formar o bien grupos triazol para el precursor amida u oxazoles en el caso de la azida de acilo (figura 2).



**Figura 4. Reacciones usadas para la obtención de los ácidos grasos modificados con grupos azida.**

La discusión de los rendimientos por química clic se divide en dos partes. La primera hace referencia a la caracterización de los copolímeros por medio de RMN-<sup>1</sup>H, GPC y FT-IR, la evaluación del grado de conversión de los grupos alquino en el polímero obtenido en la condición final de reacción y se presentan los resultados espectrales para el ácido linoleico dado que los resultados con los ácidos oleico y láurico son similares, por lo que estos se muestran en la información complementaria. En la segunda parte se describe la forma en la cual se determinaron las condiciones que permitían llevar a cabo la química clic.

En primer lugar, se empleó FT-IR con el fin de corroborar la presencia de los grupos funcionales esperados tras la reacción clic, obteniéndose espectros como los mostrados en las figuras 5 A y B, donde se compara la muestra LIN 5 (copolímero con 5 unidades de ácido linoleico) con el correspondiente precursor PP5 (copolímero que contiene 5 grupos alquino). Para LIN 5 se observa la aparición de dos señales una a  $1732\text{ cm}^{-1}$  de la vibración del grupo C=O y el estiramiento del enlace N-C=O a  $1652\text{ cm}^{-1}$  asociadas al ácido graso. Es de resaltar que LIN 5 presenta las dos señales anteriores más acentuadas que el LIN 2 (copolímero con 2 unidades de ácido linoleico).

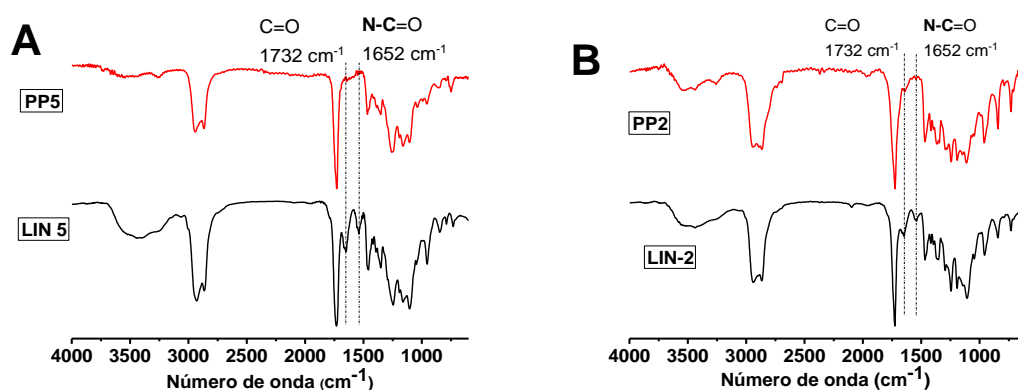


Figura 5. Espectros FT-IR de los polímeros modificados con ácido linoleico y sus precursores

La figura 6 muestra el espectro RMN- $^1\text{H}$  de la muestra LIN 5, las señales correspondientes a  $\equiv\text{C-H}$  y  $\text{CH}_2\text{C}\equiv$  a 2,5 y 4,7 ppm observadas en el precursor PP5 (figura 3C) desaparecen tras la reacción clic. Adicionalmente aparecen nuevas señales debidas al ácido linoleico:  $-\text{CH}_3$  a 0,9 ppm,  $-(\text{CH})=(\text{CH})-$  a 5,4 ppm y la señal del grupo amida N-H a 7,5 ppm. Por último, se observa la presencia de la señal asociada al anillo de triazol  $=\text{CH-N}$  a 7,8 ppm. Esto permite concluir que los grupos alquino han reaccionado y se obtuvo la formación del anillo heterocíclico.

La figura 7 muestra los cromatogramas por GPC para todos los polímeros modificados con ácidos grasos y los polímeros con grupos alquino iniciales. En la gráfica los polímeros se nombran con las 3 letras iniciales del ácido anclado a él (LIN para linoleico, LAU para láurico y OLE para oleico) y el número de ácidos añadidos a su estructura (por ejemplo, LIN 5 es el polímero con 5 unidades de ácido linoleico). Se observa en los cromatogramas que el tiempo de retención disminuye,

lo que implica que la modificación con los ácidos grasos fue efectiva. También se muestra que los polímeros no exhiben diferencias grandes cuando se incluyen en su estructura los ácidos láurico, oleico o linoleico, lo que sugiere que los 3 ácidos fueron incluidos en la misma proporción. Por último, se ve que el cambio del tiempo de retención es mucho mayor cuando se tienen 5 ácidos conjugados, en la figura 7B, lo que indica mayor modificación.

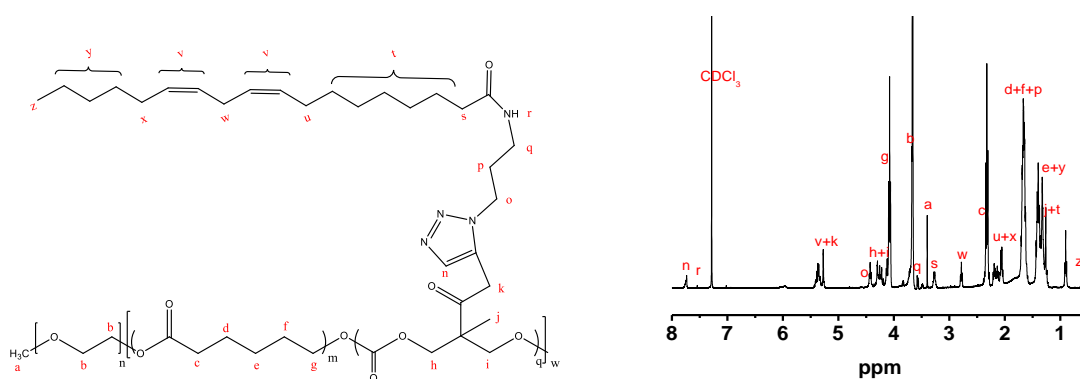


Figura 6. Espectro RMN-<sup>1</sup>H del copolímero LIN 5.

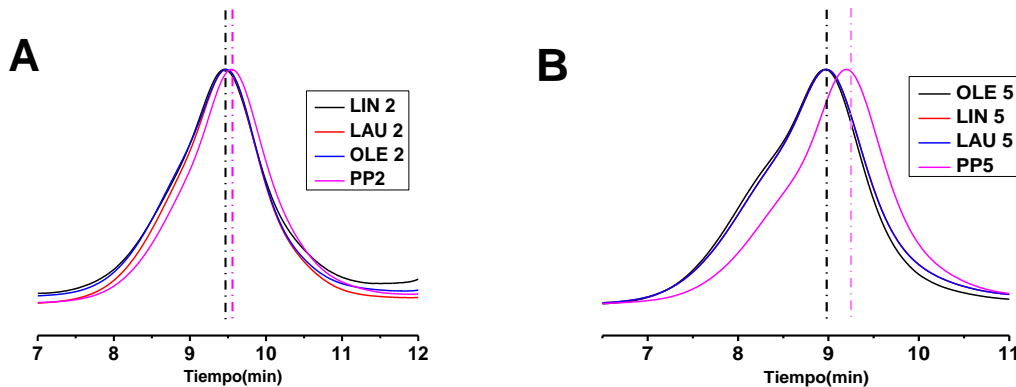


Figura 7. Cromatogramas por GPC de los polímeros modificados con ácidos grasos y sus precursores.

#### *Evaluación de diferentes condiciones de reacción de química clic*

Dado que la mayoría de los materiales desarrollados en la presente investigación no han sido reportadas, se optó por determinar las condiciones experimentales que permiten su síntesis vía CuAAC. De acuerdo con la literatura, los polímeros que se obtienen o modifican mediante química clic suelen requerir cantidades altas de catalizador, lo que los hace tóxicos y por ende limita su uso en aplicaciones

biomédicas. En esta investigación se estudió el efecto del solvente, la temperatura y el tipo sustrato sobre el rendimiento de la reacción con la finalidad de obtener condiciones en las cuales se pueda disminuir la cantidad de catalizador empleado.

Con respecto al sustrato se compararon dos moléculas como se mostró en la figura 2. Se quiso comparar los rendimientos de la reacción clic partiendo del ácido linoleico modificado para obtener una azida de acilo que permite la formación de un anillo de oxazol, debido a que es una síntesis sencilla, más económica y por ende escalable. Otro modificado con un grupo azida logrado a partir de la reacción del ácido graso con 3-azidopropilamina como se muestra en la figura 4, que permite la formación de un anillo de triazol. En cuanto al solvente, la reacción se estudió en anisol y DMF ya que presentan diferentes polaridades y son solventes que tienen alto punto de ebullición lo que permite evaluar un rango de temperaturas amplio.

En cada uno de los procedimientos reportados, la ocurrencia de la reacción se evaluó por RMN-<sup>1</sup>H, a partir de la disminución en la intensidad de las señales asociadas al grupo propargilo, es decir a 2,5 ppm, del enlace C≡H, y 4,7 ppm del CH<sub>2</sub> adyacente, de acuerdo con la figura 3. Para estimar los rendimientos de reacción se usó la señal del grupo metilo del ácido graso a aproximadamente 0,9 ppm y la de los grupos metilenos del PEG tomados como referencia, como muestra la ecuación 12. Estas dos señales son puras y no se ven afectadas por impurezas provenientes del solvente o el ácido ascórbico.

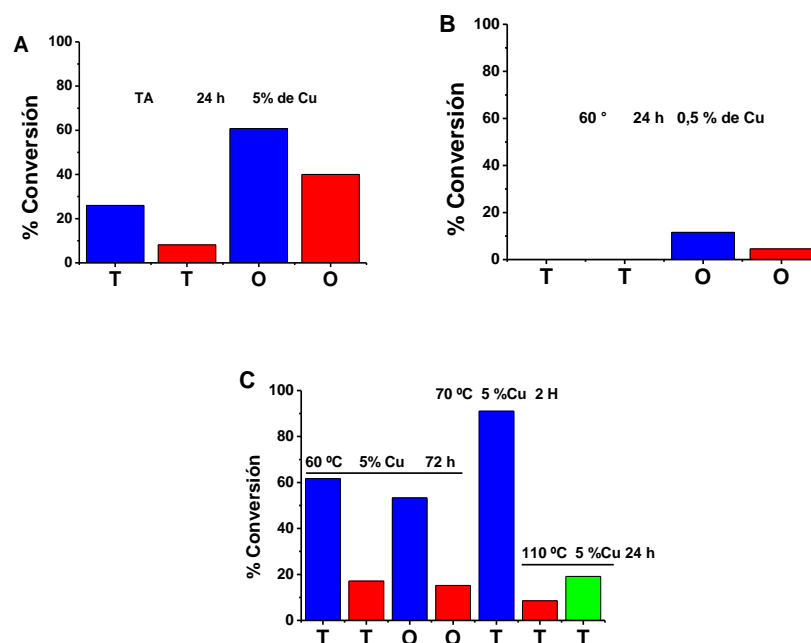
$$\% \text{ conversión} = \frac{\# \text{ protones en señal } 0,9 \text{ ppm}}{15} * 100 \quad \text{Ecuación 12.}$$

En la figura 8 se comparan los rendimientos de la reacción por química clic del ácido linoleico funcionalizado con grupos azida con PP5 empleando diferentes condiciones de síntesis. En la figura 8 A, se compara el rendimiento obtenido para ambos sustratos (azida de acilo para formación del anillo de oxazol – O y 3-azidopropilamida para obtener el anillo de triazol –T) cuando la reacción se lleva a cabo empleando un porcentaje molar de catalizador del 5% respecto a los grupos alquino a temperatura ambiente durante 24 h, empleando anisol (barras en azul) y DMF (barras en rojo) como solventes. De acuerdo con los resultados, el sustrato

azida de acilo sumado al anisol permitió el mayor rendimiento. En la figura 8 B, se presentan los resultados empleando una menor cantidad de cobre (0,5% molar) y una temperatura de reacción de 60°C, en este caso la reacción mostró poca favorabilidad y para el sustrato 3-azidopropilamida no se observó conversión.

Anisol    
  DMF    
  DMF con CuBr<sub>2</sub>    
 T: Triazol     O: Oxazol

Los valores de Cu son % molares de cobre con respecto de los grupos alquino. TA: temperatura ambiente.



**Figura 8. Rendimientos por química clic empleando diferentes condiciones de síntesis.**

Al aumentar la temperatura manteniendo un contenido de cobre del 5% como se muestra en la figura 8 C, la reactividad de los sustratos se invierte, lo cual podría estar relacionado con la menor estabilidad del grupo azida de acilo [53]. A 70 °C, el sustrato 3-azidopropilamida en presencia de anisol como solvente presentó rendimientos cercanos al 100 %. Esta reacción se siguió tomando alícuotas del seno de la reacción y analizándolas por RMN-<sup>1</sup>H, en donde incluso se observó que transcurridos 30 min de reacción la reacción era casi completa, los resultados de este análisis se presentan en los anexos del documento. Estas condiciones de reacción mostraron resultados similares en cuanto a rendimiento cuando se usaron

en la reacción de PP2 y PP5 los ácidos oleico y láurico modificados con grupos azida (ver tabla 5).

De acuerdo con las tendencias descritas, el anisol presenta un mejor desempeño como solvente en estas reacciones, lo cual resulta opuesto al hecho de que las CuAAC son reportadas generalmente en solvente de mayor polaridad[7]. De manera similar, la formación del anillo de oxazol presenta en algunas condiciones de síntesis rendimientos similares o incluso superiores a los del triazol, lo que va en contravía con reportes previos[54].

Tabla 5 . Caracterización de RMN-<sup>1</sup>H y GPC sobre los polímeros modificados con ácidos grasos

Ácido	Modificaciones	Nombre Polímero	$\bar{X}_n$ ácido (RMN- <sup>1</sup> H)	M <sub>n</sub> (RMN- <sup>1</sup> H)	M <sub>n</sub> (GPC)	Đ
Linoleico	5	LIN 5	4,65	7492	9823	1,22
Oleico	5	OLE 5	3,38	7009	9574	1,26
Láurico	5	LAU 5	4,97	7216	9457	1,20
PP5	5		5,17	5725	7450	1,32
Linoleico	2	LIN 2	1,70	5809	6106	1,28
Oleico	2	OLE 2	1,31	5660	6129	1,33
Láurico	2	LAU 2	1,61	5646	6005	1,32
PP2	2		1,60	5163	5449	1,31

Las discrepancias observadas podrían deberse a la naturaleza anfifílica de los copolímeros PP2 y PP5, además del hecho que los grupos alquinos se encuentran inmersos en un medio de baja polaridad. Bajo estas condiciones, la reacción se ve favorecida en un “buen solvente” para el segmento de P(CL-(MCP)) ya que expondría los grupos alquino al medio de reacción debido a que se reduce la formación de “loops” que se originan tras la agregación de la cadena polimérica tal como ocurre cuando su solubilidad no es favorecida termodinámicamente.

En ese sentido, la diferencia de los parámetros de solubilidad de Hansen entre la PCL y los solventes se hacen determinantes, así los valores  $\delta_{\text{DMF}} - \delta_{\text{PCL}}: 8,3 \text{ MPa}^{1/2}$  [55] y  $\delta_{\text{Ani}} - \delta_{\text{PCL}}: 2,4 \text{ MPa}^{1/2}$  [56], reflejan que el anisol presenta mejor interacción con el PCL. Para el caso de la azida de acilo, es posible que se internalicen más fácilmente en las cadenas del polímero, debido a que no presentan grupos polares como el enlace N-H, que aumenta el parámetro de solubilidad de Hansen de la 3-azidopropilamida del ácido.

Una vez se ha logrado corroborar que los polímeros han sido sintetizados mediante el uso de ROP y química clic, se estudian algunas propiedades como la CMC, los tamaños y la forma de las micelas.

### **4.3 Comportamiento micelar de los polímeros con ácidos grasos**

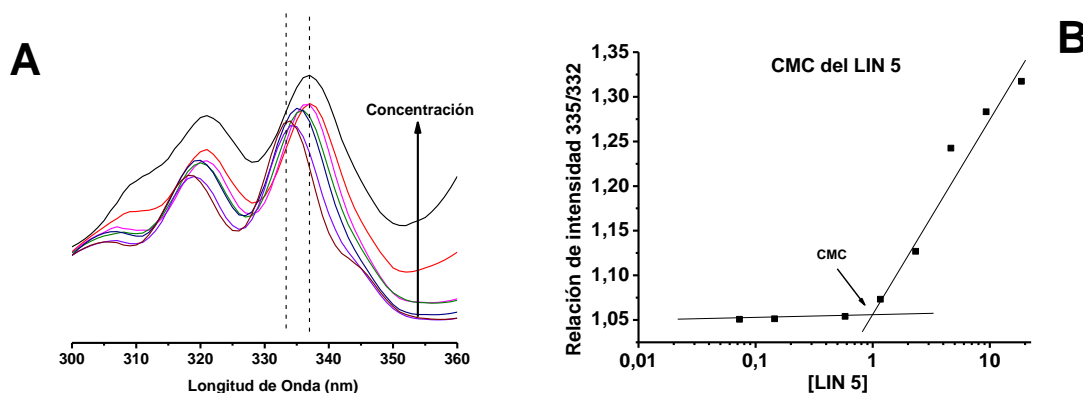
Teniendo en cuanto la naturaleza anfifílica de los copolímeros sintetizados, se procedió a caracterizar las estructuras generadas tras su autoensamble en agua. Se analizó la influencia de la nueva estructura del polímero en la CMC que se determinó usando pireno como sonda fluorescente, el tamaño de las micelas a través de dispersión dinámica de luz (DLS), y por microscopía TEM se observaron las formas de las micelas. Además, el comportamiento de la cadena hidrofóbica en el núcleo micelar se analizó por RMN-<sup>1</sup>H.

#### **4.3.1 Evaluación de la CMC de las micelas poliméricas**

El experimento para la determinación de la CMC usando pireno permite evaluar el comportamiento de los sistemas poliméricos. Este método permite corroborar la formación de dominios hidrófobos en los sistemas coloidales. La figura 9 muestra el comportamiento espectral del pireno en presencia de las dispersiones coloidales del copolímero LIN 5 con diferente concentración. Se observa en la figura 9 A que cuando se reduce la concentración del copolímero, disminuye la intensidad de la fluorescencia del pireno y cambia la relación de la señal de 335 y 332 nm, produciéndose un efecto hipsocrómico, debido a los cambios en el medio en el que se encuentra disuelto la sonda. La presencia de una región hidrofóbica en los sistemas coloidales, generada tras la agregación de las cadenas hidrofóbicas del polímero, desaparece a medida que los sistemas se diluyen, lo que se relaciona con su disociación. En consecuencia, podría afirmarse que los arreglos generados tras el autoensamble de los copolímeros sintetizados exhiben características micelares.

El comportamiento de la relación entre la intensidad de las señales a 335 y 332 nm mientras se diluye el polímero LIN 5 se muestra en la figura 9 B. A partir de este gráfico se deduce que la relación entre la señal a 335 y 332 nm disminuye con la dilución hasta hacerse constante, punto donde se encuentra la CMC. Es importante mencionar que los valores de CMC de todos los polímeros modificados con ácidos

grasos se encuentran entre 2,5 y 0,5 ppm, valores menores a los reportados para PEG-PCL con pesos moleculares similares y sistemas análogos previamente, que están alrededor de 5 ppm [57]. Esto supone un incremento de la estabilidad de estos sistemas frente a la dilución, comparado a los polímeros de PEG-PCL.



**Figura 9. Comportamiento de la sonda de pireno en las micelas de LIN 5 seguida por espectroscopia de fluorescencia.**

Además de la CMC, la forma de las micelas se evaluó usando TEM y la asociación de las cadenas hidrófobas en el núcleo micelar se estudió mediante RMN-<sup>1</sup>H. En la figura 10 A se muestra la distribución de los diámetros hidrodinámicos ( $D_h$ ) medido por DLS y la imagen TEM de un sistema micelar. De acuerdo con los resultados obtenidos por DLS, las micelas presentan una distribución de diámetro estrecha, la cual es una característica que se debe al polímero y a la metodología usada en la nanoprecipitación[58]. Por su parte, el TEM muestra que la forma de las micelas es esférica y se ve un menor tamaño comparado a la medida por DLS, lo cual se debe a que son secadas antes de la toma de la imagen y pierden el agua que interactúa con el PEG, la cual hincha la micela.

La figura 10 B muestra las micelas en agua deuterada comparadas con el polímero disuelto en  $CDCl_3$ . Como se observa en el espectro en  $D_2O$  la señal del grupo  $OCH_3$  en el PEG a 3,4 ppm presenta una alta intensidad relativa, contrario a lo observado en el espectro tomado en  $CDCl_3$ , además de verse una disminución de la intensidad de las señales del fragmento hidrófobo cuando están en forma de micelas y hacerse menos definidas. Esto sugiere que las cadenas hidrófobas presentan baja movilidad, por lo cual se produce una disminución del tiempo de relajación  $t_2$

(relajación transversal spin-spin) de los espines de los protones en el núcleo micelar, comportamiento similar al reportado para PEG-PCL[59].

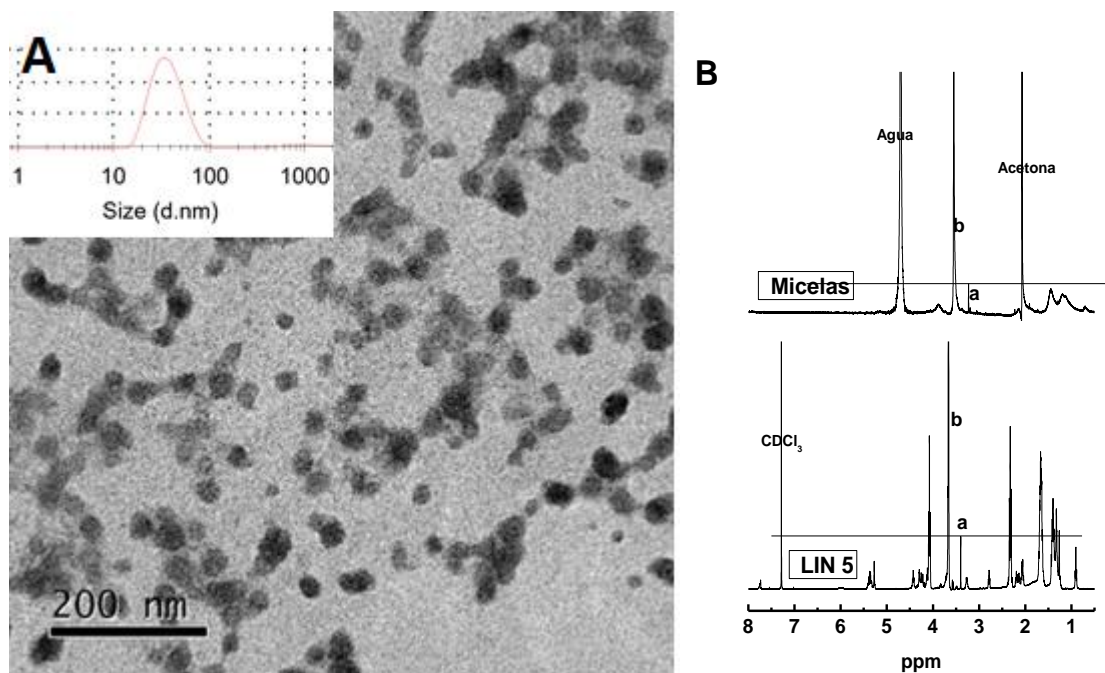
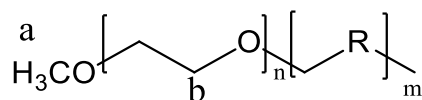


Figura 10. Imagen TEM, distribución de tamaños micelares y espectros RMN-<sup>1</sup>H en agua y cloroformo deuterados para la muestra LIN 5.

Los resultados presentados corroboran que los copolímeros obtenidos forman agregados micelares y por ende podrían emplearse como vehículos para fármacos, los principios activos se almacenan en el núcleo, lo que garantiza para este caso la interacción de los ácidos grasos con los fármacos. Es así, como en las siguientes secciones se busca identificar la influencia de las modificaciones en la encapsulación y liberación de los fármacos.

#### 4.4 Encapsulación de CBD y CUR

Los copolímeros modificados con ácidos grasos presentan una alta potencialidad de ser usados para la encapsulación de diferentes fármacos lipofílicos, en donde debido la inclusión de ácidos grasos en su estructura es posible que se presente

una mejoría de algunas propiedades tales como el porcentaje de encapsulación de los fármacos.

En esta sección se presentan los resultados de la encapsulación de un extracto de curcumina y CBD puro. Para CUR se presenta un estudio de la influencia de algunos parámetros sobre la encapsulación de los fármacos como los copolímeros, solventes, agitación, entre otras. Para CBD se muestra el efecto del polímero y la metodología usada en la encapsulación, además de evaluarse la estabilidad coloidal de las micelas cargadas con CBD. Por último, se escogen a los polímeros que presentan mejor estabilidad y encapsulación con CBD para encapsular extractos enriquecidos de THC y CBD.

La tabla 6 resume todos los polímeros sintetizados y la nomenclatura usada para referirse a ellos. Allí se incluyen tanto los polímeros PEG-PCL, mencionados en la sección anterior, como aquellos que son modificados mediante la inclusión de los 3 diferentes ácidos grasos: ácido linoleico, láurico y oleico.

**Tabla 6. Lista de los polímeros usados en la presente investigación.**

<b>Nombre</b>	<b>MCP</b>	<b>Ácido</b>
<b>P2-P4*</b>	0	Ninguno
<b>P2-P2**</b>	0	Ninguno
<b>P5-P4***</b>	0	Ninguno
<b>LAU 5</b>	5	láurico
<b>LIN 5</b>	5	linoleico
<b>OLE 5</b>	5	oleico
<b>LAU 2</b>	2	láurico
<b>LIN 2</b>	2	linoleico
<b>OLE 2</b>	2	oleico

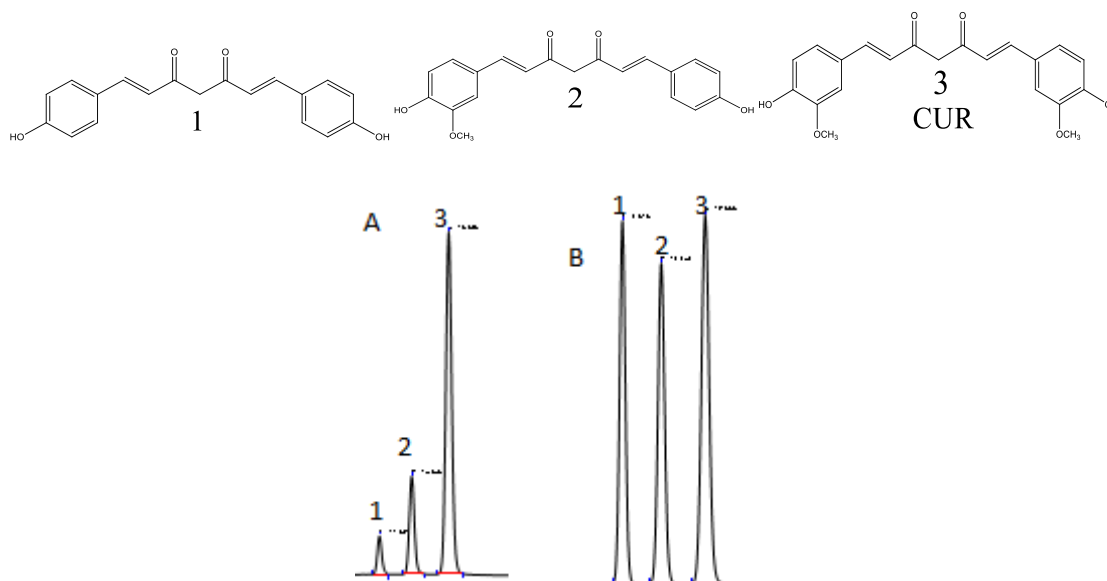
\* polímero de PEG-PCL con 2kDa de PEG y 4kDa de PCL, \*\* polímero de PEG-PCL con 2kDa de PEG y 2kDa de PCL, \*\*\* polímero de PEG-PCL con 5kDa de PEG y 4kDa de PCL. LAU: ácido láurico, OLE: ácido oleico, LIN: ácido linoleico.

#### **4.4.1 Encapsulación de CBD y CUR con copolímeros de PEG-PCL**

En primer lugar, se compara la influencia de los pesos moleculares de los polímeros de PEG-PCL en el DLC (capacidad de carga de fármaco) de curcumina y CBD, además del  $D_h$  de las nanopartículas generadas. Los valores de DLC fueron calculados disolviendo las micelas cargadas (previamente secadas por liofilización)

en metanol y cuantificando el fármaco correspondiente por HPLC, mientras que las medidas de  $D_h$  fueron obtenidas empleando DLS. Los valores obtenidos para estas medidas se muestran en la tabla 7.

Con respecto de la encapsulación de CUR, las formulaciones dadas en la tabla 7 se obtuvieron empleando como fuente del fármaco un extracto que contenía tres curcuminoides previamente reportados en la literatura [47], como se muestra en la figura 11 A, en donde el compuesto más abundante corresponde a la curcumina. De acuerdo con la figura 11 B la composición del encapsulado cambia, observándose que los tres curcuminoides presentan abundancias comparables, esta tendencia fue recurrente en las formulaciones desarrolladas en toda la investigación. Por esta razón, para la cuantificación de la curcumina encapsulada se determinaron dos valores diferentes, el % DLC(total) que incluye las tres sustancias y el % DLC(CUR) que corresponde únicamente a la curcumina y que se determinó empleando un estándar puro de esta sustancia.



**Figura 11.** Muestra los cromatogramas para el extracto de curcumina inicial y un encapsulado con los polímeros de PEG-PCL.

De acuerdo con los resultados en la tabla 7, el copolímero P2-P4 presentó los mayores valores de % DLC(total) y referente a la curcumina, adicionalmente mostró los menores tamaños de partícula. El menor desempeño se obtuvo para la muestra

P2-P2, con menores DLC y valores de *Dh* mayores. En cuanto a la encapsulación del CBD, los resultados obtenidos indican que el DLC es poco dependiente de la estructura del copolímero, pero el menor tamaño de las micelas cargadas sigue siendo favorecido para los segmentos de PCL más largos. Los resultados obtenidos concuerdan con investigaciones previas, según las cuales el % DLC y *Dh* depende de la estructura del copolímero y factores tales como el tipo de fármaco, método de encapsulación y otras variables experimentales involucradas en el proceso [60]–[62].

**Tabla 7. Muestra los valores de % de encapsulación y *Dh* para la curcumina y el CBD usando los polímeros de PEG-PCL.**

PEG-PCL	Curcumina				CBD		
	% DLC (total)	% DLC (CUR)	<i>Dh</i> (nm)	PDI	% DLC	<i>Dh</i> (nm)	PDI
<b>P2-P2</b>	4,71 ± 0,02	2,21 ± 0,01	115,62	0,24	27,90 ± 0,50	83,04	0,27
<b>P2-P4</b>	7,44 ± 0,09	4,11 ± 0,02	58,93	0,21	26,26 ± 0,07	66,54	0,21
<b>P5-P4</b>	5,48 ± 0,24	2,91 ± 0,14	90,12	0,23	28,09 ± 0,89	52,56	0,23

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, así como el hecho que estudios previos han mostrado que un menor peso molecular de PEG aumenta la biodisponibilidad oral en nanopartículas [63], o micelas [64], el copolímero P2-P4 fue seleccionado para los ensayos posteriores. Es importante resaltar que los polímeros modificados con ácidos grasos fueron sintetizados con PEG 2kDa como iniciador, lo cual mejora su potencial biodisponibilidad oral, y el peso molecular de su fragmento hidrófobo está alrededor de los 4kDa, lo cual hace que los copolímeros sean comparables en los posteriores ensayos mostrados.

La tabla 8 muestra el efecto de la relación de la masa de copolímero P2-P4 y cada uno de los fármacos (CBD y CUR). Se observa que el DLC para CBD alcanza valores de ultra alta capacidad de carga de fármaco, mientras que la encapsulación de CUR no varía significativamente. Los resultados obtenidos indican que probablemente el CBD presente una mayor afinidad por los copolímeros, lo cual favorece su encapsulación, en tanto para la curcumina se favorece su agregación y por ende se disuelve en menor proporción en las micelas. En una etapa posterior

se quiso determinar el efecto de conjugar los copolímeros con ácidos grasos: oleico, láurico y linoleico sobre el DLC, como se describe a continuación.

**Tabla 8. Influencia de la cantidad de polímero P2-P4 en el % de encapsulación de CUR y CBD.**

mg	Curcumina			CBD	
	% DLC (total)	% EE	% DLC (CUR)	% DLC (CBD)	% EE (CBD)
20	7,44 ± 0,09	26,05 ± 0,30	4,11 ± 0,02	26,26 ± 0,07	91,92 ± 0,23
16	7,10 ± 0,90	21,29 ± 2,70	3,73 ± 0,61	31,64 ± 0,52	94,92 ± 1,56
12	8,15 ± 0,34	20,37 ± 0,85	4,01 ± 0,15	38,42 ± 0,96	96,04 ± 2,39
8	7,58 ± 2,20	15,15 ± 4,40	3,78 ± 1,17	46,70 ± 2,38	93,41 ± 4,76

#### 4.4.2 Estudio de la capacidad de los polímeros modificados en la encapsulación CUR

Para llevar a cabo la encapsulación de CUR con los polímeros con ácidos grasos en su estructura, se hizo uso de nanoprecipitación manteniendo todos los parámetros constantes, excepto el polímero usado. Además, se estudiaron las interacciones entre los polímeros y los fármacos usando espectroscopia FT-IR.

La figura 12 compara los valores de DLC de CUR obtenidos para los copolímeros modificados con ácidos grasos y P2-P4. Se observó en la figura 12 A que para una proporción de 3:2 en peso de polímero:CUR, los % DLC disminuyen en presencia de los ácidos grasos. La figura 12 B, compara los valores de % DLC con una relación en masa de 5:2 (polímero:CUR) obtenidos con LIN 5 y LAU 5 con P2-P4, presentándose resultados similares. Esto podría deberse a que los polímeros sintetizados presentan una alta proporción del fragmento hidrófobo con respecto del fragmento hidrófilo (1:2 en peso), parámetro que de acuerdo a reportes previos al incrementar puede disminuir la capacidad de encapsulación de los copolímeros [4].

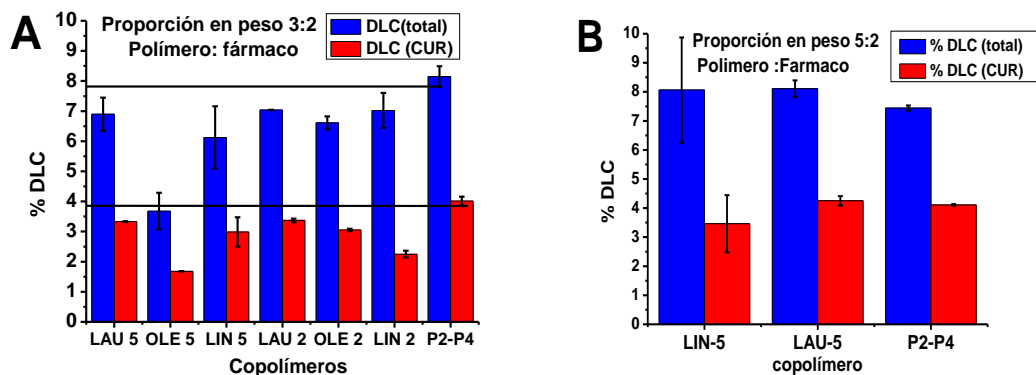


Figura 12. Valores de % de encapsulación obtenidos para CUR con los copolímeros modificados con ácidos grasos y P2-P4 usando dos proporciones en peso distintas

En la figura 13 se comparan los espectros de CUR, LIN 5 y las correspondientes micelas cargadas liofilizadas. Los componentes individuales presentan señales características de los grupos funcionales que lo componen y estas mismas señales son en su mayoría observadas en el espectro de la formulación correspondiente. Sin embargo, la banda a  $1540\text{ cm}^{-1}$  debida a los grupos amida en el LIN 5, se ensancha en presencia de CUR, sugiriendo la formación de interacciones tipo enlace de hidrógeno entre los componentes. Esto implica una reducción del valor del parámetro de solubilidad de enlace de hidrogeno entre el polímero y el fármaco, lo que muestra que una mejoraría de la solubilidad del fármaco en el polímero no indujo mayor encapsulación.

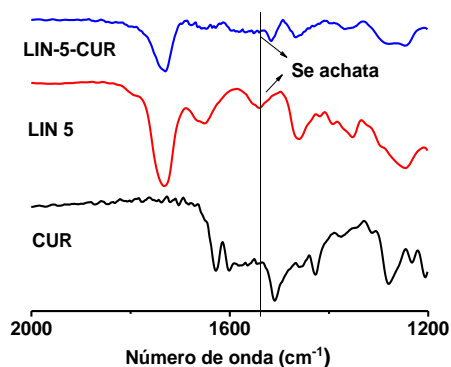


Figura 13. Espectros FT-IR de las micelas de LIN 5 libres y cargadas con CUR, además de la CUR libre.

Teniendo en cuenta que el DLC de CUR mostró poca sensibilidad a las características químicas del copolímero, se procedió a evaluar otras condiciones de

encapsulación que puedan incidir en parámetros cinéticos involucrados en el proceso.

#### 4.4.3 Efecto de la velocidad de agitación en la encapsulación de CUR

La figura 14 muestra la influencia de la velocidad de agitación en la encapsulación de CUR para los polímeros modificados y P2-P4 a dos velocidades 1000 rpm y 300 rpm. De acuerdo con los resultados, el efecto de la velocidad sobre el % DLC depende de la composición de los copolímeros, este es el caso de OLE 5 en el cual se muestra un incremento de esta propiedad, contrario a LIN 2.

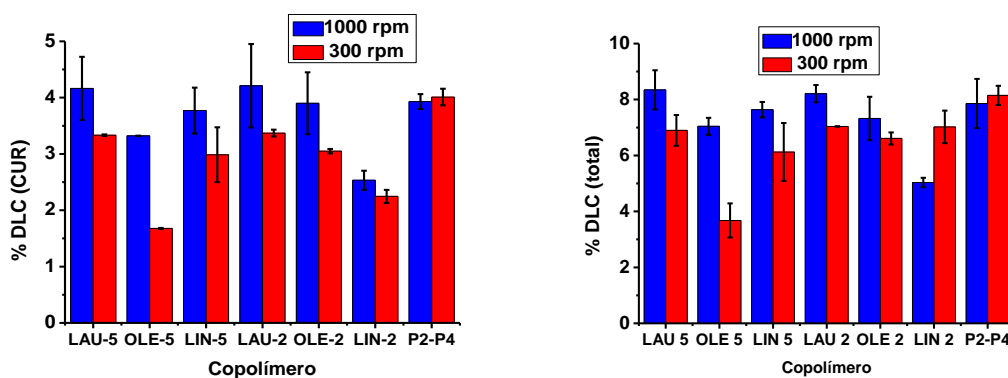


Figura 14. Muestra los valores de % de encapsulación obtenidos para CUR obtenidos cuando se usó una velocidad de agitación de 300 y 1000 rpm.

A partir de los resultados presentados, la encapsulación de la CUR puede proceder mediante la coprecipitación del polímero y el fármaco. Se ha reportado que la velocidad de agitación puede alterar la cinética de formación de los núcleos de la curcumina, debido a diferencias en los procesos de micro mezclado[65], un efecto similar podría darse en la formación de las micelas poliméricas, la cual procede a través de procesos de nucleación y crecimiento. En reportes previos, se ha establecido que cuando las velocidades de precipitación del fármaco y del polímero son comparables, se logran valores de DLC mayores [31].

En consecuencia, hay 3 escenarios posibles al alterar la velocidad de agitación. Se pueden asemejar las cinéticas de precipitación del fármaco y el copolímero, aumentando el DLC. Pero, por el contrario, las velocidades de formación de los núcleos podrían diferir de manera significativa, lo que implicaría un menor valor. También podría ocurrir que la cinética de precipitación de ambos componentes se

vea afectada en la misma proporción, implicando que no haya diferencias significativas en el DLC.

Por otro lado, dado que la cinética de precipitación de los fármacos está ligada a su estructura, es posible que los curcuminoides presentes en el extracto inicial presenten velocidades de precipitación diferentes y que por ende una mayor abundancia relativa en el encapsulado se asocie con una mayor similitud con la cinética de formación de los agregados micelares. En primer lugar, el polímero debería precipitar más rápidamente, ya que su solubilidad está menos favorecida termodinámicamente, mientras que el curcuminoide 1, mostrado en la figura 11, debería ser el primero en precipitar, por lo cual se encapsula mayoritariamente.

#### **4.4.4 Estudio de la influencia de los solventes en la encapsulación de CUR**

Se ha reportado previamente que los solventes pueden influenciar la encapsulación de los fármacos, en donde se ha discutido su importancia para alterar la cinética de precipitación de los polímeros y los fármacos usando solventes no volátiles como DMF y dimetilsulfóxido (DMSO)[31]. Debido a que la remoción de estas sustancias implica diálisis, se decide evaluar la influencia de diferentes soluciones de solventes volátiles como metanol, THF y acetona en la encapsulación de CUR usando los polímeros P2-P4 y OLE 2.

La figura 15 muestra la comparativa de diferentes mezclas de solventes sobre la encapsulación de CUR usando P2-P4. Se observa una tendencia a incrementarse el DLC (total) usando mezclas de solventes, pero este efecto es menor en el DLC (CUR). Esto se debe a una mayor encapsulación de los componentes 1 y 2 mostrados en la figura 11, probablemente debido a un efecto cinético que afecta de manera más significativa a los curcuminoides 1 y 2.

Lo anterior puede explicarse debido a que existen múltiples parámetros en este fenómeno que interactúan entre sí. Se han reportado cambios en la cristalización de la curcumina en procesos de precipitación cuando se usan diferentes solventes [66], la influencia que presenta la presencia de sustancias externas, como el PEG, en el proceso de crecimiento de los núcleos[67], además de la interacción solvente-

fármaco-polímero que afecta la difusión de los componentes a sus núcleos [68]. Esto muestra al menos tres parámetros afectando la cinética de precipitación, lo que hace poco predecible el valor de DLC resultante.

$$\delta = \varphi_i \delta_i + \varphi_j \delta_j + \dots + \varphi_n \delta_n$$

Ecuación 12[69]

Proporción en peso			$\delta$ (solvente) (MPa <sup>1/2</sup> )
THF	Acetona	Metanol	
1	1	0	19,2
0	1	0	19,7
1 *	0	0	20,2
4	3	1	21,5
1	1	2**	23,3
5	5	6	24,9
1	1	2	26,2

\*Diclorometano, \*\*etanol

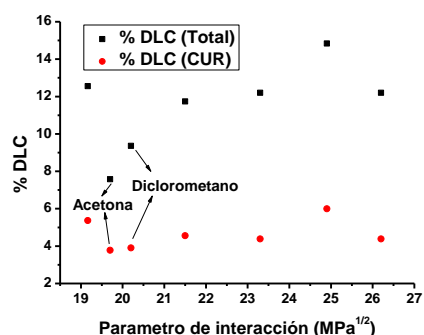


Figura 15. Efecto de diferentes mezclas de solventes sobre el porcentaje de encapsulación de CUR.

En la tabla 9 se muestran algunos valores de encapsulación usando algunas mezclas de solventes y comparando al P2-P4 con OLE 2. Se encuentra un aumento del %DLC (total) usando las mezclas de solventes para el OLE 2, aunque el valor del DLC(CUR) no es incrementado. También se observa que la encapsulación es más alta en todos los casos para el P2-P4, similar a lo encontrado en la figura 12.

Tabla 9. Compara los diferentes porcentajes de encapsulación de CUR usando diferentes proporciones de mezclas de solventes para P2-P4 y OLE-2 .

Polímero	Relaciones en peso			% DLC total	% DLC (CUR)
	THF	Acetona	Metanol		
P2-P4	0	1	0	7,58	3,78
	5	5	6	14,8	5,99
	4	3	1	11,7	4,56
	2	2	0	12,6	5,36
OLE-2	0	1	0	6,61	3,05
	5	5	6	8,10	2,81
	4	3	1	8,19	3,79
	1	1	0	8,47	2,93

Por último, la tabla 1 de los anexos de este documento se muestran múltiples condiciones para la encapsulación de CUR usando P2-P4. Fueron evaluados diferentes parámetros dentro de los cuales están: proporción agua: solvente, número de adiciones de agua y distintas mezclas de solvente, en donde no se encontró correlación entre las distintas variables evaluadas y el valor de DLC. De acuerdo con las explicaciones previamente hechas este resultado es esperado, ya que los distintos parámetros evaluados pueden afectar la encapsulación de forma impredecible.

#### **4.4.5 Estudio por difracción de rayos X (DRX) sobre las micelas cargadas con CUR**

Para poder complementar los resultados anteriores y profundizar en el estudio de las interacciones presentadas entre CUR y el polímero se hizo uso de DRX. Los difractogramas de las micelas preparadas con P2-P4 liofilizadas vacías, cargadas con CUR y el fármaco libre se presentan en la figura 16.

De acuerdo con los perfiles de difracción mostrados, mientras la CUR y las micelas vacías presentan picos de baja intensidad asociados a la presencia de estructuras cristalinas, en las micelas cargadas se intensifican las difracciones debidas a los componentes del copolímero, tales como los picos a  $23,7^\circ$  y  $21,4^\circ$  que han sido reportadas previamente en PCL para los planos cristalográficos ortorrómbicos de (200) y (110) [70], y la señal a  $19,2^\circ$  que corresponde al PEG[71]. Se observa, además, que las micelas cargadas con CUR no presentan señales del fármaco original. Los resultados sugieren que la CUR actúa como agente de nucleación en el PCL, lo cual implica que inducen la cristalización de este fragmento del copolímero en el núcleo micelar, probablemente debido a que durante el proceso de formación de las partículas se generan agregados nanométricos del fármaco, corroborando que las fuerzas cohesivas entre los componentes son de mayor magnitud que las interacciones CUR – polímero.

Sumado a lo anterior, la nucleación del PCL implica la interacción entre el fármaco y el fragmento hidrófobo lo que permite concluir que esta molécula se encuentra en

el núcleo micelar y no interactuando con el PEG, que se encuentra en la corona de los arreglos coloidales.

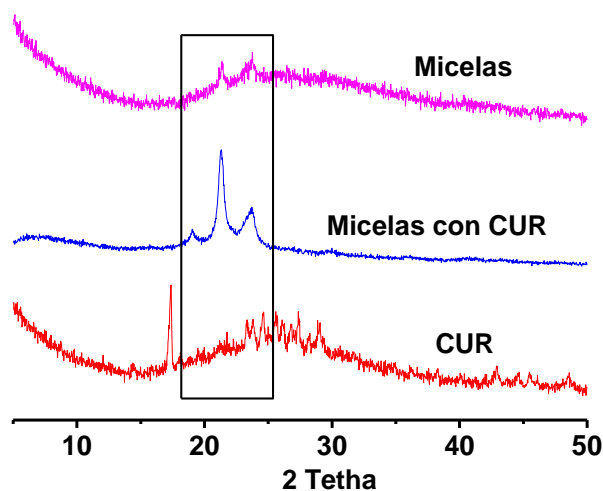


Figura 16. Diffractogramas de las micelas vacías y cargadas con CUR comparadas con el fármaco libre.

#### 4.4.6 Método de evaporación por vacío para encapsulación de CUR.

Como se mostró anteriormente, todos los valores de encapsulación de CUR se asociaron a parámetros cinéticos, sin embargo, los valores de encapsulación encontrados no superaron un 20% de DLC(total), lo que llevó a considerar el efecto que presenta la eliminación del solvente rápidamente usando evaporación por vacío, la cual es una metodología ampliamente usada en reportes anteriores.

Se procedió a preparar micelas cargadas con CUR bajo las mismas condiciones usadas anteriormente, variando únicamente la forma en la cual se elimina el solvente del sistema. Una vez la mezcla de la solución orgánica del fármaco y el copolímero con agua se ha agitado durante 20 s a 300 rpm, se evapora por vacío a 60° C por 10 minutos. Posteriormente la muestra se liofiliza y se determina el contenido de CUR por HPLC, obteniéndose los datos mostrados en la tabla 10, para el copolímero LAU 5, cuyos valores se comparan con las metodologías descritas previamente, en las cuales se varió la agitación de 300 rpm a 1000 rpm y se evaluó una proporción 5:2 en peso de polímero:fármaco. Se observa que el método de evaporación por vacío permite aumentar de manera significativa los valores de DLC.

El proceso de evaporación por vacío generó varios efectos sobre el sistema. En primer lugar, al acelerarse la remoción del solvente se incrementa la velocidad con la que los componentes presentes se agregan. Debe tenerse en cuenta que a medida que se remueve el solvente orgánico, el medio de dispersión se vuelve menos afín al fármaco y el copolímero, favoreciendo la ocurrencia de procesos debidos a interacciones solvofóbicas. Bajo estas condiciones se favorece la formación de estructuras de manera aleatoria, dando lugar a fenómenos como la coprecipitación.

Por otro lado, al aumentarse la temperatura se desfavorece la formación de interacciones intermoleculares tales como los enlaces de hidrógeno, los cuales de acuerdo con reportes previos son los responsables de la cristalización de la CUR[72] y favorecen las interacciones con otros componentes tales como los segmentos hidrófobos del copolímero.

**Tabla 10. Valores de porcentaje de encapsulación de CUR usando LAU 5 por 4 metodologías distintas**

<b>Método</b>	<b>Proporción en peso Polimero:fármaco</b>	<b>%EE</b>	<b>% DLC (total)</b>	<b>%DLC(CUR)</b>
Evaporación por vacío	3:2	92,39±11,20	36,95±4,48	28,87±3,91
300 rpm	3:2	17,24±1,37	6,89±0,55	3,33±0,01
1000 rpm	3:2	20,86±1,74	8,34±0,70	4,16±0,56
300 rpm	5:2	28,21±6,46	8,10±0,28	4,25±0,16

#### **4.4.7 Encapsulación de CBD con los copolímeros modificados con ácidos grasos**

Debido a que el comportamiento presentado para la encapsulación de CBD y CUR difirió significativamente, se presentan los resultados de ambos fármacos por separado. En esta sección se presenta a los resultados en los cuales se comparó el efecto presentado por los polímeros injertados con ácidos grasos en la encapsulación de CBD, los valores de encapsulación y el estudio de la interacción polímero-fármaco hecho por FT-IR.

La figura 17 presenta los valores de DLC para el CBD con copolímeros de diferente composición. La figura 17 A presenta los valores correspondientes a una relación másica 3:2 polímero:CBD, en donde la estructura del copolímero no presenta un efecto significativo sobre el DLC. De acuerdo con la figura 17 B, la relación 3:4 muestra que un incremento en la cantidad de CBD conlleva a un aumento en el DLC hasta alcanzar valores de 60%, observándose que los tres precursores poliméricos evaluados presentaron valores similares. Estos valores de DLC son comparables a los valores máximos reportados en literatura (ver tabla 2).

En la figura 18 se comparan los espectros de CBD, LIN 5 y las correspondientes micelas cargadas. Se observan señales debidas a los grupos funcionales en el copolímero y el fármaco. De manera análoga a lo observado cuando se encapsuló CUR, la banda a  $1540\text{ cm}^{-1}$  debida a los grupos amida en el LIN 5 se ensancha en presencia de CBD, sugiriendo la formación de interacciones tipo enlace de hidrógeno entre los componentes.

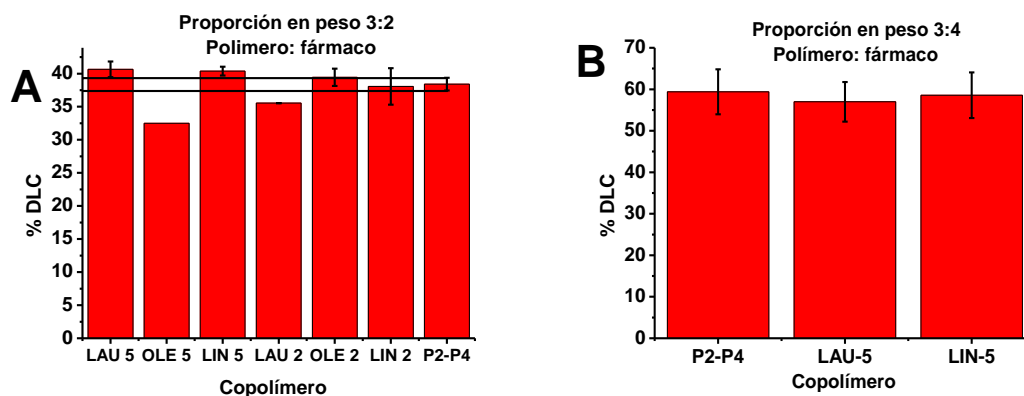


Figura 17. Valores de porcentaje de encapsulación obtenidos para el CBD con los copolímeros con ácidos grasos y P2-P4 usando dos proporciones en peso distintas

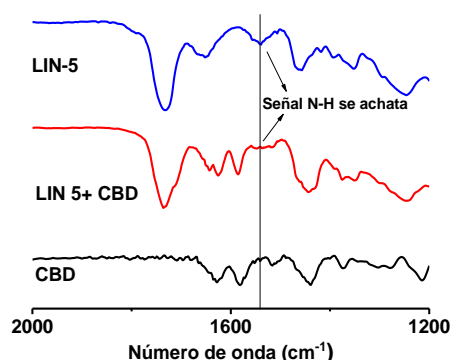


Figura 18. Espectros FT-IR de las micelas de LIN 5 libres y cargadas con CBD, además del CBD libre.

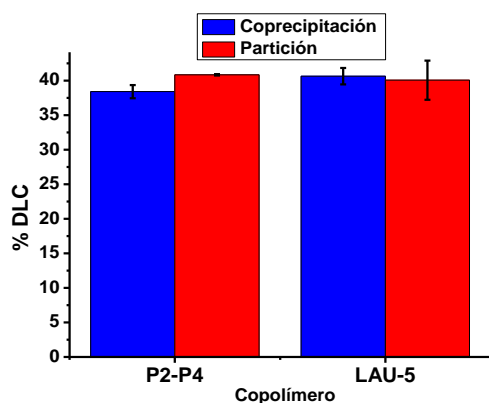
Los resultados mostrados permiten inferir que el CBD presenta alta afinidad por el núcleo micelar, lo cual puede deberse a su naturaleza lipofílica y también a las menores fuerzas cohesivas que reducen su autoagregación durante el proceso de formación de las partículas. A diferencia de la CUR, que presenta una temperatura de fusión de 173 °C[65], el CBD funde a 63°C[73], lo que sugiere una menor energía reticular y por ende se favorece su disolución. Para corroborar esta hipótesis se procedió a encapsular el CBD empleando una metodología diferente.

#### 4.4.8 Estudio de la partición del CBD al interior del núcleo micelar

En primer lugar, se formaron micelas vacías de muestras de copolímeros representativos (P2-P4 y LAU 5) y se mantuvieron en agitación durante 24 h, posteriormente a esta dispersión se adicionó el CBD disuelto en acetona. Los valores de DLC obtenidos se referencian como partición y se muestran en la figura 19, comparados con la metodología de nanoprecipitación empleada en las etapas anteriores (coprecipitación). Los resultados sugieren que la encapsulación de CBD sucede principalmente por la partición del fármaco entre la fase continua y el interior del núcleo micelar. Esto concuerda con los resultados previamente reportados para altos valores de EE y DLC para CBD[32], [48], [74].

La figura 19 compara los valores de  $D_h$  de las micelas de P2-P4 y LAU 5 cargadas con CBD mediante las metodologías de coprecipitación y partición. Se observa que hay diferencias significativas entre los tamaños de las micelas debido a la metodología usada, lo cual es esperado, ya que los sistemas coloidales pueden presentar diferentes tamaños de acuerdo con la forma en la cual son preparados,

producto del intercambio de las cadenas entre los sistemas micelares mientras alcanzan el equilibrio.



Copolímero	Método	Dh (nm)	DPI
LAU-5	Coprecipitación	113,4	0,475
LAU 5	Partición	91,88	0,256
P2-P4	Coprecipitación	61,09	0,18
P2-P4	Partición	165,1	0,298

Figura 19. Valores de porcentaje de encapsulación de CBD mediante coprecipitación y partición y sus valores de diámetro hidrodinámico.

#### 4.4.9 Estudio de DRX de las micelas de PEG-PCL cargadas con CBD

Con la finalidad de estudiar el comportamiento de las cadenas del polímero una vez se encuentran cargadas con CBD, se realizan estudios por DRX. Los difractogramas de las micelas de P2-P4 liofilizadas cargadas con CBD mediante las metodologías de coprecipitación y partición, además de cada uno de los componentes por separado se dan en la figura 20.

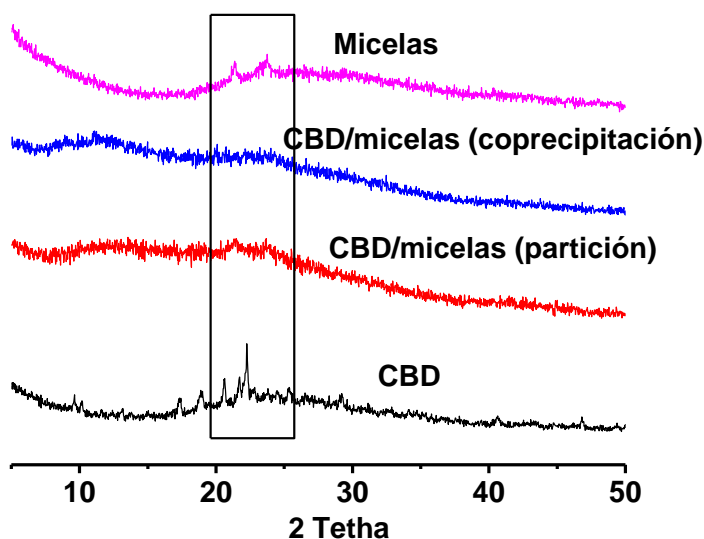


Figura 20. Difractogramas de las micelas vacías y cargadas con CBD comparadas con el fármaco libre.

A partir de la figura 20, se deduce que el polímero P2-P4 en las micelas sin fármaco presenta baja cristalinidad, al igual que en las micelas cargadas con CBD por el proceso de partición. En ambas muestras se observan las señales a 23,7° y 21,4° del PCL, mientras que en las micelas preparadas por coprecipitación no se presentan estas señales. Sumado a lo anterior, las micelas cargadas con CBD no presentan las señales del principio activo.

La razón por la cual las señales referentes a la presencia de estructuras semicristalinas del copolímero de P2-P4 se encuentran en las micelas cargadas con CBD por partición, esto podría deberse a que los cristales se forman en la nanoprecipitación previa y una vez se inyecta el CBD, este ingresa en la micela, ocupando principalmente el volumen libre de las regiones amorfas y disociando ligeramente los cristales. El caso contrario se da cuando se inyectan juntos el CBD y el copolímero, ya que esto constituye una coprecipitación y el fármaco impide la cristalización de la PCL en el núcleo micelar.

#### **4.4.10 Estudio de la estabilidad coloidal y degradación de CBD**

La estabilidad coloidal es un parámetro crítico en la preparación de sistemas coloidales, ya que una vez se obtienen las micelas cargadas con los principios activos, estas se convierten en una formulación con posible aplicación farmacéutica. Por esta razón, conocer cuánto tiempo pueden permanecer estos sistemas sin agregarse protegiendo el fármaco de su degradación es necesario para determinar la calidad de la formulación preparada.

Para determinar la estabilidad de los sistemas coloidales se inspecciona que las dispersiones no muestren la presencia de precipitados, ya que esto se asocia a procesos de agregación. La figura 21 muestra fotografías de las formulaciones micelares en diferentes períodos de almacenamiento para diferentes precursores poliméricos. Las formulaciones obtenidas con los polímeros de 2 unidades de ácidos grasos tienen presencia de sólidos en el fondo del recipiente, lo que indica que no son estables, contrario a las dispersiones preparadas con copolímeros con 5 unidades de ácidos grasos. Se observa también que las micelas con 40% de DLC

y preparadas con P2-P4 son estables por 9 meses, pero 1 año después se empiezan a agregar.

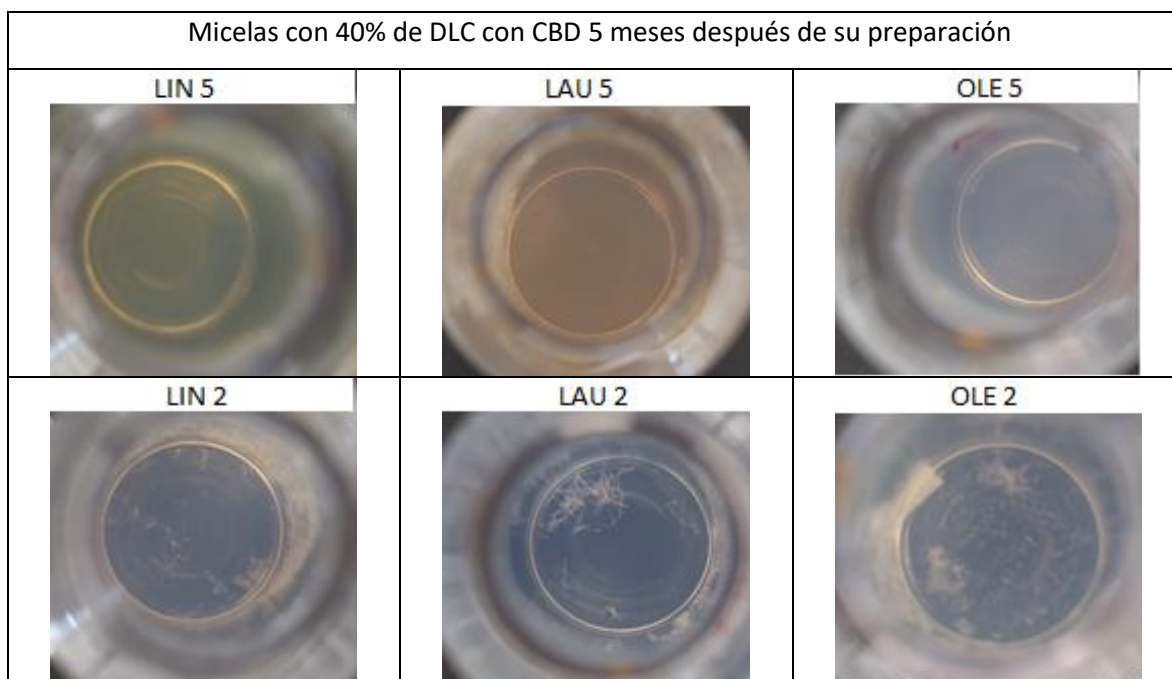


Figura 21. Fotografías de las dispersiones coloidales varios meses después de su preparación.

La tabla 11 muestra los valores de  $D_h$  y del DLC para las micelas cargadas con CBD obtenidas con los polímeros de 5 unidades de ácidos grasos y P2-P4 recién preparadas (inicial) y varios meses después de su formación (final). Las micelas de

P2-P4 y LIN 5 con ambas cargas de fármaco no han presentado cambios significativos en su tamaño, lo que indica estabilidad coloidal. Otros sistemas como las micelas de OLE 5 y LAU 5 con 40% de DLC aproximadamente disminuyeron su tamaño sugiriendo que probablemente no habían alcanzado un estado de equilibrio. Por otro lado, el CBD fue protegido más eficientemente con el copolímero P2-P4, mientras que para LIN 5 se exhibió la degradación más sustancial.

**Tabla 11. Tamaños de nanopartículas y valores de % de encapsulación recién preparadas y varios meses después.**

<i>Micelas</i>	<i>Dh (nm) (inicial)</i>	<i>DPI (antes)</i>	<i>Dh (nm) (final)</i>	<i>DPI (después)</i>	<i>%DLC (inicial)</i>	<i>% DLC (final)</i>
<b>P2-P4</b>	158,00	0,29	165,50	0,28	59,39	49,30
<b>LAU 5</b>	61,00	0,06	66,84	0,23	56,98	33,07
<b>LIN 5</b>	62,00	0,15	60,44	0,12	58,57	5,61
<b>P2-P4</b>	60,57	0,20	61,09	0,18	38,42	38,95
<b>LIN 5</b>	98,65	0,47	97,27	0,43	40,39	7,75
<b>OLE 5</b>	96,07	0,19	76,65	0,44	32,51	32,72
<b>LAU 5</b>	113,40	0,48	81,97	0,27	40,65	39,33

#### **4.4.11 Estudio morfológico por Microscopía de transmisión de electrones**

La morfología de los sistemas micelares obtenidos se estudió usando TEM. La figura 22 muestra imágenes de las micelas con CBD para P2-P4 (figura 22 A) y LIN 5 (figura 22 B) con 58% de DLC luego de 3 meses de su preparación. De las imágenes es claro que las micelas poseen forma esférica y que no se agregan después de 3 meses. Se observa que las micelas de P2-P4 en la figura 22 A son muy pequeñas con respecto de la medida por DLS, la cual es mostrada en la tabla 11, ya que hay un cambio de 160 a 30 nm. Esto es posiblemente debido a que la dilución del sistema genera que este cambie su conformación, resultando en menores tamaños.

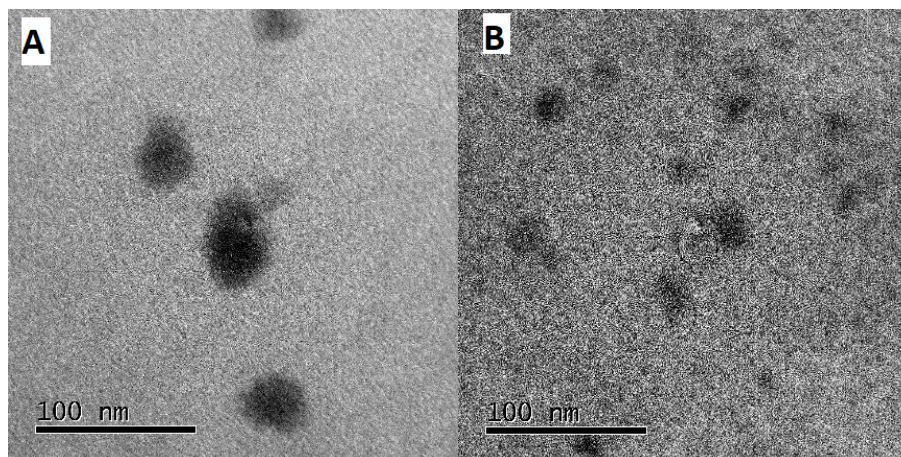


Figura 22. Imágenes de TEM de las micelas con 58% de DLC aproximadamente de los polímeros P2-P4 y LIN 5.

#### 4.5 Diseño de una formulación analgésica empleando los polímeros desarrollados

A partir de los copolímeros sintetizados en la primera parte de la investigación, se desarrollaron formulaciones basadas en extractos de cannabis ricos en CBD (30% peso/volumen) y THC (70% peso/volumen), posterior a lo cual se evaluó su actividad analgésica empleando un modelo *in-vivo*. Estas actividades se realizaron en cooperación con el grupo de ofidismo de la Universidad de Antioquia. Teniendo en cuenta los resultados anteriores, especialmente los referentes a la estabilidad del CBD frente a la degradación durante su almacenamiento, se seleccionaron los copolímeros OLE 5, LAU 5 y P2-P4 como precursores de los vehículos micelares para los extractos ricos en CBD y THC.

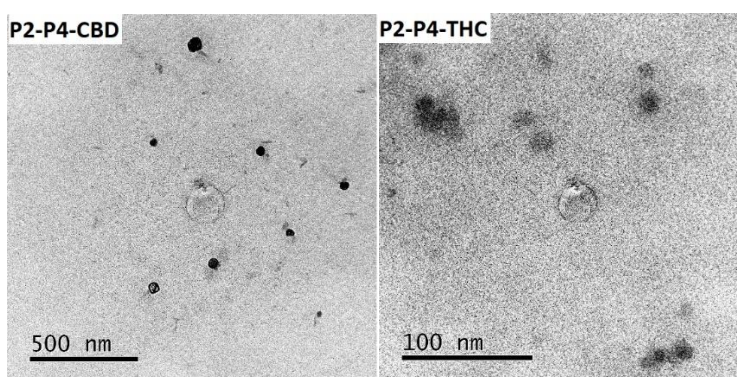
En primer lugar, se realiza una optimización de la proporción agua:solvente usada en la encapsulación de CBD para una relación en peso polímero:extracto 5:2 con P2-P4, comparándose los tamaños de los sistemas micelares obtenidos empleando DLS, como muestra la tabla 12. De acuerdo con los resultados, el menor tamaño de partícula se logra incrementando la fracción de agua durante el proceso. Sin embargo, cuando se excede la relación fase acuosa:orgánica de 1:1, se presenta separación de fases, lo que supone que el extracto se encapsula en muy baja proporción. Dentro de las 4 condiciones evaluadas se decide usar la de proporción 1:5 para encapsular los extractos ya que permite obtener micelas con un menor tamaño usando el menor volumen de agua, necesario en ensayos *in-vivo*, como se

mostrará posteriormente. Una vez se determinó la relación agua a solvente orgánico se efectuó la encapsulación del ensayo por nanoprecipitación como se describió anteriormente, pero a una escala mayor. Para el caso de las micelas preparadas con los copolímeros con ácidos grasos en su estructura se hizo uso de una relación en peso de polímero:extracto de 1:1.

**Tabla 12.** Muestra la influencia de las proporciones agua:acetona (A:A) en el tamaño de las micelas dejando las proporción 5:2 en peso de polímero y extracto de CBD constantes. S.F: separación de fases.

A:A	Dh (nm)	PDI	S.F
1:10	44,66	0,21	No
1:5	86,74	0,22	No
1:3	118,85	0,25	No
1:1	94,04	0,19	Sí

La tabla 13 muestra los valores del DLC y Dh para las micelas cargadas con los extractos de CBD y THC. Se observa que los polímeros con ácidos grasos permitieron obtener micelas con alto EE, tamaños pequeños y baja dispersidad, mientras que las micelas preparadas con P2-P4 mostraron alta dispersidad y bajo DLC. Las diferencias presentadas en la encapsulación del extracto de CBD con respecto del compuesto puro se pueden asociar a un antagonismo entre los compuestos extracto y el CBD, lo que genera que el valor de EE disminuya significativamente. Por otro lado, la figura 23 muestra las imágenes de TEM para los extractos de CBD y THC encapsulados con P2-P4, que evidencian que las micelas tienen una forma esférica resultado observado varias veces en esta investigación.



**Figura 23.** imágenes TEM de las micelas de P2-P4 con los extractos de CBD y THC.

Tabla 13. Valores de % de encapsulación de los extractos de CBD y THC.

<b>Copolímero</b>	<b>Extracto</b>	<b>% DLC</b>	<b>% EE</b>	<b>Dh</b>	<b>DPI</b>
OLE 5	CBD	11,30±0,54	75,36±3,61	75,2	0,4
OLE 5	THC	17,35±0,22	59,36±2,67	46,8	0,1
LAU 5	CBD	10,98±0,01	73,24±0,09	124,5	0,2
LAU 5	THC	17,31±0,97	47,48±2,77	47,9	0,1
P2-P4	CBD	3,46±0,59	30,01±6,93	63,8	0,7
P2-P4	THC	11,63±0,43	49,58±0,45	63,7	0,6

#### 4.5.1 Evaluación de los perfiles de liberación

Los perfiles de liberación permiten determinar que tanto tiempo le toma al fármaco salir de la micela, lo cual es necesario para saber que tanto tiempo puede mantenerse el efecto farmacológico en intervalos de tiempo que abarcan varias horas o días después de la administración de las formulaciones.

En esta sección se muestran los perfiles de liberación obtenidos mediante un proceso de diálisis. Las formulaciones micelares se dializaron frente a un exceso de un buffer de PBS al 1% en tween 80, para obtener condiciones de lavado. Para la cuantificación de la liberación, se tomaron alícuotas de las dispersiones micelares presentes en el cassette de diálisis y se hizo un seguimiento en el tiempo de la señal correspondiente a los principales principios activos, es decir el CBD y el THC por HPLC. Aquí se correlacionó la disminución de la señal de estos compuestos en el cromatograma con la liberación, se determinó que el % de liberación correspondía a la relación entre el área en el tiempo de la toma de la alícuota y el valor inicial.

En la figura 24 se presentan los perfiles de liberación correspondientes a los sistemas micelares obtenidos a partir de P2-P4, OLE 5 y LAU 5 cargadas con extractos de CBD y THC. Para las formulaciones THC/LAU 5 con y CBD/OLE 5 se

observa la supresión del efecto Burst (liberación rápida en las primeras horas) que presentan las demás formulaciones. La formulación CBD/OLE 5 presentó el mejor control en la liberación durante un tiempo prolongado. Por su parte la liberación más rápida se presentó usando la formulación de CBD/LAU 5 en la cual se llega a un 100 % de liberación luego de 72 h.

La tabla 14 muestra la correlación de las liberaciones con los modelos teóricos. Los perfiles de liberación para P2-P4 y OLE-5 se ajustan al modelo de Higuchi, lo que sugiere que en estos sistemas los fármacos se liberan por difusión Fickiana. Los perfiles de liberación con LAU-5, al mismo tiempo, ajustan al modelo de Korsmeyer-Peppas, en donde la formulación de LAU-5 con THC presenta una constante que indica un mecanismo de liberación tipo II.

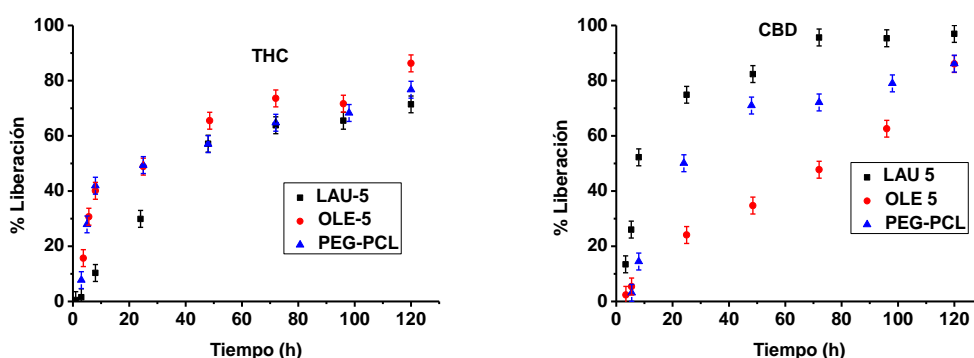


Figura 24. Perfiles de liberación de los extractos de CBD y THC.

Tabla 14. Ajuste matemático de las cinéticas de liberación de los extractos de CBD y THC.

<b>Formulación</b>		<b>Rango de tiempo</b>	<b>Korsmeyer-Peppas</b>		<b>Higuchi</b>	
<i>Polímero</i>	<i>Fármaco</i>	<i>h</i>	$R^2$	$K (h^{-1})$	$R^2$	$K (h^{-1})$
PEG-PCL	CBD	24-120	0,9989	0,3323	0,9985	0,059
LAU-5	CBD	8-72	0,9823	0,2652	0,9688	0,073
OLE-5	CBD	3-120	0,9866	0,9395	0,9889	0,0724
PEG-PCL	THC	8-120	0,9704	0,2096	0,9853	0,0411
LAU-5	THC	1-48	0,9834	1,2717	0,9726	9,7362
OLE-5	THC	25-120	0,9892	0,3607	0,9819	0,0618

#### 4.5.2 Resultados para medidas de analgesia in-vivo

Como parte del proyecto de investigación se llevó a cabo la evaluación del efecto analgésico que presentan las formulaciones de THC y CBD en ensayos *in-vivo*.

Estos experimentos fueron llevados a cabo en cooperación con la Universidad de Antioquia en el grupo de Ofidismo.

La tabla 15 muestra los valores de analgesia medidos en un ensayo Tail-Flick. En este caso se presenta el efecto analgésico a distintos tiempos para la formulación CBD/OLE 5 administrada por vía oral a una dosis de 5mg/kg. La respuesta analgésica se mide como el tiempo que tarda el ratón en retirar la cola de un estímulo térmico. Los valores obtenidos se coparán con un control positivo (CP) de morfina, y un control negativo (CN) formado por individuos no tratados. Se observa que la morfina pierde efecto a las dos horas, mientras que la formulación de CBD/OLE 5 permitió obtener un efecto sostenido desde las 24 hasta las 96 horas, lo que la hace promisoría de ser usada en tratamientos para el dolor crónico.

**Tabla 15. Resultados para ensayos de analgesia *in-vivo***

<b>Tiempo (h)</b>	<b>CN(s)</b>	<b>CP(s)</b>	<b>CBD/OLE 5</b>
0,0	4,2	5,1	5,7
0,5	4,6	10,6	5,5
1,0	5,1	11,1	4,6
2,0	4,9	7,7	5,8
24,0	5,7	6,7	7,9
48,0	4,5	8,2	7,7
72,0	5,7	6,4	8,4
96,0	5,7	5,4	9,3
144,0	5,4	5,6	5,5

## 5. Conclusiones.

La combinación de ROP y química clic permite la obtención de polímeros con funcionalidades como los ácidos grasos y puede ser empleado en la modificación con otro tipo de moléculas que le confiera propiedades al copolímero.

La encapsulación del CBD se ve favorecida, posiblemente ya que su baja tendencia a agregarse favorece su interacción con el polímero, mientras que la encapsulación de la curcumina depende de las condiciones utilizadas para llevar a cabo el proceso debido a que su encapsulación está determinada por parámetros cinéticos.

Los copolímeros son promisorios para el desarrollo de formulaciones analgésicas debido a sus altos valores encapsulación de CBD y THC en los extractos usados y los valores de analgesia observados en los ensayos *in-vivo*.

## Bibliografía.

- [1] N. Boroumand, S. Samarghandian, and S. I. Hashemy, "Immunomodulatory, anti-inflammatory, and antioxidant effects of curcumin," *J. HerbMed Pharmacol.*, vol. 7, no. 4, pp. 211–219, 2018, doi: 10.15171/jhp.2018.33.
- [2] N. Bruni, C. Della Pepa, S. Oliaro-Bosso, E. Pessione, D. Gastaldi, and F. Dosio, "Cannabinoid Delivery Systems for Pain and Inflammation Treatment," *Molecules*, vol. 23, no. 10, p. 2478, Sep. 2018, doi: 10.3390/molecules23102478.
- [3] P. Grossen, D. Witzigmann, S. Sieber, and J. Huwyler, "PEG-PCL-based nanomedicines: A biodegradable drug delivery system and its application," *J. Control. Release*, vol. 260, no. April, pp. 46–60, 2017, doi: 10.1016/j.jconrel.2017.05.028.
- [4] E. R. Arias, V. Angarita-Villamizar, Y. Baena, C. Parra-Giraldo, and L. D. Perez, "Phospholipid-conjugated peg-b-pcl copolymers as precursors of micellar vehicles for amphotericin b," *Polymers (Basel)*, vol. 13, no. 11, 2021, doi: 10.3390/polym13111747.
- [5] Z. Song, W. Zhu, N. Liu, F. Yang, and R. Feng, "Linolenic acid-modified PEG-PCL micelles for curcumin delivery," *Int. J. Pharm.*, vol. 471, no. 1–2, pp. 312–321, 2014, doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.05.059.
- [6] R. F. Storey and J. W. Sherman, "Kinetics and mechanism of the stannous octoate-catalyzed bulk polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone," *Macromolecules*, vol. 35, no. 5, pp. 1504–1512, 2002, doi: 10.1021/ma010986c.
- [7] V. D. Bock, H. Hiemstra, and J. H. Van Maarseveen, "Cu I-catalyzed alkyne-azide 'click' cycloadditions from a mechanistic and synthetic perspective," *European J. Org. Chem.*, no. 1, pp. 51–68, 2006, doi: 10.1002/ejoc.200500483.
- [8] H. C. Kolb, M. G. Finn, and K. B. Sharpless, "Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 40, no. 11, pp. 2004–2021, 2001, doi: 10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5.
- [9] R. Kretschmar, "Colloid-Facilitated Sorption and Transport," *Encycl. Soils Environ.*, vol. 4, no. 1993, pp. 276–284, 2004, doi: 10.1016/B0-12-348530-4/00201-0.
- [10] J. J. Sheng, "Surfactant Flooding," *Mod. Chem. Enhanc. Oil Recover.*, pp. 239–335, 2011, doi: 10.1016/b978-1-85617-745-0.00007-3.
- [11] M. L. Adams, A. Lavasanifar, and G. S. Kwon, "Amphiphilic block copolymers for drug delivery," *J. Pharm. ...*, vol. 92, no. 7, pp. 1343–1355, 2003.
- [12] S. C. Owen, D. P. Y. Chan, and M. S. Shoichet, "Polymeric micelle stability," *Nano Today*, vol. 7, no. 1, pp. 53–65, 2012, doi: 10.1016/j.nantod.2012.01.002.

- [13] R. Liu, *Water-Insoluble Drug Formulation*, 2nd ed. CRC Press, 2008.
- [14] W. B. Liechty, "Polymer for Drug Delivery," *Annu Rev Chem Biomol Eng.*, vol. 1, no. 1, pp. 149–173, 2010, doi: 10.1146/annurev-chembioeng-073009-100847.Polymers.
- [15] Y. J. Rodriguez, L. F. Quejada, J. C. Villamil, Y. Baena, C. M. Parra-Giraldo, and L. D. Perez, "Development of amphotericin b micellar formulations based on copolymers of poly(Ethylene glycol) and poly( $\epsilon$ -caprolactone) conjugated with retinol," *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 3, 2020, doi: 10.3390/pharmaceutics12030196.
- [16] M. Maniruzzaman, M. J. Snowden, M. S. Bradely, and D. Douroumis, "Studies of intermolecular interactions in solid dispersions using advanced surface chemical analysis," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 91, pp. 74212–74219, 2015, doi: 10.1039/c5ra13176f.
- [17] S. Hewlings and D. Kalman, "Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health," *Foods*, vol. 6, no. 10, p. 92, 2017, doi: 10.3390/foods6100092.
- [18] P. F. Whiting *et al.*, "Cannabinoids for medical use: A systematic review and meta-analysis," *JAMA - J. Am. Med. Assoc.*, vol. 313, no. 24, pp. 2456–2473, 2015, doi: 10.1001/jama.2015.6358.
- [19] T. Hložek *et al.*, "Pharmacokinetic and behavioural profile of THC, CBD, and THC+CBD combination after pulmonary, oral, and subcutaneous administration in rats and confirmation of conversion in vivo of CBD to THC," *Eur. Neuropsychopharmacol.*, vol. 27, no. 12, pp. 1223–1237, 2017, doi: 10.1016/j.euroneuro.2017.10.037.
- [20] K. Y. Yang, L. C. Lin, T. Y. Tseng, S. C. Wang, and T. H. Tsai, "Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 853, no. 1–2, pp. 183–189, 2007, doi: 10.1016/j.jchromb.2007.03.010.
- [21] D. J. McClements and H. Xiao, "Potential biological fate of ingested nanoemulsions: Influence of particle characteristics," *Food Funct.*, vol. 3, no. 3, pp. 202–220, 2012, doi: 10.1039/c1fo10193e.
- [22] J. Aparicio-Blanco, V. Sebastián, J. P. Benoit, and A. I. Torres-Suárez, "Lipid nanocapsules decorated and loaded with cannabidiol as targeted prolonged release carriers for glioma therapy: In vitro screening of critical parameters," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 134, pp. 126–137, 2019, doi: 10.1016/j.ejpb.2018.11.020.
- [23] A. P. Matarazzo *et al.*, "Mucoadhesive nanostructured lipid carriers as a cannabidiol nasal delivery system for the treatment of neuropathic pain," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 159, no. December 2020, 2021, doi: 10.1016/j.ejps.2020.105698.
- [24] V. De Leo *et al.*, "Encapsulation of curcumin-loaded liposomes for colonic

drug delivery in a pH-responsive polymer cluster using a pH-driven and organic solvent-free process,” *Molecules*, vol. 23, no. 4, pp. 1–15, 2018, doi: 10.3390/molecules23040739.

- [25] S. Lawson, K. Newport, N. Pederniera, A. A. Rownaghi, and F. Rezaei, “Curcumin Delivery on Metal-Organic Frameworks: The Effect of the Metal Center on Pharmacokinetics within the M-MOF-74 Family,” *ACS Appl. Bio Mater.*, vol. 4, no. 4, pp. 3423–3432, 2021, doi: 10.1021/acsabm.1c00009.
- [26] R. Karimi Alavijeh and K. Akhbari, “Biocompatible MIL-101(Fe) as a Smart Carrier with High Loading Potential and Sustained Release of Curcumin,” *Inorg. Chem.*, vol. 59, no. 6, pp. 3570–3578, 2020, doi: 10.1021/acs.inorgchem.9b02756.
- [27] J. Charmi, H. Nosrati, J. Mostafavi Amjad, R. Mohammadkhani, and H. Danafar, “Polyethylene glycol (PEG) decorated graphene oxide nanosheets for controlled release curcumin delivery,” *Heliyon*, vol. 5, no. 4, p. e01466, 2019, doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01466.
- [28] X. Shi *et al.*, “Heparin-reduced graphene oxide nanocomposites for curcumin delivery:: In vitro, in vivo and molecular dynamics simulation study,” *Biomater. Sci.*, vol. 7, no. 3, pp. 1011–1027, 2019, doi: 10.1039/c8bm00907d.
- [29] R. Pushpalatha, S. Selvamuthukumar, and D. Kilimozhi, “Cross-linked, cyclodextrin-based nanosponges for curcumin delivery - Physicochemical characterization, drug release, stability and cytotoxicity,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 45, no. November 2017, pp. 45–53, 2018, doi: 10.1016/j.jddst.2018.03.004.
- [30] M. M. Lübtow *et al.*, “Drug induced micellization into ultra-high capacity and stable curcumin nanoformulations: Physico-chemical characterization and evaluation in 2D and 3D in vitro models,” *J. Control. Release*, vol. 303, no. February, pp. 162–180, 2019, doi: 10.1016/j.jconrel.2019.04.014.
- [31] Y. Liu *et al.*, “Stable Polymer Nanoparticles with Exceptionally High Drug Loading by Sequential Nanoprecipitation,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 59, no. 12, pp. 4720–4728, 2020, doi: 10.1002/anie.201913539.
- [32] R. K. Prud and J. Nicholas, “Application Publication ( 10 ) Pub . No . : US 2020/0368163 A1,” vol. 2020, 2020.
- [33] S. He *et al.*, “Metal-organic frameworks for advanced drug delivery,” *Acta Pharm. Sin. B*, vol. 11, no. 8, pp. 2362–2395, 2021, doi: 10.1016/j.apsb.2021.03.019.
- [34] P. Horcajada *et al.*, “Metal–Organic Frameworks in Biomedicine,” *Chem. Rev.*, vol. 112, no. 2, pp. 1232–1268, 2012.
- [35] L. Dongmei, W. Zhiwei, Z. Qi, C. Fuyi, S. Yujuan, and L. Xiaodong, “Drinking water toxicity study of the environmental contaminant--Bromate,” *Regul.*

*Toxicol. Pharmacol.*, vol. 73, no. 3, pp. 802–810, 2015, doi: 10.1016/j.yrtph.2015.10.015.

- [36] M. E. Davis, Z. Chen, and D. M. Shin, “Nanoparticle therapeutics: An emerging treatment modality for cancer,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 7, no. 9, pp. 771–782, 2008, doi: 10.1038/nrd2614.
- [37] D. Press, “High drug-loading nanomedicines : progress , current status , and prospects,” pp. 4085–4109, 2017.
- [38] X. Zhang *et al.*, “Distribution and biocompatibility studies of graphene oxide in mice after intravenous administration,” *Carbon N. Y.*, vol. 49, no. 3, pp. 986–995, 2011, doi: 10.1016/j.carbon.2010.11.005.
- [39] A. Aghabegi Moghanjoughi, D. Khoshnevis, and A. Zarrabi, “A concise review on smart polymers for controlled drug release,” *Drug Deliv. Transl. Res.*, vol. 6, no. 3, pp. 333–340, 2016, doi: 10.1007/s13346-015-0274-7.
- [40] J. Ulbricht, R. Jordan, and R. Luxenhofer, “On the biodegradability of polyethylene glycol, polypeptoids and poly(2-oxazoline)s,” *Biomaterials*, vol. 35, no. 17, pp. 4848–4861, 2014, doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.02.029.
- [41] C. Y. Gong *et al.*, “Biodegradable self-assembled PEG-PCL-PEG micelles for hydrophobic drug delivery, part 2: In vitro and in vivo toxicity evaluation,” *J. Nanoparticle Res.*, vol. 13, no. 2, pp. 721–731, 2011, doi: 10.1007/s11051-010-0071-7.
- [42] M. Zamani, K. Rostamizadeh, H. Kheiri Manjili, and H. Danafar, “In vitro and in vivo biocompatibility study of folate-lysine-PEG-PCL as nanocarrier for targeted breast cancer drug delivery,” *Eur. Polym. J.*, vol. 103, no. April, pp. 260–270, 2018, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2018.04.020.
- [43] H. Xin, X. Sha, X. Jiang, W. Zhang, L. Chen, and X. Fang, “Anti-glioblastoma efficacy and safety of paclitaxel-loading Angiopep-conjugated dual targeting PEG-PCL nanoparticles,” *Biomaterials*, vol. 33, no. 32, pp. 8167–8176, 2012, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.07.046.
- [44] F. Landi, C. M. Johansson, D. J. Campopiano, and A. N. Hulme, “Synthesis and application of a new cleavable linker for ‘click’-based affinity chromatography,” *Org. Biomol. Chem.*, vol. 8, no. 1, pp. 56–59, 2010, doi: 10.1039/b916693a.
- [45] L. Zhou, H. He, M. C. Li, S. Huang, C. Mei, and Q. Wu, “Grafting polycaprolactone diol onto cellulose nanocrystals via click chemistry: Enhancing thermal stability and hydrophobic property,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 189, no. January, pp. 331–341, 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2018.02.039.
- [46] R. S. Kalhapure and K. G. Akamanchi, “Oleic acid based heterolipid synthesis, characterization and application in self-microemulsifying drug delivery system,” *Int. J. Pharm.*, vol. 425, no. 1–2, pp. 9–18, 2012, doi:

10.1016/j.ijpharm.2012.01.004.

- [47] D. B Gugulothu and C. B Fernandes, "A Versatile High Performance Liquid Chromatography Method for Simultaneous Determination of Three Curcuminoids in Pharmaceutical Dosage forms," *Pharm. Anal. Acta*, vol. 03, no. 04, 2012, doi: 10.4172/2153-2435.1000156.
- [48] D. Hernan Perez De La Ossa *et al.*, "Poly- $\epsilon$ -caprolactone microspheres as a drug delivery system for cannabinoid administration: Development, characterization and in vitro evaluation of their antitumoral efficacy," *J. Control. Release*, vol. 161, no. 3, pp. 927–932, 2012, doi: 10.1016/j.jconrel.2012.05.003.
- [49] S. Atta, J. Cohen, J. Kohn, and A. J. Gormley, "Ring opening polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone through water," *Polym. Chem.*, vol. 12, no. 2, pp. 159–164, 2021, doi: 10.1039/d0py01481h.
- [50] H. Y. Li, B. Zhang, P. S. Chan, J. Weng, C. K. Tsang, and W. Y. T. Lee, "Convergent synthesis and characterization of fatty acid-conjugated poly(ethylene glycol)-block-poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for improved drug delivery to the brain," *Eur. Polym. J.*, vol. 98, no. August 2017, pp. 394–401, 2018, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2017.11.038.
- [51] A. V. Angarita-Villamizar, E. R. Arias, I. L. Diaz, and L. D. Perez, "Amphiphilic copolymers modified with oleic acid and cholesterol by combining ring opening polymerization and click chemistry with improved amphotericin B loading capacity," *J. Polym. Res.*, vol. 28, no. 1, 2021, doi: 10.1007/s10965-020-02392-y.
- [52] I. L. Diaz, C. A. Sierra, V. Jérôme, R. Freitag, and L. D. Perez, "Target grafting of poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) to biodegradable block copolymers," *J. Polym. Sci.*, vol. 58, no. 16, pp. 2168–2180, 2020, doi: 10.1002/pol.20200204.
- [53] A. F. Zahoor, S. Naheed, M. Irfan, S. Ahmad, M. N. Anjum, and M. Yousaf, "Advances in the synthesis and reactivity of acyl azides (2005-2015)," *Afinidad*, vol. 75, no. 583, 2018.
- [54] I. Cano, E. Álvarez, M. C. Nicasio, and P. J. Pérez, "Regioselective formation of 2,5-disubstituted oxazoles via copper(I)-catalyzed cycloaddition of acyl azides and 1-alkynes," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, no. 2, pp. 191–193, 2011, doi: 10.1021/ja109732s.
- [55] S. Zhang, C. Campagne, and F. Salaün, "Influence of solvent selection in the electrospraying process of polycaprolactone," *Appl. Sci.*, vol. 9, no. 3, 2019, doi: 10.3390/app9030402.
- [56] C. Bordes *et al.*, "Determination of poly( $\epsilon$ -caprolactone) solubility parameters: Application to solvent substitution in a microencapsulation process," *Int. J. Pharm.*, vol. 383, no. 1–2, pp. 236–243, 2010, doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.09.023.

- [57] L. Glavas, P. Olsén, K. Odelius, and A. C. Albertsson, "Achieving micelle control through core crystallinity," *Biomacromolecules*, vol. 14, no. 11, pp. 4150–4156, 2013, doi: 10.1021/bm401312j.
- [58] V. Känkänen *et al.*, "Evaluation of the effects of nanoprecipitation process parameters on the size and morphology of poly(ethylene oxide)-block-polycaprolactone nanostructures," *Int. J. Pharm.*, vol. 590, no. September, pp. 1–11, 2020, doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119900.
- [59] L. Piao, Z. Dai, M. Deng, X. Chen, and X. Jing, "Synthesis and characterization of PCL/PEG/PCL triblock copolymers by using calcium catalyst," *Polymer (Guildf.)*, vol. 44, no. 7, pp. 2025–2031, 2003, doi: 10.1016/S0032-3861(03)00087-9.
- [60] R. Feng, Z. Song, and G. Zhai, "Preparation and in vivo pharmacokinetics of curcumin-loaded PCL-PEG-PCL triblock copolymeric nanoparticles," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 7, pp. 4089–4098, 2012, doi: 10.2147/IJN.S33607.
- [61] S. Sunoqrot, A. Alsadi, O. Tarawneh, and R. Hamed, "Polymer type and molecular weight dictate the encapsulation efficiency and release of Quercetin from polymeric micelles," *Colloid Polym. Sci.*, vol. 295, no. 10, pp. 2051–2059, 2017, doi: 10.1007/s00396-017-4183-9.
- [62] M. Ukawala *et al.*, "Investigation on design of stable etoposide-loaded PEG-PCL micelles: Effect of molecular weight of PEG-PCL diblock copolymer on the in vitro and in vivo performance of micelles," *Drug Deliv.*, vol. 19, no. 3, pp. 155–167, 2012, doi: 10.3109/10717544.2012.657721.
- [63] A. Alalaiwe, G. Roberts, P. Carpinone, J. Munson, and S. Roberts, "Influence of PEG coating on the oral bioavailability of gold nanoparticles in rats," *Drug Deliv.*, vol. 24, no. 1, pp. 591–598, 2017, doi: 10.1080/10717544.2017.1282554.
- [64] L. P. Sze *et al.*, "Oral delivery of paclitaxel by polymeric micelles: A comparison of different block length on uptake, permeability and oral bioavailability," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 184, no. October, p. 110554, 2019, doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110554.
- [65] M. Kakran, N. G. Sahoo, I. L. Tan, and L. Li, "Preparation of nanoparticles of poorly water-soluble antioxidant curcumin by antisolvent precipitation methods," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 14, no. 3, 2012, doi: 10.1007/s11051-012-0757-0.
- [66] R. Prasad, K. M. Gupta, S. K. Poornachary, and S. V. Dalvi, "Elucidating the polymorphic behavior of curcumin during antisolvent crystallization: Insights from Raman spectroscopy and molecular modeling," *Cryst. Growth Des.*, vol. 20, no. 9, pp. 6008–6023, 2020, doi: 10.1021/acs.cgd.0c00728.
- [67] S. Som *et al.*, "Quality by Design-Based Crystallization of Curcumin Using Liquid Antisolvent Precipitation: Micromeritic, Biopharmaceutical, and Stability Aspects," *Assay Drug Dev. Technol.*, vol. 18, no. 1, pp. 11–33,

2020, doi: 10.1089/adt.2018.913.

- [68] A. A. Thorat and S. V. Dalvi, "Liquid antisolvent precipitation and stabilization of nanoparticles of poorly water soluble drugs in aqueous suspensions: Recent developments and future perspective," *Chem. Eng. J.*, vol. 181–182, pp. 1–34, 2012, doi: 10.1016/j.cej.2011.12.044.
- [69] R. W. Welker, *Basics and Sampling of Particles for Size Analysis and Identification*, vol. 4. Elsevier, 2012.
- [70] R. Balu, T. S. Sampath Kumar, M. Ramalingam, and S. Ramakrishna, "Electrospun polycaprolactone/Poly(1,4-butylene adipate-co-polycaprolactam) blends: Potential biodegradable scaffold for bone tissue regeneration," *J. Biomater. Tissue Eng.*, vol. 1, no. 1, pp. 30–39, 2011, doi: 10.1166/jbt.2011.1004.
- [71] J. Li, L. He, T. Liu, X. Cao, and H. Zhu, "Preparation and characterization of PEG/SiO<sub>2</sub> composites as shape-stabilized phase change materials for thermal energy storage," *Sol. Energy Mater. Sol. Cells*, vol. 118, pp. 48–53, 2013, doi: 10.1016/j.solmat.2013.07.017.
- [72] P. Sanphui, N. R. Goud, U. B. R. Khandavilli, S. Bhanoth, and A. Nangia, "New polymorphs of curcumin," *Chem. Commun.*, vol. 47, no. 17, pp. 5013–5015, 2011, doi: 10.1039/c1cc10204d.
- [73] A. L. Stinchcomb, S. Valiveti, D. C. Hammell, and D. R. Ramsey, "Human skin permeation of  $\Delta^8$ -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 56, no. 3, pp. 291–297, 2003, doi: 10.1211/0022357022791.
- [74] N. Francke, L. Grüne, and H. Bunjes, "Formulation of Cannabidiol in Lipid Carriers," *Symp. Pharm. Eng. Res. Sph.*, no. September, pp. 25–27, 2019.

## Anexos.

Tabla 1 . Muestra las encapsulaciones y la mezcla de solventes usada para su obtención. Iny: inyecciones, Peso (mg): peso del polímero/peso del fármaco.

<b>THF (g)</b>	<b>Acetona (g)</b>	<b>Metanol (g)</b>	<b>Agua (mL)</b>	<b>Iny.</b>	<b>Peso (mg)</b>	<b>%EE</b>	<b>%DLC (total)</b>	<b>%DLC (CUR)</b>
0,75	0,75	0,90	5	2	8/8	25,7	12,8	3,87
1,20	0,90	0,30	5	2	8/8	23,5	11,7	3,77
1,20	1,20	0,00	5	2	8/8	28,7	14,4	3,87
2,25	2,25	2,70	5	5	24/24	38,5	19,2	2,89
3,60	2,70	0,90	5	5	24/24	35,1	17,6	4,09
3,60	3,60	0,00	5	5	24/24	32,5	16,2	4,16
0,90	2,70	3,60	10	10	24/24	26,8	13,4	2,71
0,90	0,90	1,80	10	10	24/24	27,9	14,0	3,71
1,80	1,80	3,60	10	10	24/24	33,4	16,7	3,87
1,80	1,80	3,60	5	5	24/24	22,7	11,3	2,23
2,25	2,25	3,60	10	1	24/24	18,7	9,3	3,64
3,60	0,00	3,60	10	10	24/24	27,7	13,8	3,41
1,25	1,25	2,50	10	10	24/24	30,2	15,1	3,83
0,00	7,20	0,00	10	10	24/24	33,3	16,6	3,29
0,00	3,60	3,60	10	10	24/24	22,6	11,3	1,99
7,20	0,00	0,00	10	10	24/24	24,8	12,4	2,69
1,80	0,00	1,80	10	10	24/24	23,0	11,5	3,72

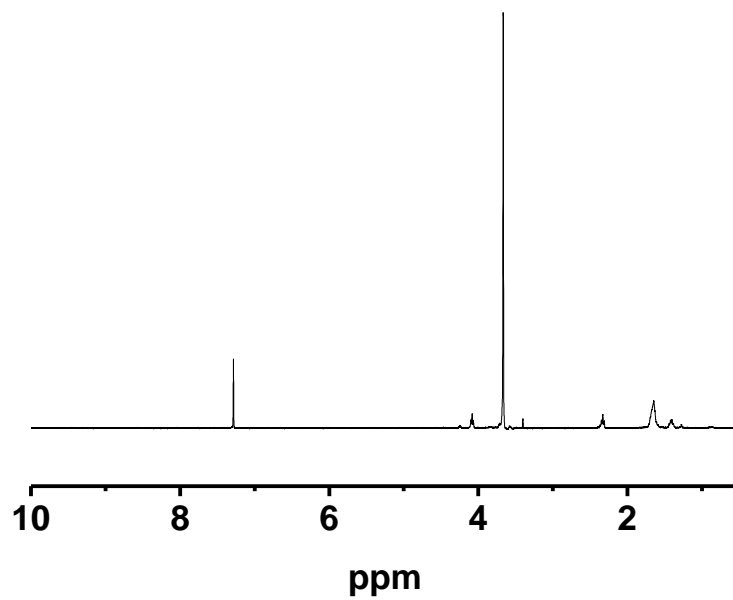


Figura 1. Espectro RMN-<sup>1</sup>H de la polimerización ROP con proporción peso (mg):volumen de tolueno (mL) 75:1 luego de 2 horas de reacción.

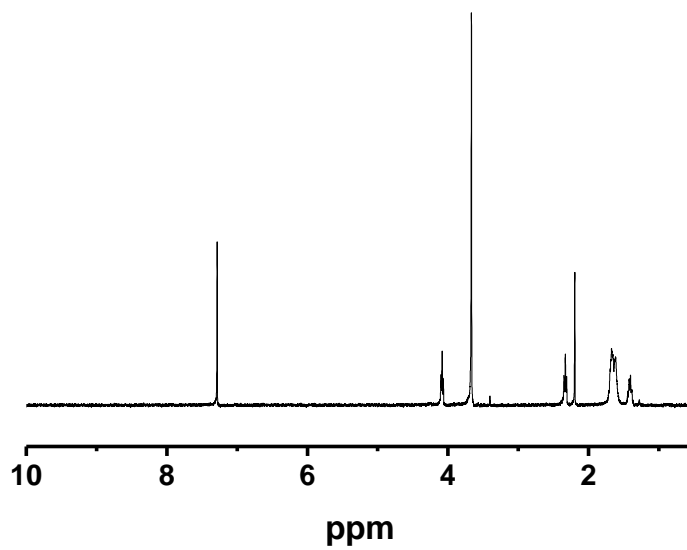


Figura 2. Espectro RMN-<sup>1</sup>H de la polimerización ROP con proporción peso (mg):volumen de tolueno (mL) 75:1 luego de 8 horas de reacción.

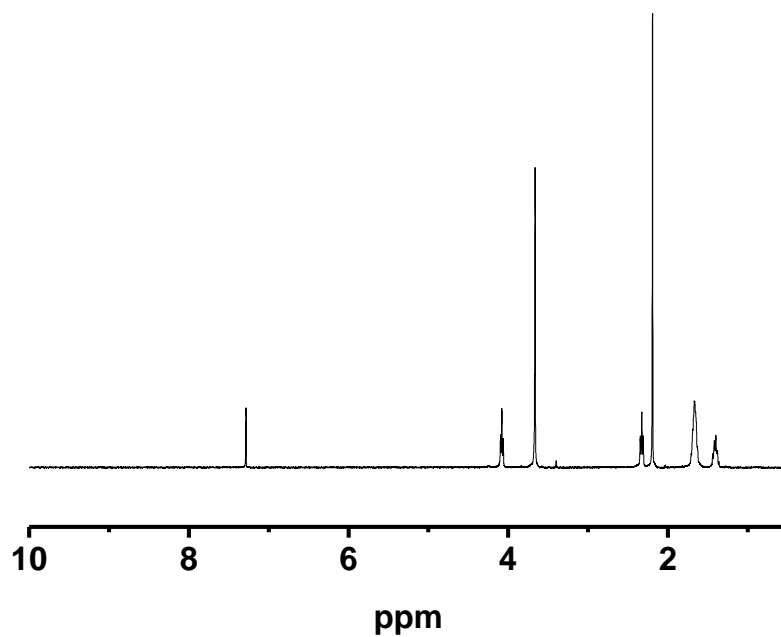


Figura 3. Espectro RMN-<sup>1</sup>H de la polimerización ROP con proporción peso (mg):volumen de tolueno (mL) 15:1 luego de 24 horas de reacción.

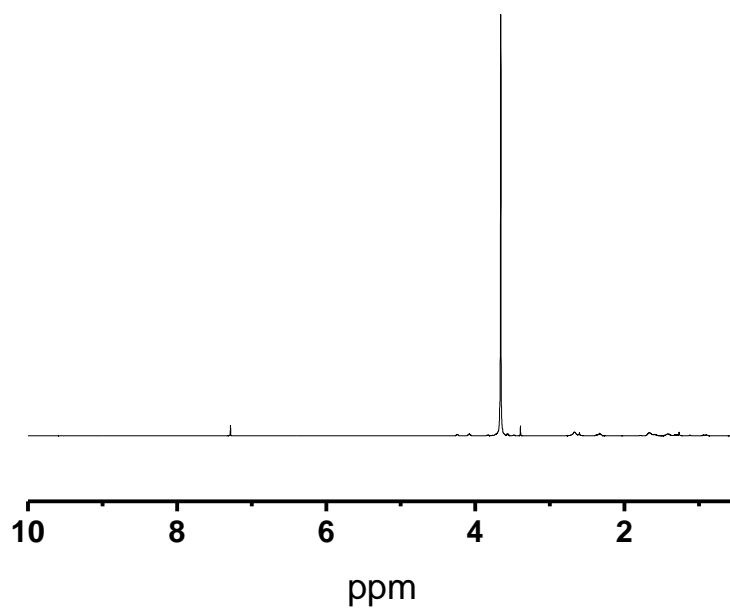


Figura 4. Espectro RMN-<sup>1</sup>H de la polimerización ROP con proporción peso (mg):volumen de tolueno (mL) 75:1 luego de 2 horas de reacción.

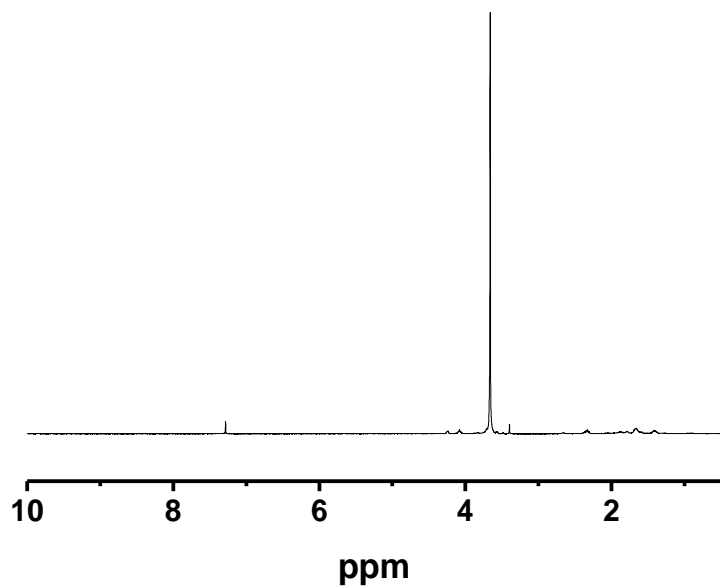


Figura 5. Espectro RMN-<sup>1</sup>H de la polimerización ROP con proporción peso (mg):volumen de tolueno (mL) 75:1 luego de 8 horas de reacción.

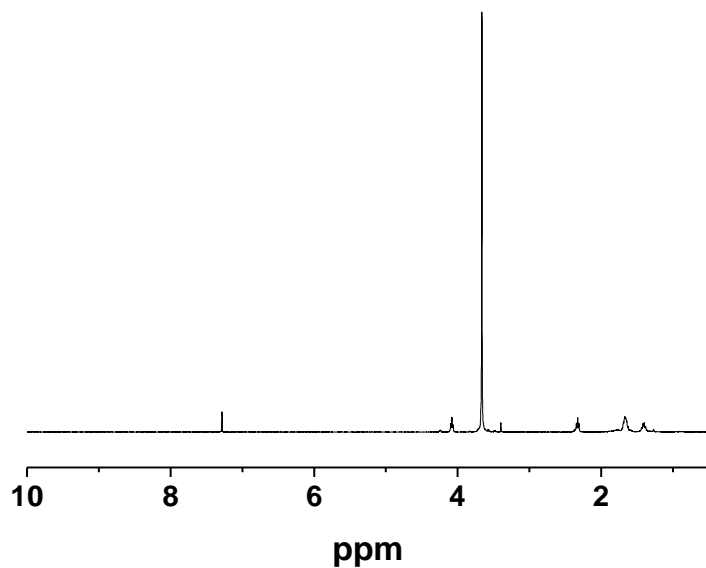


Figura 6. Espectro RMN-<sup>1</sup>H de la polimerización ROP con proporción peso (mg):volumen de tolueno (mL) 75:1 luego de 24 horas de reacción.

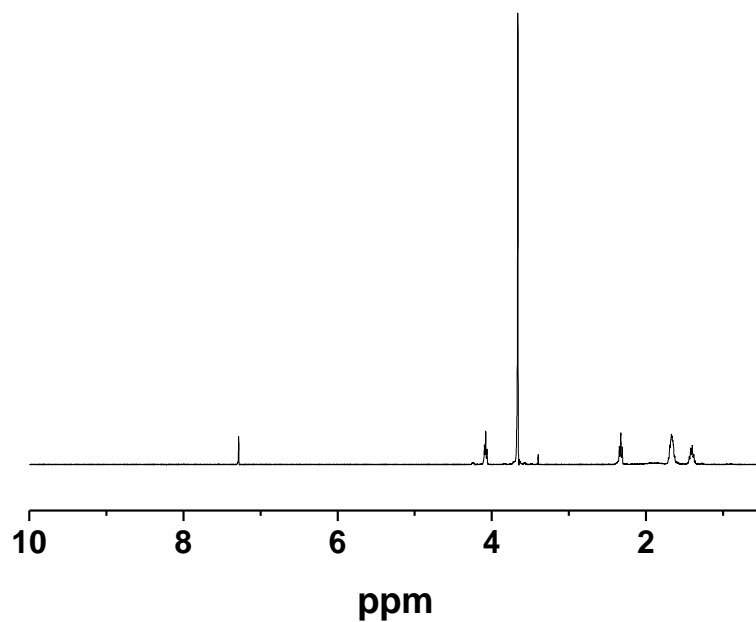


Figura 7. Espectro RMN-<sup>1</sup>H de la polimerización ROP con proporción peso (mg):volumen de tolueno (mL) 75:1 luego de 48 horas de reacción.

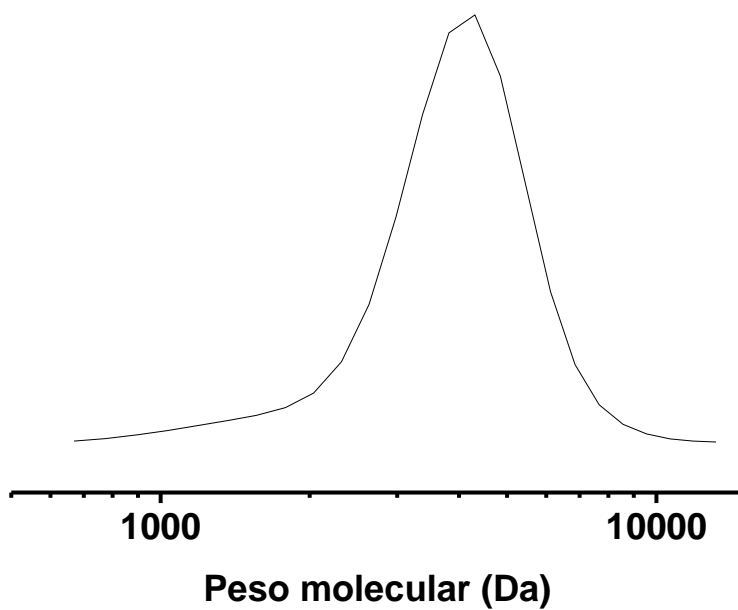


Figura 8. Distribución de pesos moleculares de la polimerización ROP con proporción peso (mg):volumen de tolueno (mL) 15:1 luego de 2 horas de reacción.

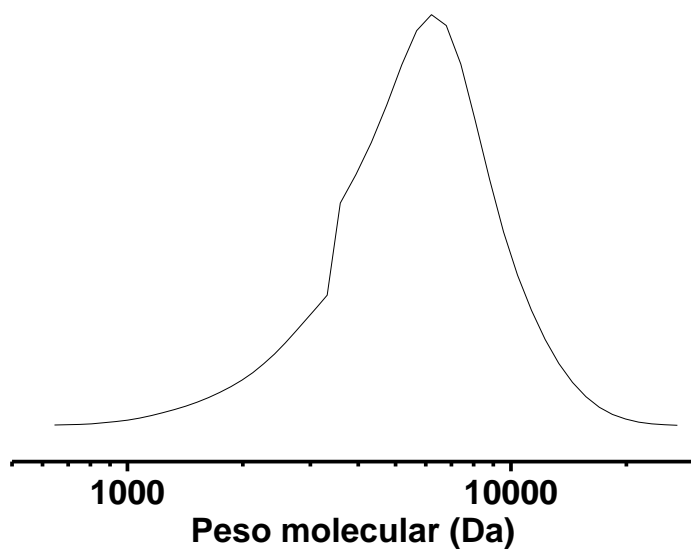


Figura 9. Distribución de pesos moleculares de la polimerización ROP con proporción peso (mg):volumen de tolueno (mL) 15:1 luego de 8 horas de reacción.

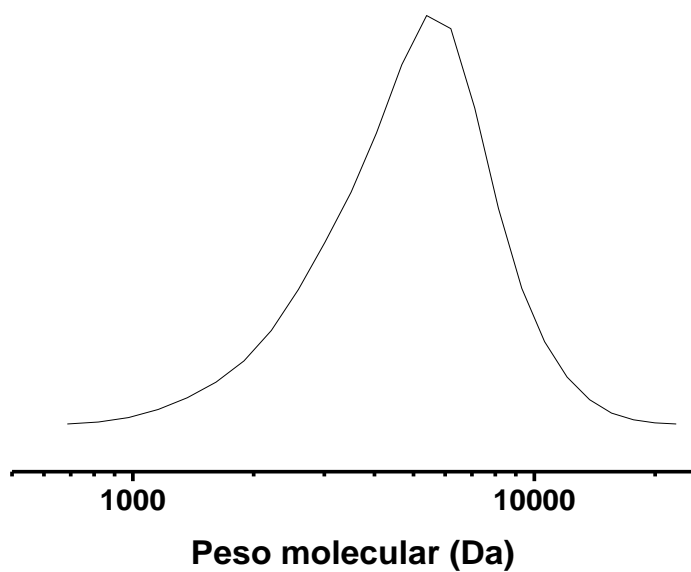


Figura 10. Distribución de pesos moleculares de la polimerización ROP con proporción peso (mg):volumen de tolueno (mL) 15:1 luego de 24 horas de reacción.

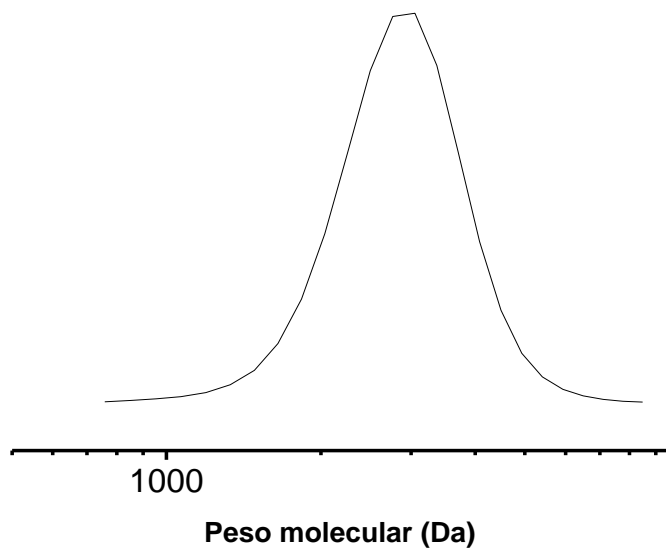


Figura 11. Distribución de pesos moleculares de la polimerización ROP con proporción peso (mg):volumen de tolueno (mL) 75:1 luego de 2 horas de reacción.

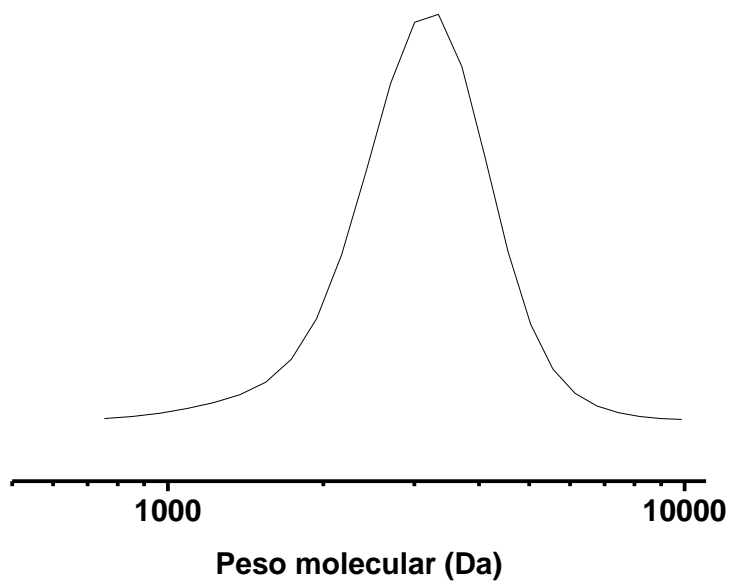


Figura 12. Distribución de pesos moleculares de la polimerización ROP con proporción peso (mg):volumen de tolueno (mL) 75:1 luego de 8 horas de reacción.

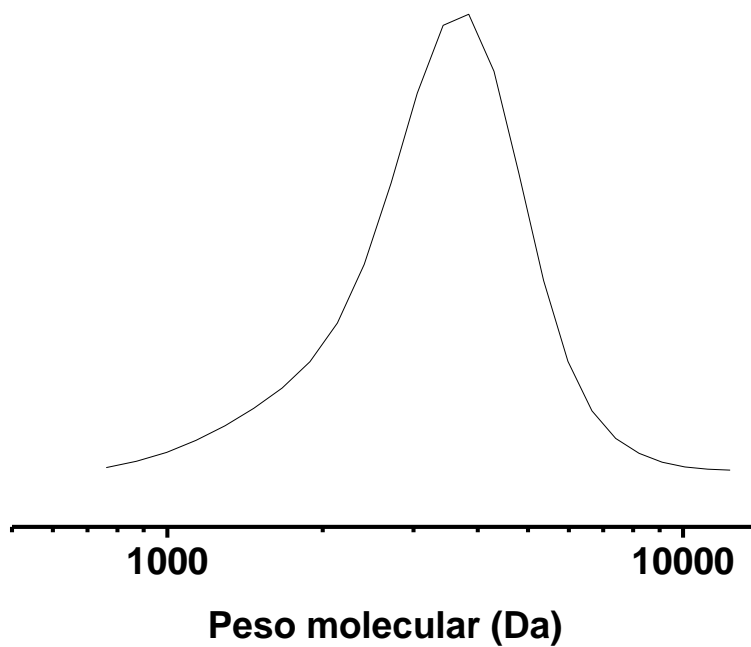


Figura 13. Distribución de pesos moleculares de la polimerización ROP con proporción peso (mg):volumen de tolueno (mL) 75:1 luego de 8 horas de reacción.

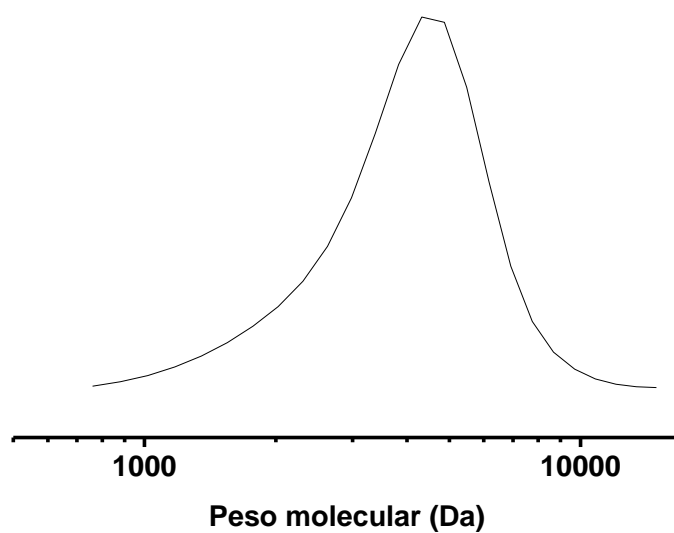


Figura 14. Distribución de pesos moleculares de la polimerización ROP con proporción peso (mg):volumen de tolueno (mL) 75:1 luego de 48 horas de reacción.

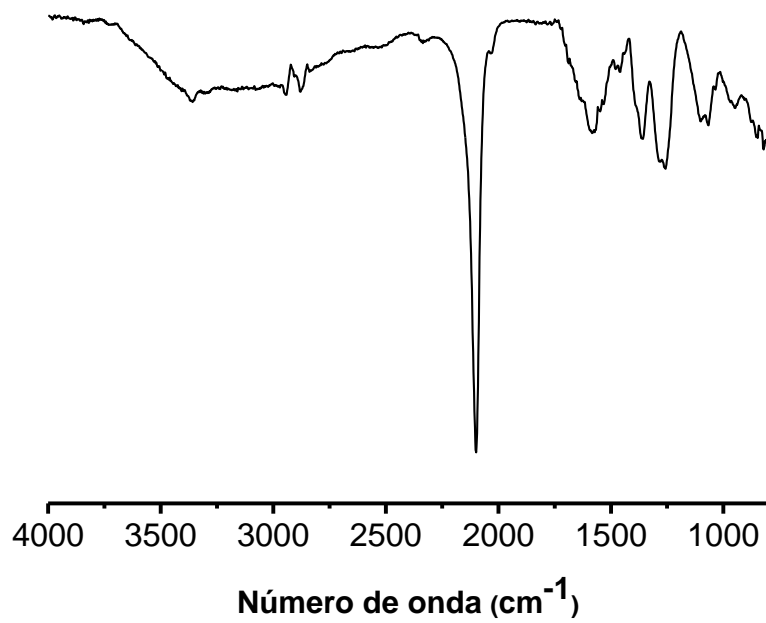


Figura 15. Espectro ATR-IR de la 3-azidopropilamina

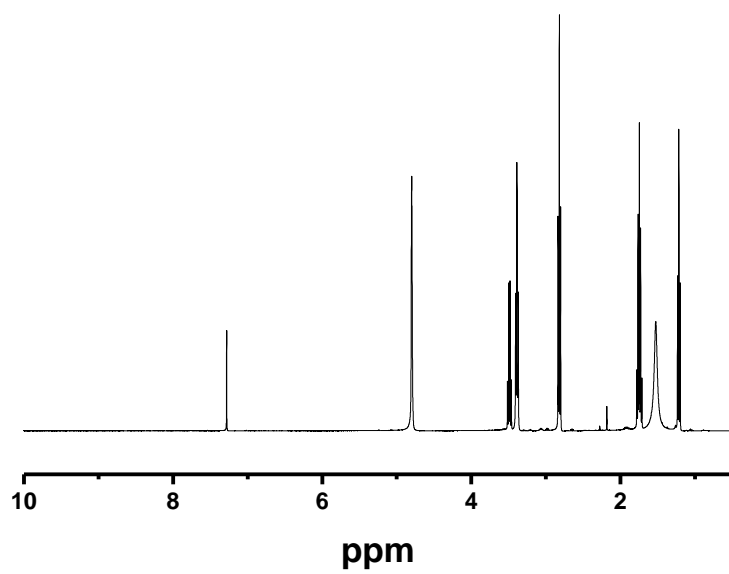


Figura 16. Espectro RMN-<sup>1</sup>H de la 3-azidopropilamina

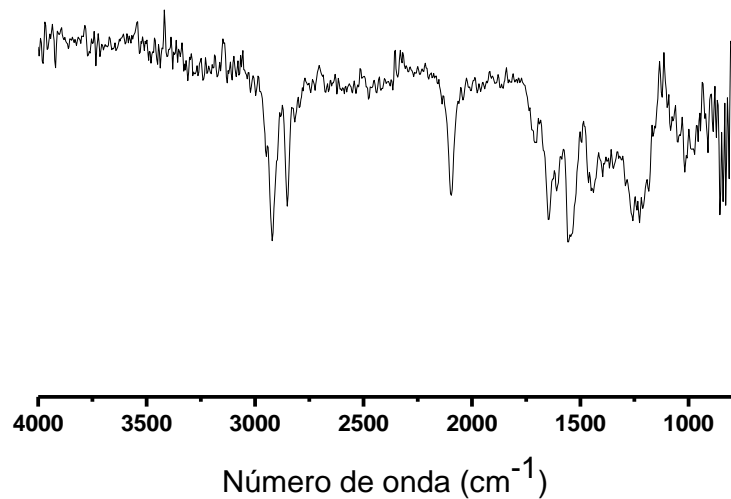


Figura 17. Espectro ATR-IR de la 3-azidopropilamida del ácido oleico.

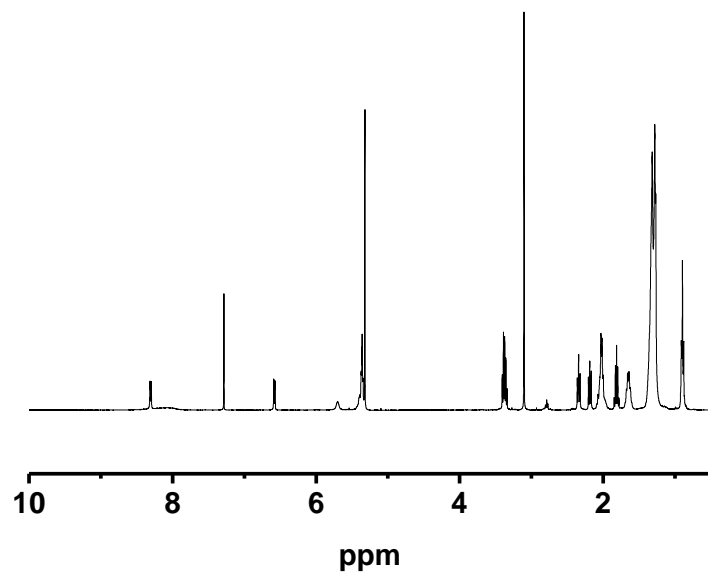


Figura 18. Espectro RMN-<sup>1</sup>H de la 3-azidopropilamida del ácido oleico.

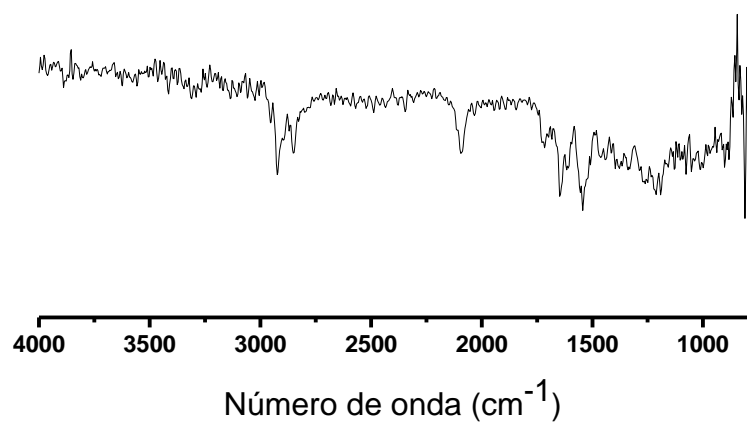


Figura 19. Espectro ATR-IR de la 3-azidopropilamida del ácido láurico.

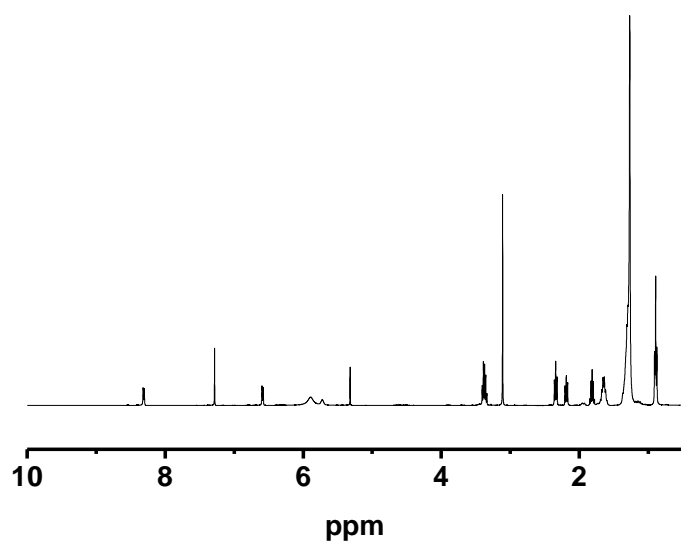


Figura 20. Espectro RMN-<sup>1</sup>H de la 3-azidopropilamida del ácido láurico

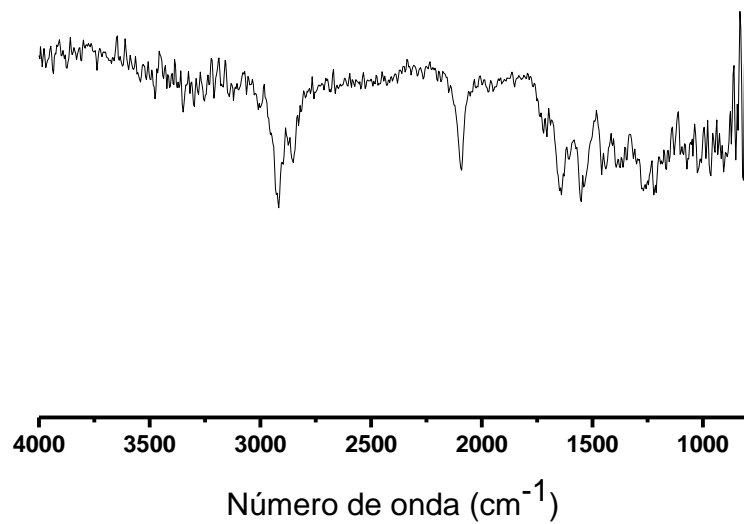


Figura 21. Espectro ATR-IR de la 3-azidopropilamida del ácido linoleico.

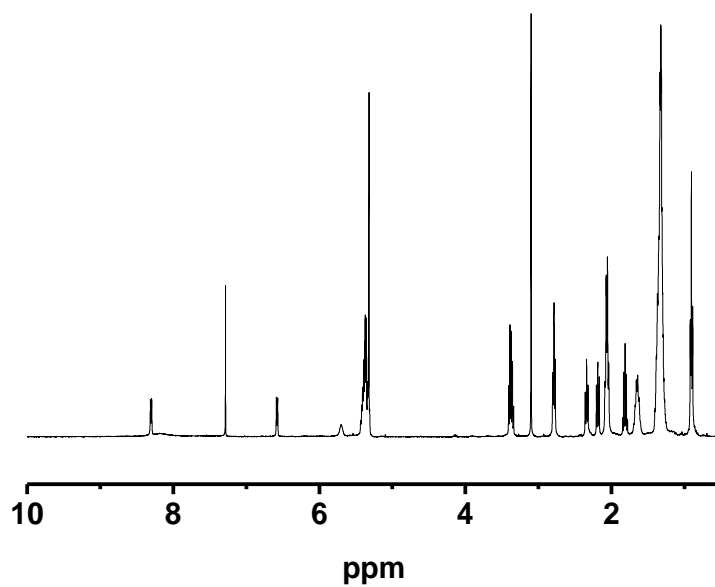


Figura 22. Espectro RMN-<sup>1</sup>H de la 3-azidopropilamida del ácido inoleico

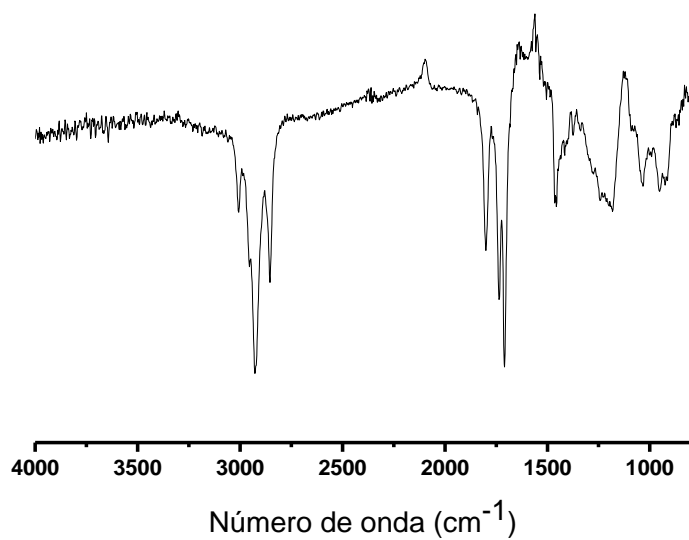


Figura 23. Espectro ATR-IR del cloruro de linoleilo.

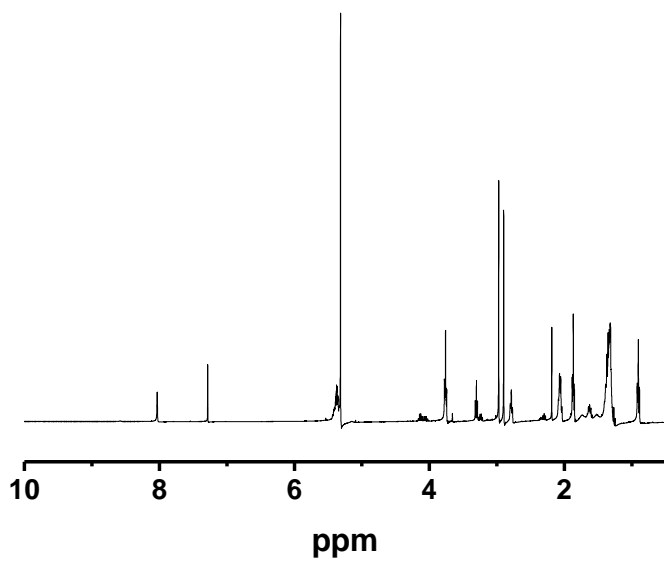


Figura 24. Espectro RMN-<sup>1</sup>H de azida de acilo del ácido linoleico.

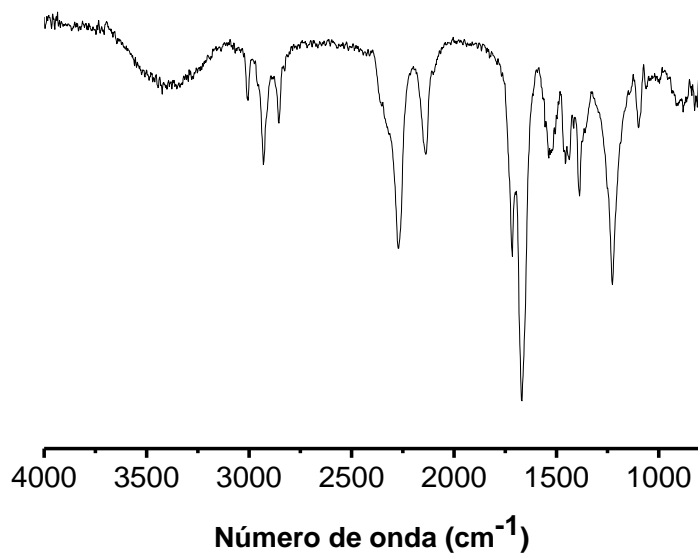


Figura 25. Espectro ATR-IR de la azida de acilo del ácido linoleico.

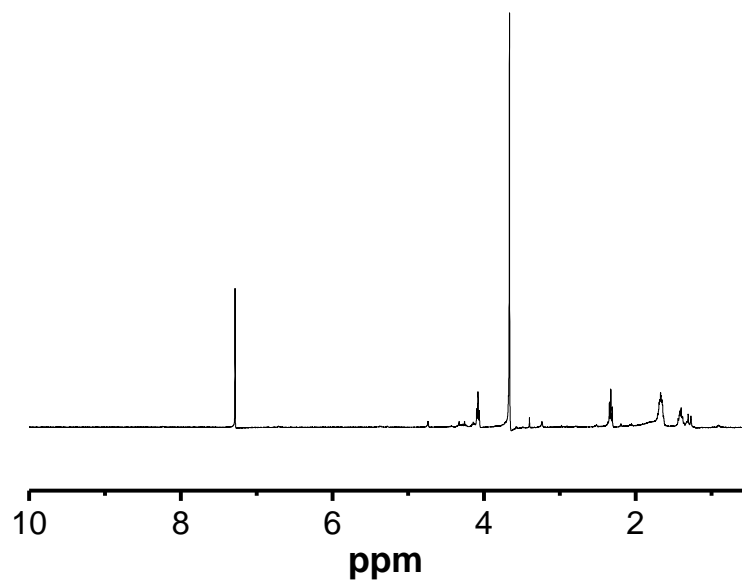


Figura 26. Espectro RMN-<sup>1</sup>H reacción de click con anisol a temperatura ambient con 5% de catalizador molar de cobre y 24 horas de reacción para formar el anillo de triazol

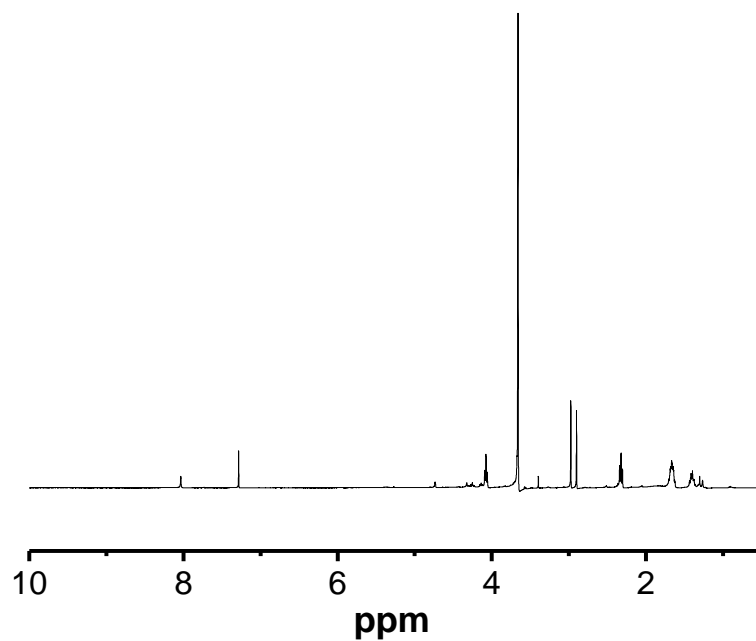


Figura 27. Espectro RMN-<sup>1</sup>H reacción de click con DMF a temperatura ambiente con 5% de catalizador molar de cobre y 24 horas de reacción para formar el anillo de triazol

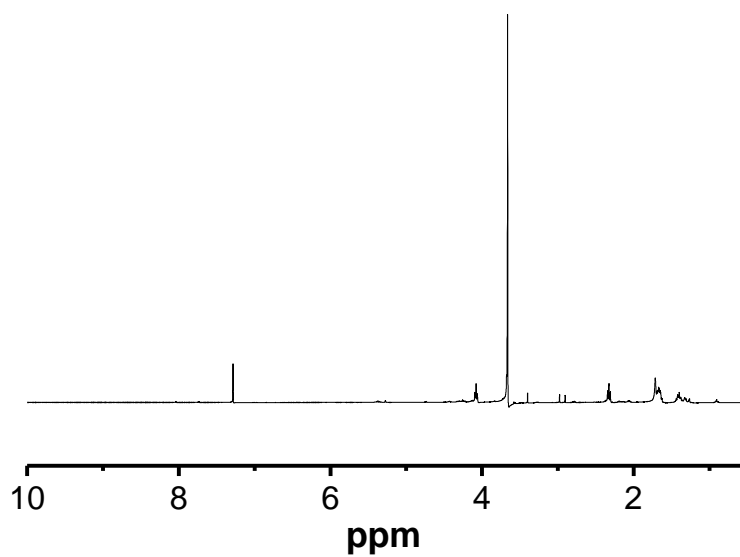


Figura 28. Espectro RMN-<sup>1</sup>H reacción de click con DMF a 110 °C con 5% de catalizador molar de bromuro de cobre y 24 horas de reacción para formar el anillo de triazol

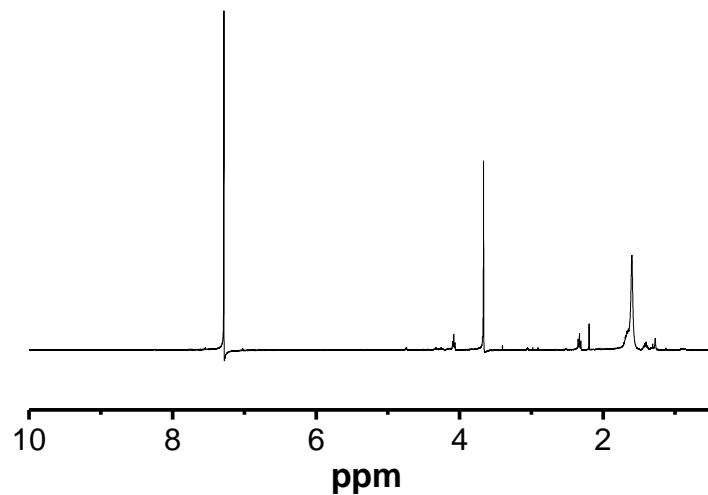


Figura 29. Espectro RMN-<sup>1</sup>H reacción de click con anisol a temperatura 60°C con 0,5% de catalizador molar de cobre y 24 horas de reacción para formar el anillo de triazol

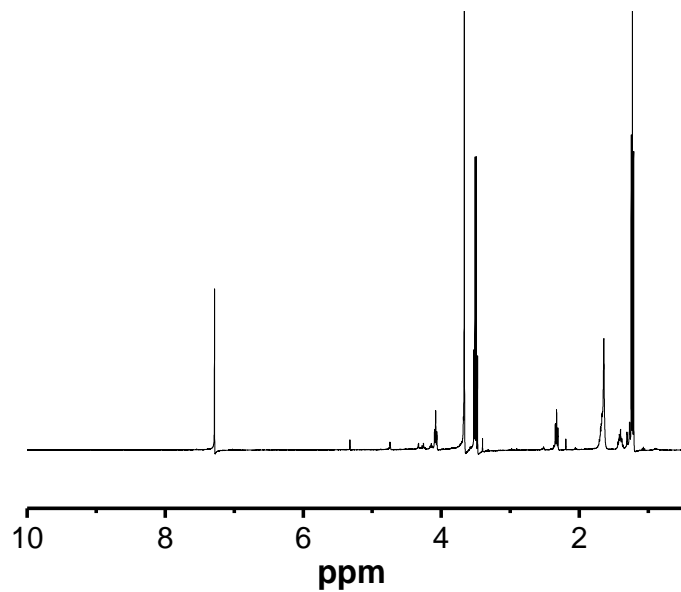


Figura 30. Espectro RMN-<sup>1</sup>H reacción de click con DMF a temperatura 60°C con 0,5% de catalizador molar de cobre y 24 horas de reacción para formar el anillo de triazol

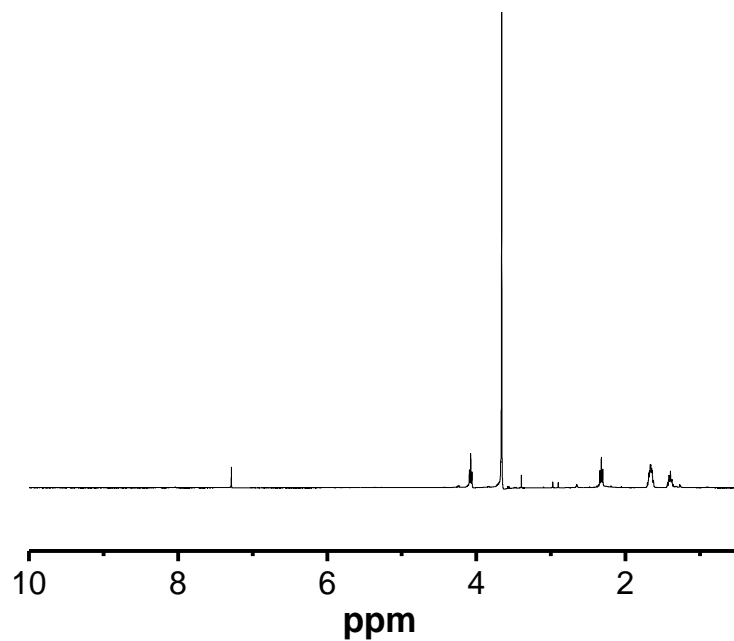


Figura 31. Espectro RMN-<sup>1</sup>H reacción de click con DMF a temperatura 110°C con 0,5% de catalizador molar de cobre y 72 horas de reacción para formar el anillo de triazol

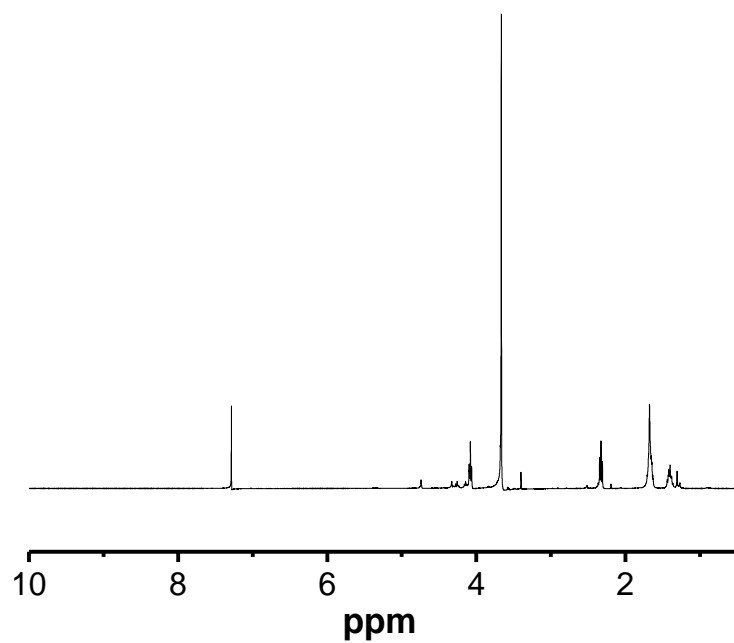


Figura 32. Espectro RMN-<sup>1</sup>H reacción de click con anisol a temperatura 60°C con 0,5% de catalizador molar de cobre y 24 horas de reacción para formar el anillo de oxazol

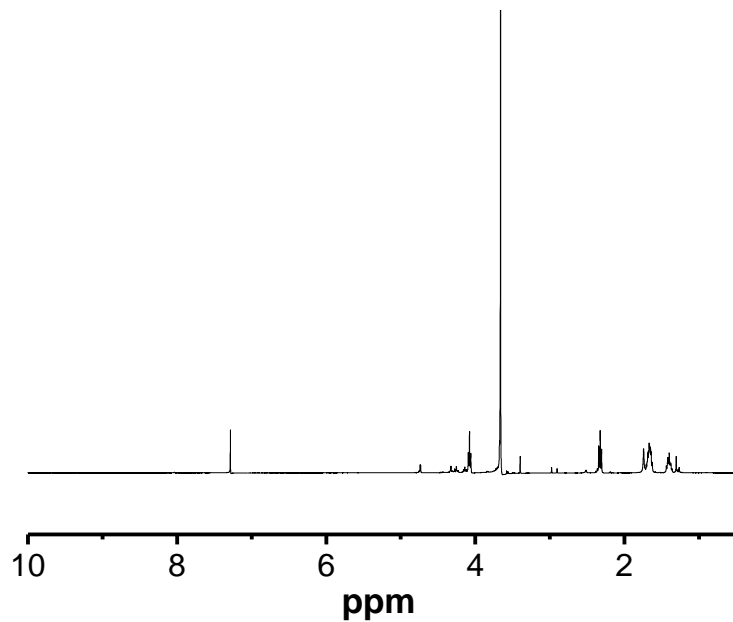


Figura 33. Espectro RMN-<sup>1</sup>H reacción de click con anisol a temperatura 60°C con 0,5% de catalizador molar de cobre y 24 horas de reacción para formar el anillo de oxazol

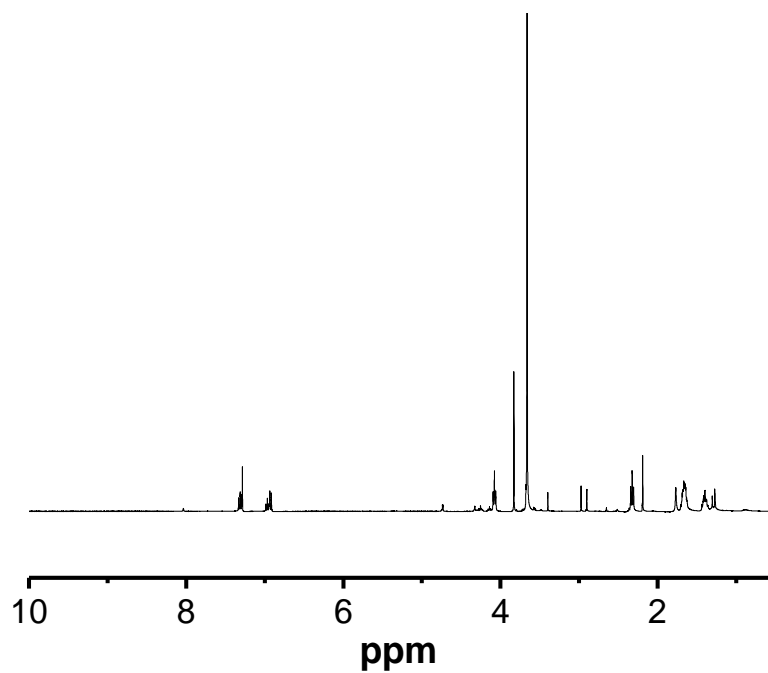


Figura 34. Espectro RMN-<sup>1</sup>H reacción de click con anisol a temperatura 60°C con 5% de catalizador molar de cobre y 72 horas de reacción para formar el anillo de oxazol

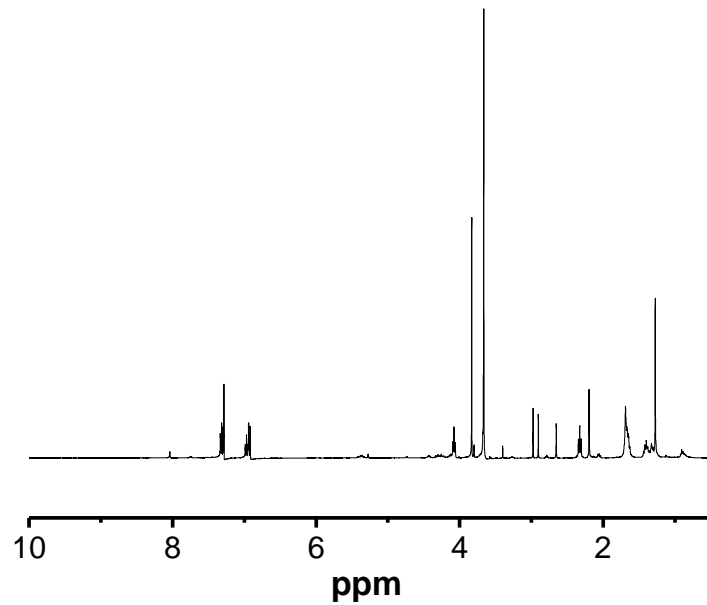


Figura 35. Espectro RMN-<sup>1</sup>H reacción de click con anisol a temperatura 60°C con 5% de catalizador molar de cobre y 72 horas de reacción para formar el anillo de triazol

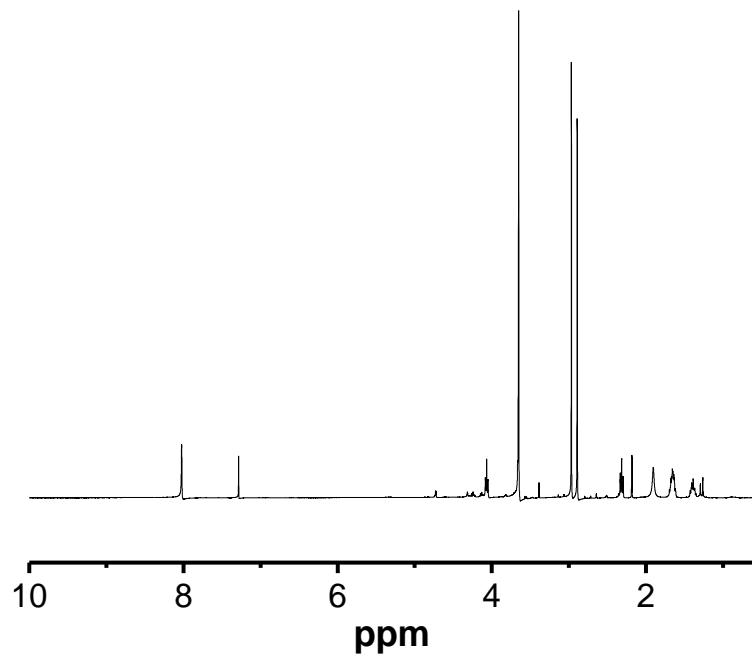


Figura 36. Espectro RMN-<sup>1</sup>H reacción de click con DMF a temperatura 60°C con 5% de catalizador molar de cobre y 72 horas de reacción para formar el anillo de oxazol

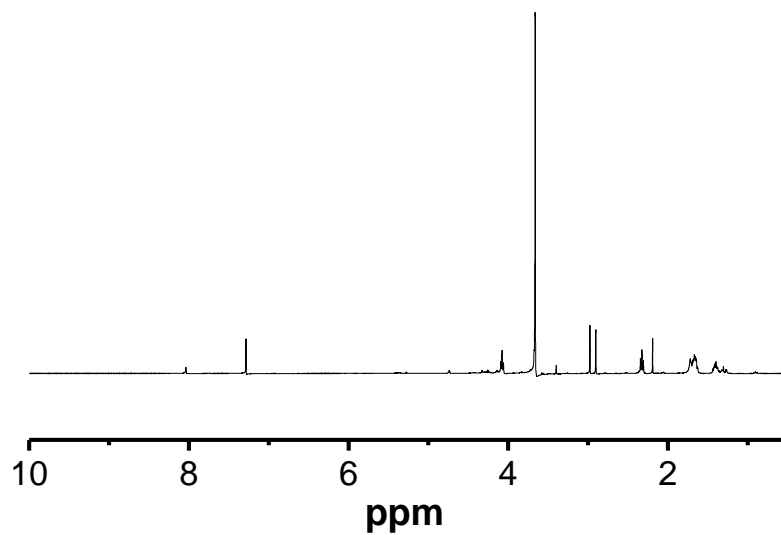


Figura 37. Espectro RMN-<sup>1</sup>H reacción de click con DMF a temperatura 60°C con 5% de catalizador molar de cobre y 72 horas de reacción para formar el anillo de triazol

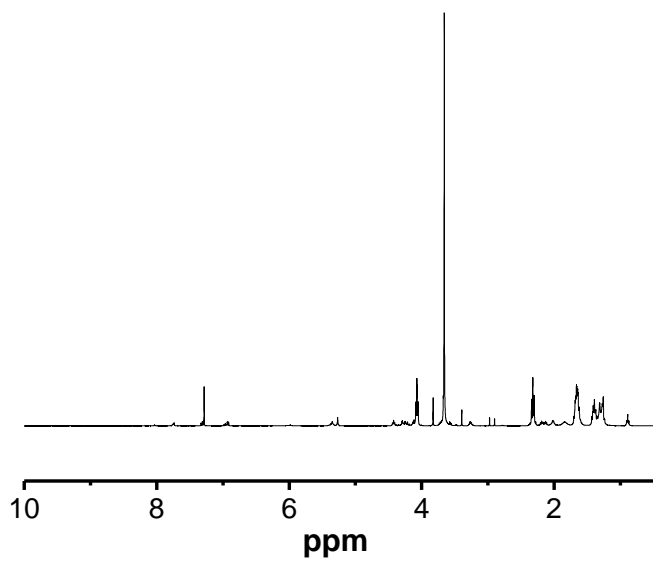


Figura 38. Espectro RMN-<sup>1</sup>H del polímero OLE 5

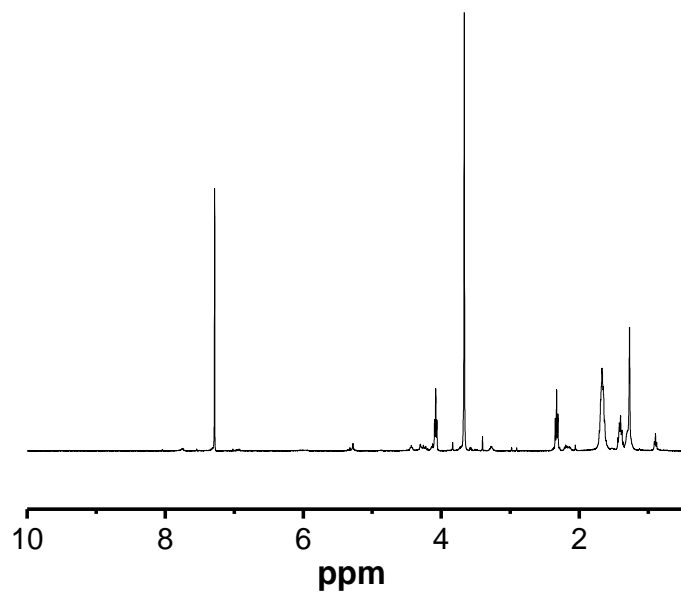


Figura 39. Espectro RMN-<sup>1</sup>H del polímero LAU 5

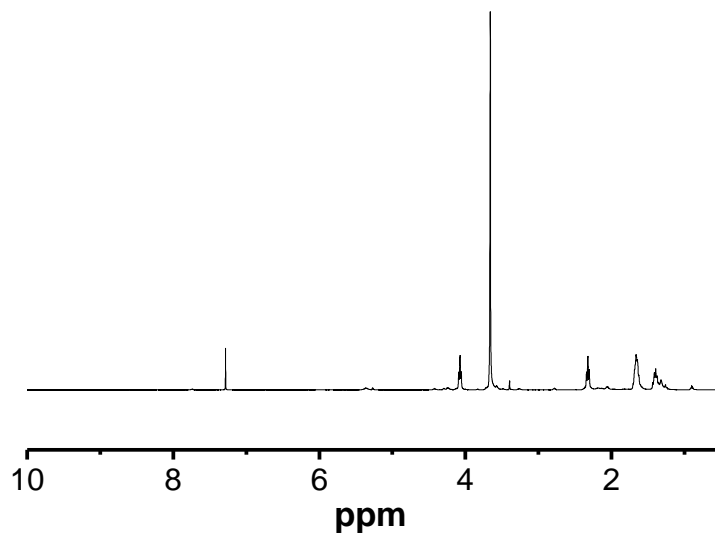


Figura 40. Espectro RMN-<sup>1</sup>H del polímero LIN 2

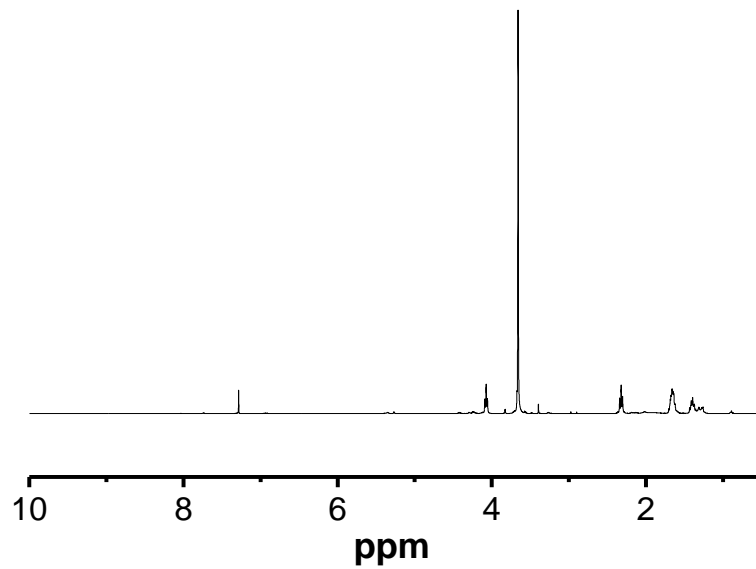


Figura 41. Espectro RMN-<sup>1</sup>H del polímero OLE 2

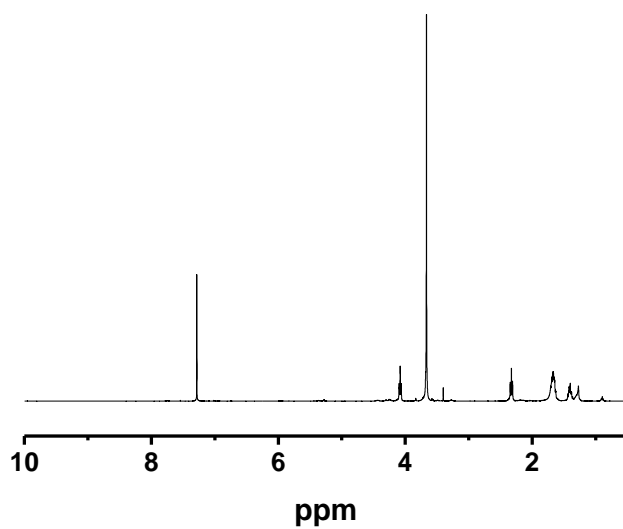


Figura 42. Espectro RMN-<sup>1</sup>H del polímero LAU 2 luego de 30 min de reacción

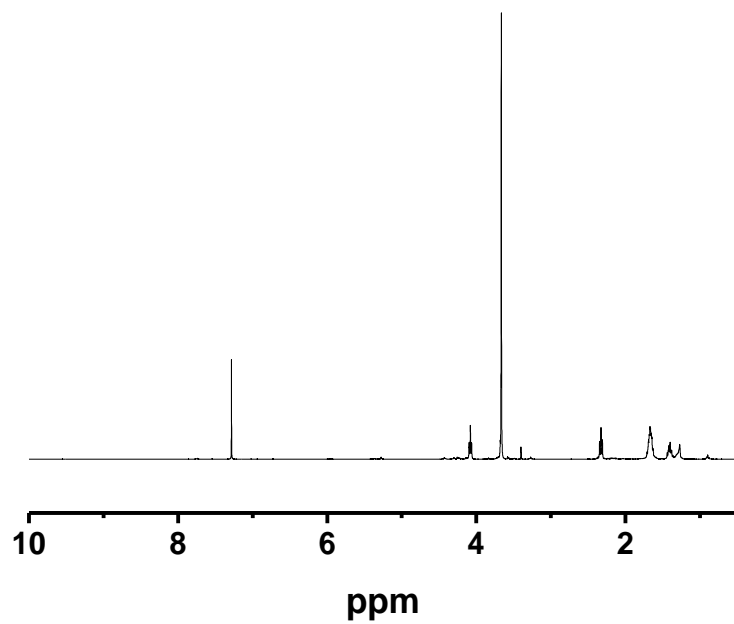


Figura 43. Espectro RMN-<sup>1</sup>H del polímero LAU 2 luego de 50 min de reacción

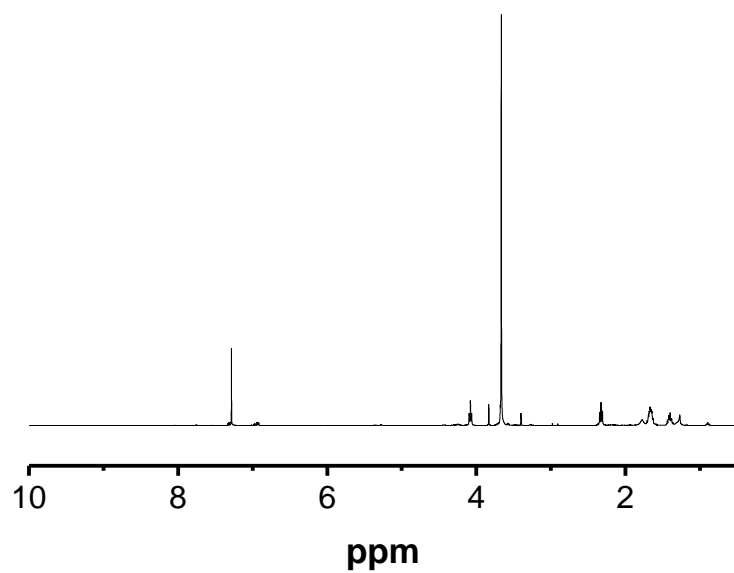


Figura 44. Espectro RMN-<sup>1</sup>H del polímero LAU 2 luego de 75 min de reacción

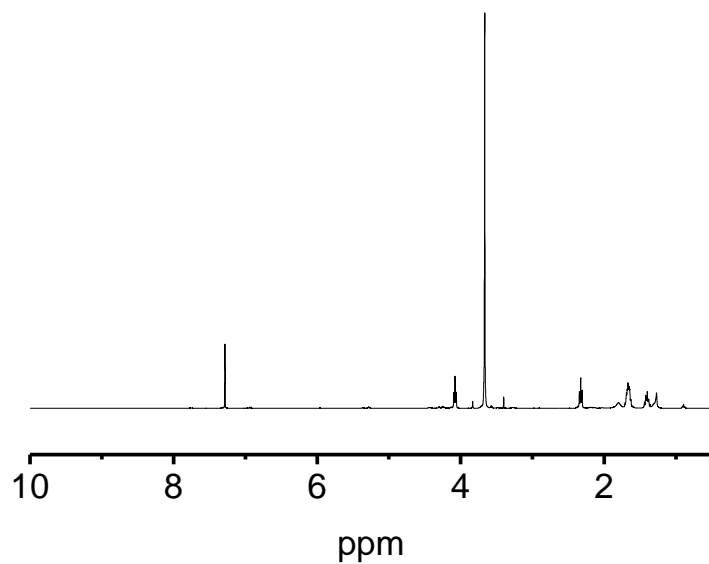


Figura 45. Espectro RMN-<sup>1</sup>H del polímero LAU 2 luego de 240 min de reacción

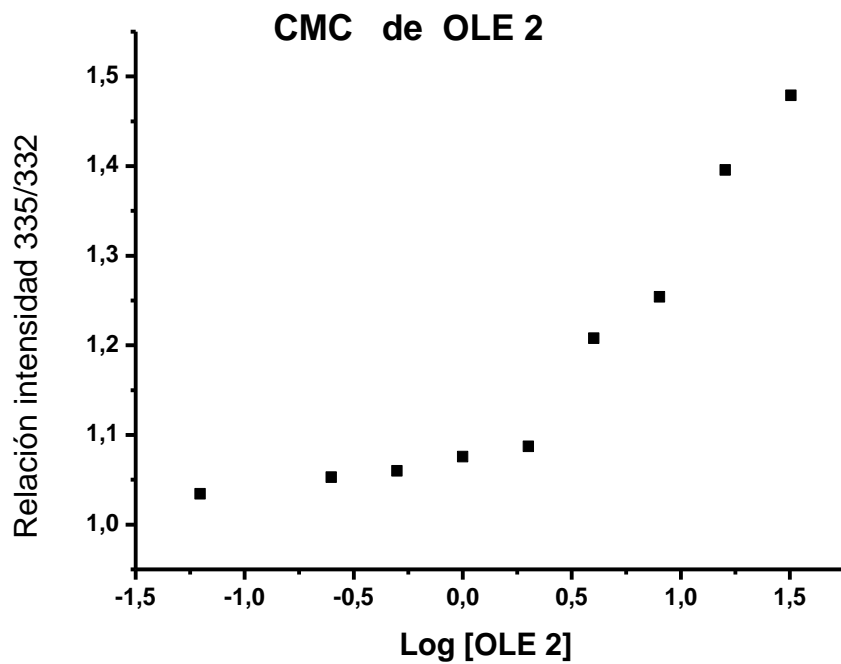


Figura 46. Comportamiento de la sonda de pireno en las micelas de OLE 2 seguida por espectroscopia de fluorescencia.

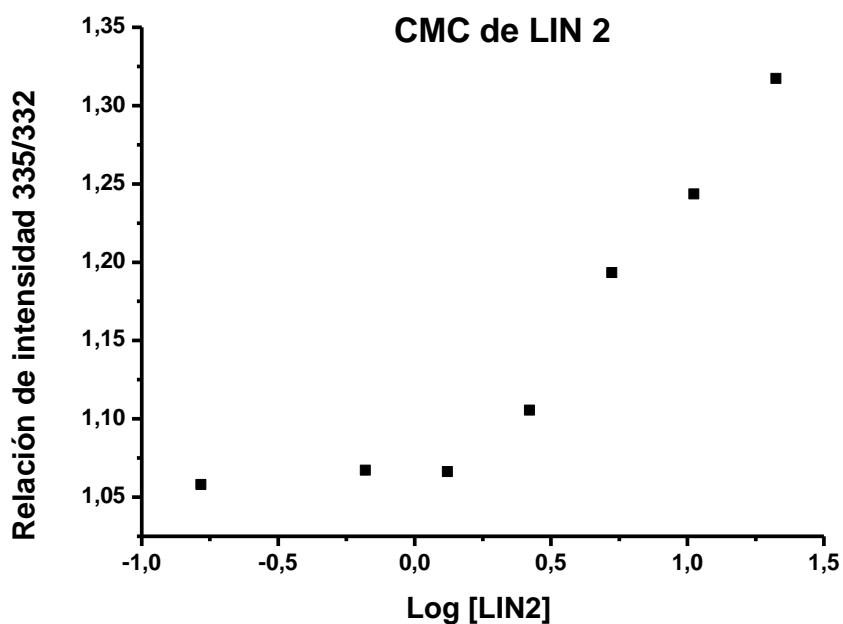


Figura 47. Comportamiento de la sonda de pireno en las micelas de LIN 2 seguida por espectroscopia de fluorescencia.

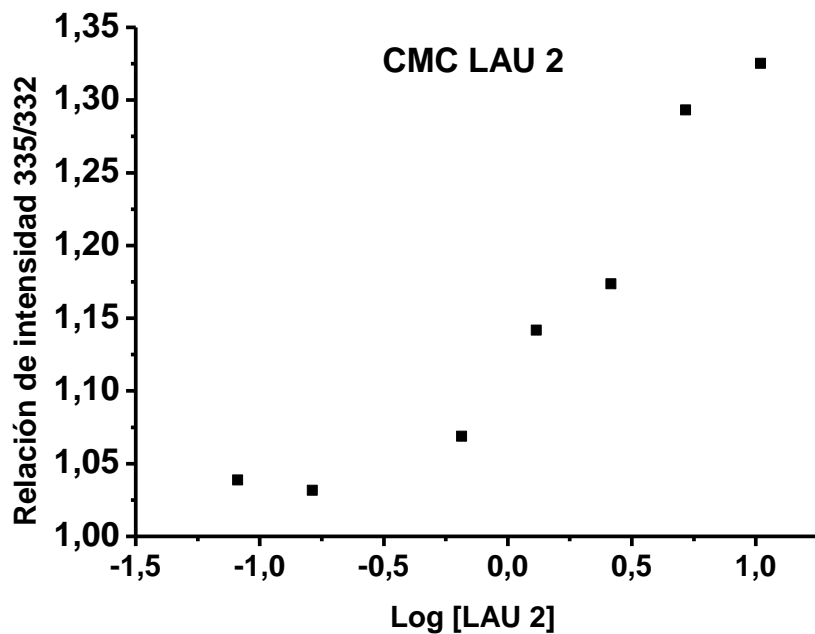


Figura 48. Comportamiento de la sonda de pireno en las micelas de LAU 2 seguida por espectroscopia de fluorescencia.

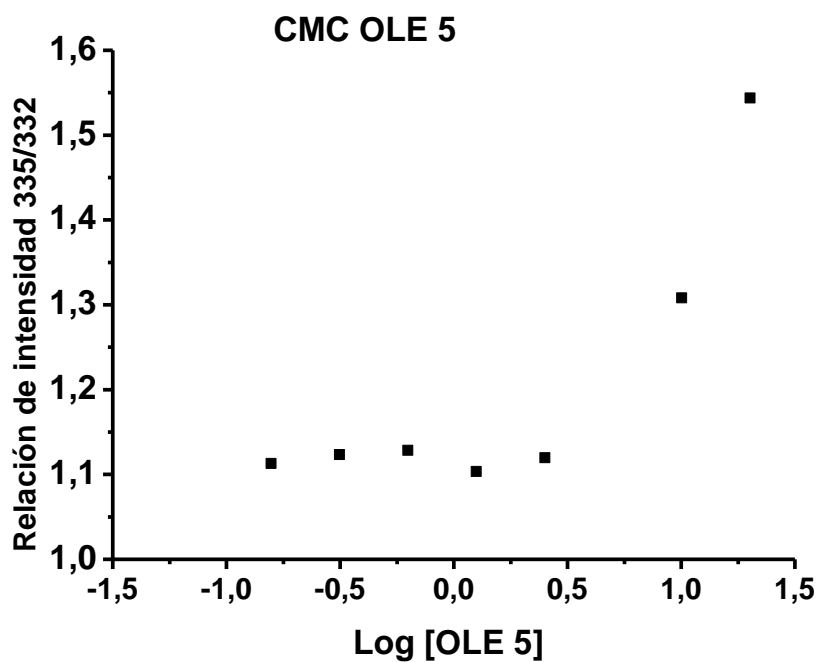


Figura 49. Comportamiento de la sonda de pireno en las micelas de OLE 5 seguida por espectroscopia de fluorescencia.

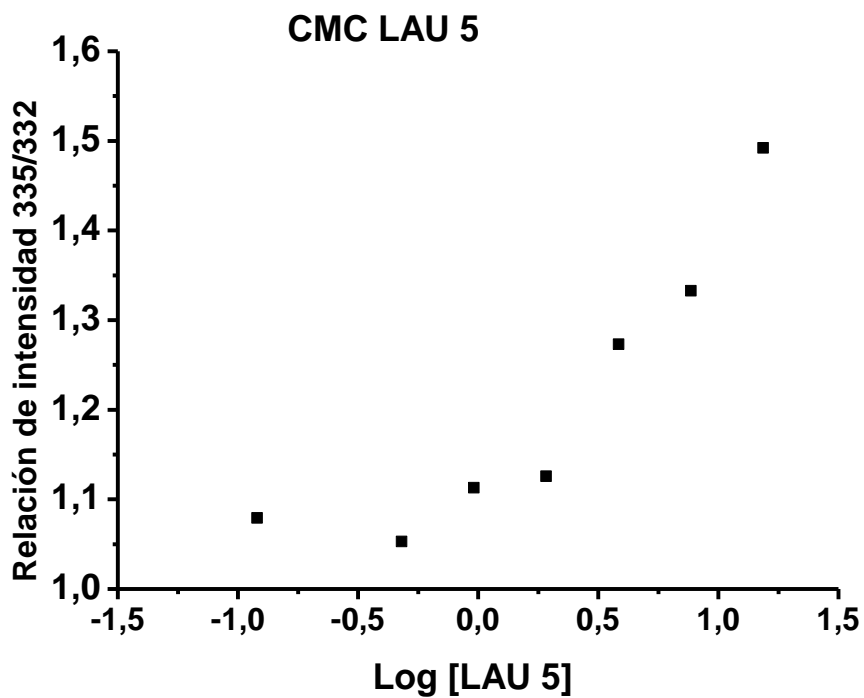


Figura 50. Comportamiento de la sonda de pireno en las micelas de LAU 5 seguida por espectroscopia de fluorescencia.



