



CARBOXIMETILCELULOSA ANFIFÍLICA:

Síntesis, caracterización y estudio en disolución

Eduardo Bordallo López

Santiago de Compostela

2014





TESIS DOCTORAL

CARBOXIMETILCELULOSA ANFIFÍLICA:

Síntesis, caracterización y estudio en disolución

Eduardo Bordallo López

Departamento de Química-Física

Facultad de Química-CIQUS

Santiago de Compostela

2014



TESIS DOCTORAL

CARBOXIMETILCELULOSA ANFIFÍLICA:

Síntesis, caracterización y estudio en disolución

**Memoria presentada en la Universidad de Santiago de Compostela para
optar al grado de Doctor en Ciencia de los Materiales**

Eduardo Bordallo López

Departamento de Química-Física

Facultad de Química-CIQUS

Santiago de Compostela

2014





D. MASSIMO LAZZARI, Profesor Titular del Departamento de Química Física de la Universidad de Santiago de Compostela y D. Jacques Rieumont, Profesor Titular del Departamento de Química Física de la Universidad de la Habana,

Como Directores de la tesis de Doctorado titulada:

“Carboximetilcelulosa anfifílica: síntesis, caracterización y estudio en disolución”

Presentada por D. Eduardo Bordallo López

Alumno del Programa de Doctorado de Ciencia de Materiales

Autorizan la presentación de la tesis indicada, considerando que reúne los requisitos exigidos en el artículo 34 de la legislación de Estudios de Doctorado y que como Directores de la misma no incurre en las causas de abstención establecidas en la ley 30/1992.

Y para que así conste, firman la presente autorización en Santiago de Compostela, el día 29 de Septiembre de 2014.

Fdo. Massimo Lazzari

Fdo. Jacques Rieumont Briones

Fdo. Eduardo Bordallo López





*A mi mamá,
a la memoria de mi papá
y para nandy*



AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido con mi formación y en la realización de este trabajo de investigación.

A mis directores de tesis Massimo Lazzari y Jacques Rieumont Briones porque sin su apoyo, dirección, ayuda y confianza no se habría materializado el trabajo que se intenta reflejar en estas páginas. En particular, deseo expresar mi gratitud inestimable a Jacques por aceptar involucrarse en el trabajo con la carboximetilcelulosa, por sus enseñanzas y tiempo dedicado.

Un agradecimiento particular para el Profesor Marcio José Tiera no sólo por haberme aceptado en su grupo en la UNESP, Campus de San José do Río Preto, sino por ser parte de la génesis del trabajo posterior y por la cálida acogida ofrecida durante toda la estancia. Quiero también agradecer a Ana Helena Casé e Isadora Pfeifer por estar siempre dispuestas a ayudarme en el trabajo de laboratorio y por los gratos momentos compartidos acompañados de originales o caipirinha. Deseo extender el agradecimiento a los demás miembros del grupo por hacerme sentir como uno más. A Evelyn, Tamiris, Bruna, Hellen, Fábio, Rafael, Carlos, Yu, Vera, a todos gracias.

Quiero agradecer además a la Profesora Mercedes Torneiro, de la Facultad de Química de la USC, por permitirme trabajar en su laboratorio y por la ayuda ofrecida en la interpretación de los espectros de resonancia magnética. Así mismo a Daniel por el tiempo y trabajo dedicado a la activación del polietilenglicol. Al Chileno Julio por hacer más llevadero el día a día en un laboratorio con tantos olores y por su ayuda en la realización de espectros. A Bea por su gentileza y ayuda expedita en la resolución de problemas de último

minuto. Al amigo Manuel Gómez por enseñarme, luego de horas que se hicieron días, el difícil arte de hacer experimentos para conseguir imágenes, las que se muestran en el trabajo son el producto de esas jornadas. Agradezco al Profesor Frank por aceptarme como uno más dentro de su grupo y a los colegas y amigos de laboratorio y oficina Marina, Elias, José, Camilo, Tinh, Carlos y Alexandros por los buenos momentos compartidos y las conversaciones de otro tipo.

Por supuesto, mi agradecimiento para mis colegas y compañeros de trabajo durante todos estos años a Isis, Dolores, Lucy, Raúl, Daisy, Yelenys, Amalia, Enma, María Isabel (la Chiqui), Gilberto. Gracias por crear un ambiente tan genial para el trabajo, por los buenos momentos y por contribuir directamente en la realización de experimentos cuyos resultados son parte de la tesis.

Mi gratitud infinita a mi familia por estar conmigo en todos los momentos, mantenerme en perspectiva, ofrecerme soporte y confianza en la viabilidad de mis sueños, gracias a todos. En particular para Vivian y Nandy que han sido un estímulo constante durante todo este tiempo.

Mi agradecimiento a las organizaciones CAPES y Banco Santander por financiar las estancias de investigación en la UNESP, Campus de San José do Río Preto y en el CIQUS, Campus vida de la USC a través de los programas CAPES/MES-Cuba y USC-Banco Santander, sin su soporte el trabajo habría sido imposible realizarlo.

Finalmente, quiero agradecer a todos aquellos amigos que de una manera u otra se han interesado por el avance y culminación de la tesis: Merchy, Paco, Valentín, Ana, Greter, Carlos, Yoel, Mariana, Bárbara A, Nela, Ariel, Gabriel, Luis, Dignora, José A. Gracias por el ánimo y apoyo brindado.



RELACIÓN DE ABREVIATURAS

AD	Agua desmineralizada
AO	Anillos oxidados
CMC	Concentración micelar crítica
CMCO	Carboximetilcelulosa oxidada
D_h	Diámetro hidrodinámico
DDA	Dodecilamina
DDC	N,N'-diciclocarbodiimida
DMSO	Dimetil sulfóxido
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
FTIR	Espectroscopia infrarroja de transformada de Furrier
GP	Grado de polimerización
GS	Grado de sustitución
h	horas
¹H-RMN	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear
$\bar{M}_n$	Peso molecular promedio en número
MsCl	Cloruro de metanosulfonilo
$\bar{M}_w$	Peso molecular promedio en peso
PEG	Polietilenglicol
PEG-OH	Metoxi polietilenglicol
s	segundo
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño
SEM	Microscopia electrónica de barrido
T_{max}	Temperatura máxima de velocidad de descomposición
TEM	Microscopia electrónica de transmisión
TGA	Análisis termogravimétrico
ζ	Potencial zeta



RESUMEN

La administración de fármacos poco solubles bajo condiciones fisiológicas constituye un reto en la formulación de los medicamentos. La búsqueda de alternativas que permitan incrementar su eficacia y seguridad ha llevado al desarrollo de materiales que permiten encapsularlos. Dentro de ellos, los polímeros que tienen la propiedad de autoensamblarse en disolución acuosa han ocupado una posición preponderante en los últimos años.

En el siguiente trabajo se propone utilizar la carboximetilcelulosa como precursor en la síntesis de copolímeros injertados, a través de la modificación de su polialdehído por aminación reductiva con grupos hidrofóbicos de la dodecilamina e hidrofílicos del amino metoxi polietilenglicol. Los productos intermedios y finales se caracterizaron por espectroscopia de resonancia magnética e infrarroja, análisis térmico y rayos-x. Además se estudiaron las propiedades físico-químicas de los copolímeros sintetizados por medidas de tensión superficial, espectroscopia de fluorescencia, dispersión dinámica de la luz y cromatografía de exclusión por tamaño. La forma de los nanoagregados se confirmó a través de imágenes de microscopia electrónica de barrido y transmisión.

Los resultados mostraron que los copolímeros anfifílicos se autoensamblan en disolución acuosa, lo que indica la validez del protocolo de síntesis seguido. Los nanoagregados comienzan a formarse a una concentración micelar crítica en el rango de $2,5 \cdot 10^{-2}$ - $8,0 \cdot 10^{-3}$ g L⁻¹, con un diámetro hidrodinámico entre 177-190 nm y su forma es cuasi esférica.



ÍNDICE GENERAL

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Motivación y estructura de la tesis	1
2.	ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN	7
2.1	Autoensamblado	7
2.2	Tensoactivos en disolución acuosa	8
2.2.1	Concentración micelar crítica	11
2.3	Clasificación de los tensoactivos	15
2.3.1	Tensoactivos aniónicos	16
2.3.2	Tensoactivos neutros o no iónicos	17
2.3.3	Tensoactivos catiónicos	18
2.3.4	Tensoactivos zwitterion	19
2.3.5	Tensoactivos cataniónicos	20
2.3.6	Tensoactivos siliconados y fluorados	20
2.3.7	Tensoactivos diméricos o géminis	21
2.3.8	Tensoactivos poliméricos	22
2.4	Polímero y copolímeros de bloque	23
2.4.1	Copolímero de bloque alternado con segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos	25
2.4.2	Copolímero con cadena hidrofílica injertada con segmentos hidrofóbicos	27
2.5	Carboximetilcelulosa	29
2.5.1	Derivados anfifílicos de la carboximetilcelulosa	30
2.6	Oxidación de la carboximetilcelulosa con periodato de sodio	33
2.7	Polietilenglicol en sistemas micelares	35
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1	Materiales	37
3.2	Métodos	37
3.2.1	Síntesis del polialdehído de la sal de sodio de la carboximetilcelulosa	37
3.2.2	Síntesis del amino metoxi polietilenglicol	38

3.2.3	Síntesis de los derivados anfifílicos del polialdehído de la sal de sodio de la carboximetilcelulosa	38
	A. Carboximetilcelulosa- <i>g</i> -dodecilamina- <i>g</i> -polietilenglicol	38
	B. Síntesis del copolímero carboximetilcelulosa- <i>g</i> -dodecilamina	39
3.3	Caracterización de los polímeros sintetizados	40
3.3.1	Análisis infrarrojo	40
3.3.2	Resonancia magnética nuclear protónica	40
3.3.3	Estimación del grado de sustitución de la sal de sodio de la carboximetilcelulosa	41
3.3.4	Estimación del grado de oxidación de la sal de sodio de la carboximetilcelulosa	42
3.4	Propiedades físico-químicas de los polímeros	42
3.4.1	Medidas de fluorescencia	42
3.4.2	Medidas de tensión superficial	43
3.4.3	Cromatografía de exclusión por tamaño	43
3.4.4	Microscopia electrónica de transmisión	44
3.4.5	Microscopia electrónica de barrido	44
3.4.6	Estimación del tamaño hidrodinámico y del potencial zeta de los nanoagregados por dispersión dinámica de la luz	45
3.4.7	Rayos X	45
3.4.8	Calorimetría diferencial de barrido	45
3.4.9	Análisis termogravimétrico	46
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
4.1	Caracterización de la Carboximetilcelulosa	47
4.1.1	Grado y patrón de sustitución	47
4.1.2	Resonancia magnética nuclear	49
4.1.3	Espectroscopia infrarroja	50
4.1.4	Análisis térmico	51
4.1.4.1	Análisis termogravimétrico	51
4.1.4.2	Calorimetría diferencial de barrido	53
4.1.5	Estimación de la masa molecular	54
4.2	Derivados de la carboximetilcelulosa	55

4.2.1	Síntesis del polialdehído de la carboximetilcelulosa	55
4.2.2	Espectroscopia infrarroja	57
4.2.3	Resonancia magnética nuclear	58
4.2.4	Análisis térmico	60
4.2.4.1	Análisis termogravimétrico	60
4.2.4.2	Calorimetría diferencial de barrido	62
4.2.5	Otros métodos de estimación del grado de oxidación de la carboximetilcelulosa	63
4.2.6	Estimación de la masa molecular del polialdehído de la carboximetilcelulosa	65
4.3	Derivados anfifílicos de la carboximetilcelulosa	66
4.3.1	Espectroscopia infrarroja	68
4.3.2	Resonancia magnética nuclear	69
4.3.4	Análisis térmico de los copolímeros injertados	72
4.3.4.1	Análisis termogravimétrico	72
4.3.4.2	Calorimetría diferencial de barrido	74
4.3.5	Análisis por Rayos-X	76
4.4	Propiedades en disolución acuosa de los copolímeros	78
4.4.1	Medidas de tensión superficial	78
4.4.2	Medidas de fluorescencia	79
4.4.3	Medidas de dispersión de la luz dinámica	84
4.4.4	Cromatografía de exclusión por tamaño	89
4.4.5	Medidas de potencial zeta	90
5.	Conclusiones	91
6.	Recomendaciones	92
	Referencias bibliográficas	93



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4.1 Anillos oxidados en la carboximetilcelulosa activada

Tabla 4.2 Resultados termogravimétricos

Tabla 4.3 Temperatura asociada a la pérdida de peso

Tabla 4.4 Por ciento de peso perdido asociado a la temperatura

Tabla 4.5 Resultados obtenidos por DSC para los copolímeros en estudio

Tabla 4.6 Por ciento de cristalinidad absoluta

Tabla 4.7 Propiedades físico-químicas de los polímeros a pH 7,4; 150 mM NaCl





ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Esquema de una molécula de tensoactivo de bajo peso molecular. Adaptado de la referencia Holmberg, 2002

Figura 2.2 Representación esquemática de la variación de algunas propiedades físicas con la concentración de tensoactivo. Adaptado de la referencia Holmberg, 2002

Figura 2.3 Representación esquemática del equilibrio entre unímeros y micelas

Figura 2.4 Esquemas geométricos de posibles estructuras micelares: A) esférica; B) vesícula; C) cilíndrica; D) lamela; E) esférica invertida. Adaptado de la referencia Shaw, 1992

Figura 2.5 Esquema del parámetro de empaquetamiento p . Adaptado de la referencia Rodríguez, 2005

Figura 2.6 Estructura de algunos tensoactivos aniónicos

Figura 2.7 Estructura de algunos surfactantes no iónicos

Figura 2.8 Estructura de algunos tensoactivos catiónicos

Figura 2.9 Estructura de algunos tensoactivos zwitterion

Figura 2.10 Estructura de un tensoactivo catiónico entre el anión dodecibencenosulfonato de sodio y el catión dodeciltrimetilamonio

Figura 2.11 Estructura esquemática de dos tensoactivos diméricos o géminis

Figura 2.12 Representación esquemática de algunos copolímeros: A) azar; B) estrella; C) bloque; D) alternado; E) injertado

Figura 2.13 Representación estructural de la Carboximetilcelulosa

Figura 2.14 Representación esquemática de algunas reacciones para la modificación hidrofóbica de la carboximetilcelulosa

Figura 2.15 Esquema del mecanismo de oxidación de dioles vecinales con periodato de sodio

Figura 3.1 Representación esquemática de la determinación de V_1 y V_2 en la valoración conductimétrica

Figura 4.1 Curva de valoración conductimétrica de la sal de sodio de la carboximetilcelulosa con NaOH 0,5 mol L⁻¹

Figura 4.2 Curva de valoración potenciométrica de la sal de sodio de la carboximetilcelulosa con NaOH 0,5 mol L⁻¹

Figura 4.3 Espectro ^1H -RMN de la carboximetilcelulosa en $\text{D}_2\text{O}/\text{D}_2\text{SO}_4$: 3/1 (V/V). En el mismo, O representa el átomo de oxígeno en la posición i ($i=2,3,6$) dentro del anillo de anhidroglucosa, H-1 los átomos de hidrógeno enlazados en el carbono anomérico ($i1$), α y β la configuración de la glucosa; s sustituido y ns no sustituido

Figura 4.4 Espectro FTIR de la sal de sodio de la carboximetilcelulosa en KBr

Figura 4.5 Curva termogravimétrica de la carboximetilcelulosa

Figura 4.6 Curva de DSC de la carboximetilcelulosa

Figura 4.7 Esquema de la oxidación de la carboximetilcelulosa con m-NaIO_4

Figura 4.8 Consumo de NaIO_4 en el tiempo bajo diferentes condiciones de reacción

Figura 4.9 Espectro FTIR del polialdehído de la carboximetilcelulosa en KBr

Figura 4.10 Espectro ^1H -RMN del polialdehído de la carboximetilcelulosa en $\text{D}_2\text{O}/\text{D}_2\text{SO}_4$: 3/1 (V/V)

Figura 4.11 Formación de hemiacetales internos cíclicos en el polialdehído de la carboximetilcelulosa

Figura 4.12 Curva termogravimétrica del polialdehído de la carboximetilcelulosa

Figura 4.13 Curva DSC del polialdehído de la carboximetilcelulosa

Figura 4.14 Oxidación intramolecular de la carboximetilcelulosa

Figura 4.15 Esquema de reacción de obtención de los copolímeros anfifílicos

Figura 4.16 Espectro FTIR del copolímero injertado 15DDA en KBr

Figura 4.17 Espectro ^1H -RMN del copolímero 15DDA en $\text{D}_2\text{O}/\text{D}_2\text{SO}_4$: 3/1 (V/V)

Figura 4.18 Espectro ^1H -RMN del copolímero 15DDA en CDCl_3

Figura 4.19 Representación esquemática del proceso de auto ensamblado en medio orgánico y acuoso

Figura 4.20 Curvas termogravimétricas de los copolímeros injertados

Figura 4.21 Curvas DSC de los copolímeros injertados

Figura 4.22 Difractogramas de los polímeros y copolímeros injertados.

Figura 4.23 Variación de la tensión superficial con la concentración de polímero

Figura 4.24 Relación de intensidades I_1/I_3 del pireno ($5,0 \cdot 10^{-7}$ M) en función de la concentración de polímero a 25 °C y pH 7,4

Figure 4.25 Relación de intensidades I_1/I_3 del pireno ($5,0 \cdot 10^{-7}$ M) en función de la concentración de polímero a 25 °C y pH 7.4. **a)** 25DDA; **b)** 35 DDA; **c)** 45DDA

Figura 4.26 Relación de intensidades I_1/I_3 del pireno ($5,0 \cdot 10^{-7}$ M) en función de la concentración de polímero a 25 °C a diferentes valores de pH: **a)** CPD15; **b)** DDA15

Figure 4.27 Variación de la tensión superficial y la relación I_1/I_3 del espectro de fluorescencia del pireno en función de la concentración de 15DDA

Figura 4.28 Variación del diámetro hidrodinámico con la concentración de los copolímeros

Figura 4.29 Distribución del diámetro hidrodinámico con la concentración: A) 15DDA y B) 45DDA

Figura 4.29 A y B Imágenes obtenidas por SEM y TEM de los nanoagregados poliméricos





INTRODUCCIÓN





1. Introducción

1.1 Motivación y estructura de la tesis

La administración de sustancias con actividad terapéutica, tanto de origen natural como sintético, ha constituido uno de los principales desafíos en la formulación de las formas terminadas de los medicamentos [Vila, 2006]. Para hacer frente a este reto se han desarrollado sistemas que contienen al principio activo incluido en un vehículo que lo transporta [Brigger et al., 2002; Yeo et al., 2001].

Los nanoagregados poliméricos autoensamblados a partir de copolímeros anfifílicos constituyen una de las alternativas estudiadas por la comunidad científica en el transporte de fármacos, debido a las propiedades de su reservorio de encapsular, estabilizar y liberar sustancias atrapadas en su interior [Taek et al., 2009; Benny et al., 2008].

El tamaño de los nanovehículos (10-100 nm) y su corona hidrofílica, formada generalmente por un polímero soluble, flexible, biocompatible, hidrofílico y neutro como el polietilenglicol (PEG), limita su interacción con el sistema reticuloendotelial y prolonga el tiempo de circulación del fármaco, lo que aumenta su eficacia y seguridad [Vihola, 2007; Gaucher et al., 2005]. Además, el polímero que la constituye puede ser modificado para alterar las propiedades superficiales del nanoagregado, lo que permite dirigirlo a un sitio específico, disminuyendo los efectos colaterales del fármaco [Prabaharan et al., 2009]. Las micelas poliméricas, debido a su tamaño nanométrico y arquitectura núcleo-corona, en la cual se pueden encapsular o dispersar sustancias de diferentes naturaleza físico-química, encuentran múltiples aplicaciones en el diseño de sistemas de liberación sostenida de fármacos, así como en herramientas de

diagnóstico y como vectores en terapia génica [Harada y Kataoka, 2006; Kundu y Sharma, 2008; Bromberg, 2008].

Estos nuevos materiales desarrollados en las últimas décadas permiten modular la biodistribución de los fármacos y se espera que “destruyan” selectivamente las células en los tejidos y órganos dañados, sin afectar las celulosas sanas. Esta idea fue formulada por primera vez por el alemán Paul Ehrlich en 1906, llamando a esa formulación hipotética bala mágica (*magic bullet*, del inglés). Un siglo y poco más después, gracias a los avances alcanzados en las ciencias, la idea se ha convertido en una realidad clínica [Rapopor, 2007].

En este sentido, los polisacáridos y sus derivados han ganado cada vez más espacio debido a la necesidad de contar con materiales obtenidos a partir de fuentes baratas, renovables, abundantes y seguras. Estos polímeros naturales se caracterizan por ser hidrofílicos, biocompatibles y biodegradables. Además, su estructura estereoregular, con múltiples centros quirales y diversidad de grupos funcionales reactivos los convierten en precursores muy interesantes para la síntesis de nuevos polímeros con propiedades ajustadas a la medida.

En el centro de atención se encuentra la síntesis de productos con un patrón de sustitución controlado, donde se encuentre presente más de un grupo funcional, combinación de funciones diferentes (hidrofílico/hidrofóbico), la introducción de grupos con propiedades ópticas, magnéticas, redox, actividad biológica, etc.

En particular, los nuevos materiales injertados con moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas (con uno de ellos en muy bajo por ciento), obtenidos a partir de los derivados solubles de la celulosa, muestran propiedades muy interesantes.

Entre ellas se puede mencionar el limitado efecto que ejerce el incremento de la concentración de electrolitos en sus disoluciones y la baja viscosidad de las mismas, en comparación con sus precursores. Además, se autoensamblan en micelas, las cuales podrían encontrar aplicación en las formulaciones farmacéuticas de nuevos y viejos fármacos de reconocida actividad terapéutica que han sido relegados debido a su toxicidad inherente y bajos perfiles farmacocinéticos.

Tomando en consideración estos antecedentes nos encontramos frente al **problema científico** de que algunos fármacos liposolubles requieren ser formulados en nuevos materiales anfifílicos para incrementar su biodisponibilidad. Este trabajo se propone comprobar la siguiente **hipótesis**: la carboximetilcelulosa-*g*-dodecilamina-*g*-polietilenglicol se comporta en disolución acuosa como un material anfifílico que se autoensambla espontáneamente en nanoagregados.

El trabajo que se presenta se propone como **objetivo general**: sintetizar, caracterizar y evaluar el comportamiento en disolución de un derivado anfifílico obtenido a partir de la carboximetilcelulosa.

Para cumplir con este propósito general, se proponen los siguientes **objetivos específicos**:

1. sintetizar el polialdehído de la carboximetilcelulosa (CMCO) a partir de la carboximetilcelulosa. Estudio de algunos parámetros de la reacción de oxidación con periodato de sodio.
2. Sintetizar polímeros que posean propiedades anfifílicas, tal como la carboximetilcelulosa-*g*-dodecilamina-*g*-polietilenglicol, a partir de la CMCO.

3. Verificar la efectividad del método de síntesis por espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier y Resonancia Magnética Nuclear de protones (*FTIR* y ^1H -RMN, de sus siglas en inglés).
4. Caracterizar los derivados por termogravimetría, calorimetría diferencial de barrido (*TGA* y *DSC*, de sus siglas en inglés), difracción de Rayos X, medidas de tensión superficial y espectroscopia de fluorescencia.
5. Evaluar el potencial zeta (ζ) y diámetro hidrodinámico (D_h) de los nanoagregados formados, así como su variación con la concentración y el pH.
6. Determinar la morfología de los nanoagregados por microscopía electrónica de barrido y de transmisión (*SEM* y *TEM*, de sus siglas en inglés).

La **novedad científica** se sustenta en el hecho de reportar una metodología para la síntesis de varios copolímeros anfifílicos a partir de la carboximetilcelulosa que se autoensambla espontáneamente en disolución acuosa que podría encontrar aplicación en el transporte de fármacos liposolubles.

El trabajo que se presenta está estructurado en seis capítulos centrados cada uno de ellos en una parte específica del trabajo efectuado.

En el Capítulo 1 se hace una breve introducción del tema a tratar, especificándose los objetivos principales que se pretenden cubrir en el trabajo.

El Capítulo 2 se inicia con una revisión sobre el autoensamblado, los tensoactivos en disolución, concentración micelar crítica y clasificación de los tensoactivos. Se incluye el tema de los tensoactivos poliméricos, los copolímeros de bloque alternado con segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos, los

copolímeros con cadena hidrofílica injertada con segmentos hidrofóbicos. Por último se desarrolla el tema de la carboximetilcelulosa, sus derivados anfílicos, oxidación con periodato de sodio y cierra el capítulo el acápite del PEG en sistemas micelares.

En el Capítulo 3 describe las características de los materiales, los equipos y los métodos analíticos empleados en el trabajo.

En el Capítulo 4 se presentan los resultados derivados en las distintas fases del trabajo y se divide en tres partes: en la primera se detallan los resultados obtenidos en la caracterización de la carboximetilcelulosa. La segunda está centrada en la oxidación de la carboximetilcelulosa con periodato de sodio. La tercera en la evaluación de los copolímeros anfílicos obtenidos tanto en fase sólida como en disolución.

En el Capítulo 5 se presentan las conclusiones más relevantes alcanzadas, basándose en los resultados obtenidos.

Las recomendaciones para completar el trabajo aparecen en el Capítulo 6 y finalmente se presentan las referencias bibliográficas.

Se debe mencionar que el trabajo experimental de esta tesis doctoral ha sido realizado tanto en el departamento de Desarrollo del Instituto Cubano de Investigaciones de la Caña de Azúcar (ICIDCA) como en el Departamento de Química-Física de la facultad de Química de la Universidad de la Habana. Así mismo una parte del estudio de la síntesis y caracterización de los polímeros autoensamblados en disolución acuosa se desarrolló en el departamento de Química y Ciencias Ambientales, Instituto de Biociencias Letras y Ciencias Exactas (IBILCE), de la Universidad Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de San José do Río Preto, São Paulo, Brazil y se completó en el

Centro Singular de Investigaciones en Química Biológica y Materiales Moleculares (CIQUS) de la Universidad de Santiago de Compostela, España.





ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN





2. Antecedentes y justificación

2.1 Autoensamblado

El origen de la vida puede verse como producto del incremento de la complejidad molecular y la especificidad [Oparin, 1938], lo cual se encuentra asociado a la formación de estructuras autoorganizadas [Kötz, 2001] fruto de la capacidad de algunas macromoléculas de autoensamblarse en disolución acuosa. Este tema se abrió a la comunidad científica después de la conferencia profética “There’s plenty of room at the bottom. An invitation to enter a new field of physics”, impartida por R.P. Feynman [Feynman, 1960].

La asociación espontánea de moléculas en geometrías bi y tridimensionales bajo condiciones definidas se ha denominado autoensamblado [Lee, 2008; Schwartz, 2010], para ello la naturaleza utiliza unos pocos elementos o bloques de construcción como por ejemplo: aminoácidos, lípidos, anhidroglucosa, etc.; a través de los cuales forma estructuras muy complejas y diversas como las proteínas, membranas o la celulosa [Klemm, 1998; Rodríguez, 2005]. Estas moléculas están constituidas por casi los mismos átomos. Sin embargo, difieren grandemente en sus propiedades físico-químicas debido a la forma en que fueron autoorganizados los mismos, diferencia que según Drexler [Drexler, 1986] separa lo barato de lo caro y lo sano de lo enfermo, cuando hace distinción entre el cáncer y un tejido sano.

Los procesos de autoensamblado pueden ser clasificados tomando en consideración diferentes elementos: según su naturaleza en termodinámicos o cinéticos; según el lugar donde se producen en biológicos o interfaciales y por el

tamaño y naturaleza de las unidades de construcción en atómicos, moleculares o coloidales [Lee, 2008].

En el proceso de autoorganización participan fuerzas débiles, que se pueden agrupar en tres categorías: i) las que tienden a mantener cercanas las unidades primarias de construcción en la estructura autoensamblada; ii) las opuestas a mantener próximas las unidades de construcción y iii) las funcionales que determinan la direccionalidad y funcionalidad del agregado autoensamblado.

El objeto producto del autoensamblado solo se forma cuando se alcanza un balance entre las fuerzas involucradas en el sistema. En la formación de micelas, a partir de tensoactivos de naturaleza iónica, se considera que las interacciones hidrofóbicas favorecen el autoensamblado y por tanto son consideradas las fuerzas que gobiernan dicho proceso, mientras que la repulsión electrostática o la solvatación actúan como fuerzas opuestas.

2.2 Tensoactivos en disolución acuosa

Los tensoactivos, surfactantes o agentes activos superficialmente se caracterizan por ser moléculas de naturaleza anfifílica (**Figura 2.1**). Término derivado de la palabra Griega “anfi” que significa “ambas partes” [Shaw, 1992; Holmberg, 2002; Fernández, 2006]; se refiere al hecho de que todas las molécula anfifílicas contienen al menos dos regiones, una soluble en un solvente (parte liofílica) y otra insoluble (parte liofóbica). Estas sustancias están constituidas por bloques hidrofóbicos unidos a grupos o bloques hidrofílicos o viceversa, así que la molécula resultante es compuesta de regiones que tienen

afinidades diferentes por el solvente. Cuando éste es el agua hablamos de regiones hidrofílicas e hidrofóbicas [Shaw, 1992; Holmberg, 2002].

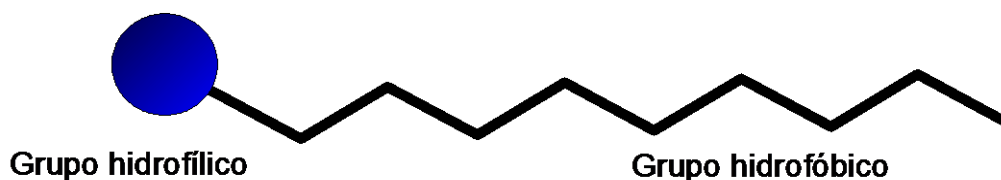


Figura 2.1 Esquema de una molécula de tensoactivo de bajo peso molecular. Adaptado de la referencia Holmberg, 2002

Cuando disolvemos una sustancia anfifílica polimérica en agua (un buen solvente para uno de los bloques y mal solvente para el otro) sus moléculas generalmente migran a la superficie de manera que su segmento polar se orienta hacia la fase acuosa y el apolar a la gaseosa. En la medida que sea mayor la tendencia del tensoactivo de acomodarse en la interfase, mejor desempeño tendrá en la reducción de su tensión superficial por lo que se consideraría un mejor tensoactivo.

Se debe mencionar que no todas las moléculas de naturaleza anfifílica se pueden considerar tensoactivos porque estos además de reducir la tensión superficial tienen la propiedad de asociarse para formar objetos estructurados a escala nanométrica [Schukin, 1988; Pasquali, 2005], es decir sus segmentos hidrofóbicos interaccionan autoensamblándose en un núcleo rodeado de una empalizada o corona hidrofílica que actúa como interfase, separando y estabilizando el agregado del medio acuoso [Francis, 2004]. De aquí su capacidad de solubilizar sustancias insolubles en agua.

La segregación del núcleo del medio acuoso es la fuerza que impulsa el proceso de autoensamblado, al mismo tiempo que se produce un aumento de la entropía de las moléculas del disolvente, disminuyendo la energía libre del sistema y favoreciendo el proceso [Kataoka, 2001; Rodríguez, 2005]. Dentro de estas fuerzas intermoleculares se incluyen interacciones hidrofóbicas, electrostáticas, acomplejamiento metálico y enlaces por puentes de hidrógeno. Las mismas, permiten clasificar las micelas en anfífilas, poli-iónicas complejas y las formadas por acomplejamiento metálico.

Se puede mencionar como ejemplo de micelas obtenidas por acomplejamiento metálico la coordinación del *cis*-platino con el copolímero polietilenglicol-*b*-ácido poliaspártico [Harada y Kataoka, 2006]. De las poli-iónicas complejas, a las formadas cuando se mezclan polietilenglicol-*b*-ácido poli(α , β -aspártico) con polietilenglicol-*b*-ácido poli(L-lisina) [Kataoka et al., 2001]. Aquí la asociación se produce entre segmentos de copolímeros de carga opuesta pero igual, resultando un polión soluble. Las anfífilas se obtienen por interacciones hidrofóbicas intramoleculares, como en el caso del poliestireno-*b*-poli(2-vinilpiridina)-*b*-polietilenglicol [Hamley, 2005].

Revisaremos en más detalle las micelas anfífilas que tienen la peculiaridad de separar físicamente cada parte o bloque a través de la formación de estructuras autoensambladas, a escala nanométrica. Esto las ha convertido en un área de constante desarrollo en las últimas tres décadas. Esta separación de microfases comienza a producirse cuando se sobrepasa cierto valor de concentración denominado concentración micelar crítica (CMC).

2.2.1 Concentración micelar crítica

Cuando se comienza a incrementar la concentración de un tensoactivo en agua, éste en la primera etapa intenta migrar a la superficie de manera de reducir el contacto del segmento apolar con la fase acuosa hasta que se alcanza un valor de concentración en que la superficie se satura y se inicia el autoensamblado de sus moléculas en nanobjetos de geometría “esférica”, llamados micelas. A este valor o rango de concentración por encima del cual aparecen los primeros agregados se le denomina CMC. Se reporta también en algunos textos como concentración de agregación crítica cuando se refiere a tensoactivos de alto peso molecular. La CMC es característica para cada surfactante, dependiendo de su composición química y arquitectura. Así, a medida que sea mayor la cadena hidrocarbonada más rápido se alcanza la saturación y por tanto menor valor tendrá la CMC. La dependencia con la temperatura no es lineal, sin embargo la adición de sales la disminuyen notablemente al favorecerse las interacciones hidrofóbicas.

Cuando hablamos anteriormente de saturación, nos referimos al punto de concentración donde las interacciones hidrofóbicas entre las moléculas del tensoactivo se vuelven lo suficientemente fuerte como para formar un agregado espontáneamente del tipo micelar en agua, dejando de migrar las mismas a la superficie. Por ello se considera la CMC más que un valor puntual un rango de concentración, porque se corresponde con el inicio de la formación de los agregados moleculares a partir de las moléculas libres en disolución. No obstante, se reporta como valor de la CMC el comienzo del proceso de autoensamblado.

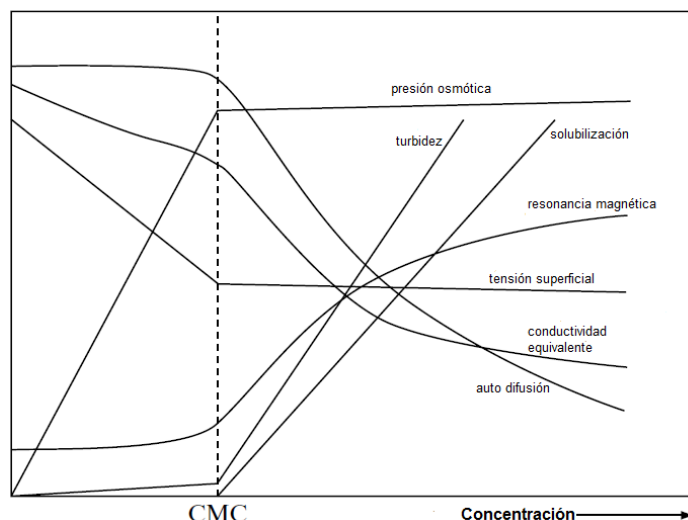


Figura 2.2 Representación esquemática de la variación de algunas propiedades físicas con la concentración de tensoactivo. Adaptado de la referencia Holmberg, 2002

La CMC se puede estimar siguiendo la variación de una propiedad física como la tensión superficial, conductividad eléctrica, presión osmótica, fluorescencia, etc. con la concentración del tensoactivo (**Figura 2.2**). En todos los casos aparece un cambio brusco de pendiente que se asocia con la aparición de las primeras micelas y por tanto con el valor de la CMC. Sus valores se encuentran entre $1 \cdot 10^{-4}$ y $1 \cdot 10^{-2}$ mol L⁻¹ y se han reportado valores menores para los tensoactivos no iónicos que para los iónicos.

Ahora bien, es importante decir que una vez alcanzada la CMC cualquier adición posterior de tensoactivo no afecta la tensión superficial del sistema, solo incrementaría la concentración de micelas en disolución. Además, las micelas coexisten en un equilibrio dinámico de intercambio con las moléculas disueltas del tensoactivo (llamados unímeros) (**Figura 2.3**). Esto significa que a baja concentración solo encontraríamos una disolución molecular de unímeros en agua, que se asocian en agregados tipo micelas cuando su concentración

se incrementa por encima de la CMC. Considerándose ésta la primera forma de autoensablado del tensoactivo o surfactante.

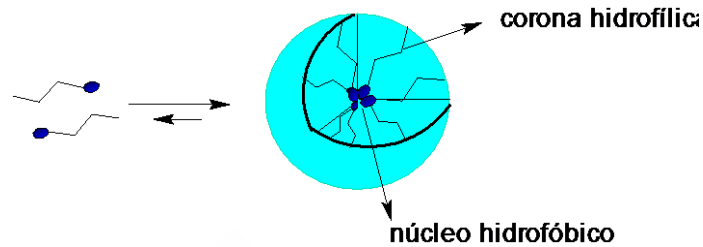


Figura 2.3 Representación esquemática del equilibrio entre unímeros y micelas

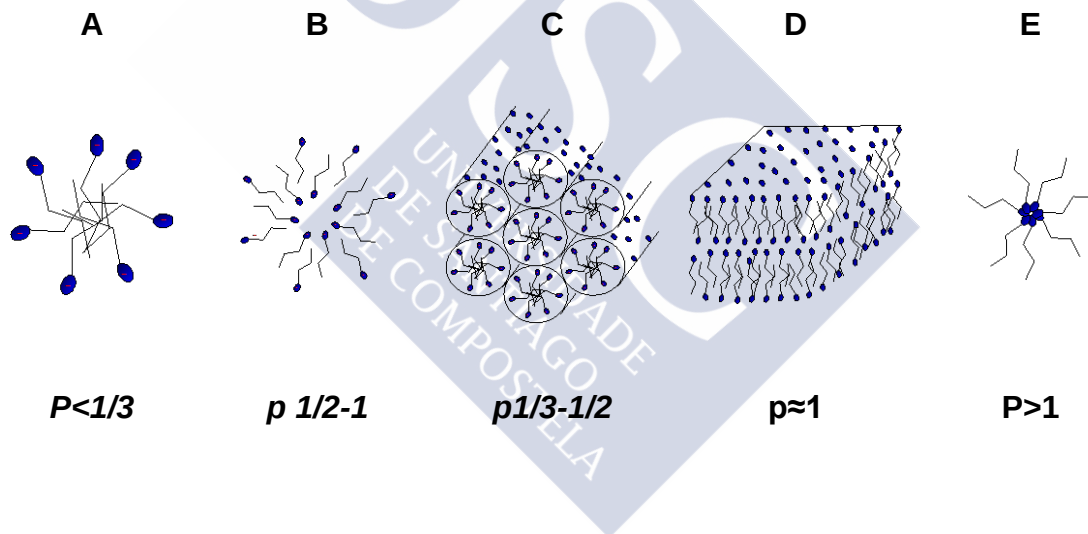


Figura 2.4 Esquemas geométricos de posibles estructuras micelares: A) esférica; B) vesícula; C) cilíndrica; D) lamela; E) esférica invertida. Adaptado de la referencia Shaw, 1992

El balance entre los segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos, así como la concentración del tensoactivo, determinan el tamaño y la arquitectura que pueden adoptar estos agregados en disolución acuosa (**Figura 2.4**) cuando su concentración excede la CMC, cuyas formas pueden ser: esféricas, vesiculares, lamelares, cilíndricas, etc. [Harada, 2006; Letchford, 2007].

Sus características geométricas quedan predefinidas por tres parámetros: el área a_o ocupada por el grupo polar en la superficie de la micela, el volumen v ocupado por la cadena hidrofóbica y su longitud l_o máxima [Israelachvili, 1976]. Los cuales, se interrelacionan según el parámetro de empaquetamiento p o forma (**Figura 2.5**):

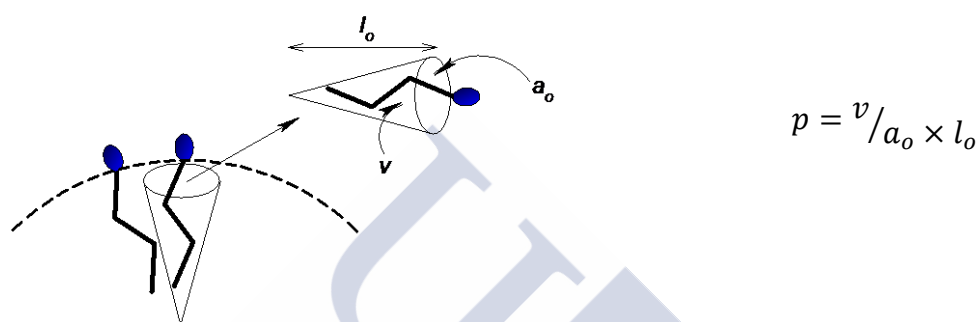


Figura 2.5 Esquema del parámetro de empaquetamiento p . Adaptado de la referencia Rodríguez, 2005

Los valores de este parámetro permiten predecir, de forma aproximada, la estructura geométrica que adoptará la micela en disolución acuosa. Así, para $p \approx 1/3$ se tendrán micelas esféricas; cilíndricas para valores de p entre $1/3$ - $1/2$. Las vesículas se forman con mayor tendencia cuando el valor de p se encuentra entre $1/2$ - 1 , las bicapas o lamelas para $p \approx 1$ y las micelas invertidas para $p > 1$ (**Figura 2.4**).

El método a seleccionar para obtener dichas micelas en disolución acuosa dependerá de las propiedades de solubilidad del compuesto anfifílico en cuestión. Para los solubles se utiliza el método directo que consiste en preparar una disolución a una concentración por encima de la CMC. Para los pocos solubles se pueden utilizar dos alternativas: i) hacer diálisis o ii) una emulsión directa aceite/agua. En el primer caso se disuelve el surfactante en un solvente

orgánico y a continuación las micelas se forman haciendo diálisis contra agua. En la segunda alternativa se prepara una disolución en un disolvente orgánico volátil no miscible con el agua, con o sin surfactante y entonces se evapora el disolvente [Letchford y Burt, 2007].

En el caso particular de los polielectrolitos anfifílicos se considera que la formación de un microdominio hidrofóbico en disolución acuosa puede variar dependiendo de la densidad y tamaño de la cola hidrofóbica. En ellos la micela puede ser unimolecular o estar constituida por más de una cadena de tensoactivo, lo cual se ha intentado explicar a través de tres modelos: i) el de la micela local, ii) la regional y iii) la molecular [Nylander et al., 2006].

Ahora, es conveniente explorar brevemente el universo de los principales tensoactivos que nos podemos encontrar con mención a sus características.

2.3 Clasificación de los tensoactivos

La clasificación, más aceptada, de los surfactantes se basa en el grupo o bloque hidrofílico que se encuentra en la estructura de su molécula, lo que permite agruparlos en las siguientes clases: aniónicos, catiónicos, neutros y los zwitterion. A esta última clase pertenecen los surfactantes que tienen grupos cargados de polaridad opuesta. En función de su aplicación industrial, se pueden nombrar como: detergentes, emulsionantes, agentes humectantes y dispersantes.

En general, los surfactantes iónicos se caracterizan por tener un único grupo cargado a los cuales se encuentran asociados contraiones que mantienen la electroneutralidad y al mismo tiempo influyen en sus propiedades físico-químicas. Entre ellos el sodio es el catión más empleado en los surfactantes

aniónicos. Aunque también se encuentran el litio, calcio, potasio y las aminas cuaternarias. En los surfactantes catiónicos los haluros y el metilsulfato son los contraiones más utilizados [Holmberg, 2002].

El grupo hidrofóbico se caracteriza por ser una cadena hidrocarbonada: lineal, ramificada o aromática, con una longitud entre los 8-18 átomos de carbono. También, puede estar constituida por segmentos de dimetilsiloxano o de fluorcarbono [Salager, 2003].

Además, se debe mencionar que existen otros tipos de surfactantes que aparecieron más recientemente entre ellos los zwitterion, los cataniónicos, siliconados, perfluorados, diméricos y los poliméricos. A continuación revisaremos brevemente sus propiedades más importantes así como sus peculiaridades estructurales.

2.3.1 Tensoactivos aniónicos

Como su nombre lo indica en su estructura molecular se encuentra un grupo ionizable de carga negativa, de naturaleza anfifílica. Usualmente del tipo carboxilato, fosfato, sulfonato o fosfato (**Figura 2.6**). Los contraiones sodio y potasio imparten solubilidad en agua mientras que el calcio [Zapf, 2003] y el magnesio en solventes apolares.

La producción mundial de estos tensoactivos se encuentra en el orden del 55-60 % [Álvarez, 2004], debido a la facilidad y bajos costos asociados a su obtención. Se utilizan en la formulación de la mayoría de los detergentes que utilizamos en nuestros hogares. Su mejor detergencia la consiguen con cadenas alquílicas y alquilarílicas en el rango de C12-C18.

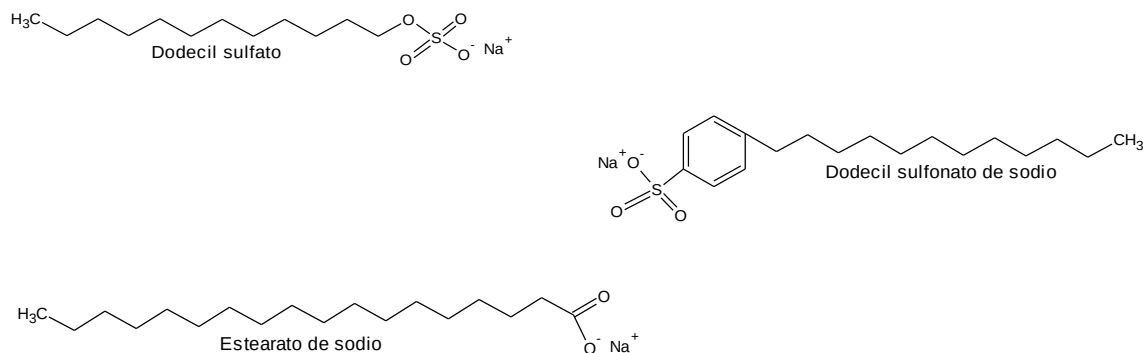


Figura 2.6 Estructura de algunos tensoactivos aniónicos

2.3.2 Tensoactivos neutros o no iónicos

Los tensoactivos no iónicos no producen iones en disolución acuosa debido a que en su estructura molecular el grupo hidrofílico generalmente se encuentra formado por un poliéter o unidades polihidroxiladas, como los azúcares. Por otro lado, alcoholes, fenoles, aminas y ácidos grasos constituyen la cola hidrofóbica (**Figura 2.7**). Se caracterizan por ser compatibles con otros surfactantes y por no ser sensibles al agua dura, pero sí al incremento de la temperatura.

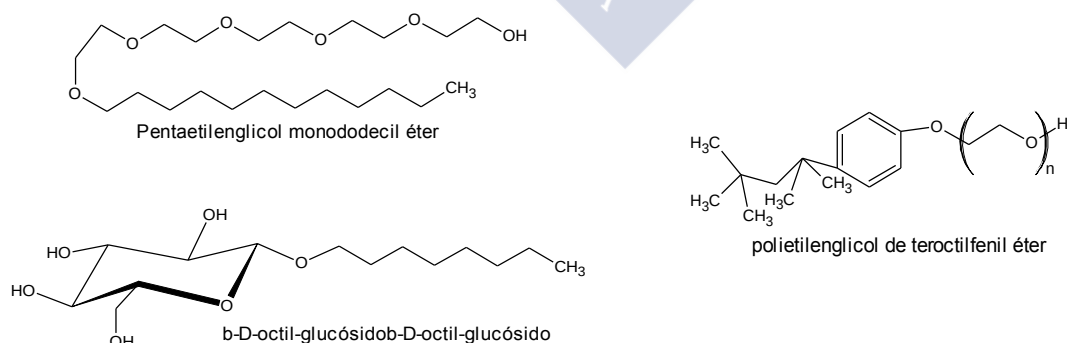


Figura 2.7 Estructura de algunos surfactantes no iónicos

De acuerdo a su volumen de producción ocupan el segundo lugar en importancia a nivel mundial, cubriendo entre el 35-40 % del mercado. De ello el 70 % es dominado por los polietoxilados [Fernández, 2004].

2.3.3 Tensoactivos catiónicos

Al disociarse en agua lo hacen en un catión anfifílico y un anión del tipo haluro. En la mayoría de estos surfactantes el grupo cargado positivamente se encuentra formado por átomos de nitrógeno en forma de aminas protonadas o de sales cuaternarias de amonio (**Figura 2.8**). Aunque también se tienen surfactantes con grupos fosfonio y sulfonio. El grupo hidrofóbico generalmente lo forman una o dos cadenas alquílicas proveniente de ácidos grasos.

La principal diferencia entre los portadores de nitrógeno radica en la susceptibilidad de las aminas a valores de pH elevados, mientras que las sales cuaternarias se pueden utilizar en todo el intervalo de pH, sin perder sus propiedades.

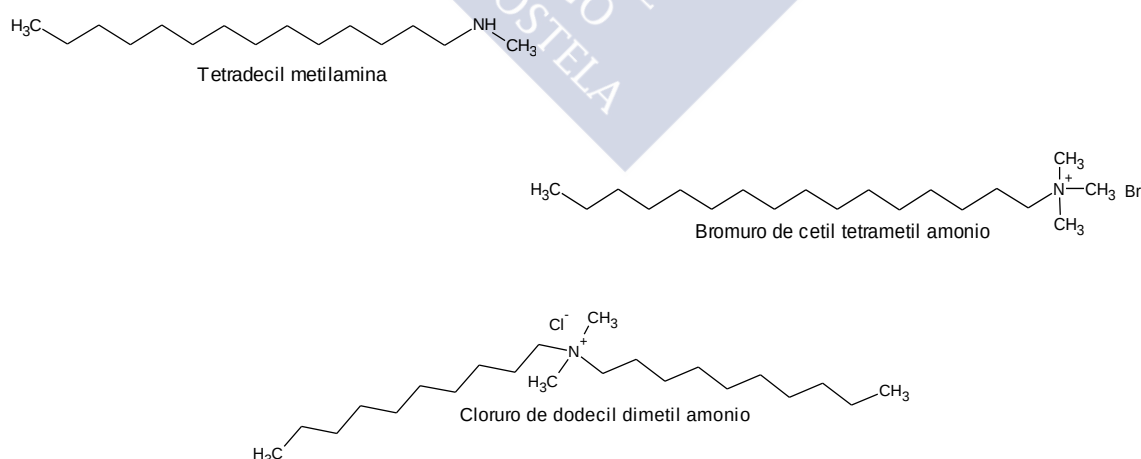


Figura 2.8 Estructura de algunos tensoactivos catiónicos

Se debe destacar que son mucho más costosos que los aniónicos, debido a la reacción de hidrogenación que se realiza durante su síntesis. Como

consecuencia, el segmento del mercado que ocupan alcanza solo un 5 %, constituyendo la tercera clase en importancia de acuerdo al volumen de producción.

La carga positiva les permite adsorberse en muchas de las superficies, encontrando aplicación como agentes anticorrosivos, antiestáticos, dispersantes, bacteriostáticos, etc.

2.3.4 Tensoactivos zwitterion

Los surfactantes zwitterion presentan en su estructura grupos cargados positiva y negativamente (**Figura 2.9**), lo que sugiere que dependiendo de las condiciones ácidas o básicas del medio prevalecerá en forma catiónica o aniónica, respectivamente. Solo cerca de su punto isoeléctrico (en que se igualan las cargas,) se comportan verdaderamente como un zwitterion, manifestando a menudo un mínimo de actividad superficial y un máximo de solubilidad en agua.

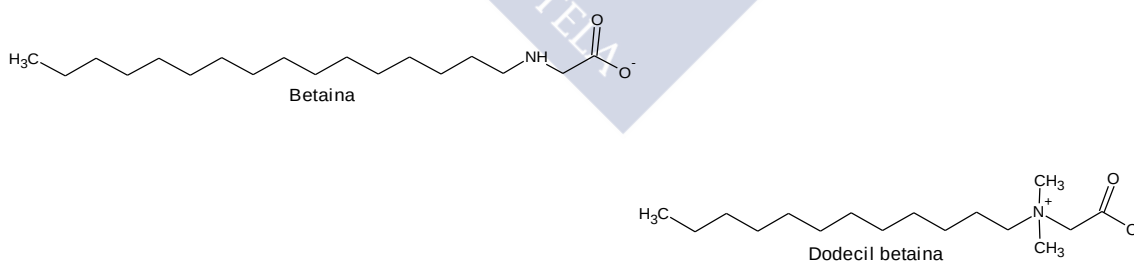


Figura 2.9 Estructura de algunos tensoactivos zwitterion

Las sales de amonio cuaternario son generalmente los responsables de conferirle carga positiva, mientras que la negativa es aportada en muchos productos por grupos carboxilatos. Cubren el 3 % del mercado, por lo que son

los menos utilizados. Sin embargo, presentan excelentes propiedades dermatológicas y son compatibles con los otros tipos de tensoactivos.

2.3.5 Tensoactivos cataniónicos

Al producto de la unión de un surfactante aniónico y uno catiónico a través de la interacción electrostática de sus grupos de carga opuesta, se le denomina tensoactivo cataniónico o de par iónico. Estos surfactantes no poseen una carga eléctrica neta (**Figura 2.10**), en estos casos un ion hidrocarbonado de cadena larga actúa como contraión de la otra [Marques, 2003]. Su comportamiento es diferente al de la mezcla equimolar de dos surfactantes de carga opuesta acompañados de sus contraiones inorgánicos [Tondre, 2001; José, 2014].

Estos productos presentan nuevas e interesantes propiedades en disolución y en las interfaces [Li, 2003; Hao, 2004]. Por ejemplo, el valor para la concentración micelar crítica es inferior a la reportada para sus componentes individuales [Ortega, 2009].



Figura 2.10 Estructura de un tensoactivo cataniónico entre el anión dodecibencenosulfonato de sodio y el catión dodeciltrimetilamonio

2.3.6 Tensoactivos siliconados y fluorados

Los surfactantes siliconados se obtienen cuando en la estructura molecular de una sustancia anfifílica se sustituye total o parcialmente la cadena hidrofóbica

hidrocarbonada o arilalquílica, por un segmento constituido por grupos dimetil siloxanos, lo que permite reducir el tamaño de la cola liposoluble y mantener una hidrofobicidad similar, debido al mayor carácter hidrofóbico de los mismos. Se caracterizan por ser inertes fisiológicamente, encontrando aplicación en la industria farmacéutica [Salager, 2002].

Los fluorados, por otra parte, se sintetizan cuando en la cadena hidrofóbica se introducen átomos de flúor en lugar de los hidrógenos de los grupos metileno. El hidrocarburo perfluorado incrementa la estabilidad química, térmica y la hidrofobicidad del derivado anfifílico [Xu y Liu, 2008]. Lo que provoca que sus propiedades como surfactantes se manifiesten más acentuadamente, toleren mejor altas concentraciones de sales y de iones divalentes que su contraparte hidrocarbonada de igual número de átomos de carbono. Sin embargo, el costo asociado a su obtención es elevado por lo que solo se justifica su utilización en aplicaciones especiales, como en las espumas de los extintores contra incendios.

2.3.7 Tensoactivos diméricos o géminis

Estos surfactantes (**Figura 2.11**) consisten en la unión de dos moléculas anfifílicas a través de un grupo espaciador, de naturaleza hidrofílica o hidrofóbica; rígido o flexible. Se caracterizan por presentar una actividad superficial extraordinaria y un comportamiento inusual en disolución acuosa [Shukla, 2008]. Sus grupos hidrofílicos pueden ser neutros o eléctricamente cargados y el segmento hidrofóbico simétrico o asimétrico en relación a su longitud [Holmberg, 2002].

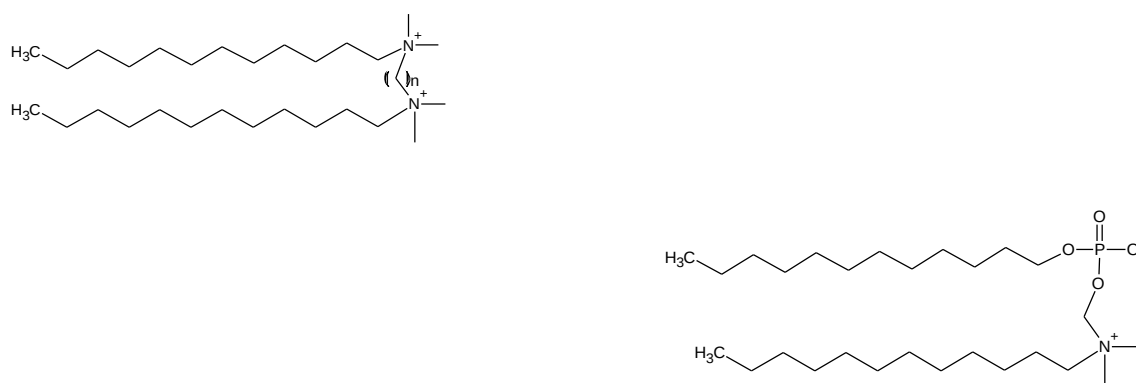


Figura 2.11 Estructura esquemática de dos tensoactivos diméricos o géminis

2.3.8 Tensoactivos poliméricos

Es importante al iniciar la presentación de este acápite aclarar la diferencia entre tensoactivos poliméricos y polímeros asociativos. Ambos son macromoléculas solubles que contienen grupos hidrofóbicos distribuidos a lo largo de la cadena o en uno de sus extremos, que les permiten asociarse en diversas estructuras en disolución [Abdala et al., 2003]. Sin embargo, los polímeros asociativos se caracterizan porque sus disoluciones acuosas son altamente viscosas debido a la asociación intermolecular entre sus cadenas. En cambio, en un surfactante polimérico permanece baja aún a elevadas concentraciones. Esto indica que la asociación principalmente es del tipo intramolecular, con ninguna o muy poca formación de redes poliméricas [Nylander et al., 2006].

Se caracterizan por presentar varias propiedades físico-químicas que permiten distinguirlos de las demás familias de tensoactivos [Duval, 2003], entre las más significativas cabe destacar: su comportamiento macromolecular, la formación de estructuras autoensambladas a valores de concentración un

orden de magnitud inferior a los reportados para su contraparte de bajo peso molecular, la mayor estabilidad de los nanoagregados formados y agregación intramolecular. También, presentan poca sensibilidad frente a cambios de temperatura y de salinidad. Además, ofrecen la oportunidad de diseño con control del balance hidrofílico/hidrofóbico de sus bloques y del peso molecular [Anton, 1994].

Esto ha permitido su aplicación no solo como detergentes, sino también como alternativa para el diseño de nuevos materiales que forman algún tipo de objeto nanoestructurado, por medio del autoensamblado espontáneo o no de sus moléculas [Ozin et al., 2009].

En este contexto, se explorará con más detalle la literatura vinculada a la obtención de micelas o nanoagregados en disolución acuosa, a partir de copolímeros de bloque e injertados.

2.4 Polímero y copolímeros de bloque

Un polímero es una macromolécula constituida por muchas subunidades denominadas monómeros, enlazadas covalentemente [Odian, 2004], según la etimología de la palabra, significa “muchos miembros”. Cuando la cadena es formada por el mismo monómero, se obtiene un homopolímero; si se utilizan dos o más monómeros se forma un copolímero, que puede ser lineal o ramificado, cargado o no (**Figura 2.12**).

En la década del 50 del siglo pasado se inició el proceso de desarrollo de la síntesis de los copolímeros de bloque y con ello la de los tensoactivos poliméricos. En estas sustancias, bloques con propiedades físico-químicas diferentes se conectan a través de enlaces covalentes que impiden su

separación en disolución a nivel macroscópico pero no a escala nanométrica donde aparecen microfases de objetos estructurados [Schwartz, 2010].

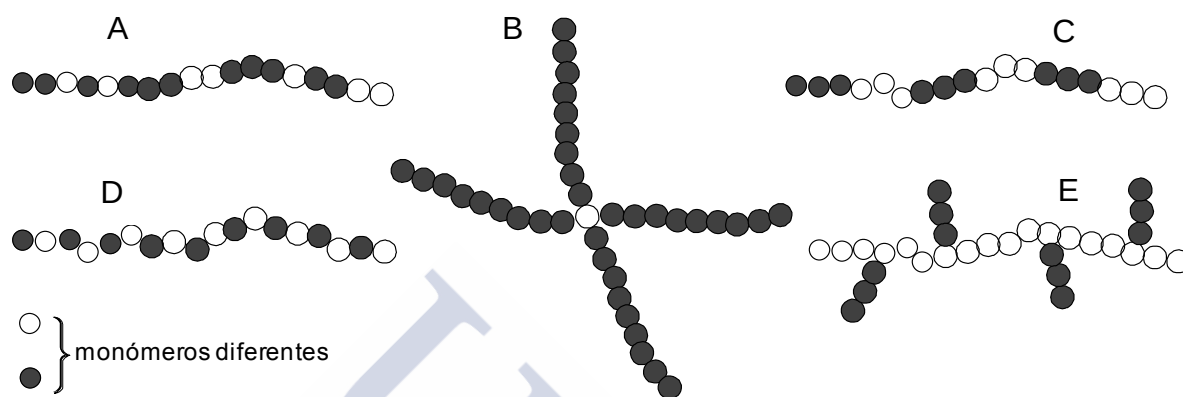


Figura 2.12 Representación esquemática de algunos copolímeros: A) azar; B) estrella; C) bloque; D) alternado; E) injertado

De forma general se puede decir que se conocen tres procedimientos de síntesis para su obtención: alternar segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos en la cadena del nuevo polímero, injertar cadenas hidrofílicas a una macromolécula hidrofóbica o injertar cadenas hidrofóbicas a un polímero hidrofílico.

En cualquiera de las alternativas se precisa tener “control” sobre la microestructura del copolímero para poder regular su comportamiento. Afortunadamente los avances en la síntesis macromolecular permiten construir cadenas incorporando monómeros de diversa naturaleza química de la forma deseada a través de la polimerización radicalica de transferencia de átomo, de cadena (*ATRP* y *RAFT*, de sus siglas en inglés), aniónica viviente, entre otras [Dimitrov et al., 2007; Bajpai, 2008; Saito, 2008]. Estas técnicas garantizan un control adecuado sobre la polidispersidad, el peso molecular y estructura del copolímero.

En el caso de la modificación de polímeros preformados, como los carbohidratos, la síntesis se puede realizar por reacción directa entre grupos funcionales complementarios [Duran, 2007], o si se prefiere por injerto de cadenas laterales hidrofóbicas por polimerización radicalica [Zhang, 2001]. Los productos finales por lo general son polidispersos, con un patrón de sustitución irregular. Aunque se han reportado estudios de reacciones regioselectivas que garantizan el control sobre la microestructura del copolímero [Heinze y Liebert, 2001] y con ello la posibilidad de obtener resultados reproducibles.

2.4.1 Copolímero de bloque alternado con segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos

Los copolímeros anfifílicos con bloques alternantes forman objetos de tamaño nanométrico de forma y tamaño predecible con bastante simplicidad, de aquí el gran interés suscitado en sectores académicos e industriales. Así, nanoagregados tipo micelas se pueden formar de una gran variedad de copolímeros de bloque. El detalle a considerar es que uno de los bloques sea soluble en el solvente seleccionado, mientras que el otro sea poco soluble. Además, debe existir un balance adecuado tanto en su composición hidrofílica/hidrofóbica, como en su peso molecular.

Dentro de esta familia existen un gran número de surfactantes a nivel comercial. Siendo los más conocidos los terpolímeros Pluronic[®] (BASF), en los cuales el segmento hidrofílico es una cadena de PEG y la hidrofóbica polipropilenglicol o polibutilenglicol. Se caracterizan por exhibir una multitud de fases líquido cristalinas, pasando de micelas cúbicas a invertidas en los sistemas acuosos. Su CMC es relativamente alta, lo que ha llevado a la

búsqueda de alternativas para estabilizar las micelas que forman con vista a su utilización en el transporte de fármacos [Rapopor, 2007]. Tienen el inconveniente de que su velocidad de biodegradación es lenta, particularmente en aquellos copolímeros con altos porcentos de polipropilenglicol [Holmberg, 2002].

En el mismo sentido se han sintetizados copolímeros de bloque que respondan a estímulos físicos y químicos de forma controlada [Licciardi et al., 2006; Cabral y Kataoka, 2010]. Estos ensamblados se conocen como “inteligentes” (*smart*, del inglés) al experimentar un cambio abrupto en respuesta a modificaciones de temperatura, luz, ultrasonido o de pH, fuerza iónica, etc.

En general, los segmentos hidrófilos están constituidos por: 1) ácidos poliamino como el ácido poliaspártico; 2) poliésteres como los ácidos poliglicólico, poli(L-láctico), poli(D,L-láctico) y poli(ε-caprolactama) y 3) fosfolípidos/ácidos grasos de cadena larga.

Dentro de los copolímeros alternados que forman micelas cargados con fármacos a través de su conjugación o por atrapamiento físico se puede mencionar al polietilenglicol-*b*-ácido poliglutámico, una mezcla de Pluronic® (L61 y L127), el poli (N-isopropilacrilamida)-*b*-ácido poliacrílico, polietilenglicol-*b*-poli(L-lisina) [Li, 2008; Kakizawa y Kataoka, 2002; Bromberg, 2008].

Como inconvenientes, a estos copolímeros, se debe mencionar que requieren purificación exhaustiva para eliminar restos de monómeros, iniciadores, catalizadores, etc. Además, las micelas a partir de los copolímeros de bloque son generalmente más difíciles de formar y de mayor tamaño que la de los copolímeros injertados. Estos, además, permiten que sus propiedades puedan ser modificadas con mayor facilidad, por simple ajuste de la composición de la

mezcla reaccionante [Xun et al., 2011]. Lo que ha llevado a explorar otras alternativas para obtener materiales con comportamiento semejante. Dentro de ellas los carbohidratos juegan un papel preponderante debido a sus propiedades físico-químicas.

2.4.2 Copolímero con cadena hidrofílica injertada con segmentos hidrofóbicos

Se hará referencia exclusivamente a los copolímeros en que un carbohidrato de alto peso molecular constituye la cadena hidrofílica a la que se le ha injertado un bajo por ciento de grupos hidrofóbicos (5-10 %) entre los que se destacan: cadenas alifáticas o perfluoradas y sustituyentes aromáticos [Charpentier et al., 1997; Rosilio et al., 2000].

En este sentido los biopolímeros [Liu et al., 2008; Hassani et al., 2012]: celulosa [Zhang, 2001], quitosana [Sui et al., 2005], dextrana [Suarez et al., 2007], almidón [Wei et al., 2011], etc. y sus derivados, debido a sus propiedades no tóxicas, disponibilidad y bajo costo han jugado un papel preponderante, al ser utilizados como precursores en la obtención de copolímeros anfifílicos, injertando en sus estructuras segmentos o grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, así como sustituyentes de naturaleza anfifílica.

En particular, los derivados de la celulosa solubles comenzaron a ser utilizados con esta finalidad desde la década del 80 del siglo pasado cuando apareció el primer reporte sobre su modificación hidrofóbica [Landoll, 1982]. Posteriormente, se han reportado diversos estudios de injerto de segmentos liposolubles en derivados de la celulosa de naturaleza iónica como la carboximetilcelulosa, etilsulfato de celulosa y el sulfato de celulosa, así como

no iónicos como la hidroxietilcelulosa, metilcelulosa e hidroxipropilcelulosa. En todos los casos el grado de sustitución es bajo para preservar la solubilidad en agua. Al mismo tiempo se ha reportado su interacción con surfactantes de bajo peso molecular [Thuresson et al., 1997; Rodríguez et al., 2003; Burke y Palepu, 2001; Iamazaki et al., 2004].

El injerto o grafting de grupos hidrofóbicos se ha dirigido a los grupos hidroxilo libres existentes en estos carbohidratos o a los grupos funcionales introducidos en su esqueleto carbonado, formando éteres, ésteres o amidas con cloruros de ácidos, cloruros de alquilo, anhídridos de ácidos, epóxidos, aminas alifáticas, etc.

Surfactantes poliméricos han sido desarrollados a partir de derivados no iónicos de la celulosa como la hidroxipropilcelulosa, injertando en su estructura metacrilato de metilo por polimerización por radicales libres [Claro et al., 2008]. También, la hidroxietilcelulosa ha sido modificada hidrofóbicamente con 2,3-epoxipropilfenil éter, utilizando hidróxido de sodio como catalizador [Danilevicius et al., 2006]. Así como con glicidil hexadecil éter en medio básico [Silioc et al., 2007] y con grupos nonilfenol [Thuresson et al., 1997].

Los éteres iónicos de la celulosa también han sido precursores de surfactantes poliméricos que se asocian en disolución acuosa. Wei [Wei y Cheng, 2007] reportó la modificación hidrofóbica de la celulosa en medio homogéneo utilizando solventes apróticos e injertando en la primera etapa los segmentos hidrofóbicos utilizando cloruros de ácido de cadena lineal de diferentes pesos moleculares para posteriormente introducir un grupo iónico de tipo sulfato. Un surfactante anfótero fue preparado haciendo reaccionar el sulfato de celulosa con hidrocloreto de glicidil dodecil dimetilamonio [Hong et al., 2007].

Dentro de estos derivados, la carboximetilcelulosa también ha sido objeto de modificaciones con diferentes grupos hidrofóbicos, que veremos en detalle más adelante.

2.5 Carboximetilcelulosa

La carboximetilcelulosa (**Figura 2.13**) es el éter iónico más importante de la celulosa, con una producción anual de 300 000 t [Klemm et al., 1998]. Se obtuvo por primera vez y se comenzó a producir a gran escala en la segunda década del siglo XX [Heinze y Koschella, 2005]. Su alta demanda se corresponde con las múltiples aplicaciones que encuentra en: productos de cuidado personal, alimentos, perforación de pozos de petróleo, industria farmacéutica, papel, pinturas, etc. [Barba et al., 2002; Pushpamalar et al., 2006; Almlöf et al., 2013].

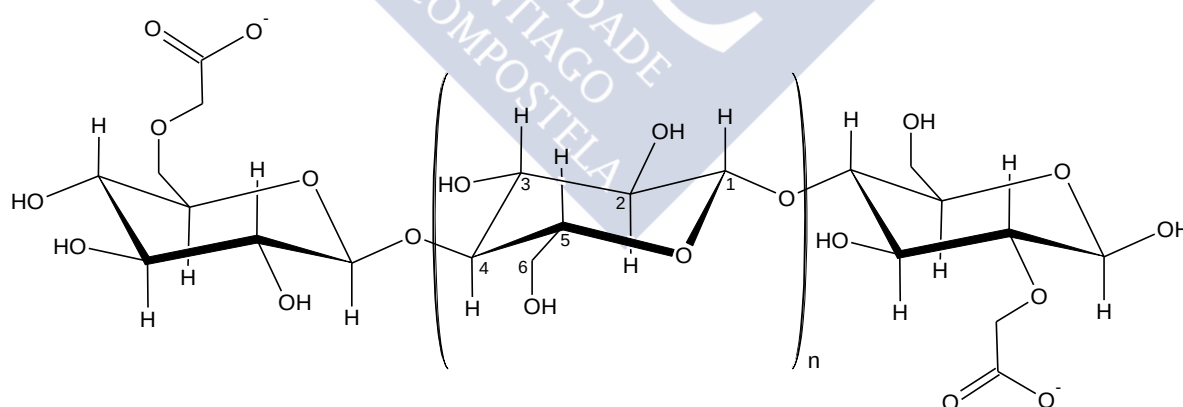


Figura 2.13 Representación estructural de la Carboximetilcelulosa

Es un polielectrolito aniónico, soluble en agua, no tóxico, biocompatible, disponible y barato [Biswal y Sing, 2004]. Se obtiene al hacer reaccionar álcali

celulosa con monocloroacetato de sodio. Bajo condiciones heterogéneas de síntesis el grado de sustitución depende de la activación de la celulosa, el medio de reacción, la concentración de los reactivos, la temperatura y del tiempo de reacción [Borsa, 1995], alcanzando valores entre 0,4-1,4.

Sus propiedades físico-químicas dependen de su peso molecular, así como del grado y distribución de los sustituyentes a lo largo de la cadena. La solubilidad en agua posibilita su modificación en fase homogénea. Pudiendo dirigir la reacción a los grupos hidroxilo libres, grupo carboximetílico o al carbono anomérico. También se puede modificar el esqueleto del carbohidrato para introducir nuevos grupos funcionales, más reactivos.

Se debe decir, además, que el precursor de la carboximetilcelulosa es el biopolímero más abundante en el planeta con un estimado 10^{11} t/a, y principal constituyente de las plantas. La celulosa, debido a su carácter renovable ha despertado el interés por el desarrollo de nuevas rutas de síntesis para obtener productos y materiales con propiedades únicas a partir de sus derivados [Heinze y Liebert, 2001], como los polímeros anfifílicos o asociativos.

2.5.1 Derivados anfifílicos de la carboximetilcelulosa

Los polisacáridos y sus derivados son considerados como una de las fuentes alternativas para el desarrollo de surfactantes biodegradables y biocompatibles, a través de nuevos desarrollos o por su inclusión en la estructura de los tensoactivos conocidos. En particular la carboximetilcelulosa puede ser convertida en un polielectrolito anfifílico después de su modificación química con grupos apolares de diversa naturaleza (**Figura 2.14**), siempre que se garantice el balance hidrofílico/hidrofóbico adecuado.

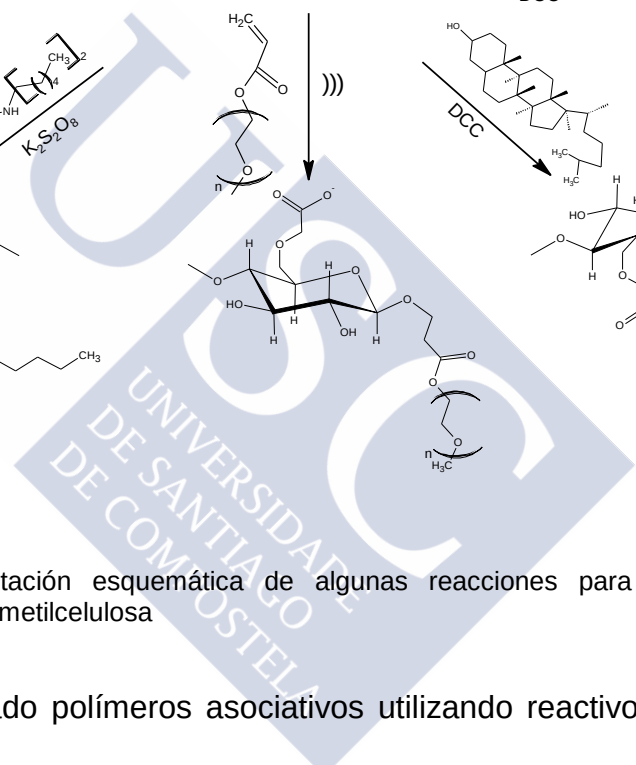


Figura 2.14 Representación esquemática de la hidrofobicidad de la carboximetilcelulosa

Así se han sintetizado polímeros asociativos utilizando reactivos alifáticos de cadena larga como: aminas primarias y secundarias con 4, 6, 8, 12 y 16 átomos de carbono [Rosilio et al., 2000; Cohen et al., 1998; Merle et al., 1999; Regia et al., 2008]. También, se pueden incluir en la mezcla reaccionante dos aminas de diferente tamaño de cadena [Charpentier et al., 2003]. En cualquier caso se requiere de un agente de acoplamiento como la N,N'-diciclocarbodiimida (DCC) para la obtención de estas amidas.

En la formación de ésteres se ha empleado el colesterol [Yang et al., 2008] y también derivados de ácidos como los cloruros y anhídridos. Entre estos reactivos se encuentra el cloruro de estearilo y anhídridos generados “in situ” a partir de ácido láurico, palmítico o esteárico [Sroková et al., 2004]. En estas reacciones se utilizó la DCC o el ácido 4-toluensulfónico en DMSO como agente activante, según la reacción sea dirigida al protón del grupo carboxilo o a los hidroxilo de la cadena. La obtención de éteres con alquíhaluros como el bromuro de dodecano, también se ha reportado [Zhang, 2001].

Es importante destacar que la reacción se debe efectuar en una mezcla de disolventes donde la carboximetilcelulosa y el reactivo liposoluble entren en contacto completamente, de manera que se obtenga un polímero anfifílico con una distribución al azar del sustituyente injertado.

Otra ruta de síntesis para la modificación de este polielectrolito hace uso de la reacciones de copolimerización con monómeros vinílicos de diferentes pesos moleculares. Entre ellos se ha reportado la copolimerización con acrilamida y el acrilato de dihexil amina por vía radicalica, utilizando iniciadores del tipo peróxido [Yang et al., 2009; Regia et al., 2008]. También, el acrilato de dodecil éter de polietilenglicol [Cao y Li, 2003], ha sido copolimerizado. En este caso utilizando irradiación ultrasónica para iniciar la reacción, lo que permite obtener productos con cadenas injertadas de mayor peso molecular.

En relación al objeto de este trabajo de tesis, cabe destacar que en la literatura consultada sobre el tema de los surfactantes poliméricos no se encontró ninguna referencia a la modificación hidrofóbica de la carboximetilcelulosa a partir de su polialdehído. Aunque sí sobre el injerto de cadenas de PEG en su

estructura, utilizando una ruta de síntesis diferente respecto a la propuesta realizada en ésta tesis [Ernsting et al., 2011].

2.6 Oxidación de la carboximetilcelulosa con periodato de sodio

La oxidación de los carbohidratos con NaIO_4 constituyó un método muy utilizado en la elucidación estructural de estos compuestos. Sin embargo, la misma reacción puede ser utilizada para la introducción de grupos más reactivos que permitan su posterior modificación. [Varma y Kulkarni, 2002; Kim et al., 2004; Verma et al., 2008; Vlessidis y Evmiridis, 2009]. Estos grupos, pertenecen a la familia de las cetonas o aldehídos, dependiendo de los sustituyentes en los carbonos con dioles vecinales. Cuando el sustituyente es un átomo de hidrógeno, como en la carboximetilcelulosa, se obtiene su polialdehído, que es una de las formas más valoradas de este polielectrolito. Se sintetiza por reacción con periodato de sodio en medio ácido o directamente con ácido periódico. Es una reacción selectiva que rompe el enlace covalente entre los carbonos dos y tres del anillo de anhidroglucosa en aquellas unidades no carboximetiladas o monosustituidas en la posición seis.

El mecanismo por el que transcurre esta reacción fue descrito por primera vez por Malaprade [Malaprade, 1928]. En el primer paso ocurre el ataque del ión periodato a los grupos hidroxilo vecinales formando un éster cíclico inestable que se descompone rompiendo el enlace covalente entre los carbonos del anillo, oxidando los hidroxilos y liberando el ión yodato más agua [Sinnott, 2007; Li et al., 2011; Teotia, 2012; Ye et al., 2012; Mu et al., 2012]. En la **Figura 2.15** se representa el mecanismo de la reacción de oxidación para un carbohidrato con los hidroxilos en posición *cis*. Es de esperar que cuando se

encuentren en posición *trans* la reacción sea más lenta, requiriéndose más tiempo para su completamiento, como sucede con la carboximetilcelulosa.

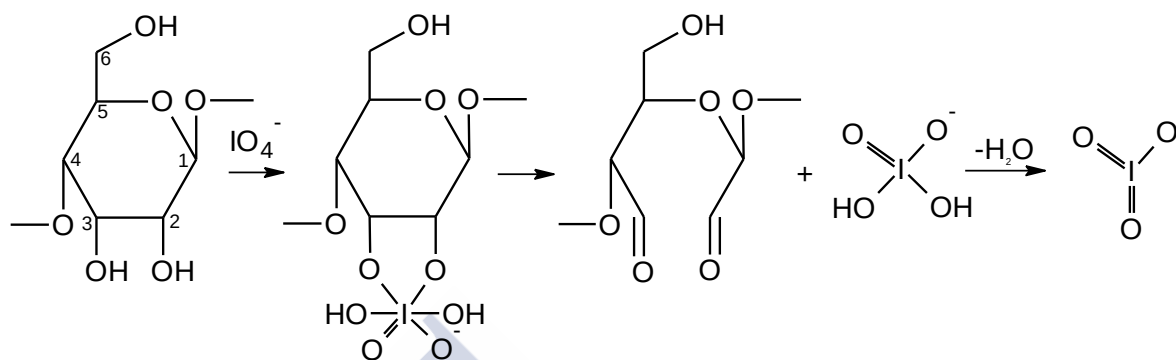


Figura 2.15 Esquema del mecanismo de oxidación de dioles vecinales con periodato de sodio

Aunque en menor proporción, los hidroxilos en la posición cuatro del extremo no reductor y el anomérico también pueden participar en la reacción. El ataque del ión periodato, por estos sitios, conlleva a la oxidación intramolecular de más de un grupo hidroxilo y a la obtención de ácido fórmico [Kristiansen et al., 2010].

Con este método se introducen un gran número de grupos aldehídos en el polímero que pueden ser convertidos en ácidos, alcoholes primarios, aminas (a través de las iminas intermedias o bases de shift) [Rahn y Heinze, 1998]. El mismo, ha encontrado aplicación en la inmovilización de enzimas [Villalonga et al., 2000], matrices para remover metales pesados y a nivel farmacéutico como portadores de fármacos.

En este estudio se utilizó la oxidación con periodato de sodio para activar la carboximetilcelulosa que posteriormente se modificó con el amino metoxi polietilenglicol de peso molecular 5 KDa y dodecilamina con el objetivo de obtener un copolímero anfifílico que se autoensamble espontáneamente en

disolución acuosa. Lo que debe estar facilitado por la apertura del anillo oxidado que disminuye la rigidez de la cadena, al facilitar la rotación de los anillos a través del enlace 1,4 β glicosídico.

2.7 Polietilenglicol en sistemas micelares

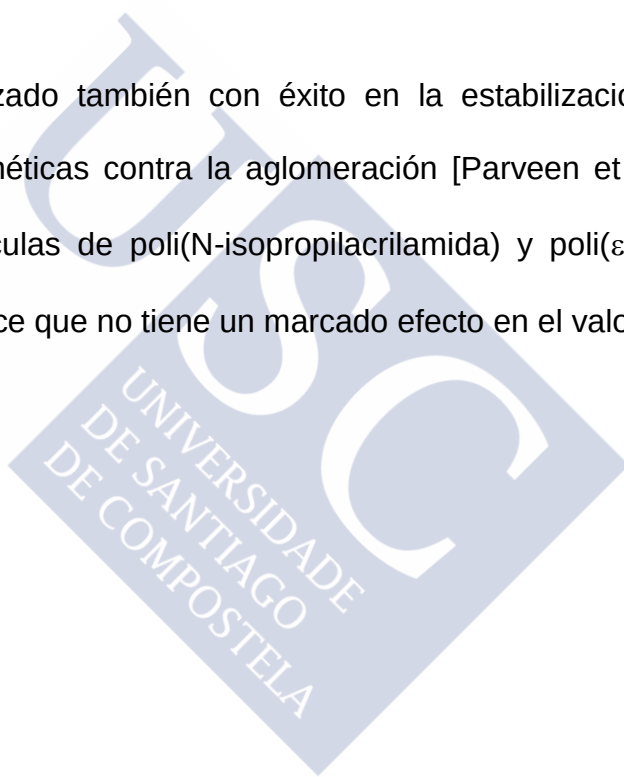
El PEG, con un peso molecular entre 1-15 kDa, es quizás el polímero más estudiado en este campo [Tirelli et al., 2002; Gaucher et al., 2005]. Es no tóxico, biocompatible, no iónico, soluble en agua y solventes orgánicos. La incorporación de sus cadenas en un copolímero anfifílico de bloque o por injerto constituyen la corona en los agregados que se forman en disolución acuosa, imprimiéndoles mayor estabilidad y cierto efecto “inteligente” en los sistemas biológicos, debido al efecto combinado de repulsión estérica, flexibilidad e hidrofiliidad de sus cadenas [Vihola, 2007; Wang et al., 2009].

Las cadenas de PEG generalmente constituyen los bloques hidrofílicos en los surfactantes no iónicos. En ellos estos grupos tienen un volumen igual o mayor que la fracción liposoluble y se distinguen porque sus propiedades físico-químicas tienen una fuerte dependencia de la temperatura. Esto se atribuye a un estado conformacional donde no se favorece la interacción de los segmentos del homopolímero con las moléculas del agua al incrementarse la temperatura [Holmberg, 2002], peculiaridad que se ha utilizado para el diseño de sistemas que responden a estímulos físicos como la temperatura [Chul et al., 1999; Rapopor, 2007].

En aplicaciones biomédicas el PEG ha sido utilizado en la modificación superficial de proteínas y micelas. A través de la pergilación y de su

incorporación en la estructura molecular de algunos copolímeros di o tribloques, los cuales se autoensamblan en micelas poliméricas en disolución acuosa que se utilizan como agentes de contraste en la obtención de imágenes [Parveen et al., 2012; Tian et al., 2012] o en el transporte de fármacos [Beija et al., 2012; Lalatsa et al., 2012]. Sus cadenas impiden el reconocimiento y eliminación de estos nanoagregados extraños al organismo, permitiendo su circulación por períodos de tiempo más largos, al tiempo que incrementan su estabilidad.

El PEG se ha utilizado también con éxito en la estabilización estérica de nanopartículas magnéticas contra la aglomeración [Parveen et al., 2012], así como de nanopartículas de poli(N-isopropilacrilamida) y poli(ϵ -caprolactona). Finalmente, se conoce que no tiene un marcado efecto en el valor de la CMC.





MATERIALES Y MÉTODOS





3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Los reactivos utilizados en el presente trabajo fueron adquiridos de las siguientes fuentes: Sigma-Aldrich (Brasil): sal de sodio de la carboximetilcelulosa, ($C_8H_{11}O_7Na$) peso molecular 90 kDa, grado de polimerización (GP) 400, grado de sustitución (GS) 0,65-0,90; Sigma-Aldrich (USA) cianoborohidruro de sodio ($NaBH_3CN$), peryodato de sodio ($NaIO_4$), dodecilamina (DDA), ($C_{12}H_{27}N$) y metoxi polietilenglicol (PEG-OH, 5 kDa; Fluka (Holanda) dimetilsulfóxido ($(CH_3)_2SO$, DMSO); trietietilamina ($(C_2H_5)_3$), dicloro metano (CH_2Cl_2), cloruro de metanosulfonilo (CH_3SO_2Cl , MsCl) azida de sodio (NaN_3), dihidrógeno (H_2), agua deuterada (D_2O), cloroformo deuterado ($CDCl_3$); Quimipur (España) sulfato de sodio anhidro ($NaSO_4$).

La carboximetilcelulosa se purificó por disolución en agua desmineralizada (AD) durante 24 h. Se precipitó en metanol, centrifugó y se secó a 50 °C, durante 24 h al vacío. La trietilamina y el diclorometano fueron refluados sobre CaH_2 y P_2O_5 , ambos se destilaron previamente a su empleo. Los demás reactivos se utilizaron sin purificación adicional.

3.2 Métodos

3.2.1 Síntesis del polialdehído de la sal de sodio de la carboximetilcelulosa

5 g (22,1 mmol) de la sal de sodio de la carboximetilcelulosa fueron disueltos en 0,1 L de AD durante 24 h. Se añadieron 4,9 g (23 mmol) de $NaIO_4$ y se dejó reaccionar durante 48 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Se añadieron

5 mL de etilenglicol y se continuó la agitación por 1 h. La CMCO se precipitó sobre metanol, se centrifugó y se purificó con una mezcla metanol/agua (90:10 v/v) hasta que el filtrado estuvo libre de productos del yodo.

3.2.2 Síntesis del amino metoxi polietilenglicol

Una cantidad de PEG-OH de peso molecular 5 kDa fue disuelto en 20 mL de CH_2Cl_2 , en atmósfera de argón. Se añadieron 12,0 mmol de trietilamina y se colocó la mezcla reaccionante en un baño de hielo. 18,2 mmol de MsCl se añadieron gota a gota y se dejó reaccionar toda la noche. El mesilato de metoxi polietilenglicol (A) se purificó por extracción en medio acuoso [Aronov, et al. 2003].

El producto A se disolvió en 30 mL de $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ y se hizo reaccionar con 70,4 mmol de NaN_3 a 90 °C, durante 14 h en atmósfera de argón. El producto se rotoevaporó y resuspendió en CH_2Cl_2 . Se filtró, y la monoazida de polietilenglicol ($\text{N}_3\text{-PEG}$, B) se recuperó mediante rotoevaporación.

Para obtener el amino metoxi polietilenglicol ($\text{NH}_2\text{-PEG}$), el producto B se hidrogenó utilizando como catalizador carbono sobre paladio (C/Pd), en un 10 % (p/p) con relación al peso inicial de la $\text{N}_3\text{-PEG}$.

3.2.3 Síntesis de los derivados anfifílicos del polialdehído de la sal de sodio de la carboximetilcelulosa

A. Carboximetilcelulosa-*g*-dodecilamina-*g*-poli(etilenglicol)

0,5 g (3 mmol) de CMCO se disolvió en 0,025 L de AD y se completó a 0,05 L con dimetilsulfóxido en un balón de reacción de 0,25 L. Se añadieron gota a gota una mezcla de 0,6 g (0,12 mmol) de $\text{NH}_2\text{-PEG}$ y 0,068 g (0,37 mmol,

15 %) de DDA, previamente disueltos en 5 mL DMSO:CHCl₃ (50:50, v/v), durante ½ h. La mezcla reaccionante se agitó durante 2 h, se enfrió a 0 °C y se adicionaron 0,46 g (7,4 mmol) de NaH₃BCN. Se permitió que la reacción alcanzara la temperatura ambiente mientras se mantuvo agitando por 48 h. El producto de la síntesis se purificó primero por diálisis extensiva, contra AD, utilizando membranas Spectra/Por® con un cut off límite de 3,5 kDa, durante 72 h. Entonces el polímero se secó al vacío a 50 °C por 24 h. El exceso de NH₂-PEG y DDA que no reaccionaron se extrajeron con cloroformo en un equipo soxhlet. Se volvió a secar, bajo las mismas condiciones, obteniéndose un derivado en forma de polvo con un ligero color amarillo.

En la reacción se emplearon diferentes niveles (por cientos, %) de DDA (15, 25, 35, 45), que se utilizarán para identificar cada producto final. Así 15DDA, representa un copolímero injertado obtenido a partir de añadir 5 % de NH₂-PEG y 15 % de DDA en el medio de reacción.

B. Síntesis del copolímero carboximetilcelulosa-g-dodecilamina

0,5 g (3 mmol) de CMCO se disolvieron en 0,025 L de AD y se completó a 0,05 L con DMSO en un balón de reacción de 0,25 L. Se añadió gota a gota 0,068 g (0,37 mmol, 15 %) de DDA, previamente disueltos en 5 mL DMSO:CHCl₃ (50:50, v/v), durante ½ h. La mezcla reaccionante se agitó durante 2 h, se enfrió a 0 °C y se adicionaron 0,46 g (7,4 mmol) de NaH₃BCN. Se permitió que la reacción alcanzara la temperatura ambiente mientras se mantuvo agitando por 48 h. El producto de la síntesis se purificó primero por diálisis extensiva, contra AD, utilizando membranas Spectra/Por® con un cut off de 3,5 kDa, durante 72 h. Entonces el polímero se secó al vacío a 50 °C por

24 h y se lavó con cloroformo en un equipo soxhlet para extraer la DDA que no reaccionó. Se volvió a secar, bajo las mismas condiciones, obteniéndose un derivado en forma de polvo con un ligero color amarillo. El producto se nombró como copolímero de DDA (CPD15).

3.3 Caracterización de los polímeros sintetizados

3.3.1 Análisis infrarrojo

Las muestras sólidas (10 mg), de las sustancias analizadas, fueron trituradas y mezcladas con KBr. Los espectros se registraron en un espectrofotómetro FTIR (PerKin-Elmer) empleando pastillas de KBr obtenidas en prensa hidráulica, a partir del material preparado previamente.

3.3.2 Resonancia magnética nuclear protónica

Los espectros ^1H -RMN fueron registrados a 500 MHz a una temperatura de 25 °C en un espectrómetro de resonancia magnética nuclear Bruker Inova-500 (Bruker, Alemania). Las muestras de los carbohidratos carboximetilcelulosa y CMCO (20 mg) se disolvieron previamente en 600 μL de D_2O . Entonces, se hidrolizaron utilizando 15 μL D_2SO_4 , durante 1 h a 80 °C. En el caso de los copolímeros los espectros se obtuvieron bajo diferentes condiciones: en disolución acuosa mediante hidrólisis ácida y por disolución directa en DCCl_3 . Los espectros fueron procesados con el software MestReC, versión 4.9.

3.3.3 Estimación del grado de sustitución de la sal de sodio de la carboximetilcelulosa

La estimación del GS en la carboximetilcelulosa se realizó por valoración potenciométrica en un pH metro DM 20 y conductimétrica en un Hanna instruments HI 2300 [Eyler et al., 1947]. Aproximadamente 40 mg de carboximetilcelulosa se disolvieron en AD, durante 24 h. Se adicionó un exceso de NaOH 0,1 mol L⁻¹ y se valoró con HCl 0,1 mol L⁻¹. La variación en el pH y conductividad de la disolución se registró simultáneamente después de cada adición. Los datos adquiridos se procesaron utilizando el software OriginPro 8.

El cálculo del GS se realizó a partir de obtener gráficamente el volumen de NaOH utilizado en la valoración del exceso de HCl y el consumido por los grupos carboximéticos (**Figura 3.1**), utilizando la siguiente expresión I.

$$GS = 162N_bV_b / (m - (80N_bV_b)) \quad I$$

Donde:

GS_{CMCA} : grado de sustitución de la CMCA

N_b : concentración de NaOH

V_b : volumen de NaOH en el punto de equivalencia ($V_2 - V_1$)

m : masa de carboximetilcelulosa

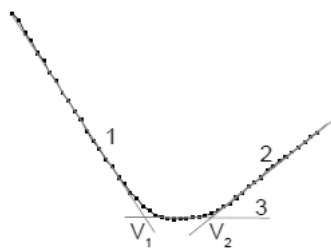


Figura 3.1 Representación esquemática de la determinación de V_1 y V_2 en la valoración conductimétrica

El grado y patrón de sustitución de la carboximetilcelulosa se calculó, además, mediante espectroscopia ^1H -RMN, de acuerdo al método propuesto por Ho y Klosiewict, 1980.

3.3.4 Estimación del grado de oxidación de la sal de sodio de la carboximetilcelulosa

La estimación del grado de oxidación de la CMCO se realizó mediante cuatro métodos:

- A) cuantificación colorimétrica del periodato de sodio reaccionado;
- B) valoración del ácido clorhídrico liberado por reacción de los grupos aldehído con $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ [Zhao y Heindel, 1991];
- C) termogravimetría [Villalonga, 2003];
- D) a partir del espectro de ^1H -RMN.

3.4 Propiedades físico-químicas de los polímeros

3.4.1 Medidas de fluorescencia

Las medidas de fluorescencia, utilizando pireno $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, se ejecutaron en un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse, (Hitachi, Japón). El pireno, a partir de una disolución ($1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, en metanol), se añadió a las disoluciones de los polímeros ($1,0 \text{ g L}^{-1}$), se agitó vigorosamente y se permitió equilibrar durante 24 h. La relación de intensidades I_1/I_3 del espectro de fluorescencia del pireno se utilizó para estimar la variación en la polaridad de los nanoagregados. I_1 e I_3 se refiere a las intensidades del primer (372 nm) y tercer (383 nm) pico vibrónico de fluorescencia del pireno. El pireno fue excitado a 310 nm y su espectro de emisión se registró de 350 a 550 nm. La

temperatura de la cubeta de cuarzo se controló circulando agua con un baño Fisher Scientific ($\pm 0,1$ °C).

3.4.2 Medidas de tensión superficial

Las medidas de tensión superficial (σ) se realizaron en un tensiómetro semi-automático Tensiomat 21 (Fischer Sci., Estados Unidos de América), utilizando la técnica del anillo de du Noüy. Volúmenes de las disoluciones y dispersiones de los polímeros y copolímeros injertados a una concentración de 5 g L^{-1} se adicionaron al agua bajo agitación magnética. La determinación de la tensión superficial del agua se realizó luego de cada adición. Después de cada lectura el anillo de iridio-platino se retiraba y lavaba en metanol y acetona. Los valores reportados corresponden al promedio de dos determinaciones.

3.4.3 Cromatografía de exclusión por tamaño

La estimación del peso molecular promedio en peso ($\bar{M}_w$) y en número ($\bar{M}_n$) se realizó por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, de sus siglas en inglés) en un sistema SEC compacto PL-GPC50 (Agilent Technologies, Estados Unidos de América). Las medidas fueron realizadas utilizando dos columnas conectadas en serie del tipo PLaquagel-OH ($15 \mu\text{m}$ 40 y $8 \mu\text{m}$ 30, $300 \times 7,5 \text{ mm}$) con un rango de fraccionamiento de 10 000-300 000 y 100-30 000, respectivamente. Las disoluciones de los polímeros en estudio se prepararon a 1 mg mL^{-1} en buffer fosfato pH 7,4; 150 mM NaCl, utilizando agua Milli-Q y fueron filtradas por membranas Millex®-LG $0,20 \mu\text{m}$, previo a ser inyectadas. Las corridas cromatográficas fueron realizadas a una velocidad de flujo de 1 mL min^{-1} . La estimación de los pesos moleculares se realizó con el

software Cirrus GPC offline, del módulo Cirrus, versión 3,4 a través de una curva de calibración obtenida con patrones de PEG.

3.4.4 Microscopia electrónica de transmisión

Las imágenes de TEM se obtuvieron en un microscopio electrónico de transmisión Jem-2010 (Jeol, Japón), utilizando un voltaje de 120 kV. Las muestras se prepararon depositando 15 μ L de las disoluciones de los copolímeros injertados directamente en rejillas de cobre de 400 Mesh (TED Pella Inc, Estados Unidos de América). Se dejó evaporar el disolvente a 25 °C y se tiñeron con una disolución al 2 % de ácido fosfotúngstico, durante 60 segundos (s).

3.4.5 Microscopia electrónica de barrido

Las imágenes de SEM se obtuvieron en un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo FESEM (Field Emission Scanning Electron Microscopy) Zeiss ULTRA Plus (Alemania). Las muestras se prepararon mediante la técnica de spin coating, a partir de la deposición, en soporte de silicio, de 15 μ L de la disolución de los copolímeros en agua Milli-Q. Los parámetros elegidos para el proceso de giro fueron: 5000 rpm, 30 s y con una rampa de 4,7 s. Los soportes de silicio se lavaron previamente en una mezcla de agua/acetona 1/1 (v/v), utilizando un baño ultrasónico. Las muestras se recubrieron con una película de cromo de 5 nm de espesor, antes de tomar las imágenes.

3.4.6 Estimación del tamaño hidrodinámico y del potencial zeta de los nanoagregados por dispersión dinámica de la luz

La estimación del tamaño hidrodinámico de los agregados poliméricos y su ζ se realizó por medidas de dispersión dinámica de la luz (*DLS*, de sus siglas en inglés) en un ZetaSizer ZS ZEN 3600 (Malvern, Reino Unido), a $25 \pm 0,1$ °C. Las dispersiones de los copolímeros fueron preparadas a diferentes concentraciones ($0,03$ - $0,5$ g L⁻¹) en buffer fosfato, pH 7,4; 150 mM NaCl, empleando agua Milli-Q. Previo a la realización de las medidas las disoluciones se filtraron por membranas con un tamaño de poro promedio de $0,45$ μ m (Whatman PVDF w/GMF, US). Se utilizaron cubetas desechables de poliestireno, para la estimación del diámetro hidrodinámico y celdas de tipo capilar DTS 1060, para el potencial Zeta. Todas las medidas fueron realizadas por triplicado, reportándose el valor promedio.

3.4.7 Rayos X

Los difractogramas fueron obtenidos en el rango angular de 5 - 60 ° con un paso de $0,02$ y un tiempo de acumulación de 3 s. Se utilizó un difractómetro (Philips, Holanda), equipado con una unidad de control “PW1710”, goniómetro vertical “PW1820/00” y un generador “Enraf Nonius FR590” operando a 40 Kv y 30 mA. Los Rayos X se obtuvieron con la radiación ($\lambda(K\alpha_1)=1,5406\text{\AA}$) del cobre.

3.4.8 Calorimetría diferencial de barrido

Los experimentos se realizaron en un DSC Q200 V24,9 (TA Instruments, Estados Unidos de América). Las muestras (5 mg) se enfriaron y equilibraron a una temperatura inicial de -20 °C y se calentaron a una velocidad 10 °C min⁻¹,

hasta 180 °C. Se enfriaron a la misma velocidad y se equilibraron a -20 °C. Entonces, fueron calentadas nuevamente hasta 180 °C, bajo el mismo régimen, para registrar las curvas de DSC. En todos los experimentos se utilizó un flujo de nitrógeno 50 mL min⁻¹ y cápsulas de aluminio de 70 µL.

3.4.9 Análisis termogravimétrico

Los TGA se realizaron en el intervalo 40-600 °C, a una velocidad de calentamiento uniforme de 10 °C min⁻¹ en atmósfera de nitrógeno, a una velocidad de flujo de 10 mL min⁻¹. Los experimentos se ejecutaron en un equipo TGA Q5000 V3,13 (TA Instruments, Estados Unidos de América). Los datos fueron adquiridos y procesados empleando el software Universal Analysis 2000 (TA Instruments). En cada corrida se utilizaron aproximadamente 5 mg de los polímeros en estudio.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN





4. Resultados y discusión

4.1 Caracterización de la Carboximetilcelulosa

4.1.1 Grado y patrón de sustitución

En este trabajo se utilizó, la sal de sodio de la carboximetilcelulosa, un polielectrolito débil de naturaleza aniónica, como esqueleto carbonado para la síntesis de los copolímeros injertados. Su GS es el número total de grupos funcionales introducidos en el carbohidrato. En este caso representa el número de moles de grupos carboximéticos ($-\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+$) por mol de unidades de anhidroglucosa. Su estimación es un prerequisite para conocer la relación propiedad-estructura, así como para su posterior modificación. Se utilizaron para la cuantificación del GS total dos métodos clásicos, basados en la acidez de los grupos carboxilo [Eyler et al., 1947; Heinze y Koschella, 2005].

Se añadió un exceso de disolución de HCl, a una muestra de carboximetilcelulosa disuelta, para garantizar que los grupos carboxilo se encontraran en forma protonada y posteriormente se valoró potenciométricamente y conductimétricamente, utilizando una disolución de NaOH previamente estandarizada.

En la **Figura 4.1** se muestra la variación de la conductividad por cada alícuota de disolución de NaOH adicionado. La disminución inicial en los valores de la conductividad corresponde a la neutralización del HCl libre en exceso. Posteriormente, se produce un cambio de pendiente debido al inicio del intercambio de protones por iones Na^+ . Mientras se produce esta reacción la conductividad de la disolución permanece cuasi constante para experimentar un incremento brusco al finalizar el intercambio, debido al exceso de iones libres del NaOH en disolución [Capitani et al., 2000; Fras et al., 2004]. El GS

calculado a partir de la diferencia de volúmenes fue 0,83; utilizando la expresión I, epígrafe 3.3.3.

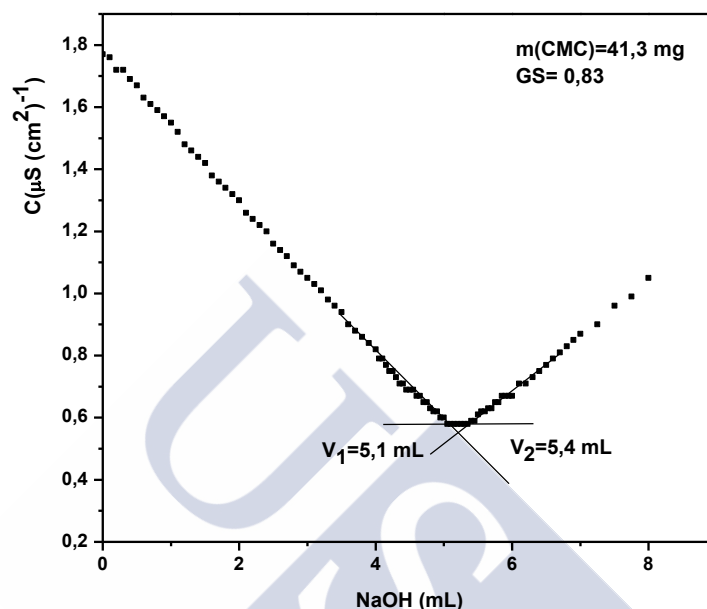


Figura 4.1 Curva de valoración conductimétrica de la sal de sodio de la carboximetilcelulosa con NaOH 0,5 mol L⁻¹

El grado de sustitución calculado por valoración potenciométrica (**Figura 4.2**) fue de 0,83 el cual es numéricamente idéntico al encontrado por lecturas de conductividad y que se encuentra en correspondencia con lo reportado por el fabricante.

La primera derivada de la curva potenciométrica muestra dos puntos de inflexión. El primer punto (V_1) corresponde a la neutralización del HCl libre por la adición de la disolución de NaOH y el segundo (V_2) se asocia directamente a la reacción de intercambio de los grupos carboximéticos enlazados covalentemente a los grupos hidroxilo de la celulosa, introducidos mediante la reacción de eterificación con ácido monocloroacético en medio básico.

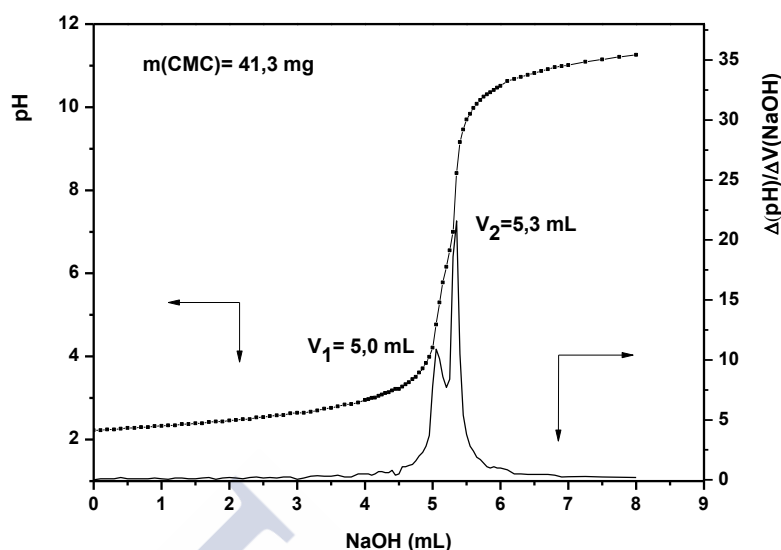


Figura 4.2 Curva de valoración potenciométrica de la sal de sodio de la carboximetilcelulosa con NaOH 0,5 mol L⁻¹

4.1.2 Resonancia magnética nuclear

En la **Figura 4.3** se muestra el espectro ¹H-RMN de la carboximetilcelulosa hidrolizada, en medio ácido, con una mezcla D₂SO₄:D₂O. La asignación de las señales, el cálculo del GS promedio y el patrón de sustitución, en las posiciones C2, C3 y C6 de la carboximetilcelulosa se realizó de acuerdo a reportes previos [Ho y Klosiewict, 1980; Kulicket et al., 1996]; Qi et al., 2009].

El GS promedio calculado fue de 0,95 y el grado de sustitución parcial por grupo hidroxilo fue de C2=0,41, C3=0,18 y C6=0,36, encontrándose que el valor del GS promedio calculado por ¹H-RMN es mayor que el reportado por valoración conductimétrica y potenciométrica. Esto se asocia a que el reactivo (NaOH) no accede a todos los grupos carboximéticos presentes en el polielectrolito. Por otro lado, éstos muestran que aproximadamente el 80 % de los grupos hidroxilo de los anillos de anhidroglucosa en la carboximetilcelulosa no fueron sustituidos en las posiciones C2 y C3. Dato muy interesante, porque

hacia estos grupos se pretende dirigir la reacción de Malaprade [Malaprade, 1928].

El patrón de sustitución encontrado para la carboximetilcelulosa fue O-2> O-6> O-3 (2,3/1,0/2,0), en buen acuerdo con lo reportado para este tipo de carbohidrato [Spurlin, 1939; Ho y Klosiewict, 1980; Kulicket et al., 1996].

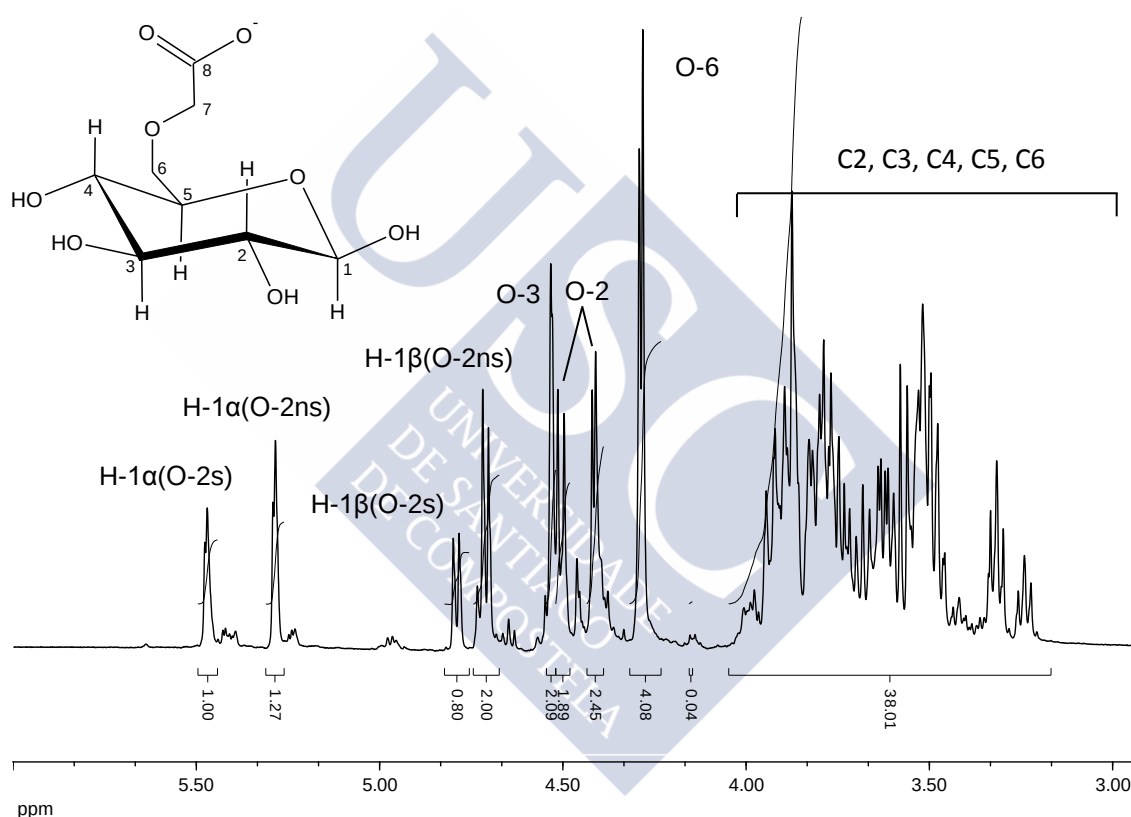


Figura 4.3 Espectro ^1H -RMN de la carboximetilcelulosa en $\text{D}_2\text{O}/\text{D}_2\text{SO}_4$: 3/1 (V/V). En el mismo, O representa el átomo de oxígeno en la posición i ($i = 2,3,6$) dentro del anillo de anhidroglucosa, H-1 los átomos de hidrógeno enlazados en el carbono anomérico ($i1$), α y β la configuración de la glucosa; s sustituido y ns no sustituido

4.1.3 Espectroscopia infrarroja

El análisis de la sal de sodio de la carboximetilcelulosa por FTIR (**Figura 4.4**), muestra las bandas de absorción características para la celulosa en 3445 cm^{-1} (deformación axial OH), 2931 cm^{-1} (deformación axial CH, CH_2), 1319 cm^{-1}

(deformación angular en el plano OH) y en 1056 cm^{-1} (deformación axial CO, COC), [Klemm et al., 2001; Biswal y Sing, 2004; Britto y Assis, 2009]. Se destacan, además, las bandas asociadas al grupo carboximetílico (CH_2COO^-), producto de la eterificación de la celulosa con ácido monocloroacético. Una banda en 1606 cm^{-1} asignada al anión carboxilato (COO^-) y otra en 1426 cm^{-1} (deformación de tijera CH_2), [Heinze y Pfeiffer, 1999; Biswal y Sing, 2004].

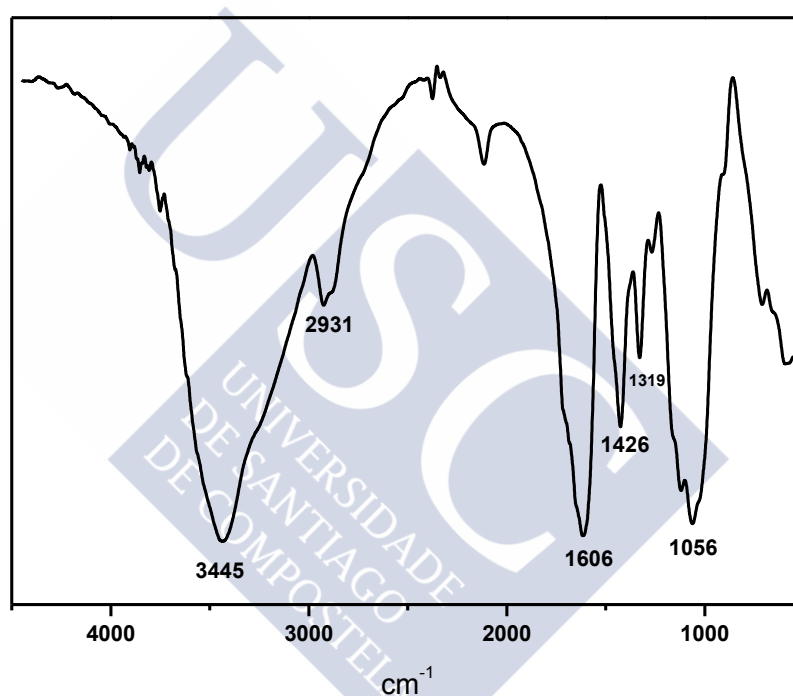


Figura 4.4 Espectro FTIR de la sal de sodio de la carboximetilcelulosa en KBr

4.1.4 Análisis térmico

4.1.4.1 Análisis termogravimétrico

En este estudio el análisis termogravimétrico se utilizó para obtener información sobre las características térmicas de los polímeros y compararlas con las de los copolímeros sintetizados.

El polielectrolito carboximetilcelulosa experimenta una pérdida de peso inicial, en el rango de temperatura comprendido entre 40 °C y 119 °C (**Figura 4.5**), debido a la presencia de agua no constituyente (libre) y físicamente enlazada en la muestra. Esta humedad, representa el 9,1 % del peso total del polímero y se consideró en todos los cálculos posteriores.

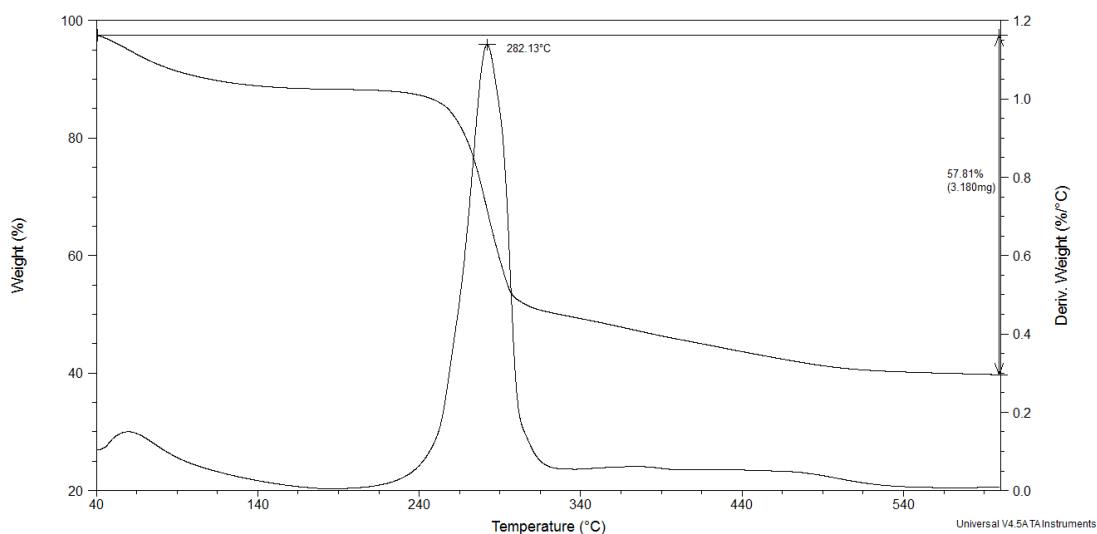


Figura 4.5 Curva termogravimétrica de la carboximetilcelulosa

La descomposición de la carboximetilcelulosa ocurre en dos etapas. La primera, se produce en el intervalo de temperatura 200-325 °C [Banerjee et al., 2006], donde pierde aproximadamente el 50 % de su peso, alcanzando la temperatura de máxima ($T_{\max}$) velocidad de descomposición a 282 °C. En este rango de temperatura se produce la pérdida de CO_2 , originado como consecuencia de la descarboxilación de la carboximetilcelulosa. A continuación se produce un proceso más lento entre 325 y 538 °C donde pierde el 10 % del peso, llevando al polímero a la formación de una estructura aromática

altamente condensada y estable por lo menos hasta 600 °C [Biswal y Sing, 2004; De Brito y Asis, 2009; Teotia et al., 2012].

4.1.4.2 Calorimetría diferencial de barrido

La DSC es una técnica de análisis térmico que mide el flujo de calor asociado con las transiciones en los materiales, en función de la temperatura o el tiempo. Tales experimentos nos brindan información cualitativa y cuantitativa acerca de los cambios físicos y químicos que involucran procesos endotérmicos o exotérmicos o cambios en la capacidad calórica.

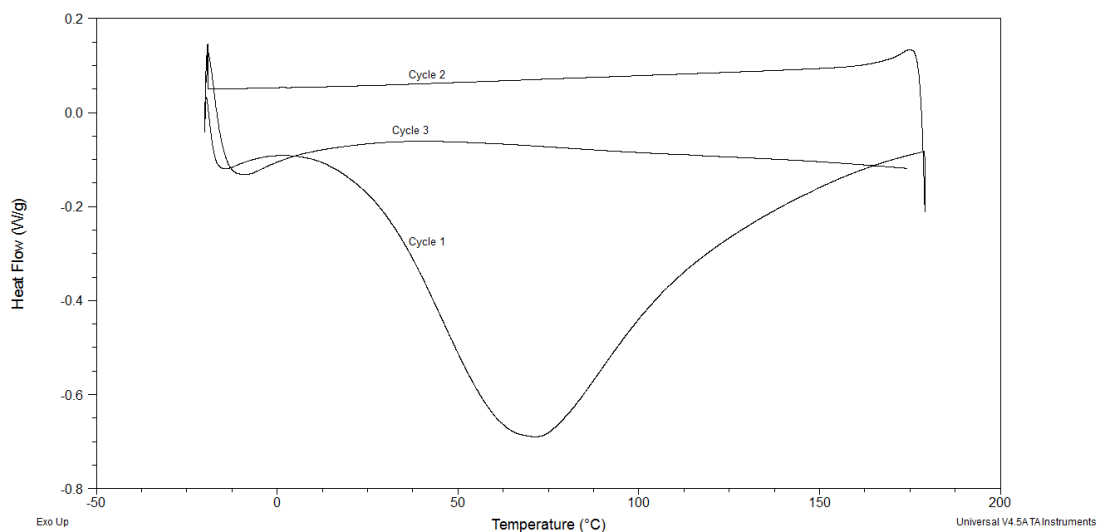


Figura 4.6 Curva de DSC de la carboximetilcelulosa

Esta técnica, fue utilizada para caracterizar térmicamente los polímeros y copolímeros en estudio, para lo cual se siguió un protocolo experimental que permitiera determinar las posibles transiciones de primer y segundo orden que pudieran aparecer cuando son sometidos a un programa de calentamiento en atmósfera inerte, luego de haber eliminado su historia térmica.

Los resultados obtenidos (**Figura 4.6**) mostraron que el polielectrolito no experimenta transiciones de primer ni de segundo orden, en el rango de temperatura estudiado de -20 a 180 °C. El pico endotérmico observado en el primer ciclo de calentamiento se asocia a la pérdida de agua no constituyente, como se mostró en la curva de TGA.

4.1.5 Estimación de la masa molecular

La masa molecular $\bar{M}_w$ y en $\bar{M}_n$ del polielectrolito se estimó por cromatografía de exclusión por tamaño, utilizando patrones de PEG. Los valores encontrados fueron 90 y 51 kDa respectivamente, en buen acuerdo al reportado por el fabricante para el $\bar{M}_w$. El índice de polidispersidad de 1,7 calculado nos corrobora, como era de esperar, la naturaleza polidispersa de la carboximetilcelulosa. Utilizando estos valores se estimó un GP para la carboximetilcelulosa igual a 418, considerando el peso molecular del monomol igual a 215 Da.

4.2 Derivados de la carboximetilcelulosa

4.2.1 Síntesis del polialdehído de la carboximetilcelulosa

La reacción de oxidación de carbohidratos con NaIO_4 se ha utilizado como método de caracterización y determinación estructural. Sin embargo, otro enfoque hace uso de la misma reacción para la introducción de grupos aldehídos en los hidratos de carbono para su posterior modificación [Varma y Kulkarni, 2002; Kim et al., 2004; Verma et al., 2008; Vlessidis y Evmiridis, 2009].

La carboximetilcelulosa utilizada en la síntesis de los copolímeros injertados, se activó mediante la oxidación de los grupos hidroxilo vecinales no sustituidos a través de la reacción de Malaprade [Malaprade, 1928]. Por lo cual, los hidroxilo en los anillos de anhidroglucosa no sustituidos y los monosustituidos en C-6 podrán ser oxidados a grupos aldehídos, por ruptura del enlace covalente entre C-2 y C-3, originando dos grupos aldehído por mol de NaIO_4 .

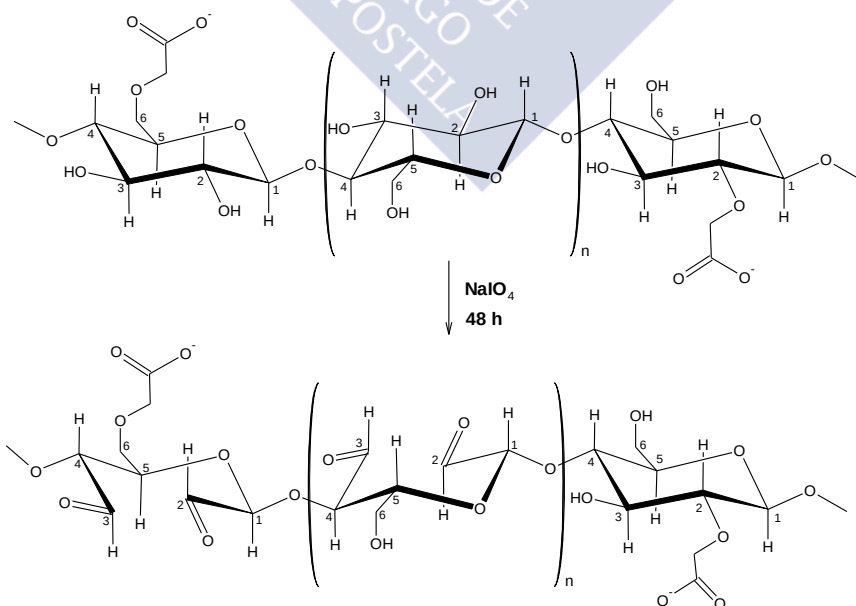


Figura 4.7 Esquema de la oxidación de la carboximetilcelulosa con NaIO_4

Los OH de los extremos de la cadena (OH reductor y no reductor) del polielectrolito no están excluidos de participar en la reacción, aunque en menor proporción. El ataque del ión peryodato, por estos sitios, conlleva a la oxidación intramolecular de más de un grupo OH y a la obtención de ácido fórmico [Kristiansen et al., 2010], que podría catalizar la degradación de la CMCO a productos de bajo peso molecular [Li et al., 2011]. Un esquema de la reacción de oxidación de este polielectrolito con NaIO_4 se representa en la **Figura 4.7**.

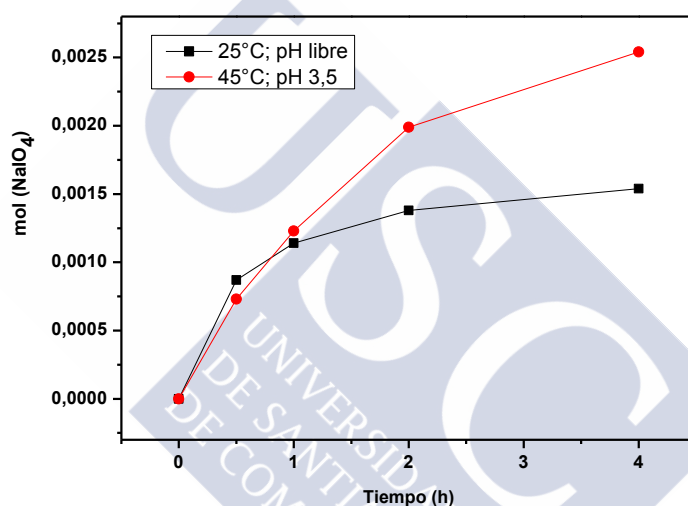


Figura 4.8 Consumo de NaIO_4 en el tiempo bajo diferentes condiciones de reacción

El consumo de NaIO_4 durante la primera etapa de la reacción de oxidación de la carboximetilcelulosa procede gradualmente en el tiempo, independientemente de las condiciones de reacción estudiadas (**Figura 4.8**). Sin embargo, a partir de 1 h se observa una mayor pendiente para la reacción llevada a cabo a pH 3,5 y 45 °C, lo que indica que se favorece el consumo de NaIO_4 , bajo estas condiciones y con ello la oxidación de la carboximetilcelulosa. Posteriormente, el consumo del agente oxidante tiende a

un valor asintótico en el tiempo. Un comportamiento similar ha sido reportado por, Hou et al., 2007; Calvinini et al., 2006; Teotia, 2012.

A pesar de estos resultados, la reacción de oxidación se realizó a temperatura ambiente y sin catalizador ácido porque el carbohidrato experimenta una reducción drástica en su GP bajo tales condiciones como se mostrará más adelante.

4.2.2 Espectroscopia infrarroja

El análisis del polialdehído de la carboximetilcelulosa por espectroscopia infrarroja (**Figura 4.9**), muestra tres nuevas bandas de absorción características en relación al espectro del polímero de partida (**Figura 4.4**), las cuales confirman la oxidación selectiva de los dioles vecinales con NaIO_4 . La banda en 886 cm^{-1} puede ser asignada a la forma hemiacetálica e hidratada de los grupos aldehído. El hombro en 1730 cm^{-1} es característico de la deformación de grupos carbonilos y el que aparece a 2755 cm^{-1} corresponde a la deformación C-H del grupo aldehído [Galbraikh y Rogovin, 1971; Bruneel y Schacht, 1993; Teotia, 2012; Mu et al., 2012].

En el espectro también se observa una disminución de la intensidad de la banda de vibración asociada a los grupos C-OH, en relación con el espectro de la carboximetilcelulosa y además se produce un corrimiento en la banda COO^- (1632 cm^{-1}), este efecto es consecuencia de la disminución del número de grupos hidroxilo y a la apertura del anillo de anhidroglucosa en el polímero, debido a su oxidación.

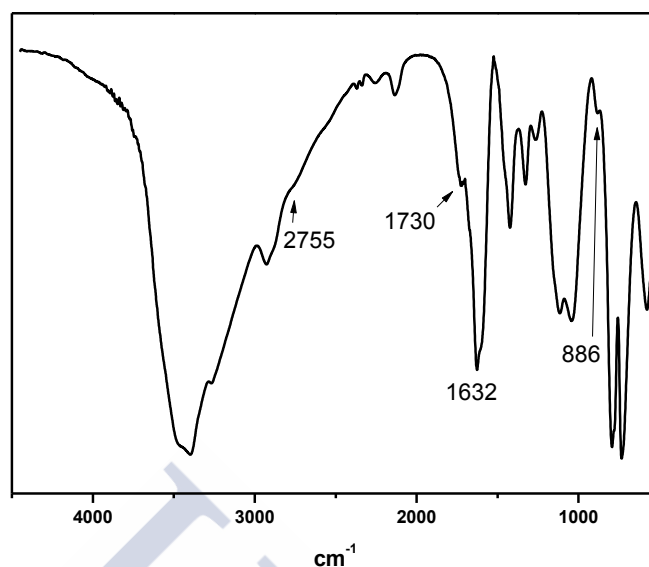


Figura 4.9 Espectro FTIR del polialdehído de la carboximetilcelulosa en KBr

4.2.3 Resonancia magnética nuclear

El espectro ^1H -RMN del polialdehído de la carboximetilcelulosa se registró a 25 °C y a 500 MHz. La asignación de las señales y el valor de sus integrales se muestran en la **Figura 4.10**.

Se observa una disminución relativa del área de la señal correspondiente a los hidrógenos en posición C-2 no sustituidos, así como en la del hidrógeno anomérico en relación con el espectro de la carboximetilcelulosa (**Figura 4.3**). Esta disminución de intensidades es causada por la oxidación de los grupos hidroxilo en C-2 y C-3, con NaIO_4 . También, se produce una modificación en el patrón de las señales correspondientes a los hidrógenos en C-4, C-5 y C-6, que se asocia a los efectos de apertura del anillo de anhidroglucosa, así como a la introducción del grupo carbonilo en posición alfa con respecto a la posición C-4.

También la existencia de las formas hidratadas de los grupos aldehído en el polímero, así como su capacidad de formar hemiacetales cíclicos de anillos de seis átomos de carbono en los residuos de anhidroglucosa no sustituidos en C-6 (**Figura 4.11**), puede contribuir a la alteración del espectro. La formación de estas estructuras ha sido demostrada previamente [Bruneel y Schacht, 1993].

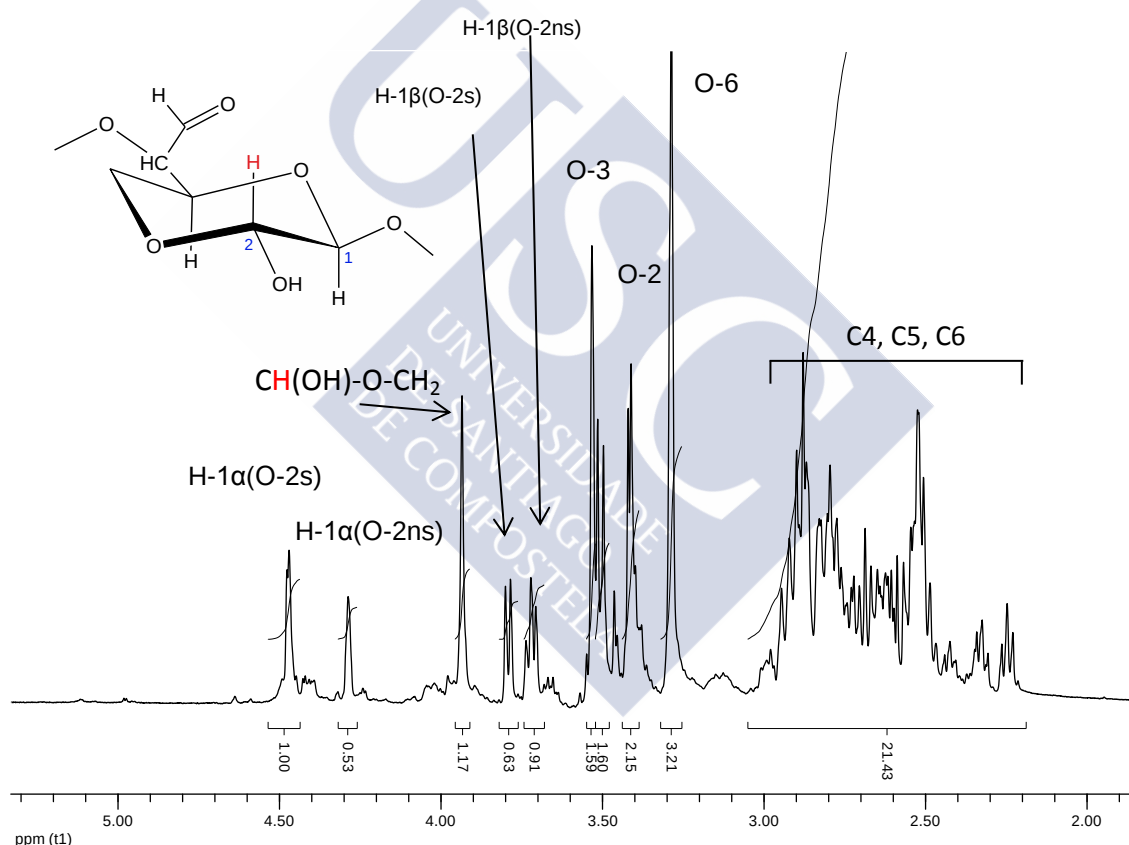


Figura 4.10 Espectro ^1H -RMN del polialdehído de la carboximetilcelulosa en $\text{D}_2\text{O}/\text{D}_2\text{SO}_4$: 3/1 (V/V)

Los anillos oxidados (AO) introducidos en el polialdehído de la carboximetilcelulosa se estimaron a partir de su espectro ^1H -RMN (**Figura 4.10**; **Tabla 4.1**), según la relación entre dos áreas integrales. Así, $\text{AO} = A/B$;

donde: A se refiere al área del protón en anillos oxidados en forma hemiacetálica en la región entre 3,85 y 4 ppm, y B se refiere al área de un protón en la unidad de anhidroglucosa. El valor de B se puede obtener a partir de la suma de las áreas correspondiente al protón anómero, o por un $\frac{1}{4}$ del área integral total asociada a los protones C-H del anillo. En la práctica el valor de B fue el promedio de estas dos medidas independientes.

Tabla 4.1 Anillos oxidados en la carboximetilcelulosa activada

Método	Anillos oxidados (%)
NH ₂ OH HCl	20.8
Consumo NaIO ₄	27.1
¹ H-RMN	28.0
Análisis termogravimétrico	25,4

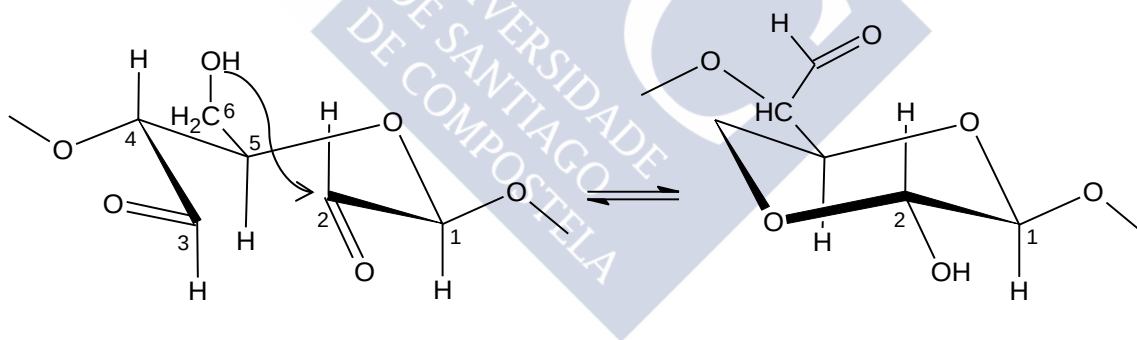


Figura 4.11 Formación de hemiacetales internos cíclicos en el polialdehído de la carboximetilcelulosa

4.2.4 Análisis térmico

4.2.4.1 Análisis termogravimétrico

El polialdehído de la carboximetilcelulosa se caracterizó también mediante análisis termogravimétrico (**Figura 4.12**). La CMCO se descompone a menor temperatura que la carboximetilcelulosa. Lo que evidencia la mayor reactividad

de los grupos aldehídos en su estructura y la fragilidad introducida, desde el punto de vista de la estabilidad térmica, por la ruptura del enlace covalente entre los carbonos dos y tres del anillo de anhidroglucosa [Vicini et al., 2004]. En el termograma se observa que la CMCO pierde inicialmente el 2,6 % de su peso inicial en forma de agua libre y físicamente enlazada, en el rango de temperatura entre 40-119 °C.

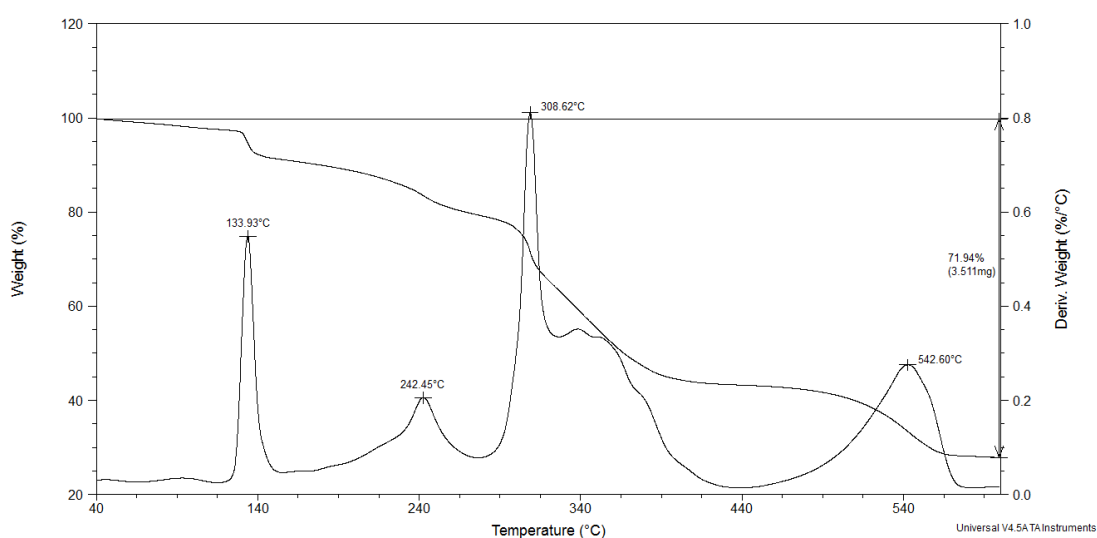


Figura 4.12 Curva termogravimétrica del polialdehído de la carboximetilcelulosa

Posteriormente, el polímero experimenta un proceso de degradación térmica en cuatro etapas, en los siguientes rangos de temperatura: 118-155; 173-272; 279-431 y 447-579 °C y la pérdida de peso por intervalos es: 6,4; 10,6; 35,7 y 14,9 %. La primera etapa de descomposición (118-155 °C) se relaciona con la pérdida de CO a partir de los grupos aldehído introducidos mediante la reacción de oxidación con m-NaIO₄, con la T_{max} a 134 °C. Las demás transformaciones que experimenta la CMCO con T_{max} a: 242, 308 y 542 °C se

asocian a la pérdida de agua estructural, dióxido de carbono y sustancias volátiles de los anillos de anhidroglucosa abiertos y cerrados, respectivamente. El residuo estable a 600 °C fue de un 28 %, el cual debe estar constituido probablemente por sodio y el producto de la deshidratación del esqueleto de la CMCO [Vicini et al., 2004].

La pérdida de peso asociada al CO en el termograma, se utilizó también para cuantificar los AO en el polímero según la relación 1. Los resultados se muestran en la **Tabla 4.1**.

$$AO = \left\{ \frac{[m(CO) * M(monol)/m(CMCO) * M(CO)]}{2} \right\} 100 \quad I$$

Donde: $m(CO)$ = peso de CO (g) liberado en el proceso de descomposición

$M(monol)$ = 215,1 Da

$m(CMCO)$ = peso seco de la CMCO, (g)

$M(CO)$ = 28 Da

4.2.4.2 Calorimetría diferencial de barrido

Los resultados obtenidos por DSC, mostraron que la CMCO no experimenta transiciones de primer ni de segundo orden, en el rango de temperatura estudiado de -20 °C a 180 °C, (**Figura 4.13**), al igual que la carboximetilcelulosa sin modificar.

El pico endotérmico que se observa en el primer ciclo de calentamiento corresponde a la descomposición de los grupos aldehído, un cambio irreversible en el polímero que no se vuelve a observar luego de enfriar y volver a someter la muestra al mismo programa de calentamiento, por segunda vez.

El pico de descomposición se observó a 139 °C, el cual se encuentra en el mismo entorno del valor reportado por TGA (134 °C).

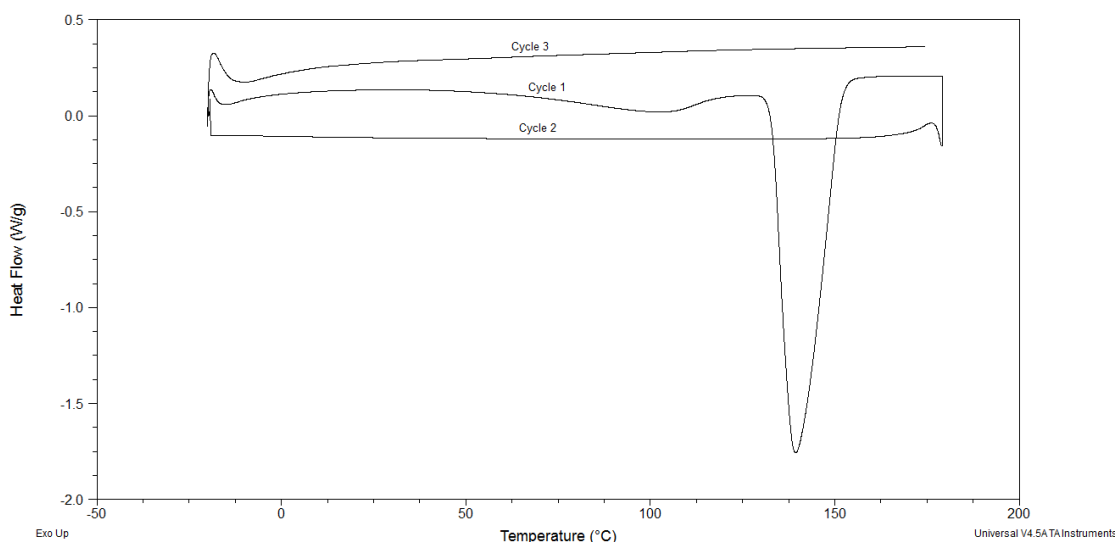


Figura 4.13 Curva DSC del polialdehído de la carboximetilcelulosa

4.2.5 Otros métodos de estimación del grado de oxidación de la carboximetilcelulosa

La cuantificación de los AO en la CMCO es un parámetro que se debe estimar previamente a la síntesis de los copolímeros injertados. Sin embargo, su evaluación no es sencilla, debido a que los grupos aldehído libres coexisten con formas hidratadas $[-CH(OH)_2]$, hemiacetálicas $[-CH(OH)-O-CH_2]$ y hemialdáticas $[-CH(OH)-O-CH(OH)-]$ dentro de la misma estructura de la CMCO [Bruneel y Schacht, 1993; Teotia, 2012]. Lo que provoca que se obtengan valores inferiores a los reales, cuando se valora el HCl liberado al hacer reaccionar el producto de la síntesis (CMCO) con clorhidrato hidroxilamina. No obstante, sigue siendo uno de los métodos más utilizados en

la actualidad [Zhao y Heindel, 1991; Kim et al., 2004; Vlessidis y Evmiridis, 2009; Li et al., 2011].

Los AO se cuantificaron según la relación II. El volumen (L) de NaOH consumido se identificó como V_c . Una solución a la misma concentración de carboximetilcelulosa, se utilizó como blanco y su consumo de solución alcalina se registró como V_b . Los resultados se muestran en la **Tabla 4.1**.

$$AO = \left(\frac{[c(NaOH) * (V_c - V_b)]}{m(CMCO)} \right) 100 \quad II$$

Donde: $c(NaOH) = 0,5 \text{ mol L}^{-1}$

$V_c = \text{Volumen de NaOH (L) consumido por la muestra}$

$V_b = \text{Volumen de NaOH (L) consumido por el blanco}$

$m(CMCO) = \text{peso seco de la CMCO, (g)}$

Otro método utilizado para estimar el contenido de AO, se basó en el monitoreo de los moles de $m\text{-NaIO}_4$ que reaccionaron, por espectrofotometría a 390 nm. El número de AO se calculó según la relación III.

$$AO = \left\{ \frac{(n(NaIO_4)_i - n(NaIO_4)_f) * 213,89}{m(CMCO)} \right\} 100 \quad III$$

Donde: $n(NaIO_4) = \text{moles de NaIO}_4 \text{ al inicio y finalizar la reacción}$

$m(CMCO) = \text{peso seco de la CMCO, (g)}$

En este caso los valores reportados pueden ser superiores a los reales debido a la oxidación intramolecular [Kristiansen et al., 2010], **Figura 4.14**.

Como se puede apreciar en la **Tabla 4.1**, existe una gran similitud entre los valores reportados para los anillos oxidados, independientemente del método utilizado para su cuantificación. Por lo que la alternativa propuesta por ^1H -RMN, de utilizar la relación de intensidades del protón en anillos oxidados en forma hemiacetálica y el anomérico, a partir de muestras de CMCO hidrolizadas en medio ácido es una propuesta válida para estimar el grado de oxidación de la carboximetilcelulosa con NaIO_4 .

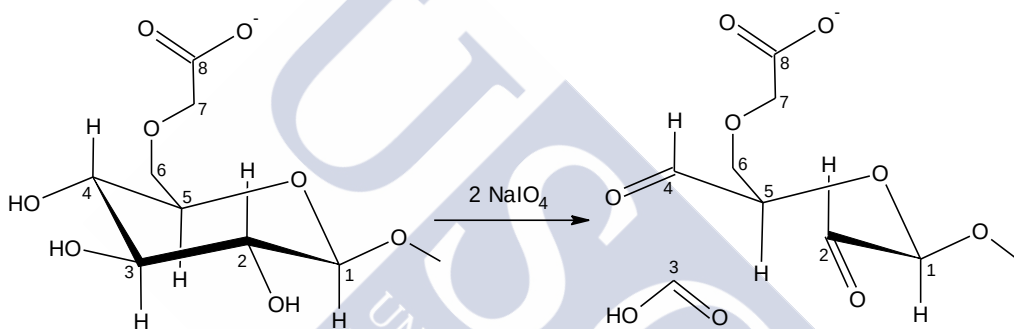


Figura 4.14 Oxidación intramolecular de la carboximetilcelulosa

El nuevo método propuesto introduce un ahorro importante de tiempo al no requerir una muestra seca para ser analizada, ni preparación de un blanco. Sin embargo, el equipamiento que conlleva es muy caro, lo que podría limitar su implementación como análisis de rutina.

4.2.6 Estimación de la masa molecular del polialdehído de la carboximetilcelulosa

El $\bar{M}_w$ y en $\bar{M}_n$ de la CMCO fue de 6,2 y 4,9 kDa; con un índice de polidispersidad de 1,3 y GS de 28. Estos valores son inferiores a los

encontrados para el polímero de partida, lo que indica que durante la reacción de oxidación además de la ruptura de los enlaces C-2 y C-3, se produce la escisión de los enlaces 1-4 β glicosídicos en el polielectrolito, catalizada por el agente oxidante o subproductos de la oxidación [Potthast et al., 2006; Hou et al., 2008; Li et al., 2011]. Estos resultados confirmaron la sospecha de la degradación que experimenta el carbohidrato durante la oxidación por lo que se decidió trabajar bajo condiciones suaves: sin catalizador y a temperatura ambiente.

4.3 Derivados anfifílicos de la carboximetilcelulosa

En el intento por obtener un copolímero anfifílico a partir de la carboximetilcelulosa se exploró su modificación directa con cloruro de dodecilo, 1-bromooctano y DDA. Con estos reactivos y las condiciones ensayadas no se formaron grupos éster o amida, probablemente por la presencia de humedad en los reactivos. Sin embargo, se obtuvieron derivados tipo éter que resultaron insolubles en agua debido al alto nivel de injerto conseguido. Por lo que ensayamos la obtención de un copolímero tribloque por aminación reductiva a través del intermediario CMCO, utilizando DDA y NH₂-PEG en una mezcla H₂O:DMSO 1:1 (V:V), (**Figura 4.15, B y C**).

En este procedimiento de síntesis, los grupos amino terminales de las aminas seleccionadas pueden ser enlazados a la CMCO a través de su transformación en bases inestables de Schiff; que posteriormente son reducidas a aminas secundarias por reducción con NaBH₃CN.

Se tomó en consideración el nivel de AO en la CMCO para la realización de la reacción de injerto, de manera que existiera un exceso molar del polielectrolito oxidado en relación al por ciento de DDA y $\text{NH}_2\text{-PEG}$.

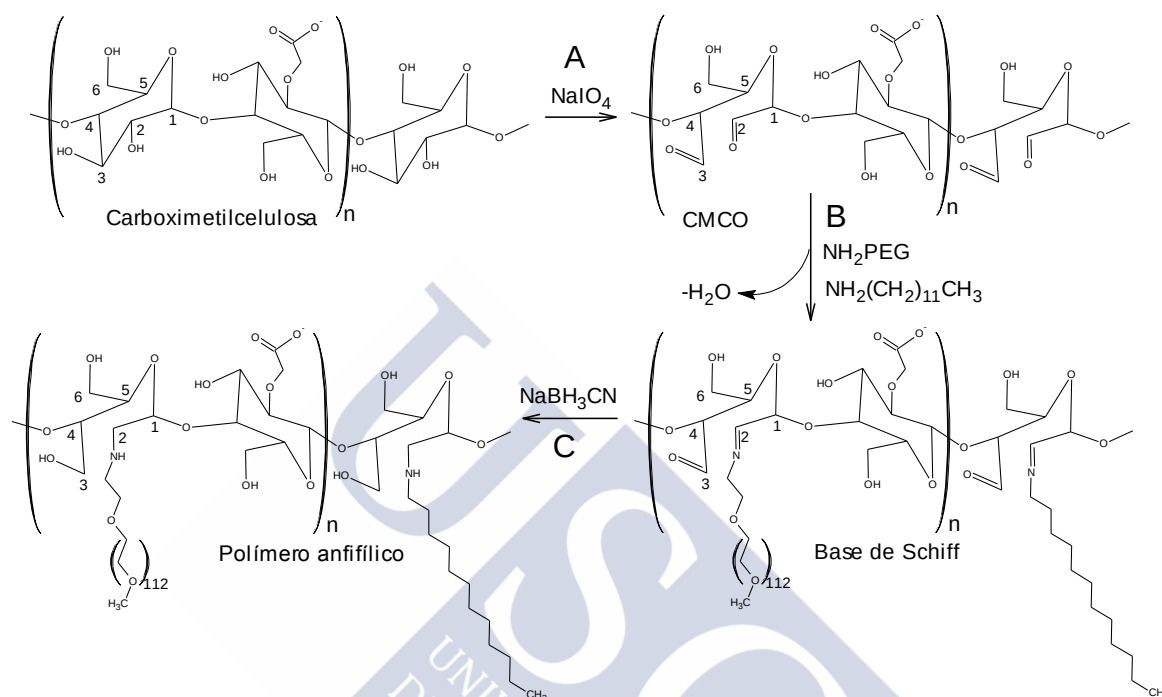


Figura 4.15 Esquema de reacción de obtención de los copolímeros anfífilicos

El esquema de purificación seleccionado, para los productos, fue diálisis extensiva contra agua, liofilización y finalmente extracción por lavado de los copolímeros injertados en un sistema soxhlet utilizando cloroformo como solvente, durante dos días.

En todas las síntesis se utilizó en la mezcla reaccionante un 5 % de $\text{NH}_2\text{-PEG}$, mientras que la DDA se adicionó en 15, 25, 35 y 45 % para obtener productos con diferentes niveles de cadenas hidrocarbonadas injertadas. El por ciento es en relación al número total de grupos aldehídos en la CMCO.

4.3.1 Espectroscopia infrarroja

El análisis por FTIR permitió confirmar el éxito del protocolo de síntesis seleccionado para la obtención de los copolímeros injertados. En la **Figura 4.16** se muestra únicamente el espectro del producto nombrado 15DDA, es decir del copolímero que se obtuvo a partir de una mezcla reaccionante con 5 % de DDA y 15 % de NH₂-PEG, aunque se obtuvieron otros tres copolímeros.

Dos nuevas bandas de absorción intensas en 2892 y 1106 cm⁻¹, asociadas a la deformación C-H y C-O debido a la unión de las cadenas de DDA y de NH₂-PEG al polialdehído, confirman su enlace en la estructura de la CMCO y no la simple ocurrencia de una mezcla física [Liu et al., 2009]. Los demás productos mostraron las mismas bandas características por FTIR.

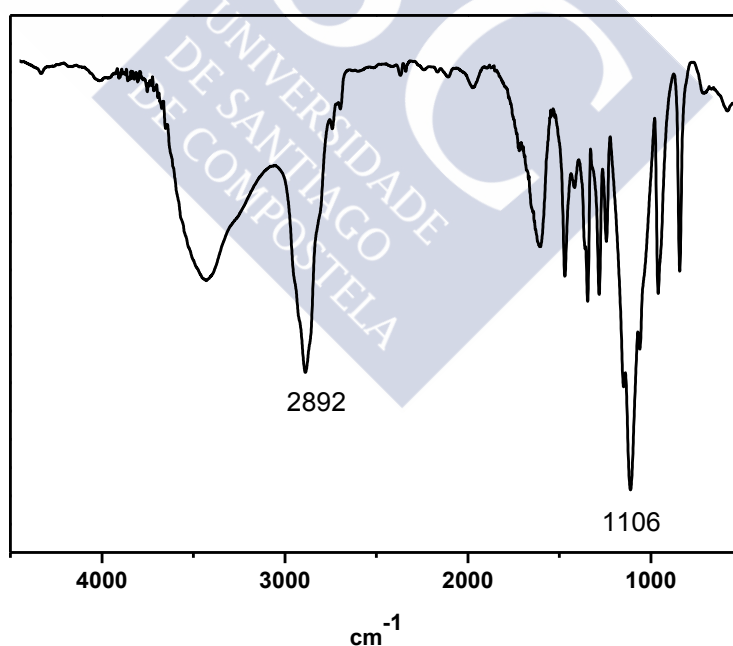


Figura 4.16 Espectro FTIR del copolímero injertado 15DDA en KBr

Se observa una disminución en la intensidad de la banda de vibración asociada a los grupos C-OH, en relación con el espectro del polialdehído de la

carboximetilcelulosa y desaparecen las bandas en 793 y 718 cm^{-1} producto del injerto de las cadenas de DDA y $\text{NH}_2\text{-PEG}$, así como por la utilización de un exceso del agente reductor. El progreso de la reacción se siguió por la disminución de la intensidad de la banda en 1730 cm^{-1} , asignada a la deformación C=O del grupo aldehído.

4.3.2 Resonancia magnética nuclear

Como ejemplo se muestra el espectro ^1H -RMN del copolímero tribloque 15DDA (**Figura 4.17**) registrado a 25 °C y a 500 MHz. La muestra se hidrolizó, en medio ácido, con una mezcla $\text{D}_2\text{SO}_4\text{:D}_2\text{O}$. En el mismo, se confirmó el éxito de la reacción de acoplamiento al exhibir la señales características de los grupos metilo y metileno de la cadena de DDA (a, b) y las del $\text{NH}_2\text{-PEG}$ (d, e), así como las señales asociadas a los protones metilenos próximos al grupo amino secundario (c) y las del grupo carboximético en el polielectrolito (g) y las del protón anomérico (f).

El análisis de ^1H -RMN brindó también información cualitativa del proceso de autoensamblado en medio acuoso (**Figura 4.17**) y orgánico (**Figura 4.18**) del copolímero tribloque 15DDA, con una relación de injerto de 1/3 $\text{NH}_2\text{-PEG/DDA}$ respectivamente. Comparando ambas figuras se observa que en el espectro del copolímero 15DDA en cloroformo desaparecen las señales atribuidas al carbohidrato y se incrementa el área atribuida a los protones metilenos de la cadena de DDA en comparación con los protones metílicos del $\text{NH}_2\text{-PEG}$ en una relación 8,4:1 en D_2O a 10,2:1 en CDCl_3 , lo que sugiere que las cadenas de $\text{NH}_2\text{-PEG}$ y del polielectrolito están apantalladas por los segmentos de DDA

en CDCl_3 . Sin embargo, las señales del PEG no desaparecen totalmente del espectro, lo que indica que una porción se encuentra en el exterior.

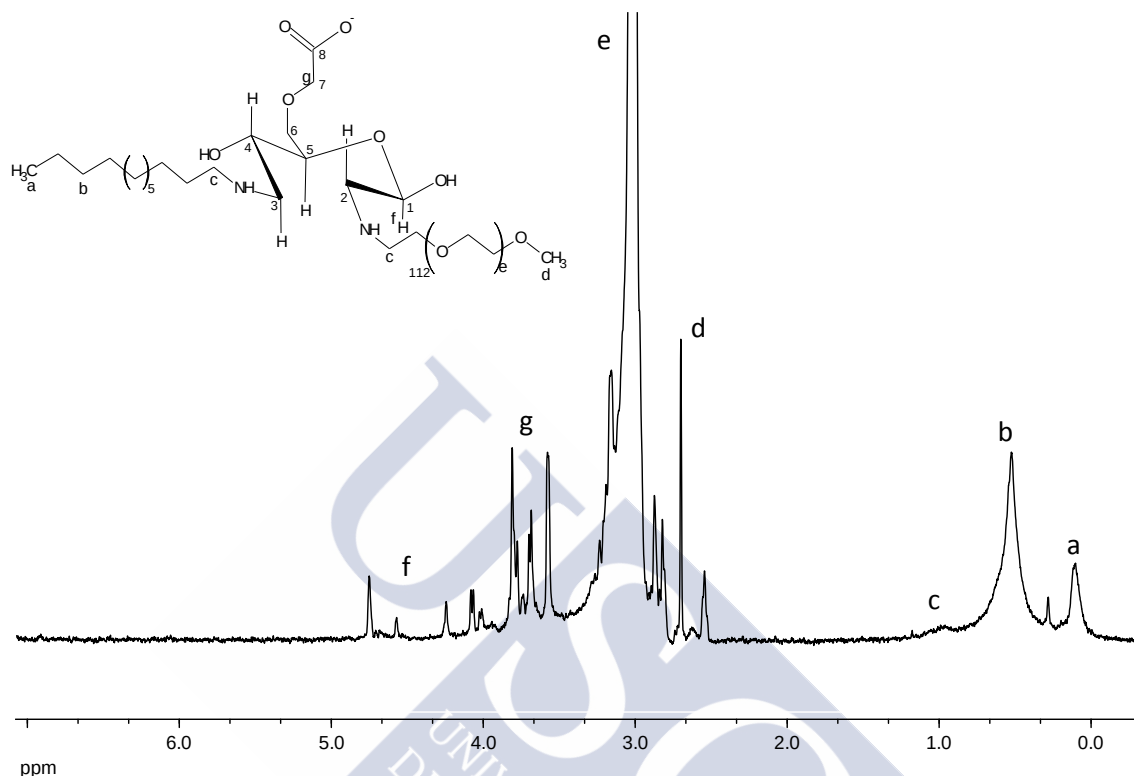


Figura 4.17 Espectro ^1H -RMN del copolímero 15DDA en $\text{D}_2\text{O}/\text{D}_2\text{SO}_4$: 3/1 (V/V)

Estos resultados, sugieren en primer, lugar que se ha producido un proceso de agregación espontánea de las partes hidrofílicas e hidrofóbicas en función del medio [Figura 4.19]. Segundo, que la estructura del agregado debe ser del tipo núcleo-corona, semejante al de las micelas. Tercero, la corona del agregado en medio acuoso debe estar constituida por las cadenas de PEG y el polielectrolito, mientras que el núcleo está constituido por cadenas de DDA. En CDCl_3 el agregado debe invertirse, formando la corona los segmentos de DDA mientras que el núcleo estará compuesto por las cadenas del polielectrolito y PEG. Un comportamiento similar ha sido reportado para otros polímeros anfifílicos [Liu y Eisenberg, 2003; Savić et al., 2006; Cheng et al., 2009; Song et al., 2011].

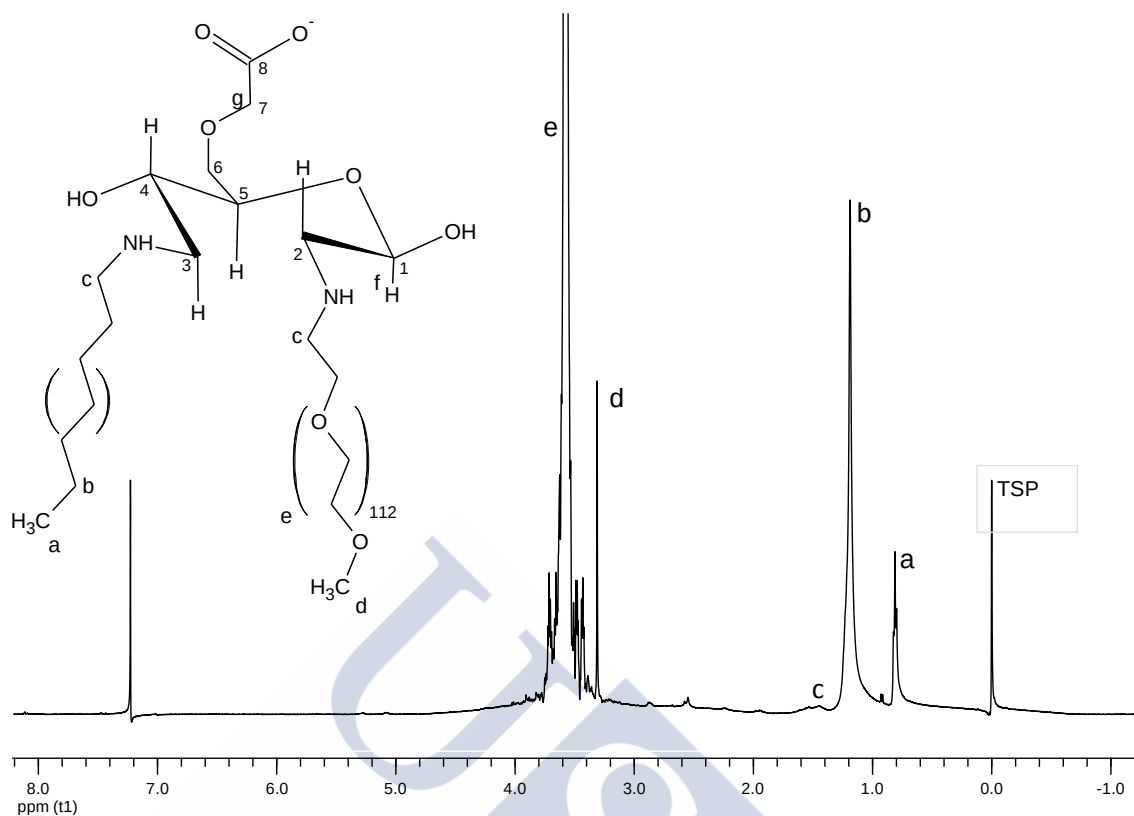


Figura 4.18 Espectro ^1H -RMN del copolímero 15DDA en CDCl_3

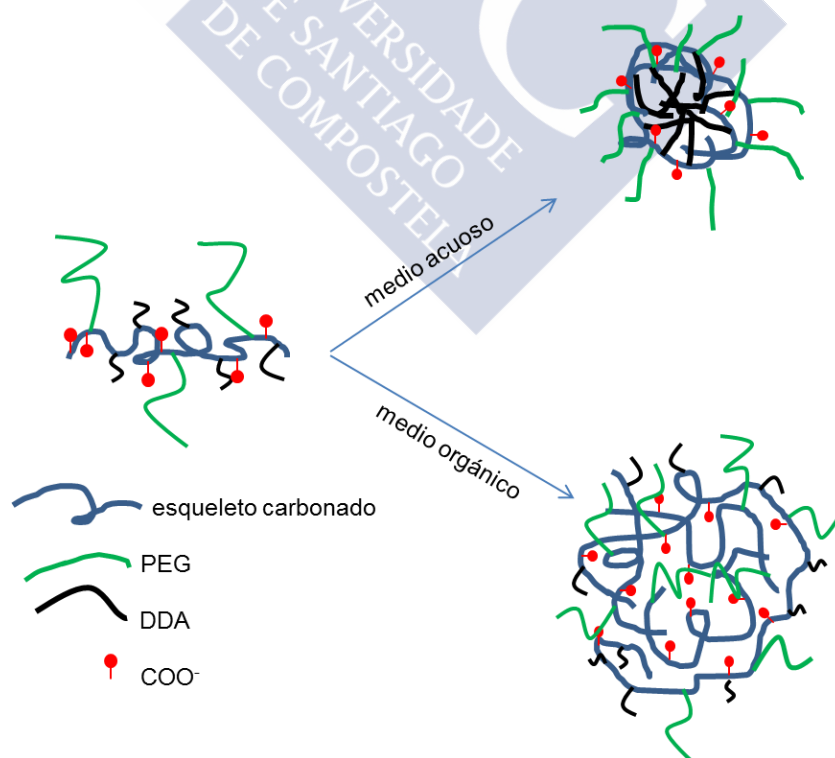


Figura 4.19 Representación esquemática del proceso de auto ensamblado en medio orgánico y acuoso

4.3.4 Análisis térmico de los copolímeros injertados

4.3.4.1 Análisis termogravimétrico

Se puede inferir que cualitativamente los copolímeros presentan un comportamiento térmico muy similar a partir de los termogramas (**Figura 4.20**) y que la modificación de la CMCO por aminación reductiva con $\text{NH}_2\text{-PEG}$ y DDA parece ser exitosa, ya que todos los copolímeros obtenidos presentan mayor estabilidad térmica que sus precursores (**Figura 4.5 y 4.12**). Además, estos polímeros experimentan un proceso degradativo más complejo, en relación con sus precursores.

En general, los copolímeros injertados sufren una pérdida de peso entre 1-6 %, por debajo de 100 °C. Su degradación transcurre en tres etapas: 110-200; 200-340 y 340-445 °C, excepto para el copolímero 15DDA (**Figura 4.20**), y su velocidad de pérdida de peso se incrementa hasta aproximadamente 405 °C para luego disminuir progresivamente.

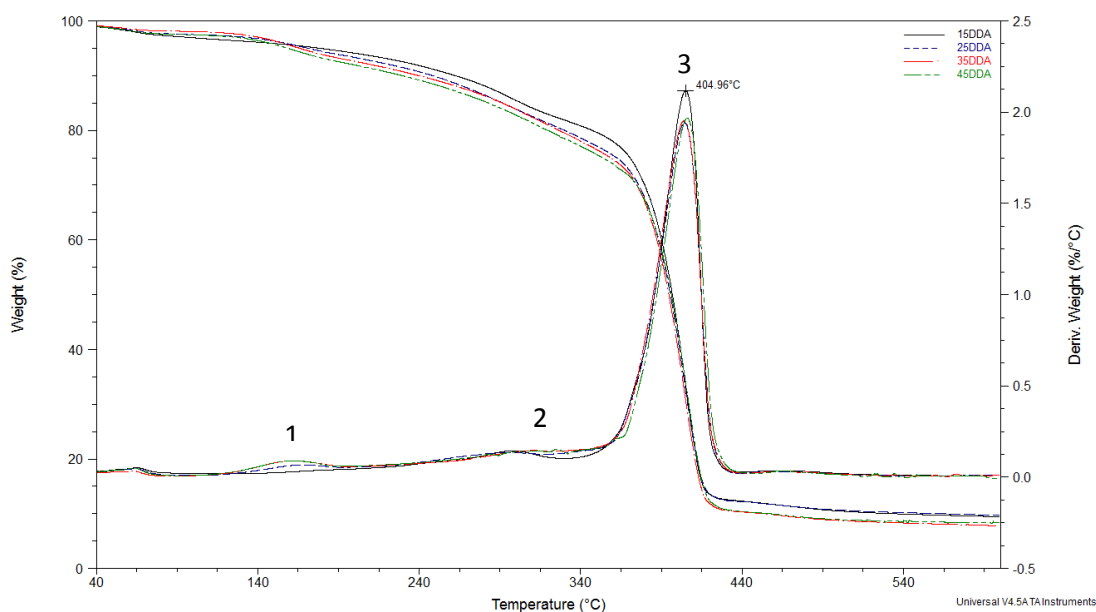


Figura 4.20 Curvas termogravimétricas de los copolímeros injertados

Tabla 4.2 Resultados termogravimétricos

Polímero	^a T _{onset} (°C)	^b T _{máx} (°C)			^c TDF (°C)	Residuo (%)
		Paso 1	Paso 2	Paso 3		
15DDA	375	-	298	405	419	9.4
25DDA	372	168	296	404	420	9.7
35DDA	371	162	312	404	420	7.8
45DDA	374	163	311	405	421	8.3

^aT_{onset}: Temperatura a la que se inicia el proceso de mayor pérdida de peso (Paso 3).

^bT_{máx}: Temperatura máxima de mayor velocidad de pérdida de peso.

^cTDF: Temperatura de descomposición final.

Tabla 4.3 Temperatura asociada a la pérdida de peso

Polímero	Temperatura (°C)							
	10%PP	20%PP	30%PP	40%PP	50%PP	60%PP	70%PP	80%PP
15DDA	262	347	379	390	396	402	406,6	411
25DDA	248	330	376	388	395	401	406,2	411
35DDA	240	326	374	387	394	400	405,3	410
45DDA	229	319	374	388	396	401	407,0	412

PP: Por ciento de pérdida de peso.

En los valores reportados no se aprecian diferencias notables entre los copolímeros injertados (**Tabla 4.2**). Sin embargo, los mismos pierden el mismo por ciento de peso a diferentes temperaturas, hasta cerca de los 400 °C, a partir de la cual la velocidad de pérdida de peso permanece casi constante (**Tabla 4.3**).

Tabla 4.4 Por ciento de peso perdido asociado a la temperatura

Polímero	Peso perdido (%)				
	100°C	200°C	300°C	400°C	500°C
15DDA	3,0	5,9	14,5	55,5	89,5
25DDA	5,0	6,7	16,1	58,1	89,3
35DDA	1,9	7,4	16,1	59,1	91,2
45DDA	2,5	8,0	17,2	56,1	91,0

La pérdida de peso de los copolímeros injertados se produce en todo el rango de temperatura estudiado y en por cientos comparables (**Tabla 4.4**), lo que

indica que el nivel de DDA injertado no contribuye notablemente en su desestabilización térmica.

4.3.4.2 Calorimetría diferencial de barrido

Se puede observar a partir de las curvas de DSC (**Figura 4.21**) que todos los copolímeros injertados experimentaron transiciones de primer orden y que se producen en el mismo rango de temperatura para la fusión (T_m) ~59 y la cristalización (T_c) ~37 °C, independientemente de la dosis de DDA utilizada en la reacción. Es de notar que sólo aparece un pico de fusión y uno de cristalización, que se asoció a las cadenas injertadas de PEG [Zhang et al., 2007].

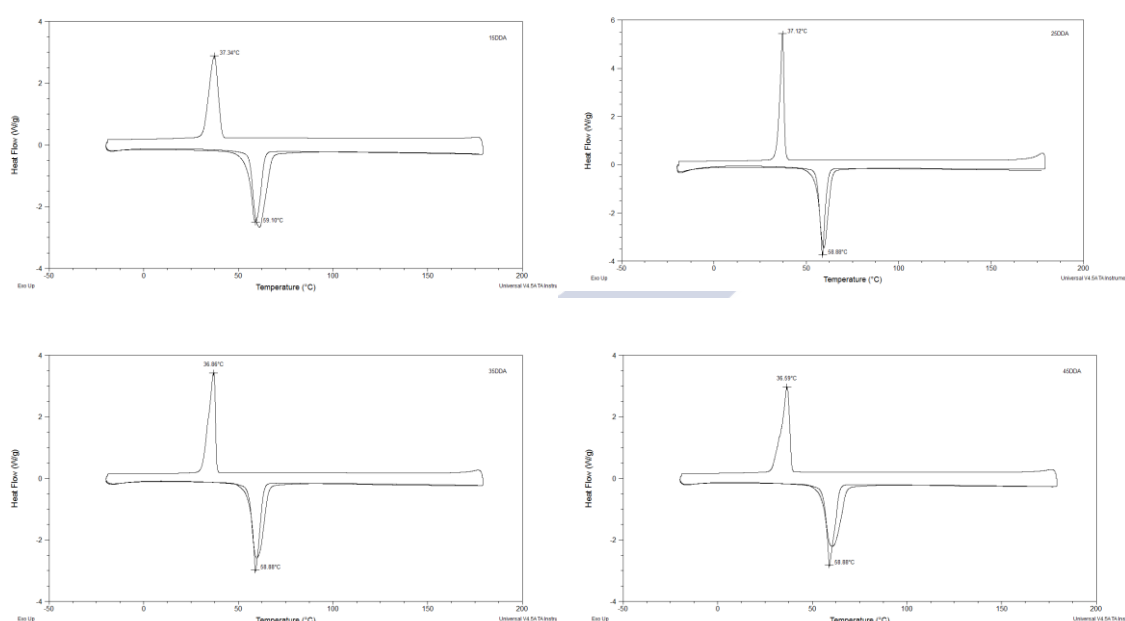


Figura 4.21 Curvas DSC de los copolímeros injertados

El proceso de cristalización se apreció (**Figura 4.21**) a una temperatura bien definida, lo que permite asegurar que lo observado corresponde a una

transición de primer orden. También, por el comportamiento térmico mostrado por los copolímeros, no se puede asociar una transición a las cadenas de DDA. El valor de la entalpía de fusión, asociada a estos cambios de estado disminuye cuando se incrementa la cantidad teórica de DDA en el medio de reacción (**Tabla 4.5**), excepto para el polímero obtenido con un 45 % de DDA que experimenta un ligero incremento al compararlo con el sintetizado con un 35 % de DDA.

Estos resultados muestran que las cadenas injertadas de NH₂-PEG y DDA actúan como barreras estéricas limitando la interacción por enlaces de hidrógenos entre las cadenas del carbohidrato y que al mismo tiempo los segmentos de NH₂-PEG son capaces de formar microdominios cristalinos a los cuales se les atribuyó los procesos de fusión y cristalización observada. Al aumentar la temperatura, estas zonas cristalinas incrementan su movilidad lo que les permite fundir a temperaturas relativamente bajas.

Es de notar que bajo las condiciones experimentales en que se trabajó no se observaron picos endo o exotérmicos, que se puedan asociar a contaminantes, lo que indica que el proceso de purificación seguido fue adecuado para eliminar los solventes utilizados, reactivos y subproductos de reacción de naturaleza orgánica.

Tabla 4.5 Resultados obtenidos por DSC para los copolímeros en estudio

Polímero	ΔH_m (J/g)	T_m (°C)	ΔH_c (J/g)	T_c (°C)
15DDA	93,46	59	-91,92	37
25DDA	90,72	58	-89,97	37
35DDA	87,99	58	-86,70	36
45DDA	89,03	58	-87,67	36

4.3.5 Análisis por Rayos-X

El espectro de difracción de rayos-X de polvos es otro método que proporciona información sobre el estado estructurado de los copolímeros injertados en estado sólido, permitiendo hacer estimaciones del porcentaje de cristalinidad que presentan los diferentes materiales. En la **Figura 4.22**, se presenta el patrón de difracción de la carboximetilcelulosa, la CMCO y de los copolímeros 15 y 45DDA.

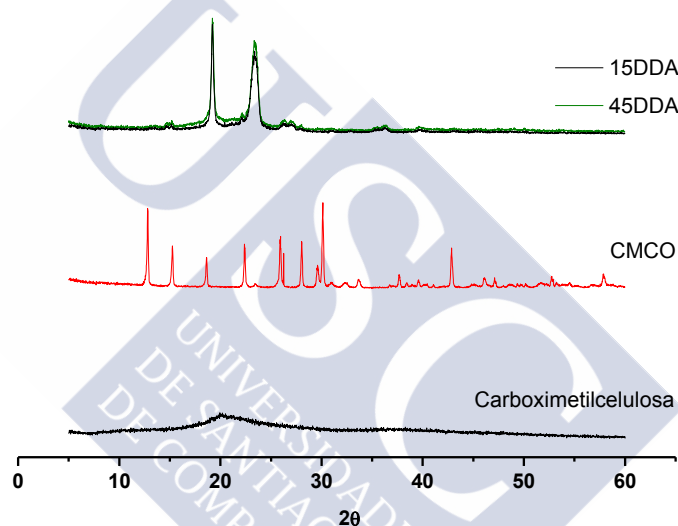


Figura 4.22 Difractogramas de los polímeros y copolímeros injertados

La carboximetilcelulosa muestra una señal débil y ancha en la región $2\theta=15,6-25,6^\circ$. La curva de la CMCO muestra varios picos estrechos muy bien definidos en $2\theta=12,7; 15,3; 18,6; 22,4; 25,9; 28,1; 30,1$ y $42,8^\circ$, evidenciando que bajo las condiciones de reacción de oxidación con NaIO_4 el polímero de partida se transforma en un material con una mayor fracción cristalina, lo que podría ser explicado, tomando en consideración que zolas nas amorfas serían las primeras en oxidarse y las que en mayor magnitud experimentarían

reacciones de degradación, que conllevarían a un producto de menor peso molecular y mayor fracción cristalina.

En las curvas de los copolímeros se observan dos nuevas señales bien definidas en 2θ igual a $19,1$ y $23,4^\circ$. Las mismas se corresponde con la presencia de un nuevo cristal y por tanto con nuevos planos de difracción de Bragg, los cuales se asocian a la cristalización de las cadenas NH_2 -PEG en los copolímeros [Zheng et al., 2005; Zhu, et al., 2007]. Este resultado confirma la existencia de zonas cristalinas que justifican las transiciones de primer orden observadas anteriormente para los copolímeros por DSC. La ausencia de las señales atribuidas a la CMCO y a la carboximetilcelulosa indica que las ramas introducidas de DDA y limitan la interacción entre sus cadenas y con ello la cristalización.

Tabla 4.6 Por ciento de cristalinidad absoluta

Polímero	^a Cristalinidad (%)	^b Cristalinidad (%)
CMC	9,5	12,6
CMCO	56,7	-
15DDA	31,3	47,5
45DDA	30,7	45,5

^aFondo individual

^bFondo común

La carboximetilcelulosa y la CMCO coinciden con los polímeros de menor y mayor por ciento de cristalinidad (**Tabla 4.6**). En relación a los copolímeros, el injertado con un 15 % de DDA presenta un por ciento ligeramente mayor de cristalinidad que el obtenido utilizando un 45 %, lo que corrobora los resultados previos asociados a su estabilidad térmica. Esto podría estar influenciado teóricamente por la menor capacidad de autoorganizarse en estructuras

ordenadas, debido al alto por ciento probable de cadenas laterales que entraron a formar parte de su esqueleto carbonado.

Otro dato que debemos mencionar es el menor por ciento de cristalinidad encontrado en los derivados en relación con la CMCO. Lo que puede ser atribuido a la presencia de grupos laterales que impiden el empaquetamiento o formación de cristales.

4.4 Propiedades en disolución acuosa de los copolímeros

4.4.1 Medidas de tensión superficial

Las medidas de tensión superficial demostraron que los copolímeros sintetizados, como se vió por los espectros de resonancia magnética, son de naturaleza anfifílica, con cadenas injertadas hidrofóbicas de DDA e hidrofílicas de NH₂-PEG. Esto proporcionó la oportunidad de formar nanoagregados que llamaremos “micelas” en disolución acuosa a partir de un nuevo copolímero anfifílico de la carboximetilcelulosa. La formación de las mismas así como el comportamiento en fase acuosa de la CMCO y de los derivados anfifílicos se evaluó por diferentes técnicas experimentales. En la **Figura 4.23** se muestra la variación de la tensión superficial cuando se incrementa la concentración de polímero, utilizando la técnica del anillo de Du Noüy. Este procedimiento permitió estimar la CMC para los copolímeros activos superficialmente.

La CMCO es inactiva superficialmente. Sin embargo, como regla todos los copolímeros anfifílicos exhiben actividad superficial a muy baja concentración (**Figura 4.23**). Siendo los polímeros 15DDA y 35DDA los que producen la menor y mayor alteración en la tensión superficial del agua.

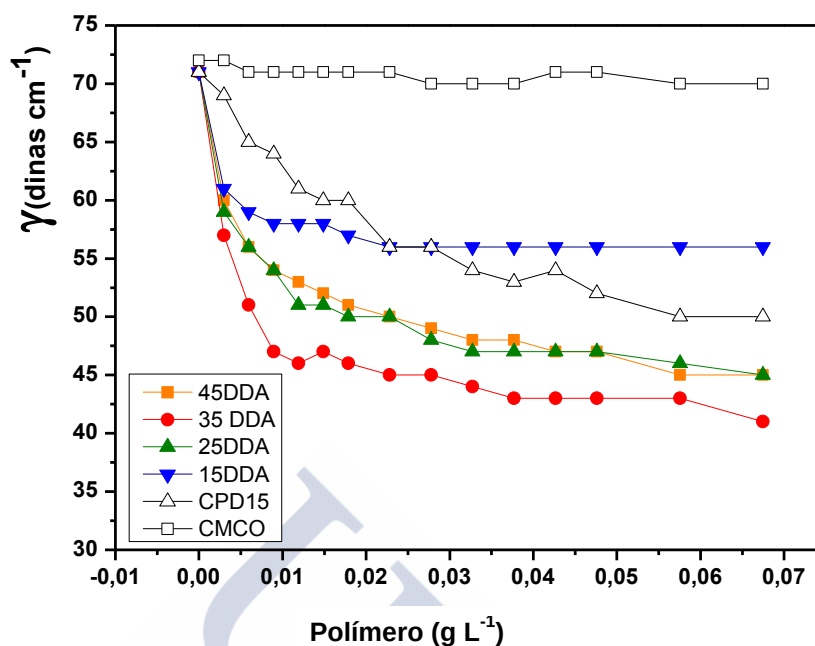


Figura 4.23 Variación de la tensión superficial con la concentración de polímero

En la curva del CPD15 (**Figura 4.23**), el cambio de pendiente es más suave y no se observa una discontinuidad bien definida, en comparación con los restantes copolímeros, sin que se alcance un valor constante para la tensión superficial. Este comportamiento no permitió realizar una estimación de la CMC con alta precisión, lo que sugiere que los agregados formados no presentan elevada estabilidad en el tiempo.

Como se esperaba los copolímeros mostraron actividad superficial, incrementándose cuando el contenido de DDA es mayor en la mezcla reaccionante, lo cual se corrobora por la disminución en la CMC (**Tabla 4.7**).

4.4.2 Medidas de fluorescencia

La relación I_1/I_3 del espectro de fluorescencia del pireno se utilizó para obtener más información acerca del proceso de agregación de los copolímeros

anfílicos y de los cambios de polaridad que se producen en el microambiente donde esta molécula es hospedada [Francis et al., 2000; Iamazaki et al., 2004].

Tabla 4.7 Propiedades físico-químicas de los copolímeros a pH 7,4; 150 mM NaCl

Polímero	$\bar{M}_n$ (kDa)	$\bar{M}_w$ (kDa)	$\bar{M}_w/\bar{M}_n$	CMC (g/L) ^b	CMC (g/L) ^c	σ (mN/m) _d	Potencial (ζ , mV)	D_h (nm) ^e
CMC	51	90	1,7	-	-	-	-	-
CMCO	5	6	1,2	-	-	-	-	-
CPD15	-	-	-	0,03	0,025	54,7	-	379±25,0
15DDA	5	6	1,4	0,1	0,004	56,3	0,1567	173±19,5
25DDA	207	226	1,1	0,0013	0,007	47,9	0,5932	163±8,0
	5	6	1,2					
35DDA	231	249	1,1	0,0013	0,007	43,8	0,3868	178±11,2
	5	6	1,3					
45DDA	254	263	1,0	0,007	0,008	47,6	0,3789	194±1,7

^bDeterminado por la razón de intensidades I_1/I_3 del pireno, a 25°C.

^{c, d}Determinado por medidas de tensión superficial.

^eDeterminado por medidas de dispersión de la luz, a 25°C.

La formación de nanoagregados se confirmó a muy baja concentración de polímero, midiendo la relación I_1/I_3 en función de la concentración (**Figura 4.24**). A partir de cierta concentración, la relación de intensidades disminuye abruptamente, indicando que se están produciendo interacciones intermoleculares con formación de microdominios hidrofóbicos en un rango de concentración muy bajo, típicamente entre $2 \cdot 10^{-3}$ - $1 \cdot 10^{-1}$ g L⁻¹, mostrando que el proceso de agregación es altamente favorecido por los grupos dodecil (DDA). Esta observación corrobora resultados ya presentados donde la presencia de cadenas hidrofóbicas en el esqueleto carbonado del polielectrolito de la CMCO inducen la formación de agregados poliméricos [Charpentier et al., 1997; Yang et al., 2008]. Por consiguiente, el cambio de pendiente observado en las **Figuras 4.24 y 4.25** puede ser interpretado como la CMC.

La relación I_1/I_3 para las curvas de la carboximetilcelulosa y la CMCO (**Figura 4.24**) permanece con muy poca variación en el mismo rango de concentración estudiado, indicando que el pireno permanece libre en disolución lo que provoca que no se detecten cambios de micropolaridad. Esto es consistente con el carácter hidrofílico y polielectrolítico de la carboximetilcelulosa. Los resultados mostrados (**Tabla 4.7**) reflejan el efecto del contenido de DDA en el proceso de agregación, lo cual se manifiesta en los valores de la CMC un orden menor para los copolímeros 25, 35 y 45DDA, en relación a los demás.

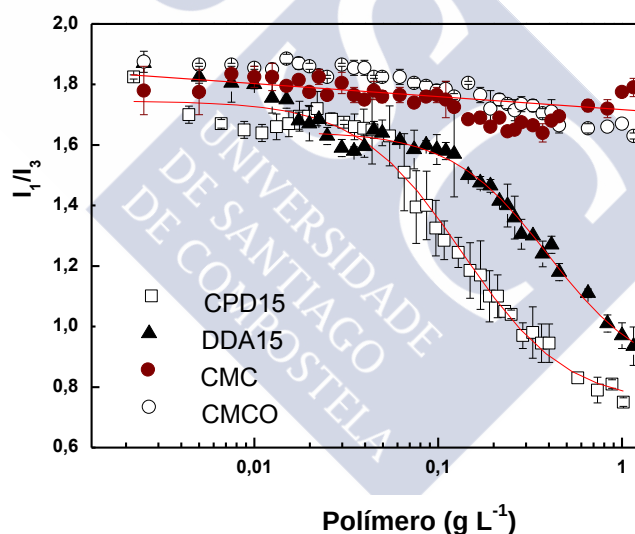


Figura 4.24 Relación de intensidades I_1/I_3 del pireno (5.0×10^{-7} M) en función de la concentración de polímero a 25 °C y pH 7.4

Los valores obtenidos para la CMC se encuentran en el mismo rango que el reportado para el dodecilsulfato de sodio ($8,3 \cdot 10^{-3}$ g L⁻¹) [Holmberg et al., 2002], por lo que es de esperar que los copolímeros formen agregados con estructuras núcleo-corona “semejantes”. Así, las cadenas de PEG se encontrarían orientadas hacia la superficie de los agregados, de acuerdo a su

carácter hidrofílico formando la corona de los nanoagregados y el núcleo entonces estaría constituido por los segmentos o cadenas de DDA.

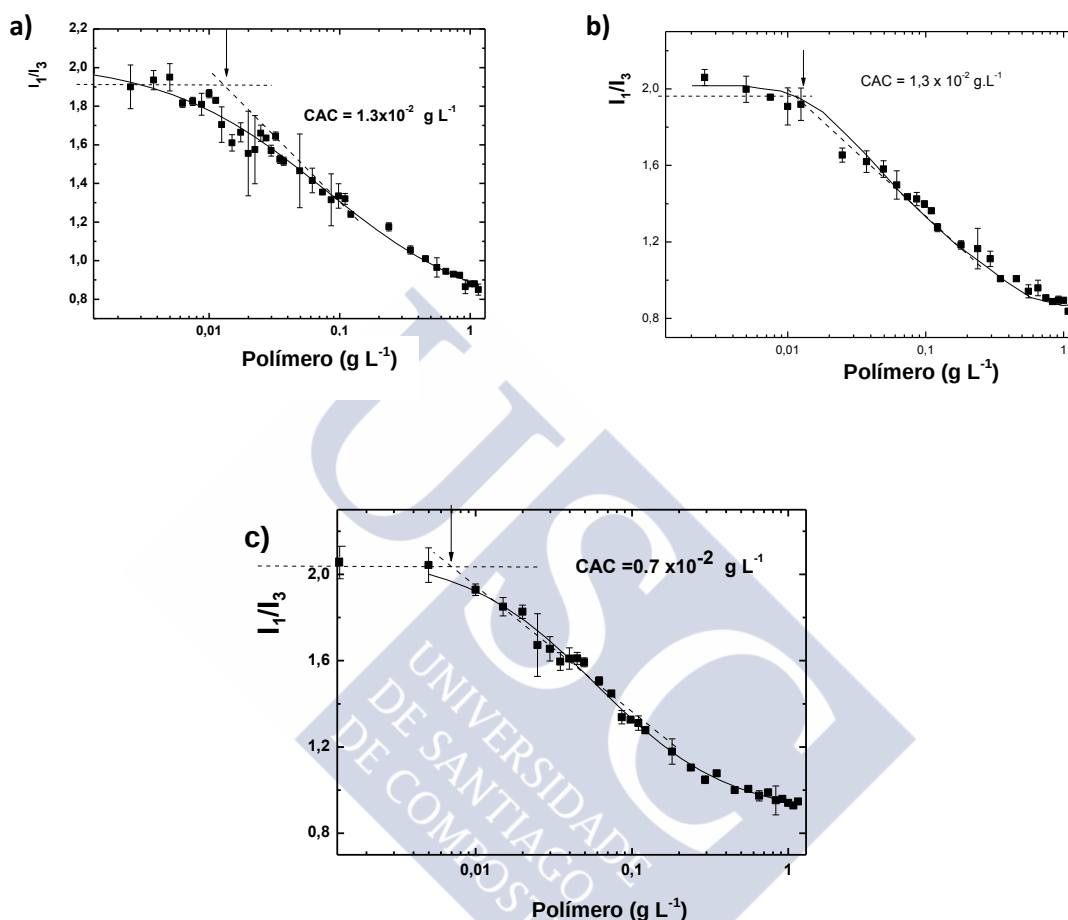


Figure 4.25 Relación de intensidades I_1/I_3 del pireno (5.0x10⁻⁷ M) en función de la concentración de polímero a 25 °C y pH 7.4. **a)** 25DDA; **b)** 35 DDA; **c)** 45DDA

El efecto del pH en el proceso de agregación fue evaluado sólo para dos valores, debido a la solubilidad limitada de los copolímeros anfifílicos a bajos pH. No se observaron diferencias para el proceso de agregación de los productos estudiados, CPD15 y 15DDA (**Figura 4.26**). Estos resultados pueden ser explicados considerando que el proceso de agregación es gobernado por la interacción hidrofóbica de las cadenas de dodecil e independiente del grado de

ionización de los grupos carboxilo, así que la disminución esperada de la repulsión electrostática a pH=5 no es suficiente para afectar el proceso de agregación. Por lo que podemos decir que el proceso de agregación es gobernado por las interacciones hidrofóbicas y estabilizado por la repulsión y movilidad de las cadenas de PEG.

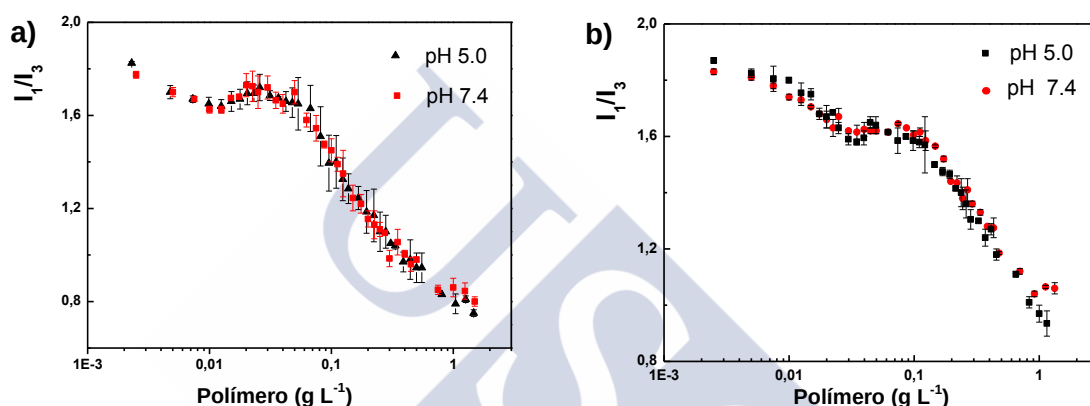


Figura 4.26 Relación de intensidades I_1/I_3 del pireno (5.0×10^{-7} M) en función de la concentración de polímero a 25 °C a diferentes valores de pH: **a)** CPD15; **b)** DDA15

Una comparación entre la variación de la tensión superficial y la relación I_1/I_3 se muestra para el polímero 15DDA (**Figura 4.27**), donde se aprecian dos plateau que sugieren que la formación de grandes agregados capaces de hospedar moléculas hidrofóbicas es precedida por la formación de pequeños pre-agregados. En ella el cambio de pendiente inicial en la relación de intensidades I_1/I_3 coincide con una disminución rápida de la tensión superficial del agua a valores de concentración inferiores a $2 \cdot 10^{-2}$ g L⁻¹. Este comportamiento podría ser atribuido a la existencia de cadenas de alto peso molecular con una alta actividad superficial que inducen la formación de pre-agregados unimoleculares pequeños.

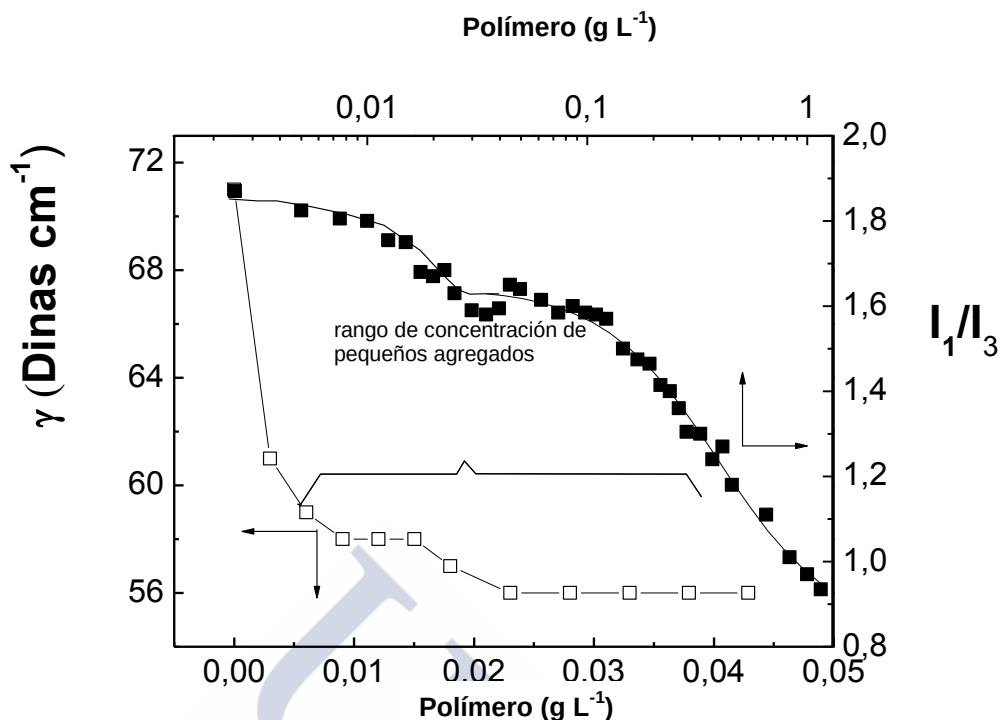


Figure 4.27 Variación de la tensión superficial y la relación I_1/I_3 del espectro de fluorescencia del pireno en función de la concentración de 15DDA

4.4.3 Medidas de dispersión de la luz dinámica

El tamaño de los agregados formados por los copolímeros se estimó, en una disolución de buffer fosfato pH 7,4 y fuerza iónica 150 mM, por dispersión de la luz dinámica (Tabla 4.7 y Figura 4.28). En la Figura se observa una región inicial, en el rango de concentración de 0,03-0,015 g L⁻¹, asociada al proceso de pre-agregación (ver también Figura 4.27), donde el tamaño de los nanoagregados es inestable. Sin embargo, cuando la concentración de copolímero se incrementa se evidencia una clara tendencia de los nanoagregados a mantener una talla promedio, independiente de la concentración y del copolímero. También, resulta interesante notar que la introducción de las cadenas de NH₂-PEG reduce el tamaño promedio de los nanogragados más de dos veces (Tabla 4.7; Figura 4.28).

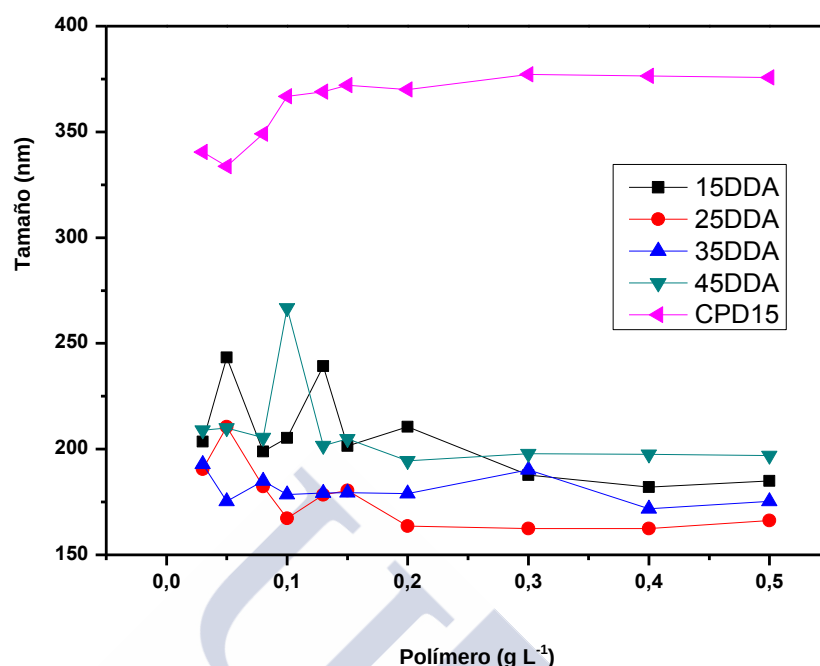


Figura 4.28 Variación del diámetro hidrodinámico con la concentración de los copolímeros

Estos resultados sugieren que la corona hidrofílica de PEG contribuye a estabilizar el núcleo hidrofóbico por apantallamiento de la repulsión hidrofóbica y por tanto a reducir el tamaño de los agregados, los cuales, mostraron un rasgo distintivo en las curvas de distribución de diámetro hidrodinámico, en función de la concentración de polímero y de la dosis de DDA en la mezcla reaccionante (**Figura 4.29 A; B**). El producto 15DDA mostró una distribución bimodal en todo el rango de concentración estudiado, predominando los agregados de mayor tamaño como puede ser juzgado por el área bajo las curvas.

La presencia de agregados de menor talla se puede asociar a la formación de pre-agregados. Esto podría estar relacionado con el grado de sustitución de los grupos DDA injertados o también con distribuciones diferentes de ellos, en la cadena principal. Al parecer en estos nanoagregados pequeños prevalece la

asociación hidrofóbica intramolecular, lo cual coincide con los resultados de fluorescencia, discutidos anteriormente, donde se apreció una disminución inicial en la relación I_1/I_3 y posteriormente una caída súbita de la misma (Figura 4.27).

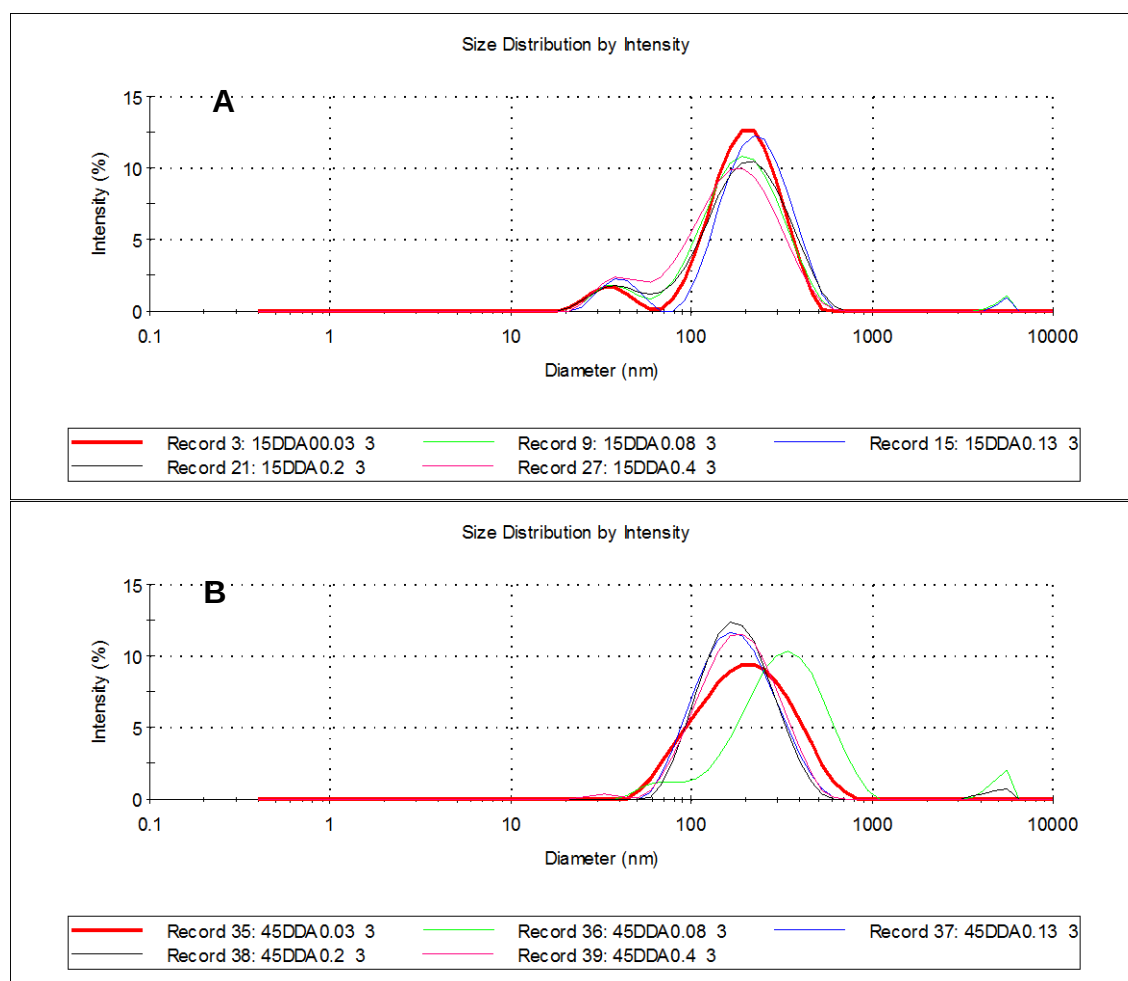


Figura 4.29 Distribución del diámetro hidrodinámico con la concentración: A) 15DDA y B) 45DDA

Por otro lado, en la curva de distribución de diámetro hidrodinámico del polímero 45DDA se observa una distribución ancha, unimodal, que se desplaza a medida que se incrementa la concentración, lo que sugiere que al incrementar la dosis de DDA en la reacción se obtiene un polímero con mayor tendencia a la autoasociación. Al mismo tiempo, se incrementa el tamaño

promedio de los nanoagregados (**Tabla 4.7**) porque se produce un incremento en el tamaño del núcleo, probablemente debido al mayor número de cadenas injertadas de DDA.

Los agregados poliméricos obtenidos a partir de la interacción de los segmentos hidrofóbicos injertados en las cadenas del polialdehído de la carboximetilcelulosa fueron confirmados por las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión y barrido (**Figura 4.31 A y B**), confirmando la naturaleza polidispersa de los agregados, su tamaño nanométrico y geometría esferoidal, en el intervalo de los 170-190 nm cuando los copolímeros contienen injertos de PEG.

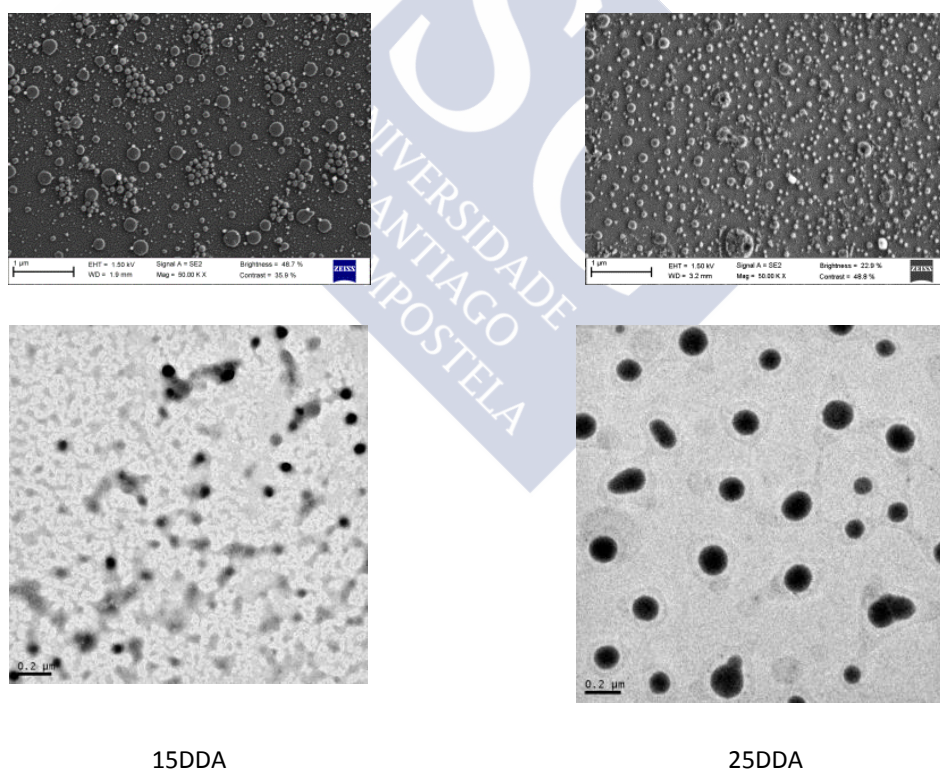


Figura 4.31 A Imágenes obtenidas por SEM y TEM de los nanoagregados poliméricos

En las imágenes SEM y TEM se observa que los agregados presentan una morfología cuasi esférica, típica de micelas. Por tanto, se pueden excluir la presencia de otras geometrías como lámelas o cilindros hexagonalmente empaquetados encontrados en otros sistemas de polímeros anfifílicos. Además, en la estimación de la talla promedio de los nanoagregados obtenidos, debe ser tomado en consideración que la preparación de las muestras pudiera distorsionar en alguna medida los resultados mostrados. Así que el tamaño determinado por DLS debe ser el más cercano al tamaño real. Tomando en consideración la geometría mostrada por los nanoagregados podemos inferir que el factor de empaquetamiento p esperado para los copolímeros en estudio debe ser próximo o inferior a un $1/3$.

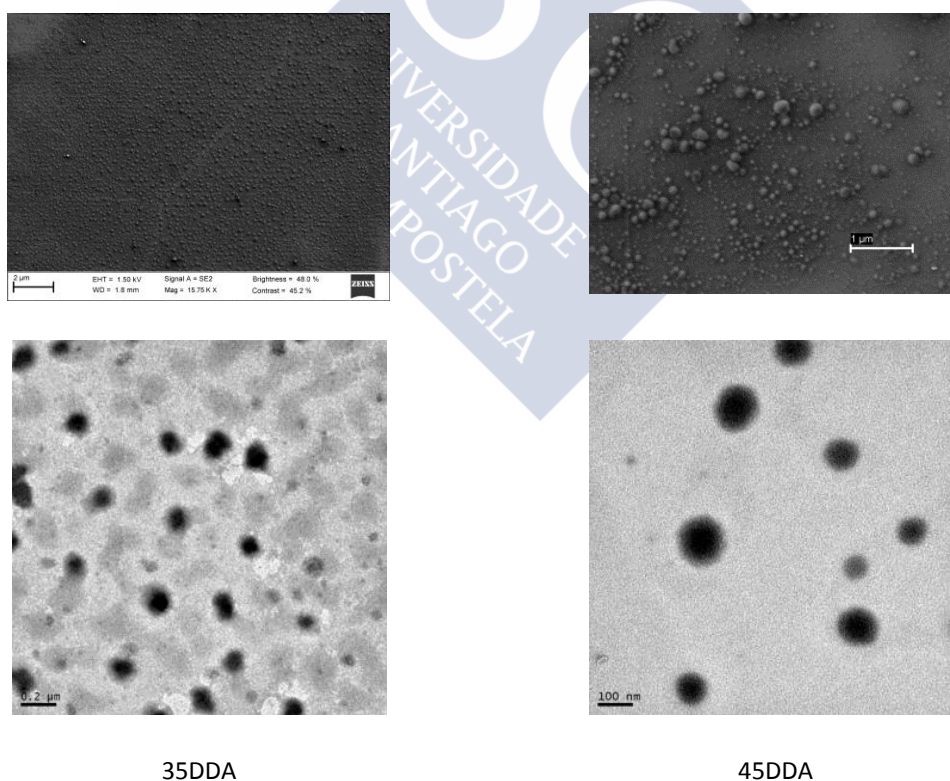


Figura 4.31 B Imágenes obtenidas por SEM y TEM de los nanoagregados poliméricos

4.4.4 Cromatografía de exclusión por tamaño

Los experimentos de SEC se realizaron a una concentración de 1 g L^{-1} , es decir a valores de concentración donde los copolímeros se encuentran formando agregados. Por lo que consideramos que los valores estimados deben estar asociados más al tamaño de los nanoagregados (226-263 kDa) que al peso molecular de las cadenas de los copolímeros, no siendo así para los polímeros de la carboximetilcelulosa y CMCO (90-6 kDa) en cada caso.

Los altos pesos moleculares encontrados indican que los copolímeros contienen fracciones macromoleculares de muy alto peso o que son capaces de autoensamblarse, formando grandes agregados en disolución acuosa. Al mismo tiempo, coexisten con una fracción de bajo peso que podría estar asociada a unímeros que se encuentran en equilibrio con los nanoagregados.

Interesante resulta encontrar que el peso molecular de los agregados se incrementa proporcionalmente con la fracción de DDA en la mezcla reaccionante (**Tabla 4.7**), lo que justifica que los copolímeros presenten valores para la CMC menores en la misma medida.

Se debe mencionar que al variar la composición de los copolímeros, se reveló por SEC (**Tabla 4.7**) que la disolución del copolímero 15DDA eluye como una muestra formada exclusivamente por unímeros, lo que sugiere que presenta baja estabilidad frente a la dilución. Mientras, las disoluciones de 25DDA, 35DDA y 45DDA mostraron la formación de grandes agregados, eluyendo intactos los agregados formados a partir del copolímero con mayor por ciento de DDA en la mezcla reaccionante, indicando alta estabilidad [Gaucher et al., 2005].

4.4.5 Medidas de potencial zeta

La carga superficial de los agregados puede influir en su formación, estabilidad y aplicación [Song et al., 2011], por lo que su estimación permite predecir el comportamiento de los agregados al modificar las condiciones físico-químicas de la disolución. En la **Tabla 4.7**, se reporta el potencial zeta de los agregados obtenidos a partir de los copolímeros injertados, en dispersión acuosa.

Los valores encontrados son virtualmente neutros. Aunque, para los copolímeros 25, 35 y 45DDA son ligeramente mayores en relación a 15DDA, lo que indica que el injerto aumenta la estabilidad al incrementar el contenido de DDA en la mezcla reaccionante. Un resultado semejante se encontró por SEC y permiten sugerir que el macromonomero de PEG se encuentra enlazado o formando parte de la superficie de los agregados, como fue corroborado por ^1H -RMN en disolución acuosa. Además, al no existir una carga superficial notable podemos decir que la estabilidad de los agregados se debe a la repulsión estérica de las cadenas de PEG [Vihola, 2007] su movilidad y alta hidrofiliidad.



CONCLUSIONES





5. Conclusiones

1. Derivados de la carboximetilcelulosa de naturaleza anfifílica fueron sintetizados a partir de su polialdehído por injerto de cadenas de dodecialmina y amino metoxi polietilenglicol de 5 kDa.
2. Los copolímeros tribloque injertados obtenidos se autoensamblan en disolución acuosa formando nanoagregados con un diámetro hidrodinámico promedio entre 170-190 nm.
3. Los copolímeros se autoensamblan a baja concentración formando agregados tipo núcleo-corona, capaces de hospedar en su centro moléculas liposolubles como el pireno, indicando la posibilidad de uso en la encapsulación de fármacos poco solubles.
4. Los valores de concentración de agregación crítica y el tamaño de los nanoagregados pueden ser controlados ajustando los parámetros de síntesis.
5. La introducción de amino metoxi polietilenglicol de 5 kDa en el esqueleto carbonado de la carboximetilcelulosa oxidada contribuye a la estabilización y reducción del tamaño de los nanoagregados.
6. La morfología de los nanoagregados observados es cuasi esférica.



RECOMENDACIONES





6. Recomendaciones

1. Definir los parámetros de síntesis del polialdehído de la carboximetilcelulosa que permita obtener un nivel de oxidación adecuado sin afectar el tamaño de la cadena macromolecular.
2. Completar la caracterización de los copolímeros injertados por ^1H -RMN que permita conocer su composición.
3. Estudiar el proceso de encapsulación y liberación de una sustancia modelo liposoluble, por ejemplo principios activos farmacéuticos.
4. Realizar la síntesis de copolímeros injertados con polietilenglicol de diferentes pesos moleculares y estudiar su comportamiento en disolución.





REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS





Referencias

Abdala A.A., Olesen K., Khan S.A., (2003) Solution rheology of hydrophobically modified associative polymer: Solvent quality and hydrophobic. *Journal of Rheology*. Vol. 47, No.2 : 497-511.

Almlöf A.H., Schenzel K., Germgard U., (2013) Carboxymethyl cellulose produced at different mercerization conditions and caracterización by NIR-FT raman spectroscopy in combination with multivariate analytical methods. *BioResources*. Vol. 8, No. 2: 1918-1932.

Álvarez M.C., (2004) La industria de los surfactantes: tendencias mundiales y perspectivas para Colombia. *Revista Palmas*. Vol. 25, No. Especial: 340-353.

Anton P., Laschewsky A., (1994) Solubilization by polysoaps. *Colloid and Polymer Science*. Vol. 272, No. 9: 1118-1128.

Aronov O., Horowitz A.T., Gabizon A., Gibson D., (2003) Folate-targeted PEG as a potential carrier for carboplatin analogs. Synthesis and in vitro studies. *Bioconjugate Chemistry*, Vol. 14: 563-574.

Bajpai A.K., Shukla S.K., Bhanu S., Kankane S., (2008) Responsive polymers in controlled drug delivery. *Progress in Polymer Science*. Vol. 33, No. 11: 1088-1118.

Banerjee J., Kumar R., Srivastava A., Behari K., (2006) Graft copolymerization of 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulphonic acid onto carboxymethylcellulose (sodium salt) using bromate/thiourea redox pair. *Journal of Applied Polymer Science*. Vol. 100 :26-34.

Barba C., Montané D., Rinaudo M., Farriol X., (2002) Synthesis and characterization of carboxymethylcellulose form non-wood fiber I. Accessibility of cellulose fibers and CMC synthesis. *Cellulose*. Vol. 9 : 319-326.

Beija M., Salvayre R., de Verguerie N.L., Marty J.D, (2012) Review. Colloidal systems for drug delivery: from desing to therapy. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.04.008> *Trends in Biotechnology*. Vol. 30, No.9 :485-96.

Benny O., Fainaru O., Adini A., Cassiola F., Bazinet L., Adini I., Pravda E., Nahmias Y., Koirola S., Corfas G., Amato R.J.D., Folkman J., (2012) An orally delivered small-molecule formulation with antiangiogenic and anticancer activity. *Nature Biotechnology*. Vol. 26, No.7: 799-807.

Biswal D. R., Sing R.P., (2004) Characterisation of carboxymethyl cellulose and polyacrylamide graft copolymer. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 57 :379-387.

Borza J., Racz I., (1995) Carboxymethylcellulose of fibrous character. A survey. *Cellulose Chemical and Technology*. Vol. 29, No. 6: 657-663.

Brigger I., Dubernet C., Couvreur P., (2002) Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery. Reviews*. Vol. 54 :631-651

Bromberg L., (2008) Polymeric micelles in oral chemotherapy. *Journal of Controlled Release.*, Vol. 128: 99-112.

Bruneel D., Schacht E., (1993) Chemical modification of pullulan: 1. Periodate oxidation. *Polymer*. Vol. 34: 2628-2632.

Burke S.E. y Palepu R., (2001) Interactions of a hydrophobically modified cationic cellulose ether derivative with amphiphiles of like charge in an aqueous environment. *Carbohydrate polymers*. Vol. 45, No. 3: 233-244.

Cabral H. y Kataoka K., (2010) Smart nanoassemblies of block copolymers for drug and gene delivery. *Advanced Nanomaterials*. Volume 1, editado por Geckeler K.E y Nishide H. Wiley-VCH, ISBN: 978-3-527-31794-3.

Calvini P., Conio G., Princi E., Vicini S., Pedemonte E., (2006) Viscometric determination of dialdehyde content in periodate oxycellulose. Part II. Topochemistry of oxidation. *Cellulose*. Vol. 13: 571-579.

Cao Y., Li H., (2003) Micellar solutions of amphipathic copolymers based on carboxymethyl cellulose. *Polymer International*. Vol. 52: 1869-1875.

Capitani D., Porro F., Segre A.L., (2000) High field NMR analysis of the degree of substitution in carboxymethyl cellulose sodium salt. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 42: 283-286.

Charpentier D., Mocanu G., Carpov A., Chapelle S., Merle L., Muller G., (1997) New Hydrophobically modified carboxymethylcellulose derivatives. Carbohydrate Polymers. Vol. 33: 177-186.

Charpentier V. D., Merle L., Mocanu G., Picton L., Muller G., (2003) Rheological properties of hydrophobically modified carboxymethylcellulose. Carbohydrate Polymers. Vol. 60: 87-94.

Cheng H., Wang S., Yang J., Zhou Y., Yan D., (2009) Synthesis and self-assembly of amphiphilic hyperbranched polyglycerols modified with palmitoyl chloride. Journal of Colloid and Interface Science. Vol. 337: 278-284.

Chul H.J., Yeon K.S., Moo L.Y., (1999) Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (Pluronic)/ poly(ϵ -caprolactone) (PCL) amphiphilic block copolymeric nanospheres. Journal of Controlled Release. Vol. 62: 381-392.

Claro C., Muñoz J., Fuente J. de la., Jiménez-Castellanos M.R., Lucero M.J., (2008) Surface tension and rheology of aqueous dispersed systems containing a new hydrophobically modified polymer and surfactants. International Journal of Pharmaceutics. Vol. 347. No.1-2: 45-53.

Cohen S. M.A., Fokkink R.G., van der Horst P.M., Lichtenbelt J.W. Th., (1998) The adsorption of hydrophobically modified carboxymethylcellulose on a hydrophobic solid: effect of a pH and ionic strength. Colloid Polymer Science. Vol. 276: 335-341.

Danilevicius A., Dobiliene J., Wutz C., Liesiene J., (2006) Phenoxyhydroxypropylhydroxyethylcellulose- new amphiphilic cellulose derivative. Cellulose Vol. 14, No.4: 321-329.

Dimitrov I., Trzebicka B., Müller A. H. E., Dworak A., Tsvetanov C. B., (2007) Thermosensitive water-soluble copolymers with doubly responsive reversibly interacting entities. Progress in Polymer Science. Vol. 32, No. 11: 1275-1343.

De Brito D., Asis O.B.G., (2009) Thermal degradation of carboxymethylcellulose in different salty forms. Thermochimica Acta. Vol. 494, No.1-2: 115-122.

Drexler E.K., (1986) Engines of creation. The coming era of nanotechnology. Doubleday, ISBN 0-385-19973-2.

Duran A., (2007) Aqueous solutions of amphilic polysaccharides: Concentration and temperature effect on viscosity. European Journal of Polymer Science. Vol. 43: 1743-1753.

Duval C.T., Huguet J., muller G., (2003) Self-assembly and hydrophobic cluster of amphiphilic polisaccharides. Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspect Vol. 220: 105-115.

Ernsting M.J., Tang W.L., MacCallum N., Li S-D., (2011) Synthetic modification of carboxymethylcellulose and use thereof to prepare a nanoparticle forming conjugate of docetaxel for enhanced cytotoxicity against cancer cells. Bioconjugate Chemistry. Vol. 24: 2474-2486.

Eyler R.W., Klug E.D., Diephuis F., (1947) Determination of degree of substitution of sodium carboxymethylcellulose. Analytical Chemistry. Vol. 19, No. 1: 24-29.

Fernández Arteaga A., (2006) Preparación, caracterización y estabilidad de emulsiones y microemulsiones o/w. Tesis doctoral. Universidad de Granada. ISBN 978-84-338-4120-9.

Fernández A., Salager J.I., Scorzza C., (2004) Surfactantes. IV noiónicos. Plan piloto en especialidades químicas. Universidad de los Andes, Mérida-Venezuela. Descargado el día 3/9/2014 de <http://www.firp.ula.ve/archivos/cuadernos/S303.pdf> a las 02.54 h.

Feynman R.P., (1960) There's plenty of room at the bottom. An invitation to enter a new field of physics. Engineering and Science. Vol. 23: 22-36.

Francis M. F., Cristea M., Winnik. F.M., (2004) Polymeric micelles for oral drug delivery: Why and how. Pure Applied Chemistry. Vol. 76, No. 7-8: 1321-1325.

Fras L., Laine J., Stenius P., Stana-Kleinschek K., Ribitsch V., Doleček V., (2004) Determination of dissociable groups in natural and regenerated cellulose

fibers by different titration methods. *Journal of Polymer Science*. Vol. 92: 3186-3195.

Gal'braikh L.S., Rogovin Z.A., (1971) en: Bikales N. M., Segal L. (editores) *Cellulose and cellulose derivatives*, 2da, edición. Vol. 5, Wiley-Interscience, New York: 893.

Gaucher G., Dufresne M.H., Sant V.P., Kang N., Maysinger D., Lerroux J.C., (2005) Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *Journal of Controlled Release*. Vol. 109: 169-188.

Hamley I.W., (2005) *Block copolymers in solution: Fundamentals and application*. John Wiley & Son Ltd. ISBN 0-470-01557-8.

Hao. J., Hoffmann H., (2004) Self-assembled structures in excess and salt free catationic surfactant solution. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. Vol. 9: 279-293.

Harada A., Kataoka K., (2006) Supramolecular assemblies of block copolymers in aqueous media as nanocontainers relevant to biological applications. *Progress Polymer Science*, Vol. 31: 949-982.

Hassani L. N., Hendra F., Bouchemal K., (2012) Auto-associative amphiphilic polysaccharides as drug delivery systems. *Drug Discovery Today*. Vol. 17, No. 11-12: 608-614.

Heinze T., Koschella A., (2005) Carboxymethyl ethers of cellulose and starch. A review. *Macromolecular Symposia* Vol. 223: 13-39.

Heinze T. y Liebert T., (2001) Unconventional methods in cellulose functionalization. *Progress in Polymer Science*. Vol. 26: 1689-1762.

Heinze T., Pfeiffer K., (1999) Studies on the synthesis and characterization of carboxymethylcellulose. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*. Vol. 266, No. 4638: 37-45.

Ho F.F.L., Klosiewict D.W., (1980) Proton nuclear magnetic resonance spectrometry for determination of substituents and their distribution in carboxymethylcellulose. *Analytical Chemistry*. Vol. 52, No.6: 913-916.

Holmberg K., Jönsson B., Kronberg B., Lindman B., (2002) Surfactants and Polymers in aqueous solution. Second edition. John Wiley & Sons, LTD. ISBN: 0-41-49883-1: 57.

Hong P., Fa C., Wei Y., Sen Z., (2007) Surface properties and synthesis of the cellulose –based amphoteric polymeric surfactant. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 69: 625-630.

Hou Q.X., Liu W., Liu Z.H., Bai L.L., (2007) Characteristic of wood cellulose fibers treated with periodate and bisulfite. *Ind. Eng. Chem. Res.* Vol. 46: 7830-7837.

Hou Q., Liu W., Liu Z., Duan B., Bai L., (2008) Characteristics of antimicrobial fibers prepared with wood periodate oxycellulose. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 74: 235-240.

Iamazaki E. T., Brito D., Schmitt C. C., Campana S. P., Neumann M.G., (2004) Preparation of substituted ionic carbohydrate polymers and their interactions with ionic surfactants. *Colloid and Polymer Science*. Vol. 283: 33-40.

Israelachvilli J.N., Mitchell D.J., Ninham B.W., (1976) Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *Journal of chemical society, Faraday Transactions 2: Molecular and chemical physical*. Vol. 72, No. 9: 1525-1568.

Jose R., Jayantilal P.T., Allen C.T., Josep W.D., Grebowicza J., Hanb H., Kumar B.P., Sharpnackc L., Mae A.D., Kumar S., (2014) Thermotropic mesomorphism in catanionic surfactants synthesized from quaternary ammonium surfactants and sodium dodecylbenzenesulfonate: Effect of chain length and symmetry. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspect*. Vol. 46: 40-49.

Kakizawa Y. y Kataoka K., (2002) Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Vol. 54: 203-222.

Kataoka K., Harada A., Nagazaky Y., (2001) Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 47: 113-131.

Kim U-J., Wada M., Kuga S., (2004) Solubilization of dialdehyde cellulose by hot water. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 56: 7-10.

Klemm D., Philipp B., Heinze T, Heinze U., Wagenknecht W., (1998) *Comprehensive cellulose chemistry*. Volume 1: fundamentals and analytical methods. Wiley-VCH: 9-43.

Kötz J., Kosmella S., Beitz T., (2001) Self-assembled polyelectrolyte systems. *Progress in Polymer Science*. Vol. 26: 1199-1232.

Kristiansen K.A., Potthast A., Christensen B.E., (2010) Periodate oxidation of polysaccharides for modification of chemical and physical properties. *Carbohydrate Research*. Vol. 345: 1264-1271.

Kulicket W.M., Kull A.H., Kull W., Thielking H., (1996) Characterization of aqueous carboxymethylcellulose solutions in terms of their molecular structure and its influence on rheological behavior. *Polymer*. Vol. 13, No. 13: 2723-2731.

Kumari, A., Kumar Y. S., Yadav S.C., (2010) Review. Biodegradable polymer nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. Vol. 75: 1-18.

Kundu P. P. y Sharma V. (2008) Synthetic polymeric vectors in gene therapy. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. Vol. 12, No.5-6: 89-102.

Lalatsa A., Schätzlein A.G., Mazza M., Hang L.T.B., Uchegbu I.F., (2012) Review. Amphiphilic poly(l-amino acid). New materials for drug delivery. *Journal of Controlled Release*. Vol.16: 523-536.

Landoll L.M. (1982) Nonionic polymer surfactants. *Journal of Polymer Science, Polymer Chemistry Edition*. Vol. 20, No. 2: 433-455.

Lee S.Y., (2008) Self-assembly and nanotechnology: a force balance approach. John Wiley & Sons, Inc. ISBN 978-0-470-24883-6: 3.

Letchford K., Burt H., (2007) A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structure: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Vol. 65, : 259-269.

Licciardi M., Giammona G., Du J., Armes S.P., Tang Y., Lewis A.L., (2006) New folate-functionalized biocompatible block copolymer micelles as potential anti-cancer drug delivery systems. *Polymer*. Vol. 47: 2946-2955.

Li G., Song S., Guo L., Ma S., (2008) Self-assembly of thermo- and pH-responsive poly(acrylic acid)-b-poly-(N-isopropylacrylamide) micelles for drug delivery. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*. Vol. 46: 5028-5035.

Li H., Wu B., Mu C., Lin W., (2011) Concomitant degradation in periodate oxidation of carboxymethyl cellulose. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 84: 881-886.

Li X., Kunieda H., (2003) Catanionic surfactants: microemulsion formation and solubilization. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. Vol. 8: 327-336.

Liu F., Eisenberg A., (2003) Preparation and pH triggered inversion of vesicles from Poly(acrylic acid)-block-Polystyrene-block-Poly(4-vinylPyridine). *Journal of American Chemical Society*. Vol. 125, No. 49: 15059-15064.

Liu L., Xu X., Guo S., Han W., (2009) Synthesis and self-assembly of chitosan-based copolymer with a pair of hydrophobic/hydrophilic graft of polycaprolactone and poly(ethylene glycol). *Carbohydrate Polymers*. Vol. 75: 401-407.

Liu Z., Jiao Y., Wang Y., Zhou C., Zhang Z., (2008) Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Vol. 60: 1650-1663.

Machado J.C., Silva G.G., de Oliveira F.C., Lavall R.L., Rieumont J., Licinio P., Windmüller D., (2007) Free-volume and crystallinity in low molecular weight

poly(ethylene oxide). *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*. Vol. 45: 2400-2409.

Malaprade M. L., (1928) Action of polyalcohol on periodic acid, analytical application. *Bulletin de la Societe Chimique de France*. Vol. 43: 683-696.

Margutti S., Vicini S., Proietti N., Capitani D., Conio G., Pedemonte E., Segre A.L., (2002) Physical-chemical characterisation of acrylic polymers grafted on cellulose. *Polymer*. Vol. 43: 6183-6194.

Marques E.F., Regev O., Khan A., Lindman B., (2003) Self-organization of double-chained and pseudodouble-chained surfactants: counterion and geometry effects. *Advances in Colloid and Interface Science*. Vol. 100-102: 83-104.

Matyjaszewski K., Tsarevsky N.V., (2009) Nanostructured functional materials prepared by atom transfer radical polymerization. *Nature Chemistry*. Vol. 1, DOI: 10.1038/NCHEM.257: 276-288.

Merle L., Charpentier D., Mocanu G., Chapelle S., (1999) Comparison of distribution pattern of associative carboxymethylcellulose derivatives. *European Polymer Journal*. Vol. 35: 1-7.

Mu C., Guo J., Li X., Lin W., Li D., (2012) Preparation and properties of dialdehyde carboxymethyl cellulose crosslinked gelatin edible films. *Food Hydrocolloids*. Vol. 27: 22-29.

Nylander T., Samoshina Y., Lindman B., (2006) Formation of polyelectrolyte-surfactant complexes on surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*. Vol. 23-26: 105-123.

Odian G., (2004) Principles of polymerization. Fourth edition. Wiley Interscience. ISBN 0-471-27400-3.

Oparin A. I., (1938) The origin of life. New York. Macmillan.

Ortega R.M., (2009) Comportamiento reológico de disoluciones acuosas de surfactantes comerciales no iónicos. Tesis presentada para optar por el Grado

de Doctor en Ciencias y Tecnología del Medio Ambiente. Universidad de Granada. ISBN978-84-692-8372-1.

Ozin G.A., Arsenault A.C., Cademartiri L., (2009). A chemical approach to nanomaterials. Second edition, RSCPublishing. ISBN 978-1-84755-895-4.

Parveen S., Misra R., Sahoo S.K., (2012) Review article. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. Vol. 8: 147-166.

Pasquali R. C., Chiappetta D. A., Bregni C., (2005) Los copolímeros en bloques anfífilos y sus aplicaciones farmacéuticas. *Acta Farm. Bonaerense.*, Vol. 24, No. 4: 610-618.

Potthast A., Rosenaut T., Kosma P., (2006) Analysis of oxidized functionalities in cellulose. *Advances in Polymer Science*. Vol. 205: 1-48.

Prabaharan M., Grailer J.J., Pilla S., Steeber D.A., Gong S., (2009) Folate-conjugated amphiphilic hyperbranched block copolymers based on Boltorn[®] H40, poly(L-Lactide) and poly(ethylene glycol) for tumor targeted drug delivery. *Biomaterials*. Vol. 30, No.16: 3009-3019.

Pushpamalar V., Langford S. J., Ahmad M., Lim Y.Y., (2006) Optimization of reaction conditions for preparing carboxymethyl cellulose from sago waste. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 64: 312-318.

Qi H., Liebert T., Meister F., Heinze T., (2009) Homogenous carboxymethylation of cellulose in the NaOH/urea aqueous solution. *Reactive & Functional Polymers*, doi:10.1016/j.reactfunctpolym. 2009.06. 007.

Rahn K. y Heinze T., (1998) New cellulosic polymers by subsequent modification of 2,3-dialdehyde cellulose. *Cellulose Chemistry and Technology*. Vol. 32: 173-183.

Rapopor N., (2007) Physical stimuli-responsive polymeric micelles for anti-cancer drug delivery. *Progress in Polymer Science*. Vol. 32: 962-990.

Regia L.V. R., Balaban R., Borsali R., (2008) Amphiphilic derivatives of carboxymethylcellulose: Evidence for intra and intermolecular hydrophobic associations in aqueous solutions. *Polymer Engineering and Science*. Vol. 48, No. 10: 2011-2026.

Rodríguez J., Chécot F., Gnanou Y., Lecommandoux S., (2005) Toward “smart” nano-objects by self-assembly of block copolymers in solution. *Progress Polymer Science*. Vol. 30: 671-724.

Rodríguez R., Alvarez-Lorenzo C., Concheiro A., (2003) Influence of cationic cellulose structure on its interactions with sodium dodecylsulfate: implications on the properties of the aqueous dispersions and hydrogels. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Vol. 56: 133-142.

Rosilio V., Albrecht G., Baszkin A., Merle L., (2000) Surface properties of hydrophobically modified carboxymethylcellulose derivatives. Effect of salt and proteins. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Vol. 19: 163-172.

Saito T., (2008) Synthesis and characterization multiphase block copolymers: Influence of functional groups on macromolecular architecture. Academic Dissertation, Virginia University.

Salager J. I., (2002) Surfactants. Types and uses. FIRP cuaderno S300-A. Módulo de enseñanza en fenómenos interfaciales, en Español. Universidad de los Andes, Mérida-Venezuela. Descargado el día 4/9/14 de <http://www.firp.ula.ve/archivos/cuadernos/S300A.pdf> a las 02.00 h.

Savić R., Eisenberg A., Maysinger D., (2006) Block copolymer micelles as delivery vehicles of hydrophobic drugs: micelle-cell interactions. *Journal of Drug Targeting*. Vol. 14, No. 6: 343-355.

Schukin E. D., Pertsov A. V, Améline E. A., (1988) *Química Coloidal*. Editorial Mir, ISBN: 5-03-000608-7.

Schwartz E.L., Ober C.K., (2010) Phase-selective chemistry in block copolymer systems en *Advanced Nanomaterials*. Volumen 1, editado por Geckeler K.E., Nishide H. WILEY-VCH. ISBN 978-3-527-31794-3.

Shaw D. J., (1992) Introduction to colloid and surface chemistry. Fourth edition. Butterworth/Heinemann, ISBN 07506 11820: 1-114.

Shukla D., Tyagi V.K., (2008) Synthesis and properties of geminis with two alkyl and two phosphate headgroups. Europe Journal of Lipid Science and Technology. Vol. 110, No.6: 576-580.

Sigma-Aldrich. Product information: Carboxymethylcellulose sodium salt. Product number C5678.

Silioc C., Maleki A., Zhu K., Kjøniksen A-L., Nyström B., (2007) Effect of hydrophobic modification on rheological and swelling features during chemical gelation of aqueous polysaccharides. Biomacromolecules. Vol. 8: 719-728.

Sinnott M. L., (2007) Carbohydrate chemistry and biochemistry. Structure and mechanism. RSC Publishing, ISBN: 978-0-85404-256-2: 597-599.

Spurlin H.M., (1939) Arrangement of substituents in cellulose derivatives. Journal of the American Chemical Society Vol. 61, No. 8: 2222-2227.

Song Y., Zhang L., Gan W., Zhou J., Zhang L., (2011) Self-assembled micelles based on hydrophobically modified quaternized cellulose for drug delivery. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. Vol. 83: 313-320.

Sroková I., Tomanová V., Ebringenová A., Malovíková A. Heinze T. (2004) Water-soluble amphiphilic O-(Carboxymethyl)-cellulose derivatives. Synthesis and properties. Macromolecular Materials Engineering. Vol. 289, No. 1: 63-69.

Suarez H. O., Mohamed S. G., Winnil F.M., (2007) Synthesis, reactivity, and pH-responsive assembly of new double hydrophilic block copolymers of carboxymethyldextran and poly(ethylene glycol). Polymer. Vol. 48: 921-930.

Sui W., Song G., Chen G., Xu G., (2005) Aggregate formation and surface activity property of an amphiphilic derivative of chitosan. Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineer Aspects. Vol. 256: 29-33.

Taek K., Taik Y., Oh N-M., Kim K., Haeng D., Seong E., (2009) A smart flower-like polymeric micelle for pH-triggered anticancer drug release. *International Journal of Pharmaceutics*. Vol. 375, No. 1-2: 163-169.

Teotia A., Ikram S., Gupta B., (2012) Structural characterization of chitosan and oxidized carboxymethyl cellulose based freeze-dried films. *Polymer Bull*. Vol. 69, No. 2: 175-188.

Teotia A., (2012) Modification of carboxymethyl cellulose through oxidation. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 87: 457-460.

Thuresson K., Lindman B., Nyström B., (1997) Effect of hydrophobic modification of nonionic derivative on the interaction with surfactants. *Rheology. Journal Physical Chemistry. B*. Vol. 101, No. 33: 6450-6459.

Tian H., Tang Z., Zhuang X., Chen X., Jing X., (2012) Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. *Progress in Polymer Science*. Vol. 37: 237-280.

Tirelli N., Lutolf M.P., Napoli A., Hubbell J.A., (2002) Polyethylene glycol block copolymers. *Reviews in Molecular Biotechnology*. Vol. 90: 3-15.

Tondre C., Caillet C., (2001) Properties of the amphiphilic films in mixed cationic/anionic vesicles: a comprehensive view from a literature analysis. *Advances in Colloid and Interface Science*. Vol. 93: 115-134.

Varma A.J., Kulkarni M.P., (2002) Oxidation of cellulose under controlled conditions. *Polymer Degradation and Stability*. Vol. 77: 25-27.

Verma V., Verma P., Ray P., Ray A.R., (2008) 2,3-Dihydrazone cellulose: Prospective material for tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*. Vol. 28: 1441-1447.

Vicini S., Princi E., Luciano G., Franceschi E., Pedemonte E., Oldak O., Kaczmarek H., Sionkowska A., (2004) Thermal analysis and characterisation of cellulose oxidised with sodium metaperiodate. *Termochimica Acta*. Vol. 418: 123-130.

Vihola H., (2007) Studies on thermosensitive poly(N-vinylcaprolactam) based polymers for pharmaceutical applications. Academic Dissertation. ISBN 978-952-10-4170-9.

Vila J.L., (2006) Nanotecnología Farmacéutica: una galénica emergente. Discurso. Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia. Depósito Legal: C-420/06, I.S.B.N.:84-689-6765-3.

Villalonga S. R., Villalonga S. M., Gómez L., (2000) Preparation and functional properties of trypsin modified by carboxymethylcellulose. Journal of Molecular catalytic B. Enzymatic. Vol. 10: 483-490.

Vlessidis A.G., Evmiridis N.P., (2009) Periodate oxidation and its contribution to instrumental methods of micro-analysis. A review. Analytica Chimia Acta. Vol. 652: 85-127.

Yang L., Kuang J., Li Z., Zhang B., Cai X., Zhang L.M., (2008) Amphiphilic cholesteryl-bearing carboxymethylcellulose derivatives: self-assembly and rheological behaviour in aqueous solution. Cellulose. Vol. 15: 659-669.

Wang J., del Rosario L. S., Demirdirek B., Bae A., Uhrich K. E., (2009) Comparison of PEG chain length and density on amphiphilic macromolecular nanocarriers: Self-assembled and unimolecular micelles. Acta Biomaterialia. Vol. 5: 883-892.

Wei L. H., Zhang L. M., Wang C., Chen R.F., (2011) Preparation and properties of new micellar drug carriers based on hydrophobically modified amylopectin. Carbohydrate Polymers. Vol. 83: 1499-1506.

Xu., S. y Liu W., (2008) Synthesis and surface characterization of an amphiphilic fluorinated copolymer via emulsifier-free emulsion polymerization of RAFT. Journal of Fluorine Chemistry. Vol 129: 125-130.

Xun W., Wang H.Y., Li Z.Y., Cheng S.X., Zhang X.Z., Zhuo R.X., (2011) Self-assembled micelles of novel graft amphiphilic copolymers for drug controlled release. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. Vol. 85: 86-91. Yang F., Li G., Ge YG., Ren FX., Wang GX., (2009) Synthesis, characterization, and applied

properties of carboxymethyl cellulose and polyacrylamide graft copolymer. Carbohydrate Polymers. Vol. 78: 95-99.

Yang L., Kuang J., Li Z., Zhang B., Cai X., Zhang L.M., (2008) Amphiphilic cholesteryl-bearing carboxymethylcellulose derivatives: self-assembly and rheological behaviour in aqueous solution. Cellulose. Vol. 15, No. 5: 659-669.

Yang L., Kuang J., Wang J., Li Z., Zhang L.M., (2008) Loading and in vitro controlled release of indomethacin using amphiphilic cholesteryl bearing carboxymethylcellulose derivatives. Macromolecular Bioscience. Vol. 8: 279-286.

Ye J., Xiong J., Sun R., (2012) The fluorescence property of schiff bases of carboxymethyl cellulose. Carbohydrate Polymers. Vol. 88: 1420-1424.

Zapf A., Beck R., Platz G., Hoffmann H. (2003) Calcium surfactants: a review. Advances in Colloid and Interface Science. Vol. 100-102: 349-380.

Zhang Y., Zhuo R.X., (2005) Synthesis and in vitro drug release behavior of amphiphilic triblock copolymer nanoparticles based on poly(ethylene glycol) and polycaprolactone. Biomaterials. Vol. 26: 6736-6742.

Zhang L.M., (2001) Cellulosic associative thickeners. Carbohydrate Polymers. Vol. 45: 1-10.

Zhao H., Heindel N.D., (1991) Determination of degree of substitution of formyl groups in polyaldehyde dextran by the hydroxylamine hydrochloride method. Pharmaceutical Research. Vol. 8, No. 3: 400-402.

Zheng L., Wang Y.Z., Yang K.K., Wang X.L., Chen S.C., Li J., (2005) Effect of PEG on the crystallization of PPDO/PEG blends. European Polymer Journal. Vol. 41: 1243-1250.

Zhu W., Xie W., Tong X., Shen Z., (2007) Amphiphilic biodegradable poli(CL-*b*-PEG-*b*-CL) triblock copolymers prepared by novel rare earth complex: Synthesis and crystallization properties. European Polymer Journal. Vol. 43: 3522-3530.