

**SÍNTESIS DE COPOLÍMEROS ANFIFÍLICOS BIOCONJUGADOS CON  
COLESTEROL Y SU APLICACIÓN EN LA ENCAPSULACIÓN Y LIBERACIÓN  
DE ANFOTERICINA B**



**YEIMY JOHANA RODRÍGUEZ MOLINA**

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS APLICADAS Y AMBIENTALES**

**FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA**

**BOGOTÁ D.C.**

**2016**

**SÍNTESIS DE COPOLÍMEROS ANFIFÍLICOS BIOCONJUGADOS CON  
COLESTEROL Y SU APLICACIÓN EN LA ENCAPSULACIÓN Y LIBERACIÓN  
DE ANFOTERICINA B**

**YEIMY JOHANA RODRÍGUEZ MOLINA**

**TRABAJO DE GRADO**

**Presentado como requisito parcial para optar al título de Química**

**Tutor: León Darío Pérez Pérez Ph.D.**

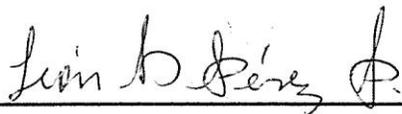
**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS APLICADAS Y AMBIENTALES**

**FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA**

**BOGOTÁ D.C.**

**2016**

**NOTA DE ACEPTACIÓN**



---

León Darío Pérez Pérez Ph.D.

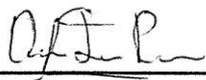
Tutor



---

Carolina Blanco Jiménez Ph.D.

Jurado 1



---

Oscar Patiño Ladino Ph.D.

Jurado 2

*A mi familia y amigos  
Por su amor y apoyo incondicional en esta experiencia de vida*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional de Colombia y al grupo de investigación en macromoléculas por permitirme el desarrollo de la presente investigación.

Quiero extender un agradecimiento especial a mi director de tesis, el profesor León Darío Pérez Pérez por su dedicación, consejos y acompañamiento constante en todas las etapas de este proceso.

Sin dejar atrás a mis amigos Sandra, Fabián, Lilian, Juan y Lorena quienes afortunadamente me colaboraron en los momentos más importantes.

Por último y no menos importante agradezco a mi familia, a mi mamá Graciela Molina, a mi papá Florián Rodríguez, a mis hermanos Diana y Camilo y a mi novio Andrés Gutiérrez, por su cariño y apoyo permanente, que me motivó cada día para alcanzar esta meta.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>13</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>14</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
<b>4. MARCO TEORICO.....</b>	<b>17</b>
4.1 Estado del arte.....	17
4.2 Copolímeros en bloque.....	19
4.3 Polimerización radicalaria por transferencia de átomo (ATRP).....	20
4.3.1 Polimerización radicalaria por transferencia de átomo y activadores regenerados por transferencia electrónica (ARGET-ATRP).....	21
4.4 Micelización de copolímeros en bloque: autoensamblaje en solución.....	22
4.5 Encapsulación de fármacos.....	23
4.6 Liberación controlada de fármacos.....	24
4.7 Anfotericina B.....	25
4.7.1 Mecanismo de acción de la anfotericina B.....	25
<b>5. METODOLOGÍA.....</b>	<b>27</b>
5.1 Determinación de las condiciones de síntesis de los materiales poliméricos.....	28
5.1.1 Síntesis del macroiniciador Br-PEG-Br.....	28
5.1.2 Preparación del acrilato de colesterilo.....	28
5.1.3 Síntesis de copolímeros en bloque anfífilicos de (ACol-co-BA)- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -(ACol-co-BA) empleando ARGET-ATRP.....	29
5.1.4. Caracterización del macroiniciador y los copolímeros en bloque anfífilicos.....	31
5.2 Propiedades de micelización: efecto de la estructura de los copolímeros en bloque anfífilicos.....	32
5.2.1 Preparación de las micelas.....	32
5.2.2 Caracterización de los sistemas micelares.....	32
5.3 Capacidad de los copolímeros de (ACol-co-BA)- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -(ACol-co-BA) para encapsular y liberar anfB.....	33
5.3.1 Encapsulación de anfB en las micelas.....	33
5.3.2 Liberación controlada de anfB.....	34
5.3.3 Cuantificación de anfB encapsulada y liberada por espectrofotometría UV/VIS.....	35

5.4 Determinación de la actividad hemolítica de la anfB encapsulada en las micelas ..	36
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>38</b>
6.1 Síntesis de los copolímeros en bloque anfifílicos (ACol-co-BA)- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -(ACol-co-BA).....	38
6.1.1 Síntesis del macroiniciador Br-PEG-Br .....	38
6.1.2 Preparación del acrilato de colesterilo.....	40
6.1.3 Síntesis de copolímeros en bloque anfifílicos de (ACol-co-BA)- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -(ACol-co-BA) empleando ARGET-ATRP .....	43
6.2 Micelización de los copolímeros en bloque anfifílicos .....	48
6.2.1 Preparación y caracterización de las micelas.....	48
6.3 Efecto de la estructura de los copolímeros anfifílicos para encapsular y liberar anfB .....	52
6.3.1 Encapsulación de anfB en las micelas .....	52
6.3.2 Liberación controlada de anfB.....	56
6.3.3 Estado de agregación de anfB .....	58
6.4 Determinación de la actividad hemolítica de la anfB encapsulada en las micelas ..	61
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>63</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>65</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>67</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema general de polimerización radicalaria por transferencia de átomo (ATRP) .....	21
<b>Figura 2.</b> Esquema general de Activadores Regenerados por Transferencia Electrónica (ARGET-ATRP) .....	22
<b>Figura 3.</b> Autoensamblaje en medio acuoso de un copolímero en bloque anfifílico .....	23
<b>Figura 4.</b> Estructura química de la anfotericina B .....	25
<b>Figura 5.</b> Fases del diseño experimental de la investigación .....	27
<b>Figura 6.</b> Esquema general de síntesis del macroiniciador Br-PEG-Br .....	28
<b>Figura 7.</b> Reacción general para la obtención del cloruro de acrilato .....	29
<b>Figura 8.</b> Reacción general para la obtención de acrilato de colesterilo (ACol)....	29
<b>Figura 9.</b> Esquema general de síntesis de los copolímeros de (ACol-co-BA)-b-PEG-b-(ACol-co-BA) .....	31
<b>Figura 10.</b> Preparación de micelas por el método de nanoprecipitación .....	32
<b>Figura 11.</b> Esquema general para la encapsulación de anfB .....	34
<b>Figura 12.</b> Esquema general para la liberación de anfB .....	35
<b>Figura 13.</b> Espectro FT-IR del PEG-diol y el macroiniciador PEG-dibromo.....	39
<b>Figura 14.</b> Espectro RMN <sup>1</sup> H del PEG-diol y el macroiniciador PEG-dibromo.....	40
<b>Figura 15.</b> Espectro FT-IR del acrilato de colesterilo .....	41
<b>Figura 16.</b> Espectro RMN <sup>1</sup> H del acrilato de colesterilo .....	42
<b>Figura 17.</b> Espectro FT-IR del copolímero en bloque anfifílico de (ACol-co-BA)-b-PEG-b-(ACol-co-BA) .....	44
<b>Figura 18.</b> Espectro RMN <sup>1</sup> H del copolímero en bloque anfifílico de (ACol-co-BA)-b-PEG-b-(ACol-co-BA) .....	46
<b>Figura 19.</b> Termograma DSC del PEG y los copolímeros en bloque anfifílicos de (ACol-co-BA)-b-PEG-b-(ACol-co-BA) y BA-b-PEG-b-BA. ....	48
<b>Figura 20.</b> Estabilidad estérica en sistemas micelares .....	51
<b>Figura 21.</b> Microscopia electrónica de transmisión de las micelas de (ACol-co-BA)-b-PEG-b-(ACol-co-BA) .....	52

<b>Figura 22.</b> Contenido de anfB encapsulada en función de los copolímeros de (ACol-co-BA)-b-PEG-b-(ACol-co-BA) .....	54
<b>Figura 23.</b> Perfiles de liberación de anfB encapsulada en las micelas poliméricas de (ACol-co-BA)-b-PEG-b-(ACol-co-BA) .....	56
<b>Figura 24.</b> Espectro de absorción UV/VIS de la anfB en dimetil sulfóxido (DMSO) .....	59
<b>Figura 25.</b> Espectro de absorción UV/VIS de la anfB en las micelas de (ACol-co-BA)-b-PEG-b-(ACol-co-BA) .....	59
<b>Figura 26.</b> Actividad hemolítica en función de la concentración de anfB encapsulada en micelas de (ACol-co-BA)-b-PEG-b-(ACol-co-BA) .....	61

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Factores fisicoquímicos que intervienen en la encapsulación de principios activos .....	24
<b>Tabla 2.</b> Factores fisicoquímicos que intervienen en la liberación de principios activos .....	25
<b>Tabla 3.</b> Relaciones molares de los copolímeros de (ACol-co-BA)-b-PEG-b-(ACol-co-BA) sintetizados (la denotación identificará el copolímero durante el presente documento). .....	30
<b>Tabla 4.</b> Características de la síntesis de los copolímeros en bloque anfífilos de de (ACol-co-BA)-b-PEG-b-(ACol-co-BA) .....	44
<b>Tabla 5.</b> Diámetro hidrodinámico promedio de las partículas micelares de (ACol-co-BA)-b-PEG-b-(ACol-co-BA) .....	49
<b>Tabla 6.</b> Potencial Z de los copolímeros en bloque anfífilos de (ACol-co-BA)-b-PEG-b-(ACol-co-BA) .....	50
<b>Tabla 7.</b> Concentración de anfB encapsulada y contenido del fármaco en las micelas de (ACol-co-BA)-b-PEG-b-(ACol-co-BA) .....	53
<b>Tabla 8.</b> Características de las preparaciones de anfB aprobadas por la FDA en comparación con los copolímeros de (ACol-co-BA)-b-PEG-b-(ACol-co-BA).....	55
<b>Tabla 9.</b> Concentración de anfB liberada y porcentaje de liberación de las micelas de (ACol-co-BA)-b-PEG-b-(ACol-co-BA) .....	56
<b>Tabla 10.</b> Relación de la intensidad de las bandas I y IV (I/IV) del espectro UV/VIS para la determinación del estado de agregación de anfB .....	60

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Curva de calibración de anfotericina B .....	65
<b>Anexo 2.</b> Espectros FT-IR de los copolímeros en bloque anfifílicos de (ACol-co-BA)- b-PEG-b-(ACol-co-BA) .....	65
<b>Anexo 3.</b> Espectros RMN <sup>1</sup> H de los copolímeros en bloque anfifílicos de (ACol-co- BA)-b-PEG-b-(ACol-co-BA) .....	66

## ABREVIATURAS

<b>Símbolo</b>	<b>Descripción</b>
ATRP	Polimerización radicalaria por transferencia de átomo
ARGET	Activadores regenerados por transferencia electrónica
anfB	Anfotericina B
PEG	Polietilenglicol
ACol	Acrilato de colesterilo
BA	Acrilato de butilo
FT-IR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear protónica
GPC	Cromatografía de permeación en gel
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DLS	Dispersión dinámica de luz
TEM	Microscopia electrónica de transmisión
DMSO	Dimetil sulfoxido
DMF	Dimetil formamida
TEA	Trietilamina
DCM	Diclorometano
<i>b</i>	Denotación de copolímero en bloque
<i>co</i>	Denotación de copolímero al azar
FDA	Food and Drug Administration
PBS	Buffer fosfato salina

## 1. RESUMEN

En el presente trabajo se estudió la síntesis de copolímeros en bloque anfifílicos basados en acrilato de colesterilo, acrilato de butilo y polietilenglicol mediante la técnica ARGET-ATRP, la polimerización fue confirmada empleando FT-IR, RMN<sup>1</sup>H, GPC y DSC. Adicionalmente, se estableció el efecto de la estructura de los copolímeros en el autoensamblaje en medio acuoso para la formación de micelas y sus propiedades coloidales mediante análisis de DLS, TEM y potencial Z. Finalmente, se estudió la capacidad de las micelas poliméricas bioconjugadas con colesterol, para encapsular y liberar anfotericina B (anfB) empleando espectroscopia UV/VIS.

De acuerdo a los resultados obtenidos, propiedades como el diámetro hidrodinámico y morfología de las micelas no se ven afectados por la composición de los copolímeros. Así mismo, al estudiar la encapsulación y liberación de anfB, se encontró que estas propiedades dependen en gran medida del carácter hidrofóbico del copolímero. Alcanzando mayor encapsulación del fármaco a medida que aumenta el contenido de colesterol, mientras que en los estudios de liberación se evidencio que a menor contenido de colesterol la liberación del fármaco es mayor.

## 2. INTRODUCCIÓN

La anfotericina B es un agente crucial en el tratamiento de afecciones fúngicas, su uso clínico fue aprobado por la FDA en 1959. (Diezi & Kwon, 2012). Su mecanismo de acción se basa en la unión de la molécula al ergosterol de la membrana celular fúngica creando un canal que permite la salida del contenido citoplasmático, lo que lleva a la muerte celular del hongo (Laniado & Cabrales, 2009). La administración de anfB está limitada por su toxicidad y baja solubilidad en la mayoría de disolventes incluyendo el agua; convencionalmente, se formula como una dispersión coloidal empleando desoxicolato, como un agente tensoactivo, sin embargo, su carácter tóxico no disminuye (Cleary & Wasan, 2011), por esta razón se hace necesario el desarrollo de micelas poliméricas que permitan mayores porcentajes de encapsulación y liberación controlada del fármaco.

Los materiales poliméricos funcionales son componentes principales de una gran variedad de aplicaciones biológicas y biomédicas, incluyendo la liberación controlada de fármacos (Siegwart et al, 2012). Un objetivo de la ciencia de polímeros ha sido sintetizar materiales bajo condiciones controladas, para ello, grupos de investigadores se han interesado en el proceso de polimerización radicalaria por transferencia de átomo (ATRP), desarrollado en la universidad Carnegie Mellon por el profesor Krzysztof Matyjaszewski en 1994 (Krzysztof Matyjaszewski, 1994). Esta técnica de polimerización permite la síntesis de copolímeros en bloque anfífilos, que son macromoléculas constituidas por bloques hidrófobos e hidrófilos unidos covalentemente (Pasquali et al., 2005), estos materiales tienen la capacidad de autoensamblarse en ambientes acuosos formando estructuras micelares que pueden encapsular fármacos insolubles en agua (Lavasanifar et al., 2002). Por sus aplicaciones prácticas, las micelas poliméricas sugieren varias ventajas como lo son: estabilidad coloidal, control sobre la solubilidad del fármaco y su velocidad de liberación, además, de que su fabricación puede ser a través de materiales biodegradables y biocompatibles (Pittella et al., 2014).

Debido a sus características adecuadas para aplicaciones biomédicas, gran parte de los copolímeros en bloque anfífilos contienen polietilenglicol (PEG) como bloque hidrófilo, puesto que no solo aumenta la solubilidad y biocompatibilidad en el cuerpo, sino también ayuda a proteger el fármaco del reconocimiento por el sistema reticuloendotelial (SRE) (Laskarb et al., 2015). Por su parte, el uso de acrilato de colesterilo (ACol) y acrilato de butilo (BA) en las cadenas del copolímero como bloque hidrófobo, proporciona una mayor solubilidad para compuestos insolubles en agua (Viján, 2015). En contraste, las micelas poliméricas basadas en polietilenglicol (PEG), acrilato de colesterilo (ACol) y acrilato de butilo (BA), tienen una aplicación promisorio en la encapsulación y liberación controlada de principios activos insolubles en agua como la Anfotericina B.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Sintetizar copolímeros en bloque anfifílicos (ACol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(ACol-co-BA) empleando polimerización radicalaria por transferencia de átomo y evaluar su aplicación en la encapsulación y liberación de anfotericina B.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Establecer las condiciones de síntesis de los copolímeros en bloque anfifílicos (ACol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(ACol-co-BA) empleando ARGET-ATRP.
- II. Establecer relaciones entre la composición de los copolímeros en bloque anfifílicos y sus propiedades micelares.
- III. Determinar relaciones entre la cantidad de colesterol presente en los copolímeros y su capacidad de encapsular y liberar Anfotericina B.

## 4. MARCO TEORICO

### 4.1 Estado del arte

A través de ATRP, se han sintetizado copolímeros en bloque anfífilicos, que cuentan con propiedades ideales para el transporte y liberación controlada de medicamentos. Laskar y colaboradores reportan la síntesis y caracterización de copolímeros al azar de poli(metacrilato de dodecil-co-metacrilato de polietilenglicol metil éter) (poli[DMA-co-mPEG]), produciendo un material con habilidades para solubilizar camptotecina, un medicamento contra el cáncer insoluble en agua (Laskar et al., 2015). Luengo y colaboradores sintetizaron copolímeros dibloque de monometoxi polietilenglicol funcionalizado con ácido colánico (PEG<sub>5kDa</sub>-Colina) estudiando su autoensamblaje en la formación de micelas que podrían actuar como nanocontenedores de Anfotericina B (Luengo-Alonso et al., 2015). Jeong, Han Bae y Wan Kim, reportaron la síntesis de copolímeros tribloque de PEG-PLGA-PEG y estudiaron su aplicación en la formación de micelas empleando DLS (Jeong et al., 1999). Gaucher y colaboradores reportan la obtención de micelas de copolímeros en bloque basados en polietilenglicol (PEG), para la encapsulación y liberación de paclitaxe (Gaucher et al., 2005).

El acrilato de colesterilo se ha combinado con polietilenglicol (PEG), para formar estructuras micelares que pueden solubilizar Camptotecina, un fármaco hidrófobo que puede penetrar fácilmente células cancerosas (Laskar et al., 2014). Vijan y Topala, estudiaron la interacción de anfB con oleato de colesterilo y linoleato de colesterilo, los experimentos se llevaron a cabo por espectrofotometría UV/VIS a una longitud de onda de 408 nm (Vijan & Topala, 2009). Lee y colaboradores obtuvieron copolímeros en bloque biodegradables que contienen colesterol y evaluaron su comportamiento en la encapsulación y liberación de paclitaxel (PTX), un fármaco anticancerígeno muy hidrófobo, demostrando que el PTX encapsulado en micelas era capaz de matar células cancerosas más eficazmente que el PTX libre (Lee et al., 2012). En la investigación realizada por Jia, Albouy y Cicco, se

estudió el autoensamblaje de copolímeros en bloque que contienen colesterol y polietilenglicol (PEG) con diferentes longitudes de cada segmento, se concluyó que el copolímero PEG-*b*-Pachol forma agregados con diferentes morfologías en THF/agua y Dioxano/agua (Jia et al., 2011).

Copolímeros dibloque de PnBA-PAA se han sintetizado por Colombani y colaboradores utilizando ATRP, en este método se empleó PnBA-Br como macroiniciador funcional de la polimerización, originando copolímeros que se disuelven fácilmente en agua (Colombani et al., 2007). Davis y Matyjaszewski reportan la obtención de copolímeros dibloque y tribloque basados en t-Butil acrilato, produciendo materiales con diferentes pesos moleculares que fueron caracterizados por RMN<sup>1</sup>H y FT-IR (Davis & Matyjaszewski, 2000). Las micelas basadas en copolímeros dibloque de poli[N-(2-hidroxipropil) metacrilamida] (poli(HPMA)) y poli(n-Butil acrilato) (poli(BA)), han sido sintetizadas por Konak y Ganchev, las soluciones micelares se prepararon por diálisis en una mezcla de DMF/H<sub>2</sub>O y sus propiedades fueron estudiadas por DLS (Konak et al., 2002). Ma y Wooley, reportan la síntesis de copolímeros anfífilicos de t-Butil acrilato, metil acrilato y estireno vía ATRP para la formación de materiales complejos nanoestructurados, los resultados indicaron que las polimerizaciones se produjeron sin problema a una temperatura de 50°C, en tolueno y usando como sistema catalítico CuBr/PMDTA (Ma & Wooley, 2000).

El estudio de sistemas micelares con capacidad de autoensamblarse en sistemas acuosos para encapsular fármacos insolubles, ha sido ampliamente investigado. Díaz y Pérez reportan el uso de copolímeros tribloque de PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA para encapsular anfB, de acuerdo a los resultados, el aumento del segmento hidrofóbico favorece la encapsulación de anfB (Diaz & Perez, 2015). Diezi y colaboradores reportan el uso de micelas basadas en PEG-DSPE co-cargado con colesterol para encapsular anfB, se demostró reducción de la toxicidad y un aumento en la solubilidad del fármaco (Diezi & Kwon, 2012). En la investigación

realizada por Vijan se comparó la interacción de la anfB con colesterol trifluorometil fenil carbamato / estigmasterol trifluorometil fenil carbamato (Ch-CF<sub>3</sub>/Stg-CF<sub>3</sub>) utilizando espectroscopia de absorción como técnica de medición (Vijan, 2015). Lavasanifar y Samuel investigaron la obtención de micelas de PEO-*b*-PHSA y su aplicación en la encapsulación y liberación de anfB, encontrando que el copolímero puede ser alterado con ácido esteárico para mejorar la encapsulación del fármaco y aumentar su eficacia (Lavasaniyar & Samuel, 2002).

De acuerdo a las investigaciones previas encontradas, los copolímeros anfífilicos constituidos por PEG, ACoI y BA, presentan características apropiadas para su potencial uso como nanocontenedores micelares de sustancias hidrofóbicas, dentro de las que se encuentra la Anfotericina B.

#### **4.2 Copolímeros en bloque**

Los copolímeros en bloque son sistemas macromoleculares que se componen por bloques dispuestos en una secuencia lineal (Torchilin, 2005). Estas estructuras normalmente son diseñadas durante su síntesis, este tipo de materiales puede presentarse en dos estados diferentes, uno desordenado, en donde se presenta miscibilidad de los segmentos y uno ordenado, que presenta segregación de los segmentos. En la mayoría de aplicaciones el estado segregado es el más provechoso, puesto que se establecen dominios entre cada bloque (Serrano et al., 2002).

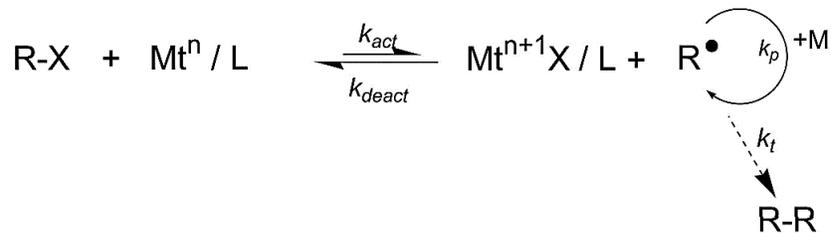
Las propiedades de los copolímeros en bloque son parecidas a las propiedades de mezclas de polímeros, pero la presencia de enlaces químicos entre los bloques asegura su estabilidad y evita su separación con la liberación de los componentes individuales. Las características de un copolímero en bloques pueden variar dependiendo de la modificación que se requiera en su aplicación final, para formar una estructura globular, fibrilar, lamelar, entre otras, y por lo tanto dar la obtención de productos con diferentes aplicaciones (Pasquali, et al, 2005).

Entre los copolímeros en bloques con aplicaciones biomédicas se destacan los anfifílicos, que poseen bloques hidrófobos unidos a bloques hidrofílos. Estos copolímeros tienen propiedades tensoactivas y pueden autoensamblarse dando lugar a micelas, vesículas y estructuras líquido cristalinas, que pueden actuar como nanocontenedores de principios activos (Pasquali, et al. 2005).

### **4.3 Polimerización radicalaria por transferencia de átomo (ATRP)**

ATRP, es un método eficaz para el diseño y preparación de polímeros nanoestructurados y multifuncionales. Este tipo de polimerización permite el control de la estructura, orden y funcionalidad de materiales poliméricos con potencial uso en el campo biomédico (Jeong et al., 1999). Al ser un sistema multicomponente, las reacciones ATRP requieren: un macroiniciador con un átomo o grupo transferible (con frecuencia un halógeno, donde  $X = \text{Cl}$  o  $\text{Br}$ ), un catalizador (metal de transición), un ligando (para formar un complejo con el metal de transición) y uno o más monómeros polimerizables (Matyjaszewski & Xia, 2001).

En este tipo de polimerización se establece un estado de equilibrio entre la propagación de radicales y la formación de las especies latentes o macromoléculas con grupos haluro terminal ( $\text{R-X}$ ). Las especies latentes reaccionan periódicamente con complejos de metal de transición en su menor estado de oxidación ( $k_{act}$ ). El metal de transición se acompleja con un ligando ( $\text{Mt}^n/\text{L}$ ) para modificar la solubilidad y actividad del catalizador. Como resultado, se forma una especie radical en crecimiento ( $\text{R}^{\bullet}$ ) y complejos metálicos en su más alto nivel de oxidación coordinados con el haluro ( $\text{X-Mt}^{n+1}/\text{L}$ ) que actúan como desactivador de la reacción, los desactivadores reaccionan con el radical en una reacción inversa ( $k_{deact}$ ) para formar nuevamente las especies latentes y el activador (Matyjaszewski, 2012). También ocurren reacciones de terminación ( $kt$ ), a través de acoplamiento de radicales y su desproporción (Siegwart et al., 2012). En la Figura 1 se muestra el mecanismo general de reacción en ATRP.

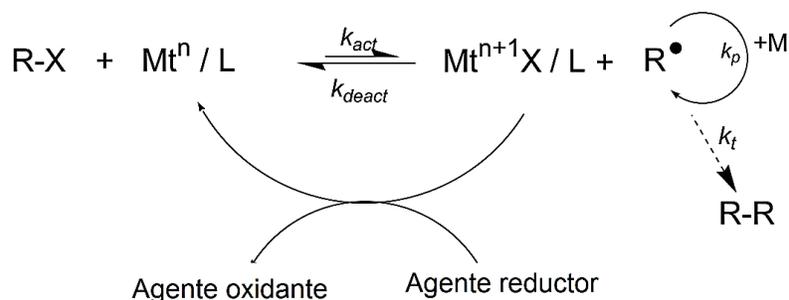


**Figura 1.** Esquema general de polimerización radicalaria por transferencia de átomo (ATRP)

Como ATRP es un proceso catalítico puede ser mediado por diferentes complejos de metales de transición con actividad redox, el cobre (Cu) ha sido ampliamente estudiado, pero otros estudios incluyen hierro, molibdeno, titanio, cobalto y paladio (Wang & Matyjaszewski, 1995).

#### 4.3.1 Polimerización radicalaria por transferencia de átomo y activadores regenerados por transferencia electrónica (ARGET-ATRP)

Este sistema catalítico se basa en la regeneración constante del activador para ATRP con agentes reductores (Jakubowski et al., 2006). Permite que las reacciones se lleven a cabo con menores cantidades de catalizador, lo que sugiere ser un método ambientalmente amigable (Kwak & Matyjaszewski, 2009). El Cu (II) formado en reacciones de terminación es continuamente regenerado a Cu (I) por un exceso de agente reductor como: ácido ascórbico, glucosa, 2 etil hexanoato de estaño (II), entre otros (Dong & Matyjaszewski, 2008). En la Figura 2 se muestra el mecanismo general de reacción en ARGET-ATRP.

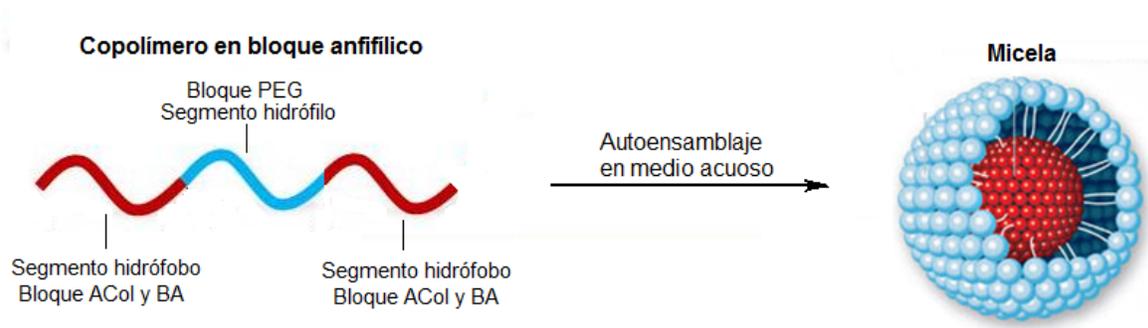


**Figura 2.** Esquema general de Activadores Regenerados por Transferencia Electrónica (ARGET-ATRP)

#### 4.4 Micelización de copolímeros en bloque: autoensamblaje en solución

Los copolímeros en bloque están constituidos por dos o más bloques unidos covalentemente con diferentes propiedades físicas y químicas (Gaucher et al., 2005). Tienen la habilidad de autoensamblarse en medio acuoso formando partículas coloidales denominadas micelas (Pasquali, et al, 2005).

La micelización se produce cuando el copolímero es disuelto en un solvente selectivo para uno de los bloques, bajo estas circunstancias las cadenas del copolímero se organizan en una estructura tipo core-shell y alcanzan tamaños en escala manométrica (Rodríguez et al., 2005). La disposición del bloque soluble hacia el medio disolvente se convierte en la “corona” de la micela formada, mientras que la parte insoluble se protegerá del disolvente en el “núcleo” de la estructura (Katime et al., 2003). De este modo, la capacidad de las micelas de copolímeros en bloque para solubilizar moléculas hidrofóbicas se deriva de su composición estructural (Gaucher et al., 2005). Recientemente, ha despertado un creciente interés utilizando micelas como vehículos en la de administración de fármacos, ya que presentan varias ventajas, tales como, tiempos de circulación prolongados debido a su tamaño y retención adecuada del principio activo atribuida a su estabilidad (Torchilin, 2005). Las propiedades fisicoquímicas de las micelas son controladas a través de parámetros como el grado de polimerización, la composición molar de los bloques hidrófilo/hidrófobo y la estructura química de cada segmento (Luisi, 2001).



**Figura 3.** Autoensamblaje en medio acuoso de un copolímero en bloque anfifílico

El proceso de formación de micelas depende principalmente de la concentración micelar crítica (CMC), en soluciones a baja concentración el copolímero se comporta como unímero, solo hasta que alcanza la CMC se activa la formación de las micelas y se adquiere el equilibrio termodinámico entre las micelas y los unímeros (Leibler et al, 2003). Las técnicas para determinar los valores de CMC comúnmente usadas son fluorescencia con pireno y dispersión de luz (Katime et al., 2003).

#### 4.5 Encapsulación de fármacos

La encapsulación de fármacos consiste en el recubrimiento de un compuesto por un material de naturaleza polimérica. En el cuerpo, estos materiales tienen la habilidad de aumentar el tiempo de vida medio de los fármacos en la sangre. Así se pueden reducir las dosis efectivas de medicamentos ingeridos, al actuar más eficazmente y disminuyendo efectos secundarios (Carrillo et al., 2013). Han sido descritas diversas metodologías para encapsular, destacándose: evaporación de solvente, secado en spray y separación de fases (Picos et al., 2000). El método de evaporación de solvente reside en formar una emulsión a partir de dos fases inmiscibles, una fase acuosa que contiene el polímero destinado a la formación de la matriz y una fase orgánica dispersa que contiene el principio activo (Gómez, 2014). Los factores fisicoquímicos que intervienen en la encapsulación de principios activos están descritos en la tabla 1. (Xing & Mattice, 1997).

<b>Factor</b>	<b>Descripción</b>
Longitud del segmento hidrófobo	Un volumen mayor del núcleo, permite mayor contenido del fármaco encapsulado.
Cristalinidad del segmento hidrófobo	El aumento de la cristalinidad del núcleo, disminuye el contenido del fármaco encapsulado.
Concentración del copolímero	El aumento de la concentración del copolímero eleva el contenido del fármaco.
Afinidad entre el núcleo micelar y el fármaco	Está relacionado con la miscibilidad entre el principio activo y el núcleo, controlando la solubilidad del fármaco

**Tabla 1.** Factores fisicoquímicos que intervienen en la encapsulación de principios activos

#### **4.6 Liberación controlada de fármacos**

Una de las aplicaciones más importantes de los nanocontenedores micelares es la liberación de fármacos. Para estos métodos de tratamiento ante afecciones fúngicas, la vía de administración más provechosa con principios activos encapsulados es la parenteral, que una vez suministrados actúan como nanosistemas de reserva liberando lentamente el fármaco (Saenz et al., 2004). La liberación del fármaco se produce predominantemente por difusión de los poros y por degradación del copolímero, o bien por la combinación de los dos mecanismos (Gómez, 2014). Los factores fisicoquímicos que intervienen en la liberación de principios activos están descritos en la tabla 2 (Rösler et al., 2012).

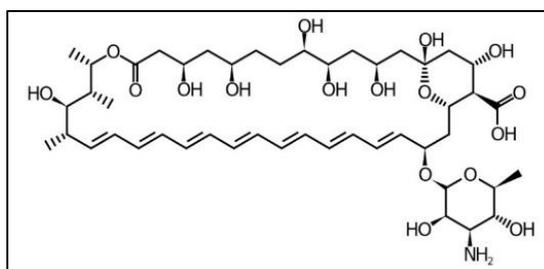
<b>Factor</b>	<b>Descripción</b>
Área superficial/porosidad	Aumenta o disminuye la modulación de la liberación del fármaco.
Contenido del fármaco	Incide en la dosis que se trate de alcanzar y la velocidad de dosificación del medicamento.
Tiempos de degradación	El tiempo de degradación requerido está presidido por la ruta de administración y la frecuencia de las dosis.

Tamaño de partícula	Está directamente relacionado con la velocidad de liberación, por el aumento o disminución del área superficial.
---------------------	--

**Tabla 2.** Factores fisicoquímicos que intervienen en la liberación de principios activos

#### 4.7 Anfotericina B

La anfotericina B es el antifúngico poliénico de elección para el tratamiento de micosis sistémicas, se produce naturalmente por el actinomiceto del suelo *Streptomyces nodosus*, fue aislada originalmente a mediados de 1955 (Cleary & Wasan, 2011). Esta molécula contiene 37 átomos de carbono formando un anillo macrocíclico cerrado por lactonización, tiene una cadena de dobles enlaces conjugados no sustituidos y una cadena polihidroxilada con siete grupos hidroxilo libres, lo que le otorga su carácter anfipático (ver figura 4) (Filippin & Souza, 2006). La anfB es poco soluble en la mayoría de disolventes con excepción de dimetil sulfóxido (DMSO) y dimetil formamida (DMF), es insoluble en agua a pH neutro, pero se podría aumentar su solubilidad mediante la adición de lauril sulfato de sodio o desoxicolato de sodio (Wasan et al., 2009).



**Figura 4.** Estructura química de la anfotericina B

##### 4.7.1 Mecanismo de acción de la anfotericina B

Los antifúngicos poliénos se unen al ergosterol presente en la membrana celular fúngica, induciendo la formación de canales que alteran la permeabilidad de la membrana ocasionando la salida del contenido citoplasmático y por ende la muerte

celular (Laniado & Cabrales, 2009). La gran similitud entre las células mamíferas y fúngicas, resulta un problema a la hora de diseñar la formulación antifúngica, pues esta, debe ser selectiva de la célula patógeno y no de la célula humana sana. En las células de los mamíferos el colesterol es el esteroles que predomina, mientras que en las células fúngicas es el ergosterol, siendo esta cualidad el blanco de acción en los fármacos antifungicos (Valdés, 2005).

## 5. METODOLOGÍA

El trabajo de investigación se abordó desde dos aspectos, uno químico y otro biomédico. Con el estudio químico se sintetizaron copolímeros en bloque anfífilos de (AChol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(AChol-co-BA) y se estudió sus propiedades de micelización, con el estudio biomédico se evaluó la capacidad de los materiales sintetizados para encapsular y liberar Anfotericina B. En la figura 5 se observa el diseño experimental usado en la investigación.



**Figura 5.** Fases del diseño experimental de la investigación

Los disolventes empleados en la síntesis, tales como anisol, cloroformo, tetrahidrofurano, diclorometano, n-Hexano, etanol, entre otros, son grado analítico, de origen comercial y no se sometieron a ningún tratamiento previo.

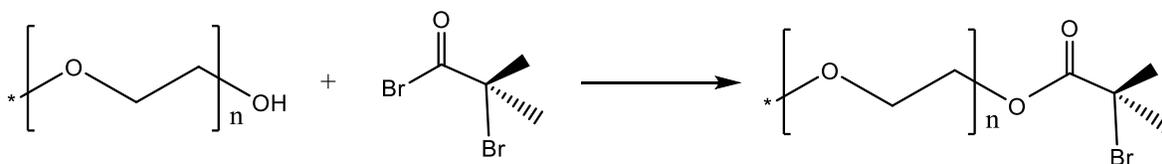
El colesterol utilizado en la preparación de acrilato de colesterilo (ACol), es una mezcla racémica entre  $\alpha$ -colesterol y  $\beta$ -colesterol.

## 5.1 Determinación de las condiciones de síntesis de los materiales poliméricos

En esta fase se sintetizaron copolímeros en bloque anfifílicos de (AChol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(AChol-co-BA) por ARGET-ATRP.

### 5.1.1 Síntesis del macroiniciador Br-PEG-Br

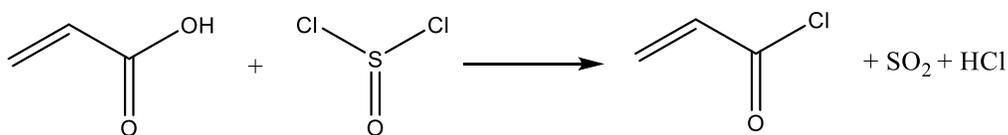
En un balón de fondo plano se disolvió polietilenglicol (PEG) ( $M_n = 1500$  g/mol) (2.5 mmol) en 10 mL de diclorometano, se adicionó trietilamina (TEA) (3.75 mmol), la reacción se dejó enfriar en un baño de hielo manteniendo una temperatura menor a  $5^\circ\text{C}$ , finalmente se adicionó por goteo 2-bromo isobutiril bromuro (BIBB) (6.25 mmol). La mezcla resultante se dejó en agitación durante 24 horas a temperatura ambiente. La solución resultante se purificó redisolviendo en diclorometano y se precipitando en frío con un exceso de n-Hexano, este paso se repitió dos veces más, inmediatamente se filtró y se secó a temperatura ambiente (Gaitzsch et al., 2011). El macroiniciador se analizó por FT-IR Y RMN<sup>1</sup>H para ratificar la inserción del bromo en el PEG.



**Figura 6.** Esquema general de síntesis del macroiniciador Br-PEG-Br

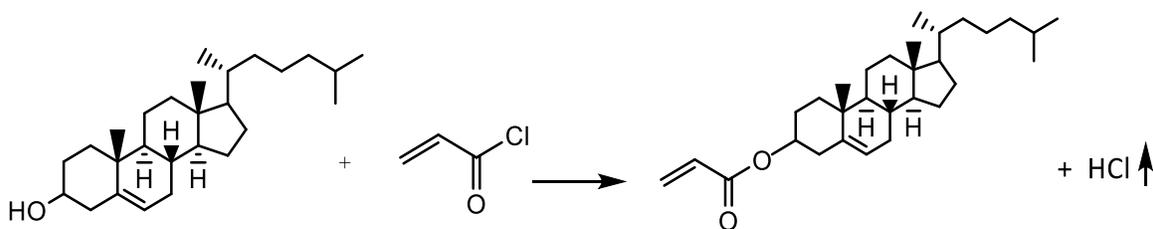
### 5.1.2 Preparación del acrilato de colesterilo

La preparación del acrilato de colesterilo se llevó a cabo en dos etapas: en la primera, se preparó cloruro de aciloilo a partir de ácido acrílico y cloruro de tionilo, en medio de diclorometano, utilizando una relación equivalente 1:1 (Osouli, 2013).



**Figura 7.** Reacción general para la obtención del cloruro de acrililo

En la segunda etapa, se disolvió 10 g (5.18 mmol) de colesterol en 50 mL de cloroformo y 18.0 mL (25.90 mmol) de trietilamina (TEA), la solución resultante se agitó y enfrió en un baño de hielo hasta alcanzar una temperatura menor a 4°C, luego se añadió 10.5 mL de cloruro de acrililo gota a gota, se agito y se dejó en reposo durante 24 horas a temperatura ambiente. Sucesivamente, la mezcla fue lavada con agua desionizada y ácido clorhídrico (9:1), se filtró mediante una cama de NaSO<sub>4</sub> anhidro, la solución se purificó haciéndola pasar por una columna corta de silica gel utilizando cloroformo como eluyente, finalmente se precipitó en frío utilizando 50 mL de etanol, este procedimiento se repitió dos veces. Se obtuvo acrilato de colesterilo de color crema (Laskar et al., 2014). El compuesto resultante se caracterizó por RMN<sup>1</sup>H para confirmar la unión entre el colesterol y el cloruro de acrililo.



**Figura 8.** Reacción general para la obtención de acrilato de colesterilo (ACol)

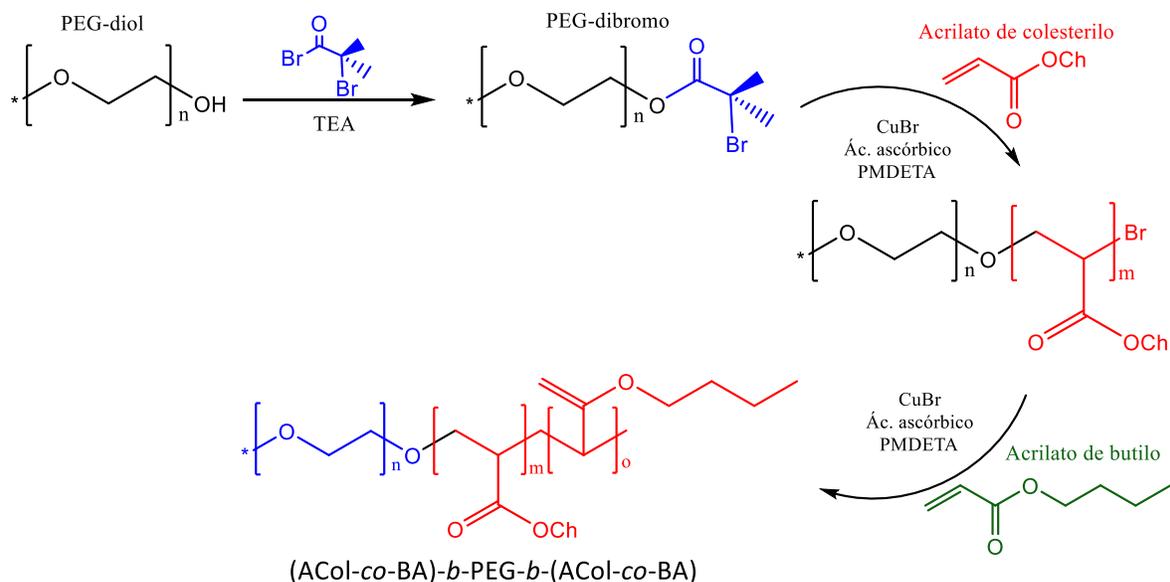
### 5.1.3 síntesis de copolímeros en bloque anfifílicos de (ACol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(ACol-co-BA) empleando ARGET-ATRP

Los copolímeros en bloque anfifílicos de (ACol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(ACol-co-BA) se sintetizaron utilizando diferentes relaciones molares de los reactivos:

Muestra	Denotación	Relación molar						
		Br-PEG-Br	BA	ACol	CuBr <sub>2</sub>	PMDETA	Ácido ascórbico	Col
(PEG:BA)	PB	1	34	-	1	2	10	-
(PEG:BA:ACol)	P1	1	17	0.85	1	2	10	-
(PEG:BA:ACol)	P2	1	34	1.7	1	2	10	-
(PEG:BA:ACol)	P3	1	8.5	0.425	1	2	10	-
(PEG:BA:ACol)	P4	1	17	1.7	1	2	10	-
(PEG:BA:ACol)	P5	1	34	8.5	1	2	10	-
(PEG:BA:ACol)	PC1	1	34	-	1	2	10	2.63
(PEG:BA:ACol)	PC2	1	42	8.5	1	2	10	2.63

**Tabla 3.** Relaciones molares de los copolímeros de (ACol-co-BA)-b-PEG-b-(ACol-co-BA) sintetizados (la denotación identificará el copolímero durante el presente documento).

Inicialmente se purificó el acrilato de butilo haciéndolo pasar por una columna de 10 cm de alúmina básica. Las polimerizaciones se llevaron a cabo disolviendo en un vial de encapsulado Br-PEG-Br (1500 g/mol), acrilato de colesterilo y PMDETA en anisol. Luego de la completa disolución se añadió el ácido ascórbico y el CuBr<sub>2</sub>, se agitó y por último se añadió el acrilato de butilo. Inmediatamente se selló para evitar pérdidas por volatilización del monómero BA, la mezcla se dejó reaccionar durante 24 horas a 100°C (Matyjaszewski, 1994; Kwak & Matyjaszewski, 2009). Las polimerizaciones resultantes se disolvieron en THF y se hicieron pasar por filtros de membrana de vidrio de 0,1 µm para remover el catalizador (Faucher et al., 2006). Finalmente se dejó evaporar el solvente a temperatura ambiente.



**Figura 9.** Esquema general de síntesis de los copolímeros de (ACol-co-BA)-b-PEG-b-(ACol-co-BA)

#### 5.1.4. Caracterización del macroiniciador y los copolímeros en bloque anfífilos

La caracterización de los materiales poliméricos sintetizados se llevó a cabo empleando:

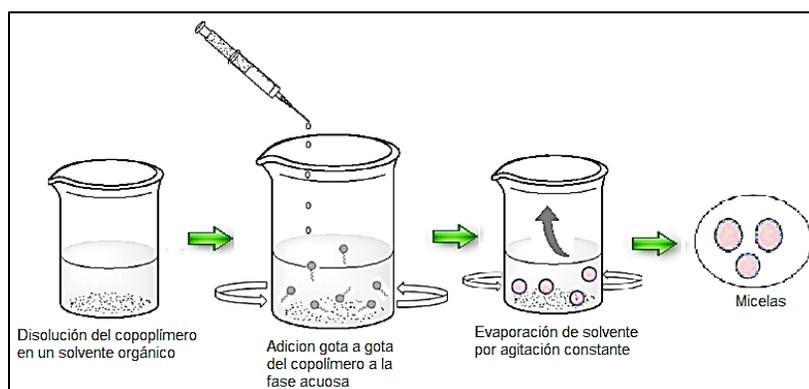
- ❖ **Espectroscopia infrarroja (FT-IR):** los análisis se realizaron en un equipo Shimadzu IR prestige 21 FT-IR, se tomaron aproximadamente 2 mg del copolímero y se disolvieron en la menor cantidad de THF, luego la solución se depositó sobre una ventana de NaCl.
- ❖ **Resonancia magnética nuclear protónica (RMN<sup>1</sup>H):** los copolímeros se analizaron empleando un espectrómetro Bruker Avance III de 300 MHz, disolviendo 20 mg de copolímero en 0.5 µL de CDCl<sub>3</sub>.
- ❖ **Cromatografía de permeación en gel (GPC):** los análisis de GPC se realizaron en un equipo Viscotek TDA GPCMax. Se utilizó THF como eluyente a un flujo de 0.8 mL/min empleando una columna HR 4E. Para obtener la curva de calibración relativa se usaron estándares de poliestireno.

- ❖ **Calorimetría diferencial de barrido (DSC):** los análisis de DSC se registraron en un equipo Mettler Toledo STAR System DSC 1, utilizando 5 mg de copolímero.

## 5.2 Propiedades de micelización: efecto de la estructura de los copolímeros en bloque anfifílicos

### 5.2.1 Preparación de las micelas

Las micelas se prepararon empleando el método de nanoprecipitación (Shen et al., 2011). Se disolvieron 20 mg del copolímero en 2.5 mL de tetrahidrofurano (THF). En un vaso de precipitado se colocó 5 mL de agua (conductividad  $<0.1\mu\text{S}$ ) y se adiciono, gota a gota la solución del copolímero bajo agitación constante (600 rpm), para obtener dispersiones micelares de 4 mg/mL. La mezcla resultante se dejó en agitación durante 48 horas hasta que se removió totalmente el THF.



**Figura 10.** Preparación de micelas por el método de nanoprecipitación

### 5.2.2 Caracterización de los sistemas micelares

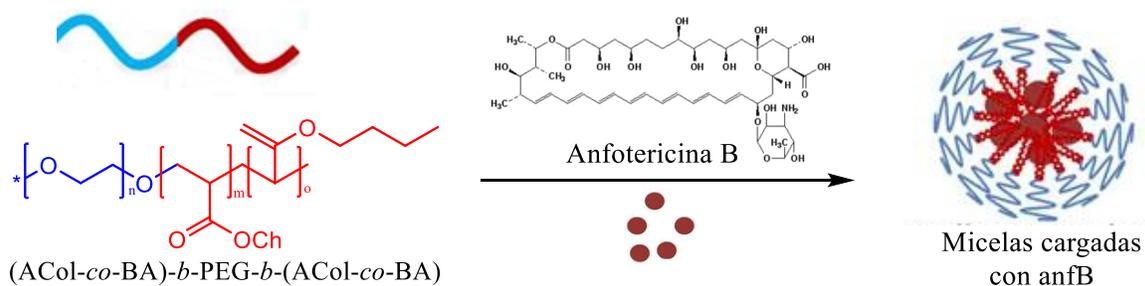
La caracterización de las micelas se realizó empleando:

- ❖ **Dispersión dinámica de luz (DLS):** las medidas de tamaño de partícula se registraron utilizando un equipo Malvern modelo ZetaSizer Nano, a una temperatura de 25°C y diluyendo las dispersiones micelares a 0.8 mg/mL.
- ❖ **Microscopia electrónica de transmisión (TEM):** la morfología de las micelas se observó con un microscopio Jeol 1400 Plus. Las muestras se prepararon dejando caer 2 µL de la solución micelar sobre el grid (rejilla de cobre recubierta con una película de formvar) las cuales se dejaron secar durante 30 horas.
- ❖ **Potencial Z:** Las medidas de potencial Z se registraron utilizando un equipo Malvern modelo ZetaSizer Nano, empleando NaCl 1 mM y diluyendo las dispersiones micelares a 0.003 mg/mL.

### **5.3 Capacidad de los copolímeros de (ACol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(ACol-co-BA) para encapsular y liberar anfB**

#### **5.3.1. Encapsulación de anfB en las micelas**

La encapsulación de anfB en las micelas se realizó empleando el método de evaporación de solvente (Alex & Bodmeier, 1990). Se prepararon dispersiones micelares disolviendo 7.5 mg de copolímero en 5 mL de agua (concentración del copolímero 1630 mg/L). en un recipiente aparte se disolvieron 7.5 mg de anfB en 5 mL de metanol, esta solución se adiciono lentamente por goteo a 5 mL de las dispersiones micelares. La solución resultante se dejó en agitación durante 72 horas. Finalmente, la mezcla obtenida se centrifuga a 13000 rpm durante 10 minutos para precipitar la anfB no encapsulada.

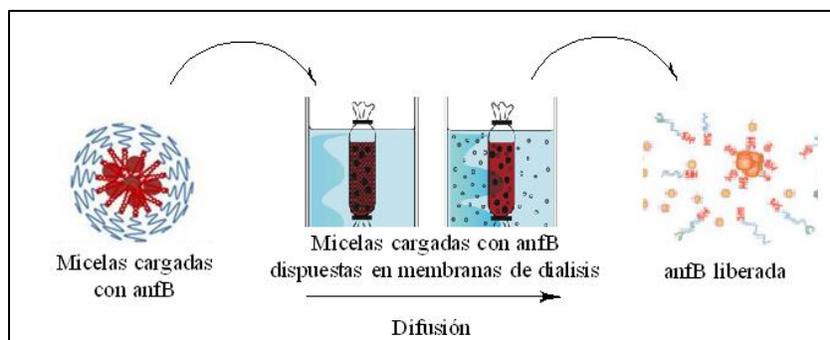


**Figura 11.** Esquema general para la encapsulación de anfB

### 5.3.2 Liberación controlada de anfB

La liberación del fármaco se estudió *in vitro* a través del método de diálisis (Choi & Kim, 2007). Se emplearon membranas de diálisis MWCO de 10 kDa, las cuales fueron activadas por agitación en agua desionizada (conductividad <0.1  $\mu$ S) durante 5 minutos.

En un microtubo con tapa rosca de 1.5 mL se dispuso 1 mL de las soluciones micelares cargadas con anfB, se colocó la membrana de diálisis y se tapó permitiendo el contacto con 25 mL de una mezcla DMSO:H<sub>2</sub>O (1:1). Las muestras se mantuvieron bajo agitación constante (200 rpm) a temperatura ambiente. A diferentes tiempos (1, 2, 3, 4, 24, 48, 72, 144 y 168 horas) se tomó una alícuota para analizar la concentración de anfB liberada por UV/VIS, el volumen de la solución de liberación (DMSO:H<sub>2</sub>O) se mantuvo constante restituyendo con la misma alícuota tomada para la lectura.



**Figura 12.** Esquema general para la liberación de anfB

### 5.3.3 Cuantificación de anfB encapsulada y liberada por espectrofotometría UV/VIS

Las medidas de cuantificación de anfB encapsulada y liberada se realizaron en un espectrofotómetro Evolution 300 UV/VIS.

Inicialmente se realizó una curva de calibración con soluciones de anfB en una mezcla DMSO:H<sub>2</sub>O (1:1) a 3, 7, 10, 15, 25, 50 y 100 mg/L. Se registró el espectro de absorción desde 300 nm hasta 450 nm, obteniéndose la longitud máxima de absorción de anfB a 414 nm.

Para la cuantificación de anfB encapsulada, se determinó el contenido del fármaco empleando la ecuación 1 (Yan et al., 2009): **(1)**

$$\text{Contenido de anfB} = \frac{\text{cantidad de anfB en las micelas}}{\text{cantidad de copolímero usada en la preparación}} \times 100$$

Para la cuantificación de anfB liberada se utilizó la curva de calibración descrita anteriormente, se tomaron alícuotas de la solución de liberación (DMSO:H<sub>2</sub>O) a los diferentes tiempos, la longitud de onda usada fue 414 nm. Los resultados se expresaron en mg/L y en porcentaje.

### 5.3.4 Estado de agregación de anfB

Se preparó una solución de anfB de 100 mg/L en DMSO, del mismo modo se prepararon soluciones de los copolímeros cargados con anfB a 100 mg/L. Posteriormente se registraron los espectros UV/VIS de todas las diluciones desde 300 nm hasta 450 nm utilizando un espectrofotómetro Evolution 300 UV/VIS. Para conocer el estado de agregación se analizó las relaciones de absorbancia del primer y cuarto pico en el espectro (M. L. Adams & Kwon, 2003).

### 5.4 Determinación de la actividad hemolítica de la anfB encapsulada en las micelas

Se recolectó sangre humana en tubos que contenían ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante, se diluyó en tampón fosfato salino (PBS) a pH 6.0 y se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos, para remover el sobrenadante y la capa leucocitaria, este procedimiento se repitió dos veces más. El precipitado (glóbulos rojos) se diluyó en PBS para obtener una muestra con absorbancia entre 0.4 y 0.5 unidades por UV/VIS a 576 nm.

Se prepararon dispersiones micelares cargadas con anfB a 5, 10, 15, 20 y 25 mg/L de todas las muestras, del mismo modo se prepararon controles positivos con anfB libre en agua desionizada y un control negativo sin anfB usando las mismas concentraciones. A 0.5 mL de las soluciones preparadas, se añadió 0.5 mL de la solución de glóbulos rojos. Estas muestras se incubaron durante 30 minutos a 37°C, seguidamente se pusieron en un baño de hielo para suspender la hemólisis. Los glóbulos rojos sin lisar se removieron centrifugando durante 1 minuto a 13000 rpm. Finalmente se analizó la hemoglobina en el sobrenadante por UV/VIS a 576 nm (Lavasani, Samuel, Sattari, et al., 2002). Mediante la ecuación 2 se calculó el porcentaje de hemólisis.

$$\% \text{ Hemólisis} = 100(\text{Abs} - \text{Abs}_0) / (\text{Abs}_{100} - \text{Abs}_0)$$

**Ecuación (2).** Porcentaje de hemólisis. Donde: Abs es absorbancia de la muestra,

Abs0 es absorbancia del control sin anfB y Abs100 es absorbancia del control en presencia de 20 mg/L de anfB libre en agua desionizada

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

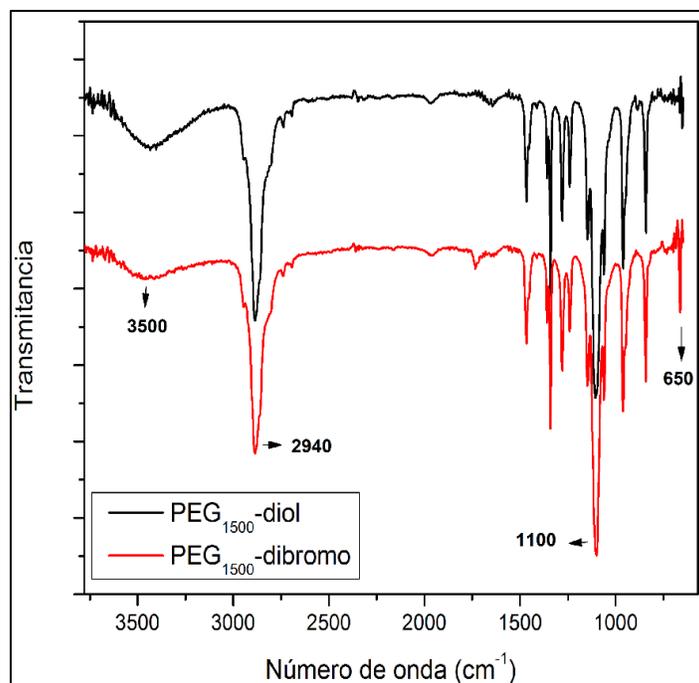
### 6.1 Síntesis de los copolímeros en bloque anfífilicos (ACol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(ACol-co-BA)

En esta etapa se sintetizaron copolímeros anfífilicos de (ACol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(ACol-co-BA) mediante tres fases: en la primera, se sintetizó el macroiniciador PEG-dibromo por la reacción con BIBB; en la segunda fase se sintetizó el monómero acrilato de colesterilo utilizando la reacción de colesterol con cloruro de acrililo; finalmente en la tercera etapa, se sintetizaron los copolímeros anfífilicos vía ARGET-ATRP bajo condiciones controladas.

#### 6.1.1 Síntesis del macroiniciador Br-PEG-Br

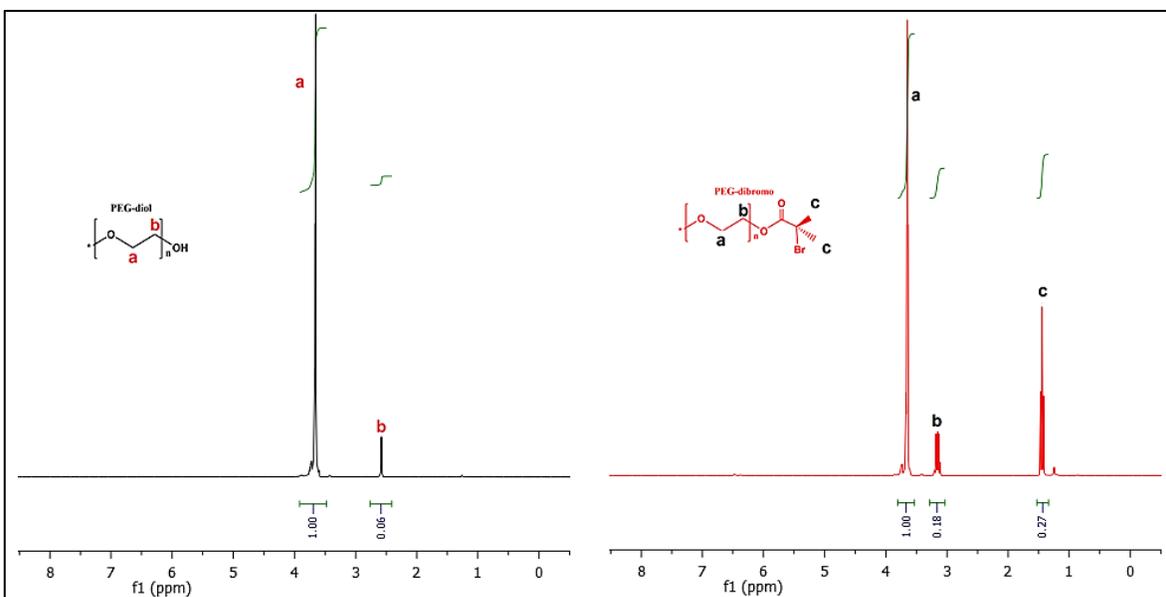
La síntesis del macroiniciador Br-PEG-Br se llevó a cabo utilizando PEG-diol comercial de 1500 g/mol y 2-Bromo isobutiril bromuro (BIBB). El rendimiento de la reacción determinado gravimétricamente fue de 91.4%. Para confirmar la sustitución del grupo hidroxilo se empleó FT-IR y RMN<sup>1</sup>H.

En la figura 13 se muestra el espectro IR del PEG-diol y el PEG-dibromo.



**Figura 13.** Espectro FT-IR del PEG-diol y el macroiniciador PEG-dibromo

En el espectro IR, se observan las señales características de las moléculas. En 3500  $\text{cm}^{-1}$  se encuentra el estiramiento -OH del PEG-diol asociado a puente de hidrogeno, en el espectro del macroiniciador disminuye notoriamente, pero debido al carácter hidrófilo del polientilenglicol no desaparece totalmente. En el rango de 2933 y 2849  $\text{cm}^{-1}$  es apreciable una banda de intensidad aguda correspondiente a los grupos metileno de la molécula. El estiramiento en 1100  $\text{cm}^{-1}$  es atribuido a la unión C-O. En cuanto a los enlaces C-Br fuera del plano, se observa la absorción para el compuesto PEG-dibromo entre 500 y 670  $\text{cm}^{-1}$  (Shameli et al., 2012).

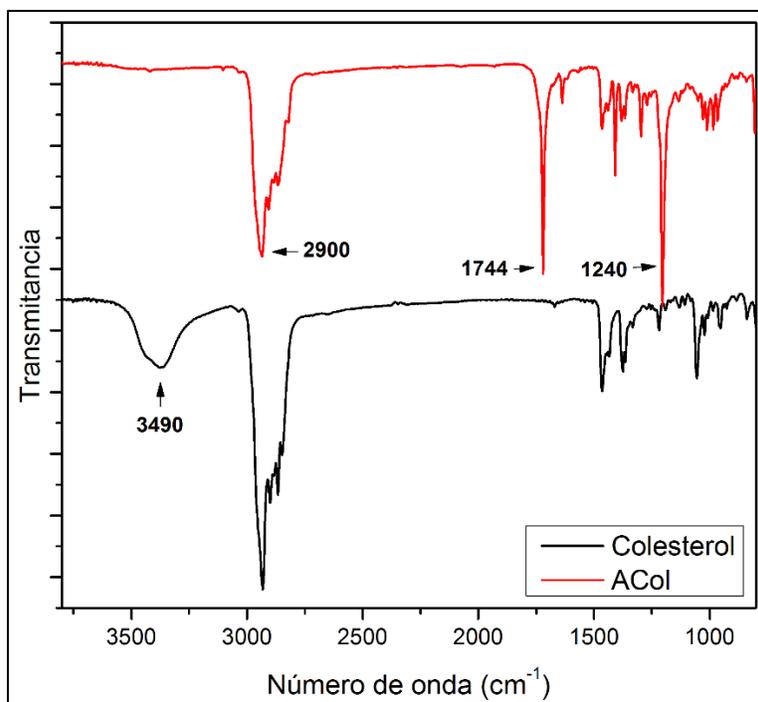


**Figura 14.** Espectro RMN<sup>1</sup>H del PEG-diol y el macroiniciador PEG-dibromo

El espectro RMN<sup>1</sup>H se muestra en la figura 14. En él se evidencian las señales esperadas para el PEG-diol y el macroiniciador PEG-dibromo. En 3.75 ppm se encuentra la señal de los protones del grupo metileno para ambas estructuras. El espectro del macroiniciador, indica el desplazamiento a campo bajo del hidroximetileno del PEG-diol desde 2.61 hasta 3.36 ppm. El singlete a 1.45 ppm en el espectro del PEG-dibromo corresponde a los protones de los dos grupos metileno de la molécula de BIBB, tal como se ha reportado en investigaciones previas (Saha et al., 2012). Mediante la integración de las señales a 1.45 ppm y 3.75 ppm, se logró confirmar que por cada molécula de PEG se enlazaron dos moléculas de BIBB.

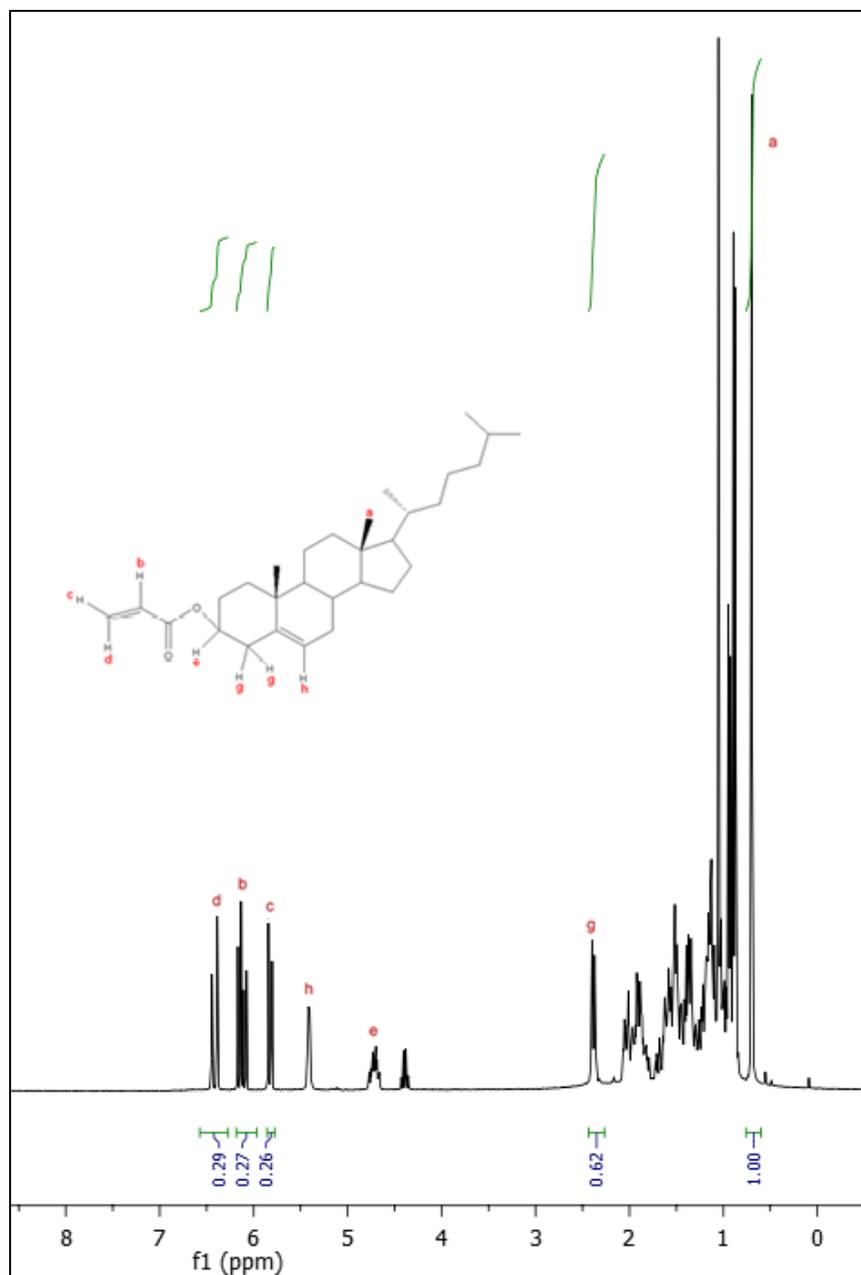
### 6.1.2 Preparación del acrilato de colesterol

De forma general, para la obtención del acrilato de colesterol necesario para síntesis de los copolímeros, se empleó la reacción entre colesterol y cloruro de aciloilo utilizando cloroforno como solvente y trietilamina (TEA) como catalizador. La estructura química del compuesto se determinó mediante análisis de RMN<sup>1</sup>H y FT-IR.



**Figura 15.** Espectro FT-IR del acrilato de colesterilo

En el espectro IR (figura 15), se observan las señales características de las moléculas de colesterol y acrilato de colesterilo. La señal entre 3448 y 3570  $\text{cm}^{-1}$  corresponde al -OH de la estructura del colesterol, esta señal desaparece en la estructura del acrilato de colesterilo confirmando la sustitución por el grupo acrilato, complementariamente, la banda intensa entre 1751 y 1736  $\text{cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento del grupo C=O de esteres alifáticos, por último, la señal en 1240  $\text{cm}^{-1}$  pertenece a el estiramiento para esteres tipo vinilo (Avella, 2006).



**Figura 16.** Espectro RMN<sup>1</sup>H del acrilato de colesterol

El espectro RMN<sup>1</sup>H (figura 16) permite identificar la inserción del grupo acrilato en el colesterol. Dado que el colesterol es una molécula quiral, se hace difícil la asignación precisa de las señales, puesto que la mayoría se presentan superpuestas, sin embargo, esta complejidad es una huella digital que confirma su

presencia, las señales más identificables son: la señal en 0.54 ppm correspondiente al grupo  $-C-CH_3$ , es un singlete integrando para 3 protones; la señal en 2.40 ppm es perteneciente al grupo  $-CH_2=(CH)COO-$ ; en 4.55 ppm se encuentra un multiplete acoplando para 1 protón que refiere a la señal de  $-COO-CH-$ ; en 5.41 ppm se localiza la señal del grupo oleofínico en el colesterol, normalmente un doblete que integra para 1 protón: por último, las señales del grupo acrilato, observándose en 5.82 y 6.41 ppm que conciernen a los protones en posición c y d, obteniendo un acople de tipo geminal, no obstante, la señal en 6.24 ppm corresponde a la posición c, debido a un acoplamiento *cis* con el protón en posición b (Laskar et al., 2014; Sevimli et al., 2012).

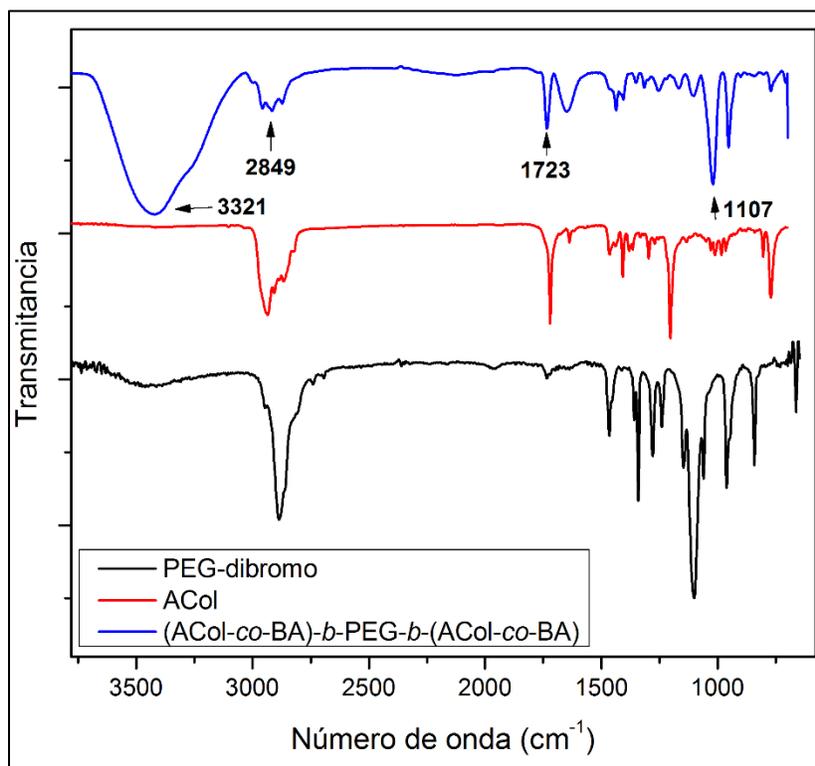
### 6.1.3 Síntesis de copolímeros en bloque anfífilicos de (ACol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(ACol-co-BA) empleando ARGET-ATRP

Los copolímeros en bloque anfífilicos de (ACol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(ACol-co-BA) se sintetizaron vía ARGET-ATRP utilizando PEG-dibromo como macroiniciador,  $CuBr_2/PMDETA$  como sistema catalítico y ácido ascórbico como agente reductor, el esquema general de reacción se aprecia en la figura 9. Se obtuvieron copolímeros en bloque con segmentos hidrófobos al azar, modificando las relaciones molares de los reactivos y manteniendo fijo el tiempo de polimerización (24 h) y la temperatura ( $100^\circ C$ ). Para las composiciones, pesos moleculares ( $M_n = g/mol$ ) y distribución de pesos moleculares ( $M_w/M_n$ ) de los copolímeros se realizaron análisis por  $RMN^1H$  y GPC, los resultados se observan en la tabla 4.

Denotación	Composición del copolímero	$M_n$	$M_w/M_n$
PB	$(PEG)_{34} - (BA)_{34}$	5858.8	1.29
P1	$(PEG)_{34} - (BA)_6 - (ACol)_2$	3150.7	1.16
P2	$(PEG)_{34} - (BA)_8 - (ACol)_3$	3847.9	1.14
P3	$(PEG)_{34} - (BA)_4 - (ACol)_1$	2453.6	1.15
P4	$(PEG)_{34} - (BA)_6 - (ACol)_3$	3591.5	1.13
P5	$(PEG)_{34} - (BA)_8 - (ACol)_6$	5170.1	1.16

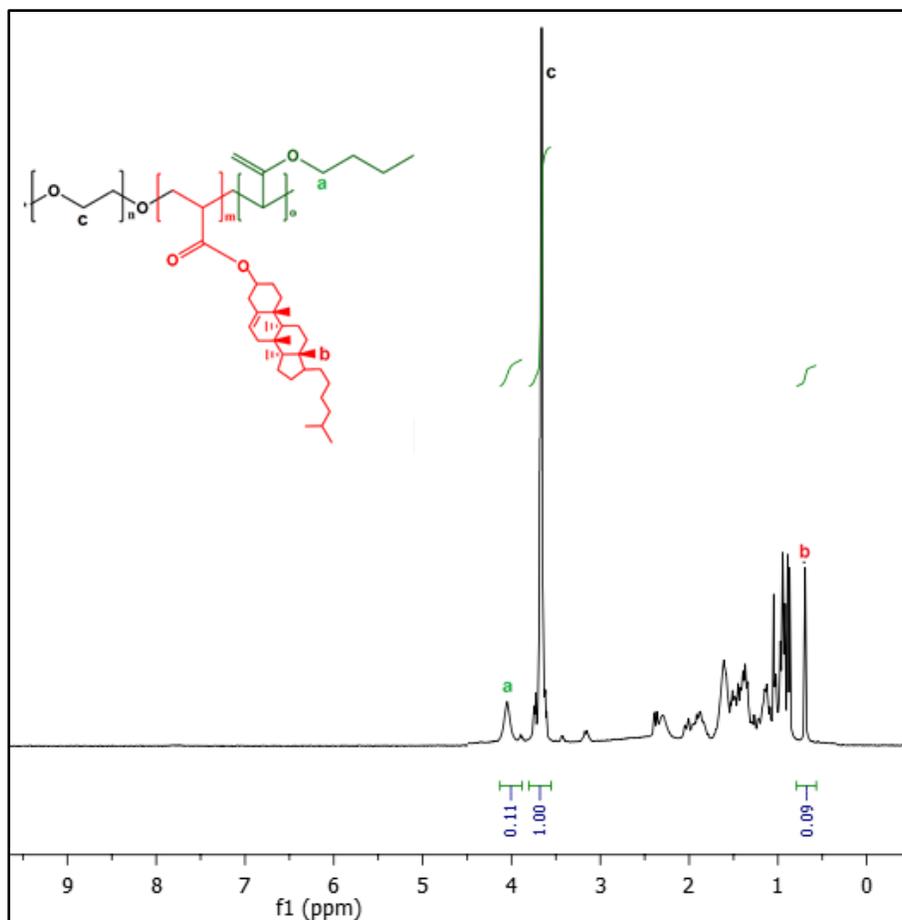
**Tabla 4.** características de la síntesis de los copolímeros en bloque anfifílicos de de (ACol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(ACol-co-BA)

El espectro IR del copolímero se muestra en la figura 17. En él se observan las señales típicas para el compuesto sintetizado. En  $1107\text{ cm}^{-1}$  se encuentra la banda del estiramiento C-O atribuido al polietilenglicol. Entre  $1751$  y  $1736\text{ cm}^{-1}$  aparece una banda intensa que corresponde al estiramiento C=O en esteres alifáticos. En la señal de  $2849\text{ cm}^{-1}$ , se observan varios picos agudos de intensidad variable que corresponden al estiramiento C-H de los grupos metileno, finalmente, la banda simétrica y ancha entre  $3448$  y  $3195\text{ cm}^{-1}$  es característica del estiramiento O-H asociado a un puente de hidrogeno intermolecular debida a la afinidad del PEG con la molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  (Avella, 2006).



**Figura 17.** Espectro FT-IR del copolímero en bloque anfifílico de (ACol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(ACol-co-BA)

La copolimerización se corroboró mediante el análisis de los espectros de RMN<sup>1</sup>H, donde se pueden observar las señales debidas a las secuencias de los monómeros y el macroiniciador. En la Figura 18 se muestra la asignación de cada señal a los átomos de hidrógeno correspondientes. Se conservan los picos debidos a los grupos -CH<sub>2</sub> del PEG en ~ 3.75 ppm. Se observa la señal debida al grupo -CH<sub>3</sub> del acrilato de colesterilo en ~ 0.54 ppm y finalmente la señal del grupo -O-CH<sub>2</sub> del acrilato de butilo en ~ 4.22 ppm, como consecuencia de los centros quirales del colesterol, se pierde certeza de los protones carentes de asignación, tal como se ha reportado previamente (Laskar et al., 2014). Así mismo se observa la desaparición del pico en 1.94 ppm debida al grupo del BIBB y no se observan señales en la zona de protones olefínicos ( $\delta \sim 5.70$  a  $6.50$  ppm), lo que permite deducir la ausencia de monómero residual.



**Figura 18.** Espectro RMN<sup>1</sup>H del copolímero en bloque anfifílico de (ACol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(ACol-co-BA)

A partir de los espectros de RMN<sup>1</sup>H se estableció la composición y pesos moleculares ( $M_n$ ) de los copolímeros a través de la integración de señales. Para ello, se comparó la intensidad de las señales en 3.75 ppm, correspondiente a los protones de uno de los grupos  $-\text{CH}_2-$  del PEG, la señal en 4.22 ppm correspondiente al grupo  $-\text{O}-\text{CH}_2$  del acrilato de butilo y la señal en 0.54 ppm, correspondiente a los protones del grupo  $-\text{CH}_3$  del acrilato de colesterilo.

Los grados de polimerización de etilenglicol, acrilato de butilo y acrilato de colesterilo se calcularon teniendo en cuenta las siguientes ecuaciones: (3 ,4 y 5)

$$NEG = Mn \text{ PEG} / \text{Peso molecular del EG} \quad (3)$$

$$NBA = (I_f \times NEG) / nP \quad (4)$$

$$NACol = I_f \times NEG / nP \quad (5)$$

Donde, *NEG* es el grado de polimerización del etilenglicol (EG), *NBA* es el grado de polimerización del acrilato de butilo (BA) y *NACol* es el grado de polimerización del acrilato de colesterilo, *nP* es el número de protones para los que integra la señal del cada monomero e *I<sub>f</sub>* corresponde a la relación en área de la señal *f* del espectro de RMN<sup>1</sup>H en ~ 0.54 y 4.22 ppm y la señal a 3.75 ppm, previamente descrita.

Conociendo la composición de los copolímeros, se calcularon los pesos moleculares utilizando la siguiente ecuación 6:

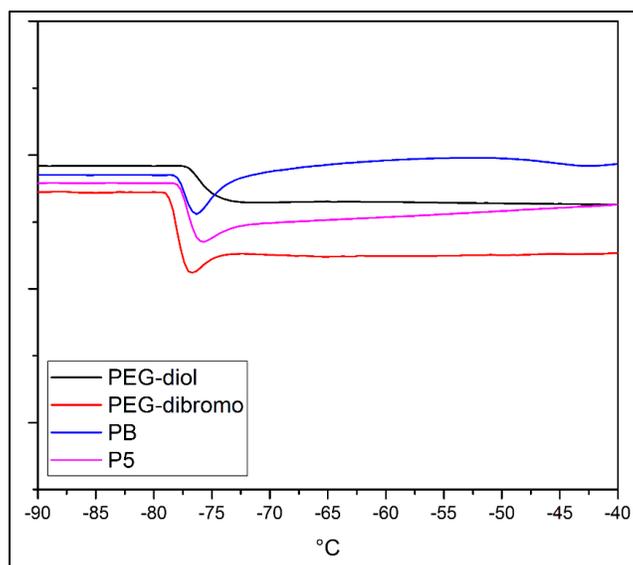
$$Mn \text{ (g/mol)} = (44 \times NEG) + (128.20 \times NBA) + (440.75 \times NACol) \quad (6)$$

Donde, *Mn* corresponde al peso molecular del copolímero, 44, 128.20 y 440.75 g/mol son los pesos moleculares de los monómeros EG, BA y ACol, respectivamente.

Los valores de dispersión del peso molecular obtenidos por GPC estuvieron cercanos a la unidad, esto permite inferir que se mantuvo un control sobre este parámetro durante la polimerización, característica distintiva de las reacciones por ARGET-ATRP (Kwak & Matyjaszewski, 2009). Los resultados se muestran en la tabla 4.

La calorimetría diferencial de barrido (DSC), es una técnica que permite determinar las propiedades termodinámicas de las macromoléculas. Tiene la capacidad de determinar las transiciones térmicas que puede sufrir un material, siendo esta un condición importante que precisa la estructura (Suriñach et al., 2002). Una de las propiedades más significativas que definen a un polímero es la temperatura de transición vítrea (*T<sub>g</sub>*), se define como la temperatura a la cual las propiedades físicas cambian radicalmente debido a los movimientos internos de las cadenas poliméricas

(Spink, 2008). El análisis térmico (figura 19), muestra que el polietilenglicol y los copolímeros anfifílicos que contienen segmentos de polietilenglicol se caracterizan por presentar una temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) a  $-76^\circ\text{C}$ , a esta temperatura, el material polimérico pasa de vítreo a gomoso (blando) (Shameli et al., 2012). Este comportamiento se observa tanto para el macroiniciador como para los copolímeros de (ACol-co-BA)-b-PEG-b-(ACol-co-BA) y BA-b-PEG-b-BA, lo cual indica que las cadenas del copolímero contienen PEG en su estructura.



**Figura 19.** Termograma DSC del PEG y los copolímeros en bloque anfifílicos de (ACol-co-BA)-b-PEG-b-(ACol-co-BA) y BA-b-PEG-b-BA.

## 6.2 Micelización de los copolímeros en bloque anfifílicos

### 6.2.1 Preparación y caracterización de las micelas

Las micelas poliméricas fueron preparadas por el método de nanoprecipitación, debido a la baja solubilidad en agua de los copolímeros. Este método fue seleccionado por su facilidad, rapidez y formación de micelas con tamaños bien definidos (Shen et al., 2011). En detalle, se prepararon micelas con una concentración de copolímero de 1630 mg/L utilizando agua desionizada. Estos

sistemas se caracterizaron empleando dispersión dinámica de luz para conocer el diámetro hidrodinámico promedio de las partículas (esta medida se realizó a las micelas con y sin anfB encapsulada), medidas de potencial zeta para determinar su estabilidad y microscopia electrónica de transmisión para establecer su morfología. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.

Copolímero en bloque anfílico	Diámetro hidrodinámico promedio (nm) sin anfB	PDI	Diámetro hidrodinámico promedio (nm) con anfB	PDI
PB	165	0.107	176	0.330
P1	200	0.139	386	0.521
P2	194	0.059	395	0.433
P3	147	0.099	152	0.232
P4	184	0.073	298	0.333
P5	190	0.131	633	0.535

**Tabla 5.** Diámetro hidrodinámico promedio de las partículas micelares de (ACol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(ACol-co-BA)

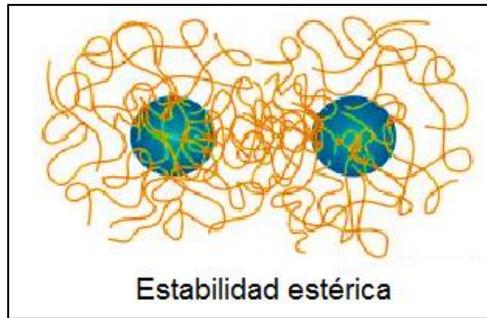
En la tabla 5 se muestran los diámetros hidrodinámicos promedio obtenidos, con los índices de polidispersidad (PDI) inferiores a 1. Las micelas poliméricas sin anfB alcanzaron tamaños entre 147 y 200 nm el diámetro medio de todos los materiales es 180 nm, con una desviación estándar relativa de 11%, esto implica que el tamaño de las micelas para los copolímeros de (ACol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(ACol-co-BA) no es una propiedad dependiente de la composición. El diámetro hidrodinámico promedio de las micelas cargadas con anfB arroja valores superiores a las micelas sin anfB para todos los copolímeros, sin embargo, no están relacionados con el contenido de anfB en las micelas, ni la composición de los materiales. Esto sugiere, que el estado de agregación de la anfB incide en la medición del tamaño de las partículas, algunos autores han estudiado este comportamiento, encontrando que el carácter anfílico de la molécula ocasiona una auto agregación que modifica la actividad y las características de la misma (Torrado et al., 2010).

Las nanopartículas utilizadas en la administración de fármacos generalmente varían en tamaño desde 10 hasta 1000 nm (Soppimath et al., 2001). Las micelas poliméricas se encuentran en tamaños de 10 a 100 nm, sin embargo, partículas mayores a 200 nm han sido reportadas, aunque su uso se ve limitado por que podría activar el sistema reticuloendotelial (SRE) (Jáuregui-haza, 2012; Gómez, 2014). Pinto y colaboradores, han estudiado la variación de tamaños de nanopartículas por diferentes métodos de preparación, encontrando que por el método de nanoprecipitación se obtienen tamaños inferiores a 300 nm (Pinto Reis et al., 2006). Nanopartículas de PEG-PLGA han sido estudiadas por Gref y colaboradores, los resultados muestran una distribución de tamaño unimodal con diámetros hidrodinámicos de 140 nm (Myles et al., 1994).

Se realizaron medidas de potencial Z de las micelas para determinar la estabilidad del sistema coloidal, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6. Estas medidas indican que las micelas obtenidas presentan una carga cercana a cero, lo que implica que la estabilidad del sistema coloidal no se da por electrostática, sino, puede ser debida a un efecto estérico como se muestra en la figura 20. La estabilidad estérica, es un factor dominante en copolímeros anfifílicos usados como surfactantes moleculares. Estos polímeros pueden mejorar la estabilidad y retardar el transporte a través de interfaces (Horne, 1995).

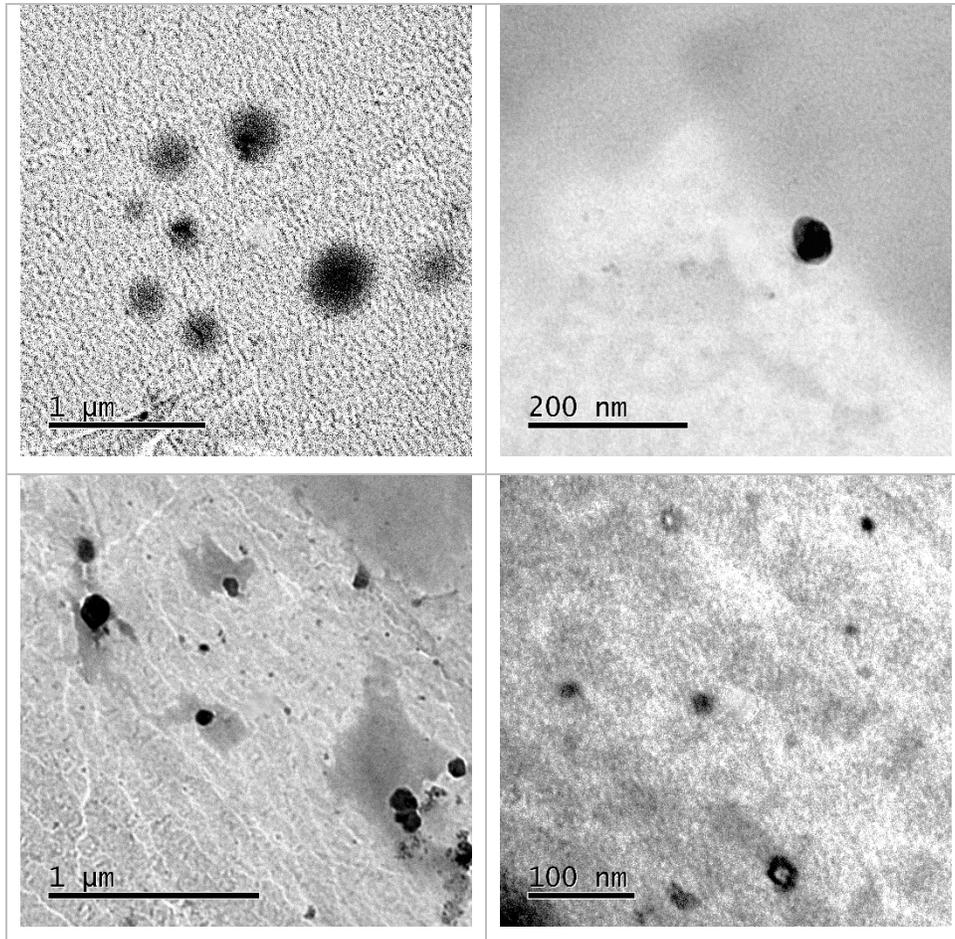
<b>Copolímero en bloque anfifílico</b>	<b>Potencial Z (mV)</b>
PB	-0.54 ± 0.12
P1	-2.01 ± 1.07
P2	-2.67 ± 0.33
P3	-1.34 ± 0.26
P4	-0.52 ± 0.19
P5	-0.30 ± 0.07

**Tabla 6.** Potencial Z de los copolímeros en bloque anfifílicos de (ACol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(ACol-co-BA)



**Figura 20.** Estabilidad estérica en sistemas micelares

Para conocer la morfología de las micelas, se emplearon análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las imágenes TEM permitieron conocer la conformación de las micelas de copolímeros en bloque. La figura 21 presenta la forma esférica convencional y permite la visualización de un núcleo oscuro y una corteza densa, incidente en la formación de micelas tipo core-shell. Los tamaños observados por esta técnica muestran la formación de agregados y de partículas pequeñas.



**Figura 21.** Microscopia electrónica de transmisión de las micelas de (ACol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(ACol-co-BA)

### 6.3 Efecto de la estructura de los copolímeros anfifílicos para encapsular y liberar anfB

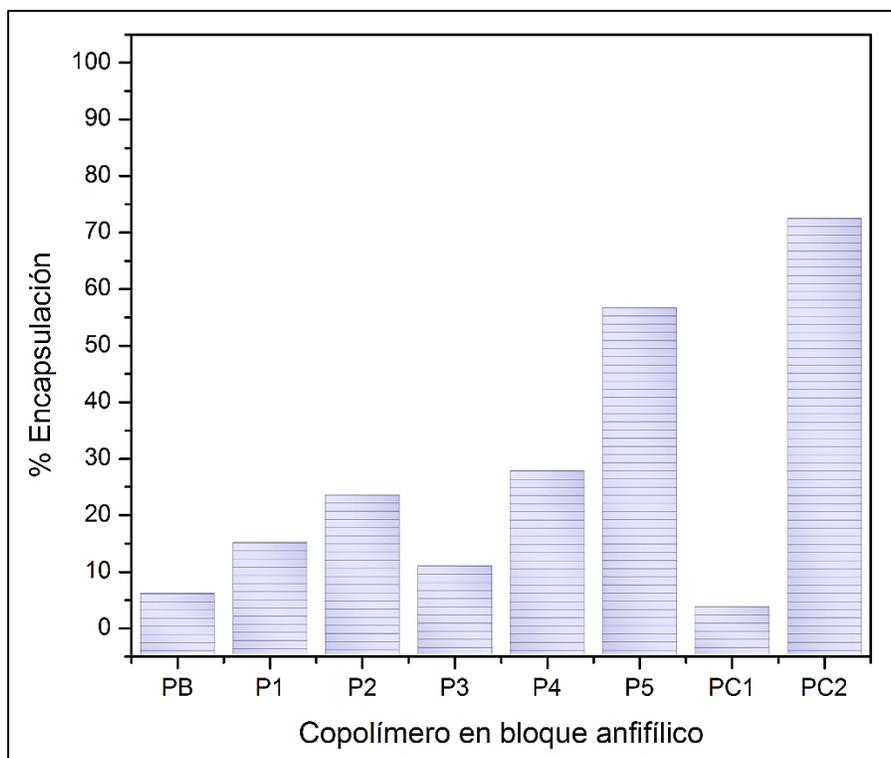
#### 6.3.1 Encapsulación de anfB en las micelas

Las micelas de copolímeros en bloque de (ACol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(ACol-co-BA) se presentan como una elección atractiva para la encapsulación de anfB. Para esto, es necesaria la unión de la molécula de anfB con el núcleo micelar, la ligeramente mayor afinidad de la anfB hacia ergosterol (esterol dominante en células de hongos) que el colesterol (esterol de mamífero) se considera como el factor más esencial en

el mecanismo de acción, pero permite el uso de colesterol en las formulaciones del principio activo (Baginski, 2002). Teniendo en cuenta esto y tomando como base investigaciones previas como la de Luengo-Alonso y colaboradores (Luengo-Alonso et al., 2015), se evidencian ventajas al usar un núcleo hidrófobo constituido por acrilato de colesterilo y acrilato de butilo para encapsular anfB.

<b>Copolímero en bloque anfífilo</b>	<b>Concentración de anfB encapsulada (mg/L)</b>	<b>Contenido del fármaco (mg/100mg)</b>
PB	104	6
P1	288	15
P2	454	24
P3	188	11
P4	379	28
P5	783	57
PC1	65	4
PC2	1103	73

**Tabla 7.** Concentración de anfB encapsulada y contenido del fármaco en las micelas de (ACol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(ACol-co-BA)



**Figura 22.** Contenido de anfB encapsulada en función de los copolímeros de (ACol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(ACol-co-BA) (mg de anfB/100 mg de copolímero)

Los resultados alcanzados para la encapsulación de anfB en las micelas de (ACol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(ACol-co-BA) por el método de evaporación de solvente se muestran en la tabla 7, ratifican que la inserción de segmentos de ACol en el copolímero, incrementan la concentración de anfB encapsulada, conforme aumenta la longitud del segmento hidrófobo. En los copolímeros co-cargados con colesterol puro, se evidencian dos situaciones distintas; en la primera, el copolímero PC1 que corresponde a PB co-cargado muestra una disminución del contenido de anfB encapsulada de 6 mg/100 a 4 mg/100mg, esto se debe a que el colesterol puro adicionado no está unido covalentemente al copolímero, por ende, con la presencia de anfB en la mezcla este presenta más afinidad por ella por lo que no se instala en el núcleo micelar, sino por el contrario fuera de él (Baginski, 2002); en la segunda situación, se evidencia que el copolímero PC2 que corresponde a P5 co-cargado incrementó el contenido de anfB de 57 mg/100mg a 73 mg/100mg, la diferencia

principal con PC1 es la composición, ya que PC2 tiene ACol presente en su estructura, esto conlleva a que el colesterol puro suministrado se instaló en el núcleo micelar permitiendo mayor solubilidad del fármaco (Diezi & Kwon, 2012).

Varios autores han investigado el comportamiento de la anfB encapsulada en diferentes materiales poliméricos. Díaz y Pérez, reportan la encapsulación de anfB en micelas obtenidas por el autoensamblaje de copolímeros tribloque de PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA con diferentes composiciones, el contenido de anfB encapsulada oscilo entre 2.3% y 4.1%, los valores más altos se obtuvieron de las micelas con los segmentos de PCL y PDMAEMA más cortos (Diaz & Perez, 2015). Lavasanifar y colaboradores, estudiaron la encapsulación de anfB en micelas de PEO-*b*-PHSA por el método de evaporación de solvente a diferentes niveles de sustitución de ácido esteárico, obteniendo anfB encapsulada entre 0.24 mg y 0.94 mg (Lavanifar, Samuel, Sattari, et al., 2002). En la tabla 8 se muestra la comparación de copolímero P5 con las cuatro formulaciones aprobadas por la FDA (Food and Drug Administration) (Hamill, 2013). Cabe resaltar, que las características del copolímero P5, muestran similitudes con las preparaciones comerciales en cuanto a estructura, tamaño y contenido de anfB.

Descripción	AnfB desoxicolato	L-amB	ABLC	ABCD	(ACol-co-BA)- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -(ACol-co-BA)
Nombre comercial	Fungizona	AmBisome	Abelcet	Amphocil	No aplica
Estructura	Micelas	Liposomas esféricos unilamelares	Cintas	Discos	Micelas
Tamaño (nm)	0.035	80	1600 - 11000	122	214
Composición	Desoxicolato sódico	HSPC:Colesterol:DSPG 10:5:4	DMPC:DM PG 7:3	Sulfato de colesterol	PEG:BA:ACol 1:34:8,5
Contenido de anfB (mg)	50	50	5	50	57

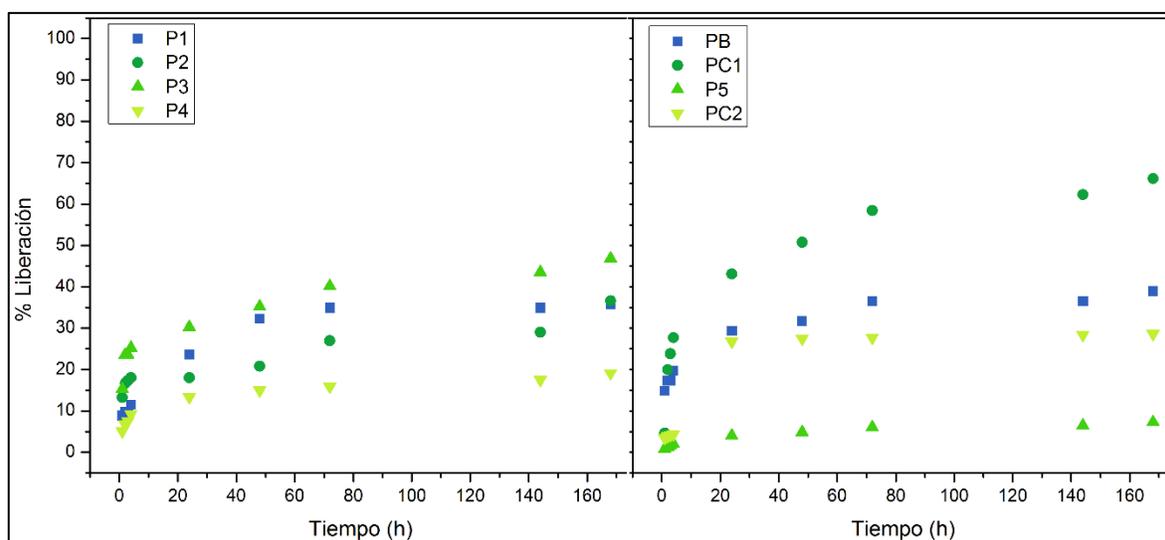
**Tabla 8.** Características de las preparaciones de anfB aprobadas por la FDA en comparación con los copolímeros de (ACol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(ACol-co-BA)

### 6.3.2 Liberación controlada de anfB

La liberación *in vitro* de anfB fue estudiada por el método de diálisis en una solución de DMSO:H<sub>2</sub>O a temperatura ambiente. La concentración de anfB liberada se cuantifico empleando espectroscopia UV/VIS a 414 nm. La figura 23 presenta los porcentajes de liberación de anfB cargada en las micelas en función del tiempo (h).

Copolímero en bloque anfífilico	Concentración de anfB liberada (mg/L) a 168 horas	Porcentaje de Liberación de anfB (%) a 168 horas
PB	41	39
P1	103	36
P2	166	37
P3	88	47
P4	73	19
P5	57	7
PC1	43	66
PC2	316	29

**Tabla 9.** Concentración de anfB liberada y porcentaje de liberación de las micelas de (ACol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(ACol-co-BA)



**Figura 23.** Perfiles de liberación de anfB encapsulada en las micelas poliméricas de (ACol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(ACol-co-BA)

Las gráficas evidencian que estos materiales exhiben una liberación controlada a lo largo de 168 horas (7 días). Para cada muestra los perfiles de liberación presentan dos zonas distintas, una de liberación rápida durante las primeras 4 horas y luego

de liberación lenta a partir de las 24 horas. En los copolímeros P1, P2, P3 y P4 se alcanzaron porcentajes de liberación de 36, 37, 47 y 19% respectivamente, así mismo para los copolímeros PB, PC1, P5 y PC2 se lograron porcentajes de liberación de 39, 66, 7 y 29% respectivamente.

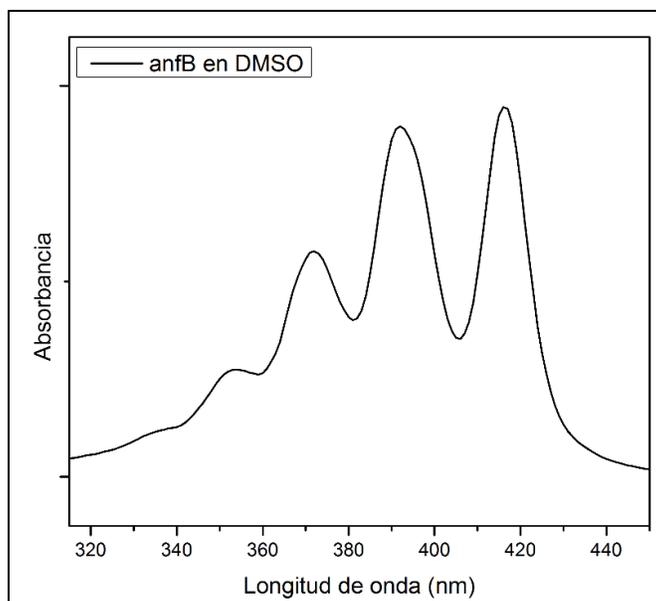
Relacionando los perfiles de liberación con la composición de los copolímeros, se observa que a menor contenido de acrilato de colesterilo (ACol) en el núcleo micelar, mayor es el porcentaje de liberación de anfB. Este comportamiento ha sido estudiado en otras investigaciones, las cuales reportan que las velocidades de liberación más lentas se presentan en nanopartículas con mayores contenidos de fármacos hidrófobos, esto es porque el fármaco produce unión hidrofóbica más fuerte entre el principio activo y el núcleo micelar induciendo bajas velocidades de liberación (Myles et al., 1994). Para el caso de los copolímeros co-cargados con colesterol PC1 y PC2 se observan porcentajes de liberación mayores en comparación con los copolímeros PB y P5, esto se puede atribuir a que la interacción entre el colesterol y la anfB es más fuerte que con el acrilato de colesterilo, que a su vez presenta mayor solubilidad en el medio de liberación (DMSO:H<sub>2</sub>O) que con el núcleo de la micela.

Investigaciones previas en estudios de liberación controlada han sido estudiadas por varios autores. Lavasanifar, Samuel y Kwon experimentaron el efecto de la sustitución de ácidos grasos de micelas de PEO-*b*-PHSA en la liberación *in vitro* de anfB, encontrando que esta, es notablemente influenciada por el grado de sustitución de ácidos grasos, a medida que aumenta la sustitución la liberación es más lenta (Lavanifar et al., 2002). En el estudio realizado por Díaz y colaboradores se diseñaron nanocontenedores micelares a base de PDMAEMA Y PCL, los resultados revelan porcentajes de liberación superiores a 60% después de 150 horas (Díaz et al., 2015). Una clase de copolímeros tribloque anfífilicos que contienen polirotaxano (PR) y polietilenglicol (PEG) fue estudiada por Zhang y colaboradores para la entrega de anfB, estas partículas de tamaño nanométrico mostraron gran potencial para la liberación controlada de anfB, sostienen un 8,7%

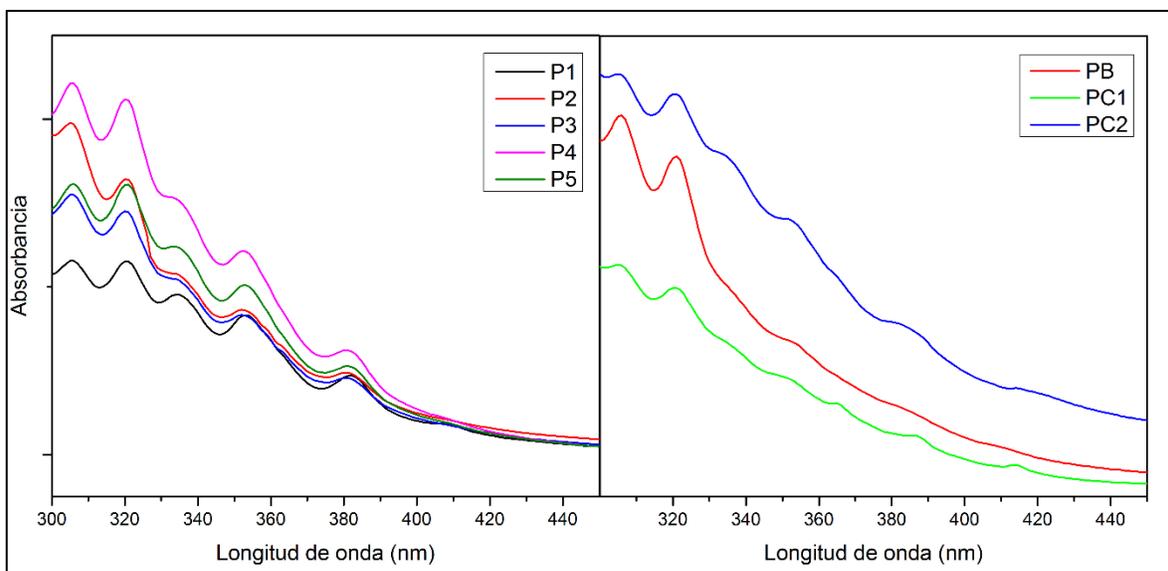
de contenido de anfB y un perfil de liberación controlada superior a 50% (Zhang et al., 2009). En el estudio realizado por Vakil se comparó la liberación de AnfB encapsulada en micelas de PEG-DSPE en buffer HEPES y BSA mostrando una liberación más lenta en el buffer HEPES debido a una mayor formación de agregados, esto dificulta la difusión del fármaco fuera de la membrana de diálisis. Al adicionar colesterol a la estructura de las micelas se logró una liberación aún más lenta (Vakil & Kwon, 2008). Este último estudio se correlaciona con la presente investigación, ya que con el aumento de acrilato de colesterilo en la composición del copolímero, la liberación se hace más lenta posiblemente por la formación de posibles agregaciones que dificultan la salida de anfB al medio de liberación.

### **6.3.3 Estado de agregación de anfB**

En medios líquidos las moléculas de anfB adoptan diferentes disposiciones dependiendo de su concentración (Sánchez-Brunete et al., 2004). En concentraciones inferiores a 0.1 mg/mL se encuentra en forma monomérica, a mayores concentraciones las moléculas de anfB se auto-asocian para formar oligómeros (dímeros) y superior a esta concentración se encuentran los agregados de oligómeros (multiagregados) (Taylor et al., 2010). El estado de agregación se analiza mediante espectrofotometría UV/VIS, y debe ser evaluado en las formulaciones por ser una propiedad relacionada con la actividad y la toxicidad (Adams & Kwon, 2004).



**Figura 24.** Espectro de absorción UV/VIS de la anfB en dimetil sulfóxido (DMSO)



**Figura 25.** Espectro de absorción UV/VIS de la anfB en las micelas de (ACol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(ACol-co-BA)

En el espectro de anfB en DMSO (figura 24), se destacan picos de absorción a 350, 370, 390 y 420 nm (bandas I, II, III y IV), característicos de anfB en forma monomérica. Los espectros de anfB cargada en las micelas de (ACol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(ACol-co-BA) (figura 25) tienen un comportamiento distinto y producen un

desplazamiento batocrómico, los oligómeros y agregaciones de oligómeros se caracterizan por bandas de menor intensidad en 320, 360, 380 y 410 nm; estas auto asociaciones incluyen la mezcla de moléculas de anfB con diferentes tamaños y diferente interacción con el solvente (Torrado et al., 2010).

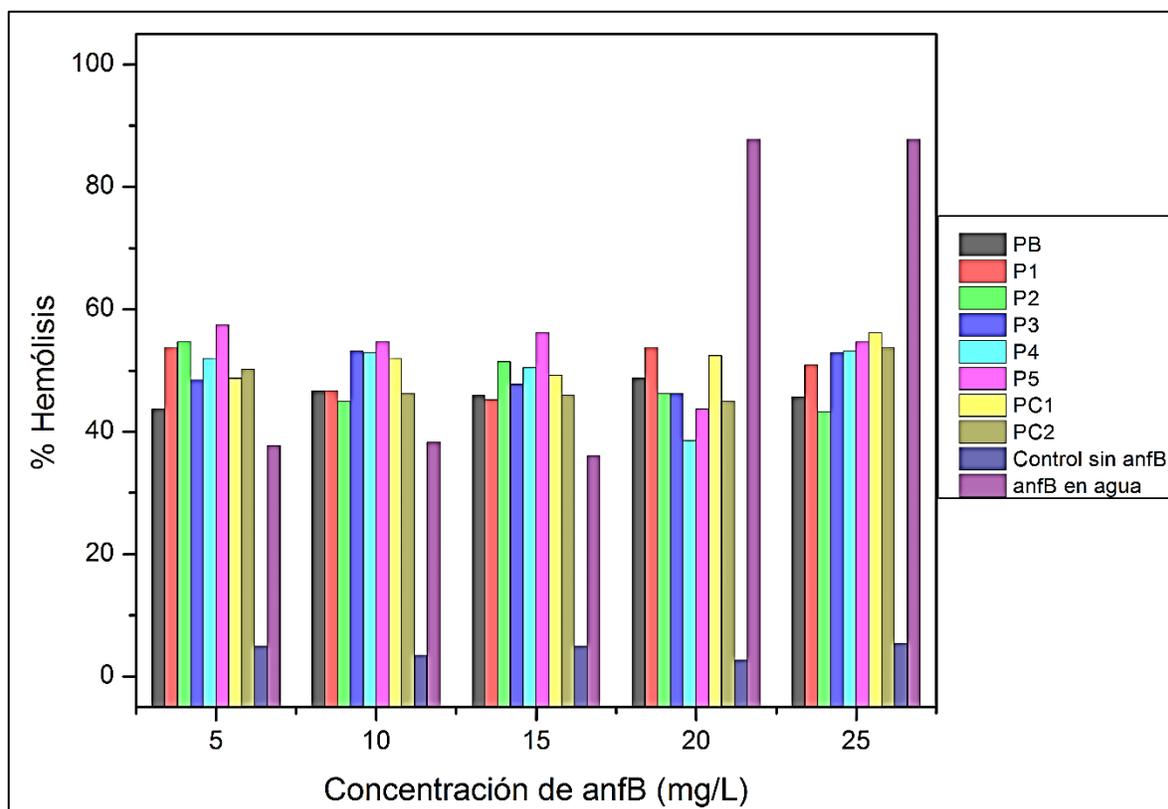
Como las intensidades de las bandas del espectro UV/VIS desde 310 hasta 450 nm varían de acuerdo a las condiciones utilizadas, la proporción de las intensidades de las bandas I y IV pueden ser tomadas como un indicativo del estado de agregación. (Barwicz et al., 1992). Los resultados del estado de agregación (tabla 10) muestran la relación I/IV de la anfB disuelta en DMSO y las micelas del copolímero en bloque anfifílico. Estos resultados permiten evidenciar que todas las muestras de anfB en las micelas se encuentran de forma agregada, pero dependiendo la composición del copolímero y el contenido de anfB encapsulada se encuentran en mayor o menor grado. Investigaciones previas evidencian que los oligómeros producen un espectro UV/VIS con una banda amplia e intensa a 328 – 340 nm como es el caso de el copolímero PB, mientras que los agregados de oligómeros tienen un espectro UV/VIS distinto caracterizado por otras bandas de menor intensidad en 383 – 385 nm y 406 – 420 nm como es el caso de los copolímeros que contienen ACol y mayor contenido de anfB (Torrado et al., 2010).

<b>anfB - Solvente</b>	<b>Relación (I/IV)</b>	<b>Estado de agregación</b>
AnfB en DMSO	0.29	No agregada
PB	6.43	Agregada
P1	6.61	Agregada
P2	6.31	Agregada
P3	7.64	Agregada
P4	8.36	Agregada
P5	8.65	Agregada

**Tabla 10.** Relación de la intensidad de las bandas I y IV (I/IV) del espectro UV/VIS para la determinación del estado de agregación de anfB

#### 6.4 Determinación de la actividad hemolítica de la anfB encapsulada en las micelas

Con el fin de evaluar la toxicidad *in vitro* de la anfB encapsulada en las micelas contra glóbulos rojos humanos, se estudió la hemólisis inducida por la anfB en agua desionizada y encapsulada a distintas concentraciones (5, 10, 15, 20 y 25 mg/L). En la figura 26 se muestran los resultados obtenidos en la prueba hemolítica.



**Figura 26.** Actividad hemolítica en función de la concentración de anfB encapsulada en micelas de (ACol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(ACol-co-BA)

Los resultados indican, que la hemólisis de la anfB en agua desionizada a 5, 10 y 15 mg/L se encuentra por debajo de 38%, mientras que para las concentraciones de 20 y 25 mg/L alcanzo un valor de 88%. Los estudios de hemólisis en las micelas cargadas con anfB no mostraron diferencias significativas, los porcentajes de hemólisis oscilan entre 40 y 50% como se enseña en la figura. Estos resultados no

revelan alteraciones ni por la composición de los materiales, ni por el contenido de anfB en las micelas.

La actividad hemolítica de anfB encapsulada en micelas poliméricas, ha sido estudiada por varios autores. Díaz y colaboradores evaluaron el porcentaje de hemólisis en micelas de PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA cargadas con anfB, los materiales mantienen en un rango bajo hemolítico de 2.7 a 28.4%, indicando que las micelas reducen la hemotoxicidad provocada por anfB (Díaz et al., 2015). Micelas de PEO-*b*-PHSA con anfB en su núcleo mostraron diferentes porcentajes de hemólisis dependiendo de la sustitución de ácido esteárico, los resultados se encuentran entre 70 y 80%, no siendo toxica completamente hasta una concentración de 22 mg/L en los copolímeros con un grado de sustitución mayor (Lavasaniyar, Samuel, Sattari, et al., 2002). Micelas de PEG-Colina no mostraron un efecto hemolítico significativo comparado con la formulación comercial Fungizona (Luengo-Alonso et al., 2015). En este estudio los porcentajes de hemólisis son más altos que los encontrados en la literatura, pero son menores en comparación con el estudio realizado por Lavasaniyar. Sin embargo, en una liberación controlada el estado de agregación de anfB será monomérico, ocasionando una disminución de la hemotoxicidad.

## 7. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados, se sintetizaron efectivamente y bajo condiciones controladas, seis copolímeros en bloque anfifílicos de acrilato de colesterilo, acrilato de butilo y polientilenglicol vía ARGET-ATRP. Se obtuvieron copolímeros del tipo (ACol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(ACol-co-BA) con diferentes composiciones y pesos moleculares, variando parámetros de síntesis como el tiempo de reacción y las relaciones molares de los reactivos. Las composiciones y pesos moleculares de los copolímeros sintetizados se obtuvieron a través de FT-IR, RMN y GPC. Los valores de dispersión del peso molecular estuvieron cercanos a la unidad, alcanzando un control sobre la polimerización, característica distintiva de ATRP.

Se evaluó el desempeño de los copolímeros para la formación de micelas tipo core-shell, por medio del autoensamblaje en medio acuoso, según los análisis DLS realizados a los sistemas micelares, se obtuvieron diámetros hidrodinámicos promedio de 180nm, dichos tamaños no se vieron afectados por la longitud del segmento de acrilato de colesterilo.

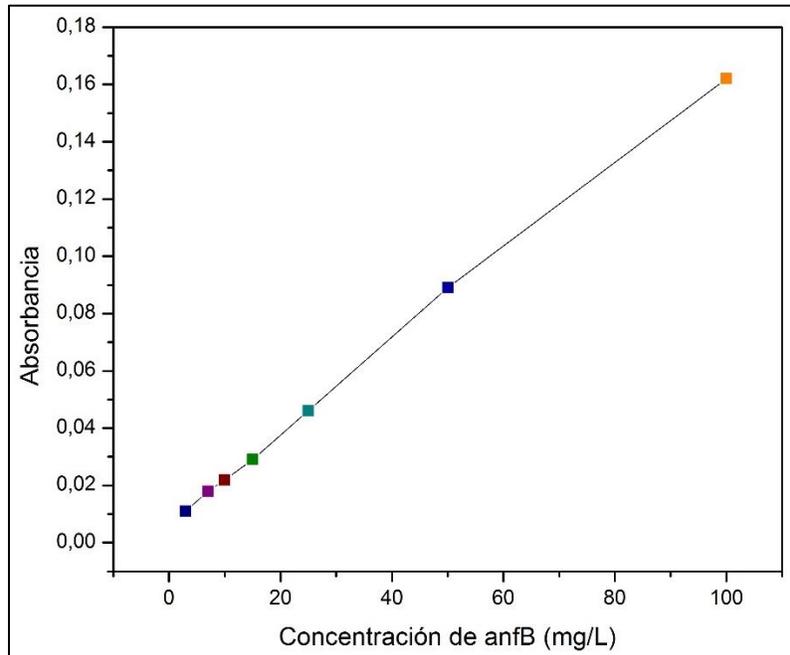
Por otro lado, se evaluó la relación del contenido de colesterol para encapsular y liberar anfotericina B. Los resultados en la incorporación de anfB en el núcleo micelar mostraron dependencia de la composición de los segmentos hidrófobos, logrando un incremento en la solubilización del fármaco, a medida que aumenta el contenido de acrilato de colesterilo en los copolímeros. Los resultados en la liberación de anfB exhiben un comportamiento controlado durante 7 días, de acuerdo a los perfiles de liberación la composición de los copolímeros influye notoriamente, obteniéndose mayores porcentajes de liberación en los materiales con menor longitud del segmento hidrofóbico.

Este estudio demostró la aplicación potencial de las micelas de (ACol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(ACol-co-BA) como una formulación alternativa para la encapsulación y liberación controlada de anfotericina B, comprobando su estabilidad en términos de potencial zeta y su capacidad de liberar el fármaco lentamente a través del tiempo.

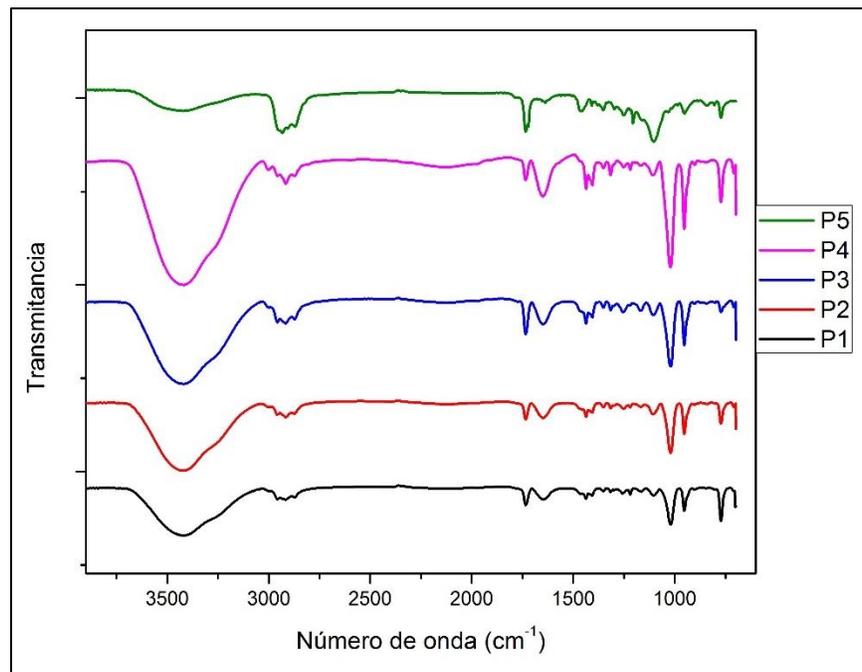
De igual forma se observó una reducción en su toxicidad, disminuyendo la hemólisis inducida por la anfB.

## 8. ANEXOS

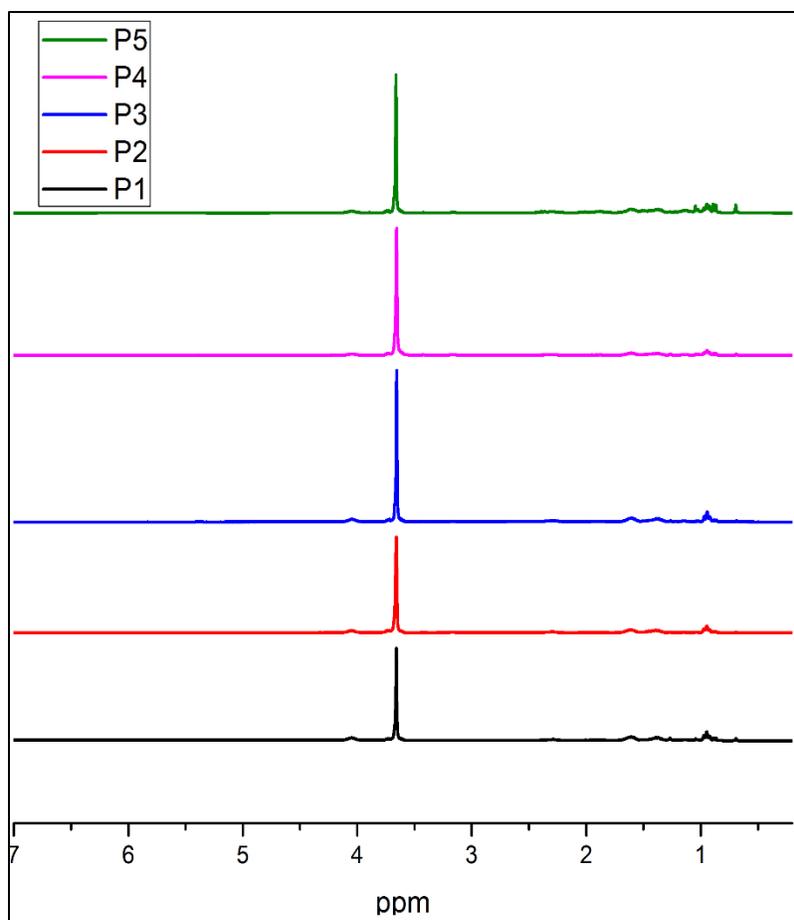
### Anexo 1. Curva de calibración de anfotericina B



### Anexo 2. Espectros FT-IR de los copolímeros en bloque anfífilos de (ACol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(ACol-co-BA)



**Anexo 3.** Espectros RMN<sup>1</sup>H de los copolímeros en bloque anfífilicos de (ACol-co-BA)-*b*-PEG-*b*-(ACol-co-BA)



## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M., & Kwon, G. S. (2004). Spectroscopic investigation of the aggregation state of amphotericin B during loading, freeze-drying, and reconstitution of polymeric micelles. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(4), 1–6.
- Adams, M. L., & Kwon, G. S. (2003). Relative aggregation state and hemolytic activity of amphotericin B encapsulated by poly(ethylene oxide)-block-poly(N-hexyl-L-aspartamide)-acyl conjugate micelles: Effects of acyl chain length. *Journal of Controlled Release*, 87(1-3), 23–32.
- Alex, R., & Bodmeier, R. (1990). Encapsulation of water-soluble drugs by a modified solvent evaporation method. I. Effect of process and formulation variables on drug entrapment. *Journal of Microencapsulation*, 7(3), 347–55.
- Avella, E. (2006). Espectroscopia IR. In *Análisis Orgánico* (pp. 2–4). Universidad Nacional de Colombia.
- Baginski, M. (2002). Comparative molecular dynamics simulations of amphotericin B–cholesterol/ergosterol membrane channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1567, 63–78.
- Barwicz, J., Christian, S., & Gruda, I. (1992). Effects of the aggregation state of amphotericin B on its toxicity to mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36(10), 2310–2315.
- carrillo, N. A., Yáñez, D., Aguirre, P., Amar, Y., Vidal, S., & Egaña, R. (2013). Encapsulación de Biomoléculas Usando Polímeros Naturales: “ Un Nuevo Enfoque en la Entrega de Fármacos en Medicina .” *Avances En Ciencias Veterinarias*, 28(2), 31–40.
- Choi, S. W., & Kim, J. H. (2007). Design of surface-modified poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles for targeted drug delivery to bone. *Journal of Controlled Release*, 122(1), 24–30.
- Cleary, J. D., & Wasan, K. M. (2011). Amphotericin B: A New Look at Cellular Binding, 30–36.
- Colombani, O., Ruppel, M., Schubert, F., Zettl, H., Pergushov, D. V., & Müller, A. H. E. (2007). Synthesis of poly(n-butyl acrylate)-block-poly(acrylic acid) diblock copolymers by ATRP and their micellization in water. *Macromolecules*, 40(12), 4338–4350.
- Davis, K. a, & Matyjaszewski, K. (2000). Atom Transfer Radical Polymerization of tert -Butyl Acrylate and Preparation of Block Copolymers, 4039–4047.

- Diaz, I. L., Parra, C., Linarez, M., & Perez, L. D. (2015). Design of Micelle Nanocontainers Based on PDMAEMA-b-PCL-b-PDMAEMA Triblock Copolymers for the Encapsulation of Amphotericin B. *AAPS PharmSciTech*, 16(5), 1069–1078.
- Diaz, I. L., & Perez, L. D. (2015). Synthesis and micellization properties of triblock copolymers PDMAEMA-b-PCL-b-PDMAEMA and their applications in the fabrication of amphotericin B-loaded nanocontainers. *Colloid and Polymer Science*, 293(3), 913–923.
- Diezi, T. A., & Kwon, G. (2012). Amphotericin B/sterol co-loaded PEG-phospholipid micelles: effects of sterols on aggregation state and hemolytic activity of amphotericin B. *Pharmaceutical Research*, 29(7), 1737–1744.
- Dong, H., & Matyjaszewski, K. (2008). ARGET ATRP of 2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate as an intrinsic reducing agent. *Macromolecules*, 41(19), 6868–6870.
- Faucher, S., Okrutny, P., & Zhu, S. (2006). Facile and effective purification of polymers produced by atom transfer radical polymerization via simple catalyst precipitation and microfiltration. *Macromolecules*, 39(1), 3–5.
- Filippin, F. B., & Souza, L. C. (2006). Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42(2), 167–194.
- Gaitsch, J., Appelhans, D., Gräfe, D., Schwille, P., & Voit, B. (2011). Photocrosslinked and pH sensitive polymersomes for triggering the loading and release of cargo. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 47(12), 3466–8.
- Gaucher, G., Dufresne, M.-H., Sant, V. P., Kang, N., Maysinger, D., & Leroux, J.-C. (2005). Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 109(1-3), 169–188.
- Gómez, C. (2014). NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS: TECNOLOGÍA Y APLICACIONES FARMACÉUTICAS ( Polymeric nanoparticles: technologie and pharmaceutical applications ). *Revista Farmacologica de Chile*, 7(2), 7–16.
- Gregorí Valdés, B. S. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia*, 39(2).
- Hamill, R. J. (2013). Amphotericin B formulations: A comparative review of efficacy and toxicity. *Drugs*, 73(9), 919–934.
- Horne, D. S. (1995). Steric stabilization and casein micelle stability. *Journal of Colloid And Interface Science*, 111(1), 250–260.
- Jakubowski, W., Min, K., & Matyjaszewski, K. (2006). Activators regenerated by

- electron transfer for atom transfer radical polymerization of styrene. *Macromolecules*, 39(1), 39–45.
- Jáuregui-haza, R. O. U. J. (2012). Las nanopartículas como portadores de fármacos: características y perspectivas Nanoparticles as drug carriers: characteristics and perspectives, 43(3).
- Jeong, B., Han Bae, Y., & Wan Kim, S. (1999). Biodegradable thermosensitive micelles of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 16(1-4), 185–193.
- Jia, L., Albouy, P. A., Di Cicco, A., Cao, A., & Li, M. H. (2011). Self-assembly of amphiphilic liquid crystal block copolymers containing a cholesteryl mesogen: Effects of block ratio and solvent. *Polymer*, 52(12), 2565–2575.
- Katime, I., Quintana, J., & Villacampa, M. (2003). Micelas. *Revista Iberoamericana*, 4(2), 123–151.
- Konak, C., Ganchev, B., Teodorescu, M., Matyjaszewski, K., Kopeckova, P., & Kopecek, J. (2002). Poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide-block-n-butyl acrylate] micelles in water/DMF mixed solvents. *Polymer*, 43(13), 3735–3741.
- Kwak, Y., & Matyjaszewski, K. (2009). ARGET ATRP of methyl methacrylate in the presence of nitrogen-based ligands as reducing agents. *Polymer International*, 58(3), 242–247.
- Laniado, R., & Cabrales, M. N. (2009). Amphotericin B: side effects and toxicity. *Revista Iberoamericana de Micología*, 26(4), 223–227.
- Laskar, P., Saha, B., Ghosh, S., & Dey, J. (2015). PEG based random copolymer micelles as drug carriers: Effect of hydrophobe content on drug solubilization and cytotoxicity. *RSC Adv.*, 5.
- Laskar, P., Samanta, S., Ghosh, S. K., & Dey, J. (2014). In vitro evaluation of pH-sensitive cholesterol-containing stable polymeric micelles for delivery of camptothecin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 430, 305–314.
- Lavasanifar, A., Samuel, J., & Kwon, G. S. (2002). The effect of fatty acid substitution on the in vitro release of amphotericin B from micelles composed of poly(ethylene oxide)-block-poly(N-hexyl stearate-L-aspartamide). *Journal of Controlled Release*, 79(1-3), 165–172.
- Lavasanifar, A., Samuel, J., Sattari, S., & Kwon, G. S. (2002). Block Copolymer Micelles for the Amphotericin B. *Pharmaceutical Research*, 19(4), 418–422.
- Lee, A. L. Z., Venkataraman, S., Sirat, S. B. M., Gao, S., Hedrick, J. L., & Yang, Y. Y. (2012). The use of cholesterol-containing biodegradable block copolymers to exploit hydrophobic interactions for the delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, 33(6), 1921–1928.

- Leibler, L., Orland, H., & Wheeler, J. C. (2003). Theory of critical micelle concentration for solutions of block copolymers. *Journal of Chemical Physics*, 79(7), 3550–3557.
- Luengo-Alonso, C., Torrado, J. J., Ballesteros, M. P., Malfanti, A., Bersani, S., Salmaso, S., & Caliceti, P. (2015). A novel performing PEG-cholane nanoformulation for Amphotericin B delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 495(1), 41–51.
- Luisi, P. L. (2001). Are micelles and vesicles chemical equilibrium systems? *Journal of Chemical Education*, 78(3), 380–384.
- Ma, Q., & Wooley, K. L. (2000). The preparation of butyl acrylate, methyl acrylate, and styrene block copolymers by atom transfer radical polymerization: Precursors to amphiphilic and hydrophilic block copolymers and conversion to complex nanostructured materials. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 38(S1), 4805–4820.
- Matyjaszewski, K. (1994). No Title. Retrieved from
- Matyjaszewski, K. (2012). Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP): Current Status and Future Perspectives. *Macromolecules*, 45(10), 4015–4039.
- Matyjaszewski, K., & Xia, J. (2001). Atom transfer radical polymerization. *Chemical Reviews*, 101(9), 2921–2990.
- Myles, D. G., Biol, D., Jaffe, L. A., Brawley, S. H., Bernard, U. C., The, F., ... Langerll, R. (1994). Biodegradable Long-Circulating Polymeric Nanospheres ILlauana Upon solvent evaporation , the. *Science*, 263(January), 1600–1603.
- Osouli, K. (2013). No Title. Retrieved from [https://www.researchgate.net/post/How\\_do\\_I\\_synthesize\\_acryloyl\\_chloride](https://www.researchgate.net/post/How_do_I_synthesize_acryloyl_chloride)
- Pasquali, R. C., Chiappetta, D. A., & Bregni, C. (2005a). Los Copolímeros en Bloques Anfifílicos y sus Aplicaciones Farmacéuticas, 24(4).
- Pasquali, R. C., Chiappetta, D. A., & Bregni, C. (2005b). No Title. Retrieved from
- Picos, D., Gómez, M., Fernández, D., & Núñez, L. (2000). Microesferas biodegradables de liberación controlada para administración parenteral. *Control*, 34(1), 70–77.
- Pinto Reis, C., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., & Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2(1), 8–21.
- Pittella, F., Cabral, H., Maeda, Y., Mi, P., Watanabe, S., Takemoto, H., ... Kataoka, K. (2014). Systemic siRNA delivery to a spontaneous pancreatic tumor model in transgenic mice by PEGylated calcium phosphate hybrid micelles. *Journal of*

*Controlled Release*, 178(1), 18–24.

- Rodríguez-Hernandez, J., Chécot, F., Gnanou, Y., & Lecommandoux, S. (2005). Toward “smart” nano-objects by self-assembly of block copolymers in solution. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 30(7), 691–724.
- Rösler, A., Vandermeulen, G. W. M., & Klok, H. A. (2012). Advanced drug delivery devices via self-assembly of amphiphilic block copolymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(SUPPL.), 270–279.
- Saenz, Hernaez, Sanz, K. (2004). Liberación Controlada De Fármacos. Micropartículas. *Revista Iberoamericana de Polimeros*, 5(2)(2), 15.
- Saha, S., Copic, D., Bhaskar, S., Clay, N., Donini, A., Hart, A. J., & Lahann, J. (2012). Chemically controlled bending of compositionally anisotropic microcylinders. *Angewandte Chemie - International Edition*, 51(3), 660–665.
- Sánchez-Brunete, J. A., Dea, M. A., Rama, S., Bolás, F., Alunda, J. M., Torrado-Santiago, S., & Torrado, J. J. (2004). Amphotericin B molecular organization as an essential factor to improve activity/toxicity ratio in the treatment of visceral leishmaniasis. *Journal of Drug Targeting*, 12(7), 453–60.
- Serrano, E., Zubeldia, A., Eceiza, A., Remiro, P., & Mondragon, I. (2002). Análisis Microscópico Y Físico-Químico Del Auto-, (Kraton 4274), 777–782.
- Sevimli, S., Sagnella, S., Kavallaris, M., Bulmus, V., & Davis, T. P. (2012). Synthesis, self-assembly and stimuli responsive properties of cholesterol conjugated polymers. *Polymer Chemistry*, 3(8), 2057.
- Shameli, K., Ahmad, M. Bin, Jazayeri, S. D., Sedaghat, S., Shabanzadeh, P., Jahangirian, H., ... Abdollahi, Y. (2012). Synthesis and characterization of polyethylene glycol mediated silver nanoparticles by the green method. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(6), 6639–6650.
- Shen, H., Hong, S., Prud'Homme, R. K., & Liu, Y. (2011). Self-assembling process of flash nanoprecipitation in a multi-inlet vortex mixer to produce drug-loaded polymeric nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(9), 4109–4120.
- Siegwart, D. J., Oh, J. K., & Matyjaszewski, K. (2012). ATRP in the design of functional materials for biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 37(1), 18–37.
- Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., & Kulkarni, A. R. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Controlled Release*, 70, 1–20.
- Spink, C. H. (2008). Differential Scanning Calorimetry. *Methods in Cell Biology*, 84(07), 115–141.

- Suriñach Cornet Santiago Bordas Alsina, N. Clavaguera, M. T. Clavaguera-Mora, M. D. B. (2002). La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la Ciencia de Materiales. *Boletín de La Sociedad Española de Cerámica Y Vidrio*, 31, 11–17.
- Torchilin, V. P. (2005). Block copolymer micelles as a solution for drug delivery problems. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 15, 63–75.
- Torrado, J. J., Espada, R., Ballesteros, M. P., & Torrado-Santiago, S. (2010). In vivo study of a polymeric glucose-sensitive insulin delivery system using a rat model. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(10), 4215–4227.
- Vakil, R., & Kwon, G. S. (2008). Effect of cholesterol on the release of amphotericin B from PEG-phospholipid micelles. *Molecular Pharmaceutics*, 5(1), 98–104.
- Vijan, L. E. (2015). Comparative study of the interactions of amphotericin B with cholesteryl / stigmasteryl comparative study of the interactions of amphotericin b with, (November).
- Vijan, L. E., & Topala, C. (2009). The characterizing of the interaction of amphotericin B with cholesteryl esters. *Journal of Molecular Liquids*, 147(1-2), 135–138.
- Wang, J.-S., & Matyjaszewski, K. (1995). Controlled/“Living” Radical Polymerization. Halogen Atom Transfer Radical Polymerization Promoted by a Cu(I)/Cu(II) Redox Process. *Macromolecules*, 28(23), 7901–7910.
- Wasan, E. K., Bartlett, K., Gershkovich, P., Sivak, O., Banno, B., Wong, Z., ... Wasan, K. M. (2009). Development and characterization of oral lipid-based Amphotericin B formulations with enhanced drug solubility, stability and antifungal activity in rats infected with *Aspergillus fumigatus* or *Candida albicans*. *International Journal of Pharmaceutics*, 372(1-2), 76–84.
- Xing, L., & Mattice, W. L. (1997). Strong solubilization of small molecules by triblock-copolymer micelles in selective solvents. *Macromolecules*, 30(6), 1711–1717.
- Yan, Q., Yuan, J., Zhang, F., Sui, X., Xie, X., Yin, Y., ... Wei, Y. (2009). Cellulose-based dual graft molecular brushes as potential drug nanocarriers: Stimulus-responsive micelles, self-assembled phase transition behavior, and tunable crystalline morphologies. *Biomacromolecules*, 10(8), 2033–2042.
- Zhang, X., Zhu, X., Ke, F., Ye, L., Chen, E. qiang, Zhang, A. ying, & Feng, Z. guo. (2009). Preparation and self-assembly of amphiphilic triblock copolymers with polyrotaxane as a middle block and their application as carrier for the controlled release of Amphotericin B. *Polymer*, 50(18), 4343–4351.