

Síntesis y caracterización de micelas poliméricas de mPEG-PCL para sistemas de suministro de fármacos: rescatando un proceso sencillo

Lillián Vianey Tapia López¹, Javier Servando Castro Carmona¹, Adalberto Vargas Mariñelarena¹, Carlos Alberto Martínez Pérez¹, Diana Ginette Zarate Triviño², Gabriel Luna Bárcenas²

¹Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.

²Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-Querétaro,

Resumen

El propósito de este estudio era reproducir un procedimiento no común y flexible para la formación de micelas de copolímeros. Aunque, estas estructuras han sido consideradas como uno de los portadores más potenciales en el campo de la administración de fármacos, los métodos más comunes utilizados para su reproducción implican el uso de varios disolventes orgánicos tóxicos, y en general, se requieren tiempos largos para asegurar la formación de micelas. Por lo tanto, debido a la necesidad de mejorar la forma de obtener micelas, que encontramos en la literatura un proceso de formación de micelas que tiene ventajas notables sobre los tradicionales. El copolímero bloque utilizado fue poli metoxi (etilenglicol) -poli (ϵ -caprolactona) mPEG-PCL y se obtiene por polimerización catiónica de apertura de anillo. Las técnicas de caracterización utilizadas para verificar la copolimerización fueron la Reflectancia Total Atenuada de Espectroscopia Infrarroja con Transformadas de Fourier (ATR-FTIR), y la Resonancia Magnética Nuclear (HNMR). Para la morfología de las micelas se empleó Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y las técnicas de Microscopía de Fuerza Atómica (AFM). Dispersión de Luz Dinámica (DLS) fueron utilizadas para determinar el tamaño y la distribución de las micelas; y las pruebas de estabilidad y la Cromatografía de Permeación en Gel (GPC) se utilizó para determinar los pesos moleculares.

Palabras clave: Micelas poliméricas, portadores de fármacos, administración de fármacos, mPEG-PCL.

Introducción

Las micelas copoliméricas se consideran uno de los portadores con mayor potencial para el transporte y liberación de fármacos (Prabaharan, Grailer, Steeber, & Gong, 2009) y han sido ampliamente estudiadas para su aplicación en tratamientos contra el cáncer (You, Hu, Du, Yuan, y Ye, 2007). Cuando los copolímeros de bloques

anfifílicos se exponen a un medio acuoso por encima de un umbral de concentración llamada Concentración Micelar Crítica (CMC), se forma un complejo de moléculas (núcleo / cáscara) (Sutton, Nasongkla, Blanco, y Gao, 2007). Su estructura permite la solubilización de fármacos hidrófobos y anfifílicos en los núcleos interiores mientras

que las superficie hidrofílicas confieren buena estabilidad en un ambiente acuoso (Prabaharan, Grailer, Steeber, & Gong, 2009; Licciardi, Giammona, Du, Armes, Tang, y Lewis, 2006). Además, deben ser de tamaño nanométrico (10-100 nm) para evitar la absorción por el sistema reticuloendotelial (RES) y la acumulación en el tejido tumoral vascularizado el conocido efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR) (Opanasopit, Yokoyama, Watanabe, Kawano, Maitani, y Okano, 2004). Además, su tamaño nanométrico con distribuciones estrechas también mejora el tiempo de circulación, la farmacocinética, biodistribución, la ingesta celular, control de entrega y disminuye la toxicidad del fármaco (You, Hu, Du, Yuan, y Ye, 2007; Kumar, Tyagi, Shakil, Parmar, Kumar, y Watterson, 2005). Sin embargo, una limitación importante en el desarrollo de tratamientos basados en micelas copoliméricas resulta de la escasa eficacia en los procedimientos de formación de micelas disponible. Por ejemplo, los métodos más comunes implican la utilización de grandes cantidades de disolventes orgánicos que podrían ser tóxicos para el cuerpo humano y el medio ambiente, por lo que su uso debería limitarse en aplicaciones farmacéuticas (Yang, Wu, Liu, Duan, y Li, 2009).

A continuación presentamos un breve análisis de algunos inconvenientes que se encuentran en los dos métodos más comunes para la obtención de micelas, basados en procesos de diálisis y evaporación.

En el método de diálisis el copolímero anfifílico se disuelve en un disolvente orgánico que es miscible en agua, disolventes como dimetilformamida DMF, NN dimetilacetamida DMAC, trietilamina TEA, y N-etilacetamida (Prabaharan, Grailer, Steeber, & Gong, 2009; Nakayama, Chung, Miyazaki, Yokoyama, Sakai, y Okano, 2007; Nakayama, Okano, Miyazaki, Kohori, Sakai, y Yokoyama, 2006; Chung, Yokoyama, Yamato, Aoyagi, Sakurai, y Okano, 1999). La mezcla se agita y se dializa contra agua hasta que el disolvente es sustituido. Para este método, el uso de disolventes tóxicos no es la única desventaja, sino también los grandes volúmenes de agua residual contaminada con disolventes tipo dos (muy poco aptos para su uso en el cuerpo humano), los tiempos largos para obtener micelas que llegan a abarcar más de un día (Fournier, Dufresne, Smith, Ranger, Leroux, 2004), y la dependencia de las membranas de diálisis que son caras y delicadas.

Por otra parte, en el método de evaporación, el copolímero se disuelve en cloroformo, otro disolvente clase dos, y la mezcla se agita hasta que se evapora el disolvente; este proceso de evaporación podría ser un problema en términos de contaminación ambiental si no se controla de manera segura. A continuación, agua destilada u otro medio acuoso se añade para formar las micelas (Opanasopit, et al., 2004; Chansri, Kawakami, Yokoyama, Yamamoto, Charoensit, y Hashida, 2008; Okuda, Kawakami, Yokoyama, Yamamoto, Yamashita, y Hashida, 2008). Existe una variante del proceso de evaporación llamado método seco (en ocasiones llamado también

método de evaporación) en el que se disuelve el copolímero en disolventes orgánicos como N,N-dimetilformamida (DMF) y el Tetrahidrofurano (THF), (Liu, Zeng, y Allen, 2007; Satoh, Higuchi, Kawakami, Hashida, Kagechika, Shudo, y Yokoyama, 2009; Mikhail y Allen, 2010) los dos clasificados como disolventes clase dos. El disolvente es luego eliminado bajo presión reducida para producir películas de copolímero. Las micelas se obtienen mediante la adición de agua caliente o agua / PBS a las películas precalentados y después la solución se agita mediante vortex o sonicación. En algunos casos, se necesita una agitación adicional como parte de la formación de micelas (Mikhail, y Allen, 2010). Además, con el fin de obtener formulaciones inyectables de larga vida de estante, los métodos descritos anteriormente requieren pasos de centrifugación, filtración y liofilización (Fournier, et al., 2004), procesos lentos que consumen tiempo, con el riesgo de obtener micelas que contienen residuos de solventes clase dos.

Como hemos visto hasta ahora, a pesar que las micelas de copolímero son una de las opciones más prometedoras en la liberación de fármacos, sus métodos de fabricación siguen siendo objeto de mejora. Esto es muy importante ya que son sistemas destinados para aplicaciones farmacéuticas donde se necesitan métodos más fáciles, expandibles y más baratos, además de otras cuestiones críticas tales como la toxicidad, la seguridad del medio ambiente, y tiempos de producción más cortos y baratos. En este estudio, hemos de reproducir un procedimiento simple pero innovador y adaptable para la fabricación micelas

reportado por Fournier et al. (2004). Aunque este método no ha sido muy común, y la mayoría a seguido los métodos propuestos por Yokoyama, consideramos que tiene ventajas notables, como tiempos más cortos para garantizar la formación de micelas y su simplicidad. Además, el tipo de disolventes utilizados para disolver el copolímero, son menos tóxicos que los utilizados por los otros métodos. En resumen, encontramos el método de Fournier muy conveniente para obtener nanomicelas potencialmente utilizables para sistemas de transporte y liberación de fármacos.

El método consta de tres pasos:

- 1) El copolímero se disuelve en una mezcla de agua y un disolvente clase tres aprobado para formulaciones parenterales como Terbutanol (TBA).
- 2) A continuación, esta solución se liofiliza y se obtiene una formulación de polvo de larga vida útil.
- 3) Finalmente, las micelas se forman por la adición de agua (Fournier, et al., 2004; Le Garrec, Gori, Luo, Lessard, Smith, Yessine, ... y Leroux, 2004).

A nuestro conocimiento, el método no se ha usado anteriormente para la obtención de micelas copoliméricos de mPEG-PCL. Por lo tanto, variables como el tiempo y la temperatura involucradas en la solvatación del copolímero se modificaron con el fin de obtener una solución cristalina. Además, después de la rehidratación del polvo, obtuvimos mejores distribuciones del tamaño de las micelas añadiendo un paso

más al método original, la técnica de sonicación (Liu, Zeng, y Allen, 2007)

Los polímeros utilizados en este trabajo ya han sido aprobados por la Food and Drugs Administration (FDA) los EE.UU. para su uso clínico en humanos. El polímero metoxi polietilenglicol (mPEG) fue utilizado para el segmento envolvente hidrófilo de las micelas debido a su biocompatibilidad y ausencia de toxicidad. Además, este polímero minimiza la absorción de proteínas sobre superficies,

como resultado: la agregación eritrocitaria se ve disminuida, la adherencia bacteriana es controlada y se evita la respuesta inmunológica (Prabaharan, Grailer, Steeber, & Gong, 2009). Por otro lado, se utilizó el polímero poli ϵ -caprolactona (PCL) para el segmento de formación de núcleo hidrófobo. Este poliéster alifático tiene una proporción relativamente grande de permeabilidad y retención del fármaco, buena degradabilidad y toxicidad nula (Sinha, Bansal, Kaushik, Kumria, y Trehan, 2004).

Materiales y Métodos

Materiales

Sigma Aldrich

- Metoxi-polietilenglicol (mPEG) Mn ~2,000, hojuelas

Alfa Aesar

- Monómero de ϵ -caprolactona
- Ácido Clorhídrico (HCl) (1 M en éter dietílico)
- Trietilamina (TEA)
- n-Hexano
- Diclorometano
- Éter etílico
- Tetrahidrofurano (THF)
- Anhídrido succínico (SA)
- Dimetil amino piridina (DMAP)

Acros Organics

- Terbutanol

Métodos y ruta Experimental

El procedimiento para obtener micelas fue el siguiente:

1) polimerización por apertura de anillo entre el polímero hidrofílico MPEG y monómeros hidrófobos de ϵ -caprolactona para obtener el copolímero de dos bloques A-B mPEG-PCL. Este copolímero de dibloque tipo A-B fue elegido debido a su sencilla estructura molecular (Sáez, Hernáez, Sanz, y Katime, 2004) y su excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad (Ahmed, Trathnigg, Kappe, y Saf, 2010; Huang, Gao, Gou, Ye, Liu, Gao, Y., ... & Zhao, Y. 2010).

2) la formación de micelas por un procedimiento en el que se obtienen formulaciones en polvo. (Fournier, et al., 2004; Le Garrec, et al., 2004).

Síntesis de copolímeros mPEG-PCL

El Copolímero de mPEG-b-PCL fue preparado por polimerización catiónica de anillo abierto del monómero ϵ -PCL libre de metal usando HCl como activador y el grupo Hidroxi del polímero mPEG ($\text{CH}_3\text{O-PEG-OH}$) como iniciador, como se informó anteriormente (Mikhail, y Allen, 2010). Brevemente, el polímero mPEG (1 mmol, $M_n \sim 2.000$) se disolvió en diclorometano (12 ml). ϵ -caprolactona (8.76 mmol) se añadió seguido por HCl (0.003 mmol, 1 M en éter dietílico). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 8, 12 y 24 horas (para obtener copolímeros con tres pesos moleculares diferentes), después de eso, se añadió TEA para terminar la reacción y la mezcla se filtró para eliminar el subproducto trietilamina sal de hidrocloreuro. Por último, el copolímero se precipitó en éter dietílico / hexano (50:50, v / v%) y se secó bajo vacío a temperatura ambiente (Mikhail, y Allen, 2010).

Preparación de micelas copoliméricas

Formación de las micelas con copolímeros de diferente peso molecular

Las micelas se prepararon mediante el método de formulaciones en polvo (Fournier, et al., 2004; Le Garrec, et al.,

2004). El experimento para la formación de micelas se hizo para cada uno de los diferentes copolímeros obtenidos anteriormente (copolímeros conseguidos en 8, 12 y 24 horas). En primer lugar, el agua se fijó en 30 °C con agitación magnética, a continuación, se incorporó el copolímero. Después de eso, se añade TBA hasta obtener una relación agua / TBA de 70/30 (Fournier, et al., 2004). Para este procedimiento, se utilizaron 7 ml de agua, 3 ml para TBA y 20 mg de copolímero. La solución transparente se agitó suavemente durante 12 h y se liofilizó durante dos días. Agua doblemente destilada se filtró con un filtro de 0.2 μm y se usó para rehidratar el polvo. Por último, se empleó sonicación durante 10 minutos para micelas reorganización. (Liu, Zeng, y Allen, 2007).

Formación de micelas con la modificación de tiempo

Una vez que se seleccionó el peso molecular más conveniente del copolímero, fue usado para llevar a cabo tres experimentos donde la temperatura (30 °C) y la mezcla agua / TBA (70/30) son constantes y el tiempo es variable con el fin de determinar la relación entre el tiempo y el tamaño de las micelas. El tiempo se establece por primera vez en 3 h, luego 12h y finalmente 24h.

Resultados y Discusión

Síntesis de mPEG-PCL copolímeros confirmados por ATR-FTIR

La síntesis del copolímero de dibloque de mPEG-b-PCL se llevó a cabo a través de

copolimerización por apertura de anillo catiónica libre de metal. Las formaciones de copolímero de bloque fueron confirmados por el espectrómetro FTIR (Nicolet 6700). El espectro ATR-FTIR para un copolímero

mPEG-PCL típico se muestra en la Figura 1. El espectro claramente exhibe bandas características de ambos mPEG y PCL. La banda de absorción a 1731 cm^{-1} se atribuyó al estiramiento del carbonilo de la unión éster ($-\text{OC}=\text{O}$). El pico a 1189 cm^{-1} pertenecía al estiramiento C-O-C del mPEG mientras que las bandas de absorción a 2886

y 2937 cm^{-1} se atribuyeron a estiramiento de vibración C-H de mPEG y ϵ -CL, respectivamente (Li, Kong, Shi, Wang, Gu, Guo, ... y Qian, 2010; Tanaka, Kanazawa, Shibata, Suda, Fukuda, Takashima, y Okada, 2010; Meerod, Tumcharern, Wichai, y Rutnakornpituk, 2008).

Espectro del Copolímero mPEG-PCL

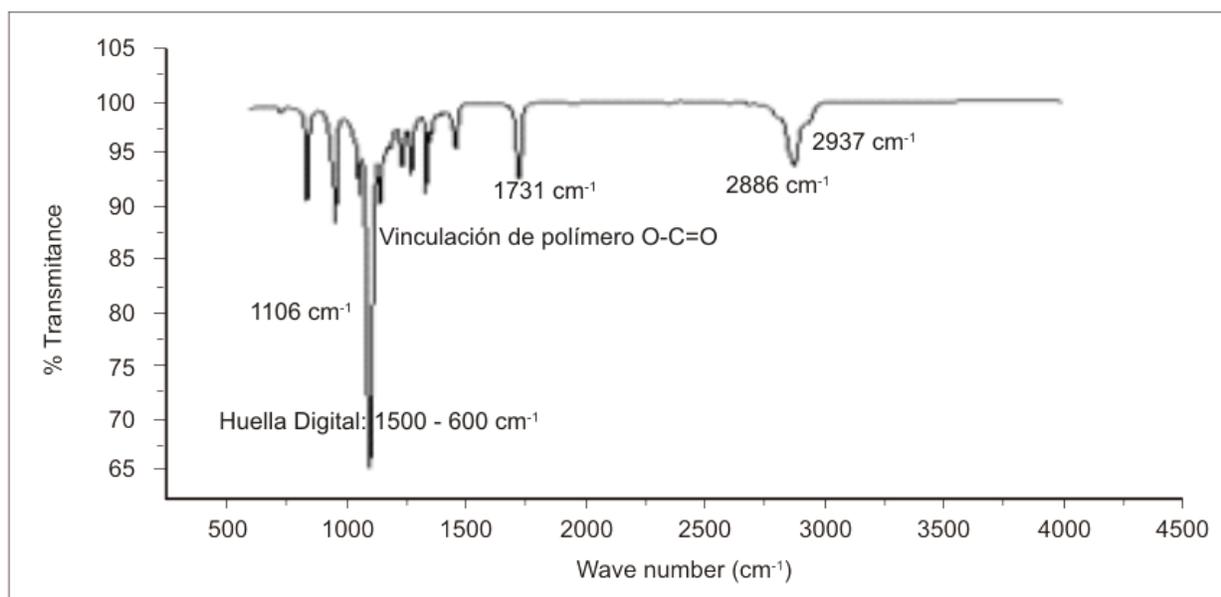


Figura 1. Copolímero mPEG-PCL Espectro $\text{H}_3\text{C}-\text{O}-[\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}]-[\text{CO}-(\text{CH}_2)_5-\text{O}]-\text{H}$

Técnica ^1H NMR

El copolímero de dibloque se confirmó por ^1H NMR (JEOL ECS 300 + de 300 Hz) utilizando cloroformo deuterado.

La señal de los protones en la región de mPEG se observan a 3.33 ppm (3H, CH_3-O) y 3.64 (4H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), y las señales de

PCL en 1.32 ppm (2H, $\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}$), 1.63 (4H, $\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}$), 2.30 (2H, $\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}$) y 4.03 (2H, $\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}$). Las señales son de acuerdo a espectros reportados previamente para el copolímero PEG-PCL, Mikhail (2010), Zhou (2003), Park (2005), Zhiping (2008), y Yasugi (1999).

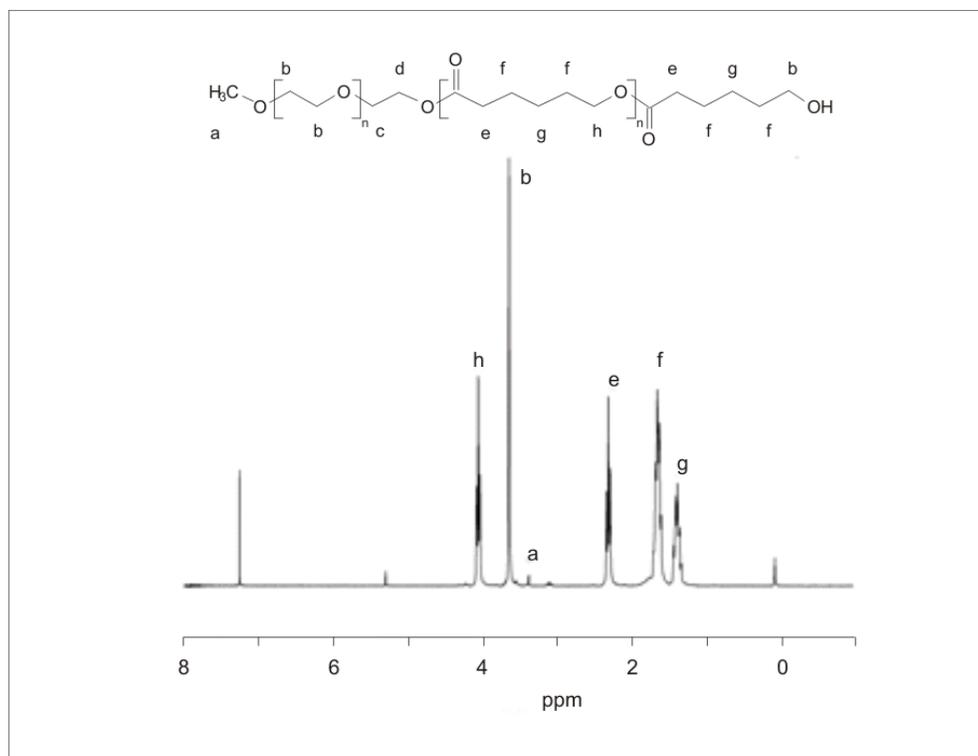


Figura 2. Espectro ^1H NMR para la identificación estructural del copolímero mPEG-PCL

La terminación de la síntesis del copolímero en diferentes momentos (debido al TEA) permitió obtener tres pesos moleculares diferentes, los cuales fueron evaluados y comparados para formar micelas. La Tabla 1 resume el peso molecular medio y la polidispersibilidad de los copolímeros. La Figura 3 muestra los tiempos de retención para cada copolímero durante el análisis GPC utilizando el equipo 2695 Waters acoplado a un detector de dispersión de luz. Este análisis se complementó mediante la medición de mPEG ($M_n \sim 2000$) como referencia.

Posteriormente, las señales se procesan para obtener el peso molecular medio M_n , peso molecular medio M_w , y el índice de polidispersidad PDI. Según Parveen, Misra y Sahoo (2011) todos los pesos moleculares obtenidos son capaces de formar micelas. Se esperaba que debido a la naturaleza del proceso de polimerización y la falta de catalizador de metal los valores de polidispersidad oscilaran entre 1.35 y 1.44. A fin de mejorar los resultados, Nakayama (2006), propone en el uso de ultrafiltración a fin de estandarizar la longitud de la cadena copolimérica.

Tabla 1. Pesos moleculares del copolímero de mPEG-b-PCL con tiempos de polimerización diferentes.

Muestra	M_n	M_w	PDI	mPEG/PCL
mPEG	2,431	2,684	1.10	2,808/0
mPEG-b-PCL 8h	4,596	6,224	1.35	2,808/2,402
mPEG-b-PCL 12h	7,730	10,382	1.34	2,808/6,922
mPEG-b-PCL 24h	9,630	13,854	1.44	2,808/9,253

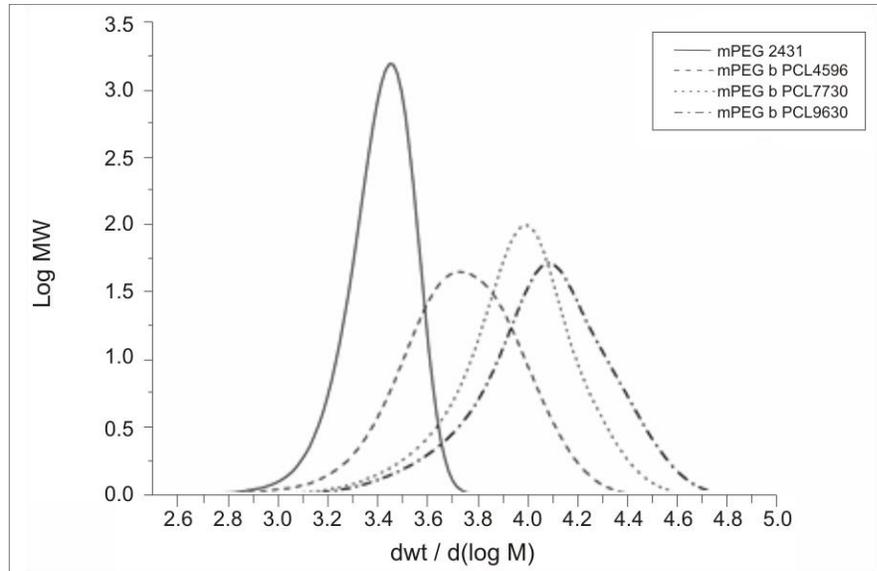


Figura 3. GPC cromatograma para copolímeros de PEG-b-PCL con diferentes pesos moleculares.

De acuerdo con la información obtenida anteriormente, se confirmó la formación de la estructura de copolímero de bloque con diferentes pesos moleculares por medio de ruta ROP reportada por Aliabadi, Elhasi, Mahmud, Gulamhusein, Mahdipoor,

y Lavasanifar (2007) utilizando HCL como activador, el grupo hidroxilo del polímero mPEG (CH₃O-PEG-OH) como iniciador y TEA para terminar la reacción. La Figura 4 muestra brevemente el proceso para obtener mPEG-b-PCL.

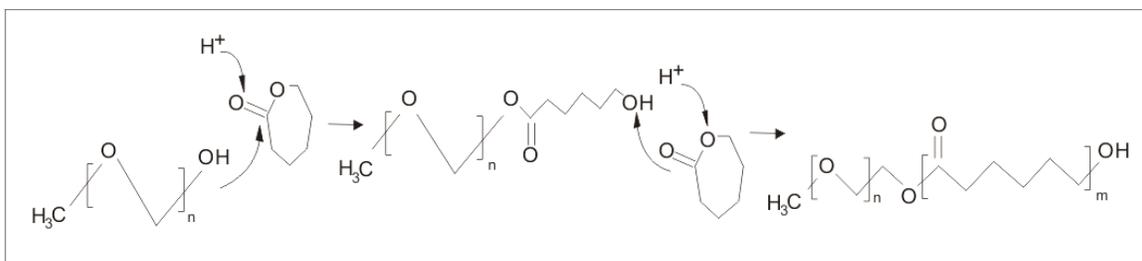


Figura 4. Copolímero mPEG-b-PCL vía ROP sin catalizador metálico.

Estabilidad de las micelas copoliméricas

La formación de micelas copoliméricas de mPEG-b-PCL se realizó correctamente, utilizando el método de formulación de polvos. En primer lugar, las micelas copoliméricas fueron formadas con copolímeros de tres pesos moleculares diferentes en las mismas condiciones, la temperatura a 30 °C, con un tiempo de reacción de 12 h, 70/30 de agua / TBA, liofilización, la rehidratación del polvo y sonicación durante 10 min.

Un análisis de DLS utilizando un Nanotrak Wave Microtrac (λ : 730 nm) se llevó a cabo para obtener el peso molecular,

diámetro y potencial zeta para determinar su estabilidad (tabla 2). La medición de la distribución del tamaño y el potencial zeta se realizaron en un sistema acuoso a temperatura ambiente y pH 6.68.

Se observó que el diámetro de las polimicelas PM con 4.596 y 7.730 Da tienden a aumentar durante un período de aproximadamente 24 a 48 horas, creando distribuciones bimodales (datos no mostrados) y que indican la floculación de micelas. Sin embargo, las PM hechas de copolímeros pesan 9,360 Da y son estables en las mismas condiciones por un período de hasta 80 horas, como se muestra en la Figura 5.

Tabla 2. Copolímeros de diferentes pesos moleculares de mPEG-b-PCL

Peso Molecular (Da)	Diámetro (nm)	Desviación Estándar	Potencial Zeta (mV)
4596	70.3	28.76	-27.9
7730	78.4	25.94	-22.9
9,360	86.23	35.47	-30.8

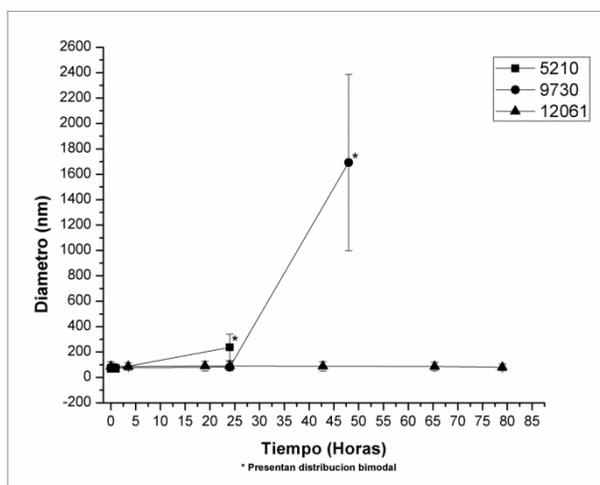


Figura 5. Estabilidad de las micelas en el tiempo para mPEG-b-PCL con diferentes pesos moleculares en medio acuoso

En resumen, el peso molecular del copolímero (9360 Da) mostró la mejor estabilidad y la capacidad para formar micelas. Al parecer, es un buen candidato para ser un nanotransportador de fármacos hidrófobos con fines médicos.

Tamaño de micelas copoliméricas

Los resultados de los experimentos llevados a cabo para la formación de micelas para determinar el tiempo de influencia cuando las cadenas de copolímeros se disuelven en agua / TBA 70/30 a 30 °C se analizaron mediante SEM; todos ellos fueron colocados

en rejillas de carbono y recubiertos con una película de oro/paladio debido a la baja conductividad del copolímero. El copolímero utilizado tenía un peso molecular de 9360 Da.

El primer tiempo de modificación se fijó en 3 h. La morfología de las micelas se distingue claramente como esferoidal y su tamaño cae en el rango nanométrico. Se encontraron micelas de entre 150 y 260 nm aproximadamente. La media de las micelas fue de 85.25 nm y su desviación estándar de 37.37nm.

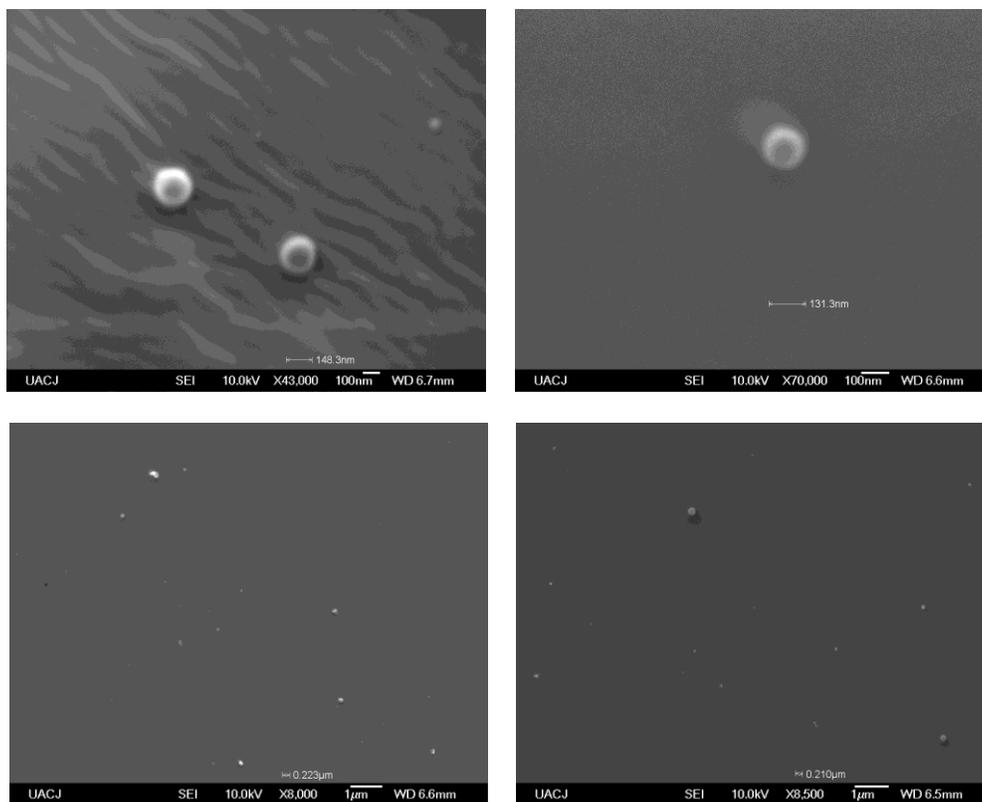


Figura 4. Micelas de copolímero mPEG-PCL ultrasonificadas, (a) y (b) micelas observadas a alta ampliación, (c) y (d) micelas observadas a bajo aumento

La segunda modificación se fijó en 18 horas. La imagen mostró una morfología

esferoidal con un tamaño menor que las imágenes anteriores.

El análisis de micelas con 9360 Da de peso molecular con el TEM se realizó utilizando un microscopio modelo FEI TITAN con voltaje de aceleración de 300 keV. Previo al análisis, se preparó una solución diluida de 50% v/v de micelas en agua. 1 μ L de muestra se colocó sobre una rejilla de cobre con membrana de carbono

(carbón Lacey) y se dejó secar durante 8 horas. Para un mejor contraste de la imagen, la rejilla se trató con 1 μ L de ácido fosfotúngstico al 1% v/v y dejando que se seque durante 3 horas antes del análisis. En la Figura 6 se aprecia una media de 18.86 nm.

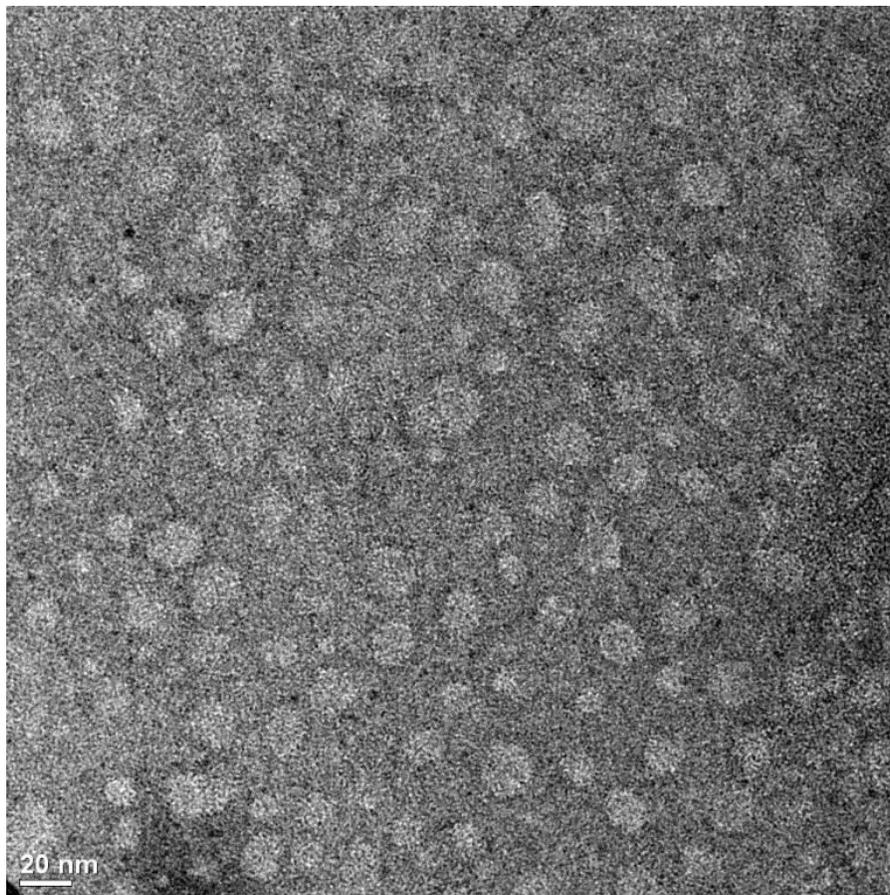


Figura 6. TEM a 110,000X para la formación de PMs usando mPEG-b-PCL con un peso molecular de 9,360 Da

Para estas micelas, también se realizó un análisis con AFM como una técnica complementaria para observar el tamaño y la morfología de las micelas (Figura 7). Los resultados obtenidos fueron

de acuerdo con los resultados mencionados anteriormente, media 18.4 nm y desviación estándar de 7.6 nm. Los resultados son congruentes y están de acuerdo con los datos del análisis por TEM.

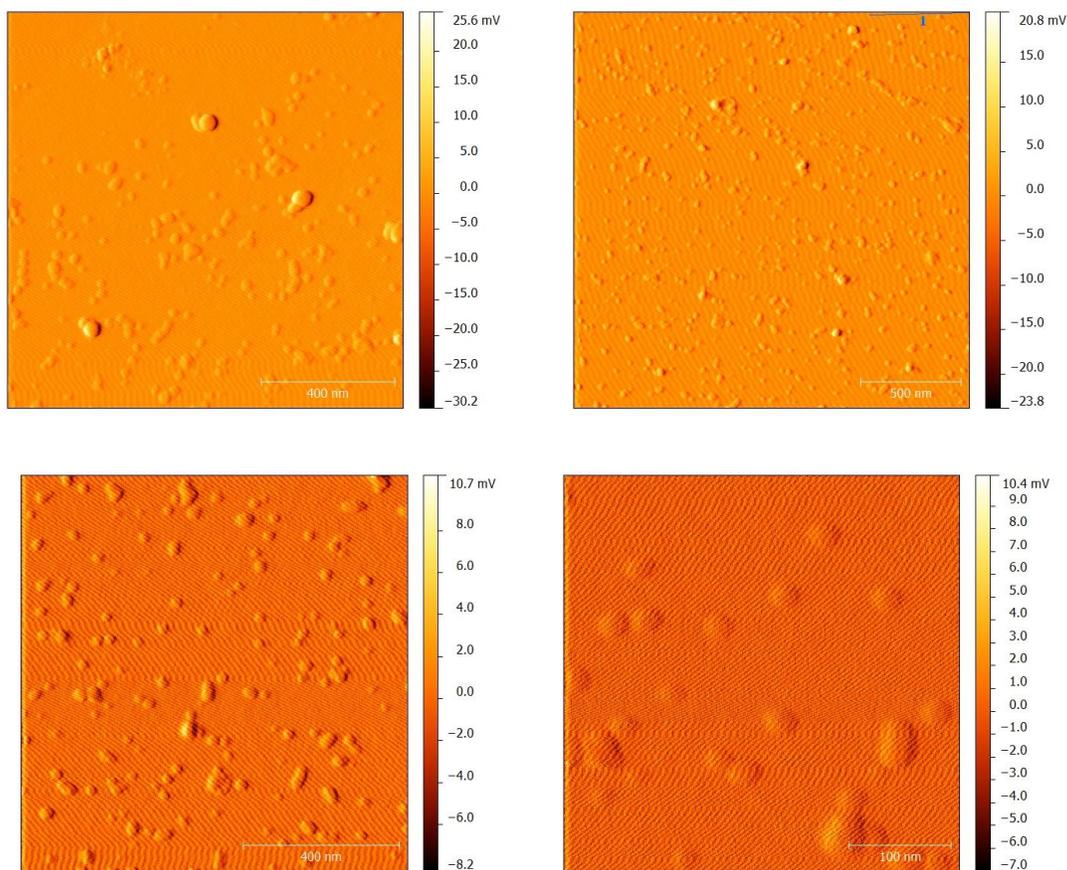


Figura 7. Imágenes de AFM de polimicelas mPEG-PLC

Cuando el tiempo se ajustó a 24h, de acuerdo con los resultados, se formaron gran cantidad de micelas con una distribución de tamaño muy estrecha. Se asume que el copolímero tenía una buena dispersión en el medio acuoso y las cadenas de copolímeros estaban bien solvatadas. Además, se formaron micelas con un tamaño mayor a 20

nm; para reducir este tipo de formaciones, como se mencionó anteriormente, técnicas de ultrafiltración podrían emplearse después de la copolimerización para estandarizar el tamaño las cadenas de copolímero como es estipulado por Nakayama, et al. (2006). Media = 9.11 nm, Desviación estándar = 1.4 nm.

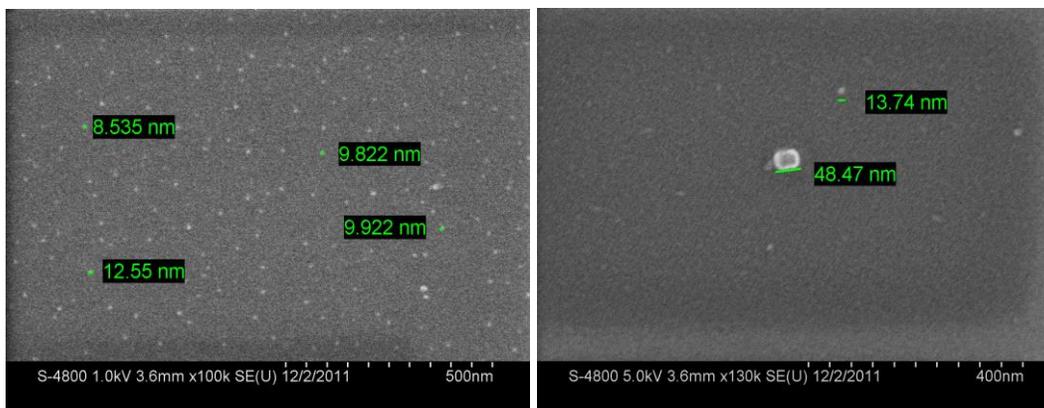


Figura 5. Micelas de copolímero mPEG-PCL, (a) micelas a baja magnificación bajo voltaje, (b) micelas en la alta ampliación y alto voltaje.

En resumen, por el método de formulación de polvos para el copolímero mPEG-b-PCL, a decir por la evidencia experimental el tiempo en que el copolímero se disuelve en agua / TBA es en gran parte responsable del tamaño de las micelas, posiblemente relacionado con la solvatación,

produciendo una alta asociación entre las moléculas de disolvente y las cadenas de los copolímeros que reducen al mínimo las interacciones hidrofóbicas responsables de la formación de micelas. En consecuencia, un bajo número de cadenas poliméricas forman micelas.

Conclusiones

El procedimiento presentado en este trabajo representa una manera sencilla para la formación de micelas de copolímero. Se corroboró la fácil adaptabilidad de este procedimiento como la forma en que se adaptaron las variables durante el experimento. Variables como la temperatura cuando el copolímero y el disolvente se mezclan con el fin de obtener una solución cristalina y el tiempo de agitación para asegurar una buena solvatación de las cadenas copoliméricas, fueron muy importantes para controlar el proceso. Estas dos características están fuertemente correlacionadas y son directamente responsables para la formación de micelas con una estrecha distribución de tamaños. Es importante destacar que no hemos

encontrado otra investigación que hable al respecto de eso. Aunque es necesario llevar a cabo más experimentos con el fin de corroborar estos resultados, encontramos suficientes evidencias experimentales para sentar las bases del método. Del mismo modo, el tiempo y la temperatura necesitan adaptarse de acuerdo con el copolímero utilizado. Por último, se añadió un paso adicional al procedimiento original y el proceso de sonificación fue empleado para disminuir la agregación de las micelas después de la rehidratación del polvo. Además, se recomienda firmemente el uso de técnicas de ultrafiltración después de la copolimerización para estandarizar el tamaño de las cadenas de copolímero.

En resumen el método de formulaciones en polvo es muy atractivo para ser utilizado para la producción masiva

de micelas copoliméricas con aplicaciones para el transporte y liberación de fármacos en la industria farmacéutica.

Agradecimientos

Los autores agradecen al CONACYT proyecto Número septiembre CB 2.014 hasta 241.001 para el apoyo financiero,

CINVESTAV Querétaro por acceder al uso del AFM, y a Eleazar León por las imágenes AFM tomadas.

Referencias

Aliabadi, H. M., Elhasi, S., Mahmud, A., Gulamhusein, R., Mahdipoor, P., & Lavasanifar, A. (2007). Encapsulation of hydrophobic drugs in polymeric micelles through co-solvent evaporation: the effect of solvent composition on micellar properties and drug loading. *International journal of pharmaceutics*, 329(1), 158-165.

Ahmed, H., Trathnigg, B., Kappe, C. O., & Saf, R. (2010). Synthesis of poly (ϵ -caprolactone) diols and EO-CL block copolymers and their characterization by liquid chromatography and MALDI-TOF-MS. *European Polymer Journal*, 46(3), 494-505.

Chansri, N., Kawakami, S., Yokoyama, M., Yamamoto, T., Charoensit, P., & Hashida, M. (2008). Anti-tumor effect of all-trans retinoic acid loaded polymeric micelles in solid tumor bearing mice. *Pharmaceutical research*, 25(2), 428-434.

Chung, J. E., Yokoyama, M., Yamato, M., Aoyagi, T., Sakurai, Y., & Okano, T. (1999). Thermo-responsive drug delivery from polymeric micelles constructed using block copolymers of poly (N-isopropylacrylamide) and poly (butylmethacrylate). *Journal of Controlled Release*, 62(1), 115-127.

Fournier, E., Dufresne, M. H., Smith, D. C., Ranger, M., & Leroux, J. C. (2004). A novel one-step drug-loading procedure for water-soluble amphiphilic nanocarriers. *Pharmaceutical research*, 21(6), 962-968.

Huang, Y., Gao, H., Gou, M., Ye, H., Liu, Y., Gao, Y., ... & Zhao, Y. (2010). Acute toxicity and genotoxicity studies on poly (ϵ -caprolactone)-poly (ethylene glycol)-poly (ϵ -caprolactone) nanomaterials. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 696(2), 101-106.

Kumar, R., Tyagi, R., Shakil, N. A., Parmar, V. S., Kumar, J., & Watterson, A. C. (2005). Self-Assembly of PEG and Diester Copolymers: Effect of PEG Length, Linker, Concentration and Temperature. *Journal of Macromolecular Science Part A: Pure and Applied Chemistry*, 42(11), 1523-1528.

Le Garrec, D., Gori, S., Luo, L., Lessard, D., Smith, D. C., Yessine, M. A., ... & Leroux, J. C. (2004). Poly (N-vinylpyrrolidone)-block-poly (D, L-lactide) as a new polymeric solubilizer for hydrophobic anticancer drugs: in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Controlled Release*, 99(1), 83-101.

Li, X., Kong, X., Shi, S., Wang, X., Gu, Y., Guo, G., ... & Qian, Z. (2010). Preparation, characterization, and self-assembly behavior of a novel MPEG/PCL-g-Chitosan copolymer. *Soft Materials*, 8(4), 320-337.

Licciardi, M., Giammona, G., Du, J., Armes, S. P., Tang, Y., & Lewis, A. L. (2006). New folate-functionalized biocompatible block copolymer micelles as potential anti-cancer drug delivery systems. *Polymer*, 47(9), 2946-2955.

Liu, J., Zeng, F., & Allen, C. (2007). In vivo fate of unimers and micelles of a poly (ethylene glycol)-block-poly (caprolactone) copolymer in mice following intravenous administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65(3), 309-319.

Meerod, S., Tumcharern, G., Wichai, U., & Rutnakornpituk, M. (2008). Magnetite nanoparticles stabilized with polymeric bilayer of poly (ethylene glycol) methyl ether-poly (ϵ -caprolactone) copolymers. *Polymer*, 49(18), 3950-3956.

Mikhail, A. S., & Allen, C. (2010). Poly (ethylene glycol)-b-poly (ϵ -caprolactone) micelles containing chemically conjugated and physically entrapped docetaxel: synthesis, characterization, and the influence of the drug on micelle morphology. *Biomacromolecules*, 11(5), 1273-1280.

Nakayama, M., Chung, J. E., Miyazaki, T., Yokoyama, M., Sakai, K., & Okano, T. (2007). Thermal modulation of intracellular drug distribution using thermoresponsive polymeric micelles. *Reactive and Functional Polymers*, 67(11), 1398-1407.

Nakayama, M., Okano, T., Miyazaki, T., Kohori, F., Sakai, K., & Yokoyama, M. (2006). Molecular design of biodegradable polymeric micelles for temperature-responsive drug release. *Journal of Controlled Release*, 115(1), 46-56.

Okuda, T., Kawakami, S., Yokoyama, M., Yamamoto, T., Yamashita, F., & Hashida, M. (2008). Block copolymer design for stable encapsulation of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide into polymeric micelles in mice. *International journal of pharmaceutics*, 357(1), 318-322.

Opanasopit, P., Yokoyama, M., Watanabe, M., Kawano, K., Maitani, Y., & Okano, T. (2004). Block copolymer design for camptothecin incorporation into polymeric micelles for passive tumor targeting. *Pharmaceutical research*, 21(11), 2001-2008.

Prabaharan, M., Grailer, J. J., Steeber, D. A., & Gong, S. (2009). Thermosensitive Micelles Based

on Folate-Conjugated Poly (N-vinylcaprolactam)-block-Poly (ethylene glycol) for Tumor-Targeted Drug Delivery. *Macromolecular bioscience*, 9(8), 744-753.

Sáez, V., Hernández, E., Sanz, L., & Katime, I. (2004). Liberación controlada de fármacos. Micropartículas. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 5(2), 87-101.

Satoh, T., Higuchi, Y., Kawakami, S., Hashida, M., Kagechika, H., Shudo, K., & Yokoyama, M. (2009). Encapsulation of the synthetic retinoids Am80 and LE540 into polymeric micelles and the retinoids' release control. *Journal of Controlled Release*, 136(3), 187-195.

Sinha, V. R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R., & Trehan, A. (2004). Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International journal of pharmaceutics*, 278(1), 1-23.

Sutton, D., Nasongkla, N., Blanco, E., & Gao, J. (2007). Functionalized micellar systems for cancer targeted drug delivery. *Pharmaceutical research*, 24(6), 1029-1046.

Tanaka, K., Kanazawa, T., Shibata, Y., Suda, Y., Fukuda, T., Takashima, Y., & Okada, H. (2010). Development of cell-penetrating peptide-modified MPEG-PCL diblock copolymeric nanoparticles for systemic gene delivery. *International journal of pharmaceutics*, 396(1), 229-238.

Yang, L., Wu, X., Liu, F., Duan, Y., & Li, S. (2009). Novel biodegradable polylactide/poly (ethylene glycol) micelles prepared by direct dissolution method for controlled delivery of anticancer drugs. *Pharmaceutical research*, 26(10), 2332-2342.

You, J., Hu, F. Q., Du, Y. Z., Yuan, H., & Ye, B. F. (2007). High cytotoxicity and resistant-cell reversal of novel paclitaxel loaded micelles by enhancing the molecular-target delivery of the drug. *Nanotechnology*, 18(49), 495101.