

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA



“Síntesis y caracterización de hidrogeles a partir de copolímeros profármacos para potenciales aplicaciones tópicas en la liberación dual de indometacina y ácido salicílico”

TESIS

Para obtener el título de **Químico Farmacobiólogo** por

Daniel Sosa Ruiz

Director de tesis

Dr. Héctor Alfonso Magaña Badilla

Codirector de tesis

Dra. Kenia Palomino Vizcaíno

Tijuana, Baja California a 04 de abril del 2023.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE EXTENSIÓN Y VINCULACIÓN

" 2023, AÑO DE LA CONCIENCIACIÓN SOBRE LAS PERSONAS CON TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA "

FOLIO No. 056

Tijuana, Baja California, a 12 de abril de 2023

C. DANIEL SOSA RUIZ
PASANTE DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGO
PRESENTE:

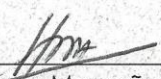
El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
opción de Tesis


Es propuesto, por el **Dr. Héctor Alfonso Magaña Badilla y la Dra. Kenia Palomino Vizcaino**, quienes serán los responsables de la calidad del trabajo que usted presente, referido al tema; **"Síntesis y caracterización de hidrogeles a partir de copolímeros profármacos para potenciales aplicaciones tópicas en la liberación dual de indometacina y ácido salicílico"**, el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

RESUMEN

- I. AGRADECIMIENTOS
- II. ÍNDICE
- III. LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS
- IV. LISTA DE TABLAS
- V. LISTA DE FIGURAS
- VI. RESUMEN
- VII. INTRODUCCIÓN
- VIII. TEORÍA EN GENERAL
- IX. PARTE EXPERIMENTAL
- X. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
- XI. CONCLUSIONES
- XII. REFERENCIAS
- XIII. ANEXOS




Dr. Héctor Alfonso Magaña Badilla
Director de Tesis


Dra. Kenia Palomino Vizcaino
Co- Directora de Tesis


M.C. Roberto Alejandro Reyes Martínez
Director


Dra. Ana Alejandra Ramírez Rodríguez
Subdirectora

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Quiero iniciar mis agradecimientos a las dos personas más importantes de mi vida las cuales me dieron más de lo que una persona puede pedir, a mis padres Anacleto y Guadalupe, siempre estaré agradecido por todo lo que han llegado hacer por mi desde darme las enseñanzas, los valores y virtudes que han permeado en mí y trato de hacer notar día con día esas enseñanzas; vivir con humildad, altruismo y empatía para algún día llegar a ser una persona buena, digna y noble.

Quisiera dar un agradecimiento adicional para mi padre Anacleto Sosa, una persona maravillosa tanto como investigador como también lo fue como persona, sé que ya no estarás ahí para escuchar las cosas que hago y mucho menos podré escuchar las mismas historias que contabas, nadie te prepara para afrontar la vida, pero tu si lo hiciste con cada prueba que me hiciste y en cada encrucijada en la cual fui sometido, recuerdo que una vez dijiste que si tu pudieras ser cualquier persona en el mundo quisieras ser Daniel Sosa, pero sin ti yo no sería nada, te amo papá y siempre será así.

A mis hermanos Carlos, Diana, Nadia y Brenda quienes estuvieron presentes toda mi vida, a quienes vi crecer y me vieron de igual manera, por esos buenos momentos y por estar presente en los peores. Les doy las gracias por enseñarme lo que es tener a las personas más inteligentes y humanas que alguna vez conocí. Aun cuando estemos lejos sé que nuestro vínculo trasciende la distancia y les deseo lo mejor porque los amo.

A Andrea Sarahi Juárez García la persona más importante en mi vida, por siempre apoyarme en mis decisiones, por hacerme ver los hechos de las situaciones que pasan en mi vida y no dejarme perder en mis indecisiones, por creer no solo en mis cualidades para el mundo profesional si no por creer en mí como persona y por brindarme su amor por todos estos años y enseñarme lo que significa amar a una persona de verdad.

A mis "Chemistree" Alex e Ita amistades que se han vuelto familia, nunca olvidare esos bellos momentos que vivimos a lo largo de este tiempo donde escuchamos

nuestros problemas, nos reímos de ellos y salimos de aventuras juntos, siempre las voy a llevar en mi corazón.

A mis amigos Carlos, Paul, Alejandro amigos que se convirtieron en hermanos que marcan tu vida a tal nivel que cuando los recuerdas te sacan una sonrisa.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Autónoma de Baja California, a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la UABC, así como a los profesores que tuve el gusto de conocer, por siempre brindarme las herramientas necesarias para poder ser un profesional capaz y competente.

Agradezco al Dr. Héctor Alfonso Magaña Badilla por darme la oportunidad de participar en un proyecto de investigación que se convirtió en una tesis, darme las herramientas y conocimientos que uno realmente no ve en la carrera y no solo eso también se ha convertido en una persona importante en mi vida ya que creyó y en mis capacidades cuando nadie lo hubiera hecho.

Agradezco a la Dra. Kenia Palomino Vizcaino. Por ser una persona muy amable y gentil conmigo en todo momento al estar trabajando en el proyecto de investigación, además de siempre esclarecer mis dudas de una forma muy amigable y amigable

Agradezco a todos mis amigos de posgrado, por ser unos mentores para mí y brindarme el conocimiento, los secretos y sus consejos para poder salir de los problemas e inquietudes que surgen en todos mis experimentos además por todos esos momentos en que las risas no faltaban y por estar ahí siempre que los necesito, porque más que unos amigos se han convertido en una familia para mí.

ÍNDICE

Capítulo I. INTRODUCCIÓN	9
I.1 Resumen.....	9
I.2 Planteamiento del problema	10
I.3 Justificación	11
I. 4 Hipótesis	12
I. 5 Objetivo general.....	12
I. 6 Objetivos específicos	12
Capítulo II. MARCO TEÓRICO	13
II.1 Polímero y monómero.....	13
II.2 Clasificación de los polímeros.....	14
II.3 Morfologías de polímeros.....	17
II.4 Síntesis de polímeros vía radicales libres	19
II.4 Profármaco	20
II.5 Polímero profármaco	21
II.6 Hidrogeles y sus características	23
II.7Tipos de liberación de fármacos	27
II.8 Liberación de fármacos a partir de hidrogeles	28
Capítulo III. Experimental	29
III.1 Equipos y Reactivos	29
A. Equipos	29
B. Reactivos, solventes y Gases	30
III.2 Síntesis del monómero ácido 2-metacrililoiloxibenzoico (MAOB).....	31
III.3 Síntesis del derivado de metacrililoiloxietilo de indometacina (MOEIN)	32
III.4 Caracterización de monómeros	33

III.4.1 Cromatografía en capa fina.	33
III.4.2 Espectrofotometría de infrarrojo con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR)	34
III.4.3 Resonancia magnética de protón (RMN-H)	34
III.5 Síntesis de hidrogel	34
III.5.1 Caracterización de hidrogeles	35
III.6 Estudio hidrólisis-liberación.....	35
III.6.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).....	35
III.6.1.1. Preparación de fase móvil	35
III.6.1.1.1. Preparación de solución estándar de ácido salicílico e indometacina	36
III.6.1.2 Condiciones cromatográficas.....	36
III.6.1.3 Análisis por medio de CLAR	36
III.7 Estudio de hinchamiento.....	37
III.8 Estudio viabilidad celular.....	37
Capítulo IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	40
IV.1 Síntesis del monómero ácido 2-metacrilóiloxibenzoico (MAOB)	40
IV.2 Síntesis del derivado de metacrilóiloxietilo de indometacina (MOEIN)	40
IV.3 Caracterización de monómeros	42
IV.3.1 Caracterización por FTIR-ATR de MOEIN	42
IV.3.2 Resonancia magnética de protón (RMN-H) de MOEIN.....	44
IV.3.3 Resonancia magnética de protón (RMN-H) de MAOB	45
IV. 4 Síntesis de hidrogel	46
IV.5 Caracterización de hidrogeles	47
IV.6 Estudio de hinchamiento	48
IV.7 Estudio hidrólisis-liberación	52
IV.8 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)	56
IV.8.1 Determinación de tiempos de retención	56

IV.9 Estudio viabilidad celular	57
Capítulo V. CONCLUSIONES.....	60
Capítulo VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y CIBERNÉTICAS.....	61

Lista de Figuras

Figura. - 1 Lista de moléculas con relación a su funcionalidad	14
Figura. - 2 Tipos de reacciones para síntesis de polímeros	16
Figura. - 3 Polímeros termoplásticos y termoestables con relación a estímulos térmicos.....	17
Figura. - 4 Arquitectura de polímeros.....	19
Figura. - 5 Etapas de reacción por polimerización vía radicales libres.....	20
Figura. - 6 Tipos de profármacos según su modelo de activación (Landis, 2013) ...	21
Figura. - 7 Métodos de síntesis de hidrogel	24
Figura. - 8 Esquema del diseño de hidrogeles de interacciones covalentes (Li & Mooney, 2016)	26
Figura. - 9 Esquema de hidrogeles de interacciones no covalentes (Li & Mooney, 2016).....	27
Figura. - 10 Reacción de síntesis de MAOB	32
Figura. - 11 Reacción de síntesis de MOEIN	33
Figura. - 12 Reducción de MTT a formazán por metabolismo mitocondrial	38
Figura. - 13 Mecanismo de reacción para síntesis de MAOB	40
Figura. - 14 Mecanismo de reacción para síntesis de MOEIN	41
Figura. - 15 Aspecto del MOEIN purificado	42
Figura. - 16 Espectros de infrarrojo de MOEIN	43
Figura. - 17 Espectros de infrarrojo de indometacina, HEMA y MOEIN	43
Figura. - 18 Espectro de RMN de MOEIN	44
Figura. - 19 Espectro de RMN de MAOB	45
Figura. - 20 Propuesta de molécula del hidrogel.....	46
Figura. - 21 Aspecto del hidrogel sintetizado	47
Figura. - 22 IR de los monómeros del hidrogel y del hidrogel sintetizado	48
Figura. - 23 Gráfica de hinchamiento con respecto al tiempo	49
Figura. - 24 Interacciones moleculares del hidrogel a diferentes pH.....	50
Figura. - 25 Hidrogeles a las 48 horas de hinchamiento	51

Figura. - 26 Hidrogeles a las 100 horas de hinchamiento	51
Figura. - 27 Hidrogel a las 192 horas tiempo final	52
Figura. - 28 Hidrólisis de fármacos de la matriz polimérica	53
Figura. - 29 Gráfico comparativo de liberación de ácido salicílico e indometacina a pH 7.4.....	54
Figura. - 30 Grafico de fracción de fármaco liberado	55
Figura. - 31 Cronograma de estándar dual	56
Figura. - 32 Cromatograma de la muestra de liberación tiempo 24h horas.....	57
Figura. - 33 Gráfica de viabilidad celular	58
Figura. - 34 Viabilidad de fibroblastos control y con hidrogel	58
Figura. - 35 Viabilidad de melanoma control y con hidrogel.....	59

Capítulo I. INTRODUCCIÓN

I.1 Resumen

En el presente trabajo de tesis se propone la síntesis de un copolímero entrecruzado usando monómeros funcionalizados con ácido salicílico e indometacina. El biomaterial obtenido fue un hidrogel el cual se estudió su comportamiento a estímulos fisiológicos de pH y temperatura e investigar su aplicación mediante estudios *in vitro*. Se realizó la síntesis de los metacrilato de ácido salicílico (MAOB) a partir de ácido salicílico y anhídrido metacrílico catalizado por DMAP por medio de una esterificación y metacrilato de indometacina (MOEIN) se obtuvo a partir de la síntesis de indometacina y HEMA usando como agente acoplante DCC catalizado por DMAP. Individualmente, se purificaron y caracterizaron mediante FTIR-ATR. La síntesis de hidrogel se realizó en proporciones 9:1 de MAOB y MOEIN respectivamente utilizando como solvente DMSO, como agente entrecruzante dimecrilato de etilenglicol (EGDMA) y Azobisisobutirilnitrilo (AIBN) como iniciador utilizando el método de polimerización por disolución vía radicales libres con ayuda de placas de vidrio con espaciadores de plástico. Los estudios de liberación se realizaron a condiciones fisiológicas de temperatura 37°C y pH 7.4 con tiempos de muestreo de 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168 horas. El estudio del grado de hinchamiento del hidrogel fue realizado con respecto al pH (1.2, 5.5, 7.4), por medio de cálculo gravimétrico se obtuvo el grado de hinchamiento cuyos resultados revelan que los hidrogeles son más sensibles a pH más altos (pH>7.4) se presenta una fase de transición de hinchamiento, mientras que a pH 1.2 no se presenta, por otro lado, los hidrogeles pH 5.5 presentan un ligero hinchamiento mostrando que los hidrogeles son pH sensibles. Por medio del estudio de cromatografía de líquidos de alta resolución se comparó una muestra con un estándar de referencia de ácido salicílico e indometacina las muestras de liberación, esto con fines de determinar las concentraciones de la liberación además de confirmar que así se liberara los fármacos. Haciendo uso de la metodología MTT se realizaron pruebas de viabilidad celular en fibroblastos y en melanomas donde la viabilidad celular en fibroblastos fue de 88% y de melanoma 70

de manera que los hidrogeles son citotóxicos para las células de melanoma, pero no para las células de fibroblastos.

I.2 Planteamiento del problema

En el proceso de cicatrización de heridas existen cuatro fases, que son hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación (Farnaz Esmaeili. 2015). La fase inflamatoria implica la activación del sistema inmunitario innato, los neutrófilos y los monocitos son las principales células que migran rápidamente al sitio de la herida tras la lesión. Consiste principalmente en la permeabilidad vascular, la migración activa de células sanguíneas y el paso de constituyentes del plasma al tejido lesionado (Holzer-Geissler et al., 2022).

Debido a que los macrófagos y neutrófilos secretan muchas especies reactivas de oxígeno en la etapa de inflamación provoca como consecuencia el daño los tejidos o deteriora la función de los queratinocitos y los fibroblastos (Huang et al., 2021). Un inconveniente de la inflamación es que a menudo provoca un cambio en el pH de la herida, lo cual en ocasiones puede llegar a resultar en el retraso de la cicatrización de heridas y complicaciones en casos extremos. Por lo tanto, es crucial prevenir la inflamación de la herida. El nivel de inflamación puede revelar tanto el tiempo de curación como la calidad de la reparación. Por el contrario, la inflamación fuerte es responsable del retraso en la cicatrización de heridas en pacientes crónicos (Holzer-Kessler et al., 2022; Chucla et al., 2019; Schilrreff & Alexiev, 2022).

Las nuevas terapias pueden centrarse en lograr un equilibrio de fase inflamatoria en la cascada de curación al atenuar el daño de la inflamación conservando sus aspectos beneficiosos que facilitará la reparación del tejido. La liberación controlada de fármacos antiinflamatorios es una estrategia que se podría explorar para tratar de atenuar y equilibrar el proceso inflamatorio para realizar la regulación negativa de la inflamación temprana (Zhu et al., 2022).

Una de las principales preocupaciones de la atención de la salud es la incidencia y la carga de la herida, en 2018 más de 8,2 millones de personas sufrieron heridas en los EE. UU. y el costo de la atención osciló entre 28,1 y 96,8 mil millones de dólares. El tamaño del mercado mundial del cuidado de heridas se valoró en USD 18 400 millones y se espera que crezca a una tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR) del 3,9 % entre 2019 y 2026. Las heridas crónicas representan un gasto de más de

25 000 millones de USD al año y afectan a más de 6,5 millones de personas solo en los EE. UU (Monika et al., 2022).

A medida que crece la población y las personas viven más tiempo, se espera que aumenten los costos y el número de pacientes, afectando a alrededor de $\frac{1}{4}$ de la población de edad avanzada para 2050. Los avances en el cuidado de heridas durante el último siglo han sido muy lentos. Un conocimiento más profundo de la estructura anatómica y la función de la piel durante la cicatrización de heridas crónicas es esencial para el tratamiento de heridas crónicas. Además, sigue siendo un gran desafío encontrar un nuevo tratamiento para las heridas crónicas (Schilrreff & Alexiev, 2022).

I.3 Justificación

En relación con el planteamiento del presente problema, al tener evidencia que los polímeros con respuesta a estímulos pueden ser una buena opción para el uso de formulaciones tópicas ya que estos tendrían una aplicación en el sitio específico donde se quiere llevar a cabo el efecto terapéutico reduciendo el proceso de inflamación agudo y por consiguiente generando las condiciones de homeostasis para el proceso de reparación del tejido.

En los últimos años ha cobrado importancia buscar diversas estrategias para el diseño de fármacos con un enfoque de respuesta a estímulos químico / bioquímico para superar varias barreras que obstaculizan la administración de fármacos haciendo en el proceso fármacos para esa labor (Huang et al., 2021; Farnaz Esmaeili. 2015 ; Zhu et al., 2022).

Está documentado que los profármacos poliméricos o el conjugado polímero-fármaco son técnicas eficaces para el uso mejorado de fármacos para posibles nuevas aplicaciones terapéuticas. Los fármacos que están conjugados con polímeros generalmente exhiben mayor estabilidad, una vida media prolongada, menor inmunogenicidad y antigenicidad, solubilidad en agua, direccionamiento específico a tejidos o células entre otras propiedades. Los polímeros cumplen con la función de ser un vehículo del fármaco para la administración (Huang et al., 2021; Zhu et al., 2022).

I. 4 Hipótesis

Se podrían sintetizar y desarrollar hidrogeles copolimerización a partir del monómero ácido 2- metacrililoioxibenzoico (MAOB) y metacrililoioxietilo de indometacina (MOEIN), para evaluar su capacidad como matriz de respuesta a estímulos fisiológicos (pH y temperatura), para el cargado y liberación de ácido salicílico e indometacina, que podría brindar una alternativa en la industria farmacéutica como sistema liberación de activos estímulo sensible.

I. 5 Objetivo general

Sintetizar y caracterizar, un nuevo hidrogel copolimerizado sensible a estímulos del pH, a partir de un monómero derivado de ácido salicílico y otro de indometacina. Estudiar las propiedades del hidrogel, mediante experimentos de variación de pH para las pruebas de hinchamiento, además estudiar la hidrólisis/liberación *in vitro* bajo condiciones fisiológicas de pH 7.4 y temperatura.

I. 6 Objetivos específicos

- 1.- Sintetizar y purificar los monómeros de ácido 2-metacrililoioxibenzoico (MAOB) y metacrililoioxietilo de indometacina (MOEIN).
- 2.- Caracterizar los monómeros sintetizados a través de cromatografía de capa fina y espectrofotometría de infrarrojo con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR).
- 3.- Sintetizar el hidrogel a partir de los monómeros de MAOB y MOEIN mediante disolución vía radicales libres, en forma de lámina en placas de vidrio.
- 4.- Caracterizar el hidrogel sintetizado por espectrofotometría de infrarrojo con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR).
- 5.- Estudiar el comportamiento de hinchamiento del hidrogel con relación a las variaciones de pH.
- 6.- Realizar estudios de hidrólisis /liberación *in vitro* en condiciones fisiológicas de pH y temperatura simuladas, cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).
- 7.- Realizar estudios en cultivo celular con células de cáncer de melanoma y fibroblastos por medio del método MTT.

Capítulo II. MARCO TEÓRICO

II. 1 Polímero y monómero

En los últimos cien años los polímeros han tenido una gran importancia por su amplia aplicación en diferentes sectores industriales tales como en el área de la medicina, aeroespacial, automotriz, construcción, agricultura, biomateriales, etc. (Rogel Hernández Eduardo, 2020).

El término **polímero** se refiere por definición a unas macromoléculas formadas a partir de una serie de bloques, llamados **monómeros**, generalmente conectados por enlaces covalentes por lo cual dichas macromoléculas son de alto peso molecular. El prefijo "poli" viene de la palabra griega para "muchos", por otro lado, prefijo griego "mono" significa "único" y se refiere aquí a un solo bloque o la molécula más pequeña usada como material de inicio de un polímero (Rogel Hernández Eduardo, 2020; Koltzenburg et al., 2017).

Partiendo del hecho de que un monómero es la unidad o unidad más pequeña usada para formar un polímero es necesario saber cuándo una molécula puede ser un monómero, por consiguiente, un monómero debe poder formar de dos a más enlaces covalentes a esta cualidad se le denomina funcionalidad (f) donde dicha funcionalidad está relacionada a los grupos funcionales de la molécula y su capacidad de reaccionar para formar enlaces con otra molécula (Rogel Hernández Eduardo, 2020). Se pueden tener moléculas cuya f sea (*Figura. - 1*):

- **$f=1$ Monofuncional:** Formación de dímeros.
- **$f=2$ Bifuncional:** Formación de polímeros lineales.
- **$f>2$ Polifuncional:** Formación de polímeros ramificados o polímeros entrecruzados.

Gran parte de los monómeros cuentan con más de un grupo funcional y esto permite la posibilidad de generar polímeros por una variedad de métodos de reacción distintos. Dependiendo de la funcionalidad de dicho monómero podemos tener diferentes tipos de polímeros desde lineales, ramificados, dendrímeros, en estrella hasta entrecruzados (Rogel Hernández Eduardo, 2020;Koltzenburg et al., 2017).



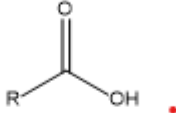

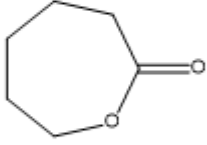
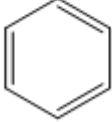


Grupo funcional	Funcionalidad
	f=2
	f= 2
	f=1
	f=1
	f=2
	f=3
	f=2
	f=4

Figura. - 1 Lista de moléculas con relación a su funcionalidad

II. 2 Clasificación de los polímeros

Al existir una gran variedad en la forma en la que se puede presentar los polímeros se han propuesto diferentes formas en la cual se pueden clasificar los polímeros que pueden partir dependiendo por:

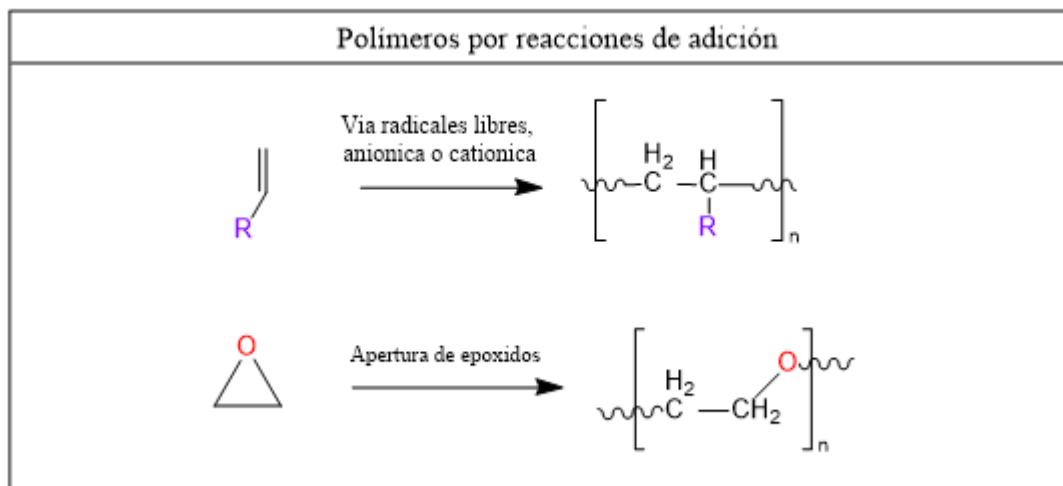
Por su origen: En esta clasificación pueden existir tres tipos de polímeros los cuales son los de origen **natural, sintético o semisintético**. Se le considera como naturales a todos aquellos se generan por organismo vivos en los cuales se pueden mencionar los polisacáridos tales como la celulosa o el almidón. Por otro lado, los polímeros sintéticos son todos aquellos que se pueden obtener de manera artificial por

reacciones químicas in vitro en un laboratorio como pueden ser, polímeros vinílicos, poliamidas, poliésteres o poliuretano entre otros (Rogel Hernández Eduardo, 2020;Koltzenburg et al., 2017).

Por estructura: de acuerdo a su arreglo molecular las estructuras de un polímero pueden ser de manera lineal (se repite el mismo tipo de unión), ramificada (presencia de cadenas laterales unida a la principal) entre los cuales pueden entrar los dendrímero (es una macromolécula tridimensional de construcción arborescente) y en forma de estrella, otra de las formas en la que se pueden presentar los polímeros en redes tridimensionales o entrecruzados (unión de dos cadenas vecinas mediante un tipo de enlace).

Método de síntesis: Por condensación o adición

Los métodos de síntesis son otras de las clasificaciones por las cuales se pueden clasificar y diferenciar los polímeros dependiendo de la forma en que se construyan las cadenas poliméricas en el curso de la poli reacción de los monómeros, se puede distinguir entre crecimiento escalonado y reacciones de crecimiento en cadena estos métodos son en base a las reacciones de adición y de condensación (Figura. - 2) (Rogel Hernández Eduardo, 2020;Koltzenburg et al., 2017).



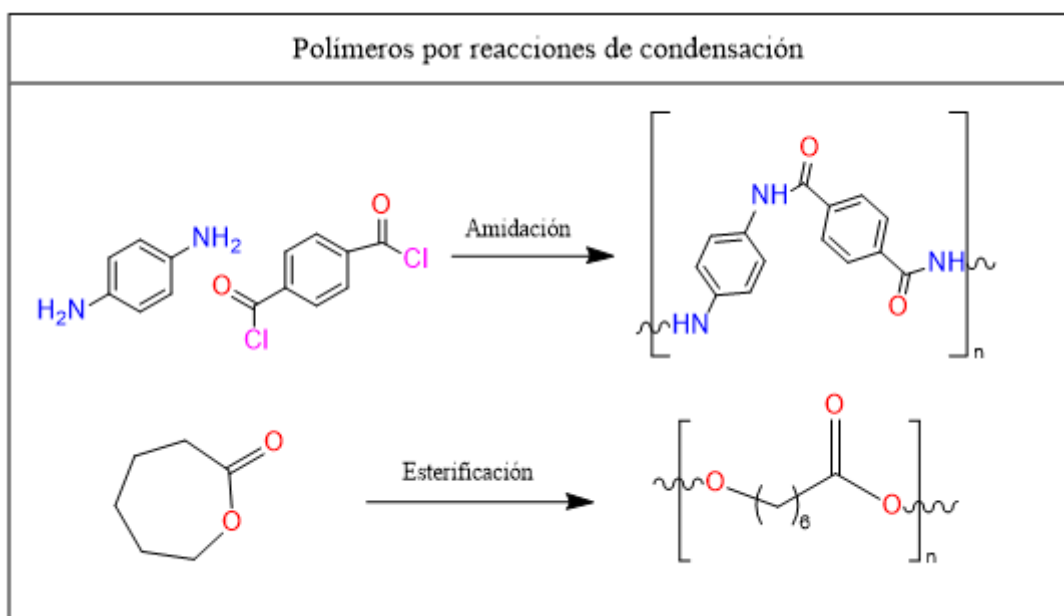


Figura. - 2 Tipos de reacciones para síntesis de polímeros

Los polímeros por el método de síntesis por reacciones de adición también conocidos como polimerizaciones de crecimiento en cadena, en estas las unidades poliméricas de monómero van reaccionando una a la vez al formar un enlace en este proceso de reacción se da a tres etapas distintas de la reacción (Rogel Hernández Eduardo, 2020;McKeen, 2016).

- **Iniciación:** En esta etapa se genera la especie reactiva por medio de un catalizador (en las cuales se puede elegir formar un radical libre, carbocatión o carbanión) el cual comenzará a interactuar con el monómero pasando dicha especie reactiva.
- **Propagación:** Los monómeros a medida que pasa el tiempo van agregando a la cadena polimérica creando así un sitio activo para la siguiente unión del monómero, esta es la etapa más larga de la reacción.
- **Terminación:** Las especies reactivas formadas al alcanzar cierto tiempo comenzarán a neutralizarse deteniendo el proceso de la propagación.

El método de síntesis de polímeros por reacciones de condensación (también llamado por crecimiento escalonado) al reaccionar las unidades monoméricas y los grupos terminales su crecimiento tenderán a liberar una molécula pequeña que en cuyo caso puede ser agua, para este caso las moléculas monoméricas del polímero tendrán dos

grupos funcionales por cada molécula de reacción las cuales pueden ser ácidos carboxílicos, halogenuros de acilo, alcoholes, aminas, etc. Teniendo un extremo reductor y uno no reductor. Esta reacción es de tipo reversible y alcanzará el equilibrio, se detendrá a menos que se elimine este pequeño subproducto molecular. Los poliésteres y las poliamidas se encuentran entre los plásticos fabricados mediante este proceso (Rogel Hernández Eduardo, 2020; McKeen, 2016).

Por comportamiento físico: También se pueden subdividir por su comportamiento físico entre los cuales se encuentran los Termoplásticos y los termofijos. Los polímeros termoplásticos son todos aquellos que puedan ablandarse, fundirse o son maleables al calentarse además de ello estos podrán disolverse usando el solvente adecuado. A diferencia de los termoplásticos los polímeros termofijos no pueden fundirse debido a su estructura molecular, dicha estructura es tridimensional o altamente entrecruzada por lo cual una vez sintetizados estos no podrán resolver en los solventes y solo sufrirán de un proceso de hinchamiento o descomposición en caso de tener un estímulo térmico (Figura. -3) (Rogel Hernández Eduardo, 2020; Gedde & Hedenqvist, n.d.).

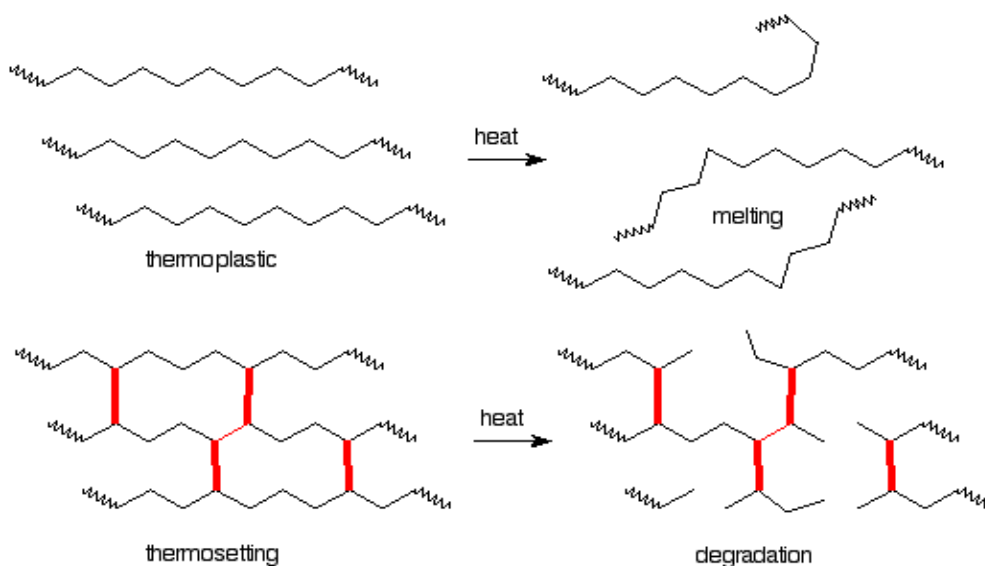


Figura. – 3 Polímeros termoplásticos y termoestables con relación a estímulos térmicos (Gedde & Hedenqvist, n.d.)

II. 3 Morfologías de polímeros

La arquitectura de los polímeros se relaciona con la forma en que la polimerización conduce a una desviación de una cadena polimérica. Dependiendo de la estructura

del monómero y del método de polimerización empleado, las cadenas de polímeros pueden mostrar diferentes arquitecturas. Si los segmentos están conectados a través de los átomos de carbono, entonces resulta una cadena polimérica lineal. Una cadena de polímero puede tener segmentos que se ramifican fuera de la columna vertebral de carbono principal. Esta estructura se denomina cadena polimérica ramificada. La siguiente figura muestra el caso del polietileno de baja densidad (Rogel Hernández Eduardo, 2020; Koltzenburg et al., 2017; McKeen, 2016).

La arquitectura de los polímeros se puede clasificar por medio de cómo se establece la estructura al finalizar la polimerización, entre los cuales se encuentran (Figura. -4):

- Lineal. – Estructura donde la cadena polimérica crece de manera lineal sin sufrir ningún tipo de ramificación, se obtiene usando monómeros de $f=2$
- Ramificados. – Estructura donde predomina un crecimiento lineal, pero se puede ramificar en ciertas regiones donde tendrá un crecimiento en menor proporción, se pueden usar copolímeros donde se presente uno de $f=2$ y el otro de $f=3$ o bien por polímeros de injerto.
- Dendrímero. – Consisten en moléculas con una forma aproximadamente esférica en el cual el crecimiento consta de un monómero con una $f>5$ donde el crecimiento nace del centro hacia afuera
- Entrecruzado. – Se le conoce como un polímero entrecruzado o reticulado debido a que tienen cadenas de átomos cortos que sirven como conectores entre las cadenas poliméricas más largas.

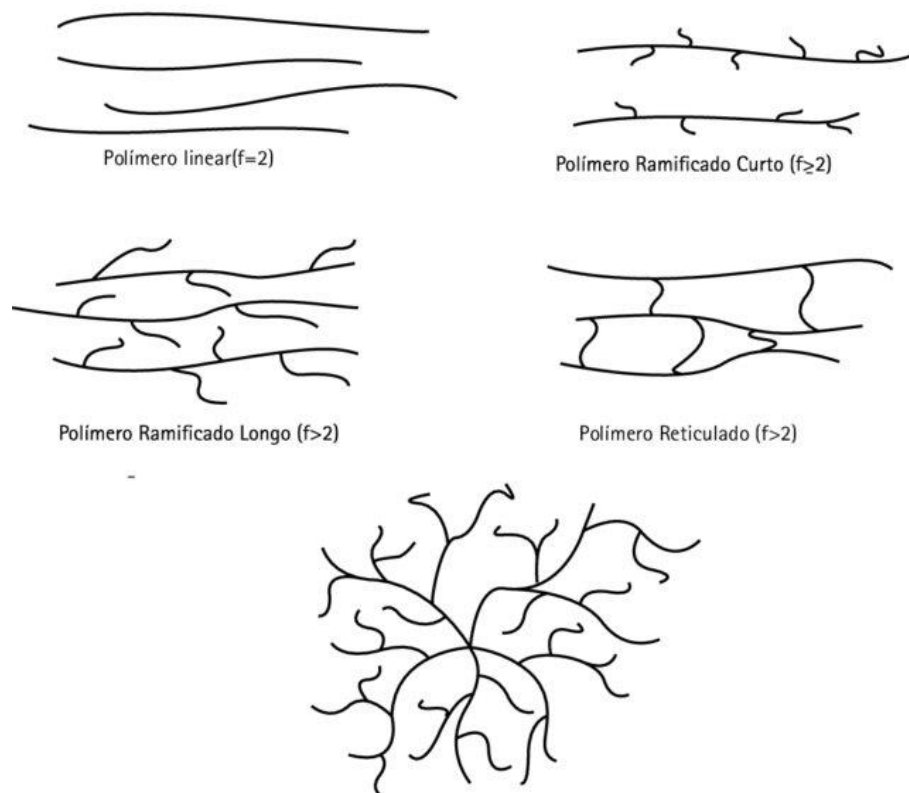


Figura. – 4 Arquitectura de polímeros (McKeen, 2016)

II. 4 Síntesis de polímeros vía radicales libres

La polimerización vía radicales libres es uno de los métodos de síntesis para generar polímeros más versátiles y estudiados debido a la facilidad en la cual se pueden dar las condiciones reacción se basa en compuestos que tienen un enlace covalente inestable que puede disociarse en dos radicales (Gedde & Hedenqvist, 2017.). Los elementos que conforman la reacción son un iniciador, el monómero o los monómeros y un solvente adecuado (Figura. -5). (Rogel Hernández Eduardo, 2020; Gedde & Hedenqvist, 2017).

- **Iniciación:** En esta etapa los radicales formados por la descomposición del iniciador reaccionan con compuestos insaturados. En este proceso, el radical se mueve desde el fragmento iniciador al monómero formando un enlace covalente y generando un radical en el monómero.
- **Propagación:** El oligómero radicalizado reacciona rápidamente con la gran cantidad de moléculas monoméricas disponibles, dicha etapa de reacción es la etapa más larga de la polimerización.

- **Terminación:** Posterior a la propagación, dos radicales de moléculas poliméricas se encuentran y se combinan en un enlace covalente para finalizar la reacción, en dicho proceso puede ocurrir el caso de terminar por acoplamiento o desproporción.

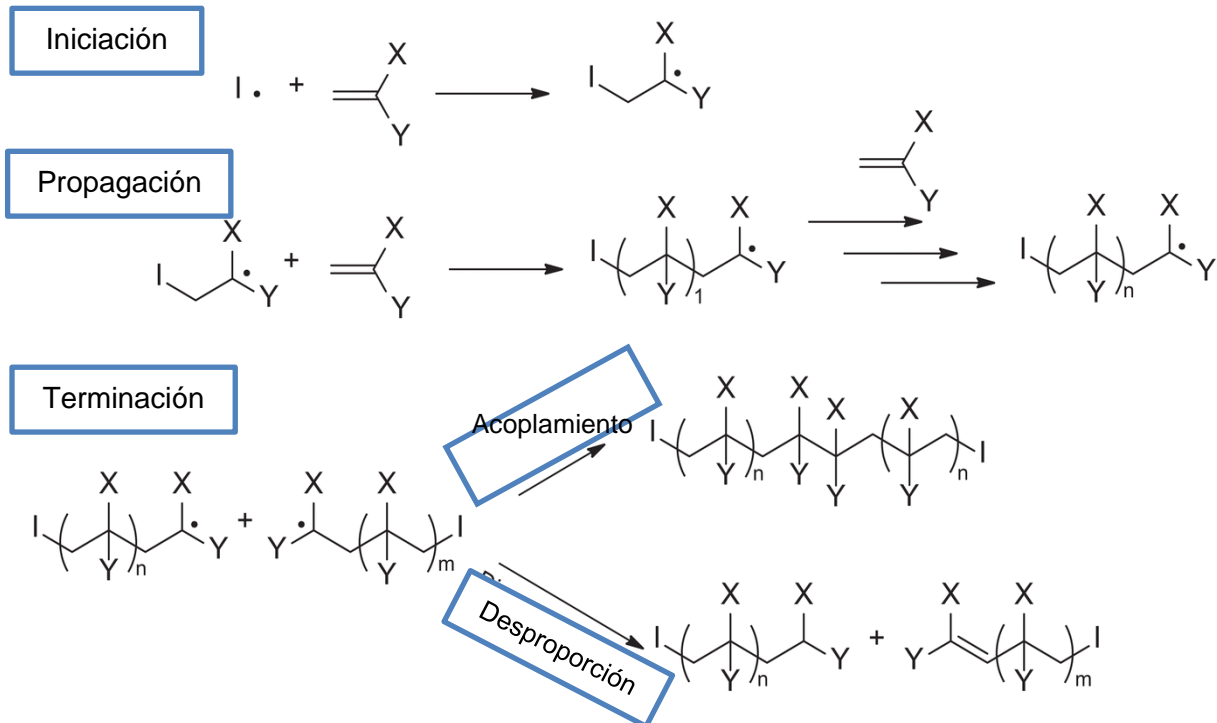


Figura. – 5 Etapas de reacción por polimerización vía radicales libres

II. 4 Profármaco

Los profármacos son derivados de fármacos inactivos y de carácter bioreversibles, que tienen la capacidad de convertirse en el fármaco original en el organismo de acuerdo con la orientación del diseño del profármaco (Markovic et al., 2020). Actualmente se emplean varias estrategias en el enfoque del diseño de los profármacos. El más común es hacer que sea susceptible a regresar a su forma activa mediante ayuda enzimática por medio de la funcionalización con un grupo que se puede escindir para producir la forma activa (Najjar & Karaman, 2019).

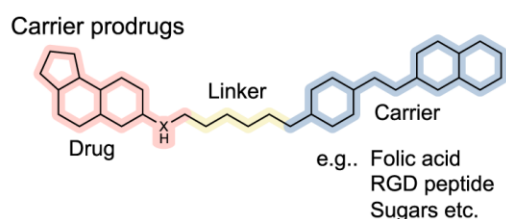
La finalidad de los enfoques del desarrollo de un profármaco es superar obstáculos de carácter biofarmacéuticos, farmacocinéticos o farmacodinámicos, que pueden englobar estabilidad química deficiente, limitaciones de solubilidad, falta de especificidad de sitio, metabolismo extenso del fármaco, paso a través de barreras biológicas, explotación de vías metabólicas endógenas, toxicidad u obstáculos de

cumplimiento, todo a favor de una biodisponibilidad en la liberación de forma óptima para poder llevar a cabo el efecto terapéutico deseado (Markovic et al., 2020; Najjar & Karaman, 2019).

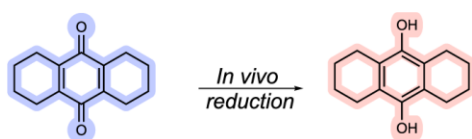
La categorización general de los tipos de profármacos se puede realizar a través de su vía de activación como son activa de forma natural o externa (Figura. -6) (Landis, 2013). A partir de su vía de activación se han identificado y desarrollado varios tipos de fármacos dependiendo de sus mecanismos de activación, el cual puede ser por activación fisiológica o de activación externa. Hablando de la activación fisiológica se divide en fármacos de tipo portador y bioprecursor. En estos casos la activación de moléculas bioactivas se basa en mecanismos internos, como enzimas naturales o entornos celulares específicos como podría ser dependientes del pH, especies reactivas de oxígeno entre otros estímulos de carácter fisiológico. Estos tipos de profármacos están diseñados para que los grupos funcionales relevantes como son $-NH_2$, $-OH$ o $-COOH$ de moléculas bioactivas están enmascaradas y luego se pueden escindir en presencia de un activador externo (Nasibullin et al., 2022).

a Types of Prodrug

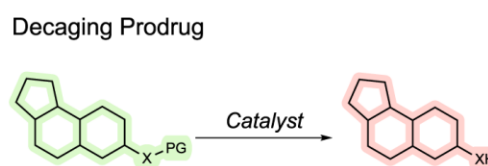
o Physiologically activated



Bioprecursor prodrugs



o Externally activated



Synthetic Prodrug (*This work*)

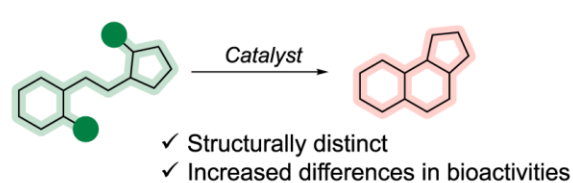


Figura. – 6 Tipos de profármacos según su modelo de activación (Landis, 2013)

II. 5 Polímero profármaco

A la unión covalente de un fármaco con una estructura polimérica se le denomina como “profármaco polimérico”. Se tiene entendido que el profármaco es una forma

inactiva de un fármaco pero que puede ser convertido en su forma activa por las condiciones específicas en el sitio objetivo (Gao, 2018; Walther et al., 2017).

El profármaco polimérico se puede considerar como un sistema de administración de fármacos que posee sus actividades terapéuticas mediante la liberación de moléculas de fármaco de la cadena de polímero durante un período prolongado de tiempo. (Bahram et al., 2016). El polímero funciona como vehículo que transporta al fármaco para su posterior liberación frente a un estímulo fisiológico.

Estos nuevos sistemas de administración macromolecular que utilizan polímeros como profármacos se han desarrollado para reducir los efectos en el sitio al mismo tiempo aumentar la eficacia de muchos de los fármacos respectivos que son populares en el uso clínico. El fármaco debe permanecer unido al polímero hasta que esta macromolécula alcance el sitio objetivo. Por lo tanto, el fármaco elegido debe ser potente e intacto hasta que alcance el objetivo. Además, debe tener un grupo funcional para unirse directamente con el esqueleto del polímero (Gao, 2018). Los requisitos para seleccionar polímeros como portadores de fármacos son:

- **Disponibilidad de grupos funcionales:** adecuados -COOH, -OH, -SH o -NH₂ para acoplamiento covalente con fármacos.
- **Biocompatibilidad:** Preferiblemente no tóxico, no inmunogénico.
- Biodegradabilidad o peso molecular por debajo del límite de excreción renal.
- **Disponibilidad:** Fabricado de forma reproducible y convenientemente administrado a los pacientes.
- **Solubilidad en agua:** Hidrófilo para garantizar la solubilidad en agua.
- **Baja polidispersidad:** para asegurar una aceptable homogeneidad de los conjugados finales.

Clasificación de los polímeros utilizados para la bioconjugación:

- **Polímeros sintéticos:** Los polímeros sintéticos se pueden usar ampliamente porque las propiedades de estas moléculas se pueden modificar al variar sus estructuras. Los polímeros comúnmente utilizados de esta clase son polietilenglicol (PEG), polímeros de vinilo y copolímero de anhídrido/ácido diviniletermaleico (DIVEMA), etc.

- **Polímeros naturales:** Dextrano, Chitosan, Proteínas y Pullulan.
- **Polímeros pseudosintéticos:** Poli(α -aminoácidos) sintéticos y Ácido poliglicólico (PGA).

II. 6 Hidrogeles y sus características

Los hidrogeles son macromoléculas poliméricas que están compuestos por una red de polímeros reticulados con gran cantidad de retener agua (Li & Mooney, 2016). Su peculiar estructura en forma de malla reticulada tridimensional, tienen la tendencia de absorber cantidades considerables de agua dentro de sus intersticios y seguir reteniendo mientras mantienen la estructura de la red en estado hinchado (Bahram et al., 2016).

La capacidad de retener agua de los hidrogeles se debe a la disponibilidad grupos funcionales de carácter hidrofílicas polares, entre los cuales se pueden encontrar SO_3H , OH , NH_2 , COOH , CONH_2 , etc. A lo largo de la red polimérica como grupos ramificados (Bashir et al., 2020). Para que un hidrogel absorba agua ocurre una transición de fase de volumen significativa o transición de fase gel-sol en respuesta a ciertos estímulos físicos y químicos. Los estímulos físicos incluyen temperatura, campos eléctricos y magnéticos, composición de solventes, intensidad de luz y presión, mientras que los estímulos químicos o bioquímicos incluyen pH, iones y composiciones químicas específicas (Bahram et al., 2016).

Estos materiales se pueden clasificar en dos categorías de acuerdo su tipo de entrecruzamiento, en esta clasificación están “los hidrogeles físicamente entrecruzados” y “los hidrogeles químicamente entrecruzados” (Figura. -7) (Qureshi et al., 2019; Bustamante-Torres et al., 2021; George et al., 2020).

Hidrogeles físicamente entrecruzados:

La forma en la que se genera el entrecruzamiento de este tipo de hidrogel está determinada por las interacciones intermoleculares de atracción que se presentan en la macromolécula estas fuerzas son a menudo puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, interacciones puente de hidrógeno, electrostáticas y formación cristalina. Se experimenta un arreglo tridimensional, pero en este tipo de moléculas el entrecruzamiento es carente de uniones covalentes.

Hidrogeles químicamente entrecruzados:

Los hidrogeles de este tipo tienen un arreglo tridimensional derivado de un agente entrecruzante que unirá secciones de un polímero, al entrecruzante se formará enlaces covalentes y puede ser un entrecruzante molecular, por medio de un polímero híbrido con regiones terminales reactivas, agentes fotosensibles y entrecruzamiento mediado por enzimas, el resultado generará una red polimérica permanente a menos que se poseen enlaces covalentes fácilmente hidrolizables.

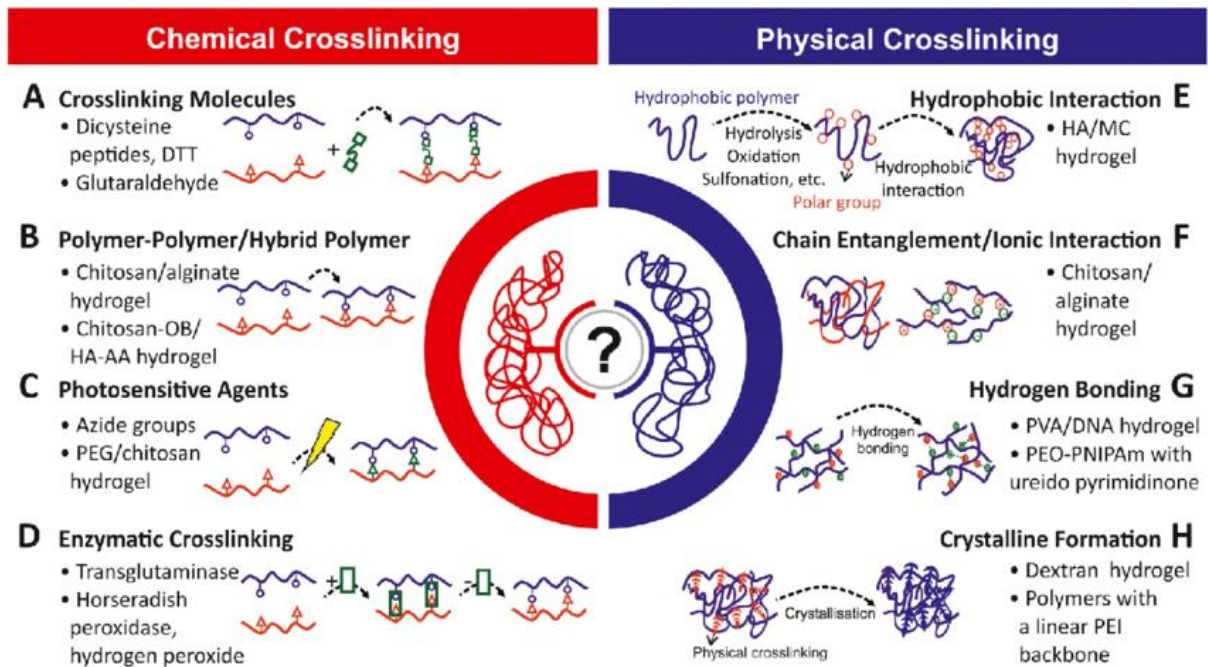


Figura. – 7 Métodos de entrecruzamiento hidrogeles (George et al., 2020)

Hidrogeles profármacos e Interacciones fármaco-polímero

Otro enfoque para controlar liberación de fármacos de hidrogeles es diseñar enlaces químicos entre el fármaco y las cadenas poliméricas. En esta estrategia, las interacciones de afinidad moderada a alta ralentizan efectivamente y, en algunos casos, terminan la difusión del fármaco a través de la red. Esta estrategia es particularmente importante cuando se van a administrar fármacos pequeños (es decir, por debajo del rango ajustable del tamaño de malla), porque de lo contrario se liberarán en un período muy corto. Para lograr interacciones de alta afinidad, se pueden usar varias interacciones químicas y físicas, que van desde la conjugación covalente hasta interacciones secundarias, como interacciones electrostáticas y asociaciones hidrofóbicas (Li & Mooney, 2016; Chai et al., 2017).

Enlace covalente

Para los hidrogeles de interacción covalente es necesario formar un enlace covalente entre el fármaco y el polímero, dicho enlace puede ser muy estables o escindibles (Figura. -8) (Li & Mooney, 2016).

- **Altamente estables:** Los enlaces covalentes altamente estables retienen el fármaco hasta que la red se degrada, Los de alta estabilidad en el tiempo incluyen enlaces amida, enlaces de tioeno, tioester.
- **Escindible o hidrolizable:** Los enlaces covalentes escindibles, al igual que los enlaces cruzados escindibles en redes degradables, se pueden programar para escindirse con el tiempo o en respuesta a señales ambientales. Los fármacos se liberan a una velocidad dictada por la escisión de los enlazadores, Los enlaces covalentes escindibles van desde moléculas pequeñas enlaces, incluidos enlaces éster, enlaces disulfuro y βeliminación enlaces escindibles.

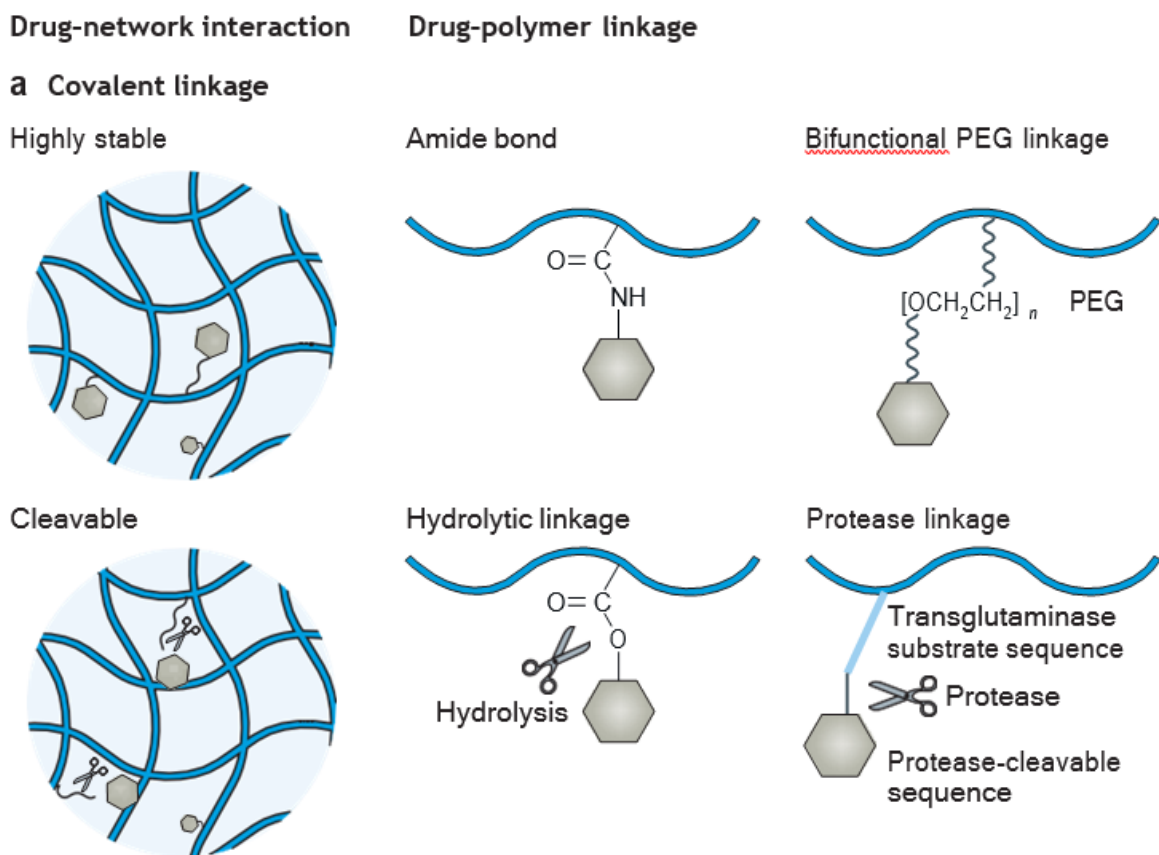


Figura. – 8 Esquema del diseño de hidrogeles de interacciones covalentes (Li & Mooney, 2016)

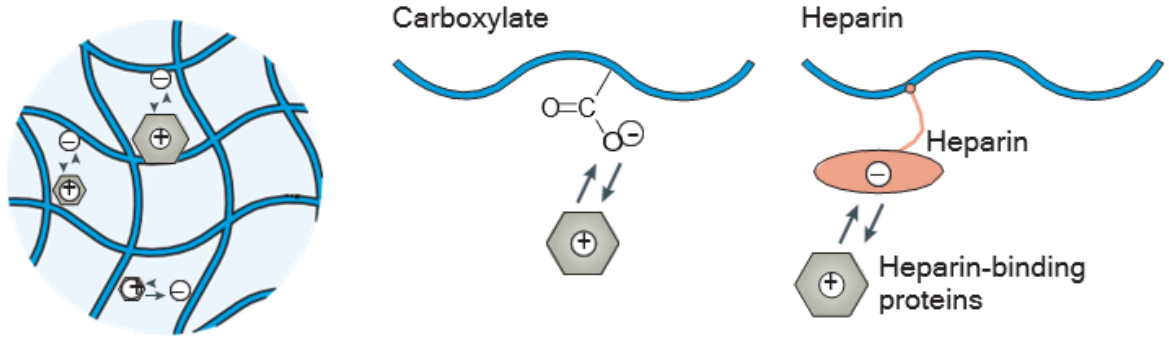
Interacciones no covalentes

En este tipo de hidrogel el cargado del fármaco no depende de la formación covalentes entre el fármaco y el polímero si no que se basa de interacciones de tipo iónicas o de interacciones hidrofóbicas (Figura).

- **Interacciones electrostáticas** Este mecanismo consiste en la interacción no es específica entre el fármaco ionizado y la cadena polimérica, puede permitir la entrega controlada y simultánea de varios fármacos desde un único sistema. Los fármacos se liberan cuando el hidrogel se degrada o cuando la interacción electrostática es apantallada por iones móviles del medio ambiente.
- **Asociaciones hidrofóbicas** Este tipo de hidrogel consiste en una porción del polímero que sea hidrofóbico para que permita la encapsulación del fármaco por medio de interacciones hidrofóbicas, Los enfoques típicos para

agregar dominios hidrofóbicos en hidrogeles incluyen la copolimerización de monómeros hidrofóbicos y la incorporación de moléculas hidrofóbicas.

b Electrostatic interaction



c Hydrophobic association

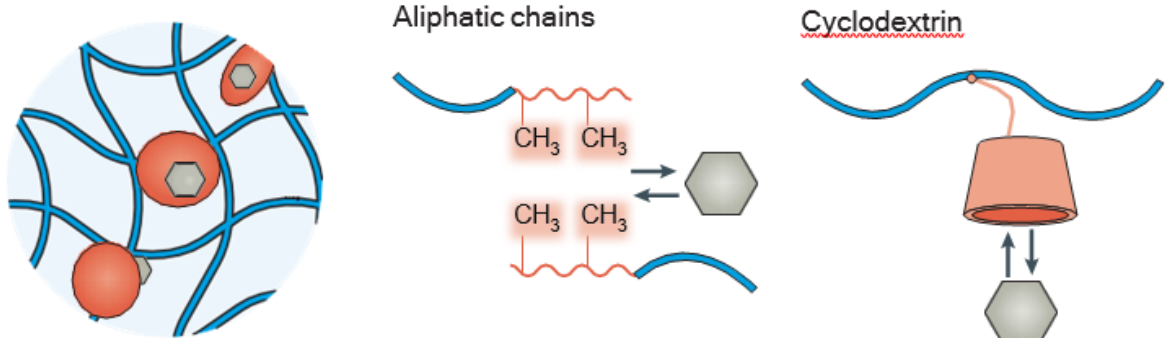


Figura. – 9 Esquema de hidrogeles de interacciones no covalentes (Li & Mooney, 2016)

II. 7 Tipos de liberación de fármacos

El sistema de administración de fármacos permite la liberación del ingrediente farmacéutico activo para lograr una respuesta terapéutica deseada. Los sistemas de administración de fármacos convencionales (Adepu & Ramakrishna, 2021). Algunas de las formas farmacéuticas diseñadas, presentan diferente tipo de liberación, las cuales dependerán del material o metodología utilizada para desarrollarlas, brindando más opciones al momento de seguir un tratamiento farmacológico, adaptándose a cada tipo de necesidad (George et al., 2020; Ramirez et al., 2016).

El objetivo final de cualquier sistema de administración es extender, confinar y orientar el fármaco en el tejido enfermo con una interacción protegida. Cada forma de

dosificación es una combinación de fármaco/ingredientes farmacéuticos activos (Adepu & Ramakrishna, 2021).

Los sistemas de administración controlada de medicamentos se desarrollan para combatir los problemas asociados con la administración convencional de medicamentos. Ha habido una enorme evolución en los sistemas de administración controlada de fármacos en las últimas dos décadas, desde macroescala y nanoescala hasta administración dirigida inteligente (Adepu & Ramakrishna, 2021; Ramirez et al., 2016).

II. 8 Liberación de fármacos a partir de hidrogeles

Los hidrogeles, como clase importante de biomateriales, pueden definirse como sistemas coherentes compuesto por una red polimérica tridimensional, que contiene una gran cantidad de fases que no pueden disolver la red a través de interacciones físicas y químicas debido a la presencia de interconexiones, llamadas enlaces cruzados (Bordbar-Khiabani & Gasik, 2022).

Estos materiales son atractivos sistemas de administración de fármacos para tratar problemas de cardiología, la oncología, la inmunología, la curación de heridas y el tratamiento del dolor (Li & Mooney, 2016). El alto contenido de agua típicamente 70-99% proporciona similitud física a los tejidos y puede dar a los hidrogeles una excelente biocompatibilidad y la capacidad de encapsular agua fácilmente por grupos hidrófilos. Debido a que normalmente se forman en soluciones acuosas, se minimiza el riesgo de desnaturalización y agregación del fármaco tras la exposición a disolventes orgánicos (Dreiss, 2020; Li & Mooney, 2016).

Uno de los materiales más utilizados para generar este tipo de liberación son los hidrogeles, denominados “materiales inteligentes” por su capacidad de respuesta ante un medio acuoso. (Bustamante-Torres et al., 2021)

Un hidrogel funciona como una matriz que encapsula fármacos manteniéndolo aislado del medio de manera que protege a dicho fármaco hasta que presentado el estímulo adecuado comenzará su proceso de hinchamiento y al absorber el agua el fármaco encapsulado podrá ser liberado y difundirlo en el sitio (Ramirez et al., 2016).

La matriz del hidrogel forma un frente de hinchamiento, provocando en cuestión una interface entre el polímero no hidratado que se encuentra en el interior de la matriz

polimérica y el polímero hidratado gelificado, el fármaco al encontrarse inmóvil en las regiones internas del hidrogel al pasar por la hidratación estas se difundirán por el medio acuoso en el estado de relajación del hidrogel (Li & Mooney, 2016; Sun et al., 2020).

Estas matrices poliméricas son idóneas para generar un sistema dirigido y específico ya que, dependiendo del tipo de polímero utilizado para su síntesis, se pueden generar diversos tipos de matrices que respondan a diferentes estímulos fisiológicos (Ramirez et al., 2016).

Estos materiales son idóneos para generar sistemas dirigidos y de carácter específico, dependiendo de las propiedades del polímero utilizado se pueden generar diversos tipos de matrices que respondan a diferentes estímulos fisiológicos. La liberación de los fármacos en dependiente de matrices poliméricas está relacionada con el hinchamiento del hidrogel además de la velocidad de difusión que presenta el fármaco (Bashir et al., 2020).

En la presente investigación está orientado a la síntesis de monómero profármacos derivados de indometacina y ácido salicílico los cuales son antiinflamatorios no esteroideos para generar hidrogeles de copolímeros entrecruzados con respuesta a estímulos de pH. El desarrollo de estos materiales poliméricos, así como su estudio e interpretación de sus propiedades, permitirán ampliar el conocimiento sobre estos tipos de material, además de brindar posibles alternativas en el desarrollo de nuevos sistemas de liberación y nuevas formas farmacéuticas.

Capítulo III. Experimental

III. 1 Equipos y Reactivos

IV. Equipos

1. Agitador magnético VWR Dyla-Dual.
2. Balanza analítica, marca Denver Instrument M-200.
3. Baño de temperatura, marca VWR International Shel Lab modelo 1217.
4. Bomba de adición, marca RAZEL, modelo R-99.
5. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR).
6. Espectrofotómetro de infrarrojo con transformadas de Fourier (FTIR).

7. Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible Beckman Coulter DU520, Single Cell.
8. Module.
9. Equipo de filtración con membrana millipore Superlco, Life Sciences GHP.
10. Acrodisc 25mm Syrenge Filter 0.2um, filtros Suport-100 0.2um 47mm.
11. PN60310.
12. Estufa de vacío WVR.
13. Potenciómetro, 430 Corning. O Potenciómetro HANNA, modelo HI 2210.
14. Purificador de agua, marca Barnstead Sybron, modelo D2604.
15. Recirculador de agua con temperatura controlada, Cole-Parmer Polystat modelo 12101-10.
16. Recirculador de agua con temperatura controlada, marca LAUDA Brinkmann, ecoline RE10.

B. Reactivos, solventes y Gases

Los reactivos fueron adquiridos en su mayoría con proveedor de Aldrich Chemical Company.

1. Ácido clorhídrico
2. Ácido salicílico
3. Acetato de etilo
4. Agua destilada
5. Anhídrido metacrílico
6. Diclorometano
7. Dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA)
8. Dimetilformoamida
9. Etanol
10. Éter etílico
11. Fosfato de potasio monobásico
12. Fosfato dibásico de sodio
13. Hexano
14. Hidróxido de sodio
15. Hidroxietil metacrilato (HEMA)
16. Indometacina
17. Metanol

18. Nitrógeno grado alta pureza
19. Persulfato de amonio (APS)
20. Poli(etilenglicol) metil éter metacrilato (1,100 g/mol) (PEGMA1100)
21. Removedor del inhibidor hidroquinona
22. Sulfato de Magnesio anhidro, 99% (MgSO₄)
23. Tetrametilendiamina
24. Trietilamina

III.2 Síntesis del monómero ácido 2-metacrililoiloxibenzoico (MAOB)

En un matraz bola de 100 mL se adiciona 6.91 g de ácido salicílico y 0.49 g de 4-dimetilaminopiridina y se disuelve con 20 mL de diclorometano y 8.42 mL de trietilamina. Se lleva a una temperatura de 0 °C en un baño de hielo con una agitación constante hasta que los reactivos estén disueltos. Con una bomba de adición se agrega gota a gota 7.50 g de anhídrido metacrílico en un intervalo de tres horas, pasando las tres horas se deja en agitación 24 horas a temperatura ambiente.

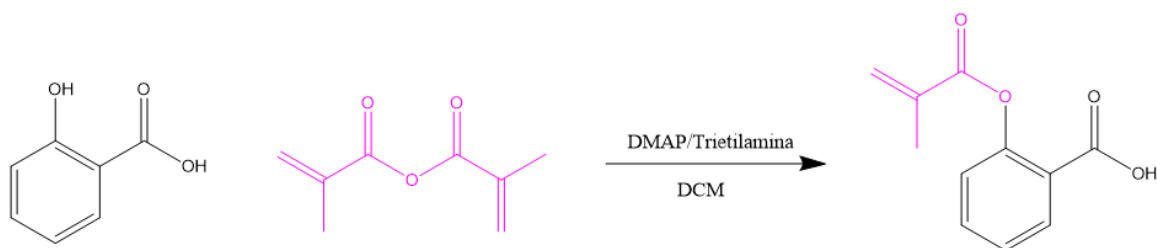


Figura. – 10 Reacción de síntesis de MAOB

Después de las 24 horas la solución se transfiere a un vaso de precipitado de 250 ml en un baño de hielo para llevar el pH a 3 con una solución de HCl 3N. posterior a ajustar el pH se realiza una extracción liquido/liquido con 10 mL de éter etílico y un embudo de extracción este procedimiento se hace por triplicado. La fase orgánica resultante se trata con 20 mL de una solución al 0.1 N de HCl y 20 mL de agua destilada. En la fase orgánica se agrega sulfato de magnesio anhidro para eliminar los restos de agua que puedan estar presentes, se filtra al vacío y se deja cristalizar durante 24 horas.

La purificación del MAOB se realiza mediante un lavado de 30 mL de agua destilada a temperatura ambiente y 30 mL de agua destilada a 40 °C con el equipo de filtrado al vacío realizando el procedimiento por triplicado. El sólido resultante se disuelve en metanol y se deja a recristalizar durante 24 horas con el fin de purificar el monómero.

III.3 Síntesis del derivado de metacrililoioxietilo de indometacina (MOEIN)

En un matraz bola, se disuelve 500 mg de indometacina y 15 mg de dimetilaminopiridina en 5 mL de DMF. El matraz se enfría hasta 0 °C en un baño de hielo y se añadió gota a gota una solución de 265 mg de DCC disuelto en 2.6 mL de DMF a la solución del matraz a esta temperatura. Luego, se disuelve 166 mg de HEMA en 1mL de DMF y se añade a la mezcla del matraz a la temperatura mencionada.

La mezcla de reacción se agita vigorosamente a 0 °C durante 1 hora y se regresa lentamente a temperatura ambiente. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas y se filtró para eliminar la precipitación blanca de

N, N-diciclohexilurea. Luego, la DMF se evaporó al vacío y el sólido obtenido se recristaliza en metanol.

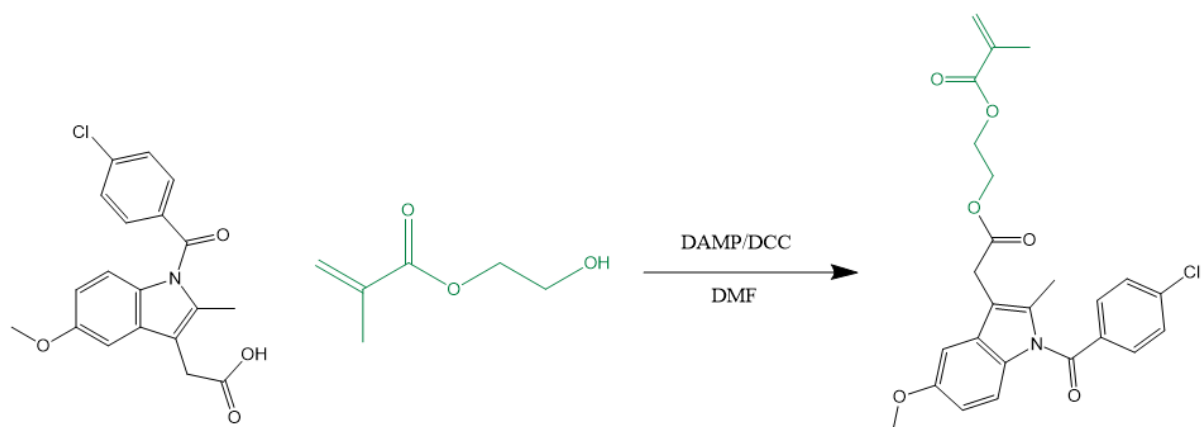


Figura. – 11 Reacción de síntesis de MOEIN

III.4 Caracterización de monómeros

Los monómeros sintetizados se le realiza pruebas de caracterización las cuales son una cromatografía en capa fina como método de ver la pureza de los monómeros, en la cual se compara los monómeros obtenidos contra una solución de referencia de ácido salicílico e indometacina respectivamente. Se analiza por FT-IR con ATR marca Thermo modelo IS5 un espectro de infrarrojo en un intervalo de $450\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ con la finalidad de ver el cambio en los espectros de ácido salicílico comparado con el MAOB e indometacina comparada con el MOEIN.

III.4.1 Cromatografía en capa fina.

Se prepara una solución acetato de etilo/ hexano /metanol en una proporción 0.5 ml cada uno, se corta una tira de placa cromatográfica de 2 cm x 4.5 cm. Se carga la placa con una gota de solución de referencia de ácido salicílico y una gota del monómero de más que por separado se realiza el mismo procedimiento para el segundo monómero con indometacina y una gota del monómero se vierte la placa verticalmente en una cámara cromatográfica con la solución y se deja unos minutos. Una vez terminado el proceso se revela con luz negra (UV) y se realiza los cálculos correspondientes.

III.4.2 Espectrofotometría de infrarrojo con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR)

Se toma muestras de los monómeros de ácido 2-metacrililoixibenzoico y metacrililoixietilo de indometacina los cuales se lee en el espectrofotómetro de infrarrojo con ATR marca Thermo modelo IS5.

III.4.3 Resonancia magnética de protón (RMN-H)

Se realiza un análisis a los monómeros por medio de resonancia magnética de protón (RMN1H) después de purificarse, se disuelve 15 mg de cada monómero, y se agrega a un tubo de RMN, una vez los monómeros se dispone en el tubo etiquetado, se procede a agregar 0.6 mL de cloroformo deuterado por las paredes asegurando que se disuelva totalmente. Para evitar problemas con la solubilización, se coloca el tubo en vortex para homogenizar. Son analizados en un equipo Spinsolve® 60 de la marca Magritek del Laboratorio de Análisis Instrumental de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingenierías de 60 MHz, este equipo es capaz de proporcionar espectros de RMN en 1D y 2D rápidamente.

III.5 Síntesis de hidrogel

Los hidrogeles se sintetizan a partir de los monómeros obtenidos, se utiliza en porciones 90 de MAOB y 10 de MOEIN por el método de polimerización en disolución vía radicales libres por iniciadores térmicos. Estos se elaboran en forma de lámina delgada (espacio equidistante entre dos placas de vidrio). El agente entrecruzante que se emplea es dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA). Se purifica previamente través de una microcolumna la cual contenía perlas de removedor de hidroxiquinona; El iniciador térmico que se implementa en la reacción fue azobisisobutinitrilo (AIBN) y el disolvente polar aprotico empleado es el dimetilsulfoxido (DMSO). Se coloca un espaciador de plástico de 2 mm de diámetro, entre las dos placas de vidrio de dimensiones 10 cm x 10 cm las cuales se ajustan con pinzas de metal. Al terminar los 10 minutos de degasificación, con ayuda de una micropipeta de 1000 µL se coloca la solución dentro de las placas de vidrio, se posiciona verticalmente en una estufa bajo condiciones de atmósfera inerte de nitrógeno a 60 °C durante 24 horas. Después de las 24 horas, se retira las placas de vidrio de la estufa y se deja atemperar hasta que alcanzara el equilibrio térmico, se extrae el hidrogel cuidadosamente para evitar

fracturas durante dicho proceso. El hidrogel resultante se coloca dentro de un recipiente y se realiza un lavado con metanol hasta cubrir completamente el hidrogel durante 5 minutos, posterior a ello se cambia el hidrogel a una caja Petri con poco metanol y se prosigue a cortar el hidrogel. Una vez terminado el proceso de corte se dejará secar a temperatura ambiente por 24 horas.

III.5.1 Caracterización de hidrogeles

Los hidrogeles purificados se les analiza por FT-IR para obtener un espectro de infrarrojo en un intervalo de 450-4000 cm^{-1} con la finalidad de ver el cambio y trazabilidad con los espectros de Poli (MAOB-co-MOEIN) comparado con los espectros de MAOB, MOEIN y EDGMA como el entrecruzante respectivamente.

III.6 Estudio hidrólisis-liberación

Para realizar la prueba de hidrólisis-liberación, se pesa cada uno de los hidrogeles estando secos. Se coloca un disco del hidrogel vial de vidrio de 30 mL con 5 mL de medio, los medios que se utilizan en esta prueba son, Buffer pH 7.4, se realiza por duplicado a temperatura fisiológica (37 °C) se toman alícuotas de 1mL a los tiempos de 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 ,72 ,96, 120 ,168 horas con reposición de medio en cada toma.

III.6.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

El estudio se realiza usando el equipo Thermo fisher Dionex Ultimate 3000 Utilizando una columna supelcolsil™ LC-18 25 cm x 4.6 mm de diámetro, con tamaño de partícula de 5 μm .

III.6.1.1. Preparación de fase móvil

En un vaso de precipitado de 1000 mL se colocaron 1 ml ácido fórmico y 1000 mL de agua destilada con agitación constante, se deja agitar por 10 minutos. Para finalizar se filtra y desgasifica durante 15 minutos. Se pasa en un reservorio de 1000 mL (reservorio D). Se filtra aproximadamente 300 mL de Acetonitrilo grado CLAR y se colocaron en un reservorio (reservorio C).

III.6.1.1.1. Preparación de solución estándar de ácido salicílico e indometacina

Se pesaron 10 mg de estándar de indometacina de ácido salicílico los cuales se transfieren a un matraz volumétrico de 10 mL el cual se añade aproximadamente con 8 ml de una solución 70:20 metanol: buffer 7.4 se agita hasta disolver completa y posteriormente se afora, teniendo una concentración conocida de 1 mg/mL

Se toma 1 mL de alícuota y se filtra usando un filtro con acrodisco de Nylon 0.45 μ m y se añade a un vial limpio de 2 mL de capacidad.

III.6.1.2 Condiciones cromatográficas

- **Fase móvil:** Ácido fórmico al 0.1%
- **Columna:** Supelcilsil™ LC-18 25 cm x 4.6 mm, 5 μ m
- **Temperatura de columna:** 25 °C
- **Flujo:** 1.000 mL/min
- **Longitudes de onda:** 291 y 280 nm
- **Tiempo de corrida:** 12 minutos

III.6.1.3 Análisis por medio de CLAR

Las muestras de liberación, así como los estándares se analiza siguiendo las condiciones anteriormente mencionadas, los gradientes se describen en la siguiente tabla. -1:

Tabla. -1 Condiciones cromatografías.

Tiempo(min)	Flujo(ml/min)	Acetonitrilo (%)	Ac. Fórmico 0.1% (%)	Curva
0	1	45	55	6

10	1	80	20	6
12	1	45	55	6

III.7 Estudio de hinchamiento

Para realizar la prueba de hinchamiento, se determina el peso de cada uno de los hidrogeles estando secos. Se coloca un disco del hidrogel vial de vidrio de 30 mL con 10 mL de medio, los medios utilizados en esta prueba fueron, Buffer pH 1.2, 5.5 y 7.4, se realiza por duplicado a temperatura fisiológica (37 °C). Los tiempos de pesado son de 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 horas, una vez transcurridas. Una vez terminado el estudio se procede a retirar el hidrogel del medio y se seca el excedente con cuidado de no generar algún daño.

III.8 Estudio viabilidad celular

El ensayo MTT se utiliza para comprobar la citotoxicidad, que ayuda a determinar el número de células vivas y muertas en una población después del tratamiento con una sustancia farmacológica.

Este tipo de ensayo es colorimétrico para evaluar la actividad metabólica de las células. El ensayo utiliza la reducción de una sal amarilla de tetrazolio (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, o MTT) para medir la actividad metabólica celular como indicador de la viabilidad celular. Las células viables contienen enzimas oxidorreductasa dependientes de NAD(P)H que reducen el reactivo MTT a formazán, un producto cristalino insoluble con un color púrpura intenso (Figura. -12).

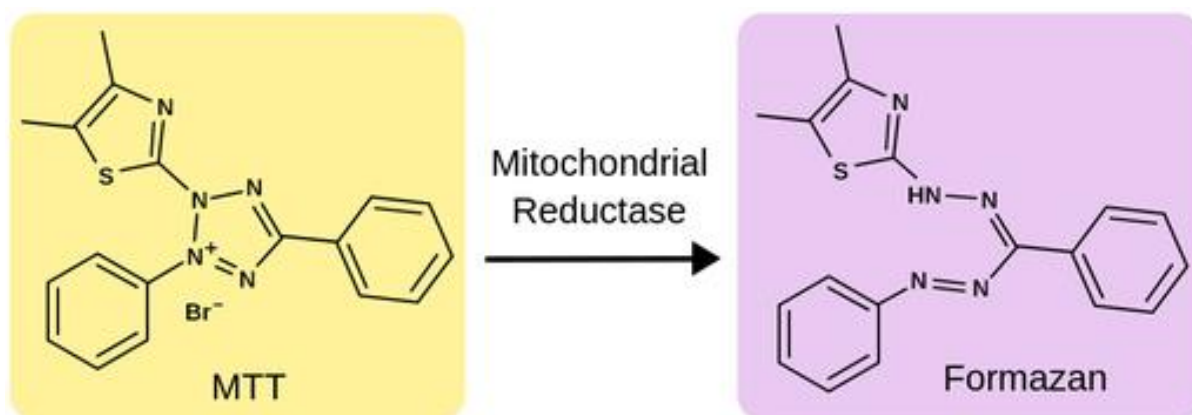


Figura. – 12 Reducción de MTT a formazán por metabolismo mitocondrial (Labster theory, 2018.<http://theory.labster.com/mtt-assay/>)

Se disuelve los cristales de formazán con una solución solubilizante y se mide la absorbancia a 500-600 nanómetros con un lector de placas. Cuanto más oscura sea la solución, mayor será el número de células metabólicamente activas viables. Para realizar las pruebas de cultivo celular se tiene que poner en crecimiento células de melanoma y fibroblastos. Para ello se dejan en crecimiento a temperatura de 35 °C. Los ensayos de citotoxicidad del hidrogel se optaron por realizar por un método indirecto en el cual se dejaron liberar los hidrogeles por 24 horas en medio de crecimiento celular y posteriormente se adicionan a los pasillos donde se encuentran las células, para este estudio las células fueron en fibroblastos de ratón BALB/3T3 a concentraciones 6000 cel/mL y para melanoma B16F10 a una concentración de 30,000 cel/mL con la finalidad de determinar la biocompatibilidad o citotoxicidad del material. Se hizo un conteo de células en cámara de Neubauer y posteriormente se determinó el total de la cantidad de células de la solución por mL dando como resultado 85,000 cel/mL para melanoma y 7,500 cel/mL para fibroblastos. Se realizan las diluciones correspondientes para generar la concentración de células anteriormente mencionadas preparando en un volumen de 1.5 mL para melanoma y 0.8 mL para fibroblastos.

Cálculos para preparación de células para cultivo celular

Melanoma células:

$$(30,000 \text{ cel/mL} \times 1.5 \text{ mL}) / 85,000 \text{ cel/mL} = 0.529 \text{ cel/mL} + 0.970 \text{ mL medio}$$

Fibroblastos:

$$(6000 \text{ cel/mL} \times 0.8 \text{ mL}) / 7500 \text{ cel/mL} = 0.640 \text{ cel/mL} + 0.160 \text{ mL medio}$$

Una vez obtenido la solución de las células a concentración conocida se procedió a poner las células en una placa de pasillos por triplicado, para las células de melanoma por cada pocillo de coloco un volumen de 0.187 mL y para fibroblastos se colocó un volumen de 0.1 mL.

Después del período de incubación, se agregó 100 μ L del reactivo de marcaje MTT (concentración final de 0,5 mg/mL) a cada pocillo y se dejó incubando durante 4 horas en una atmósfera húmeda, como +37 °C, 5 a 6,5 % de CO₂.

Se agregó 100 μ l del tampón de solubilización en cada pocillo.

Se dejó la placa durante la noche en la incubadora en una atmósfera húmeda, como +37 °C, 5 a 6,5 % de CO₂.

Compruebe la solubilización total de los cristales de formazán púrpura y mida la absorbancia espectrofotométrica de las muestras utilizando un lector de microplacas (ELISA). La longitud de onda para medir la absorbancia del producto de formazán está entre 550 y 600 nm según los filtros disponibles para el lector de ELISA utilizado. Utilice una longitud de onda de referencia > 650 nm.

Capítulo IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

IV.1 Síntesis del monómero ácido 2-metacrililoiloxibenzoico (MAOB)

Como resultado de la reacción de síntesis se obtuvo el monómero en forma de polvo color blanco través de una reacción de esterificación, en el cual se lleva a cabo un ataque nucleofílico por parte del catalizador dimetilaminopiridina a la región electrofílica del carbonilo de en el anhídrido metacrílico, generando un intermediario el cual será atacado nucleofilicamente por el grupo OH del ácido salicílico (Figura. - 13) finalizando al final de la reacción con el monómero.

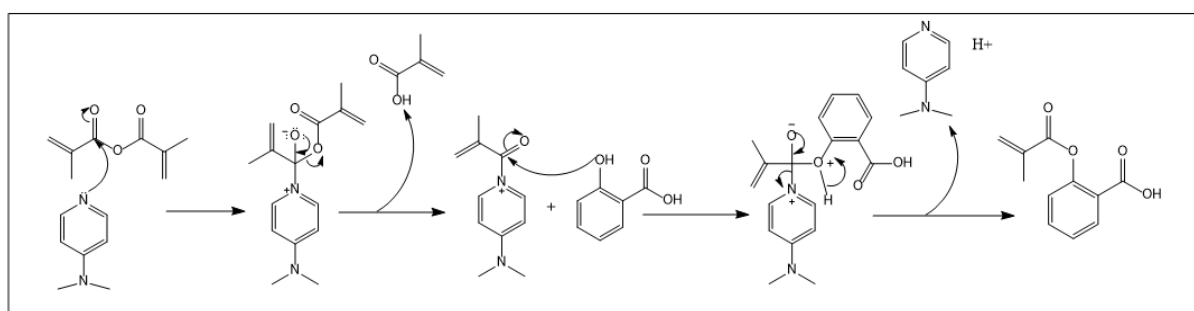


Figura. – 13 Mecanismo de reacción para síntesis de MAOB

IV.2 Síntesis del derivado de metacrililoiloxietilo de indometacina (MOEIN)

El monómero que se obtuvo es un sólido viscoso de color amarillo fácilmente manipulable a temperaturas de 15 °C, mediante un procedimiento de transesterificación o aminólisis consecutivos se es posible generar el monómero polimerizable. Por medio de la reacción de esterificación de Steglich el grupo hidroxilo de HEMA reaccionó con el grupo carboxilo de indometacina usando DCC el cual funciona como un agente acoplante para producir DCU como un precipitado blanco con ayuda del catalizador DMAP Figura.- 14).

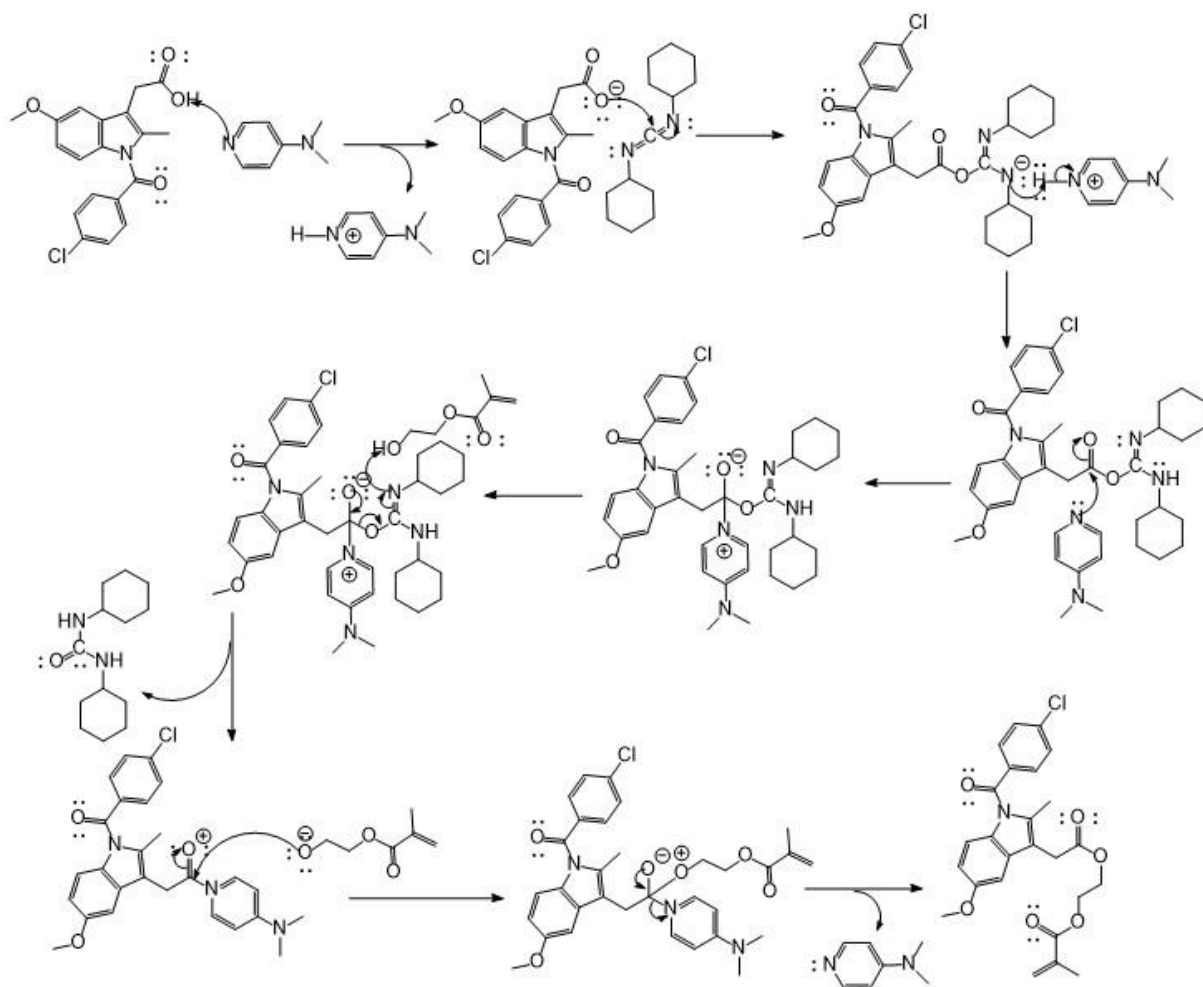


Figura. - 14 Mecanismo de reacción para síntesis de MOEIN

Una vez completada la reacción, se aisló el precipitado blanco y se evaporó el disolvente al vacío para obtener el MOEIN como monómero polimerizable estable.



Figura. - 15 Aspecto del MOEIN purificado

IV.3 Caracterización de monómeros

IV.3.1 Caracterización por FTIR-ATR de MOEIN

El espectro de infrarrojo del monómero MOEIN, se presenta las bandas características mencionadas con anterioridad, a 3030.86 cm^{-1} una señal con intensidad baja que se le asignó al estiramiento $=\text{C-H}$ del anillo aromático presente en la estructura, a 2853.98 cm^{-1} se encuentra una señal con intensidad baja la cual es asociada al estiramiento C-H de carbono alifático, en 1736.96 cm^{-1} está presente una banda de intensidad fuerte asociado del estiramiento del enlace C=O correspondiente al Éster, a 1679.71 cm^{-1} una banda de intensidad fuerte asignada a la vibración del estiramiento C=O . Correspondiente a la amida, por 1520.32 cm^{-1} se presenta una banda de intensidad baja que se asignó al estiramiento C=C del carbono vinílico, entre 1144.04 cm^{-1} se presenta banda de intensidad media a fuerte, asignada a las vibraciones C-O del correspondientes al Éster entre indometacina y HEMA (Figura. - 16).

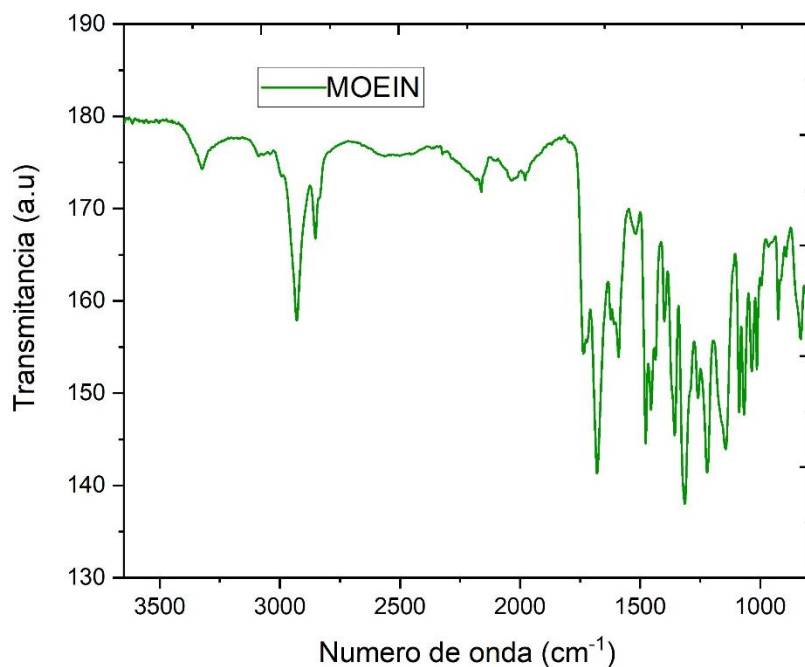


Figura. - 16 Espectros de infrarrojo de MOEIN

En una comparativa entre los diferentes espectros de FTIR (Figura. -17) de los precursores del monómero podemos encontrar cambio en las bandas significativas como puede ser la pérdida de la banda intensa a 3475cm^{-1} de estiramiento OH del HEMA o la aparición del estiramiento C=C vinílico a 1520.32cm^{-1} y C-O a 1144cm^{-1} que no posee el espectro de indometacina.

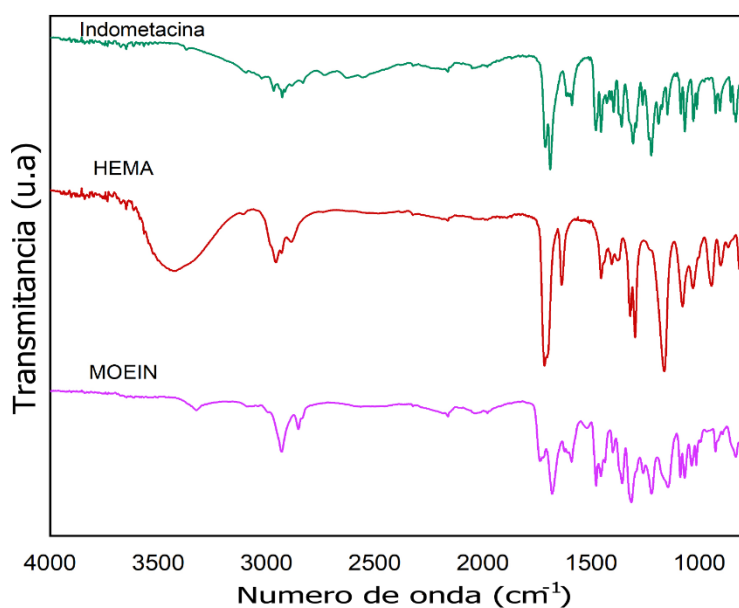
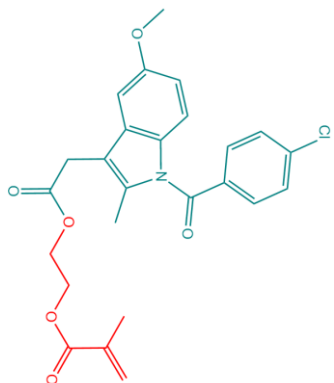


Figura. - 17 Espectros de infrarrojo de indometacina, HEMA y MOEIN

Tabla. -2 Identificación de bandas de infrarrojo de MOEIN.

Grupo funcional	n. de onda cm^{-1}	MOEIN
(C-H) aromático	3030.86	
C-H Vinílico (sp^2)	2929.67	
C-H alifático (sp^3)	2853.98	
C=O éster	1736.96	
C=O amida	1679.71	
C=C vinílico	1520.32	
C-O	1144.04	

IV.3.2 Resonancia magnética de protón (RMN-H) de MOEIN

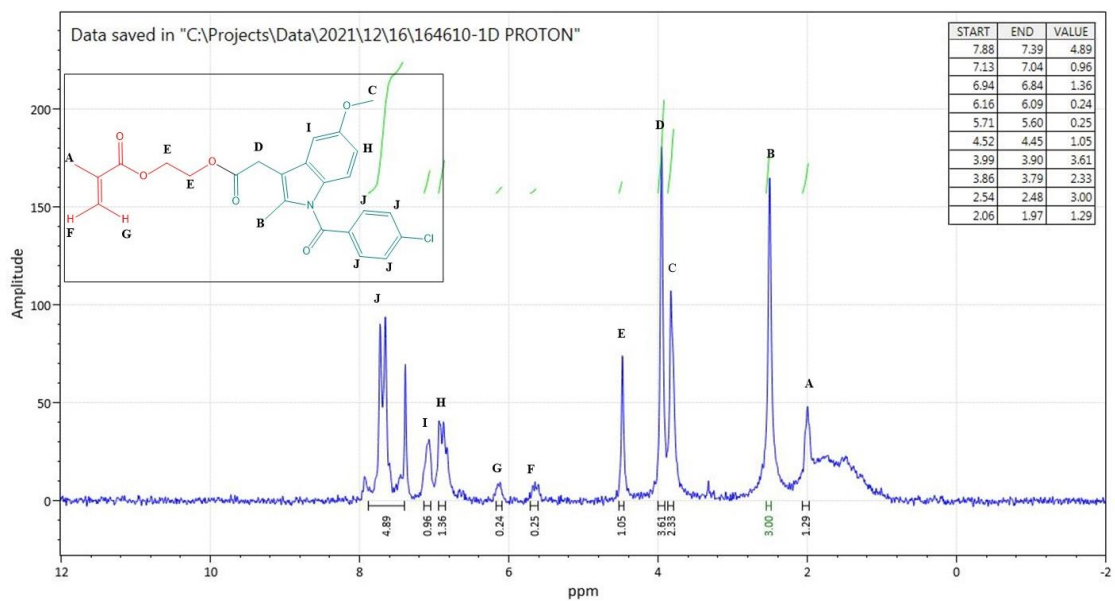


Figura. - 18 Espectro de RMN de MOEIN

En el espectro de resonancia para MOEIN se observó que, a 2.06 ppm se encuentra un singulete asignado con los protones “A” (s, 3H, C=CCH₃), seguido de otro singulete a 2.54 ppm el cual fue asignado a los protones “B” (s, 3H, Ar-CH₃), así mismo a 3.86 ppm se aprecia otro singulete, correspondiente a los protones asignados como “C” (s, 3H, Ar-OCH₃), a 3.99 ppm otro singulete es asignado para los protones “D” (s, 2H, Ar-CH₂COO-), por otro lado a 4.52 ppm el cual se asignó a los protones “E” (t, 2H, -CH₂OCOCH₂-), seguido de los protones de otro triplete a 5.71 ppm asignados como “F” (t, 2H, -CH₂OCOC=), se asignó un doblete para los protones “G” 6.16 (d, 1H, CH₂=C), en 6.94 se asignó un doblete como “H” (d, 1H, CH₂=C), Los protones asignados como “I” y “J” corresponden a un multiplete a 7.13-7.88 ppm de la región aromática (m, 7H, arilo-H).

IV.3.3 Resonancia magnética de protón (RMN-H) de MAOB

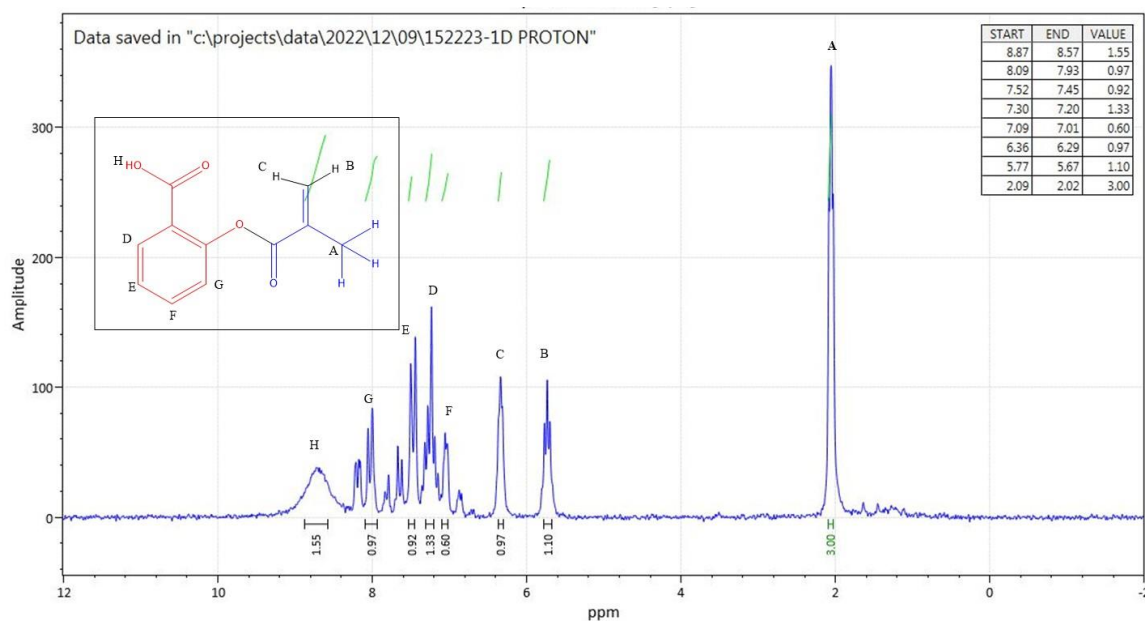


Figura. - 19 Espectro de RMN de MAOB

Se pudo observar en el espectro de resonancia de protón de MAOB, que a 2.09 ppm, un singulete perteneciente a los protones asignados como “A”(3H, C=CCH₃), en la región de 5.77 a 5.67 se observó los protones asignados como “B”(1H, CH₂=C), a 6.36 ppm se determinó otro singulete perteneciente al protón “C”(1H, CH₂=C); Un triplete aproximadamente a 7 ppm, que integra para el protón asignado como “F”(1H, CH₂=C), otro doblete a 7.3 ppm aproximadamente, que integra para el protón “D” (1H, CH₂=C), 8 y 8.2, que integran para los protones asignados como “G”(1H, CH₂=C) y

a 8.87ppm aparece un singulete el cual pertenece a los protones asignados como "H"(1H, COOH).

IV. 4 Síntesis de hidrogel

Para la preparación de hidrogeles se realizó una reacción de polimerización vía radicales libres se utilizó como agente entrecruzante EGDMA purificado, y el iniciador fue AIBN el cual es un iniciador térmico, se adiciono DMSO como disolvente, se colocaron el monómero MAOB y MOEIN en porciones 9:1 en base a su peso, se eliminó el oxígeno con nitrógeno por 20 min y se colocó en placas de vidrio silanizadas, fijando las condiciones de reacción en una temperatura de 65 °C por 24 horas en estufa con una atmósfera inerte con nitrógeno. Con estas condiciones se logró una correcta preparación del hidrogel, el material en cuestión presentó una ligera adherencia a la placa. Después del lavado con metanol y 24 horas de reposo los hidrogeles tomaron una consistencia más rígida. El hidrogel obtenido presentó una apariencia transparente de color amarillo (Figura. -21).

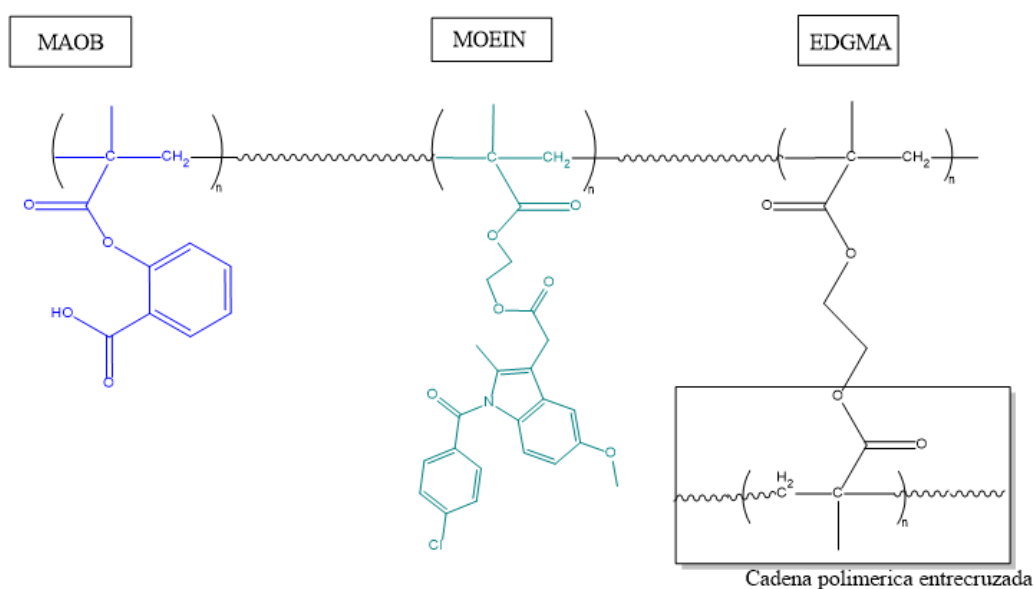


Figura. - 20 Propuesta de molécula del hidrogel

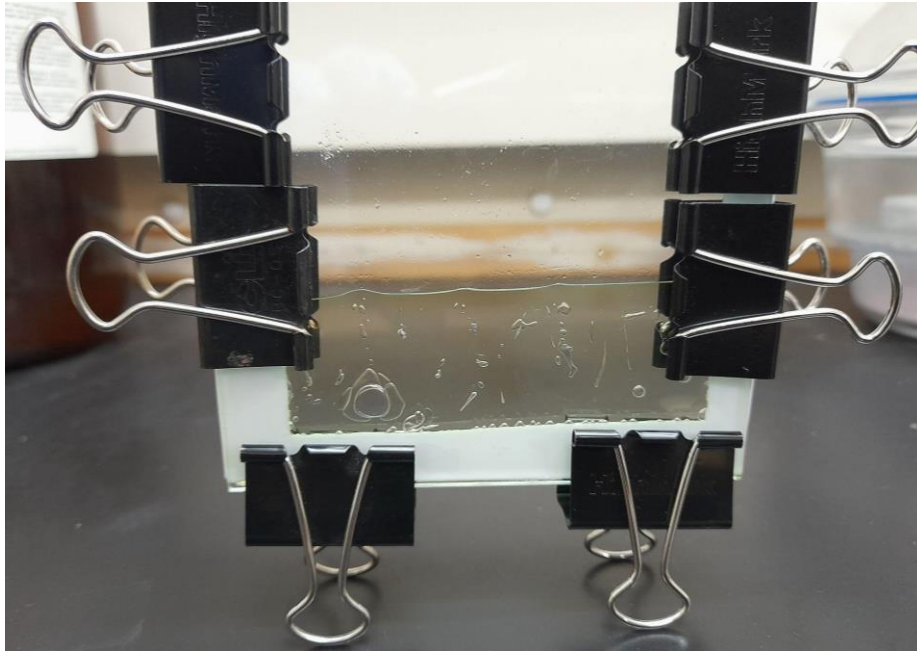


Figura. - 21 Aspecto del hidrogel sintetizado

IV.5 Caracterización de hidrogeles

La caracterización del hidrogel se hizo por medio de la comparación del espectro de infrarrojo del con los monómeros utilizados para la síntesis de hidrogel. debido a que el polímero incluye la mayoría de los grupos funcionales de sus monómeros gran parte de las señales serán las mismas pero ciertos grupos funcionales tienden a desaparecer al momento de realizar la preparación del hidrogel, esto debido a que al someter la reacción a las condiciones dadas en el apartado de se llevará a cabo el proceso de polimerización del monómero.

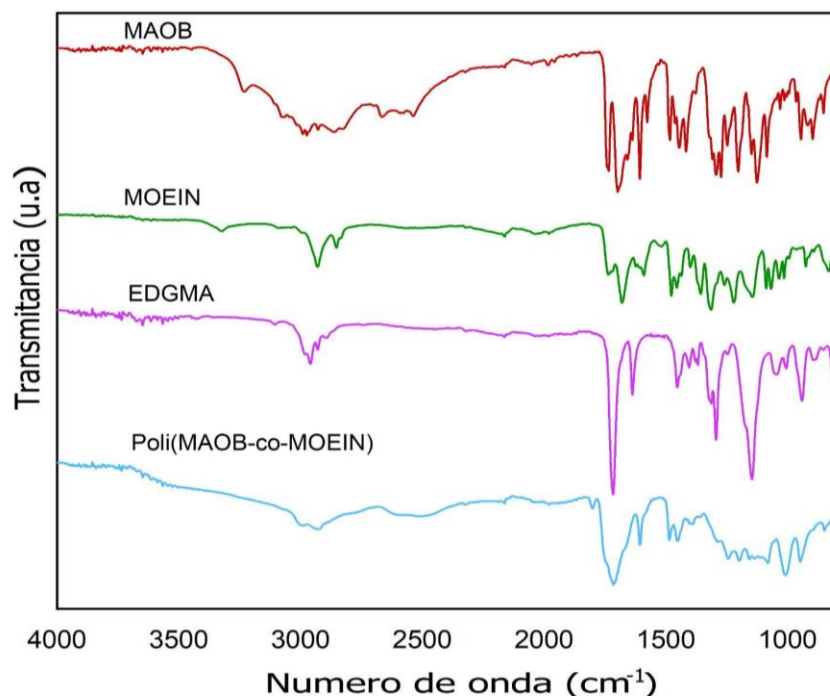


Figura. - 22 IR de los monómeros del hidrogel y del hidrogel sintetizado

Al comparar el espectro de infrarrojo del polímero con los monómeros se puede notar que las señales de los hidrogeles están menos definidas con respecto a los monómeros, se pierde una señal

Se presenta un mayor grosor en la banda de 1697 cm^{-1} , uno de los cambios más representativos es la desaparición de la señal perteneciente al estiramiento $\text{C}=\text{C}$ del enlace vinílico la cual debería encontrarse a 1635 cm^{-1} , esto se debe a un proceso de polimerización exitosa ya que, al generarse dicho proceso, la molécula pierde enlace y da lugar a la generación de una molécula polimérica

IV.6 Estudio de hinchamiento

En la estructura molecular de los hidrogeles sintetizados contienen grupos ácidos débiles ($-\text{COOH}$) en los sustituyentes laterales de la cadena principal pertenecientes al ácido salicílico esterificado, Es por ello por lo que hidrogeles tienen la capacidad de responder a estímulos externos, en este caso presentó un comportamiento de hinchamiento son el pH y la temperatura. Por lo cual se llega a la conclusión que son fisiológicamente sensibles.

Las pruebas de hinchamiento de los hidrogeles se realizaron en soluciones fisiológicas de pH 1.2, 5.5 y 7.4. El análisis del grado de hinchamiento se determinó con la siguiente ecuación:

$$Q = \frac{W_h - W_s}{W_s} \times 100$$

Donde Q es el grado de hinchamiento expresado en porcentaje, W_h es el peso del hidrogel hinchado en un tiempo determinado y W_s es el peso del hidrogel seco.

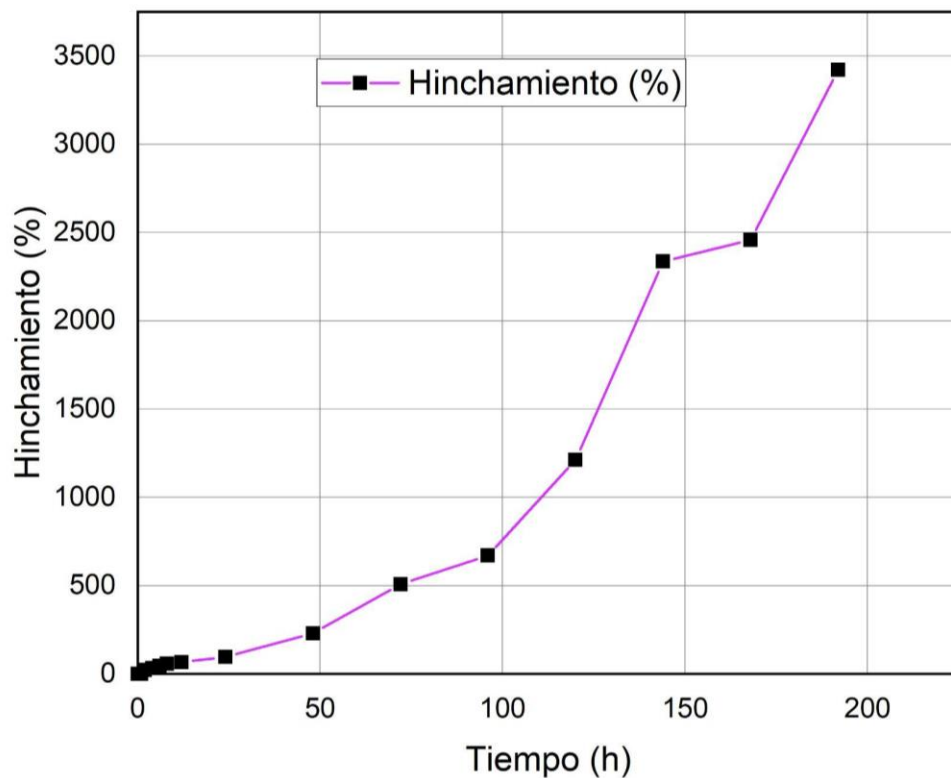


Figura. - 23 Gráfica de hinchamiento con respecto al tiempo

El aumento del pH en el medio de prueba, provoca en los grupos de los ácidos carboxílicos un aumento en el grado de ionización en la red polimérica del hidrogel provocando así un aumento en la repulsión electrostática entre los grupos carboxilatos lo cual ocasiona un relajamiento en las cadenas poliméricas(figura), que en conjunto con la generación de contraiones móviles dentro del hidrogel se induce a una fase de hinchamiento, en el caso de los hidrogeles a pH más bajos como podría ser 1.2 o 5.5 el grado de ionización es mínimo por lo que las interacciones intermoleculares tipo puente de hidrógeno así como interacciones aplanamiento π - π

entre los anillos aromáticos de Poli MAOB y MOEIN. las interacciones intermoleculares se hacen presente en predominancia impidiendo así el relajamiento de las cadenas y la internalización del agua al no ocurrir el fenómeno de la repulsión electrostática, lo que genera es que las interacciones Hidrofóbicas están más presentes en la zona exterior del hidrogel dotándolo de una cualidad hidrofóbica.

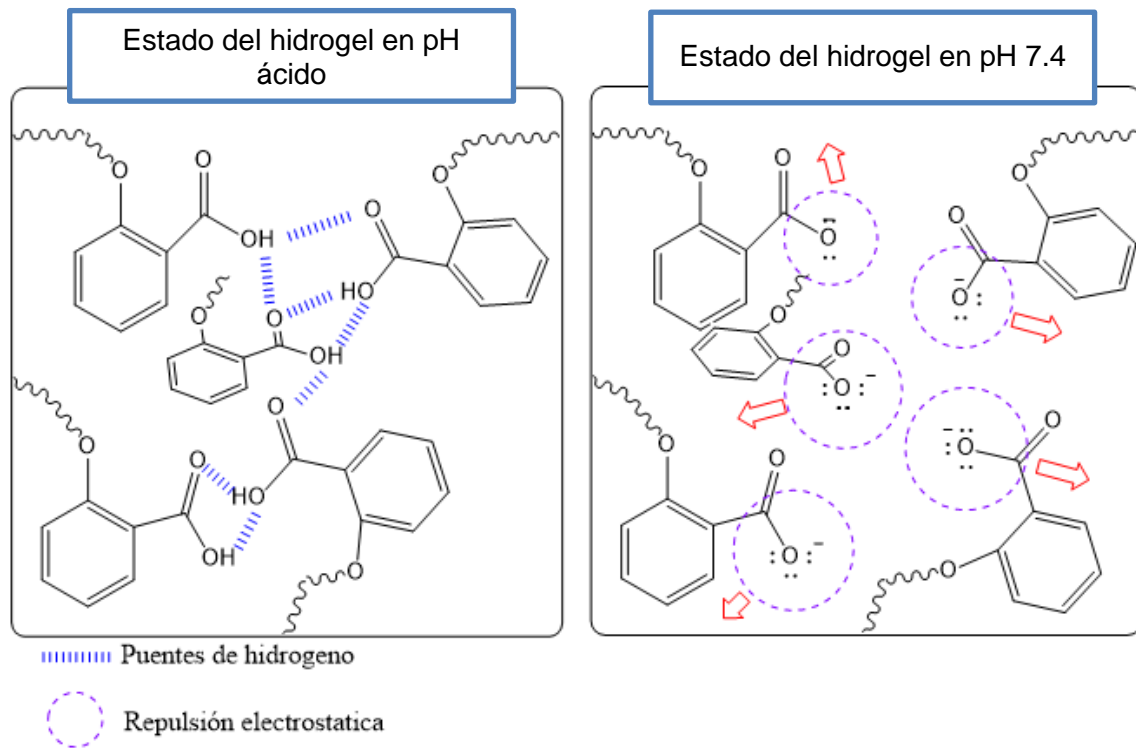


Figura. - 24 Interacciones moleculares del hidrogel a diferentes pH

Visualmente al comparar el hidrogel en diferentes pH los cuales son 1.2, 5.5 y 7.4 a las primeras horas las diferencias en el peso son mínimas entre los geles, pasado las 12 horas hay una diferencia considerable entre los geles de 1.2, 5.5 con respecto al de 7.4. a las 48 horas (Figura. -25) es notable ver como el hinchamiento a pH 7.4 se presenta tornándose de un color blanco a comparación de los pH 1.2 que no presenta ningún cambio y 5.5 que presenta una ligera coloración de color blanco. a las 100 horas el hinchamiento se aprecia de manera más notable entre los pH 1.2, 5.5 y 7.4 (Figura. -26) donde en los dos primeros valores de pH están de un tamaño similar a diferencia del pH 7.4. Esto guardando una relación con el grado de ionización del hidrogel ya que es conocido que poli MAOB cuenta con un Pka aparente de 5.8 donde la ionización de los ácidos carboxílicos es del 50% por lo que a pH 1.2 y 5.5 los grupos ácidos carboxílicos se encontrarían predominantemente no ionizados donde los

grados de ionización esperados se pueden estimar usando la ecuación de Henderson Hasselbach teniendo como resultado 0.003% y 49.74% respectivamente a diferencia de pH 7.4 donde el grado de ionización es de 99.6% es por ello que al esto pH tener un menor grado de ionización las interacciones de repulsión electroestáticas se ven disminuidas dando como consecuencia un ambiente más hidrofóbico en el hidrogel a diferencia de un pH más alto teniendo un aumento en las cargas negativas del materia propiciando la repulsión así como la interacción ion-dipolo con el agua entre la porción carboxílica del polímero con las moléculas del agua.

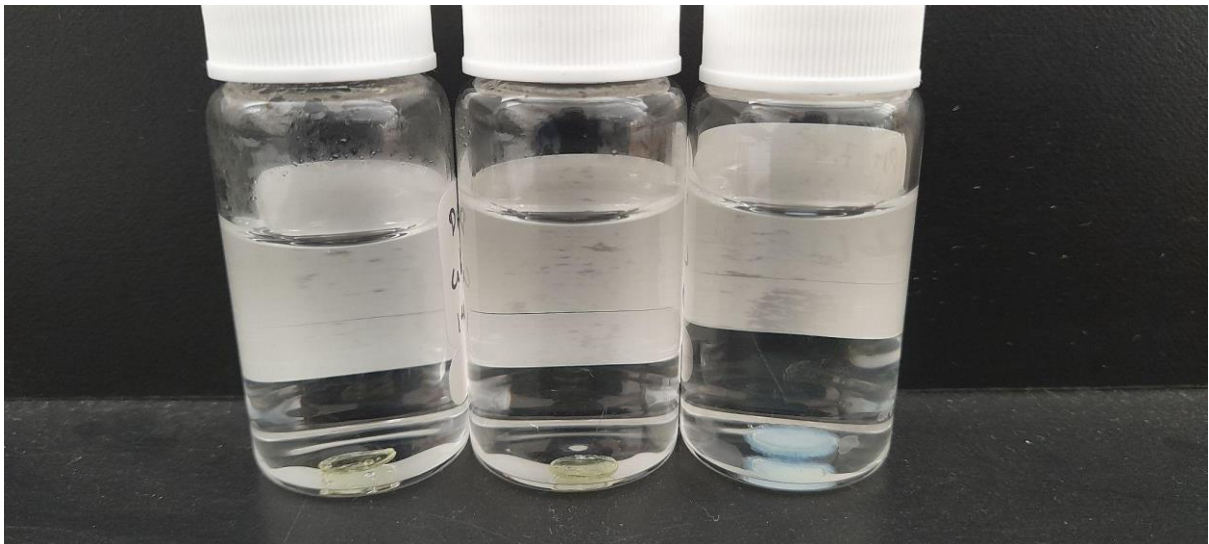


Figura. - 25 Hidrogeles a las 48 horas de hinchamiento



Figura. - 26 Hidrogeles a las 100 horas de hinchamiento

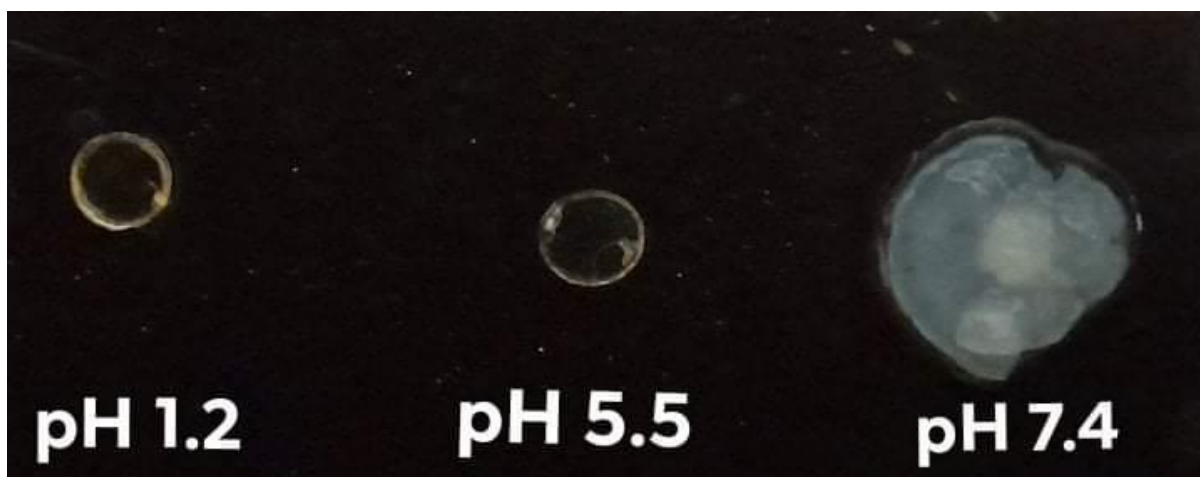


Figura. - 27 Hidrogel a las 192 horas tiempo final

Al tiempo final del experimento que fueron las 192 horas comparamos los hidrogeles, el Hidrogel a pH 7.4 aún mantiene una consistencia uniforme, estable y maleable a diferencia de lo reportado en la síntesis de hidrogeles de poliMAOB al 100% donde este presentaba una ruptura al momento de su manipulación.

IV.7 Estudio hidrólisis-liberación

El experimento del estudio de hidrólisis-liberación se realizó a un pH 7.4 con una temperatura de 37 °C para poder imitar las condiciones fisiológicas de la sangre, esto con el propósito de observar el comportamiento de hidrólisis de los grupos éster presente en la molécula del hidrogel, así como su liberación a dichas condiciones (figura. -28). La hidrólisis es impulsada por el ataque nucleofílico del agua hacia la región electrófila del éster.

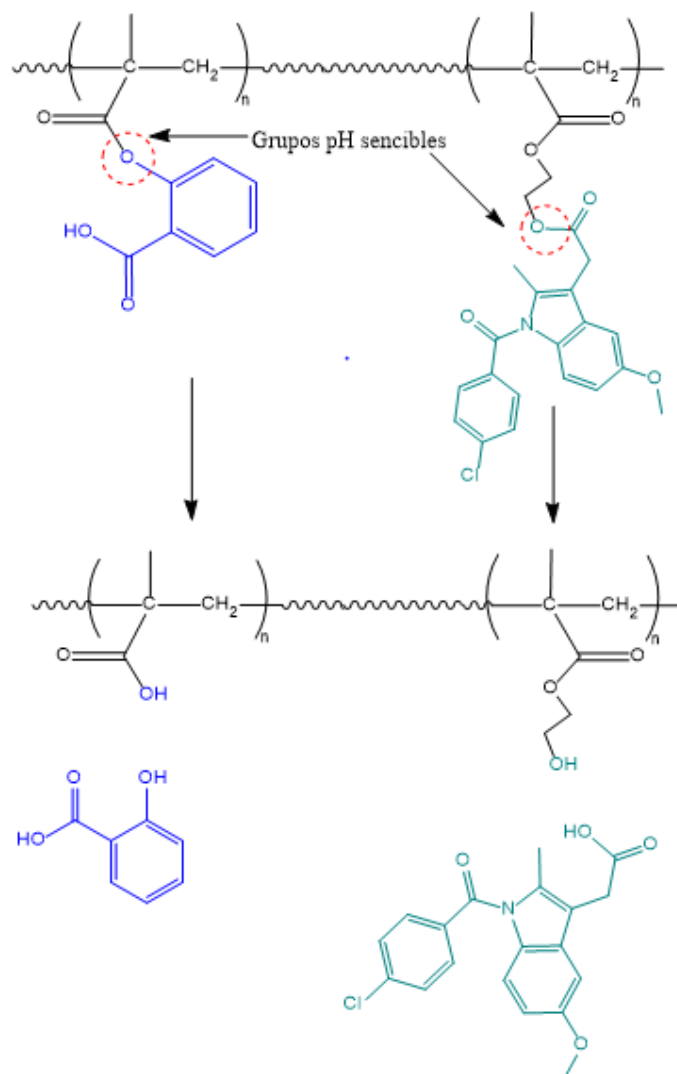


Figura. - 28 Hidrólisis de fármacos de la matriz polimérica

La liberación del hidrogel a pH de 7.4, como se observa dentro de las 12 horas comienza a liberar ácido salicílico en concentraciones, pero se observa casi nula liberación de indometacina en ese lapso de tiempo, llegando a las 24 horas aumenta significativamente las concentraciones de ácido salicílico e indometacina, las concentraciones máximas de indometacina se alcanzan a partir de las 48 horas y ácido salicílico a las 72 horas respectivamente (Figura. -29).

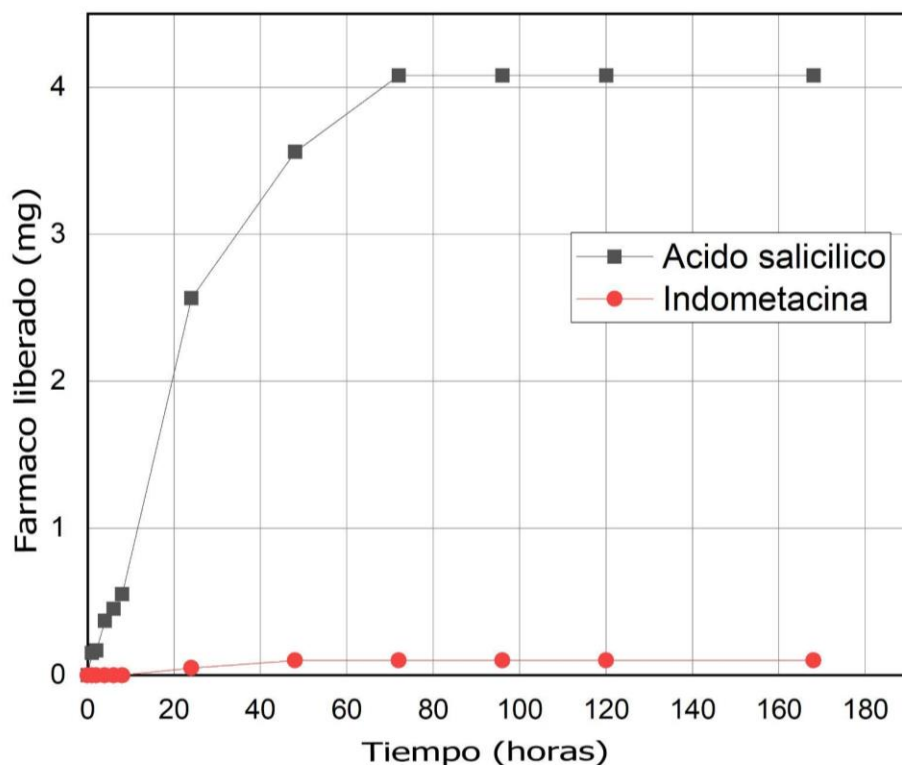


Figura. - 29 Gráfico comparativo de liberación de ácido salicílico e indometacina a pH 7.4

Con relación al fármaco cargado en el polímero y lo que se liberó se determinó que hay un 46% para ácido salicílico alcanzando su liberación máxima a un tiempo de 72 horas y por otro lado la liberación máxima de Indometacina es a las 42 horas teniendo una fracción liberada de 8.7% (Figura. -30). La diferencia en la fracción de fármaco liberado entre ácido salicílico e indometacina se puede deber por la facilidad que posee el poliMAOB para hidrolizarse la cual está condicionada a tener una región ionizable cercana al éster que puede atraer moléculas de agua por medio de interacciones ion-dipolo acercando a las moléculas de agua a la región electrófila del éster al momento de tratar de solvatar la carga negativa del carboxilato, además de tener un éster cuya región perteneciente al alcohol de tipo aromática la cual dará como resultado un mejor grupo saliente al momento de formarse el compuesto tetraédrico posterior al ataque nucleofílico en el éster, otro factor que nos ayuda a comprender la liberación del ácido salicílico en el polímero es lo que se reporta que para el ácido acetilsalicílico puede ocurrir la hidrólisis ya sea por una reacción intramolecular que puede ocurrir entre el carboxilato del ácido y el éster que podría dar como resultado la una ciclación o deprotonación del agua por equilibrio acido-

base pero también se podría proponer una reacción de neutralización del oxonio impulsada por el carboxilato.

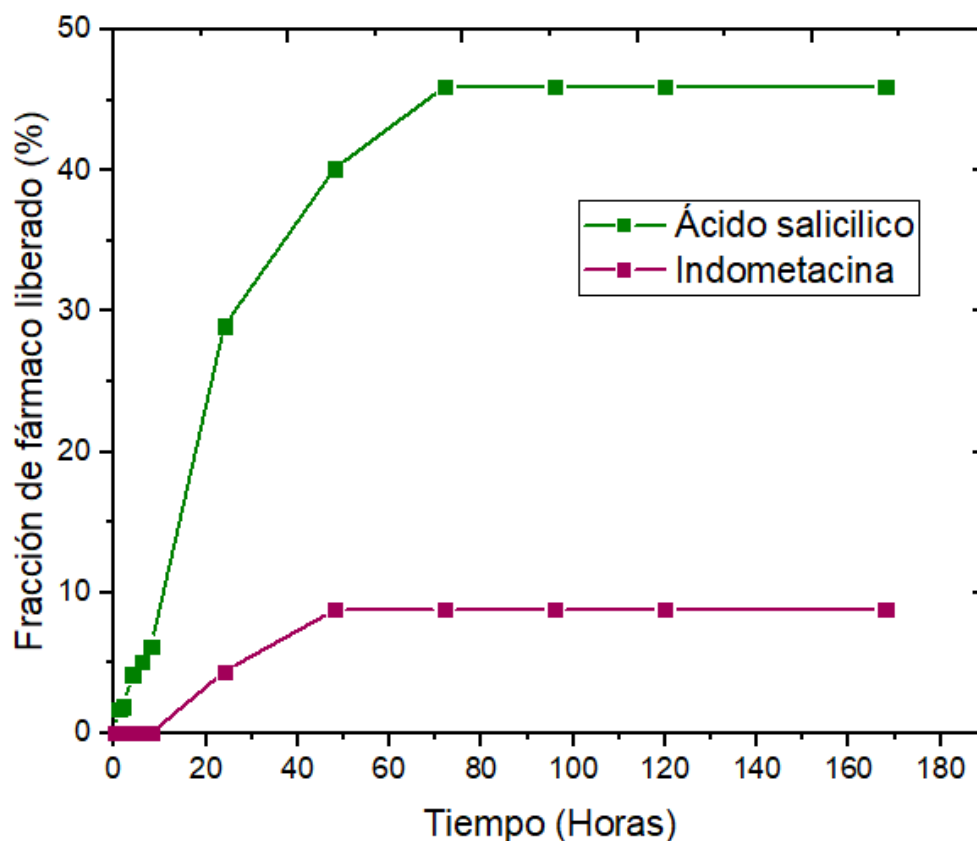


Figura. - 30 Grafico de fracción de fármaco liberado

Por otro lado, los ésteres derivados de HEMA, aunque son de carácter alifático y pueden ser hidrolizables estos tienen como limitantes ser menos hidrofílicos como para aproximar las moléculas de agua a la región electrófila del éster. Otro factor para tomar en cuenta son los posibles núcleos hidrofóbicos generados por que se pueden formar entre las regiones donde se encuentre el MOEIN en agrupación de bloques hidrofóbicos.

Los resultados de la liberación se ajustaron a un modelo de liberación para ácido salicílico, se optó por elegir el modelo de Higuchi ya que fue el que presentó una R^2 de 0.9547 la cual se aproximó, con el modelo de Korsmeyer-peppas de 0.9208 y con el modelo de Weibull R^2 0.9488. Este resultado nos da indicios que la liberación de ácido salicílico se debe a un proceso de difusión.

IV.8 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

La cuantificación de la liberación dual fue posible usando un método cromatográfico por medio del CLAR, en la cual fue posible separar las señales analíticas de ácido salicílico e indometacina las se determinaron a un tiempo de retención de 4.5 min y 10.4 min dichos tiempos de retención se pudieron contrastar con los estándares duales de los fármacos puros de ácido salicílico e indometacina respectivamente.

IV.8.1 Determinación de tiempos de retención

Con el método cromatográfico propuesto fue posible obtener la separación de los indometacina y Ácido salicílico, para determinar los tiempos de retención de los fármacos se inyectaron muestras uno de ácido salicílico, indometacina y un estándar dual, los resultados fueron 4.5 min y 10.35 min de ácido salicílico e indometacina respectivamente (figura. -31).

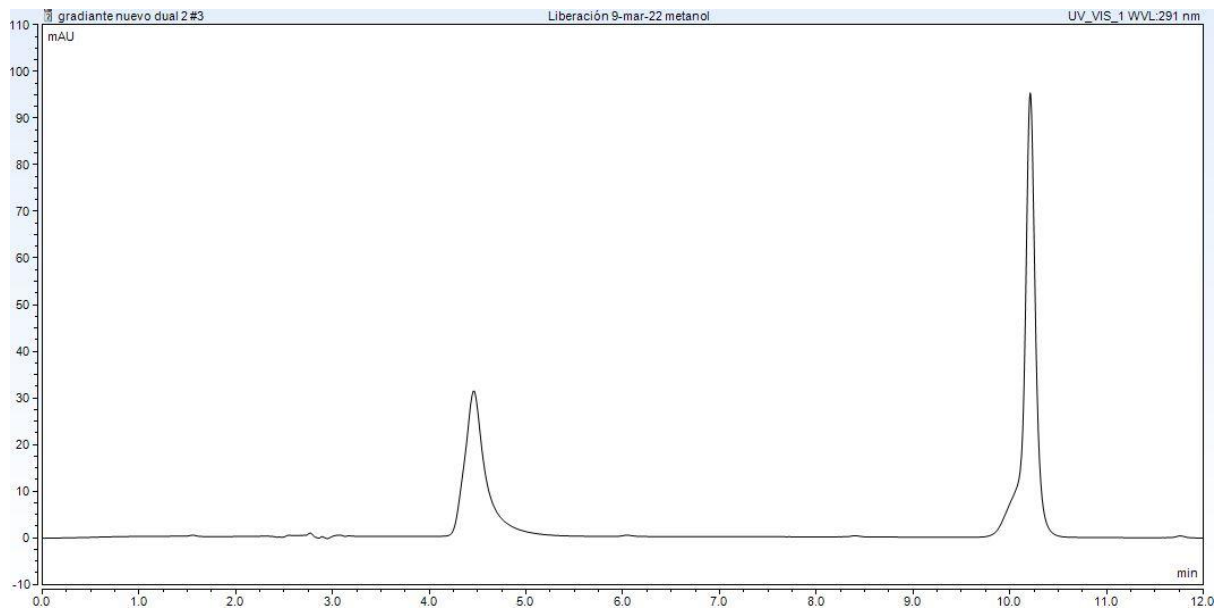


Figura. - 31 Cronograma de estándar dual

Se comparó los resultados de los estándares con respecto a una muestra de liberación (Figura. -32)

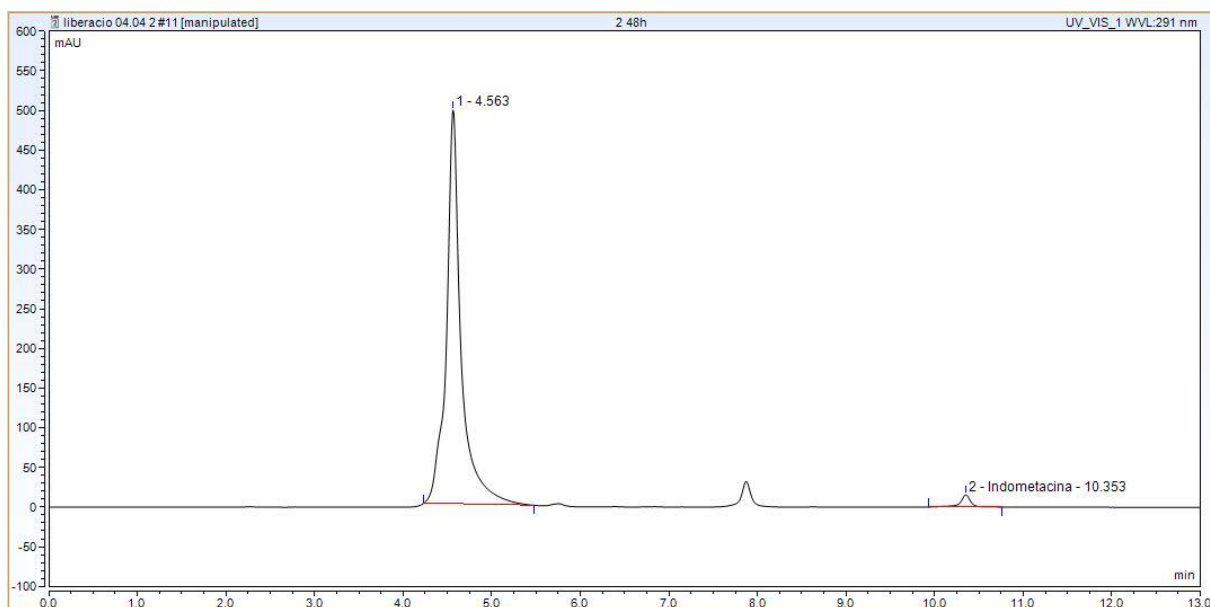


Figura. - 32 Cromatograma de la muestra de liberación tiempo 24 horas

IV.9 Estudio viabilidad celular

La viabilidad celular usando el método de MTT obtuvo como resultado en células de fibroblastos una viabilidad celular de 86% con respecto al control, las células de melanoma por otro lado tuvieron un descenso en la viabilidad celular de un 69% (Figura. -33), Un material se puede considerar como citotóxico cuando presenta una viabilidad celular menor al 70% por ende podemos inferir que los hidrogeles no resultan citotóxicos para células de fibroblastos a diferencia de las células de melanoma.

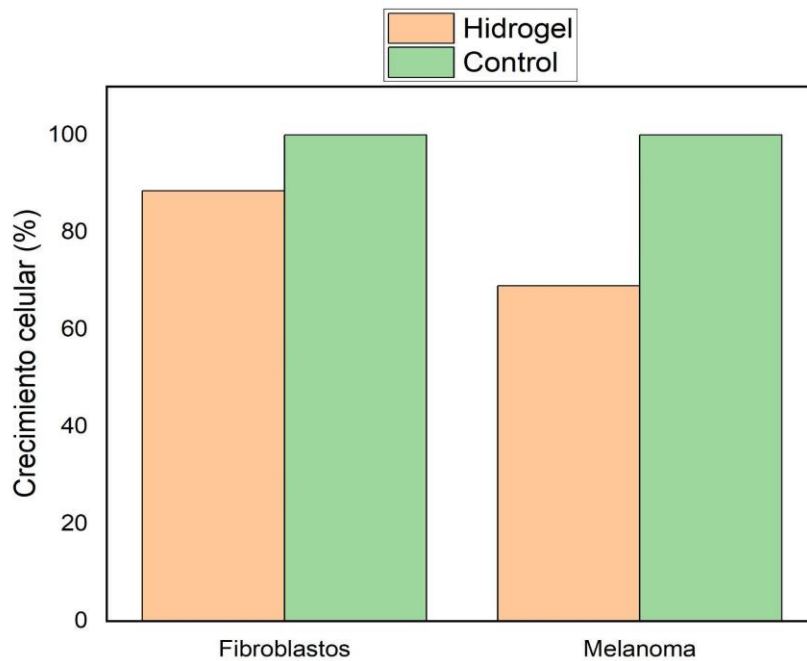


Figura. - 33 Gráfica de viabilidad celular

Visualmente se puede percibir en las micrografías del control y fibroblastos que no hay una diferencia significativa a diferencia de las células de melanoma donde es apreciable los efectos del hidrogel y como es que en el control hay una mayor cantidad de células de melanoma con respecto al del hidrogel.

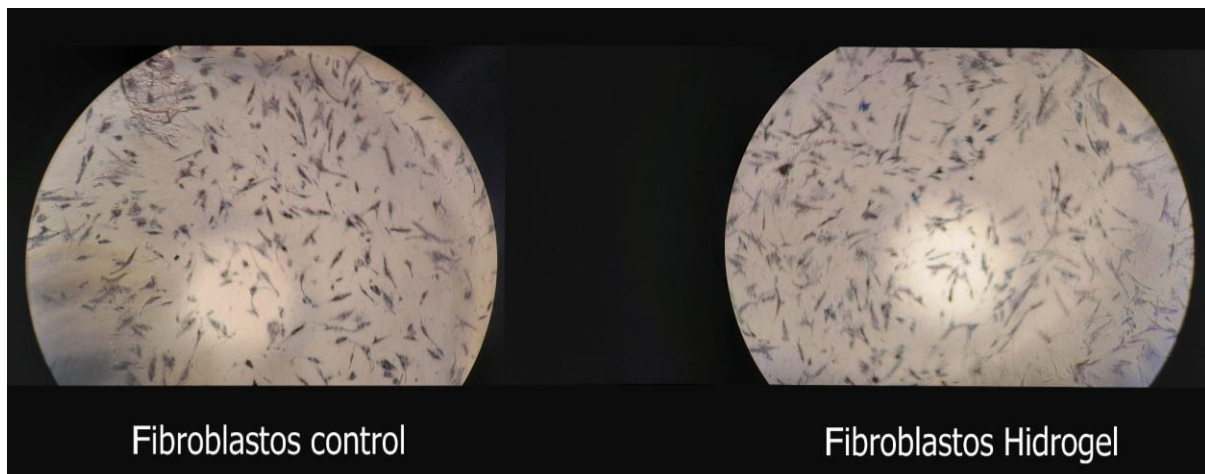


Figura. - 34 Viabilidad de fibroblastos control y con hidrogel

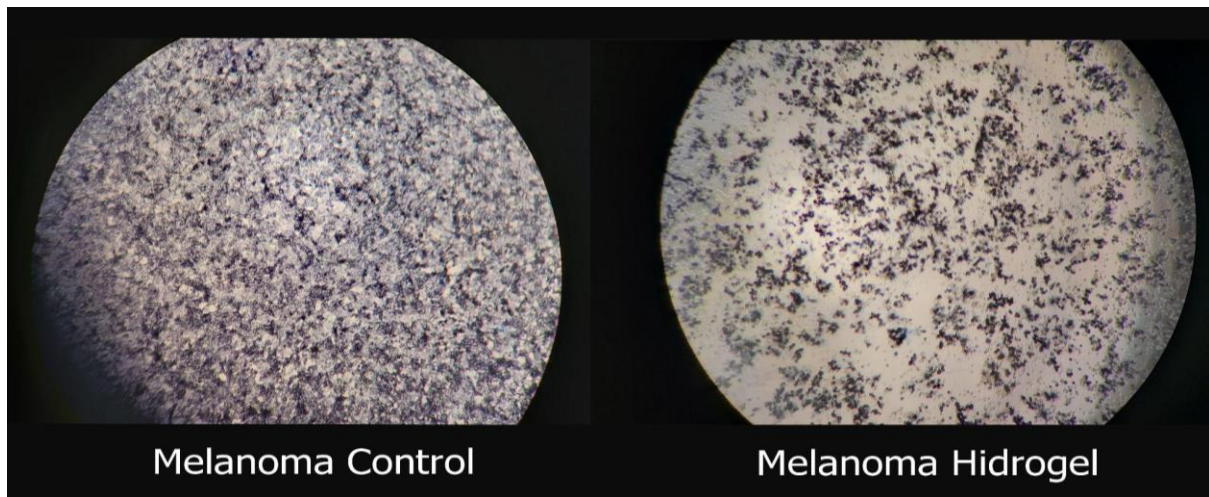


Figura. - 35 *Viabilidad de melanoma control y con hidrogel*

Se tiene reportado que los salicilatos tienen un efecto en el crecimiento de melanoma asociada a diversos fenómenos entre los cuales se puede destacar promover el estrés y la apoptosis del retículo endoplásmico dependiente del óxido nítrico (Fausto De Souza et al., 2020) y aumenta la expresión de la proteína p53 a través de la vía RP/Mdm2/p53 (Ausina et al., 2020), los cuales pueden ser una posible explicación de como el ácido salicílico tiene un efecto citotóxico en células de melanoma.

Capítulo V. CONCLUSIONES

- Fue posible llevar a cabo una reacción de polimerización usando los dos monómeros para generar el hidrogel en porciones 9:1, mediante el modelo de polimerización en disolución vía radicales libres.
- El hidrogel mostró ser sensible a cambios de pH presentando un mayor hinchamiento a pH 7.4 que a pH 1.2 y 5.5.
- A condiciones de pH 7.4 y temperatura de 37 °C el hidrogel es capaz de liberar ácido salicílico hasta en un 45% e indometacina en un 8%.
- El modelo de liberación que se adecua más sería el Higuchi.
- Se logró determinar que los hidrogeles no presentan citotoxicidad con los fibroblastos mediante el método de MTT, pero sí presentaron citotoxicidad con las células de melanoma.
- Los hidrogeles sintetizados son un modelo y propuesta como sistema de liberación dual de fármacos para potenciales aplicaciones tópicas.

Capítulo VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y CIBERNÉTICAS

1. Adepu, S., & Ramakrishna, S. (2021). Controlled drug delivery systems: Current status and future directions. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 19). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules26195905>
2. Ausina, P., Branco, J. R., Demaria, T. M., Esteves, A. M., Leandro, J. G. B., Ochioni, A. C., Mendonça, A. P. M., Palhano, F. L., Oliveira, M. F., Abou-Kheir, W., Sola-Penna, M., & Zancan, P. (2020). Acetylsalicylic acid and salicylic acid present anticancer properties against melanoma by promoting nitric oxide-dependent endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76824-6>
3. Bahram, M., Mohseni, N., & Moghtader, M. (2016). An Introduction to Hydrogels and Some Recent Applications. In *Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels*. InTech. <https://doi.org/10.5772/64301>
4. Bashir, S., Hina, M., Iqbal, J., Rajpar, A. H., Mujtaba, M. A., Alghamdi, N. A., Wageh, S., Ramesh, K., & Ramesh, S. (2020). Fundamental concepts of hydrogels: Synthesis, properties, and their applications. In *Polymers* (Vol. 12, Issue 11, pp. 1–60). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/polym12112702>
5. Bordbar-Khiabani, A., & Gasik, M. (2022). Smart Hydrogels for Advanced Drug Delivery Systems. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23073665>
6. Monika, P., Chandraprabha, M. N., Rangarajan, A., Waiker, P. V., & Chidambara Murthy, K. N. (2022). Challenges in Healing Wound: Role of Complementary and Alternative Medicine. In *Frontiers in Nutrition* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.791899>
7. Schilrreff, P., & Alexiev, U. (2022). Chronic Inflammation in Non-Healing Skin Wounds and Promising Natural Bioactive Compounds Treatment. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23094928>
8. Bustamante-Torres, M., Romero-Fierro, D., Arcenales-Vera, B., Palomino, K., Magaña, H., & Bucio, E. (2021). Hydrogels classification according to the physical or chemical interactions and as stimuli-sensitive materials. In *Gels* (Vol. 7, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/gels7040182>

9. Chai, Q., Jiao, Y., & Yu, X. (2017). Hydrogels for biomedical applications: Their characteristics and the mechanisms behind them. In *Gels* (Vol. 3, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/gels3010006>
10. Dreiss, C. A. (2020). Hydrogel design strategies for drug delivery. In *Current Opinion in Colloid and Interface Science* (Vol. 48, pp. 1–17). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2020.02.001>
11. Fausto De Souza, D., Tsering, T., Burnier, M. N., Bravo-Filho, V., Dias, A. B. T., Abdouh, M., Goyeneche, A., & Burnier, J. V. (2020). Acetylsalicylic Acid Exerts Potent Antitumor and Antiangiogenic Effects in Cutaneous and Uveal Melanoma Cell Lines. *Ocular Oncology and Pathology*, 6(6), 442–455. <https://doi.org/10.1159/000510582>
12. Rogel Hernández Eduardo, E. G. J. H. M. L. M. A. R. O. R. (2020). Principios básicos de síntesis de polímeros (ILCSA).
13. Gao, Y. (2018). Introduction and synthesis of polymeric prodrugs. *MOJ Bioequivalence & Bioavailability*, 5(3). <https://doi.org/10.15406/mojbb.2018.05.00092>
14. Gedde, U. W., & Hedenqvist, M. S. (n.d.). *Graduate Texts in Physics Fundamental Polymer Science*. <http://www.springer.com/series/8431>
15. George, J., Hsu, C. C., Nguyen, L. T. B., Ye, H., & Cui, Z. (2020). Neural tissue engineering with structured hydrogels in CNS models and therapies. In *Biotechnology Advances* (Vol. 42). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.009>
16. Holzer-Geissler, J. C. J., Schwingenschuh, S., Zacharias, M., Einsiedler, J., Kainz, S., Reisenegger, P., Holecek, C., Hofmann, E., Wolff-Winiski, B., Fahrngruber, H., Birngruber, T., Kamolz, L. P., & Kotzbeck, P. (2022). Article The Impact of Prolonged Inflammation on Wound Healing. *Biomedicines*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10040856>
17. Huang, Y., Dan, Y., Dan, N., & Chen, Y. (2021). Controlled-release of indomethacin triggered by inflammation-response for wound care. *Polymer Testing*, 97. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2021.107129>
18. Farnaz Esmaeili, Mirzaagha Babazadeh (2015). *Targeted and controlled release of indomethacin from polyacrylic carrier systems*. www.scholarsresearchlibrary.com

19. Koltzenburg, S., Maskos, M., & Nuyken, O. (2017). Introduction and Basic Concepts. In *Polymer Chemistry* (pp. 1–16). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-49279-6_1
20. Landis, M. S. (2013). Physicochemical property trends of marketed prodrugs. In *Therapeutic Delivery* (Vol. 4, Issue 2, pp. 225–237). <https://doi.org/10.4155/tde.12.150>
21. Li, J., & Mooney, D. J. (2016). Designing hydrogels for controlled drug delivery. In *Nature Reviews Materials* (Vol. 1, Issue 12). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.71>
22. Markovic, M., Ben-Shabat, S., & Dahan, A. (2020). Prodrugs for improved drug delivery: Lessons learned from recently developed and marketed products. In *Pharmaceutics* (Vol. 12, Issue 11, pp. 1–12). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111031>
23. McKeen, L. W. (2016). Introduction to Plastics and Polymers. In *Fatigue and Tribological Properties of Plastics and Elastomers* (pp. 45–64). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-44201-5.00003-4>
24. Najjar, A., & Karaman, R. (2019). The prodrug approach in the era of drug design. In *Expert Opinion on Drug Delivery* (Vol. 16, Issue 1, pp. 1–5). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1553954>
25. Nasibullin, I., Smirnov, I., Ahmadi, P., Vong, K., Kurbangalieva, A., & Tanaka, K. (2022). Synthetic prodrug design enables biocatalytic activation in mice to elicit tumor growth suppression. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27804-5>
26. Qureshi, D., Nayak, S. K., Maji, S., Anis, A., Kim, D., & Pal, K. (2019). Environment sensitive hydrogels for drug delivery applications. In *European Polymer Journal* (Vol. 120). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.109220>
27. Ramirez, A., Luis Benítez, J., Rojas De Astudillo, L., Rojas De Gáscue, B., Ftir, S., & And, T. (2016). MATERIALES POLIMEROS DE TIPO HIDROGELES: REVISIÓN SOBRE SU CARACTERIZACIÓN MEDIANTE FTIR, DSC, MEB y MET POLYMERS MATERIALS TYPE HYDROGELS: REVIEW OF THEIR CHARACTERIZATION. In *Rev. LatinAm. Metal. Mat* (Vol. 36, Issue 2). www.rlmm.org

28. Schilrreff, P., & Alexiev, U. (2022). Chronic Inflammation in Non-Healing Skin Wounds and Promising Natural Bioactive Compounds Treatment. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23094928>
29. Shukla, S. K., Sharma, A. K., Gupta, V., & Yashavardhan, M. H. (2019). Pharmacological control of inflammation in wound healing. In *Journal of Tissue Viability* (Vol. 28, Issue 4, pp. 218–222). Tissue Viability Society. <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2019.09.002>
30. Sun, Y., Nan, D., Jin, H., & Qu, X. (2020). Recent advances of injectable hydrogels for drug delivery and tissue engineering applications. *Polymer Testing*, 81. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2019.106283>
31. Walther, R., Rautio, J., & Zelikin, A. N. (2017). Prodrugs in medicinal chemistry and enzyme prodrug therapies. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 118, pp. 65–77). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.06.013>
32. Zhu, J., Zhong, K., Zong, Y., Wang, S., Yang, H., Zhen, L., Tao, S., Sun, L., Yang, J., & Li, J. (2022). A mussel-inspired wet-adhesion hydrogel with hemostasis and local anti-inflammation for managing the development of acute wounds. *Materials and Design*, 213. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2021.110347>