

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA



*“Síntesis de hidrogeles a partir profármaco polimérico y antiinflamatorio,
para potenciales aplicaciones tópicas”*

T E S I S

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

VANESSA GONZÁLEZ GUERRERO

Director de tesis

Dr. Héctor Alfonso Magaña Badilla

Co-Directora de tesis

Dra. Kenia Palomino Vizcaíno

Tijuana, Baja California

Abril 2022

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco a la Universidad Autónoma de Baja California y a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería por permitirme cumplir mi deseo de conocer una carrera que me ha encantado estos 4 años. Estoy agradecida por la oportunidad de estudiar en la facultad y por su apoyo incondicional a lo largo de estos años.

Agradezco inmensamente al Dr. Héctor Alfonso Magaña Badilla y a la Dra. Kenia Palomino Vizcaíno que sin su apoyo y sin su amabilidad este trabajo no hubiera pasado. Les agradezco por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por abrirme las puertas de su laboratorio y por aceptarme como persona, siempre confiando en mí como alumno y profesionista. Estoy infinitamente agradecida.

Con el Dr., por compartir sus conocimientos y su experiencia en el área de investigación, son lecciones que honestamente no olvidaré. Por brindarme sus consejos, todo su entendimiento y apoyo durante todo este tiempo. A la Dra., por darme los ánimos de terminar este trabajo en tiempo y forma y, por estar allí siempre para sus alumnos, es una persona honorable que me instruyó demasiado en el área químico farmacéutica biológica.

Les agradezco y respeto demasiado porque, aunque no fuera parte de su trabajo, se quedaran hasta altas horas de la noche por ayudarnos, dándonos buenas pláticas y su disposición en cualquier momento.

Agradezco al laboratorio de tecnología farmacéutica por aceptarme como su grupo de trabajo, por compartir tantas experiencias, tantas anécdotas con ustedes y por fomentar mi deseo y entusiasmo por la investigación farmacéutica.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco a Dios, por concederme la oportunidad de entregar este trabajo, por brindarnos alegría a mi familia y por darme unos maravillosos papás.

A mis excelentes padres les agradezco de corazón, todo lo que me han dado, siempre se han preocupado por mi, han estado conmigo en los buenos y malos momentos que era lo que más necesitaba en los malos momentos. Gracias por su apoyo a lo largo de mi vida, ustedes me dieron su mano todo el tiempo y cumplieron hasta mi más anhelado sueño. Gracias porque en mi carrera cuando necesitaba algo, a la hora que sea, me ayudaron a conseguirlo. Por su amor y su cariño, gracias, sin ustedes no sería quien soy y este trabajo no sería posible sin su guía y confianza.

A mi familia, por ser la familia que no escogí pero sin dudarlo escogería, a mi hermana por hacerme reír y compartir tantos momentos bonitos, a mi hermano, por ser el pequeño de la familia y el que siempre querré, a mis primos por, simplemente ser ellos mismos, y con eso me enseñaron que puedo ser quien yo quiera ser y por su cariño, a mis tías y tíos, por darme el ejemplo, motivándome a ser una buena persona tanto personal como profesionalmente. A mi abuela, por siempre levantar mi ánimo cuando lo necesito y contarme sus historias que son muy importantes para mí.

Mi amor infinito para ustedes, familia, los adoro, mil gracias a cada uno de ustedes.

ÍNDICE

CONTENIDO

Agradecimientos

Índice

	Página
Capítulo I. INTRODUCCIÓN	
I.I Antecedentes	6
I.II Resumen	7
I.III Planteamiento del problema	8
I.IV Justificación	8
I.V Hipótesis	9
I.VI Objetivo general	9
I.VII Objetivos específicos	9
Capítulo II. MARCO TEÓRICO	
II.I Polímero y monómero	11
II.II Clasificación de polímeros	12
II.III Funcionalidad de los monómeros	13
II.IV Polimerización en cadena	14
II.V Polímero profármaco	15
II.VI Hidrogeles y sus características	16
II.VII Liberación de fármacos	17
Capítulo III. EXPERIMENTAL	
III.I Equipos y Reactivos	19
III.II Síntesis y purificación del monómero monómero ácido metacrililoixi- <i>o</i> -benzoico (MAOB)	20
III.II.I Síntesis del monómero ácido metacrililoixi- <i>o</i> -benzoico	20
III.II.II Purificación del monómero ácido metacrililoixi- <i>o</i> -benzoico	21
III.III.II.I Técnica de identificación de impurezas del monómero ácido metacrililoixi- <i>o</i> -benzoico (MAOB) por cromatografía de capa fina	21
III.III Técnicas de caracterización del monómero ácido metacrililoixi- <i>o</i> -benzoico (MAOB) con espectrofotometría de infrarrojo con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR)	22
III.IV Caracterización de diclofenaco con espectrofotometría de infrarrojo con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR)	22

III.V. Síntesis de hidrogeles de ácido metacrililoixi- <i>o</i> -benzoico (MAOB) y diclofenaco in situ	22
III.V.I Preparación de hidrogeles entre placas de vidrio	22
III.VI Caracterización de hidrogeles de MAOB con Diclofenaco in situ con infrarrojo con equipo (FTIR-ATR)	24
III.VII Estudio de hinchamiento de hidrogeles	24
III.VIII Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)	25
III.VIII.I Preparación de fase móvil	25
III.VIII.II Preparación de diluyente para soluciones estandarizadas	25
III.VIII.III Preparación de solución estándar de ácido salicílico a concentración de 1 mg/mL	25
III.VIII.IV Preparación de solución estándar de diclofenaco a concentración de 1 mg/mL	25
III.VIII.V Preparación de solución estándar dual (ácido salicílico-diclofenaco) a concentración de 1 mg/mL	26
III.VIII.VI Preparación de muestra problema	26
III.VIII.VII Preparación de soluciones estándares duales a pH 7.4 para recta de calibración	26
III.VIII.VIII Condiciones de corrida	26
III.IX Estudio de hidrólisis-liberación de hidrogeles	27
III.X Pruebas biológicas	28
III.X.I Prueba microbiológica utilizando la escala de McFarland y lectura de cambio en turbidez con espectrofotómetro	28
III.X.II Prueba microbiológica con técnica de sembrado en placa por extensión	28
Capítulo IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	
IV.I Síntesis y purificación del monómero ácido metacrililoixi- <i>o</i> -benzoico (MAOB)	29
IV.I.I Síntesis del monómero ácido metacrililoixi- <i>o</i> -benzoico	29
IV.I.II Purificación del monómero ácido metacrililoixi- <i>o</i> -benzoico	30
IV.I.II.I Técnica de identificación de impurezas del monómero MAOB por medio de cromatografía de capa fina	30
IV.II Técnicas de caracterización del monómero ácido metacrililoixi- <i>o</i> -benzoico (MAOB) con espectrofotometría de infrarrojo con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR)	31

IV.III Caracterización de diclofenaco con espectrofotometría de infrarrojo con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR)	32
IV.IV Síntesis de hidrogeles a partir del monómero ácido metacrililoiloxi-o-benzoico (MAOB) y diclofenaco <i>in situ</i>	33
IV.V Caracterización de los hidrogeles con espectrofotometría de infrarrojo con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR)	35
IV.VI Experimentos de hinchamiento de hidrogeles	37
IV.VII Cromatografía de líquidos de alta resolución	39
IV.VII.I Cromatogramas del estándar dual	40
IV.VII.II Cromatogramas de las liberaciones de los hidrogeles de MAOB cargados con diclofenaco <i>in situ</i> a distintos pH	40
IV.VIII Estudio de hidrólisis-liberación de fármacos a partir de los hidrogeles	44
IV.IX Pruebas biológicas	46
IV.IX.I Prueba microbiológica utilizando la escala de McFarland y lectura de cambio en turbidez con espectrofotómetro	46
IV.IX.II Prueba microbiológica con técnica de sembrado en placa por extensión	49
Capítulo V. CONCLUSIONES	51
Capítulo VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y CIBERNÉTICAS	53
LISTA DE FIGURAS	56
ANEXOS	60

Capítulo I. INTRODUCCIÓN

I.1 Antecedentes

El avance de hidrogeles para su uso localizado ha tenido un avance creciente en los últimos años, ya que estos poseen las facultades de liberar el fármaco cuando está siendo estimulado y así, llega a su sitio de acción, en tiempo y velocidad deseada, lo que genera interés en estos temas. Actualmente, un hidrogel se ha convertido en una gran herramienta para el desarrollo y mejora de sistemas de tratamientos terapéuticos.

Actualmente, los hidrogeles se han convertido en un considerable apósito para heridas y esto es de vital importancia, más ahora, ya que las heridas siguen siendo un desafío importante para el sistema de salud mundial, con procesos de tratamiento, en ocasiones prolongados, costosos y de alta prevalencia. El vendaje de heridas con gasa de algodón es usado vastamente debido a su conveniencia y su bajo precio. (Lirong Wang y col. 2022)

Sin embargo, estos apósitos tradicionales deben desinfectarse y reemplazarse con frecuencia según la experiencia clínica, lo que puede dañar el nuevo tejido de la piel y aumentar el riesgo de infección. En años recientes, se han ido desarrollando numerosos apósitos para heridas con excelentes propiedades, con capacidad antibacteriana, antiinflamatoria y capacidad de ser inyectable para proteger y acelerar la cicatrización de heridas. (Lirong Wang y col. 2022)

El hidrogel se ha convertido gradualmente en un candidato importante para el vendaje de heridas médicas por sus ventajas únicas, como biocompatibilidad superior, características mecánicas y capacidad de curación con precisión. Los hidrogeles están siendo vastamente estudiados para buscar mejorar la salud del paciente y la calidad de vida. (Lirong Wang y col. 2022)

I.II Resumen

El presente trabajo de tesis presenta la síntesis de hidrogeles profármacos a partir de un monómero de ácido salicílico y diclofenaco cargado *in situ*, con el fin de estudiar su comportamiento ante estímulos fisiológicos de pH y temperatura para conocer su practicidad, posible aplicación en heridas y fomentar su investigación con estudios *in vitro*. Se realizó la síntesis y caracterización del monómero llamado ácido metacrililoiloxi-*o*-benzoico (MAOB) por medio de cromatografía de capa fina y por espectroscopía de infrarrojo con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR), así como una caracterización del diclofenaco por FTIR-ATR. Se prepararon los hidrogeles entre placas de vidrio sujetas por pinzas y se colocó por medio de una pipeta, entre sus paredes, el producto con el diclofenaco cargado. mediante polimerización en disolución vía radicales libres o polimerización en cadena en condiciones de atmósfera inerte de nitrógeno y a una temperatura de gelificación de 60 °C, utilizando como agente entrecruzante dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA), azobisisobutinitrilo (AIBN) como iniciador y como solvente dimetilsulfóxido. Posteriormente, se extrae de las placas y se realiza un lavado con metanol para su purificación, mientras está en este proceso se le realiza cortes en forma de discos para los estudios siguientes. Después de 24 horas, se cristalizaron los discos y se iniciaron los estudios de hinchamiento y de hidrólisis-liberación con una duración de 10 días. Se sometieron a pH de 1.2 (simulando el del estómago), 5.5 (simulando el de la piel) y el de 7.4 (simulando el de la sangre), así como movimiento continuo por medio de un oscilador con temperatura constante de 37 °C cómo se presenta en un cuerpo humano. Se obtuvo una mayor transición del hidrogel cuando el pH era más alcalino en el medio, generando un colapso total en las pruebas de hinchamiento y en las de hidrólisis. Las muestras recogidas para el análisis de hidrólisis-liberación fueron inyectadas en cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) apareciendo los picos duales de ácido salicílico y diclofenaco, viéndose mayores concentraciones de ambos fármacos en las liberaciones a pH 7.4, y de manera consiguiente el resultado menos favorable eran aquellos provenientes de las liberaciones a pH 1.2 debido a que el ácido salicílico y diclofenaco, de lo que está compuesto nuestro hidrogel es con tendencia a ser ácido así que su forma ionizada (grado de hinchamiento) será en medios alcalinos. El utilizar este equipo fue para fines cuantitativos analíticos para una comprobación más precisa de la liberación del fármaco.

I.III Planteamiento del problema

Heridas por cortaduras o quemaduras son constantes en la vida diaria, afectando a todas las edades y siendo ampliamente dolorosas en algunos casos. Estas heridas pueden llegar a complicarse y convertirse en un área expuesta hacia microorganismos infecciosos que perjudican la salud del paciente.

Las heridas se ven, día con día, en el ámbito hospitalario, comúnmente son heridas profundas que necesitan más que solo su limpieza para su mejora, se administran farmacéuticos por vía intravenosa para calmar el dolor del paciente, aumentar su cicatrización, prevenir una infección y disminuir la inflamación.

Debido a la existencia de los hidrogeles (Zahra Shariatinia, 2021), estos se pueden aplicar como apósito de heridas ya que son localizados y ofrecen beneficios con capacidades únicas, haciéndolos aún más importantes, cuando tienen fármacos en ellos, ya que atacan a más de una afección que tenga el paciente en la herida, llegando a la sangre, por ejemplo, para aliviar su dolor, así como disminuir la inflamación aguda que se genera por el sistema inmunitario. (Lirong Wang y col. 2022)

I.IV Justificación

En base al alto índice de procesos inflamatorios y por consiguiente infecciosos que se dan en cortadas tópicas por accidentes o procesos quirúrgicos el poder encontrar y contar con nuevos y sofisticados productos que sean innovadores, así como multifuncionales genera una necesidad emergente en el área clínica.

Se sabe que los polímeros son ampliamente estudiados en debido a sus habilidades inteligentes o sensibles a estímulo-respuesta y estos se han desarrollado como eficientes vehículos de reparto. Estos agentes pueden variar sus composiciones, estructuras o conformaciones a la respuesta interna y/o estímulos bioquímicos o físicos externos y conducen a la liberación de agentes activos atrapados. (Zahra Shariatinia, 2021). En el caso de heridas, es conveniente utilizar a los polímeros en su forma de hidrogeles, debido a sus propiedades de hinchamiento por estímulos de pH y temperatura fisiológica que lo harán activo solo estando en contacto con el ser humano y, de esta manera, liberar su monómero y contenido solamente en el área colocada.

En este trabajo se busca eficientizar la sanación de heridas mediante la preparación de unos hidrogeles a base un monómero a base de ácido salicílico y con un cargado

in situ de diclofenaco. Se explica que con la hidrólisis de las cadenas poliméricas del hidrogel por el estímulo de temperatura y pH se liberará el antiinflamatorio y reduce la hinchazón generada cerca de la herida debido a procesos inflamatorios propios del sistema inmunitario. Debido a que el monómero es profármaco, libera ácido salicílico, se observa que este posee liberación específica en el sitio de acción y se beneficia de sus propiedades antiinflamatorias, analgésicas y propiedades antibiofilm (Magaña y col. 2016), lo cual sería beneficioso para el preparado farmacéutico generado que busca crear un apósito inteligente para mejorar el problema recurrente de heridas hospitalarias y comunes.

I.V Hipótesis

Es posible formular un hidrogel a partir de un polímero profármaco junto con un antiinflamatorio para eficientizar la sanación de heridas; estos dos componentes se verían beneficiados en el mercado, para su aplicación tópica y localizada. Los hidrogeles a partir de un polímero profármaco de tipo salicilatos y un antiinflamatorio como diclofenaco podrían favorecer a la profilaxis ante procesos infecciosos en heridas tópicas.

I.VI Objetivo general

Síntesis de hidrogeles a partir de poli(ácido metacrililoixi-*o*-benzoico) cargados *in situ* con diclofenaco. Su caracterización y estudio hidrólisis-liberación de ácido salicílico y diclofenaco por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).

I.VII Objetivos específicos

1. Síntesis del monómero ácido metacrililoixi-*o*-benzoico mediante un proceso de esterificación.
2. Purificación del monómero ácido metacrililoixi-*o*-benzoico y comprobación por cromatografía de capa fina (CCF).
3. Caracterización del monómero por medio de espectroscopía de FTIR-ATR.
4. Síntesis y purificación de los hidrogeles, formulados a partir del monómero profármaco ácido metacrililoixi-*o*-benzoico y diclofenaco

in situ mediante disolución vía radicales libres, en forma de lámina en placas de vidrio.

5. Caracterización del hidrogel por medio de la espectroscopia FTIR-ATR.
6. Estudio de hidrólisis-liberación de los hidrogeles a partir de un polímero poli(MAOb) y diclofenaco *in situ*.
7. Cuantificación de fármacos por medio de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).

Capítulo II. MARCO TEÓRICO

La industria de polímeros es una de las industrias más emergentes del último siglo. La producción de estos está creciendo más de 10 veces más rápido que la industria de generación de metales. El hecho de que una gran proporción de químicos egresados de distintas áreas estén empleados en industrias e investigación de polímeros demuestra el esfuerzo dedicado hacia los polímeros. (Lopez-Serrano, 2015)

II.I Polímero y monómero

Para entender lo que es un polímero primeramente se tiene que explicar lo que es un monómero. Un monómero es una molécula pequeña, única, que suele utilizarse como un material de inicio, al estar unida a otras iguales para formar una molécula más grande, el cual sería un oligómero después un polímero, como se podría observar en la *figura 1*. En el polímero, a cada monómero se le conoce como unidad repetitiva constitucional (CRU) o residuo (Rogel y col. 2020). Un polímero está constituido por una repetición de muchas subunidades iguales (monómeros) unidas por medio de enlaces covalentes, también, comúnmente conocido como una macromolécula. Mientras que un oligómero es un polímero corto con un número pequeño, de 1 a 20 unidades repetitivas de monómeros (*figura 2*). Son conocidos por ser polímeros de bajo peso molecular donde sus propiedades físicas dependen significativamente de la longitud de la cadena.

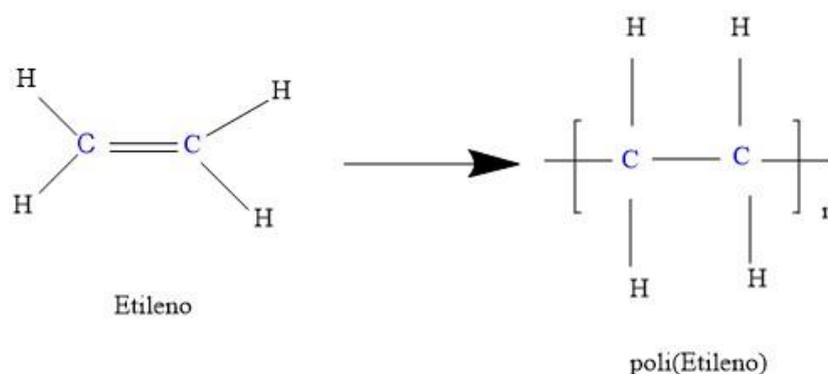


Figura 1. El monómero etileno y su polímero poli(Etileno).

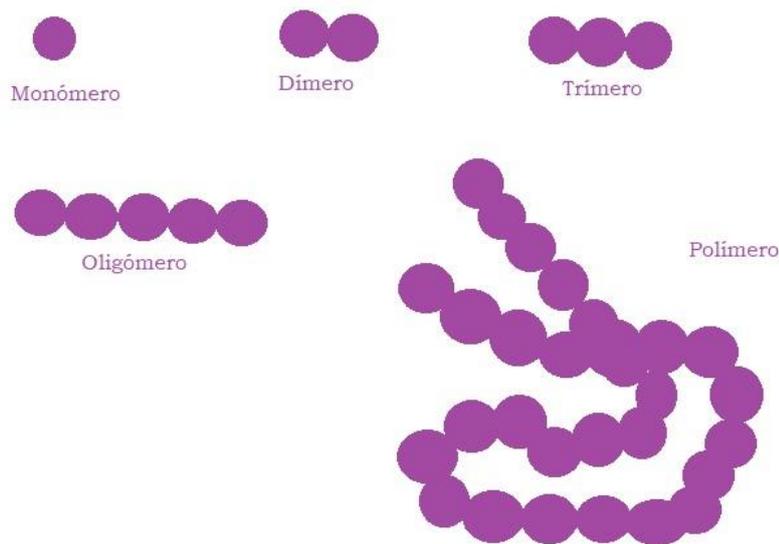


Figura 2. Representación de monómero, oligómero y polímero lineal.

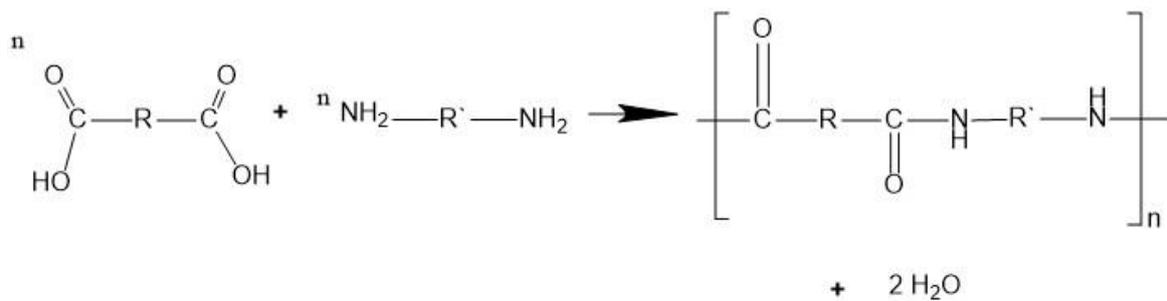
II.II Clasificación de polímeros

Para su mayor entendimiento, la clasificación general de polímeros es de acuerdo a su naturaleza, ya sea natural o sintética. (Élida H. 2011)

- A. *Polímeros naturales.* Se refiere a aquellos que son generados por seres vivos, como las proteínas que generamos cada una con su función específica. Como ejemplo, están los polisacáridos como el glucógeno que es como almacenamos la glucosa o azúcar que comemos.
- B. *Polímeros sintéticos.* Son aquellos generados mediante una síntesis química inducida en ambientes controlados para así generar la polimerización.

Carothers propuso una clasificación de diferenciación entre polímeros, el cual es de acuerdo a su síntesis, ya sea por condensación o por adición. Esto nos ayuda, sobre todo, a subclasificar a los polímeros por su formación. (Rogel y col. 2020)

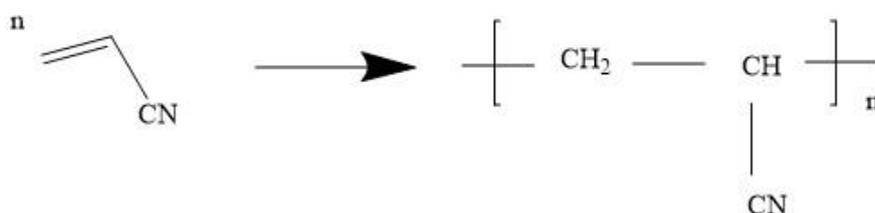
- A. *Polímeros por condensación.* La fórmula molecular del polímero carece de ciertos átomos que sí estaban presentes en el monómero originario (*figura 3*).



Polimerización por condensación

Figura 3. Polimerización por condensación.

B. *Polímeros por adición.* La fórmula molecular del polímero es idéntica a la del monómero (figura 4).



Polimerización por adición

Figura 4. Polimerización por adición.

Asimismo, los polímeros también se pueden subdividir dependiendo de su comportamiento físico (Rogel y col. 2020), como:

- A. *Termoplásticos.* Se refiere a aquellos que se funden al calentarse y son solubles en sus correspondientes disolventes; son moléculas de cadena lineal o ramificada.
- B. *Termofijos.* No son capaces de fundirse ya que se descomponen a temperaturas elevadas y son insolubles en disolventes polares y apolares. Poseen estructuras tridimensionales.

II.III Funcionalidad de los monómeros

Una clasificación relevante es conforme a su estructura molecular, entre los cuales existen 3 principales, la estructura lineal, ramificada y reticulada. Este tipo de clasificación nos ayuda a visualizar el polímero en su esqueleto. Un grupo funcional, en un monómero, es el arreglo particular de átomos en una molécula, lo cual la hace capaz de polimerizarse. La funcionalidad entonces, es el número de grupos

funcionales por molécula, o bien, el número de enlaces que un monómero puede formar con otro. Un monómero mono funcional es por ejemplo un dímero, uno bifuncional es un polímero lineal y uno polifuncional es un polímero ramificado y el reticulado, como es posible observarlo en la *figura 5*. (Rogel y col. 2020)

- A. *Estructura lineal*. Se repite el mismo tipo de unión de adición de grupos vinilo -CH₂. Debido a que son muy flexibles porque solo existen fuerzas de van der Waals o fuerzas eléctricas puede tener ciertas rotaciones, así como puede estar superpuesta en sí misma o enrollada.
- B. *Estructura ramificada*. Las cadenas laterales están unidas a la principal en distintas zonas.
- C. *Estructura reticulada*. Existe unión de dos o más cadenas vecinas mediante un enlace covalente.

Muchos monómeros se encuentran con más de un grupo funcional, así, las posibilidades de polimerización son más variadas. Para cada tipo de polimerización, se requiere que la funcionalidad del monómero sea mínimo, bifuncional. (Rogel y col. 2020)

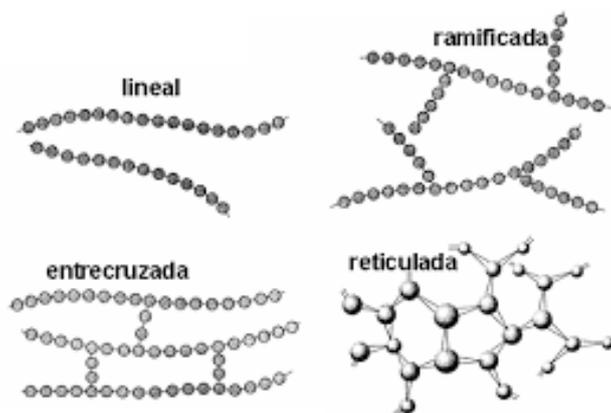


Figura 5. Representaciones de distintas estructuras moleculares que toman los polímeros: la estructura lineal, ramificada, entrecruzada y reticulada.

II.IV Polimerización en cadena

La polimerización en cadena se ha estudiado con gran interés hasta nuestros días. La polimerización vía radicales libres o radicales primarios contiene 3 etapas principales: iniciación (activación), propagación y terminación. (Rogel y col. 2020)

La etapa de iniciación ocurre cuando en el medio de reacción ya se encuentran los radicales libres. Estos se generan por parte de iniciadores, los cuales son moléculas

que generan los radicales primarios. La reacción de disociación del iniciador es clave (figura 6). Este se disocia más rápidamente a temperaturas altas. La cinética de descomposición del iniciador está correlacionada con la presencia del disolvente y de la temperatura de polimerización. (Rogel y col. 2020)

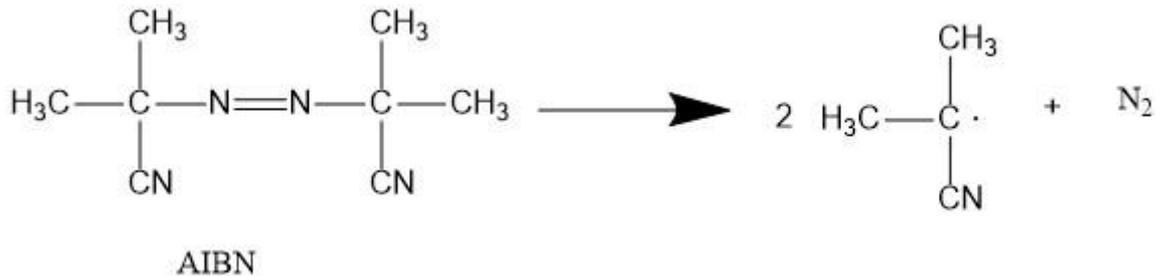


Figura 6. Ruptura homolítica del iniciador azobisisobutironitrilo (AIBN) para generar radicales libres.

La etapa de propagación consta en la reacción del monómero con el resto de monómeros presentes en la reacción.

La etapa de terminación es aquella donde la cadena de polímero activo no permanece como radical libre por siempre, y termina, ocurriendo esto de distintas formas: una es forzando la terminación mediante la adición de sustancias que son capaces de terminar la reacción, o por reacciones laterales como las reacciones de transferencia de cadena, asimismo, la terminación puede llevarse a cabo mediante el acoplamiento de dos cadenas de polímero activo, resultando en un polímero del doble de sus tamaños originales, o bien, por desproporción, la cual consiste en la transferencia de un átomo (generalmente hidrógeno) de una cadena a otra, por lo que se generan dos cadenas independientes. (Rogel y col. 2020)

El tipo de terminación depende de distintos factores, como lo son:

- A. Temperatura de reacción.
- B. Estructura del radical.
- C. Efectos estéricos.
- D. Efectos electrostáticos.
- E. Disponibilidad de hidrógenos β para así, su transferencia a otra cadena del polímero.

II.V Polímero profármaco

Los profármacos son derivados inactivos y biorreversibles de moléculas de fármacos activos que deben sufrir una transformación *in vivo* para liberar el fármaco original

activo, que después provocará el efecto farmacológico deseado en el cuerpo. En la mayoría de los casos, estos son derivados químicos simples que están a solo uno o dos pasos químicos o enzimáticos del fármaco original activo. (Huttunen y col. 2011) (Rautio y col. 2008)

Aunque el desarrollo de un profármaco puede ser muy desafiante, el enfoque de profármaco representa una forma factible de mejorar las propiedades de los fármacos en investigación o los fármacos que ya están en el mercado. (Huttunen y col. 2011) (Rautio y col. 2008) La síntesis de un fármaco a partir de un polímero se denomina profármaco polimérico. Estos deben de ser no tóxicos, no antigénicos y no teratogénicos. Los profármacos poliméricos están diseñados para mejorar el uso de fármacos para aplicaciones terapéuticas ya que son sistemas de administración de fármaco dirigidos. (Feng Li y col. 2018)

I.VI Hidrogeles y sus características

El hidrogel es un material de polímero de red tridimensional reticulado, que puede absorber una gran cantidad de agua e hincharse sin disolverse, y tiene una excelente hidrofiliidad y flexibilidad. En los últimos años, gracias a los esfuerzos continuos de los investigadores, los materiales de hidrogel tienen una investigación profunda y amplias aplicaciones en pieles artificiales, sensores flexibles, ingeniería de tejidos y campos de la biomedicina. (Patel y col. 2022)

Además, el comportamiento de estímulo-respuesta también es un comportamiento esencial del hidrogel a través de la modificación estructural y la composición del material. Bajo estímulos externos (luz, temperatura, humedad, electricidad, magnético, pH), el hidrogel cambiará de color o forma. (Patel y col. 2022)

Los hidrogeles pueden clasificarse de distintas maneras. Una de las clasificaciones más conocidas es por el tipo de enlace del cual están entrecruzados, ya que de este depende la estructura de la red tridimensional y prevenir la disolución de las cadenas hidrofílicas. Existen dos tipos en las cuales se pueden clasificar: los hidrogeles físicamente entrecruzados, los cuales son por medio de enlaces débiles como puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas y, están también, los hidrogeles

químicamente entrecruzados, donde su entrecruzamiento es más estable debido a que es por enlaces covalentes inducidos por un químico añadido para mantener la estructura. (Dilshad Qureshi, 2019)

I.VII Liberación de fármacos

La administración de fármacos depende en gran medida de su forma farmacéutica ya que esto condiciona su capacidad para tratar a la célula diana y asimismo, condiciona que no genere demasiados efectos adversos. Las vías de administración se dividen en parenterales y enterales. Las parenterales son aquellas que evitan el tracto gastrointestinal y por lo tanto su biodisponibilidad en sangre aumenta y son más eficaces, como lo serían los inyectables. La vía enteral es aquella que, si pasa por el tracto gastrointestinal y pasa un proceso de metabolismo en él, unos ejemplos serían las cápsulas, tabletas, los comprimidos y los supositorios. Cada uno afecta su liberación en el organismo de distinta forma dependiendo de su composición.

Algunas de las formas farmacéuticas diseñadas, presentan diferente tipo de liberación, dependiendo de su composición buscando que se administre en algunas ocasiones, menos dosis repetidas y aun siga en el margen terapéutico, ejerciendo su función. Los sistemas de liberación se pueden clasificar de la siguiente manera: (Suñé. 2002)

- A. *Sistemas de liberación sostenida:* donde las formas farmacéuticas liberan rápidamente la dosis de fármaco inicial suficiente para obtener el proceso terapéutico y posteriormente, liberan solo la cantidad adecuada de manera constante para que la velocidad de absorción sea igual a la de eliminación durante un tiempo extenso y su cinética sea constante.
- B. *Sistemas de liberación prolongada:* donde las formas farmacéuticas liberan rápidamente la dosis de fármaco inicial suficiente para obtener el proceso terapéutico o incluso un exceso no nocivo para el organismo, posteriormente, liberan fármaco de forma lenta, no constante y no de la misma dosis por tiempo, por lo tanto, en su cinética, velocidad de absorción puede no igualarse con la velocidad de eliminación.
- C. *Sistemas de liberación repetida:* donde las formas farmacéuticas que liberan una dosis de fármaco inicial estándar y después, liberan otra dosis similar, pero

no existe liberación de fármaco en el intervalo de tiempo entre una dosis y otra, asimismo, estas formas farmacéuticas liberan dos o más dosis de fármaco iguales extendidas en el tiempo.

- D. *Sistemas de liberación retardada*: donde las formas farmacéuticas liberan una dosis de fármaco inicial después de transcurrido un tiempo de latencia, esto ocurre a menudo con fármacos enterales ya que es necesario su administración, su disociación (tiempo de latencia) y después la absorción del fármaco al torrente sanguíneo para así ya distribuirlo al sitio de acción.
- E. *Liberación controlada por hinchamiento*: Suele utilizarse más comúnmente con hidrogeles, denominados “materiales inteligentes” por su capacidad de respuesta ante un medio acuoso donde estén las condiciones propias para su hidrólisis y correspondiente hinchamiento. Los hidrogeles se desempeñan como una matriz polimérica que encapsulan al fármaco en cuestión en su región interna manteniéndolo inmóvil hasta que esté en el medio adecuado, allí las cadenas poliméricas entrarán a un estado de relajación liberando el fármaco cargado *in situ* y difundiéndose en el medio. Si el polímero es profármaco, al momento de su hidrólisis se va liberando el fármaco, así como, con su hidrólisis se hincha el hidrogel haciendo que sus cadenas poliméricas estén más expuestas y, una a una se vayan hidrolizando hasta que se libere todo el fármaco en el medio. La cinética de liberación de fármacos de este sistema, dependerá de la velocidad de hinchamiento del hidrogel, al igual que de la velocidad de difusión que presenta el fármaco,

Capítulo III. EXPERIMENTAL

III.I Equipo y reactivos

Equipo utilizado:

1. Matraz bola de 100 mL.
2. Baño maría/hielo.
3. Pinzas.
4. Soporte.
5. Vasos de precipitado.
6. Septum de goma.
7. Parrilla con agitador magnético.
8. Termómetro.
9. Pipetas de vidrio.
10. Pipetas transfer.
11. Jeringa con aguja de metal.
12. Equipo de filtrado con pinza.
13. Sonificador.
14. Espátula.
15. Mosca.
16. Vortex.

Reactivos:

1. Ácido salicílico. (Sigma Aldrich,USA)
2. 4-(Dimetilamino)piridina. (Sigma Aldrich,USA)
3. Trietanolamina. (Sigma Aldrich,USA)
4. Diclorometano. (Sigma Aldrich,USA)
5. 1,4-Dioxano. (Sigma Aldrich,USA)
6. Anhídrido metacrílico. (Sigma Aldrich,USA)
7. Ácido clorhídrico a disoluciones de 5N y 3N. (Favela Pro S.A. de C.V. FAGA LAB, México)
8. Azobisisobutironitrilo. (Sigma Aldrich,USA)
9. Diclofenaco. (Victory Enterprises, México)
10. Dimetacrilato de etilenglicol. (Productos Químicos Monterrey S.A. de C.V. Fermont, México)

11. Dimetilsulfóxido. (Sigma Aldrich, USA)
12. Metanol. (Productos Químicos Monterrey S.A. de C.V. Fermont, México)
13. Agua destilada.
14. Éter etílico anhidro. (Productos Químicos Monterrey S.A. de C.V. Fermont, México)
15. Hexano. (Sigma Aldrich, USA)
16. Sulfato de Magnesio anhidro al 99%. (Spectrum Chemical MFG CORP., USA)

III.II Síntesis y purificación del monómero ácido metacrililoixi-*o*-benzoico (MAOB)

III.II.I Síntesis del monómero ácido metacrililoixi-*o*-benzoico

Para formar el monómero se agrega a un matraz bola de 100 mL 6.9 g de ácido salicílico, 0.5 g de 4-(dimetilamino)piridina, 8.40 mL de trietanolamina y, finalmente, se añade diclorometano. A este matraz se le añade una mosca y se coloca en un agitador magnético para lograr la incorporación de los componentes mediante el movimiento. Cuando se genera una mezcla homogénea, se adiciona por goteo 7.2 mL de anhídrido metacrílico durante 3 horas en un baño de hielo. Pasadas las 3 horas, se quitará el baño de hielo y se mantendrá el matraz en agitación por 24 horas.

Al producto generado, se le acidifica hasta alcanzar un pH de 3 con ácido clorhídrico 5N con agitación constante obteniendo un precipitado. Este producto se extrae mediante un embudo de separación con 40 mL de éter etílico y se hacen 2 lavados, uno con 40 mL de una dilución de ácido clorhídrico 3N y el otro lavado con 40 mL de agua destilada. El producto se quedará en la fase orgánica. A la fase orgánica se le añade sulfato de magnesio anhidro al 99%, se filtra a vacío y se vierte a un cristizador.

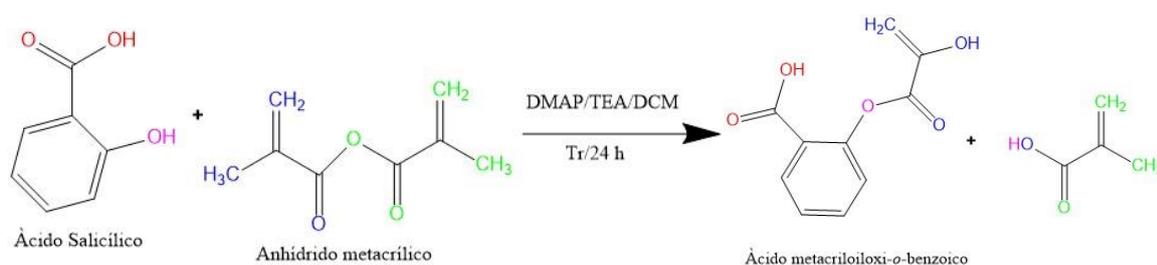


Figura 7. Reacción de síntesis del monómero ácido metacrililoixi-*o*-benzoico.

III.II.II Purificación del monómero ácido metacrililoiloxi-o-benzoico

El sólido obtenido en la síntesis se purifica, primeramente, mediante lavados a vacío con agua destilada. Se agrega 30 mL de agua destilada a temperatura ambiente y luego con agua destilada a 40 °C. Se repite en 3 ocasiones para eliminar impurezas del anhídrido metacrílico que no reaccionó.

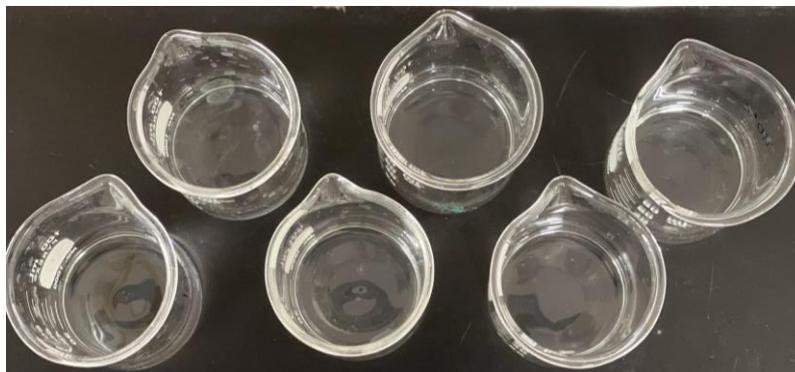


Figura 8. Representación de lavados con agua destilada a temperatura ambiente y posteriormente, con agua destilada a 40 °C.

El producto se transfiere a un vaso de precipitado y se disuelve en metanol. El fluido se vierte en un recrystalizador y se seca en una campana de extracción por un día. Más adelante, se calienta en una parrilla eléctrica 40 mL hexano hasta los 60 °C y se obtiene el sólido. Los cristales adquiridos se transportan al vaso de precipitado y se filtra este producto en caliente y se vierte a un recrystalizador se coloca en la estufa de vacío a 40 °C para conseguir el monómero de ácido metacrililoiloxi-o-benzoico.

III.II.III Técnicas de identificación de impurezas del monómero MAOB con cromatografía de capa fina

Esta prueba de identificación es para conocer la pureza del compuesto y confirmar su presencia. Se cargó la hoja de cromatografía con una gota de solución de referencia de ácido salicílico y a su lado con 1 cm de diferencia se cargó una gota del monómero. En la campana de extracción se hizo una solución de hexano y acetato de etilo con una proporción de 70:30 respectivamente. Se colocó 4 mililitros de esta solución en la cámara cromatográfica y con cuidado se vertió la placa verticalmente y se esperó unos minutos. Una vez concluido el proceso, se leyó los resultados con luz negra (UV).

III.III Técnicas de caracterización del monómero ácido metacrililoiloxi-*o*-benzoico (MAOB) con espectrofotometría de infrarrojo con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR)

El equipo empleado para el análisis de monómero MAOB es un equipo ATR Thermo Scientific modelo Nicolet iS5. Se limpió el área de análisis y el detector previamente con etanol y una vez evaporado el solvente, se colocó la cantidad necesaria de monómero para cubrir el detector, se bajó la punta de diamante con cuidado hasta el tope y se leyó un blanco para eliminar la humedad del ambiente de la lectura. Posterior a esto, se realiza un barrido de 16 lecturas y así, se obtuvo el espectro de IR del monómero MAOB.

III.IV Caracterización de diclofenaco con espectrofotometría de infrarrojo con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR)

El equipo empleado para el análisis de diclofenaco grado USP es un equipo ATR Thermo Scientific modelo Nicolet iS5. Se limpió el área de análisis y el detector previamente con etanol y una vez evaporado el solvente, se colocó la cantidad necesaria de diclofenaco para cubrir el detector, se bajó la punta de diamante con cuidado hasta el tope y se leyó un blanco para eliminar la humedad del ambiente de la lectura. Posterior a esto, se realizó un barrido de 16 lecturas y así, se obtuvo el espectro de IR del diclofenaco exitosamente.

III.V Síntesis de hidrogeles de ácido metacrililoiloxi-*o*-benzoico (MAOB) y diclofenaco *in situ*

III.V.I Preparación de hidrogeles entre placas de vidrio

Para la formación de hidrogel con 100 mg de diclofenaco *in situ*, a un matraz bola de 100 mL se le agrega primeramente 947 mg de monómero, 7.4 mg del iniciador azobisisobutironitrilo (AIBN), 16 microlitros del entrecruzante dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA) y finalmente se añade el agente solvente dimetilsulfóxido, se agita hasta disolver con mosca. La solución obtenida se coloca en baño de hielo se desgasifica durante 10 minutos con nitrógeno y una consiguiente salida. Cuando esto termina la salida se quita primero para no permitir la entrada de oxígeno a la muestra.

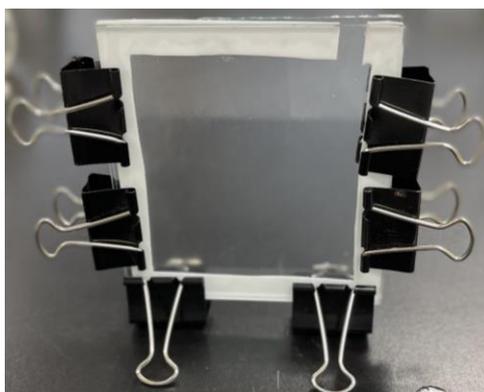


Figura 9. Modelo de placas de vidrio sujetado con pinzas para la formación de hidrogeles.

Utilizando una micropipeta, se coloca toda la solución obtenida entre las 2 placas de vidrio y un molde preparado previamente sujetado por pinzas por los costados y la parte inferior. Luego, se posicionó verticalmente en una estufa de vacío bajo condiciones de atmósfera inerte de nitrógeno a 60 °C por 24 horas.

Una vez transcurrido este tiempo, se extrajo la placa de cristal de la estufa y fueron retiradas las pinzas para retirar el hidrogel con cuidado de no generar fracturas. En una estufa inestable se hubieran generado unas burbujas en el hidrogel. Se realiza un lavado colocando el hidrogel en la campana de extracción dentro de una nave grande con suficiente metanol para cubrir por completo el hidrogel por 10 minutos y esta nave está cubierta para evitar la evaporación del solvente.

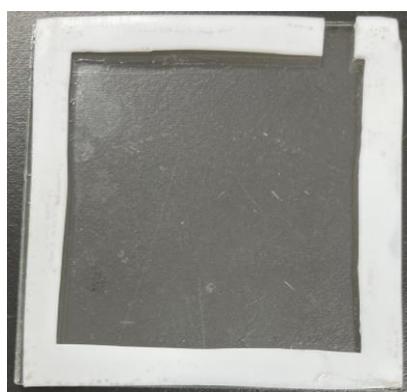


Figura 10. Molde utilizado entre las placas de vidrio para dar forma al hidrogel.

Se procede a cortar el hidrogel después del tiempo mencionado. Se corta en pequeños discos de dos diámetros distintos: 0.5 cm y 1 cm, así como en rectángulos largos simulando un parche con un cortador de metal y se deja secar por 24 horas mientras seguía esponjado con metanol. Se despegó cada disco o parche de la caja

Petri donde se dejó para secar, ya que al endurecerse se adhieren a las superficies. Cuando transcurran las 24 horas y estén secos por completo serán transparentes y completamente cristalinas.

III.VI Caracterización de hidrogeles de MAOB con Diclofenaco *in situ* con infrarrojo con equipo (FTIR-ATR)

El equipo empleado para el análisis del hidrogel de MAOB y diclofenaco *in situ* es un equipo ATR Thermo Scientific modelo Nicolet iS5. Se hicieron 2 pruebas, en una se cortó un pedazo de hidrogel en que peso 0.10 g y en otra se trituró un pedazo pequeño de hidrogel para observar cual daba mejor lectura. Se limpió el área de análisis y el detector previamente con etanol y una vez evaporado el solvente, se colocó la cantidad necesaria de hidrogel para cubrir el detector, se bajó la punta de diamante con cuidado hasta el tope y se leyó un blanco para eliminar la humedad del ambiente de la lectura. Posterior a esto, se realizó un barrido de 16 lecturas y así, se obtuvo el espectro de IR del hidrogel exitosamente. Se concluyó que la lectura se ve favorecida cuando está triturado ya que se observan mejor los picos característicos.

III.VII Estudio de hinchamiento de hidrogeles

Para conocer los cambios en el hinchamiento y peso de nuestro hidrogel con polímero profármaco y el diclofenaco se realizó este estudio con los distintos pH fisiológicos preparados para el estudio de hidrólisis, buffers a pH 1.2, 5.5 y 7.4. En este análisis se realizó un triplicado con los 3 distintos buffers y se agregó el hidrogel cristalino en forma de disco de 1 cm a cada vial correspondiente con 20 mL de buffer. Se contó este momento como tiempo 0. Los viales se colocaron en el oscilador a 37 °C con 100 RPM de agitación constante y se pesaron a los siguientes intervalos de tiempo: 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas en el primer día y después de este día cada 24 horas hasta el décimo día. Se elimina el exceso de agua con ayuda de la espátula y papel kimwipes. Asimismo, se dejó un vial con cada buffer a distinto pH a temperatura ambiente sin agitación para observar su comportamiento.

III.VIII Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)

III.VIII.I Preparación de fase móvil

Fase móvil: Metanol HPLC.

Se filtra metanol grado HPLC con equipo de filtrado con pinza y se desgasifica durante 10 minutos.

Fase móvil: Agua destilada.

Se filtra agua destilada con equipo de filtrado con pinza y se desgasifica durante 10 minutos.

Fase móvil: Acetonitrilo HPLC.

Se filtra acetonitrilo grado HPLC con equipo de filtrado con pinza y se desgasifica durante 10 minutos.

Fase móvil: Ácido fórmico 0.1%.

Se agrega 1 mL a 1000 mL de agua destilada y se mantiene en agitación constante durante 10 minutos para su incorporación. Posteriormente se filtra con equipo de filtrado con pinza y se desgasifica durante 10 minutos.

III.VIII.II Preparación de diluyente para soluciones estandarizadas

En un matraz volumétrico de 100 mL se añade 50 mL de agua destilada y 50 mL de etanol para obtener una relación 1:1, se agita en vortex durante 5 minutos.

III.VIII.III Preparación de solución estándar de ácido salicílico a concentración de 1 mg/mL

Se pesan 10 mg de ácido salicílico y se disuelve en 5 mL de agua destilada, la solución se agrega a un matraz volumétrico de 10 mL y se afora con el diluyente. Se agita con vortex hasta homogeneizar.

III.VIII.IV Preparación de solución estándar de diclofenaco a concentración de 1 mg/mL

Se pesan 10 mg de diclofenaco y se disuelve en 5 mL de agua destilada, la solución se agrega a un matraz volumétrico de 10 mL y se afora con el diluyente. Se agita con vortex hasta homogeneizar.

III.VIII.V Preparación de solución estándar dual (ácido salicílico-diclofenaco) a concentración de 1 mg/mL

Se agrega 1 mL de cada solución en un matraz volumétrico de 10 mL y se afora con el diluyente. Se agita con vortex hasta homogeneizar.

III.VIII.VI Preparación de muestra problema

Para la muestra problema se toman 1.5 mL con una micropipeta de 1000 microlitros, se filtra con acrodiscos y se envía para su lectura.

III.VIII.VII Preparación de soluciones estándares duales a pH 7.4 para recta de calibración

La solución de estándar dual a pH 7.4 se diluye a distintas concentraciones con una solución a una relación 1:1 de buffer 7.4 y agua para realizar una recta de calibración.

III.VIII.VIII Condiciones de corrida

Las fases móviles de acondicionamiento son ácido fórmico (89%), metanol (10%) y acetonitrilo (1%), se dejan correr por 20 minutos antes de inyectar las muestras a 1 mL/min. La columna utilizada es Agilent Eclipse XDB-C18 5 µl 4.6x150 mm, se mantiene una temperatura ambiente, un flujo de 1 mL/min y se analiza 10 µL por cada muestra.

Las longitudes de onda de las señales analíticas son a 291, 275, 232, y 203 nm.

Se utilizan los diferentes gradientes durante la corrida mostrados en la *figura 11*.

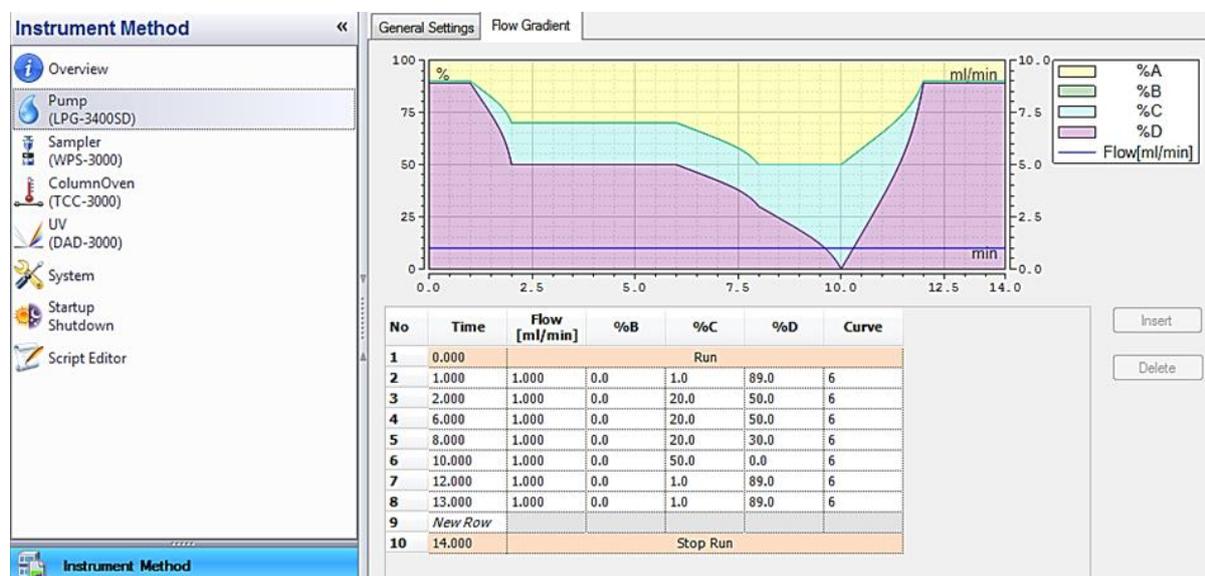


Figura 11. Gradientes de flujo utilizados en la corrida.

El lavado de columna cuando se finaliza la corrida es inicialmente con metanol (100%) por 5 minutos, después agua destilada (50%) y metanol (50%) por 5 minutos, posteriormente agua destilada (100%) por 5 minutos y finalmente, acetonitrilo (100%) por 5 minutos.

Una vez diseñado el método se purga cada línea con agua destilada filtrada hasta eliminar cualquier burbuja que tomará el filtro de la línea y después se colocó el reservorio correspondiente con la fase móvil y se purga nuevamente. Luego, se coloca la columna y se verifica el flujo en ella con metanol a 1 mL/min por 10 segundos. Después, se diseña la secuencia y se acondiciona la columna por 20 minutos como ya se había mencionado sometiéndola a las condiciones descritas previamente. Posterior a estos 20 minutos, se inicia la secuencia y se vigila el equipo hasta su conclusión. La presión debe de ser constante a lo largo de este tiempo con el fin de evitar daños a la columna. Una vez leídas las muestras y completada la secuencia se procede al lavado de la columna para evitar el acumulamiento de sales.

III.IX Estudio de hidrólisis-liberación de hidrogeles

Para conocer el tiempo necesario para la liberación de nuestro hidrogel de polímero profármaco y el diclofenaco se realizaron estudios de liberación a distintos pH fisiológicos. Se preparó buffer a pH 1.2 correspondiente al pH estomacal, buffer a pH 5.5 correspondiente al pH de la piel y se generó buffer a pH 7.4 para conocer su tiempo de degradación a pH sanguíneo. Se hizo un triplicado de viales con los 3 distintos buffers y se agregó el hidrogel cristalino en forma de disco de 1 cm a cada vial correspondiente con 20 mL de buffer. Se contó este momento como tiempo 0. Los viales se colocaron en el oscilador a 37 grados centígrados con 100 RPM de agitación constante y se tomó alícuotas de 1.5 mililitros en los siguientes intervalos de tiempo: 1, 3, 6, 8, 12, 24 horas en el primer día y después de este día cada 24 horas hasta el décimo día. Asimismo, se dejó un vial con cada buffer a distinto pH a temperatura ambiente sin agitación para observar su comportamiento. Las alícuotas extraídas fueron repuestas en volumen por el buffer a pH correspondiente.

III.X Pruebas biológicas

III.X.I Prueba microbiológica utilizando la escala de McFarland y lectura de cambio en turbidez con espectrofotómetro

Los hidrogeles utilizados para las pruebas microbiológicas tenían pesos parecidos con una variación máxima de 4 mg entre ellos. Los pesos de los hidrogeles utilizados fueron de: 84, 85 y 88 mg. Se tomó de una caja Petri detrás del mechero con asa de nicromo previamente esterilizada con fuego *S. aureus* y se añadió la cepa al tubo de estándar como control positivo con medio BHI de *Staphylococcus aureus* ya esterilizado en boquilla. De la misma manera, se añadió la cepa de *Staphylococcus aureus* a 2 tubos con medio BHI, se agregó la cantidad necesaria para parecerse a un tubo a 0.5 de turbidez según la escala de McFarland y después se vertió un hidrogel de ácido metacrililoixi-*o*-benzoico y diclofenaco *in situ* a los 2 tubos ya mencionados. Este es el tiempo 0. Se m De la misma manera, se siguió este procedimiento para los tubos estándar de *Escherichia coli* y los dos tubos con 0.5 de grado de turbidez según la escala de McFarland de *Escherichia coli* con un hidrogel agregado, contando este momento como tiempo 0. Se generó un control negativo el cual es solamente medio BHI. Al momento 0 se leyó la primera absorbancia para comparación a 600 nm a todos los tubos y después de 24 horas se leyó las absorbancias de los tubos de nuevo para su compilación.

III.X.II Prueba microbiológica con técnica de sembrado en placa por extensión

Después de medir las absorbancias a las 24 horas, decidimos inocular 10 microlitros con una técnica de siembra en placa por extensión con asa de Drigalsky en 8 cajas Petri con medio Mueller Hinton. La caja Petri, como era estéril, se abrió para su sembrado hasta estar en la campana de extracción con ambiente estéril y se utilizó un asa esterilizada por la autoclave. Se dejó en incubación hasta su crecimiento a las 24 horas para su comparación.

Capítulo IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

IV.I Síntesis y purificación del monómero ácido metacrililoixi-*o*-benzoico (MAOB)

IV.I.I Síntesis del monómero ácido metacrililoixi-*o*-benzoico

Se obtuvo el monómero en forma de polvo blanco mediante inicialmente un proceso acilación, esto es aprovechando la alta reactividad como catalizador del 4-(dimetilamino)piridina (DMAP), donde se forma la sal de nacilpiridinonio como par iónico altamente activo con el anhídrido metacrílico. A lo largo de este procedimiento, se formó ácido metacrílico al mismo tiempo que nuestro monómero, pero queda neutralizado por la trietanolamina añadida. Nuestro monómero, se generó mediante una reacción de esterificación, donde el activado grupo funcional anhídrido ácido del anhídrido metacrílico, mediante deslocalización de cargas, permite que sea fácilmente atacado en su carbonilo por el nucleófilo del ácido salicílico, proveniente del oxígeno del grupo hidroxilo del ácido salicílico, resultando en una exitosa sustitución nucleofílica acílica, o dicho generalmente generando al ácido salicílico una reacción de esterificación.



Figura 12. Monómero MAOB en recrystalizador.

La estructura química del monómero es un benceno con un metacrilato y un ácido carboxílico en la posición orto del anillo aromático.

IV.I.II Purificación del monómero ácido metacrililoiloxi-*o*-benzoico

Después de la purificación del monómero se concluyó que se obtuvo un 61.35% de rendimiento, generando 4.239 gramos de monómero ácido metacrililoiloxi-*o*-benzoico. Se obtuvo un polvo blanco cristalino fino.



Figura 13. Monómero MAOB purificado.

El rendimiento pudo haberse mejorado con un mejor control de la temperatura para mantenerla a 0 °C ya que estaba en baño de hielo al momento de agregar el anhídrido metacrílico. Este último podría haberse agregado constantemente en su goteo mejorando el rendimiento general.

IV.I.II.I Técnica de identificación de impurezas del monómero MAOB por medio de cromatografía de capa fina

Para determinar cuál era la mejor proporción entre solventes para una fase móvil que de un factor de retención menor a 1 para observar los resultados completamente, se realizaron pruebas de cambios en los gradientes de las fases móviles, se determinó que el mejor es hexano y acetato de etilo en proporción 70:30 respectivamente.

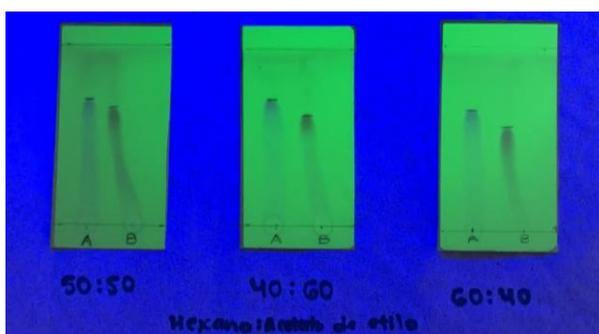


Figura 14. Distintas proporciones entre las fases móviles, hexano y acetato de etilo para generar las que se utilizarán para caracterizar el monómero MAOB.

Luego de que los solventes se evaporan de la placa cromatográfica, se reveló el cromatograma con luz negra (UV). El compuesto **A** es el estándar de ácido salicílico y el compuesto **B** es el monómero sintetizado. Se observa que el monómero tiene alta pureza.



Figura 15. Cromatograma del monómero MAOB.

Se procedió a calcular el factor de retención a través de la siguiente fórmula:

RF= Distancia recorrida de la muestra/Distancia recorrida del solvente.

$$\mathbf{RF (A)= 2.8 \text{ cm}/3.9 \text{ cm} = 0.72}$$

$$\mathbf{RF (B)= 2.6 \text{ cm}/3.9 \text{ cm} = 0.67}$$

Siendo el compuesto **A** es el estándar de ácido salicílico y el compuesto **B** es el monómero MAOB.

IV.II Técnicas de caracterización del monómero ácido metacrililoiloxi-*o*-benzoico (MAOB) con espectrofotometría de infrarrojo con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR)

La estructura química del monómero MAOB presentó las siguientes señales en el espectro de infrarrojo (*Figura 16*), una banda ancha desde 3245.99 cm^{-1} lo cual muestra el sustituyente lateral -OH y una banda ancha de mediana intensidad a 2975.62 cm^{-1} debido al estiramiento de -OH del grupo carboxilo, está asimismo, presente una banda a 2926.14 cm^{-1} que se correlaciona con uniones C-H de carácter alifático, está presente la banda 3069.35 cm^{-1} que corresponde a las vibraciones del anillo aromático, una banda de intensidad fuerte a 1737.50 cm^{-1} debido a la vibración del estiramiento del carbonilo enlace C=O del éster, una banda muy fuerte a 1691.62 cm^{-1} representando la vibración del carbonilo, del estiramiento C=O del ácido carboxílico, una banda de intensidad intermedia a 1606.74 cm^{-1} que presenta el estiramiento del doble enlace entre C=C de un alqueno y finalmente la banda de

absorción de las vibraciones de C-O del éster, ácido carboxílico y alcohol a 1201.27 cm^{-1} y 1122.25 cm^{-1} .

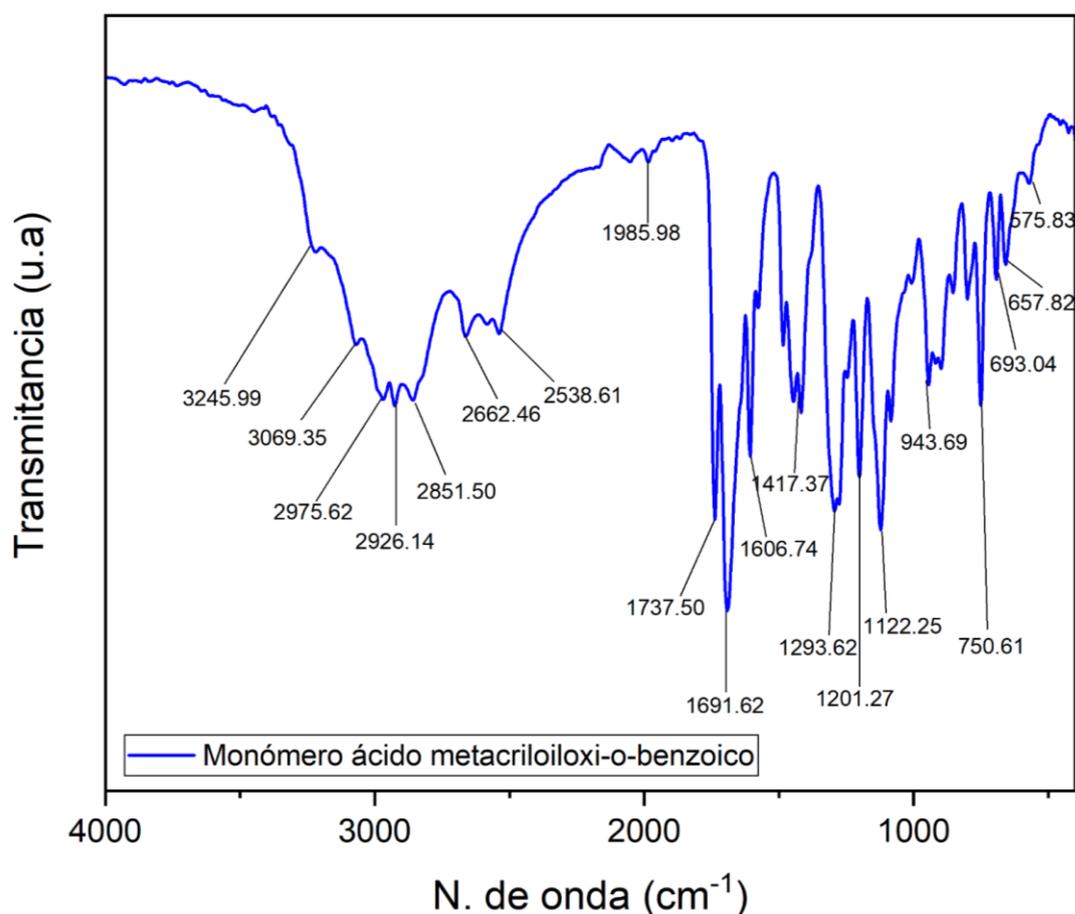


Figura 16. Espectro de infrarrojo del monómero MAOB con sus bandas representativas.

IV.III Caracterización de diclofenaco con espectrofotometría de infrarrojo con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR)

La estructura química del diclofenaco presentó las siguientes señales en el espectro de infrarrojo (*Figura 17*), una banda ancha de mediana intensidad a 3381.85 cm^{-1} debido al estiramiento de O-H del ácido carboxílico, está asimismo, presente la banda 3087.49 cm^{-1} que corresponde a las vibraciones del anillo aromático, una banda de intensidad intermedia a 1568.60 cm^{-1} hasta 1450.86 cm^{-1} que representan el estiramiento C=C del anillo aromático, una banda a 3579.07 cm^{-1} que representa a la amina secundaria en el centro de la estructura, una banda de intensidad intermedia a 747.34 cm^{-1} debido al estiramiento C-Cl y finalmente la banda de absorción de las

vibraciones de C-O ácido carboxílico a 1288.96 cm^{-1} y 1191.82 cm^{-1} . Observar la estructura química del diclofenaco en *anexos*.

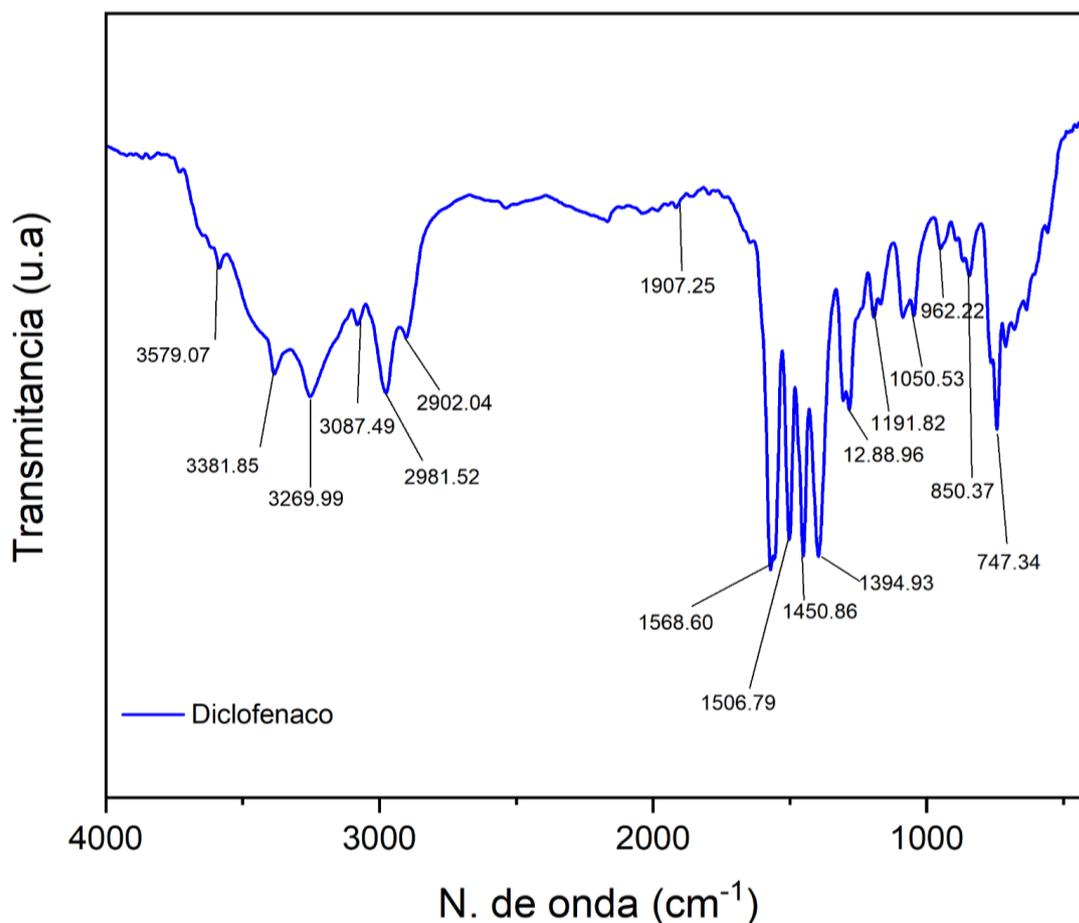


Figura 17. Espectro de infrarrojo del diclofenaco con sus bandas representativas.

IV.IV Síntesis de hidrogeles a partir del monómero ácido metacrililoixi-*o*-benzoico (MAOB) y diclofenaco *in situ*

Se sintetizó un hidrogel que se adhiere fácilmente a las placas de vidrio con aspecto gelatinoso a partir del monómero monómero MAOB y diclofenaco cargado *in situ* al momento de su fabricación.

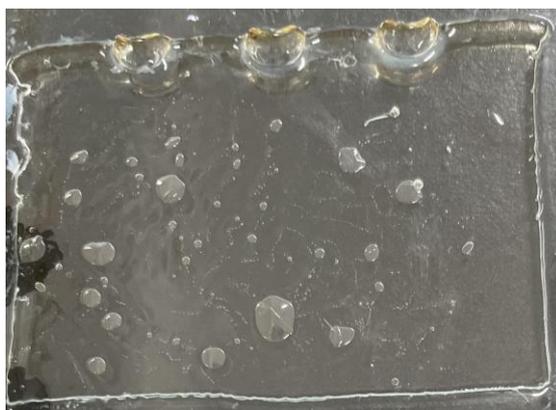


Figura 18. Hidrogel de monómero ácido metacrililoixi-*o*-benzoico y diclofenaco *in situ* después de ser despegado de la placa de vidrio. Se observa un cambio ligero en la adherencia hacia los vidrios.

La solución, ya sin tener presencia de oxígeno, se colocó en la estufa de vacío con atmósfera inerte con nitrógeno a 60 °C. Con estas condiciones, el hidrogel parecía gelificar como es característico sin presentar burbujas en él, que significa presencia de oxígeno en la preparación previa a su colocación entre placas de vidrio o en la atmósfera de la estufa. Se despegó de la placa de vidrio con metanol y una espátula y parecía ya no adherirse como al momento de salir de la estufa.

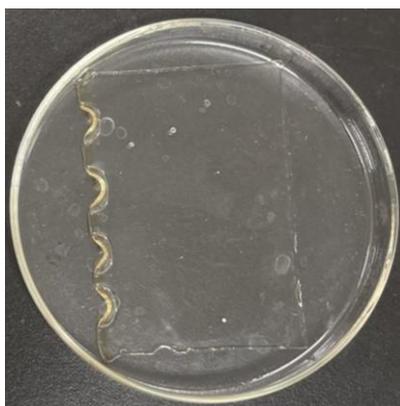


Figura 19. Hidrogel de monómero ácido metacrililoixi-*o*-benzoico y diclofenaco *in situ* previo a sus cortes en forma de disco y parche.

Se procedió a hacer su lavado con metanol y sus cortes en discos de 1 centímetro para el estudio de hidrólisis-liberación y las pruebas de hinchamiento. Una vez cortados y el solvente evaporado, se vuelven completamente cristalinos.



Figura 20. Hidrogeles del monómero MAOB y diclofenaco *in situ* cristalinos cortados a distintos diámetros.

De la misma manera, se mantuvo una zona del hidrogel para cortarlo en parches rectangulares de 2 cm de largo por 1 cm de ancho como una posible presentación farmacéutica.

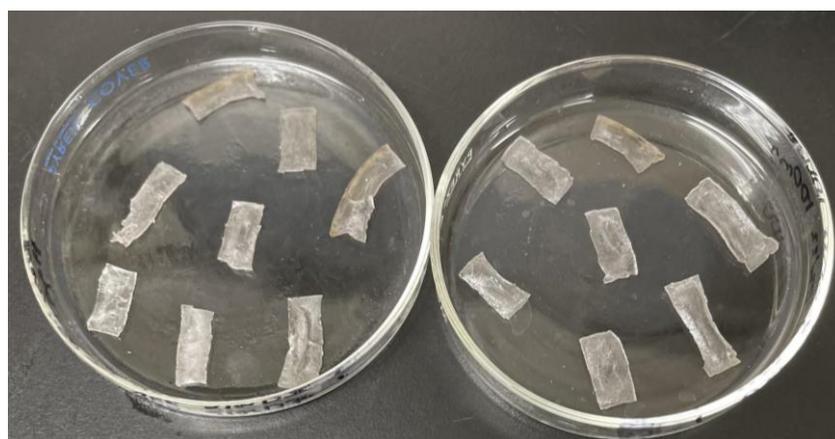


Figura 21. Hidrogeles de monómero ácido metacrililoixi-o-benzoico y diclofenaco *in situ* secos y cristalinos, cortados en forma de parche.

IV.V Caracterización de los hidrogeles con espectrofotometría de infrarrojo con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR)

En la *figura 22* se observa el espectro de infrarrojo como figura comparativa del diclofenaco, monómero MAOB y del hidrogel sintetizado. La estructura química del hidrogel se retoma monómero MAOB y del diclofenaco, así como de su entrecruzante EGDMA. Presentó las siguientes señales en el espectro de infrarrojo una banda

ancha de mediana intensidad a 2937.24 cm^{-1} debido al estiramiento de OH del grupo carboxilo, está asimismo, está presente la banda 2995.29 cm^{-1} y a 1487.19 cm^{-1} que corresponde a las vibraciones del anillo aromático, una banda muy fuerte a 1697.89 cm^{-1} y 1713.08 cm^{-1} representando la vibración del carbonilo, del estiramiento C=O del ácido carboxílico, una banda de intensidad intermedia a 1605.58 cm^{-1} hasta 1453.46 cm^{-1} que representan el estiramiento C=C del anillo aromático, una banda a 3565.74 cm^{-1} que representa a la amina secundaria en el centro de la estructura del diclofenaco y finalmente la banda de absorción de las vibraciones de C-O ácido carboxílico a 1248.18 cm^{-1} hasta 1078.74 cm^{-1} .

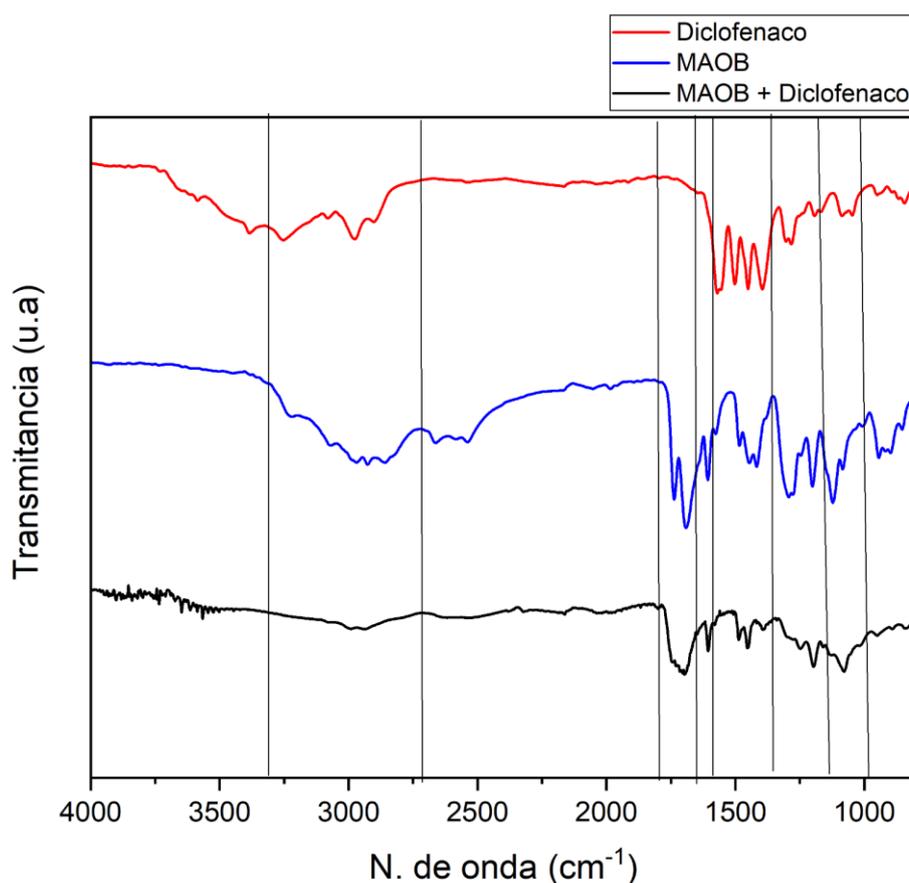


Figura 22. Comparativo de los espectros de infrarrojo de diclofenaco, del monómero MAOB y del hidrogel del monómero MAOB y diclofenaco *in situ*, con divisiones en sus señales características.

En Anexos se observa una figura comparativa del hidrogel sintetizado y del entrecruzante EGDMA para observar si tienen similitudes.

IV.VI Experimentos de hinchamiento de hidrogeles

Los hidrogeles de ácido metacrililoiloxi-*o*-benzoico son categorizados como hidrogeles polielectrolitos aniónicos. Estos contienen grupos ácidos débiles (-COOH) en las cadenas laterales referentes a la cadena principal. Los hidrogeles, se concluyó que son estímulos sensibles, ya que su hinchamiento depende básicamente del ambiente donde están colocados. Algunos de los estímulos a los cuales se presenta una respuesta, en un comportamiento de hinchamiento, son el la temperatura y el pH donde están ubicados, por lo cual, son fisiológicamente sensibles.

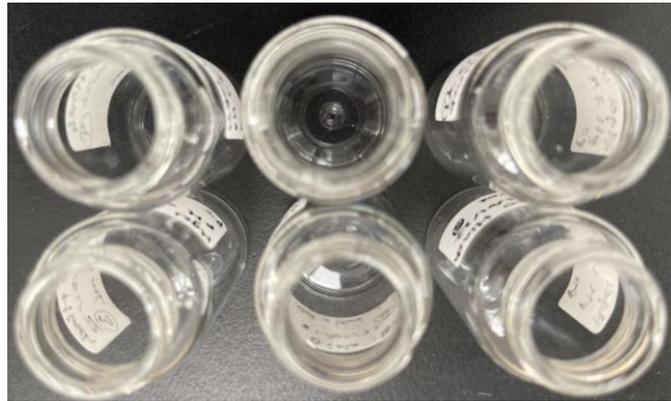


Figura 23. Viales utilizados para determinar porcentajes de hinchamiento y estudios de hidrólisis-liberación.

Para reflejar su comportamiento ante cambios en el pH, se conoce que ya que es un hidrogel con componentes en su mayoría ionizables a pH básico se observa un incremento en el grado de ionización en la red polimérica del hidrogel cuando aumenta el pH del medio lo cual ocasiona un relajamiento en las cadenas poliméricas y aumento en la presión osmótica. También, existe una generación de contraiones móviles dentro del hidrogel, creando el hinchamiento del hidrogel

Se analizó el porcentaje de hinchamiento en tres pH distintos: 1.2, 5.5 y 7.4. El grado de hinchamiento de determinar con la siguiente ecuación:

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

Donde Q representa el grado o porcentaje de hinchamiento y W_h es el peso del hidrogel hinchado y W_s es el peso del hidrogel a tiempo 0.

En la *Figura 24* se observa el grado de hinchamiento de los hidrogeles a distintos pH a 37 °C a 100 RPM. El hidrogel en el medio de liberación a pH 7.4, a los 3 días, se obtuvo un gran hinchamiento hasta su colapso, donde se destrozó en varios pedazos, no haciendo fiable el pesarlo en balanza analítica.

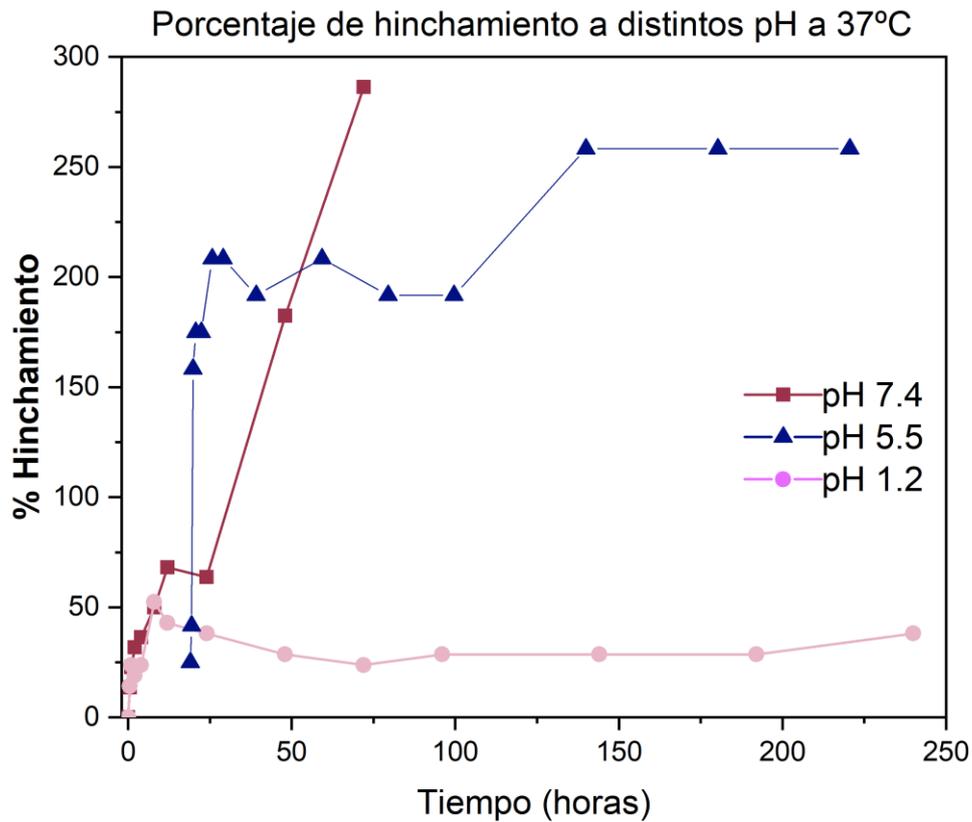


Figura 24. Gráfico comparativo del porcentaje de hinchamiento del hidrogel MAOB y diclofenaco *in situ* sometido a pH 1.2, 5.5 y 7.4. Se observa el aumento en su hinchamiento y, por estimulación, se libera fármaco al medio. Se dejó los viales en el oscilador por 10 días a 37 °C y 100 RPM.

En la *Figura 25* se observa el grado de hinchamiento de los hidrogeles a distintos pH a temperatura ambiente para su comparación con colocar a los hidrogeles a condiciones parecidas a las del cuerpo humano.

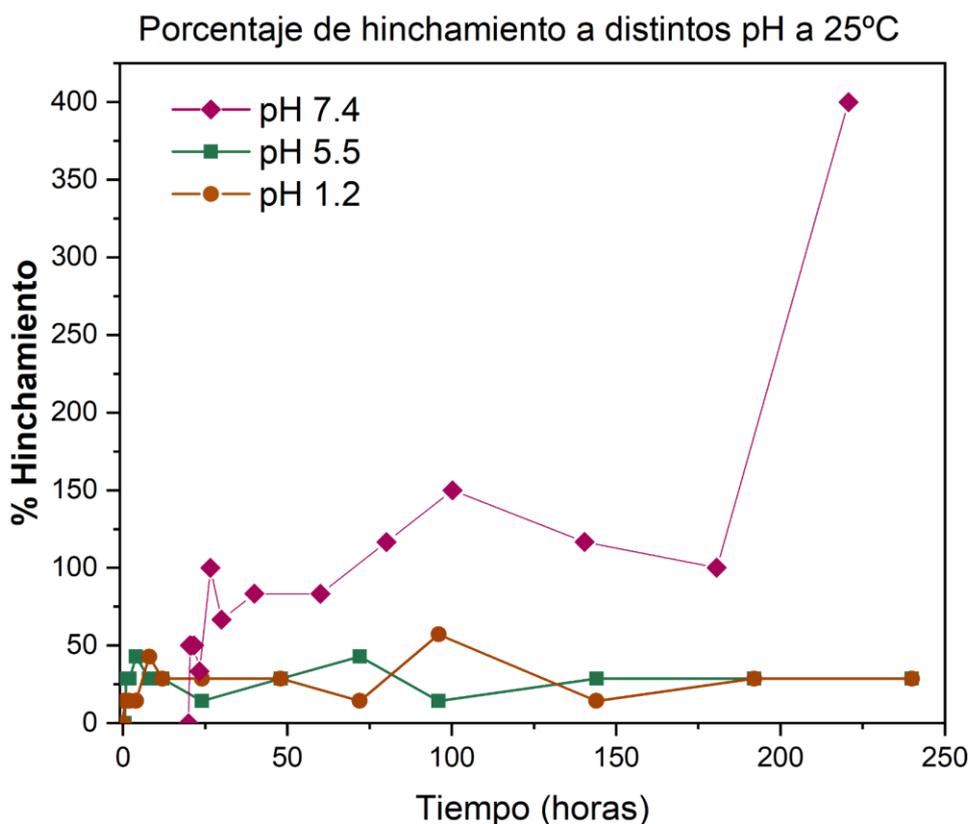


Figura 25. Gráfico comparativo del porcentaje de hinchamiento del hidrogel MAOB y diclofenaco *in situ* sometido a pH 1.2, 5.5 y 7.4. Se observa un retardo en su hinchamiento debido a cambios en las condiciones ambientales. Se dejó los viales en una gaveta por 10 días a 25 °C sin movimiento.

Es posible apreciar que el hidrogel del monómero MAOB y diclofenaco *in situ* presentan una respuesta a someterlos a medios con pH distintos, donde el pH 7.4 es donde se observa una transición mayor, cambiando su color transparente y apariencia cristalina a una esponjosa de color blanquecina hasta llegar al punto de desmoronarse después de su hinchamiento, lo cual se conoce como un colapso total debido a estímulos.

IV.VII Cromatografía de líquidos de alta resolución

La longitud de onda específica a la que se leyó las muestras de liberación para esta investigación fue de: ácido salicílico a 291 nm y diclofenaco a 275 nm. Debido a que las muestras son duales y se usaron 3 diferentes pH de disolución hay 2 áreas de picos para cada pH, una correspondiente al ácido salicílico (tiempo de retención

promedio de: 5.407 min) y la otra corresponde al diclofenaco (tiempo de retención promedio de: 11.131 min). Primeramente, en la *Figura 26* y *27* se presentan los cromatogramas del estándar dual para comparar el área de sus picos con las muestras.

IV.VII.I Cromatogramas del estándar dual

Se observan los picos característicos de ácido salicílico y diclofenaco.

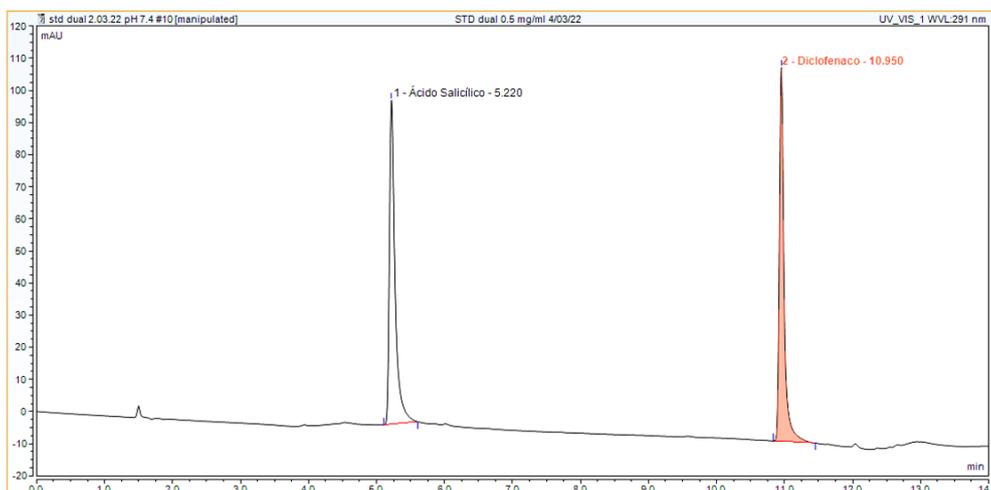


Figura 26. Cromatograma de estándar dual a pH 7.4 con análisis en la longitud de onda 291 nm para analizar el área del pico de ácido salicílico.

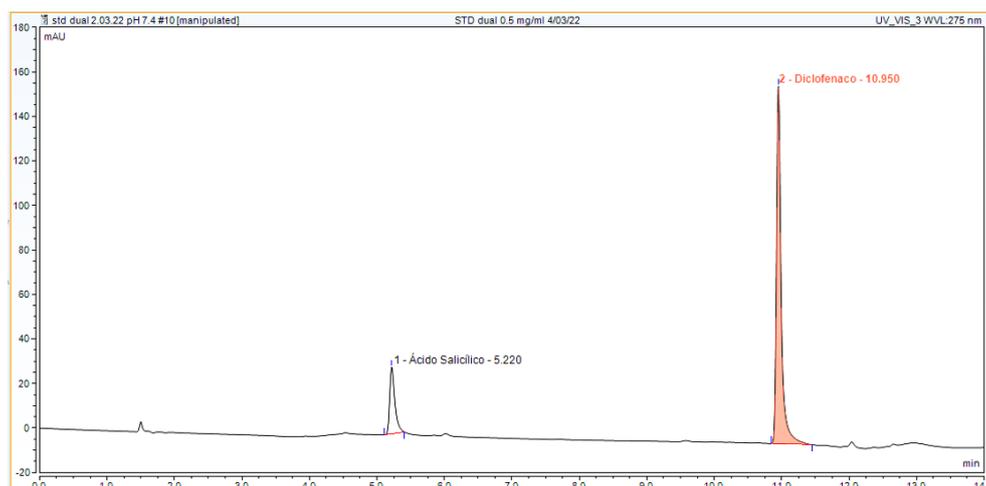


Figura 27. Cromatograma de estándar dual a pH 7.4 con análisis en la longitud de onda 275 nm para analizar el área del pico de diclofenaco.

IV.VII.II Cromatogramas de las liberaciones de los hidrogeles de MAOB cargados con diclofenaco *in situ* a distintos pH

En las Figuras 28 hasta la 33 se observan los cromatogramas a distintas longitudes de onda ya que son hidrogeles duales y a los distintos pH a los que fueron sometidos.

Cromatograma de las liberaciones de los hidrogeles de MAOB cargados con diclofenaco *in situ* a pH 7.4

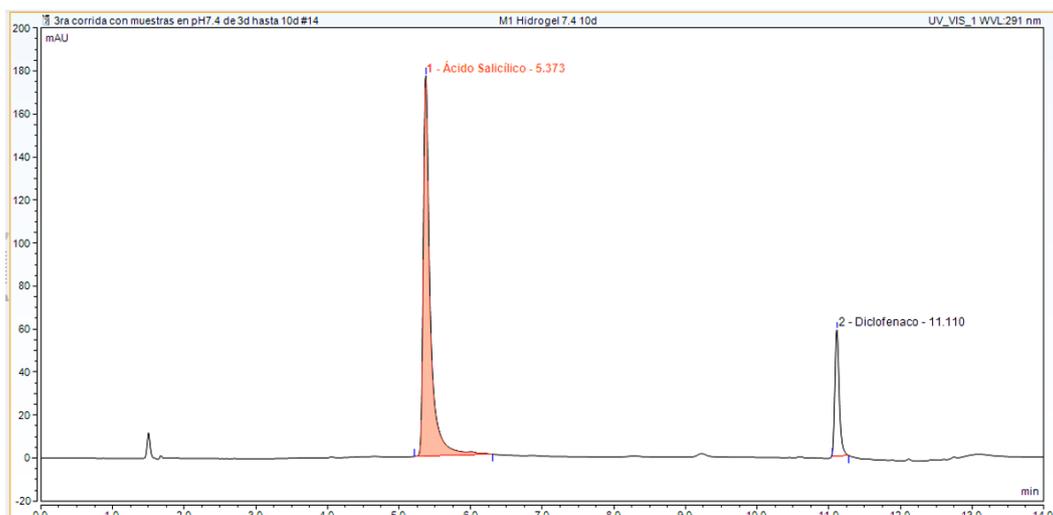


Figura 28. Cromatograma del hidrogel del monómero MAOB con diclofenaco *in situ* a pH 7.4, con análisis en la longitud de onda 291 nm para analizar esencialmente el área del pico de ácido salicílico.

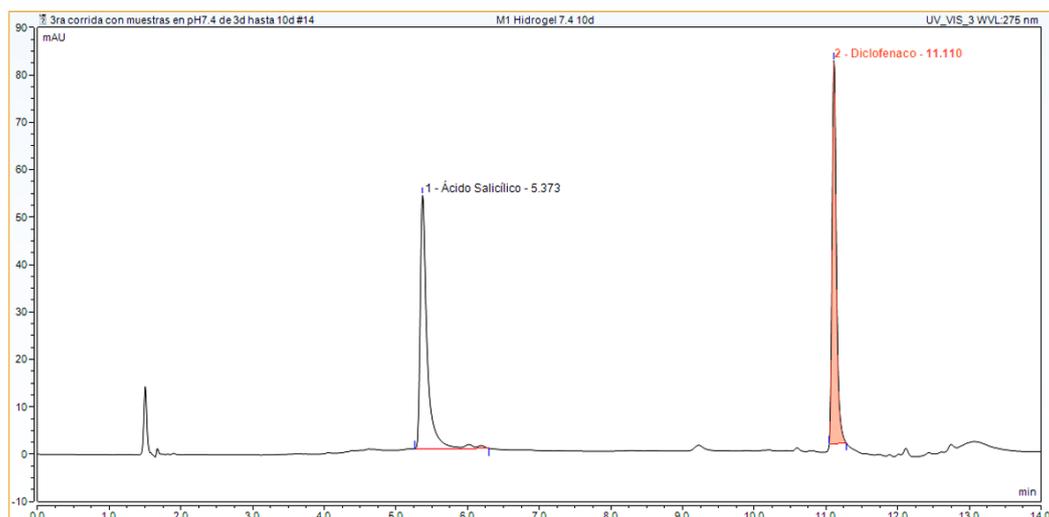


Figura 29. Cromatograma del hidrogel del monómero MAOB con diclofenaco *in situ* a pH 7.4, con análisis en la longitud de onda 275 nm para analizar esencialmente el área del pico de diclofenaco.

Cromatogramas de las liberaciones de los hidrogeles de MAOB cargados con diclofenaco *in situ* a pH 5.5

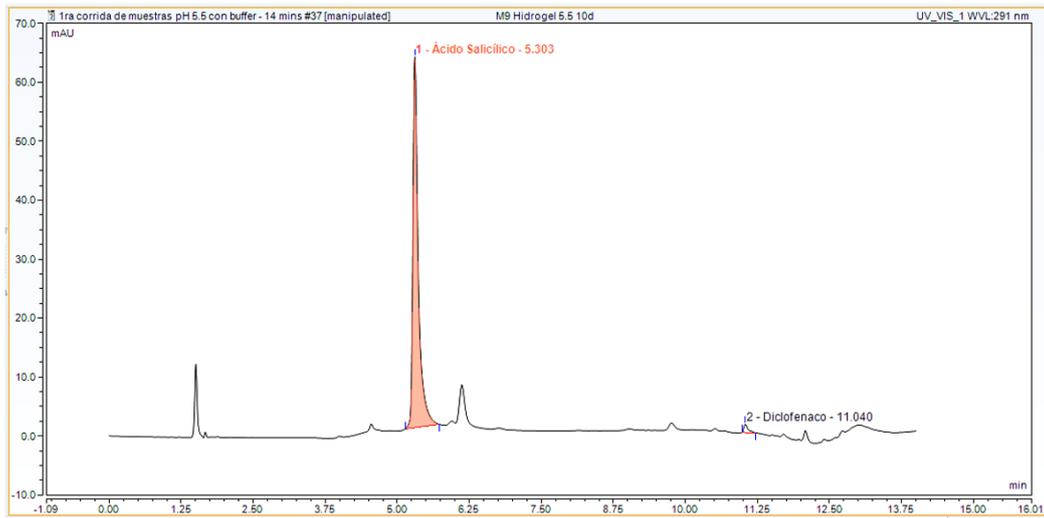


Figura 30. Cromatograma del hidrogel del monómero MAOB con diclofenaco *in situ* a pH 5.5, con análisis en la longitud de onda 291 nm para analizar esencialmente el área del pico de ácido salicílico.

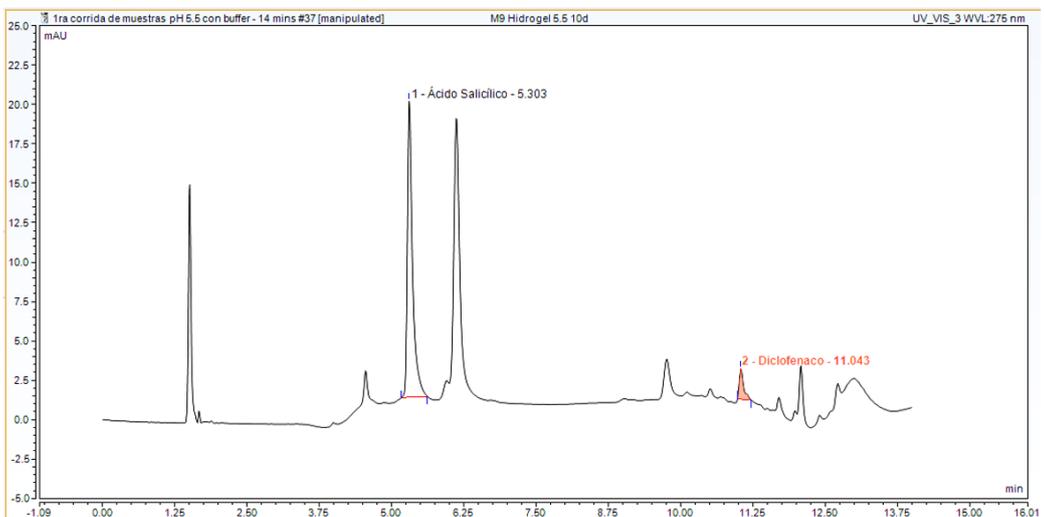


Figura 31. Cromatograma del hidrogel del monómero MAOB con diclofenaco *in situ* a pH 5.5, con análisis en la longitud de onda 275 nm para analizar esencialmente el área del pico de diclofenaco.

Cromatogramas de las liberaciones de los hidrogeles de MAOB cargados con diclofenaco *in situ* a pH 1.2

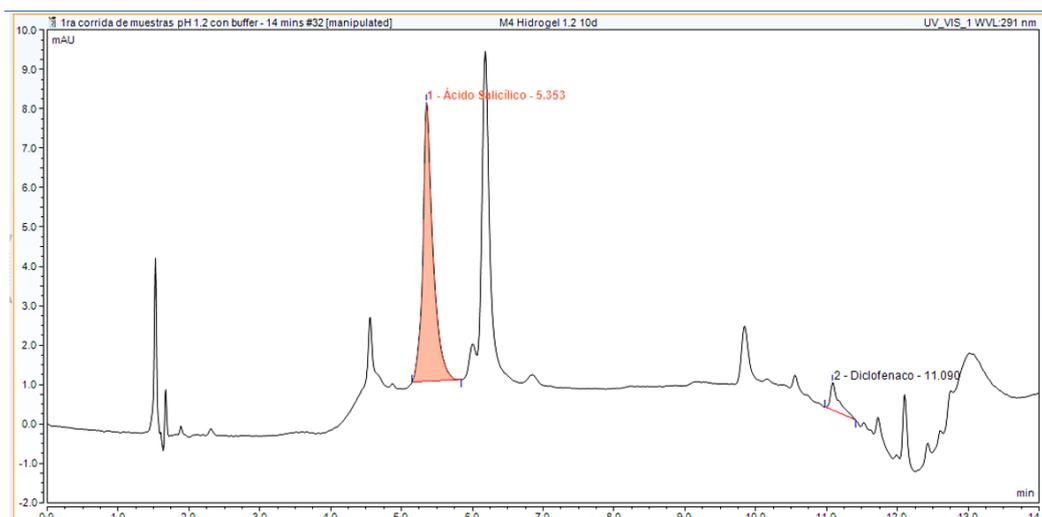


Figura 32. Cromatograma del hidrogel del monómero MAOB con diclofenaco *in situ* a pH 1.2, con análisis en la longitud de onda 291 nm para analizar esencialmente el área del pico de ácido salicílico.

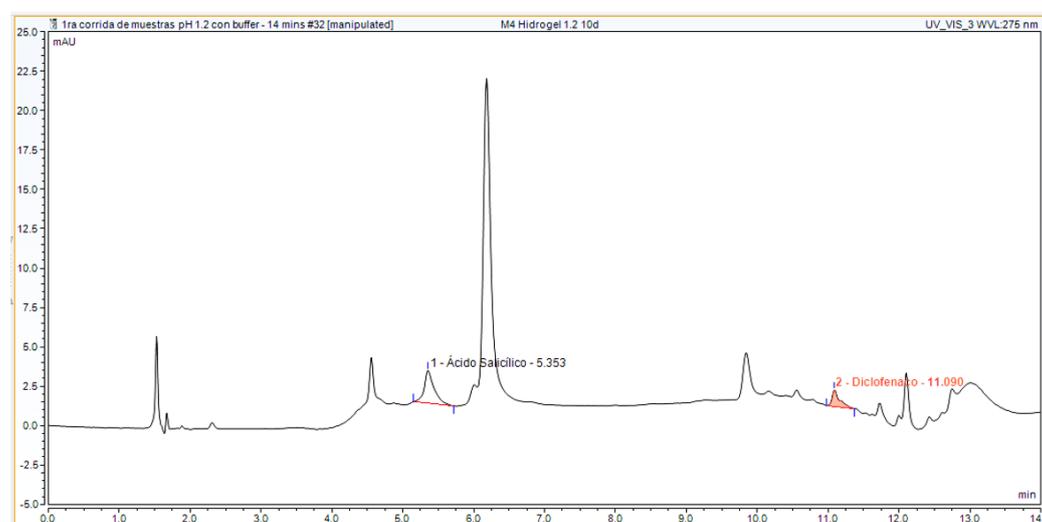


Figura 33. Cromatograma del hidrogel del monómero MAOB con diclofenaco *in situ* a pH 1.2, con análisis en la longitud de onda 275 nm para analizar esencialmente el área del pico de diclofenaco.

A pH de 7.4 se observaron los picos mayores alturas debido a que la molécula es relativamente ácida, así que su liberación es mayor al pH más básico porque se encuentra en su forma ionizada. Por lo tanto, al menor pH, no se liberó o hincho adecuadamente el hidrogel, afectando así, la concentración en el medio de ácido salicílico y diclofenaco libre. Debido a que el hidrogel tiene un cargado *in situ* de diclofenaco en MAOB, se libera primero y mayormente el ácido salicílico y se libera poco a poco diclofenaco de manera prolongada.

IV.VIII Estudio de hidrólisis-liberación de fármacos a partir de los hidrogeles

Los hidrogeles se mantuvieron en el oscilador a condiciones estables de agitación constante, a 100 RPM (revoluciones por minuto) a 37 °C por 10 días.



Figura 34. Viales en el oscilador.

Los resultados arrojaron que la cinética de liberación de los hidrogeles es sostenida. Las pruebas tuvieron una duración de 10 días conociendo su liberación constante a lo largo de días, pero podía mantenerse por más tiempo hasta observar la completa liberación del ácido salicílico y, por lo tanto, de diclofenaco. Para esto, es necesario el hidrolisis del entrecruzamiento que se generó en el hidrogel al momento de sintetizarlo y la hidrólisis del polímero de poli(ácido metacrililoiloxi-o-benzoico) para generar ácido salicílico. Se observa una liberación de fármacos dependiente del pH en el medio de liberación.

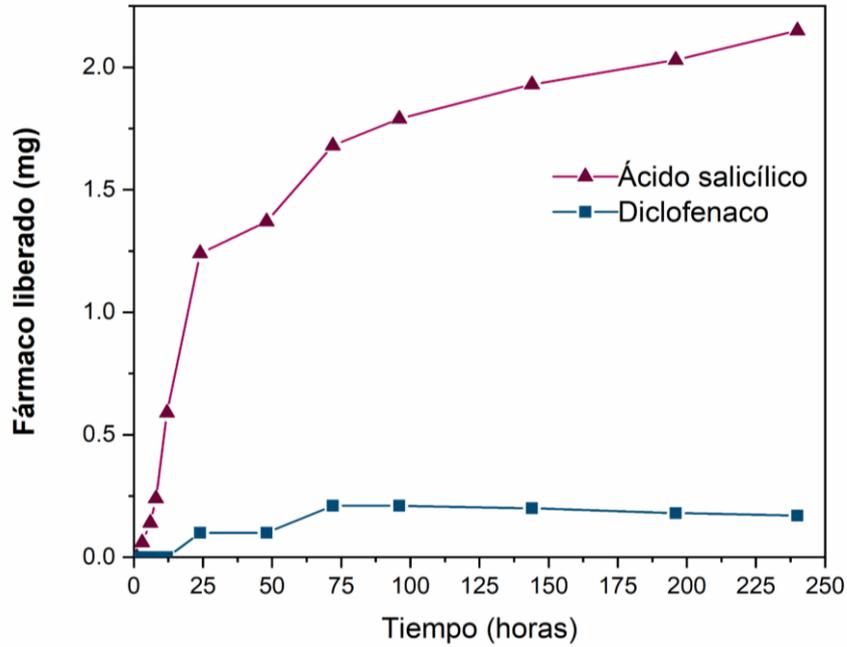


Figura 35. Cuantificación de la liberación de ácido salicílico y diclofenaco a partir de los hidrogeles de monómero MAOB y diclofenaco *in situ* en un medio a pH 7.4, 37 °C y 100 RPM por 10 días.

La mejor liberación e hinchamiento del hidrogel es a pH más alcalino y, a un pH ligeramente ácido como el de la piel, la liberación es casi lineal, con posibles mejoras cuando se forme su presentación comercial al acercarse a la piel cálida humana con movimiento con una solución de buffer que se añadiría cada cierto tiempo para beneficiar la liberación.

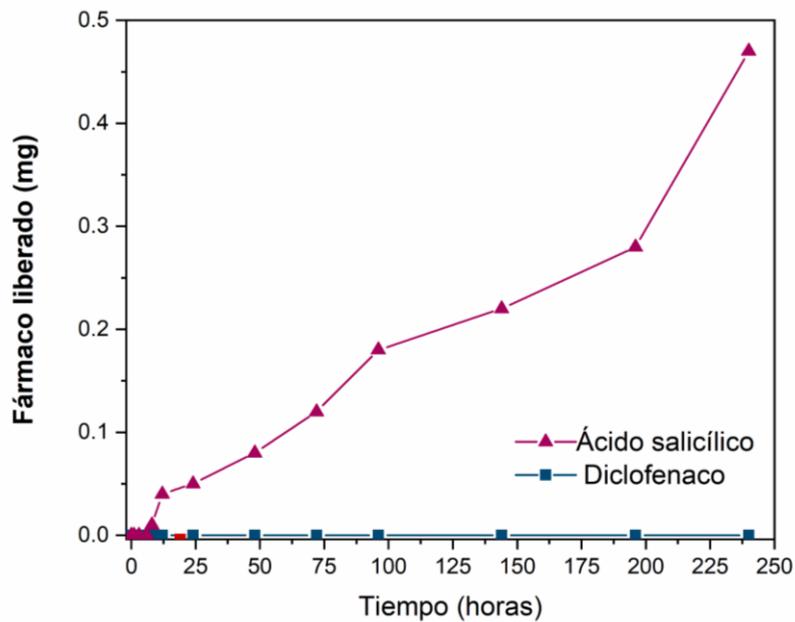


Figura 36. Cuantificación de la liberación de ácido salicílico y diclofenaco a partir de los hidrogeles de monómero MAOB y diclofenaco *in situ* en un medio a pH 5.5, 37 °C y 100 RPM por 10 días.

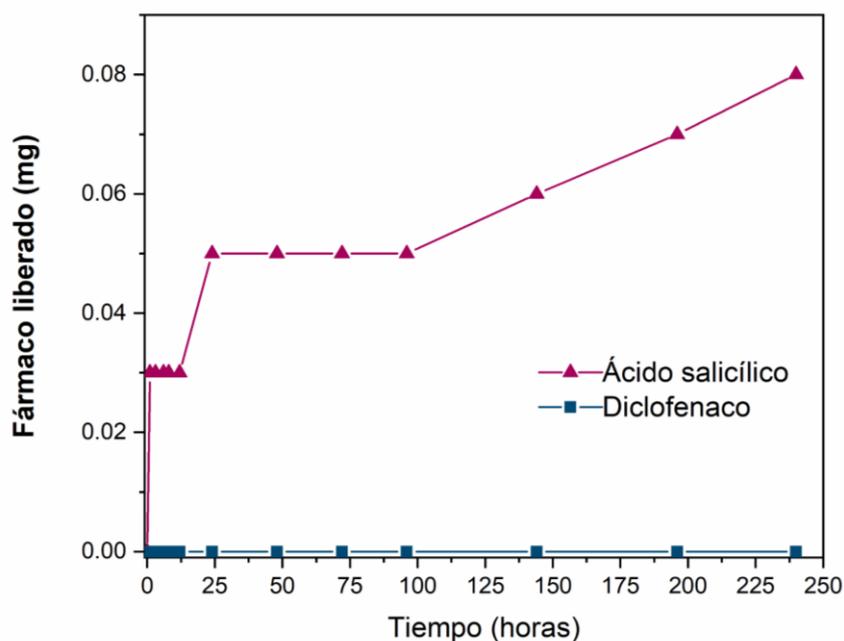


Figura 37. Cuantificación de la liberación de ácido salicílico y diclofenaco a partir de los hidrogeles de monómero MAOB y diclofenaco *in situ* en un medio a pH 1.2, 37 °C y 100 RPM por 10 días.

IV.IX Pruebas biológicas

IV.IX.I Prueba microbiológica utilizando la escala de McFarland y lectura de cambio en turbidez con espectrofotómetro

Se leyó las absorbancias de cada tubo al momento de poner el hidrogel en los tubos con bacteria *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* respectivamente. Se toma 0.5 mililitros de cada medio y se coloca en celdas distintas para medir su absorbancia al tiempo 0. Para esto, se coloca como blanco medio BHI (Infusión cerebro-corazón) estéril. Como control negativo se coloca medio BHI estéril e hidrogel y como control positivo y referencia, un tubo con *Escherichia coli* con turbidez de 0.5 en la escala de McFarland sin hidrogel añadido; y para las pruebas con *Staphylococcus aureus* se hace otro control positivo, el cual es un tubo con medio BHI con la bacteria con las mismas condiciones que con la primera bacteria. Posterior a las 24 horas, se toma otra lectura de los tubos 8 tubos para su comparación al día de ser incubados a 37 °C en incubadora. Así, podremos clasificar si el monómero MAOB genera inhibición en

las distintas bacterias gram positiva y gram negativa después de 24 de introducir el hidrogel en el medio inoculado.



Figura 38. Comparación entre tubo con medio BHI y bacteria inoculada a una turbidez en relación a la escala de McFarland a un tubo con solamente medio BHI.

Lectura de absorbancias a tiempo 0 con la bacteria gram negativa *Escherichia coli*:

Muestra	Resultado (A)
Control (-) caldo	0
Control (-) caldo con hidrogel	-0.013
Control (+)	0.095
Muestra 1	0.055
Muestra 2	0.142



Figura 39. Tubos de ensayo con medio BHI y bacteria inoculada a una turbidez en relación a la escala de McFarland e hidrogel insertado; tiempo 0. Los primeros 2 tubos corresponden a aquellos inoculados con *Escherichia coli* y los dos últimos son aquellos sembrados con *Staphylococcus aureus*.

Lectura de absorbancias a tiempo 0 con la bacteria gram positiva *Staphylococcus aureus*:

Muestra	Resultado (A)
Control (-) caldo	0
Control (-) caldo con hidrogel	0
Control (+)	0.076
Muestra 1	0.041
Muestra 2	0.112

Lectura de absorbancias a las 24 horas con *Escherichia coli*:

Muestra	Resultado (A)
Control (-) caldo	0
Control (-) caldo con hidrogel	0.010
Control (+)	0.496
Muestra 1	0.402
Muestra 2	0.435

Lectura de absorbancias a las 24 horas con *Staphylococcus aureus*:

Muestra	Resultado (A)
Control (-) caldo	0
Control (-) caldo con hidrogel	0.010
Control (+)	0.310
Muestra 1	0.251
Muestra 2	0.246



Figura 40. Tubos de ensayo con medio BHI y bacteria inoculada a una turbidez en relación a la escala de McFarland e hidrogel insertado a las 24 horas, después de lecturas de absorbancia. Los primeros 2 tubos corresponden a aquellos inoculados con *Escherichia coli* y los dos últimos son aquellos sembrados con *Staphylococcus aureus*.

IV.IX.II Prueba microbiológica con técnica de sembrado en placa por extensión

Fue realizada una prueba microbiológica a base de aquella realizada en tubos de ensayo. Se inoculó una proporción del contenido y se sembró en cajas Petri mediante el asa Drigralsky estériles. A las 24 horas posteriores, se observó un crecimiento irregular de microorganismos con una masa visualmente menor a la del estándar de cada bacteria. Aún con este resultado, a las 24 horas se observó crecimiento de bacterias.

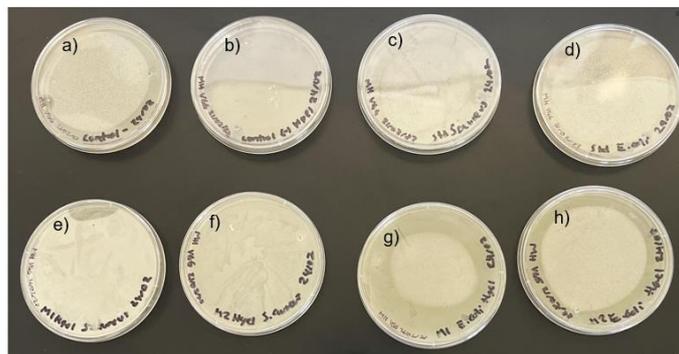


Figura 41. Cajas Petri con medio Mueller Hinton a las 24 horas de incubación. Caja Petri a) Control negativo, b) Control negativo con hidrogel, c) estándar de *Staphylococcus aureus*, d) estándar de *Escherichia coli*, e) muestra 1 (*Staphylococcus aureus* e hidrogel de monómero MAOB y diclofenaco *in situ*), f) muestra 2 (*Staphylococcus aureus* e hidrogel de monómero MAOB y diclofenaco *in situ*), g) muestra 1 (*Escherichia coli* e hidrogel de monómero MAOB y diclofenaco *in situ*) y h) muestra 2 (*Escherichia coli* e hidrogel de monómero MAOB y diclofenaco *in situ*).

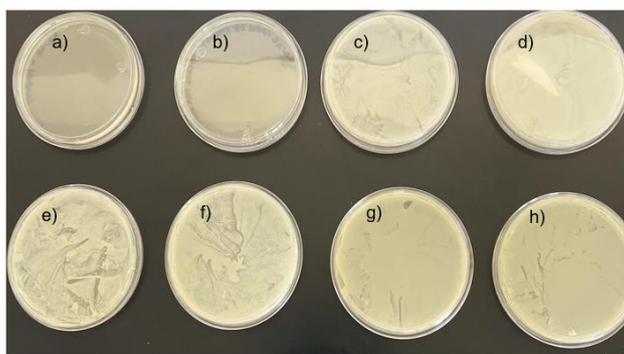


Figura 42. Cajas Petri con medio Mueller Hinton a las 24 horas de incubación volteadas para comparar el crecimiento de las bacterias. Caja Petri a) Control negativo, b) Control negativo con hidrogel, c) estándar de *Staphylococcus aureus*, d) estándar de *Escherichia coli*, e) muestra 1 (*Staphylococcus aureus* e hidrogel de monómero MAOB y diclofenaco *in situ*), f) muestra 2 (*Staphylococcus aureus* e hidrogel de monómero MAOB y diclofenaco *in situ*), g) muestra 1 (*Escherichia coli* e hidrogel de monómero MAOB y diclofenaco *in situ*) y h) muestra 2 (*Escherichia coli* e hidrogel de monómero MAOB y diclofenaco *in situ*).

Se compararon los resultados de los controles positivos o estándares contra las muestras que contenían la bacteria e hidrogel y, debido a que existió crecimiento con el hidrogel de monómero MAOB y diclofenaco *in situ* a las 24 horas, se considerara otro método donde se permita mantener más tiempo el hidrogel en el tubo de ensayo con la bacteria inoculada y leer el cambio en las absorbancias para clasificarlo como que generó un efecto bactericida debido a la acidez liberada del ácido salicílico. Asimismo, si se aumenta el tiempo de lectura, puede haber un cambio en el sembrado en la caja Petri.



Figura 43. Cajas Petri con medio Mueller Hinton a las 24 horas de incubación volteadas. Caja Petri a) control negativo y b) muestra 1 (*Staphylococcus aureus* e hidrogel de monómero MAOB y diclofenaco *in situ*).

Capítulo V. CONCLUSIONES

- A. Se realizó con éxito la reacción de esterificación para obtener el monómero ácido metacrililoiloxi-*o*-benzoico (MAOB) a partir de ácido salicílico y como proyecto a futuro se buscará eficientizar el procedimiento para obtener un rendimiento mayor.
- B. Se llevó a cabo exitosamente la síntesis del hidrogel a partir del monómero MAOB con un cargado *in situ* de diclofenaco para una capacidad completa antiinflamatoria y analgésica por medio de una polimerización de radicales libres con iniciador AIBN, entrecruzante EGDMA y solvente dimetilsulfóxido.
- C. La caracterización del monómero MAOB mediante infrarrojo nos mostró una banda de intensidad fuerte a 1737.50 cm^{-1} debido a la vibración del estiramiento del carbonilo enlace C=O del éster lo cual nos muestra que está formado el monómero.
- D. En la caracterización del hidrogel mediante infrarrojo nos presenta bandas características del monómero así como una banda a 3565.74 cm^{-1} que representa a la amina secundaria en el centro de la estructura del diclofenaco, lo cual significa que el cargado ocurrió exitosamente.
- E. En el estudio de hinchamiento en soluciones amortiguadoras a pH 1.2, 5.5 y 7.4 se observó que es relevante la temperatura para aumentar el grado de ionización, aumentar la presión osmótica del hidrogel y así provocar su hinchamiento. También se observó que el hidrogel si es sensible a pH teniendo mayor afinidad y mayor velocidad de liberación de fármaco a pH alcalino y mientras disminuye el pH acercándose al pH ácido disminuye la velocidad de liberación de fármaco. Es pH y temperatura dependiente.
- F. Se realizó exitosamente estudios de hidrólisis-liberación donde se observó que el hidrogel posee una cinética prolongada y poca liberación de diclofenaco debido a que su tiempo de liberación de fármaco es prolongado, por lo que dura días.
- G. Se cuantificó la cantidad de fármaco liberada en los estudios de hidrólisis-liberación por medio de HPLC y este establece que si se libera diclofenaco y ácido salicílico al medio aun cuando es un medio acuoso ácido pero la cantidad aumenta cuando el pH es más alcalino, como sería el pH sanguíneo.

H. Este trabajo de tesis permite dar a conocer información sobre polímeros a base de salicilatos y su cargado *in situ* de un antiinflamatorio a la comunidad científica, permitiendo conocer que es posible la dispersión de ácido salicílico y de fármaco cargado al medio. Asimismo, esta metodología nos permite una posible síntesis de otro profármaco polimérico o agregar otro fármaco en el cargado del hidrogel para proporcionarle más capacidades terapéuticas y aumentar la rapidez de curación de heridas.

Capítulo VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y CIBERNÉTICAS

Eduardo Rogel Hernández, José H. Espinoza Gómez, Manuel A. Martínez López & Raudel Ramos Olmos. (2020) *Principios Básicos de Síntesis de Polímeros*. EDICIONES ILCSA S.A de C. V. Primera edición. Impreso en México. ISBN_ 978-607-8705-33-7.

PHILLIP H. GEIL. (1965) *Polymer Morphology*. Chem. Eng. News 1965, 43, 33, 72–85. American Chemical Society. DOI: <https://doi.org/10.1021/cen-v043n033.p072>
Recuperado del sitio web: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cen-v043n033.p072>

Lirong Wang, Mengyun Zhou, Tailin Xu & Xueji Zhang. (2022) *Multifunctional hydrogel as wound dressing for intelligent wound monitoring*. Chemical Engineering Journal. Volume 433, Part 1, 134625. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.134625>
Recuperado del sitio web: <https://libcon.rec.uabc.mx:4440/10.1016/j.cej.2022.134625>

Palena, M. C., García, M. C., Manzo, R. H., & Jimenez-Kairuz, A. F. (2015) *Self-organized drug interpolyelectrolyte nanocomplexes loaded with anionic drugs. Characterization and in vitro release evaluation*. Journal of Drug Delivery Science and Technology. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.09.014>

Gang Zhao, Rongguo Ren, Xin Wei, Zhenshan Jia, Ningrong Chen, Yuanyuan Sun, Zhifeng Zhao. Subodh M. Lele, Haizhen A. Zhong, Mary B. Goldring, Steven R. Goldring & Dong Wang. (2021) *Thermoresponsive polymeric dexamethasone prodrug for arthritis pain*. Journal of Controlled Release Volume 339, Pages 484-497. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.10.007> Recuperado del sitio web: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168365921005368?via%3Dihub>

Kristiina M Huttunen, Hannu Raunio & Jarkko Rautio (2011) *Prodrugs--from serendipity to rational design*. Pharmacol Rev. Sep;63(3):750-71. DOI: <https://doi.org/10.1124/pr.110.003459>

Jarkko Rautio, Krista Laine, Mikko Gynther & Jouko Savolainen. *Prodrug Approaches for CNS Delivery*. AAPS J. 2008 Mar; 10(1): 92–102. DOI: <https://doi.org/10.1208/s12248-008-9009-8>

Alberts B, Johnson A, Lewis J & et al. (2002) *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science. Glossary. Recuperado del sitio web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21052/>

Chenping Zhang, Yugang Duan, Hong Xiao, Ben Wang, Yueke Ming, Yansong Zhu T. & Fugan Zhang. (2022) *Effect of porosity and crystallinity on mechanical properties of laser in-situ consolidation thermoplastic composites*. Polymer. Volume 242, 124573. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2022.124573> Recuperado del sitio web: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S003238612200060X?via%3Dihub>

Dinesh K.Patel, Keya Ganguly, Jin Hexiu, Sayan Deb Dutta, Tejal V. Patil & Ki-Taek Lim. (2022) *Functionalized chitosan/spherical nanocellulose-based hydrogel with superior antibacterial efficiency for wound healing*. Carbohydrate Polymers. Volume 284, 119202. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119202> Recuperado del sitio web: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861722001060>

Feng Li & and Ram I. Mahato. (2017) *Bioconjugate Therapeutics: Current Progress and Future Perspective*. Mol Pharm. 14(5): 1321–1324. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00263> Recuperado del sitio web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5793904/>

Yufei Wang, Zihao Chen, Nanshu Li, Hanbing Zhang & Jie Wei. (2022) *Programmable photo-responsive self-healing hydrogels for optical information coding and encryption*. European Polymer Journal. Volume 166, 111025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111025> Recuperado del sitio web: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014305722000295>

I. Charfeddine, J.C. Majesté, C. Carrot & O. Lhost. (2020) *A model for the prediction of the morphology of immiscible blends of polymers*. Polymer. Volume 193, 122334. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2020.122334> Recuperado del sitio web: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032386120301713>

Vivekkumar K. Redasani & Sanjay B. Bari. *Prodrug Design*. Perspectives, Approaches and Applications in Medicinal Chemistry. 2015, Pages 21-31. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803519-1.00003-9>

Élida H. (2011) *Polímeros*. Capítulo 9. (pág. 3-70). Argentina: Encuentro.

Hector Magaña, Kenia Palomino, Jose M. Cornejo-Bravo, Luis Díaz-Gómez, Angel Concheiro, Edgar Zavala-Lagunes, Carmen Alvarez-Lorenzo, Emilio Bucio (2016) *Polymeric prodrug-functionalized polypropylene films for sustained release of*

salicylic acid. International Journal of Pharmaceutics. Vol. 511, pág. 579–585. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.07.044>

Classification of therapeutic systems for drug delivery. (2015). Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems. Pág. 29–36. DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100092-2.00003-5>

Suñé, J. M., & Bel, E. (2002) *Nuevas aportaciones galénicas a las formas galénicas de administración*. Formación continuada para farmacéuticos de hospital. (pág. 30-65).

Kohudic M.A. (1994) *Advances in Controlled Delivery of drugs*. Primera edición. Technomic Publishing A.G. (pág. 82-89).

Donald L. Pavia, Gary M. Lampman, George S. Kriz & James R. Vyvyan. (2009) *Introduction to Spectroscopy*. Fourth Edition. USA: BROOKS/COLE CENGAGE Learning.

Zahra Shariatinia. (2021) *Big family of nano- and microscale drug delivery systems ranging from inorganic materials to polymeric and stimuli-responsive carriers as well as drug-conjugates*. Journal of Drug Delivery Science and Technology. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102790>

Escalona O., Quintanar D. (2014). Polymeric nanogels: a new alternative for drug delivery. *Rev Mex Cienc Farm* 45(3) (pp. 17-38).

Dilshad Qureshi, Suraj Kumar Nayak, Samarendra Maji, Arfat Anis, Doman Kim, Kunal Pal. (2019) *Environment sensitive hydrogels for drug delivery applications*. European Polymer Journal 120 109220. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.109220>

REFERENCIAS DE FIGURAS

01. Jesús Setién Marquín y col. *Materiales-G704/G742. Lección 16. Polímeros*. Universidad de Cantabria. Recuperado del sitio web: https://ocw.unican.es/pluginfile.php/287/course/section/217/leccion_16.pdf

LISTA DE FIGURAS

1. El monómero etileno y su polímero poli(Etileno).
2. Representación de monómero, oligómero y polímero lineal.
3. Polimerización por condensación.
4. Polimerización por adición.
5. Representaciones de distintas estructuras moleculares que toman los polímeros: la estructura lineal, ramificada, entrecruzada y reticulada.
6. Ruptura homolítica del iniciador azobisisobutironitrilo (AIBN) para generar radicales libres.
7. Reacción de síntesis del monómero ácido metacrililoiloxi-*o*-benzoico.
8. Representación de lavados con agua destilada a temperatura ambiente y posteriormente, con agua destilada a 40 °C.
9. Modelo de placas de vidrio sujetado con pinzas para la formación de hidrogeles.
10. Molde utilizado entre las placas de vidrio para dar forma al hidrogel.
11. Gradientes de flujo utilizados en la corrida.
12. Monómero MAOB en recristalizador.
13. Monómero MAOB purificado.
14. Distintas proporciones entre las fases móviles, hexano y acetato de etilo para generar las que se utilizarán para caracterizar el monómero MAOB.
15. Cromatograma del monómero MAOB.
16. Espectro de infrarrojo del monómero MAOB con sus bandas representativas.
17. Espectro de infrarrojo del diclofenaco con sus bandas representativas.
18. Hidrogel de monómero ácido metacrililoiloxi-*o*-benzoico y diclofenaco *in situ* después de ser despegado de la placa de vidrio. Se observa un cambio ligero en la adherencia hacia los vidrios.
19. Hidrogel de monómero ácido metacrililoiloxi-*o*-benzoico y diclofenaco *in situ* previo a sus cortes en forma de disco y parche.
20. Hidrogeles del monómero MAOB y diclofenaco *in situ* cristalinos cortados a distintos diámetros.
21. Hidrogeles de monómero ácido metacrililoiloxi-*o*-benzoico y diclofenaco *in situ* secos y cristalinos, cortados en forma de parche.

22. Comparativo de los espectros de infrarrojo de diclofenaco, del monómero MAOB y del hidrogel del monómero MAOB y diclofenaco *in situ*, con divisiones en sus señales características.
23. Viales utilizados para determinar porcentajes de hinchamiento y estudios de hidrólisis-liberación.
24. Gráfico comparativo del porcentaje de hinchamiento del hidrogel MAOB y diclofenaco *in situ* sometido a pH 1.2, 5.5 y 7.4. Se observa el aumento en su hinchamiento y, por estimulación, se libera fármaco al medio. Se dejó los viales en el oscilador por 10 días a 37 °C y 100 RPM.
25. Gráfico comparativo del porcentaje de hinchamiento del hidrogel MAOB y diclofenaco *in situ* sometido a pH 1.2, 5.5 y 7.4. Se observa un retardo en su hinchamiento debido a cambios en las condiciones ambientales. Se dejó los viales en una gaveta por 10 días a 25 °C sin movimiento.
26. Cromatograma de estándar dual a pH 7.4 con análisis en la longitud de onda 291 nm para analizar el área del pico de ácido salicílico.
27. Cromatograma de estándar dual a pH 7.4 con análisis en la longitud de onda 275 nm para analizar el área del pico de diclofenaco.
28. Cromatograma del hidrogel del monómero MAOB con diclofenaco *in situ* a pH 7.4, con análisis en la longitud de onda 291 nm para analizar esencialmente el área del pico de ácido salicílico.
29. Cromatograma de estándar dual a pH 7.4 con análisis en la longitud de onda 275 nm para analizar el área del pico de diclofenaco.
30. Cromatograma del hidrogel del monómero MAOB con diclofenaco *in situ* a pH 5.5, con análisis en la longitud de onda 291 nm para analizar esencialmente el área del pico de ácido salicílico.
31. Cromatograma del hidrogel del monómero MAOB con diclofenaco *in situ* a pH 5.5, con análisis en la longitud de onda 275 nm para analizar esencialmente el área del pico de diclofenaco.
32. Cromatograma del hidrogel del monómero MAOB con diclofenaco *in situ* a pH 1.2, con análisis en la longitud de onda 291 nm para analizar esencialmente el área del pico de ácido salicílico.
33. Cromatograma del hidrogel del monómero MAOB con diclofenaco *in situ* a pH 1.2, con análisis en la longitud de onda 275 nm para analizar esencialmente el área del pico de diclofenaco.

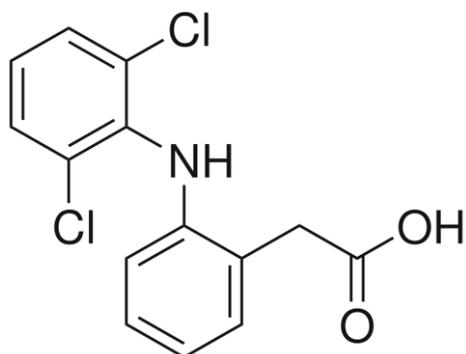
34. Viales en el oscilador.
35. Cuantificación de la liberación de ácido salicílico y diclofenaco a partir de los hidrogeles de monómero MAOB y diclofenaco *in situ* en un medio a pH 7.4, 37 °C y 100 RPM por 10 días.
36. Cuantificación de la liberación de ácido salicílico y diclofenaco a partir de los hidrogeles de monómero MAOB y diclofenaco *in situ* en un medio a pH 5.5, 37 °C y 100 RPM por 10 días.
37. Cuantificación de la liberación de ácido salicílico y diclofenaco a partir de los hidrogeles de monómero MAOB y diclofenaco *in situ* en un medio a pH 1.2, 37 °C y 100 RPM por 10 días.
38. Comparación entre tubo con medio BHI y bacteria inoculada a una turbidez en relación a la escala de McFarland a un tubo con solamente medio BHI.
39. Tubos de ensayo con medio BHI y bacteria inoculada a una turbidez en relación a la escala de McFarland e hidrogel insertado; tiempo 0. Los primeros 2 tubos corresponden a aquellos inoculados con *Escherichia coli* y los dos últimos son aquellos sembrados con *Staphylococcus aureus*.
40. Tubos de ensayo con medio BHI y bacteria inoculada a una turbidez en relación a la escala de McFarland e hidrogel insertado a las 24 horas, después de lecturas de absorbancia. Los primeros 2 tubos corresponden a aquellos inoculados con *Escherichia coli* y los dos últimos son aquellos sembrados con *Staphylococcus aureus*.
41. Cajas Petri con medio Mueller Hinton a las 24 horas de incubación. Caja Petri a) Control negativo, b) Control negativo con hidrogel, c) estándar de *Staphylococcus aureus*, d) estándar de *Escherichia coli*, e) muestra 1 (*Staphylococcus aureus* e hidrogel de monómero MAOB y diclofenaco *in situ*), f) muestra 2 (*Staphylococcus aureus* e hidrogel de monómero MAOB y diclofenaco *in situ*), g) muestra 1 (*Escherichia coli* e hidrogel de monómero MAOB y diclofenaco *in situ*) y h) muestra 2 (*Escherichia coli* e hidrogel de monómero MAOB y diclofenaco *in situ*).
42. Cajas Petri con medio Mueller Hinton a las 24 horas de incubación volteadas para comparar el crecimiento de las bacterias. Caja Petri a) Control negativo, b) Control negativo con hidrogel, c) estándar de *Staphylococcus aureus*, d) estándar de *Escherichia coli*, e) muestra 1 (*Staphylococcus aureus* e hidrogel de monómero MAOB y diclofenaco *in situ*), f) muestra 2 (*Staphylococcus aureus* e hidrogel de monómero MAOB y diclofenaco *in situ*), g) muestra 1 (*Escherichia coli* e hidrogel

de monómero MAOB y diclofenaco *in situ*) y h) muestra 2 (*Escherichia coli* e hidrogel de monómero MAOB y diclofenaco *in situ*).

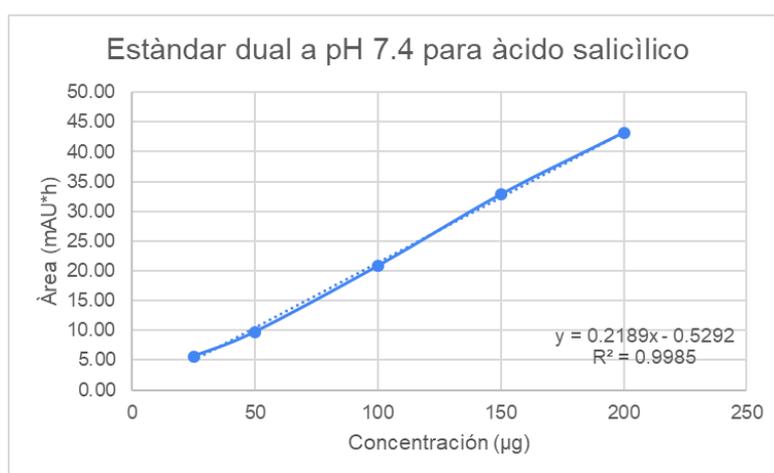
43. Cajas Petri con medio Mueller Hinton a las 24 horas de incubación volteadas. Caja Petri a) control negativo y b) muestra 1 (*Staphylococcus aureus* e hidrogel de monómero MAOB y diclofenaco *in situ*).

ANEXOS

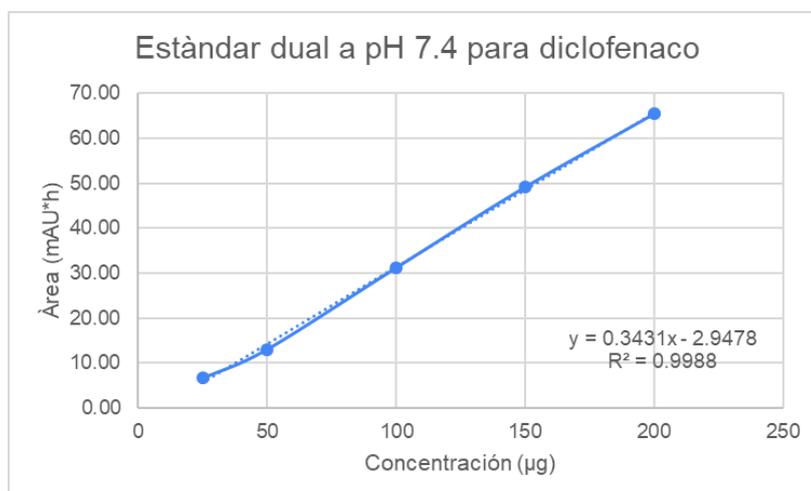
Estructura química del diclofenaco



Recta de calibración a pH 7.4 para ácido salicílico.



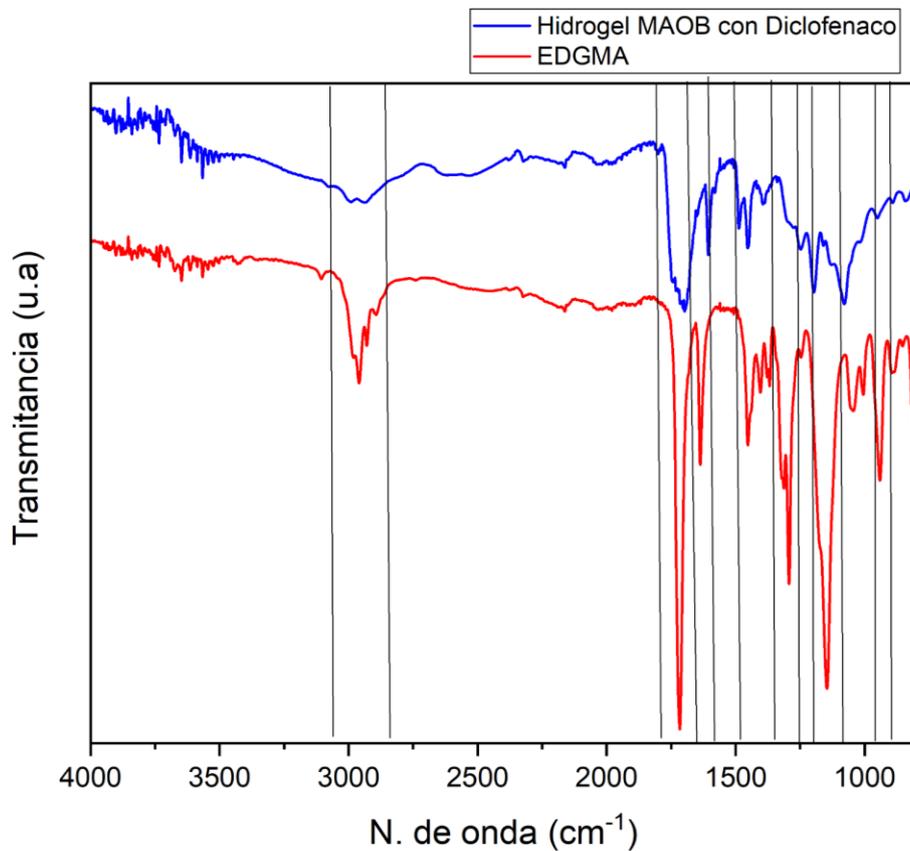
Recta de calibración a pH 7.4 para diclofenaco



Hidrogeles de monómero ácido metacrililoiloxi-*o*-benzoico y diclofenaco *in situ* hinchados con metanol, cortados en forma de parche



Comparativo entre los espectros de infrarrojo del hidrogel del monómero MAOB y diclofenaco *in situ* y su entrecruzante EGDMA, con divisiones en sus señales principales.



Área de picos obtenidos por los picos de cada cromatograma a distinto pH

Área de picos a pH 7.4

Área de picos a pH 7.4 para ácido salicílico.

Tiempo (h)	Área (mAU*h)
1	0.4405
3	1.2194
6	2.0784
8	3.0259
12	6.7067
24	13.5244
48	10.9513
72	17.0642
96	17.4245
144	18.0817
196	18.3586
240	18.7262

Área de picos a pH 7.4 para diclofenaco.

Tiempo (h)	Área (mAU*h)
1	0.5284
3	0.7029
6	1.0926
8	1.1503
12	2.5434
24	4.7331
48	3.9319
72	6.4258
96	6.2231

144	5.8223
196	5.4055
240	5.0818

Área de picos a pH 5.5

Área de picos a pH 5.5 para ácido salicílico.

Tiempo (h)	Área (mAU*h)
1	0.2321
3	0.3183
6	0.4043
8	0.6225
12	0.9104
24	1.1002
48	1.3638
72	1.7436
96	2.3516
144	2.6497
196	3.2681
240	5.1740

Área de picos a pH 5.5 para diclofenaco.

Tiempo (h)	Área (mAU*h)
1	0.0772
3	0.1183
6	0.1479
8	0.2052
12	0.1096
24	0.1881
48	0.2117

72	0.2311
96	0.1990
144	0.2016
196	0.1400
240	0.1661

Área de picos a pH 1.2

Área de picos a pH 1.2 para ácido salicílico.

Tiempo (h)	Área (mAU*h)
1	0.8151
3	0.8207
6	0.8402
8	0.8433
12	0.7885
24	0.9666
48	0.9345
72	0.9205
96	0.9847
144	1.0559
196	1.1335
240	1.1731

Área de picos a pH 1.2 para diclofenaco.

Tiempo (h)	Área (mAU*h)
1	0.1594
3	0.1570
6	0.1589
8	0.1608
12	0.1506

24	0.1358
48	0.1537
72	0.1446
96	0.1377
144	0.1356
196	0.1305
240	0.1270

Peso extraído acumulado obtenido de los cromatogramas de las liberaciones a distintos pH

A la liberación a pH 7.4 se encontró un peso extraído acumulado de ambos fármacos con una cinética prolongada.

INICIO a pH 7.4: tiempo (horas)	Peso (mg) extraído acumulado (Ácido salicílico)	Peso (mg) extraído acumulado (Diclofenaco)
1	0.00	0.00
3	0.06	0.00
6	0.14	0.00
8	0.24	0.00
12	0.59	0.00
24	1.24	0.10
48	1.37	0.10
72	1.68	0.21
96	1.79	0.21

144	1.93	0.20
196	2.03	0.18
240	2.15	0.17

A la liberación a pH 5.5 se encontró un peso extraído acumulado de ambos fármacos con una cinética reducida relacionada a una acidificación del pH.

INICIO a pH 5.5: tiempo (horas)	Peso (mg) extraído acumulado (Ácido salicílico)	Peso (mg) extraído acumulado (Diclofenaco)
1	0.00	0.00
3	0.00	0.00
6	0.00	0.00
8	0.01	0.00
12	0.04	0.00
24	0.05	0.00
48	0.08	0.00
72	0.12	0.00
96	0.18	0.00
144	0.22	0.00
196	0.28	0.00
240	0.47	0.00

A la liberación a pH 1.2 se encontró un peso extraído acumulado de ambos fármacos menor debido a un pH ácido.

INICIO a pH 5.5: tiempo (horas)	Peso (mg) extraído acumulado (Ácido salicílico)	Peso (mg) extraído acumulado (Diclofenaco)
1	0.03	0.00
3	0.03	0.00
6	0.03	0.00
8	0.03	0.00
12	0.03	0.00
24	0.05	0.00
48	0.05	0.00
72	0.05	0.00
96	0.05	0.00
144	0.06	0.00
196	0.07	0.00
240	0.08	0.00